

基于网络药理学和实验验证探究疏清颗粒治疗 甲型 H1N1 流感的作用机制*

王紫嫣 孟窈 张思宇 王国强 王放 董智勇**

吉林大学基础医学院, 吉林 长春 130021

[摘要] **目的** 探究疏清颗粒治疗甲型 H1N1 流感的潜在作用靶点及机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库筛选疏清颗粒活性成分及靶点, 结合 TTD 数据库获取甲型流感相关靶点, 对共有靶点进行京都基因与基因组百科全书通路富集分析。构建甲型 H1N1 流感病毒感染 A549 细胞模型, CCK8 法检测疏清颗粒对细胞活力影响及抗感染的效果; ELISA 法检测疏清颗粒干预后分泌干扰素 (IFN) 的含量; Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路蛋白磷酸化水平和干扰素刺激基因 (ISGs) mRNA 表达。**结果** 共筛选出疏清颗粒活性成分 89 个, 流感相关靶基因 10 个; 富集分析显示 MAPK 信号通路为疏清颗粒抗流感作用的核心通路; 疏清颗粒浓度为 25.78 mg/mL、作用 48 h 时, 抗流感效果最佳, 治疗指数为 4.51; 疏清颗粒可降低细胞外信号调节激酶、p38 蛋白磷酸化水平, 促进 IFN- β 释放; 上调 ISGs (*PKR*、*MxA*、*OAS1*) mRNA 表达。**结论** 疏清颗粒可显著抑制甲型 H1N1 流感, 其机制可能与调节 MAPK 通路蛋白磷酸化、诱导 IFN- β 分泌及上调下游 ISGs 表达有关。

[关键词] 网络药理学; 甲型 H1N1 流感病毒; 疏清颗粒; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路; 干扰素

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2026.03.005

Exploring the mechanism of Shuqing Granules in the treatment of influenza A (H1N1) based on network pharmacology and experimental verification

Wang Ziyao, Meng Yao, Zhang Siyu, Wang Guoqiang, Wang Fang, Dong Zhiyong**

College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China

**Corresponding author: Dong Zhiyong, email: dongzy@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To explore the potential targets and mechanisms of Shuqing Granules in the treatment of influenza A (H1N1). **Methods** The active components and targets of Shuqing Granules were screened through the TCMSP, and the targets related to influenza A were obtained in combination with the TTD. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis was conducted on overlapping targets. A cellular model of influenza A (H1N1) virus infection was established using A549 cells, and the effect of Shuqing Granules on cell viability and anti-infection was detected by the CCK8 method. The content of interferon (IFN) secreted after Shuqing Granules intervention was detected by ELISA. The phosphorylation levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway proteins and the mRNA expression of interferon-stimulated genes (ISGs) were detected by Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** A total of 89 active components of Shuqing Granules and 10 influenza-related target genes were identified. MAPK signaling pathway was the core anti-influenza pathway of Shuqing Granules. Shuqing Granules showed an optimal anti-influenza effect at 25.78 mg/mL for 48 h (therapeutic index was 4.51). Shuqing Granules could reduce the phosphorylation levels of extracellular signal-regulated kinase and p38 proteins, promote the release of IFN- β , and up-regulated the mRNA expressions of *PKR*, *MxA* and *OAS1* in ISGs. **Conclusion** Shuqing Granules exert a significant inhibitory effect against influenza A (H1N1). The mechanism may be related to regulating the phosphorylation of MAPK pathway proteins, inducing IFN- β secretion and up-regulating the expression of downstream ISGs.

[Key words] Network pharmacology; Influenza A (H1N1) virus; Shuqing Granules; Mitogen-activated protein kinase signaling pathway; Interferon

流感是由流感病毒引发的急性病毒性呼吸道 传染病, 其流行范围覆盖全球^[1]。其中, 甲型

收稿日期: 2025-12-04 修回日期: 2025-12-31 录用日期: 2026-01-04

* 吉林省科技发展计划项目 (20210401084YY)

** 通信作者: 董智勇, 电子邮箱 dongzy@jlu.edu.cn

H1N1 流感病毒具有跨物种感染能力, 可侵袭鸟类及部分哺乳动物, 且具备引发人类流感大流行的潜力。临床患者以急性发热为主要特征, 并伴随不同程度的全身及呼吸系统症状, 包括发烧、寒战、头痛、虚弱、眼睛红肿、喉咙痛、干咳及流鼻涕等^[2]。2009 年甲型 H1N1 流感大流行导致全球范围内近 2 万人死亡^[3-4]。尽管此次大流行已经结束, 但甲型 H1N1 及其他流感病毒株仍以季节性流感病毒形式持续存在, 尤其在在我国北方地区秋冬季呈高发态势, 仍存在引发流感大流行的风险^[5-6]。

目前临床上常用的抗病毒药物包括流感疫苗、M2 离子通道阻断剂类药物和神经氨酸酶抑制剂类药物。尽管这些手段能在一定程度上阻断病毒感染, 但其疗效高度依赖病毒的基因型稳定性, 一旦病毒发生突变, 治疗效果会显著下降。同时, 受药物毒性、病毒耐药性等因素影响, 西药在流感的治疗中的应用受到了限制^[7]。因此, 现急需安全而有效的替代药物, 以满足流感预防与治疗的需求。

疏清颗粒源于《伤寒论》经典清热方剂“白虎汤”, 通过优化药味组成与配伍比例, 形成适配热证的现代改良方剂。该方剂主要由大青叶、甘草、桑叶等中药组成, 具有清热解毒、宣泄肺胃的作用^[8-9]。临床研究证实, 疏清颗粒对急性呼吸道感染、手足口病等疾病均具有良好的疗效^[10-11]。此外, 最新研究表明, 疏清颗粒在抗新型冠状病毒感染中发挥了显著的作用, 不仅能有效抑制病毒复制, 还可显著减轻因病毒感染引发的炎症反应^[12]。上述研究提示, 疏清颗粒对流行性及传染性疾病具有潜在治疗价值, 但其对甲型 H1N1 流感病毒感染的有效性尚未明确, 其药效物质基础与抗病毒作用机制亦有待阐明。基于此, 本研究拟结合网络药理学和分子生物学实验, 探究疏清颗粒抗甲型 H1N1 流感的机制, 旨在为疏清颗粒在甲型 H1N1 流感治疗中的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 疏清颗粒活性成分及靶点的收集 通过中药系统药理分析平台 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 收集疏清颗粒的主要组成药材 (大青叶、甘草、桑叶) 的化学成分, 基于类药性 (Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 且口服生物利用度 (Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 的筛选标准, 获得活性化合物, 并通过“Related Targets”获得靶蛋白, 使用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 规范靶蛋白名称。

