

· 基础研究 ·

天山堇菜总黄酮抗流感病毒作用及机制研究

王 雪 司丽君 刘 燕 黄 华

摘要 **目的** 研究天山堇菜总黄酮 (TFVM) 的体内外抗流感病毒作用及其机制。**方法** 体外实验采用细胞病变效应 (CPE) 法观察 TFVM 对流感病毒 A/FM/1/1947 (H1N1) 致犬肾细胞 (MDCK) 病变的影响; 设置细胞对照组, 病毒感染组, 阳性药金刚烷胺 (AH) 对照药组 (10 μ mol/L), TFVM 100、50、25 μ g/mL 3 个浓度组, 以 H1N1 分别感染 MDCK 和人体系白血病单核细胞 (THP-1), Western Blot 法检测基质蛋白 2 (M2)、非结构蛋白 (NS1) 蛋白表达, 检测 THP-1 细胞中 p65 蛋白表达及核转位; 鸡血球细胞凝集实验检测 TFVM 对血凝素 (HA) 的抑制作用, 荧光法检测神经氨酸酶 (NA) 活性。体内实验将小鼠随机分为病毒感染对照组, 阳性药达菲 (11.375 mg/kg) 组, TFVM 高、低剂量 (0.4、0.2 g/kg) 组, 以流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠建立病毒性肺炎模型, 取小鼠肺组织研磨液接种 MDCK 细胞, CPE 法观察对小鼠肺组织病毒增殖量的影响; qRT-PCR 检测 M2 蛋白及肺组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、干扰素诱导蛋白 10 (IP-10) mRNA 表达水平。**结果** TFVM 明显抑制流感病毒致 MDCK 细胞病变, 其 IC_{50} 为 79.1 μ g/mL; 其 100 μ g/mL 浓度对 MDCK 和 THP-1 细胞中流感病毒 M2、NS1 蛋白表达均有明显抑制作用; TFVM 还可抑制 THP-1 细胞内 p65 蛋白表达及其核转位。TFVM 对流感病毒的两个膜蛋白 NA 和 HA 功能无明显影响; TFVM 以 0.2、0.4 g/kg 剂量给药可明显降低流感病毒感染小鼠肺组织内病毒载量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IP-10 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 在一定程度上能降低 M2 mRNA 表达水平 ($P > 0.05$)。**结论** TFVM 在体内外均有明显的抗流感病毒作用, 其机制可能是通过抑制 M2 蛋白和 NS1 蛋白表达而直接抑制流感病毒的复制; 还可能通过抑制宿主细胞内 p65 蛋白表达及其核转位, 从而干预 NF- κ B 信号通路下游炎症因子的表达, 发挥间接抗病毒作用。

关键词 天山堇菜总黄酮; 流感病毒; 作用机制

Study on the Mechanism Anti-Influenza Virus of Total Flavonoids from *Viola Tianshanica*

Maxim WANG Xue, SI Li-jun, LIU Yan, and HUANG Hua Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi (830004)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect and mechanism against influenza virus of total flavonoids from *Viola tianshanica* Maxim (TFVM). **Methods** CPE method was used to detect the cytotoxicity of TFVM on madin-darby canine kidney (MDCK) cells and the anti-influenza efficacy. *In vitro*, normal cell control group, virus control group, positive Amantadine (AH) control group (10 μ mol/L), TFVM 100, 50, 25 μ g/mL groups were set. Western Blot experiment was used to detect the effects on M2, NS1 expression in MDCK or THP-1 cells which were infected with influenza virus A/FM/1/1947 (H1N1). The effects of TFVM on protein expression and nuclear translocation of p65 in THP-1 cells were detected by Western Blot. The inhibitory effect of TFVM on hemagglutinin (HA) was detected by agglutination assay of chicken erythrocyte. The effect of TFVM on neuraminidase (NA) activity of influenza virus was detected by fluorescence. *In vivo*, mice were randomly divided into virus infection control group, Tamiflu positive (11.375 mg/kg) group, TFVM (0.4, 0.2 g/kg) groups. The mice were infected with virus FM1, then, the lung tissue lapping solution were collected to inoculate MDCK

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (No. 2017D01A71)

作者单位: 新疆维吾尔自治区药物研究所 (乌鲁木齐 830004)

