

分 类 号: R151

单位代码: 10183

研究生学号: 2021722046

密 级: 公 开



吉 林 大 学

硕士学位论文

(学术学位)

维生素 A 对 H1N1 流感病毒毒性的抑制作用研究

Study on the inhibitory effect of vitamin A on H1N1 influenza
virus toxicity

作者姓名: 解英东

专 业: 营养与食品卫生学

研究方向: 营养与疾病

指导教师: 崔巍巍 副教授

培养单位: 公共卫生学院

2024 年 06 月

维生素 A 对 H1N1 流感病毒毒性的抑制作用研究

Study on the inhibitory effect of vitamin A on H1N1
influenza virus toxicity

作者姓名： 解英东

专业名称： 营养与食品卫生学

指导教师： 崔巍巍 副教授

学位类别： 医学硕士

答辩日期： 2024 年 6 月 3 日

中文摘要

维生素 A 对 H1N1 流感病毒毒性的抑制作用研究

目的:

维生素 A 是一种与机体免疫功能密切相关的维生素, 已有研究证实维生素 A 具有增强机体免疫系统抵抗甲型 H1N1 流感病毒 (AH1N1 influenza, H1N1) 感染复制的能力。本文探讨了维生素 A 抑制 H1N1 流感病毒毒性作用机制, 以预防和治疗 H1N1 流感病毒感染, 为维生素在预防及早期干预治疗 H1N1 流感中的应用, 提供了科学依据和理论基础。

方法:

用 10 日龄鸡胚扩增 H1N1 流感病毒 (H1N1pdm09), 采用鸡红细胞血凝实验和组织半数感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 检测鸡胚扩增出来的 H1N1 流感病毒的血凝效价和滴度, 采用空斑实验测定鸡胚扩增出来的 H1N1 流感病毒的空斑形成单位 (plaque forming unit, PFU)。分别以 0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M 浓度的视黄醛 (all trans-Retinal, RE) 和狗肾细胞 (Madin Darby Canine Kidney, MDCK) 细胞共同孵育培养 4 小时, 利用细胞增殖和细胞毒性试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK8) 进行细胞活性检测, 确定了试验用视黄醛的作用剂量。体外实验用扩增的 H1N1 流感病毒体外感染视黄醛干预的 MDCK 细胞, 验证视黄醛对 H1N1 流感病毒感染细胞过程中存在抑制作用。实验分组为: H1N1 组、H1N1+视黄酸受体阻断剂(Retinoic acid receptor blockers, RAa)组、H1N1+RE 组和 H1N1+RE+RAa 组。根据不同组的药物干预, 采用 qRT-PCR 检测 H1N1 流感病毒的基因表达情况。采用分子对接技术 (dock) 模拟 H1N1 流感病毒蛋白和视黄醛分子的结合情况。根据计算机模拟结果, 将有可能与视黄醛结合的蛋白通过哺乳动物表达系统进行蛋白表达, 其中采用甘油菌扩增质粒、仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO) 转染、His 标签重力柱纯化蛋白。采用表面等离子共振技术 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 验证流感病毒蛋白与视黄醛分子的结合能力。使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析及相关结果作图, 计量资料采用 $\bar{X} \pm S$ 表示。组间

比较采用单因素 ANOVA 检验和 Student' s T 检验。 $P < 0.05$ ，表示差异存在统计学意义。

结果:

1. H1N1 流感病毒血凝效价的检测: 1%鸡红细胞血凝实验显示收集的鸡胚尿囊液中的 H1N1 流感病毒在稀释度为 1:256 时, 使鸡红细胞在孔底出现环状并伴随四周小的凝集块, 代表 H1N1 流感病毒的血凝效价为 1:256。收集的鸡胚尿囊液中的 H1N1 流感病毒符合实验要求。

2. H1N1 流感病毒滴度的检测: H1N1 流感病毒组 TCID₅₀ 实验计算得出收集的鸡胚尿囊液中 H1N1 流感病毒的 TCID₅₀ 为 $8.75 \times 10^{-3}/\text{mL}$ 。收集的 H1N1 流感病毒有一定的毒性。

3. H1N1 流感病毒空斑形成单位的检测: 空斑实验显示, 收集的鸡胚尿囊液中的 H1N1 流感病毒在稀释 5^3 倍时, 200 μL 病毒液产生 20 个空斑, 根据公示计算得出流感病毒的 PFU 为 $1.25 \times 10^{-4}/\text{mL}$ 。

4. 视黄醛浓度的确定: CCK8 试验检测连续不同浓度视黄醛对 MDCK 细胞增殖毒性的影响, 结果显示当视黄醛浓度为 0.1 μM 时无细胞毒性; 因此选用 0.1 μM 作为视黄醛的试验用浓度。

5. 维生素 A 抑制 H1N1 流感病毒毒性检测: qRT-PCR 结果显示, 与空白对照组相比, 视黄醛干预降低了 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞组的 H1N1 流感病毒基因表达 ($P < 0.01$)。在视黄酸受体被阻断后, H1N1 流感病毒的基因表达比未加 RAa 组显著增加 ($P < 0.05$)。

6. 分子对接技术模拟 H1N1 流感病毒蛋白和视黄醛分子结合情况: H1N1 流感病毒的 10 种蛋白中, 经过筛检, NA protein (PDB ID: 3B7E)、M1 protein (PDB ID: 1EA3) 和 NP protein (PDB ID: 3ZDP) 4 种蛋白中存在和视黄醛分子的结合位点, 表明存在结合的可能。

7. SPR 结果显示 H1N1 流感病毒和视黄醛分子的结合力 (KD) 大小: 1EA3、3ZDP 和 3B7E 蛋白结合力大小符合结合情况, 4YYL 蛋白没有显示出与视黄醛分子的结合力。

结论:

1. 视黄醛能够抑制 H1N1 流感病毒体外感染细胞。

2. 视黄醛与 H1N1 流感病毒的 NA protein (PDB ID: 3B7E)、M1 protein (PDB ID: 1EA3) 和 NP protein (PDB ID: 3ZDP) 存在结合位点, 并能够结合。

3. 视黄醛通过直接与 H1N1 病毒蛋白结合, 抑制 H1N1 流感病毒感染复制的过程。

关键词:

H1N1, 病毒蛋白, 维生素 A, 视黄醛, 计算机模拟

Abstract

Study on the inhibitory effect of vitamin A on the virulence of H1N1 influenza virus

Objective:

Vitamin A is a vitamin closely related to the immune function of the body. It has been confirmed that vitamin A can enhance the ability of the body's immune system to resist the infection and replication of H1N1 influenza virus. This paper discusses the mechanism of vitamin A inhibiting the virulence of H1N1 influenza virus in order to prevent and treat the infection of H1N1 influenza virus, and provides scientific basis and theoretical basis for the application of vitamin in the prevention and early intervention of H1N1 influenza virus.

