

防己诺林碱阻断自噬抑制 H1N1 病毒感染的研究

谢芳^{1#}, 禹艳丽^{2#}, 王靳勇², 李琪琪², 孔令东², 张美琦¹, 成翠芹¹, 王遥^{1*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 探索防己诺林碱在细胞水平抗 H1N1 病毒的作用, 阐明防己诺林碱调控细胞自噬抑制 H1N1 病毒复制的分子机制。方法 CCK-8 法检测 0.312 5、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0、10.000 0、20.000 0、40.000 0、60.000 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的防己诺林碱对 MDCK 细胞活力的影响; MDCK 细胞设置对照组、模型组和防己诺林碱(2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组, 除对照组外, 以感染复数(MOI)为 0.1 的 H1N1 病毒感染 MDCK 细胞, 加入防己诺林碱共同孵育 12 h, 同时设置防己诺林碱(10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与病毒共同孵育 4、8 h 组, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, 检测 *H1N1* mRNA 表达) 和 Western blotting [H1N1 病毒核蛋白(NP)] 检测防己诺林碱对病毒复制的抑制作用; PI/Hoechst 33342 染色检测防己诺林碱(10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 MDCK 细胞死亡的影响; qRT-PCR 法检测防己诺林碱检测防己诺林碱预处理、病毒感染早期药物处理、病毒感染晚期药物处理以及吸附和进入阶段给药对病毒复制的影响; MDCK 细胞转染 EGFP-LC3 或 EGFP-mCherry-LC3 双荧光质粒, 观察防己诺林碱对 EGFP-LC3 的荧光强度、EGFP-mCherry-LC3 共定位的影响, 设置自噬诱导剂雷帕霉素(0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、自噬晚期抑制剂氯喹(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、巴佛洛霉素 A1(100 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$)对照。转染过 EGFP-LC3 质粒的 MDCK 细胞感染 H1N1 病毒, 免疫荧光检测防己诺林碱对 LC3 与胞内的病毒 NP 蛋白共定位的影响; 体外培养 A549 细胞, 以 MOI 为 0.1 的 H1N1 病毒感染, Western blotting 检测防己诺林碱对 LC3II/LC3I 蛋白表达的影响。结果 防己诺林碱对 MDCK 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 40.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与模型组比较, 防己诺林碱以浓度相关性的方式抑制 *H1N1* mRNA 表达, 以浓度和时间相关性的方式抑制 NP 蛋白表达($P<0.01$ 、 0.001); 显著减少 H1N1 诱导的细胞死亡($P<0.001$); 抑制 H1N1 病毒进入过程。与对照组比较, 防己诺林碱处理诱导 LC3 荧光聚集, 诱导 EGFP-LC3 和 mCherry-LC3 双荧光共定位显著增加($P<0.001$)。与模型组比较, 防己诺林碱处理明显减少 NP 的荧光数量($P<0.001$), 同时造成 LC3 荧光积累并与胞内的病毒 NP 蛋白共定位; 引起 LC3II 积累($P<0.01$ 、 0.001)。结论 防己诺林碱同氯喹和巴佛洛霉素 A1 一致, 阻断自噬途径, 使病毒粒子在自噬体内滞留, 破坏病毒生命周期。

关键词: 防己诺林碱; 甲型流感病毒; 自噬; 氯喹; 巴佛洛霉素 A1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 04-0711-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.005

Effect of fangchinoline against H1N1 infection by blocking autophagy

XIE Fang¹, YU Yanli², WANG Jinyong², LI Qiqi², KONG Lingdong², ZHANG Meiqi¹, CHENG Cuiqin¹, WANG Yao¹

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** To investigate the antiviral effect of fangchinoline against the H1N1 virus and elucidate its molecular mechanism in regulating cellular autophagy. **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of tetrandrine of 0.312 5, 0.625 0, 1.250 0, 2.500 0, 5.000 0 0, 10.000 0 0, 20.000 0, 40.000 0, and 60.000 0 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ on viability of MDCK cells. MDCK cells were divided into control group, model group, and tetrandrine (2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. Except for control group, MDCK cells were infected with H1N1 virus with a multiple infection index (MOI) of 0.1, and co-incubated with tetrandrine for 12 h. At the same

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 北京市科技新星计划(2023107); 中华中医药学会青年人才托举工程项目(CACM-2023-QNRC2-A02); 国家自然科学基金资助项目(82001663)

#共同第一作者: 谢芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为抗病毒免疫药理。E-mail: fangxie19990402@163.com

