

## 葛根通过转录因子 EB 促进溶酶体生物发生抵抗病毒感染

董秋童<sup>1</sup>, 李 敏<sup>2#</sup>, 张美琦<sup>2</sup>, 成翠芹<sup>2</sup>, 罗 政<sup>1</sup>, 李俊良<sup>2</sup>, 刘 哲<sup>1</sup>, 周义翔<sup>2</sup>, 王 遥<sup>2,3\*</sup>, 贾 鑫<sup>1\*</sup>

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院, 北京 100029

3. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029

**摘要:**目的 研究葛根 *Pueraria lobata* 水提物的体内外抗病毒作用, 基于溶酶体生物发生探究其抗病毒作用的细胞学机制。方法 CCK-8 检测葛根水提物对非小细胞肺癌 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 A549 细胞, 荧光显微镜和流式细胞术检测葛根水提物对 GFP 阳性细胞比例的影响; Western blotting 检测葛根水提物对 VSV 病毒 G 蛋白表达的影响; qRT-PCR 检测葛根水提物对甲型流感病毒 (influenza A virus, H1N1)、脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV)、单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 病毒复制的影响。葛根水提物 (0.8、1.6 g/kg) 治疗 H1N1 病毒滴鼻感染小鼠, 观察记录其对小鼠的生存曲线、体质量变化和肺指数的影响, 利用小动物 CT、肺组织苏木素-伊红 (HE) 染色观察药物治疗对肺组织病理变化的影响; qRT-PCR 检测肺组织病毒载量、白细胞介素-6 (interleukin-6, *Il6*) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , *Tnfa*) 的基因表达。葛根水提物处理 MEF 胚胎成纤维细胞并进行转录组测序分析, qRT-PCR 检测溶酶体相关基因表达。流式细胞术检测葛根水提物在转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 敲除的鼠永生骨髓源性巨噬细胞 (*Tfeb*<sup>-/-</sup> iBMDM) 中对 GFP 阳性细胞比例的影响。结果 葛根水提物显著抑制细胞内 VSV-GFP 病毒复制和 VSV 病毒 G 蛋白表达 ( $P < 0.001$ ), 降低 H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒复制 ( $P < 0.001$ )。葛根水提物能够提升 H1N1 感染小鼠的存活率, 降低肺部病毒载量, 改善小鼠肺部病变情况。生物信息学分析表明葛根水提物上调溶酶体相关基因表达, 并证明葛根水提物通过 TFEB 促进溶酶体生物发生抵抗 VSV 病毒感染 ( $P < 0.001$ )。结论 葛根水提物通过 TFEB 促进溶酶体生物发生, 从而在体内外抑制病毒感染。

**关键词:** 葛根; 抗病毒; 溶酶体; 转录因子 TFEB; 葛根素; 3'-羟基葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 大豆苷

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)16-5503-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.013

## *Pueraria lobata* water extract promotes lysosomal biogenesis to resist viral infection via transcription factor EB

DONG Qiutong<sup>1</sup>, LI Min<sup>2</sup>, ZHANG Meiqi<sup>2</sup>, CHENG Cuiqin<sup>2</sup>, LUO Zheng<sup>1</sup>, LI Junliang<sup>2</sup>, LIU Zhe<sup>1</sup>, ZHOU Yixiang<sup>2</sup>, WANG Yao<sup>2,3</sup>, JIA Xin<sup>1</sup>

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

3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** To investigate the anti-viral effects of *Pueraria lobata* water extract *in vitro* and *in vivo*, and explore the cellular mechanisms of its anti-viral effects based on lysosomal biosynthesis. **Methods** CCK-8 assay was performed to detect cell viability of A549 cells treated with *P. lobata* water extract. A549 cells were infected by vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein (VSV-GFP), fluorescence microscopy and flow cytometry were used to evaluate the effect of *P. lobata* water extract on the

收稿日期: 2024-05-06

**基金项目:** 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); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-A02); 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)

**作者简介:** 董秋童, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: qiutongdong@163.com

**#共同第一作者:** 李 敏, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: linn\_lee1220@163.com

**\*通信作者:** 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

王 遥, 教授, 研究方向为中医药免疫。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

proportion of GFP positive cells; Western blotting was used to examine the effect of *P. lobata* water extract on the expression of VSV G protein; qRT-PCR was used to detect the effect of *P. lobata* water extract on the replication of influenza A virus (H1N1), encephalomyocarditis virus (EMCV), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) respectively. *P. lobata* water extract was used to treat H1N1 drop-nose infected mice at doses of 0.8 and 1.6 g/kg, the survival rate, body weight changes and lung inhibition index of mice were observed; CT images, hematoxylin-eosin (HE) staining of lung tissue were used to observe the effect of drug treatment on pathological changes in lung tissue; qRT-PCR was used to detect the viral load, interleukin-6 (*Il6*), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (*Tnfa*) gene expressions in lung tissue. MEF cells were treated with *P. lobata* water extract and subjected to transcriptome sequencing analysis, qRT-PCR was used to detect mRNA expressions of lysosomal related genes. Flow cytometry was used to detect effect of *P. lobata* water extract on the proportion of GFP positive cells in transcription factor EB (*Tfeb*)<sup>-/-</sup> of mouse immortalized bone marrow-derived macrophages (iBMDM). **Results** *P. lobata* water extract significantly inhibited intracellular VSV-GFP virus replication and VSV virus G protein expression ( $P < 0.001$ ), and reduced H1N1, EMCV and HSV-1 virus replication ( $P < 0.001$ ). *P. lobata* water extract could improve the survival rate of H1N1 infected mice, reduce the viral load in lung, and improve lung lesions in mice. Bioinformatics analysis showed that *P. lobata* water extract up-regulated the expressions of lysosomal related genes, and demonstrated that *P. lobata* water extract promoted lysosomal biogenesis to resist VSV virus infection through TFEB ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** *P. lobata* water extract promotes lysosomal biogenesis through TFEB, thereby inhibiting viral infection *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; anti-virus; lysosomes; transcription factor EB; puerarin; 3'-hydroxy puerarin; 3'-methoxy puerarin; daidzin

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 味甘、辛, 入脾胃经, 具有解表退热、生津止渴和升阳透疹的功效<sup>[1]</sup>。在传统中医方剂如葛根汤、葛根芩连汤、柴葛解肌汤等复方中均重用葛根以发挥药效。现代药理学研究表明, 葛根汤颗粒可治疗小鼠病毒性肺炎<sup>[2]</sup>; 葛根芩连汤发酵液抑制 Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 表达减少肺组织病毒载量, 在流感治疗中发挥抗炎作用<sup>[3]</sup>。另外, 葛根所含成分葛根素<sup>[4]</sup>可以作为神经氨酸酶抑制剂发挥抗流感作用<sup>[5-6]</sup>, 也可通过调节干扰素信号传导抵御猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 感染<sup>[7]</sup>。上述研究表明, 葛根具有潜在的广谱抗病毒功能。然而, 目前对葛根单味药的抗病毒机制研究十分有限, 关于葛根抗病毒药理研究不能很好地揭示其广泛的抗病毒谱。提示可能存在某种共性的宿主因素在葛根抗病毒过程中发挥了关键作用。

