

Ferulaldehyde 的体外抗流感作用研究

周艳,宿露,王云,范韦佟,李洪梅,李蓉涛,刘丹*

昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 650500

摘要:本研究对从蜘蛛香(*Valeriana jatamansi* Jones)和赤芍(*Paeoniae Rubra Radix*)中分离的一种苯丙素类化合物 ferulaldehyde 的抗甲型流感病毒的作用机制进行探索。通过加药时间点、免疫荧光实验、红细胞凝集法与神经氨酸酶活力检测等实验,发现化合物 ferulaldehyde 主要影响流感病毒的复制和释放环节,干扰病毒的生命周期从而发挥抗流感病毒活性。分子对接结果进一步确认流感病毒 NP 和 NA 蛋白很可能是它作用的靶点。同时,该化合物还能显著抑制由流感病毒引起的巨噬细胞炎症相关蛋白和趋化因子的表达。综上所述,化合物 ferulaldehyde 可能通过直接抑制流感病毒复制和释放的过程以及影响免疫细胞的功能从而发挥抗流感的作用。

关键词: ferulaldehyde; 苯丙素; 病毒复制周期; 炎症相关蛋白; 抗流感病毒

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)8-1364-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.8.009

Study on the anti-influenza effect of ferulaldehyde *in vitro*

ZHOU Yan, SU Lu, WANG Yun, FAN Wei-tong, LI Hong-mei, LI Rong-tao, LIU Dan*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: To investigate the mechanism of ferulaldehyde, a phenylpropanoid compound isolated from *Valeriana jatamansi* Jones and *Paeoniae Rubra Radix*, against influenza A virus. Through experiments such as dosing time point, immunofluorescence, red blood cell agglutination, and neuraminidase activity detection, it was found that ferulaldehyde mainly affected the replication and release of influenza virus, interfering with the life cycle of the virus, thereby exerting its anti-influenza virus activity. Molecular docking simulation confirmed that NP and NA might be the targets of the compound anti-influenza virus. In addition, the compound significantly inhibited the expression of macrophage inflammation-associated proteins iNOS and COX-2 and chemokine IP-10 induced by influenza virus. In conclusion, the compound ferulaldehyde might exert anti-influenza effects by directly inhibiting influenza virus replication and release and by affecting the function of immune cells.

Key words: ferulaldehyde; phenylpropanoid; virus replication cycle; inflammation-associated proteins; anti-influenza virus

流感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,具有季节性和流行性的特点^[1]。流感病毒属于正粘病毒科,分为 A 型、B 型、C 型和 D 型四种类型。预防和治疗流感,疫苗和抗病毒药物仍是最有效的选择。就降低发病率和死亡率而言,疫苗被认为是控制流感病毒大流行最理想的方法^[2]。然而,流感疫苗只有在疫苗毒株与流行性病毒株相匹配时才有效^[3]。流感最常见的临床治疗药物主要是 NA 抑制剂,包括奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦,以及 M2 质子通道阻滞剂,包括金刚烷胺和金刚乙胺^[4]。不幸的是,一些新出现的甲型流感病毒株,自然携带药

物突变基因,导致对这些药物产生耐药性^[5]。因此寻找新型抗流感药物刻不容缓。流感病毒感染机体后可触发各种免疫反应,引起调控细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6) 等的释放,而过度的免疫反应也会导致靶器官的炎性损伤,甚至影响脏器功能。据此,降低由流感病毒引起的炎性损伤也是治疗流感的一个主要方面^[6]。

苯丙素类是天然存在的一大类化合物,包括苯丙醇、苯丙醛、苯丙酸、香豆素、木质素等,现代药理研究发现这类化合物具有减轻氧化应激损伤、抗肿瘤以及抗流感病毒的作用。有研究证明,中药制剂板蓝根的抗流感的作用也与其中的苯丙素类成分密切相关。苯丙素类小分子化合物 ferulaldehyde

(FDE)^[7]广泛存在于甘草、神经脂草、洋甘菊等植物中,被报道具有抗氧化和抗炎的活性^[8]。我们从蜘蛛香(*Valeriana jatamansi* Jones)和赤芍(*Paeoniae Rubra Radix*)中都分离获得了 FDE 结构,并首次发现了其显著的抗流感病毒的作用。蜘蛛香和赤芍作为我国传统中药,药用历史悠久,在流感治疗方面也有相关的记载,因此从中筛选有效化合物并研究其活性成分的作用机理,对其综合开发和利用具有重要的意义。因此本研究旨在探索 FDE 对流感病毒生命过程的影响以及对流感病毒感染引起的炎症反应的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库;磷酸奥司他韦(Oseltamivir)(安耐吉化学,批号:CK030008);DMEM 高糖培养基(美国纽约 Gibco 公司,批号:8122554);胎牛血清(FBS)(美国纽约 Gibco 公司,批号:2176404);胰蛋白酶(中国 Solarbio 公司,批号:510T0419);MTT(中国 Solarbio 公司,批号:530R0515);DAPI 染料(中国 Beyotime 公司,批号:073120201023);神经氨酸酶测定试剂盒(中国 Beyotime 公司,批号:071420211012);CellTiter-Glo[®] 发光法细胞活力检测试剂盒(美国 Promega 公司,批号:0000424721);放射免疫沉淀测定(RI-PA)裂解液(中国 Beyotime 公司,批号:22308515);小鼠抗核蛋白(NP)单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号:GR3397701-3);山羊抗小鼠 IgG 结合 FITC 荧光二抗(中杉金桥生物技术公司,批号:133449);化合物 FDE 由本课题组通过各种色谱方法从蜘蛛香和赤芍中分离得到,并通过 NMR 和 MS 等波谱方法进行结构鉴定^[9,10]。

