

· 呼吸系统疾病 · 论著 ·

淡豆豉水煎液体外抗流感病毒作用

何泳愉 沃恩康 杨新燕 杨灿 路鑫怡 项婷婷 马淑敏 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 了解淡豆豉水煎液体外抗流感病毒作用,为抑制病毒的新型中药开发提供基础。方法 以 A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)(以下简称 PR8 病毒)感染狗肾上皮细胞(MDCK)作为模型,应用噻唑兰(MTT)法评估淡豆豉水煎液的安全性。以血液凝集抑制实验和神经氨酸酶活性抑制实验检测淡豆豉水煎液对流感病毒吸附和释放的影响。设立 PR8 病毒+淡豆豉水煎液组和 PR8 病毒组,以实时荧光定量 PCR、Western 印迹试验、免疫荧光的方法检测淡豆豉水煎液对病毒基因转录水平和蛋白表达水平的影响。结果 6.25 mg/mL 的淡豆豉水煎液能够抑制 1 HAU 流感病毒的吸附。PR8+淡豆豉水煎液组的子代病毒血凝效价为 PR8 组的 1/8。2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的淡豆豉水煎液能够抑制大于 80% 的神经氨酸酶活性。在第 24 小时,PR8+淡豆豉水煎液组的 NP 和 M1 基因转录水平分别为 $3\ 444.52\pm 378.35$ 和 $98\ 737.80\pm 1\ 643.00$; NP、M1a 和 M2e 蛋白表达水平分别为 0.39 ± 0.03 、 0.54 ± 0.01 和 0.82 ± 0.02 ,均低于 PR8 组 ($t=-16.03$ 、 -16.17 、 -39.26 、 -272.80 和 -220.00 , P 均 <0.05)。结论 淡豆豉水煎液通过影响流感病毒生命周期的吸附、基因转录和翻译、流感子代病毒释放多个阶段,在体外发挥直接抗流感病毒作用。

【关键词】 正黏病毒科;淡豆豉水煎液;中药抗病毒作用;病毒生命周期;基因转录;蛋白表达

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项目(LQY19H190001、LGF18C180001、LY18H100005、QQ20H190001)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20220624-00141

Effect of Semen Sojae Praeparatum decoction against influenza virus in vitro

He Yongyu, Wo Enkang, Yang Xinyan, Yang Can, Lu Xinyi, Xiang Tingting, Ma Shumin, 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 understand the anti-influenza virus effect of *Semen Sojae Praeparatum*(SSP) decoction *in vitro*, so as to provide basic data for the development of new Traditional Chinese Medicine against influenza virus. **Methods** Canine renal epithelial cells(MDCK) infected with A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)(PR8 virus) was used as a model. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT) method was used to evaluate the safety of SSP decoction. The effects of SSP decoction on the adsorption and release of influenza virus were tested by hemagglutination inhibition test and neuraminidase activity inhibition test. The PR8+SSP decoction group and PR8 group were set up to explore the effects of SSP decoction on the gene transcription and protein expression which were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, Western blot and immunofluorescence. **Results** SSP decoction (6.25 mg/mL) could inhibit the adsorption of influenza virus at 1 HAU. The hemagglutination of progeny virus in PR8+SSP group was 1/8 of that in PR8 group. SSP decoction(2 000 $\mu\text{g/mL}$) could inhibit more than 80% of neuraminidase activity. At 24 h, the transcription levels of NP and M1 in PR8+SSP group were $3\ 444.52\pm 378.35$ and $98\ 737.80\pm 1\ 643.00$, respectively, the protein expression levels of NP, M1a and M2e were 0.39 ± 0.03 , 0.54 ± 0.01 and 0.82 ± 0.02 , respectively. These levels were all lower than those in PR8 group ($t=-16.03$, -16.17 , -39.26 , -272.80 and -220.00 , P all <0.05). **Conclusions** SSP decoction can affect several stages of life cycle of influenza virus, including absorption, gene transcription and translation, and release of progeny influenza virus. It plays a direct anti-influenza virus effect *in vitro*.

