

基于天然免疫激活的紫苏叶醇提物抗病毒作用研究

何昱廷¹, 孔令东¹, 禹艳丽¹, 薛蕊蕾², 楼奕男¹, 韦斯娴¹, 周义翔², 贾鑫^{1*}, 徐安龙^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

摘要: **目的** 探究紫苏叶醇提物 (PFEE) 的体内外抗病毒作用, 阐明其激活抗病毒天然免疫进而发挥抗病毒作用的分子机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测 PFEE (100~800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 A549 细胞活力的影响; 通过流式细胞术、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、Western blotting 探究 PFEE (200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对水疱性口炎病毒 (VSV) 感染 A549 细胞的抑制作用, 通过 qRT-PCR、Western blotting 探究 PFEE 对甲型流感病毒 (H1N1) 的抑制作用, 通过 qRT-PCR 探究 PFEE 对脑心肌炎病毒 (EMCV) 的抑制作用。构建 VSV 感染小鼠模型, qRT-PCR 法检测肝、肺、脾组织中 *VSV-G* 的 mRNA 表达水平, 检测肺组织白细胞介素-6 (*Il6*)、肿瘤坏死因子 α (*Tnfa*)、趋化因子配体 10 (*Cxcl10*) mRNA 表达水平, Western blotting 检测肺组织 VSV-G 蛋白表达。PFEE 处理成纤维细胞 (MEF) 细胞 12 h, 转录组测序分析基因通路富集变化, qRT-PCR 检测干扰素刺激基因 (*ISGs*) (*Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Isg15*、*Ddx58*) 的 mRNA 表达, 免疫荧光检测干扰素调节因子 3 (IRF3) 核转位情况, Western blotting 检测 I 型干扰素 (IFN-I) 通路上游转录因子 IRF3、p-核因子- κ B 活化激酶 (TBK1) 蛋白磷酸化情况; PFEE 处理 VSV 感染的干扰素受体敲除 (*IFNAR1*^{-/-}) A549 细胞和野生型 A549 细胞, 利用流式细胞术检测 PFEE 对 VSV 的抑制作用差异。**结果** PFEE 对 A549 细胞 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下无明显细胞毒性。与模型组比较, PFEE 具有体外抑制 VSV、H1N1、EMCV 病毒作用 ($P<0.01$ 、 0.001); PFEE 在 VSV 感染小鼠体内能抑制病毒和炎症因子的 mRNA 表达水平、显著降低 VSV-G 蛋白表达 ($P<0.01$ 、 0.001)。转录组测序分析结果显示, PFEE 上调干扰素相关基因及信号通路, 结合 qRT-PCR、Western blotting 和免疫荧光发现, 与对照组比较, PFEE 能诱导 *ISGs* mRNA 的表达、促进 TBK1、IRF3 的磷酸化以及核转位 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与 A549 细胞比较, 在 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞中, PFEE 的抗病毒作用被显著抑制 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** PFEE 通过激活基于 IFN-I 通路的抗病毒天然免疫应答在体内外发挥抗病毒作用。

关键词: 紫苏叶; 水疱性口炎病毒 (VSV); 甲型流感病毒 (H1N1); 脑心肌炎病毒 (EMCV); 抗病毒先天免疫; I 型干扰素
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)04-0809-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.003

Research on antiviral effect of ethanol extracts from *Perillae Folium* based on activation of innate immunity

HE Yuting¹, KONG Lingdong¹, YU Yanli¹, XUE Ruilei², LOU Yinan¹, WEI Sixian¹, ZHOU Yixiang², JIA Xin¹, XU Anlong²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To research the antiviral effects of ethanol extracts from *Perillae Folium* (PFEE) *in vitro* and *in vivo*, and elucidate the underlying mechanism based on innate immunity response. **Methods** The effect of PFEE (100—800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the viability of A549 cells was detected by CCK-8 assay; the inhibitory effect of PFEE (200, 400, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on vesicular stomatitis virus (VSV) infection of A549 cells was investigated by flow cytometry, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and Western blotting; the inhibitory effect of PFEE on influenza A virus (H1N1) was investigated by qRT-PCR and Western blotting; the

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474153); 2023 年度北京中医药大学-优莎纳联合研究中心 (BURC) 基金重点项目 (BUCM-2023-JS-KF-032); 北京市科技新星计划课题 (20230484342); 北京市自然科学基金资助项目 (7242239); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-A02)

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

***通信作者:** 徐安龙, 教授, 研究方向为中医药治疗免疫性疾病的机制研究。E-mail: xuanlong@bucm.edu.cn

贾鑫, 副教授, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: jiaxin@bucm.edu.cn

inhibitory effect of PFEE on encephalomyocarditis virus (EMCV) was investigated by qRT-PCR. A VSV-infected mouse model was constructed, and the mRNA expression levels of VSV-G in liver, lung, and spleen tissues were detected by qRT-PCR, and the mRNA expression levels of interleukin-6 (*Il6*), tumor necrosis factor α (*Tnfa*), and chemokine ligand 10 (*Cxcl10*) in lung tissue were detected by qRT-PCR, and the expression of VSV-G protein in lung tissue was detected by Western blotting. MEF cells were treated with PFEE for 12 h, and transcriptome sequencing was used to analyze the enrichment changes of gene pathways. The mRNA expression of interferon-stimulated genes (*ISGs*) (*Ifnb1*, *Ifit1*, *Ifit2*, *Isg15*, *Ddx58*) was detected by qRT-PCR, and the nuclear translocation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) was detected by immunofluorescence. **Results** PFEE showed no significant cytotoxicity to A549 cells at concentrations below $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Compared with the model group, PFEE had an inhibitory effect on VSV, H1N1, and EMCV *in vitro* ($P < 0.01, 0.001$); PFEE could inhibit the mRNA expression levels of virus and inflammatory factors and significantly reduce the expression of VSV-G protein in VSV-infected mice ($P < 0.01, 0.001$). Transcriptome sequencing analysis showed that PFEE upregulated interferon-related genes and signaling pathways. Combined with qRT-PCR, Western blotting, and immunofluorescence, it was found that compared with the control group, PFEE could induce the expression of *ISGs* mRNA, promote the phosphorylation and nuclear translocation of TBK1 and IRF3 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with A549 cells, the antiviral effect of PFEE was significantly inhibited in *IFNAR1*^{-/-} A549 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** PFEE resists viral infection *in vitro* and *in vivo* by activating IFN-I signaling.