1.2 仪器

多功能读板仪 Spectra Max M2(美国 Molecular Devices);光学倒置显微镜 CKX41(德国 O-lympus);CO₂ 细胞培养箱 3111(美国 Thermofisher);高速冷冻离心机 1-14K(德国 Sigma);尼康激光共聚焦显微镜 A1R/A1(日本 Nikon)。

1.3 细胞毒性实验

使用 MTT 法测 FDE 的细胞毒性。将 FDE 倍比稀释成 5 个浓度(6.25、12.5、25、50 和 100 μmol/L),分别加入到已长成单层细胞的 96 孔培养板中,设正常细胞对照组,每组设置 3 个复孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,采用 MTT 法测定细胞

活度^[11],使用 Spectra Max M2 检测波长为 490 nm 的吸光度。

1.4 体外抗流感病毒活性筛选

取对数生长期的 MDCK 细胞以 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞的汇合率达到 95% 以上用 PBS 清洗细胞 2 次,之后按照实验分组分别加药并于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,其中活性实验组的细胞加入不同浓度的待测样品与 100 TCID₅₀ 病毒等比例混合后的溶液,阴性对照组细胞只加病毒,而不做任何处理的孔为对照组。待培养 48 h 后,用 CellTiter-Glo[®] 发光法细胞活力检测试剂盒检测其荧光值^[12]。病毒株 A/WSN/33/2009 H1N1(WSN)的扩增方法:把病毒原液稀释后注射至培养 10~11 d 的鸡胚尿囊腔中,气室朝上置于 35 °C 培养箱中孵育 48 h。48 h 后用一次性无菌注射器缓慢吸出尿囊液,即为我们扩增的病毒,最后采用 Reed-Muench 法,计算细胞半数感染量 TCID₅₀^[13]。

1.5 噬斑实验

MDCK 细胞以 3×10^5 个/孔的数量接种于 12 孔板中,培养 24 h,直至长成单层细胞。用 WSN(250 TCID₅₀)感染 2 h,用预冷的 PBS 清洗两遍,洗去未与细胞结合的病毒,加入含有不同浓度药物的无血清培养基,待其完全凝固后,倒置放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱。培养 72 h 后,4% 多聚甲醛固定 30 min,去除琼脂糖覆盖层,用 0.1% 结晶紫染色。

1.6 加药时间点实验

MDCK 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 12 孔板中,培养 24 h。用 WSN(250 TCID₅₀)感染细胞,分别在 0~2、0~5、0~8 和 0~10 h(采用预防给药的方式,WSN 和 FDE 共同作用前 2 h,然后洗去 WSN,加入 FDE,0~2 h 为 WSN 和药物共同作用的 2 h,下同)进行 FDE(60 μmol/L)处理。收集裂解细胞,分析 NP 含量变化^[14],到达给药时间后,将细胞用 80 μL 裂解液(含 1% 的 PI 和 PMSF)裂解 40 min,收集裂解液,加入 20 μL 的 5 × loading buffer 变性 10~15 min 后,用 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳,后将蛋白质从凝胶转移至 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭,一抗、二抗孵育后通过化学发光显影并拍摄分析。

1.7 免疫荧光实验

MDCK 细胞以 1×10^5 个/孔的数量接种于共聚焦皿中,培养 24 h。WSN(250 TCID₅₀)感染细胞,分别在 0~2、0~5、0~8 和 0~10 h 进行 FDE(60 μmol/L)处理。处理后细胞经 4% 多聚甲醛溶液固

定 10 min, 0.1% Triton X-100 打孔 10 min 后, 一抗孵育过夜, 二抗孵育 1 h, DAPI 染核 10 min 后用共聚焦显微镜进行拍摄。

1.8 血凝素活性抑制试验

根据病毒血凝滴度稀释病毒。将一系列浓度 (6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 的化合物与稀释后的病毒涡旋混匀后加入到 V 型 96 孔板中, 之后加入等体积 1% 的红细胞悬液, 室温静置 30 min, 观察并记录 V 型 96 孔板中红细胞的凝集效果。

1.9 神经氨酸酶抑制剂筛选实验

通过神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒检测化合物对 NA 活性的抑制作用。将 70 μL NA 缓冲液和 10 μL NA 溶液混合均匀, 然后分别加入 10 μL 梯度稀释的待测化合物, 混合均匀后。加入 10 μL 显色底物, 混合均匀后室温震荡 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 30 min, 使用多功能酶标仪检测激发波长 322 nm 和发射波长 450 nm 的荧光信号。根据荧光值计算化合物对 NA 活性的抑制作用。

