

## • 研究论文 •

## 鼠尾草酸对甲型流感病毒的体外抑制作用研究

彭海英, 刘泽鑫, 杨霞, 邱电, 贾伟新, 亓文宝, 陈建新\*, 武力\*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 鼠尾草酸 (carnosic acid, CA) 是迷迭香与鼠尾草等植物中主要的酚二萜类活性成分, 具有抗氧化、抗炎等作用, 但目前未见 CA 抗流感病毒的相关报道。本研究通过病毒滴度测定方法评价了迷迭香中主要活性成分迷迭香酸、CA 和熊果酸的抗流感病毒活性, 发现 CA 在 A549 细胞中显著抑制流感病毒 H5N1 增殖, 进一步通过间接免疫荧光、Western blot 和实时荧光定量 PCR 等方法对 CA 的体外抗流感病毒作用进行了系统评价并初步探讨其作用机制。结果表明, CA 在 A549 和 MDCK 细胞中可显著抑制流感病毒 H5N1 复制, 半数有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 分别为 4.30 和  $3.64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时, CA 也抑制流感病毒 2009panH1N1 ( $EC_{50}$ :  $10.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 H3N2 ( $EC_{50}$ :  $12.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 在 A549 细胞中的复制。机制研究发现, CA 对 H5N1 复制的抑制作用与其诱导 A549 细胞血红素加氧酶-1 (HO-1) 的表达并减少 H5N1 感染细胞中活性氧的水平有关。

**关键词:** 鼠尾草酸; 流感病毒; 抗病毒活性; 血红素加氧酶-1 信号通路; 活性氧

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0360-11

## *In vitro* inhibition of carnosic acid against influenza A virus infections

PENG Hai-ying, LIU Ze-xin, YANG Xia, QIU Dian, JIA Wei-xin, QI Wen-bao,  
CHEN Jian-xin\*, WU Li\*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Carnosic acid (CA) is the main phenolic diterpenoid active ingredient in plants such as rosemary and sage, and has antiviral, antioxidant, anti-inflammatory effects and so on, however, its antiviral activity against influenza virus infections was not reported. In this study, antiviral activities against influenza A virus infections of three main bioactive ingredients from rosemary, including rosmarinic acid, CA and ursolic acid, were evaluated using virus titer titration assay, and CA showed remarkable inhibition on influenza H5N1 replication in A549 cells. The antiviral activity of CA was further confirmed and its mechanism of action was investigated using the indirect immunofluorescence assay (IFA), Western blot and real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that the 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) of CA against influenza H5N1 in A549 cells and MDCK cells were 4.30 and  $3.64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Meanwhile, CA also showed inhibition on influenza virus 2009panH1N1 ( $EC_{50}$ :  $10.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and H3N2 ( $EC_{50}$ :  $12.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) replications in A549 cells. Mechanistic studies showed that antiviral activity of CA is related to its induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in A549 cells and suppression on production of reactive oxygen in H5N1-infected cells.

**Key words:** carnosic acid; influenza virus; antiviral activity; heme oxygenase-1 signaling pathway; reactive oxygen species

收稿日期: 2022-06-08; 修回日期: 2022-08-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31572565); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019B1515210007).

\*通讯作者 Tel: 86-20-85280665, E-mail: jxchen@scau.edu.cn;

Tel: 86-20-85284886, E-mail: 30000924@scau.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0705

流感是由流感病毒 (influenza virus) 感染引起的传染性疾病, 具有发烧、喉咙痛、流鼻涕等临床症状, 严重者可能继发细菌感染及导致肺炎, 全球每年因感染流感而致死的病例高达 25~50 万<sup>[1]</sup>。流感病毒是单股负链 RNA 囊膜病毒, 根据病毒核蛋白的不同分为甲、乙、丙、丁 4 型。甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 可根据病毒糖蛋白血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抗原性不同分为多种不同亚型, 现有 18 种 HA 和 11 种 NA 亚型<sup>[2]</sup>。流感可在不同物种间传播, 宿主广泛, 禽类及哺乳动物均可被感染<sup>[3]</sup>。能使禽类宿主感染的流感病毒被称为禽流感病毒, 禽流感病毒一般情况下只感染禽类, 当禽流感病毒发生突变获得人际间传播能力时, 可能会导致人类感染引发大流行<sup>[4]</sup>。高致病性禽流感病毒也可能直接传染给人类导致重症肺炎甚至死亡。2003~2017 年, 高致病性 H5N1 病毒致东南亚国家 860 余人感染, 死亡率高达 60%<sup>[5]</sup>; 2013~2018 年, 我国华东地区高致病性 H7N9 禽流感病毒致 1 569 人感染, 死亡率达 39%<sup>[6]</sup>。因此, 流感病毒 (特别是高致病性流感病毒) 是威胁人类健康的重要病原。

接种疫苗是预防流感感染的主要措施。但流感病毒抗原漂移可能减弱疫苗的有效性, 而病毒的跨种传播及新毒株的流行可能导致疫苗完全无效<sup>[7]</sup>。药物是防治流感的第二道防线。目前, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于临床治疗流感的药物主要包括 M2 离子通道抑制剂 (金刚烷胺和金刚乙胺)、NA 抑制剂 (扎那米韦、奥司他韦和帕拉米韦) 及近年来日本开发的流感病毒聚合酶抑制剂法匹拉韦和 Cap 依赖型核酸内切酶抑制剂巴沙洛韦<sup>[8-10]</sup>。然而药物的长期使用易造成流感流行株耐药, 20 世纪 60 年代上市的金刚烷胺和金刚乙胺已致流感病毒全面耐药, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 已不推荐这两种药物作为季节性流感病毒治疗药物<sup>[11]</sup>; 近年来, 有关奥司他韦耐药的报道也日益增多<sup>[12]</sup>。研发新型抗流感病毒药物, 特别是具有新作用机制的抑制剂的开发是国际抗病毒药物研究的热点。

中药和天然植物在中国、日本和东南亚国家被广泛用于流感等病毒感染性疾病的治疗。研究表明<sup>[13,14]</sup>, 中药及天然植物中的多酚、黄酮、生物碱、萜类和皂苷等活性成分可直接抑制病毒或通过调节宿主免疫反应间接抑制病毒感染, 从而发挥抗感染作用。中药及天然产物中的抗流感活性成分不仅是获得抗流感病毒新药的重要途径, 而且对阐明中药抗流感的药效物质基础具有重要价值。迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* Linn.) 是一种常见香料植物, 原产于欧洲及非洲北部, 目前全

球多个国家都有引种, 作为著名香料植物广泛用于调味食品、饮料及化妆品中。研究表明<sup>[15]</sup>, 迷迭香及其提取物具有治疗或预防支气管哮喘、痉挛性疾病、消化性溃疡等功效。迷迭香提取物的主要活性成分包括鼠尾草酸 (carnosic acid, CA)、迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 和熊果酸 (ursolic acid, UA) 等化合物。CA 属于酚二萜化合物, 具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤、神经保护和抑制肥胖等药理活性<sup>[16]</sup>, 但 CA 对流感病毒的抑制作用未见报道。本研究报道了 CA 的抗流感病毒作用, 并初步探讨了其作用机制。

