

本文引用: 黄家望, 王康宇, 马心悦, 刘卓琳, 冯芷莹, 尹抗抗, 李玲. 基于 VEGF/PI3K/Akt/eNOS 信号通路探讨木犀草素干预 A 型流感病毒的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1584-1590.

基于 VEGF/PI3K/Akt/eNOS 信号通路探讨木犀草素 干预 A 型流感病毒的作用机制

黄家望¹, 王康宇², 马心悦¹, 刘卓琳¹, 冯芷莹², 尹抗抗^{3*}, 李玲^{1,4*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医学院, 湖南长沙 410208;

3. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南长沙 410208; 4. 中西医结合病原生物学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨木犀草素对 A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)感染的小鼠肺上皮细胞损伤模型的作用机制。**方法** 将小鼠肺上皮 MLE-12 细胞分为正常组、模型组、奥司他韦组、高剂量组和低剂量组,除正常组外,其余 4 组均使用 IAV 感染,正常组加入等量病毒稀释液;2 h 后弃病毒工作液,正常组和模型组加入病毒维持液,药物组加入用病毒维持液稀释的药物工作液,干预 8 h 后收集细胞。使用 CCK-8 检测细胞增殖情况;ELISA 实验检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达;免疫荧光检测细胞内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达情况;RT-qPCR 技术检测细胞内 VEGF、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、3-磷酸肌醇激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) mRNA 表达情况;Western blot 法检测细胞内 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 蛋白表达情况。**结果** CCK-8 结果显示,不同浓度的木犀草素均能降低 IAV 感染所致的细胞损伤($P < 0.01$),其 EC_{50} 值为 $7.204 \mu\text{mol/L}$,因此,将后续实验中的木犀草素药物浓度定为 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 。与正常组相比,模型组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 升高($P < 0.01$),细胞内 VEGF 的荧光蛋白强度增强($P < 0.01$),细胞内 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 的 mRNA 和蛋白的表达升高($P < 0.01$);与模型组相比,高剂量组和低剂量组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 降低($P < 0.01$),细胞内 VEGF 的荧光蛋白强度减弱($P < 0.01$),细胞内 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 的 mRNA 和蛋白的表达降低($P < 0.01$)。**结论** 木犀草素能抑制炎症细胞因子的分泌,缓解 IAV 感染所致的细胞损伤,其过程可能与 VEGF/PI3K/Akt/eNOS 信号通路密切相关。

[关键词] 木犀草素; A 型流感病毒; 作用机制; VEGF/PI3K/Akt/eNOS 信号通路

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.006

Mechanism of action of luteolin against influenza A virus based on the VEGF/PI3K/Akt/eNOS signaling pathway

HUANG Jiawang¹, WANG Kangyu², MA Xinyue¹, LIU Zhuolin¹, FENG Zhiying²,
YIN Kangkang^{3*}, LI Ling^{1,4*}

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Science &

[收稿日期] 2023-03-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973670);湖南省自然科学基金项目(2020JJ5418);中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(21PTKF1007);湖南省大学生创新创业培训项目(A202210541108);湖南中医药大学中西医结合病原生物学湖南省重点实验室开放基金项目(2022KFJJ02);湖南中医药大学研究生创新项目(2022CX63)。

[第一作者] 黄家望,男,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸道感染性疾病的研究。

[通信作者] *李玲,女,高级实验师,硕士研究生导师, E-mail: liling1049@hnu.edu.cn; 尹抗抗,男,实验师, E-mail: 120494339@qq.com。

Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Key Laboratory of Pathogen Biology of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China.

