

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1607-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250616

盐酸小檗碱调控PI3K/AKT/mTOR信号通路对感染1型单纯疱疹病毒HeLa细胞自噬的影响

朱海东, 吕长坤, 师 玮

(商丘医学高等专科学校基础医学部, 河南 商丘 476100)

[摘要] **目的:** 探讨盐酸小檗碱(BBR)对1型单纯疱疹病毒(HSV-1)感染HeLa细胞自噬的影响, 并阐明其相关机制。**方法:** 将处于对数生长期的HeLa细胞分别加入0、10、20、40、80、120和160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR中培养24 h。另将HeLa细胞分为HSV-1组(感染HSV-1)、L-BBR组(感染HSV-1后, 用20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR处理24 h)、M-BBR组(感染HSV-1后, 用40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR处理24 h)、H-BBR组(感染HSV-1后, 用80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR处理24 h)和740 Y-P组(感染HSV-1后, 用80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 740 Y-P处理24 h), 进行病毒感染及相应的药物处理。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度BBR处理HeLa细胞活性, 空斑减数实验检测各组HeLa细胞中HSV-1增殖能力, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组HeLa细胞中病毒复制相关基因mRNA表达水平, 免疫荧光法检测各组HeLa细胞中微管相关蛋白1轻链3(LC3)自噬小体形成情况, 流式细胞术检测各组HeLa细胞凋亡率, Western blotting法检测各组HeLa细胞中自噬及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路相关蛋白表达水平。**结果:** MTT法检测, 与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR组比较, 120和160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR组HeLa细胞活性明显降低($P<0.05$), 对细胞具有一定毒性; 选择20、40和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR进行后续实验。空斑减数实验检测, 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞中空斑形成单位(PFUs)明显减少($P<0.05$), 并呈剂量依赖性; 与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞中PFUs明显增加($P<0.05$)。RT-qPCR法检测, 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组感染细胞蛋白0(ICP0)、感染细胞蛋白22(ICP22)、感染细胞蛋白8(ICP8)、胸苷激酶(TK)、糖蛋白B(gB)和糖蛋白D(gD) mRNA表达水平均明显降低($P<0.05$), 并呈剂量依赖性; 与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞中ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB和gD mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$)。免疫荧光法检测, 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞中LC3自噬小体形成数量增加; 与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞中LC3自噬小体形成数量减少。流式细胞术检测, 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞凋亡率明显升高($P<0.05$), 并呈剂量依赖性; 与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。Western blotting法检测, 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞中Beclin-1及B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)/腺病毒E1B 19kDa蛋白相互作用蛋白(BNIP)蛋白表达水平和LC3-II/LC3-I比值均明显升高($P<0.05$), 并呈剂量依赖性; 与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞中Beclin-1和BNIP蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值均明显降低($P<0.05$); 与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1(Caspase-1)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达水平均明显升高

[收稿日期] 2024-12-26 [录用日期] 2025-01-14

[基金项目] 河南省科技厅科技发展计划项目(242102310081)

[作者简介] 朱海东(1971—), 男, 山东省菏泽市人, 副教授, 医学硕士, 主要从事抗感染免疫方面的研究。

[通信作者] 朱海东, 副教授(E-mail: 772073669@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性; 与 H-BBR 组比较, 740 Y-P 组 HeLa 细胞中 Caspase-1、Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 HSV-1 组比较, L-BBR 组、M-BBR 组和 H-BBR 组 HeLa 细胞中磷酸化 PI3K (p-PI3K) /PI3K、磷酸化 AKT (p-AKT) /AKT 和磷酸化 mTOR (p-mTOR) /mTOR 比值均明显降低 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性; 与 H-BBR 组比较, 740 Y-P 组 HeLa 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值均明显升高 ($P < 0.05$)。结论: BBR 能够促进 HSV-1 病毒感染 HeLa 细胞的自噬过程, 诱导自噬依赖性凋亡, 并显著抑制病毒的复制, 其作用机制与调控 PI3K/AKT/mTOR 通路有关。

[关键词] 盐酸小檗碱; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路; 1 型单纯疱疹病毒; 自噬

[中图分类号] R373.9 [文献标志码] A

Effect of berberine hydrochloride on autophagy of HeLa cells infected with herpes simplex virus type 1 by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

ZHU Haidong, LYU Changkun, SHI Wei

(Department of Basic Medicine, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476100, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of berberine hydrochloride (BBR) on autophagy in the HeLa cells infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), and to clarify its related mechanism. **Methods:** The HeLa cells at logarithmic growth phase were added with 0, 10, 20, 40, 80, 120, and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR, respectively, and cultured for 24 h. In addition, the HeLa cells were divided into HSV-1 group (the cells were infected with HSV-1), L-BBR group (were infected with HSV-1 and then treated with 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR for 24 h), M-BBR group (were infected with HSV-1 and then treated with 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR for 24 h), H-BBR group (were infected with HSV-1 and then treated with 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR for 24 h), and 740 Y-P group (were infected with HSV-1 and then treated with 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 740 Y-P for 24 h) for viral infection and corresponding drug treatment. MTT method was used to detect the activities of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) the HeLa cells after treated with different concentrations of BBR; plaque reduction assay was used to detect the proliferation ability of HSV-1 in the HeLa cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of virus replication-related genes in the HeLa cells in various groups; immunofluorescence method was used to detect the formation of autophagosomes in the HeLa cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of the HeLa cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of autophagy and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway pathway-related proteins in the HeLa cells in various groups. **Results:** The MTT method results showed that compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR group, the activities of the HeLa cells in 120 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR groups were significantly decreased ($P < 0.05$), which had certain toxicity to the cells; 20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR were selected for subsequent experiments. The plaque reduction assay results showed that compared with HSV-1 group, the plaque forming units (PFUs) in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the PFUs in the HeLa cells in 740 Y-P group were significantly increased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with HSV-1 group, the mRNA expression