禹艳丽, 女, 硕士研究生, 研究方向为抗病毒免疫药理。E-mail: yuyanli0222@163.com

*通信作者: 王遥, 教授, 研究方向为中药免疫药理。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

time, tetrandrine ($10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was set up incubated with the virus for 4 and 8 h, and detected the inhibitory effect of tetrandrine on virus replication through real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR, detecting H1N1 mRNA expression) and Western blotting [H1N1 virus nucleoprotein (NP)]. PI/Hoechst 33342 staining was used for detection of tetrandrine on MDCK cell death. QRT-PCR method was used to detect the effects of pre-treatment with tetrandrine, early drug treatment for viral infection, late drug treatment for viral infection, as well as adsorption and entry stage administration on virus replication. MDCK cells were transfected with EGFP-LC3 or EGFP-mCherry-LC3 dual fluorescent plasmids to observe the fluorescence intensity of EGFP-LC3 and EGFP-mCherry-LC3 co-localization. MDCK cells transfected with EGFP-LC3 plasmid were infected with H1N1 virus, and immunofluorescence was used to detect the effect of tetrandrine on LC3 and co-localization with intracellular viral NP protein. A549 cells were cultured *in vitro* and infected with H1N1 virus with a MOI of 0.1. Western blotting was performed to detect the effect of tetrandrine on expression of LC3II/LC3I protein. **Results** The half inhibitory concentration (IC_{50}) of tetrandrine on MDCK cells is $40.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with model group, tetrandrine inhibited H1N1 mRNA expression in a concentration dependent manner and NP protein expression in a concentration and time dependent manner ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced H1N1 induced cell death ($P < 0.001$), and inhibited the entry process of H1N1 virus. Compared with control group, treatment with tetrandrine induced LC3 fluorescence aggregation and significantly increased co-localization of EGFP-LC3 and mCherry-LC3 dual fluorescence ($P < 0.001$). Compared with model group, treatment with tetrandrine significantly reduced the fluorescence quantity of NP ($P < 0.001$), while causing the accumulation of LC3 fluorescence and co-localization with intracellular viral NP proteins, causing accumulation of LC3II ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Fangchinoline is consistent with bafilomycin A1, blocking the autophagy pathway, causing viral particles to remain in the autophagy, and destroying the life cycle of the virus.

Key words: fangchinoline; influenza A virus subtype H1N1; autophagy; chloroquine; bafilomycin A1

自噬是一种广泛存在于真核生物中高度保守的降解途径,在维持细胞存活、物质再利用以及内环境稳态中发挥至关重要的作用。当细胞受到压力刺激(如饥饿、缺氧、病原体感染等)时,可活化自噬相关信号通路,自噬体包裹需降解的物质与溶酶体融合降解^[1-3]。研究表明,自噬在流感病毒复制和致病机制中发挥重要作用,流感病毒能够调控并利用宿主自噬,且以病毒特异性方式促进自我复制^[4-7]。此外,自噬的抑制剂干扰自噬过程可有效降低细胞内的病毒感染。如自噬早期抑制剂3-MA在体外和体内显著抑制H9N2病毒复制并减轻病毒引发的炎症反应^[8];丁香酚通过抑制Beclin1-Bcl2异二聚体的解离抑制自噬,降低流感病毒在细胞内的病毒滴度^[9];巴佛洛霉素A1、ABMA及其优化类似物DABMA可抑制晚期自噬体-溶酶体融合阻断自噬通量,并抑制H1N1流感病毒复制^[10-11]。因此,抑制自噬的发生和发展可作为抗病毒药物筛选的重要生物学靶点。

防己诺林碱又称汉防己乙素,是由防己分离得到的主要双苄基异喹啉类生物碱^[12]。现代药理学研究表明,防己诺林碱具有抗肿瘤、抗炎、抗骨质疏松等药理作用^[13-17]。然而,目前对其抗病毒的功能与机制研究较少,从一定程度上限制了防己诺林碱药用价值的发掘与提升。本研究通过建立H1N1病毒感染的细胞模型,以细胞内病毒载量为主要评价指标,研究防己诺林碱对H1N1病毒的抑制作用和

对病毒诱导细胞死亡的影响。基于细胞自噬在流感病毒感染过程中的作用,初步阐明防己诺林碱通过阻断自噬抑制H1N1病毒在细胞内的复制,为防己诺林碱抗病毒感染研究提供参考。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

防己诺林碱($\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$,质量分数98.5%,货号PU0822-0025)购于成都普思生物科技有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)配制成 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药液,储存于 4°C 备用;氯喹(质量分数99.98%,货号54-05-7)和巴佛洛霉素A1(质量分数98.88%,货号88899-55-2)购买于陶术生物科技有限公司;转染试剂聚乙烯亚胺(PEI,货号BMS1003-A)和Trizol Reagent(货号15596018)购于Invitrogen公司;碘化丙啶(PI,货号11348639001)购买于Sigma公司;Evo M-MLV RT Kit(货号AG11711)和SYBR®Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit(货号AG11701)购于湖南艾科瑞生物工程有限公司;DMEM高糖培养基(货号C11995500CP)、青霉素-链霉素(货号15140-122)和胎牛血清(FBS,货号2358184P)购于Gibco公司;CCK-8细胞增殖/毒性检测试剂盒(货号CK04)购于东仁化学科技(上海)有限公司;H1N1病毒核蛋白(NP)(货号ab104870)、重组Anti-LC3B抗体(货号ab192890)和羊抗兔IgG H&L (Alexa Fluor® 594)(货号ab150080)购于Abcam公司;超敏ELC发光液(货号WBKLS0500)

购于美国 Millipore 公司;羊抗兔 IgG HRP(货号 M21002)购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司。

1.2 细胞、质粒和病毒

犬肾上皮细胞(MDCK)和人非小细胞肺癌细胞(A549)来源于美国典型培养物保藏中心(ATCC),细胞在含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 的培养基中 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。EGFP-LC3 质粒和 EGFP-mCherry-LC3 质粒由本实验室提供。甲型流感病毒(H1N1, PR8 株)来自本实验室,病毒扩增后置于一80 °C 保存。

1.3 实验仪器

Epoch 全波长酶标仪(美国 Bio Tek 公司);T100 型 PCR 仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪、Power Pac 型基础电泳仪(美国 Bio-rad 公司);Tanon 5200 系列全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命科学有限公司);SK-L180- Pro 数控线性摇床(大龙兴创实验仪器股份公司);1300 Series A2 型生物安全柜和 Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);激光扫描共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8检测细胞活力

