

## 热毒宁注射液抗流感病毒作用及机制研究

颜海燕<sup>#</sup>, 王 萌<sup>#</sup>, 王辉强, 李玉环<sup>\*</sup>

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 中国医学科学院抗病毒药物研究重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 为了探究热毒宁注射液 (Reduning injection, RI) 抗甲型流感病毒的作用及其机制, 本研究在 A549 和 MDCK 细胞上采用 CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测药物细胞毒性; 采用 Western blot 和 CPE (cytopathic effect) 方法检测 RI 对病毒蛋白、细胞病变和病毒毒力的影响评价其药效; Western blot 法检测血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 的蛋白水平、转录因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 核转运、P38 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 和 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) 磷酸化; 实时荧光定量 PCR 检测 IFN- $\alpha/\beta$  (interferon- $\alpha/\beta$ ) mRNA 含量; 双荧光素酶报告基因检测 Nrf2 的转录活性。结果显示, RI 剂量依赖性地抑制流感病毒诱导的 MDCK 细胞病变, 降低流感病毒 M2 蛋白水平和病毒毒力, 具有明确的抗流感病毒作用; 促进 P38 MAPK 和 ERK1/2 的磷酸化并激活 Nrf2 核转录因子活性, 促进细胞核内 Nrf2 蛋白表达, 从而上调 HO-1 蛋白表达, 最终增加 IFN- $\alpha/\beta$  mRNA 水平。综上, 本研究表明, RI 通过激活 MAPK/Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗流感病毒作用, 揭示了 RI 抗流感病毒新的作用机制, 为其临床治疗流感病毒提供了理论依据。

**关键词:** 热毒宁注射液; 流感病毒; 血红素加氧酶 1; 干扰素; 抗流感药物

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1596-07

## Effect and mechanism of Reduning injection on influenza A virus

YAN Hai-yan<sup>#</sup>, WANG Meng<sup>#</sup>, WANG Hui-qiang, LI Yu-huan<sup>\*</sup>

(CAMS Key Laboratory of Antiviral Drug Research, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to investigate the effect of Reduning injection (RI) on influenza A virus (IAV) and its mechanism. We evaluated the cytotoxicity of RI in A549 and MDCK cells by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Western blot and cytopathic effect (CPE) assays were applied to test the effects of RI on viral protein, CPE and virus virulence to evaluate its inhibitory effect. The proteins level of heme oxygenase 1 (HO-1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), phosphorylation of P38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) were detected by Western blot. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the RNA expression of interferon- $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ). The relative luciferase reporter assay was used to analyze the promoter activity and transcriptional regulation of Nrf2. The results indicated that RI inhibited IAV-induced MDCK cytopathies in a dose-dependent manner, decreased M2 protein of influenza virus and viral titer, indicating that it has definite effect on inhibiting IAV. RI promotes the phosphorylation of P38 MAPK and ERK1/2, activates the activity of Nrf2 nuclear transcription factor, increases the expression of Nrf2 protein in the nucleus, thus up-regulates the expression of HO-1 protein, and ultimately increases the IFN- $\alpha/\beta$  mRNA level. In summary, our results demonstrated that RI inhibits the replication of IAV by

收稿日期: 2022-10-04; 修回日期: 2022-10-28.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (8220131872); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-048).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-63010984, E-mail: yuhuanlibj@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1092

activating MAPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway, revealing a new mechanism of RI against influenza virus, and providing theoretical basis for clinical treatment of influenza virus.

