

土木香内酯抗病毒作用的体内外研究

李艺颖¹, 初英杰^{1#}, 孔令东², 谢芳¹, 何昱廷², 刘霞¹, 李俊良¹, 罗政², 周义翔¹, 王遥^{1*}

1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 探索土木香内酯体内外的抗病毒作用, 并基于 I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 通路探究其抗病毒作用机制。方法 CCK-8 法检测土木香内酯对 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 (vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein, VSV-GFP) 感染细胞模型, 结合流式细胞术检测土木香内酯对病毒复制的影响; qRT-PCR 检测土木香内酯对甲型流感病毒 (influenza A virus, H1N1)、脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 复制的影响; Western blotting 检测土木香内酯对 VSV 病毒 G 蛋白和 H1N1 病毒 NP 蛋白表达的影响; 利用生物信息学初步分析土木香内酯的抗病毒分子机制; qRT-PCR 检测药物处理后干扰素 $\alpha 1$ (interferon $\alpha 1$, *Ifna1*)、干扰素 $\beta 1$ (interferon $\beta 1$, *Ifnb1*)、干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, *Ifit1*)、干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *Isg15*) 的 mRNA 表达变化; 流式细胞术和 qRT-PCR 检测 I 型干扰素受体 1 (type I interferon receptor 1, IFNAR1) 敲除 (*Ifnar1*^{-/-}) 细胞中, 土木香内酯的抗病毒作用与干扰素信号通路的关系; 构建小鼠 H1N1 病毒滴鼻感染模型探究土木香内酯的体内抗病毒作用。结果 土木香内酯体外抑制 VSV、H1N1 和 EMCV 病毒复制; 土木香内酯激活 IFN-I 信号通路; 在 *Ifnar1*^{-/-} 细胞中土木香内酯抗病毒作用被削弱; 土木香内酯提高 H1N1 感染小鼠的存活率, 降低脏器 H1N1 病毒载量。结论 土木香内酯激活基于 IFN-I 信号通路的抗病毒天然免疫反应, 发挥抵抗多种病毒复制的作用。

关键词: 土木香内酯; 抗病毒先天免疫; 干扰素; 干扰素刺激基因; 病毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)07-2248-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.012

Antiviral effects of alantolactone *in vitro* and *in vivo*

LI Yiyang¹, CHU Yingjie¹, KONG Lingdong², XIE Fang¹, HE Yuting², LIU Xia¹, LI Junliang¹, LUO Zheng², ZHOU Yixiang¹, WANG Yao¹

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

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

Abstract: Objective To explore the antiviral effects of alantolactone *in vitro* and *in vivo*, and investigate its mechanism based on type I interferon (IFN-I) pathway. **Methods** The CCK-8 assay was used to evaluate the effect of alantolactone on viability of A549 cells. The vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein (VSV-GFP) was employed to infect cells to establish a model, and flow cytometry was used to assess the influence of alantolactone on virus replication. qRT-PCR was conducted to measure the effects of alantolactone on the replication of influenza A virus (H1N1) and encephalomyocarditis virus (EMCV). Western blotting was performed to determine the effect of alantolactone on the expressions of VSV G protein and H1N1 NP protein. Bioinformatics was used to investigate the antiviral molecular mechanism of alantolactone. qRT-PCR was employed to measure the mRNA expressions of interferon $\alpha 1$ (*Ifna1*), interferon $\beta 1$ (*Ifnb1*), interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (*Ifit1*) and interferon stimulated gene 15 (*Isg15*) after alantolactone treatment. Flow cytometry and qRT-PCR were used to investigate the relationship between the antiviral effects of alantolactone and the interferon signaling pathway in type I interferon receptor 1 (IFNAR1) knockout cells (*Ifnar1*^{-/-}). To investigate the antiviral effects of alantolactone *in vivo*, a mouse model of H1N1 virus intranasal infection was

收稿日期: 2023-10-13

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 (CACM-2023-QNRC2-A02); 北京市自然科学基金资助项目 (7242239)

作者简介: 李艺颖 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为抗病毒药理。E-mail: 18239205569@163.com

#共同第一作者: 初英杰, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: 20220931207@bucm.edu.cn

*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

established. **Results** Alantolactone exhibited inhibition of VSV, H1N1 and EMCV virus replication *in vitro*. Alantolactone activated IFN-I signaling pathway. The antiviral effects of alantolactone were weakened in *Ifnar1*^{-/-} cells. Alantolactone increased the survival rate of H1N1-infected mice and reduced the viral load of H1N1 in organs. **Conclusion** Alantolactone activates the antiviral innate immune response based on IFN-I signaling pathway, exhibiting the ability to resist the replication of various viruses.

Key words: alantolactone; antiviral innate immunity; interferon; interferon stimulating genes; virus

土木香是菊科植物土木香 *Inula helenium* L. 的干燥根,为蒙医常用清热类药,收录于《中国药典》2020年版、《本草纲目拾遗》等^[1],其味苦、甘、辛,性平,具有解巴达干热、清赫依血相证、开胃止痛、温中消食的功效,并作为多种蒙药复方中主药,用于瘟疫热症的治疗。如四味土木香散为治疗瘟疫热症的经典方和基础方,于1977年被载入《中国药典》^[2-5]。该方清瘟解表,用于瘟疫初期发冷发热、头痛咳嗽、咽喉肿痛的治疗。土木香内酯是从土木香中提取出的倍半萜烯内酯类小分子化合物,是《中国药典》2020年版中规定的土木香主要的药效和质量评价成分,分子式为C₁₅H₂₀O₂。现代药理学研究表明,土木香内酯对细菌、真菌具有明显的抵抗活性,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌具有较佳的抑菌作用;土木香内酯能够通过抑制核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB)和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路发挥抗炎功能。然而,作为土木香主要活性成分的土木香内酯,对其临床相关的抗病毒感染作用与机制的研究仍未见报道,很大程度上限制了土木香及其活性成分药用价值的提升。

抗病毒天然免疫反应是宿主抵御病毒入侵的第一道防线^[6]。病毒释放基因组进入细胞质,宿主细胞通过模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别并结合病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP),将病毒入侵信号传给接头蛋白 (MAVS/STING),进而激活转录因子干扰素调节因子3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 和 IRF7 转位入核,启动 I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 的转录和表达。环鸟苷酸-腺苷酸合酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) -STING 信号轴由第二信使 cGAS 和干扰素基因 STING 的环鸟苷酸-腺苷酸受体刺激物组成,可检测致病 DNA,以触发先天免疫反应,涉及针对微生物感染的强 IFN-I 反应^[7]。在细胞质中,视黄酸诱导基因-I 样受体 (retinoic acid-inducible gene I-like receptor, RLR)、视黄酸诱导基因-I (retinoic acid-inducible gene I,