溶酶体作为细胞内负责降解和循环利用的细胞器, 通过内吞和自噬等过程在维持细胞内稳态和代谢调节中发挥着至关重要的作用<sup>[8]</sup>, 参与包括炎症、抗原呈递和抗病原体防御等免疫功能。研究表明, 溶酶体在抗病毒过程中发挥重要作用, 其中的酸性水解酶可以降解吞噬入细胞的病毒颗粒, 限制病毒在细胞内的复制和传播, 发挥抗病毒功能<sup>[9-10]</sup>。溶酶体生物发生的功能异常促进病毒感染, 并可诱发免疫疾病的发生与进展, 如新冠感染重症化和自身免疫性疾病。最新的研究表明, 促进溶酶体的生物发

生在调控细胞内环境平衡、清除异常蛋白质和有害物质、维持细胞稳态等方面发挥重要作用<sup>[11-12]</sup>。

目前, 葛根单味药的抗病毒现象和机制报道较为有限, 探究其抗病毒药理作用与机制具有重要意义。本研究利用病毒感染细胞和动物模型, 评价葛根水提物体内对多种病毒的抑制作用; 通过对比转录因子 EB (transcription factor EB, *TFEB*) 基因敲除细胞与野生型细胞中葛根的抗病毒功能, 初步阐明其依赖 *TFEB* 通路促进溶酶体生物发生, 发挥对病毒的抵抗作用。本研究揭示了葛根抗病毒感染的临床应用的细胞学机制, 并提供了中医药抗病毒感染的新靶点。

## 1 材料

### 1.1 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 THP1 细胞系, 来源于美国 ATCC; MEF 小鼠原代胚胎成纤维细胞从小鼠胚胎中分离; *TFEB* 敲除 iBMDM 细胞 (*Tfeb*<sup>-/-</sup> iBMDM) 和对照细胞由中国科学院生物物理研究所李新建研究团队馈赠。细胞使用含 1% 双抗、10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。

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) 为中山大学秦晓峰教授馈赠, 脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 为中国农业大学杨汉春教授馈赠, 甲型流感病毒

(influenza A virus, H1N1) 为中山大学崔隽教授馈赠, 单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 来自本实验室, 病毒扩增后于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.2 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量  $18\sim 20\text{ g}$ ,  $6\sim 8$  周龄, 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于温度  $18\sim 22^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $50\%\sim 60\%$ 、12 h 光暗交替的环境中, 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-2024-033101-1160), 严格按照动物实验相关章程执行。

## 1.3 药材

葛根饮片 (批号 230506009) 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中药师鉴定为豆科植物野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。

## 1.4 药品与试剂

PBS 溶液 (批号 C3580-0500) 购自上海达特希尔生物科技有限公司; 磷酸奥司他韦胶囊 (以奥司他韦计  $75\text{ mg/粒}$ , 批号 0222311006) 购自宜昌长江药业有限公司; Trizol Reagent (批号 15596018) 购自 Invitrogen 公司; Evo M-MLV RT Kit (批号 AG11711)、SYBR<sup>®</sup> 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 ( $10\ 000\text{ U/mL}$ , 批号 15140-122)、FBS (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) 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; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (批号 10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 异氟烷 (批号 902-03087-00) 购自山东安特牧业科技有限公司; 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 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); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪 (美谷分子仪器有限公司); SK-L180-Pro 型数控线性摇床 (大龙兴创实验仪器股份公司); Sorvall<sup>™</sup> Legend Micro 21R 型微量离心机、1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型  $\text{CO}_2$  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); SkyScan 1276 型 CMOS Micro-CT (比利时 Bruker 公司); CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 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); WP-Z-UV 型微量元素型超纯水机 (四川沃特尔特水处理设备有限公司); BK-360B 型超声机 (济南巴克超声波科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 葛根水提物的制备

将葛根饮片粉碎, 过 100 目筛, 加入 8 倍量超纯水回流提取 3 次, 每次  $2\text{ h}^{[13]}$ , 合并滤液, 浓缩, 得葛根水提物浸膏, 将所得水提物干燥成粉末,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。使用时称取适量葛根水提物粉末, 加入 PBS 溶解并用  $0.22\ \mu\text{m}$  细胞筛滤过, 母液质量浓度为  $100\text{ mg/mL}$ 。

### 2.2 UPLC-QTOF 高分辨质谱分析

**2.2.1 供试品溶液的制备** 称取葛根水提物粉末  $0.5\text{ g}$ , 加入 50% 甲醇  $10\text{ mL}$ , 超声  $30\text{ min}$ , 放冷, 取提取液适量离心; 离心后取上清液过  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜, 取滤液作为供试品溶液。

**2.2.2 色谱条件** Waters HSS T3 色谱柱 ( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.8\ \mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱:  $0\sim 20\text{ min}$ ,  $5\%\sim 50\%\text{ A}$ ;  $20\sim 25\text{ min}$ ,  $50\%\sim 90\%\text{ A}$ ;  $25\sim 30\text{ min}$ ,  $90\%\text{ A}$ ;  $30\sim 30.5\text{ min}$ ,  $90\%\sim 5\%\text{ A}$ ; 柱温  $35^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量  $0.3\text{ mL/min}$ ; 进样量  $0.2\ \mu\text{L}$ 。

**2.2.3 质谱条件** 离子源为电喷雾电离源 (ESI); 正、负离子同时扫描; 扫描模式为  $254\text{ nm}$  全波长扫描; 扫描范围  $m/z\ 100\sim 1\ 700$ ; 毛细管温度  $300^{\circ}\text{C}$ ; 锥孔电压  $100^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气温度  $350^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气体积流量

11 L/min。

**2.2.4 数据处理** 将采集得到的原始数据导入 Qualitative Analysis 10.0 软件, 通过其向导设置及方法模板, 建立未知化合物鉴定流程, 对原始数据进行峰提取。将样品紫外色谱图中选取特征峰进行分析, 通过提取得到的分子离子色谱峰、同位素峰拟合出可能的分子式, 并将二级碎片与 PCDL 二级数据库进行匹配, 过滤质量偏差大于  $7.5 \times 10^{-6}$ 、匹配得分低于 80 分的结果, 获得分析结果。

**2.3 细胞活力测定**

A549 细胞以  $2.5 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 培养过夜使细胞完全贴壁; 用 DMEM 完全培养基配制 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/mL 的葛根水提物加入细胞中, 另设置不含药物的对照组以及不接种细胞不含药物的空白孔, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱中培养; 分别在培养 12、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 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞相对存活率。

