

千金藤素抗病毒作用的免疫学机制研究

王靳勇^{1#}, 何昱廷^{1#}, 谢芳², 成翠芹², 张美琦², 初英杰², 罗政¹, 李俊良², 徐安龙^{2*}, 王遥^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

摘要: 目的 探索千金藤素体内外的抗病毒作用, 并基于抗病毒天然免疫通路探究其抗病毒作用的分子机制。方法 CCK-8法检测千金藤素(0.062 5~64.000 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对A549细胞活力的影响; 利用表达绿色荧光蛋白的水疱性口炎病毒(VSV-GFP)感染A549细胞模型, 结合流式细胞术检测千金藤素对病毒复制的影响并探究预处理、吸附过程及吸附后加药对VSV-GFP病毒复制的影响; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测千金藤素对甲型流感病毒(H1N1)、脑心肌炎病毒(EMCV)和单纯疱疹病毒I型(HSV-1)复制的影响; 构建VSV感染小鼠模型探究千金藤素的体内抗病毒作用; A549细胞中利用生物信息学方法探究其抗病毒机制; qRT-PCR检测药物处理A549和原代胚胎成纤维细胞(MEF)后 $IFNB1$ 及干扰素刺激基因(ISGs)表达变化; 免疫印迹法(Immunoblotting)检测人源单核细胞白血病细胞(THP-1)中TBK1和STAT1的磷酸化水平。结果 与模型组相比, 千金藤素在A549细胞中显著抑制VSV、H1N1、EMCV和HSV-1复制; 千金藤素不影响VSV的吸附过程, 而预处理或吸附后给药可以显著抑制病毒复制; 千金藤素提高VSV感染小鼠的存活率; 千金藤素激活基于IFN-I通路的抗病毒天然免疫应答。结论 千金藤素通过激活基于IFN-I通路的抗病毒天然免疫发挥体内外抗病毒作用。

关键词: 千金藤素; 抗病毒天然免疫; I型干扰素通路; 干扰素刺激基因; 抗病毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1232-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.007

Immunological mechanism of antiviral effect of cepharanthine

WANG Jinyong¹, HE Yuting¹, XIE Fang², CHENG Cuiqin², ZHANG Meiqi², CHU Yingjie², LUO Zheng¹, LI Junliang², XU Anlong², WANG Yao²

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

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

Abstract: Objective To investigate the antiviral effects of cepharanthine (Cep) *in vivo* and *in vitro* and explore its immunological mechanism based on the innate antiviral immune pathway. **Methods** The viability of A549 cells was assessed using the CCK-8 assay to determine the impact of Cep (0.062 5—64.000 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Using a vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein (VSV-GFP) infected cell models, combined with flow cytometry to investigate the impact of Cep on virus replication. We also examined how pretreatment, the adsorption process, and post-adsorption treatment affect virus replication. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was employed to detect the replication of influenza A virus (H1N1), encephalomyocarditis virus (EMCV), and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) under the influence of Cep. The *in vivo* antiviral effects of Cep were investigated using the VSV infection mouse model. Bioinformatics analysis was conducted in A549 cells to explore the mechanism of the antiviral function of Cep. qPCR was used to detect changes in mRNA expression of $IFNB1$ and the interferon-stimulated genes (ISGs) in A549 and MEF cells with Cep treatment. Immunoblotting was performed to measure changes in the phosphorylation level of TBK1 and STAT1 in THP-1 cells. **Results** *In vitro* experiments showed that Cep significantly inhibited the replication of VSV, H1N1, EMCV, and HSV-1 viruses compared to the model group in A549 cells. Cep did not affect the adsorption process of VSV, but pre-treatment or post-adsorption administration effectively inhibited virus replication. Cep increased the survival rate of VSV-infected mice. Cep activates the innate antiviral immune response through the IFN-I pathway.

收稿日期: 2024-01-05

基金项目: 北京市科技新星计划课题(20230484342); 中华中医药学会青年人才托举工程项目A类资助项目(2023-QNRC2-A02)

*共同第一作者: 王靳勇, 男, 硕士研究生, 研究方向为抗病毒免疫药理。E-mail: wjy384537582@163.com

何昱廷, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: hyt0002411@163.com

*共同通信作者: 王遥, 教授, 研究方向为中医药免疫学。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

徐安龙, 教授, 研究方向为中医免疫学。E-mail: xuanlong@bucm.edu.cn

Conclusion This study demonstrates that Cep exhibits antiviral effects both *in vivo* and *in vitro* by activating the innate antiviral immune response through the IFN-I pathway.

