

盐酸黄连碱靶向 TRPV4 抵抗甲型流感病毒的机制研究

王 硕^{1,2}, 邱非凡², 曹 研², 李雪娜², 薛 坤², 王悦琦², 吴佳婧², 申蓓蕾², 王铁成², 高玉伟^{1,2*}

1. 长春中医药大学中西医结合学院, 吉林 长春 130117

2. 中国农业科学院长春兽医研究所, 病原微生物安全全国重点实验室, 吉林省人兽共患病预防控制重点实验室, 吉林 长春 130122

摘要: 目的 研究盐酸黄连碱对甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 的抑制作用及其潜在分子机制。方法 采用 CCK-8 法检测盐酸黄连碱对犬肾细胞 (Madin-Darby canine kidney, MDCK)、人胚肾 293T 细胞 (human embryonic kidney 293T cells, 293T) 活力的影响; 通过体外病毒感染模型, 检测盐酸黄连碱对 IAV 复制及病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP) 表达的调控作用, 并计算其半数有效浓度 (half effective concentration, EC₅₀) 与半数细胞毒性浓度 (half cytotoxic concentration, CC₅₀)。构建 H1N1-UI182 感染小鼠模型, 给予盐酸黄连碱干预后, 检测小鼠生存率、体质量、肺指数、肺组织病毒滴度及病毒载量变化; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肺组织病理损伤情况; 免疫组化法检测肺组织 NP 蛋白表达; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测盐酸黄连碱对瞬时受体电位香草酸亚型 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)/核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路的调控作用, 以及对肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1β、γ 干扰素 (interferon-γ, IFN-γ) 等细胞因子表达的影响。结果 在细胞水平, 与模型组比较, 盐酸黄连碱显著抑制 IAV 复制, 降低 NP 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.001); 盐酸黄连碱在 MDCK 细胞中 EC₅₀ 为 15.93 μg/mL、CC₅₀ 为 83.42 μg/mL, 在 293T 细胞中 EC₅₀ 为 18.44 μg/mL、CC₅₀ 为 69.90 μg/mL。在 H1N1-UI182 感染小鼠模型中, 与模型组比较, 盐酸黄连碱显著改善小鼠体质量下降情况, 提高小鼠生存率, 并显著降低小鼠肺指数、肺组织病毒滴度及病毒载量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。组织病理学结果显示, 盐酸黄连碱显著减轻病毒感染引发的肺部炎性浸润与肺泡结构破坏。免疫组化结果表明, 盐酸黄连碱可显著减少肺组织中 NP 蛋白表达。Western blotting 和 qRT-PCR 结果显示, 与模型组比较, 盐酸黄连碱可调控 TRPV4/NF-κB 信号通路, 显著抑制 TRPV4 过度活化 ($P < 0.001$), 阻断 NF-κB 核转位 ($P < 0.001$), 进而下调 TNF-α、IL-6、IL-1β 等促炎因子表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 盐酸黄连碱可通过直接抑制 IAV 复制, 并调控 TRPV4/NF-κB 信号通路改善病毒诱导的炎症反应, 发挥抗甲型流感病毒作用。

关键词: 盐酸黄连碱; 甲型流感病毒; TRPV4; NF-κB; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-2898-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.003

Mechanism of coptisine hydrochloride targeting TRPV4 to resist influenza A virus

WANG Shuo^{1,2}, QIU Feifan², CAO Yan², LI Xuena², XUE Kun², WANG Yueqi², WU Jiajing², SHEN Beilei², WANG Tiecheng², GAO Yuwei^{1,2}

1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Jilin Province Key Laboratory of Prevention and Control of Zoonotic Diseases, National Key Laboratory of Pathogenic Microbial Biosafety, Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect and its potential molecular mechanism of coptisine hydrochloride on influenza A virus (IAV). **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of coptisine hydrochloride on viability of Madin-Darby canine kidney (MDCK) and human embryonic kidney 293T cells (293T). By using an *in vitro* viral infection model, the regulatory effect of coptisine hydrochloride on IAV replication and viral nucleoprotein (NP) expression was detected, and its half effective concentration

收稿日期: 2025-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32170539)

作者简介: 王 硕, 硕士研究生, 研究方向为中西医防治慢病的新药临床前研究。E-mail: wangshuo06152023@163.com

*通信作者: 高玉伟, 研究员。E-mail: dawei1105@foxmail.com

(EC₅₀) and half cytotoxic concentration (CC₅₀) were calculated. A mouse model infected with H1N1-UI182 was constructed, coptisine hydrochloride was given for intervention, changes in survival rate, body weight, lung index, lung tissue virus titer and viral load were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological damage of lung tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression of NP protein in lung tissue. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the regulatory effect of coptisine hydrochloride on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway, as well as its effect on the expressions of cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and interferon- γ (IFN- γ). **Results** At the cellular level, compared with model group, coptisine hydrochloride significantly inhibited IAV replication and reduced NP protein expression level ($P < 0.05, 0.001$). Coptisine hydrochloride had an EC₅₀ of 15.93 μ g/mL and a CC₅₀ of 83.42 μ g/mL in MDCK cells, and an EC₅₀ of 18.44 μ g/mL and a CC₅₀ of 69.90 μ g/mL in 293T cells. In the H1N1-UI182 infected mouse model, compared with model group, coptisine hydrochloride significantly improved the decline in body weight of mice, increased survival rate, and significantly reduced lung index, lung tissue virus titer and viral load ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The histopathological results showed that coptisine hydrochloride significantly reduced the inflammatory infiltration and alveolar structural damage caused by viral infection in lungs. The immunohistochemical results showed that coptisine hydrochloride significantly reduced the expression of NP protein in lung tissue. Western blotting and qRT-PCR results showed that compared with model group, coptisine hydrochloride could regulate TRPV4/NF- κ B signaling pathway, significantly inhibit TRPV4 overactivation ($P < 0.001$), block NF- κ B nuclear translocation ($P < 0.001$), and subsequently downregulate the expressions of pro-inflammatory factors such as TNF- α , IL-6, IL-1 β ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Coptisine hydrochloride could directly inhibit IAV replication and regulate TRPV4/NF- κ B signaling pathway to improve virus induced inflammatory response, exerting anti-IAV effects.