[Abstract] Objective To explore the mechanism of action of luteolin on lung epithelial cell injury model of mice infected with influenza A virus (IAV). **Methods** Mouse lung epithelial cells (MLE-12) were divided into normal group, model group, oseltamivir group, high-dose group, and low-dose group. Except for the normal group, the other four groups were infected with IAV. The normal group received an equal amount of virus diluent, and the virus working solution was discarded after 2 h. The normal group and the model group were added with virus maintenance solution, and the medication groups were added with drug working solution diluted with virus maintenance solution. After 8 hours of intervention, the cells were collected. Cell proliferation was evaluated using the CCK-8 assay. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in cell supernatant were measured by ELISA. Immunofluorescence was used to determine protein expression of intracellular vascular endothelial growth factor (VEGF). RT-qPCR was performed to examine the mRNA expressions of VEGF, protein kinase B (Akt), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cells. Western blot analysis was conducted to measure the protein expressions of VEGF, Akt, PI3K, and eNOS in cells. **Results** CCK-8 assay showed that different concentrations of luteolin could alleviate cell damage caused by IAV infection ($P<0.01$), with an EC_{50} of 7.204 $\mu\text{mol/L}$. Therefore, the drug concentrations of luteolin in subsequent experiments were set at 5 $\mu\text{mol/L}$ and 2.5 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the normal group, the model group exhibited increased secretion of TNF- α and IL-6 in cell supernatant ($P<0.01$), increased fluorescence intensity of VEGF in cells ($P<0.01$), and up-regulated mRNA and protein expressions of VEGF, Akt, PI3K, and eNOS in cells ($P<0.01$). Compared with the model group, the high- and low-dose groups showed reduced secretion of TNF- α and IL-6 in cell supernatant ($P<0.01$), decreased fluorescence intensity of VEGF in cells ($P<0.01$), and down-regulated mRNA and protein expressions of VEGF, Akt, PI3K, and eNOS in cells ($P<0.01$). **Conclusion** Luteolin can inhibit the secretion of inflammatory cytokines and alleviate cell damage caused by IAV infection, which may be closely related to the VEGF/PI3K/Akt/eNOS signaling pathway.

[Keywords] luteolin; influenza A virus; mechanism of action; VEGF/PI3K/Akt/eNOS signaling pathway

流行性感是一种由流感病毒诱发的累及上呼吸道和下呼吸道的急性呼吸系统感染性疾病,以发热、咳嗽、出汗、肌肉酸痛不适等为主要症状,具有较高的传染性、易感性、发病率和死亡率,其病原体主要包括 A、B、C 3 种亚型病毒,其中 A 型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 是对全球健康影响最大的病毒亚型^[1]。目前,流行性感冒防治策略主要是每年接种疫苗和使用抗病毒药物,但由于 IAV 对原有变异的高易感性对抗,使得 IAV 在接种疫苗后可以逃避抗体介导的免疫^[2]。此外,抗病毒药物一般只在流行性感冒感染早期有效,而流感早期与普通上呼吸道感染症状类似,在大多数情况下未引起患者重视,从而错过流感早期就医。许多 IAV 毒株也已经对目前的抗病毒药物产生了耐药性^[3],很大程度上限制了临床抗病毒药物的应用。中医学将流行性感冒归

入“时行感冒”“咳嗽”“肺炎喘嗽”范畴,中医具有丰富的临床诊疗经验,在缓解症状、缩短治疗时间、减少病情发展等方面具有独特的优势,同时,越来越多的证据表明,对流行性感冒患者早期予以中医药干预,能够提高治愈率、缩短病程、延缓疾病进展和降低死亡率^[4]。

木犀草素的化学名为 3',4',5,7-四羟基黄酮,是一种可从多种中草药中分离出的常见的生物活性类黄酮类多酚化合物,其基本结构为两个苯环中间以含氧环和一个碳双键相连,即 C6-C3-C6 结构^[5]。木犀草素具有调节氧化、抗炎、抗菌、抗纤维化、抗凋亡和抗癌等药理作用^[6]。

