

• 药理与临床 •

基于分子对接与实验验证的板蓝根及其活性成分抗乙型肝炎病毒作用机制研究

曹梦珍^{1,2}, 赵旭², 郑艳芳², 葛斐林², 思兰兰³, 李乐³, 王伽伯², 刘妍^{3*}, 肖小河^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610032

2. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 肝病医学部研究所, 北京 100039

3. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 感染病医学部研究所, 北京 100039

摘要: **目的** 通过体外实验评价板蓝根 *Isatidis Radix* 及活性成分 4-羟基-1*H*-吲哚-3-甲醛对乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的抑制作用, 并探索其基于调控视黄酸诱导基因蛋白 1-线粒体抗病毒信号蛋白 (retinoic acid-inducible gene 1-mitochondria antiviral signaling protein, RIG-I-MAVS) 信号通路的抗病毒机制。**方法** 采用 CCK-8 方法在 HBV 稳定复制细胞系 HepG2.2.15 细胞分析板蓝根毒性, 选择安全药物浓度进行抗 HBV 实验研究, 计算药物对 HBV DNA、乙型肝炎 E 抗原 (HBeAg)、乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的抑制率, 评价板蓝根抗病毒药效; 采用 Western blotting 方法检测板蓝根对宿主免疫相关 RIG-I-MAVS 信号通路中关键信号蛋白 RIG-I、MAVS、干扰素调节因子 7 (interferon regulated-factor 7, IRF7)、磷酸化 IRF7 (phosphorylated IRF7, p-IRF7) 表达水平的影响。基于 TCMSPP 数据库检索板蓝根中的活性成分, 使用 Schrödinger 软件将板蓝根活性成分与 RIG-I、MAVS、IRF7 蛋白进行分子对接, 初步筛选板蓝根中的抗 HBV 潜在活性成分, 选定分子对接结果中与靶标蛋白结合能力较强的活性成分进行抗 HBV 活性评价并对其作用机制进行探索。**结果** 板蓝根对 HepG2.2.15 细胞中 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 均具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 抑制率分别为 54.67%、23.29%、66.62%; 板蓝根可上调 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白的表达, 对 RIG-I 的上调作用最为显著 ($P < 0.001$); 分子对接结果显示, 4-羟基-1*H*-吲哚-3-甲醛与 RIG-I、MAVS、IRF7 蛋白具有较强的亲和力, 结合能分别为 -5.218、-6.525、-6.813 kJ/mol; 4-羟基-1*H*-吲哚-3-甲醛对 HepG2.2.15 细胞的 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的抑制率分别为 33.87%、28.14%、46.14%, 可促进 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白的表达。**结论** 板蓝根及活性成分 4-羟基-1*H*-吲哚-3-甲醛均可抑制 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的分泌, 可能通过上调 RIG-I-MAVS 信号通路发挥抗 HBV 作用。

关键词: 板蓝根; 4-羟基-1*H*-吲哚-3-甲醛; 乙型肝炎病毒; 抗病毒作用; RIG-I-MAVS 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)07-2127-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.012

Anti-hepatitis B virus effect and mechanism of *Isatidis Radix* and its active components based on molecular docking and experimental verification

CAO Meng-zhen^{1,2}, ZHAO Xu², ZHENG Yan-fang², GE Fei-lin², SI Lan-lan³, LI Le³, WANG Jia-bo², LIU Yan³, XIAO Xiao-he^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610032, China

2. Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

3. Department of Infectious Diseases, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To evaluate the inhibitory effect of Banlangen (*Isatidis Radix*) and its active component 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on hepatitis B virus (HBV) by *in vitro* experiments, and explore the antiviral mechanism based on regulation of retinoic

收稿日期: 2022-11-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81930110); 国家自然科学基金创新群体项目 (81721002); 河南省中医药科学研究专项 (2023ZY3040)

作者简介: 曹梦珍 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事临床中药学研究。Tel: (010) 66933231 E-mail: Caomengzhen1213@163.com

***通信作者:** 刘妍, 女, 副研究员, 主要从事病毒性肝炎等传染病诊断新技术及中药抗病毒作用研究。

Tel: (010)66933231 E-mail: liuyan5360@163.com

肖小河, 男, 研究员, 主要从事中药鉴定学和临床中药学研究。Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy_302@126.com