Key words: coptisine hydrochloride; influenza A virus; TRPV4; NF- κ B; inflammatory response

甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 是引起季节性流感及流感大流行的主要病原体。IAV 具有高度变异性, 频繁的抗原转换导致新亚型或变种的出现, 对全球公共卫生构成持续威胁。尽管疫苗接种是预防流感的有效手段, 但其有效性受限于疫苗株与流行株的匹配程度及人群免疫应答差异^[1]。目前的抗病毒策略仅在疾病早期有效, 且面临病毒基因组不稳定性挑战, 因此流感病毒仍是人类健康的重大威胁^[2-3]。神经氨酸酶抑制剂 (如奥司他韦) 和聚合酶抑制剂 (如巴洛沙韦) 是主要的抗病毒药物, 但耐药毒株的出现限制了其临床疗效^[4]。因此, 开发新型、高效、天然抗病毒药物仍是迫切需求。

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 是清热燥湿、泻火解毒的经典中药^[5]。盐酸黄连碱是黄连的主要活性生物碱成分之一。已有研究表明, 盐酸黄连碱在多种疾病相关过程中具有生物活性, 包括改善气道异常收缩^[6]、调节脂肪酸代谢并保护神经炎症^[7]以及潜在抗病毒作用^[8]。瞬时受体电位香草酸亚型 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 是一种非选择性阳离子通道, 广泛参与细胞钙稳态维持、机械信号转导及炎症应答过程。近年研究证实, TRPV4 在 IAV 感染中扮演关键角色: 病毒感染可激活 TRPV4, 进而促进病毒复制并加剧炎症反应; 而抑制 TRPV4 表达或功能则可显著阻断

IAV 复制^[9-10]。本课题组前期基于 ConPLex 的药物筛选方法发现盐酸黄连碱与 TRPV4 靶点紧密相关。同时进一步发现, 靶向抑制 TRPV4 能够使 IAV 感染所诱导的核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路恢复至静息状态^[11-14]。基于此, 本研究聚焦探讨盐酸黄连碱是否通过靶向 TRPV4 发挥抗 IAV 活性。综合采用犬肾细胞 (Madin-Darby canine kidney, MDCK)、人胚肾 293T 细胞 (human embryonic kidney 293T cells, 293T) 及 TRPV4 基因敲除 293T 细胞体外模型, 联合 BALB/c 小鼠体内感染模型, 系统评价盐酸黄连碱的抗病毒效果, 并深入阐明其靶向 TRPV4、调控宿主固有免疫应答的抗病毒机制。

1 材料

1.1 动物、细胞和病毒

SPPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 体质量 18~20 g, 6~8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006, 动物合格证号 110011241105526364。所有操作均遵循《实验动物管理条例》并经中国农业科学院长春兽医研究所动物伦理委员会批准 (批准号 IACUC-JSYAL-11-2025-064)。

MDCK 和 293T 细胞保存于中国农业科学院长春兽医研究所。TRPV4 基因敲除 293T 细胞 (TRPV4 knockout 293T cells, TRPV4^{-/-} 293T) 购自赛业 (苏

州) 生物科技有限公司。

H1N1-UI182 病毒株为 2009 年甲型流感 H1N1 病毒 A/长春/01/2009 (H1N1) 的小鼠适应株, 在 MDCK 细胞中传代。

1.2 药品与试剂

盐酸黄连碱 (批号 HY-N0736; 质量分数为 99.73%)、聚乙二醇 300 (批号 HY-Y0873)、CCK-8 试剂盒 (批号 HY-K0301)、蛋白酶抑制剂 (批号 HY-K0011)、巴洛沙韦 (批号 HY-109025) 购自美国 MedChemExpress 公司; DMEM 培养基 (批号 C11995500BT)、胎牛血清 (批号 A5669701)、PBS (批号 C10010500BT)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (批号 25200-056) 购自美国 Gibco 公司; 青霉素-链霉素双抗 (批号 15140-122)、预染蛋白 Marker (批号 26616) 购自美国 Thermo 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 HY-Y0320C)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 批号 B2064) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 聚山梨酯 80 (批号 T8360)、4% 多聚甲醛 (批号 G1101) 购自北京索莱宝科技有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 YDP604-T3A) 购自天根生化科技(北京)有限公司; Triton X-100、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0010S)、5×SDS-PAGE 上样缓冲液 (批号 P0015L)、Western 快速转膜液 (批号 P0575)、BeyoECL Star 化学发光试剂盒 (批号 P0018AM)、10×TBST (批号 ST673)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 A0216)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 A0208) 购自碧云天生物技术有限公司; SurePAGE™ 预制胶 (批号 M00600)、MOPS 电泳缓冲液 (批号 M00680) 购自金斯瑞生物科技有限公司; 病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP) 抗体 (批号 ab20343)、β-actin 抗体 (批号 ab6276)、TRPV4 抗体 (批号 ab39260)、Alexa Fluor® 647 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 ab150119) 购自英国 Abcam 公司; NF-κB 抑制蛋白 α (inhibitor kappa B α, IκBα) 抗体 (批号 4812)、p-IκBα 抗体 (批号 2859)、NF-κB p65 抗体 (批号 8242)、p-NF-κB p65 抗体 (批号 3033)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 抗体 (批号 12703)、IL-6 抗体 (批号 12912)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 抗体 (批号 11948) 购自美国 CST 公司; γ 干扰素 (interferon-γ, IFN-γ) 抗体 (批号 BS3486) 购自南京巴傲得生物科技有限公司。

1.3 仪器

BSC-1100 CLASS II TYPE A2 型生物安全柜 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); YC-1015L 型医用冷藏箱 (合肥美菱股份有限公司); BB150-2TCS-L 型二氧化碳培养箱、Heraeus Pico 17 型离心机、S1 移液器、Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); SCIENTZ-48L 型、SCIENTZ-IIID 型超声破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); CFX96 Touch 型实时荧光定量 PCR 系统 (美国 Bio-Rad 公司); E6050 型电泳/转膜系统 (碧云天生物技术有限公司); 5200 Multi 型化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司); CKX41 型倒置显微镜、APX100 型全自动荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); GR85DP 型高压蒸汽灭菌锅 [致微 (厦门) 仪器有限公司]。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 CCK-8 法检测盐酸黄连碱对 MDCK 和 293T 细胞的毒性 取对数生长期的 MDCK 和 293T 细胞, 分别经 0.25%、0.05% 胰酶消化后, 以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至 70%~80% 融合度。更换为含系列浓度 (0.001~100.000 μmol/L) 盐酸黄连碱的培养基, 每组 3 个复孔, 设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和空白组 (不接种细胞不给药), 继续培养 48 h。显微镜下观察细胞形态后, 每孔加入含 10% CCK-8 的培养基, 避光孵育 1 h, 于 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率和药物的半数细胞毒性浓度 (half cytotoxic concentration, CC₅₀)。

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

2.1.2 抗病毒活性检测 MDCK 和 293T 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至 70%~80% 融合度。接种于冰上融化的 H1N1-UI182 病毒 [感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 0.1], 吸附 1 h 后更换为含系列浓度 (1.625、3.125、6.250、12.500、25.000 μmol/L) 盐酸黄连碱的培养基, 每组 3 个复孔, 设置对照组 (不接种病毒不给药) 和模型组 (接种病毒不给药), 继续培养 48 h。采用 CCK-8 法测定 *A* 值, 计算病毒抑制率和半数有效浓度 (half effective concentration, EC₅₀)。

2.1.3 免疫荧光检测 NP 蛋白表达 MDCK 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至 70%~80% 融合度。设置对照组、模