1.1.2 甲型流感相关靶点的获取 在 TTD 数据库 (<http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>) 中以“Influenza”为关键词, 获得疾病靶点, 利用 Uniprot 数据库校正蛋白名称。

1.1.3 疏清颗粒活性化合物-靶基因-疾病网络图 利用 Cytoscape3.7.1 软件构建“化合物-靶基因-疾病网络图”, 利用 BisoGenet 分别导入药物靶基因和疾病靶基因, merge 后得到相互作用蛋白。通过 CytoNCA 筛选出网络拓扑性质的度值大于 2 倍中位数的基因, 得到最终的分子网络。

1.1.4 KEGG 信号通路及关键靶点分析 将疏清颗粒与甲型流感共有靶点基因导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>), 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。在 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi>) 中输入共有靶点基因, 计算分析获得相关的生物学过程、分子功能和反应途径等信息, 通过对不同的信号通路颜色标记得疾病相关的靶基因, 为后续实验提供参考。

1.2 疏清颗粒治疗甲型 H1N1 流感病毒感染关键靶点的体外实验验证

1.2.1 细胞系和病毒株 A549 细胞为腺癌人类肺泡基底上皮细胞, 由吉林大学基础医学院冻存。甲型流感病毒: H1N1 (txid 211044) 流感病毒由吉林大学基础医学院病原生物学系提供。

1.2.2 主要药物、试剂及仪器 药物: 疏清颗粒购自吉林华康药业股份有限公司 (生产批号 Z10980132)。试剂: 牛血清白蛋白 (货号 ST023)、蛋白浓度测定试剂盒 (货号 P0010)、放射免疫沉淀法 (Radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液 (货号 P1003B) 购自中国 Beyotime 公司; DMEM 培养基 (货号 1821224)、逆转录试剂盒 (货号 K1622) 购自美国 Thermo 公司; 细胞计数试剂盒 8 (Cell counting kit-8, CCK8) (货号 CK04) 购自日本同仁公司; TRIzo (货号 15596-026) 购自美国 Ambion 公司; 实时定量 PCR 试剂盒 (货号 04913-001) 购自瑞士 Roche 公司; 人 α 干扰素 (Interferon α , IFN- α) 酶联免疫试剂盒 (货号 CSB-E08636h)、人 β 干扰素 (Interferon β , IFN- β) 酶联免疫试剂盒 (货号 CSB-E09889h) 购自中国 CUSABIO 公司; 细胞外信号调节激酶 (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) 抗体 (货号 9102S)、磷酸化 ERK (Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK) 抗体 (货号 9101S)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38) 抗体 (货号 8690S)、磷酸化 p38 (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38) 抗体 (货号 4511S)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抗体 (货号 3708S)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (Phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体 (货号 4671S) 购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) (货

号 ab6721) 购自美国 Abcam 公司; HRP 山羊抗小鼠 IgG (货号 RS0001) 购自美国 Immunoway 公司。仪器: 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪 (美国 Applied biosystems 公司, 型号 Step One), 细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司, 型号 MC0175), 全波长酶标仪 (美国 Biotek 公司, 型号 Epoch), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 CKX41), 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司, 型号 Fresco21), 蛋白电泳仪 (中国 Tanon 公司, 型号 EPS300)。

1.2.3 病毒组织培养感染剂量的测定 将甲型 H1N1 流感病毒液连续 10 倍倍比稀释至 10^{-10} 。取对数生长期的 A549 细胞液, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 12 h。加入稀释好的病毒液, 每个浓度设置 8 个复孔, 另设正常细胞组和细胞维持液组。每隔 12 h 观察细胞病变情况, 直至病变孔数不发生变化。根据 Reed-Muench 方法计算 50% 病毒组织培养感染剂量 (Tissue culture infectious dose 50%, TCID₅₀), 实验重复 3 次。

1.2.4 药物毒性试验 取处于对数生长期的 A549 细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 培养 24 h 后进行分组, 分别为空白对照组、细胞对照 (Cell control, CC) 组以及不同浓度的疏清颗粒组 (0.10、1.00、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00、50.00 mg/mL), 每组 4 个复孔。药物作用 24 h 后, 加入 CCK8 测定 OD₄₅₀, 计算药物的最大无毒浓度 (Toxic concentration 0, TC₀) 和药物半数毒性浓度 (Toxic concentration 50, TC₅₀), 实验重复 3 次。

细胞存活率 = [(实验孔 - 空白孔) / (对照孔 - 空白孔)] × 100%

1.2.5 疏清颗粒体外抗甲型 H1N1 病毒感染的作用方式筛选 实验设计两种疏清颗粒抗甲型 H1N1 病毒作用方式: ① 药物阻断作用 (先加药物后加病毒); ② 药物的抑制作用 (先加病毒后加药物)。设置 CC 组、病毒对照 (Virus control, VC) 组和疏清颗粒组, 检测两种作用方式下的细胞存活率。

1.2.6 不同作用时间及浓度的疏清颗粒抗甲型 H1N1 流感病毒感染活性 将 100 TCID₅₀ 病毒液加入已长成单层的 A549 细胞的 96 孔培养板中 (5×10^4 个/孔) 中, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 吸附 2 h, 然后加

入各浓度的疏清颗粒药液 (5.00、10.00、15.00、20.00 mg/mL), 每个浓度设置 4 个复孔, 分别培养 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h, 通过 CCK8 法测定各个时间点细胞存活率, 实验重复 3 次。

1.2.7 疏清颗粒抗甲型 H1N1 病毒感染活性 将 100 TCID₅₀ 病毒液加入已长成单层的 A549 细胞的 96 孔培养板 (5×10^4 个/孔) 中, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 吸附 2 h, 加入各浓度的疏清颗粒药液 (1.00、5.00、10.00、15.00、20.00、25.00 mg/mL), 每个浓度 4 个复孔, 同时设立 CC 组、VC 组、阳性对照组 - 板蓝根颗粒 (Positive control group-Banlangen Granules, pb) 组 (板蓝根颗粒的药物浓度为 50.00 mg/mL), 培养 48 h。用 CCK8 法测定药物半数有效抑制病毒浓度 (Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 和药物 90% 抑制病毒浓度 (Inhibitory concentration 90, IC₉₀), 并计算治疗指数 (Therapeutic index, TI), $\text{TI} = \text{TC}_{50} / \text{IC}_{50}$, 实验重复 3 次。