**Key words:** Reduning injection; influenza virus; heme oxygenase 1; interferon; anti-influenza virus agent

流感是由流感病毒引起的一类急性呼吸道疾病。流感病毒传染性强、传播速度快、呈现全球性流行。根据世界卫生组织报告,流感每年可致5%~10%的成人和20%~30%的儿童发病,全球每年流感流行可致29万~65万例死亡<sup>[1]</sup>。此外,有证据表明,甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)可加重冠状病毒 SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 的感染<sup>[2]</sup>。因此,针对流感病毒的防治具有重要意义。目前疫苗和药物是防治流感病毒的有效方法,但由于流感病毒变异速度快,且无法准确预测下一年的流感病毒毒株,因此使用疫苗预防具有局限性。常用的抗流感病毒药物主要分为以下几类:① M2 离子通道抑制剂[金刚烷胺(amantadine, AH)、金刚乙胺等],由于其耐药性严重,目前已不建议使用;② 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)抑制剂(奥司他韦、扎那米韦等),其只在感染后48 h内使用有效,在2008~2009年流感季节传播的大约90%的流感毒株被发现对NA抑制剂具有耐药性<sup>[3]</sup>;③ 法匹拉韦(favipiravir, T705)是一种广谱抗病毒药物,可抑制流感病毒依赖RNA的RNA聚合酶;④ 酸性聚合酶(PA)核酸内切酶抑制剂巴洛沙韦于2018年10月获美国食品和药物管理局(FDA)批准上市。以上抗病毒药物均是针对病毒靶点,随着抗流感病毒药物的广泛使用,导致大量耐药株的产生,因此需开发新的抗流感病毒药物。

中药是药物开发的重要资源库,中草药由于其成分多样、作用靶点多,可通过多种途径和机制发挥抗流感病毒作用,因此研究中药抗流感病毒作用具有重要意义。由青蒿、金银花、栀子组成的热毒宁注射液(Reduning injection, RI)中药复方制剂具有清热、疏风、解毒功能,临床主要用于外感风热所致感冒、咳嗽、症见高热、微恶风寒、上呼吸道感染、急性支气管炎等证候者<sup>[4]</sup>。有文献<sup>[5]</sup>报道热毒宁注射液在小鼠体内具有抗甲型H1N1流感病毒的作用,可提高小鼠存活率、显著降低病毒感染小鼠肺组织病毒载量,但有关该药的抗流感病毒作用机制尚不完全明确。因此,本研究探索RI抗流感病毒作用机制,为该复方中药的临床应用提供更多理论依据。

## 材料与方法

**细胞与病毒** 马达犬肾细胞[MDCK, 美国典型

培养物保藏中心(ATCC)];人肺癌细胞(A549)、人单核巨噬细胞(THP-1)(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心);人肾上皮细胞(HEK293T/17, 中科院上海细胞库);流感病毒毒株 A/Fort Monmouth/1/1947 (FM1, H1N1, ATCC)。

MDCK 细胞使用 MEM 培养基(含 1% MEM 非必需氨基酸溶液), A549 细胞使用 F-12K 培养基, THP-1 细胞使用 RPMI1640 培养基, HEK293T/17 细胞使用 DMEM 培养基, 均加入 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 双抗, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。全部实验均采用对数生长期的细胞进行。以上所有培养试剂均购自 Invitrogen 公司。

**药品与试剂** RI(每支 10 mL, 批号 190534, 江苏康缘药业股份有限公司);金刚烷胺(amantadine, AH, 美国 MCE 公司);法匹拉韦(上海陶术公司);原卟啉氯化钴[cobalt(III) protoporphyrin IX chloride, CoPP]、IAV M2 抗体(美国 Santa Cruz 公司);MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) 抑制剂(PD98059)和 P38 抑制剂(SB239063)(上海 Selleck 公司)。CCK-8 (cell counting kit-8) 细胞增殖及毒性检测试剂盒、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 一步法试剂盒(北京全式金公司);Lipofectamine™ 3000 (美国 Invitrogen 公司);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(上海碧云天公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega 公司);RNeasy Mini Kit (QIAGEN 公司);TransScript II Green One-Step qRT-PCR SuperMix (北京全式金公司)。抗体  $\beta$ -actin、P38、p-P38 (phospho-P38)、ERK (extracellular signal-regulated kinases)、p-ERK、tubulin、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司);血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 抗体(英国 Abcam 公司);Histone H3、转录因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)(美国 Proteintech 公司)。

**仪器** 二氧化碳孵箱(美国 Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500 Fast, Applied Biosystems 公司);倒置显微镜和荧光显微镜(奥林巴斯公司);凝胶成像系统(ChemiDoc™ XRS+) (美国伯乐公司);EnSpire 荧光检测仪(美国 PerkinElmer 公司)。