RIG-I) 和黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5) 感知与病毒感染相关的非典型 RNA^[8-9],通过接头分子 MAVS 触发信号级联反应,翻译产生 IFN-I,干扰素分泌到细胞外,与细胞膜表面的干扰素受体 [I 型干扰素受体 1 (type I interferon receptor 1, IFNAR1)、I 型干扰素受体 2 (type I interferon receptor 2, IFNAR2)] 结合,激活 JAK 激酶 (Janus kinase, JAK) -信号传导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路,并诱导大量干扰素刺激基因 (interferon stimulated genes, ISGs) 表达,这些 ISGs 可在病毒生命周期的各个阶段包括入侵、复制、装配和释放发挥广泛的抗病毒作用^[10]。

本研究通过构建多种病毒感染的细胞模型,发现土木香内酯对水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)、甲型流感病毒 (influenza A virus, H1N1)、脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 等病毒复制的体外抑制作用。此外,通过构建小鼠 H1N1 病毒滴鼻感染模型,发现土木香内酯能够提高感染小鼠的存活率,降低肺组织中 H1N1 的病毒载量。本研究利用分子生物学及免疫学研究手段,初步阐明土木香内酯通过活化抗病毒天然免疫信号通路抵抗病毒复制的免疫药理机制。为土木香及蒙药四味土木香散的抗病毒临床应用提供了重要的科学数据支撑,为相关药物未来的科学开发打下了坚实的基础。

1 材料

1.1 细胞与病毒

人肺上皮细胞系 A549 细胞购自美国 ATCC 公司; IFNAR1 敲除 A549 细胞 (*Ifnar1*^{-/-} A549) 由本实验室构建^[11]; 小鼠原代成纤维 MEF 细胞来源于本实验室冻存; VSV (印第安纳株)、VSV-GFP、H1N1 (PR8 株)、EMCV 均来自本实验室,病毒扩增后置于-80 °C 保存。

1.2 动物

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

生产许可证 SCXK (京) 2019-0010。动物于室温 (23±2) °C、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-2023120501-4152)。

1.3 药品与试剂

土木香内酯(质量分数≥98.0%, 批号 PS1852-0025) 购自成都普思生物科技股份有限公司; 达菲® 磷酸奥司他韦胶囊(以奥司他韦计 75 mg/粒, 批号 0221906016) 购自宜昌长江药业有限公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D4540) 购自美国 Sigma 公司; IFN 刺激性 DNA(interferon stimulatory DNA, ISD, 批号 t1rl-isdn)、聚乙烯亚胺(PEI, 批号 BMS1003-A)、Trizol 试剂(批号 15596018) 均购自美国 Invitrogen 公司; Evo M-MLV RT Kit(批号 AG11711)、SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR 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, 批号 15140-122)、胎牛血清(批号 2358184P) 购自美国 Gibco 公司; 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 细胞消化液(批号 T1300) 购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(批号 CK04) 购自东仁化学科技(上海)有限公司; VSV-G tag 重组抗体(批号 ab183497)、H1N1 Influenza A virus Nucleocapsid protein(H1N1-NP) 抗体(批号 104870) 购自英国 Abcam 公司; 超敏 ELC 发光液(批号 WBKLS0500) 购自美国 Millipore 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 M21002) 购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司。

1.4 仪器

CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、PowerPac 型基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); NANODROP ONEc 型分光光度计、Sorvall™ Legend™ Micro 21R 型微量离心机、300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; Mill-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ZHCH-C1115B 型超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司); SKL180-Pro 型数控线性摇床[大龙兴创实验仪器(北京)股份公

司]; EPS-300 型数显式稳压稳流电泳仪(天能公司); SCL-VS 型可调式混匀仪(美国 Scilogex 公司); 1CKX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物的配制

取土木香内酯 25 mg, 加入 1.076 1 mL DMSO, 充分振荡, 37 °C 超声 60 min 后即为 100 mmol/L 母液, 分装后储存于-80 °C 备用。根据具体使用浓度计算所需母液体积, 按照一定比例用 DMEM 完全培养基稀释至使用浓度, 充分涡旋振荡后, 加入细胞使用。

2.2 细胞活力测定

A549 细胞以每孔 2.5×10^4 个的密度接种于 96 孔板, 培养过夜使细胞完全贴壁; 配制 0.078 125、0.156 250、0.312 500、0.625 000、1.250 000、2.500 000、5.000 000、10.000 000、20.000 000、40.000 000、80.000 000 $\mu\text{mol/L}$ 的土木香内酯溶液加入细胞中, 同时设置仅加入 DMEM 的空白组(不含细胞)和 0.1% DMSO 溶剂对照组(含细胞), 每孔设置 3 个复孔, 于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养; 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 30 min, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

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

2.3 流式细胞术检测土木香内酯对 A549 细胞中 VSV-GFP 病毒复制的影响

A549 细胞以每孔 1.2×10^5 个密度接种于 24 孔板, 培养过夜至细胞贴壁后, 设置对照组、模型组和土木香内酯(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组, 除对照组外, VSV-GFP 以 0.05 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染各组细胞^[11], 同时加药共同孵育, 对照组和模型组加入 DMSO。孵育 12 h 后用预冷 PBS 清洗细胞 2 次, 加入 100 μL 胰酶消化, 收集细胞至流式管, 采用流式细胞仪上机检测 GFP 阳性细胞比例。

2.4 荧光显微镜检测土木香内酯对 A549 细胞中 VSV-GFP 病毒复制的影响

细胞接种、分组同“2.3”项, 除对照组外, VSV-GFP 以 MOI=0.1 感染各组细胞^[11], 同时加药共同孵育, 对照组和模型组加入 DMSO。孵育 24 h 后, 采用荧光显微镜检测土木香内酯对 VSV-GFP 的抑制作用。

2.5 qRT-PCR 检测土木香内酯对 EMCV、H1N1 病毒 mRNA 表达的影响

细胞接种、分组同“2.3”项, 分别使用 H1N1

(MOI=0.05)、EMCV (MOI=3) 感染细胞^[11], 同时加药共同孵育。共同孵育 12 h 后, 收集细胞, 加入

Trizol 试剂提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 检测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 sequences