本研究根据木犀草素的化学结构特征,探索药物与机体的相关性以及木犀草素治疗流行性感冒的潜在作用机制,以期为木犀草素治疗流行性感冒

的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒株

小鼠肺上皮 MLE-12 细胞购自美国细胞培养物收藏中心(批号:CRL-2110),传代保存于本实验室。IAV 病毒株(A/PR/8/34)为湖南师范大学病毒研究室惠赠。将半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)病毒尿囊液以灭菌 PBS 缓冲液稀释 50 倍干预细胞[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.2]。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 基础培养基、磷酸缓冲液、青霉素-链霉素混合液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:W0022E241、WH0022K191、WHAB23N201);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号:2232241);CCK-8 细胞毒性检测试剂盒、小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:FU2082F83788、E-EL-M0044C、E-EL-M0049c);木犀草素、奥司他韦(美国 MedChemExpress 公司,批号:HY-N0162、HY-17016);Trizol 试剂(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号:5301100);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(上海近岸科技有限公司,批号:E047-01B、E096-01B);细胞核染料 DAPI 试剂、Triton X-100 试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号:Coo65、T8200);FITC 荧光二抗(美国 Proteintech Group 公司,批号:SA00003);GAPDH 抗体、VEGF 抗体、Akt 抗体、PI3K 抗体、eNOS 抗体、山羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司,批号:ab8245、ab46154、ab38449、ab278545、ab300071、ab150077)。

1.3 主要仪器

台式高速冷冻离心机、微量冷冻离心机、CO₂ 细胞培养箱(赛默飞世尔科技公司,型号:ST8R、Fresco21、3111);微量移液器(波兰 High Tech Lab 公司,型号:LM20);电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备公司,型号:DK-S22);实时定量 PCR 仪、超微量分光光度计、SDS-PAGE 电泳及转膜设备[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:CFX96TOUCH、Take3、JY300HE+JY-SCZ2+JY-ZY5];倒置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号:AE2000-T);多功能酶标仪(美国博腾仪器有限公司,型号:CYTATION3);倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:IX73)。

1.4 细胞培养及造模方法

MLE-12 细胞于 37 °C、5%CO₂ 培养箱内,用含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养,待细胞增殖至培养瓶约 90%时,再用 0.25%胰酶消化传代。根据本课题组之前的研究工作^[7],病毒感染细胞造模条件如下:待细胞贴壁后,病毒工作液干预细胞 2 h 后去细胞上清液,换含药物的病毒维持液干预 8 h 后收集细胞,处理样本。

1.5 CCK-8 法检测药物细胞毒性

取对数生长期的 MLE-12 细胞重悬,按每孔 5 000 个细胞接种至 96 孔板,待细胞贴壁后进行病毒感染,造模方法同“1.4”。为探究药物最佳作用浓度,病毒感染 2 h 后,按木犀草素的药物浓度(20、10、5、2.5、1.25、0 μ mol/L),共设置 6 组,每组设置 5 个重复孔,药物干预时间为 8 h。8 h 后将 CCK-8 试剂加入 96 孔板内,在 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中继续孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 处测量每个孔的吸光度。计算各组细胞的增殖率和 EC₅₀,确定最佳药物作用浓度。

1.6 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6、TNF- α 含量

取对数生长期的 MLE-12 细胞重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至 6 孔板,待细胞贴壁后进行病毒感染,造模方法同“1.4”。实验设置正常组、模型组、奥司他韦组、高剂量组和低剂量组,奥司他韦组加入 5 μ mol/L 药物^[8],高剂量组和低剂量组根据 CCK-8 实验结果分别加入 5 μ mol/L 和 2.5 μ mol/L 药物。药物干预 8 h 后收集各组细胞上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测各组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 含量。

1.7 免疫荧光法检测各组细胞内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达情况

取对数生长期的 MLE-12 细胞重悬,按每孔 8 000 个细胞接种至 12 孔板,待细胞贴壁后依次进行病毒感染和药物干预,造模方法和分组干预方法同“1.6”。药物干预 8 h 后去细胞上清液,用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,1% BSA 封闭 30 min,VEGF 蛋白一抗(稀释比例为 1:500)4 °C 孵育过夜,山羊抗兔荧光二抗(稀释比例为 1:1 000)37 °C 孵育 1 h,避光核复染,封片,拍照,使用 Image J 软件对细胞荧光强度定量。

1.8 RT-qPCR 检测细胞内 mRNA 表达情况

取对数生长期的 MLE-12 细胞重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至 6 孔板,待细胞贴壁后依次进行病毒感染和药物干预,造模方法和分组干预方法同“1.6”。药物

