# 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<sup>\*</sup>

欧 利<sup>1</sup>, 秦 克<sup>1</sup>, 杨子宵<sup>2</sup>, 别明江<sup>3,4 $\triangle$ </sup>

西南医科大学附属成都三六三医院 呼吸内科 (成都 610041); 2. 川北医学院 临床医学院 (南充 637000);
 四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院 检验科 (成都 610041); 4. 四川大学学报(医学版)编辑部 (成都 610041)

【摘要】目的 探讨双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)对甲型流感病毒(influenza A virus,IAV) A/PR/8/34(H1N1)诱导人支气管上皮细胞(BEAS-2B)促炎症因子和细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated kinase,ERK)信号通路蛋白表达的影响。方法 采用不同浓度的DHA(即0、12.5、25、50和100 µmol/L)作用BEAS-2B细胞 24 h,CCK8法检测DHA对BEAS-2B细胞活性的影响。IAV吸附BEAS-2B细胞1 h,分别采用不同浓度的DHA(低、中、高 浓度DHA,即12.5、25和50 µmol/L)作用24 h,同时设置正常对照组和IAV组。采用实时荧光定量PCR法(real time quantitative PCR,RT-qPCR)和酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)分别检测肿瘤坏死因子a(tumor necrosis factor-a,TNF-a)和白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)的mRNA和蛋白表达水平,蛋白质印迹法(Western blot)检测磷酸化ERK(phospho-ERK,p-ERK)蛋白表达水平。采用特异性ERK激动剂(ERK agonist, 20 ng/mL)作用BEAS-2B 细胞(分组为正常对照、IAV、DHA、DHA+IAV、ERK agonist、DHA+IAV+ERK agonist组)24 h,观察对DHA抑制IAV诱导 BEAS-2B细胞TNF-a、IL-6和p-ERK表达的影响。结果 DHA浓度在12.5、25、50 µmol/L时,BEAS-2B细胞存活率与正常 对照组比较差异无统计学意义;与正常对照组比较,IAV组细胞*TNF-a、IL-6* mRNA和蛋白及p-ERK蛋白表达水平量剂量 依赖性的下降(P<0.05),而ERK激动剂减弱了DHA抑制IAV诱导BEAS-2B细胞ERK信号通路蛋白p-ERK表达和促炎症因子 TNF-a、IL-6的分泌。结论 DHA可通过ERK信号通路抑制IAV诱导BEAS-2B细胞TNF-a和IL-6的表达。

【关键词】 双氢青蒿素 甲型流感病毒H1N1 ERK信号通路

**The Effects and Mechanisms of Dihydroartemisinin on Influenza A Virus H1N1 Induces TNF-a and IL-6 Expression in Bronchial Epithelial Cells** OU Li<sup>1</sup>, QIN Ke<sup>1</sup>, YANG Zi-xiao<sup>2</sup>, BIE Ming-jiang<sup>3,4 $\triangle$ </sup>. 1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Chengdu 363 Hospital of Southwest Medical University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 3. Clinical Laboratory, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Editorial Board of Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), Chengdu 610041, China

 $\triangle$  Corresponding author, E-mail: 13941057@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of dihydroartemis (DHA) on influenza A virus (IAV) A/PR/8/34 (H1N1) induces the pro-inflammatory factor and protein of extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway expression in bronchial epithelial cells. Methods The BEAS-2B cells were treated with different concentrations of DHA (i.e.,0, 12.5, 25, 50 and 100 µmol/L) for 24 h and the effect of DHA on the viability of BEAS-2B cells were measure by CCK8 method. The BEAS-2B cells were absorbed with IAV for 1 h, and then were treated with different concentrations of DHA (i.e., 12.5, 25 and 50 µmol/L) for 24 h, meanwhile, the normal control group and IAV group were established. The mRNA and protein expression levels of tumor necrosis factor-a (TNF-a) and interleukin (IL-6) were measured by real time quantitative PCR (RT-qPCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the expression levels of phospho-ERK (p-ERK) proteins were tested by Western blot (WB). Then, an ERK agonist (20 ng/mL) was used to treat BEAS-2B cells (the groups were divided into normal control group, DHA group, DHA+IAV group, ERK agonist group and DHA+IAV+ERK agonist group) for 24 h, and to observe the effect of DHA on inhibiting IAV induce the TNF-a, IL-6 and p-ERK expression in the BEAS-2B cells. Results The BEAS-2B cells viability was not significantly different from that of the normal control group after treatment with DHA (i.e., 12.5, 25, and 50 µmol/L). The expression levels of TNF-α, IL-6 mRNA and TNF-α, IL-6, p-ERK protein in IAV group were significantly up-regulated compared with that in the normal control group (P<0.05), meanwhile, compared with the IAV group, the expression levels of TNFα, IL-6 mRNA and TNF-α, IL-6, p-ERK protein showed dose-dependent decrease in IAV+DHA group (P<0.05).