基因	序列 (5'→3')	
<i>ACTB</i>	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>β-actin</i>	F: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	R: GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Ifnb1</i>	F: AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	R: GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
<i>Ifna1</i>	F: TCCCCTCTCTCTGCTGAAAG	R: GAGGGTTGTATTCCATGCAGCA
<i>Isg15</i>	F: GGTGTCCGTGACTAACTCCAT	R: CTGTACCACTAGCATCACTGTG
<i>Ifit1</i>	F: ATCGCGTAGACAAAGCTCTTC	R: GTTTCGGGATGTCTCAGTTG
<i>VSV-G</i>	F: CAAGTCAAATGCCAAAGAGTCACA	R: TTTCTTGCATTGTTCTACAGATGG
<i>H1N1-HA</i>	F: CCCGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA	R: GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
<i>EMCV-1C</i>	F: CCGCGATGATGAAGGGCAAG	R: CGGGCATCCTGGTGGGTAAGT

2.6 Western blotting 检测土木香内酯对 VSV-G 和 H1N1-NP 蛋白表达的影响

收集不同浓度 (5、10、20 μmol/L) 土木香内酯和不同时间 (0、8、12、16 h) 处理后的病毒感染细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 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 °C 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。

2.7 土木香内酯对 VSV-GFP、H1N1 和 EMCV 病毒复制周期的影响

细胞接种同“2.3”项, 过夜培养后, 设置对照组、模型组和土木香内酯 (5、10、20 μmol/L) 组。土木香内酯使用病毒感染前预处理 12 h、病毒吸附 2 h 过程中、病毒吸附后 3 种不同方式给药, 加入 VSV-GFP (MOI=0.05) 或 H1N1 (MOI=0.05) 或 EMCV (MOI=3) 感染 12 h, 通过流式细胞术检测土木香内酯对 VSV-GFP 病毒复制的影响, 通过 qRT-PCR 检测土木香内酯对 EMCV、H1N1 病毒复制的影响。

2.8 RNA 测序及转录组学分析

MEF 细胞接种于 12 孔板, 培养过夜后, 加入 DMSO (对照组) 或 20 μmol/L 土木香内酯处理 12 h, 收集细胞, 加入 Trizol 试剂提取 RNA, 然后反转录为 cDNA 进行测序。使用 HiSeq NGS Ultima Dualmode mRNA Library Prep Kit for Illumina (Yeasen 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 (false discovery rate, FDR) <0.05 且 |log₂FC| >1 的基因被认为是差异表达基因。

2.9 qRT-PCR 检测土木香内酯对 ISGs mRNA 表达的影响

MEF 细胞以每孔 1×10⁵ 个的密度接种于 12 孔板, 培养过夜后, 加入 DMSO (对照组) 或 5、10、20 μmol/L 土木香内酯处理 12 h, 收集细胞, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 检测干扰素 α1 (interferon α1, *Ifna1*)、干扰素 β1 (interferon β1, *Ifnb1*)、干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, *Ifit1*)、*Isg15* 的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

2.10 土木香内酯对 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中 VSV-GFP、H1N1、EMCV 病毒复制的影响

A549 细胞和 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞分别以每孔 1.2×10⁵ 个密度接种于 24 孔板, 培养过夜至细胞贴壁后, 设置对照组、模型组和土木香内酯 (5、10、20 μmol/L) 组, 使用 VSV (MOI=0.05)、EMCV (MOI=3)、H1N1 (MOI=0.05) 感染细胞^[11], 同时加药共同孵育。共同孵育 12 h 后, 通过流式细胞术检测 A549 细胞和 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中给予土木香内酯对 GFP 阳性细胞比率的影响, 或者通过 qRT-PCR 检测这 2 种细胞中给予土木香内酯对 H1N1 和 EMCV 病毒复制的影响。

2.11 土木香内酯对流感病毒感染小鼠的保护作用

将小鼠随机分为对照组、模型组、土木香内酯 (30 mg/kg) 组和磷酸奥司他韦胶囊 (40 mg/kg) 组, 每组

10只。小鼠适应性饲养1周后,除对照组外,其余小鼠于实验第0天滴鼻接种H1N1病毒(50 μL/只)建立流感病毒感染小鼠模型。各给药组ig相应药物,对照组和模型组ig生理盐水,1次/d,连续14 d。给药组小鼠第7天每组随机选取5只小鼠处死,采集小鼠肺组织,经Trizol法提取总RNA, qRT-PCR检测肺组织中H1N1的mRNA表达水平。统计各组剩余小鼠存活天数及死亡数,计算存活率。

2.12 统计学分析

数据用GraphPad Prism软件进行可视化处理,

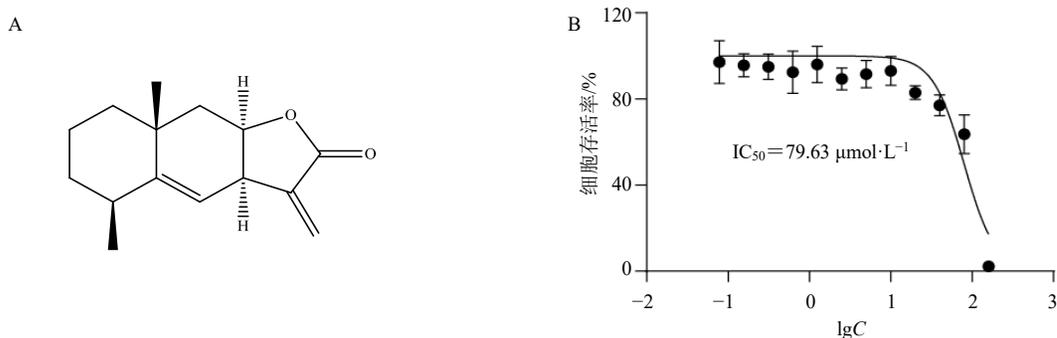


图1 土木香内酯结构式(A)及其对A549细胞存活率(B)的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Structure of alantolactone (A) and its effect on survival rate (B) of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 土木香内酯对VSV病毒复制的影响

如图2-A所示,与对照组比较,VSV-GFP感染引起了A549细胞GFP阳性细胞比例的增加($P < 0.001$);与模型组比较,土木香内酯呈剂量相关性地减少了GFP阳性细胞的比例($P < 0.001$),尤其在浓度为20 μmol/L时抑制病毒复制的效果显著,GFP阳性细胞即被感染细胞的比例降低至5.74%。随后,使用荧光显微镜检测了土木香内酯对VSV-GFP感染的细胞绿色荧光强度的影响,如图2-B所示,与模型组比较,土木香内酯可以显著抑制VSV-GFP的荧光强度($P < 0.001$);此外,检测了土木香内酯对野生型VSV的抑制作用,如图2-C、D所示,与模型组比较,土木香内酯在剂量和时间梯度上降低了VSV-G蛋白表达。表明土木香内酯能够在细胞水平有效抑制VSV的复制。