型组、巴洛沙韦(10 μmol/L)组和盐酸黄连碱(6.25、12.50、25.00 μmol/L)组。除对照组外,其余各组接种于H1N1-UII82病毒(MOI=0.1),吸附1h后更换为不同浓度药物的培养基,对照组加入不含药物的培养基,继续培养48h。细胞经4%多聚甲醛固定20min、0.2% Triton-X-100透膜10min及PBS洗涤后,以2%BSA封闭1h。加入一抗,室温孵育4h,洗涤后加入荧光二抗,避光孵育1h。经DAPI染核后,于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.1.4 Western blotting 检测 NP 蛋白表达 按“2.1.3”项下处理后,收集细胞,用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取总蛋白,4℃、12000r/min离心15min后取上清,BCA法测定蛋白浓度。等量蛋白经100℃煮沸变性后,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,经5%BSA封闭2h后,加入一抗,4℃孵育过夜;TBST洗涤,加入HRP标记的二抗,室温孵育1h。ECL发光液孵育1min后,于化学发光成像系统显影,分析条带灰度值。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、造模、给药与取材 BALB/c小鼠适应性饲养1周后,按随机数字表法分组。为兼顾组织学/病毒学终点检测与生存结局评价,设置取材亚组[用于感染后3、5d(days after infection, dpi)取样]与生存随访亚组(观察至14dpi)。

设置对照组、模型组及盐酸黄连碱低、中、高剂量(12.5、25.0、50.0 mg/kg)组和巴洛沙韦(5 mg/kg)组,每组12只。根据文献报道中盐酸黄连碱在小鼠模型中的常用安全有效剂量(10~50 mg/kg),结合盐酸黄连碱体外抗病毒的EC₅₀进行剂量换算,以确保体内剂量覆盖有效浓度窗口;巴洛沙韦的剂量参考已建立的小鼠流感模型治疗方案。除对照组外,其余各组小鼠均在麻醉状态下经鼻腔接种50 μL含15 MLD₅₀(半数致死剂量, median lethal dose)的H1N1-UII82病毒液建立感染模型。感染病毒后12h,各给药组ig相应药物。取材亚组持续给药至采样终点(3、5 dpi),并在对应时间点采集血样后实施安乐死,分离肺、脾、肝、肾组织,于4%多聚甲醛中固定;血样室温静置2h后离心,收集血清,保存于-80℃。生存随访亚组连续给药7d,持续观察至14dpi,期间每日记录小鼠体质量变化与生存情况。

2.2.2 病毒滴度测定 取各组小鼠肺组织,加入

DMEM培养基研磨,离心收集上清。将上清液进行10倍系列稀释(0.1~1×10⁻⁸),每个稀释度接种3个9日龄SPF鸡胚,37℃孵育72h。将鸡胚置于4℃处理30min后,与1%鸡红细胞悬液混合并观察凝血现象。采用Reed-Muench法计算病毒滴度,结果以lgEID₅₀(鸡胚半数感染量,50% egg infectious dose)表示。

2.2.3 qRT-PCR 检测肺组织 IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-6、趋化因子配体5 (chemokine ligand 5, CCL-5) 基因表达 取各组小鼠肺组织,按照试剂盒说明书提取总RNA并合成cDNA,进行qRT-PCR分析。引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	F: TGG AATCCCTGTGGGACCATGAAAC R: ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
<i>IFN-γ</i>	F: AGCCAAATCGTCTCCTTCTACTTC R: TGCACCTTGTGCTGCTGTT
<i>TNF-α</i>	F: AGCCCTGGTATGAACCCATC R: GGAATCGGCAAAGTCAAGGT
<i>IL-1β</i>	F: TCATCGTGGCAGTGGAAAAG R: GGG AAGCAAGGGTCTCAGGT
<i>IL-6</i>	F: AGTTGCCTTCTTGGGACTGATG R: GGGAGTGGTATCCTCTGTGAAGTCT
<i>CCL-5</i>	F: CTCCTTGCTGCTTTCCTAC R: ACACACCTGGCGGTTCTTTC

2.2.4 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 观察肺组织病理变化 取各组小鼠肺组织,于4%多聚甲醛中固定24~72h,经脱水、石蜡包埋后制备4~8 μm厚切片。切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,进行HE染色,干燥后于光学显微镜下观察并拍照。

2.2.5 免疫组化染色检测肺组织 NP 蛋白表达 取肺组织切片,以0.3% H₂O₂甲醇溶液室温处理20min以抑制内源性过氧化物酶活性。抗原修复后,于室温下以5%山羊血清封闭20min,随后在4℃条件下与甲型流感病毒核蛋白抗体孵育过夜。洗涤后,切片与生物素标记二抗室温孵育1h,最后使用DAB显色液进行显色,苏木素复染,封片后在显微镜下观察并拍照。

2.2.6 Western blotting 检测肺组织 NP、TRPV4、NF-κB 通路、TNF-α、IFN-γ、IL-6 和 IL-1β 蛋白表达 取各组小鼠肺组织,匀浆后加入裂解液提取蛋白,按“2.1.4”项下方法检测相关蛋白表达。

2.3 敲除 TRPV4 后盐酸黄连碱对 TRPV4 和 NP 蛋白表达的影响

TRPV4^{-/-} 293T 和 293T 细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至 70%~80%融合度。接种 H1N1-UI182 病毒 (MOI=0.1), 吸附 1 h 后更换为含 25 μmol/L 盐酸黄连碱的培养基, 设置对照组 (不接种病毒不给药) 和模型组 (接种病毒不给药), 继续培养 48 h。收集细胞, 按“2.1.4”项下方法检测 TRPV4 和 NP 蛋白表达。

2.4 分子对接验证

从 PDB 数据库下载得到 TRPV4 (PDB ID: 4DX2) 的 3D 结构文件, 通过 zinc 数据库 (<https://zinc.docking.org/>) 获得配体小分子盐酸黄连碱的结构。使用 AutoDock Tools 1.5.7 处理蛋白与小分子的结构文件并进行对接, 使用 PyMOL2.3.0 软