<sup>\*</sup> 四川省科技计划项目(No.2019YJ0263)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 13941057@qq.com

第 51卷

However, ERK agonists attenuated the DHA inhibit IAV induced the proinflammatory factors  $TNF-\alpha$ , IL-6 secretion and the p-ERK protein expression of ERK signaling pathway in BEAS-2B cells. **Conclusion** These data suggest that DHA can inhibit IAV induces the TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in BEAS-2B cells through ERK signaling pathway.

**(Key words)** Dihydroartemis Influenza A virus H1N1 ERK signaling pathway

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是季节性流感 的主要病原体,每年季节性流感导致29万~65万患者死 亡,严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。流感病毒感染后诱导促炎症 因子水平的增加,引发机体过度免疫应答,形成细胞因子 风暴,导致组织病理损伤和器官衰竭是流感患者死亡的 主要原因。因此,抑制流感患者促炎症因子水平,是控制 细胞因子风暴的发生及降低流感患者死亡的主要策略之 一<sup>[3-5]</sup>。但现阶段临床上治疗流感病毒的药物在此方面效 果有限,急需探索新的药物以应对流感病毒流行。

双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是临床安全、 有效的抗疟疾药物<sup>[6]</sup>,同时还具有抗肿瘤<sup>[7]</sup>,抗寨卡病 毒<sup>[8]</sup>和抗炎<sup>[9-10]</sup>等生物学功能。此外DHA还可抑制细菌脂 多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症反应<sup>[11]</sup>。流感 病毒侵入呼吸道上皮细胞后首先诱导促炎症因子肿瘤坏 死因子-α(tumor necrosis factor-a, TNF-a)表达, 随后白细 胞介素-6(interleukin 6, IL-6)水平显著升高, TNF-α和IL-6增加会进一步促进炎症反应,导致组织损伤,加重病 情[12-14]。同时流感病毒感染后细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路也 被显著激活,进而调控相关基因表达[15]。但DHA能否抑 制IAV诱导TNF-α和IL-6表达及相关信号通路是否与 ERK信号通路有关,现阶段还未见相关报道。因此,本研 究通过观察DHA对甲型流感病毒A/PR/8/34(H1N1)诱导 人支气管上皮细胞(BEAS-2B)促炎症因子和ERK信号通 路蛋白表达的影响,以及ERK激动剂作用于细胞后,促炎 症因子和ERK信号通路蛋白表达的变化,探讨DHA的作 用机制,为DHA成为抗流感病毒感染药物提供理论研究 基础。

## 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

**1.1.1** 细胞株 狗肾上皮细胞(Madin Darby Canine Kidney, MDCK)和人支气管上皮细胞(BEAS-2B)购自中 国科学院昆明细胞库。

1.1.2 病毒毒株 甲型流感病毒A/PR/8/34(H1N1)由中 国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心提 供。SPF级鸡胚由济南斯帕法斯家禽有限公司提供。
1.1.3 主要试剂与仪器 总RNA提取试剂盒(北京天根) 生化科技有限公司); PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser(宝日医生物技术北京有限公司); UltraSYBR Mixture(High ROX)(北京康为世纪生物科技 有限公司); TGX Stain-Free<sup>™</sup> FastCast<sup>™</sup> Acrylamide Kit(美国BIO-RAD公司); 兔抗ERK、磷酸化ERK(p-ERK) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司); 人TNF- $\alpha$ 和IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(北京义 翘神州科技有限公司); CCK8试剂盒(东仁化学科技(上 海)有限公司); 双氢青蒿素(中国索莱宝公司); BEAS-2B细胞专用培养基(KCB)(中国科学院昆明细胞库); DMEM高糖培养基(美国GIBCO公司); ERK激动剂(ERK agonist, 美国Peprotech公司); ECL发光液和PVDF膜(美 国Millipore公司); 封闭液(上海碧云天生物技术有限公 司); GAPDH、TNF- $\alpha$ 和IL-6基因引物由苏州金唯智生物 科技有限公司合成。