【Key words】 Orthomyxoviridae; *Semen Sojae Praeparatum* decoction; Chinese Medicine for antiviral effect;

Virus life cycle; Gene transcription; Protein expression

Fund program: Fundamental Research Fund for the Central Public Welfare Research Institutes(ZZ13-035-01);Foundation of National Health and Family Planning Commission of China(WKJ-ZJ-1508);Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang(LQY19H190001,LGF18C180001,LY18H100005,QQ20H190001)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20220624-00141

据统计, 每年的季节性流感会造成 29 万~65 万人死亡, 对人类健康构成重大威胁^[1-2]。流感病毒基因组中的基因突变会引起抗原漂移, 不仅会导致耐药株的出现, 还会逃避抗体介导的病毒中和, 使得当今的流感疫苗和部分抗病毒药物无法有效地发挥作用^[3]。淡豆豉始载于《名医别录》^[4], 由黑豆/大豆、桑叶和青蒿等中药发酵而成, 常用于治疗感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等症状^[5]。目前关于单味淡豆豉的抗流感病毒研究尚少报道, 本文探讨淡豆豉水煎液的体外抗流感病毒作用, 现报道如下。

材料与方 法

一、材料与试剂

犬肾上皮细胞 (MDCK)、A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1, 简称 PR8 病毒) 均为本实验室保存; 淡豆豉购自华东医药中药饮片公司 (批号 190923); β -actin 抗体、HRP 结合羊抗鼠抗体 IgG 均购自杭州华安生物科技有限公司; 抗 NP 抗体、抗 M2e 抗体、抗 M1a 抗体均由本实验室制备并保存; 神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒、奥司他韦酸、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、BCA 试剂盒、Triton X-100 均购自上海碧云天生物技术有限公司; Trizol、逆转录试剂、SYBR Green 荧光定量试剂均购自翌圣生物科技有限公司; 噻唑兰 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DMEM/High 培养基购自 Cellmax; 引物序列委托上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

二、淡豆豉水煎液的制备与细胞毒性测定

1. 淡豆豉水煎液的制备

称取 25 g 研磨捣碎的淡豆豉颗粒, 于冷水中浸泡 30 min, 加入 500 mL 纯水煎煮 20 min, 5 000 r/min

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GADPH	F: GAAGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: CATGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
M1	F: CCAGCATCGGTCTCATAG
	R: TAGCCTGACTAGCAACCT
NP	F: GCCATAAGGACCAGAAAGTG
	R: GTGAATGCTGCCATAACG

的速度离心 10 min (离心半径 7 cm) 去除滤渣, 滤液浓缩至 125 mL, 使用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 调配生药浓度为 200 mg/mL 的淡豆豉水煎液, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱分装保存备用。

2. 细胞毒性实验

用不含血清的 DMEM 培养液将淡豆豉水煎液和奥司他韦酸分别从 200 mg/mL 和 1 mg/mL 按 5 倍倍比稀释成 8 个浓度, 分别加入长成单层 MDCK 细胞的 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 每个浓度 6 个复孔, 同时设立正常细胞组 (正常细胞, 只加培养液), 空白调零组 (没有细胞, 只加培养液)。上述 4 组均置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 避光作用 4 h 后弃去上清, 每孔加入 150 μ L DMSO 摇匀 10 min, 使用多功能酶标仪 (BioTek) 检测 490 nm 的吸光度, 细胞存活率 = $(OD_{\text{药物}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{正常}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

三、淡豆豉水煎液对流感病毒生命周期抑制实验

1. 血液凝集抑制实验

用不含血清的 DMEM 培养液将淡豆豉水煎液从 200 mg/mL 按 2 倍倍比稀释为 10 个浓度 (25 μ L / 孔), 分别与 1 HAU 和 2 HAU 的 PR8 病毒 (25 μ L / 孔) 于 37 $^{\circ}$ C 混合孵育 6 h, 同时设置病毒对照组 (25 μ L PR8 + 25 μ L PBS), 空白对照组 (50 μ L PBS), 每组重复 3 次, 6 h 后每孔加入 50 μ L 1% 豚鼠红细胞, 置于 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h, 观察血凝结果。