Key words: cepharanthine; antiviral innate immunity; interferon; interferon-stimulated genes; virus

千金藤是防己科千金藤属植物千金藤 *Stephania japonica* (Thunb.) Miers 的干燥根,始载于《本草拾遗》^[1],含多种生物碱成分,为中国民间常用草药,性苦、辛、寒,具有清热解毒、利尿消肿、祛风止痛的功效^[2]。千金藤素是千金藤主要的生物碱活性成分,具有抗炎、抗肿瘤等作用^[3-4]。千金藤素片用于肿瘤患者放射治疗或化学药物治疗引起的白细胞减少症已有10余年的临床应用历史^[5]。近期研究人员发现千金藤素具有很强的抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)、人类免疫缺陷病毒(HIV)和乙型肝炎病毒(HBV)的活性^[6-8]。研究表明,千金藤素可逆转 SARS-CoV-2 感染细胞中的基因紊乱与信号途径抑制病毒复制;千金藤素通过降低细胞膜的流动性、抑制 HIV-1 包膜蛋白介导的病毒感染细胞的膜融合而靶向抑制 HIV-1 入侵阶段;盐酸千金藤素通过抑制宿主 Hsc70 mRNA 的表达发挥抑制细胞内 HBV 复制的作用。然而,上述机制无法合理解释千金藤素所具有的广泛的抗病毒谱,提示可能某种宿主共性机制在千金藤素抵抗不同病毒感染时发挥重要作用。阐明该共性机制对千金藤素用于病毒感染性疾病治疗具有重要的科学和临床意义。

抗病毒天然免疫是机体抵抗病毒感染的第一道防线。病毒入侵宿主细胞后,释放其遗传物质 DNA 或 RNA,这些核酸成分作为病原体相关分子模式(PAMP)被模式识别受体(PRR)识别,然后通过接头分子如线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)、干扰素基因刺激因子(STING)等进行一系列信号转导过程,最终激活 TANK 结合激酶1(TBK1)和干扰素调节因子3(IRF3)等转录因子,刺激 I 型干扰素(IFN-I)的表达从而启动抗病毒免疫应答。IFN-I 通路被病毒核酸激活后,分泌的 IFN-I 会与自身或邻近细胞表面的 IFN 受体结合,激活 Janus 激酶/信号转导器和转录激活剂(JAK-STAT)通路,促进干扰素刺激基因的表达,从而发挥广泛的抗病毒作用^[9-12]。

本研究通过建立病毒感染的细胞模型考察中药活性小分子千金藤素对水疱性口炎病毒(VSV)、甲型流感病毒(H1N1)、脑心肌炎病毒(EMCV)、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)病毒复制的抑制作用。通过生物信息学分析及分子生物学实验证明千金藤素激活基于 IFN-I 通路的抗病毒天然免疫,从而在体内发挥抗病毒作用。本研究旨在阐明千金藤

素抵抗多种病毒的共性免疫学机制,为其抗病毒研发及应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要药品与试剂

千金藤素(质量分数 $\geq 98.0\%$,货号 PS0303-0020)购于成都普思生物股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO),(货号 D4540)购于 Sigma 公司;Trizol Reagent(货号 15596018),购于 Invitrogen 公司;Evo M-MLV RT Kit(货号 AG11711)、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($10\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,货号 15140-122)、胎牛血清(FBS,货号 2358184P)购于 Gibco 公司;0.25% 胰蛋白酶/EDTA 细胞消化液(货号 T1300)购于北京索莱宝科技有限公司;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;抗磷酸化 TANK 激酶1(phospho-TBK1)抗体(货号 5483S)和抗磷酸化信号转导与转录激活因子1(phospho-STAT1)抗体(货号 9167S)购于 Cell Signaling Technology 公司;羊抗兔 Ig G-HRP(货号 M21002)购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司;超敏 ELC 发光液(货号 WBKLS0500)购于美国 Millipore 公司。