CFX96型实时荧光定量PCR仪和凝胶成像系统(美国 BIO-RAD公司); NanoDrop 2000型紫外分光光度计(美国 Thermo公司); 371型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司); HFsafe-1500型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公 司); ELX50型多功能酶标仪(美国BioTek公司); 3300型成 像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中的GAPDH、TNF-α和 IL-6序列,使用NCBI数据库中的Pick Primers功能,直接设 计引物;然后选择长度在18~24个碱基,上游和下游碱基 数相差不超过5个,自配对碱基数不超过5对,产物大小在 100~300 bp之间,并且与其他基因无交叉反应的引物序 列。引物序列见表1。

表 1 引物序列和扩增片段大小 Table 1 Primer sequence and gene transcript

Gene		Sequence (5'-3')	Product length
TNF-α	F	GAGAGATGGGGGGAGATAAGGAGA	135 bp
	R	TTAGCCCTGAGGTGTCTGGTT	
IL-6	F	TGAACTCCTTCTCCACAAGCG	187 bp
	R	CCGTCGAGGATGTACCGAAT	
GAPDH	F	AGAAGGCTGGGGGCTCATTTG	258 bp
	R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	

1.2.2 病毒增殖及组织半数感染量(TCID<sub>50</sub>)测定 病毒增殖:在无菌操作台中,用注射器取病毒液0.2 mL,接种至9日龄鸡胚尿囊腔中,于37 ℃恒温箱中培养48 h,48 h后将鸡胚置于4 ℃过夜,次日抽取鸡胚尿囊液,尿囊液经0.2 µm孔径滤器过滤后备用。TICD<sub>50</sub>测定:待96孔板中MDCK细胞生长至底面积80%时,去原培养基,细胞用PBS洗涤3次。将病毒增殖液用无血清DMEM培养基(含1µg/mL TPCK-胰酶)按10倍梯度倍比稀释(10<sup>-1</sup>~10<sup>-9</sup>),将稀释后的病毒液加入含MDCK细胞的96孔板中,每个稀释梯度重复6孔,同时设置阴性对照;然后每孔补加150 µLDMEM培养基(含1%胎牛血清),在37 ℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下常规培养72 h。然后按常规用Reed-Muench公式计算病毒的TCID<sub>50</sub>。

1.2.3 DHA对BEAS-2B细胞活性影响 待96孔板中 BEAS-2B细胞生长至底面积90%时,去原培养基,分别加 入用不含血清DMEM培养基稀释的DHA溶液(12.5、25、 50、100 μmol/L),同时设置空白组(无细胞)和正常对照 组(不含DHA),每个组重复5孔。常规培养24 h后,加入 细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK8)的试剂作用 1 h,酶标仪450 nm处,以空白组孔调零,读取吸光度(A) 值。计算DHA对细胞活性的影响:细胞存活率=实验组 A值/正常对照组A值。

1.2.4 实验分组和DHA、ERK激动剂干预BEAS-2B细胞 ①待6孔板中的细胞生长至底面积90%时,将培养细胞分 为5组:正常对照组、IAV组和IAV+DHA低、中、高浓度 (12.5、25、50 μmol/L)干预组。除正常对照组细胞外,各 组细胞加入100×TCID<sub>50</sub>的IAV病毒吸附1 h,然后PBS洗涤 3次,去除未吸附的病毒,按分组分别加入对应浓度的 DHA溶液作用24 h。②待6孔板中的细胞生长至底面积 90%时,将培养细胞分为6组:正常对照、IAV、DHA、 DHA+IAV、ERK agonist、DHA+IAV+ERK agonist组。根 据实验分组需感染IAV的组别,加入100×TCID<sub>50</sub>的IAV病 毒吸附1 h,然后PBS洗涤3次,去除未吸附的病毒,按分组 分别加入对应浓度的DHA(50 μmol/L)或ERK agonist (20 ng/mL)作用24 h。