levels of infected cell protein 0 (*ICP0*), infected cell protein 22 (*ICP22*), infected cell protein 8 (*ICP8*), thymidine kinase (*TK*), glycoprotein B (*gB*), and glycoprotein D (*gD*) in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the expression levels of *ICP0*, *ICP22*, *ICP8*, *TK*, *gB*, and *gD* mRNA in the HeLa cells in 740 Y-P group were significantly increased ($P < 0.05$). The immunofluorescence method results showed that compared with HSV-1 group, the number of LC3 autophagosomes formed in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group was increased; compared with H-BBR group, the number of LC3 autophagosomes formed in the HeLa cells in 740 Y-P group was decreased. The flow cytometry results showed that compared with HSV-1 group, the apoptotic rates of the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly increased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the apoptotic rate of the HeLa cells in 740 Y-P group was significantly decreased ($P < 0.05$). The Western blotting method results showed that compared with HSV-1 group, the expression levels of Beclin-1 and B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*)/adenovirus E1B 19kDa protein interacting protein protein (BNIP) 2 proteins and the ratios of LC3- II /LC3- I in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly increased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the expression levels of Beclin-1 and BNIP proteins and the LC3- II /LC3- I ratio in the HeLa cells in 740 Y-P group were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with HSV-1 group, the expression levels of cysteine-containing aspartate protein hydrolase 1 (Caspase-1), cysteine-containing aspartate protein hydrolase 3 (Caspase-3), and Bcl-2 associated X protein (Bax) proteins in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the expression levels of Caspase-1, Caspase-3, and Bax proteins in the HeLa cells in 740 Y-P group were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P < 0.05$); compared with HSV-1 group, the ratios of phosphorylated PI3K (p-PI3K)/PI3K, phosphorylated AKT (p-AKT)/AKT, and phosphorylated mTOR (p-mTOR)/mTOR in the HeLa cells in L-BBR group, M-BBR group, and H-BBR group were significantly decreased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner; compared with H-BBR group, the ratios of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in the HeLa cells in 740 Y-P group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** BBR can promote the autophagy process in the HeLa cells infected with HSV-1 by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway, induce autophagy-dependent apoptosis, and significantly inhibit the virus replication.

KEYWORDS Berberine hydrochloride; Phosphatidylinositol 3-kinase; Protein kinase B; Mammalian target of rapamycin pathway; Herpes simplex virus type 1; Autophagy

1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 是一种专门感染人类的嗜神经双链 DNA 病毒, 属于 α 疱疹病毒家族, 在上皮细胞中复制, 并能在神经元中潜伏终身^[1]。在全球范围内, HSV-1 具有高感染率, 50%~90% 的人口 HSV-1 血清检测呈阳性^[2-3]。HSV-1 主要通过黏膜或皮肤侵入宿主, 引发除生殖器以外的皮肤、黏膜 (如口腔黏膜) 及器官 (如脑部) 的感染。一旦进入体内, 病毒会潜伏于感觉神经末梢和神经节, 形成难以治愈的终身潜伏状态^[4]。HSV-1 感染的症状通常表现为唇疱疹和皮肤水泡, 也可能导致严重的并

发症, 如病毒性角膜炎、病毒性脑炎和癌症, 甚至死亡^[5]。鉴于其潜在的严重后果, 研发新型高效的抗病毒药物显得尤为重要。小檗碱 (berberine, BBR) 是多种植物次生代谢的产物, 广泛存在于中草药根、根茎、茎皮及小檗属植物中, 具有抗病毒和抗癌等多种生物活性^[6]。在临床前研究中, BBR 可通过靶向疱疹病毒生命周期的多个阶段引起抗疱疹病毒作用的机制和途径^[7], 但其抗 HSV-1 病毒的具体机制尚未完全明确。因此, 本研究利用 BBR 对感染 HSV-1 病毒的 HeLa 细胞进行干预, 以初步探讨其抗病毒潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、主要试剂和仪器 人宫颈癌细胞株 HeLa 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。HSV-1 F 株购自武汉大学医学院病毒学研究所。BBR (纯度 >97%) 和四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 胰蛋白酶、牛血清白蛋白、RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 RIPA 裂解液均购于美国 Promega 公司, 逆转录试剂盒购自上海碧云天生物有限公司, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 激活剂 740 Y-P 购自于上海麦克林生化科技股份有限公司, TRIzol、SYBR green PCR Mix、兔抗 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) /腺病毒 E1B 19kDa 蛋白相互作用蛋白 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein, BNIP) 2 抗体、兔抗蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体、兔抗磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 抗体、兔抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体和兔抗磷酸化 mTOR (phosphorylated mTOR, p-mTOR) 抗体购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 兔抗微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)-II 抗体、兔抗 LC3-I 抗体、兔抗苜蓿素 1 (Beclin-1) 抗体、兔抗含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1) 抗体、兔抗含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 抗体、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体、兔抗 Bcl-2 抗体、兔抗 PI3K 抗体、兔抗磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 抗体和甘油醛 3 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购自美国 Abcam 公司。TGL-16MS 型高台式离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 光学显微镜购自日本 Nikon 公司, 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养和分组处理 在暗室条件下, 将 1.6 mg BBR 与 20 μL DMSO 溶剂混合均匀, 随后加入 980 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 定容至 1 000 mL, 再次充分混匀以制备母液。此过程中, 确保二甲基亚砷 (dimethyl