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britt; vesicular stomatitis virus (VSV); influenza A virus (H1N1); encephalomyocarditis virus (EMCV); antiviral innate immunity; type I interferon

天然免疫是保护机体抵御外界病原微生物入侵的第一道防线^[1]。病毒感染机体后, 宿主免疫细胞的模式识别受体 (PRR), 如识别 RNA 病毒的 Toll 样受体 (TLRs)、维甲酸诱导基因蛋白 I 样受体 (RLRs)、Nod 样受体 (NLRs) 和识别 DNA 病毒的受体环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶 (cGAS), 能够特异性地检测到病原相关分子模式 (PAMPs)^[2-3], 迅速启动下游信号传递, 活化核因子- κ B (NF- κ B)、干扰素调节因子 3 (IRF3) 和 IRF7, 进而诱导 I 型干扰素 (IFN-I)、炎症因子等表达。分泌到细胞外的 IFN-I 与细胞膜表面的 IFN-I 受体 (IFNAR1/2) 结合, 激活酪氨酸激酶 2 亚家族成员 1 (JAK1) 和酪氨酸激酶 2 (TYK2), 诱导信号转导因子和转录激活因子 (STAT1/2) 二聚化后进入细胞核, 与 IRF9 形成干扰素刺激因子 3 复合物 (ISG3), 进而结合 IFN 刺激应答元件 (ISRE) 导致多种干扰素刺激基因 (*ISGs*) 的表达^[4-6]。这些 *ISGs* 在病毒生活周期的各个环节干预病毒, 从而广泛地抵抗病毒感染。

紫苏叶是唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶, 气清香, 味微辛, 归肺、脾经, 具有解表散寒、行气和胃、解鱼蟹毒等功效, 是一种药食同源的中药^[7]。现代药理研究表明, 紫苏叶含有多种活性成分, 包括挥发油、黄酮类、酚酸类等, 这些成分赋予了紫苏叶抗炎、抗过敏、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗抑郁、调脂降糖等多种药理作用^[8-15]。研究表明, 紫苏叶中的挥发油成分, 尤

其是紫苏醛, 能通过影响病毒复制的关键酶抑制病毒复制^[16-17]。然而, 紫苏叶在抗病毒天然免疫中的作用和机制尚不清楚。

本研究通过建立病毒感染的细胞和动物模型, 探究紫苏叶醇提取物 (ethanol extracts from *Perillae Folium*, PFEE) 体内外的抗病毒作用, 并通过生物信息学分析和分子生物学实验, 研究 PFEE 是否通过激活 IFN-I 通路抑制病毒复制。以期在阐明紫苏叶激活抗病毒天然免疫的分子机制的同时, 也为中药现代研究提供新视角, 为抗病毒药物的开发和临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞和病毒

人非小细胞肺癌 A549 细胞系来源于美国模式培养物集存库 (ATCC); 小鼠原代胚胎成纤维 MEF 细胞从小鼠胚胎中分离; *IFNAR1* 敲除 A549 细胞 (*IFNAR1*^{-/-} A549) 由本实验室构建^[18]。细胞使用含 1% 双抗、10% 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。

表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的水疱性口炎病毒 (VSV-eGFP)、VSV、甲型流感病毒 (H1N1)、脑心肌炎病毒 (EMCV) 来自本实验室, 病毒扩增后于 -80 °C 保存。

1.2 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~20 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,

实验动物生产许可证 SCXK(京)2019-0010。动物于室温(23±2)℃、相对湿度 40%~70%、昼夜交替照明的环境中饲养,自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-2024092401-3329)。

1.3 药材

紫苏叶饮片(批号 221216010)购自北京仟草中药饮片有限公司,经北京北中大药业有限公司平玉杰执业药师鉴定为唇形科植物紫苏 *P. frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶。

1.4 药品与主要试剂

DT-diaphorase 抑制剂(DMXAA, 货号 D833566)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 C3580-0500)购自上海达特希尔生物科技有限公司;Trizol Reagent(货号 15596018),购自 Invitrogen 公司;Evo M-MLV RT Kit(货号 AG11711)、SYBR®Green Premix Pro Taq HS q PCR Kit(批号 AG11701)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;DMEM 高糖培养基(批号 C11995500CP)、青霉素-链霉素(10 000 U·mL⁻¹, 货号 15140-122)、FBS(批号 2358184P)购自美国 Gibco 公司;0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)细胞消化液(批号 T1300)购于北京索莱宝科技有限公司;细胞增殖-毒性检测 CCK-8 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)、VSV-G tag 重组抗体(批号 ab183497)、羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 594)(货号 ab150080)购自英国 Abcam 公司;极超敏 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;HRP 标记小鼠抗兔 IgG(货号 D110059)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号 10494-1-AP)、p-IRF3 抗体(货号 11312-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;p-NF-κB 活化激酶(TBK1)抗体(货号 5483S)购于 Cell Signaling Technology 公司;甲酸(色谱纯,批号 2023041701)、甲醇(分析纯,批号 2022092002)购自成都市科隆化学品有限公司;乙腈(色谱级,批号 F22M8G206)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.5 主要仪器

Cyto FLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司);CFX96 型荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、Power Pac 型基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Spectra Max

i3x 型多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司);SK-L180-Pro 型数显线性摇床(大龙兴创实验仪器股份公司);Sorvall™Legend Micro 21R 型微量离心机、1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell150 i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);EPS-300 型数显式稳压稳流电泳仪(天能公司);SCI-VS 型可调式混匀仪(美国 Scilogex 公司);激光扫描共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司);WP-Z-UV 型微量元素型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司);Agilent 1290 型 UHPLC 超高效液相色谱仪、Agilent 6530 LC/Q TOF 高分辨质谱仪(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 PFEE 的制备

称取紫苏叶粉末 1.00 g 于 50 mL 离心管中,按料液比 1:45(g·mL⁻¹)加入 40%的乙醇溶液,超声提取(频率 40 kHz、功率 180 W)70 min,提取 2 次^[19]。滤过,收集滤液,旋转浓缩蒸发后真空干燥,得到 PFEE 粉末 268 mg,提取率为 26.8%。使用时称取适量 PFEE 粉末,加入 PBS 溶解,并用 0.22 μm 细胞筛滤过后密封,-20℃保存,母液质量浓度为 100 mg·mL⁻¹。

《中国药典》2020 年版只对紫苏叶中挥发油含量作出规定,部分省市的中药质量标准及中药饮片炮制规范也没有作出更多的含量测定规定^[20]。已有研究报道,基于有效基准特征图谱、指纹图谱等筛选出迷迭香酸、木犀草素-7-二葡萄糖苷酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、野黄芩苷等有望作为紫苏叶潜在标志成分,可以完善和扩大紫苏叶质量表征和评价体系、并具有潜在的抗病毒功能^[20-23]。经 LC-MS/MS 分析检测到本研究使用的 PFEE 中含有木犀草素-7-二葡萄糖苷酸、野黄芩素-7-*O*-双葡萄糖酸苷、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷、异高山黄芩素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷、野黄芩苷、迷迭香酸。

2.2 细胞活力测定

A549 细胞(每孔 2×10⁴ 个)接种于 96 孔板中培养过夜使细胞贴壁;用 DMEM 完全培养基配制 100、200、400、600、800 μg·mL⁻¹ 的 PFEE 加入细胞中,另设置对照组(不加药)以及无细胞无药的空白孔,于 5% CO₂、37℃细胞培养箱中孵育 12 h 后,弃掉含药上清培养基,每孔添加 6 μL CCK-8 试