Method:

H1N1 influenza virus (H1N1pdm09) was amplified from 10-day-old chicken embryos. The hemagglutination titer and titer of H1N1 influenza virus isolated from chicken embryos were detected by hemagglutination test of chicken red blood cells and Tissue culture infective dose(TCID₅₀). The plaque forming unit (PFU) of H1N1 influenza virus isolated from chicken embryos was determined by plaque assay. Dog Kidney Transformed (MDCK) cells were incubated with 0.03μM, 0.1μM, 0.3μM, 1μM, and 3μM retinal (RE) for 4 hours, and the cell viability was detected by CCK8 assay to determine the effective dose of retinaldehyde. The expanded H1N1 influenza virus was used to infect retinal-treated MDCK cells in vitro to verify the inhibitory effect of retinaldehyde on the infection of H1N1 influenza virus. The cells were divided into four groups: H1N1+DMEM group, H1N1+DMSO group, H1N1+ retinoic acid receptor blocker (RAa) group, H1N1+RE group and H1N1+RE+RAa group. According to the drug intervention in different groups, the gene expression of H1N1 influenza virus was detected by qRT-PCR. Molecular docking technology (dock) was used to simulate the binding between H1N1 influenza virus proteins and retinal molecules. According to the results of computer simulation, the potential retinal-binding proteins were expressed through the mammalian expression system, in which glycerol bacteria amplification plasmid, CHO cell transfection, His-tag gravity column purification of proteins. Surface

plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC) were used to verify the binding ability of influenza virus proteins to retinal molecules. GraphPad Prism 8.0.1 software was used for statistical analysis and related results mapping. Measurement data were expressed as $\bar{X} \pm S$. One-way ANOVA test and Student's T test were used for comparison between groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Result:

1. Detection of hemagglutination titer of H1N1 influenza virus: The hemagglutination test of 1% chicken red blood cells showed that when the dilution of H1N1 influenza virus in the allantoic fluid of chicken embryos was 1:256, the chicken red blood cells appeared a ring at the bottom of the hole accompanied by a small agglutination mass around, representing the hemagglutination titer of H1N1 influenza virus was 1:256. The H1N1 influenza virus in the collected chick embryo allantoic fluid met the experimental requirements.

2. Detection of virus titer of H1N1 influenza virus: TCID₅₀ of H1N1 influenza virus in allantoic fluid was 8.75×10^{-3} /mL. H1N1 influenza virus in the allantoic fluid collected from chicken embryos was virulent to some extent.

3. Detection of H1N1 influenza virus plaque forming unit: plaque assay showed that 200 μ L of H1N1 influenza virus in the allantoic fluid collected from chicken embryos produced 20 plaques when the virus was diluted 5^3 times, and the PFU of influenza virus was 1.25×10^{-4} /mL calculated according to the public. The PFU of H1N1 influenza virus in the allantoic fluid collected from chicken embryos was determined and the virulence of H1N1 influenza virus was confirmed.

4. Determination of retinaldehyde concentration: CCK8 assay was used to detect the effect of successive different concentrations of retinaldehyde on the proliferation of MDCK cells, the results showed that when the concentration of retinaldehyde was 0.1 μ M, there was no cytotoxicity. Therefore, 0.1 μ M was chosen as the test concentration of retinaldehyde.

5. Inhibition of H1N1 influenza virus virulence assay by vitamin A: qRT-PCR results showed that retinaldehyde intervention reduced H1N1 influenza virus gene expression in MDCK cells infected with H1N1 influenza virus compared with the blank control group ($P < 0.01$). The gene expression of H1N1 influenza virus was significantly increased after RA receptor blockade compared with the group without RA receptor

blocker ($P<0.05$).

6. Molecular docking technology to simulate the binding of H1N1 influenza virus proteins and retinal molecules: Among the 10 proteins of H1N1 influenza virus, after screening, NA protein (PDB ID: 3B7E), M1 protein (PDB ID: 1EA3) and NP protein (PDB ID: 3ZDP) were found to have binding sites with retinal molecules, indicating the possibility of binding.

7. SPR results showed that the binding forces (KD) between H1N1 influenza virus and retinal molecules: 1EA3, 3ZDP and 3B7E proteins were in accordance with the binding conditions, but 4YYL protein did not show binding forces to retinal molecules.

Conclusions:

1. Retinaldehyde can inhibit H1N1 influenza virus infection in vitro.
2. Retinaldehyde has binding sites with NA protein(PDB ID:3B7E), M1 protein(PDB ID:1EA3) and NP protein(PDB ID:3ZDP) of H1N1 influenza virus and is able to bind.
3. Retinal inhibited the process of H1N1 influenza virus infection and replication by directly binding to H1N1 virus proteins.

Key words:

H1N1, Viral proteins, Vitamin A, Retinaldehyde, Computer simulation

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 H1N1 流感病毒简介.....	1
1.1.1 H1N1 流感病毒的来源及特征	1
1.1.2 H1N1 流感病毒的结构及功能	1
1.1.3 H1N1 流感病毒感染复制的过程	3
1.1.4 H1N1 流感病毒感染的预防及其局限性	4
1.1.5 H1N1 流感病毒感染的治疗措施	4
1.2 维生素 A 简介.....	4
1.2.1 维生素 A 概述.....	4
1.2.1 维生素 A 代谢.....	5
1.2.2 维生素 A 缺乏的流行病学现状	6
1.2.3 维生素 A 对免疫系统的影响	6
1.3 维生素 A 与 H1N1 流感病毒的相关研究.....	7
1.4 研究目的及意义	8
第 2 章 材料方法	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 主要试剂及耗材	10
2.1.2 主要实验仪器和设备	12
2.2 实验方法	12
2.2.1 主要试剂配制	12
2.2.2 实验分组及细胞处理	13
2.2.3 H1N1 流感病毒的鸡胚扩增.....	14
2.2.4 血凝实验测定 H1N1 流感病毒血凝效价	14
2.2.5 空斑实验测定 H1N1 流感病毒的 PFU	15
2.2.6 Cell Counting Kit-8	16

2.2.7	实时定量聚合酶链反应	17
2.2.8	计算机模拟	19
2.2.9	甘油菌制备质粒	20
2.2.10	质粒转染制备蛋白	20
2.2.11	聚丙烯酰胺蛋白电泳	24
2.2.12	表面等离子共振技术	26
2.2.13	统计学方法	26
第 3 章	结 果	27
3.1	扩增的 H1N1 流感病毒测定.....	27
3.1.1	扩增的 H1N1 具有血凝抑制作用	27
3.1.2	扩增的 H1N1 具有蚀斑毒性	28
3.2	体外实验视黄醛对 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞的影响	28
3.2.1	视黄醛浓度的确定	28
3.2.2	视黄醛对 H1N1 感染细胞具有抑制作用	29
3.3	计算机模拟 H1N1 四种蛋白与视黄醛存在结合位点	29
3.3.1	视黄醛和 H1N1 流感病毒蛋白分子结构建模	30
3.3.2	视黄醛和 H1N1 流感病毒蛋白分子对接	30
3.4	H1N1 蛋白与视黄醛结合能力的验证	31
3.4.1	qRT-PCR 鉴定 H1N1 基因转染成功	31
3.4.2	SDS-PAGE 鉴定 H1N1 蛋白纯化成功	32
3.4.3	表面等离子共振技术测定 H1N1 蛋白与视黄醛的结合力	33
第 4 章	讨 论	35
4.1	维生素 A 与视黄酸受体的关系	35
4.2	H1N1 流感病毒与免疫反应.....	35
4.3	维生素 A 与 H1N1 流感病毒.....	36
4.4	计算机模拟的优势	37
第 5 章	结 论	39

5.1 结论.....	39
5.2 创新性	39
5.3 局限性与展望	39
参考文献.....	40
作者简介及攻读硕士期间取得的科研成果	46
致谢.....	47

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ANOVA	Analysis of variance	方差分析
CHO	Chinese hamster ovary cell	中国仓鼠卵巢细胞
CCK8	Cell counting kit-8	CCK8 试剂盒
CYP26	Recombinant Cytochrome P45026	细胞色素酶
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	含氨基酸和葡萄糖培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HIS	Anti-6*His	多组氨酸
H1N1pdm09	H1N1 pandemic 2009	2009 年流行的 H1N1 病毒
HAI	Hemagglutination inhibition	血清血凝抑制
HA	Hemagglutinin	糖蛋白血凝素
IAV	Influenza A virus	甲型流感病毒
IBV	Influenza B virus	乙型流感病毒
ICV	Influenza C virus	丙型流感病毒
IDV	Influenza D virus	丁型流感病毒
IgA	Immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	等温滴定量热技术
LRAT	Lecithin retinol acyltransferase	卵磷脂视黄醇酰基转移酶
LB	Luria-Bertani	溶菌肉汤
mM	mmol/L	毫摩尔每升
MDCK	Dog Kidney Transformed Cells	狗肾细胞
MPMS	1-Methoxy PMS	1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯盐