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

**2.4 流式细胞术检测葛根水提物对 A549 细胞中 VSV-GFP 病毒复制的影响**

A549 细胞以  $1.2 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板, 培养过夜至细胞贴壁后, 设置对照组、模型组和葛根水提物 (1.25、2.50、5.00 mg/mL) 组, 除对照组外, VSV-GFP 以 0.02 的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 感染各组细胞, 加药共同孵育。12 h

后用预冷 PBS 清洗细胞 2 次, 取 100 μL 胰酶消化, 200 μL 完全培养基终止消化, 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。

**2.5 荧光显微镜检测葛根水提物对 A549 细胞中 VSV-GFP 表达的影响**

细胞接种、分组、造模、给药方式同“2.4”项, 共同孵育 16 h 后, 在荧光显微镜下拍摄并计算 GFP 平均荧光强度。

**2.6 Western blotting 检测葛根水提物对 A549 细胞中 VSV 病毒 G 蛋白表达的影响**

细胞接种、分组、造模、给药方式同“2.4”项, 共同孵育 16 h 后, 收集细胞, 加入 IP 裂解液充分裂解, 离心后取上清, 加入 Loading Buffer, 100 °C 使蛋白变性, BCA 法测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳、湿法转膜、封闭, 于 4 °C 孵育 VSV-G 抗体 (1 : 3 000) 过夜, 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。

**2.7 qRT-PCR 检测葛根水提物对 H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒 mRNA 表达的影响**

细胞接种、分组同“2.4”项, 分别使用 H1N1 (MOI=0.1), EMCV (MOI=0.1) 和 HSV-1 (MOI=1) 感染细胞, 加药共孵育 12 h 后, 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          | 种属 | 上游引物序列 (5'-3')               | 下游引物序列 (5'-3')            |
|-------------|----|------------------------------|---------------------------|
| ACTB        | 人  | CATGTACGTTGCTATCCAGGC        | CTCCTTAATGTCACGCACGAT     |
| H1N1-HA     | 病毒 | CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA | GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT |
| EMCV-1C     | 病毒 | CCGCGATGATGAAGGGCAAG         | CGGGCATCCTGGTGGGTAAAGT    |
| HSV-1-ICP27 | 病毒 | TTTCTCCAGTGCTACCTGAAGG       | TCAACTCGCAGACACGACTCG     |
| Actb        | 鼠  | GTGACGTTGACATCCGTAAAGA       | GCCGGACTCATCGTACTCC       |
| Il6         | 鼠  | CTGCAAGAGACTTCCATCCAG        | AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG   |
| Tnfa        | 鼠  | CAGGCGGTGCCTATGTCTC          | CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG    |
| NPC1        | 人  | TGGAGGGATTGTGGTGTGG          | ATCGCTCTTCAGTGGCACAA      |
| NPC2        | 人  | CAAAGGACAGTCTTACAGCGT        | GGATAGGGCAGTTAATTCCACTC   |
| CTSO        | 人  | GCCTTCCGGGAAAGTCTTAATAG      | TCCAGTCAAATCTTAACGGCAAA   |
| CTSL        | 人  | GGAGGAGAGCAGTGTGGGAGAA       | TGGGGCCTCATAAAACAGA       |
| CTSD        | 人  | TGCTCAAGAAGTACATGGACGC       | CGAAGACGACTGTGAAGCACT     |
| LIPA        | 人  | CCCACGTTTGCACTCATGTC         | CCCAGTCAAAGGCTTGAAACTT    |
| Ctsd        | 鼠  | CGATTATCAGAATCCCTCTGCG       | GGTCTTAGGCGATGACTGCAT     |
| Sqstm1      | 鼠  | GAAGTCGTATAAGTGCAGTGT        | AGAGAAGCTATCAGAGAGGTGG    |
| Mcoln1      | 鼠  | GTCGGTGTCAATTCGCTACCTGA      | GAACGATCCAGCCACAGAAGCA    |
| Lipa        | 鼠  | TGCCTGAGTTGGCAAAGAAGA        | GTGGGTGCAAACGTGAATGC      |
| Hps1        | 鼠  | AGCAGCCAAAACATCCCAGT         | CAGACGAGGCTACCTGAACTC     |
| Naglu       | 鼠  | GGCTGACACCTTCAATGAGATGC      | AGCAGCCAAAACAGCATCAGGGT   |

## 2.8 葛根水提物对流感病毒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、H1N1 感染模型组、奥司他韦 (40 mg/kg) 组和葛根水提物低、高剂量 (0.8、1.6 g/kg) 组, 每组 10 只。病毒感染前, 葛根水提物和奥司他韦组小鼠 ig 相应药物预处理 3 d; 感染时用异氟烷麻醉小鼠, 除对照组外, 第 0 天将流感病毒液以滴鼻的方式感染小鼠 (每只 40  $\mu$ L) 建立模型。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 生理盐水, 每天 1 次, 连续 9 d, 记录小鼠生存情况和体质量变化。给药组小鼠第 7 天每组随机选取 5 只小鼠, 处死前拍摄 CT; 采集肺组织, 称定肺质量计算肺指数抑制率, 肺组织用于检测病毒载量、白细胞介素-6 (interleukin-6, *Il6*) 与肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , *Tnfa*) 和苏木素-伊红 (HE) 染色切片。统计各组剩余小鼠存活天数及死亡数, 计算生存率与体质量变化情况。

## 2.9 RNA 测序及转录组分析

MEF 细胞以  $2.4 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔板中, 培养过夜以贴壁, 单独加入 4 mg/mL 葛根水提物处理 24 h, 收集细胞, 加入 Trizol Reagent 提取 RNA, 由华大基因股份有限公司进行测序分析。

## 2.10 qRT-PCR 检测葛根水提物对溶酶体相关 mRNA 表达的影响

MEF 细胞以  $2.4 \times 10^5$  个/孔接种到 12 孔板中, 培养过夜, 加入 4 mg/mL 葛根水提物处理; THP1 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种到 12 孔板, 加入 4 mg/mL 葛根水提物处理。培养 24 h 后分别收集细胞, 加入 Trizol Reagent 提取 RNA, 然后反转录为 cDNA 进行 qRT-PCR 实验, 检测 *TFEB*、组织蛋白酶 O (cathepsin O, *CTSO*)、组织蛋白酶 D (cathepsin D, *CTSD*)、组织蛋白酶 L (cathepsin L, *CTSL*)、溶酶体酸性脂肪酶 (lysosomal acid lipase, *LIPA*)、神经鞘脂蛋白 1 溶酶体膜蛋白 (Niemann-Pick C1, *NPC1*)、神经鞘脂蛋白 2 溶酶体膜蛋白 (Niemann-Pick C2, *NPC2*)、选择性自噬受体 (sequestosome 1, *Sqstm1*)、氯离子通道蛋白 1 (mucolipin 1, *Mcoln1*)、黏附蛋白综合体亚基 1 (Hermansky-Pudlak syndrome 1, *Hps1*)、*N*-乙酰- $\alpha$ -葡萄糖氨基葡萄糖苷酶 (*N*-acetyl- $\alpha$ -glucosaminidase, *Naglu*) 基因<sup>[14-19]</sup>的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

