

# 燕窝酶解液的制备及其抗流感病毒作用初探

路鑫怡 沃恩康 杨新燕 杨灿 徐琦 杨柳 何泳愉 项婷婷 郭潮潭

杭州医学院检验医学院与生物工程学院, 杭州 310013

通信作者: 郭潮潭, Email: gchaotan@163.com

**【摘要】** 目的 制备燕窝酶解液并初步了解其抗流感病毒的方式和效果。方法 以唾液酸提取率为评价标准, 选择最佳酶解时长和液料比, 获取燕窝酶解液。通过实时荧光定量 PCR 和血凝试验分析并明确燕窝酶解液对流感病毒的抑制方式和单个复制周期中的作用环节。试验同时设立病毒对照组。采用实时荧光定量 PCR 和 Western 印迹法检测燕窝干预下 NF- $\kappa$ B 的表达情况和炎症细胞因子转录水平的变化。结果 在液料比 45:1、酶解时长不低于 3 h 的条件下获得燕窝酶解液, 唾液酸的提取率为 (66.87 $\pm$ 0.05)%。相比病毒对照组, 燕窝酶解液通过直接抑制流感病毒的方式降低病毒基因 NP 和 M 的转录水平 ( $t=2.81$  和  $3.34$ ,  $P=0.023$  和  $0.010$ )。在病毒复制过程中燕窝酶解液在病毒感染初期和复制初期 (0 h 和 2 h) 发挥抑制效果, NP 基因转录相比病毒对照组显著降低 ( $t=13.79$  和  $21.84$ ,  $P=0.005$  和  $0.002$ )。与燕窝液组相比, 在燕窝酶解液干预下, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ Bp65 的表达也降低 ( $t=15.12$ 、 $21.31$ 、 $4.85$ 、 $7.40$ 、 $13.77$  和  $29.39$ ,  $P$  均  $<0.05$ )。结论 通过酶解的方式可以提高燕窝的抗流感病毒效果, 燕窝酶解液能够抑制流感病毒引起的炎症因子表达。

**【关键词】** 流感病毒 A 型; 燕窝; 酶解液; 抗流感病毒; 炎症因子; 抑制

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (ZZ13-035-01); 国家卫生和计划生育委员会科研基金 (WKJ-ZJ-1508); 浙江省基础公益研究计划 (LQY19190001、LGF18C180001、LY18H100005、QQ20H190001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220130-00021

## Preparation of enzymatic solution of bird's nest and its anti-influenza virus effect

Lu Xinyi, Wo Enkang, Yang Xinyan, Yang Can, Xu Qi, Yang Liu, He Yongyu, Xiang Tingting, Guo Chaotan

School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China

Corresponding author: Guo Chaotan, Email: gchaotan@163.com

**【Abstract】 Objective** To prepare the enzymatic solution of bird's nest and to preliminarily understand its mode and effectiveness against influenza virus. **Methods** The optimal enzymatic digestion time and liquid-to-material ratio were selected to obtain enzymatic solution of bird's nest by using sialic acid extraction rate as the evaluation criteria. The mode of inhibition of influenza virus by enzymatic solution of bird's nest and the role of the individual replication cycle were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR and hemagglutination test. Virus control group was established simultaneously. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were also used to detect the expression of NF- $\kappa$ B and the change of inflammatory cytokine transcript levels under bird's nest intervention. **Results** The enzymatic solution of bird's nest was obtained with the extraction rate of sialic acid of (66.87 $\pm$ 0.045) % at the liquid-to-material ratio of 45:1 and the duration of enzymatic digestion of not less than 3 h. Compared to the virus control group, enzymatic solution of bird's nest reduced the transcript levels of NP and M viral genes ( $t=2.81$  and  $3.34$ ,  $P=0.023$  and  $0.010$ ) by directly inhibiting the influenza virus. During viral replication, enzymatic solution of bird's nest played an inhibitory role at the beginning of virus infection and early replication (0 h and 2 h), and the transcription level of NP gene decreased significantly compared with the virus control group ( $t=13.79$  and  $21.84$ ,  $P=0.005$  and  $0.002$ ). Compared with bird's nest group, the expressions of inflammatory factors such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ Bp65 reduced by the intervention of bird's nest enzymatic solution ( $t=15.12$ ,  $21.31$ ,  $4.85$ ,  $7.40$ ,  $13.77$  and  $29.39$ ,  $P$  all  $<0.05$ ). **Conclusions** The anti-influenza virus effect of bird's nest can be improved by enzymatic digestion, and the enzymatic solution of bird's nest can inhibit the expression of inflammatory

factors induced by influenza virus.

