

· 药效与毒理学研究 ·

邓氏清毒饮抗甲型流感病毒及抗炎机制研究

马钦海¹, 陈瑞晗¹, 雷标¹, 王周琅¹, 朱梓宁², 黄子天³, 陈凯佳³, 邱仕君⁴, 刘小斌⁴, 邓中光⁴, 杨子峰^{1,5,6} (1. 广州医科大学附属第一医院广州呼吸健康研究院呼吸疾病国家重点实验室/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 广东 广州 511436; 2. 邓老金方药业科技有限公司, 广东 梅州 514000; 3. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405; 4. 广东新南方中医研究院, 广东 广州 510230; 5. 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室, 澳门特别行政区, 519020; 6. 金域医学病毒诊断与转化中心, 广东 广州 510725)

摘要: **目的** 探讨邓氏清毒饮对甲型流感病毒(H3N2)的抗病毒活性及其在调节宿主炎症免疫应答中潜在的作用。**方法** 观察邓氏清毒饮对 H3N2 体外活性的影响; 用实时荧光定量 PCR 检测邓氏清毒饮对 A549 细胞感染 H3N2 病毒后白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、干扰素诱导蛋白 10(IP-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)及趋化因子配体 5(CCL-5)表达的影响。用蛋白印迹实验检测核因子抑制蛋白- κ B(I κ B α)、磷酸化核因子抑制蛋白- κ B(p-I κ B α)、核因子- κ B p65(NF- κ B p65)、磷酸化核因子- κ B p65(p-NF- κ B p65)的表达。**结果** 邓氏清毒饮 23.4、11.7、5.85 mg·mL⁻¹ 可显著抑制 H3N2 的体外复制, 减少病毒空斑形成; 在 mRNA 水平上可显著降低细胞因子 IL-6、IL-8、IP-10、TNF- α 、MCP-1 及 CCL-5 的表达; 蛋白印迹检测发现邓氏清毒饮可下调 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达, 增加 I κ B α 的表达, 从而抑制 H3N2 诱导的 NF- κ B 信号通路激活。**结论** 邓氏清毒饮可抑制 H3N2 的体外复制, 抑制流感病毒诱导的 NF- κ B 信号通路激活, 降低炎性细胞因子的表达, 表明邓氏清毒饮具有防治流感病毒的潜力。

关键词: 邓氏清毒饮; 甲型流感病毒; H3N2; 抗病毒; 抗炎; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0597-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.001

Study on the Anti-influenza Virus(H3N2) Effect and Anti-inflammatory Mechanism of Dengshi Qingdu Decoction

MA Qin Hai¹, CHEN Rui Han¹, LEI Biao¹, WANG Zhou Lang¹, ZHU Zin ing², HUANG Ziti an³, CHEN Kai jia³, QIU Shi jun⁴, LIU Xiaobin⁴, DENG Zhongguang⁴, YANG Zifeng^{1,5,6} (1. State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436 Guangdong, China; 2. Denglao JinFang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Meizhou 514000 Guangdong, China; 3. School of Basic Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 4. Guangdong New South China Academy of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510230 Guangdong, China; 5. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Taipa 519020 Macau SAR, China; 6. KingMed Virology Diagnostic & Translational Center, Guangzhou 510725 Guangdong, China)

Abstract: Objective This study was designed to investigate the antiviral activity of Dengshi Qingdu Decoction

收稿日期: 2021-01-19

作者简介: 马钦海, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药物抗病毒研究。Email: 630336477@qq.com。通信作者: 杨子峰, 男, 教授, 研究方向: 药物抗病毒研究。Email: jeffyah@163.com。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1309302); 国家自然科学基金面上项目(81873065); 澳门科学技术发展基金项目(0172/2019/A3); 广州医科大学高水平大学建设项目([2017]159 号、160 号)。