1.2.8 ELISA 检测细胞分泌干扰素 取细胞上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 经包被孵育、封闭加样、加酶标抗体后加入显色剂, 使用酶标仪检测 A450 处 OD 值, 绘制标准曲线, 计算 IFN- α 、IFN- β 水平。

1.2.9 MAPK 通路相关蛋白表达的检测 使用 RIPA 裂解液提取蛋白质, 进行蛋白定量, 按常规方法进行 Western blot 检测丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路相关蛋白的表达。将检测蛋白抗体 (1 : 1 000) 和抗 β -actin 单克隆抗体 (1 : 1 000) 作为一抗孵育, 分析蛋白表达。应用 Image J 图像分析软件对条带进行灰度分析, 以 β -actin 为内参, 得出蛋白的相对表达量。

1.2.10 RT-qPCR 法检测干扰素刺激基因 (Interferon-stimulated genes, ISGs) 的表达 向各组细胞中加入 TRIzol 提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 使用 SYBRs Green Master Mix 试剂进行 RT-qPCR 反应, 检测双链 RNA 依赖性蛋白激酶 R (Double-stranded RNA-dependent protein kinase R, PKR)、黏液病毒抗性蛋白 A (Myxovirus resistance protein A, MxA) 和 2', 5'-寡腺苷酸合成酶 (2', 5'-oligoadenylate synthetase 1, OAS1) 的 mRNA 表达。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。基因的引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

基因	正向引物	反向引物
PKR	5'-ACGTGTGAGTCCCAAAGCAA-3'	5'-AGGTCAAATCTGGGTGCCAA-3'
OAS1	5'-CAGGAAACTTGGGTGGTG-3'	5'-TCGTCGGTCTCATCGTCT-3'
MxA	5'-TCAGTTACCAGGACTACGAG-3'	5'-ATGCCAGGAAGGTCTATT-3'
GAPDH	5'-ACAACCTTGGTATCGTGAAGG-3'	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'

1.3 统计学方法

实验数据用 GraphPad Prism 6.0 软件进行分析, 服从正态分布的计量资料多组间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 Tukey's HSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 疏清颗粒活性成分筛选

经过 OB 和 DL 筛选, 得到疏清颗粒中 89 种活性化合物, 其中大青叶 5 种、甘草 70 种、桑叶 16

种。存在 3 种跨成分共有活性化合物: 甘草醇、 β -谷甾醇和槲皮素, 见表 2。提示这些化合物可能作为疏清颗粒治疗甲型 H1N1 病毒感染的核心活性成分。

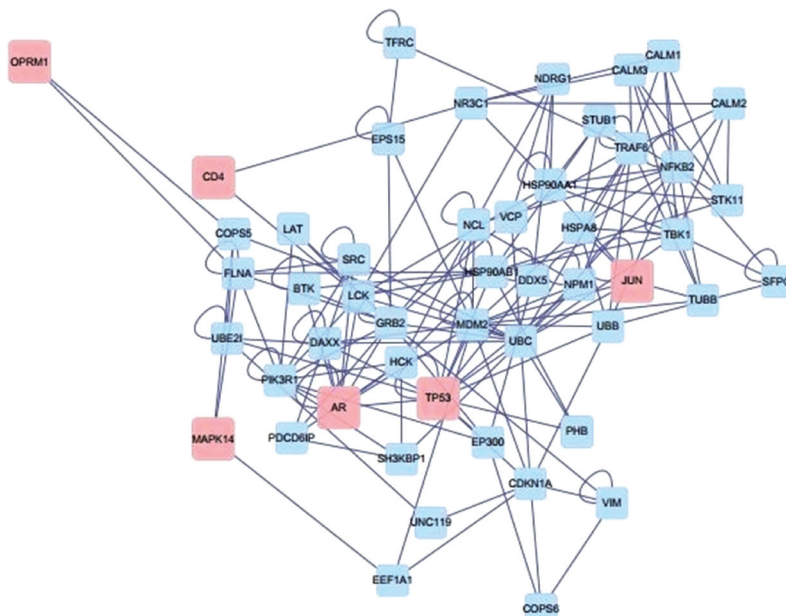
2.2 疏清颗粒的活性化合物-靶基因-疾病网络图

经过筛选, 共获得疏清颗粒药物靶点 85 个, 甲型流感相关疾病靶点 10 个。利用 Cytoscape 3.7.1 软件建立活性化合物-靶基因-疾病网络图, 见图 1。

表 2 疏清颗粒跨成分共有活性化合物

Tab. 2 Cross-component common active compounds in Shuqing Granules

药物	编号	化合物	分子量	OB (%)	DL
大青叶、甘草	MOL002311	甘草醇 (Glycyrol)	366.39	90.78	0.67
大青叶、桑叶	MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	414.79	36.91	0.75
桑叶、甘草	MOL000098	槲皮素 (Quercetin)	302.25	46.43	0.28



注: 图中粉色基因是筛选靶基因, 蓝色基因是间接作用基因。

图 1 疏清颗粒的活性化合物-靶基因-疾病网络图

Fig. 1 Network diagram of Shuqing Granules active compounds-target genes-diseases

2.3 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集共得到 26 条相关通路, 见表

3。其中与疏清颗粒治疗甲型流感最为相关的是 MAPK 信号通路。

表 3 信号通路富集

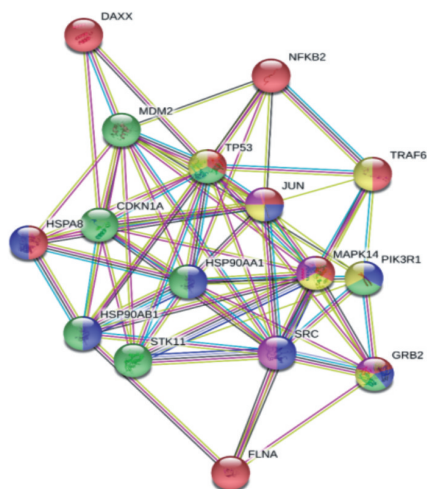
Tab. 3 Signal pathway enrichment

序号	通路	基因数	P 值
1	MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)	11	<0.001
2	神经营养素信号通路 (Neurotrophin signaling pathway)	9	<0.001
3	雌激素信号通路 (Estrogen signaling pathway)	9	<0.001
4	PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)	8	<0.001