**【Key words】** Influenza A virus; Bird's nest; Enzymatic solution; Anti-influenza virus; Inflammatory factors; Inhibition

**Fund program:** Fundamental Research Fund for the Central Public Welfare Research Institutes (ZZ13-035001); Foundation of National Health and Family Planning Commission of China (WKJ-ZJ-1508); Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang (LQY19190001, LGF18C180001, LY18H100005, QQ20H190001)

DOI: 10.3760/ema.j.cn331340-20220130-00021

流感病毒是一种急性人畜共患传染病,抗流感病毒药物是控制流感的重要手段,但因病毒易发生变异,使得药物易产生耐药性。有研究显示,从燕窝水提液中获得的一种病毒血凝反应抑制剂,具有广谱抗病毒效应<sup>[1-2]</sup>,可见有效利用燕窝活性成分,可为抗流感病毒药物的研发打下基础。对燕窝进行酶提取,可减少其中过敏性和难消化的化合物<sup>[3]</sup>。本研究尝试建立燕窝酶解液的制备方法,并研究其抗流感病毒作用,现报告如下。

### 材料与方 法

#### 一、细胞系与病毒株

犬肾上皮细胞系 MDCK 细胞,小鼠单核巨噬细胞系 Raw264.7 细胞,病毒株 A/Memphis/1/71(H3N2) (简称 Memphis)均为本实验室保存。MDCK 细胞采用 5%新生牛血清(NBS)的 DMEM 培养;Raw264.7 细胞采用 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养。感染性实验均使用含有 1 μg/mL TPCK 胰酶的 DMEM 作为稀释缓冲液。

#### 二、试剂及设备

燕窝购自华东医药;中性蛋白酶和茚三酮试剂购自上海源叶生物科技有限公司;冰醋酸、硫酸铵购自上海麦克林生化科技有限公司;RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒和 SYBR Green 荧光定量试剂购自翊圣生物科技有限公司;DMEM/High 培养基购自 Cellmax;NP 抗体、M2e 抗体、M1a 抗体 (1:1 000)由本实验室制备并保存;β-actin 抗体 (1:1 000)、Phospho-IKKα/β 抗体、IKKα/β 抗体、Phospho-NF-κBp65 抗体和 NF-κBp65 抗体购自 Cell Signaling 科技公司;山羊抗小鼠、山羊抗兔 HRP 抗体(1:5 000)购自杭州华安生物科技有限公司;MTT、二甲基亚砷

(DMSO)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;引物合成委托上海捷瑞生物技术有限公司,引物序列如表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
NP	CAACATACCAGAGGA-CAAG	ATCAACTCCATCAC-CATTG
M	AAGTGAGCAGGCAGCA-GAG	CTCGCAGCAACAACAA-GAGG
IL-1β	ACTGATGAGAATGACCT-GTT	GATACTGCCTGCCTGAAG
IL-6	TCCATCCAGTTGCCTTCT	TAAGCCTCCGACTTGTGA
IFN-γ	ATCTGGAGGAACTG-GCAA	CTGTGATTCAAT-GACGCTTA
TNF-α	GACCCCTCACACTCAGAT-CATCTTCT	GCTACGACGTGGGC-TACAG
NG-κBp65	GAAGCACAGATACCAC-CAA	CAGCCTCATAGTAGC-CATC
GAPDH	GAAGGTCGGTGT-GAACGGATTG	CATGTAGACCATG-TAGTTGAGGTCA

注:NP:流感病毒核蛋白;M:流感病毒基质蛋白;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

设备包括:可见/紫外分光光度计(Biochrom)、低温高速离心机(Kubota)、StepOnePlus™ Real-time PCR 仪(Applied Biosystems)、电热恒温水槽(常州诺基仪器有限公司)、酶标仪(KHB ST-360)、生物安全柜(ESCO)、化学发光成像仪(GE 公司)。