MDCK 细胞以每孔 4×10^4 个的密度接种于 96 孔板,培养过夜使细胞完全贴壁;用 DMEM 完全培养基稀释防己诺林碱母液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)至相应浓度,配制不同浓度(0.03125、0.625 0、1.250 0、2.500 0、5.000 0、10.000 0、20.000 0、40.000 0、60.000 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的防己诺林碱孵育 MDCK 细胞,并设置空白孔、对照孔和 DMSO 孔(空白孔:仅加 DMEM,不含细胞,含 CCK-8;对照孔:含细胞及 CCK-8;DMSO 孔:含细胞、DMSO 及 CCK-8),每组设 3 个复孔,于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,轻轻振摇培养板;将培养板放置在细胞培养箱内孵育 30 min,用酶标仪测定 450 nm

处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 Western blotting 检测 H1N1 病毒 NP 和 LC3B 蛋白表达的水平

12 孔板中以每孔 2.5×10^5 个密度接种 MDCK 细胞,过夜培养后设置对照组、模型组和防己诺林碱(2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,除对照组外,以 MOI 为 0.1 的 H1N1 病毒感染 MDCK 细胞,同时加入不同浓度的防己诺林碱共同孵育 12 h。同时设置防己诺林碱(10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与病毒共同孵育 4、8 h 组。12 孔板中以每孔 2.5×10^5 个密度接种 A549 细胞,过夜培养后以 MOI 为 0.1 的 H1N1 病毒感染 A549 细胞,同时加入防己诺林碱(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、氯喹(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或巴佛洛霉素 A1(100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)共处理细胞 12 h。收集细胞,加 IP 裂解液冰上充分裂解细胞 30 min,4 °C 离心取上清,BCA 法测定蛋白浓度,加入 $5 \times \text{Loading Buffer}$ 100 °C 金属浴 10 min 使蛋白变性。制备聚丙烯酰胺凝胶,上样后进行 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜后 5% BSA 封闭 1 h,于 4 °C 过夜孵育一抗 NP 蛋白(1:5 000)或重组 Anti-LC3B 抗体(1:5 000),然后室温孵育羊抗兔二抗(1:5 000)1 h,加入 ECL 化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影,观察蛋白条带变化。

2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测病毒复制

MDCK 细胞以每孔 1.5×10^5 个密度接种到 24 孔板中,过夜培养。H1N1 以 MOI 为 0.1 感染 MDCK 细胞 12 h,同时用不同浓度的防己诺林碱(2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理。药物处理 12 h 后,收集细胞,Trizol 法提取总 RNA。使用 Evo M-MLV RT 试剂盒和 gDNA Clean for qRT-PCR 试剂盒合成 cDNA,使用 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qRT-PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 实验。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 H1N1 基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table1 Primer sequence

基因	序列(5'→3')	序列(3'→5')
canine- $\beta\text{-actin}$	F-CGGCATCGTCACCAACTGG	R-AGGCGTACAGGGACAGCACAG
H1N1-HA	F-CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA	R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT

MDCK 细胞以每孔 1.5×10^5 个密度接种到 24 孔板中,过夜培养,H1N1 以 MOI 为 0.1 感染 MDCK 细胞 12 h,同时用巴佛洛霉素 A1(100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、防己诺林碱(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、氯喹(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、防己诺林碱(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 巴佛洛霉素 A1(100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、防

己诺林碱(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 氯喹(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 12 h。qRT-PCR 法检测 H1N1 mRNA 表达。

2.4 PI/Hoechst 33342 染色检测细胞死亡

MDCK 细胞以每孔 1.5×10^5 个密度接种于 24 孔板,过夜培养。H1N1 以 MOI 为 1 感染 MDCK 细

胞,加入防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共孵育24 h后, PBS洗3遍,以 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PI和 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的Hoechst 33342室温下避光染色10 min, PBS洗3遍,每孔加入200 μL 4%多聚甲醛固定,使用荧光显微镜检测PI阳性细胞,随机取5个视野进行量化。

2.5 防己诺林碱不同给药方式对H1N1病毒复制周期的影响

MDCK细胞以每孔 1.5×10^5 个的密度接种于24孔板培养过夜后,采用不同方式给药:防己诺林碱预处理、病毒感染早期药物处理与病毒感染晚期药物处理,并进一步在吸附和进入阶段给药。通过qRT-PCR检测防己诺林碱在MDCK细胞中对H1N1病毒复制的影响。实验设置对照组、模型组和防己诺林碱处理组。防己诺林碱预处理:防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)加药预处理MDCK细胞5 h,弃上清液,加入H1N1(MOI=0.1)4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附1.5 h, PBS洗掉未吸附的病毒,换液培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养8 h后收集细胞,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA。病毒感染早期药物处理:H1N1(MOI=0.1)吸附1.5 h, PBS洗3遍,防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育4 h,更换不含药物的培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养4 h后收集细胞,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA。病毒感染晚期药物处理:H1N1(MOI=0.1)4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附1.5 h, PBS洗3遍,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 h后,加防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)继续培养4 h后收集细胞,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA。病毒吸附过程药物处理:H1N1(MOI=0.1)于4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附1.5 h同时加入防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育, PBS清洗细胞3次,洗掉未吸附的病毒粒子,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA。病毒进入过程药物处理:H1N1(MOI=0.1)于4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附1.5 h, PBS清洗细胞3次,洗掉未吸附的病毒粒子,37 $^{\circ}\text{C}$ 进入2 h同时加入防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理,胰酶消化1 min洗掉未进入的病毒粒子,终止消化收样,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA。

2.6 质粒转染观察防己诺林碱对LC3以及自噬后期的影响

MDCK细胞以每孔 1.2×10^5 个的密度接种于共聚焦小皿,过夜培养。待细胞生长至80%,转染EGFP-LC3或EGFP-mCherry-LC3双荧光质粒(2 000 ng),PEI质量浓度为 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,转染6 h后换液,加入防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、雷帕霉素($0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、氯喹($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或巴佛洛霉素A1($100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理细胞12 h。观察EGFP-