## 2.11 流式细胞术检测葛根水提物在 *Tfeb*<sup>-/-</sup> iBMDM 细胞中对 VSV-GFP 病毒复制的影响

将 *Tfeb*<sup>-/-</sup> iBMDM 和对照细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔

接种到 24 孔板中, 培养过夜至贴壁, 设置对照组、模型组和葛根水提物 (0.6、1.2、2.5 mg/mL) 组, 除对照组外, VSV-GFP (MOI=0.02) 感染各组细胞, 同时加药共同孵育。12 h 后, 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, 计算 GFP 阳性抑制率。

## 2.12 统计学分析

数据用 GraphPad Prism 软件进行可视化处理和统计学分析, 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 葛根水提物的成分测定

利用高分辨质谱分析技术鉴定分析葛根水提物中所含成分, LC-MS/MS 基峰图见图 1。《中国药典》2020 年版规定葛根素为葛根的主要有效成分<sup>[1]</sup>, 另外 3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷的含量是葛根优质药材产地与质量控制的参考指标<sup>[20]</sup>。通过分析测得本研究所使用的葛根水提物有上述几种葛根的有效成分 (表 2)。

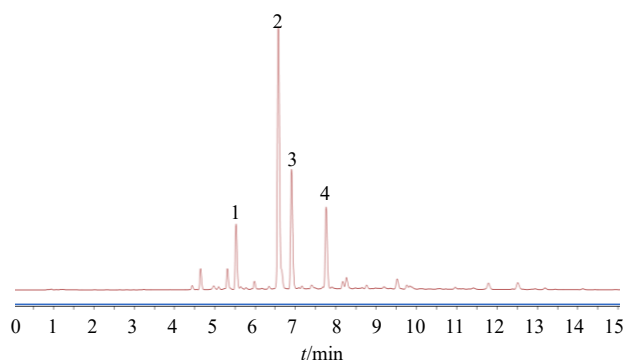


图 1 葛根水提物的 LC-MS/MS 基峰图

Fig. 1 LC-MS/MS base peak map of *P. lobata* water extract

### 3.2 葛根水提物对 A549 细胞存活率的影响

如图 2 所示, 根据 A549 细胞存活率计算得到葛根水提物对 A549 细胞的 12 h 半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 为 20.14 mg/mL, 5 mg/mL 葛根水提物对 A549 细胞未显示明显细胞毒性, 因此在后续的实验中, 葛根水提物的质量浓度设定为 5 mg/mL 及以下。

### 3.3 葛根水提物对 VSV 复制的影响

为了评估葛根是否具有抗病毒活性, 首先用 VSV 病毒感染 A549 细胞, 检测药物处理后 VSV 病毒复制情况。如图 3-A、D 所示, VSV-GFP 感染 A549

表 2 葛根水提物的主要成分

Table 2 Main components of *P. lobata* water extract

| 峰号 | $t_R/\text{min}$ | 分子式                                       | 理论值 ( $m/z$ ) | 实测值 ( $m/z$ ) | 离子模式 | 二级碎片                                                  | 鉴定结果      |
|----|------------------|-------------------------------------------|---------------|---------------|------|-------------------------------------------------------|-----------|
| 1  | 5.526            | $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ | 432.105 6     | 433.118 6     | 正离子  | 379.080 8, 367.080 2, 313.070 2, 283.060 3, 179.034 5 | 3'-羟基葛根素  |
|    |                  |                                           |               | 431.098 8     | 负离子  | 341.065 6, 311.055 1, 283.060 2, 255.062 7            |           |
| 2  | 6.573            | $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$    | 416.110 7     | 417.124 6     | 正离子  | 399.107 2, 381.096 6, 351.086 0, 321.075 1, 297.075 6 | 葛根素       |
|    |                  |                                           |               | 415.124 6     | 负离子  | 325.071 0, 295.061 2, 267.064 7, 253.048 3, 223.068 7 |           |
| 3  | 6.902            | $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ | 446.121 3     | 447.132 3     | 正离子  | 429.117 9, 411.107 7, 381.096 8, 351.086 0, 327.086 1 | 3'-甲氧基葛根素 |
|    |                  |                                           |               |               |      | 297.074 5                                             |           |
|    |                  |                                           |               | 445.114 2     | 负离子  | 325.070 8, 310.049 0, 297.074 0, 282.050 4, 225.052 6 |           |
| 4  | 7.759            | $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$    | 416.113 1     | 417.122 8     | 正离子  | 255.064 8, 199.073 5, 137.023 0                       | 大豆苷       |
|    |                  |                                           |               | 451.079 6     | 负离子  | 415.103 9, 253.049 3, 224.043 2                       |           |

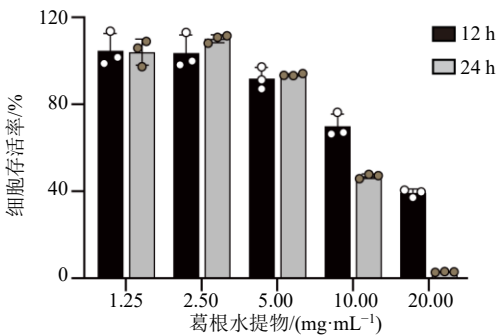
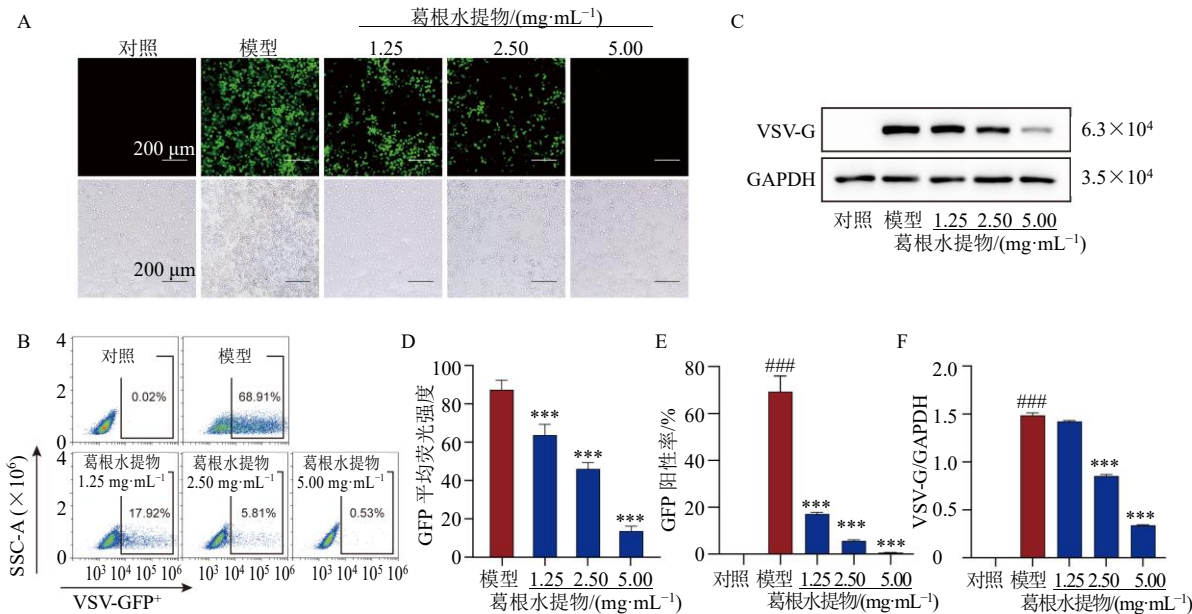