#### 三、方法

##### 1. 确定燕窝酶解条件

称取 0.12 g 燕窝放入锥形瓶中,按照液料比分别为 20:1、30:1、40:1、45:1 和 50:1 加入蒸馏水使燕窝充分溶胀。随后各添加 10 mL 中性蛋白酶,酶解 1 h,而后沸水浴 10 min 使酶灭活。取 10 mL 酶解后的液体加入 10 mL 的 50%醋酸溶液。在酸性环境下利用茚三酮试剂测定不同液料比对唾液酸提取率

的影响。在固定合适液料比的情况下,试验不同的酶解时长(0~8 h)对唾液酸提取率的影响。每个液料比和每个酶解时长重复 6 次。

唾液酸提取率计算公式为: $x=[c \times 50 \times 10^{-9} / (V \times 0.006077)] \times 100\%$

式中, $x$ 表示唾液酸提取率(%); $c$ 表示从标准曲线上查到的唾液酸浓度(mg/mL); $V$ 表示样本体积(mL);50表示提取后定容体积(mL);0.006077表示1 g 标准燕窝中唾液酸的含量(g)。

## 2. 燕窝酶解液对 MDCK 细胞毒性作用

用不含血清的细胞培养液将燕窝酶解液、燕窝液和中性蛋白酶分别从 2.4 mg/mL 和 5.52 mg/mL 按 2 倍倍比稀释为 8 个浓度。MDCK 细胞接种于 96 孔板中,每孔加入 2 倍稀释的样本,每个稀释度重复 6 次。同时设立正常细胞对照组和空白调零组,置于培养箱中培养 24 h,用 MTT 检测细胞存活情况并计算细胞存活率,选择细胞生存率高于 50% 的浓度作为样本最大使用浓度<sup>[4-6]</sup>。细胞存活率 $=[(\text{实验孔吸光度}-\text{空白孔吸光度})/(\text{对照孔吸光度}-\text{空白孔吸光度})] \times 100\%$ 。

## 3. 燕窝酶解液对流感病毒的体外抑制试验

采用以下 3 种方式进行燕窝酶解液对流感病毒的体外抑制试验:①对流感病毒的直接抑制:燕窝酶解液和 4 HAU 的病毒液混匀置于 37 °C 孵育 4 h,混合液加入 MDCK 细胞感染 1 h,弃去混合液,用 PBS 洗去多余病毒后加入无血清培养液继续培养 24 h;②对流感病毒吸附阶段的抑制:燕窝酶解液加入细胞培养板中吸附 4 h,弃去后用 PBS 洗去多余燕窝并加入 4 HAU 的病毒液接种 1 h,弃去后用 PBS 洗去多余病毒,加入无血清培养液继续培养 24 h;③对流感病毒吸附后复制增殖的抑制:MDCK 细胞中加入 4 HAU 的病毒液接种 1 h,弃去后用 PBS 洗去多余病毒,用不含血清的燕窝酶解液继续培养 24 h。试验根据所需的样本分为 3 组:燕窝酶解液组、燕窝液组和中性蛋白酶组,同时设立病毒对照组。24 h 后收集细胞上清进行血凝试验,根据细胞上清在稀释数倍后是否引起红细胞凝集现象判断子代病毒产生量,每组重复 2 次;收

集细胞分别进行实时荧光定量 PCR 对流感病毒的核蛋白 NP 和基质蛋白 M 的转录情况进行检测,每组重复 3 次。

## 4. 燕窝酶解液对流感病毒作用时间试验

MDCK 细胞接种于 6 孔板,用 4 HAU 病毒液吸附 MDCK 细胞,作用 1 h 后用 PBS 洗去未吸附的病毒,接着加入无血清培养基进行孵育。将燕窝酶解液/燕窝液分别在吸附前 4 h(-4 h)和吸附前 2 h(-2 h),病毒开始孵育(0 h)、病毒孵育后 2 h(2 h)和孵育后 4 h(4 h)加入细胞孔中。24 h 后收集细胞采用实时荧光定量 PCR 检测流感病毒 NP 的转录水平,每组重复 3 次。根据所用的试验样本分为燕窝酶解液组和燕窝液组,另设病毒对照组加入等量 PBS。

5. 燕窝酶解液对流感病毒激活的 NF- $\kappa$ B 及炎症因子表达水平影响的检测

燕窝酶解液和燕窝液分别与 4 HAU 病毒液混合均匀置于 37 °C 孵育 4 h。4 h 后分别加入到 Raw264.7 细胞中感染 1 h,弃去混合液后继续培养 24 h。24 h 后收集细胞进行实时荧光定量 PCR 和 Western 印迹法,每组重复 3 次。