## 材料与方 法

**细胞与病毒** 人肺癌上皮细胞 (A549) 和马-达二氏犬肾细胞 (MDCK) 购自中国科学院上海生命科学院细胞库; 流感病毒 A/Guangzhou/03/2009 (2009panH1N1) 和 A/Guangdong/Dongguan/1100/2006 (H3N2) 由广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室杨子峰教授惠赠。上述病毒经本实验室无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡胚传代扩增, 于 -80 °C 保存。A/Duck/Guangdong/99 (H5N1) 亚型流感病毒由华南农业大学兽医生物技术中心分离鉴定并保存。本实验涉及到有关 H5N1 禽流感病毒相关的实验均在华南农业大学兽医学院生物安全三级 (BSL-3) 实验室开展。

**试剂与耗材** 迷迭香提取物 CA、UA、RA (湖南先伟实业有限公司提供, 纯度均大于 97.0%); 阳性对照药磷酸奥司他韦胶囊 (oseltamivir, OST, 东阳光长江药业); 氯化血红素 (hemin)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 诱导剂 (美国 MedChemExpress 公司); DMEM 细胞培养基和 0.25% EDTA-胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 以色列 Biological Industries 公司); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司); 鼠源抗 IAV-NP (nucleoprotein) 单克隆抗体 (北京义翘神州公司); 兔源抗 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B) p65 和 NF- $\kappa$ B p (phosphorylated)-p65 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体 (美国 Abcam 公司); 荧光二抗 anti-rabbit IgG H&L (AlexaFluor<sup>®</sup>488)、活性氧探针 (DCFH-DA)、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (上海碧云天生物科技有限公司); 总 RNA 抽提试剂盒 (上海飞捷公司); cDNA 第一链合成试剂盒和 SYBR Green I 荧光定量 PCR Mix (北京康润公司); 人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (四正柏生物公司); 共聚焦玻璃培养皿 (安徽 Biosharp 公司)。

**仪器** 生物安全柜(西班牙 Telstar 公司); 二氧化碳细胞培养箱(美国 Scilogex 公司); 倒置显微镜、荧光倒置显微镜和激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); 凝胶成像仪(北京科创锐新公司); LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪(上海 Roche 公司); 全波长酶标检测仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

**细胞毒性测定方法** 待 96 孔板中的细胞贴壁生长至单层约 90% 时, 弃上清磷酸盐缓冲液 (PBS), 洗净各孔, 加入用 DMEM 稀释的待测化合物, 设置空白对照组, 每组 6 个重复孔。于细胞培养箱中分别孵育 24、48 或 72 h。弃各孔液体, PBS 洗 2 次, 加入 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液, 37 °C 恒温培养箱中避光孵育 4 h。加入二甲基亚砜 (DMSO) 振荡 10 min。用酶标检测仪测量样品在 570 nm 处的吸光度 (A) 值, 按公式 (1) 计算细胞相对活力<sup>[17]</sup>, 采用 GraphPad Prism8.0 计算得到各待测化合物对细胞的半数毒性浓度 (50% cytotoxic concentration, CC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞相对活力 (\%)} = 100 \times \frac{\text{药物组 } A \text{ 值}}{\text{空白对照组 } A \text{ 值}} \quad (1)$$

**间接免疫荧光实验 (IFA)** 待 96 孔板中的细胞贴壁生长至单层约 90% 时弃上清, PBS 洗 1 次, 加入 100 倍半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>) 的流感病毒液, 细胞培养箱中孵育 1 h, 设置空白对照组。弃掉液体, PBS 洗 2 次, 加入稀释至待测浓度的化合物, 设置病毒对照组和阳性药物对照组, 继续于培养箱培养 24 或 48 h。终止培养, 按照文献<sup>[2]</sup>中的方法进行间接免疫荧光实验。用 Image J 软件计算各孔荧光密度, 按公式 (2) 计算各药物组细胞中病毒 NP 蛋白的相对表达量, 病毒组 NP 蛋白相对表达量设为 100%。

$$\text{病毒 NP 蛋白相对表达量 (\%)} = 100 \times \frac{\text{药物组绿色荧光值}}{\text{病毒组绿色荧光值}} \times \frac{\text{病毒组蓝色荧光值}}{\text{药物组蓝色荧光值}} \quad (2)$$

**终点稀释法测病毒滴度** 细胞样品按“间接免疫荧光实验 (IFA)”项的方法制样并反复冻融 3 次, 收集各孔溶液, 参考终点稀释法<sup>[18]</sup>操作, 记录细胞病变效应 (CPE) 情况, 评价标准参照 Zheng 等<sup>[19]</sup>报道的方法, 用 Reed-Muench 法计算出各组样品的 TCID<sub>50</sub> 值, 采用 GraphPad Prism8.0 绘制拟合曲线并计算化合物半数有效浓度 (EC<sub>50</sub>) 值, 计算选择指数 (selective index, SI = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>)。

**实时荧光定量 PCR 检测 (qRT-PCR)** 细胞样品按“间接免疫荧光实验 (IFA)”项方法制样并反复冻融 3 次, 按照总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 用 cDNA 第一链合成试剂盒和 SYBR Green I 荧光定量

PCR Mix 进行荧光定量 PCR 检测, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行分析计算。qRT-PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成 (表 1)。

**Table 1** Primers used for real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction (qRT-PCR). IAV: Influenza virus A; NP: Nucleoprotein; F: Forward; R: Reverse; *HO-1*: Heme oxygenase-1; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene	Sequence
IAV (H5N1)-NP	F: 5'-ACCAGAAGATKGTGTCMTTCCAGGG-3' R: 5'-TACTCCTCCGCATTGTCTCCGAAG-3'
<i>HO-1</i>	F: 5'-AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC-3' R: 5'-AAAGCCCTACAGCAACTGTCTCG-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' R: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

**蛋白免疫印迹分析 (Western blot)** 细胞样品按照“间接免疫荧光实验 (IFA)”中的方法用 6 孔板制样, 后续实验参照 Yan 等<sup>[2]</sup>报道的方法操作。

**活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平检测** 用 DMEM 基础培养液将流感病毒 H5N1 稀释至 100 TCID<sub>50</sub>, 加入到铺满 A549 细胞的 24 孔板中, 每孔加入 500 μL, 1 h 后, 用 PBS 洗 2 次, 换入含所需浓度的 CA 培养液, 设置病毒对照组; 用含 200 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的培养液将 CA 稀释成所需浓度, 加入到铺满 A549 细胞的 24 孔板中, 设置 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阳性对照组和空白对照组, 24 h 后终止培养后, DCFH-DA 探针孵育 30 min 后 PBS 洗 3 次, 于倒置荧光显微镜 (激发波长 488 nm、发射波长 525 nm) 观察并拍摄。

**NF-κB (p65) 核易位检测实验** 用 DMEM 基础培养液将流感病毒 H5N1 稀释至 100 TCID<sub>50</sub>, 加到接种 A549 细胞 (1×10<sup>5</sup> 个) 的共聚焦玻璃培养皿中, 每皿 1 mL, 设置空白对照组, 于 37 °C 细胞培养箱中孵育 1 h, 用 PBS 洗 2 次, 换入含 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的 CA 培养液, 设置病毒对照组, 细胞培养箱中培养 24 h, 终止培养, 固定细胞, 按 Su 等<sup>[20]</sup>报道的方法处理样品, 加入 NF-κB p65 一抗, 于 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 2 次后, 加入荧光二抗, 避光孵育 1 h, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 细胞核染色 5 min 后, 在激光共聚焦显微镜下观察 A549 细胞中 p65 的核易位。