续表 3

序号	通路	基因数	P 值
5	GnRH 信号通路(GnRH signaling pathway)	7	<0.001
6	T 细胞受体信号通路(T cell receptor signaling pathway)	7	<0.001
7	FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)	7	<0.001
8	Rap1 信号通路(Rap1 signaling pathway)	7	<0.001
9	Ras 信号通路(Ras signaling pathway)	7	<0.001
10	NF-κB 信号通路(NF-kappa B signaling pathway)	6	<0.001
11	催产素信号通路(Oxytocin signaling pathway)	6	<0.001
12	cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)	6	<0.001
13	Fc-εri 信号通路(Fc epsilon RI signaling pathway)	5	<0.001
14	ErbB 信号通路(ErbB signaling pathway)	5	<0.001
15	Toll 样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)	5	<0.001
16	甲状腺激素信号通路(Thyroid hormone signaling pathway)	5	<0.001
17	胰岛素信号通路(Insulin signaling pathway)	5	<0.001
18	NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)	4	<0.001
19	B 细胞受体信号通路(B cell receptor signaling pathway)	4	<0.001
20	催乳素信号通路(Prolactin signaling pathway)	4	<0.001
21	胰高血糖素信号通路(Glucagon signaling pathway)	4	<0.001
22	HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)	4	<0.001
23	趋化因子信号通路(Chemokine signaling pathway)	4	<0.001
24	VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway)	3	<0.001
25	p53 信号通路(p53 signaling pathway)	3	<0.001
26	RIG-1 样受体信号通路(RIG-I-like receptor signaling pathway)	3	<0.001

将 1~10 号信号通路所包含的基因输入 STRING 数据库, 使用不同颜色标记 1~5 号信号通路, 得到的关键基因有 MAPK14、JUN、PIK3R1 等, 见图 2。



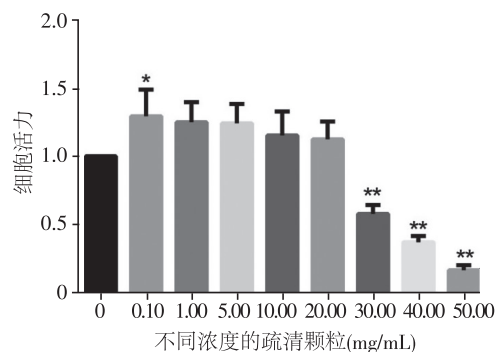
注: 红色为 MAPK 信号通路, 蓝色为雌激素信号通路, 黄色为神经营养素信号通路, 绿色为 PI3K-Akt 信号通路, 紫色为 GnRH 信号通路。

图 2 通路基因的富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis of pathway genes

2.4 疏清颗粒无毒浓度测定

疏清颗粒药物浓度 ≥ 30.00 mg/mL 时, 细胞存活率显著下降 ($P < 0.01$)。TC₀ 为 25.81 mg/mL, TC₅₀ 为 32.33 mg/mL, 见图 3。因此, 后续试验选择疏清颗粒浓度为 < 25.81 mg/mL。



注: 与 0 mg/mL 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 疏清颗粒对 A549 细胞的毒性

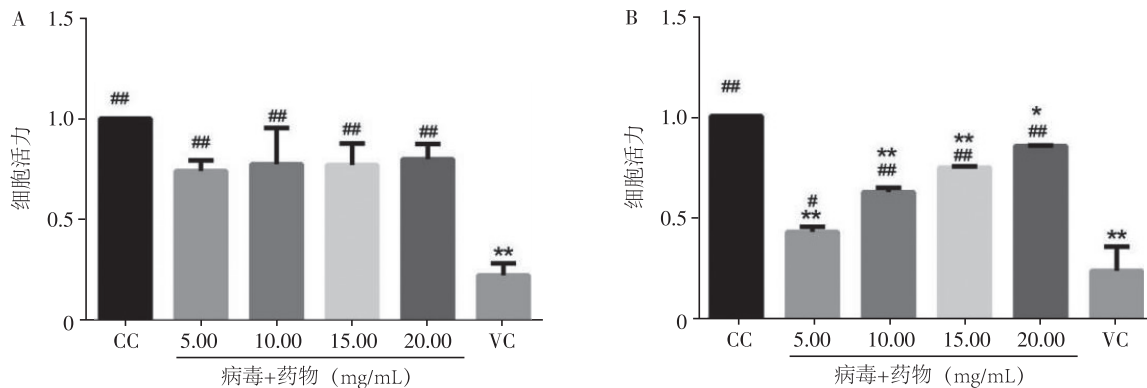
Fig. 3 Toxicity of Shuqing Granules on A549 cells

2.5 疏清颗粒作用于甲型 H1N1 流感病毒感染的最佳途径

与 VC 组比较, 两种给药途径均能显著提高细

胞活性 ($P < 0.01$)。阻断作用: 不同浓度组无显著性差异, 细胞存活率均约 70%, 见图 4A。抑制作用: 细胞存活率与药物浓度呈剂量依赖性, 随着给药浓度的升高细胞存活率同时升高 ($P < 0.05$),

见图 4B。因此, 疏清颗粒可通过阻断和抑制途径作用于甲型 H1N1 流感病毒, 抑制作用较为显著, 即病毒刺激后再进行药物治疗。



注: 图 A 为药物的阻断作用, 图 B 为药物的抑制作用。与 CC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 VC 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 疏清颗粒作用于甲型 H1N1 流感病毒感染的最佳途径

Fig. 4 The optimal administration route of Shuqing Granules for influenza A (H1N1) virus infection

2.6 不同作用时间下不同浓度的疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞的影响

药物作用 24 h、36 h、48 h 时, 细胞存活率呈时间梯度性升高, 其中 48 h 时, 浓度为 20.00 mg/mL 的疏清颗粒处理组细胞存活率接近 90%; 而药物作用延长至 60 h 和 72 h 时, 浓度为 20.00 mg/mL 的疏清颗粒处理下细胞存活率反而下降。综上所述, 疏清颗粒作用时间 48 h、浓度为 20.00 mg/mL 的疏清颗粒抗甲型 H1N1 流感病毒感染效果较好, 见图 5。