中英文缩略词表（续表）

英文缩写	英文全称	中文全称
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
PFU	Plaque forming unit	空斑形成单位
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription-PCR	定量反转录 PCR
RE	Retinal	视黄醛
RAR	Retinoic acid receptor	视黄酸受体
RAa	Retinoic acid receptor blockers	视黄酸受体阻断剂
RXR	Retinoid receptors	类视黄醇受体
REH	Retinol ester hydrolase	视黄酯水解酶
RDH	Retinol dehydrogenase hydrolase	视黄醇脱氢酶
RRD	Retinol reductase hydrolase	视黄醇还原酶
RALDH	Retinal dehydrogenase hydrolase	视黄醛脱氢酶
RPE65	Human retinal pigment epithelial cell specific protein 65	人视网膜色素上皮细胞特异性蛋白
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面等离子共振技术
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
vRNP	Ribonucleoprotein complexes	核蛋白复合物
vRNA	Viral ribonucleic acid	病毒核糖核酸
VA	Vitamin A	维生素 A
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
μM	μmol/L	微摩尔每升

第1章 绪 论

1.1 H1N1 流感病毒简介

1.1.1 H1N1 流感病毒的来源及特征

流感病毒 (influenza virus, IV) 属于单负链 RNA 病毒, 是正粘科病毒 (Orthomyxoviridae) 的一种^[1]。包括甲 (A)、乙 (B)、丙 (C)、丁 (D) 四种类型流感病毒。甲型 (influenza A virus, IAV) 和乙型 (influenza B virus, IBV) 流感病毒是导致人类发病和死亡的主要病毒类型, 而丙型 (influenza C virus, ICV) 流感病毒可以感染人类, 但很少造成疾病发生。另外, 丁型 (influenza D virus, IDV) 流感病毒尚未被发现与人类感染有关。

甲型流感病毒起源于各种鸟类和哺乳动物物种, 由于其极易发生突变, 常引起全球人类流感疫情^[2]。流感症状包括轻度上呼吸道疾病伴发热、咽痛、咳嗽、肌肉疼痛、疲劳、头痛和虚弱, 以及严重继发性下呼吸道感染或致死性肺炎^[3]。2018 年据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 估计, 每年流感造成的全球死亡率负担在 250 万至 500 万例全因死亡之间。根据两种主要表面糖蛋白血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 的抗原性, 甲型流感病毒分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[4]。其中 H1N1 流感病毒 (简称 H1N1) 是一种起源于 1918 年的可编码 10 种蛋白的甲型流感病毒亚型。该病毒通过空气传播, 是人类最常感染的流感病毒之一, 引起的流感具有高致病性和传染性。流感病毒根据其类型、地理来源、数量、分离年份和病毒亚型进行命名。自 1918 年西班牙 H1N1 流感爆发以来, 该病毒于 2009 年再次引起重大流感流行, 对人类健康和生命造成严重影响。

1.1.2 H1N1 流感病毒结构及功能

H1N1 流感病毒的结构和其他流感病毒一样, 主要由三部分组成, 分别是核心核糖蛋白、中间层基质蛋白和外层的包膜蛋白。H1N1 流感病毒的具体结构如图 1.1 所示, 根据其基因组编码的十种蛋白的功能不同, 可以将其蛋白分为 6 类。①HA 蛋白是 H1N1 表达最丰富的包膜蛋白, 也是 H1N1 致病的主要因素, 通过

宿主细胞表面的唾液酸受体使 H1N1 结合宿主细胞并感染^[5,6]。②碱性聚合酶 1 (polymerase basic 1, PB1) 和碱性聚合酶 2 (polymerase basic 2, PB2) 和酸性聚合酶 (phosphatidic acid, PA) 蛋白是 H1N1 的三种聚合酶蛋白, 能够形成 RNA 聚合酶复合物并参与 H1N1 RNA 的转录和复制^[7]。③NP 蛋白又称 H1N1 核蛋白, 是维持 H1N1 内结构的重要蛋白, 具有促进 H1N1 RNA 和 RNA 聚合酶复合物结合形成核蛋白复合物 (Madin-Darby canine kidney, vRNP) 从而稳定 H1N1 基因组 RNA 的作用^[8]。同时, NP 还是调节线粒体自噬的调节因子, 其介导的线粒体自噬导致线粒体锚定蛋白的降解, 从而阻断抗病毒信号传导并促进 H1N1 复制^[9]。④非结构蛋白 1 (non-structural protein 1, NS1) 和非结构蛋白 2 (non-structural protein 2, NS2) 属于非结构蛋白, 在感染的细胞中, NS1 位于细胞核中, NS2 位于细胞质中^[10]。NS1 通过结合病毒粒子 RNA 以及一些病毒和细胞蛋白在流感病毒生命周期中作为转录后调节因子起重要作用^[11]。NS2 通过输出信号和与染色体维持蛋白 1 (Chromosome region maintenance 1, Crm1) 的相互作用在介导病毒 vRNP 从细胞核输出到细胞质中起重要作用^[12]。⑤M1 和 M2 属于基质蛋白, M1 在病毒出芽和组装过程中起着关键作用^[13]。M2 与病毒表面特征质子通道活性相关, 参与病毒的传染过程^[14]。⑥NA 是一种可切割 HA 与宿主细胞唾液酸化受体之间的连接的酶, 以促进后代病毒释放。NA 还可以去除呼吸道粘蛋白、纤毛和细胞糖萼中的诱饵受体, 帮助病毒穿透覆盖在宿主细胞上的高度唾液酸化粘液层, 促进病毒进入^[15-18]。其中, NA 蛋白和 HA 蛋白在病毒感染中起重要作用, 同时也最易发生突变, 使流感病毒发生逃逸宿主免疫反应。