剂, 37 ℃ 孵育 30 min, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞相对存活率。

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

2.3 流式细胞术检测 PFEE 对 A549 细胞中 VSV-eGFP 病毒复制的影响

A549 细胞 (每孔 1.2×10^5 个) 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 PFEE 低、中、高质量浓度 (200、400、600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组。除对照组外, VSV-eGFP 以 0.08 的感染复数 (MOI) 感染细胞, PFEE 组同时给予 PFEE 共同处

理。12 h 后收集细胞至流式管内, Cyto FLEX 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比率。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 PFEE 对 VSV、H1N1 和 EMCV 病毒 RNA 表达的影响

细胞接种、分组同“2.3”项, 分别使用 VSV-eGFP (MOI=0.08)、H1N1 (MOI=0.5)、EMCV (MOI=6) 感染细胞并加药共同孵育 12 h 后^[18, 24], 收集细胞, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA, 并合成 cDNA 进行 VSV-G、H1N1-HA、EMCV-IC 的 qRT-PCR 分析, 检测不同病毒基因的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列 (5'→3')	
ACTB (内参)	F-CATGTACGTTGCTATCCAGGC	R-CTCCTTAATGTCACGCACGAT
VSV-G	F-CAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACA	R-TTTCCTTGCAATTGTTCTACAGATGG
H1N1-HA	F-CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAAGTA	R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
EMCV-1C	F-CCGCGATGATGAAGGGCAAG	R-CGGGCATCCTGGTGGGTAAAGT
Actb	F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	R-GCCGGACTCATCGTACTCC
Il6	F-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	R-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
Tnfa	F-CAGGCGGTGCCTATGTCTC	R-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
Cxcl10	F-CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC	R-GGCTCGCAGGGATGATTTCAA
Ifnb1	F-AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	R-GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
Ifit1	F-ATCGCGTAGACAAAGCTCTTC	R-GTTTCGGGATGTCCTCAGTTG
Ifit2	F-CTGGGGAAACTATGCTTGGGT	R-ACTCTCTCGTTTTGGTTCTTGG
Isg15	F-GGTGTCCGTGACTAACTCCAT	R-CTGTACCACTAGCATCACTGTG
Ddx58	F-GAAGAGCCAGAGTGTCAGAATC	R-AGCTCCAGTTGGTAATTTCTTGG

2.5 Western blotting 检测 PFEE 对 VSV-G 和 H1N1-NP 蛋白表达的影响

细胞接种、分组同“2.3”项, 分别使用 VSV-eGFP (MOI=0.08)、H1N1 (MOI=0.5) 感染细胞并加药共同孵育 12 h 后, 收集细胞, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 $5 \times$ Loading Buffer, 100 ℃ 金属浴 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 封闭后, 分别加入 VSV-G 抗体 (1:3 000) 和 H1N1-NP 抗体 (1:1 500), 4 ℃ 孵育过夜; 室温孵育二抗 (1:5 000), 加入 ECL 化学发光试剂, 于凝胶成像仪中曝光显影。

2.6 PFEE 对 VSV 感染小鼠的保护作用

小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为对照组、模型组 (VSV 感染)、DMXAA (阳性药, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和 PFEE 低、高剂量 (400、800 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 6 只。病毒感染前, PFEE 组小鼠 ig 药物预处理 2 d, DMXAA

组小鼠 ip 药物预处理 2 d; 除对照组外, 第 0 天 ip 给予 VSV 病毒感染小鼠 (每只 3×10^7 PFU, 35 μL)^[18] 建立模型。小鼠给予病毒感染后 48 h 处死, 采集小鼠组织, 经 Trizol 法提取总 RNA。qRT-PCR 法检测肝、肺、脾组织中 VSV-G 的 mRNA 表达水平, 检测肺组织白细胞介素-6 (Il6)、肿瘤坏死因子 α (Tnfa)、趋化因子配体 10 (Cxcl10) mRNA 表达水平; Western blotting 检测肺组织 VSV-G 蛋白表达, 方法同“2.5”项。

2.7 PFEE 处理 MEF 细胞转录组测序及生物信息学分析

将 MEF 细胞 (每孔 2.5×10^5 个) 接种于 12 孔板, 培养过夜后, 加入 $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PFEE 处理 12 h, 对照组不给药。收集细胞, 加入 Trizol Reagent 提取 RNA。对 RNA 进行质检, 由华大基因股份有限公司进行测序分析。使用 Hieff NGS Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina (Yeasten

Biotechnology Co., Ltd.) 产生测序文库。文库在 Illumina NovaSeq 平台上测序, 产生 150 bp 的成对端读数。使用 Hisat2 工具软件与参考基因组进行映射, 并获得每个样本中基因的原始表达值。使用 edgeR 进行差异表达分析, 错误发现率 (FDR) < 0.05 且 $|\log_2 FC| > 1$ 的基因被认为是差异表达基因。基因组富集分析 (GSEA) 是在 GSEA 软件上运行的, 基因集来自 MSigDB 数据库。

2.8 qRT-PCR 检测 PFEE 对 MEF 细胞 ISGs 表达的影响

细胞接种、分组、给药方法均同“2.7”项。收集细胞, 加入 Trizol Reagent 提取 RNA, 反转录为 cDNA 进行 qRT-PCR 实验, 检测 *Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Isg15* 和 *Ddx58* 基因的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

2.9 Western blotting 检测 PFEE 对 IFN-I 通路上游转录因子的影响

细胞接种方法同“2.7”项, 200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PFEE 处理 MEF 细胞 12 h, 对照组不给药。收集细胞, 加入磷酸酶抑制剂和 IP 裂解液裂解后, 离心取上清, 进行 Western blotting 实验检测 IRF3、p-IRF3、TBK1、p-TBK1 蛋白表达水平, 方法同“2.5”项。

2.10 免疫荧光检测 IRF3 核转位情况

A549 细胞以每孔 2.4×10^5 个的密度接种于共聚焦小皿, 培养过夜至细胞贴壁后, 分为对照组、PFEE 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组。对照组不给药, 药物处理 12 h 后, 吸弃上清, 4%多聚甲醛固定细胞 30 min 后, 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 IRF3 (1:200) 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, Hoechst33342 (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。

2.11 PFEE 对 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞中 VSV-eGFP 病毒复制的影响

A549 细胞和 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞 (每孔 1.2×10^5 个) 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 PFEE 低、中、高质量浓度 (200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组。除对照组外, 以 VSV-eGFP (MOI=0.08) 感染细胞, PFEE 组同时给予 PFEE 共同处理。12 h 后收集细胞至流式管内, Cyto FLEX 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比率。

2.12 统计学分析

数据用 Graph Pad Prism 软件进行可视化处理和统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 PFEE 对 A549 细胞毒性检测