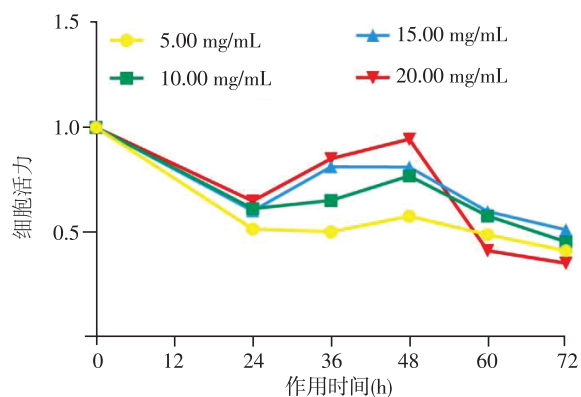


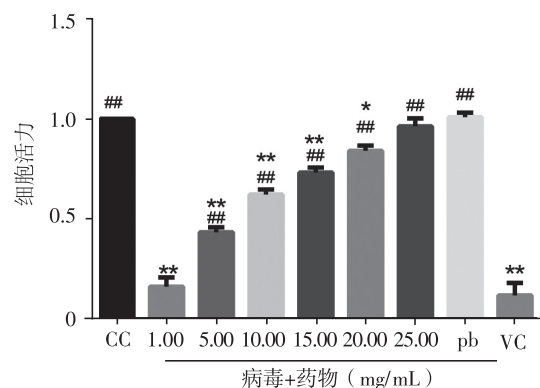
图 5 不同作用时间下不同浓度的疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞存活率的影响

Fig. 5 The effect of Shuqing Granules with different concentrations on the survival rate of influenza A (H1N1) virus-infected cells under different action durations

2.7 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞的抗病毒效果

与 VC 组比较, 疏清颗粒浓度 > 5.00 mg/mL

时, 各组感染细胞的存活率显著升高 ($P < 0.01$), 见图 6。IC₉₀ 为 25.78 mg/mL, IC₅₀ 为 7.17 mg/mL。TI (TC₅₀/IC₅₀) 为 4.51。选择低 (1.00 mg/mL)、中 (10.00 mg/mL)、高 (20.00 mg/mL) 3 个浓度的疏清颗粒进行后续实验。



注: 与 CC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 VC 组比较 ## $P < 0.01$ 。

图 6 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞的影响

Fig. 6 The effect of Shuqing Granules on influenza A (H1N1) virus-infected cells

如图 7 所示, 病毒感染组细胞出现肿胀褶皱、结构破坏并释放代谢产物的病变状态; 低浓度组与病毒组细胞状态无明显差异; 高浓度组细胞状态接近正常细胞, 呈多角贴壁状, 结构完整且细胞间连接紧密; 中浓度组细胞部分病变、部分状态良好。

2.8 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞 MAPK 通路蛋白及其磷酸化的调控

各组 ERK、p38 和 JNK 总蛋白比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组 p-ERK、p-p38 和 p-JNK

蛋白比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 VC 组比较: 低浓度组 p-ERK 降低 ($P < 0.05$), 中浓度、高浓度组显著降低 ($P < 0.01$); 中浓度组 p-38 降低 ($P < 0.05$), 高浓度组显著下降 ($P < 0.01$); 高浓度组

p-JNK 显著上升 ($P < 0.01$), 见图 8。综上所述, 甲型 H1N1 流感病毒感染可以促进 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化, 而疏清颗粒可以抑制 ERK 和 p38 的磷酸化, 促进 JNK 的磷酸化。

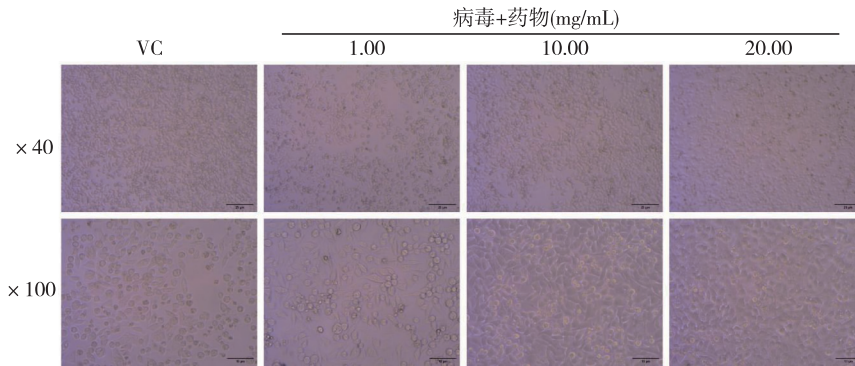
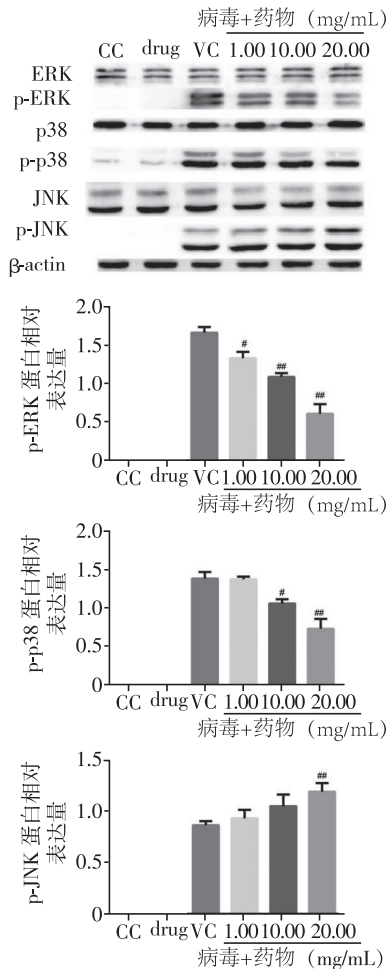


图 7 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞的形态学影响

Fig. 7 The morphological effects of the Shuqing Granules on influenza A (H1N1) virus-infected cells



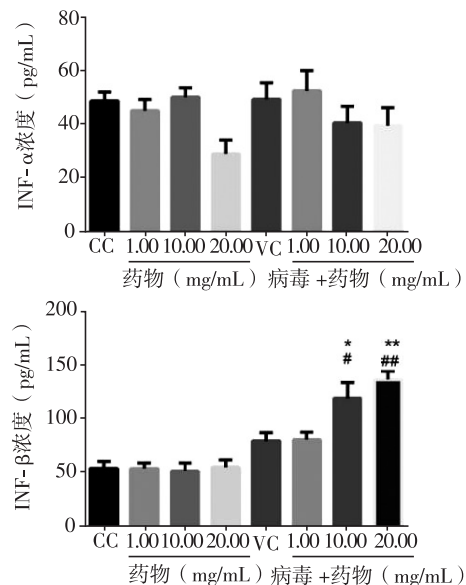
注: 与 VC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 8 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞 ERK、p38 和 JNK 蛋白及其磷酸化水平的影响