## 四、统计学分析

采用 Graphpad.Prism.v8.0 软件对数据进行作图绘制并进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、液料比和酶解时长

从图 1 ①中可见,燕窝中唾液酸的提取率随液料比的增大而上升,在 45:1 时最高,达到(35.24 $\pm$ 0.18)%,此后在液料比为 50:1 时,提取率下降至(11.38 $\pm$ 0.02)%。从图 1 ②中可见,在液料比为 45:1 的条件下,燕窝中唾液酸的提取率在 3 h 时达到最大值,为(66.87 $\pm$ 0.05)%,此后随着酶解的时间延长提取率未见明显升高。为使燕窝中唾液酸的提取率达到理想条件,确定酶解的条件为:液料比 45:1 和酶解时长不低于 3 h。

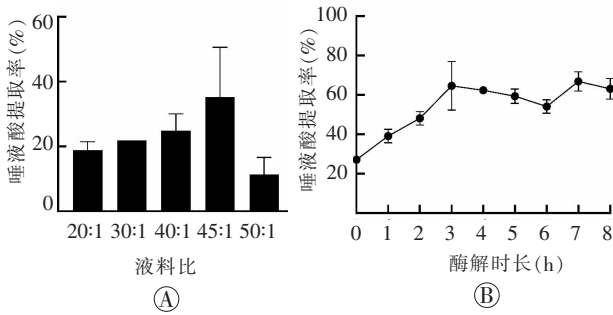


图 1 不同液料比(A)和液料比为 45:1 的条件下不同酶解时长(B)对燕窝唾液酸提取率的影响(n=6)

二、燕窝酶解液的细胞毒性

图 2 所示,随着稀释倍数的增加和样本浓度的降低,燕窝酶解液组和中性蛋白酶组细胞生存率逐渐增高,燕窝组细胞生存率与浓度未见明显的依赖关系。选择细胞生存率高于 50% 的浓度作为最大使用浓度,显示燕窝酶解液组和燕窝液组的最大使用浓度均为 1.22 mg/mL,中性蛋白酶组为 0.69 mg/mL。

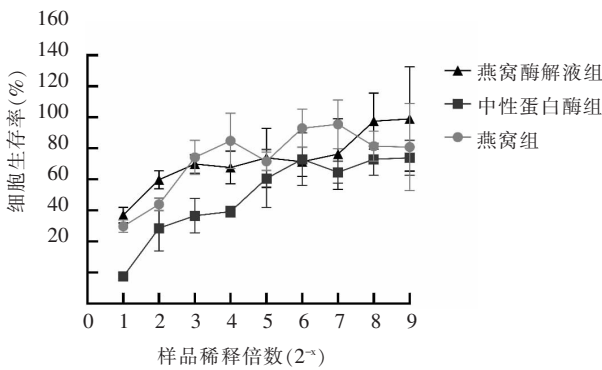


图 2 燕窝酶解液对 MDCK 细胞毒性作用(n=6)

三、燕窝酶解液对流感病毒的体外抑制作用

1.对子代病毒的影响

如图 3 所示,使用流感病毒吸附后复制增殖的

抑制方式,燕窝酶解液组子代病毒产生量为病毒对照组的 1/4;而使用直接抑制方式,子代病毒产生量为病毒对照组的 1/2。燕窝酶解液组和燕窝液组对流感病毒吸附阶段的抑制作用不影响子代病毒的产生。