against influenza virus(H3N2) and its potential role in regulating inflammatory host immune response. **Methods** The *in vitro* inhibitory effect of *Dengshi Qingdu* Decoction on the replication of influenza virus (H3N2) was evaluated by plaque reduction and other tests. Real-time RT-PCR was used to detect the expression levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IP-10, TNF- α , MCP-1 and CCL-5) in A549 cells infected with influenza virus(H3N2). Western Blot was used to detect the expression levels of I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B p65, p-NF- κ B p65. **Results** The results showed that 23.4, 11.7, 5.85 mg $\cdot$ mL⁻¹ *Dengshi Qingdu* Decoction could significantly inhibit the replication of H3N2 *in vitro*, reduce the formation of viral plaque. Real-time RT-PCR showed that *Dengshi Qingdu* Decoction could significantly reduce the mRNA levels of IL-6, IL-8, IP-10, TNF- α , MCP-1 and CCL-5 in the infected cells. Western Blot detection showed that *Dengshi Qingdu* Decoction could significantly reduce the expression of p-I κ B α and p-NF- κ B p65, while increase the I κ B α in the infected cells, thus, inhibit the activation of NF- κ B signaling pathway induced by influenza virus (H3N2), and reduce the expression of inflammatory cytokines. **Conclusion** Studies have shown that *Dengshi Qingdu* Decoction can inhibit the replication of influenza virus(H3N2) *in vitro*, inhibit the activation of NF- κ B signal pathway induced by influenza virus, and reduce the expression of inflammatory cytokines, which proves that *Dengshi Qingdu* decoction has the potential of preventing and treating influenza virus.

Keywords: *Dengshi Qingdu* Decoction; influenza A virus; H3N2; antiviral; anti-inflammatory; NF- κ B

流行性感是由流感病毒引起的一种高度传染性呼吸道疾病。虽然已经证明目前的抗病毒药物能有效降低与病毒感染相关的发病率和死亡率,但病毒复杂的生命周期和快速的基因突变,使病毒能够快速适应机体并产生耐药性^[1]。抗病毒药金刚烷的耐受性差和高耐药率,现已不再被推荐使用^[2],而耐药病毒突变体对奥司他韦的敏感性也逐渐降低^[3]。因此,必须研发高效、安全的抗流感新药。

邓氏清毒饮1号方(简称邓氏清毒饮)是国医大师邓铁涛师承团队在邓氏凉茶基础上加减而成,由金银花、野菊花、桑叶、蒲公英、薄荷叶、甘草、北杏仁、桃仁、冬瓜仁、青蒿、桔梗、薏苡仁、藿香、苇茎、五爪龙、大青叶、板蓝根、白茅根、白花蛇舌草19味中药组成。该方取五味消毒饮合苇茎汤方义以清热解毒、通腑泄浊,加大青叶、板蓝根增强清热解毒的功效,青蒿、藿香、薄荷芳香化湿、透风于热外,桔梗、北杏仁宣肃气机,白茅根清热利尿、渗湿于热下,五爪龙、甘草扶正和中。该方被广泛用于预防和治疗流感引起的发热、咳嗽、咽喉痛等。其中金银花^[4-5]、甘草^[6-8]、桑叶^[9]、藿香、青蒿^[10-13]、板蓝根、大青叶^[14-15]对流感病毒有良好的抑制活性。处方中药物富含各活性成分,其中咖啡酰奎宁酸^[16-17]、黄酮类化合物^[18-19]、三萜类化合物、倍半萜内酯化合物等可能是该处方的主要活性

成分。本研究建立甲型流感病毒(H3N2)感染的细胞模型,研究邓氏清毒饮的抗病毒活性及其在调节宿主炎症免疫应答中潜在的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒 狗肾细胞系(Madin darby canine kidney, MDCK)、人肺癌上皮细胞系(Human adenocarcinoma cell, A549),美国ATCC细胞保存库。2种细胞采用10%胎牛血清的DMEM/F12培养基(Gibco,美国)培养。甲型流感病毒(H3N2)病毒株由本实验室存储备用。病毒滴度通过观察细胞病变效应(CPE)并采用Reed-Muench法计算半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)表示。

1.2 药物 邓氏清毒饮由广东邓老凉茶药业集团有限公司提供。将邓氏清毒饮溶解于PBS缓冲液中,调至浓度为100 mg $\cdot$ mL⁻¹(生药量),室温震荡后作为储备液保存于-20℃。磷酸奥司他韦(东阳光药业集团,批号:196618-13-0),使用二甲亚砜(DMSO)溶解,终浓度为100 mmol $\cdot$ L⁻¹(DMSO的终浓度为0.01%),保存于-20℃。感染性实验均使用含2 μ g $\cdot$ mL⁻¹ TPCK处理的胰蛋白酶的DMEM/F12作为稀释缓冲液。

1.3 细胞毒性试验 采用甲基噻唑四唑(MTT)法检测邓氏清毒饮对MDCK细胞和A549细胞的细胞毒性作用。在96孔板中培养单层MDCK细胞和A549细

胞, 将 DMEM/F12 配制的不同浓度邓氏清毒饮培养液加入 96 孔板中培养细胞, 48 h 后去上清并用含 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 的 PBS 溶液孵育细胞 4 h; 去除上清并加入 DMSO 溶解活细胞内甲瓞晶体。使用 Multiskan Spectrum 酶标仪(Thermo Fisher, 美国)测定 490 nm 处的吸光度, 计算半数致死浓度(TC_{50})。