件对盐酸黄连碱与 TRPV4 受体蛋白的分子对接结果进行可视化。

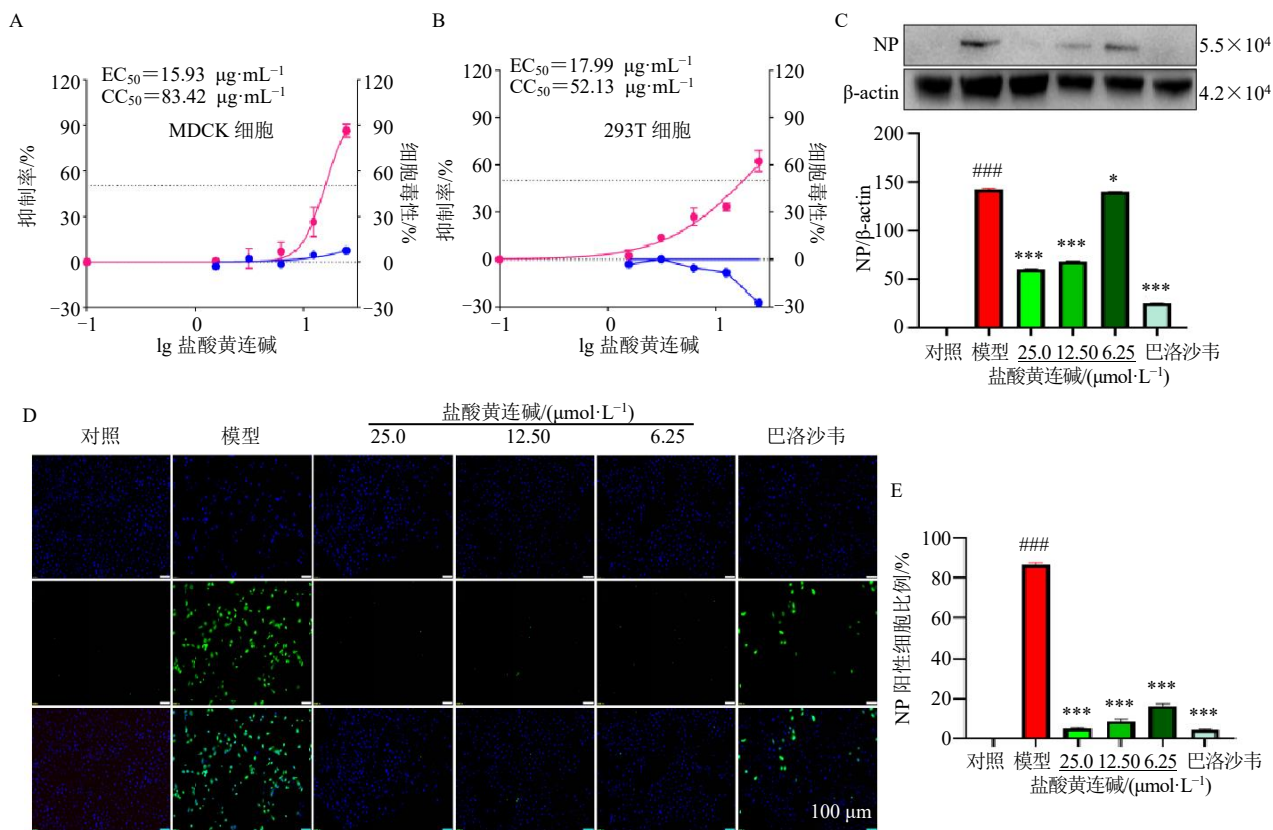
2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用未配对的学生 *t* 检验进行显著性分析。

3 结果

3.1 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 病毒复制的影响

采用 CCK-8 法测定盐酸黄连碱对 MDCK、293T 细胞的毒性, 盐酸黄连碱对 MDCK 和 293T 细胞的 CC₅₀ 分别为 83.42、52.13 μg/mL; 接种 H1N1-UI182 病毒 (MOI=0.1) 后, 盐酸黄连碱对 MDCK 和 293T 细胞的 EC₅₀ 分别为 15.93、17.99 μg/mL (图 1-A、B)。采用 6.25、12.50、25.00 μmol/L 盐酸黄连碱进行后续实验。



A、B-CCK-8 法测定盐酸黄连碱对 MDCK 和 293T 细胞的 CC₅₀ 和抗病毒活性 (EC₅₀), 红色曲线为病毒抑制率, 蓝色曲线为细胞毒性; C-Western blotting 检测 MDCK 细胞中 NP 蛋白表达; D、E-免疫荧光染色检测 MDCK 细胞核中 NP 表达 (×50), 蓝色为 DAPI 染核, 绿色为 NP; 与对照组比较: ###*P*<0.001; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001, 下同。

A, B-CC₅₀ and antiviral activity (EC₅₀) of coptisine hydrochloride on MDCK and 293T cells detected by CCK-8, red curve represents virus inhibition rate, and blue curve represents cytotoxicity; C-expression of NP protein in MDCK cells detected by Western blotting; D, E-expression of NP in nuclei of MDCK cells detected by immunofluorescence staining (×50), with blue indicating DAPI staining and green indicating NP; ###*P*<0.001 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group, same as below figures.

图 1 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 病毒复制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

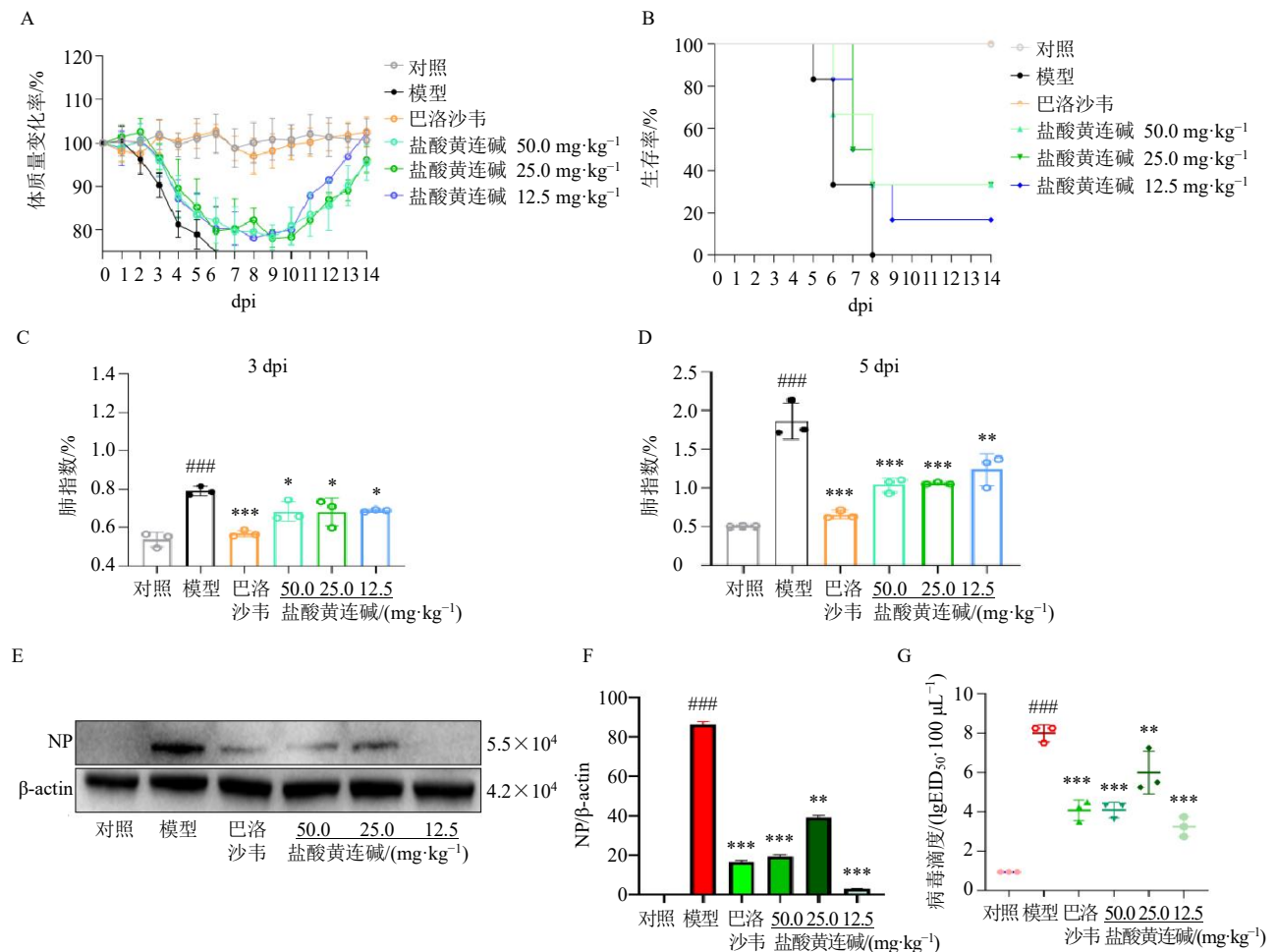
Fig. 1 Effect of coptisine hydrochloride on replication of H1N1-UI182 virus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