acid-inducible gene I-mitochondria antiviral signaling protein (RIG-I-MAVS) signaling pathway. **Methods** The toxicity of *Isatidi Radix* was analyzed in HBV stably-replicating cell line HepG2.2.15 cells by CCK-8 method, and anti-HBV experimental study was conducted under the safe drug concentrations. The inhibition rate of drugs on HBV DNA, HBeAg and HBsAg was calculated, and the antiviral efficacy of *Isatidi Radix* was evaluated. Western blotting was used to detect the effects of *Isatidi Radix* on expressions of RIG-I, MAVS, interferon regulated-factor 7 (IRF7) and phosphorylated IRF7 (p-IRF7), which were the key signaling proteins in host immune-related RIG-I-MAVS signaling pathway. Active compounds in *Isatidi Radix* were retrieved based on TCMS database, and were molecularly docked with RIG-I, MAVS and IRF7 proteins using Schrödinger software, so as to screen the potential anti-HBV active compounds in *Isatidi Radix*. The active components with strong binding ability to target proteins in molecular docking results were selected to evaluate their anti-HBV activity and their mechanism were explored. **Results** *Isatidi Radix* could significantly inhibit HBV DNA, HBeAg and HBsAg levels in HepG2.2.15 cells with inhibition rates of 54.67%, 23.29% and 66.62%, respectively. *Isatidi Radix* could up-regulate RIG-I, MAVS, IRF7 and p-IRF7 protein expressions, and the up-regulation of RIG-I was the most significant ($P < 0.001$). Molecular docking results showed that 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde had a strong affinity with RIG-I, MAVS and IRF7 proteins, and the binding energies were -5.218, -6.525 and -6.813 kJ/mol, respectively. The inhibition rates of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on HBV DNA, HBeAg and HBsAg of HepG2.2.15 cells were 33.87%, 28.14%, 46.14%, respectively, which could promote RIG-I, MAVS, IRF7 and p-IRF7 protein expression. **Conclusion** *Isatidi Radix* and its active ingredient 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde could inhibit HBV DNA, HBeAg and HBsAg levels, suggesting that they play anti-HBV roles by up-regulating RIG-I-MAVS signaling pathway.

Key words: *Isatidis Radix*; 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde; hepatitis B virus; antiviral efficacy; RIG-I-MAVS signaling pathway

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染仍是全球重大公共卫生问题,除了可导致慢性乙型肝炎,还与肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌等终末期肝病的发生密切相关^[1]。理想的慢性 HBV 感染治疗终点是获得“功能性治愈”,其定义为在抗病毒治疗结束后,乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 持续消失,HBV DNA 检测阴性,转氨酶水平持续正常和肝脏组织学情况的改善^[1]。我国已批准临床用于治疗 HBV 感染的药物主要分为 2 类,一类是干扰素 (interferon, IFN) 类,一类为核苷 (酸) 类似物 (nucleoside analogue, NAs)^[2]。然而 IFN 类药物不良反应较大,血清学转换及治愈率有限^[3],虽然 NAs 可有效抑制病毒复制并降低肝脏相关并发症的风险,但单独长期使用 NAs 容易产生耐药而影响疗效,此外其对 HBV 抗原抑制性较差,难以实现 HBsAg 清除,获得功能性治愈的概率很小 (仅为 0.5%)^[4]。因此寻找新的抗 HBV 治疗药物是当前临床面临的迫切需要。

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,性苦、寒,归心、胃经,具有清热解毒、凉血利咽的功效,常用于温疫时毒,发热咽痛,温毒发斑,痄腮,烂喉丹痧,大头瘟疫,丹毒,痈肿^[5]。板蓝根是中医临床上常用的清热解毒类中药,主要含有生物碱类、含硫化合物类、苯丙素类等 19 大类成分^[6]。以往研究表明,板蓝根具有抗流感病毒、抗单纯疱疹病毒、抗呼吸道合胞病毒、抗肝炎病毒、抗内毒素、抗氧化和调节免疫等多种药

理作用^[7-8],尤其抗病毒、抗炎药效显著,一直是国内外研究的热点^[6]。板蓝根颗粒药物血清在体外细胞培养中能使 HBV 稳定复制细胞系 HepG2.2.15 细胞减少分泌 HBsAg 和乙型肝炎 E 抗原 (HBeAg),作用 8 d 时能有效抑制 HBeAg 的分泌^[9]。板蓝根多糖对 HBV 有抑制作用,其可能是由于 IFN- α 依赖性的 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) /信号转导与转录激活子 (signal transducer and activator of transcriptions, STAT) 信号通路的激活和抗 HBV 蛋白表达的诱导^[10]。然而板蓝根对 HBV 具有抑制作用的具体活性成分及作用机制尚需进一步明确。

慢性 HBV 感染时宿主呈现免疫耐受状态,激活机体的固有免疫应答是有望实现 HBV 功能性治愈的重要治疗手段。视黄酸 (维甲酸) 诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene-I, RIG-I) 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 和 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是固有免疫中宿主细胞识别 HBV 的 2 类重要模式识别受体^[11],RLRs 和 TLRs 与其配体结合之后,构象发生改变,从而招募特异的位于细胞质的接头蛋白,激活信号级联反应,引起 I 型 IFN、促炎症细胞因子、趋化因子等一系列抗病毒因子的产生^[12]。研究表明,慢性 HBV 患者的树突状细胞的 RIG-I 表达量明显低于急性 HBV 患者及健康人 RIG-I 的表达量^[13];乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 作为去泛素化酶作用于 RIG-I 通路中的多个环节,使多个接头蛋白