1.2 细胞和病毒

人非小细胞肺癌 A549 细胞系、人源单核细胞白血病 THP-1 细胞系,来源于美国典型培养物保藏中心(ATCC),小鼠原代胚胎成纤维细胞(MEF)从小鼠胚胎中分离。表达绿色荧光蛋白(GFP)的水疱性口炎病毒(VSV-GFP)、野生型 VSV、H1N1、EMCV、HSV-1 来源于美国菌种保藏中心(ATCC),病毒扩增后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重(20 ± 2)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证为 SCXK(京)2019-0010。动物于室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%,昼夜交替的环境中饲养,自由进食饮水。所有动物实验和研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-2023112002-4086),在 P2 实验室中进行,并

严格按照动物实验相关章程执行。

1.4 仪器

CytoFlex 流式细胞仪,美国 Beckman 公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、Power Pac 型基础电泳仪,美国 Bio-rad 公司; Spectra Max i3x 多功能酶标仪,美谷分子仪器有限公司。

2 方法

2.1 药物的配制

千金藤素 20 mg 直接加入 329.64 μL DMSO 溶解为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液,分装后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用; 用时用 DMEM 完全培养基稀释至使用浓度。

2.2 细胞活力测定

A549 细胞以每孔 3×10^4 的密度接种于 96 孔板,培养过夜使细胞完全贴壁;配制 0 (对照)、0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0、2.000 0、4.000 0、8.000 0、16.000 0、32.000 0、64.000 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的千金藤素加入细胞中,于 5% CO_2 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养;24 h 后,向每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 2 h,无细胞孔为空白孔,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)值,计算细胞相对存活率。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列(5'-3')	
ACTB	F-CATGTACGTTGCTATCCAGGC	R-CTCCTTAATGTCACGCACGAT
IFNB1	F-GCTTGGATTCTTACAAAGAAGCA	R-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC
IFIT1	F-AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA	R-CTGAAACCGACCATAGTGGAAT
IFIT2	F-GACACGGTTAAAGTGTGGAGG	R-TCCAGACGGTAGCTTGCTATT
IFI44	F-ATGGCAGTGACAACCTCGTTTG	R-TCCTGGTAACTCTCTTCTGCATA
Actb	F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	R-GCCGGACTCATCGTACTCC
Ifnb1	F-AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	R-GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
Ifit1	F-ATCGCGTAGACAAAGCTCTTC	R-GTTTCGGGATGTCCTCAGTTG
Ifit2	F-CTGGGGAAACTATGCTTGGGT	R-ACTCTCTCGTTTTGGTTCTTGG
Ifi44	F-ATGCTCCAAGTACTGCTCTCG	R-ACAGCAATGCCTCTTGCTTT
VSV-G	F-CAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACA	R-TTTCCTTGCAATTGTTCTACAGATGG
H1N1-HA	F-CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA	R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
EMCV-IC	F-CCGCGATGATGAAGGGCAAG	R-CGGGCATCCTGGTGGGTAAAGT
HSV1-ICP27	F-TTTCTCCAGTGCTACCTGAAGG	R-TCAACTCGCAGACACGACTCG

2.5 千金藤素在病毒生命周期不同阶段给药对 VSV-GFP 病毒复制的影响

千金藤素使用预处理、病毒吸附过程中、病毒吸附 3 种不同方式,通过流式细胞术检测 A549 细胞中 VSV-GFP 的复制情况。

2.5.1 预处理 细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加药预处理 12 h 后,弃去含药上清,PBS 清洗细胞 2 次,加入 VSV-GFP(MOI=0.01)感染。培养 12 h 后收集细胞,上

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

2.3 流式细胞术检测千金藤素对 VSV-GFP 病毒复制的影响

A549 细胞以每孔 1.2×10^5 的密度接种于 24 孔板,培养过夜至细胞贴壁后,分为对照组、模型组和千金藤素 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组。除对照组外,VSV-GFP 以 0.01 的感染复数(MOI)感染各组细胞,同时加药共同孵育,对照组与模型组加入 DMSO^[13]。孵育 12 h 后用预冷 PBS 清洗细胞 2 次,取 130 μL 胰酶消化,收集细胞至流式管于 CytoFLEX 流式细胞仪上机检测 GFP 阳性细胞比例。

2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测千金藤素对 H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒 RNA 表达的影响