采用 Western blotting 检测 NP 表达, 结果如图 1-C 所示, 与对照组比较, 模型组 NP 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 提示病毒在细胞内大量复制; 与模型组比较, 盐酸黄连碱可显著下调 MDCK 细胞中 NP 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。在感染早期, NP 主要定位于细胞核, 感染后期可转运至细胞质并参与子代病毒装配^[15]。为研究盐酸黄连碱对细胞核内 NP 表达的影响, 采用免疫荧光染色检测细胞核内 NP 表达。结果如图 1-D、E 所示, 与模型组比较, 盐酸黄连碱显著降低细胞核内 NP 荧光强度 ($P < 0.001$), 提示盐酸黄连碱可干预病毒复制与转录过程, 从而抑制早期感染与子代病毒释放。

3.2 盐酸黄连碱的体内抗病毒作用

3.2.1 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 感染小鼠体质量、生存率和肺指数的影响 在 H1N1-UI182 病毒滴鼻感染后, 连续给药 7 d, 持续观察至 14 dpi, 期间每日记录小鼠体质量变化与生存情况, 如图 2-A、B 所示, 盐酸黄连碱有效缓解了感染小鼠的体质量减轻, 并显著提高了感染小鼠的生存率。在 H1N1-UI182 病毒滴鼻感染后 3、5 d, 测定小鼠肺指数, 如图 2-C、D 所示, 盐酸黄连碱显著降低感染小鼠在 3 dpi 和 5 dpi 时的肺指数 ($P < 0.05$ 、 0.001)。

3.2.2 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 感染小鼠肺组织 NP 蛋白表达和病毒滴度的影响 在 H1N1-UI182 病毒滴鼻感染后 5 d, 取小鼠肺组织, 通过 Western



A-感染后 14 d 内小鼠体质量变化; B-感染后 14 d 内小鼠生存曲线; C、D-感染后 3、5 d 小鼠的肺指数; E、F-Western blotting 检测小鼠肺组织中 NP 蛋白表达; G-血凝抑制实验测定感染后 5 d 小鼠肺组织中的病毒滴度。

A-changes in body weight of mice within 14 d after infection; B-survival curve of mice within 14 d after infection; C, D-lung index of mice at 3, 5 d after infection; E, F-expression of NP protein in lung tissue of mice detected by Western blotting; G-virus titer in lung tissue of mice 5 d after infection detected by hemagglutination inhibition assay.

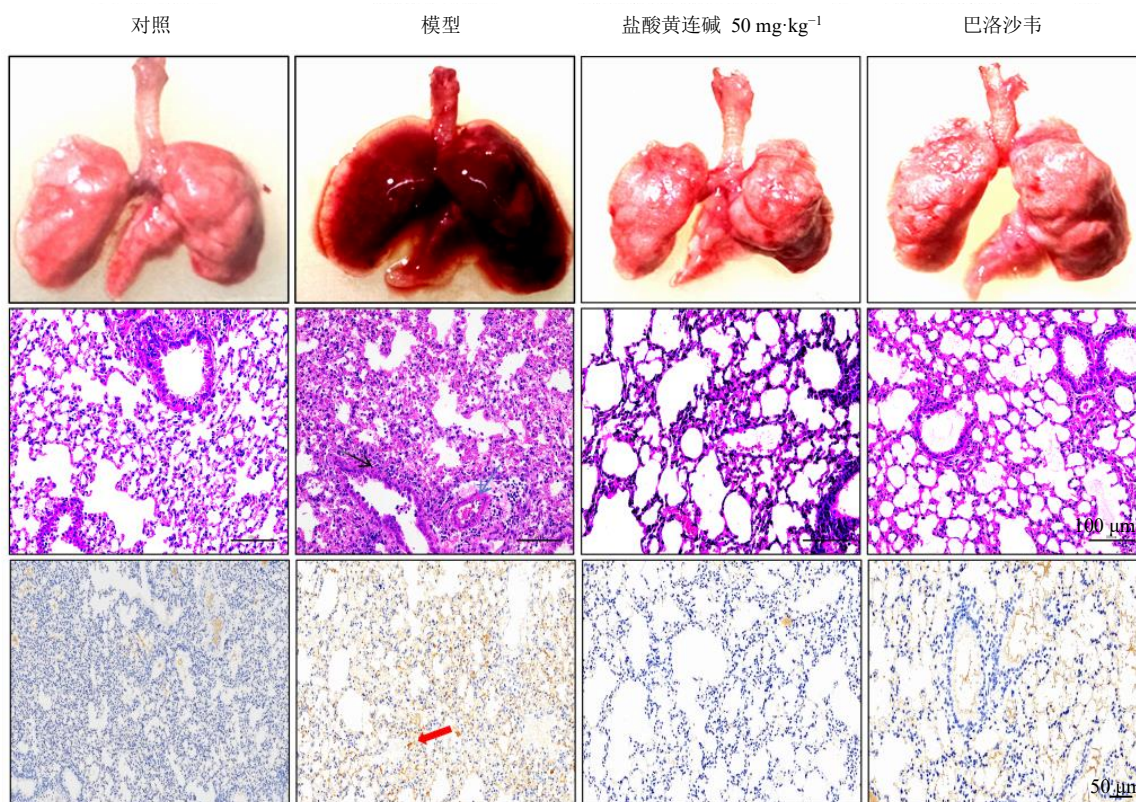
图 2 盐酸黄连碱对 H1N1 病毒感染小鼠的体内保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 *In vivo* protective effects of coptisine hydrochloride against H1N1 virus infection in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

blotting 检测小鼠肺部病毒载量的变化,结果如图 2-E、F 所示,与模型组比较,盐酸黄连碱显著下调肺组织 NP 蛋白表达 ($P<0.01$ 、 0.001),且呈剂量相关性。采用血凝抑制实验分析 5 dpi 时小鼠肺组织中的病毒载量,结果如图 2-G 所示,与模型组比较,盐酸黄连碱显著降低感染小鼠肺组织病毒滴度 ($P<0.01$ 、 0.001)。