激活受阻, 导致 I 型 IFN 产生障碍^[14], 提示 RIG-I 信号通路的激活对于 HBV 治疗具有重要意义。

本研究首先在 HepG2.2.15 细胞明确板蓝根对 HBV 的抑制作用, 进一步从 RIG-I-线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondria antiviral signaling protein, MAVS) 信号通路角度探讨板蓝根的抗病毒作用机制, 同时以该信号通路中的 RIG-I、MAVS、IFN 调节因子 7 (IFN regulated-factor 7, IRF7) 蛋白为靶点, 与板蓝根中的活性化合物进行分子对接, 初步筛选板蓝根中调控该信号通路的活性化合物, 从而明确板蓝根的抗 HBV 物质基础及作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

HepG2.2.15 细胞由解放军总医院第五医学中心感染病医学部研究所提供。

1.2 药材

板蓝根饮片 (批号 19092001) 购自北京绿野药业有限公司, 经解放军总医院第五医学中心肖小河研究员鉴定为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛 (批号 S76690, 质量分数为 97%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 替诺福韦酯 (tenofovir disoproxil, TDF, 批号 FE6X) 购自美国吉利德公司; CCK-8 试剂 (批号 KH741) 购自北仁化学科技有限公司; HBeAg 检测试剂盒 (批号 ZC00604)、HBsAg 诊断试剂盒 (批号 ZCY0503) 购自北京万泰生物有限公司; HBV 核酸测定试剂盒 (PCR-荧光探针法, 批号 C001) 购自北京纳捷诊断试剂有限公司; RIPA 裂解液 (批号 C1053) 购自北京普利莱基因技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 C190501) 购自北京阳光英锐生物科技有限公司; MAVS 多克隆抗体 (批号 ab220170) 购自英国 Abcam 公司; IRF7 多克隆抗体 (批号 4920s)、p-IRF7 多克隆抗体 (批号 5184s) 购自美国 CST 公司; RIG-I 多克隆抗体 (批号 ATUJA2101)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (批号 A01020) 购自 Abbkine 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 P21118)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 P21206) 购自北京全式金生物技术股份有限公司。

1.4 仪器

MSA36S 型分析天平 (德国 Sartorius 公司);

R502B 型旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); CV200 型真空冷冻干燥机、5410 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IX70 型荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); BCL-130A 型超净工作台 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司); Synergy H1 型板式酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 164-5052 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5200Multi 型全自动化学发光成像仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 给药溶液的制备

称取板蓝根饮片 85 g, 使用 80% 乙醇回流提取, 提取结束后使用旋转蒸发器浓缩至浸膏状再低温冷冻成粉末, 得黄色固态粉末共 19.23 g。细胞给药时使用 PBS 溶解, 并使用 0.22 μm 滤膜滤过, 然后将其配制成所需质量浓度的溶液。

2.2 药物的细胞毒性检测

将对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞完全贴壁后, 加入不同质量浓度 (0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 mg/mL) 板蓝根提取物或不同浓度 (0、5、10、20、40、80、160、320 μmol/L) 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛培养, 分别于给药后第 1、3、5 天, 加入 CCK-8 试剂, 采用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度 (*A*) 值, 计算不同浓度药物的细胞毒性, 评价药物在 HepG2.2.15 细胞中的安全浓度 (与药物未处理的对照组相比, 可维持 ≥95% 的细胞活力的最大浓度), 并计算半数细胞毒性浓度 (half-cytotoxic concentration, CC₅₀)。

2.3 药物抗 HBV 活性评价

2.3.1 抗原抑制实验 将对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 48 孔板, 待细胞完全贴壁后, 加入不同质量浓度 (0、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL) 板蓝根提取物或不同浓度 (0、5、10、20、40 μmol/L) 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛培养, 给药后第 5 天收集细胞上清, 按 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清中 HBeAg、HBsAg 水平, 计算药物对 HBeAg 和 HBsAg 的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3.2 HBV DNA 抑制实验 采用 PCR-荧光探针法检测细胞上清 HBV DNA, 计算药物对 HBV DNA 的抑制率, 根据给药 5 d 内 HBV DNA 抑制率最大值评价药物作用于 HepG2.2.15 细胞的最佳有效时间, 检测并计算药物在安全浓度及最佳有效时间下对 HepG2.2.15 细胞上清中 HBV DNA 和 HBeAg、

HBsAg 的抑制率, 此外选用 TDF (0、0.2、2、20、200 $\mu\text{mol/L}$) 作为阳性对照。

抑制率 = $1 - \text{给药组细胞上清 HBV DNA 滴度} / \text{对照组细胞上清 HBV DNA 滴度}$

2.4 药物对蛋白表达作用的验证实验

将对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后, 加入不同质量浓度 (0、0.4、0.8、1.6 mg/mL) 板蓝根提取物或不同浓度 (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛培养, 给药后第 5 天收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h, TBST 洗膜后分别加入 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7、GAPDH 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗膜后加入二抗, 室温孵育 1 h, 最后用 ECL 发光液显影, 使用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