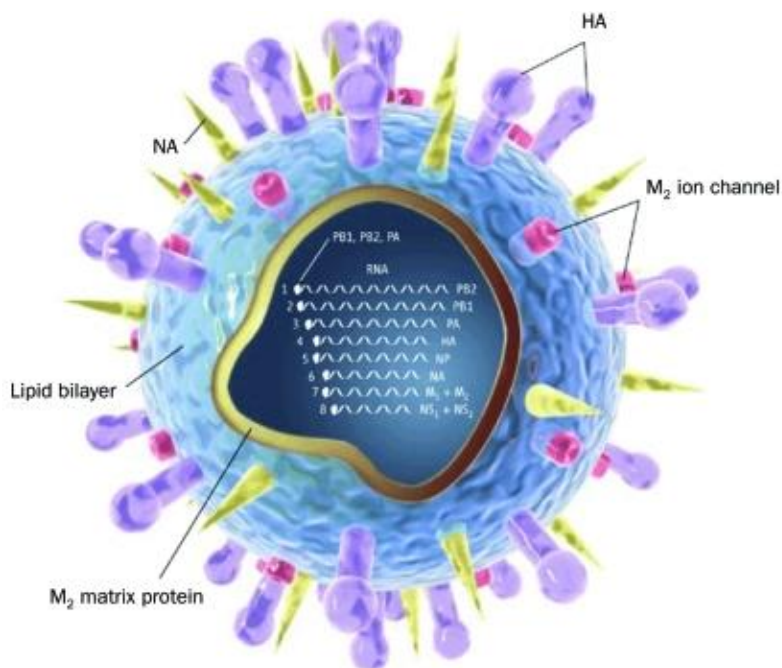


图 1.1 H1N1 流感病毒的结构

1.1.3 H1N1 流感病毒感染复制的过程

H1N1 流感病毒感染机体后，通过感染宿主细胞进而进行复制和繁殖。大致可以分为五个阶段：①病毒吸附和入侵宿主细胞：当 H1N1 通过鼻腔或口腔进入体内，病毒表面的 HA 蛋白与宿主细胞表面的唾液酸受体结合，并促进病毒颗粒的内化，进而使细胞膜内陷包裹病毒颗粒，将病毒颗粒以内吞的方式进入细胞内，并内化形成核内体^[19,20]。②病毒脱壳并释放核心元件：生成的核内体经过 H1N1 的 M2 蛋白离子通道介导后，PH 由 6.5 降低至 5.0，PH 的改变导致 HA0 蛋白前体被蛋白酶切割成 HA1 和 HA2^[21,22]同时促进了 H1N1 病毒包膜和宿主细胞内体膜的融合，以及病毒的 vRNP 复合物与 M1 蛋白解离并释放进入细胞质^[23]。③病毒复制：vRNP 复合物通过 NP 蛋白释放核定位信号，将其转运至细胞核内。在细胞核内，vRNP 复合物以 vRNA 为模板启动病毒 mRNA 的合成，并进行病毒基因组 RNA 的复制。④新病毒组装及出芽：病毒 mRNA 输出细胞核并在细胞质中合成新的病毒蛋白质。病毒基因组 RNA 则保留在细胞核中并生成新的病毒核糖核酸（viral RNA，vRNA），并与病毒蛋白在质膜处组装形成新的 vRNP 复合物，引发宿主细胞膜的出芽^[24,25]。⑤病毒释放：在宿主细胞表面，当唾液酸受体被 NA 切除后，新形成的病毒颗粒会被释放到气道中，以感染新的宿主。

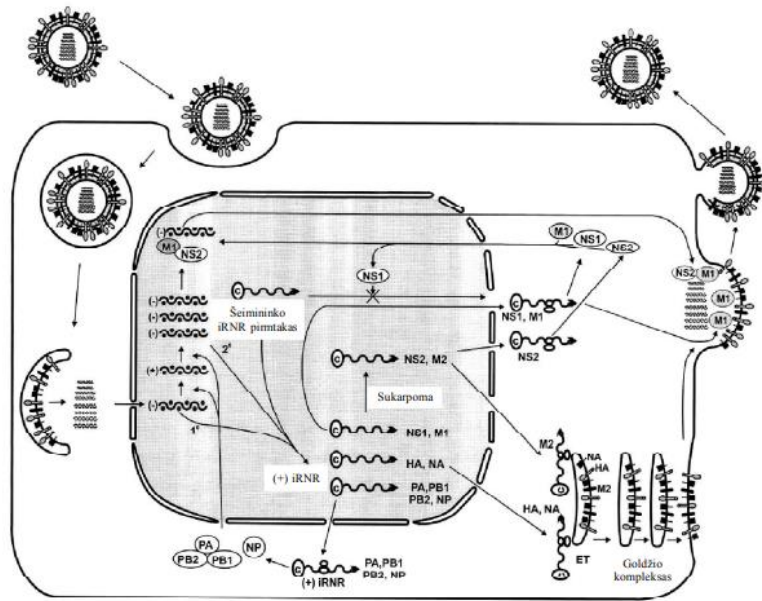


图 1.2 H1N1 流感病毒感染复制的过程

1.1.4 H1N1 流感病毒感染的预防及其局限性

H1N1 流感病毒能够引发季节性和爆发性的流行性感冒，主要通过呼吸道传播，通过飞沫或气溶胶，也可以通过口、鼻、眼睛等黏膜直接或间接接触传播。目前预防流感发生和传播的最有效方法是接种 H1N1 流感疫苗^[26]。市面上准许使用的 H1N1 流感疫苗根据疫苗病毒活性，分为灭活病毒疫苗和减毒或无毒病毒疫苗两种。流行病学研究表明，单剂 2009 年 H1N1 流感病毒疫苗可增强 80% - 96% 的 18-64 岁成年人和 56% - 80% 的 65 岁及以上成年人对流感病毒的抗原反应。同时，当再次感染 H1N1 流感病毒时，血清血凝抑制（hemagglutination inhibition test, HAI）效价明显降低，HAI 代表了抗体阻止血凝素蛋白与唾液酸结合的能力，是评价甲型 H1N1 流感病毒免疫后机体抗原反应的重要指标^[27]。然而，由于流感病毒具有抗原变异性，以及特殊人群，如老年和肥胖等人群全身较低的炎症水平等因素，接种流感疫苗预防流感仍然存在一定的局限性^[28,29]。

1.1.5 H1N1 流感病毒感染的治疗措施

H1N1 流感病毒感染机体后，一方面病毒的复制和繁殖能对宿主呼吸道上皮细胞造成损害，另一方面病毒可以通过诱导的过度炎症反应导致肺组织损伤。目前，抗病毒治疗的药物主要包括两类，一是 M₂ 离子通道阻滞剂，临床常用的包括金刚烷胺（an antadine）和金刚乙胺（rin antadine）。原理是通过阻滞 H1N1 病毒表面的 M2 蛋白离子通道，抑制病毒核内体进入细胞以及病毒包膜和

宿主细胞内体膜的融合，阻止病毒的复制^[30]。另一类是以奥司他韦（oseltamivit）和帕拉米韦（peramivir）为主的神氨酸酶抑制剂。原理是诱导病毒 NA 蛋白上神经氨酸糖苷键的断裂，抑制病毒从宿主细胞中的释放和扩散^[31,32]。然而，由于药物的广泛应用，H1N1 对两类药物均产生了明显的耐药性^[33,34]。2015 年印度甲型流感爆发是 H1N1 病毒对奥司他韦产生耐药性所致^[35,36]。因此，研发新的治疗 H1N1 流感病毒的方法迫在眉睫。

1.2 维生素 A 简介

1.2.1 维生素 A 概述

维生素是一类在物质代谢中起重要作用的调节物质，不构成身体组织也不是能量的来源，但是维持身体必须生命活动的一类有机化合物。其中维生素 A 是人体必需的易缺乏的脂溶性维生素，它以视黄醇、视黄醛（all trans-Retinal, RE）、视黄酸、醋酸视黄酯和棕榈酸视黄酯等衍生物的形式广泛存在于人体^[37]。由于人体无法自行合成，维生素 A 作为人体重要的微量元素只能通过食物摄入。外源性维生素 A 主要有两种来源方式：一种如视黄醇长链脂肪酸酯（视黄酯）的先天性维生素 A，易于在体内水解形成视黄醇，主要来自动物性食物，如鸡蛋、鱼油、内脏、乳制品等；另一种是如 β -胡萝卜素的是维生素 A 前体类胡萝卜素，主要存在于深色水果和蔬菜中，如胡萝卜、芒果等^[43,44]。 β -胡萝卜素在肠粘膜内可部分转化为维生素 A，转化率为 12:1（其他类胡萝卜素为 24:1）^[45]。维生素 A 在视觉、皮肤黏膜、生长发育、生殖功能、免疫功能以及抗细胞增殖等方面都发挥着重要作用^[38,39,46]。