细胞接种、分组同“2.3”项,分别使用 H1N1(MOI=0.1),EMCV(MOI=0.3)和 HSV-1(MOI=1)感染 A549 细胞,同时加药共同孵育。培养 12 h 后收集细胞,加入 Trizol Reagent 提取 RNA,然后反转录为 cDNA 进行 qPCR 实验,检测病毒基因的 RNA 表达水平。相关引物序列见表 1。

机检测 GFP 阳性细胞比例。

2.5.2 病毒吸附过程中给药 细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加入 VSV-GFP(MOI=0.05)感染,同时加药, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h 后,弃去含有病毒和药物的上清,PBS 清洗细胞 2 次,补充细胞培养基继续培养。10 h 后收集细胞,上机检测 GFP 阳性细胞比例。

2.5.3 病毒吸附后给药 细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加入

VSV-GFP(MOI=0.05)于4℃吸附2 h,然后弃去上清,PBS清洗细胞2次,加药继续培养。10 h后收集细胞,上机检测GFP阳性细胞比例。

2.6 VSV感染小鼠模型制备及给药

将小鼠随机分为对照组、模型组和千金藤素(30 mg·kg⁻¹,该剂量为预试验确定)组,每组5只。小鼠适应性饲养3 d后,千金藤素组小鼠每天ip给予30 mg·kg⁻¹的千金藤素(枸橼酸溶解,pH值约为5.5)预处理2 d,然后模型组和药物组ip给予VSV(每只3×10⁷ PFU)构建败血症模型^[13]。各组小鼠每天ip给予枸橼酸溶液或药物7 d,7 d后隔天给药,记录各组小鼠死亡情况。模型组小鼠全部死亡后,继续观察2 d,停止实验。

2.7 千金藤素处理A549细胞转录组测序及生物信息学分析

本试验设置对照组、千金藤素处理组。A549细胞以每孔1.2×10⁵的密度接种于24孔板,培养过夜后,加入DMSO(对照组)或10 μmol·L⁻¹千金藤素处理24 h,收集细胞,加入Trizol Reagent提取RNA。对RNA进行质检,送至北京百迈客生物科技有限公司进行2代测序分析。使用edge R进行差异表达分析,错误发现率(FDR)<0.05且|log₂(FC)|>1的基因被认为是差异表达基因。基因集富集分析(GSEA)在GSEA软件上运行,背景基因集来自MSigDB数据库。

2.8 qRT-PCR检测千金藤素对A549细胞和MEF细胞干扰素刺激基因(ISGs)表达的影响

A549细胞以每孔1.2×10⁵的密度接种于24孔板,培养过夜后,加入DMSO(对照组)或10 μmol·L⁻¹千金藤素处理24 h,收集细胞,加入Trizol Reagent提取RNA,然后反转录为cDNA进行qRT-PCR实验,检测IFNB1、IFIT1、IFIT2和IFI44基因的mRNA表达。同样操作,MEF细胞以每孔2.5×10⁵的密度接种于12孔板,培养过夜后,加入DMSO(对照组)或10 μmol·L⁻¹千金藤素处理8 h,收集细胞,提取RNA,检测相关基因的表达。相关引物序列见表1。

2.9 Western blotting检测千金藤素对IFN-I通路上游转录因子的影响

用0(对照)、2.5、5.0、10.0 μmol·L⁻¹的千金藤素处理THP-1细胞12 h后,收集细胞,IP裂解液裂解后,离心取上清,加入Loading Buffer于100℃下使蛋白变性,BCA法测定蛋白浓度,进行SDS-PAGE电泳,于4℃孵育phospho-TBK1抗体或phospho-STAT1抗体过夜(抗体稀释比为1:1 000),室温孵育

羊抗兔二抗1 h,加入ECL化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影。

2.10 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,多组间比较采用单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 千金藤素对A549细胞活力的影响

通过CCK-8法测定不同浓度的千金藤素处理A549细胞24 h后对其存活率的影响,计算得千金藤素半数抑制浓度(IC₅₀)为38.48 μmol·L⁻¹(图1)。从其中选取无细胞毒性的低、中、高浓度(2.5、5.0、10.0 μmol·L⁻¹)进行后续实验。