1.10 ELISA 检测流感病毒感染巨噬细胞中 IP-10 表达量

巨噬细胞细胞以 5×10^5 个/孔的数量接种于 12 孔板中, 将 15、30、60 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度的 FDE 与 100 TCID₅₀ 的 WSN 共同作用细胞 24 h, 收集细胞上清, 使用 ELISA 试剂盒检测上清溶液中 IP-10 趋化

因子的含量。

2 结果

2.1 FDE 对流感病毒感染的 MDCK 细胞具有明显的保护作用

研究发现, FDE (见图 1) 在 6.25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围对 WSN 感染的 MDCK 细胞具有明显的保护作用 (见图 2A、2C), WSN 感染 MDCK 细胞 48 h, 只加病毒的 WSN 组与未加病毒和 FDE 的对照组 (control 1, Con 1) 相比, 细胞发生明显病变, 当用 6.25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 FDE 与 WSN 共同作用时, 细胞病变率显著降低, 其 EC₅₀ 为 $19.83 \pm 2.03 \mu\text{mol/L}$, 阳性药奥司他韦 (oseltamivir, OST) EC₅₀ 为 $6.85 \pm 0.12 \mu\text{mol/L}$, MTT 法证实该化合物在该浓度范围内对 MDCK 细胞活性几乎没有影响 (见图 2B), CC₅₀ 大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 。同时, 噬斑实验结果也证实了 FDE 的这一作用 (见图 2D), WSN 感染 48 h 后细胞大面积脱落形成较多空斑, 未加 WSN 和 FDE 的对照组只有边缘有部分细胞脱落, FDE 治疗组中空斑的数量随药物浓度的增加而减少。

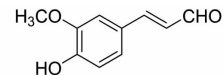


图 1 Ferulaldehyde 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of ferulaldehyde

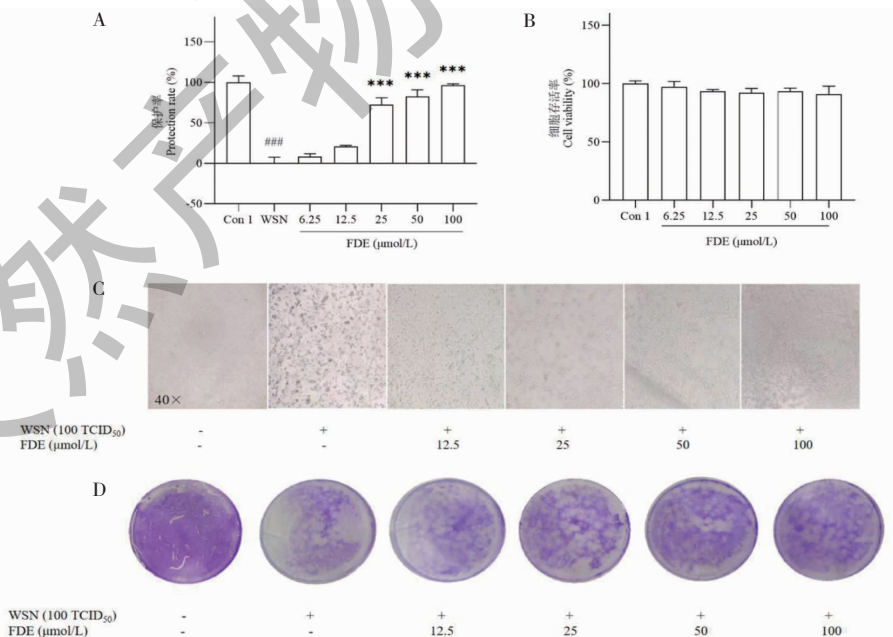


图 2 FDE 的抗流感病毒活性和对 MDCK 的细胞毒性

Fig. 2 The anti-influenza virus activity and cytotoxicity of MDCK cells of FDE

注: A: 与 Con 1 组比较, ### $P < 0.001$; 与 WSN 组比较, *** $P < 0.001$; C: 40 \times : 于 40 倍光学倒置显微镜下拍摄。Note: A: Compared with the Con 1 group, ### $P < 0.001$; Compared with the WSN group, *** $P < 0.001$; C: 40 \times : Photographed under a 40 \times optical inverted microscope.