2. 淡豆豉水煎液对流感病毒生物合成抑制试验

设立 PR8+淡豆豉水煎液组 [淡豆豉水煎液 (8 mg/mL, 1 mL)+ PR8 病毒(2³ HAU, 1 mL)]和 PR8 组 [PBS(1 mL)+ PR8 病毒(2³ HAU, 1 mL)], 各组混匀置于 37 °C 孵育 4 h, 混合液加入 MDCK 细胞中感染 1 h, 弃去混合液, 补充无血清 DMEM 继续培养。分别于感染后的 0、4、8、12、16、20 和 24 h 收集细胞 RNA, 以实时荧光定量 PCR 检测病毒基因 M1、NP 转录水平; 于感染后的 0、8、16 和 24 h 收集细胞蛋白, 以 Western 印迹法检测病毒基因 M1a、NP、M2e 的蛋白表达; 于感染后 24 h 固定细胞, 以间接免疫荧光检测细胞 NP 蛋白表达情况。所有试验每组均重复 3 次。

3. 淡豆豉水煎液对流感子代病毒释放抑制试验

将 PR8+淡豆豉水煎液组和 PR8 组混匀置于 37 °C 孵育 4 h, 混合液加入 MDCK 细胞中感染 1 h 后, 弃去混合液, 补充无血清 DMEM 继续培养。24 h 后收集上清进行血凝实验, 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。

应用神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒检测淡豆豉水煎液对神经氨酸酶活性的抑制作用, 实验严格按照说明书执行, 设置淡豆豉水煎液浓度(125、250、500、1 000 和 2 000 μg/mL) 和奥司他韦酸浓度(25、50、100、200、400 和 500 μg/mL), 每个浓度重复 3 次, 奥司他韦酸为阳性对照, 根据标准曲线计算出药物对神经氨酸酶的抑制百分比。

四、统计学分析

应用 Grapad Prime v8.0 软件进行绘图和统计学分析, 符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、淡豆豉水煎液的细胞毒性结果

如图 1 所示, 选取细胞生存率大于 80% 的浓度为细胞最大无毒浓度(TC₀), 淡豆豉水煎液 TC₀ 为 8 mg/mL, 对照组奥司他韦酸 TC₀ 为 40 μg/mL。

二、淡豆豉水煎液阻碍流感病毒吸附结果

如图 2 所示, 采取两种 PR8 病毒量(1 HAU、

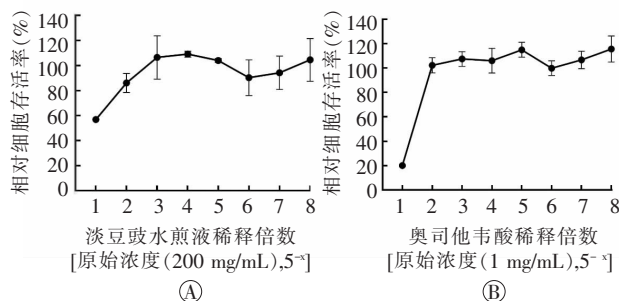
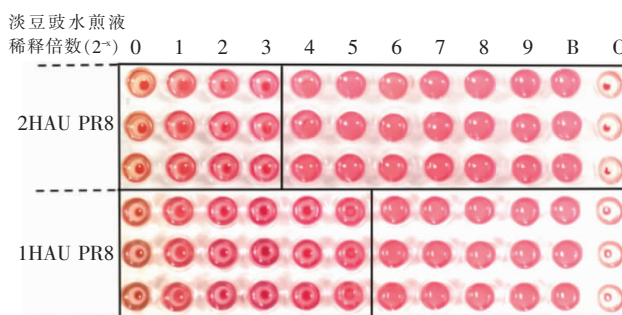


图 1 淡豆豉水煎液(A)和奥司他韦(B)对 MDCK 的细胞毒性(n=6)



注:B;病毒对照;C;空白对照;淡豆豉水煎液起始浓度为 200 mg/mL; PR8: A/Puerto Rico/8/1934 病毒株

图 2 淡豆豉水煎液对流感病毒吸附的影响

2 HAU)进行实验, 正常情况下, 病毒对照会使红细胞发生凝集反应, 当使用淡豆豉水煎液与流感病毒 PR8 在 37 °C 共处理 6 h 后, 出现不同程度抑制血凝的作用, 血凝抑制活性分别为 25 mg/mL (2 HAU)、6.25 mg/mL(1 HAU), 表明淡豆豉水煎液可能存在靶点与血凝素(HA)蛋白的相互作用, 从而阻断流感病毒吸附细胞。