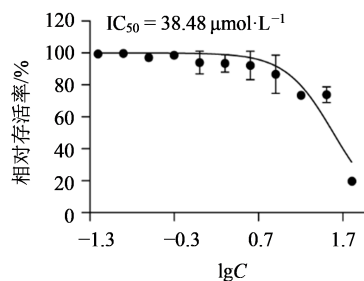


图1 千金藤素对A549细胞存活能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

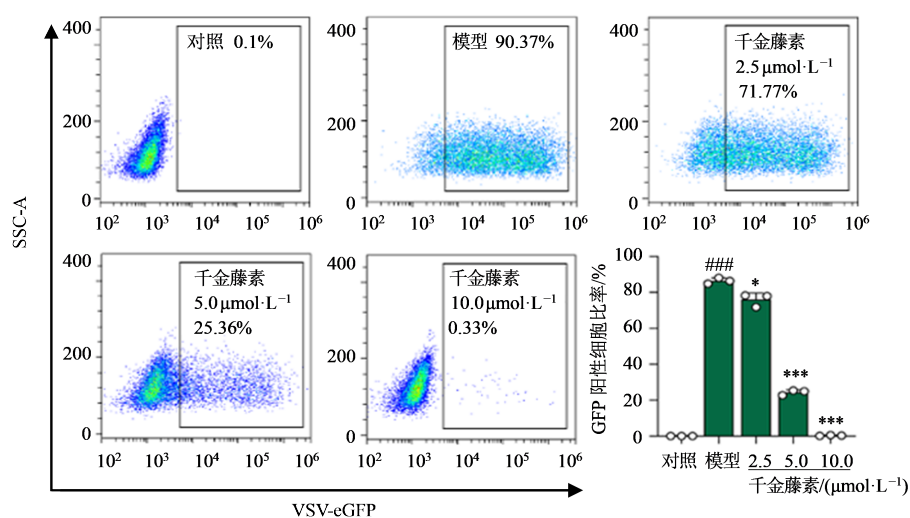
Fig. 1 Effect of cepharanthine on A549 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 千金藤素对VSV-GFP病毒复制的影响

将不同浓度的千金藤素与VSV-GFP共同孵育12 h,通过流式细胞术检测GFP阳性细胞的比率。如图2所示,与对照组相比,模型组中VSV-GFP感染A549细胞引起GFP阳性细胞比例显著增加($P<0.001$);与模型组相比,千金藤素以浓度相关方式显著减少了GFP阳性细胞的比例($P<0.05, 0.001$),在浓度为10.0 μmol·L⁻¹时,几乎完全抑制VSV病毒复制。结果表明千金藤素能够在A549细胞中显著抑制VSV的复制。

3.3 千金藤素对H1N1、EMCV、HSV-1病毒复制的影响

为了探究千金藤素对不同病毒的抑制作用,利用EMCV、H1N1、HSV-1感染A549细胞,同时加入千金藤素处理,通过qRT-PCR技术检测不同病毒的mRNA丰度。如图3所示,与对照组比较,模型组病毒基因的表达量均显著升高($P<0.01, 0.001$);与模型组比较,千金藤素各组病毒基因表达量均显著降低($P<0.05, 0.01, 0.001$),且这种抑制作用呈现浓度相关性。结果表明千金藤素在A549细胞中显著抑制H1N1、EMCV和HSV-1的病毒复制。

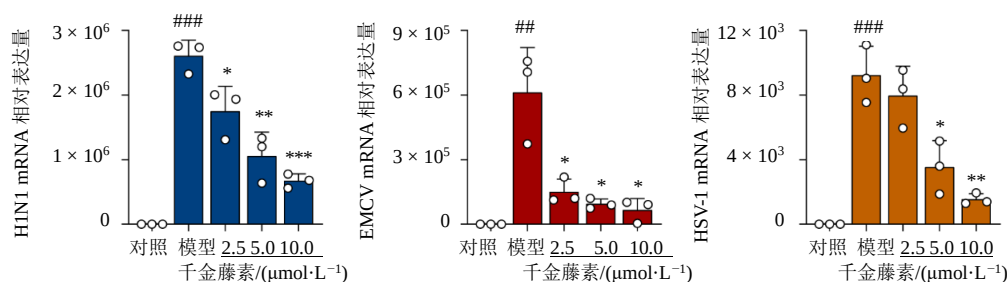


与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图2 千金藤素对VSV-GFP病毒在A549细胞中复制的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of cepharanthine on proportion of VSV-GFP in A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图3 千金藤素对A549细胞中H1N1、EMCV、HSV-1病毒复制的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Inhibition effect of cepharanthine on EMCV, H1N1, and HSV-1 replication in A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 千金藤素病毒生命周期不同阶段给药对VSV病毒复制的影响