2.2 FDE 对流感病毒生命周期的影响

为了确定 FDE 作用于病毒感染受体细胞生命周期的哪一个阶段,我们设计了加药时间点实验,分别在 WSN 感染的 0~2、0~5、0~8、0~10 h 时间段

(见图 3A)进行 FDE(60 $\mu\text{mol/L}$)处理,药物作用时间分别覆盖了病毒吸附、入核、复制和子代病毒释放过程。免疫印记实验结果(见图 3B)显示,在该化合物作用的各时间段内,MDCK 细胞内病毒 NP 蛋白

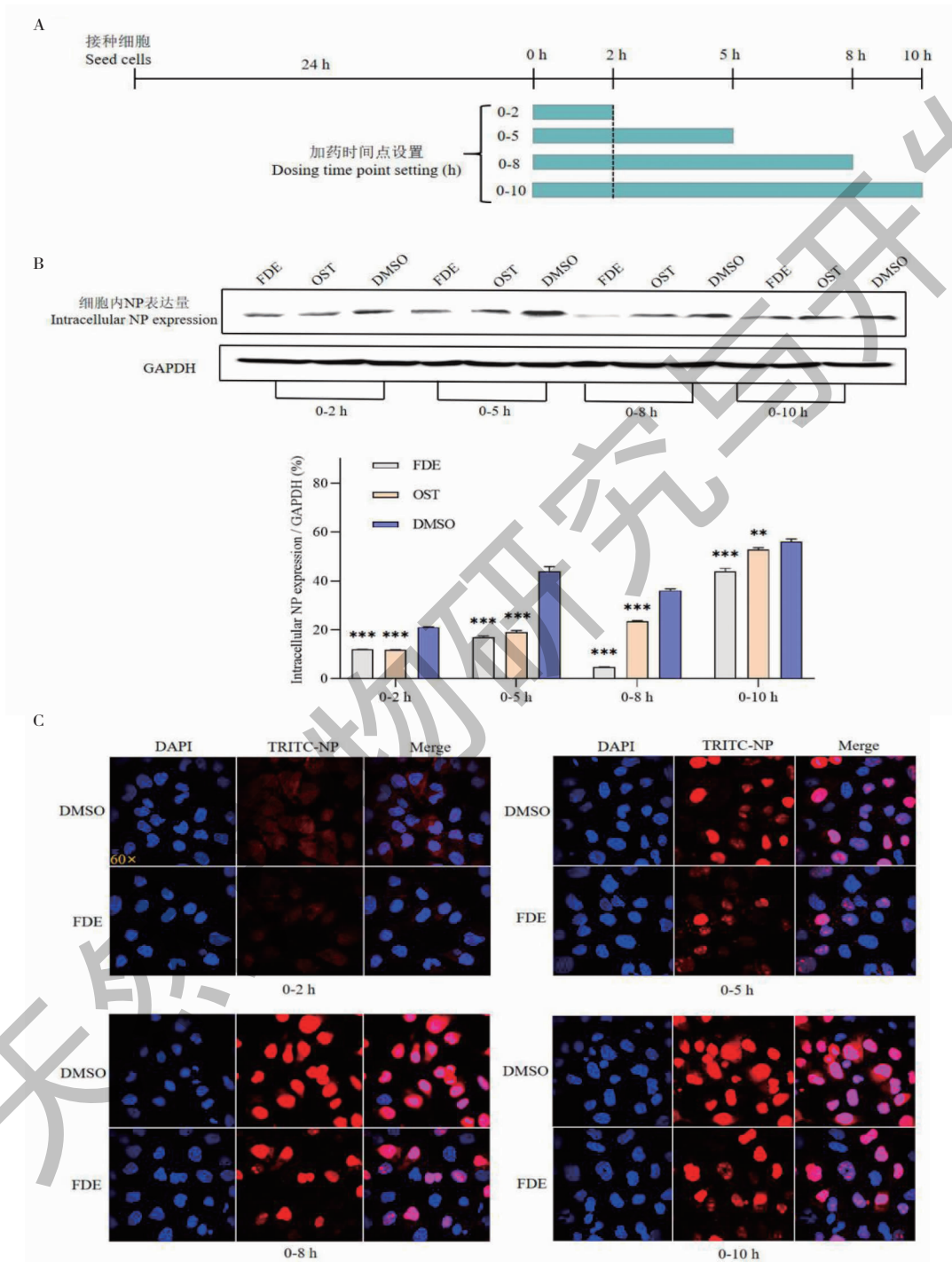


图3 FDE 对流感病毒复制周期的影响

Fig. 3 Effects of FDE on replication cycle of influenza virus in cells

注: B: 与 DMSO 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: 60 \times : 于 60 倍激光共聚焦显微镜下拍摄。Note: B: Compared with the DMSO group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: 60 \times : Photographed under a 60 \times laser confocal microscope.

的量与对照组(DMSO组:加入与FDE组等量WSN且加入了和FDE组所加药物溶剂等量DMSO的对照组,DMSO)相比都具有不同程度的减少,在0~8 h内,FDE组与DMSO组和OST组相比NP蛋白的含量降低最为显著。用250 TCID₅₀的WSN感染MDCK细胞,在同样给药时间处理条件下,通过免疫荧光法显示细胞内NP蛋白的定位从而追踪病毒的活动(见图3C),发现给药2 h后,DMSO组和FDE组的病毒均可以吸附到宿主细胞上,FDE组病毒量略少于DMSO组。给药5 h和8 h后,病毒进入细胞核进行复制,此时FDE组细胞核内的病毒量明显少于DMSO组。而给药8 h后,DMSO组中病毒依然大量复制并开始从细胞核输出释放到细胞质中,此时FDE组中感染病毒的细胞数量和细胞中的病毒量明显要少,这也与免疫印迹结果相互印证,因此猜测该化合物可能抑制了流感病毒的复制。给药10 h后,病毒大量从胞质释放到细胞外,从免疫印迹的结果只能看出FDE组的病毒量显著少于DMSO组,具体FDE对WSN的出胞是否有影响还需进一步研究。综上可知,FDE对WSN的进入过程略有影响,但主要还是抑制了其复制过程。