**1.2.5** 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测*TNF-α*和*IL-6* mRNA表达 按RNAsimple提取试剂盒说明书方法提取细胞总mRNA,并按PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书方法将提取的mRNA逆转录为cDNA,取1  $\mu$ L cDNA用于RT-qPCR检测。扩增条件: 95.0 ℃预变性10 min, 95.0 ℃变性10 s、60.0 ℃退火延伸 30 s、扩增40个循环。扩增结束后*TNF-α*和*IL-6* mRNA的相对表达水平用2<sup>-AACt</sup>方法进行计算。以对照组 *TNF-α*和

*IL*-6 mRNA的2<sup>-ΔΔCt</sup>值为1,计算其他组 *TNF*-α 和 *IL*-6 mRNA的相对表达水平。

1.2.6 ELISA检测TNF-α和IL-6蛋白水平 细胞培养上清 经12 000×g,离心10 min,收集上清,按照TNF-α和IL-6 ELISA试剂盒说明书进行加样检测,同时设置标准曲线及 空白孔,检测结果在酶标仪450 nm处,经空白孔调零,读 取A值。绘制TNF-α和IL-6标准曲线,根据标准曲线计算 样本中TNF-α和IL-6蛋白水平。

1.2.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测p-ERK蛋白的 表达 采用放射性免疫沉淀测定裂解液(RIPA)提取细胞 总蛋白并制备成电泳样品;样品经SDS-PAGE凝胶电泳 后,将凝胶上的目的蛋白分子分别转至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF)模上;PVDF膜TBST洗涤及封闭液封闭后,分别 加入兔抗ERK(1:1000)、p-ERK(1:1000)和 GAPDH(1:1000)抗体,4℃孵育过夜;TBST漂洗后加入 HRP-羊抗兔IgG(1:5000),室温孵育40 min;TBST漂洗 后加入ECL发光液于凝胶成像系统中采集图像,分析目 的蛋白灰度值;细胞中p-ERK蛋白相对表达水平=p-ERK 条带灰度值/ERK条带灰度值。

#### 1.3 统计学方法

实验独立重复3次,结果用*x*±*s*表示。进行单因素方 差分析和LSD-*t*检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 DHA对BEAS-2B细胞活性影响

CCK8法检测结果(图1)显示,DHA浓度在12.5、25、 50 μmol/L时,细胞存活率与正常对照组比较差异无统计 学意义(P>0.05),当DHA浓度达100 μmol/L时,细胞存活 率低于正常对照组(P<0.05)。取对BEAS-2B细胞活性无





影响的DHA浓度12.5、25、50 µmol/L进行后续实验。

2.2 DHA对甲型流感病毒H1N1诱导的促炎症因子*TNFa*和*IL*-6 mRNA和蛋白表达的影响

RT-qPCR(图2A)和ELISA检测(图2B)结果显示,与 正常对照组比较,IAV组细胞*TNF-α、IL-6* mRNA和蛋白 表达水平增高 (P<0.05), 与IAV组比较, IAV+DHA低、 中、高浓度组细胞TNF-α、IL-6 mRNA和蛋白表达水平下 降 (P<0.05), 且随着DHA浓度增加, 细胞TNF-α、IL-6 mRNA和蛋白表达水平呈下降趋势, 说明DHA可抑制甲 型流感病毒H1N1诱导促炎症因子TNF-α和IL-6表达。



图 2 各组细胞中*TNF-a、IL-6* mRNA(A)和TNF-a、IL-6蛋白(B)的表达(*n*=3) Fig 2 The expression levels of *TNF-a*, *IL-6* mRNA (A) and TNF-a, IL-6 protein (B) in each group cells(*n*=3)

DHA (12.5 µmol/L)

DHA (25 µmol/L) DHA (50 µmol/L)