2.5 板蓝根活性成分与潜在靶点间的分子对接

在 RCSB 蛋白质数据库 (PDB, <http://www.rcsb.org/>) 查找并下载 RIG-I、MAVS、IRF7 蛋白结构, 保存其 PDB 格式结构。采用中药系统药理学分析网络平台 (TCMSP)^[15] 检索板蓝根主要活性成分, 将其 mol2 格式结构保存作为配体。使用 Schrödinger 软件进行分子对接, 软件打开 PDB 格式的靶点蛋白

结构并对其进行对接前处理, 删去靶点蛋白的水分子, 去除蛋白多构象, 补充非完整的氨基酸残基, 为蛋白加氢, 导入的配体库后进行对接。对接结束后导出对接结果并根据 Docking score 进行排序, 一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生作用的可能性越大, 本研究根据 Docking score 结合能 $\leq -5 \text{ kJ/mol}$ 作为筛选标准选取活性成分, 将对结果进行可视化分析。

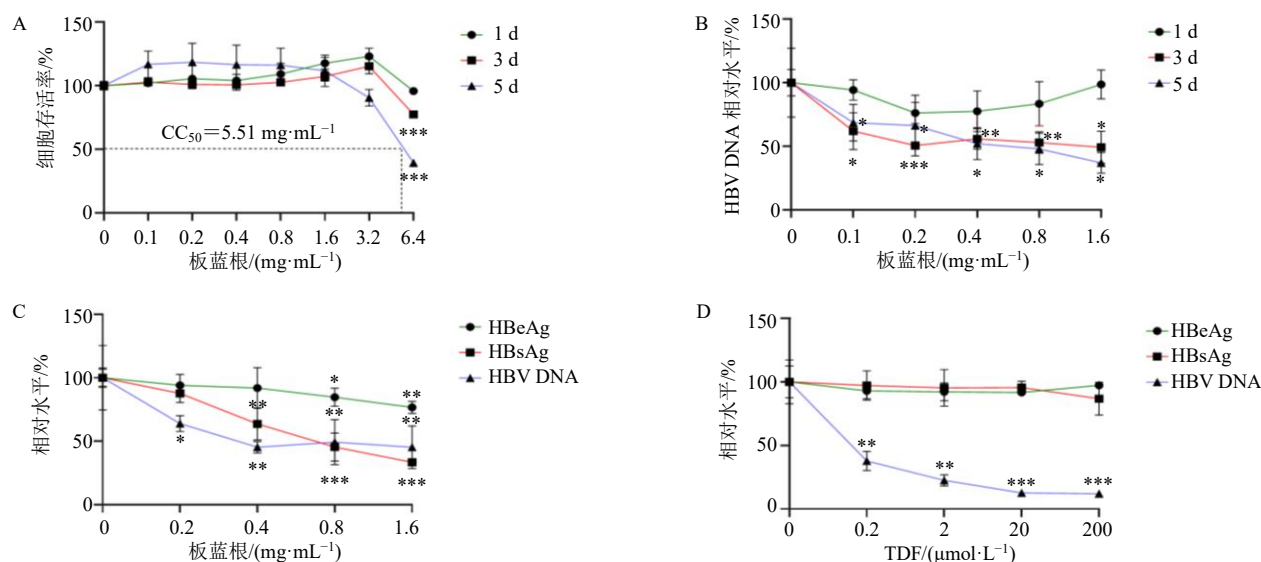
2.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理与统计分析, 采用 *t* 检验分析两样本间数据, 采用单因素方差分析比较组间数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 板蓝根在细胞模型中的抗 HBV 作用

体外实验结果显示, 板蓝根在 HepG2.2.15 细胞模型中的 CC_{50} 为 5.51 mg/mL, 最大安全质量浓度为 1.6 mg/mL (图 1-A), 板蓝根在给药后第 5 天的抗病毒作用最为显著 (图 1-B)。在 HepG2.2.15 细胞模型中, 板蓝根 (1.6 mg/mL) 对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的抑制率分别为 54.67%、23.29%、66.62% (图 1-C), TDF (200 $\mu\text{g/mL}$) 对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的抑制率分别为 95.25%、11.16%、9.26% (图 1-D)。



A-板蓝根对 HepG2.2.15 细胞存活率的影响 B-板蓝根不同作用时间对 HBV DNA 水平的影响 C-板蓝根对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 水平的影响 D-TDF 对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 水平的影响 与对照组 (板蓝根 0 mg/mL) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
A-effect of *Isatidis Radix* on survival rate of HepG2.2.15 cells B-effect of *Isatidis Radix* on level of HBV DNA in different time C-effect of *Isatidis Radix* on levels of HBV DNA, HBeAg and HBsAg D-effect of TDF on levels of HBV DNA, HBeAg and HBsAg * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group (*Isatidis Radix* 0 mg/mL), same as below figures

图 1 板蓝根对 HepG2.2.15 细胞的安全质量浓度及在最佳有效时间下对 HBV 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Safe concentration of *Isatidis Radix* on HepG2.2.15 cells and its inhibition effect on HBV under optimal effective time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 板蓝根对 RIG-I-MAVS 信号通路的调控作用