2.3 FDE对流感病毒HA和NA的影响

血凝素HA是流感病毒上的一种包膜蛋白,在

病毒入侵细胞中起关键作用。成熟的HA由两个亚基HA1和HA2组成。HA1主要介导病毒与细胞表面唾液酸受体的结合,HA2主要介导膜融合和vRNP脱壳过程。血凝素活性抑制实验常用于确认药物的作用靶点是否为HA1^[15]。血凝素活性抑制试验结果如图所示(见图4A),未加入WSN的对照组(control 2, Con 2),红细胞沉降于孔底呈点状,当加入以1:128倍稀释的WSN后,红细胞发生凝集在孔底平铺呈网状,而当有FDE和WSN共同作用时,100 μmol/L FDE处理能在一定程度上抑制红细胞的凝集,25、50 μmol/L FDE有微弱的作用但并不显著。结果表明,该化合物在高浓度时(100 μmol/L)可能会对流感病毒与宿主细胞的结合有一定的抑制作用,可能是通过与流感病毒的表面抗原HA1结合,抑制WSN的早期吸附过程,但浓度低于50 μmol/L其影响作用有限。

甲型流感病毒的子代病毒颗粒从细胞表面出芽后,病毒表面的神经氨酸酶能使病毒本身从细胞表面脱落,能切割细胞表面与糖结合的N-乙酰神经氨酸,释放子代病毒,完成感染周期^[16]。神经氨酸酶抑制实验结果显示(见图4B),化合物FDE具有一定的抑制神经氨酸酶作用,且抑制效果呈现剂量依赖关系。

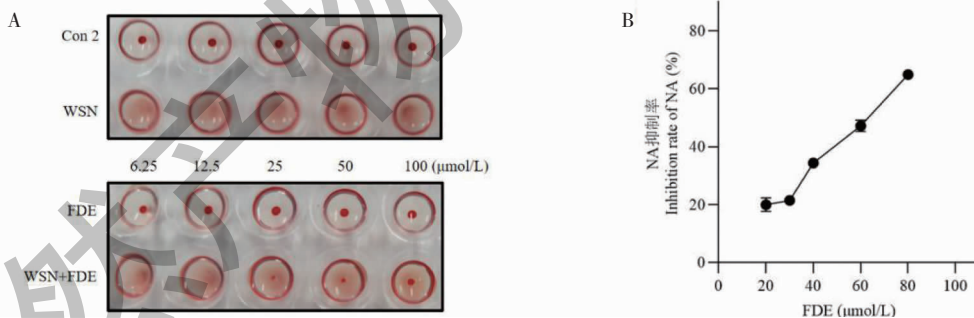


图4 FDE对流感病毒HA和NA的影响

Fig. 4 Effect of FDE on influenza virus HA and NA

2.4 FDE能与NP和NA功能域结合

为了进一步探索FDE与流感病毒的相互作用,我们用AutoDock进行分子对接,模拟FDE与NP和NA蛋白质氨基酸残基之间的相互作用。FDE与NP蛋白分子对接结果显示(见图5A),FDE能以氢键与NP蛋白342位精氨酸(Arg342)、417位天冬酰胺(Asn417)结合,以π-烷基作用(疏水作用力的一种)与419位赖氨酸(Pro419)结合,这3个位点刚好处于核定位信号(Nuclear localization signal, NLS3)

320~400残基和NP-NP结合区371~465残基的区域之中^[17]。另外有研究报道,Ile408、Pro410、Phe412、Val414和Pro419的疏水侧链位于核蛋白尾环中,该处的环结合腔可能是小分子药物的理想靶点,并且尾环的结构特征预计会干扰核蛋白的寡聚^[18]。因此,说明FDE可能通过与NP蛋白的结合干扰NP蛋白的功能从而抑制病毒的复制。

FDE与NA蛋白分子对接结果显示(见图5B),FDE能以氢键与NA蛋白97位丝氨酸(Ser97)、247

位丝氨酸(Ser247)、295位天冬酰胺(Asn295)结合,以 Π -烷基作用(疏水作用力的一种)与106位缬氨酸(Val106)、110位异亮氨酸(Ile110)结合,以碳氢键与111位甘氨酸(Gly111)、112位丝氨酸

(Ser112)结合。已有研究报道NA蛋白的247位的丝氨酸突变可能具有很高的抵抗流感病毒的作用^[19]。因此,说明FDE很可能通过与NA蛋白的结合干扰流感病毒的出胞。