1.4 体外抗病毒活性试验 在 96 孔板中培养单层 MDCK 细胞, 分别接种 100 TCID_{50} 的 H3N2 吸附 2 h。去除上清后, 使用 DMEM/F12(含 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPCK 处理的胰蛋白酶)配制不同浓度邓氏清毒饮培养液加入 96 孔板中培养细胞。48 h 后观察 MDCK 细胞病变效应(CPE), 采用 Reed-Muench 法计算半数有效浓度(IC_{50})。采用 MTT 法检测 MDCK 细胞存活率, 使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 计算 IC_{50} , 治疗指数(TI)= $\text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ (治疗指数 TI 的判断标准: $\text{TI} < 1$ 表示无效; TI 为 1~2 表示高毒低效; $\text{TI} > 2$ 表示低毒高效^[20])。

1.5 空斑减少试验 实验分空白组, 病毒组, 邓氏清毒饮高、中、低剂量和奥司他韦组。用一定空斑形成单位(PFU)的 H3N2 感染 12 孔板中的单层 MDCK 细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下, 吸附 2 h; 去除上清, 使用含有 23.4 、 11.7 、 $5.85\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 邓氏清毒饮和 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥司他韦的 1.5% 琼脂(含 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPCK 处理的胰蛋白酶)覆盖细胞单层; 病毒组和空白组加入等量的培养液(1.5% 琼脂+ $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPCK 处理的胰蛋白酶), 其中空白组不感染病毒; 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中孵育, 48 h 后使用 10% 福尔马林固定并去除覆盖琼脂, 1% 结晶紫染色, 流水洗涤后计数斑块。

1.6 实时荧光定量 PCR 测定炎症细胞因子的表达 在上述药效实验的基础上, 选择病毒抑制率较高的药物浓度进行实验。在 6 孔板中培养单层 A549 细胞, 分组及实验方法同“1.5”项下。24 h 后收集细胞, 根据 RNA 试剂(Invitrogen, 美国)说明书操作, 提取各组的总 RNA, 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒(Takara Bio, 日本)对 RNA 进行定量逆转录。然后, 通过 Tag Man Premix Ex Tap™ II(Takara Bio, 日本)对 cDNA 样品进行 RT-PCR 检测。PCR 数据使用检测系统(ABI PRISM® 7500 Real-time PCR system, Applied Biosystems Co. 美国)进行分析。PCR 产物的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算^[21]。使用引物 5.0 设计甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、干扰素诱导蛋白 10(IP-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋

化蛋白 1(MCP-1)及趋化因子(C-C 基元)配体 5(CCL-5)基因引物(见表 1)。

表 1 RT-qPCR 基因引物

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因名称		引物序列(5'-3')
TNF- α	Forward	AACATCCAACCTTCCCAAACG
	Reverse	GACCCTAAGCCCCCAATTCTC
	Probe	FAM-CCCCCTCCTCAGACACCTCAACC-TAM
IL-6	Forward	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA
	Reverse	CGCTTGTGGAGAAGGAGTTCA
	Probe	FAM-TCCCTCCAGGAGCCAGCT-TAM
MCP-1	Forward	CAAGCAGAAGTGGGTTCAAGAT
	Reverse	AGTGAGTGTCAAGTCTTCGGAGTT
	Probe	FAM-CATGGACCACCTGGACAAGCAAACC-TAM
IP-10	Forward	GAAATTATTCCTGCAAGCCAATTT
	Reverse	TCACCTTCTTTTTCATTGTAGCA
	Probe	FAM-TCCACGTGTTGAGATCA-TAM
IL-8	Forward	TTGGCAGCCTTCCTGATTTTC
	Reverse	TATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA
	Probe	FAM-CCTTGGCAAACTGCACCTTCACACA-TAM
CCL-5	Forward	CAGCAGTCGCTTTTGTCACC
	Reverse	GTTGATGTACTCCCGAACCC
	Probe	FAM-CGCCAAGTGTGTGCCAACCC-TAM
GAPDH	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTG
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
	Probe	FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAM

1.7 蛋白印迹检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达 在 6 孔板中培养单层 A549 细胞, 分组及实验方法同“1.5”项下。24 h 后使用预冷 PBS 洗涤细胞, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞、提取蛋白, 采用 BCA 试剂盒(Beyotime, 中国)检测样品的蛋白浓度。取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 变性蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。使用 BIO-RAD 转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 PVDF 膜, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育对应抗体过夜, 次日使用 TBST 洗涤 PVDF 膜并室温孵育相应 HRP 标记抗体, TBST 洗涤 3 次后在凝胶成像系统中曝光得到蛋白条带。

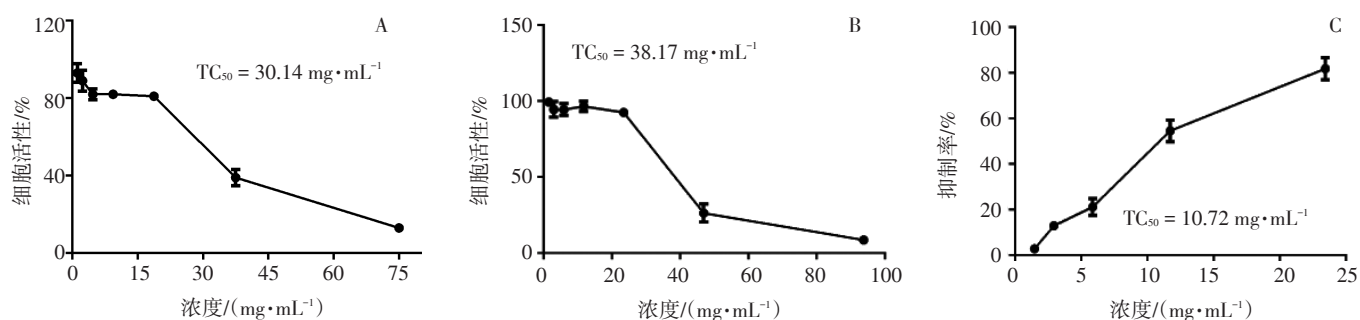
1.8 统计学处理方法 应用 SPSS 19.0 统计软件处理数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法进行分析, 如果差异有统计学意义($P < 0.05$), 则进行组间 LSD 检验。计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 邓氏清毒饮对 H3N2 体外活性的影响 邓氏清毒饮的 MDCK 细胞的毒性: 邓氏清毒饮对 A549 细胞的

半数致死浓度(TC_{50})为 $30.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 MDCK 细胞 TC_{50} 为 $38.17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (见图 1-A 和 B)。对病毒致细胞病变效应的影响: 邓氏清毒饮的半数有效浓度(IC_{50})为 $10.72 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (见图 1-C), 治疗指数(TI)=3.56。空斑试验结果见图 2。与病毒组相比, 邓氏清毒饮高、中、低浓度组(23.4、11.7、 $5.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

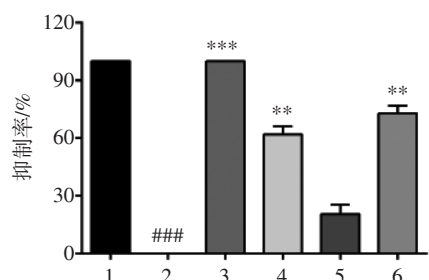
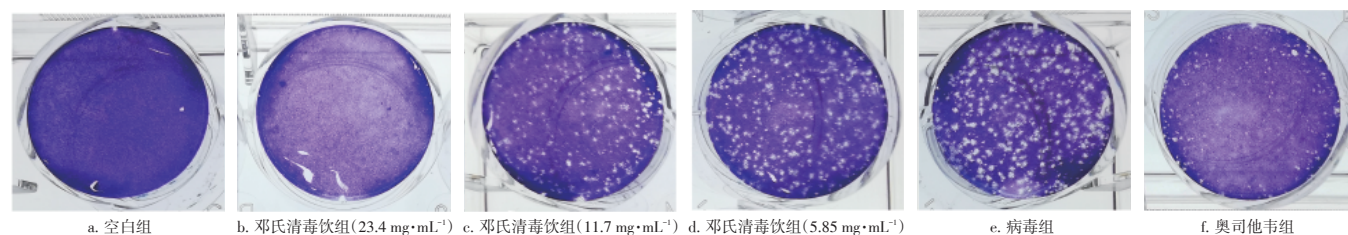
的病毒空斑数量明显减少, 抑制率分别为 100% ($P < 0.001$)、61.8% ($P < 0.01$)、20.3% ($P > 0.05$), 呈剂量依赖关系, 其中 $23.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 邓氏清毒饮几乎完全抑制病毒空斑形成。结果表明邓氏清毒饮在体外能够抑制 H3N2 的活性。