LC3的荧光强度、EGFP-mCherry-LC3共定位。

2.7 免疫荧光检测LC3水平及与胞内的病毒NP蛋白共定位

转染过EGFP-LC3质粒的MDCK细胞感染H1N1(MOI=1),并与巴佛洛霉素A1($100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、防己诺林碱($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、氯喹($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共同处理12 h。吸弃上清,4%多聚甲醛固定细胞30 min, PBS洗3遍,0.5% Triton X-100破膜渗透15 min, PBS洗3遍,5% BSA室温封闭1 h,一抗NP(1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,再用羊抗兔IgG H&L (Alexa Fluor® 594)荧光二抗(1:500)室温染色1 h。Hoechst 33342(1:500)室温避光染色20 min以用于显示细胞核的形状和位置。使用Olympus FV1000共焦显微镜成像。

2.8 数据处理

数据用GraphPad Prism进行可视化处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组样本间通过双尾非配对 t 检验进行比较,多组样本间通过单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 防己诺林碱对MDCK细胞相对存活率的影响

为了确定防己诺林碱的细胞毒性,将不同浓度的防己诺林碱处理MDCK细胞24 h后,通过CCK8法检测细胞存活情况,防己诺林碱的细胞毒性如图1所示,计算得到半数抑制浓度(IC_{50})为 $40.19\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。后续实验选取无明显细胞毒性的低、中、高浓度(2.5 、 5.0 、 $10.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行。

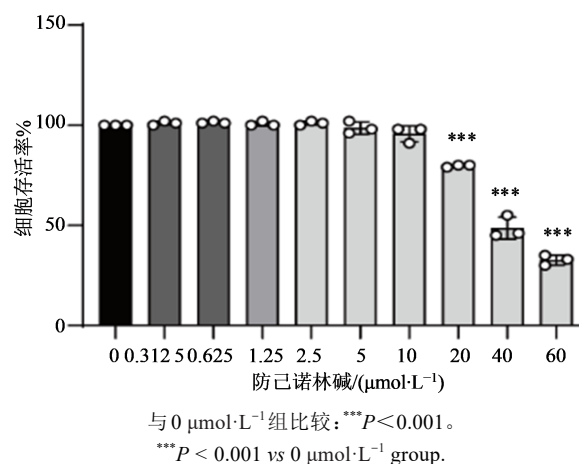


图1 防己诺林碱对MDCK细胞的存活率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of fangchinoline on viability of MDCK cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 防己诺林碱抑制H1N1病毒复制

利用H1N1感染MDCK细胞,同时用不同浓度的防己诺林碱处理12 h,qRT-PCR检测H1N1病毒的mRNA,结果见图2-A,与对照组比较,模型组病

毒基因的拷贝数显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,防己诺林碱以浓度相关方式抑制H1N1复制($P < 0.001$)。此外,通过Western blotting实验检测防己诺林碱在蛋白水平对H1N1病毒的影响,结果见图2-B、C,与对照组比较,模型组NP蛋白表达显著升高($P < 0.01$ 、 0.001);与模型组比较,防己诺林碱以浓度相关性和时间相关性抑制NP蛋白表达($P < 0.01$ 、 0.001)。

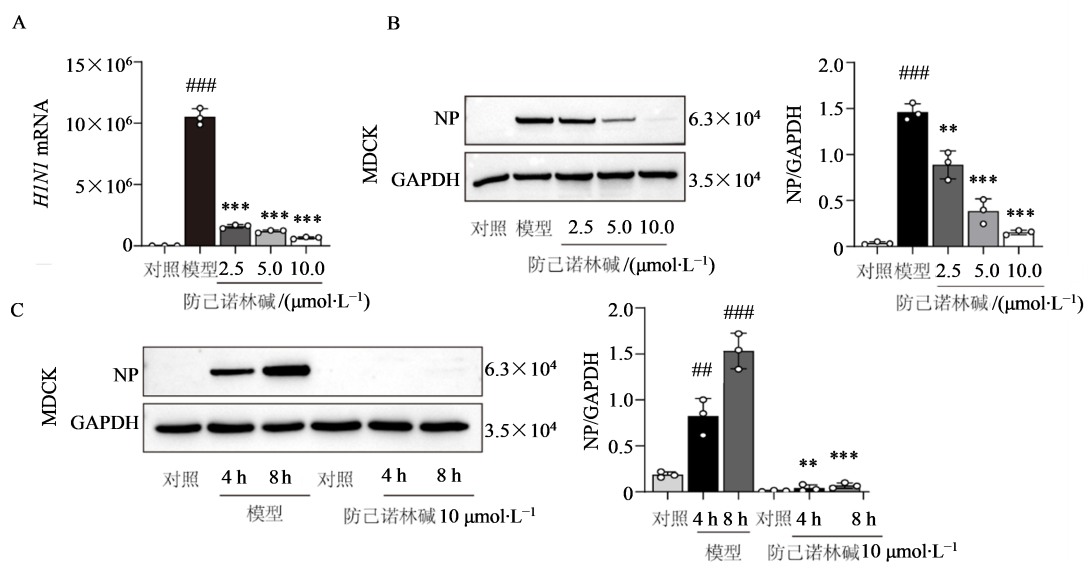
3.3 防己诺林碱对病毒诱导的细胞死亡的影响

结果见图3,与对照组比较,H1N1感染MDCK

细胞后,PI阳性率增加,表明细胞死亡增多($P < 0.001$);加入防己诺林碱处理后,H1N1诱导的细胞死亡显著减少($P < 0.001$)。结果表明,防己诺林碱能减少H1N1病毒诱导的MDCK细胞死亡。