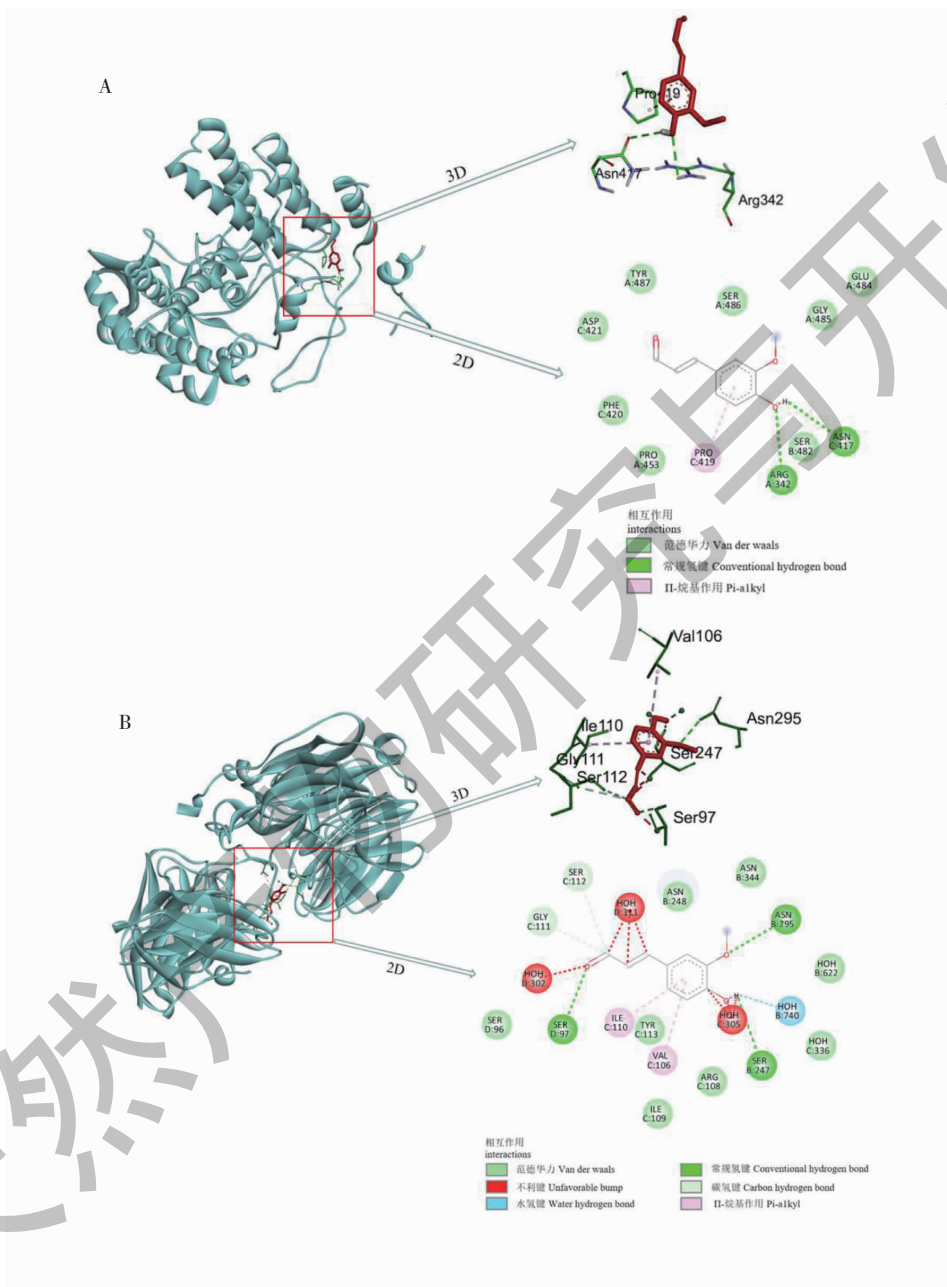


图5 FDE与NP(A)和NA(B)的分子对接结果

Fig. 5 Molecular docking results of FDE with NP(A) and NA(B)

2.5 FDE能降低流感病毒感染的巨噬细胞的炎症相关蛋白和趋化因子的表达

FDE曾被发现在LPS诱导的巨噬细胞炎症模型中抑制NO的产生^[20]。巨噬细胞在流感病毒感染

后也会被激活并激发免疫反应,抵抗流感病毒的同时也可能造成机体的损伤。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧合酶(COX-2)在炎症发生中是影响NO和PGE2生成的关键酶,我们检测发现FDE处

理影响 WSN 感染的巨噬细胞中 iNOS、COX-2 (见图 6A) 的表达, 如图所示, 与 Con 1 (与结果 2.1 中对照设置方法一样, 也为未加 WSN 和 FDE) 相比, WSN 感染后巨噬细胞中 iNOS、COX-2 表达显著增加, 而 FDE 处理剂量依赖性明显抑制细胞中的 iNOS 和