三、淡豆豉水煎液抑制流感病毒生物合成的结果

在病毒基因转录层面上, 与 PR8 组相比, PR8+淡豆豉水煎液组的流感病毒基因 NP、M1 的转录水平始终维持在低水平 ($t=-5.57$ 、 -9.71 、 -34.84 、 -17.85 、 -9.90 、 -8.84 、 -16.03 、 -12.33 、 -20.46 、 -28.02 、 -8.71 、 -38.11 、 -13.08 和 -16.17 , *P* 均<0.05, 见表 2)。在蛋白表达水平层面上(图 3 A)和表 3), 与 PR8 组相比, PR8+淡豆豉水煎液组在第 8~24 小时的 NP、M1a、M2e 蛋白表达明显被抑制($t=-42.53$ 、 -65.82 、 -39.26 、 -41.63 、 -94.42 、 -272.80 、 -41.63 、 -47.95 和 -220.00 , *P* 均<0.05)。免疫荧光结果如图 3 B)所示, 与 PR8 组相比, PR8+淡豆豉水煎液组衡

表 2 不同时间点淡豆豉水煎液对病毒 NP 和 M1 基因的转录水平的影响

组别	份数	NP 基因						
		0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
PR8+淡豆豉水煎液	3	83.96±7.53	40.74±2.04	56.25±3.43	5 478.56±204.30	4 643.36±507.92	5 444.15±363.86	3 444.52±378.35
PR8	3	757.24±172.82	2 665.57±381.71	27 026.69±1 094.21	39 548.26±2 513.34	54 229.08±7 546.75	26 217.37±3 465.78	24 062.12±2 195.52
<i>t</i> 值		-5.57	-9.71	-34.84	-17.85	-9.90	-8.84	-16.03
<i>P</i> 值		0.030	0.011	<0.001	0.003	0.010	0.013	0.004

组别	份数	M1 基因						
		0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
PR8+淡豆豉水煎液	3	3 892.29±1 035.72	1 753.31±42.87	1 562.85±121.10	285 228.10±19 105.02	169 320.10±7 042.28	184 592.40±13 642.58	98 737.80±1 643.00
PR8	3	18 302.39±1 076.22	51 064.48±3 450.63	813 686.9±41 034.39	1 323 053±185 091.10	2 010 611±61 735.75	719 543.1±44 373.58	734 988.9±56 484.81
<i>t</i> 值		-12.33	-20.46	-28.02	-8.71	-38.11	-13.08	-16.17
<i>P</i> 值		0.007	0.002	0.001	0.013	<0.001	0.006	0.004

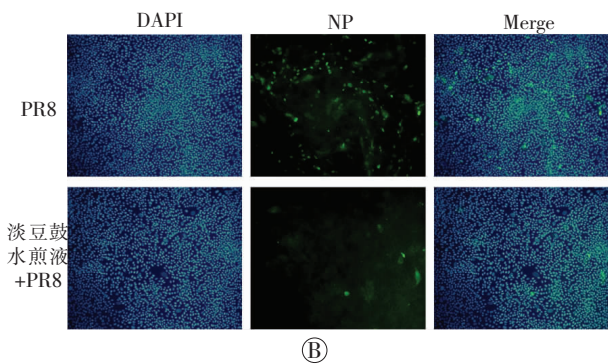
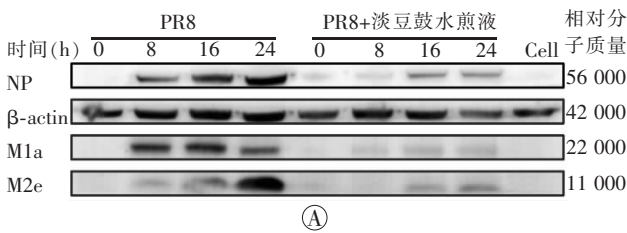
注: PR8: A/Puerto Rico/8/1934 病毒株