注: A. 对A549细胞的毒性; B. 对MDCK细胞的毒性; C. 对MDCK细胞感染H3N2的抑制作用

图1 邓氏清毒饮抑制甲型流感病毒 H3N2 体外活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 1 Dengshi Qingdu Decoction inhibits the activity of influenza virus H3N2 *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 1. 空白组; 2. 病毒组; 3. 邓氏清毒饮组($23.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 4. 邓氏清毒饮组($11.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 5. 邓氏清毒饮组($5.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 6. 奥司他韦组($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。与空白组比较, $###P < 0.001$; 与病毒组比较, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

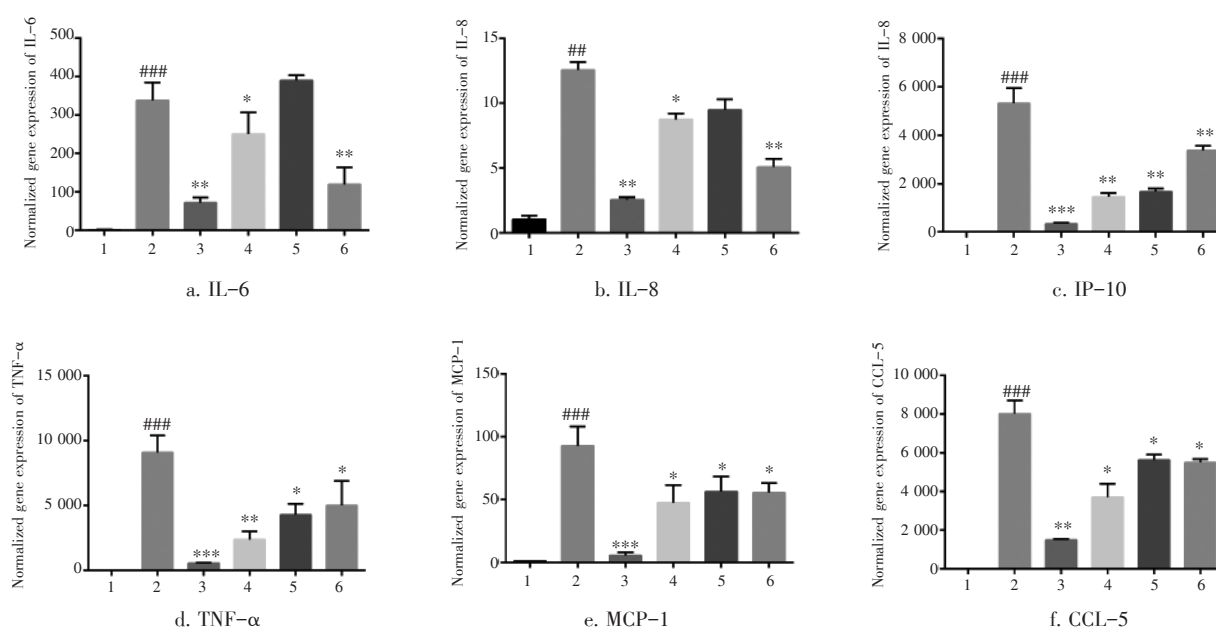
图2 邓氏清毒饮对感染 H3N2 空斑数量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Effect of Dengshi Qingdu Decoction on the plaque assay of H3N2 infection ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.2 邓氏清毒饮对 H3N2 诱导的炎症因子表达的影响 结果见图 3。H3N2 感染 A549 细胞后 24 h, 与空白组比较, 病毒组 IL-6、IL-8、IP-10、TNF- α 、MCP-1、CCL-5 的 mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。与病毒组相比, 邓氏清毒饮 (23.4 、 $11.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 能显著降低 A549 细胞中 IL-6、IL-8 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 邓氏清毒饮 (23.4 、 11.7 和 $5.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 可显著降低 A549 细胞中 IP-10、TNF- α 、MCP-1 和 CCL5 的表达, 并呈剂量依

赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。高剂量 ($23.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 邓氏清毒饮的抑制作用有优于奥司他韦的趋势。