2.不同抑制方式对流感病毒基因 NP 和 M 转录水平的影响

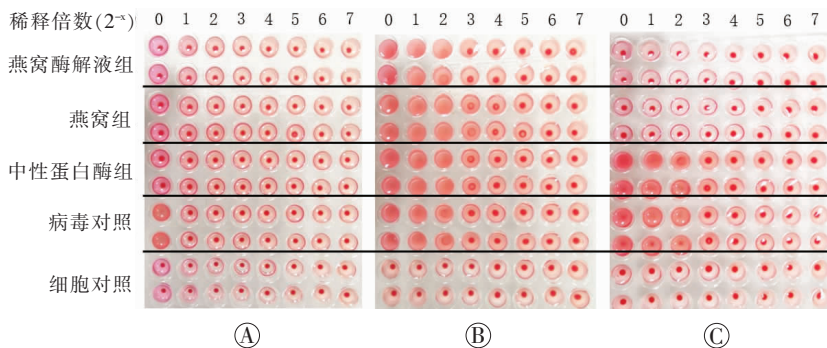
采用直接抑制方式,不同组别的流感病毒基因 NP 和 M 差异均有统计学意义(F=9.92, P=0.005; F=11.27, P=0.003),详见表 2。与病毒对照组相比,燕窝酶解液组 NP 和 M 的转录水平明显降低(t=-2.81, P=0.023; t=-3.34, P=0.010),而中性蛋白酶组升高(t=2.16, P=0.040; t=2.38, P=0.045)。

采用吸附阶段进行抑制,不同组别的流感病毒基因 NP 和 M 转录水平差异均有统计学意义(F=6.14, P=0.018; F=14.31, P<0.001),详见表 2。与病毒对照组相比,燕窝酶解液组 NP 和 M 的转录水平升高近 2 倍(t=2.56, P=0.034; t=3.41, P=0.009),而燕窝液组降低(t=-1.57, P=0.154; t=-3.11, P=0.014)。

采用吸附后复制增殖进行抑制,不同组别的流感病毒基因 M 的转录水平差异具有统计学意义(F=6.24, P=0.017),详见表 2。相比病毒对照组,燕窝液组 M 的转录水平降低(t=-3.05, P=0.016)。

四、燕窝酶解液在不同作用时间抑制流感病毒的效果

表 3 显示,不同组别在不同作用时间 NP 转录水平比较差异有统计学意义(F=230.90, 5.76, 197.00、



注: (A)为不同组别对流感病毒的直接抑制; (B)为不同组别对流感病毒吸附阶段的抑制; (C)为不同组别对流感病毒吸附后复制增殖的抑制

图 3 燕窝酶解液不同体外抑制方式对子代流感病毒产生量的影响

表 2 燕窝酶解液不同体外抑制方式对病毒基因 NP 和 M 转录水平的影响

组别	份数	相对于病毒对照组病毒基因 NP 和 M 的相对转录水平					
		直接抑制		吸附阶段抑制		吸附后复制增殖阶段抑制	
		NP	M	NP	M	NP	M
燕窝酶解液组	3	0.41±0.14 <sup>a</sup>	0.43±0.06 <sup>a</sup>	1.09±0.16 <sup>a</sup>	1.13±0.14 <sup>a</sup>	1.69±0.27	1.67±0.24
燕窝液组	3	0.73±0.20	0.74±0.13	0.91±0.18 <sup>b</sup>	0.61±0.18 <sup>ab</sup>	0.58±0.08	0.39±0.14 <sup>ab</sup>
中性蛋白酶组	3	1.52±0.34 <sup>ab</sup>	1.41±0.31 <sup>ab</sup>	1.40±0.20	1.00±0.12 <sup>b</sup>	1.31±0.46 <sup>a</sup>	0.93±0.29
F 值		9.92	11.27	6.14	14.31	3.79	6.24
P 值		0.005	0.003	0.018	<0.001	0.059	0.017

注:NP:流感病毒核蛋白;M:流感病毒基质蛋白;三种抑制模式下各自病毒对照组的 Ct 平均值取等于 1;直接抑制模式下,NP:16.82±0.06;M:16.14±0.90;吸附阶段抑制模式下,NP:13.51±1.03;M:12.78±0.18;吸附后复制增殖阶段抑制模式下,NP:13.42±0.75;M:12.90±0.03;<sup>a</sup>:与病毒对照组相比,*P*<0.05;<sup>b</sup>:与燕窝酶解液组相比,*P*<0.05

427.20 和 39.89, *P* 均<0.05)。与病毒对照组相比,在 0 h 和 2 h 时燕窝酶解液组 NP 基因的转录水平降低 10 倍 ( $t=-13.79, P=0.005; t=-21.84, P=0.002$ ); 燕窝液组 NP 转录水平也降低 ( $t=-13.22, P=0.006; t=-36.94, P=0.001$ ), 差异具有统计学意义; 在-4 h 和-2 h 及 4 h 加入燕窝酶解液处理组,NP 基因转录水平升高 ( $t=19.22, P=0.003; t=2.97, P=0.097; t=2.43, P=0.136$ )。