IAV

# 2.3 DHA对甲型流感病毒H1N1诱导的ERK信号通路蛋白p-ERK表达的影响

Western blot检测结果(图3)显示,与正常对照组比较,IAV组p-ERK蛋白表达水平增高(P<0.05),与IAV组比

p-ERK

Total-ERK

GAPDH

较,IAV+DHA低、中、高浓度组细胞p-ERK蛋白表达水 平下降 (P<0.05),且随着DHA浓度增加,细胞p-ERK蛋白 表达水平呈下降趋势。说明DHA可抑制甲型流感病毒 H1N1诱导ERK信号通路活化。



图 3 各组细胞中p-ERK的表达水平(n=3)



\*P<0.05, vs. control group; #P<0.05, vs. IAV group

# 2.4 ERK激活剂对DHA抑制甲型流感病毒H1N1诱导的 p-ERK蛋白表达的影响

Western blot检测结果(图4)显示,与正常对照组比较,DHA组的p-ERK蛋白表达水平差异无统计学意义(P>0.05),DHA+IAV+ERK agonist、ERK agonist、IAV组p-ERK蛋白表达水平增高(P<0.05);与IAV组比较,DHA+IAV和DHA+IAV+ERK agonist组p-ERK蛋白表达

水平降低(*P*<0.05);与DHA+IAV+ERK agonist组比较, DHA+IAV组p-ERK蛋白表达水平降低(*P*<0.05)。说明 ERK激活剂减弱了DHA抑制IAV诱导p-ERK蛋白的表达。 2.5 ERK激活剂对DHA抑制甲型流感病毒H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>诱导的 TNF-α和IL-6表达的影响

RT-qPCR(图5A)和ELISA检测(图5B)结果显示,与 正常对照组比较,DHA组*TNF-α、IL-*6mRNA和蛋白表达

<sup>\*</sup>P<0.05, vs. control group; #P<0.05, vs. IAV group



图 4 各组细胞中p-ERK表达水平(n=3)

#### Fig 4 The expression levels of p-ERK in each group cells ( n=3 )

 $\Delta P$ <0.05, vs. control group; \*P<0.05, vs. IAV group; #P<0.05, vs. DHA+IAV+ ERK agonist group





 $\Delta P{<}0.05,$  vs. control group; \*P<0.05, vs. IAV group; #P<0.05, vs. DHA+IAV+ ERK agonist group

水平差异无统计学意义(*P*>0.05), DHA+IAV+ERK agonist、 ERK agonist、IAV组*TNF-α、IL-6* mRNA和蛋白表达水平 增高(*P*<0.05); 与IAV组比较, DHA+IAV和DHA+IAV+ ERK agonist组*TNF-α、IL-6* mRNA和蛋白表达水平降低 (*P*<0.05); 与DHA+IAV+ERK agonist组比较, DHA+ IAV组*TNF-α、IL-6* mRNA和蛋白表达水平降低(*P*<0.05)。 说明ERK激活剂减弱了DHA抑制IAV诱导促炎症因子 TNF-α和IL-6的表达。

### 3 讨论

细胞因子风暴是指病原体感染、药物或疾病等引起的免疫系统过度激活,一旦发生将迅速引发器官衰竭,威胁患者生命,同时也是高致病性流感病毒<sup>[16-17]</sup>及冠状病毒<sup>[18-19]</sup>[严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)、中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)]等呼吸道病毒致死的主要原因,其危害性比病

毒自身复制的危害更为严重。其中1918年和2009年流行 的流感病毒均因诱发细胞因子风暴造成大量患者死 亡<sup>[16-17]</sup>。呼吸道上皮细胞是流感病毒首先侵入的细胞,当 病毒进入机体后首先诱导呼吸道上皮细胞促炎症因子分 泌,促炎症因子可使炎症细胞活化、迁移,进一步加重感 染部位炎症反应,进而引发细胞因子风暴,导致组织病理 损伤或器官衰竭等并发症,加重患者病情或使患者死亡<sup>[4]</sup>。 因此在流感病毒感染后抑制促炎症因子分泌,可在一定 程度上控制细胞因子风暴的发生,进而降低患者死亡 人数。