3.4 防己诺林碱抑制H1N1病毒进入过程

如图4,与模型组相比,防己诺林碱预处理和早期阶段药物处理可显著抑制病毒复制($P < 0.001$);病毒进入阶段给予防己诺林碱可显著抑制病毒复制($P < 0.001$),病毒吸附阶段给予没有显著影响。结果表明,防己诺林碱通过抑制H1N1的进入阶段发挥抗病毒功能。

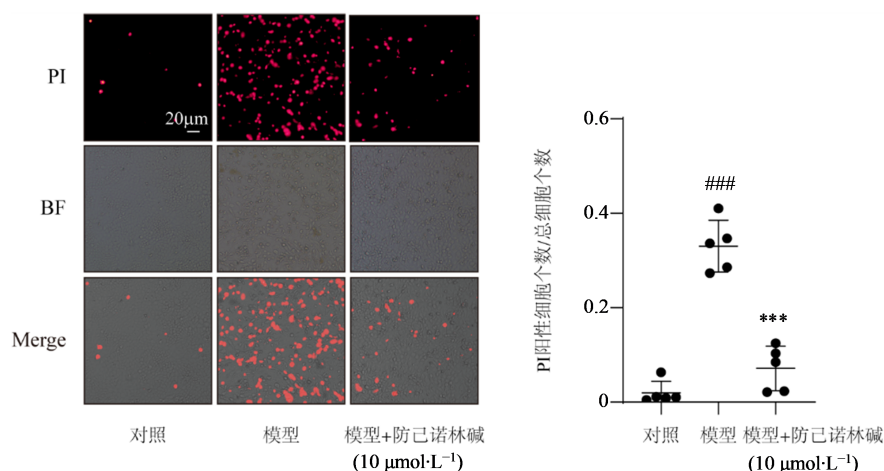


与对照组比较:### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图2 防己诺林碱对H1N1病毒感染RNA水平(A)和H1N1-NP蛋白表达(B,C)的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Inhibition of fangchinoline on level of RNA (A) and H1N1-NP protein expression (B, C) in H1N1-infected cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:*** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图3 PI染色检测防己诺林碱对H1N1诱导MDCK细胞死亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Effect of fangchinoline on H1N1 induced cell death of MDCK detected by PI staining ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

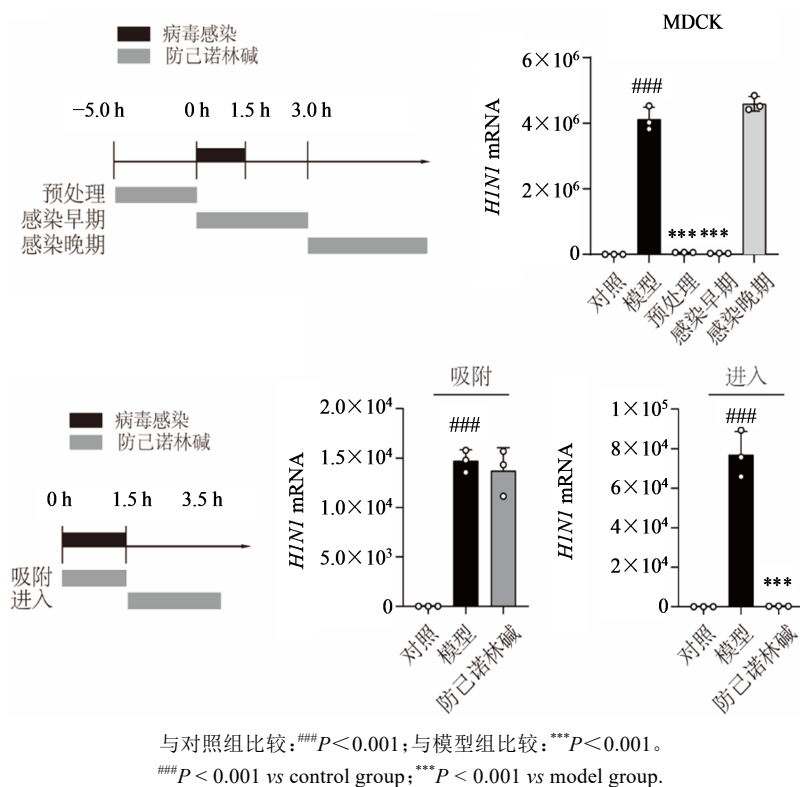


图4 防己诺林碱不同加药方式对MDCK细胞内H1N1 mRNA表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of different dosing modes of fangchinoline on expression of H1N1 mRNA in MDCK cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