**ELISA 检测 TNF-α 水平** 用 DMEM 基础培养液将流感病毒 H5N1 稀释至 100 TCID<sub>50</sub>, 加入到铺满 A549 细胞的 12 孔板中, 每孔加入 1 mL, 1 h 后, 用 PBS 洗 2 次, 换入含所需浓度的 CA 培养液, 设置病毒阳性对照组和空白对照组, 24 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 洗 2 次, 加入 500 μL PBS, 将细胞板反复冻融 3 次, 取出细胞裂解液, 1 000 ×g 离心 10 min, 收取上清液, 按照

TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒说明书测定各孔 TNF- $\alpha$  浓度。

**统计学分析** 所有实验均重复 3 次, 数据表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 利用双尾  $t$  检验法对数据进行差异显著性分析, 用 GraphPad Prism8.0 软件绘图。  $P < 0.05$  表示具有统计学差异。

## 结果

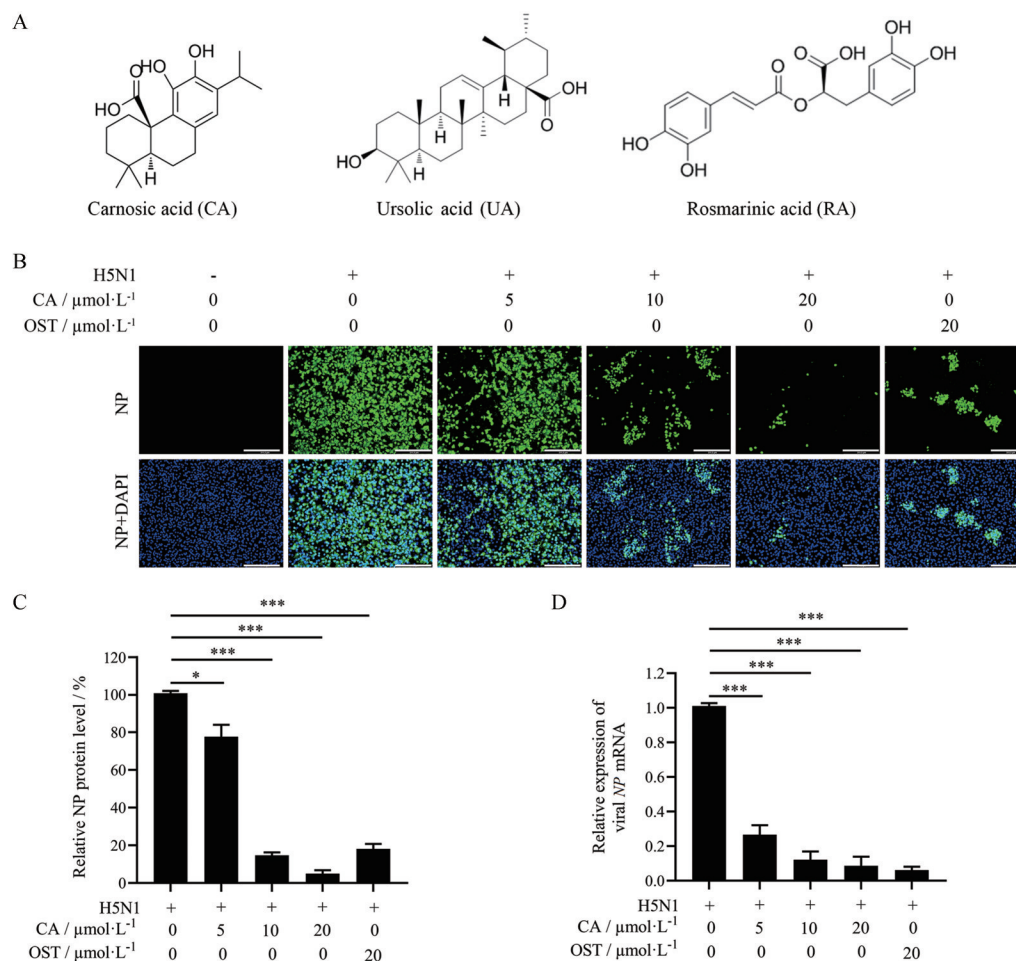
### 1 CA 在 A549 和 MDCK 细胞上抑制 H5N1 复制

本研究首先采用 MTT 法测定了迷迭香酸中 3 种主要有效成分 CA、RA 和 UA 对 A549 和 MDCK 细胞的毒性。处理细胞 48 h 后, CA、RA 和 UA 对 A549 细胞的  $CC_{50}$  值分别为 37.89、 $> 100.0$  及  $> 100.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 对 MDCK 细胞的  $CC_{50}$  值分别为 35.69、 $> 100.0$  及  $> 100.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (表 2)。在无毒剂量下通过终点稀释法测定病毒滴度, 评价 CA、RA 和 UA (化学式见图 1A) 在 A549 细胞中对流感病毒 H5N1 的抑制作用 (表 2)。A549 细胞中 CA 在  $5 \sim 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  显著抑制 H5N1

增殖, 且具有剂量依赖关系, CA 处理显著降低 H5N1 子代病毒滴度 ( $EC_{50}$ :  $4.30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与病毒组相比,  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 作用 48 h 使子代病毒产量减少了 97.7%; 而 RA 和 UA 对 H5N1 的复制没有明显抑制作用,  $EC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 MDCK 细胞中, CA 对 H5N1 的增殖也具有抑制作用,  $EC_{50}$  为  $3.64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而 RA 和 UA 同样没有 H5N1 增殖抑制作用,  $EC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**Table 2** Antiviral effects of carnosic acid (CA) against H5N1 infection in A549 and MDCK cells. “-”: Not detected;  $CC_{50}$ : 50% Cytotoxic concentration;  $EC_{50}$ : 50% Effective concentration; SI: Selective index; RA: Rosmarinic acid; UA: Ursolic acid

Cell line	Compound	A/Duck/Guangdong/99(H5N1)		
		$CC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SI
A549	CA	37.89	4.30	8.8
	RA	$> 100.0$	$> 100.0$	-
	UA	$> 100.0$	$> 100.0$	-
MDCK	CA	35.69	3.64	9.8
	RA	$> 100.0$	$> 100.0$	-
	UA	$> 100.0$	$> 100.0$	-



**Figure 1** CA inhibits H5N1 infection in A549 cell cultures. A549 cells infected with H5N1 were treated with the indicated concentrations of CA or oseltamivir (OST) for 48 h. A: The chemical structures of CA, RA and UA; B: The expression level of H5N1 NP protein was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA). Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ ; C: Relative expression level of H5N1 NP protein; D: The expression level of NP mRNA were detected using qRT-PCR.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole

进一步采用 IFA 分析病毒蛋白 NP 表达和 qRT-PCR 分析病毒 NP mRNA 水平, 评估 CA 处理感染细胞 48 h 后对 H5N1 增殖的抑制作用。结果显示, H5N1 感染后, 病毒在细胞中进行了病毒 NP 蛋白的转录和表达, CA 处理显著抑制了病毒复制, 呈良好的剂量依赖关系; 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 使病毒 NP 蛋白的表达减少了 95%, 而阳性药 OST 使病毒 NP 蛋白的表达减少了 81.9% (图 1B~D)。

## 2 CA 能持续抑制流感病毒在 A549 细胞上的增殖

为考察 CA 对流感病毒的增殖是否具有持续的抑制作用, 用终点稀释法、qRT-PCR 和 Western blot 方法检测了 CA 分别干预感染 H5N1 的 A549 细胞 24、48 和 72 h 后的病毒滴度、NP mRNA 的相对表达水平和 NP 蛋白的表达情况。如图 2 所示, H5N1 感染 A549 细胞后, 其病毒滴度、NP mRNA 和 NP 蛋白表达水平在 24~72 h 内持续增加, 而 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 在 3 个时间点均显著降低子代病毒滴度、病毒 NP mRNA 和 NP 蛋白水平, 其抑制效果与阳性药 OST (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相当。综上, CA 在 H5N1 感染的 72 h 内能持续抑制病毒的增殖。

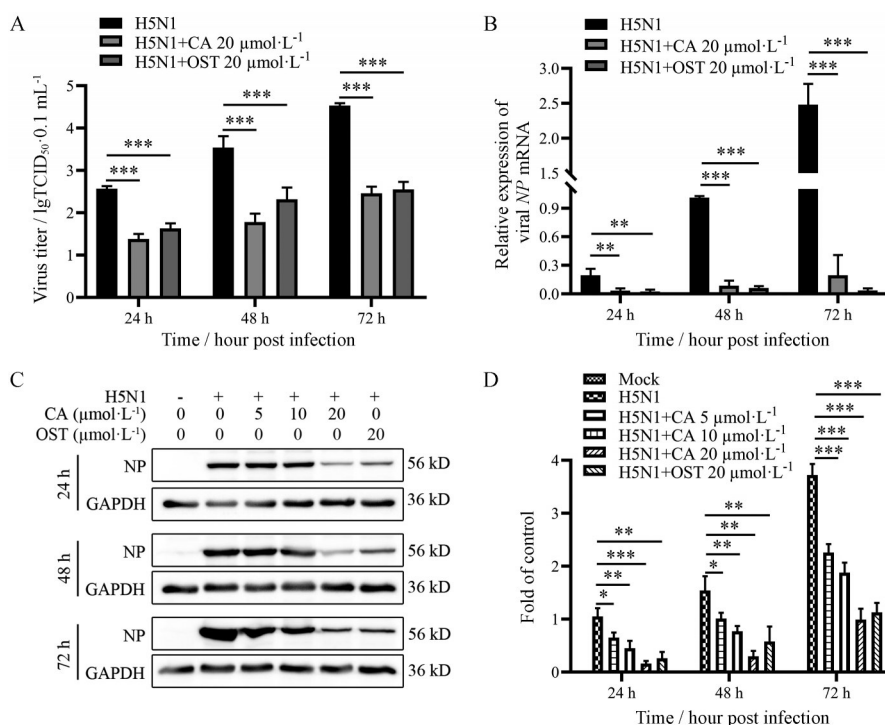
## 3 CA 在 A549 细胞上抑制多种亚型流感病毒的增殖

为了确认 CA 是否对不同亚型流感病毒具有广谱抑制作用, 本研究考察了 CA 在 A549 细胞中对另

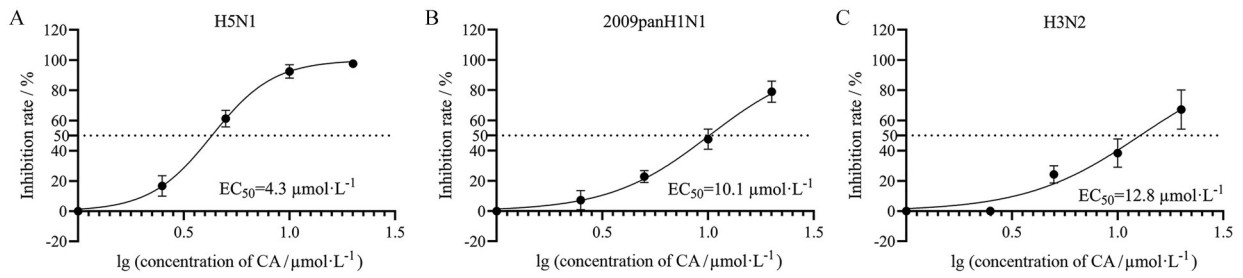
两种不同亚型流感病毒 2009panH1N1 和 H3N2 增殖的抑制作用。结果显示 (图 3), CA 对 2009panH1N1 和 H3N2 流感病毒也有不同程度的抑制作用, 能减少 2009panH1N1 ( $\text{EC}_{50}$ : 10.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 H3N2 ( $\text{EC}_{50}$ : 12.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的复制, 表明 CA 对 3 种亚型流感病毒均有抑制作用, 通过  $\text{EC}_{50}$  值比较可知, CA 对 H5N1 亚型的抑制作用较强, 对 2009panH1N1 的抑制作用次之, 对 H3N2 亚型的抑制作用较弱。阳性药 OST (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 3 种亚型流感病毒的抑制率均达到 90%。综上, CA 具有广谱抗甲型流感病毒活性。