通讯作者: 黄 华, Tel: 0991-2812061, E-mail: huangh6505@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210604. 054

cells, the virus proliferation in the lung tissue was detected by CPE method; RNA was extracted from lung tissue of the mice, the expression levels of influenza virus M2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and IP-10 in lung tissues were detected by qRT-PCR. **Results** TFVM significantly inhibited pathological changes in MDCK cells infected with influenza virus, the IC_{50} against influenza virus was 79.1 μ g/mL. At the dose of 100 μ g/mL, TFVM showed a good inhibitory effect on the protein expression of M2, NS1 in MDCK or THP-1 cells which were infected with influenza virus. TFVM could significantly inhibit p65 protein expression and nuclear translocation of p65 in THP-1 nucleus. TFVM had no effect on NA and HA. For *in vivo* investigation, at the dose of 0.2 g/kg and 0.4 g/kg, TFVM could significantly decrease the virus proliferation ($P<0.05$, $P<0.01$) and the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and IP-10 ($P<0.05$, $P<0.01$) in the lung tissue of mice infected with influenza virus, TFVM could also decrease M2 mRNA expression to some extent ($P>0.05$). **Conclusions** TFVM has obvious anti-influenza virus effect *in vivo* and *in vitro*. The mechanism of its antiviral effect may be directly inhibiting the replication of influenza virus by inhibiting the expression of M2 and NS1 protein, on the other hand, TFVM may also has an indirect anti-influenza virus effect by inhibiting p65 protein expression in host cells and nuclear translocation of p65, thereby interfering with the expression of inflammatory factors of the NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS total flavonoids from *Viola tianshanica* Maxim; influenza virus; mechanism

流感是由流感病毒所引起的急性呼吸道传染病, 传染性强、发病率高^[1, 2]。流感病毒分为甲、乙、丙三型, 其中甲型流感病毒抗原易发生变异, 曾多次引起世界性大流行, 在世界范围内造成重大的死亡和经济损失^[1, 2]。甲型流感病毒的高变异性增大了人类应对流感的难度。由于不能有针对性地进行预防疫苗的研制和接种, 抗流感药物的应用成为防治流感的重要手段之一。我国传统中药在抗流感病毒方面具有独特的优势。一些单味中药材提取部位不仅具有直接抑制病毒的作用, 还可通过调节机体的免疫功能发挥间接抗病毒作用, 如黄芩、板蓝根、连翘、甘草等^[3, 4]。因此, 具有综合抗病毒效应的中药提取部位有良好的开发应用前景。

天山堇菜又名“比那夫西”, 是堇菜科 (Violaceae) 植物天山堇菜 (*Viola tianshanica* Maxim) 的干燥全草, 为多年生草本, 分布于新疆各山区, 有清热解毒之功效。主要用于感冒, 发烧, 头痛, 咽痛, 肢肿, 小儿惊厥, 也可外用于疔疮肿痛等症^[5]。全草含挥发油、黄酮类、生物碱、氨基酸、皂苷、鞣质、香豆素等成分, 具有明显的抗菌、抗氧化等作用^[5, 6]。本研究前期发现天山堇菜总黄酮 (total flavonoids from *Viola tianshanica* Maxim, TFVM) 对流感病毒株 A/H1N1/ 京防 /262/95、A/H3N2/ 济防 15/90、A/H3N2/ 粤防 /243/72 感染犬肾细胞 (madin-darby canine kidney, MDCK) 引起的细胞病变具有明显的抑制作用, 对流感病毒鼠肺适应株 A/H1N1/PR/8/34 感染的小鼠肺炎模型具有较好的保护作用^[7], 在此基础上进一步采用流感病毒株

A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1, 简写 FM/1) 感染 MDCK、人髓系白血病单核细胞 (human myeloid leukemia mononuclear cells, THP-1) 细胞模型以及流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠模型进一步研究和深入探讨 TFVM 抗流感病毒的作用及机制, 为在抗流感病毒方面的开发应用提供依据。

材料与方法

1 动物 30 只昆明小鼠, 雌性, 体重 14~16 g, 购自北京华阜康生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2014-0004, 实验动物质量合格证号为 No.11401300081707。小鼠在 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的温度下饲养 1~2 天, 每天给予 12 h 日夜交替的光照, 并给予充足的水和食物。小鼠的流感病毒感染实验在二级动物生物安全实验室 (ABSL-2) 中进行, 本实验通过中国医学科学院生物技术研究所有动物伦理委员会审批 (No.IBM-20180705D1101)。

2 细胞与病毒株 MDCK 细胞, 购自美国标准生物品收藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC); THP-1 细胞, 购自国家实验细胞资源共享服务平台; FM1 购自 ATCC, 经 10 天龄鸡胚传代 - 80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

3 药物 TFVM 含量为 52%, 新疆维吾尔自治区药物研究所植物化学室制备, 批号 20180204; 奥司他韦羧酸盐 (oseltamivir carboxylate, OC) 100 mg/支, 批号: 44039, MCE 公司; 金刚烷胺 (1-adamantanamine hydrochloride, AH) 5 g/支, 批号: 13623, Sigma 公司。