COX-2 的表达。同时, 我们还发现, FDE 还影响趋化因子 IP-10 的分泌 (见图 6B)。WSN 感染引起的巨噬细胞中 IP-10 表达量的增加可以被 FDE 有效的抑制, 提示 FDE 还可能影响进一步的炎症细胞的招募聚集。

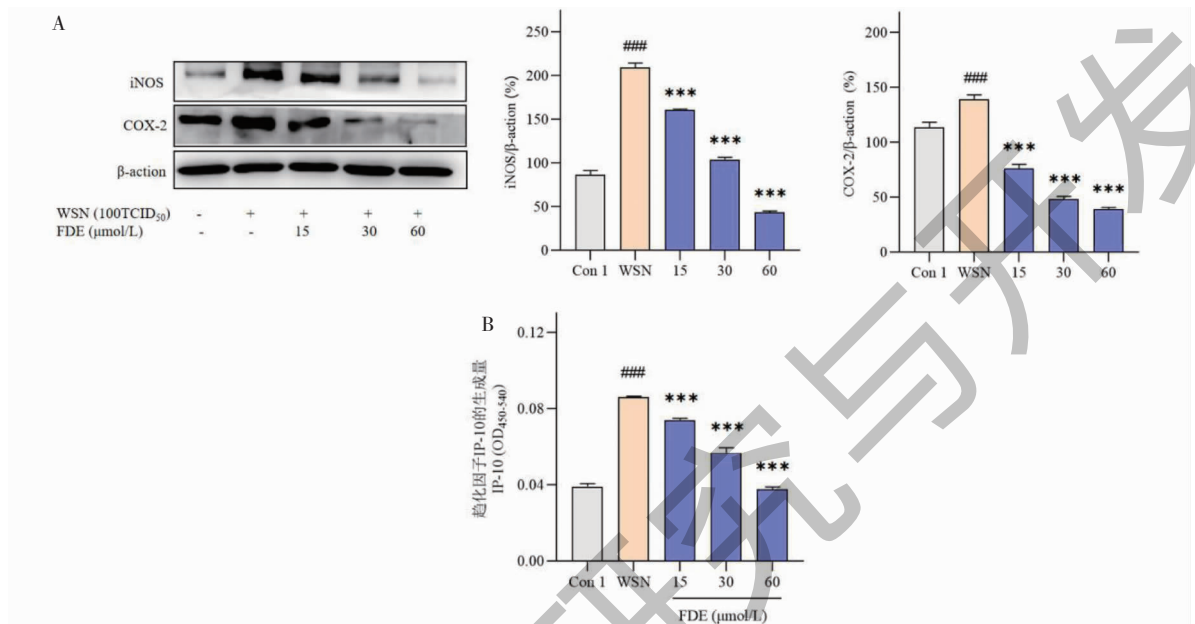


图 6 FDE 治疗对流感病毒感染的巨噬细胞的 iNOS、COX-2 蛋白和趋化因子 IP-10 的影响

Fig. 6 Effect of FDE treatment on iNOS, COX-2 protein and chemokine IP-10 in influenza virus-infected macrophages

注: 与 Con 1 组比较, ### $P < 0.001$; 与 WSN 组比较, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with the Con 1 group, ### $P < 0.001$; Compared with the WSN group, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论与结论

我们从蜘蛛香和赤芍两种药材中都分离获得了苯丙素类化合物 FDE, 含量分别为 0.02% 和 0.012%, 尽管苯丙素类成分并不是蜘蛛香和赤芍的主成分, 但其在这两种中药的抗流感应用中很可能发挥了重要的作用, 本研究就发现 FDE 具有显著的抗流感病毒的作用。高浓度的 FDE 能够影响红细胞的凝集, 提示其可能干扰流感病毒与受体细胞的结合, 但其在低浓度时作用并不显著。进入宿主细胞的流感病毒借助宿主细胞的多种元件进行转录和复制, 病毒 vRNP 是流感病毒最基本的复制单位, 是由病毒 RNA 和碱性聚合酶 1 (PB1)、碱性聚合酶 2 (PB2)、酸性聚合酶 (PA) 及核蛋白 (NP) 组成的复合物。vRNP 通过运输进入细胞核, 并通过引物依赖的方式进行转录合成病毒 mRNA, mRNA 出核翻译合成病毒蛋白^[4]。通过加药时间点实验我们发现 FDE 可以降低病毒 NP 蛋白的生成, 很可能干预了病毒的复制过程, 分子对接结果显示 FDE 确实可

以与 NP 蛋白的活性位点结合, NP 有可能是 FDE 的有效靶点, 另外, 我们通过神经氨酸酶活抑制实验发现了 FDE 对 NA 活性的影响, 分子对接实验也支持这一结果, 提示 FDE 很可能还抑制了流感病毒的出胞过程。此外, 流感病毒本身并不是导致重症及致死的关键, 病毒导致的肺组织损伤或更加严重的急性呼吸窘迫综合征是流感病毒尤其是高致病性流感病毒的高致病力和致死的主要原因^[6]。我们检测发现 FDE 可减弱流感病毒感染的巨噬细胞中 iNOS、COX-2 的表达, 还抑制了病毒引起的巨噬细胞中 IP-10 的表达量, 提示 FDE 还可能影响进一步的炎症细胞的招募聚集, 降低炎症反应。以上结果说明 FDE 发挥抗流感病毒活性可能不止一个作用靶点, 小分子化合物存在多个作用靶点有可能使其更高效和更不易产生耐药现象, 但也往往使其在体内的作用也更为复杂甚至可能有更多的毒副作用。