sulfoxide, DMSO) 的浓度维持在 0.1% 以下。将配置好的药物进行分装, 并储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的避光环境中。将 HeLa 细胞接种于含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 环境中进行常规培养。随后将处于对数生长期的细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 将培养好的细胞分别加入不同浓度 (0、10、20、40、80、120 和 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) BBR 培养 24 h, 每个浓度设 3 个复孔, 用于检测 BBR 对 HeLa 细胞活性的影响。另将细胞随机分为 HSV-1 组 (感染 HSV-1)、L-BBR 组 (感染 HSV-1 后, 用 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 处理 24 h)、M-BBR 组 (感染 HSV-1 后, 用 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 处理 24 h)、H-BBR 组 (感染 HSV-1 后, 用 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 处理 24 h) 和 740 Y-P 组 (感染 HSV-1 后, 用 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 740 Y-P 处理 24 h), HeLa 细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 形成单层后, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下感染 HSV-1 病毒, 多重感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 1.5。感染 2 h 后, 移除病毒接种物。加入相应的药物培养液于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h, 每组设 3 个复孔, 用于检测 BBR 对 HSV-1 病毒感染 HeLa 细胞的影响。药物剂量和 MOI 参考文献 [8-9]。

1.3 MTT 法检测不同浓度 BBR 处理 HeLa 细胞活性 将处于对数生长期的 HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h。随后去除原有培养基, 分别加入分别含 0、20、40、80、120 和 $160\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 的培养液, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下进行孵育 72 h, 弃上清, 每孔加 10 μL MTT ($0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育 2~4 h。吸弃上清, 加入 100 μL DMSO 溶解结晶, 于波长 490 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值代表细胞活性。

1.4 空斑减数实验检测各组 HeLa 细胞中 HSV-1 增殖能力 根据文献 [10] 中的方法, 将 HeLa 细胞于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下感染 HSV-1 病毒 2 h 后, 移除病毒接种物。向每孔中加入 1 mL 甲基纤维素覆盖层, 该覆盖层由 2% 甲基纤维素与 2 倍最终测试浓度的相应药物组成。于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下, 将细胞孵育 72 h。使用 4% 多聚甲醛固定细胞。固定后, 用 1% 结晶紫对细胞进行染色, 在显微镜下观察染色后的细胞层, 识别由单个病毒感染细胞形成的空斑。结晶紫将细胞核染成紫色, 而无细胞的部分则为透明。进行空斑计数。根据空斑数和病毒

稀释度计算病毒滴度, 结果以每毫升病毒样品的空斑形成单位 (plaque formilg uints, PFUs) 表示。PFUs=(X1+X2+...+Xn)×d/(n×v)。X1、X2、Xn 代表同一稀释梯度下不同培养孔中所观察到的空斑数目, n 代表参与计数的培养孔总数, v 表示病毒量 (mL), d 表示病毒的稀释倍数。PFUs 数值越高表示病毒增殖能力越强。

1.5 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测各组 HeLa 细胞中感染细胞蛋白 0 (infected cell protein 0, ICP0)、感染细胞蛋白 22 (infected cell protein 22, ICP22)、感染细胞蛋白 8 (infected cell protein 8, ICP8)、胸苷激酶 (thymidine kinase, TK)、糖蛋白 B (glycoprotein B, gB) 和糖蛋白 D (glycoprotein D, gD) mRNA 表达水平 取各组细胞, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 依据逆转录试剂盒说明书将其逆转录为 cDNA。采用 RT-qPCR 仪进行 RT-qPCR 实验。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C

变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 及 gD mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

1.6 免疫荧光法检测各组 HeLa 细胞中 LC3 自噬小体形成情况 将 HeLa 细胞接种至 6 孔细胞培养板中, 采用含有人绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)-单体红色荧光蛋白 (monomeric red fluorescent protein, mRFP)-LC3 腺病毒转染 24 h, PBS 缓冲溶液洗涤后, 荧光显微镜对 LC3 自噬小体进行成像。GFP-mRFP-LC3 标记的自噬小体表现为红色荧光。

1.7 流式细胞术检测各组 HeLa 细胞凋亡率 PBS 缓冲液洗涤各组 HeLa 细胞样本, 4 °C 离心收集细胞样本, 重悬细胞于结合缓冲液, 加入膜联蛋白 V-FITC (5 μL) 和 PI (5 μL), 室温避光孵育 15 min, 流式细胞术检测荧光信号。统计右下象限细胞百分率, 即为细胞凋亡率。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ICP0	TGTGCACGGATGAGATCG	TCGTTACGATCGGGATG
ICP22	ATGGACAAGGTAACCATCGG	TTGAAAAACGGAAGGGGGTA
ICP8	TGAAGTTCCTCCCCCTCCAC	TGAAGTTCCTCCCCCTCCACGGAGACCATCATCACCAACC
TK	CGATGACTTACTGGCGGGTGT	GCGTCGGTCACGGCATAA
gB	GCCTTCTTCGCTTTTCGC	CGCTCGTGCCCTTCTTCTT
gD	CCCGATCACGGTTTACTACG	AGCGATGGTCAGGTTGTAGG
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCAA	CCATCACGCCACAGTTTCC

1.8 Western blotting 法检测各组 HeLa 细胞中自噬、凋亡和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达水平 于 RIPA 缓冲液 (含蛋白酶抑制剂) 中收集各组 HeLa 细胞。随后, 将裂解液于 4 °C 条件下以 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 以去除不溶性的细胞组分。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。通过 12% SDS-PAGE 电泳, 从每个样品中分离出 20 μg 蛋白质, 并将其转移至 PVDF 膜上。将膜置于含有 0.05% Tween-20 的 TBST 缓冲盐溶液及 5% 脱脂牛奶中, 于室温下孵育 2 h 封闭。膜与一抗 BNIP2 (1:1 000)、AKT (1:1 000)、p-AKT (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、p-mTOR (1:1 000)、LC3-II (1:1 000)、LC3-I (1:1 000)、Beclin-1 (1:1 000)、Caspase-1 (1:1 000)、Caspase-3 (1:1 000)、Bax