4 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养基, 批号: 8120018; MEM 液体培养基, 批号: 8119457; 胎牛血清 (fetal bovine serum), 批号: 42F6480K; 以上均购自 Invitrogen 公司; 细胞总蛋白提取试剂盒, 批号: UH286883, 美国 Thermo Scientific 公司; 组织 RNA 提取试剂盒, 批号: R7126, 天根生化科技公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒, 批号: O20427, 北京全式金生物技术有限公司; 鼠抗流感病毒 M2 抗体 (批号: sc-32238) 和 NS1 (批号: sc-130568) 抗体, 美国 Santa Cruz Technology 公司; p65 (批号: 8242S) 和 p-p65 (批号: 3033S) 抗体, 兔二抗 (批号: 7074S), 鼠二抗 (批号: 7076S) 和 β -actin (批号: 3700S) 抗体, 美国 Cell Signal Technology 公司; 戊巴比妥钠, 批号: 6900183, Solar Bio Germany. Forma Series 3WJ 二氧化碳孵箱, 美国 Thermo Scientific 公司; CKX53 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Bio-Rad 湿转系统、凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

5 细胞培养 MDCK 细胞培养基为 MEM 培养基, 含 10% 胎牛血清 (FBS), 1% 双抗 (Pen-strep), 1% NEAA (非必需氨基酸), 细胞在含 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱中培养, 2~3 天传代 1 次。MDCK 细胞的病毒维持液为 MEM 培养基, 含有 2 μ g/mL 胰酶、0.08% BSA、1% 双抗, 1% NEAA。THP-1 细胞培养基为 RPMI-1640 培养基, 含 10% FBS, 1% 双抗。THP-1 细胞在含 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱中培养, 4~5 天传代 1 次。THP-1 细胞的病毒维持液为 RPMI-1640 培养基, 含有 2% FBS、1% 双抗 (Pen-strep)。

6 TFVM 对 MDCK 细胞毒性以及对流感病毒致 MDCK 细胞病变的影响 取处于指数生长期的 MDCK 细胞, 以 2.5×10^4 个/孔接种 96 孔板, 待细胞长至单层, 给予 TFVM 样品溶液, 使其终浓度为 200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09 μ g/mL, 于 37 °C, 5% CO₂ 条件培养 48 h, 细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 评分法^[7] 检测半数毒性浓度 TC₅₀。另取 MDCK 细胞已经长成单层的 96 孔板, 采用 10^4 流感病毒液感染 MDCK 细胞 2 h, 给予维持液配制的 TFVM, 终浓度为 200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09 μ g/mL, 置于 37 °C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 48 h。实验设细胞对照及病毒对照各 2 孔, 实验重复 3 次。显微镜下观察细胞病变, CPE 评分法^[7] 检测半数有

效浓度 IC₅₀, 完全破坏为 4; 75% 为 3; 50% 为 2; 25% 为 1; 无病变为 0。用 Reed-Muench^[2] 法计算 TC₅₀、IC₅₀。

7 TFVM 对流感病毒 M2、NS1 蛋白以及对细胞内 p65 蛋白表达的影响 将 THP-1 和 MDCK 按照 9×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 于 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。设置细胞对照组, 病毒对照组, 阳性对照药组 (AH, 10 μ mol/L), TFVM 100、50、25 μ g/mL 3 个浓度组。24 h 后吸弃培养液, 分别用 10^{-3} 和 10^{-4} 流感病毒液感染吸附 THP-1 和 MDCK 细胞 2 h, 然后各组加入相应浓度药液继续培养 24 h, 24 h 后采用哺乳动物细胞裂解液 (加入蛋白酶抑制剂) 提取细胞总蛋白, Western Blot 实验检测 TFVM 对流感病毒 M2 (matrix protein 2, M2) 蛋白和 NS1 蛋白表达的影响。此外, THP-1 细胞感染病毒后 30 min, 进行细胞核质分离, Western Blot 分别检测细胞质和细胞核内 p65、p-p65 蛋白表达水平。