表 3 不同时间点淡豆豉水煎液对病毒 NP、M1a 和 M2e 蛋白表达水平的影响

组别	份数	NP 蛋白				M1a 蛋白				M2e 蛋白			
		0 h	8 h	16 h	24 h	0 h	8 h	16 h	24 h	0 h	8 h	16 h	24 h
PR8+淡豆豉水煎液	3	0.14±0.01	0.13±0.01	0.32±0.02	0.39±0.03	0.33±0.01	0.32±0.01	0.42±0.01	0.54±0.01	0.61±0.01	0.43±0.01	0.58±0.01	0.82±0.02
PR8	3	0.06±0.01	0.44±0.02	0.64±0.03	0.83±0.04	0.24±0.01	0.92±0.01	0.92±0.02	0.75±0.01	0.38±0.01	0.51±0.01	0.71±0.01	1.45±0.01
<i>t</i> 值		37.50	-42.53	-65.82	-39.26	16.08	-41.63	-94.42	-272.80	122.20	-41.63	-47.95	-220.00
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: PR8: A/Puerto Rico/8/1934 病毒株

量 NP 蛋白表达绿色荧光明显减少 ($t=-40.59, P<0.001$), 表明淡豆豉水煎液能够抑制 NP 蛋白的表达, 该结果与 Western 印迹法一致。

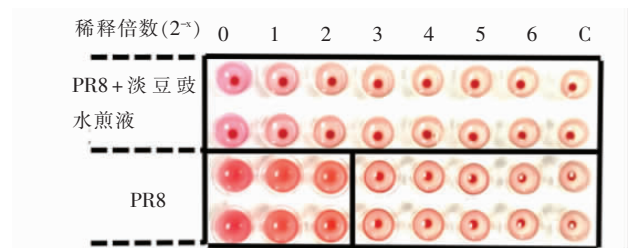


注: ①不同时间点淡豆豉水煎液对病毒 NP、M1a、M2e 蛋白表达水平的影响; ②间接免疫荧光检测淡豆豉水煎液对流感病毒 NP 蛋白表达的影响; PR8: A/Puerto Rico/8/1934 病毒株

图 3 淡豆豉水煎液对流感病毒生物合成的影响

四、淡豆豉水煎液抑制流感子代病毒释放结果

24 h 细胞上清中子代病毒的血凝效价显示, PR8+淡豆豉水煎液组的子代病毒血凝效价为 PR8 组的 1/8, 表明淡豆豉水煎液可以抑制流感子代病毒的产生(图 4)。神经氨酸酶活性抑制实验结果表明, 2 000 μg/mL 的淡豆豉水煎液即能抑制大于 80% 的神经氨酸酶活性, 且抑制效果呈现剂量依赖关系, $IC_{50}=710 \mu\text{g/mL}$ 。使用奥司他韦酸作为阳性对照药物, $IC_{50}=67.7 \mu\text{g/mL}$ (表 4)。以上结果提示, 淡豆豉水煎液可以通过抑制流感病毒神经氨酸酶活性, 阻止新一代子病毒的有效释放。



注: C: 细胞对照

图 4 淡豆豉水煎液对流感子代病毒血凝效价的影响

表 4 奥司他韦和淡豆豉水煎液对神经氨酸酶活性的抑制率

药物浓度($\mu\text{g/mL}$)	神经氨酸酶抑制率(%)
奥司他韦酸($n=3$)	
25	31.32 \pm 1.05
50	38.25 \pm 2.43
100	59.56 \pm 0.24
200	74.64 \pm 3.52
400	84.56 \pm 4.30
500	95.02 \pm 0.62
淡豆豉水煎液($n=3$)	
125	0.00 \pm 0.00
250	8.59 \pm 4.35
500	36.42 \pm 4.15
1 000	66.84 \pm 4.56
2 000	86.56 \pm 2.48