图 2 葛根水提物对 A549 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 2 Effect of *P. lobata* water extract on survival rate of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

细胞后, 通过荧光显微镜观察绿色荧光强度可判断病毒在细胞内的复制情况。加药加病毒后绿色荧光显著减弱, 表明加入葛根水提物后 VSV 病毒感染受到抑制 ( $P < 0.001$ )。如图 3-B、E 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, 葛根水提物呈剂量相关性地减少了 GFP 阳性细胞的比例 ( $P < 0.001$ ), 尤其在质量浓度为 5 mg/mL 时抑制病毒复制的效果显著。此外, 通过 Western blotting 检测细胞内 VSV 病毒 G 蛋白表达, 评估葛根水提物对野生型 VSV 的抑制作用。如图 3-C、F 所示,



A、D-荧光显微镜检测葛根水提物对 VSV-GFP 病毒复制的影响 ( $\times 10$ ); B、E-流式细胞仪检测葛根水提物对 VSV-GFP 病毒复制的影响; C、F-Western blotting 检测葛根水提物对 VSV-G 蛋白表达的影响; 与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图 4~6 同。  
A, D-effect of *P. lobata* water extract on VSV-GFP virus replication by fluorescence microscopy ( $\times 10$ ); B, E-effect of *P. lobata* water extract on VSV-GFP virus replication by flow cytometry; C, F-effect of *P. lobata* water extract on VSV-G protein expression by Western blotting; ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as Figs. 4—6.

图 3 葛根水提物对 A549 细胞中 VSV 病毒复制的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Inhibition of *P. lobata* water extract on VSV replication in A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与模型组比较, 2.5、5.0 mg/mL 葛根水提取物明显抑制了 G 蛋白表达 ( $P < 0.001$ )。以上结果表明葛根水提取物能够在细胞水平显著抑制 VSV 的复制。

### 3.4 葛根水提取物对 H1N1、EMCV、HSV-1 病毒复制的影响

为了探究葛根水提取物对不同病毒的抑制作用,

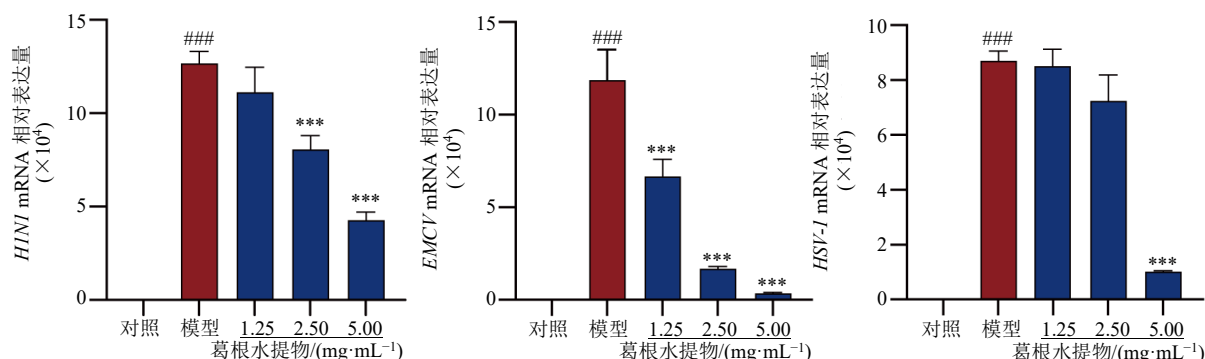


图 4 葛根水提取物对 H1N1、EMCV 和 HSV-1 感染细胞中病毒 RNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of *P. lobata* water extract on viral RNA expression in H1N1, EMCV and HSV-1 infected cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.5 葛根水提取物在小鼠体内抗 H1N1 的影响

进一步采用 H1N1 感染小鼠模型评估葛根水提取物的体内抗病毒效果。如图 5-A 所示, 模型组小鼠在感染后第 4 天死亡超过半数, 经葛根水提取物治疗的小鼠生存率、体质量变化情况均优于 H1N1 模型组 (图 5-B), 表明葛根水提取物提高流感病毒感染小鼠的生存情况。CT 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠明显肺部发白; 葛根水提取物高、低剂量组治疗后, 均有明显改善 (图 5-C)。HE 染色结果显示, 对照组小鼠肺泡无明显增大, 组织结构正常; 模型组小鼠肺间质有大面积炎症反应和炎症细胞的浸润; 葛根水提取物高、低剂量组均能明显改善小鼠肺内病变程度 (图 5-D)。同时, 葛根水提取物呈剂量相关性降低肺指数抑制率 ( $P < 0.01$ , 图 5-E)。qRT-PCR 结果显示, 与模型组比较, 葛根水提取物处理组 H1N1 病毒基因表达下降 ( $P < 0.001$ , 图 5-F), 炎症因子 *Il6*、*Tnfa* 表达均显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ , 图 5-G、H)。上述结果表明葛根水提取物在体内显著抑制流感病毒感染。

### 3.6 转录组分析显示葛根水提取物诱导溶酶体生物发生和功能的激活

为了探究葛根水提取物的抗病毒机制, 对葛根水提取物处理的 MEF 细胞进行 RNA 测序以及转录组分析。通过基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析, 发现溶酶体相关基因被显著富集 (图 6-A), 如