表1 引物序列

基因	正向(5'-3')	反向(5'-3')	产物长度/bp
β -actin	TCTGGCACCACACCTTCT	GATCTGGGTCATCTTCTCAC	101
Akt	TCAGGATGTGGATCAGCGAGAGTC	AGGCAGCGGATGATAAAGGTGTTG	108
VEGF	GGGCTCTTCTCGCTCCGTAGTAG	CCCTCTCTTCTTCTTCTTCTCCTC	137
PI3K	CGAAACAAAGCGGAGAACCTATTGC	TCTACCACTACGGAGCAGGCATAG	101
eNOS	ATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTC	TAGGTGAGGGCTTGGCTGAGTG	131

干预8 h后收集各组细胞,用 Trizol 提取细胞总RNA,超微量分光光度计检测 RNA 浓度,按照逆转录试剂盒将 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA,根据试剂盒操作说明进行 qPCR 扩增。qPCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,循环 40 次,以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.9 Western blot 法检测细胞内 VEGF、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、3-磷酸肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 蛋白表达情况

取对数生长期的 MLE-12 细胞重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至 6 孔板,待细胞贴壁后依次进行病毒感染和药物干预,造模方法和分组干预方法同“1.6”。药物干预 8 h 后收集各组细胞,RIPA 裂解液提取总蛋白后用 BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后,进行转膜,封闭 1 h 后分别加入 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 蛋白一抗(稀释比例均为 1:10 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(稀释比例 1:10 000)37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加入 ECL 工作液后,在化学发光成像仪中显影成像。使用 Image J 软件分析图像灰度值。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,对数据进行方差齐性检验,方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验,并用 LSD 法进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,先用 Kruskal-Wallis H 检验比较总的差异,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度木犀草素对损伤细胞活性的影响

使用不同浓度的木犀草素对 IAV 感染后的 MLE-12 细胞模型进行干预,与 0 μ mol/L 组相比,木

犀草素各剂量组均能降低病毒引起的细胞损伤,且出现不同程度的增殖($P < 0.01$),其 $EC_{50} = 7.204 \mu$ mol/L,基于此,在后续的体外实验中,药物干预浓度选择 5 μ mol/L 和 2.5 μ mol/L。详见图 1。

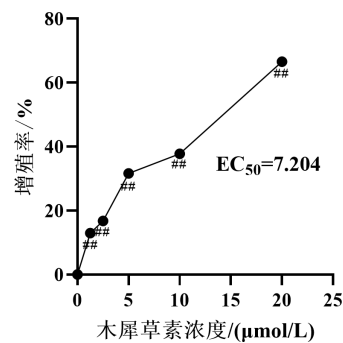


图1 各组细胞的增殖情况

注:与 0 μ mol/L 组相比,## $P < 0.01$ 。

2.2 木犀草素对细胞形态及细胞活性的影响

正常组细胞呈梭形,细胞形态完整;与正常组相比,模型组细胞活性降低($P < 0.01$),细胞形态发生变化,视野内出现细胞碎片;与模型组相比,各药物组均能不同程度地修复病毒感染后的细胞损伤,细胞活性增加($P < 0.01$),视野内细胞碎片减少。详见图2。

2.3 木犀草素对细胞上清液中炎症细胞因子释放的影响

与正常组相比,模型组细胞上清液中 IL-6、TNF- α 水平增加($P < 0.01$);与模型组相比,各药物组 IL-6、TNF- α 表达水平降低($P < 0.01$)。详见图 3。

2.4 木犀草素对细胞 VEGF 蛋白荧光强度的影响

与正常组相比,模型组细胞内 VEGF 蛋白荧光强度明显增强($P < 0.01$);与模型组相比,各药物组荧光强度明显降低($P < 0.01$)。详见图 4。

2.5 木犀草素对细胞 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS mRNA 表达的影响

与正常组相比,模型组 VEGF、Akt、PI3K、eNOS 表达增加($P < 0.01$);与模型组相比,各药物组 VEGF、Akt、PI3K、eNOS 表达降低($P < 0.01$)。详见图 5。