Fig. 8 The effect of Shuqing Granules on ERK, p38 and JNK proteins and their phosphorylation levels in influenza A (H1N1) virus-infected cells

2.9 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞中 IFN- α 、IFN- β 分泌的影响

各组 IFN- α 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 且与药物剂量无相关性, 见图 9。各浓度疏清颗粒处理正常细胞后, IFN- β 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。中浓度和高浓度疏清颗粒处理病毒吸附的细胞后 IFN- β 水平升高 ($P < 0.05$)。综上所述, 疏清颗粒对 IFN- α 和 IFN- β 的分泌无明显影响, 但在甲型 H1N1 流感病毒感染细胞后, 疏清颗粒可显著增加 IFN- β 的分泌。



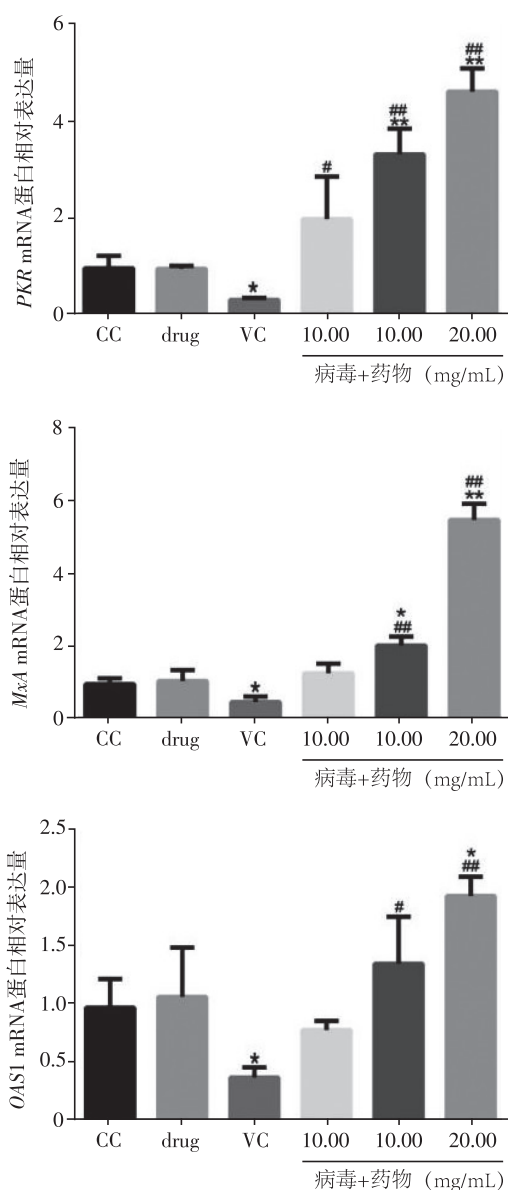
注: 与 CC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 VC 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 9 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞 IFN 分泌量的影响

Fig. 9 The effect of Shuqing Granules on the IFN secretion of influenza A (H1N1) virus-infected cells

2.10 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞 ISGs mRNA 表达的影响

与 CC 组比较, VC 组 *PKR*、*MxA*、*OAS1* 的 mRNA 表达均下降 ($P < 0.05$), 中、高浓度组 *PKR*、*MxA* mRNA 表达上升 ($P < 0.05$), 高浓度组 *OAS1* mRNA 表达明显上升 ($P < 0.01$)。与 VC 组比较, 低浓度组 *PKR* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), *MxA* mRNA 和 *OAS1* mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 10。综上所述, 疏清颗粒可刺激甲型 H1N1 流感病毒感染细胞表达 ISGs, 进而抑制病毒生长。



注: 与 CC 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 VC 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 10 疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒感染细胞 ISGs mRNA 表达的影响

Fig. 10 The effect of Shuqing Granules on the expression of ISGs mRNA in influenza A (H1N1) virus-infected cells

3 讨论

在全球范围内, 每年约有 10 亿例季节性流感病例, 其中重症病例 300 万~500 万, 呼吸系统并发症死亡人数约 29 万~65 万。甲型流感病毒是人类中最常见的流感病原体, 感染人类气道引发急性呼吸综合征, 具有高发病率和感染性。目前临床常见的治疗甲型流感的西药包括 M2 离子通道抑制剂类、神经氨酸酶抑制剂类和内切核酸酶抑制剂类, 然而有 95% 的 H1N1 和 H3N2 流感病毒对西药产生抗性^[13]。因此, 多成分多靶点的复方中药对易突变的流感病毒更为有效。

复方中药疏清颗粒的抗病毒作用在新型冠状病毒中已得到研究支持^[12]。值得注意的是, 该药物的关键成分为大青叶、桑叶、甘草等, 在既往研究中也显示出对流感病毒的拮抗活性。大青叶作为传统中药, 主要成分包括吡啶类化合物、芥子苷类化合物和喹唑酮类化合物等, 具有清热解毒, 抑制微生物和病毒感染, 增强免疫力的作用, 被广泛应用于角膜炎、流感等治疗^[14]。有研究显示, 大青叶的单体成分可以有效抑制甲型 H1N1 流感病毒在体外的复制^[15]。桑叶是桑树的叶子, 性味苦寒, 其主要成分包括生物碱、谷甾醇、黄酮、多糖等, 具有化痰止咳和利尿等功效, 多用于治疗感冒、头昏、糖尿病等^[16]。研究显示, 桑叶提取物可以有效治疗由甲型流感病毒感染引起的病毒性肺炎^[17]。甘草属豆科类植物, 被广泛应用于治疗流感, 金翘片、大青龙汤和麻杏石甘汤等复方中药均含有甘草成分^[18-20]。三萜类化合物作为甘草的主要活性成分之一, 被大量的研究证实具有广谱抗病毒活性, 如对抗疱疹病毒、HIV、肝炎病毒、SARS 冠状病毒和流感病毒等^[21]。有研究显示, 甘草能够显著抑制甲型 H1N1 流感病毒诱导的人支气管上皮细胞分泌趋化因子, 从而治疗慢性炎症和病毒感染^[22]。本研究证实, 疏清颗粒可通过抑制和阻断两种途径发挥作用, 其中抑制作用较为显著, 细胞存活率较高。疏清颗粒对甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用随作用时间的延长效果不断加强, 48 h 达到最佳效果, 因此, 复方中药疏清颗粒在 48 h 表现出对甲型 H1N1 流感病毒良好的抑制效果。