3.2.3 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 感染小鼠肺组织病理损伤的影响 在 H1N1-UI182 病毒滴鼻感染后 5 d,取小鼠肺组织,进行 HE 和免疫组化染色。结果如图 3 所示,盐酸黄连碱能有效缓解病毒感染所致的小鼠肺部肿胀与出血损伤。HE 染色结果显示,模型组小鼠肺泡出血、细胞碎片聚集、肺泡壁扩张及大量淋巴细胞浸润;与模型组比较,各给药组小鼠肺组织的病理改变显著减轻。免疫组化染色结果显示,与模型组比较,盐酸黄连碱显著减少小鼠肺组织中 NP 的表达。

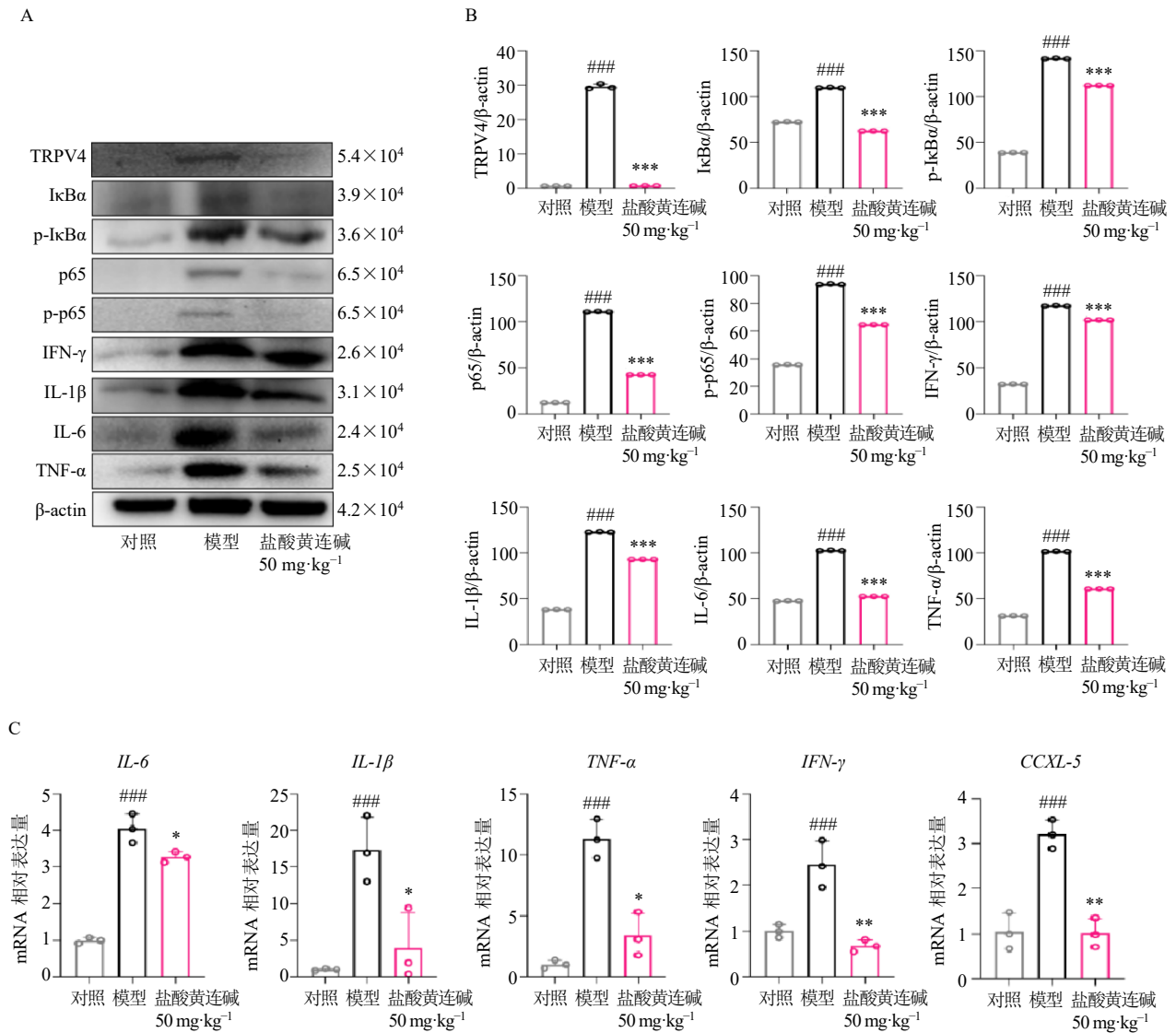
3.2.4 盐酸黄连碱对 H1N1-UI182 感染小鼠肺组织 NP、TRPV4、NF- κ B 通路、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 和 CCL-5 表达的影响 当流感病毒侵入宿主细胞时,NF- κ B 可以触发一系列反应,最终导致 NF- κ B 从其抑制蛋白 I κ B α 释放到细胞核中,在细胞核中激活多个基因的转录^[16]。在 H1N1-UI182 病毒滴鼻感染后 5 d,取小鼠肺组织,采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测 NP、TRPV4、NF- κ B 通路及炎症因子的表达。Western blotting 结果(图 4-A、B)显示,感染 H1N1-UI182 病毒后,小鼠肺组织中 NF- κ B 磷酸化水平显著升高 ($P<0.001$),NP、TRPV4 及促炎细胞因子(TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-1 β)蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$),提示病毒感染激活了 NF- κ B 信号通路及其下游炎症因子的释放;给予高剂量的盐酸黄连碱干预后,小鼠肺组织中 NP、TRPV4、p-NF- κ B 和促炎细胞因子表达水平显著降低 ($P<0.001$)。qRT-PCR 结果(图 4-C)显示,病



A-肺组织外观形态; B-HE 染色观察肺组织病理变化 ($\times 50$), 黑色箭头指示肺泡出血和细胞碎片, 蓝色箭头指示淋巴细胞浸润; C-免疫组化染色检测肺组织中 NP 表达 ($\times 50$), 红色箭头指示 NP 阳性细胞。
A-appearance and morphology of lung tissue; B-pathological changes in lung tissue observed by HE staining ($\times 50$), with black arrows indicating alveolar hemorrhage and cell debris, and blue arrows indicating lymphocyte infiltration; C-NP expression in lung tissue detected by immunohistochemistry staining ($\times 50$), with red arrows indicating NP positive cells.