3.3 土木香内酯对EMCV、H1N1病毒复制的影响

为了探究土木香内酯对不同病毒的抑制作用,利用EMCV、H1N1感染A549细胞,同时加入土木香内酯处理12 h。通过qRT-PCR技术检测病毒基因拷贝情况,如图3-A、B所示,与对照组比较,模型组病毒基因的拷贝数均显著升高($P < 0.001$);与模型组

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

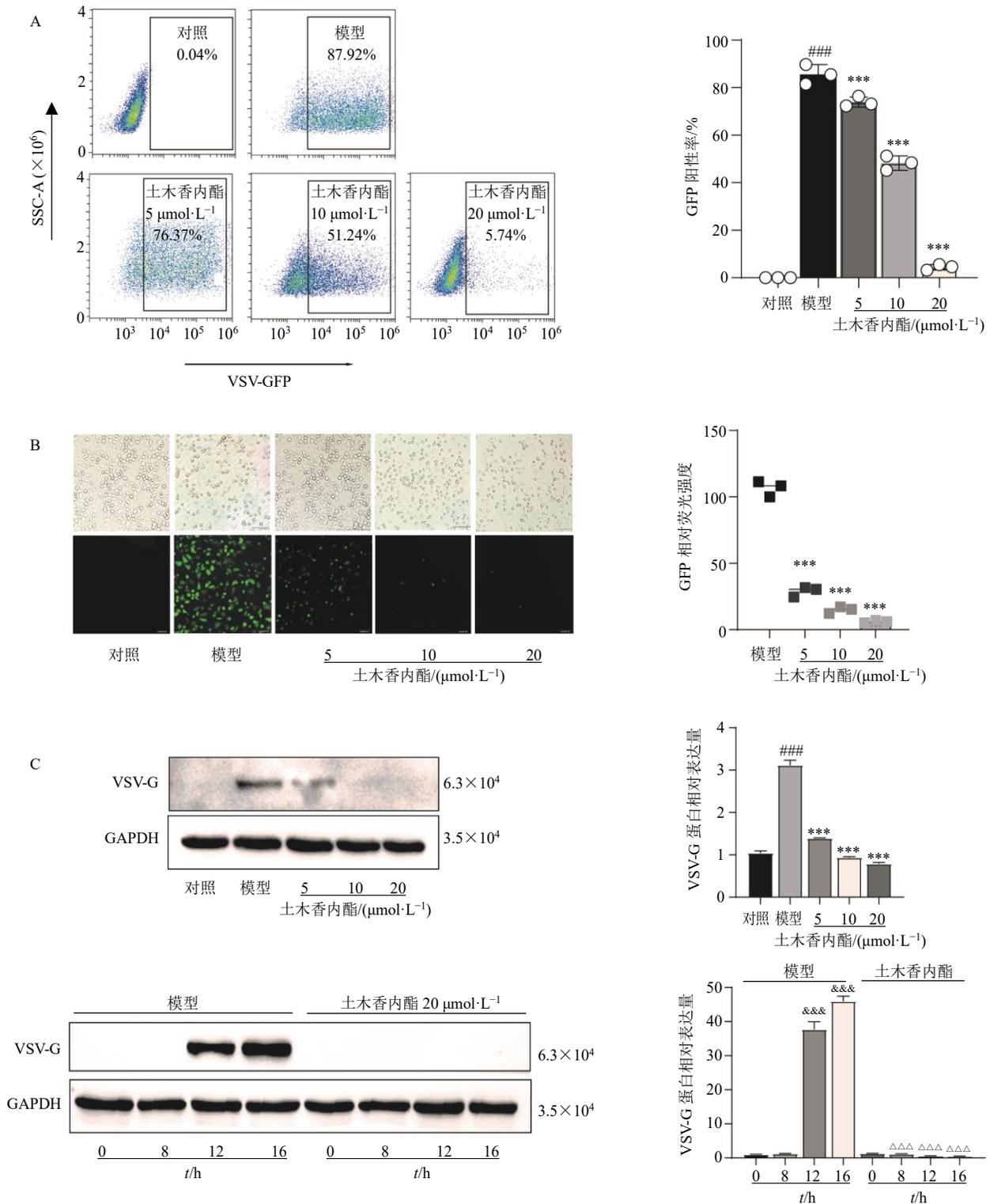
3.1 土木香内酯对A549细胞存活率的影响

通过CCK-8法检测不同浓度的土木香内酯处理24 h后,对A549细胞存活率的影响,计算得到半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50})为79.63 μmol/L(图1)。后续选取无明显细胞毒性的低、中、高浓度(5、10、20 μmol/L)进行实验。

比较,土木香内酯组病毒基因的拷贝数均显著降低($P < 0.001$)。如图3-C所示,土木香内酯在剂量和时间梯度上明显抑制了H1N1-NP蛋白表达,表明土木香内酯显著抑制EMCV、H1N1病毒的复制。

3.4 土木香内酯作用于VSV-GFP、EMCV、H1N1病毒复制周期的多个阶段

为了探究土木香内酯对VSV-GFP、EMCV、H1N1病毒复制周期不同阶段的影响,设置了不同的加药方式(图4-A),分别对细胞进行了预处理、病毒吸附过程中给药、病毒吸附后给予土木香内酯。结果表明,预处理给予土木香内酯处理下,与模型组比较,土木香内酯预给药组可以抑制VSV-GFP、EMCV、H1N1病毒复制($P < 0.01$ 、 0.001 ,图4-B、E、H);在病毒吸附的过程中给药时,与模型组比较,病毒复制水平没有显著性变化(图4-C、F、I);在病毒吸附后给药,与模型组比较,土木香内酯可以显著抑制VSV-GFP、EMCV、H1N1病毒复制($P < 0.01$ 、 0.001 ,图4-D、G、J)。上述结果表明,土木香内酯对VSV-GFP、EMCV和H1N1病毒的吸附过程没有影响,而预处理或吸附后给药可以显著抑制VSV-GFP、EMCV、H1N1病毒复制。