综上所述, 本研究发现蜘蛛香和赤芍中的苯丙素 FDE 在体外具有抗流感病毒活性。通过探索

FDE 对流感病毒的生命周期的影响,发现其抗流感机制主要是干扰了流感病毒的复制和释放过程,流感病毒 NP 和 NA 蛋白很可能是它作用的靶点。同时,该化合物还能抑制由流感病毒引起的炎症相关蛋白和趋化因子的表达,从而缓解病毒感染引起的机体的免疫损伤。

参考文献

- 1 Zhen RL, Chen MY, Chen DY, et al. Research progress of polysaccharide against influenza virus [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:167-172.
- 2 Yu DH, Wang LL, Wang Y. Recent advances in application of computer-aided drug design in anti-influenza A virus drug discovery[J]. Int J Mol Sci,2022,23:4738.
- 3 Syrjänen RK, Jokinen J, Ziegler T, et al. Effectiveness of pandemic and seasonal influenza vaccines in preventing laboratory-confirmed influenza in adults: a clinical cohort study during epidemic seasons 2009-2010 and 2010-2011 in Finland [J]. PLoS One,2014,9:e108538.
- 4 Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, et al. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit [J]. Antiviral Res,2018,160:109-117.
- 5 Lin CY, Yang ZS, Wang WH, et al. The antiviral role of galectins toward influenza A virus infection-an alternative strategy for influenza therapy [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021,14:490.
- 6 Wang YT, Zhou BX, Lu JG, et al. Inhibition of influenza virus via a sesquiterpene fraction isolated from *Laggera pterodonta* by targeting the NF- κ B and p38 pathways[J]. BMC Complement Altern Med,2017,17:25.
- 7 Brillatz T, Kubo M, Takahashi S, et al. Metabolite profiling of Javanese ginger *Zingiber purpureum* and identification of antiseizure metabolites via a low-cost open-source zebrafish bioassay-guided isolation [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 7904-7915.
- 8 Liu JH, Wang SW, Tan WX, et al. Dual-screening of anti-inflammatory and antioxidant active ingredients of shenxiang suhe pill and its potential multi-target therapy for coronary heart disease[J]. Biomed Pharmacother,2020,129:110283.
- 9 Fan WT, Liao CC, Zhou Y, et al. Chemical constituents of *Paeoniae Radix Rubra* and their anti-inflammatory activities [J]. J Kunming Univ Sci Technol: Nat Sci(昆明理工大学学报:自科版),2022,47:117-122.
- 10 Wang Y, Liu ZY, Zhou Y, et al. The chemical constituents from *Valeriana jatamansi* and their anti-influenza virus and anti-inflammatory effects [J]. Phytochem Lett,2022,52:20-26.
- 11 Wang S, Liu F, Zhu JY, et al. DNA repair genes ERCC1 and BRCA1 expression in non-small cell lung cancer chemotherapy drug resistance [J]. Med Sci Monit,2016,22:1999-2005.
- 12 Jiang N, Quan LQ, Zhou Y, et al. Exploring the anti-influenza virus activity of novel triptolide derivatives targeting nucleoproteins [J]. Bioorg Chem,2022,129:106118.
- 13 Karakus U, Cramer M, Lanz C, et al. Propagation and titration of influenza viruses [J]. Methods Mol Biol,2018,1836:59-88.
- 14 Yu MR, Si L, Wang YF, et al. Discovery of pentacyclic triterpenoids as potential entry inhibitors of influenza viruses [J]. J Med Chem,2014,57:10058-10071.
- 15 Wu WJ, Li RC, Li XL, et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry [J]. Viruses,2015,8:6.
- 16 Avila G, Cruz-Licea V, Rojas-Espinosa K, et al. Influenza A H1N1 virus 2009 synthetic hemagglutinin and neuraminidase peptides for antibody detection [J]. Arch Med Res,2020,51:436-443.
- 17 Bullido R, Gómez-Puertas P, Albo C, et al. Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein [J]. J Gen Virol,2000,81:135-142.
- 18 Das K, Aramini JM, Ma LC, et al. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets [J]. Nat Struct Mol Biol,2010,17:530-538.
- 19 Tran-Nguyen VK, Le MT, Tran TD, et al. Peramivir binding affinity with influenza A neuraminidase and research on its mutations using an induced-fit docking approach [J]. SAR QSAR Environ Res,2019,30:899-917.
- 20 Jin CS, Jin M, Li R, et al. Isolation of a new natural kingiside aglucone derivative and other anti-inflammatory constituents from *Syringa reticulata* [J]. Nat Prod Res, 2020, 34: 518-524.