1.2.2 维生素 A 代谢

食物中的维生素 A 和 β -胡萝卜素被吸收后，在体内通过各种酶转变为视黄醛和视黄酯。全反式视黄醛在体内可通过视黄醛脱氢酶作用转化为视黄酸^[40]。

当外源性的膳食维生素 A 被摄入后，以视黄酯的形式储存在体内，视黄酯由卵磷脂视黄醇酰基转移酶（Recombinant Lecithin Cholesterol Acyltransferase, LRAT）合成^[40]。在眼视网膜色素上皮细胞内，全反式视黄酯被人视网膜色素上皮细胞特异性蛋白 65（retinal pigment epithelium 65, RPE65）水解和异构化形成 11-顺式视黄醛，参与光导反应^[42]。

在膳食维生素 A 不足时, 储存的视黄酯可能被视黄酯水解酶 (Retinyl Ester Hydrolase, REH) 水解, 以产生生理上可用的全反式视黄醇。代谢中间产物全反式视黄醛可以通过胡萝卜素-15, 15' -加氧酶 (β -carotene-15, 15' -monooxygenase 1, BCMO1) 裂解 β -胡萝卜素或通过视黄醇脱氢酶 (retinal dehydrogenase, RDH) 介导的全反式视黄醇的氧化产生^[41]。同时, 全反式视黄醛也能由视黄醇还原酶 (Retinol reductase, RRD) 介导还原为全反式视黄醇。在可视和非可视系统中, 视黄醛异构体也是发色团, 可与 G-蛋白偶联跨膜蛋白家族的视蛋白结合, 形成光敏受体, 在眼球发育中充当重要的信号转导分子。

全反式维甲酸是膳食维生素 A 的主要活性代谢物, 它由全反式视黄醛通过视黄醛脱氢酶 (retinoic acid (RA)-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase, RALDH) 表达。视黄酸是视黄酸受体 (retinoic acid receptor, RAR) 和类视色素 X 受体 (Retinoid X receptor, RXR) 的配体, 这两种受体作为转录因子调控正常和恶性细胞的生长和分化。在细胞核内, 全反式维甲酸与核受体结合, 调控维生素 A 反应基因的表达水平。多余的全反式维甲酸会被特定的细胞色素 26 (cytochromeP26, CYP26) 分解代谢, 然后排出体内。然而由于维甲酸的局部刺激性, 一定程度上限制了其临床应用。视黄醛是维甲酸的中间代谢产物, 具有相似的生物学活性, 因此, 相关研究常以视黄醛模拟维生素 A 进行相关试验。

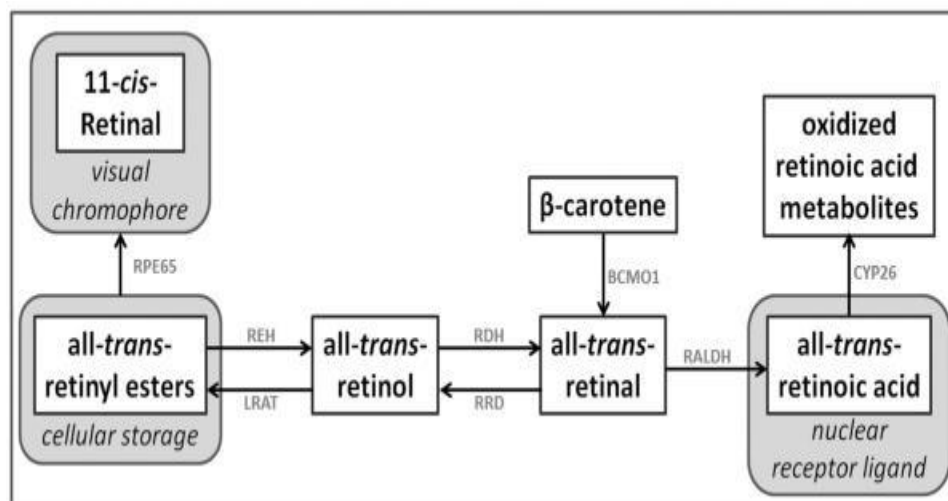


图 1.3 维生素 A 体内代谢的过程

1.2.3 维生素 A 缺乏的流行病学现状

由于人体不能合成维生素 A, 只能通过食物进行摄取, 常常导致维生素 A 不足或缺乏。维生素 A 在体内各个脏器中均发挥着重要作用, 当其缺乏时, 会

引起干眼症、夜盲症、皮肤角化等一系列生理改变和临床症状。维生素 A 缺乏和亚缺乏在世界范围内普遍存在，严重影响发展中国家和发达国家^[47]。2013 年，全球范围内约有 0.9% 的维生素 A 缺乏症儿童，以及 33% 的亚临床维生素 A 缺乏症儿童^[48]。世界卫生组织数据显示至 2017 年，发展中国家存在着 2 亿的学龄前儿童和 2000 万孕妇的维生素 A 缺乏症患者。2018 年，我国中小学生的维生素 A 缺乏率高达 36%，维生素 A 缺乏已然成为了影响公众健康的主要公共卫生问题之一^[49]。

1.2.4 维生素 A 对免疫系统的影响

研究表明，机体的营养状态与免疫水平密切相关，维生素 A 在免疫功能中充当重要因子^[50]，主要在以下几个方面发挥作用：①促进免疫细胞的发育和分化：维生素 A 对免疫细胞的生成和发育具有调节作用，尤其是对 T 细胞、B 细胞和自然杀伤（natural killer cell, NK）细胞等免疫细胞的发育和分化有重要影响^[51]。维生素 A 缺乏会导致 NK 细胞活性以及细胞毒性 T 淋巴（Cytotoxic T lymphocytes, CTL）细胞功能降低，以及增强迟发性的超敏反应，导致外源性的感染更加严重。②维持黏膜屏障：黏膜是身体内部与外界环境的重要屏障，维生素 A 能够促进黏膜细胞的分化和增殖，维持黏膜的完整性和功能，从而增强免疫防御能力^[52]。③调节免疫应答：维生素 A 还能够调节免疫细胞的活性和功能，影响炎症反应和免疫应答的平衡。它可以调节免疫细胞产生和释放细胞因子，影响炎症反应的强度和持续时间^[53]。维生素 A 缺乏会导致免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G, IgG），免疫球蛋白 E（Immunoglobulin E, IgE）和黏膜免疫球蛋白 A（Immunoglobulin A, IgA）水平降低，以及嗜酸性粒细胞比例下降，引发机体免疫功能降低和对病毒的易感性增加。④抗氧化作用：维生素 A 具有一定的抗氧化作用，能够清除自由基、抑制氧化损伤，从而保护免疫细胞和组织免受损伤^[54]。