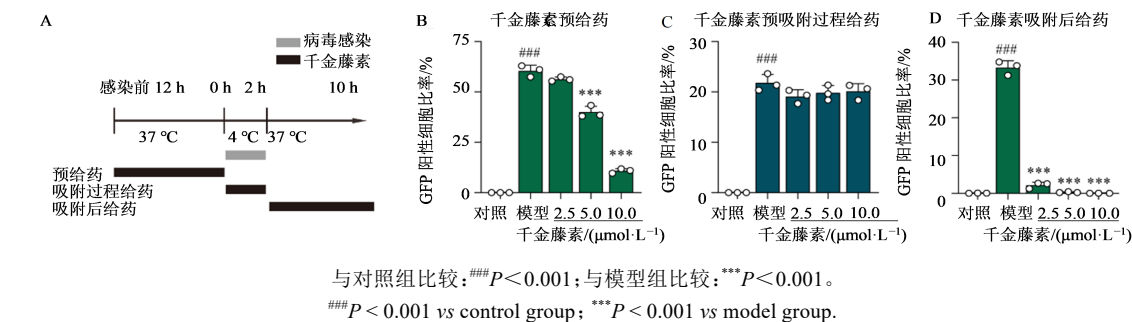
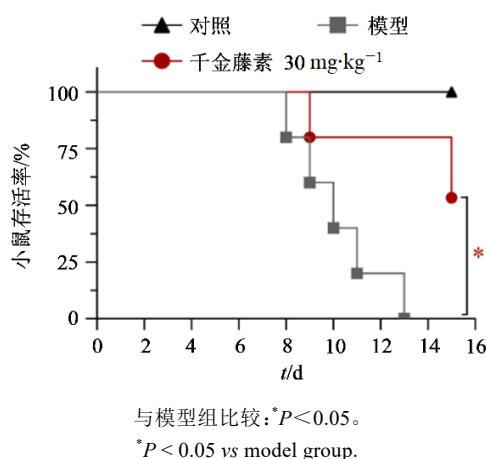
如图4-A所示,为了探究千金藤素在不同阶段给药对VSV-GFP病毒复制的影响,分别对细胞进行了预处理给药、病毒吸附过程中给药以及病毒吸附后给药,通过流式细胞术检测不同阶段给药对VSV病毒复制的影响。如图4-B、C、D所示,千金藤素预处理给药方式中,相对于模型组,在感染后GFP阳性细胞比例降低,5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异更加显著($P < 0.001$)。在病毒吸附的过程中给药,与模型组相比,3种浓度的千金藤素都未显示出对GFP阳性细胞比例的显著影响。在病毒吸附2 h后给药,与模型组比较,千金藤素处理的A549细胞中GFP阳性细胞比例显著降低,且呈浓度相关性抑制作用($P < 0.001$)。上述结果表明千金藤素在预处理和病毒进入后2种加药方式均可显著抑制病毒复制。

3.5 千金藤素对VSV感染小鼠存活率的影响

为了探究千金藤素在小鼠体内是否发挥抗病毒药效,构建了VSV感染小鼠模型。如图5所示,模型组小鼠在感染后第8天开始出现死亡,到第13天全部死亡。而千金藤素组小鼠在第9天开始死亡,且死亡数量减少,两组之间存在显著差异($P < 0.05$),表明千金藤素能提高VSV感染小鼠的存活率。

3.6 千金藤素对A549细胞转录组的影响

为了探究千金藤素潜在的抗病毒机制,对千金藤素处理的A549细胞进行了转录组测序,并进行生物信息学分析。如图6-A所示,与对照组相比,千金藤素处理诱导了836个差异表达基因,包括608个上调基因,218个下调基因。值得注意的是,几种编码IFN-I通路下游抗病毒蛋白的基因被显著上调,如IFIT1、IFIT2、MX1、OAS2等(图6A)。此外,如图6-B所示,GSEA发现,千金藤素处理组显著富

图4 千金藤素不同阶段给药对VSV-GFP感染细胞比例的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Time-of-addition assay of cepharanthine on proportion of VSV-GFP in A549 ($\bar{x} \pm s, n=3$)图5 千金藤素对VSV感染小鼠的保护作用($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 5 Protective effect of cepharanthine on VSV-infected mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