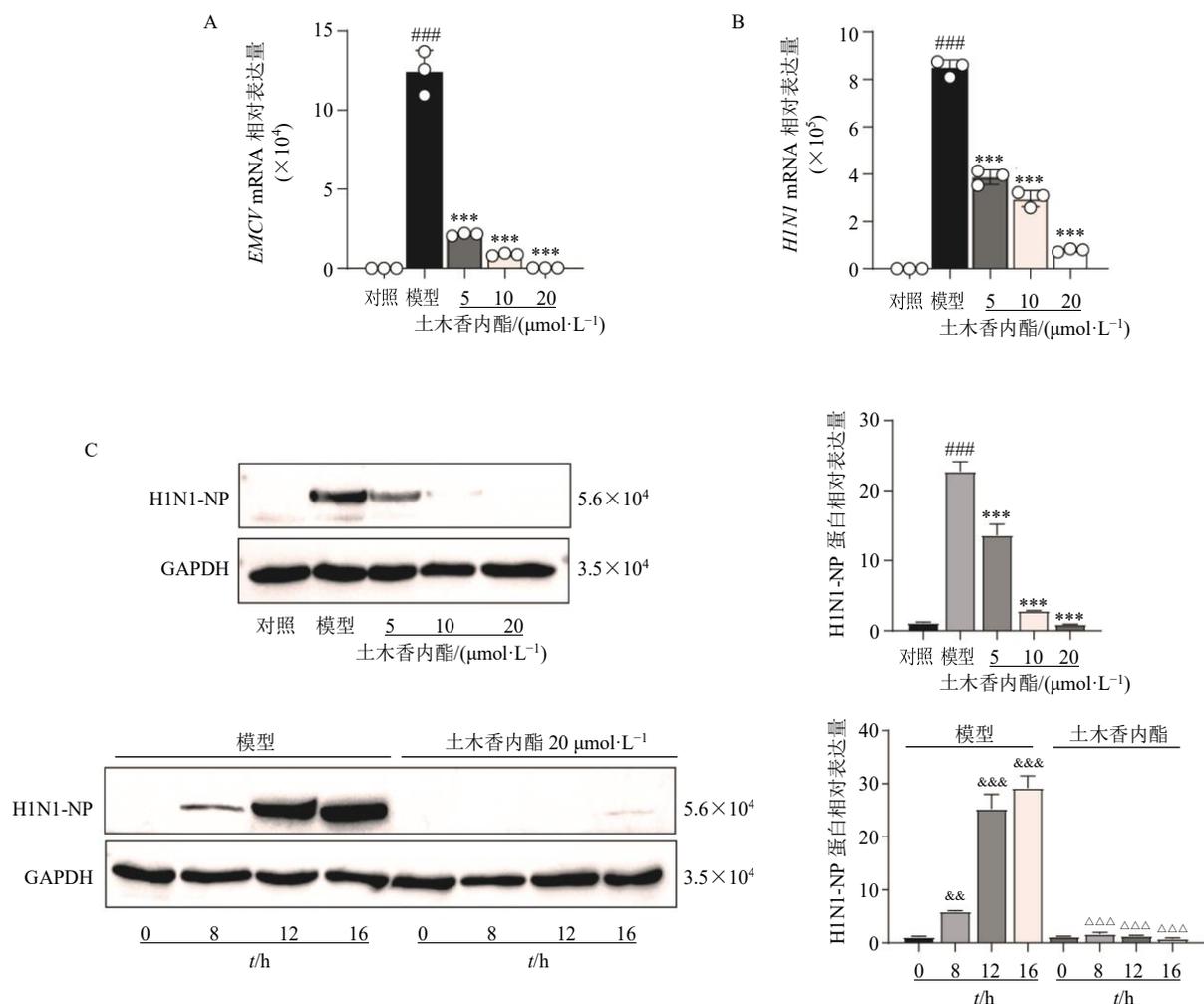


A-流式细胞仪检测土木香内酯对 VSV-GFP 病毒复制的影响; B-荧光显微镜检测土木香内酯对 VSV-GFP 病毒复制的影响; C-Western blotting 检测土木香内酯对 VSV-G 蛋白表达的影响; 与对照组比较: $###P < 0.01$ $####P < 0.001$; 与模型 (病毒感染) 组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$; 与处理 0 h 组比较: $&&P < 0.01$ $&&&P < 0.001$; 与模型组相同处理时间比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 图 3、4、7、8 同。

A-effect of alantolactone on VSV-GFP virus replication by flow cytometry; B-effect of alantolactone on VSV-GFP virus replication by fluorescence microscopy; C-effect of alantolactone on VSV-G protein expression by Western blotting; $###P < 0.01$ $####P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model (viral infection) group; $&&P < 0.01$ $&&&P < 0.001$ vs 0 h group; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs model group at the same time, same as Figs. 3, 4, 7, 8.

图 2 土木香内酯对 A549 细胞中 VSV 病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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



A、B-qRT-PCR 检测土木香内酯对 EMCV 和 H1N1 病毒复制的影响；C-Western blotting 检测土木香内酯对 H1N1-NP 蛋白表达的影响。
A, B-effect of alantolactone on EMCV and H1N1 virus replication by qRT-PCR; C-effect of alantolactone on H1N1-NP protein expression by Western blotting.

图 3 土木香内酯对 A549 细胞中 H1N1、EMCV 病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