8 TFVM 对流感病毒神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 活性的影响 NA 活性是通过切割 4-methylumbelliferyl-a-D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) 所得荧光产物的定量来进行评价。反应体系包括 20 μ L 样品、20 μ L 酶、60 μ L 底物混合液 [20 μ mol/L MUNANA、33 mmol/L MES buffer (pH 3.5)、4 mmol/L CaCl₂、ddH₂O]。稀释的 TFVM 样品和酶在室温孵育 60 min, TFVM 终浓度为 200、100、50、25 μ g/mL, 同时设病毒对照组, 阳性对照药奥司他韦羧酸盐 (OC) 组, 终浓度 10、1、0.1、0.01、0.001 μ mol/L。然后加入 60 μ L 底物混合液, 置于多功能酶标仪 Enspire 中于激发光 355 nm, 发射光 460 nm 条件下读取切割产物的荧光强度, 37 °C 孵育 15 min 后再次读取结果。两次结果数值相减得到荧光强度的变化值, NA 抑制率计算公式^[8] 如下: 抑制率 (%) = (病毒对照组荧光强度变化值 - 样品对照组荧光强度变化值) / (病毒对照组荧光强度变化值 - 底物对照组荧光强度变化值) $\times$ 100%。Fenzyme 和 Fblank 分别是病毒对照组 (20 μ L 酶、20 μ L ddH₂O、60 μ L 底物混合液) 和底物对照组 (40 μ L ddH₂O、60 μ L 底物混合液), 待测样品组 20 μ L 样品、20 μ L 酶、60 μ L 底物混合液。

9 TFVM 对血凝素 (hemagglutini, HA) 的影响 TFVM 对流感病毒 HA 功能的影响通过血凝素抑制实验进行评价, 实验中鸡红细胞的凝集现象是由于流感病毒的表面膜蛋白 HA 结合在宿主细胞表面的唾液酸受体而导致的。取 A/Fort

Monmouth/1/1947 (H1N1) 1 支, 用生理盐水按 1: 80 进行稀释。同时, 用生理盐水在 96 孔板中按照 2 倍浓度梯度稀释 TFVM 样品, 取 200、100、50 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度组, 另取 96 孔 U 型培养板, 将 50 μL 稀释的病毒液和 TFVM 样品等体积混合, 共 100 μL , TFVM 终浓度为 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$, 每个浓度设 2 个重复。同时设病毒对照组, 对照药 AH 组。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。30 min 后取出培养板, 每孔加入 100 μL 1.2% 鸡血球悬液, 并设正常鸡血球对照, 轻轻晃匀, 室温放置 40 min 后观察鸡血球细胞凝集情况并拍照。

10 TFVM 对流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠肺组织病毒滴度的影响 实验小鼠按随机数字表法分为正常对照组, 病毒感染对照组, 阳性药达菲 (11.375 mg/kg) 对照组, TFVM 高、低剂量 (0.4、0.2 g/kg, 分别为小鼠最大给药量的 1/10、1/20) 组, 每组 6 只, 除正常对照组外, 各实验组小鼠经乙醚轻度麻醉后, 以流感病毒鼠肺适应株 FM1 (10^{-5} 稀释液) 滴鼻感染小鼠, 0.04 mL/只。将感染小鼠平均分为两批, 分别于感染后 24 h 和 48 h 开始灌胃给药, 每天 2 次, 间隔 6 h, 病毒感染对照组以等量蒸馏水灌胃, 给药 3 天后, 处死小鼠, 无菌取肺, 加入预冷的 MDCK 病毒维持液中, 在冰浴条件下将肺组织研碎, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。用病毒维持液将含有病毒的上清按 10 倍梯度倍比稀释, 将梯度稀释的病毒液加入长满单层的 MDCK 细胞中, 同时设正常细胞对照组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养 2 天, 倒置显微镜下观察 CPE 结果, CPE 评分法同方法 5, 并根据 Reed&Muench 法^[2] 计算 TCID₅₀, 并以 -LgTCID₅₀ 表示流感病毒的载量。

11 qRT-PCR 检测 TFVM 对肺组织中炎症因子以及 M2 mRNA 表达的影响 按照 RNA prep pure tissue kit (DP431) 说明书的方法提取小鼠肺组织总 RNA 样品, 对提取的总 RNA 样品进行定量并保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。设计并合成特异引物见表 1。使用 TransScript II Green One-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒, 反应体系为 20 μL 。反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 35 cycles of : 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。Q-PCR 相对定量结果计算方法采用 SybrGreen ER 荧光检测系统, 对目的基因进行相对定量分析, 采用看家基因 GAPDH 作为内参照对 Ct 值进行归一化处理, 基因表达差异计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。