集到与抗病毒天然免疫相关的信号通路,包括SARS-CoV-2感染期间I型干扰素的诱导及其信号转导和JAK-STAT信号通路。转录组测序分析表明千金藤素能显著上调抗病毒免疫应答。

3.7 千金藤素对A549和MEF细胞中IFN-I通路相关基因表达的影响

IFN-I信号通路是抗病毒天然免疫应答的关键过程。为了验证千金藤素是否能够活化IFN-I信号通路,检测了千金藤素处理的A549和MEF细胞中

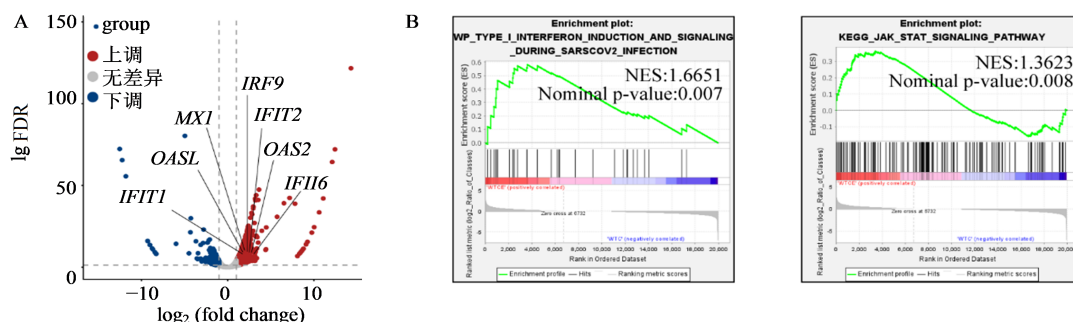
*IFNB1*和ISGs(*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44*)的表达情况。如图7-A所示,A549细胞中,与对照组比较,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 千金藤素处理24 h显著诱导*IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*和*IFI44*的表达($P < 0.05$ 、0.01)。如图7-B所示,MEF细胞中,与对照组比较,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 千金藤素处理8 h观察到类似结果($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。千金藤素处理A549和MEF细胞均能诱导*IFNB1*和ISGs的表达,表明其可以活化IFN-I信号通路。

3.8 千金藤素对THP-1细胞IFN-I通路上游转录因子相关蛋白表达的影响

为了进一步验证千金藤素对IFN-I通路的调控作用,利用免疫印迹法检测了千金藤素处理的THP-1细胞中重要转录因子TBK1、STAT1的激活情况。如图8所示,千金藤素处理12 h可以显著促进TBK1和STAT1的磷酸化水平,对TBK1和STAT1的表达没有显著影响。结果表明千金藤素能够促进IFN-I通路的信号传导。

4 讨论

千金藤属植物药用价值较高,如地不容、千金藤、粉防己等,它们多具有清热解毒、利湿截疟、消痰止痛的功效^[14]。千金藤素是千金藤属植物中含量较高的双苄基异喹啉生物碱之一,常见于金线吊乌龟、千金藤、地不容等^[15]。除了抗肿瘤、抗炎外,

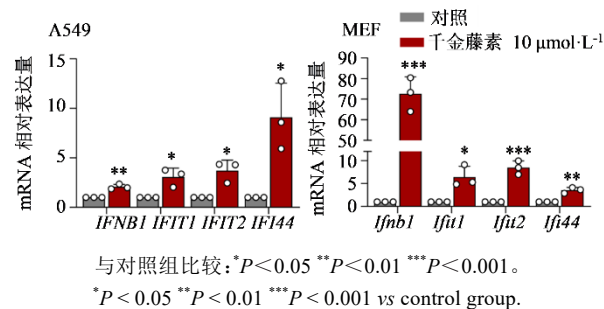


A-差异表达基因火山图; B-GSEA分析。

A-Volcano map of differentially expressed genes; B-GSEA analysis.

图6 千金藤素对A549细胞基因表达谱的影响

Fig. 6 Effect of cepharanthine treatment on gene expression profiles of A549 cells



参考文献

- [1] 陈万生, 詹亚华, 吴和珍, 等. 中国中药资源大典 [M]. 2020.
Chen W S, Zhan Y H, Wu H Z, et al. *Chinese Pharmacopoeia of Traditional Chinese Medicine Resources* [M]. 2020.