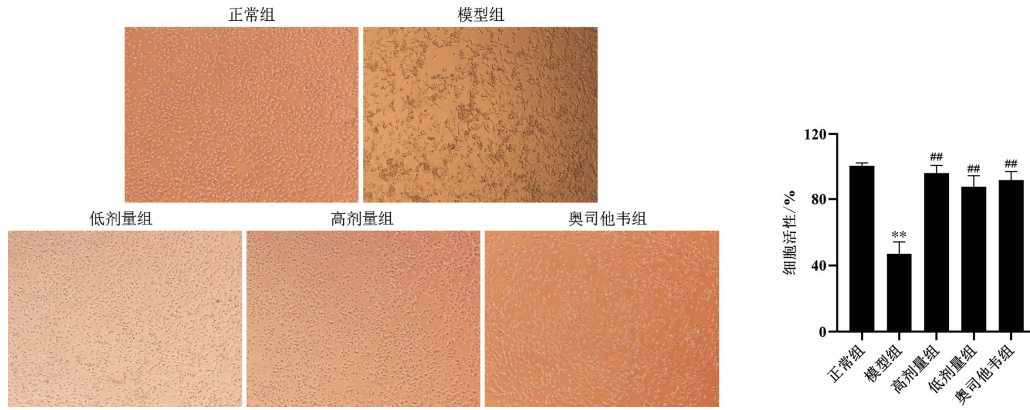


图 2 各组细胞形态及细胞活性比较(倒置显微镜,×40)

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

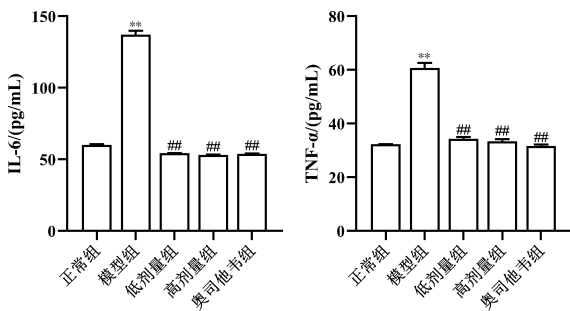


图 3 各组细胞炎症细胞因子水平比较

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

2.6 木犀草素对细胞 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS

蛋白表达增加($P<0.01$);与模型组相比,各药物组 VEGF、Akt、PI3K 和 eNOS 蛋白表达均降低($P<0.01$)。详见图 6。

3 讨论

IAV 感染后刺激肺内和循环血液中的中性粒细胞进入肺泡腔内,通过释放炎症细胞因子进而引起弥漫性肺损伤和血管内皮损害,导致急性肺水肿或急性呼吸窘迫综合征^[9]。抗病毒药物如奥司他韦等多用于临床治疗流行性感冒,但病毒变异株和耐药性大大限制了抗病毒药物在临床上的使用^[10]。中医药在治疗流行性感冒方面具有丰富的临床诊疗经验,