如图 1 所示, 通过 CCK-8 法测定不同质量浓度的 PFEE 处理 A549 细胞 12 h 后对其存活率的影响, 并计算得出 PFEE 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 9.292 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下显示无明显细胞毒性。因此在后续实验中, 选择无明显细胞毒性的低、中、高质量浓度 (200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行实验。

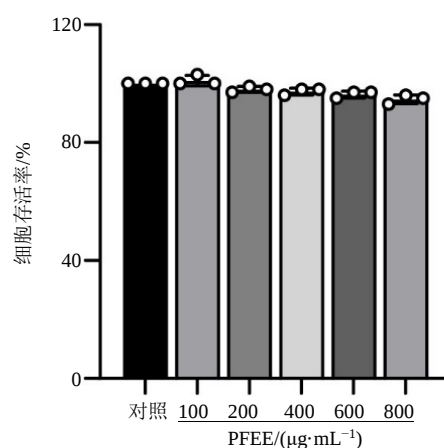


图 1 PFEE 对 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of PFEE on survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

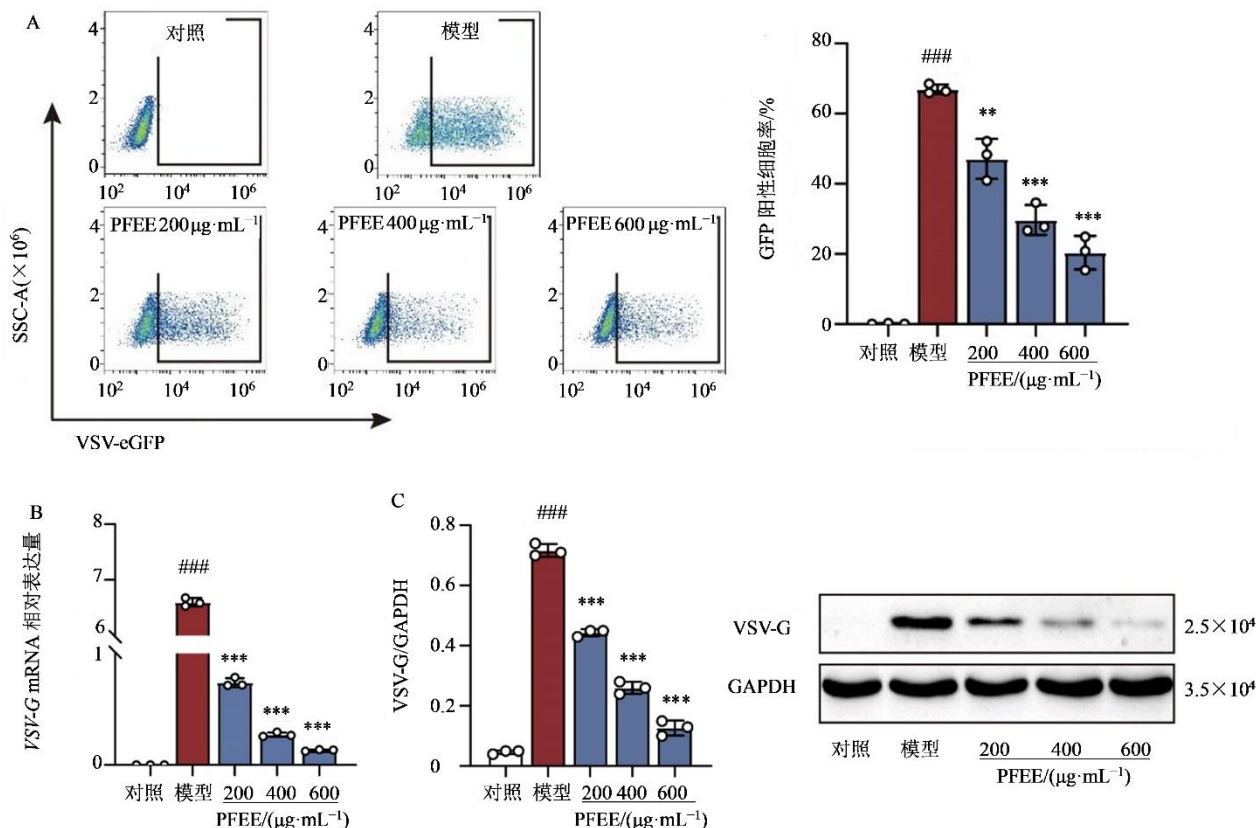
3.2 PFEE 对 VSV 病毒复制的影响

将不同质量浓度的 PFEE 与 VSV-eGFP 共同孵育 12 h 后, 通过流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例。如图 2-A 所示, 与对照组相比, VSV-eGFP 感染引起了 A549 细胞 GFP 阳性细胞比例的增加 ($P<0.001$); 与模型组相比, PFEE 以浓度相关的方式减少了 GFP 阳性细胞的比例 ($P<0.01, 0.001$), 在 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制病毒复制的效果最显著, GFP 阳性细胞比例降低至 24.9%。随后, 使用 qRT-PCR 检测 *VSV-G* 基因的表达水平, 如图 2-B 所示, 与对照组相比, 模型组 *VSV-G* mRNA 相对表达水平显著增加 ($P<0.001$); 与模型组相比, PFEE 显著抑制 *VSV-G* 基因的表达 ($P<0.001$)。此外, 通过 Western blotting 检测细胞内 VSV-G 蛋白的表达, 如图 2-C 所示, 与对照组相比, 模型组 VSV-G 蛋白表达显著

增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, PFEE 显著降低 VSV-G 蛋白的表达 ($P < 0.001$), 且呈浓度相关性。结果表明, PFEE 能够在 A549 细胞中有效抑制 VSV 病毒复制。

3.3 PFEE 对 H1N1、EMCV 病毒复制的影响

如图 3-A、B 所示, 与对照组相比, 分别使用 H1N1 (MOI=0.5)、EMCV (MOI=6) 感染细胞后, 模型组 *H1N1-HA*、*EMCV-IC* mRNA 表达水平