12 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进

表 1 引物序列

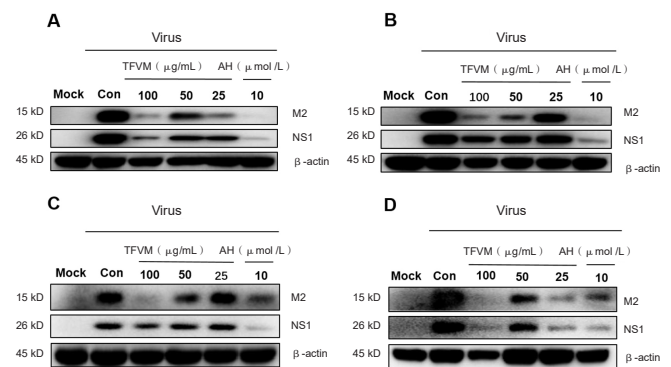
基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
M2	上游 GACCRATCCTGTACCTCTGAC	95
	下游 GGGCATTYTGGACAAKCGTCTACG	
GAPDH	上游 CTCTGGAAAGCTGTGGCGTGATG	120
	下游 ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG	
IL-1 β	上游 CTAAGTATGGGCTGGACTG	352
	下游 AGCTTCAATGAAAGACCTCA	
IL-6	上游 TGATGCACTTGCAGAAAACAA	270
	下游 GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC	
TNF- α	上游 CCAAAGGGATGAGAAGTTCC	133
	下游 CTCCACTTGGTGGTTTGCTA	
IP-10	上游 CGTCATTTTCTGCCTCATCTT	227
	下游 TGGTCTTAGATTCCGGATTGAG	
IL-10	上游 TGAATTCCTGGGTGAGAAGCTGA	147
	下游 TGGCCTTGTAGACACCTTGGTCTT	

行数据分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 TFVM 对 MDCK 细胞的毒性及对流感病毒 H1N1 致 MDCK 细胞病变的影响 TFVM 在 MDCK 细胞的 TC₅₀ 为 (200 ± 22.3) $\mu\text{g/mL}$, 抗流感病毒 H1N1 IC₅₀ 为 79.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

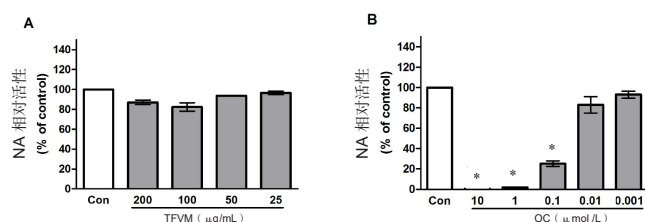
2 TFVM 对 MDCK 和 THP-1 细胞中流感病毒蛋白表达的影响 (图 1) 在流感病毒 H1N1 感染 MDCK 和 THP-1 细胞 24 h 后, TFVM 在 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 对流感病毒 M2 蛋白表达有明显抑制作用, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 对 NS1 蛋白表达有明显抑制作用。