图 3 盐酸黄连碱减轻 H1N1-UI182 病毒感染引起的小鼠肺组织病理损伤

Fig. 3 Coptisine hydrochloride alleviates lung tissue pathological damage in mice induced by H1N1-UI182 virus infection



A、B-Western blotting 检测小鼠肺组织中 TRPV4、NF-κB 通路相关蛋白及炎症因子表达；C-qRT-PCR 检测小鼠肺组织中炎症因子表达。
A, B-expressions of TRPV4, NF-κB pathway related proteins and inflammatory cytokine in lung tissue of mice detected by Western blotting; C-expressions of inflammatory cytokine in lung tissue of mice detected by qRT-PCR.

图 4 盐酸黄连碱抑制 H1N1-UI182 病毒感染小鼠肺组织中 NF-κB 通路激活及炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Coptisine hydrochloride inhibits NF-κB pathway activation and inflammatory cytokine expressions in lung tissues of H1N1-UI182-infected mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

病毒感染显著上调促炎细胞因子 (*TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-6*、*IL-1β*) 及趋化因子 *CCL-5* 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$)；给予盐酸黄连碱干预后，小鼠肺组织中 *TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-6*、*IL-1β*、*CCL-5* 的 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05, 0.01$)。以上结果表明，盐酸黄连碱可能通过抑制病毒复制和下调炎症细胞因子表达来减轻 H1N1-UI182 感染引起的炎症反应。

3.3 敲除 *TRPV4* 后盐酸黄连碱对 *TRPV4* 和 NP 蛋白表达的影响

敲除 *TRPV4* 的 293T 细胞和正常 293T 细胞分

别感染 H1N1-UI182 病毒后，给予盐酸黄连碱干预，通过检测 *TRPV4* 和 NP 蛋白的表达，探究盐酸黄连碱的抗病毒作用是否依赖于 *TRPV4*。如图 5 所示，与野生型 293T 细胞比较，敲除 *TRPV4* 导致 NP 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)，从而显著抑制 H1N1-UI182 病毒的复制。表明 *TRPV4* 可能是抗病毒策略的潜在靶点。

3.4 盐酸黄连碱与 *TRPV4* 受体蛋白结合的分子对接结果

为了进一步探究药物与受体蛋白间的作用机

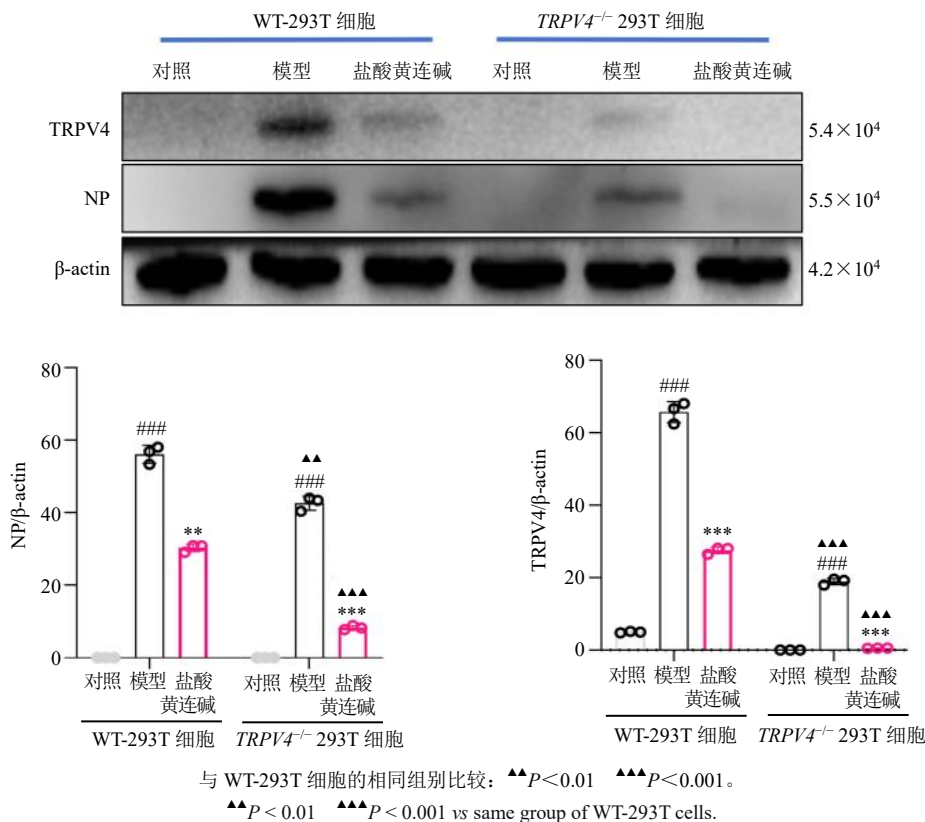


图 5 TRPV4 敲除增强盐酸黄连碱对 NP 蛋白表达的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 TRPV4 knockout enhances inhibitory effect of coptisine hydrochloride on NP protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制, 使用 Autodock 1.5.7 对盐酸黄连碱与 TRPV4 受体蛋白进行分子对接, 使用 PyMOL 2.3.0 软件进行可视化。如图 6 所示, 盐酸黄连碱与 TRPV4 蛋白中的氨基酸残基 GLN-267 形成了氢键相互作用, 两者对接产生的结合能为 -6.76 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 说明两者之间的结合状态十分稳定, 产生了一定的相互作用, 并可能对 TRPV4 蛋白的

结构功能与生物活性产生影响。

4 讨论

本研究系统评价了盐酸黄连碱抗 IAV 的活性及其靶向 TRPV4 的作用机制。结果表明, 盐酸黄连碱在体外能有效抑制 IAV 在 MDCK 细胞及 293T 细胞中的复制和病毒粒子释放, 在体内能显著提高 IAV 感染小鼠的存活率、减轻肺组织病毒载量和病

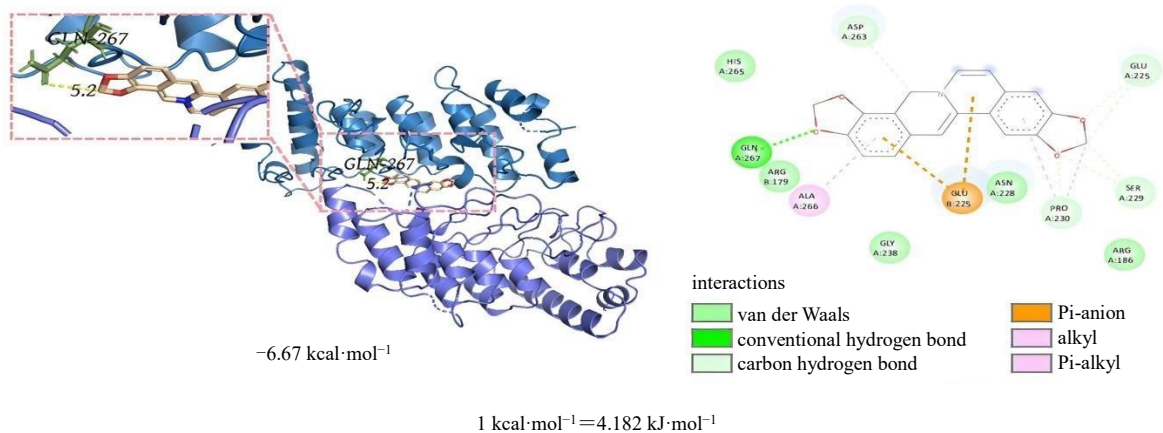


图 6 盐酸黄连碱与 TRPV4 受体蛋白的分子对接

Fig. 6 Molecular docking of coptisine hydrochloride with TRPV4 receptor protein

理损伤。机制研究揭示，盐酸黄连碱通过抑制 TRPV4 表达、阻断 NF- κ B 核转位、下调促炎因子 (IL-6、TNF- α) 表达，同时促进抗病毒因子 IFN- γ 产生，从而发挥抗病毒和免疫调节双重作用。