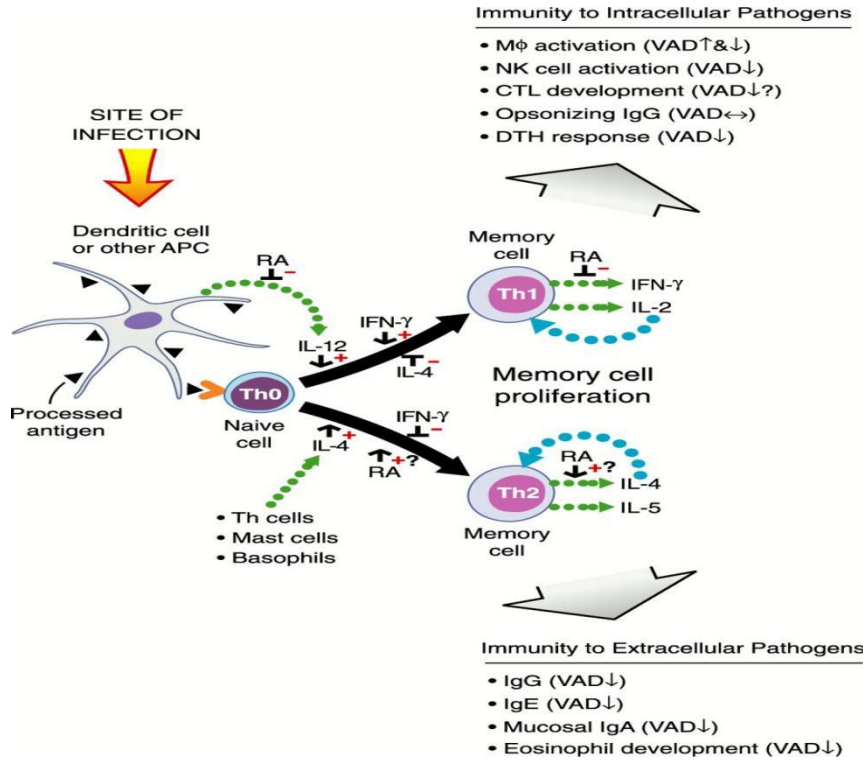


图 1.4 维生素 A 及其缺乏对免疫系统的影响

1.3 维生素 A 与 H1N1 流感病毒的相关研究

关于维生素 A 与 H1N1 流感病毒间的关系，现有研究表明，维生素 A 通过调节免疫系统，增强机体对 H1N1 流感病毒的抵抗，进而抑制 H1N1 流感病毒感染。一方面，维生素 A 可以通过增强 IgA 在粘膜表面的诱导作用，改变 B 细胞重链的开关重组^[47]，促进 IgA 和 IgA-afc（抗体形成细胞）应答，影响 IgA 与 IgG 比例，从而介导免疫类型向针对 H1N1 病毒的 Th1 免疫应答类型转化^[55,56]。传统上认为，Th1 细胞驱动的皮肤免疫是机体对抗流感病毒入侵的主要免疫反应。其通过分泌促炎细胞因子，如干扰素- γ (IFN- γ ，Interferon- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 2 (Interleukin-2, IL-2) 刺激巨噬细胞、NK 细胞和 CD8⁺T 细胞细胞毒性等对抗细胞内病原体。另一方面，还有研究证实，维生素 A 通过干扰蛋白激酶 (protein kinase B, Akt) 和信号转导及转录激活因子 1 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 1, STAT 1) 通路，能够抑制甲型 H1N1 流感病毒诱导的 A549 肺泡上皮细胞 t 细胞表达和分泌激活调节趋化因子 (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted, RANTES) 的产生。同时，维生素 A 对维持黏膜的完整性

发挥了重要作用，以减轻 H1N1 流感病毒相关的气道炎症反应^[57]。

维生素 A 与 H1N1 流感病毒的相关性在流行病学研究中也证实，一项队列研究显示，维生素 A 水平低的人群，对 H1N1 流感病毒的易感性和感染的严重程度高于正常人群^[58]。临床试验研究中，给予维生素 A 水平低的人群一定的维生素 A 补充剂后，血清维生素 A 水平得到恢复，并能够改善 H1N1 流感病毒感染的情况^[59]。

实验动物学研究中，对维生素 A 缺乏小鼠和维生素 A 正常水平小鼠同时滴鼻 H1N1 流感病毒，发现缺乏维生素 A 组对 H1N1 流感病毒的易感性和致死率显著高于正常水平组小鼠^[26]。并且对维生素 A 缺乏组给予维生素 A 补充剂后，能够改善 H1N1 流感病毒感染情况^[60]。正常维生素 A 水平小鼠感染 H1N1 流感病毒后给予维生素 A 补充剂，相关免疫因子水平得到改善，对 H1N1 流感病毒的防御能力也相应提高^[61]。

总之，维生素 A 通过免疫系统在机体防御 H1N1 流感病毒感染过程中发挥着不可或缺的作用。

1.4 研究目的及意义

H1N1 流感病毒不仅在过去对人类健康造成了巨大危害，且由于其变异特性增加了预防和治疗的难度。在当今人类亚健康状态日益增长的情况下，维生素 A 缺乏所导致的免疫水平降低难免会引起包括流感在内各种疾病的易感。通过改善维生素 A 缺乏状态，进而增强对流感的抵抗力，无疑是一种双赢的公共卫生策略。尽管有研究已经证实维生素 A 对 H1N1 流感病毒的抑制作用，但目前的研究都集中在通过机体免疫系统间接发挥作用。不同人群的免疫水平、基线维生素 A 水平以及孕期、肥胖等特殊状态仍然是研究的局限性所在。因此，新的疗效显著的预防和治疗 H1N1 流感的手段迫在眉睫，探索科学、可靠的细胞学机制是研究的重点。本课题拟探讨维生素 A 能否与 H1N1 流感病毒相关蛋白结合，直接作用于 H1N1 流感病毒本身使其毒性降低。通过本研究可证实维生素 A 抑制 H1N1 流感病毒毒性的新的途径，从另外一个角度完善两者之间的联系，为流感病毒患者早期临床诊断和干预治疗提供理论依据。

第2章 材料方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂及耗材

表 2.1 实验试剂

试剂名称	产地及公司
BCA 蛋白定量试剂盒	上海, 碧云天
dNTPs	日本, Takara
DMEM 培养基	以色列, BI
ECL 显色液	中国, 新赛美
GAPDH 抗体	中国, Proteintech
H1N1 蛋白引物	上海, 生工生物
H1N1 NA 引物	上海, 生工生物
H1N1pdm09	吉林大学基础医学院
HRP 标记山羊抗小鼠抗体	中国, Proteintech
HIS 标签抗体	中国, 正能
HRP 标记山羊抗兔抗体	中国, Proteintech
IKK β 抗体	美国, CST
IKB α 抗体	美国, CST
Lip 2000 转染试剂	美国, Sigma
MDCK 细胞株	上海, Absin
Oligo dT	日本, Takara
PVDF 膜	美国, Millipore
PBS 缓冲液	中国, 鼎国
p-ERK 抗体	美国, CST
Reverse Transcriptase M-MLV	日本, Takara
RIPA 蛋白裂解液	中国, Beyotime

续表 2.1 实验试剂

试剂名称	产地及公司
RNase Inhibitor	日本, Takara
SDS-PAGE 配胶试剂盒	北京, 博奥龙
SYBR [®] Premix EX Taq [™]	日本, Takara
SDS	中国, 鼎国
Tris-base	中国, 鼎国
TPCK 胰酶	上海, 懋康生物
0 日龄鸡胚	济南, 赛斯
1%鸡红细胞悬液	上海, 源叶生物
5×buffer	日本, Takara
10%福尔马林固定液	中国, Biosharp
氨苄霉素	北京, 索莱宝
低熔点琼脂糖	北京, 索莱宝
蛋白 Marker	美国, Thermo
蛋白酶抑制剂	德国, Roche
低熔点琼脂糖	上海, 源叶生物
二甲基亚砷	美国, Sigma
过硫酸胺	中国, 鼎国
甘氨酸	中国, 鼎国
结晶紫染液	上海, 源叶生物
切片石蜡	中国, 阿拉丁
青链霉素	北京, 索莱宝
脱脂奶粉	中国, 鼎国
胎牛血清	以色列, BI
胰酶	以色列, BI
质粒提取试剂盒	北京, 全式金