五、燕窝酶解液抑制流感病毒引起的炎症因子表达的结果

表 4 和图 4 显示,与燕窝液组相比,燕窝酶解液组的病毒 NP、M、炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B 及其家族成员 NF- $\kappa$ Bp65 的转录水平

均降低 ( $t=-13.15, -15.27, -15.12, -21.31, -4.85, -7.40, -13.77$  和  $-29.39, P$  均<0.05)。燕窝酶解液处理组的 NF- $\kappa$ Bp65 及其前体 IKK 蛋白的磷酸化程度和蛋白表达量也都降低。

### 讨 论

燕窝水提取物可以抑制流感病毒感染犬肾细胞和红细胞血凝反应,能安全有效预防流感病毒<sup>[2]</sup>。中性蛋白酶作为一种天然酶制剂,既能够催化分解燕窝中蛋白质为小分子的蛋白、小肽和游离的氨基酸,同时其本身不会对燕窝的生物学特性产生影响,本文通过对燕窝的酶解提取,探讨其对抗病毒作用的影响,为进一步研究燕窝抗流感机制提供参考。

表 3 燕窝酶解液不同作用时间对流感病毒 NP 转录水平的影响

组别	份数	不同作用时间流感病毒 NP 的转录水平				
		-4 h	-2 h	0 h	2 h	4 h
病毒对照组	3	4.84×10 <sup>6</sup> ±2.72×10 <sup>5</sup>	1.15×10 <sup>7</sup> ±3.03×10 <sup>5</sup>	1.14×10 <sup>7</sup> ±9.64×10 <sup>5</sup>	1.36×10 <sup>7</sup> ±6.29×10 <sup>5</sup>	1.11×10 <sup>7</sup> ±6.12×10 <sup>5</sup>
燕窝酶解液组	3	1.93×10 <sup>7</sup> ±7.91×10 <sup>5a</sup>	1.42×10 <sup>7</sup> ±1.03×10 <sup>6</sup>	1.08×10 <sup>6</sup> ±1.14×10 <sup>5a</sup>	1.28×10 <sup>6</sup> ±3.83×10 <sup>5a</sup>	1.35×10 <sup>7</sup> ±8.43×10 <sup>5a</sup>
燕窝液组	3	1.61×10 <sup>7</sup> ±8.91×10 <sup>5a</sup>	1.34×10 <sup>7</sup> ±9.36×10 <sup>5</sup>	2.69×10 <sup>6</sup> ±3.39×10 <sup>4a</sup>	2.03×10 <sup>6</sup> ±3.63×10 <sup>5a</sup>	1.81×10 <sup>7</sup> ±89.13×10 <sup>5a</sup>
F 值		230.90	5.76	197.00	427.20	29.89
P 值		<0.001	0.040	<0.001	<0.001	<0.001

注:组间两两比较采用 LSD 检验,<sup>a</sup>:表示与病毒对照组相比,*P*<0.05

表 4 燕窝酶解液对流感病毒基因及炎症因子转录水平的影响

组别	份数	流感病毒基因及炎症因子的转录水平							
		NP	M	NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ Bp65	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
病毒+燕窝酶解液组	6	0.64±0.12	0.99±0.24	0.29±0.05	0.24±0.03	89.21±12.17	0.018±0.004	8.41±0.99	0.019±0.002
病毒+燕窝液组	6	0.89±0.19	1.20±0.32	0.73±0.18	0.49±0.04	304.68±25.86	0.360±0.022	15.91±1.95	0.307±0.005
t 值		-13.15	-15.27	-13.77	-29.39	-15.12	-21.31	-4.85	-7.40
P 值		0.048	0.016	0.027	0.003	<0.001	<0.001	0.002	0.008