(1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000) 于 4 °C 条件下共同孵育过夜。加入相应 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000), 于室温孵育 2 h。采用增强化学发光法对膜进行可视化处理, 化学发光成像系统 Amersham Imager 600 采集图像。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

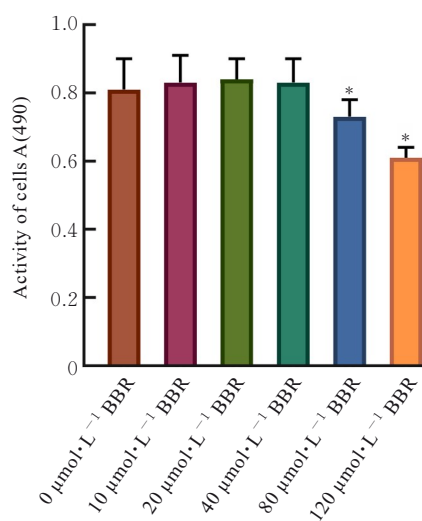
1.9 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。Hela 细胞活性、各组 HeLa 细胞中 PFUs、细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 和 gD mRNA 表达水平、HeLa 细胞凋亡率、自噬和凋亡及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达水平均符合正

态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HeLa 细胞活性 与 $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR组比较,10、20、40和 $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR组 HeLa细胞活性差异无统计学意义($P>0.05$),120和 $160\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR组 HeLa细胞活性明显降低($P<0.05$),表明其对细胞具有一定毒性。见图1。因此选择20、40和 $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR进行后续实验。

2.2 各组 HeLa 细胞中 PFUs 与 HSV-1 组比较,

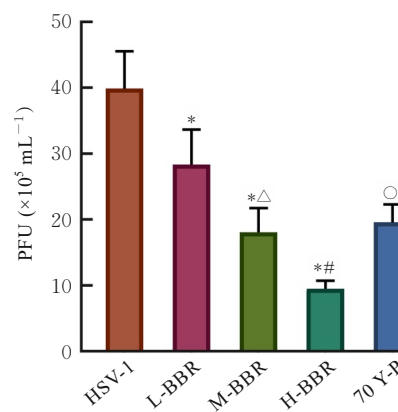


* $P<0.05$ compared with $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR group.

图1 各组 HeLa 细胞活性

Fig. 1 Activities of HeLa cells in various groups

L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组 HeLa细胞中PFUs明显降低($P<0.05$),并呈剂量依赖性。与H-BBR组比较,740 Y-P组 HeLa细胞中PFUs明显升高($P<0.05$)。见图2。



* $P<0.05$ compared with HSV-1 group; $\Delta P<0.05$ compared with L-BBR group; # $P<0.05$ compared with M-BBR group; $\circ P<0.05$ compared with H-BBR group.

图2 各组 HeLa 细胞中 PFUs

Fig. 2 PFUs in HeLa cells in various groups

2.3 各组 HeLa 细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 和 gD mRNA 表达水平 与 HSV-1 组比较,L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组 HeLa细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 和 gD mRNA 表达水平均明显降低($P<0.05$),并呈剂量依赖性。与H-BBR组比较,740 Y-P组 HeLa细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 和 gD mRNA 表达水平均明显升高($P<0.05$)。见表2。

表2 各组 HeLa 细胞中 ICP0、ICP22、ICP8、TK、gB 和 gD mRNA 表达水平

Tab. 2 Expression levels of ICP0, ICP22, ICP8, TK, gB and gD mRNA in HeLa cells in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	ICP0	ICP22	ICP8	TK	gB	gD
HSV-1	1.01 \pm 0.02	0.98 \pm 0.10	1.06 \pm 0.13	1.01 \pm 0.09	1.05 \pm 0.12	0.99 \pm 0.09
L-BBR	0.85 \pm 0.09*	0.79 \pm 0.06*	0.80 \pm 0.09*	0.83 \pm 0.08*	0.79 \pm 0.07*	0.71 \pm 0.08*
M-BBR	0.61 \pm 0.08 Δ	0.50 \pm 0.07 Δ	0.58 \pm 0.07 Δ	0.66 \pm 0.05 Δ	0.59 \pm 0.08 Δ	0.52 \pm 0.06 Δ
H-BBR	0.33 \pm 0.05*#	0.23 \pm 0.04*#	0.22 \pm 0.05*#	0.30 \pm 0.06*#	0.20 \pm 0.05*#	0.23 \pm 0.04*#
740 Y-P	0.65 \pm 0.07 \circ	0.56 \pm 0.07 \circ	0.64 \pm 0.08 \circ	0.49 \pm 0.05 \circ	0.58 \pm 0.06 \circ	0.59 \pm 0.08 \circ
F	462.461	330.150	247.229	401.737	289.045	309.713
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

* $P<0.05$ compared with HSV-1 group; $\Delta P<0.05$ compared with L-BBR group; # $P<0.05$ compared with M-BBR group; $\circ P<0.05$ compared with H-BBR group.