**细胞毒性检测(CCK-8 法)** 取对数生长期的 MDCK (每孔  $1.5 \times 10^4$  个)、A549 (每孔  $2.5 \times 10^4$  个) 和

THP-1 (每孔  $4.5 \times 10^4$  个) 细胞, 接种入 96 孔板中培养 24 h 后, 弃掉完全培养基, 加入维持液稀释的 RI [起始浓度为 RI 原液的 10% (体积比), 2 倍稀释, 共 8 个浓度梯度。继续培养 48 h 后, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8,  $37^\circ\text{C}$  培养 2 h, 酶标仪检测各孔吸光值 ( $A_{450}$ )。

**病毒滴度检测** MDCK (每毫升  $3.5 \times 10^5$  个) 和 A549 (每毫升  $2.5 \times 10^5$  个) 细胞接种于 12 孔板中培养过夜,  $37^\circ\text{C}$  感染流感病毒 [MOI (multiplicity of infection): 0.002、0.2], 同时给予 RI (2.5%、1.25%、0.63%) 处理, 2 h 后, 未吸附的病毒被移除, 加入同剂量含 RI 的病毒维持液。24 h 后, 将培养板放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱三冻三融,  $4^\circ\text{C}$ 、 $5\ 000 \times g$  离心 2 min 收集上清。用病毒维持液将上清进行 10 倍梯度稀释, 将梯度稀释的病毒液加入 MDCK 细胞中, 设置细胞对照, 放置于细胞培养箱中培养。48 h 后使用倒置显微镜读取 CPE (cytopathic effect) 结果, 并根据 Reed & Muench 法计算病毒半数组织细胞感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>), 结果以  $-\lg\text{TCID}_{50}$  表示流感病毒的载量。

**Western blot 检测** MDCK (每毫升  $3.5 \times 10^5$  个) 和 A549 (每毫升  $2.5 \times 10^5$  个) 细胞接种于 12 孔板培养过夜, 流感病毒 (MOI: 0.002、0.2) 感染细胞, 感染同时加入 RI (2.5%、1.25%、0.63%) 和阳性对照药 AH, 于  $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养 2 h 后, 未吸附的病毒被移除, 加入同剂量含 RI 的病毒维持液。24 h 后, 提取细胞总蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,  $5\%$  牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h, 孵育一抗 (IAV M2、HO-1、Nrf2、P38、p-P38、ERK、p-ERK、 $\beta$ -actin、tubulin、histone H3) 于  $4^\circ\text{C}$  过夜, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 增强型化学发光 (enhanced chemiluminescent, ECL) 显影液显影, 于凝胶成像仪曝光。

**qRT-PCR 检测** 取对数生长期 THP-1 细胞, 感染流感病毒 (MOI: 0.2), 同时给予 RI (1.25%、0.63%) 处理,  $37^\circ\text{C}$  感染 2 h 后, 未吸附的病毒被移除, 加入同剂量含 RI 的病毒维持液。感染后 36 h 使用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 于提取细胞内的总 RNA。使用 TransScript II Green One-Step qRT-PCR SuperMix 进行 RNA 水平的定量 PCR 检测。以 *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 作为内参, 对 Ct 值进行归一化处理, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法相对定量方法计算目的基因 *IFN- $\alpha$* 、*IFN- $\beta$*  和流感病毒 *M2* 的表达差异。qRT-PCR 引物见表 1。

**双荧光素酶报告基因检测** HEK293T/17 (每毫升  $4.5 \times 10^5$  个) 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h。细胞共转染表达萤火虫荧光素酶的 pGL4.37 [luc2P/ARE/

**Table 1** Oligonucleotides used for real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR)

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')
5' <i>M2</i> (influenza)	GACCRATCCTGTCACTCTGAC
3' <i>M2</i> (influenza)	GGGCATTYTGACAAAKCGTCTACG
5' <i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA
3' <i>GAPDH</i>	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
5' <i>IFN-<math>\alpha</math></i>	CTGTCCTCCATGAGATGATCC
3' <i>IFN-<math>\alpha</math></i>	CTCATGATTCTGCTCTGACAACC
5' <i>IFN-<math>\beta</math></i>	GCTGGAATGAGACTATTGTTGAGA
3' <i>IFN-<math>\beta</math></i>	CAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG

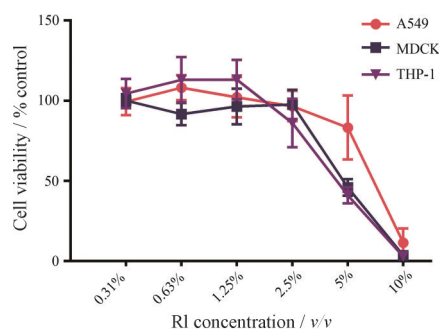
Hygro]/pAP-1-Luc/pNF- $\kappa$ B-Luc 和表达海肾荧光素酶的 pRL-SV40 质粒, 比例为 10:1。转染 24 h 后, 感染流感病毒 (MOI: 0.02) 并加入 RI, 继续处理 24 h。提取细胞总蛋白, 收集上清, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测萤火虫荧光和海肾荧光强度, 二者比值即为荧光素酶报告基因的活性。

**统计学分析** 采用 GraphPad Prism 7.0 软件作图, 并对数据进行统计分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 并用 Holm-Sidak 法进行组间的多重比较。  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 结果

### 1 细胞毒性检测

采用 CCK-8 法检测 RI 在不同细胞中的毒性 (图 1), 在 MDCK 和 A549 细胞中, RI 无毒浓度为 RI 原液的 2.5%, THP-1 细胞上无毒浓度为 1.25%。因此, 在后续 MDCK 和 A549 细胞实验中, RI 所使用的最大浓度为 2.5%, THP-1 中使用的药物最大浓度为 1.25%。



**Figure 1** Cytotoxicity of Reduning injection (RI) in MDCK, A549 and THP-1 cells. The cells were incubated with various concentrations of RI for 48 h. The cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$

### 2 RI 的抗流感病毒作用

通过 CPE 方法检测 RI 在 MDCK 细胞上的病变效

应, 结果显示, RI 剂量依赖性地抑制流感病毒诱导的 MDCK 细胞病变 (图 2A),  $IC_{50}$  为 1.38%。通过检测病毒滴度, 发现 RI 可剂量依赖性抑制 MDCK 和 A549 细胞感染流感病毒后的病毒毒力, 与病毒对照组相比具有统计学差异 (图 2B、C)。进一步验证 RI 在 MDCK 和 A549 细胞中对流感病毒蛋白表达的影响, 结果表明, RI 在两种细胞中均可剂量依赖性降低流感病毒 M2 的蛋白水平, 且 2.5% RI 对 IAV 蛋白的抑制效果与阳性药 AH 相当 (图 2D、E)。上述结果表明, RI 具有明显的抗流感病毒作用。

### 3 RI 通过上调 HO-1 的表达抑制流感病毒复制

检测 RI 对未感染及感染流感病毒后 A549 细胞中 HO-1 蛋白表达的影响, 结果显示, 2.5% RI 显著增加细胞中 HO-1 蛋白的表达 (图 3A、B); 此外, 使用了 HO-1 的激动剂 CoPP 和 RI 共同处理细胞, 如图 3C 所示, RI 和 CoPP 均能上调 HO-1 的表达, 且 RI 和 CoPP 联合可协同上调 HO-1 的表达, 降低流感病毒 M2 的蛋白水平。综上, RI 可显著增加 HO-1 的蛋白表达。