注:NP:流感病毒核蛋白;M:流感病毒基质蛋白

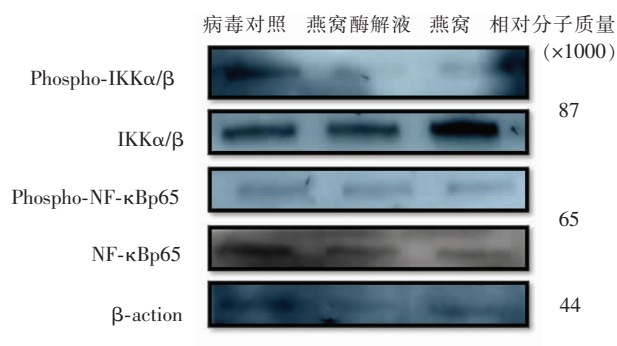


图 4 燕窝酶解液抑制 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达结果

一、确定了燕窝唾液酸提取率和燕窝酶解液的最大无毒浓度

在最佳液料比和酶解时长条件下,燕窝唾液酸的提取率可以达到 $(66.87\pm 0.05)\%$ ,高于未经酶解的燕窝唾液酸。本研究通过 MTT 法测定出燕窝酶解液在细胞上最大无毒浓度为 1.22 mg/mL。

二、燕窝酶解液可通过直接作用的方式抑制病毒感染并在感染初期发挥作用

从本文子代病毒产生的结果来看,燕窝酶解液可以通过直接抑制流感病毒和抑制病毒吸附后增殖的 2 种方式来降低子代病毒产生量。从病毒基因 NP 和 M 的转录水平上看,燕窝酶解液仅能通过直接抑制的方式降低病毒基因转录,其作用机制可能是酶解液通过影响流感病毒的穿入和内化过程降低了病毒 NP 的转录水平。本文试验结果表明燕窝酶解液和燕窝液主要在病毒孵育初期(0 h)发挥作用,降低病毒基因 NP 的转录。相比燕窝液,燕窝酶解液的效果更好,NP 的表达更低。

三、燕窝酶解液可以降低炎症因子的表达

NF- $\kappa$ B 的激活与流感病毒感染后双向相关,感染早期 NF- $\kappa$ B 被激活,感染后期 NF- $\kappa$ B 参与病毒的复制<sup>[7-8]</sup>。本试验结果显示燕窝酶解液可以直接作用于流感病毒,降低病毒基因 NP 和 M 的转录水平,降低 NF- $\kappa$ B 及其前体蛋白的表达。NF- $\kappa$ B 能启动和调控众多参与炎症过程细胞因子和炎症介质的基因表达<sup>[9-11]</sup>,但燕窝如何激活免疫信号通路还需要深入研究。

四、结语

综上,酶解过程可以提高燕窝中唾液酸的提取

率,制备的燕窝酶解液可以抑制流感病毒转录水平 NF- $\kappa$ B 蛋白及调控的炎症因子的表达。本文结果表明进一步探讨燕窝与流感病毒的作用机制,可以为流感病毒的防治和药物研发提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 路鑫怡:实验研究、采集数据、分析数据、统计分析、论文撰写及修改;沃恩康,杨新燕,杨灿,徐琦,杨柳,何泳愉,项婷婷:论文修改;郭潮潭:研究指导、论文指导、经费支持

## 参 考 文 献

- [1] Guo CT, Takahashi N, Yagi H, et al. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors [J]. *Glycobiology*, 2007,17(7):713-724. DOI: 10.1093/glycob/cwm038.
- [2] Guo CT, Takahashi T, Bukawa W, et al. Edible bird's nest extract inhibits influenza virus infection[J]. *Antiviral Res*, 2006,70(3):140-146. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.02.005.
- [3] Tavano, OL. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2013, 90:1-11. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011.
- [4] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983,65 (1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、药理学、毒理学)[M]. 北京:中华人民共和国卫生部, 1993.
- [6] 中国医学科学院流行病防治研究所. 常见病毒病实验技术[M]. 北京:科学出版社, 1978.
- [7] Flory E, Kunz M, Scheller C, et al. Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase[J]. *J Biol Chem*, 2000,275(12):8307-8314. DOI: 10.1074/jbc.275.12.8307.
- [8] Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, et al. Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2004,85(Pt 8):2347-2356. DOI: 10.1099/vir.0.79958-0.
- [9] Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway[J]. *J Clin Invest*, 2001,107(2):143-151. DOI: 10.1172/JCI11918.
- [10] Kumar N, Xin ZT, Liang Y, et al. NF-kappaB signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis[J]. *J Virol*, 2008,82(20):9880-9889. DOI: 10.1128/JVI.00909-08.
- [11] Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors[J]. *Science*, 2004,304(5673):1014-1018. DOI: 10.1126/science.1096158.

(收稿日期:2022-01-30)