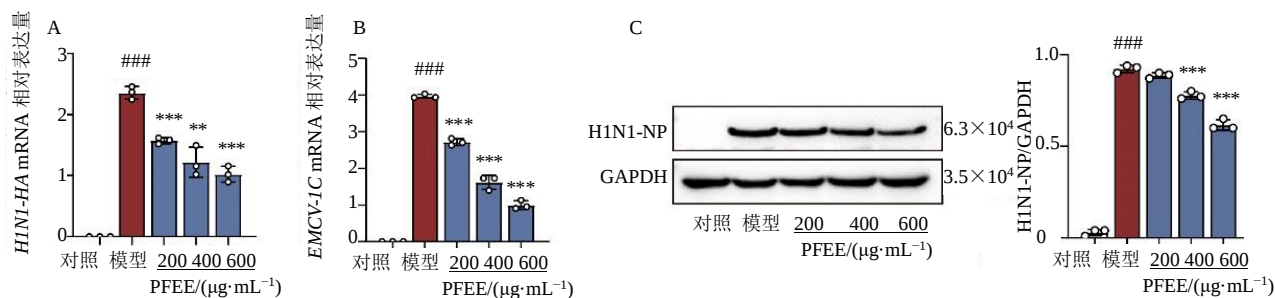


A-流式细胞仪检测 PFEE 对 VSV-eGFP 病毒复制的影响; B-qRT-PCR 检测 PFEE 对 VSV 病毒复制的影响; C-Western blotting 检测 PFEE 对 VSV-G 蛋白表达的影响; 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-Effect of PFEE on VSV-eGFP virus replication by flow cytometry; B-Effect of PFEE on viral RNA in VSV infected cells by qRT-PCR; C-Effect of PFEE on VSV-G protein expression by Western blotting; ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 2 PFEE 在 A549 细胞中对 VSV 病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Inhibition of PFEE on VSV replication in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A、B-qRT-PCR 检测 PFEE 对 H1N1、EMCV 病毒复制的影响; C- Western blotting 检测 PFEE 对 H1N1-NP 蛋白表达的影响; 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A, B-Effect of PFEE on viral RNA in H1N1 and EMCV infected cells by qRT-PCR; C-Effect of PFEE on H1N1-NP protein expression by Western blotting; ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 3 PFEE 在 A549 细胞中对 H1N1、EMCV 病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

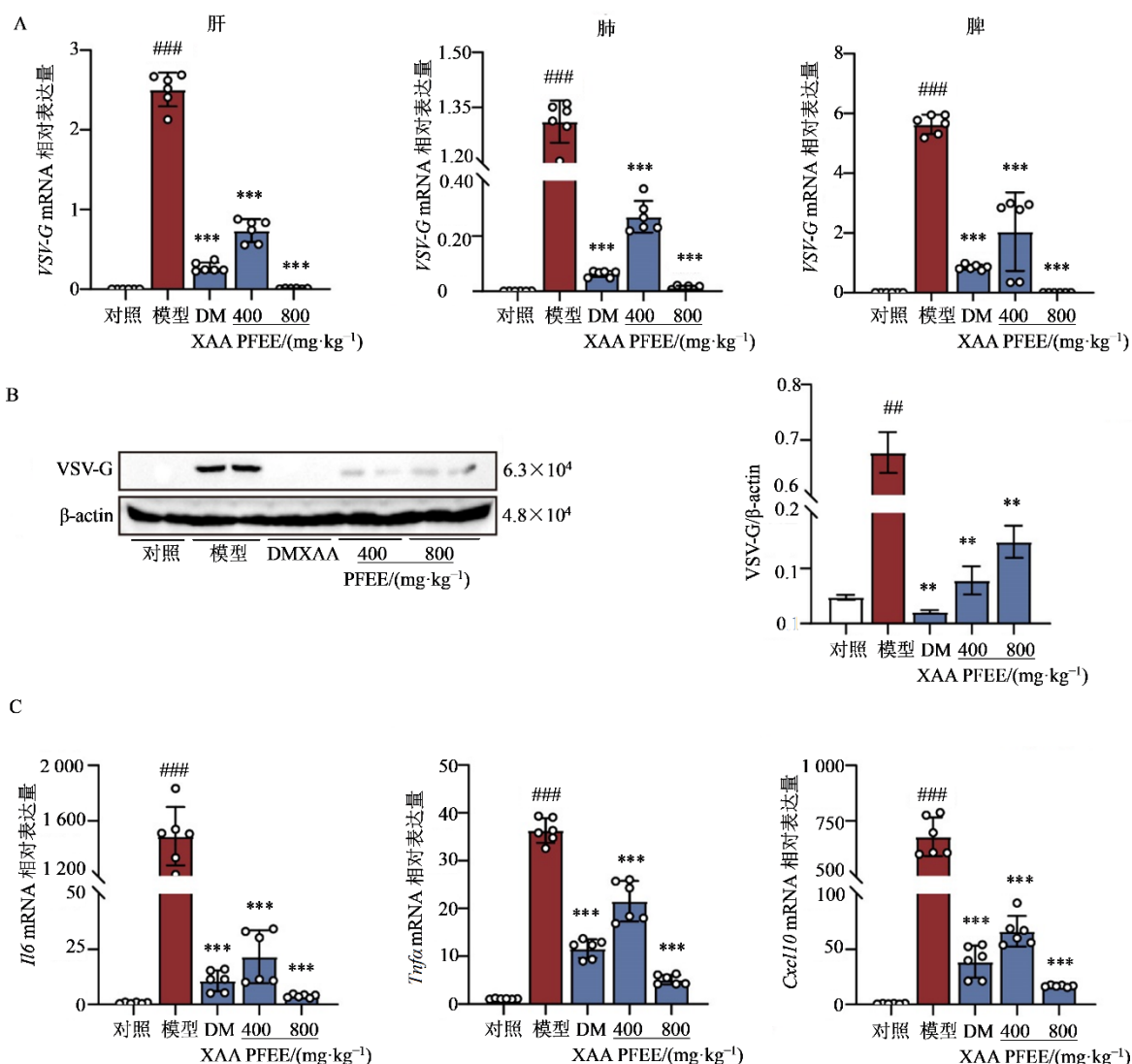
Fig. 3 Inhibition of PFEE on H1N1 and EMCV replication in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, PFEE 呈浓度相关性地抑制了 *H1N1-HA*、*EMCV-IC* 的基因表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。如图 3-C 所示, 与对照组相比, 使用 H1N1 (MOI=0.5) 感染细胞后, 模型组 H1N1-NP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PFEE 显著抑制 H1N1-NP 蛋白表达 ($P < 0.001$)。结果表明, PFEE 能够在细胞水平显著抑制 H1N1、EMCV 的复制。

3.4 PFEE 在小鼠体内抗 VSV 感染

进一步采用 VSV 感染小鼠模型评估 PFEE 的

体内抗病毒效果。如图 4-A 所示, 在病毒感染 48 h 后检测小鼠肝、肺、脾脏组织中的 VSV 病毒载量, 与对照组相比, 模型组小鼠肝、肺、脾脏组织 *VSV-G* 基因表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, PFEE 组的小鼠肝、肺、脾脏组织 *VSV-G* 基因表达显著降低 ($P < 0.001$)。如图 4-B 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织 VSV-G 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, PFEE 组肺组织 VSV-G 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。如图 4-C 所示, qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺



A-各组小鼠肝、肺、脾组织 *VSV-G* mRNA 水平; B-各组小鼠肺组织中 VSV-G 蛋白的表达; C-各组小鼠肺组织中炎症因子的 mRNA 表达水平; 与对照组比较: ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-*VSV-G* mRNA levels in liver, lung, and spleen tissues of mice in each group; B-Expression of VSV-G protein in lung tissue of mice in each group; C-mRNA expression levels of inflammatory factors in the lung tissues of mice in each group; ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 4 PFEE 对 VSV 感染小鼠的保护作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of PFEE on VSV virus-infected mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组织中 *Il6*、*Tnfa*、*Cxcl10* mRNA 表达均显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 在 PFEE 给药组的小鼠肺组织中, 炎症因子 *Il6*、*Tnfa*、*Cxcl10* 表达均显著降低 ($P<0.001$)。结果表明, PFEE 具有体内抑制 VSV 病毒感染的作用。