注: A 和 B 为 MDCK 细胞; C 和 D 为 THP-1 细胞; Mock 为细胞对照组; Con 为病毒对照组

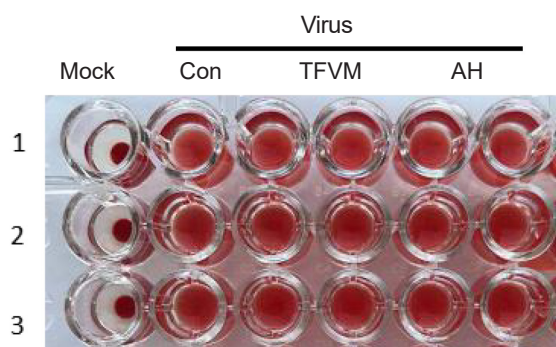
图 1 TFVM 对流感病毒 M2、NS1 蛋白表达的影响

3 TFVM 对流感病毒 NA 和 HA 功能的影响 (图 2、3) TFVM 对于流感病毒 A/FM/1/1947 的 NA 活性无明显抑制作用, 而 OC 在 10、1、0.1 $\mu\text{mol/L}$



注: A 为 TFVM 对 NA 活性的抑制作用; B 为 OC 对 NA 活性的抑制作用; Con 为病毒对照组; 与病毒对照组比较, $*P < 0.01$

图 2 TFVM 对流感病毒 NA 活性的影响

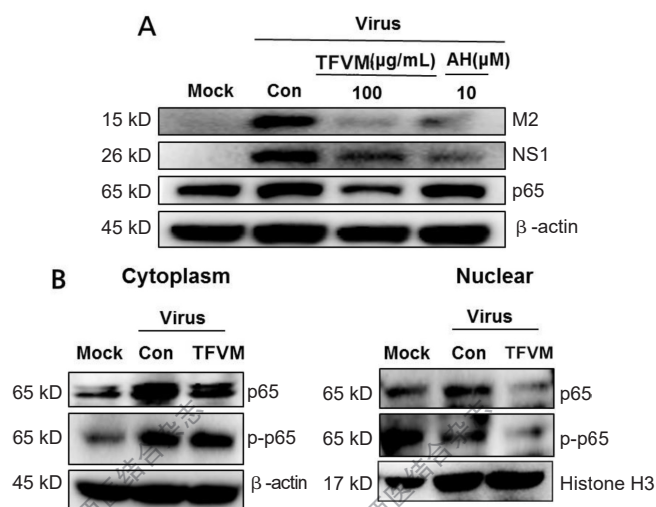


注: Con 为病毒对照组; Mock 为正常鸡血球细胞

图 3 TFVM 对流感病毒 HA 功能的影响

浓度对 NA 的活性显示出明显的剂量依赖抑制效应 ($P < 0.01$)。图 3 结果显示 TFVM 同对照 AH 一样, 对鸡血球细胞的凝集无抑制作用。

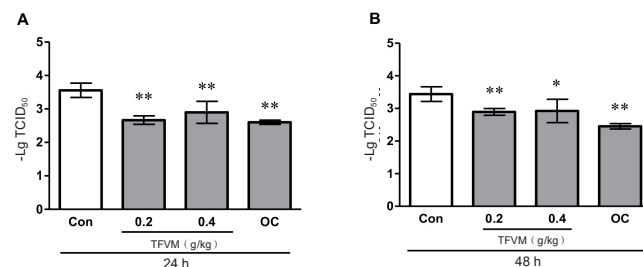
4 TFVM 对 p65 蛋白的影响 (图 4) Western Blot 结果显示, TFVM 100 μg/mL 可以降低 THP-1 细胞内的病毒蛋白 M2、NS1、NF-κB p65 蛋白表达 (图 4A); 细胞感染病毒后 30 min, 进行细胞核质分离, 分别检测细胞质和细胞核内 p65 的磷酸化, 图 4B 结果显示, TFVM 可以降低细胞核内 p65 的磷酸化。



注: Mock 为细胞对照组; Con 为病毒对照组

图 4 TFVM 对 NF-κB p65 蛋白的影响

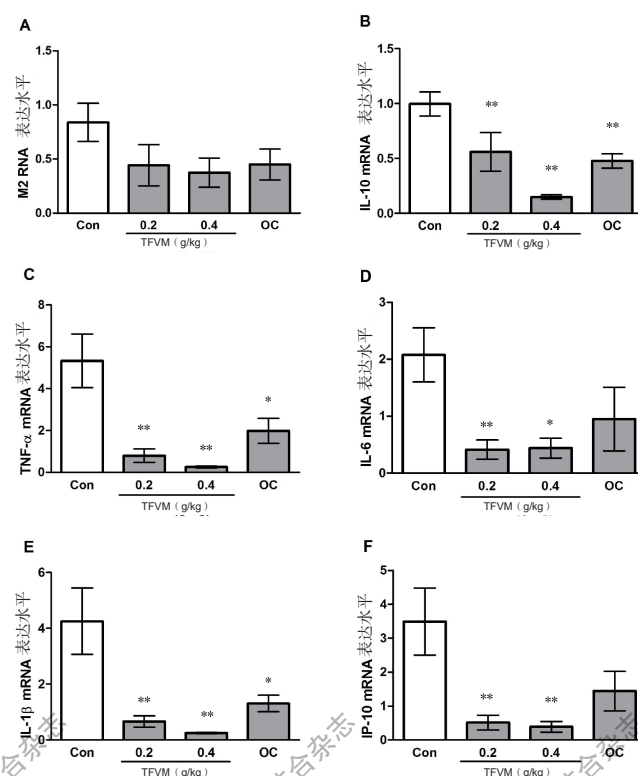
5 TFVM 对小鼠肺组织中病毒滴度的影响 (图 5) 流感病毒感染后 24 h 和 48 h 给药, 与病毒对照组比较, TFVM 两个剂量组 (0.2、0.4 g/kg) 均能降低小鼠肺组织的病毒滴度 ($-LgTCID_{50}$, $P < 0.01$)。



注: A、B 分别为病毒感染 24、48 h 对肺组织病毒滴度的影响; Con 为病毒对照组; 与病毒对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

图 5 TFVM 对小鼠肺组织病毒滴度的影响

6 qRT-PCR 检测 TFVM 对小鼠肺组织中炎症因子及 M2 的影响 (图 6) 感染后 24 h 给药, TFVM 在 0.2、0.4 g/kg 均可降低流感病毒的 M2 mRNA 表达, 与病毒对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 感染后 24 h 给药, TFVM 在 0.2 g/kg 和 0.4 g/kg 剂量均降低细胞因子 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-10、IP-10 mRNA 表达水平, 与病毒对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: A~F 分别为 M2、IL-10、TNF-α、IL-1β、IP-10 mRNA 表达水平; Con 为病毒对照组; 与病毒对照组比较, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$