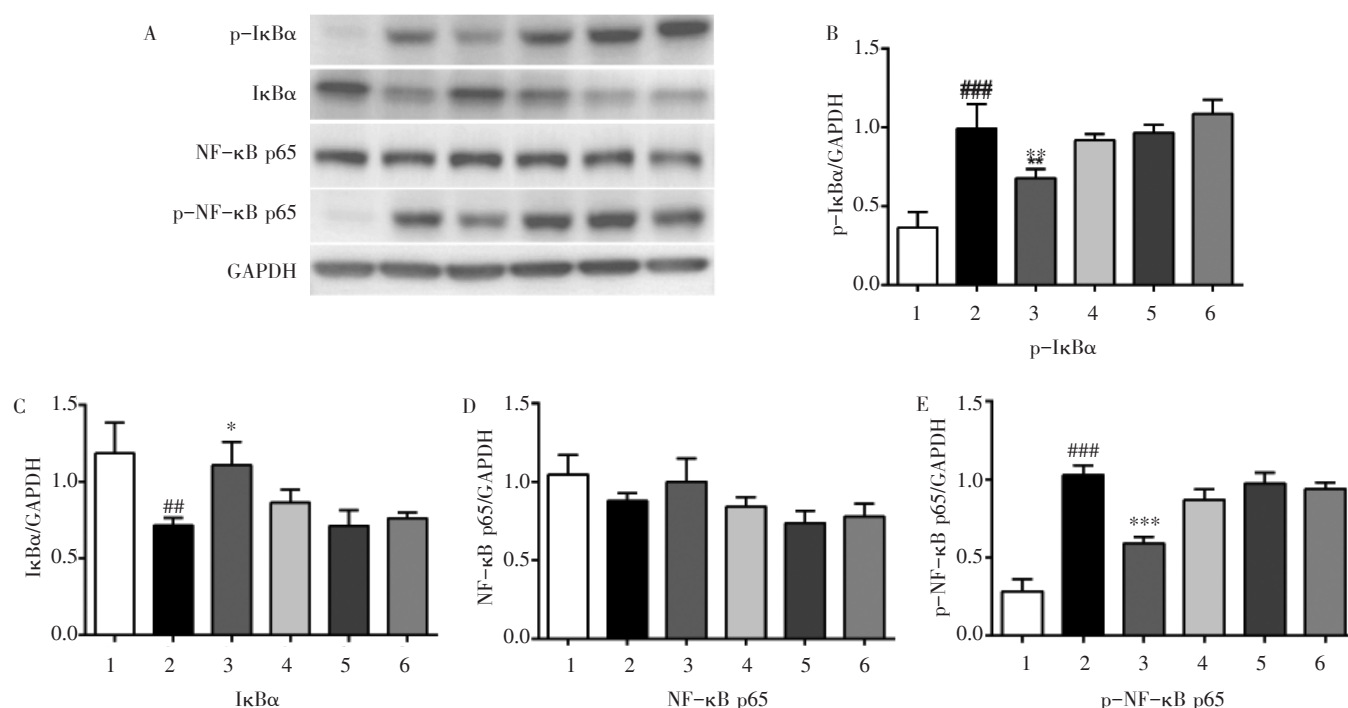
2.3 邓氏清毒饮对 NF- κ B 信号通路关键蛋白表达的影响 结果见图 4。与空白组比较, 病毒组的 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 的表达均显著升高 ($P < 0.001$), 而 I κ B α 的表达显著降低 ($P < 0.01$); 与病毒组比较, 邓氏清毒饮组 ($23.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 能明显下调 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 的表达 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 且能明显上调 I κ B α 的表达 ($P < 0.05$)。



注: 1. 空白组; 2. 病毒组; 3. 邓氏清毒饮组(23.4 mg·mL⁻¹); 4. 邓氏清毒饮组(11.7 mg·mL⁻¹); 5. 邓氏清毒饮组(5.58 mg·mL⁻¹); 6. 奥司他韦组(100 mmol·L⁻¹)。与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与病毒组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 3 邓氏清毒饮对 H3N2 诱导的 A549 细胞中 IL-6、IL-8、IP-10、TNF-α、MCP-1 及 CCL-5 的 mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 Dengshi Qingdu Decoction inhibited the mRNA levels of IL-6, IL-8, IP-10, TNF-α, MCP-1 and CCL-5 in A549 cells induced by influenza virus infection($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 1. 空白组; 2. 病毒组; 3. 邓氏清毒饮组(23.4 mg·mL⁻¹); 4. 邓氏清毒饮组(11.7 mg·mL⁻¹); 5. 邓氏清毒饮组(5.58 mg·mL⁻¹); 6. 奥司他韦组(100 mmol·L⁻¹)。与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与病毒组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 4 邓氏清毒饮对 NF-κB 信号通路关键蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Dengshi Qingdu Decoction can inhibit the inflammatory response of virus by regulating NF-κB signaling pathway($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