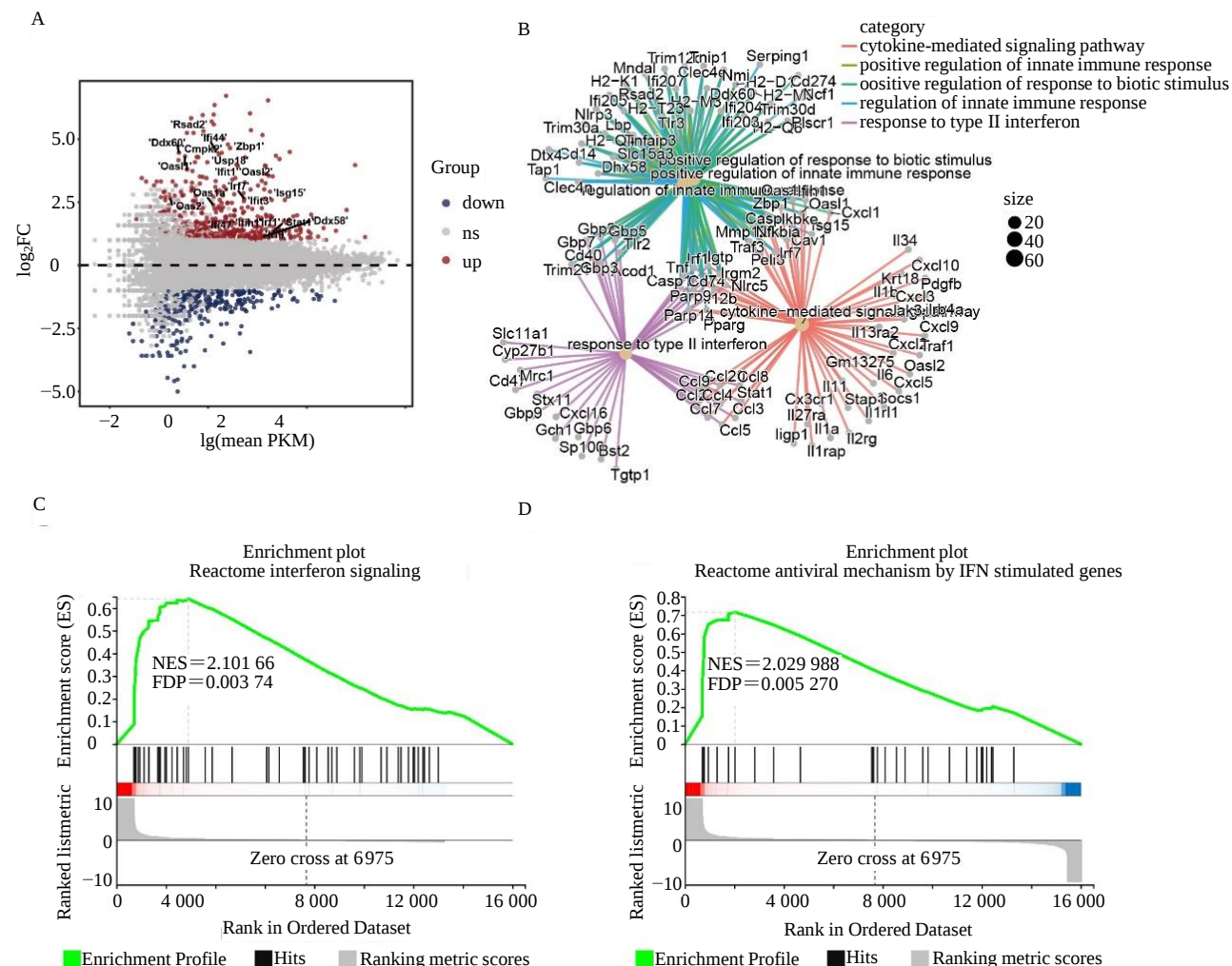


图 5 PFEE 对 MEF 细胞基因表达的影响
Fig. 5 Effect of PFEE on gene expression profiles of MEF cells

因。值得注意的是, IFN-I 通路下游几种编码抗病病毒的基因被显著上调, 如 *Ifit1*、*Isg15*、*Ddx58*、*Oas2*、*Ifi44* 等。基因通路富集 (图 5-B) 和 GSEA (图 5-C、D) 显示, PFEE 组显著富集到与抗病毒天然免疫相关的信号通路。转录组测序分析表明, PFEE 能正向调节抗病毒免疫应答。

3.6 PFEE 通过激活 IFN-I 通路发挥抗病毒作用

药物处理细胞的生物信息学分析显示, PFEE 的抗病毒功能与宿主抗病毒天然免疫应答的信号

3.5 PFEE 处理 MEF 细胞的转录组分析

为了探究 PFEE 潜在的抗病毒机制, 对 PFEE 处理的 MEF 细胞进行转录组测序分析。如图 5-A 所示, 与对照组相比, PFEE 处理诱导了 498 个差异基因表达, 包括 341 个上调基因和 157 个下调基

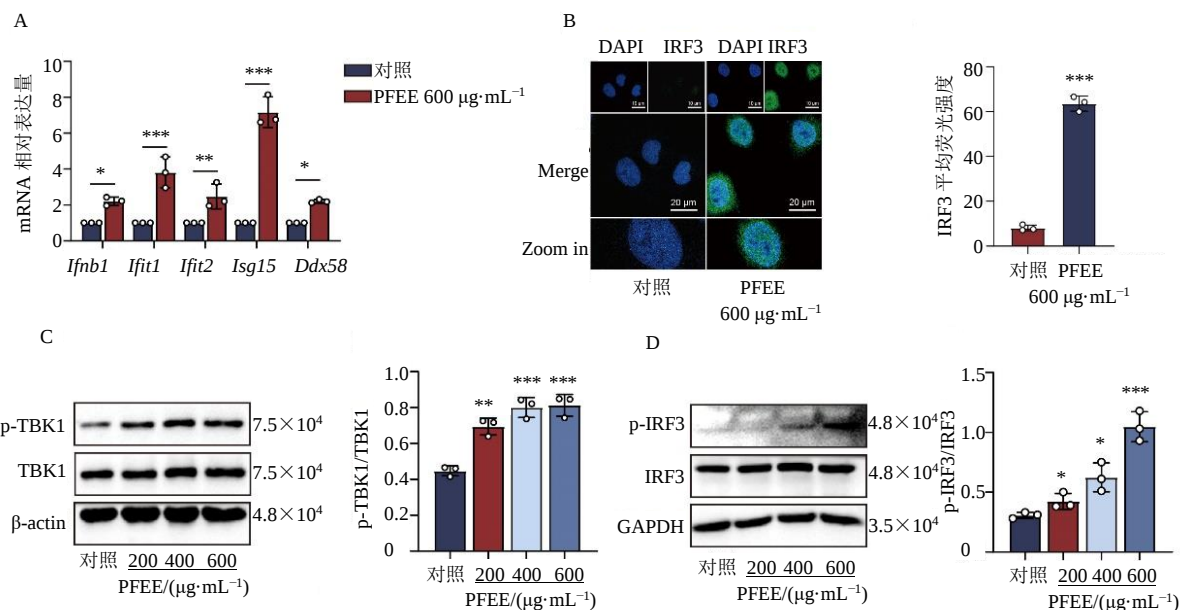
通路高度相关。进一步检测了 PFEE 处理 MEF 细胞后 ISGs (*Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Isg15*、*Ddx58*) 的表达情况, 如图 6-A 所示, MEF 细胞中, 与对照组相比, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PFEE 处理 12 h 后显著诱导 *Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Isg15*、*Ddx58* 的基因表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。免疫荧光结果显示 (图 6-B), 与对照组相比, 在 A549 细胞中 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PFEE 处理 12 h 后会诱导 IRF3 由细胞质向细胞核的转位 ($P<0.001$)。为进一步验证 PFEE 对 IFN-I 通路的调控作