## 4 CA 在不同作用模式下对流感病毒的抑制作用

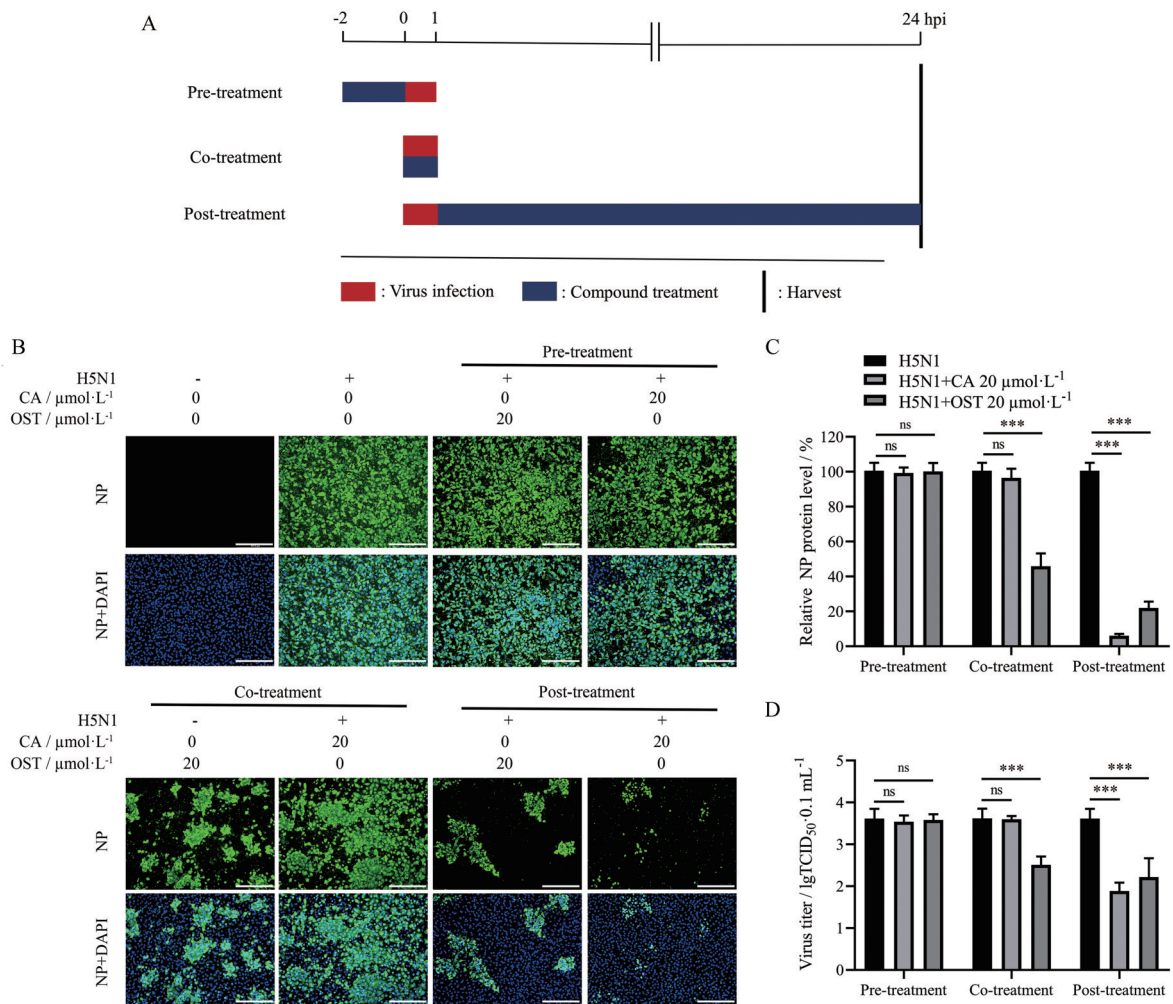
为了确定 CA 在流感病毒感染过程中哪个阶段发挥抑制作用, 本研究设置了 3 种作用模式 (图 4A), 包括预防作用 (pre-treatment)、共同作用 (co-treatment) 和感染后给药 (post-treatment) 模式, 在感染后 24 h 测定病毒 NP 蛋白的表达和病毒滴度。结果显示 (图 4B~D), 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 预处理 A549 细胞 2 h 不会降低子代病毒的滴度和病毒 NP 蛋白的表达, 提示 CA 处理不影响 A549 细胞对 H5N1 的敏感性; 共同作用模式下, 与病毒组相比, CA 处理对 H5N1 的增殖没有显著影响, 提示 CA 对 H5N1 病毒粒子没有直接抑制作用, 也不影响病毒对细胞的吸附过程; H5N1 感染 A549 细胞后再用



**Figure 2** CA exhibits sustaining antiviral effect against H5N1 infection in A549 cell cultures. A-C: A549 cells were infected with H5N1 and treated with CA for 24, 48 and 72 h, respectively; virus titer (A), expression levels of viral NP mRNA (B) and NP protein (C) were determined by the end point dilution assay, qRT-PCR and Western blot, respectively; D: Western blot bands were quantified by Image J and data were normalized by setting the control (the expression of NP protein at 24 h of H5N1 group) as 1.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .  $\text{TCID}_{50}$ : 50% Tissue culture infective dose



**Figure 3** Inhibitory activity of CA against the replications of three different IAV strains in A549 cells. A549 cells were infected with H5N1 (A), 2009panH1N1 (B) or H3N2 (C), and treated with CA for 24 h, the inhibitory effect of CA against IAV replication was determined by the end point dilution assay and fitting curves were drawn based on the results by GraphPad Prism8.0, respectively.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



**Figure 4** CA exhibits inhibition on H5N1 replication in the post-treatment mode. A: A549 cells were treated with indicated compounds for 2 h prior to virus infection (pre-treatment), or for 1 h during viral infection (co-treatment), or for 24 h after 1 h virus infection and removal (post-treatment); B-D: At 24 hours post infection (hpi), the cells were subjected to viral NP protein analysis using IFA (B, C) and supernatants were collected for the determination of virus titer using the end point dilution assay (D). Scale bar: 250  $\mu\text{m}$ . Results shown in C are normalized NP levels based on the fluorescence optical densities of the images from three independent experiments (B).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$ . ns: No statistical significance

20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 处理细胞, 结果子代病毒滴度相比病毒组减少了 1.63 log, 病毒 NP 蛋白的表达减少了 93%, 表明 CA 在病毒进入细胞后的阶段抑制病毒的增殖。

### 5 CA 通过激活 HO-1 信号通路抑制流感病毒在细胞中的复制

HO-1 是一种可诱导血红素降解为胆绿素、一氧化

碳和亚铁离子的限速酶,是一种典型的应激反应蛋白<sup>[21]</sup>,其可降低细胞内过度的氧化应激,在炎症消退中起重要调控作用,已有研究证明HO-1信号通路的激活具有显著的抗病毒作用<sup>[22,23]</sup>。Hemin是一种含铁的卟啉化合物,是血红素加氧酶HO-1诱导剂。为了探究CA是否通过激活A549细胞的HO-1通路而起到抗病毒效果,用不同浓度的CA和hemin处理细胞24 h,用Western blot检测细胞HO-1蛋白表达水平,结果如图5A、B所示,CA和hemin都能以剂量依赖关系提高A549细胞的HO-1蛋白的表达量,表明二者均能激活A549细胞中的HO-1信号通路。接下来,检测了不同浓度CA和40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hemin处理对感染H5N1病毒A549细胞HO-1和流感病毒NP的表达量和mRNA水平的影响。如图5C、D所示,CA能提高感染H5N1病毒A549细胞中HO-1蛋白表达量和mRNA水平,并抑制流感病毒NP蛋白表达和mRNA水平,呈良好的量效关系;40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hemin对H5N1病毒A549细胞中HO-1蛋白表达量和mRNA水平的提高能力优于20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CA,但其对病毒NP蛋白和mRNA的表达的抑制却弱于后者。这些结果表明,CA可能一部分通过激活A549细胞的HO-1通路抑制流感病毒在细胞中的增殖,同时还存在其他的抗病毒机制。

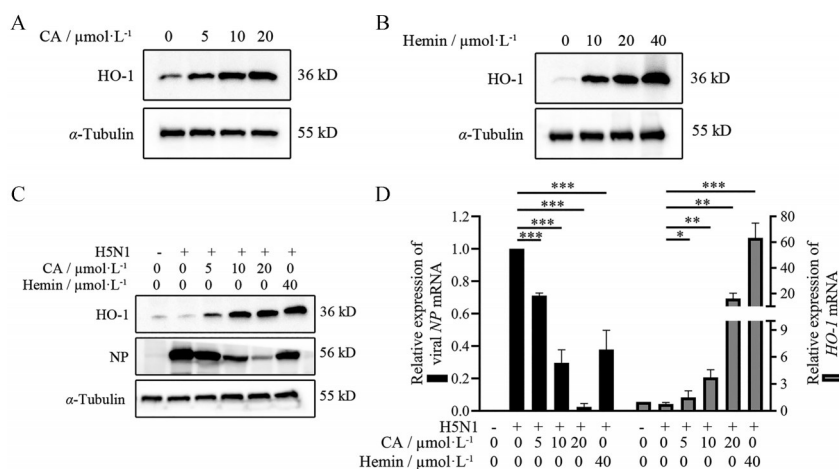
## 6 CA抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和流感病毒感染诱导的氧化应激