图 6 TFVM 对小鼠肺组织中炎症因子及 M2 的影响

讨 论

当今抗流感药物的研究主要从 HA、NA、M2 三个流感病毒特异性靶点入手,此外,还有潜在的研究靶向核蛋白 NP 以及流感病毒 RNA 聚合酶^[9]。其中,流感病毒表面抗原 HA 为构成病毒囊膜纤突的主要成分,是基因表达产物中最大的糖蛋白,在流感病毒吸附和穿膜过程中起关键作用;NA 是构成病毒囊膜纤突的另一个重要的表面糖蛋白,主要作用是通过切断子代病毒血凝素与唾液酸连接,使子代病毒颗粒从宿主细胞表面释放,进行更广泛的传播,神经氨酸酶抑制剂可选择性抑制流感病毒的复制;M2 蛋白是跨膜离子通道蛋白,是病毒复制的关键酶,阻断 M2 离子通道功能可有效抑制病毒在感染细胞中的存活和复制,从而阻止病毒感染的扩散。NS1 蛋白在感染 A 型流感病毒的细胞中表达量很高,因此,人们普遍认为 NS1 蛋白是 A 型流感病毒的非结构蛋白^[10],在调节 A 型流感病毒的致病力和毒力方面发挥着重要作用,是一种具有多种功能的调节蛋白^[11-13]。一方面 NS1 蛋白通过调控机体的抗病毒应答而间接增强了病毒的致病力;另一方面,NS1 蛋白可增强病毒 mRNA 的翻译,从而提高了病毒的复制水平,以此直接增强流感病毒对抗宿主的抗病毒应答的能力^[13]。因此,NS1 蛋白也是抗流感病毒药物的一个潜在靶点。

近年来,中医药在抗击流感等呼吸道病毒传染性疾病以及严重急性呼吸综合征的过程中发挥了积极的作用^[14, 15]。国内外研究认为中草药成分复杂,含有多酚类、黄酮类、皂苷类、生物碱类等化合物,作用靶点多,不仅具有直接抗病毒作用,还能调节病毒引起免疫病理损伤的复杂过程,在流感的治疗中具有独特的优势^[16, 17]。病毒感染机体后,机体启动宿主免疫应答,形成炎症反应和炎症免疫病理损伤^[18]。在免疫病理损伤过程中,涉及多种免疫细胞和细胞因子,而中医药在调节机体和细胞免疫方面有明显的优势,研究显示,有些中药可直接灭活或抑制病毒,有些中药则通过诱生干扰素或调节人体免疫功能而发挥间接抗病毒作用^[19, 20]。

本研究发现,TFVM 可显著抑制流感病毒株 A/FM/1/1947 (H1N1) 致 MDCK 发生细胞病变,其 IC₅₀ 为 79.13 μg/mL。TFVM 在 MDCK 和 THP-1 细胞中对流感病毒 M2 和 NS1 蛋白表达均有很好的抑制作用,说明 TFVM 能够有效抑制流感病毒在感染细胞中的存活和复制,削弱病毒的致病力,具有一定的直接抗流感病毒作用。但对流感病毒的 NA 和 HA 这两个膜蛋白的功能并无影响。在流感病毒感染

THP-1 细胞模型中,TFVM 可以抑制 NF-κB p65 的蛋白表达,显著抑制细胞核内 NF-κB p65 的磷酸化,说明 TFVM 能够抑制 NF-κB 信号通路的级联反应,抑制下游细胞因子的产生和释放,从而改善病毒对细胞造成的炎症损伤;体内实验时,选择用雌性小鼠,主要是为了避免雄性小鼠好斗互相掐架的现象,对实验结果并无实质影响。通过体内实验发现 TFVM 可以显著降低流感病毒鼠肺适应株 FM1 感染小鼠肺组织的病毒滴度,说明 TFVM 对肺内流感病毒具有良好的清除作用,此外,在一定程度上能够降低流感病毒 M2 mRNA 水平,抑制流感病毒的复制,在病毒感染后 24 h 连续给药 3 天,能显著降低肺组织炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-10、IP-10 mRNA 表达水平,说明 TFVM 可以通过减轻由炎症介质过度释放引起的免疫损伤,从而改善小鼠流感病毒肺炎症状。