用, 利用 Western blotting 法检测了 PFEE 处理的 MEF 细胞中关键转录因子 IRF3、TBK1 的激活情况, 如图 7-C、D 所示, 与对照组相比, PFEE 处理 12 h 后可以增强 IRF3、TBK1 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明, PFEE 能够激活 IFN-I 信号通路。

3.7 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞中 PFEE 对病毒复制的影响

IFNAR1 是细胞表面干扰素的关键受体, 参

与了 IFN-I 信号传递。IFN 与 IFNAR1 结合后激活下游 JAK-STAT 信号通路发挥抗病毒作用。利用 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞研究 PFEE 的抗病毒作用是否依赖于 IFN-I。如图 8 所示, 与 A549 细胞相比, PFEE 在 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞中对 VSV 的抑制功能被显著削弱 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明 PFEE 的抗病毒功能部分依赖于 IFN-I 信号通路。

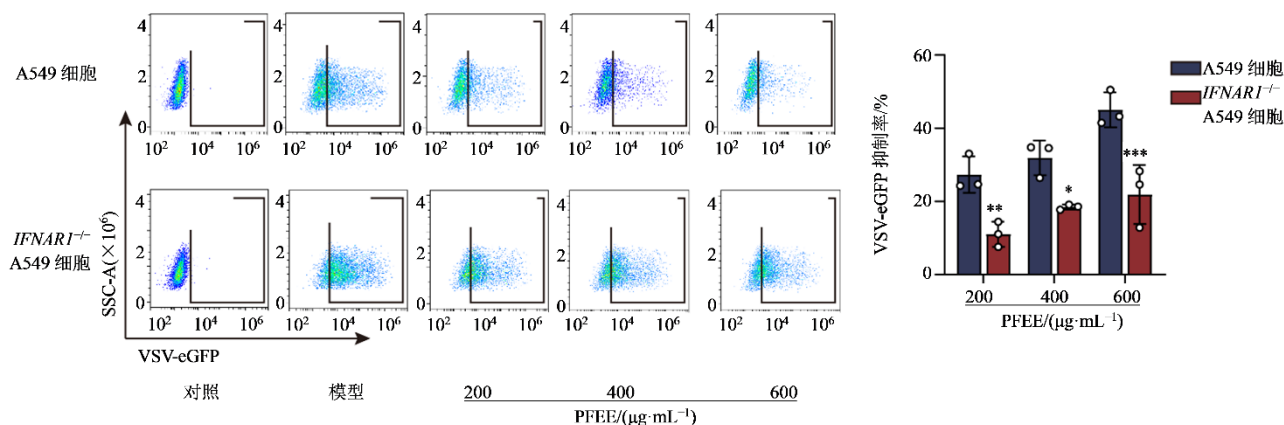


A-PFEE 对 MEF 细胞中 ISGs 的影响; B-激光共聚焦拍摄 PFEE 在 A549 细胞中诱导 IRF3 的核转位; C、D-PFEE 对 MEF 细胞中 IFN-I 通路中转录因子的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-Effect of PFEE on expression of ISGs in MEF cells; B-Laser confocal imaging of PFEE induced nuclear translocation of IRF3 in A549 cells; C, D-Effect of PFEE on activation of transcription factors of IFN-I pathway in MEF cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 PFEE 对 MEF 细胞 IFN-I 通路中相关基因和上游转录因子激活的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of PFEE on gene expression of related genes and activation of transcription factors upstream of IFN-I pathway in MEF cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与 A549 细胞组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs A549 cells group.

图 8 PFEE 对 *IFNAR1*^{-/-} A549 细胞中 VSV-eGFP 复制的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of PFEE on VSV-eGFP replication in *IFNAR1*^{-/-} A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

紫苏药用历史悠久,《中国药典》收录有紫苏子、紫苏叶、紫苏梗三味药,其是同基原多部位入药的典型代表^[25]。《太平惠民和剂局方》中记载有香苏散,由香附、紫苏、陈皮、甘草组成,有疏风散寒、理气和中的作用,主治外感风寒、气滞症,临床用于治疗感冒咳嗽、消化系统疾病等,其中以紫苏叶入药,重在发挥其辛温解表、理气机之功效^[26]。紫苏叶的现代药理研究发现,其活性成分,包括迷迭香酸和木犀草素能够抑制炎症介质的释放,减轻炎症反应^[27-28]。此外,研究表明 PFEE 可能具有抑制新型冠状病毒和埃博拉病毒活性^[29-30]。

本研究通过流式细胞术、qRT-PCR 等实验首先证明了 PFEE 体外抑制 VSV、H1N1、EMCV 多种病毒复制的活性,利用 VSV 病毒感染的小鼠模型揭示 PFEE 具有降低小鼠组织病毒载量、下调炎症因子表达和改善肺部炎症浸润的功能。结合生物信息学分析和分子生物学实验,发现 PFEE 可上调抗病毒天然免疫信号通路、增强转录因子 TBK1、IRF3 的磷酸化并诱导 IFN 相关基因的表达。重要的是,干扰素受体缺失后,PFEE 对病毒的抑制作用明显减弱。上述结果共同表明,PFEE 的抗病毒功能一定程度上依赖于 IFN-I 介导的抗病毒天然免疫通路。