2.4 各组 HeLa 细胞中 LC3 自噬小体形成情况 与 HSV-1 组比较,L-BBR组、M-BBR组和

H-BBR组 HeLa细胞中 LC3 自噬小体形成数量增加。与H-BBR组比较,740 Y-P组 HeLa细胞中

LC3 自噬小体形成数量减少。见图 3。

2.5 各组 HeLa 细胞凋亡率 与 HSV-1 组比较, L-BBR 组、M-BBR 组和 H-BBR 组 HeLa 凋亡率明

显升高 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。与 H-BBR 组比较, 740 Y-P 组 HeLa 凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。见图 4 和表 3。

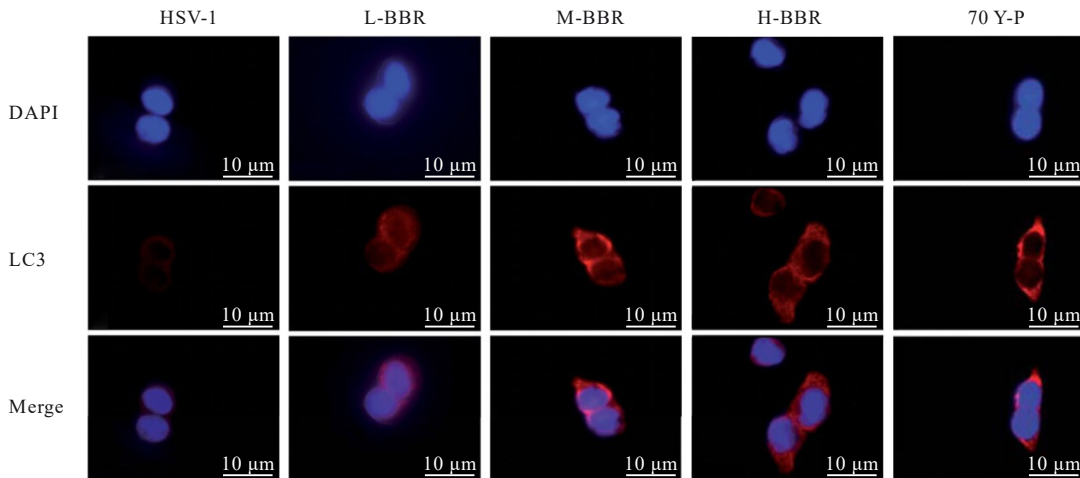
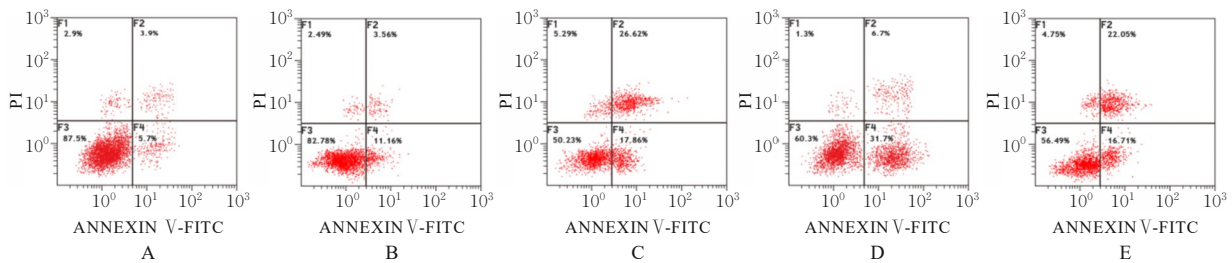


图 3 免疫荧光法检测各组 HeLa 细胞中 LC3 自噬小体形成情况

Fig. 3 Formation of LC3 autophagosomes in HeLa cells in various groups detected by immunofluorescence



A: HSV-1 group; B: L-BBR group; C: M-BBR group; D: H-BBR group; E: 740 Y-P group.

图 4 流式细胞术检测各组 HeLa 细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of HeLa cells in various groups

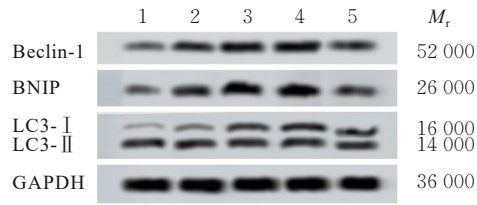
表 3 各组 HeLa 细胞凋亡率
Tab. 3 Apoptotic rates of HeLa cells in various groups
($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Apoptotic rate
HSV-1	5.36 ± 0.25
L-BBR	11.03 ± 1.16*
M-BBR	17.94 ± 2.29 [△]
H-BBR	30.23 ± 4.91 ^{*△#}
740 Y-P	16.62 ± 3.15 [○]
F	31.734
P	< 0.01

* $P < 0.05$ compared with HSV-1 group; [△] $P < 0.05$ compared with L-BBR group; [#] $P < 0.05$ compared with M-BBR group; [○] $P < 0.05$ compared with H-BBR group.

2.6 各组 HeLa 细胞中 Beclin-1 和 BNIP 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 比值 与 HSV-1 组比较, L-BBR 组、M-BBR 组和 H-BBR 组 HeLa 细胞中 Beclin-1 及 BNIP 蛋白表达水平和 LC3- II /LC3- I 比值均明显升高 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。与 H-BBR 组比较, 740 Y-P 组 HeLa 细胞中 Beclin-1 和 BNIP 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 比值均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5 和表 4。

2.7 各组 HeLa 细胞中 Caspase-1、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平 与 HSV-1 组比较, L-BBR 组、M-BBR 组和 H-BBR 组 HeLa 细胞中 Caspase-1、Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性; 与 H-BBR 组比较, 740 Y-P 组



Lane 1: HSV-1 group; Lane 2: L-BBR group; Lane 3: M-BBR group; Lane 4: H-BBR group; Lane 5: H-BBR group; Lane 6: 740 Y-P group.

图5 Western blotting法检测各组HeLa细胞中Beclin-1、BNIP、LC3-II和LC3-I蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of Beclin-1, BNIP, LC3-II, and LC3-I proteins in HeLa cells in various groups detected by Western blotting method

表4 各组HeLa细胞中Beclin-1和BNIP蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值

Tab. 4 Expression levels of Beclin-1 and BNIP proteins and ratios of LC3-II/LC3-I in HeLa cells in various groups

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Beclin-1	BNIP	LC3-II/LC3-I
HSV-1	0.29±0.04	0.35±0.05	0.15±0.04
L-BBR	0.62±0.07*	0.67±0.08*	0.47±0.06*
M-BBR	0.98±0.09* [△]	0.93±0.10* [△]	0.91±0.10* [△]
H-BBR	1.33±0.14* ^{△#}	1.41±0.15* ^{△#}	1.32±0.13* ^{△#}
740 Y-P	0.59±0.07 [○]	0.53±0.07 [○]	0.92±0.09 [○]
<i>F</i>	64.124	60.267	78.190
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

* $P<0.05$ compared with HSV-1 group; [△] $P<0.05$ compared with L-BBR group; [#] $P<0.05$ compared with M-BBR group; [○] $P<0.05$ compared with H-BBR group.