通过 Western blotting 方法对 RIG-I-MAVS 信号通路中各关键蛋白 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 的表达进行检测, 如图 2 所示, 板蓝根对 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白的表达均具有上调作用, 对 RIG-I 蛋白的上调作用较为显著 ($P < 0.05$ 、 0.001), 并且呈剂量相关性。

3.3 分子对接结果

在 PDB 数据库中检索的 RIG-I、MAVS、IRF7 的 PDB 格式结构分别为 RIG-I (PDB ID: 6KYV)、MAVS (PDB ID: 2VGQ)、IRF7 (PDB ID: 3QU3) 蛋白, 在 TCMSP 数据库中共检索到板蓝根的主要活性成分共 169 个, 使用 Schrödinger 软件将目标靶点与板蓝根主要活性成分对接后, 导出对接结果,

靶点 RIG-I、MAVS、IRF7 对接结果中结合能 ≤ -5 kJ/mol 的分别有 46、83、41 个活性成分。鉴于 IRF7 是 I 型 IFN 的上游因子, IRF7 的磷酸化可直接诱导产生具有抗 HBV 作用的 IFN, 推测与 IRF7 结合能力最强的板蓝根活性成分有较强的抑制 HBV 作用的潜力。对接结果显示, 与 IRF7 结合能力最强的是 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛。此活性成分与 RIG-I、MAVS 也均具有较强的结合能力, 与 RIG-I、MAVS 和 IRF7 的结合能分别为 -5.218 、 -6.525 、 -6.813 kJ/mol。

IRF7 与 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛的分子结合模式如图 3 所示, 化合物 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白两者间的疏水作用较弱, IRF7 蛋白对 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛不会产生较强的排斥作用 (图

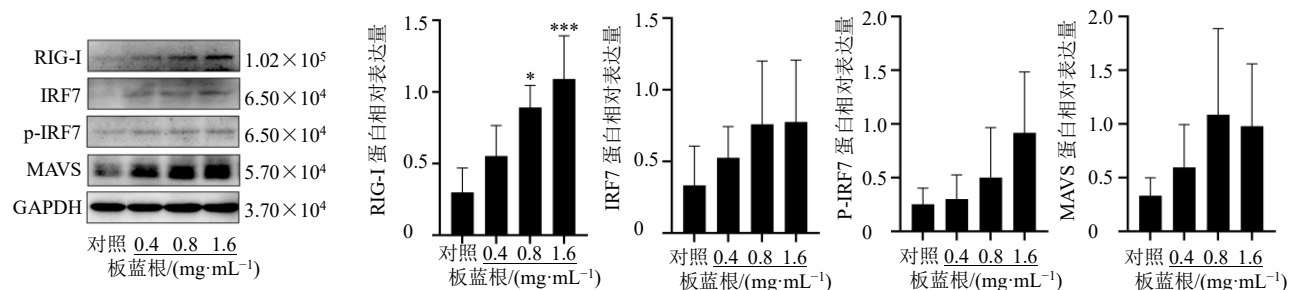
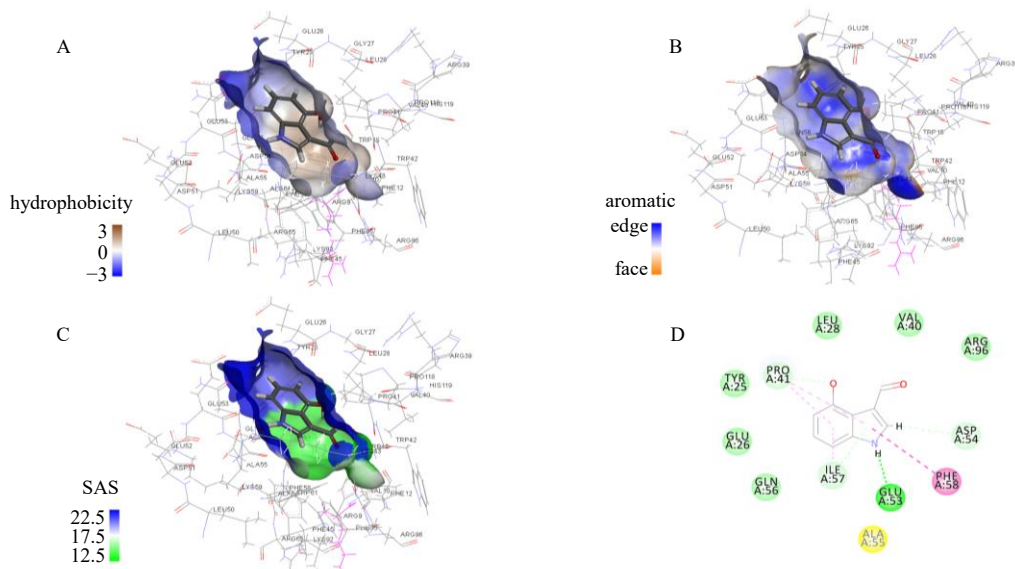