ROS指机体由内氧组成、含氧且性质活泼的物质的总称。Wang等<sup>[24]</sup>报道流感病毒感染能引起细胞内ROS产量增加,从而加重机体病理损伤。为了进一步探究CA是否能减缓流感病毒感染诱导的氧化应激,检测了细胞内ROS的水平。结果如图6所示,图中绿

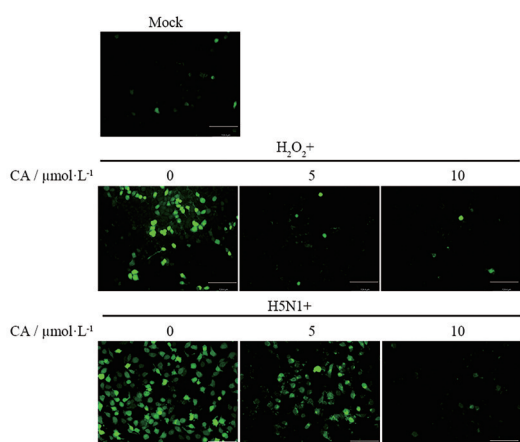
色荧光代表被ROS氧化生成的二氯荧光素(DCF),其荧光强度代表ROS水平,流感病毒H5N1感染和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激A549细胞都能使ROS水平上升,而CA处理能有效降低A549细胞内的ROS水平。需指出的是,CA也可能通过抑制H5N1的复制从而减少了病毒感染诱导的ROS的生成。

## 7 CA减少流感病毒感染的细胞炎症反应

多项研究表明,流感病毒复制诱导炎症通路NF- $\kappa$ B的激活,促进炎症因子的表达,高致病性流感病毒感染可诱导炎症因子风暴而导致机体严重的免疫炎症病理损伤<sup>[25]</sup>。Ruan等<sup>[26]</sup>发现CA能明显改善大鼠类风湿关节炎症状,其作用机制可能与抑制NF- $\kappa$ B信号通路和炎症反应相关。为了探究CA是否影响流感病毒感染诱导的NF- $\kappa$ B激活,通过Western blot和免疫荧光-激光共聚焦方法检测CA是否影响磷酸化p65(p-p65)蛋白的表达和入核过程。结果如图7A、B所示,H5N1的感染激活NF- $\kappa$ B信号通路,p-p65的表达增加;CA处理减少H5N1诱导的p-p65表达量升高,并呈良好的剂量依赖关系,并且10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA处理抑制p-p65的入核。这些结果表明,CA可能抑制了H5N1感染诱导的NF- $\kappa$ B通路的活化。NF- $\kappa$ B通路的活化导致TNF- $\alpha$ 等促炎细胞因子表达的增加,为了探讨CA是否能影响H5N1感染诱导的炎症因子的表达,采用ELISA方法检测CA处理后感染细胞TNF- $\alpha$ 表达水平。结果如图7C所示,H5N1感染导致A549细胞中TNF- $\alpha$ 表达升高,而CA处理能显著降低H5N1感染诱导的TNF- $\alpha$ 的过表达,并呈良好的量效关系。值得指出的是,CA也可能通过抑制H5N1的复制从而减少了



**Figure 5** CA inhibits H5N1 replication in A549 cells partly by enhancing cellular HO-1 expression. A, B: A549 cells without H5N1 infection were treated with the indicated concentrations of CA (A) or hemin (B) for 24 h, and the protein expression of cellular HO-1 was assessed by Western blot; C, D: A549 cells infected with H5N1 were treated with the indicated concentrations of CA or 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  hemin for 24 h. The protein expressions of cellular HO-1 and viral NP were assessed by Western blot (C). The relative expressions of cellular HO-1 mRNA and viral NP mRNA were assessed by qRT-PCR (D).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



**Figure 6** CA suppresses oxidative stress induced by H5N1 infection and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in A549 cells. A549 cells infected with H5N1 were treated with the indicated concentrations of CA for 24 h. As a positive control, A549 cells were stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μmol·L<sup>-1</sup>) at 37 °C for 24 h. The reactive oxygen species (ROS) level, reflected by the ratio of positive cells stained with dichlorofluorescein (DCF), was determined using IFA. Scale bar: 125 μm

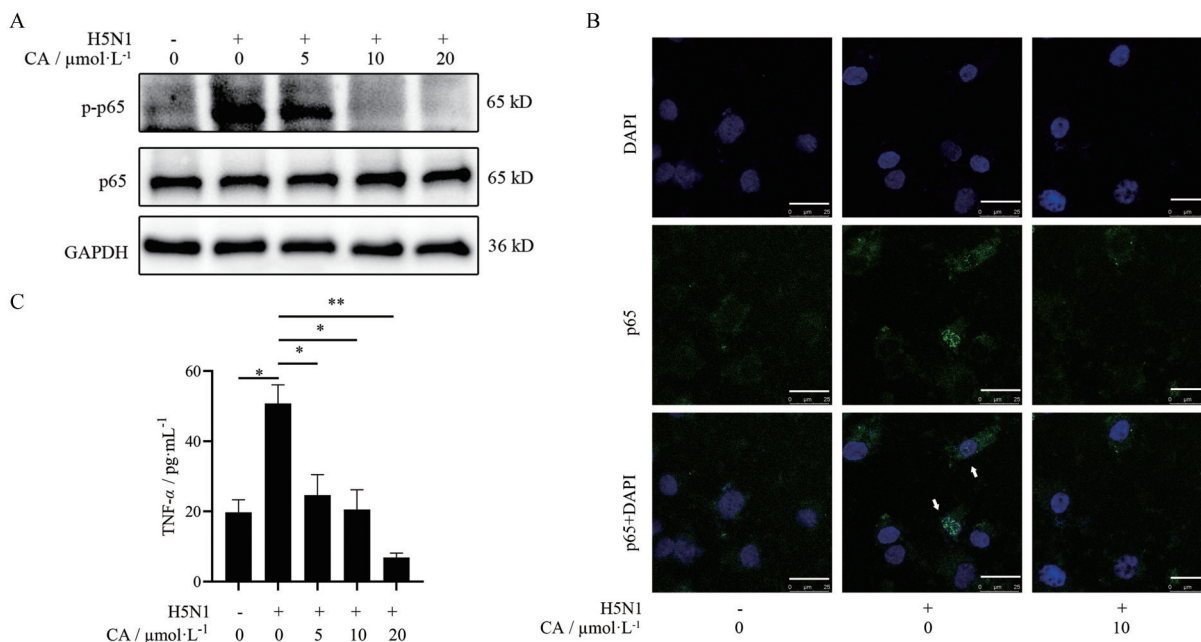
病毒感染诱导的NF-κB通路的活化及炎症因子TNF-α的生成。

### 讨论

人类对流感病毒的认识已有上百年历史,但流感

对人类和动物健康仍然危害巨大。现有的流感疫苗保护作用有限,抗流感病毒药物种类数量少,且其临床药效受耐药性的影响<sup>[27]</sup>,因此亟需开发新型抗流感病毒感染药物。本研究首次揭示了CA在体外对流感病毒复制具有显著抑制作用,其有效浓度远低于其细胞毒性浓度,其对H5N1的抑制活性与阳性药OST相当。此外,CA对2009panH1N1和H3N2两种目前人间传播的流感病毒亚型也具有显著抑制作用。药物对病毒的作用机制研究发现,CA的抗病毒活性可能与其促进细胞抗炎蛋白HO-1的表达及抑制H5N1感染诱导的氧化应激和炎症反应密切相关。