药理研究及临床应用^[22]均发现许多中药能够直接抑制流感病毒的复制,提高宿主机体的免疫功能,对流感有明显的治疗作用,且具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点。邓氏清毒饮广泛用于预防和治疗流感及发热、咽喉痛等病证。然而,其抗病毒、抗炎的作用机制尚不清楚。因此,本实验开展邓氏清毒饮的抗病毒和抗炎的作用机制研究。

本研究以 CPE 试验、MTT 检测和斑块减少试验观察了邓氏清毒饮对 H3N2 的抗病毒作用。结果表明,邓氏清毒饮对 H3N2 感染的 MDCK 细胞有明显的保护作用,治疗指数达到 3.56,且能显著减少病毒斑块数量,存在剂量依赖关系。

当流感病毒入侵宿主后,先天免疫反应是宿主抵御病毒感染的第一道防线,先天免疫反应系统被激活可产生一系列的抗病毒和炎症细胞因子,从而限制病毒的复制、增值和传播。但是,如果先天免疫反应持续激活会在体内引发“细胞因子风暴”。致病性流感病毒大爆发期间,细胞因子风暴、过度炎症渗透和病毒引起的组织破坏都导致发病率和死亡率的升高,细胞因子风暴可能是诱发重症流感及死亡的重要机制^[23-24],流感病毒感染可诱导 IL-6、IL-8、IP-10、TNF- α 、MCP-1 及 CCL-5 产生,其中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 是病毒感染过程中的重要炎症细胞因子,被认为是抗感染细胞因子,可增强猕猴中性粒细胞和单核细胞的浸润活性,而产生较强的抗病毒作用^[25-26]。IP-10 是参与细胞炎症反应和免疫调节的重要趋化因子,对淋巴细胞、单核巨噬细胞和树突状细胞有较强的趋化和激活作用。流感患者 IP-10 水平可明显增高^[27]。CCL5 和 MCP-1 是病毒感染过程中 2 种重要的炎症趋化因子,病毒感染时被触发,促使白细胞向感染区域迁移,对先天免疫系统和适应性免疫系统的细胞起引导作用^[28]。本研究结果表明,H3N2 流感病毒可显著上调 A549 细胞中的 IL-6、IL-8、IP-10、TNF- α 、MCP-1 及 CCL-5 的 mRNA 表达;邓氏清毒饮给药干预后,能显著抑制 H3N2 诱导的 A549 细胞中 IL-6、IL-8、IP-10、TNF- α 、MCP-1 及 CCL-5 的 mRNA 表达,高剂量的邓氏清毒饮的抑制作用有优于奥司他韦的趋势。细胞因子谱的变化提示邓氏清毒饮可对 H3N2 诱导的细胞因子风暴有抑制作用。

当宿主受到病毒感染时,病毒蛋白会与宿主蛋白

相互作用,使机体产生一系列的信号级联传导,如 NF- κ B 信号传导级联,流感病毒感染可上调 NF- κ B 信号传导和流感病毒核蛋白核易位^[29]。NF- κ B 信号系对机体受到的多种外界刺激能够做出反应,NF- κ B 的激活可以促进先天免疫和特异性免疫的许多蛋白的表达,诱导炎症细胞因子和趋化因子的产生,形成细胞因子风暴,并加剧炎症反应^[30-31]。因此,调节 NF- κ B 信号通路有助于减轻炎症反应。本研究结果表明,H3N2 病毒激活 NF- κ B 信号通路,病毒组 p-I κ B α 、p-NF- κ B p65 的表达均显著升高,而 I κ B α 的表达则显著降低;邓氏清毒饮可显著拮抗 H3N2 诱导的 p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 的升高,而使 I κ B α 的表达水平上调。推测邓氏清毒饮对甲型流感病毒的抗炎作用机制可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路的活性,抑制细胞因子产生,从而降低炎症反应。

综上所述,邓氏清毒饮在体外具有显著的抗甲型流感病毒 H3N2 的活性,可抑制甲型流感病毒空斑形成数量;并可通过抑制 NF- κ B 信号通路,减少炎症细胞因子和趋化因子产生,抑制细胞因子风暴的形成,从而降低由 H3N2 病毒产生的炎症反应。本实验为邓氏清毒饮作为流感治疗的潜在药物研究提供了参考。

参考文献:

- [1] IRWIN K K, RENZETTE N, KOWALIK T F, et al. Antiviral drug resistance as an adaptive process[J]. *Virus Evol*, 2016, 2(1): 1-10.
- [2] HURT A C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses[J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 8(1): 22-29.
- [3] RENAUD C, KUYPERS J, ENGLUND J A. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1[J]. *J Clin Virol*, 2011, 52(2): 70-78.
- [4] LI M, WANG Y, JIN J, et al. Inhibitory Activity of Honeysuckle Extracts against Influenza A Virus In Vitro and In Vivo[J]. *Viro Sin*, 2020, 12(5): 12250-12261.
- [5] DING Y, CAO Z, CAO L, et al. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase[J]. *Sci Rep*, 2017, 10(7): 45717-45723.
- [6] DAO T T, NGUYEN P H, LEE H S, et al. Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from *Glycyrrhiza inflata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(1): 294-298.
- [7] SONG W, SI L, JI S, et al. Uralsaponins M-Y, antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(7): 1632-1643.
- [8] SUN Z G, ZHAO T T, LU N, et al. Research progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity[J]. *Mini Rev Med Chem*,

- 2019, 19(10): 826–832.
- [9] 孙经梦, 刘骏, 李炯, 等. 桑叶提取物对小鼠感染甲型流感病毒 FM1 的预防与治疗作用研究[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1837–1842.
- [10] 李立, 寇爽, 赵静, 等. 藿香、苍术对甲型 H1N1 流感免疫调节差异的生物信息学分析. 中医杂志[J]. 2016, 57(12): 1011–1014.
- [11] 欧利, 秦克, 杨子宵, 等. 双氢青蒿素对甲型流感病毒 H1N1 诱导人支气管上皮细胞 TNF- α 和 IL-6 表达的影响及机制研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(2): 171–177.
- [12] 杨霞. 青蒿琥酯和双氢青蒿素抗甲型流感病毒作用研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [13] 张志安. 藿香、苍术对甲型 H1N1 流感病毒感染的免疫调节作用分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(24): 35–36.
- [14] 黄远, 李菁, 徐科一, 等. 板蓝根抗流感病毒有效成分研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2618–2623.
- [15] 罗芬. 大青叶水提物抗甲型流感病毒活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(10): 881–884.
- [16] YU Y, ZHU C, WANG S, et al. Homosecoiridoid alkaloids with amino acid units from the flower buds of *Lonicera japonica*[J]. J Nat Prod, 2013, 76(12): 2226–2233.
- [17] LI L, CHANG S, XIANG J, et al. Screen anti-influenza lead compounds that target the PA (C) subunit of H5N1 viral RNA polymerase[J]. PloS one, 2012, 7(8): e35234.
- [18] ZIMA V, RADILOVÁ K, KOŽÍŠEK M, et al. Unraveling the anti-influenza effect of flavonoids: Experimental validation of luteolin and its congeners as potent influenza endonuclease inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2020, 208(5): 112754–112776.
- [19] SADATI S M, GHEIBI N, RANJBAR S, et al. Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase[J]. Biomed Rep, 2019, 10(1): 33–38.
- [20] 黄婉怡. 臭灵丹黄酮类和挥发油成分抗流感病毒及抗炎的药效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [21] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9): 2002–2007.
- [22] 李华, 吴锦雯, 周雅萍. 中医药对呼吸道病毒作用的最新研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(17): 2725–2727, 2731.
- [23] TEIJARO J R, WALSH K B, RICE S, et al. Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during influenza virus infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(10): 3799–3804.
- [24] IWASAKI A, PILLAI P S. Innate immunity to influenza virus infection. Nature reviews[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(5): 315–328.
- [25] LAM W Y, YEUNG A C, CHAN P K. Apoptosis, cytokine and chemokine induction by non-structural 1 (NS1) proteins encoded by different influenza subtypes[J]. Virol J, 2011, 8(5): 554–562.
- [26] US D. Cytokine storm in avian influenza[J]. Mikrobiol Bul, 2008, 42(2): 365–380.
- [27] BIAN J R, NIE W, ZANG Y S, et al. Clinical aspects and cytokine response in adults with seasonal influenza infection[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5593–5602.
- [28] LAM W Y, YEUNG A C, CHU I M, et al. Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses[J]. Virol J, 2010, 7(5): 344–352.
- [29] CHEN J, DUAN M, ZHAO Y, et al. Saikosaponin A inhibits influenza a virus replication and lung immunopathology[J]. Oncotarget, 2015, 6(40): 42541–42556.
- [30] MITCHELL S, VARGAS J, HOFFMANN A. Signaling via the NF κ B system[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227–241.
- [31] SANTORO M G, ROSSI A, AMICI C. NF- κ B and virus infection: who controls whom[J]. EMBO J, 2003, 22(11): 2552–2560.

(编辑: 梁进权)