图 2 板蓝根对 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白表达的调控作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Regulation of *Isatis Radix* on RIG-I, MAVS, IRF7 and p-IRF7 protein expressions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白间的疏水性示意图 B-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白间的芳香性示意图 C-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白间的能级分布示意图 D-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白相互作用的 2D 结构示意图

A-schematic representation of hydrophobicity between 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde and IRF7 protein B-schematic representation of aromaticity between 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde and IRF7 protein C-schematic representation of energy level distribution between 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde and IRF7 protein D-schematic 2D structure of interaction between 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde and IRF7 protein

图 3 IRF7 蛋白与 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛的分子对接模式

Fig. 3 Molecular docking mode of IRF7 protein with 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde

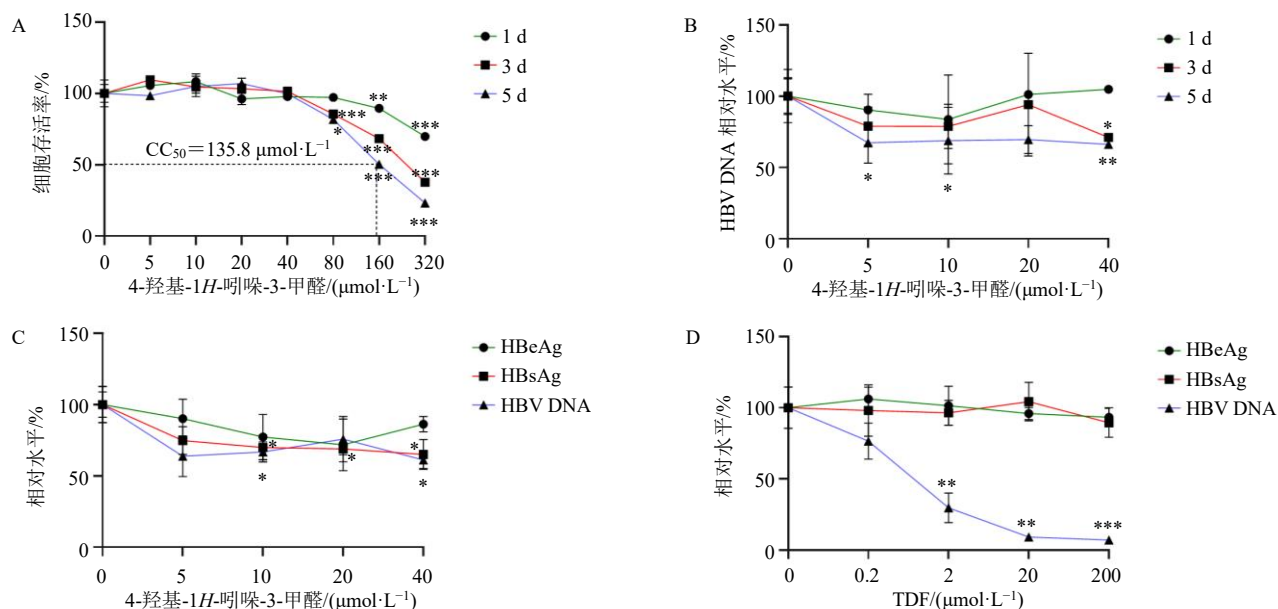
3-A), 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与 IRF7 蛋白的活性口袋具有较强结合能力, 芳香性较强, 且能量分布均衡 (图 3-B、C), IRF7 蛋白中的赖氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸与 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛间有 π - π 键结合、赖氨酸与其以 σ - π 结合, 此外还有谷氨酸、天冬氨酸与之形成氢键作用 (图 3-D)。

3.4 活性成分的抗 HBV 活性评价及机制探索

本研究通过分子对接方法初步筛选出潜在抗 HBV 活性化合物 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛, 与板蓝根同样, 基于 HBV 稳定复制细胞系 HepG2.2.15 细胞对其进行抗 HBV 活性评价。如图 4 所示, 4-羟基-

1*H*-吡咯-3-甲醛对 HepG2.2.15 细胞的 $CC_{50}=135.8 \mu\text{mol/L}$, 最大安全浓度为 $40 \mu\text{mol/L}$, 最佳作用时间与板蓝根同为第 5 天。在安全浓度下, 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛对 HBV DNA 的最大抑制率为 33.87%, 对 HBeAg、HBsAg 的抑制率分别为 28.14%、46.14%, 阳性对照药物 TDF 对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的最大抑制率分别为 93.0%、6.69%、10.55%。

此外, 为了比较 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与板蓝根抗 HBV 的异同及效率, 同时测定二者与 TDF 的抗 HBV 活性。如图 5 所示, 板蓝根、4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛、TDF 对 HepG2.2.15 细胞 HBV DNA 的