HeLa细胞中Caspase-1、Caspase-3和Bax蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。见图6和表5。

表5 各组HeLa细胞中Caspase-1、Caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达水平

Tab. 5 Expression levels of Caspase-1, Caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins in HeLa cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Caspase-1	Caspase-3	Bcl-2	Bax
HSV-1	0.23±0.04	0.35±0.05	1.41±0.12	0.29±0.04
L-BBR	0.45±0.06*	0.61±0.07*	1.12±0.08*	0.47±0.05*
M-BBR	0.71±0.07* [△]	0.94±0.09* [△]	0.89±0.09* [△]	0.88±0.09* [△]
H-BBR	1.06±0.11* ^{△#}	1.35±0.12* ^{△#}	0.33±0.04* ^{△#}	1.13±0.12* ^{△#}
740 Y-P	0.66±0.07 [○]	0.53±0.08 [○]	0.64±0.07 [○]	0.82±0.07 [○]
<i>F</i>	56.375	66.705	92.733	53.700
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

* $P<0.05$ compared with HSV-1 group; [△] $P<0.05$ compared with L-BBR group; [#] $P<0.05$ compared with M-BBR group; [○] $P<0.05$ compared with H-BBR group.



Lane 1: HSV-1 group; Lane 2: L-BBR group; Lane 3: M-BBR group; Lane 4: H-BBR group; Lane 5: H-BBR group; Lane 6: 740 Y-P group.

图6 Western blotting法检测各组HeLa细胞中Caspase-1、Caspase-3、Bax和Bcl-2蛋白表达电泳图

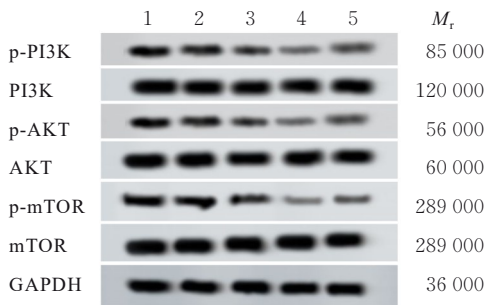
Fig. 6 Electrophoregram of expressions of Caspase-1, Caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins in HeLa cells in various groups detected by Western blotting method

2.8 各组HeLa细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR和mTOR蛋白表达水平

与HSV-1组比较, L-BBR组、M-BBR组和H-BBR组HeLa细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR比值均明显降低($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。与H-BBR组比较, 740 Y-P组HeLa细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR比值均明显升高($P<0.05$)。见图7和表6。

3 讨论

疱疹病毒采用“逃逸与隐匿”策略进行感染, 当免疫系统因生理或环境因素受损时, 这些感染便可能引发严重并发症^[11]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的治疗该疾病的药物主要包括核苷类似物, 如阿昔洛韦、喷昔洛韦和伐昔洛韦, 其通过靶向病毒DNA聚合酶以防止病毒复制^[9], 但其无法根治疾病或预防复发, 在某些情况下还会加剧由病毒感染引



Lane 1: HSV-1 group; Lane 2: L-BBR group; Lane 3: M-BBR group; Lane 4: H-BBR group; Lane 5: H-BBR group; Lane 6: 740 Y-P group.

图 7 Western blotting 法检测各组 HeLa 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR 和 mTOR 蛋白表达电泳图
 Fig. 7 Electrophoregram of expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, p-mTOR, and mTOR proteins in HeLa cells in various groups detected by Western blotting method

表 6 各组 HeLa 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值

Tab. 6 Ratios of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR in HeLa cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
HSV-1	1.54±0.16	1.39±0.13	1.62±0.15
L-BBR	1.10±0.12 [*]	1.12±0.09 [*]	1.20±0.09 [*]
M-BBR	0.87±0.07 [△]	0.93±0.07 [△]	0.95±0.10 [△]
H-BBR	0.49±0.06 ^{*△#}	0.33±0.05 ^{*△#}	0.46±0.06 ^{*△#}
740 Y-P	0.71±0.08 [○]	0.62±0.07 [○]	0.68±0.08 [○]
<i>F</i>	65.806	87.165	92.312
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

^{*} $P < 0.05$ compared with HSV-1 group; [△] $P < 0.05$ compared with L-BBR group; [#] $P < 0.05$ compared with M-BBR group; [○] $P < 0.05$ compared with H-BBR group.

发细胞损伤, 长期使用还可能引发耐药性问题^[12-13]。因此, 开发具有不同于核苷类似物活性机制的新型抗单纯疱疹病毒 (herpes simple virus, HSV) 药物具有重要意义。近年来, 大多数药物发现策略依赖于天然产物, 尤其是植物, 常作为新候选药物相对安全且丰富的来源。本研究结果显示: BBR 处理后, HeLa 细胞中 PFUs 明显降低, 并呈剂量依赖性, 与既往关于 BBR 具有多种生物活性的报道^[7]相符。研究^[14-15]发现: BBR 具有抑制 HSV 感染的潜力, 如通过调节核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 途径抑制 HSV-1 复制及抑制病毒复制周期中的吸