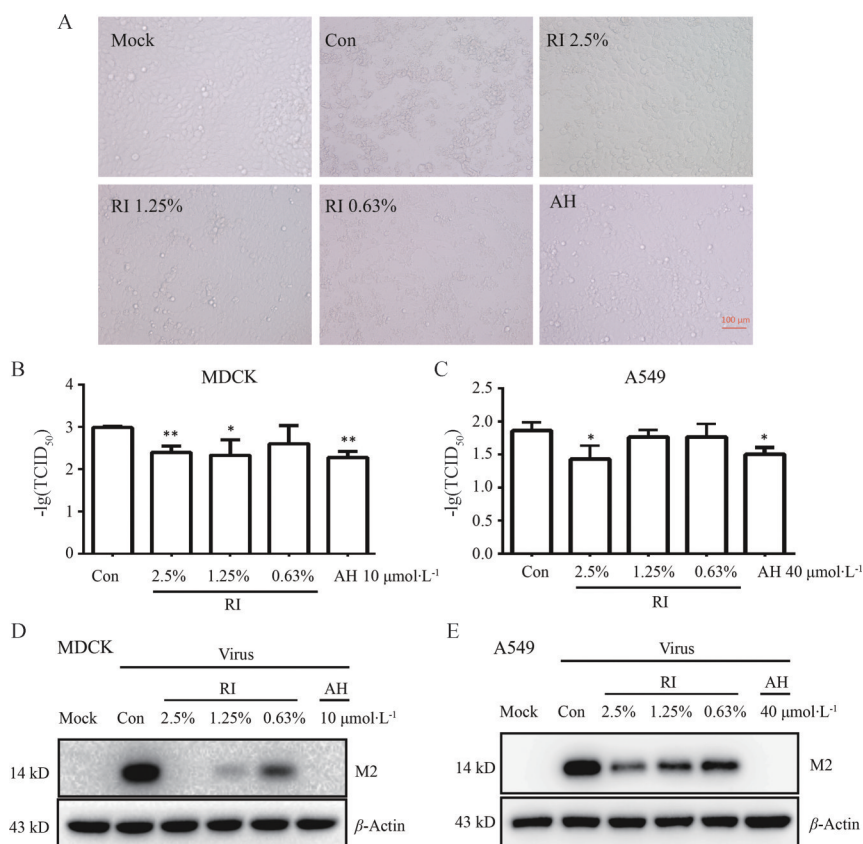
### 4 RI 通过上调 HO-1 激活干扰素

如图 4 所示, 在流感病毒感染 THP-1 细胞 36 h 后, RI 降低流感病毒 M2 水平的同时, 可显著增加 *IFN- $\alpha$*  和 *IFN- $\beta$*  的 mRNA 水平, 与病毒对照组相比具有统计学差异, 说明 RI 可通过上调 HO-1 激活干扰素发挥抗流感病毒作用。

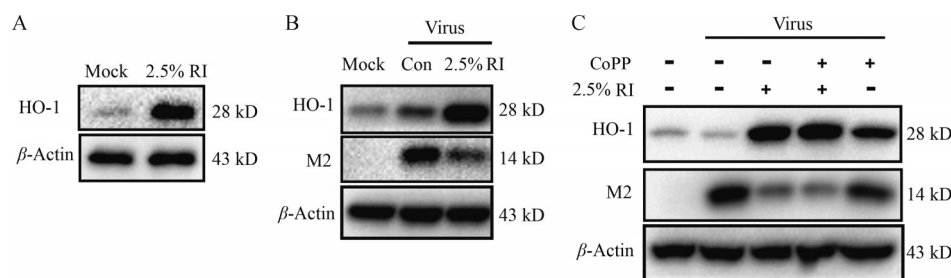
### 5 RI 激活核转录因子 Nrf2 并促进 Nrf2 核转运

为检测 RI 诱导 HO-1 表达的上游信号通路, 使用双荧光素酶基因报告系统对 Nrf2 调节的抗氧化反应元件 ARE、核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和转录因子活化蛋白-1 (AP-1) 所启动的报告基因活性进行了分析, 结果显示, RI 显著提高 Nrf2 转录因子活性; 但对 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 所启动的报告基因活性无影响 (图 5A~C)。因此, RI 通过激活核转录因子 Nrf2 上调 HO-1 的表达。

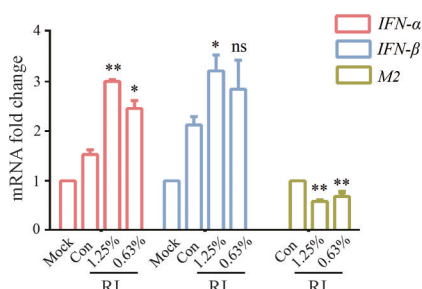
由于 Nrf2 蛋白主要在细胞核中发挥作用, 因此通过细胞核质分离检测 RI 对 Nrf2 蛋白的影响。RI 处理细胞 6 h 后, RI 促进细胞质中的 Nrf2 发生了核转位 (图 5D、E)。因此, RI 可通过促进 Nrf2 入核, 诱导 Nrf2/



**Figure 2** Effects of RI against influenza A virus (IAV). MDCK and A549 cells were infected with IAV (A/Fort Monmouth/1/1947, FM1, MOI: 0.002, 0.2) for 2 h, and treated with indicated concentrations of RI and amantadine (AH) at the same time. After infection, the cells were incubated with RI for 24 h. A: RI inhibited the cytopathic effect (CPE) induced by IAV infection in MDCK cells. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; B, C: Antiviral activity of RI in MDCK (B) and A549 cells (C) against IAV was tested by viral titers assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control (Con); D, E: Cell lysates (MDCK, D; A549, E) were prepared and analyzed for M2 expression by Western blot.  $TCID_{50}$ : 50% tissue culture infective dose; MOI: Multiplicity of infection