A-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛对 HepG2.2.15 细胞存活率的影响 B-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛不同作用时间对 HBV DNA 抑制率的影响 C-4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 抑制率的影响 D-TDF 对 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 抑制率的影响
A-effect of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on survival rate of HepG2.2.15 cells B-effect of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on level of HBV DNA in different time C-effect of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on levels of HBV DNA, HBeAg and HBsAg D-effect of TDF on levels of HBV DNA, HBeAg and HBsAg

图 4 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛对 HepG2.2.15 细胞的安全浓度及在最佳有效时间下对 HBV 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Safe concentration of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde in HepG2.2.15 cells and its inhibition effect on HBV under optimal effective time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

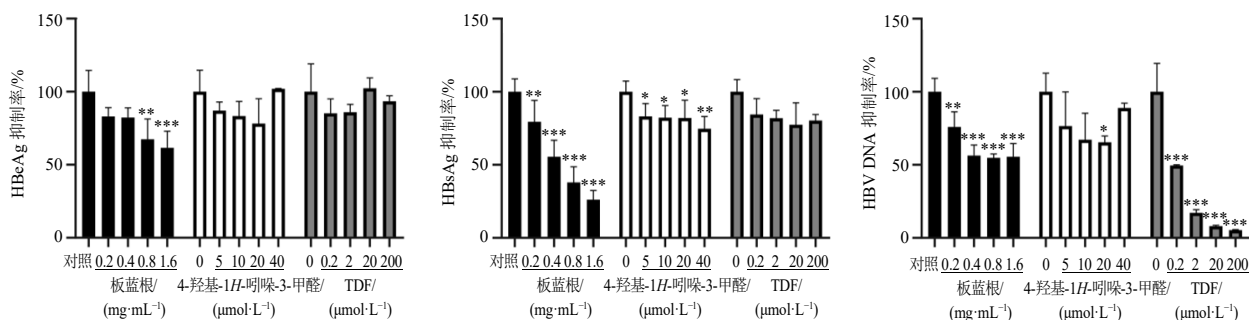


图 5 4-羟基-1*H*-吡咯-3-甲醛与板蓝根对 HBV 的抑制效率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Inhibition efficiency of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-formaldehyde and *Isatis Radix* on HBV ($\bar{x} \pm s, n=3$)

最大抑制率分别为 45.13%、34.6%、94.68%，对 HBeAg 的最大抑制率分别为 38.39%、21.78%、14.83%，对 HBsAg 的最大抑制率分别为 73.85%、25.35、22.57%。板蓝根和 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛均可以显著抑制 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 分泌 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，但 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛对 HepG2.2.15 细胞 HBeAg 的分泌无明显的抑制作用；此外二者均可以显著抑制 HBV DNA 的分泌 ($P <$

0.05、0.01、0.001)。

为了验证 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛对 RIG-I-MAVS 信号通路是否具有调控作用，采用 Western blotting 方法检测其处理细胞 5 d 后的蛋白样品中 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白的表达情况，如图 6 所示，4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛可不同程度上调 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白表达，对 RIG-I 蛋白的上调作用最为显著 ($P < 0.05$)。

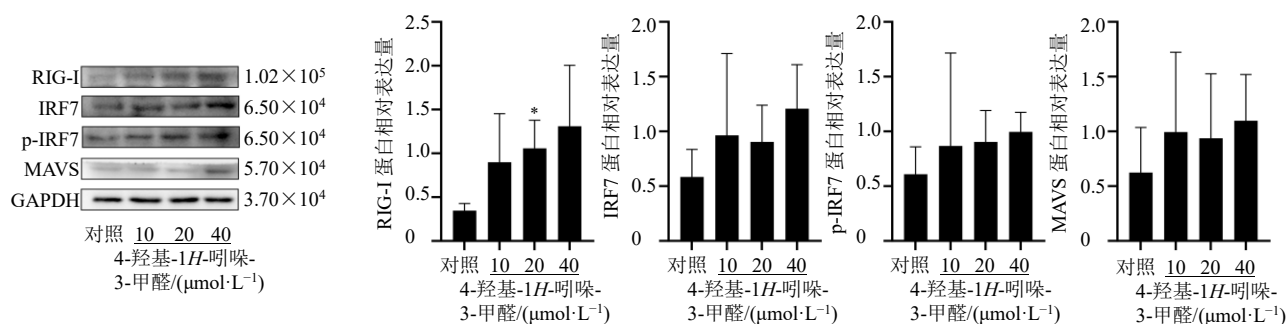


图 6 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛对 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白表达的调控作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Regulation of 4-hydroxy-1*H*-indole-3-carbaldehyde on RIG-I, MAVS, IRF7 and p-IRF7 protein expressions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