讨 论

现代药理研究表明,淡豆豉含有多种生物活性物质包括大豆皂苷、大豆异黄酮、 γ -氨基丁酸等^[6],具有降血糖、抗肿瘤、抗骨质疏松、防治心血管疾病等作用^[7-9],而有关抗流感病毒作用的研究仅限于大豆的主要成分(如大豆异黄酮、大豆苷元)调节机体免疫反应^[10-11],或含淡豆豉复方制剂(如银翘散)改善炎症反应和提高奥司他韦抗流感病毒效果方面^[12-13]。本研究初步证实了淡豆豉有抑制流感病毒感染的功效,提示淡豆豉也许可以作为抗流感病毒候选药,作进一步研究开发。

一、淡豆豉水煎液可阻碍病毒吸附细胞

HA 蛋白抑制剂是一类新型抗病毒药物,可通过作用于流感病毒进入宿主细胞的不同环节,如竞争性结合病毒 HA 蛋白或细胞唾液酸受体抑制病毒 HA 吸附宿主细胞,或抑制流感病毒包膜和内体膜的融合过程,从而阻断流感病毒进入宿主细胞^[14-15]。从血液凝集抑制试验结果来看,淡豆豉水煎液可以与病毒 HA 相互作用,竞争性结合宿主细胞表面唾液酸受体,从而阻碍病毒吸附细胞,提示淡豆豉中含有某种化合物单体与唾液酸物类似,今后将尝试使用分子对接技术和生物膜干涉等技术筛选出靶向 HA 的淡豆豉潜在单体化合物和相互作用的具体结合位点^[16]。

二、淡豆豉水煎液可抑制流感病毒的生物合成

流感病毒吸附宿主细胞后脱去衣壳,病毒核糖核蛋白复合体(vRNPs)释放至细胞质随后入核,在核内启动转录和复制过程,新产生的 mRNA 会核输出至细胞质进行翻译,该过程是流感病毒生长繁殖的重要阶段^[17]。本实验监测了淡豆豉水煎液干预后流感病毒感染宿主细胞单个复制周期(24 h)的病毒基因转录和蛋白表达情况,结果显示,PR8 组病毒基因 NP、M1 转录水平在第 4~16 小时迅速增长,病毒蛋白 NP、M1a、M2e 在第 8~24 小时有大量表达,经淡豆豉水煎液干预后,病毒基因转录水平和蛋白表达水平始终维持在低水平且未见高峰的形成,以上结果表明淡豆豉对病毒的基因转录和蛋白表达均有抑制作用,但具体机制还需要进一步探索^[18-19]。

三、淡豆豉水煎液抑制神经氨酸酶活性的安全性较好

子代病毒颗粒要经神经氨酸酶切断唾液酸与 HA 之间的连接才能释放至胞外并感染新的宿主细胞。从 24 h 细胞上清血凝结果看,淡豆豉能抑制子代病毒的产生,进一步应用神经氨酸酶抑制实验测定淡豆豉抑制神经氨酸酶的能力,发现 2 mg/mL 的淡豆豉水煎液具有抑制 80% 神经氨酸酶活性的能力,可以推断淡豆豉可以通过降低神经氨酸酶活性的能力阻断子代病毒的释放。淡豆豉虽然不如奥司他韦酸(奥司他韦体内代谢物)的抑制强度,但安全性相对较好。奥司他韦是一种作用于神经氨酸酶的特异性抑制剂,可以通过抑制子代流感病毒的释放发挥抗流感病毒作用,目前奥司他韦在治疗甲型流感病毒上仍存争议^[20-21]。因此,兼备低不良反应和高抑制神经氨酸酶活性的新型抗流感药物有待开发。

四、结语

本研究初步发现淡豆豉水煎液可以通过阻碍病毒吸附,抑制病毒的转录和翻译,以及减少子代病毒释放等过程发挥体外抗流感病毒作用。由于本实验仅为体外细胞研究,且只对流感病毒的生命周期的过程(直接作用)进行探索,存在一定的局限性。今后将尝试通过动物体内实验淡豆豉能否通过调节机体免疫反应作用间接发挥抗流感作用,以更准