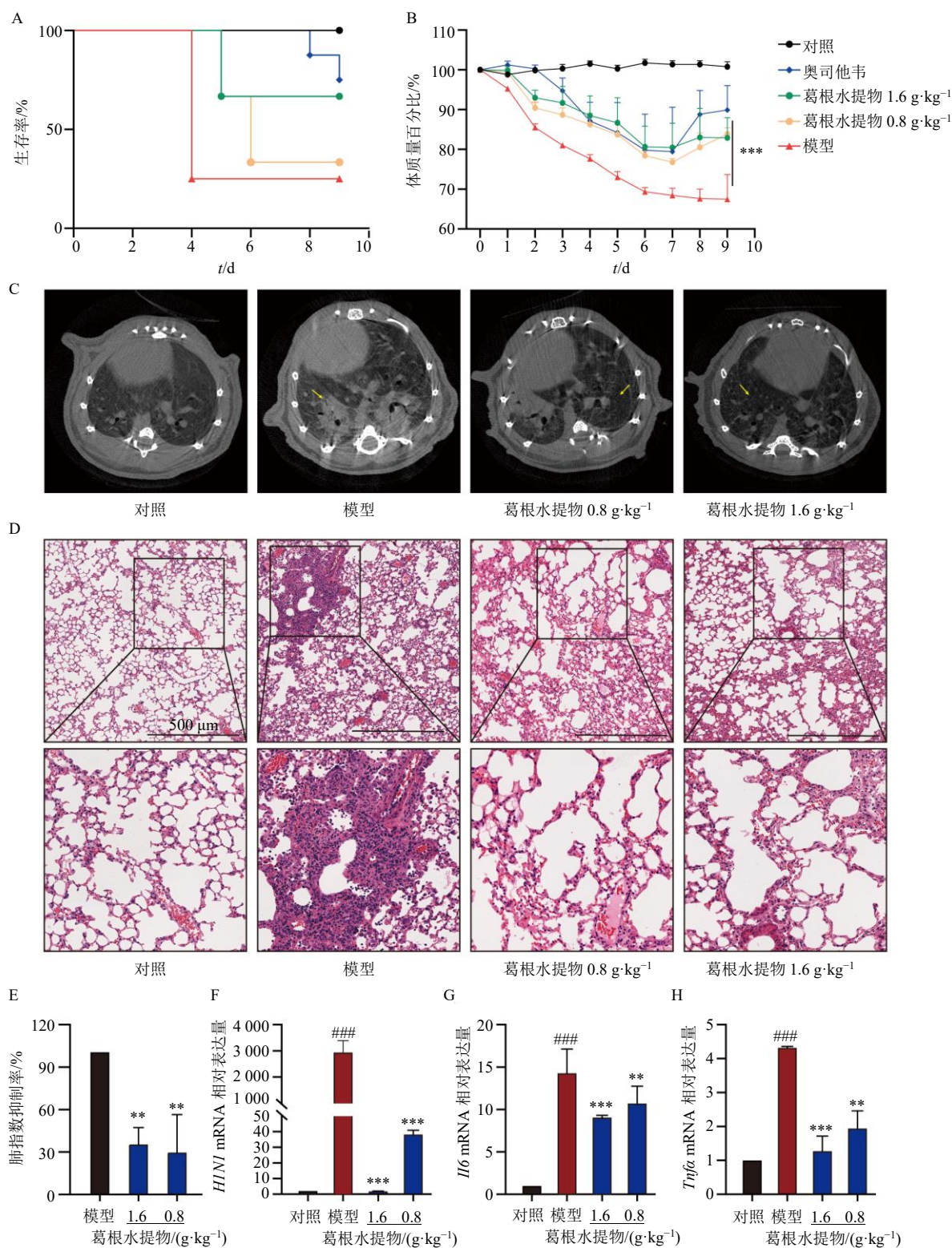
利用 H1N1、EMCV、HSV-1 感染 A549 细胞, 同时加入葛根水提取物处理 12 h。如图 4 所示, 与模型组比较, 葛根水提取物呈剂量相关性地抑制了 H1N1、EMCV 和 HSV-1 的病毒基因表达 ( $P < 0.001$ )。结果表明, 葛根水提取物能够在细胞水平显著抑制 H1N1、EMCV 和 HSV-1 的复制。

*Slc38a9*、*Slc48a1* 和 *Vps18* 等与溶酶体发生和功能有关的基因<sup>[21-22]</sup>上调表达 (表 3)。进一步在 MEF (图 6-B) 和 THP1 细胞 (图 6-C) 中检测 4 mg/mL 葛根水提取物处理 24 h 溶酶体生物发生和功能相关基因表达情况, 结果显示, 与对照组比较, 这些基因被显著上调 ( $P < 0.001$ )。

在溶酶体生物发生和功能的研究中, TFEB 主要调控溶酶体生物发生和自噬等基本细胞过程<sup>[23]</sup>。在 *Tfeb*<sup>-/-</sup> iBMDM 细胞中, 与对照细胞相比, 葛根水提取物在敲除细胞中的抗病毒能力明显减弱 (图 6-D)。结果表明, 葛根水提取物可能在细胞中通过部分影响溶酶体生物发生和功能而发挥抗病毒作用。

## 4 讨论

葛根性凉味甘, 善于解表退热, 可帮助清除外邪, 提升机体抵抗力; 升阳止泻有助于调节肠道功能, 维护肠道免疫屏障; 脱毒外出能清除体内毒素, 减轻炎症, 维持免疫系统正常功能。这些作用使葛根被认为在中医理论中具有调节免疫功能的作用, 有助于增强免疫力以增强机体抗病功能。同时, 葛根作为药食同源中药, 具有应用广泛、安全性高的特点<sup>[24]</sup>。现有临床治疗多以含葛根的复方形式出现, 用于扩张血管、改善微循环、抗炎镇痛、免疫调节<sup>[25-29]</sup>。此外, 葛根中的活性成分葛根素影响的免疫调节功能也被广泛报道, 葛根素通过促进巨噬细胞发生 M2 极化抑制脂多糖诱导的炎症反应; 葛



A-各组小鼠生存率; B-各组小鼠体质量百分比; C-各组小鼠肺部 CT 结果; D-各组小鼠肺组织 HE 切片 (×2.25); E-各组小鼠肺指数抑制率; F-各组小鼠肺组织病毒载量; G、H-各组小鼠肺组织炎症因子表达。

A-survival rate of mice in each group; B-body weight percentage of mice in each group; C-CT scans of lungs of mice in each group; D-HE sections of lung in each group of mice (×2.25); E-inhibition rate of lung index of mice in each group; F-lung viral load of mice in each group; G, H-expressions of inflammatory factors in lung tissue of mice in each group.