在 HBV 生命复制周期中，HBV 前基因组 RNA (pre-genomic RNA, pgRNA) 由感染肝细胞核内的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 转录产生。研究显示，RIG-I 可识别 pgRNA 并诱导 IFN- λ 的表达；此外，RIG-I 可依赖以 RNA 结合的方式阻止 HBV 聚合酶 P 蛋白与 pgRNA 的 5'- ϵ 区相互作用，从而抑制 HBV 复制，基于病毒 RNA-RIG-I 相互作用的先天防御机制，其中 RIG-I 不仅是激活 IFN 反应的 HBV 传感器，而且可作为一种直接的抗病毒因子发挥作用^[16]。在 RIG-I 通路中，RIG-I 首先识别外源 RNA 而被激活，然后通过半胱天冬酶募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 与位于线粒体外膜的 MAVS 的 CARD 结构域相互作用，MAVS 被激活后在线粒体上形成朊病毒样聚集体，募集下游激酶，从而磷酸化 IRF7，调节 IFNs 和干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的表达。IFN- β 可以通过招募 STAT1 与 STAT2 与 α/β 干扰素受体 (interferon- α/β receptor, IFNAR) 结合，导致这些分子的二聚、核易位和与 IRF9 结合，形成 ISG 因子 3 复合体。然后复合体结合到 ISG 启动子中 IFN 刺激的响应元件上，导致 ISG 转录的激活。通过这种方式，IFN- α/β 诱导数百个 ISGs 的表达，其中大量 ISGs 在细

胞内诱导抗病毒状态^[17]。

本研究通过分子对接的方法，选取机体固有免疫应答 RIG-I-MAVS 信号通路中的 RIG-I、MAVS、IRF7 作为激活诱导 I 型 IFN 分泌的抗 HBV 靶点，筛选了板蓝根中具有潜在抗 HBV 的活性成分，根据分子对接结果显示板蓝根中的 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛与 RIG-I、MAVS、IRF7 蛋白均有较强的相互作用，对其进行抗 HBV 生物活性验证，同时对其作用机制进行初步探索。板蓝根在 HBV 稳定复制 HepG2.2.15 细胞系上具有抑制 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 作用，4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛在 HepG2.2.15 细胞上也可一定程度上抑制 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的分泌。Western blotting 实验结果显示，板蓝根和 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛均上调了 RIG-I、MAVS、IRF7、p-IRF7 蛋白的表达。RIG-I 作为 IFN 通路激活表达的 ISG 基因，在 IFN 通路活化后也会增强表达，提示板蓝根及其活性成分 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛可能通过直接上调 RIG-I 蛋白表达，同时间接增加 RIG-I 等 IFN 信号通路分子的蛋白表达水平，进一步增强 IFN 信号通路的活化，执行其抗病毒作用。

综上，本研究通过分子对接技术与药理学实验结合，首次从 RIG-I-MAVS 信号通路的角度阐明了板蓝根的抗病毒作用免疫学机制，并初步发现其抗

病毒有效成分 4-羟基-1*H*-吡啶-3-甲醛, 为板蓝根的抗病毒临床应用与深入研究提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎临床治愈 (功能性治愈) 专家共识 [J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(4): 241-252.
- [2] Ge F L, Si L L, Yang Y, *et al*. Chinese patent medicine Liuweiwuling Tablet had potent inhibitory effects on both wild-type and entecavir-resistant hepatitis B virus (HBV) *in vitro* and effectively suppressed HBV replication in mouse model [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 756975.
- [3] 蔡梦芝, 秦刚. 抗 HBV 药物的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2302-2307.
- [4] Kim G A, Lim Y S, An J, *et al*. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: Clinical outcomes and durability [J]. *Gut*, 2014, 63(8): 1325-1332.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 214.
- [6] 聂黎行, 王馨平, 黄烈岩, 等. 板蓝根化学成分信息库的构建 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57(6): 428-452.
- [7] 刘敏超, 杨羚, 呼永河. 通过网络药理学和分子对接研究板蓝根治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用机制 [J]. 中药与临床, 2022, 13(2): 51-57.
- [8] 李咸慰, 宋沁洁, 杨新荣, 等. 板蓝根多糖抗病毒作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6227-6233.
- [9] 叶军, 明安萍. 板蓝根颗粒药物血清对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(6): 10-12.
- [10] Wang T B, Wang X W, Zhuo Y, *et al*. Antiviral activity of a polysaccharide from *Radix Isatidis* (*Isatis indigotica* Fortune) against hepatitis B virus (HBV) *in vitro* via activation of JAK/STAT signal pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112782.
- [11] Yoneyama M, Fujita T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors [J]. *Immunity*, 2008, 29(2): 178-181.
- [12] 张煜, 钟波, 杨艳, 等. TLRs 与 RLRs 介导的细胞抗病毒反应信号转导及其调节机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(4): 453-468.
- [13] 赵钢德, 谢青, 王晖, 等. 乙型肝炎病毒感染者单核细胞来源的树突状细胞中维甲酸诱导基因-1 的表达及功能 [J]. 中华传染病杂志, 2009, 27(12): 727-732.
- [14] Jiang J Y, Tang H. Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(12): 1106-1117.
- [15] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al*. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [16] Sato S, Li K, Kameyama T, *et al*. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus [J]. *Immunity*, 2015, 42(1): 123-132.
- [17] Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, *et al*. IRF family of transcription factors as regulators of host defense [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 623-655.

[责任编辑 李亚楠]