2.1.2 主要实验仪器和设备

表 2.2 实验主要仪器与设备

设备名称	产地及公司
立式蒸汽高压灭菌锅	中国, 博讯
超净无菌操作台	中国, 苏净安泰
电热鼓风恒温干燥箱	中国, 中仪国科
细胞恒温培养箱	日本, SANYO
低速离心机	中国, 君意
涡旋仪	美国, Vortex Genie
低温高速离心机	中国, 大龙
普通光学显微镜	日本, SANYO
制冰机	中国, 国仪
恒温水浴锅	中国, 中和
多功能酶标仪	美国, Bio-Rad
4℃冰箱	中国, 海尔
-20℃冰箱	中国, 海尔
-80℃冰箱	日本, SANYO
BD FACS Calibur 流式细胞仪	美国, BD
电子天平	中国, 宁波新芝仪器
电泳仪	中国, 君意
转膜仪	中国, 君意
ECL 成像仪	美国, Gene
普通 PCR 仪	美国, PERKIN
实时定量 PCR 仪	美国, ABI

2.2 实验方法

2.2.1 主要试剂配制:

(1) 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer solution, PBS): 取一袋 PBS 粉末, 使用 1000 mL 的量筒称取 1000 mL 的双蒸水, 将 PBS 粉末、800 mL 的双蒸水

和转子加入到 1000 mL 的烧杯中，然后用保鲜膜封口，在磁力搅拌器上搅拌 0.5 小时直至充分溶解。将溶液定容至 1000 mL，并放入立式蒸汽高压灭菌锅中进行灭菌（121℃，20 min）。待冷却至室温后密封，并标明配制日期及溶液名称，放入 4℃ 保存。

（2）5×电泳缓冲液:1000 mL 量筒量取 800 mL ddH₂O 于烧杯中，称取 15g Tris-base、94g 甘氨酸和 5g SDS 加入烧杯，充分溶解后定容至 1000 mL，于室温保存。

（3）1×电泳缓冲液：1000 mL 量筒量取 200 mL 5×电泳缓冲液于烧杯中，加入 800 mL ddH₂O 稀释至 1000 mL，充分搅拌混匀，于室温保存。

（4）转膜缓冲液：1000mL 量筒量取 700 mL ddH₂O 于烧杯中，称取 7.207g 甘氨酸、1.514g Tris-base 加入烧杯，完全溶解后加入 200 mL 甲醇，磁力搅拌器搅拌均匀，ddH₂O 定容至 1000 mL，室温保存。

（5）LB 培养基：1000 mL 量筒量 950 mL 去离子水于烧杯中，取称取胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5g，NaCl 10g 加入烧杯。完全溶解后，用 5mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，用去离子水定容至 1L。在 15psi 高压下蒸汽灭菌 21 min。待冷却至室温后，4℃ 保存。

（6）考马斯亮蓝染色液：使用 375 mL 去离子水溶解 25g 硫酸铝，向溶液中加入 48 mL 无水乙醇并充分混合。称取 0.1g 考马斯亮蓝 G250 染料并混合均匀。向溶液中加入 11.75 mL 85%的磷酸并再次混合。最后加入剩余的去离子水直到总量达到 500 mL。将配制好的染液存放在棕色瓶中，并在室温暗处保存，使用时需摇匀。

（7）考马斯亮蓝洗液：量筒分别量取 250 mL 甲醇和 80 mL 冰醋酸加入 1 L 烧杯中，然后用 ddH₂O 定容至 1000 mL。常温放置，1 个月内使用。

2.2.2 实验分组及细胞处理

将购自普诺赛生物公司的狗肾细胞（MDCK）（货号 CL-0154）复苏后，传代，待稳定培养 2-3 代后准备进行试验。实验分组如下：H1N1 组、H1N1+视黄酸受体阻断剂(RAa)组、H1N1+RE 组和 H1N1+RE+RAa 组。RAa 浓度为 3μM、RE 浓度为 0.03μM、DMSO 浓度为总体积的 5%。

- (1) H1N1 组：加 H1N1 病毒作为对照，加入对应的溶剂。
- (2) H1N1+RAa 组：首先加入 RAa 作用 0.5 h，然后给予 H1N1 感染 3 h，最后加入对应的溶剂。
- (3) H1N1+RE 组：首先加入 RE 作用 0.5 h，然后给予 H1N1 感染 3 h，最后加入对应的溶剂。
- (4) H1N1+RE+RAa 组：首先加入 RAa 作用 0.5 h，然后加入 RE 作用 0.5 h，最后给予 H1N1 感染 3 h，最后加入对应的溶剂。

2.2.3 H1N1 流感病毒的鸡胚扩增

流感病毒来源于吉林大学基础医学院 H1N1pdm09 病毒株，相关病毒实验均在吉林大学 p2 实验室完成。

- (1) 首先准备受精的鸡胚 20 枚，表面消毒处理后，置于 37℃ 孵箱内孵育，底层放一定的去离子水，保持孵箱内一定的湿度；
- (2) 待鸡胚 9-10 日龄时，照蛋。标记气室，并在上方 0.5 cm 处标记打孔；
- (3) 消毒。生物安全柜内对气室进行消毒；
- (4) 打孔。避开鸡胚的血管在标记的位置进行打孔；
- (5) 接种。每个鸡胚注射 0.1 mL 病毒液；
- (6) 封蜡。接种完毕后，使用酒精灯将蜡块熔化，然后将溶化的蜡用于密封鸡胚蛋壳上的孔洞，并将鸡胚置入恒温箱内，保持在 37℃ 温度下进行培养；
- (7) 继续孵育 48 h，将鸡胚每天翻蛋两次，照蛋一次。正常发育的受精蛋胚胎，其血管呈放射状分布，色彩鲜艳鲜红；而死亡的胚胎蛋，则表现为较浅的颜色，且内部存在不规则的血弧、血环，缺少放射状血管。24 h 内若发现有死亡的鸡胚则舍去；
- (8) 收获。将鸡胚 4℃ 过夜，避免血管破裂。碘酒消毒蛋壳，用镊子去卵壳和尿囊膜，用 1 mL 注射器吸取尿囊液于 2 mL EP 管内，每个鸡胚可收集 5-8 管；
- (9) 4℃，1000rpm，10 min 离心，收取上清病毒液，用 2.2.3 血凝实验检查扩增的 H1N1 流感病毒毒性，血凝效价小于 1:256 的病毒液舍弃。无菌检查，1 mL 每管分装冰冻保存，取用时一次一管，避免反复冻融病毒失活。

2.2.4 血凝实验测定 H1N1 流感病毒血凝效价

- (1) 微量血凝板每孔加入 50 μL 1 $\times$ PBS ；
- (2) 第一列的每个孔滴加 50 μL 尿囊液，从左至右倍比稀释，第 12 列空白对照；
- (3) 从左至右每个孔中加入 50 μL 1%的鸡红细胞悬液；
- (4) 将血凝板放置在微型振荡器上振荡 1min 混匀；
- (5) 室温（18-20 $^{\circ}\text{C}$ ）放置 45 min，观察结果；
- (6) 结果观察：
 - “-”表示不凝集，红细胞沉积于管底，呈边缘整齐的圆盘状。
 - “+”表示微量凝集。红细胞沉积于管底，呈边缘不清晰的圆盘。
 - “++”表示凝集，红细胞沉积于管底呈环状，四周有凝集的小块。
 - “+++”大部凝集，红细胞呈颗粒状凝集，边沿不整齐，有下垂趋势。
 - “++++”完全凝集，红细胞均匀铺于管底。