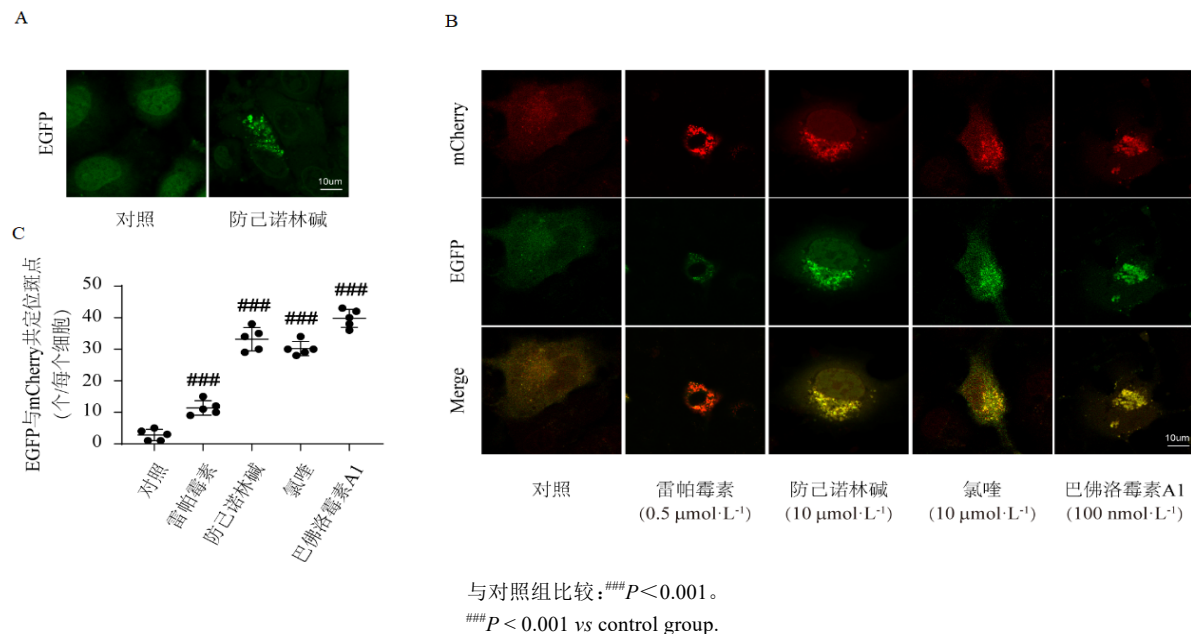
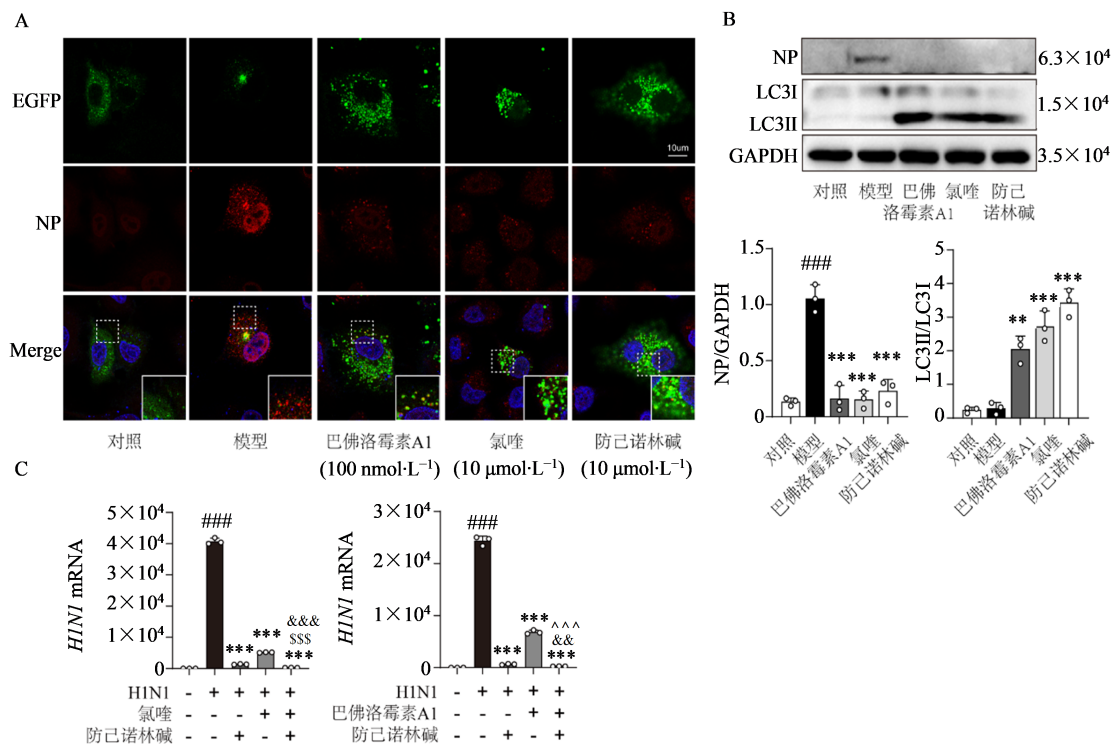
3.5 防己诺林碱触发自噬体的积累并抑制自噬后期

已有研究报道,防己诺林碱通过调控自噬过程发挥抗炎抗肿瘤的功能^[18-19]。为了确定防己诺林碱是否会影响MDCK细胞中的自噬过程,用EGFP-LC3瞬时转染MDCK细胞,并检测LC3的荧光强度。如图5-A所示,对照组的绿色荧光呈现弥散的均匀分布;而防己诺林碱($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理24 h后,MDCK细胞中观察到绿色荧光点状聚集,LC3蛋白募集积聚,表明防己诺林碱造成自噬体的累积。为了进一步探究防己诺林碱调控自噬的机制,用自噬诱导剂雷帕霉素($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、自噬晚期抑制剂氯喹($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、巴佛洛霉素A1($100 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和防己诺林碱($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理转染串联报告质粒(mCherry-EGFP-LC3)的MDCK细胞,然后评估EGFP-LC3和mCherry-LC3荧光斑点的共定位。如图5-B,自噬诱导剂雷帕霉素处理的细胞呈现为红色的荧光斑点;而防己诺林碱处理与自噬晚期抑制剂氯喹和巴佛洛霉素A1处理有相似的作用模式,引起绿色和红色荧光LC3点状的显著形成,共定位呈现为黄色荧光。相比于对照组,防己诺林碱处理双荧光共定位显著增加($P < 0.001$)(图5-C)。结果表明,防己诺林碱抑制自噬的晚期,导致自噬体的