TRPV4 通道在流感病毒感染过程中起着至关重要的作用^[17]。通过抑制 TRPV4 通道的活性或敲除 TRPV4，可以有效地阻止或减缓病毒的进入和复制过程，减少感染的发生。例如，钆红等化合物能够有效地结合 TRPV4 通道的选择性过滤区域，阻止其打开，从而抑制 Ca²⁺流入细胞内部^[18-19]。给予 TRPV4 抑制剂不仅可以阻止病毒的入侵，还可以改善病毒引起的肺损伤^[20-21]。以上研究表明，通过抑制 TRPV4 通道可以有效降低病毒的感染率，同时可以改善病毒引起的组织损伤和其他并发症。研究表明，TRPV4 通道激活可引发细胞内 Ca²⁺水平持续升高，进而激活钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 等下游信号分子，这些激酶可进一步磷酸化并激活 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 复合物，最终导致 I κ B α 降解、NF- κ B 核转位，驱动促炎因子大量释放^[22]。本研究发现 IAV 感染显著上调小鼠肺组织 TRPV4 表达并激活 NF- κ B 通路，而盐酸黄连碱有效逆转了这一过程。提示盐酸黄连碱可能通过直接结合并抑制 TRPV4 通道功能，干扰其介导的钙信号和下游 NF- κ B 活化，从而抑制病毒复制和炎症风暴。

综上，盐酸黄连碱作为黄连的核心活性成分，具有良好的安全性和多靶点作用特性。本研究为盐酸黄连碱抗 IAV 提供了科学依据，也为基于宿主靶点开发抗病毒中药单体化合物提供了思路。未来研究可进一步通过表面等离子共振等实验直接证明盐酸黄连碱与 TRPV4 靶点的结合亲和力，验证盐酸黄连碱与 TRPV4 结合后，对其蛋白构象、功能活性的具体影响，并探索其在其他呼吸道病毒如呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)、SARS-CoV-2 感染中的潜在价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Cowling B J, Okoli G N. Influenza vaccine effectiveness and progress towards a universal influenza vaccine [J]. *Drugs*, 2024, 84(9): 1013-1023.
 [2] Gu Y N, Zuo X, Zhang S Y, et al. The mechanism behind influenza virus cytokine storm [J]. *Viruses*, 2021, 13(7):

1362.
 [3] Peteranderl C, Herold S, Schmoltdt C. Human influenza virus infections [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(4): 487-500.
 [4] Sima M, Lv C X, Qi J, et al. Anti-inflammatory effects of theaflavin-3'-gallate during influenza virus infection through regulating the TLR4/MAPK/p38 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 938: 175332.
 [5] 崔西, 李航航, 翟睿, 等. 黄连在治疗炎症性肠病中的作用机制和应用研究进展 [J]. *中草药*, 2026, 57(4): 1546-1558.
 [6] Wen N N, Xue L, Yang Y L, et al. Coptisine, a protoberberine alkaloid, relaxes mouse airway smooth muscle via blockade of VDLCs and NSCCs [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(2): BSR20190534.
 [7] Zhang J J, Qi A, Shen J, et al. Coptisine protects against transient focal cerebral ischaemic injury by regulation of arachidonic acid metabolism [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(6): 724-735.
 [8] He M F, Liang J H, Shen Y N, et al. Coptisine inhibits influenza virus replication by upregulating p21 [J]. *Molecules*, 2023, 28(14): 5398.
 [9] 徐杭杭, 王书凡, 程小龙, 等. 金丝桃苷调控大鼠脑基底动脉 TRPV4 激活 EDHF 改善缺血性脑损伤及其具体靶点的作用机制研究 [A] // 首届东方药理论坛暨 2018 年全国心脑血管药理学学术会议、上海市药理学第十九届学术年会 [C]. 上海: 皖南医学院药物研发中心药理学教研室国家中医药管理局中药药理三级实验室安徽省多糖药物工程技术研究中心, 2018.
 [10] 吕朝相. TRD 抗流感病毒和新型冠状病毒感染作用机制研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2022.
 [11] 骆荣波. 基于宿主钙信号的广谱抗病毒候选小分子研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2024.
 [12] 郭瑾. TRPV4 在流感与寨卡病毒感染过程中的作用研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2023.
 [13] Sun Y, Wu J J, Shen B L, et al. Discovery of TRPV4-targeting small molecules with anti-influenza effects through machine learning and experimental validation [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1381.
 [14] 张诗筠, 骆荣波, 孙妍, 等. 基于靶点 TRPV4 的抗 SARS-CoV-2 中药单体化合物筛选及其作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(17): 4913-4925.
 [15] Li J, Yu M, Zheng W N, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins [J]. *Viruses*, 2015, 7(5): 2668-2682.
 [16] Ma Y M, Ouyang J, Wei J Y, et al. Involvement of host non-coding RNAs in the pathogenesis of the influenza virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): 39.

- [17] Bai H Q, Si L L, Jiang A, *et al.* Mechanical control of innate immune responses against viral infection revealed in a human lung alveolus chip [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1928.
- [18] Dutta B, Arya R K, Goswami R, *et al.* Role of macrophage TRPV4 in inflammation [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(2): 178-185.
- [19] Madreiter-Sokolowski C T, Waldeck-Weiermair M, Bourguignon M P, *et al.* Enhanced inter-compartmental Ca²⁺ flux modulates mitochondrial metabolism and apoptotic threshold during aging [J]. *Redox Biol*, 2019, 20: 458-466.
- [20] Thorneloe K S, Cheung M, Bao W K, *et al.* An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(159): 159ra148.
- [21] Bihari S, Dixon D L, Lawrence M D, *et al.* Fluid-induced lung injury-role of TRPV4 channels [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(9): 1121-1134.
- [22] Liu D D, Mao M L, Liu W J, *et al.* The role of the TRPV4 channel in intestinal physiology and pathology [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 9307-9317.

[责任编辑 李亚楠]