图5 葛根水提取物对 H1N1 感染小鼠的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 Effect of *P. lobata* water extract on influenza virus-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



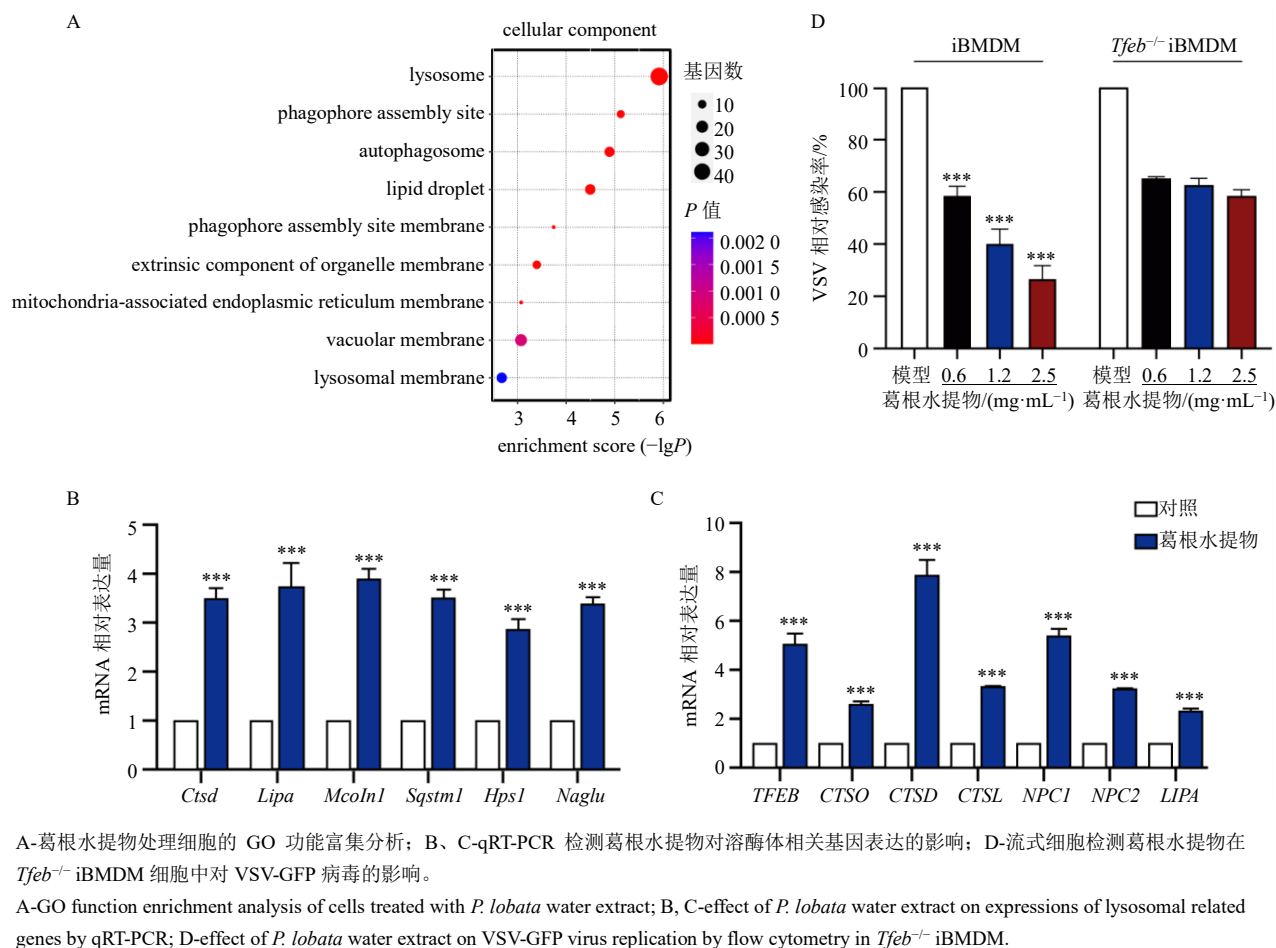


图 6 葛根水提取物对溶酶体生物发生和功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of *P. lobata* water extract on lysosomal biogenesis and function ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

表 3 葛根水提取物对溶酶体相关基因上调情况

Table 3 Up-regulation of lysosomal related genes by *P. lobata* water extract

| 基因             | log <sub>2</sub> (葛根提取物/对照) | 基因             | log <sub>2</sub> (葛根提取物/对照) |
|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| <i>Mfsd4b5</i> | 2.700 439 718               | <i>Ramp3</i>   | 1.216 575 095               |
| <i>Arrdc3</i>  | 2.570 782 172               | <i>Abca5</i>   | 1.199 648 466               |
| <i>Mtl</i>     | 2.428 295 877               | <i>Vps18</i>   | 1.168 621 165               |
| <i>Fil1</i>    | 2.235 820 564               | <i>Prdx6</i>   | 1.163 398 628               |
| <i>Slc48a1</i> | 2.144 684 475               | <i>Slc30a4</i> | 1.140 862 536               |
| <i>Hyal1</i>   | 1.784 595 676               | <i>Bloc1s2</i> | 1.126 292 974               |
| <i>Cd68</i>    | 1.558 967 292               | <i>Cln3</i>    | 1.113 843 089               |
| <i>Cat</i>     | 1.494 738 324               | <i>H2-DMa</i>  | 1.088 268 189               |
| <i>Syt11</i>   | 1.490 688 469               | <i>Gm2a</i>    | 1.071 232 024               |
| <i>Sqstm1</i>  | 1.465 042 956               | <i>Gpr137b</i> | 1.056 307 441               |
| <i>Mfsd13b</i> | 1.416 839 742               | <i>Rptor</i>   | 1.046 596 278               |
| <i>Atp13a2</i> | 1.375 581 210               | <i>Bbc3</i>    | 1.041 222 663               |
| <i>Kif2a</i>   | 1.324 375 121               | <i>Abca2</i>   | 1.036 220 188               |
| <i>Cd34</i>    | 1.294 183 104               | <i>Abhd6</i>   | 1.017 890 159               |
| <i>Slc38a9</i> | 1.264 742 748               | <i>Nbr1</i>    | 1.014 051 850               |
| <i>Sod1</i>    | 1.229 458 746               | <i>Vps11</i>   | 1.000 885 904               |
| <i>Meak7</i>   | 1.218 740 027               |                |                             |

根素促进核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 表达和核转位, 减少活性氧积累和脂质过氧化, 提高细胞抗氧化能力<sup>[30-31]</sup>。然而, 鲜有葛根单味药的抗病毒研究。因此, 阐明葛根的抗病毒功能与机制, 有利于其药用价值的进一步提升。

溶酶体抵抗病毒感染引发的细胞应激的过程中, 细胞自噬发挥了重要的调节作用。细胞自噬作为一种细胞保守的防御机制, 可将病毒或病毒蛋白运送到溶酶体进行降解, 激活先天性和适应性免疫反应, 并减少病毒感染诱导的细胞死亡<sup>[32-33]</sup>。于此, SARS-CoV-2 通过抑制自噬溶酶体的形成和功能导致溶酶体损伤, 发挥了病毒的逃逸功能<sup>[34]</sup>; 流感病毒通过复制干扰细胞自噬并阻断溶酶体融合, 增加自噬体的积累, 促进病毒复制<sup>[35]</sup>; 细胞自噬保护中枢神经系统免受 Sindbis 病毒感染等<sup>[36]</sup>。TFEB 是维持溶酶体功能稳态的核心转录因子之一, 在细胞受