高致病性流感病毒诱导的过度免疫反应又称为“细胞因子风暴”,是导致高致病性流感患者肺损伤和死亡的主要原因<sup>[28]</sup>。M2离子抑制剂、NA抑制剂等抗流感药物均不能有效阻止过度免疫反应导致的肺损伤<sup>[29]</sup>。开发靶向宿主过度免疫反应和控制由流感感染诱导的氧化应激和炎症反应的药物非常重要。HO-1是重要的抗炎和抗氧化酶,可催化血红素代谢为一氧化碳(CO)、亚铁离子和胆绿素。CO和胆绿素也具有抗氧化、抗炎、抗病毒和抗凋亡作用<sup>[30]</sup>。已有研究报道<sup>[31,32]</sup>,HO-1的上调抑制多种不同种类病毒的感染,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)、肠道病毒、埃博拉病毒(EBOV)



**Figure 7** CA attenuates nuclear factor kappa-B (NF-κB) activation and subsequent production of pro-inflammatory cytokines in H5N1-infected A549 cells. A549 cells infected with H5N1 was treated with the indicated concentrations of CA for 24 h. A: The protein expression of NF-κB p65, p-p65 and GAPDH in A549 cells was assessed by Western blot; B: The p65 nuclear translocation was detected by confocal microscopy. The white arrows represent p65 nuclear translocation. Scale bar: 25 μm; C: The content of tumor necrosis factor α (TNF-α) was analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

和IAV。Espinoza等<sup>[33]</sup>报道, HO-1诱导剂CoPP通过在体外增强A549细胞中干扰素(IFN)的表达,抑制了呼吸道合胞病毒的复制。穿心莲内酯通过上调Huh-7细胞中HO-1依赖性的IFN表达表现抗丙型肝炎病毒活性<sup>[34]</sup>; HO-1与干扰素调节因子3(IRF3)的相互作用是诱导IFN- $\beta$ 应对Sendai病毒感染所必需的,提示HO-1在先天性抗病毒免疫反应中也起重要作用<sup>[35]</sup>。为了定殖宿主细胞及增殖,IAV进化出多种机制来逃避或抑制宿主先天免疫应答。如IAV NS1蛋白是病毒的非结构蛋白,可抑制干扰素刺激基因(ISG)及IFN- $\alpha/\beta$ 的产生,逃避宿主的抗病毒反应。因此,在IAV感染过程中,通过小分子化合物保护及诱导宿主的先天性抗病毒免疫反应是抑制病毒复制的重要途径。研究发现<sup>[36]</sup>,一枝蒿黄酮类化合物YZH-106通过激活HO-1的表达进而激活I型IFN反应抑制IAV复制。本研究发现CA可显著上调A549细胞中HO-1的表达,同时CA处理显著抑制流感病毒的复制,而HO-1诱导剂hemin也导致病毒增殖下降,这些结果表明CA对流感病毒的抑制作用与其激活HO-1的活性有关,但详细机制有待进一步研究。值得指出的是,虽然 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ hemin提高细胞HO-1蛋白表达量与 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CA相当,但前者对病毒的抑制作用明显弱于后者,提示CA除通过提高HO-1表达外,同时还通过其他途径抑制流感病毒复制。

流感病毒入侵宿主细胞后,会产生介导组织损伤、炎症反应和细胞凋亡的氧化应激。ROS在细胞正常代谢下稳定产生,一旦ROS积累超过机体对氧化物的清除,氧化系统和抗氧化系统间的平衡将被打破,导致中性粒细胞炎症浸润加重,蛋白酶分泌增加,氧化中间体积聚,最终引起组织损伤、炎症反应和细胞凋亡<sup>[37]</sup>。氧化应激是流感病毒,特别是高致病性H5N1感染致病的重要因素<sup>[38]</sup>。氧化还原环境的失衡是流感病毒感染致组织损伤的基础,可增加宿主上皮细胞对流感病毒的易感性,并促进细胞间的病毒传播<sup>[39]</sup>。Xia等<sup>[40]</sup>研究发现CA可有效清除ROS,保护破骨细胞免受p38通路介导的炎症侵袭。CA还可保护正常小鼠肝细胞免受 $\text{H}_2\text{O}_2$ 通过sirtuin 1信号介导诱导的细胞毒害作用<sup>[41]</sup>。本研究证实流感病毒H5N1感染确实诱导A549细胞产生ROS,而CA处理显著降低了H5N1感染细胞中的ROS。本研究结果与Xiang等<sup>[42]</sup>研究报道的CA可通过上调RAW264.7巨噬细胞中HO-1的表达来保护ROS/RNS诱导的蛋白损伤的结果一致。Ki等<sup>[43]</sup>研究报道,过量ROS产生还可激活NF- $\kappa\text{B}$ 通路。正常生理状态下,NF- $\kappa\text{B}$ 通路在细胞质中处于静息状态,与抑制蛋白I $\kappa\text{B}$ (inhibitor of NF- $\kappa\text{B}$ )结合成三聚体复合物。

当受到病毒感染等促炎刺激时,I $\kappa\text{B}$ 激酶能使I $\kappa\text{B}$ 蛋白磷酸化,I $\kappa\text{B}$ 随即从p50/p65/I $\kappa\text{B}$ 异源三聚体中解离出来随后降解,NF- $\kappa\text{B}$  p65被磷酸化为NF- $\kappa\text{B}$  p-p65,迅速从细胞质进入细胞核内(核易位),与核内DNA上的特异序列相结合,从而诱导产生大量的细胞因子<sup>[44]</sup>,包括IFN、TNF、白细胞介素(IL)和趋化因子等,而ROS作为炎症介质可促进这些细胞因子的表达。Li等<sup>[45]</sup>研究发现CA可通过抑制NF- $\kappa\text{B}$ 的激活对脂多糖诱导小鼠的急性肺损伤起到保护作用。在本研究中,H5N1感染A549细胞后,经典的促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 水平显著升高,而CA能显著降低TNF- $\alpha$ 的过度表达。CA可能通过上调HO-1的表达发挥抗氧化(抑制ROS生成)及抗炎(抑制NF- $\kappa\text{B}$ 通路活化)活性,但不排除CA通过抑制流感病毒的增殖进而减少病毒感染诱导的ROS的生成及NF- $\kappa\text{B}$ 通路的活化,其详细机制有待深入研究。