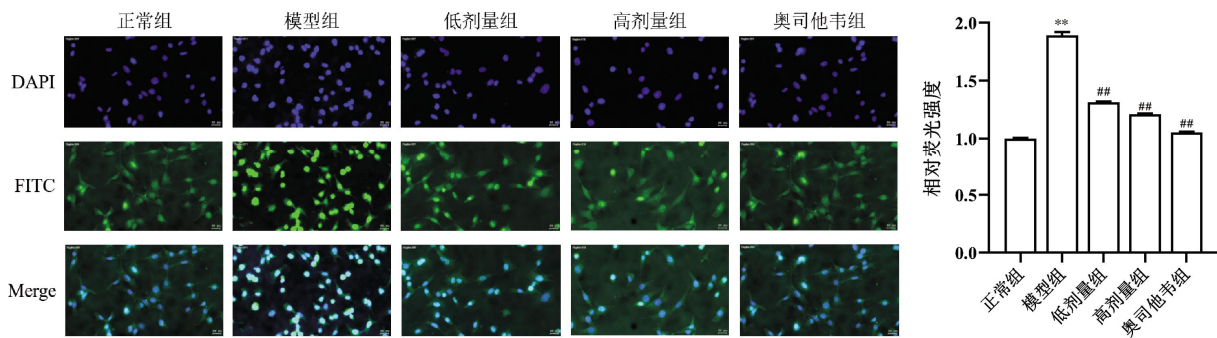


图 4 各组细胞 VEGF 蛋白表达情况比较

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

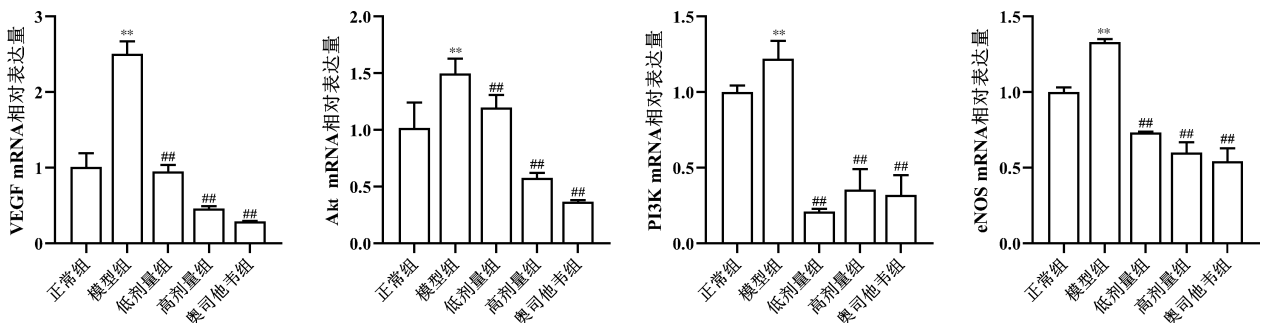


图 5 各组细胞内 VEGF 信号通路相关 mRNA 表达水平比较

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

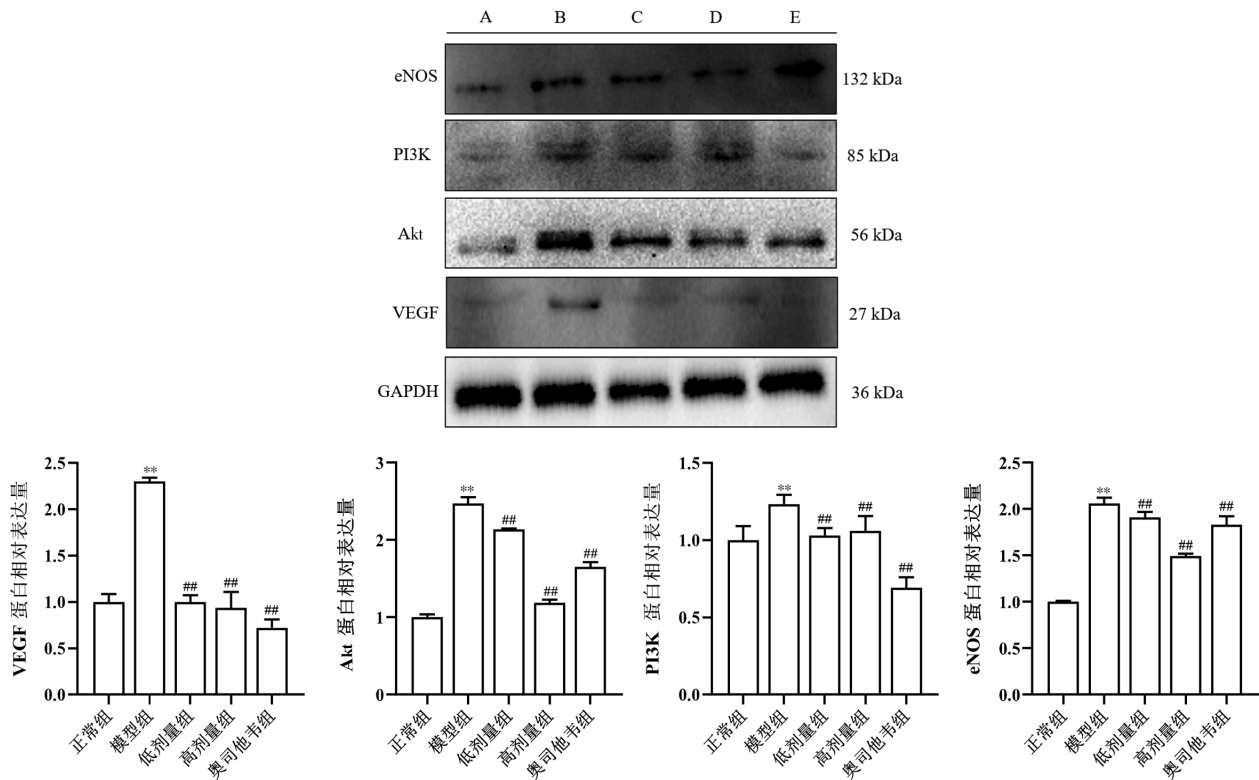


图6 各组细胞中 VEGF 信号通路相关蛋白表达水平比较

注:A.正常组;B.模型组;C.低剂量组;D.高剂量组;E.奥司他韦组。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

具有安全性高、不易产生耐药性以及毒副作用少等特点。木犀草素作为一种可以从多种中草药中分离出来的类黄酮多酚化合物,具有抗炎、抗氧化等多种生理活性^[11]。本研究通过构建 IAV 诱导小鼠肺上皮细胞损伤模型,进一步探索和挖掘木犀草素治疗流行性感冒的作用机制,以期为木犀草素在未来临床治疗流感病毒性肺损伤中提供实验依据。

研究表明,入侵宿主的流感病毒 RNA 可通过多种模式识别受体,促进干扰素、炎性细胞因子、类花生酸、趋化因子等的分泌,从而引发局部和全身炎症,造成机体肺部的损伤,甚至组织的破坏^[12]。因此,炎性细胞因子的表达可作为确定流行性感冒严重程度和药物治疗效果的重要指标。本研究结果证实,木犀草素可抑制 IAV 感染诱导的炎性细胞因子释放,提示木犀草素可能通过减少感染后炎性细胞因子的分泌来减轻 IAV 诱导的细胞炎症。新生血管的生成在机体的发育和生理稳态过程中至关重要,血管将营养物质输送到组织和器官并去除分解代谢产物,但不受控的血管生长,对许多疾病过程有促进作用^[13]。在血管生成、炎性血管生成以及淋巴管生成过程中,VEGF 扮演着至关重要的角色^[14]。VEGF 家族成员包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE

和胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF),其中 VEGFA 是研究最多的成员,也是最主要的成员,通常被简称为 VEGF^[15]。作为一种多功能细胞生长因子,VEGF 与血管通透性的增加和血管内皮细胞的增殖、修复有关^[16]。作为血管生成和通透性的关键调节因子,VEGF 介导的 PI3K/Akt/eNOS 通路对调节血管内皮细胞增殖、调节炎症反应具有重要作用^[17-18]。研究表明,VEGF 表达的变化在急性肺损伤、支气管哮喘和肺纤维化等一些常见呼吸道疾病的病理生理变化中扮演着重要角色^[19-21]。大量实验研究表明,VEGF 过度表达可能造成高渗透性肺水肿^[22]。临床研究也发现了血浆 VEGF 水平升高的急性呼吸窘迫综合征患者^[23]。IAV 感染导致的肺部炎症和肺损伤可以促进肺血管增厚、炎性渗出增多^[24]。本研究结果显示,IAV 感染可以升高细胞 VEGF、PI3K、Akt 及 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达,表明当 IAV 感染细胞时,可以刺激细胞 VEGF 的生成和释放,进而刺激细胞 PI3K 和 Akt 的活化,活化后的 Akt 可使刺激血管重塑和血管新生的 eNOS 活化后产生一氧化氮(nitric oxide, NO),促进炎性细胞因子分泌增加,在使用木犀草素治疗后可降低 VEGF、PI3K、Akt 及 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达,提示在木犀草素防治

流感病毒性肺损伤中, VEGF 介导的 PI3K/Akt/eNOS 信号轴发挥着重要作用。

综上所述, 木犀草素能有效缓解 IAV 所致的细胞损伤, 其作用机制可能是通过抑制 VEGF 介导的 PI3K/Akt/eNOS 信号通路, 从而抑制相关炎症反应, 最终抑制 IAV 感染引起的细胞损伤。