到应激信号刺激后转录入核, 激活一系列与自噬和溶酶体功能相关的基因, 提升细胞内病原体清除与细胞应激状修复能力<sup>[37]</sup>。在本研究中, 利用 RNA 转录组测序和生物信息学分析了葛根水提物处理后的细胞样品, 发现其处理促进溶酶体功能、自噬溶酶体相关功能的基因上调表达并被显著富集; 并用实验验证溶酶体生物合成相关基因, 如 *Lipa*、*Ctsd*、*Ctso* 等表达显著上调。在此基础上, 本研究进一步探究了葛根的抗病毒功能与溶酶体生物发生相关的关键 TFEB 信号通路的关系。利用野生型与 *Tfeb* 敲除细胞结合病毒感染模型, 研究初步证明了葛根的抗病毒功能部分依赖于 TFEB 信号通路。

本研究采用了多种病毒 (包括 VSV、H1N1、EMCV 和 HSV-1) 感染的细胞模型, 结合流式细胞术和 qRT-PCR 等技术, 揭示葛根水提物在细胞水平对上述病毒都展现出抗病毒复制作用, 并呈现剂量相关性。利用 H1N1 病毒滴鼻感染模型, 发现葛根水提物治疗延长感染小鼠的生存时间, 缓解小鼠的体质量下降情况; 小动物 CT 结果显示葛根水提物能够有效减少病毒感染引发的“白肺”状况; 并证明葛根水提物处理降低病毒感染小鼠肺组织的病毒载量。

本研究揭示了葛根在细胞内抵抗 VSV、H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒复制的作用, 并在小鼠体内抑制 H1N1 病毒的感染, 其通过 TFEB 信号通路促进细胞溶酶体的生物发生从而发挥抗病毒的功能。本研究不仅明确了葛根体内外的抗病毒复制作用, 还为以 TFEB 为靶标的中医药抗病毒研究提供了新的研究思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 347.
- [2] 赵荣华, 孙静, 包蕾, 等. 基于免疫调节探讨葛根汤颗粒治疗小鼠病毒性肺炎的作用机制 [J]. 中国药物警戒, 2024, 21(2): 132-136.
- [3] 肖奕珂, 许华冲, 邓力, 等. 葛根芩连汤发酵液对流感病毒 FM1 感染模型小鼠的治疗作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(8): 1555-1560.
- [4] 陈艳, 文佳玉, 谢晓芳, 等. 葛根的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药与临床, 2021, 12(1): 53-60.
- [5] 王惠娴. 葛根素作为神经氨酸酶抑制剂的抗流感作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [6] 耿子凯. 经方葛根汤抗甲型 H1N1 流感病毒的作用机制及药效物质研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [7] 胡玉妍, 王倩, 谌梦, 等. 葛根素对 PEDV 感染幼龄仔猪肺脏、脾脏和肠系膜淋巴结抗氧化功能和免疫功能的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(2): 383-390.
- [8] Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, et al. The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target [J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(4): 214-226.
- [9] Settembre C, Fraldi A, Medina D L, et al. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(5): 283-296.
- [10] Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry [J]. *J Cell Biol*, 2011, 195(7): 1071-1082.
- [11] Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. *Immunity*, 2021, 54(3): 437-453.
- [12] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [13] 房思远, 刘贺, 赵子玉, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法优化改良葛根芩连汤提取工艺研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2024, 43(1): 64-69.
- [14] Liang D F, Lin W J, Ren M, et al. m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 modulates autophagy by targeting SQSTM1 in diabetic skin [J]. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1318-1337.
- [15] Qi J S, Li Q Q, Xin T L, et al. MCOLN1/TRPML1 in the lysosome: A promising target for autophagy modulation in diverse diseases [J]. *Autophagy*, 2024, 20(8): 1712-1722.
- [16] Yu J Y, He X, Wei A H, et al. HPS1 regulates the maturation of large dense core vesicles and lysozyme secretion in paneth cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 560110.
- [17] Xing C C, Jiang Z Y, Wang Y. Downregulation of NAGLU in VEC increases abnormal accumulation of lysosomes and represents a predictive biomarker in early atherosclerosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 797047.
- [18] Zhang L M, Wei C L, Li D B, et al. COVID-19 receptor and malignant cancers: Association of *CTSL* expression with susceptibility to SARS-CoV-2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(6): 2362-2371.
- [19] Zhang Z X, Chen C, Yang F, et al. Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(15): 2844-2857.
- [20] 叶彬, 闫小巧, 雷婷, 等. 葛根药材 HPLC 指纹图谱与 6 种成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8222-8227.
- [21] Segala G, Bennesch M A, Ghahhari N M, et al. Vps11 and Vps18 of Vps-C membrane traffic complexes are E3 ubiquitin ligases and fine-tune signalling [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1833.
- [22] O'Callaghan K M, Ayllon V, O'Keeffe J, et al. Heme-binding protein HRG-1 is induced by insulin-like growth

- factor I and associates with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase to control endosomal pH and receptor trafficking [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(1): 381-391.
- [23] Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(6): e202102001.
- [24] 付旭冉, 叶永丽, 赵晓联, 等. 葛根功效活性及其在食品中的应用进展 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(13): 197-205.
- [25] 保继琼. 葛根芩连汤合异功散加味治疗溃疡性结肠炎大肠湿热证的临床研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2016.
- [26] 曹浩坤. 桂枝加葛根汤治疗强直性脊柱炎的疗效观察 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [27] 麻文菁. 加味葛根汤治疗感冒 (风寒表实证) 有效性的临床研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [28] 张志文. 桂枝加葛根汤治疗颈型颈椎病 (风寒湿型) 的临床疗效及其调控 PI3K/AKT/mTOR 自噬通路的机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2023.
- [29] 赵旭凡, 田立新. 从“火郁发之”论《伤寒论》葛根芩连汤方证本义 [J]. 环球中医药, 2020, 13(1): 122-124.
- [30] 田赵威, 刘晨风, 王琛. 葛根素在重大慢性疾病临床应用中的探索研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(3): 522-529.
- [31] 丁文姣. 葛根素对溃疡性结肠炎缓解作用研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [32] Jackson W T. Viruses and the autophagy pathway [J]. *Virology*, 2015, 479/480: 450-456.
- [33] Viret C, Rozières A, Faure M. Autophagy during early virus-host cell interactions [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(12): 1696-1713.
- [34] Miao G Y, Zhao H Y, Li Y, *et al.* ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(4): 427-442.
- [35] Feizi N, Mehrbod P, Romani B, *et al.* Autophagy induction regulates influenza virus replication in a time-dependent manner [J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66(4): 536-541.
- [36] Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R Jr, *et al.* Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(2): 115-127.
- [37] Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function [J]. *Science*, 2009, 325(5939): 473-477.

[责任编辑 李亚楠]