显著积累。

3.6 防己诺林碱通过阻断自噬抑制H1N1病毒感染

先前研究表明,自噬参与流感病毒感染过程^[8]。为了探究防己诺林碱抑制H1N1病毒感染的药理作用是否跟抑制自噬相关联,用H1N1感染转染EGFP-LC3质粒的MDCK细胞,同时分别加入防己诺林碱、氯喹和巴佛洛霉素A1处理,通过免疫荧光和qRT-PCR探究抗病毒效果。如图6-A,与对照组比,H1N1感染MDCK细胞后,NP荧光显著增加($P < 0.001$)。防己诺林碱处理明显减少了NP的荧光数量($P < 0.001$),同时造成LC3荧光积累并与胞内的病毒NP蛋白共定位,表明防己诺林碱同氯喹和巴佛洛霉素A1一致,阻断自噬途径,使病毒粒子在自噬体内滞留,破坏病毒生命周期。qRT-PCR结果再次表明(图6-C),在MDCK细胞中,与模型组比较,防己诺林碱与氯喹、巴佛洛霉素A1均有效抑制H1N1病毒感染,并且联用抗病毒效果增强($P < 0.01, 0.001$)。Western blotting实验结果显示(图6-B),与模型组比较,防己诺林碱同氯喹和巴佛洛霉素A1一致,在抑制H1N1病毒复制的同时,引起LC3II积累($P < 0.01, 0.001$)。结果表明,防己诺林碱通过阻断自噬过程抑制H1N1病毒在胞内的

图 5 免疫荧光观察防己诺林碱对 LC3(A) 以及自噬后期(B、C)的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 5 Effects of fangchinoline on LC3 (A) and late autophagy (B, C) observed by immunofluorescence($\bar{x} \pm s, n=5$)图 6 防己诺林碱、氯喹及巴佛洛霉素 A1 在 MDCK 细胞(A、C)和 A549 细胞(B)中对 H1N1 病毒复制的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 Inhibition of H1N1 virus replication in MDCK (A, C) and A549 (B) cells by fangchinoline, chloroquine and bafilomycin A1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

感染。

4 讨论

防己系防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra*

S.Moore 的干燥根, 味苦, 性寒, 功效为祛风止痛、利水消肿, 主要用于风湿痹痛, 水肿脚气, 小便不利, 湿疹疮毒。防己诺林碱是防己的主要生物碱成分,

药典规定防己含粉防己碱($C_{38}H_{42}N_2O_6$)和防己诺林碱($C_{37}H_{40}N_2O_6$)的总量不得少于1.6%。现代药理研究表明,防己诺林碱在肿瘤治疗、心血管疾病、抗炎等多方面具有良好的药效活性^[14-16]。此外,防己中的双苄基异喹啉类生物碱(BBAs),包括千金藤素、汉防己甲素、小檗胺和防己诺林碱等被报道具有良好的抗病毒活性。然而,作为防己主要质量标志物的防己诺林碱,其抵抗病毒的分子机制仍有待进一步阐明。因此,基于化学结构的相似性,从自噬角度探讨防己诺林碱的抗病毒功能对探究双苄基异喹啉类生物碱的抗病毒作用机制有一定的启示作用。

防己诺林碱在多种病毒感染模型中具有显著的抗病毒功能。如防己诺林碱在人冠状病毒OC43(HCoV-OC43)感染早期具有良好的抗病毒活性^[20];可通过阻断病毒进入来抑制SARS冠状病毒(SARS-CoV)、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)和中东呼吸系统综合征冠状病毒(MERS-CoV)的体外复制^[21];以及通过干扰gp160蛋白水解加工来抑制HIV病毒的复制^[22]。然而,目前防己诺林碱抗流感病毒的作用与机制仍有待探究。本研究发现,防己诺林碱显著抑制H1N1病毒在体外的复制,并有效抑制病毒诱导的细胞死亡,证明防己诺林碱的抗H1N1病毒感染的作用;通过在H1N1病毒感染的不同阶段加入防己诺林碱药物处理表明,防己诺林碱药物预处理与病毒感染早期药物处理的抗病毒效果最优,并显示出其主要抑制H1N1病毒进入细胞过程。

自噬参与病毒感染细胞的过程,并对病毒维持的自身生活周期具有重要意义^[23-24]。研究表明,流感病毒感染的细胞中存在大量的自噬体,表现为自噬体积聚和LC3II表达水平升高,抑制自噬过程可有效抑制病毒复制^[25-26]。自噬晚期抑制剂巴佛洛霉素A1可以抑制核内体和溶酶体的酸化,抑制自噬后期;在病毒感染的情况下,病毒粒子积聚在自噬体内,阻滞病毒的感染进程^[10]。本研究通过荧光报告系统,证明防己诺林碱通过阻断自噬体-溶酶体融合,抑制自噬后期。通过免疫荧光实验发现,在H1N1病毒感染后防己诺林碱与自噬晚期抑制剂巴佛洛霉素A1和氯喹的抗病毒作用方式相似,即有效抑制病毒复制的同时诱导自噬体大量积累,并阻止病毒粒子由晚期内体向细胞质的释放。此外,本研究表明防己诺林碱与自噬晚期抑制剂巴佛洛霉素A1和氯喹联用显示出显著的促进自噬抑制剂的