参考文献

- [1] ZHU M, MA X, HUANG J, et al. Extracellular vesicle-derived miR-1249-5p regulates influenza A virus-induced acute lung injury in RAW246.7 cells through targeting SLC4A1[J]. *Microbes and Infection*, 2022, 24(8): 104998.
- [2] 张 彧, 吴东升, 齐 堃, 等. 五倍子酯提取物抗流感病毒诱导的小鼠急性肺损伤作用机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(12): 1366-1370.
- [3] 李文娟, 王大燕. 我国流感疾病负担相关研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(10): 928-933.
- [4] AMARELLE L, LECUONA E, SZNAJDER J. Anti-influenza treatment: drugs currently used and under development[J]. *Archivos De Bronconeumologia*, 2017, 53(1): 19-26.
- [5] LIN Y, SHI R, WANG X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2008, 8(7): 634-646.
- [6] WU B, SONG H, FAN M, et al. Luteolin attenuates sepsis-induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 45(5): 1477-1487.
- [7] 马心悦, 朱梦晨, 卢芳国, 等. 流感病毒诱导的小鼠肺上皮细胞损伤及外泌体 miRNA 差异表达谱研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(1): 40-49.
- [8] LIU H, JIANG C, WU Y, et al. Antiviral effects of ABMA and DABMA against influenza virus in vitro and in vivo via regulating the endolysosomal pathway and autophagy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3940.
- [9] 尹香琳, 张婧瑶, 刘卫东, 等. 1-磷酸鞘氨醇受体 2 介导 PI3K/Akt/eNOS 通路抑制甲型流感病毒诱导的病毒性肺炎[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(11): 2062-2067.
- [10] 赵 澄, 吴 涛, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肺组织 CCL3、CCL25 表达水平的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(10): 1216-1220.
- [11] YAN H, MA L, WANG H, et al. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2019, 73(3): 487-496.
- [12] MIFSUD E J, KUBA M, BARR I G. Innate immune responses to influenza virus infections in the upper respiratory tract[J]. *Viruses-Basel*, 2021, 13(10): 2090.
- [13] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [14] 陶一秋, 杜佳琦, 张冬梅, 等. 柏氏清热散瘀方对肛裂术后创面血管生成及 VEGF 水平的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2022, 24(1): 79-81.
- [15] CHEN L, CAO Y, SHEN Y, et al. Downregulation of PIK3IP1 in retinal microglia promotes retinal pathological neovascularization via PI3K-Akt pathway activation[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 12754.
- [16] TRIMM E, RED-HORSE K. Vascular endothelial cell development and diversity[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2023, 20(3): 197-210.
- [17] LEE S H, LEE S H, KIM C H, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in lung tissue of patients with chronic bronchitis[J]. *Clinical Biochemistry*, 2014, 47(7-8): 552-559.
- [18] 郭利培, 刘 洁, 张文青, 等. 吴茱萸碱调控 PI3K/Akt 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4): 612-618.
- [19] FAN J, LV H, LI J, et al. Roles of Nrf2/HO-1 and HIF-1 α /VEGF in lung tissue injury and repair following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(6): 7695-7707.
- [20] 谢丽华, 蔺晓源, 何 飘, 等. 基于网络药理学与分子对接法探寻双黄连口服液治疗新型冠状病毒肺炎的有效成分及机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(9): 1123-1131.
- [21] LU Y Z, LIANG L M, CHENG P P, et al. VEGF/Src signaling mediated pleural barrier damage and increased permeability contributes to subpleural pulmonary fibrosis[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2021, 320(6): L990-L1004.
- [22] YOKOKAWA T, SUGIMOTO K, KIMISHIMA Y, et al. Pulmonary hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia related to an ACVRL1 mutation[J]. *Internal Medicine*, 2020, 59(2): 221-227.
- [23] VASSILIOU A G, KOTANIDOU A, DIMOPOULOU I, et al. Endothelial damage in Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8793.
- [24] 阎昱升, 湛 韬. 六神胶囊联合磷酸奥司他韦胶囊治疗流行性感冒的临床研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(1): 109-113.

(本文编辑 周 旦)