**Figure 3** RI inhibited influenza virus replication through up-regulating heme oxygenase 1 (HO-1). A: A549 cells were treated with 2.5% RI for 24 h; B: A549 cells were infected with IAV (MOI: 0.2) for 2 h and treated with 2.5% RI together for 24 h; C: A549 cells were infected with IAV (MOI: 0.2) in the absence of cobalt(III) protoporphyrin IX chloride (CoPP, 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and/or 2.5% RI for 24 h. Cell lysates were prepared and analyzed for HO-1 and M2 expression by Western blot



**Figure 4** RI activates the mRNA levels of interferon- $\alpha/\beta$  (*IFN- $\alpha$* /*IFN- $\beta$* ). THP-1 cell was infected with IAV (MOI: 0.2) for 2 h, and treated with RI at the same time for 36 h. *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\beta$*  and IAV *M2* mRNA levels were determined by qRT-PCR.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Con. ns: Not significant

细胞中检测了RI对Nrf2上游MAPK家族成员的蛋白磷酸化的影响。结果显示,细胞在感染流感病毒并同时给予RI处理5和15 min,可显著促进ERK1/2和P38的磷酸化水平(图6A)。为证实这一作用,利用Ras/Raf/MEK/ERK级联途径中MEK的特异性抑制剂PD98059和P38 MAPK的特异性抑制剂SB239063处理细胞,检测其对Nrf2转录活性的影响。结果显示加入这两种抑制剂后,Nrf2的结合活性下降,并且两种抑制剂同时处理时对Nrf2的抑制效果更为明显(图6B)。综合以上结果提示,RI通过激活ERK1/2和P38 MAPK磷酸化促进Nrf2的核转位。