抗H1N1病毒功能。

本研究发现防己诺林碱在体外通过抑制细胞自噬、阻断病毒的胞内释放发挥良好的抗H1N1病毒作用。为防己诺林碱及双苄基异喹啉类生物碱的抗病毒研究提供了全新的分子机制,为相关化合物的抗病毒药物研发提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. *Immunity*, 2021, 54(3): 437-453.
- [2] Kim K H, Lee M S. Autophagy: A key player in cellular and body metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-337.
- [3] Wang L M, Klionsky D J, Shen H M. The emerging mechanisms and functions of microautophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3): 186-203.
- [4] Wang R F, Zhu Y X, Zhao J C, et al. Autophagy promotes replication of influenza A virus *in vitro* [J]. *J Virol*, 2019, 93(4): e01984-e01918.
- [5] Choi Y, Bowman J W, Jung J U. Autophagy during viral infection—a double-edged sword [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 341-354.
- [6] A型流感病毒2009年大流行株NS1蛋白通过诱导宿主细胞自噬促进病毒复制 [J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(2): 220.
The NS1 protein of the 2009 pandemic strain of influenza A virus promotes viral replication by inducing host cell autophagy [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2023, 45(2): 220.
- [7] Ma J H, Sun Q, Mi R F, et al. Avian influenza A virus H5N1 causes autophagy-mediated cell death through suppression of mTOR signaling [J]. *J Genet Genom*, 2011, 38(11): 533-537.
- [8] Zhang R H, Zhang H L, Li P Y, et al. Autophagy is involved in the acute lung injury induced by H9N2 influenza virus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105737.
- [9] Dai J P, Zhao X F, Zeng J, et al. Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61026.
- [10] Yeganeh B, Ghavami S, Kroeker A L, et al. Suppression of influenza A virus replication in human lung epithelial cells by noncytotoxic concentrations bafilomycin A1 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(3): L270-L286.
- [11] Liu H T, Jiang C L, Wu Y, et al. Antiviral effects of

- ABMA and DABMA against influenza virus *in vitro* and *in vivo* via regulating the endolysosomal pathway and autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3940.
- [12] 马悦, 李凯, 崔娜, 等. RP-HPLC法同时测定防己中3种生物碱类成分的含量 [J]. *化学工程师*, 2019, 33(2): 24-26, 12.
- Ma Y, Li K, Cui N, et al. Simultaneous determination of 3 alkaloids in *Stephaniae tetrandrae radix* by RP-HPLC [J]. *Chem Eng*, 2019, 33(2): 24-26, 12.
- [13] 张升波, 刘伟, 张晨. 汉防己乙素通过调节NF- κ B信号通路对胃癌前病变大鼠的作用研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(16): 1685-1689.
- Zhang S B, Liu W, Zhang C. Effect of Tetrandrine on gastric precancerous lesion in rats by regulating NF- κ B signal pathway [J]. *J Clin Exp Med*, 2021, 20(16): 1685-1689.
- [14] 李昌, 王爱玲, 肖跃红, 等. 汉防己乙素抑制P38 MAPK和ERK1/2的磷酸化缓解心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡和线粒体氧化损伤 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(5): 336-342.
- Li C, Wang A L, Xiao Y H, et al. Fangchinoline inhibits P38 MAPK and ERK1/2 phosphorylation and mitigates myocardial cell apoptosis and mitochondrial oxidative damage in myocardial ischemia/reperfusion rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2020, 34(5): 336-342.
- [15] 于有江, 罗雪, 叶记林, 等. 汉防己乙素对人肺癌95D细胞凋亡的诱导作用及机制 [J]. *山东医药*, 2017, 57(38): 5-7.
- Yu Y J, Luo X, Ye J L, et al. Effect of fangchinoline on proliferation of human lung cancer 95D cells [J]. *Shandong Med J*, 2017, 57(38): 5-7.
- [16] Villa T, Kim M, Oh S. Fangchinoline has an anti-arthritis effect in two animal models and in IL-1 β -stimulated human FLS cells [J]. *Biomol Ther*, 2020, 28(5): 414-422.
- [17] 陈静梅, 郝二伟, 杜正彩, 等. 基于化学成分、药理作用和网络药理学的余甘子质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1570-1586.
- Chen J M, Hao E W, Du Z C, et al. Predictive analysis on quality marker of *Phyllanthus emblica* based on chemical composition, pharmacological effects and network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(5): 1570-1586.
- [18] Zhu W J, Ding W G, Shang X J, et al. Fangchinoline promotes autophagy and inhibits apoptosis in osteoporotic rats [J]. *Med Sci Monit*, 2022, 28: e938703.
- [19] Xiang X C, Tian Y H, Hu J N, et al. Fangchinoline exerts anticancer effects on colorectal cancer by inducing autophagy via regulation AMPK/mTOR/ULK1 pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 186: 114475.
- [20] Kim D E, Min J S, Jang M S, et al. Natural bis-benzylisoquinoline alkaloids-tetrandrine, fangchinoline, and cepharanthine, inhibit human coronavirus OC43 infection of MRC-5 human lung cells [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 696.
- [21] Sadhu S, Dandotiya J, Dalal R, et al. Fangchinoline inhibits SARS-CoV-2 and MERS-CoV entry [J]. *Antiviral Res*, 2023, 220: 105743.
- [22] Wan Z T, Lu Y M, Liao Q J, et al. Fangchinoline inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by interfering with gp160 proteolytic processing [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39225.
- [23] Zhou Z, Jiang X J, Liu D, et al. Autophagy is involved in influenza A virus replication [J]. *Autophagy*, 2009, 5(3): 321-328.
- [24] Zhang R H, Zhang H L, Li P Y, et al. Autophagy is involved in the replication of H9N2 influenza virus via the regulation of oxidative stress in alveolar epithelial cells [J]. *Virology*, 2021, 18(1): 22.
- [25] 李春红, 王丽, 董玉龙, 等. H9N2流感病毒诱导MDCK细胞自噬对病毒复制的影响 [J]. *中国饲料*, 2022(17): 12-16, 23.
- Li C H, Wang L, Dong Y L, et al. The effects of autophagy induced by H9N2 influenza virus on virus replication in MDCK cells [J]. *China Feed*, 2022(17): 12-16, 23.
- [26] Beale R, Wise H, Stuart A, et al. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(2): 239-247.

[责任编辑 兰新新]