确地揭示淡豆豉治疗流感病毒的具体机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 何泳愉: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,路鑫怡、项婷婷、马淑敏:论文修改;郭潮潭:研究指导、论文指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Dunning J, Thwaites RS, Openshaw P. Seasonal and pandemic influenza: 100 years of progress, still much to learn[J]. *Mucosal Immunol*, 2020,13(4):566-573. DOI: 10.1038/s41385-020-0287-5.
- [2] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study[J]. *Lancet*, 2018,391(10127):1285-1300. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2.
- [3] Shin WJ, Seong BL. Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019,14(2):153-168. DOI: 10.1080/17460441.2019.1560261.
- [4] 陶弘景. 名医别录[M]. 尚志钧辑校.北京:人民卫生出版社, 1986.
- [5] 关水清,周改莲,周媛,等. 淡豆豉的本草考证及现代研究概况[J].*中草药*,2020,43(9):2296-2303. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2020.09.043.
- [6] 林王敏,翁倩倩,邓爱平,等. 基于文献的淡豆豉发酵过程成分转化分析[J].*中国中药杂志*,2021,46(9):2119-2132. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210115.601.
- [7] 郭金洲,杨翠萍,徐彬人,等. 淡豆豉异黄酮通过上调 Nrf2/HO-1 发挥对 EA.hy926 细胞氧化损伤的保护作用[J].*中华中医药学刊*, 2021,39(6):93-97,后插 9. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2021.06.018.
- [8] 张进召,刘松,潘双,等. 淡豆豉提取物通过调控 LncRNA miR155 HG/miR-409-3 p 表达抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J].*中国老年学杂志*,2021,41(14):3077-3082. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.14.045.
- [9] 孙红梅,罗蓉,陈瑞仪. 四季豆和淡豆豉提取物降血糖动物实验研究[J]. *中国食物与营养*, 2016, 22(2): 72-75.
- [10] Liu AL, Wang HD, Lee SM, et al. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their *in vitro* anti-viral activities[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008,16(15): 7141-7147. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.06.049.
- [11] Smith BN, Morris A, Oelschlager ML, et al. Effects of dietary soy isoflavones and soy protein source on response of weanling pigs to porcine reproductive and respiratory syndrome viral infection[J]. *J Anim Sci*, 2019, 97(7): 2989-3006. DOI: 10.1093/jas/skz135.
- [12] 李林生. 银翘散加味联合奥司他韦治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的疗效观察[J].*中医临床研究*,2021,13(5):35-37. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2021.05.009.
- [13] 王佳,冯星火,国丽娜,等. 银翘散对流感病毒感染性重症肺炎小鼠肺组织的修复机制研究[J]. *陕西中医*,2020,41(2):156-159. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2020.02.005.
- [14] Zeng LY, Yang J, Liu S. Investigational hemagglutinin-targeted influenza virus inhibitors[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017,26(1):63-73. DOI: 10.1080/13543784.2017.1269170.
- [15] Zhang W, Chen ST, He QY, et al. Asprellcosides B of *Ilex asprella* inhibits influenza A virus infection by blocking the hemagglutinin-mediated membrane fusion[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:3325. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03325.
- [16] 李曼,李海伟,梁烁斌,等. 靶向流感病毒进入(细胞)抑制剂研究进展[J]. *中国科学:化学*, 2018, 48(11): 1347-1364.DOI: 10.1360/N032018-00100.
- [17] Tyrrell CS, Allen J, Gkrania-Klotsas E. Influenza: epidemiology and hospital management[J]. *Medicine (Abingdon)*, 2021,49(12): 797-804. DOI: 10.1016/j.mpmed.2021.09.015.
- [18] Shaw ML, Stertz S. Role of host genes in influenza virus replication[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2018, 419: 151-189. DOI: 10.1007/82_2017_30.
- [19] Bamunuarachchi G, Pushparaj S, Liu L. Interplay between host non-coding RNAs and influenza viruses[J]. *RNA Biol*, 2021, 18(5): 767-784. DOI: 10.1080/15476286.2021.1872170.
- [20] 樊红波,郭晶,李俊生,等. 奥司他韦治疗甲型流感的临床研究进展[J].*中国医院用药评价与分析*, 2021, 21(3): 381-384. DOI: 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.03.029.
- [21] Kang HR, Lee EK, Kim WJ, et al. Risk of neuropsychiatric adverse events associated with the use of oseltamivir: a nationwide population-based case-crossover study[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(2): 453-461. DOI: 10.1093/jac/dky445.

(收稿日期:2022-06-24)