虽然大量研究显示甘草、大青叶和桑叶具备抗流感病毒活性, 但由于其多组分的特点, 对其作用机制的探索较为困难, 因此本研究采用网络药理学的手段分析复方中药疏清颗粒的作用途径。经数据库查询与筛选, 3 种成分共有 89 种活性化合物。在构建活性化合物-靶点-疾病关系图中, 关键基因包括 MAPK14、JUN、TP53、AR、OPRM1 和 CD4 等。如 MAPK14 是一种普遍存在的蛋白激酶, 由炎症因子、应激信号和病原微生物等刺激产生, 是治疗骨质疏松、癌症和心血管疾病等众多疾病的重要靶点^[22-23]。有研究证明, 柴石退热颗

粒通过 TRAF6/MAPK14 轴发挥对抗甲型流感的作用, 并显著抑制促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 的释放^[24]。JUN 是编码细胞源性 Jun (Cellular Jun, c-jun) 蛋白的基因, c-jun 可以被 JNK 磷酸化, 与 c-fos 形成二聚体, 即转录因子激活蛋白-1 (Activator protein-1, AP-1), AP-1 的表达促进了 IFN- β 和细胞间黏附分子 1 等细胞因子的表达^[25]。有研究发现, 利多卡因通过 JNK-AP1 信号通路上调 IFN- α , 抑制流感病毒的复制^[26]。

通过 KEGG 通路富集分析, 获得最相关的前五条通路分别是 MAPK 信号通路、雌激素信号通路、神经营养因子信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 GnRH 信号通路。MAPK 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路同属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶通路, 参与细胞的许多生命活动, 如炎症、凋亡、氧化应激和过敏等。雌激素信号通路和 GnRH 信号通路也可以通过 MAPK 信号通路启动^[27-28]。MAPK 信号通路的主要分支包括 ERK、p38 和 JNK, 大量研究证实三种蛋白均参与了病毒的复制与传播^[29-30]。有研究显示, ERK1/2 在病毒粒子装配脱壳中发挥重要作用, 抑制 ERK1/2 磷酸化水平可显著降低病毒感染^[31]。RSV 病毒在感染早期会激活 p38, 并利用 p38 进行复制^[32]。本研究发现, 甲型 H1N1 流感病毒感染后细胞 ERK、p38 和 JNK 蛋白磷酸化水平升高, 疏清颗粒干预后, ERK 蛋白和 p38 蛋白的磷酸化水平明显下降, 而 JNK 蛋白磷酸化水平显著上升。综上所述, 病毒通过促进 ERK、p38 和 JNK 蛋白磷酸化, 增强了其复制和传播的能力。一方面, 疏清颗粒通过抑制 ERK 和 p38 蛋白的磷酸化, 可能经阻断病毒脱壳与装配过程抑制病毒复制; 另一方面, 疏清颗粒可促进 JNK 蛋白磷酸化, 激活下游 c-jun 蛋白进而表达 AP-1 转录因子, 诱导干扰素 IFN- β 的形成, 协同发挥抗病毒作用。

PKR、MxA、OAS1 均属于 ISGs 家族成员, 是干扰素信号通路激活后产生的关键抗病毒效应分子。PKR 具有广泛的抗病毒活性, 它可以诱导宿主细胞和病毒的 RNA 翻译关闭。甲型流感病毒通过非结构蛋白 1 蛋白沉默 PKR 以确保病毒的高水平复制^[33]。MxA 属于 GTP 酶超家族, 有研究证明, 通过靶向病毒核蛋白可抑制核蛋白-依赖 RNA 的 RNA 聚合酶复合物相互作用和核糖核蛋白活性, 限制病毒感染^[34]。OAS1 是免疫系统最重要的组分之一, OAS1 可以招募三环结构域蛋白 21 降解病毒主要衣壳蛋白, 抑制病毒的复制^[35]。本研究证实, 甲型 H1N1 流感病毒可抑制 ISGs 的表达, 疏清颗粒干预后, ISGs mRNA 表达水平显著上升, 证明疏清颗粒可以刺激 ISGs 发挥抗病毒作用。

综上所述, 本研究发现中药疏清颗粒在体外能有效拮抗甲型 H1N1 流感病毒。疏清颗粒作用 48 h 对流感病毒的抑制效果最佳, 可能通过激活

MAPK 信号通路, 刺激 IFN- β 分泌, 表达 MxA、PKR 和 OAS1, 发挥治疗作用。

参考文献

- [1] Uyeki T M, Hui D S, Zambon M. et al. Influenza[J]. The Lancet, 2022, 400(10353):693-706.
- [2] Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, et al. A brief review of influenza virus infection[J]. J Med Virol, 2021, 93(8):4638-4646.
- [3] Fisher D, Hui D S, Gao Z, et al. Pandemic response lessons from influenza H1N1 2009 in Asia[J]. Respirology, 2011, 16(6):876-882.
- [4] Cheng V C C, To K K W, Tse H, et al. Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned? [J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2):223-263.
- [5] Han Y, Wang Z, Li X, et al. Differences of the chest images between coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients and influenza patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Med Sci, 2025, 22(3):641-650.
- [6] 王宪龙, 翟如义, 郭培全, 等. 一起学校甲型 H1N1 流感聚集疫情的流行特征和全基因组测序分析[J]. 中国热带医学, 2022, 22(12):1154-1159.
Wang X L, Zhai R Y, Guo P Q, et al. Epidemiological characteristics and whole-genome sequencing analysis of a clustered Influenza A (H1N1) outbreak in a school[J]. Int J Trop Med, 2022, 22(12):1154-1159.
- [7] Hurt A C, Chotpitayasunondh T, Cox N J, et al. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives [J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(3):240-248.
- [8] 韦少强, 刘森, 冯敏, 等. 白虎汤的临床应用及现代药理作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(6):26-31.
Wei S Q, Liu S, Feng M, et al. Study on clinical application and modern pharmacological effects of Baihu Decoction [J]. J Chin Vet Med Pharm, 2023, 42(6):26-31.
- [9] 车宏伟, 杨海宁, 王登才, 等. 疏清颗粒质量标准提高研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(31):34-37, 52.
Che H W, Yang H N, Wang D C, et al. Study on the improvement of quality standard for Shuqing Granules [J]. Chin Med Herald, 2018, 15(31):34-37, 52.
- [10] 马融, 胡思源, 李新民, 等. 疏清颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染的上市后再评价[J]. 药物评价研究, 2018, 41(4):513-518.
Ma R, Hu S Y, Li X M, et al. Post-marketing evaluation of Shuqing Granules in treatment of pediatric acute upper respiratory infection[J]. Drug Evaluat Res, 2018, 41(4):513-518.
- [11] 陈宝伶, 徐阔, 刘丹, 等. 疏清颗粒治疗儿童手足口病临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(12):130-131.
Chen B L, Xu K, Liu D, et al. Clinical observation of