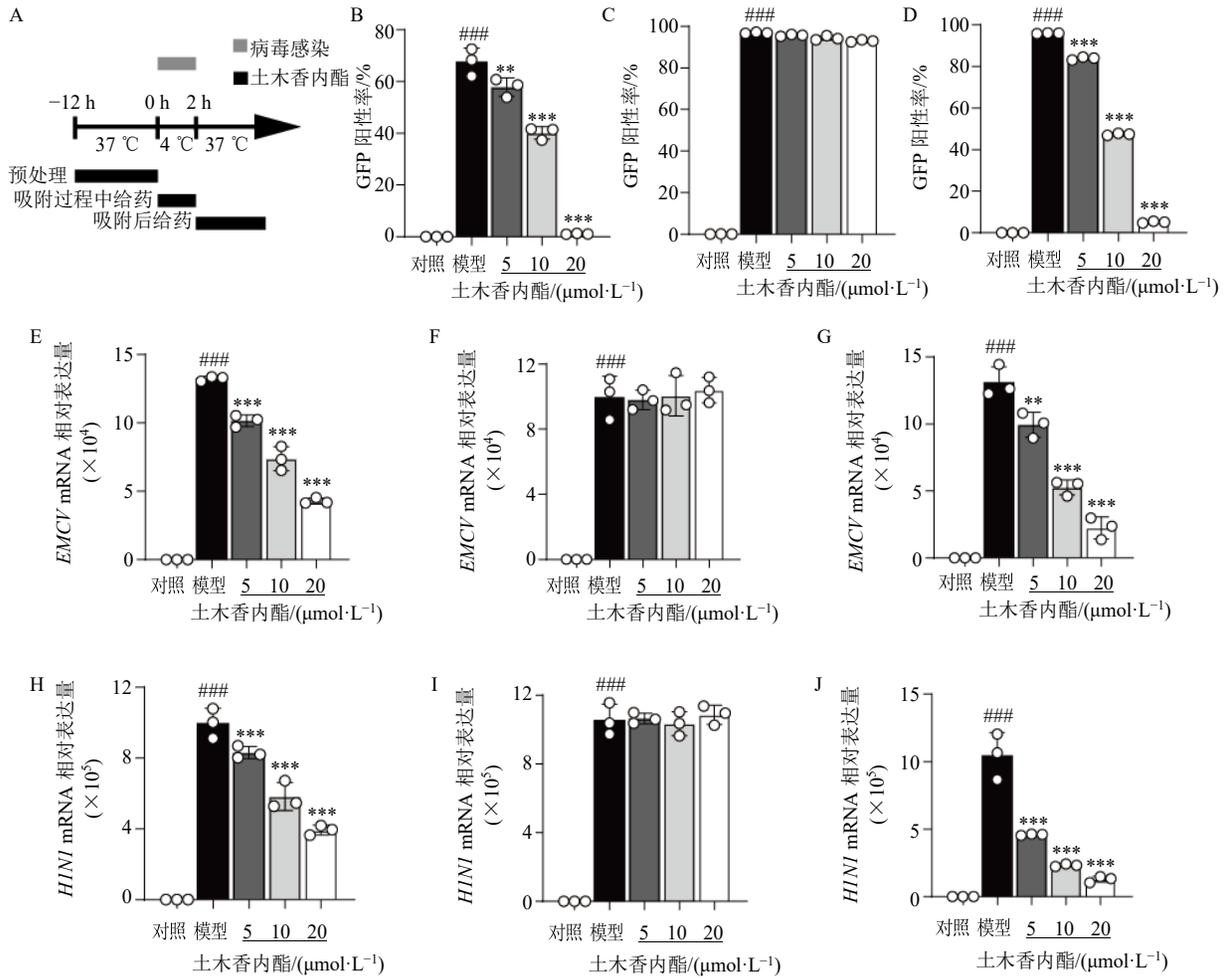
3.5 土木香内酯诱导抗病毒天然免疫信号通路激活

为了探究土木香内酯抵抗病毒复制的分子机制，对土木香内酯处理的 MEF 细胞进行了转录组学测序分析。如图 5-A 所示，与对照组比较，土木香内酯处理诱导了 549 个差异表达基因，其中包含 367 个上调基因、182 个下调基因。值得注意的是，几种与抗病毒 IFN-I 通路相关的基因被显著上调，如 *Ifna1*、*Ifnb1*、*Ifit44*、*Isg15*、*Ifit1* 等。通过对差异基因进行 KEGG 通路富集分析，结果显示病毒感染和抗病毒天然免疫相关的通路被显著富集，主要包括 EB 病毒感染、甲流病毒感和 Toll 样受体信号通路等（图 5-B）。基于基因表达值的 GSEA 分析发现（图 5-C），土木香内酯处理组显著富集到与抗病

毒天然免疫反应相关的 IFN- α 信号通路。上述结果提示，土木香内酯可能通过激活细胞内的抗病毒天然免疫信号通路，发挥抗病毒功能。

3.6 土木香内酯通过激活 IFN-I 信号通路发挥抗病毒作用

药物处理细胞的生物信息学分析结果提示，土木香内酯的抗病毒功能与宿主抗病毒天然免疫应答的核心信号通路 IFN-I 信号通路高度相关。因此，检测了土木香内酯处理 MEF 细胞中 ISGs (*Ifna1*、*Ifnb1*、*Ifit1*、*Isg15*) 的表达情况。如图 6 所示，与对照组比较，土木香内酯处理显著诱导 *Ifna1*、*Ifnb1*、*Ifit1*、*Isg15* 的 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.001$)。表明土木香内酯单独药物处理有效促进 IFN-I 的表达，并诱导干扰素诱导基因 *Ifit1*、*Isg15* 等的表达。



A-加药方式示意图; B、E、H-预处理给药, 土木香内酯对 VSV-GFP、EMCV、H1N1 病毒复制的影响; C、F、I-病毒吸附过程中给药, 土木香内酯对 VSV-GFP、EMCV、H1N1 病毒复制的影响; D、G、J-病毒吸附后给药, 土木香内酯对 VSV-GFP、EMCV、H1N1 病毒复制的影响。A-schematic diagram of dosing method; B, E, H-effect of alantolactone on replication of VSV-GFP, EMCV, H1N1 virus pre-treatment administration; C, F, I-effect of alantolactone on replication of VSV-GFP, EMCV and H1N1 virus during the adsorption process of virus; D, G, J-effect of alantolactone on replication of VSV-GFP, EMCV and H1N1 virus after virus adsorption and administration.

图 4 土木香内酯在病毒复制周期不同阶段给药对 VSV-GFP、EMCV、H1N1 病毒复制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of alantolactone administration at different stages of virus replication cycle on VSV-GFP, EMCV, H1N1 virus replication ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

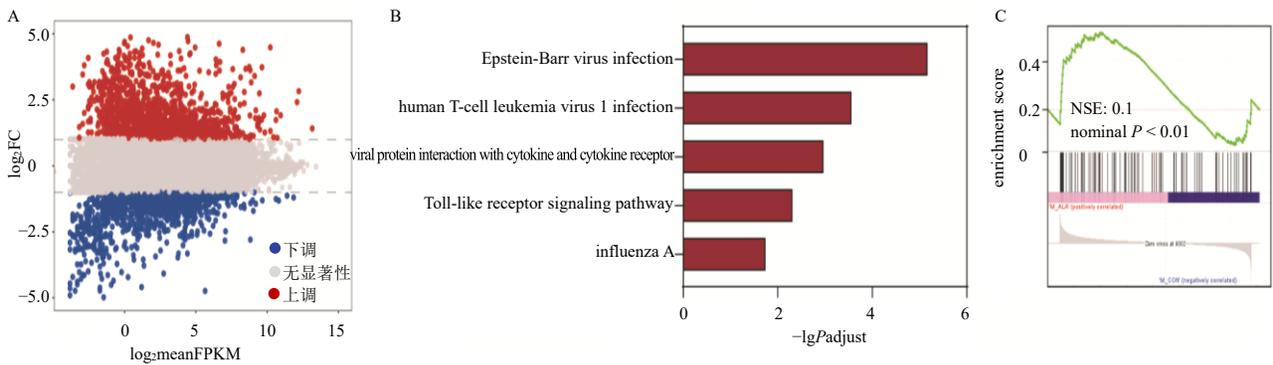


图 5 土木香内酯处理细胞的生物信息学分析 (A)、KEGG 通路分析 (B) 和 GSEA (C)

Fig. 5 Bioinformatics analysis of alantolactone-treated cells (A), KEGG pathway analysis (B) and GSEA (C)