本研究表明,CA对流感病毒复制具有显著的体外抑制作用,其抗病毒机制与其促进HO-1表达有关。鉴于CA来源丰富,成本低廉,安全性好,可望成为具有开发前景的抗流感病毒感染先导化合物。后续重要的工作是评价CA对感染流感病毒小鼠的保护作用。

**作者贡献:** 彭海英负责药效学实验、初步作用机制研究实验和文章初稿撰写;刘泽鑫负责部分作用机制研究实验;杨霞和邱电负责实验数据分析;贾伟新和元元宝负责提供部分实验条件;陈建新和武力负责论文的修改和审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明没有利益冲突。

## References

- [1] Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, et al. A brief review of influenza virus infection [J]. *J Med Virol*, 2021, 93: 4638-4646.
- [2] Yan H, Wang M, Wang H, et al. Effect of compound houttuynia mixture on influenza virus *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1409-1415.
- [3] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7: 440-451.
- [4] Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 243-267.
- [5] Uyeki TM. Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses [J]. *Respirology*, 2008, 13Suppl 1: S2-S9.
- [6] Li C, Chen H. H7N9 Influenza virus in China [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021, 11: a038349.
- [7] Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 6852-6862.

- [8] Leonov H, Astrahan P, Krugliak M, et al. How do aminoadamantanes block the influenza M2 channel, and how does resistance develop? [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 9903-9911.
- [9] Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1363-1373.
- [10] Tejus A, Mathur AG, Pradhan S, et al. Drug update-baloxavir marboxil: latest entrant into the arena of pharmacotherapy of influenza [J]. *Med J Armed Forces India*, 2022, 78: 125-130.
- [11] Pielak RM, Schnell JR, Chou JJ. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 7379-7384.
- [12] Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors [J]. *Virus Res*, 2004, 103: 199-203.
- [13] Ye M, Liao Y, Wu L, et al. An oleanolic acid derivative inhibits hemagglutinin-mediated entry of influenza A virus [J]. *Viruses*, 2020, 12: 225.
- [14] Liang X, Huang Y, Pan X, et al. Erucic acid from *Isatis indigotica* Fort. suppresses influenza A virus replication and inflammation *in vitro* and *in vivo* through modulation of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK pathway [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10: 130-146.
- [15] Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sena P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials [J]. *Indian J Exp Biol*, 1999, 37: 124-130.
- [16] Birtic S, Dussort P, Pierre FX, et al. Carnosic acid [J]. *Phytochemistry*, 2015, 115: 9-19.
- [17] Shi D, Wang Y, Rao K, et al. Sesquiterpenoids and iridoids from *Valeriana jatamansi* with anti-inflammatory and anti-influenza virus properties [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 428-432.
- [18] Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula [J]. *World J Virol*, 2016, 5: 85-86.
- [19] Zheng Z, Wang K, Wei H, et al. Antiviral effect of Fufang yinhua jiedu (FFYH) granules against coronavirus and its potential mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1808-1815.
- [20] Su L, Gao Y, Zhang M, et al. Andrographolide and its derivative potassium dehydrographolide succinate suppress PRRSV replication in primary and established cells *via* differential mechanisms of action [J]. *Virol Sin*, 2021, 36: 1626-1643.
- [21] Agarwal A, Bolisetty S. Adaptive responses to tissue injury: role of heme oxygenase-1 [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2013, 124: 111-122.
- [22] Ma L, Zhang P, Wang H, et al. Heme oxygenase-1 agonist CoPP suppresses influenza virus replication through IRF3-mediated generation of IFN- $\alpha/\beta$  [J]. *Virology*, 2019, 528: 80-88.
- [23] Hill-Batorski L, Halfmann P, Neumann G, et al. The cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 suppresses Ebola virus replication [J]. *J Virol*, 2013, 87: 13795-13802.
- [24] Wang R, Zhu Y, Lin X, et al. Influenza M2 protein regulates MAVS-mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production [J]. *Autophagy*, 2019, 15: 1163-1181.
- [25] Michaelis M, Geiler J, Naczek P, et al. Glycyrrhizin exerts antioxidative effects in H5N1 influenza A virus-infected cells and inhibits virus replication and pro-inflammatory gene expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e19705.
- [26] Ruan R, Deng X, Zhu X, et al. Study on the effect of carnosic acid on NF- $\kappa$ B signaling pathway in rheumatoid arthritis rats [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志)*, 2020, 29: 2757-2761.
- [27] Hussain M, Galvin HD, Haw TY, et al. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management [J]. *Infect Drug Resist*, 2017, 10: 121-134.
- [28] Maines TR, Szretter KJ, Perrone L, et al. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response [J]. *Immunol Rev*, 2008, 225: 68-84.
- [29] Zheng B, Chan K, Lin Y, et al. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 8091-8096.
- [30] Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 119.
- [31] Zhu Z, Wilson AT, Mathahs MM, et al. Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 1430-1439.
- [32] Schmidt WN, Mathahs MM, Zhu Z. Heme and HO-1 inhibition of HCV, HBV, and HIV [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 129.
- [33] Espinoza JA, León MA, Céspedes PF, et al. Heme oxygenase-1 modulates human respiratory syncytial virus replication and lung pathogenesis during infection [J]. *J Immunol*, 2017, 199: 212-223.
- [34] Lee JC, Tseng CK, Young KC, et al. Andrographolide exerts anti-hepatitis C virus activity by up-regulating haeme oxygenase-1 *via* the p38 MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 237-252.
- [35] Tzima S, Victoratos P, Kranidioti K, et al. Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN- $\beta$  production [J]. *J Exp Med*, 2009, 206: 1167-1179.
- [36] Ma LL, Wang HQ, Wu P, et al. Rupestonic acid derivative YZH-106 suppresses influenza virus replication by activation of heme oxygenase-1-mediated interferon response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96: 347-361.
- [37] Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152: 415-422.
- [38] Erlich JR, To EE, Liang S, et al. Targeting evolutionary

- conserved oxidative stress and immunometabolic pathways for the treatment of respiratory infectious diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32: 993-1013.
- [39] Nencioni L, Sgarbanti R, De Chiara G, et al. Influenza virus and redox mediated cell signaling: a complex network of virus/host interaction [J]. *New Microbiol*, 2007, 30: 367-375.
- [40] Xia G, Wang X, Sun H, et al. Carnosic acid (CA) attenuates collagen-induced arthritis in mice *via* inflammation suppression by regulating ROS-dependent p38 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 418-432.
- [41] Wang T, Takikawa Y. Carnosic acid protects normal mouse hepatocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity *via* sirtuin 1-mediated signaling [J]. *Hepatol Res*, 2016, 46: 239-246.
- [42] Xiang Q, Liu Q, Xu L, et al. Carnosic acid protects biomolecules from free radical-mediated oxidative damage *in vitro* [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2013, 22: 1-8.
- [43] Ki YW, Park JH, Lee JE, et al. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 218: 235-245.
- [44] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, et al. Into the eye of the cytokine storm [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76: 16-32.
- [45] Li Q, Liu L, Sun H, et al. Carnosic acid protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18: 3707-3714.