- Shuqing Granules in the treatment of hand, foot and mouth disease in children [J]. *Liaoning J Trad Chin Med*, 2022,49(12):130-131.
- [12] Guo X, Zheng H, An Y, et al. Network pharmacology and experiment verification-based strategy for exploring the mechanisms of Shuqing Granule in the treatment of COVID-19 [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2025, 18(8):1216.
- [13] O'Hanlon R, Shaw ML. Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market [J]. *Curr Opin Virol*, 2019, 35:14-18.
- [14] 韩苏日古嘎, 乌日拉嘎, 杨立国. UPLC-Q-TOF-MS 法分析大青叶入血成分及其代谢产物 [J]. *中成药*, 2025, 47(2): 487-496.
Han S R G G, Wu R L G, Yang L G. Analysis of blood entry components and metabolites of Folium Isatidis by UPLC-Q-TOF-MS method [J]. *Chin J Pat Med*, 2025, 47(2): 487-496.
- [15] 刘钊, 杨占秋, 肖红. 中药大青叶有效单体抗流感病毒作用 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2009, 28(3):42-46.
Liu Z, Yang Z Q, Xiao H. Anti-influenza virus effect of active monomers from Folium Isatidis [J]. *J South-Central Minzu Univ (Nat Sci Ed)*, 2009, 28(3):42-46.
- [16] Marchetti L, Truzzi E, Frosi I, et al. In vitro bioactivity evaluation of mulberry leaf extracts as nutraceuticals for the management of diabetes mellitus [J]. *Food Funct*, 2022,13(8):4344-4359.
- [17] 景俊松. 桑叶提取物通过 Dectin-1/Syk 通路治疗流感病毒性肺炎的作用和机制研究 [D]. 杭州:浙江省医学科学院, 2025.
Jing J S. Study on the effect and mechanism of mulberry leaf extract in the treatment of influenza viral pneumonia via the Dectin-1/Syk pathway [D]. Hangzhou: Zhejiang Academy of Medical Sciences, 2025.
- [18] 张美义, 何家靖, 杨子峰, 等. 金翘片体内抗流感病毒作用研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2018,35(1): 143-148.
Zhang M Y, He J J, Yang Z F, et al. Study on the anti-influenza virus effect of Jinqiao Tablets in vivo [J]. *J Guangzhou Univ Chin Med*, 2018,35(1):143-148.
- [19] 田连起. 大青龙汤抗甲型 H1N1 流感病毒及解热的药效物质基础研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2013.
Tian L Q. Study on the pharmacodynamic material basis of Daqinglong Decoction in anti-influenza A (H1N1) virus and antipyretic effects [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2013.
- [20] 邓遵, 邓建华. 麻杏石甘汤加减联合磷酸奥司他韦胶囊治疗甲型流行性感胃患者的效果观察 [J]. *大医生*, 2025,10(15):83-85.
Deng Z, Deng J H. Observation on the effect of modified Maxing Shigan Decoction combined with oseltamivir phosphate capsules in the treatment of patients with influenza A [J]. *Da Yi Sheng*, 2025,10(15):83-85.
- [21] Pu J, He L, Wu S, et al. Anti-virus research of triterpenoids in licorice [J]. *Bing Du Xue Bao*, 2013,29(6): 673-679.
- [22] Ko H C, Wei B L, Chiou W F. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006,107(2):205-210.
- [23] Madkour M M, Anbar H S, El-Gamal M I. Current status and future prospects of p38 α /MAPK14 kinase and its inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021,213:113216.
- [24] Wang L, Guo J, Wang Y, et al. Anti-inflammatory effects of Chaishi Tuire Granules on influenza A treatment by mediating TRAF6/MAPK14 axis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022,9:943681.
- [25] Xie X, Kaoud T S, Edupuganti R, et al. C-Jun N-terminal kinase promotes stem cell phenotype in triple-negative breast cancer through upregulation of Notch1 via activation of c-Jun [J]. *Oncogene*, 2017,36(18):2599-2608.
- [26] Liu X, Zheng F, Tian L, et al. Lidocaine inhibits influenza A virus replication by up-regulating IFN α 4 via TBK1-IRF7 and JNK-AP1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023,115:109706.
- [27] Chi R, Liu Y, Wang P, et al. Estrogen-induced circ-FAM171A1 regulates sheep myoblast proliferation through the oar-miR-485-5p/MAPK15/MAPK pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2025,82(1):123.
- [28] Jiao X, Chu Z, Li M, et al. GnRH-mediated suppression of S100A4 expression inhibits endometrial epithelial cell proliferation in sheep via GNAI2/MAPK signaling [J]. *Front Vet Sci*, 2024,11:1410371.
- [29] Chen J, Ye C, Wan C, et al. The roles of c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in infectious diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(17):9640.
- [30] Liu Y, Luo Z. Repurposing anticancer drugs targeting the MAPK/ERK signaling pathway for the treatment of respiratory virus infections [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13):6946.
- [31] Dai M, Feng M, Liao M, et al. Inhibition of ERK/MAPK suppresses avian leukosis virus subgroup A and B replication [J]. *Microb Pathog*, 2017,102:29-35.
- [32] Jones L P, Martin D E, Tripp R A. The MAPK response to virus infection is modified by probenecid [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2025,47(4):246.
- [33] Schierhorn K L, Jolmes F, Bepalowa J, et al. Influenza A virus virulence depends on two amino acids in the N-Terminal domain of its NS1 protein to facilitate inhibition of the RNA-Dependent protein kinase PKR [J]. *J Virol*, 2017,91(10):e00198-17.
- [34] Chang M, Min Y, Xu Z, et al. Host factor MxA restricts Dabie bandavirus infection by targeting the viral NP protein to inhibit NP-RdRp interaction and ribonucleoprotein activity [J]. *J Virol*, 2024,98(1):e0156823.
- [35] Sun H, Wu M, Zhang Z, et al. OAS1 suppresses African swine fever virus replication by recruiting TRIM21 to degrade viral major capsid protein [J]. *J Virol*, 2023, 97(10):e0121723.