附和渗透阶段。本研究深入探讨了 BBR 对 HSV-1 基因表达的影响。HSV-1 的转录调控分为即刻早期、早期和晚期基因^[16]阶段, 其中即刻早期基因在病毒进入和衣壳分解后首先表达, 进而调控早期和晚期病毒基因的表达。本研究结果显示: BBR 明显抑制了 HSV-1 的即刻早期基因 (ICP0 和 ICP22)、早期基因 (ICP8 和 TK) 以及晚期基因 (gB 和 gD) 的表达^[9]。与既往关于 BBR 通过调控 I 型干扰素刺激展现抗病毒特性的研究^[17]一致, 进一步证实了 BBR 在抗病毒方面的广泛作用机制。

自噬作为细胞稳态维持的关键机制, 是一种高度保守且至关重要的细胞内物质循环和降解过程, 其核心在于自噬体的形成, 这些自噬体能够包裹待降解物质并与溶酶体融合, 从而实现物质的循环利用。自噬不仅扮演着细胞自我清理的角色, 清除无用或有害的细胞成分, 也是对抗病原体如细菌和病毒的重要防御手段, 这一过程被称为异种自噬, 以区别于细胞对自身成分的降解^[18]。既往研究^[19]已经揭示了 HSV-1 病毒具有破坏自噬激活、降解及抗原呈递的能力, 从而导致自噬功能障碍。HSV-1 感染会导致评价自噬水平的标志蛋白 Beclin-1 和 BNIP 蛋白表达水平降低, LC3-II/LC3-I 比值降低, 自噬小体数量减少, 即自噬也在抵御 HSV-1 感染中发挥着重要作用。HSV-1 病毒的 ICP34.5 蛋白作为一种自噬抑制因子, 通过与 Beclin-1 结合, 干扰自噬的正常执行, 从而增强病毒的复制能力和感染效率。相反, 高水平的自噬则能够保护宿主细胞免受 HSV-1 的感染^[19]。这一发现得到了其他研究的支持, 如 AHMAD 等^[20]研究发现: 自噬通过促进受感染细胞的存活, 降解病毒颗粒和过量或缺陷的蛋白, 并激活适应性免疫反应, 从而在 HSV-1 感染中发挥保护作用。另一项研究^[21]也发现: 促进自噬小体成熟为自噬-溶酶体, 可以加速 HSV-1 病毒及其复制所必需的细胞成分的降解, 进而抑制 HSV-1 的感染。本研究在此基础上, 进一步探讨了 BBR 对 HSV-1 感染 HeLa 细胞后自噬水平的影响, 结果显示: BBR 干预后, HSV-1 感染 HeLa 细胞中 Beclin-1 和 BNIP 蛋白表达水平明显升高, LC3-II/LC3-I 比值明显升高, 自噬小体形成增加。提示 BBR 可能通过促进自噬过程来增强细胞对 HSV-1 病毒的防御能力。自噬在 HSV-1 感染中具有保护作用, BBR 可以作为潜在抗 HSV-1 药物候选者。

自噬和细胞凋亡共同构成了细胞稳态调节的关

键机制,两者间的相互作用复杂且精细,其中线粒体自噬与细胞凋亡的交互尤为关键,这一过程受到包括 Bcl-2 和 Bax 在内的多种分子的精细调控。已知自噬过程中产生的 Beclin-1 蛋白,其 BH3 结构域能够与 Bcl-2 特异性结合,从而调控细胞凋亡通路,诱导自噬依赖性凋亡^[22]。细胞凋亡不仅维持细胞群体平衡,还是宿主防御机制的一部分,能限制病原体在内部应激或细菌感染时的复制和传播。HSV-1 病毒具有干扰凋亡信号的能力,能在多个层面阻止感染细胞进入凋亡状态。研究^[23]表明:通过提升 HSV-1 感染细胞的凋亡水平,可以有效降低其感染率和繁殖能力。本研究结果显示:经 BBR 干预后,HSV-1 感染的 HeLa 细胞中 Caspase-1、Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显升高,Bcl-2 蛋白表达水平明显降低。同时,流式细胞术检测结果显示:经 BBR 干预后,HSV-1 感染的 HeLa 细胞凋亡率明显升高。这些发现不仅与既往关于 HSV-1 干扰凋亡信号的研究^[23]结果一致,而且进一步验证了 BBR 可能通过促进细胞凋亡来发挥抗 HSV-1 病毒的作用。

PI3K/AKT/mTOR 是调控许多重要生物活性的关键信号通路。病毒通过操纵这一通路能够显著增强其复制、转录及翻译能力,并促进病毒的入侵、复制、潜伏及激活^[24]。在 HSV-1 感染的背景下,PI3K/AKT 信号通路调节对 HSV-1 在宿主细胞内复制非常重要^[25-26]。BBR 作为一种具有广泛生物活性的化合物,已被证实是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的有效调节剂,并在多种癌症治疗中显示出显著的疗效^[27-28]。尽管 BBR 在调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路方面展现出显著的效果,但其在 HSV-1 病毒感染中的作用尚未得到明确证实。因此,在本研究检测了 PI3K/AKT/mTOR 相关通路的表达情况,结果显示:经 BBR 干预后,HeLa 细胞的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值明显降低,并呈剂量依赖性。提示 BBR 可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥抗病毒作用。本研究使用 PI3K 激活剂处理经 BBR 干预的 HSV-1 感染细胞,结果显示:Beclin-1、BNIP、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 比值明显降低,而 PFUs、复制相关蛋白和 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高。进一步证实了 BBR 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来发挥抗 HSV-1 病毒的作用。

综上所述,BBR 能够通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路促进 HSV-1 病毒感染 HeLa 细胞的自噬过程,诱导自噬依赖性凋亡,并显著抑制病毒的复制。本研究结果为 BBR 在抗病毒和细胞自噬调控领域的探讨提供了新的理论依据,为开发新型抗病毒药物提供了潜在的靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

朱海东参与实验设计和论文撰写,吕长坤参与数据收集和实验操作,师玮参与实验操作。

[参考文献]