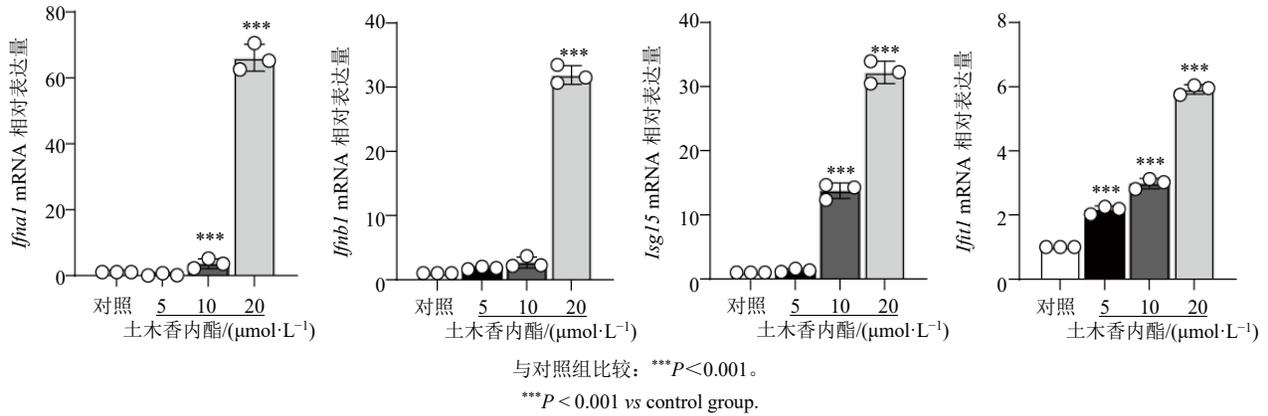


图6 土木香内酯对MEF细胞IFN-I通路中相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of alantolactone on expressions of related genes in IFN-I pathway of MEF cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中土木香内酯对病毒复制的影响

IFNAR1 是细胞表面 IFN 的重要受体,其与 IFN 结合后可激活下游 JAK-STAT 信号通路。因此,利用 IFNAR1 敲除 A549 细胞 (*Ifnar1*^{-/-} A549) 探究土木香内酯发挥抗病毒作用与 IFN-I 信号通路的依赖关系。qRT-PCR 结果显示,与野生型细胞 (A549

细胞) 相比,在 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中土木香内酯对 VSV、EMCV 和 H1N1 病毒的抑制功能被显著削弱。上述结果表明,土木香内酯的抗病毒功能部分依赖 IFN-I 信号通路 (图 7)。

3.8 土木香内酯对流感病毒感染小鼠的保护作用

如图 8-A 所示,模型组小鼠在感染后第 8 天开始出现死亡,到第 10 天全部死亡。而磷酸奥司他韦

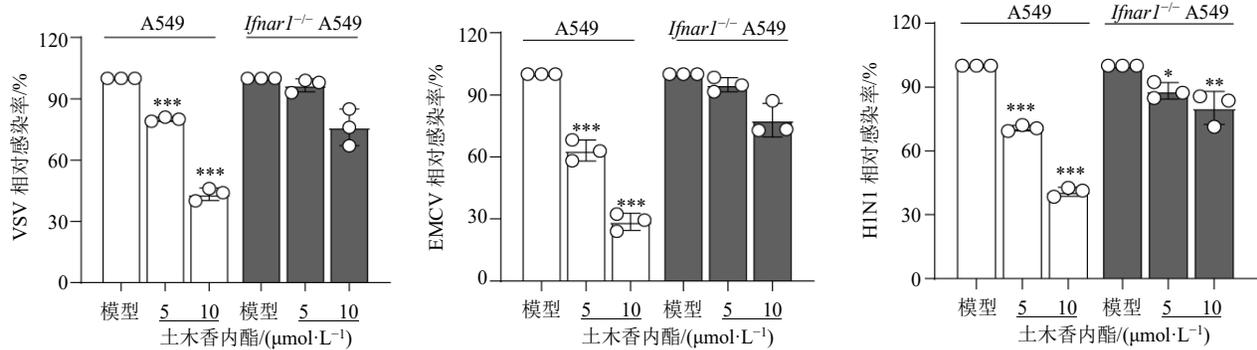
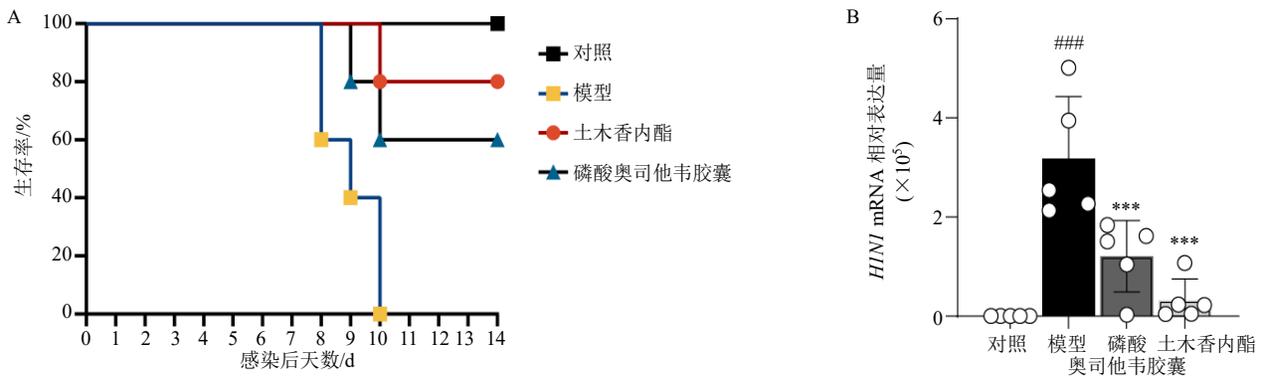


图7 土木香内酯对 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中 VSV、EMCV、H1N1 病毒复制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of alantolactone on VSV, EMC and H1N1 virus replication in *Ifnar1*^{-/-} A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-各组小鼠生存率; B-各组小鼠肺组织病毒载量。

A-survival rate of mice in each group; B-lung viral load of mice in each group.