流感病毒感染呼吸道上皮细胞后首先诱导促炎症因 子TNF-a分泌, 随之 IL-6的分泌也显著增加<sup>[12]</sup>, TNF-a分 泌后可诱导白细胞迁移, 肺内皮细胞活化和粒细胞脱颗 粒; 此外IL-6促进巨噬细胞和中心粒细胞的增殖, 导致更 多炎症因子分泌, 加重感染部位炎症反应<sup>[13-14]</sup>。在细胞因 子风暴中TNF-a和IL-6被认为是关键节点, 针对TNF-a和 IL-6的治疗被认为是治疗重症流感患者的可行方法<sup>[20-21]</sup>。 DAI等同研究发现氧化苦参碱可抑制小鼠感染IAV后肺组 织损伤和降低小鼠的死亡率,进一步研究发现氧化苦参 碱是通过抑制肺组织中促炎症因子TNF-α和IL-6等炎症 因子表达,进而保护小鼠肺组织免受损伤。同样姜黄素 减轻流感病毒导致小鼠的肺组织损伤,也与其抑制促炎 症因子表达相关[22]。本研究结果发现, IAV感染BEAS-2B细胞后诱导TNF-α和IL-6表达, 而DHA以剂量依赖性 下调IAV诱导TNF-α和IL-6表达,证实DHA具有抑制流感 病毒诱导呼吸道上皮细胞促炎症因子TNF-α和IL-6分泌 的作用。流感病毒感染后可通过不同机制活化ERK信号 通路,进而促进病毒的复制和增加炎症因子表达[15,23-24]。 SCHRÄDER等<sup>[25]</sup>研究显示,采用ERK信号通路抑制剂不 仅抑制了流感病毒复制,还抑制了流感病毒诱导的促炎 症因子和趋化因子表达。本实验结果显示, IAV感染 BEAS-2B细胞后ERK信号通路蛋白p-ERK表达增加,说明 ERK信号通路活化,而DHA可剂量依赖性抑制IAV诱导 的p-ERK表达,抑制ERK信号通路活化;而给予ERK激动 剂后减弱了DHA抑制IAV诱导BEAS-2B细胞ERK信号通 路蛋白p-ERK表达和促炎症因子TNF-α和IL-6的分泌。

综上所述,在本研究中我们将已在临床上使用安全 的药物DHA用于抗IAV感染及作用机制研究,证实DHA 可以抑制IAV诱导BEAS-2B细胞ERK信号通路蛋白p-ERK表达和促炎症因子TNF-a、IL-6的分泌。同时我们进 一步采用ERK激动剂进行反向论证,发现DHA作用机制 是通过抑制IAV诱导ERK信号通路的活化,从而抑制促炎 症因子TNF-α和IL-6表达,证实了DHA抑制IAV感染炎症 反应的部分作用机制和调控靶点。但本研究仅在体外探 索了DHA在流感病毒感染后的抗炎作用,无法观察到 DHA对流感病毒导致的肺损伤保护效果;同时流感病毒 感染后炎症因子的分泌不仅受ERK信号通路的调控,这 是本研究存在的不足。因此在今后研究中我们将进一步 观察DHA体内抗流感的效果,并采用转录组学更全面的 研究DHA在流感病毒感染后抗炎的分子机制。虽然本研 究存在上述不足,但首次阐明了DHA可通过ERK信号通 路抑制IAV诱导BEAS-2B细胞TNF-α和IL-6的表达,为 DHA成为抗流感病毒感染药物和进一步的研究提供了理 论研究基础。

#### 参考文献

- HORIMOTO T, KAWAOKA Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(8): 591–600.
- [2] LEE V J, HO Z J M, GOH E H, *et al.* Advances in measuring influenza burden of disease. Influenza Other Respi Viruses, 2018, 12(1): 3–9.