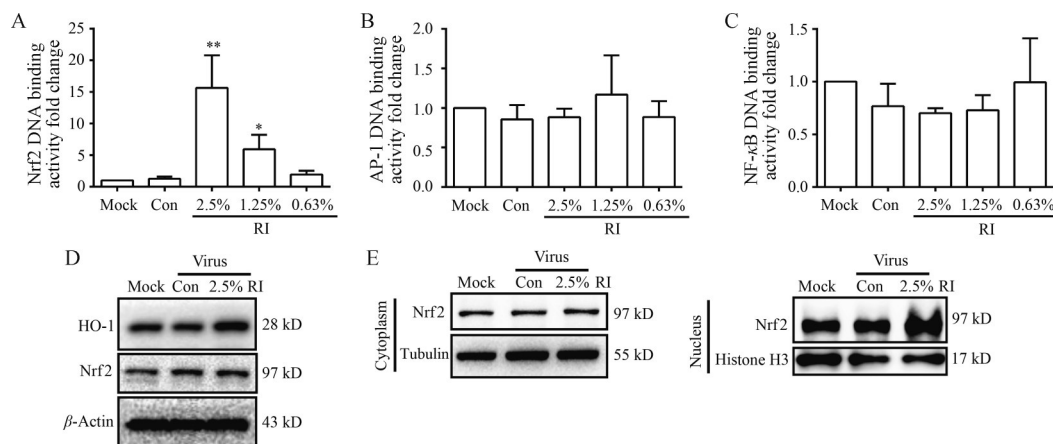
ARE下游的HO-1表达。

### 6 RI激活P38 MAPK、ERK1/2途径诱导Nrf2/HO-1的表达

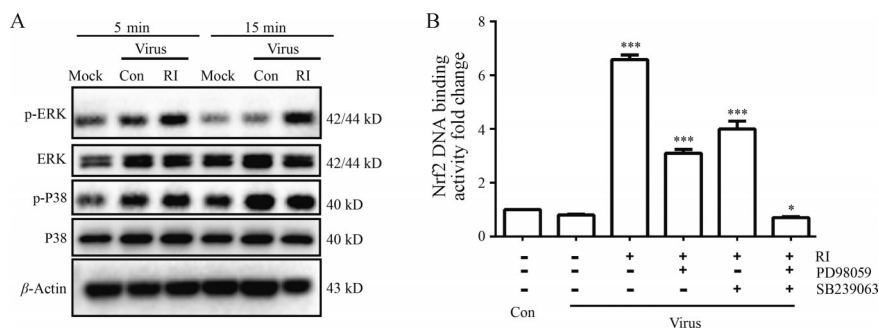
为阐明RI如何通过激活Nrf2发挥作用,在A549

### 讨论

传统中药在中国医药史上发挥极为重要的作用,至今中药在流感治疗中仍占有重要地位。RI具有清热、解毒、疏风之功效,用于治疗外感风热引起的感冒、



**Figure 5** RI activates nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) pathway and promote Nrf2 nuclear translocation. A-C: HEK293T/17 cells were co-transfected with pGL4.37 (luc2P/ARE/Hygro)/pAP-1-Luc/pNF- $\kappa$ B-Luc and pRL-SV40 vector for 24 h, after that, cells were treated with RI for 24 h. Cell lysates were prepared and analyzed for DNA binding activity of Nrf2 (A), activator protein-1 (AP-1, B), nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B, C) by Dual-Glo luciferase assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Con; D, E: A549 cells were infected with IAV (MOI: 0.2) for 2 h and treated with RI for 6 h. The total amounts of cellular (D), cytoplasmic and nuclear (E) protein were analyzed by Western blot



**Figure 6** A: RI activates phosphorylation of ERK1/2 and P38 MAPK. A549 cells were infected with IAV (MOI: 2) and treated with RI 2.5% for 5 or 15 min at the same time and then phospho-ERK1/2 (p-ERK) and phospho-P38 (p-P38) proteins were analyzed by Western blot; B: 293T/17cells co-transfected with pGL4.37 [luc2P/ARE/Hygro] and pRL-SV40 vector were infected with IAV (MOI: 0.1) for 2 h and treated with 2.5% RI in the presence of inhibitors against P38 (SB239063), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) (PD98059) or their combination for 24 h. The Nrf2 DNA binding activity was analyzed by Dual-Glo luciferase assay.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Con

咳嗽、上呼吸道感染所致的高热、微恶风寒等症。本研究采用两种细胞、在分子和细胞水平研究RI抗流感病毒活性。结果显示,RI可剂量依赖性地抑制流感病毒的复制。此外,RI对A/H1N1/BJ/09、A/California/07/2009流感病毒和H5N1亚型禽流感病毒也具有较好的抑制作用<sup>[5-7]</sup>,说明RI具有广谱抗流感病毒作用。

RI中含有环烯醚萜类、黄酮类和有机酚酸类等多种抗病毒成分,包括绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、隐绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、阿魏酸、栀子苷和京尼平等。其中绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、隐绿原酸能抑制流感病毒NA活性<sup>[8]</sup>,另外,阿魏酸也可通过降低流感病毒NA活性抑制流感病毒复制<sup>[9]</sup>。本课题组发现,2.5% RI可抑制约22%的流感病毒NA活性(结果未提供),但在此浓度下,Western blot检测出其抗IAV药效可达90%。因此,RI作为中药复方制剂,具有多成分、多靶点、多途径的作用机制,除直接靶向流感病毒NA外,可能对宿主蛋白也有调节作用。

HO-1是生物体降解血红素生成胆绿素、一氧化碳和铁离子的一种限速酶,副产物胆绿素及其还原型胆红素具有抗炎、抗氧化及抗凋亡等作用<sup>[10]</sup>。RI作为一种广泛使用的中药复方制剂,所含化学成分明确,文献<sup>[11,12]</sup>报道其具有抗炎抗氧化活性。有证据表明,上调HO-1对包括IAV、人类免疫缺陷病毒(HIV)、肠道病毒71(EV71)、埃博拉病毒(EBOV)在内的多种病毒均有抑制作用<sup>[13-17]</sup>。本研究也证实RI可通过诱导HO-1的表达发挥抗流感病毒作用。此外,HO-1在免疫调节反应中占有重要作用。流感病毒感染后,HO-1通过与IRF3相互作用促进IRF3磷酸化及入核,从而激活干扰素系统进而抑制流感病毒的复制<sup>[18]</sup>。有研究<sup>[16]</sup>表明,过表达HO-1显著上调IFN- $\alpha/\beta$ 水平及干扰素刺激基