图8 土木香内酯对流感病毒感染小鼠的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Protective effect of alantolactone on influenza virus-infected mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

胶囊组和土木香内酯组的生存率分别为 60% 和 80%，表明土木香内酯提高流感病毒感染小鼠的生存率。如图 8-B 所示，在病毒感染后第 7 天检测小鼠肺组织流感病毒载量，与模型组比较，土木香内酯给药组小鼠肺脏中 *H1N1* 病毒 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$)，表明土木香内酯在体内抑制流感病毒的复制。

4 讨论

土木香是菊科植物土木香 *I. helenium* L. 的干燥根，又名黄花菜，始载于《本草图经》，土木香性微温，味辛苦，无毒，入肺、肝、脾三经。有健脾和胃、行气止痛之效，临床用于治胸腹胀满疼痛、呕吐泄泻、痢疾、疟疾等。土木香中主要的化学成分是倍半萜内酯类，包括土木香内酯、异土木香内酯、土木香醇、土木香酸、二氢土木香内酯等。其中土木香内酯和异土木香内酯是《中国药典》土木香质量评价的对照品成分^[12]。土木香内酯的药理作用包括抗菌、抗炎、抗肿瘤、镇痛、保肝等^[1,13-18]。然而，土木香内酯作为土木香中主要药效和质量评价成分，关于其临床应用、治疗由病毒感染引发的瘟疫热症的药理作用及机制研究匮乏，限制了土木香及其活性成分药用价值提升和药物研发。

VSV、H1N1 和 EMCV 病毒是抗病毒研究中常用的 RNA 模式病毒^[19-22]，因此本研究利用流式细胞术、qRT-PCR 等技术证明了土木香内酯可在细胞水平抑制 VSV-GFP、H1N1 和 EMCV 病毒复制，并发现土木香内酯预处理和在病毒吸附后处理其抗病毒效应最优，这提示土木香内酯可能通过影响宿主细胞的细胞内因素发挥抗病毒功能。通过生物信息学分析结合 qRT-PCR 验证土木香内酯单独处理可诱导 IFN-I 编码基因 *Ifna1*、*Ifnb1* 表达，并同时诱导干扰素诱导基因 *Ifit1*、*Isg15* 表达，即土木香内酯可直接激活细胞 IFN-I 信号通路。接着在 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中证明土木香内酯抗病毒功能与 IFN 通路的部分依赖关系。此外，土木香内酯在 H1N1 感染的小鼠模型中表现出提升小鼠生存率、降低肺组织病毒载量的作用。

IFN 是对病毒感染的先天免疫反应的关键效应因子。通过结合 IFNAR 诱导下游 ISGs 的表达。这些 ISGs 基因能够抑制病毒复制和促进病毒清除^[23]。本研究结果表明，药物处理细胞后抗病毒通路相关的基因包括 *Ifna1*、*Ifnb1*、*Ifi44*、*Isg15*、*Ifit1* 被显著上调。其中，IFIT 蛋白在人体内包含 4 个家族成员

(IFIT1、IFIT2、IFIT3 等)^[24-25]，在病毒感染或 IFNs 诱导后，IFIT 家族蛋白能够与其他家族蛋白以及数种 RNA 结合蛋白形成复合体，从而清除病毒^[24]。ISG15 编码的蛋白 ISG15 是一个类泛素蛋白，该家族蛋白能够与 IFN 诱导的抗病毒因子如蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR)、三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 酶 MxA、HuP 家族结合将靶蛋白 ISG 化，从而促进这些抗病毒因子的表达活性^[25]。

综上，本研究表明土木香内酯通过激活 IFN-I 通路诱导干扰素诱导基因表达，在体内外发挥抵抗病毒复制的作用。为土木香及蒙药四味土木香散的抗病毒研究提供扎实的科学研究支持，并为其临床应用提供重要的科学理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Q, Gao S, Wu G Z, *et al.* Total sesquiterpene lactones isolated from *Inula helenium* L. attenuates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice [J]. *Phytomedicine*, 2018, 46: 78-84.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 824.
- [3] 布仁达来. 国家中药管理局民族医药文献整理丛书·蒙医文献学 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2006: 341-343.
- [4] 罗布桑. 蒙药学家罗布桑学术著作大成 (1) 蒙药研究新成果 (蒙古文) [M]. 赤峰: 内蒙古科技出版社, 2011: 150-159.
- [5] 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册 [S]. 1998: 58.
- [6] Wolf A J, Underhill D M. Peptidoglycan recognition by the innate immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(4): 243-254.
- [7] Hopfner K P, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(9): 501-521.
- [8] Liu X, Xia S Y, Zhang Z B, *et al.* Channeling inflammation: Gasdermins in physiology and disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 384-405.
- [9] Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA-RIG-I like receptors [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(11): 1322-1335.
- [10] Seth R B, Sun L J, Ea C K, *et al.* Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF3 [J]. *Cell*, 2005, 122(5): 669-682.
- [11] Wang Y, Yuan S C, 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):

- 1346-1356.
- [12] 白丽明, 王剑, 付美玲, 等. 土木香化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2512-2518.
- [13] Stojanović-Radić Z, Comić L J, Radulović N, *et al.* Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: Eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(6): 1015-1025.
- [14] Kim M, Song K, Kim Y S. Alantolactone improves palmitate-induced glucose intolerance and inflammation in both lean and obese states *in vitro*: Adipocyte and adipocyte-macrophage co-culture system [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 187-194.
- [15] Lim S S, Kim J R, Lim H A, *et al.* Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium* [J]. *J Med Food*, 2007, 10(3): 503-510.
- [16] Wang X, Lan Y L, Xing J S, *et al.* Alantolactone plays neuroprotective roles in traumatic brain injury in rats via anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptosis pathways [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2): 368-380.
- [17] Oliveira P D, Kachimarek A C, Bittencourt A L. Early onset of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL): Systematic search and review [J]. *J Trop Pediatr*, 2018, 64(2): 151-161.
- [18] Käräjämäki A J, Pätsi O P, Savolainen M, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease as a predictor of atrial fibrillation in middle-aged population (OPERA study) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142937.
- [19] Shi T T, Huang Y, Li Y, *et al.* MAVI1, an endoplasmic reticulum-localized microprotein, suppresses antiviral innate immune response by targeting MAVS on mitochondrion [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(35): eadg7053.
- [20] Jiang Z M, Wei F H, Zhang Y Y, *et al.* IFI16 directly senses viral RNA and enhances RIG-I transcription and activation to restrict influenza virus infection [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(7): 932-945.
- [21] Zhang Z D, Xiong T C, Yao S Q, *et al.* RNF115 plays dual roles in innate antiviral responses by catalyzing distinct ubiquitination of MAVS and MITA [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5536.
- [22] 王浩嘉, 李森, 连瑞, 等. 小檗胺的体外抗病毒作用及基于 I 型干扰素通路的机制研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1185-1192.
- [23] Stetson D B, Medzhitov R. Type I interferons in host defense [J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 373-381.
- [24] Pichlmair A, Lassnig C, Eberle C A, *et al.* IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 624-630.
- [25] Abbas Y M, Pichlmair A, Gónra M W, *et al.* Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins [J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 60-64.

[责任编辑 李亚楠]