综上所述,TFVM 在体内外均有明显的抗流感病毒作用,其抗病毒作用的机制可能是通过抑制 M2 蛋白和 NS1 蛋白的表达而直接抑制流感病毒的复制;TFVM 还可能通过抑制宿主细胞内 p65 蛋白的表达及其核转位,从而干预 NF-κB 信号通路下游炎症因子的表达,发挥间接抗病毒作用。

利益冲突:所有作者均声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Loregian A, Mercorelli B, Nannelli G, et al. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71 (19): 3659.
- [2] 伍庆华,钟阳红,舒任庚.山蜡梅提取物体外抗流感病毒作用研究[J].时珍国医国药,2020,31(3): 536-538.
- [3] 陈冉,王婷婷,李开铃,等.免疫调节抗病毒中药的特性与应用[J].中草药,2020,51(6): 1412-1426.
- [4] 周沁阳,蔡文涛,陈勇.中药抗流感病毒活性剂作用机制研究新进展[J].中草药,2019,50(7): 1719-1726.
- [5] 王雪,史玉柱,司丽君,等.天山堇菜总黄酮抗菌、抗炎、解热、镇咳作用研究[J].中国医药导报,2019,16(29): 21-24.
- [6] 吴建芳,薛梅,李炳奇,等.天山堇菜总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究[J].食品科技,2010,35(10): 214-217.
- [7] 王雪,史玉柱,司丽君,等.天山堇菜总黄酮抗甲型流

- 感病毒作用的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 550-556.
- [8] 魏燕楠, 张超, 陈勋, 等. H7N9 禽流感病毒野生或突变神经氨酸酶对奥司他韦及扎那米韦敏感性的研究[J]. 病毒学报, 2014, 30(4): 396-401.
- [9] 罗小琴, 吴德峰. 抗流感病毒药物研究进展[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(3): 86-89.
- [10] Chang WH, Mi SJ, Se BJ. Structure and function of the influenza A virus non-structural protein[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1184-1192.
- [11] Xia S, Robertus JD. X-ray structure of NS1A effector domain mutants[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 494: 198-204.
- [12] Arturo RS, Juan EL. The dual role of the antibody response against the flavivirus non-structural protein 1 (NS1) in protection and immuno-pathogenesis[J]. Front Immunol, 2019, 10(1651): 1-6.
- [13] 彭欠欠, 孙王杨吉, 石磊, 等. A 型流感病毒 NS1 蛋白的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(7): 132-135.
- [14] 肖倩倩, 张福利. 中医治疗突发传染病的优势回顾及构建温病学防治传染病体系之思考[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2860-2863.
- [15] Wang XG, Liu ZJ. Prevention and treatment of viral respiratory infections by traditional Chinese herbs[J]. Chin Med J, 2014, 127(7): 1344-1350.
- [16] Ding Y, Zeng L, Li R, et al. The Chinese prescription Lianhuaqingwen Capsule exerts anti-influenza activity through the inhibition of viral propagation and impacts immune function[J]. BMC Compl Altern Med, 2017, 17(1): 1-11.
- [17] 赵昕, 王周琅, 李润峰, 等. 中药抗流行性感冒作用机制研究进展[J]. 北京中医药, 2021, 40(1): 35-38.
- [18] White MR, Tripathi S, Verma A, et al. Collectins, H-ficolin and modulate virus-induced cytokine production[J]. Innate Immun, 2017, 23(1): 77-88.
- [19] Wu QF, Zhu WR, YAN YL, et al. Anti-H1N1 influenza effects and its possible mechanism of Huanglian Xiangru Decoction[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 185: 282-288.
- [20] Chung ST, Huang YT, HSIUNG HY, et al. Novel daidzein analogs and their *in vitro* anti-influenza activities[J]. Chem Biodivers, 2015, 12(4): 685-696.

(收稿: 2020-10-12 在线: 2021-09-27)

责任编辑: 白霞

欢迎订阅 2021 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀教授担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床经验、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖; 2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”, 列入中国期刊方阵; 2002—2020 年 17 次被评为“百种中国杰出学术期刊”; 2012—2017 年连续评为“中国最具国际影响力学术期刊”; 3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助; 4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”; 2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目; 2018 年入选“中文科技期刊精品建设计划”。本刊被多种国内外知名检索系统收录, 如: 中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等; 为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被编入北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》, 每年影响因子及总被引频次在中西医结合期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本, 月刊, 128 页; 铜版纸印刷, 彩色插图。国内定价: 30.00 元/期。全年定价: 360.00 元。国际标准刊号: ISSN 1003-5370, 国内统一刊号: CN 11-2787/R, 国内邮发代号: 2-52, 国外代号: M640。国内外公开发售, 在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjim@cjim.cn, 网址: <http://www.cjim.cn>。