- [1] CHANG J Y, BALCH C, PUCCIO J, et al. A narrative review of alternative symptomatic treatments for herpes simplex virus[J]. *Viruses*, 2023, 15(6): 1314.
- [2] ALMUKDAD S, HARFOUCHE M, FAROOQUI U S, et al. Epidemiology of herpes simplex virus type 1 and genital herpes in Australia and New Zealand: systematic review, meta-analyses and meta-regressions [J]. *Epidemiol Infect*, 2023, 151: e33.
- [3] GOPINATH D, KOE K H, MAHARAJAN M K, et al. A comprehensive overview of epidemiology, pathogenesis and the management of herpes labialis[J]. *Viruses*, 2023, 15(1): 225.
- [4] BHUTTA M S, SHECHTER O, GALLO E S, et al. Ginkgolic acid inhibits herpes simplex virus type 1 skin infection and prevents zosteriform spread in mice [J]. *Viruses*, 2021, 13(1): 86.
- [5] YAN C, LUO Z, LI W, et al. Disturbed Yin-Yang balance: stress increases the susceptibility to primary and recurrent infections of herpes simplex virus type 1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(3): 383-398.
- [6] ZHU C P, LI K Q, PENG X X, et al. Berberine a traditional Chinese drug repurposing: Its actions in inflammation-associated ulcerative colitis and cancer therapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1083788.
- [7] ŠUDOMOVÁ M, BERCHOVÁ -BÍMOVÁ K, MARZOCCO S, et al. Berberine in human oncogenic herpesvirus infections and their linked cancers [J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1014.
- [8] LIU Z J, WEI J H, SUN H B, et al. Plumbagin ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating PI3K/AKT/mTOR and Keap1-Nrf2/HO-1 signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(13): e18386.
- [9] TANG Q, LUAN F, YUAN A, et al. Sophoridine

- suppresses herpes simplex virus type 1 infection by blocking the activation of cellular PI3K/Akt and p38 MAPK pathways [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 872505.
- [10] LI F, SONG X W, SU G F, et al. AT-533, a Hsp90 inhibitor, attenuates HSV-1-induced inflammation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 166: 82-92.
- [11] ASHA K, SHARMA-WALIA N. Targeting host cellular factors as a strategy of therapeutic intervention for herpesvirus infections [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 603309.
- [12] HASSAN S T S. Brassicasterol with dual anti-infective properties against HSV-1 and mycobacterium tuberculosis, and cardiovascular protective effect: nonclinical *in vitro* and *in silico* assessments [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(5): 132.
- [13] SADOWSKI L A, UPADHYAY R, GREELEY Z W, et al. Current drugs to treat infections with herpes simplex viruses-1 and-2[J]. *Viruses*, 2021, 13(7): 1228.
- [14] SONG S W, QIU M, CHU Y, et al. Downregulation of cellular c-Jun N-terminal protein kinase and NF- κ B activation by berberine may result in inhibition of herpes simplex virus replication [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(9): 5068-5078.
- [15] CHIN L W, CHENG Y W, LIN S S, et al. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San[J]. *Arch Virol*, 2010, 155(12): 1933-1941.
- [16] DREMEL S E, DELUCA N A. Genome replication affects transcription factor binding mediating the cascade of herpes simplex virus transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(9): 3734-3739.
- [17] KIM J H, WEERATUNGA P, KIM M S, et al. Inhibitory effects of an aqueous extract from *Cortex Phellodendri* on the growth and replication of broad-spectrum of viruses *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 265.
- [18] PINO-BELMAR C, AGUILAR R, VALENZUELA-NIETO G E, et al. An intrinsic host defense against HSV-1 relies on the activation of xenophagy with the active clearance of autophagic receptors[J]. *Cells*, 2024, 13(15): 1256.
- [19] RIPA I, ANDREU S, LÓPEZ-GUERRERO J A, et al. Interplay between autophagy and herpes simplex virus type 1: ICP34.5, one of the main actors[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13643.
- [20] AHMAD L, MOSTOWY S, SANCHO-SHIMIZU V. Autophagy-virus interplay: from cell biology to human disease[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 155.
- [21] LIU Y, TANG Q, RAO Z L, et al. Inhibition of herpes simplex virus 1 by cepharanthine *via* promoting cellular autophagy through up-regulation of STING/TBK1/P62 pathway[J]. *Antiviral Res*, 2021, 193: 105143.
- [22] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury [J]. *Autophagy*, 2023, 19(2): 401-414.
- [23] LIU Y, CHEN L, LIU W J, et al. Cepharanthine suppresses herpes simplex virus type 1 replication through the downregulation of the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 795756.
- [24] ZHAN Y, YU S Q, YANG S, et al. Newcastle Disease virus infection activates PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Mnk1 pathways to benefit viral mRNA translation *via* interaction of the viral NP protein and host eIF4E[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(6): e1008610.
- [25] KE L, YANG Y N, LI J W, et al. Modulation of corneal FAK/PI3K/Akt signaling expression and of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 during the development of herpes simplex keratitis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 4143981.
- [26] LI W M, XU C J, HAO C, et al. Inhibition of herpes simplex virus by myricetin through targeting viral gD protein and cellular EGFR/PI3K/Akt pathway [J]. *Antiviral Res*, 2020, 177: 104714.
- [27] MOKHFI F Z, AMIN MAL, ZEHRABI M, et al. Alkaloid-based modulators of the PI3K/Akt/mTOR pathway for cancer therapy: Understandings from pharmacological point of view[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 402: 111218.
- [28] SHI X Z, ZHAO S, WANG Y, et al. Antitumor activity of berberine by activating autophagy and apoptosis in CAL-62 and BHT-101 anaplastic thyroid carcinoma cell lines[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 1889-1906.