本研究证明了 PFEE 基于激活 IFN-I 的天然免疫应答从而发挥在体内、体外对病毒的抑制作用。初步阐明了紫苏叶对免疫的调控功能,为其抗病毒药物的开发和研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wu J X, Chen Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 461-488.
- [2] Chen C, Xu P L. Cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(8): 630-648.
- [3] Xu Q, Tang Y T, Huang G. Innate immune responses in RNA viral infection [J]. Front Med, 2021, 15(3): 333-346.
- [4] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors [J]. Immunol Rev, 2004, 202: 8-32.
- [5] Schreiber G, Piehler J. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling [J]. Trends Immunol, 2015, 36(3): 139-149.
- [6] Stark G R, Darnell J E Jr. The JAK-STAT pathway at twenty [J]. Immunity, 2012, 36(4): 503-514.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [8] 何佳奇, 李效贤, 熊耀康. 紫苏总黄酮提取物对四氧嘧啶致糖尿病小鼠糖脂代谢及抗氧化水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1667-1669. He J Q, Li X X, Xiong Y K. Effects of total flavonoids of *Perilla frutescens* leaves on blood glucose, blood lipids and serum SOD, MDA leaves in alloxan induced diabetic mice [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2011, 29(7): 1667-1669.
- [9] 刘行仁, 白义凤, 梁良, 等. 紫苏醇对肺癌 A549 细胞增殖和侵袭的抑制作用机制的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 859-863. Liu X R, Bai Y F, Liang L, et al. Anti-lung cancer effect and anti-angiogenesis therapy study of perillyl alcohol [J]. Chin J Immunol, 2017, 33(6): 859-863.
- [10] 邢钰彬, 刘思佳, 星萍, 等. 紫苏叶乙醇提取物的抗过敏活性及其作用机制 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 23-30. Xing Y B, Liu S J, Xing P, et al. Antiallergic activity and mechanism of ethanol extract from *Perilla* leaves [J]. Mod Food Sci Technol, 2021, 37(7): 23-30.
- [11] 尹丽, 孟学林. 正交试验法优化紫苏叶中总黄酮提取工艺及体外抗氧化活性研究 [J]. 饲料研究, 2024, 47(4): 99-103. Yin L, Meng X L. Optimization of extraction process and study of *in vitro* antioxidant activity of total flavonoids from *Perilla frutescens* leaves by orthogonal test [J]. Feed Res, 2024, 47(4): 99-103.
- [12] 钟萍, 汪镇朝, 刘英孟, 等. 紫苏叶挥发油化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13): 215-225. Zhong P, Wang Z C, Liu Y M, et al. Advances on chemical constituents of essential oils from *Perillae Folium* and their pharmacological effect: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(13): 215-225.
- [13] Jee H J, Ryu D, Kim S, et al. Fermented *Perilla frutescens* ameliorates depression-like behavior in sleep-deprivation-induced stress model [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 622.
- [14] Yang J H, Yoo J M, Lee E, et al. Anti-inflammatory effects of *Perillae Herba* ethanolic extract against TNF- α /IFN- γ -stimulated human keratinocyte HaCaT cells [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 211: 217-223.
- [15] Yuan J Q, Li X Y, Fang N, et al. Perilla leaf extract (PLE) attenuates COPD airway inflammation via the TLR4/syk/PKC/NF- κ B pathway *in vivo* and *in vitro* [J].

- Front Pharmacol, 2022, 12: 763624.
- [16] Chu Z Y, Li Y L, Wang L, et al. Perillaldehyde: A promising antibacterial agent for the treatment of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* infection [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 126: 111311.
- [17] Erhunmwunsee F, Pan C, Yang K L, et al. Recent development in biological activities and safety concerns of perillaldehyde from *Perilla* plants: A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(23): 6328-6340.
- [18] Wang Y, Yuan S, Jia X, et al. Mitochondria-localised ZNFX1 functions as a dsRNA sensor to initiate antiviral responses through MAVS [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(11): 1346-56.
- [19] 代沙, 吴卫, 谢晓娟. 紫苏叶抗氧化物质超声提取工艺的优化 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 277-281.
- Dai S, Wu W, Xie X J. Optimal extraction of technology antioxidants in the leaves of *Perilla frutescens* by ultrasonic [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(8): 277-281.
- [20] 廖楠汐, 石德志, 肖莲莲, 等. 基于指标成分测定及指纹图谱模式识别的紫苏叶产地差异性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6355-6362.
- Liao N X, Shi D Z, Xiao L L, et al. Regional differences of *Perillae Folium* based on index component determination and fingerprint pattern recognition [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(18): 6355-6362.
- [21] 刘振杰, 丘海芯, 甘金月, 等. 紫苏叶 HPLC 指纹图谱建立及其抗流感病毒活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 287-296.
- Liu Z J, Qiu H X, Gan J Y, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Perillae Folium* and its spectrum-effect relationship of anti influenza virus activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(1): 287-296.
- [22] 路东波, 孔静, 李思潼, 等. 基于有效基准特征图谱质量表征模式的中药紫苏叶质量评价研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(2): 148-162.
- Lu D B, Kong J, Li S T, et al. Quality evaluation of *Perillae folium* based on representation model of effective characteristic spectrum of reference [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(2): 148-162.
- [23] 张良琦, 陈凡, 张子桢, 等. 基于网络药理学和 UPLC 指纹图谱的紫苏质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(10): 1800-1812.
- Zhang L Q, Chen F, Zhang Z A, et al. Prediction of Q-Marker in *Perilla frutescens* (L.) Britt based on UPLC fingerprint and network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev, 2024, 36(10): 1800-1812.
- [24] 王新勇, 何昱廷, 谢芳, 等. 千金藤素抗病毒作用的免疫学机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1232-1239.
- Wang J Y, He Y T, Xie F, et al. Immunological mechanism of antiviral effect of cepharanthine [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(6): 1232-1239.
- [25] 钱锦秀, 孟武威, 刘晖晖, 等. 经典名方中紫苏类药材的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(10): 55-67.
- Qian J X, Meng W W, Liu H H, et al. Textual research on *Perillae* in famous classical formulas [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(10): 55-67.
- [26] 李玉丽, 袁振仪, 尹周安, 等. 经典名方香苏散的关键信息考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024. Doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240818.
- Li Y L, Yuan Z Y, Yin Z A, et al. Historical evolution and key information research of classic formula Xiangsusan [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024. Doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240818.
- [27] Fei J L, Liang B, Jiang C Z, et al. Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1586-1592.
- [28] Wang T B, He Y, Li R C, et al. Rosmarinic acid mitigates acrylamide induced neurotoxicity via suppressing endoplasmic reticulum stress and inflammation in mouse hippocampus [J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155448.
- [29] Kuo Y T, Liu C H, Corona A, et al. The methanolic extract of *Perilla frutescens* robustly restricts Ebola virus glycoprotein-mediated entry [J]. Viruses, 2021, 13(9): 1793.
- [30] Tang W F, Tsai H P, Chang Y H, et al. *Perilla* (*Perilla frutescens*) leaf extract inhibits SARS-CoV-2 via direct virus inactivation [J]. Biomed J, 2021, 44(3): 293-303.

[责任编辑 兰新新]