因(ISG)的表达并抑制IAV复制。本研究结果显示,RI可通过上调HO-1的蛋白表达,促进干扰素IFN- $\alpha/\beta$ 的mRNA表达,发挥抗病毒作用。Wang等<sup>[5]</sup>在研究RI体内抗流感病毒作用机制中发现,RI可促进小鼠肺组织 $\gamma$ 干扰素的分泌,降低白细胞介素-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平。综合以上结果说明,RI在体内外均可通过增强干扰素系统而减轻病毒对机体的损伤,但其体内抗流感病毒作用是否通过上调HO-1还需进一步研究。

RI可通过激活P38 MAPK、ERK1/2途径诱导Nrf2/HO-1表达,从而激活干扰素系统发挥抗流感病毒作用。RI具有靶向流感病毒NA的直接抗病毒作用和通过上调HO-1激活干扰素系统的靶向宿主的抗病毒作用,提示其可能成为新型针对病毒-宿主双机制模式的抗病毒中药。本研究揭示了RI的部分抗流感病毒作用机制,为临床治疗流感病毒提供了理论依据。

**作者贡献:** 颜海燕负责药效学和初步作用机制研究实验、实验结果分析和文章初稿撰写;王萌负责部分药效学实验和作用机制研究实验;王辉强指导文章撰写;李玉环负责实验设计和论文审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明没有利益冲突。

## References

- [1] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study [J]. *Lancet*, 2018, 391: 1285-1300.
- [2] Bai L, Zhao Y, Dong J, et al. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity [J]. *Cell Res*, 2021, 31: 395-403.
- [3] Zhao J, Wang J, Pang X, et al. An anti-influenza A virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2079.

- [4] Yu J. Antibacterial antiviral drug—Reduning injection [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2010, 8: 548-550.
- [5] Wang Z, Bao L, Sun L, et al. Mechanism of Reduning injection against influenza A/H1N1 virus [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 90-93.
- [6] Sun L, Duan SM, Zhou J, et al. *In vitro* inhibition of Reduning injection on influenza A/H1N1 influenza virus [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2014, 29: 848-851.
- [7] Xiao W, Liu T, Chen SL, et al. Inhibitory effect of Reduning injection on avian influenza virus [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40: 1943-1945.
- [8] Qiu LL, Xiao Y, Zhi X, et al. Screening active ingredients of *Lonicerae Japonicae* Flos against influenza based on Box-Behnken response surface method [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2016, 18: 1454-1457.
- [9] Cui MY, Xiao MW, Xu LJ, et al. Bioassay of ferulic acid derivatives as influenza neuraminidase inhibitors [J]. Arch Pharm, 2020, 353: e1900174.
- [10] Sun BH, Wang YT, Lu YF, et al. Progress on the protective effect of heme oxygenase-1 in viral infection [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1574-1583.
- [11] Lee SJ, Oh PS, Ko JH, et al. Glycoprotein isolated from *Gardenia jasminoides* Ellis has a scavenging activity against oxygen radicals and inhibits the oxygen radical-induced protein kinase C alpha and nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2006, 21: 8-21.
- [12] Wang KF, Xiao W, Wang ZH, et al. Influence of Reduning injection on the inflammatory mediators of IL-1, IL-6, ET-1 and PGE2 [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2013, 33: 1918-1922.
- [13] Hill BL, Halfmann P, Neumann G, et al. The cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 suppresses Ebola virus replication [J]. J Virol, 2013, 87: 13795-13802.
- [14] Bunse CE, Fortmeier V, Tischer S. Modulation of heme oxygenase-1 by metalloporphyrins increases anti-viral T cell responses [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179: 265-276.
- [15] Hossain MK, Saha SK, Abdal Dayem A. Bax inhibitor-1 acts as an antiinfluenza factor by inhibiting ROS mediated cell death and augmenting heme-oxygenase 1 expression in influenza virus infected cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 712.
- [16] 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.
- [17] Cummins NW, Weaver EA, May SM. Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice [J]. FASEB J, 2012, 26: 2911-2918.
- [18] Ma LL, Zhang P, Wang HQ, 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.