- [3] WANG C, LIU P, LUO J, et al. Geldanamycinreduces acute respiratory distress syndrome and promotes the survival of mice infected with the highly virulent H5N1influenza virus. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 267–277.
- [4] GU Y, HSU A C, PANG Z, et al. Role of the innate cytokine storm induced by the Influenza A virus. Viral Immunol, 2019, 32(6): 244–251.
- [5] DAI J P, WANG Q W, SU Y, et al. Oxymatrineinhibits influenza A virus replication and inflammation via TLR4, p38 MAPK and NF-κB pathways. Int J Mol Sc, 2018, 19(4): 965–981.
- [6] KAKURU A, JAGANNATHAN P, MUHINDO M K, et al. Dihydroartemisinin-piperaquine for the prevention of malaria in pregnancy. N Engl J Med, 2016, 374(10): 928-939.
- [7] SHI X, WANG L, REN L, et al. Dihydroartemisinin, an antimalarial drug, induces absent in melanoma 2 inflammasome activation and autophagy in human hepatocellular carcinoma HepG2215 cells. Phytother Res, 2019, 33(5): 1413–1425.
- [8] HAN Y, PHAM H T, XU H, et al. Antimalarial drugs and their metabolites are potent Zika virus inhibitors. J Med Virol, 2019, 91(7): 1182–1190.
- [9] YIN J, XIA W, ZHANG Y, et al. Role of dihydroartemisinin in regulating prostaglandin E2 synthesis cascade and inflammation in endothelial cells. Heart Vessels, 2018, 33(11): 1411–1422.
- [10] ZHANG Z, GU O M, ZHAO S, et al. ROS-JNK1/2-dependent activation of autophagy is required for the induction of anti-inflammatory effect of dihydroartemisinin in liver fibrosis. Free RadicBiol Med, 2016, 101: 272–283.
- [11] 覃万翔, 罗敏, 石英, 等. 双氢青蒿素抑制LPS诱导的小胶质细胞炎症 反应. 第三军医大学学报, 2017, 39(22): 45-50.
- [12] PHUNG T T, SUGAMATA R, UNO K, et al. Key role of regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8 (A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. Microbiol Immunol, 2011, 55(12): 874–884.
- [13] PAUL A T, GOHIL V M, BHUTANI K K. Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products. Drug Disco Today, 2006, 11(15-16): 725-732.
- [14] ZHANG F, YAO S, ZHANG M, et al. Roles of circulating soluble interleukin (IL)-6 receptor and IL-6 receptor expression on CD4<sup>+</sup> T cells in patients with chronic hepatitis B. Int J Infect Dis, 2011, 15(4): 267–271.
- [15] COURTIN N, FOTSO A F, FAUTRAD P, et al. Antiviral activity of formyl peptide receptor 2 antagonists against influenza viruses. Antiviral Res, 2017, 143(7): 252–261.
- [16] CANTAN B, LUYT C E, MARTIN L. Influenza infections and emergent viral infections in Intensive Care Unit. Semin Respir Crit Care Med, 2019, 40(4): 488–497.
- [17] SHORT K R, KEDZIERSKA K, VAN DE SANDT C E. Back to the future: lessons learned from the 1918 Influenza Pandemic. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 343 [2020-02-17]. https://doi.org/10.3389/ fcimb.2018.00343.
- [18] CHANNAPPANAVAR R, PERLMAN S. Pathogenic human coronavirus

infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. Semin Immunopathol, 2017, 39(5): 529-539.

- [19] HUANG C, WANG Y, LI X C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet, 2020, 395(10223): 497–506.
- [20] LIU Q, ZHOU Y H, YANG Z Q. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. Cell Mol Immunol, 2016, 13(1): 3-10.
- [21] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. Immunotherapy, 2016, 8(8): 959–970.
- [22] XU Y, LIU L. Curcuminalleviates macrophage activation and lung inflammation induced by influenza virus infection through inhibiting the NF-κB signaling pathway. Influenza Other Respir Viruses, 2017, 11(5):

457-463.

- [23] WANG C, LIU H, LUO J, et al. HA Triggers the switch from MEK1 SUMOylation to phosphorylation of the ERK pathway in influenza A virus-infected cells and facilitates its infection. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 27[2020-02-03]. https://doi.org/10.3389/ fcimb.2017.00027.
- [24] HUANG S Y, HUANG C H, CHEN C J, et al. Novel role for miR-1290 in host species specificity of influenza A virus. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 10–23.
- [25] SCHRÄDER T, DUDEK S E, SCHREIBER A, et al. The clinically approved MEK inhibitor trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. Antiviral Res, 2018, 157: 80–92.

(2019-12-23收稿, 2020-01-03修回)

编辑沈进