以出现红细胞沉积于管底呈环状，四周有凝集的小块，为判断血凝的标准。血凝时，稀释倍数越高，代表 H1N1 流感病毒的凝集效价越高，越符合试验标准。

2.2.5 空斑实验测定 H1N1 流感病毒的 PFU

- (1) 准备单层 MDCK 细胞，前一晚用胰酶消化 MDCK 细胞，显微镜下用细胞计数器对细胞进行计数，然后用 DMEM 完全培养基稀释细胞悬液，将细胞密度调整为 5×10^5 细胞/mL。在 6 孔板中加入 2 mL/孔稀释好的细胞悬液。轻轻地前后左右摇晃培养板使细胞分布均匀；将细胞置 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 培养箱。过夜（24 h），显微镜下观察细胞确认细胞是否分布均匀并形成 90%左右的细胞单层；
- (2) 用准备好的病毒稀释液，含 1 $\mu\text{g/mL}$ TPCK 胰酶的 DMEM，5 倍倍比稀释病毒原液，每个梯度至少配置 200 μL 稀释液；
- (3) 准备好病毒洗液，含 1 $\mu\text{g/mL}$ TPCK 胰酶和 0.3%牛血清白蛋白（BSA）的 DMEM。BSA 用 DMEM 溶解并用 0.22 μm 规格的过滤器过滤除菌；
- (4) 吸去无菌 6 孔板中的培养液，用配置好的病毒洗液洗两遍，（洗的时

候要轻柔避免洗掉单层细胞造成空斑误差），除去培养液中的胎牛血清（FBS），每孔加入 180 μL 病毒稀释液，最后一个孔加 DMEM 作为空白对照；

（5）将加有病毒的细胞重新置于摇菌用振荡器中，让病毒感染 1.5 h，期间 37℃、转速 100rpm，混合病毒稀释液，使病毒充分接触并感染细胞；

（6）琼脂糖覆盖物的准备：双蒸水配制的 1.8%的低熔点琼脂糖+等量的含 2 $\mu\text{g/mL}$ TPCK 胰酶、0.6%BSA 的 2 $\times$ DMEM。BSA 用 2 $\times$ DMEM 溶解并用 0.22 μm 规格的过滤器过滤除菌；

（7）配制的琼脂糖置于玻璃瓶提前高压灭菌融化，然后在 45℃温育；2 $\times$ DMEM 培养基于 50 mL 无菌离心管中放置于 37℃水浴箱中温育；二者混合后 37℃温育待使用；

（8）病毒感染 1.5 h 后，用移液器小心吸去病毒液，避免碰到细胞；然后每孔加入 2 mL 制备好的琼脂糖覆盖物，注意温度避免烫伤细胞。注意稍微加快操作，不要耽误太久，10-15 min 内完成覆盖的操作，以免琼脂糖凝固；

（9）将加有覆盖物的细胞培养板放置于室温 10-20 min，待琼脂糖凝固，然后把它放回细胞培养箱中，继续培养箱倒置培养 96 h；

（10）病毒感染细胞并培养 96 h 后，弃掉琼脂糖覆盖物；以 10%福尔马林和 0.1%结晶紫混合液固定染色，每孔 1 mL；

（11）用自来水冲洗干净后，用电吹风吹干或甩板晾干；

（12）在 LED 灯箱上拍照、数空斑；

（13）以 10-100 内斑点的孔计数并计算，公式为：

$$\text{空斑形成单位 (PFU / mL)} = \frac{\text{每孔平均空斑数}}{\text{每孔病毒接种量 (mL)}} \times \text{病毒稀释度}$$

2.2.6 Cell Counting Kit-8 细胞活力检测

（1）制作标准曲线（测定细胞具体数量）

①细胞计数，铺板；

②按比例稀释细胞浓度，每个浓度准备 3 副孔；

③细胞贴壁后，加入 CCK8 试剂，并测定 OD 值。制作标准曲线。

（2）细胞增殖-毒性检测

①在 96 孔板中接种 MDCK 细胞悬液（每孔 1×10^4 个/100 μL ）。37℃，

5%CO₂ 培养细胞过夜；

②按视黄醛浓度不同，每组分别加入 0.03μM、0.1μM、0.3μM、1μM、3μM 浓度的视黄醛；

③将培养板在 37℃，5%CO₂ 培养箱孵育 4 h；

④每孔加入 10 μL CCK8 溶液，避免气泡生成；

⑤将培养板置于培养箱内孵育 2 h；

⑥用酶标仪测定 450nm 处的吸光度，并按公式计算细胞的增殖率。公式为：

$$\text{细胞增殖率} = \frac{\text{实验组吸收值} - \text{空白对照吸收值}}{\text{对照组吸收值} - \text{空白对照吸收值}} \times 100\%$$

2.2.7 实时定量聚合酶链反应

按照 2.2.1 实验分组及细胞处理部分，收集细胞进行 qRT-PCR 实验。通加入总 RNA 提取试剂（Trizol）提取总 RNA，并逆转录成 cDNA。根据试剂说明，使用 Agilent Mx3000P 机器进行定量实时聚合酶链反应。使用 2-ΔΔCT 方法计算相对于 GAPDH 基因表达水平的量，每个样品制备三个重复。引物从上海生工生物股份有限公司订购，引物序列如下表所示：

表 2.1 H1N1 流感病毒蛋白引物

Gene	Primer
NP	Forward: 5'- TGCTGGATCTGGTATTATC -3'
	Reverse: 5'- TGGGAGGCTGGTGTTTATAG -3'
4YYL	Forward: 5'- GCA GCA TGG AGG ACT TCG TGA G -3'
	Reverse: 5'- TAC AGG TCG GGC AGG AAC TTG G -3'
1EA3	Forward: 5'- GAC TGG AAA CCC TGA TTC TGC TGA G-3'
	Reverse: 5'- GGT GGT GGT GAT GGT GAT TGC TAG-3'
3ZDP	Forward: 5'- TCG AGG AGC TGA GCA GAG ATT GG -3'
	Reverse: 5'- GCT TTC AGT GGT GGT GGT GAT GG -3'
3B7E	Forward: 5'- ACT GGA GGA GAT GAG CAG AGA TTG G-3'
	Reverse: 5'- GCT TTC AGT GGT GGT GGT GAT GG-3'
GAPDH	Forward: 5'- GAC TTC AAC AGC AAC TCC CAC TC -3'
	Reverse: 5'- TAG CCG TAT TCA TTG TCA TAC CAG -3'

步骤如下：

(1) RNA 提取

①PBS 洗细胞 2-3 遍，提取细胞于 EP 管，离心使之于管底，用 1 mL Trizol 吹打混匀，室温静置 10 min，使细胞充分裂解；

②每管加入 200 μ L 氯仿充分混匀，室温静置 5 min，待液体分层后 4℃，12000rpm，15 min 离心；

③取 0.5 mL 上清液至新 EP 管；

④加入与 0.5 mL 异丙醇混匀，室温静置 10 min；

⑤4℃，12000rpm，20 min 离心，弃上清；

⑥加 1 mL 含 75%乙醇的无核酸酶（DEPC）水；

⑦4℃，7500rpm，1 min 离心，弃上清；

⑧室温干燥，至沉淀透明；

⑨加 30 μ L 冰冷的 DEPC 水，吹打溶解沉淀，溶解的 RNA 在 4℃保存，后续在低温操作；暂时不用则-80℃保存。

(2) RNA 浓度测定：

①准备物品：擦镜纸，2 μ L 枪及枪头，样品，DEPC 水，U 盘；

②打开程序；

③洗板：DEPC 水 2 μ L 洗每个孔，待程序检测结果正常后，进行下一步检测操作；

④上样：擦净 DEPC 水，每孔中加 2 μ L 样品，读板；

⑤记录结果。

(3) 逆转录：

反应液体系包括 RNA 模板、逆转录酶、dNTPs、引物和缓冲液等，可使用商用逆转录试剂盒进行反应。反应体系为 20 μ L，其中包括反应试剂和 RNA 模板。

①在冰上融化各试剂组分，并充分混匀，并在去 RNA 酶（RNase-free）离心管中配置如下体系：

试剂	用量
RNA	1 μg
5 $\times$ All-in-one RT Buffer	4 μL
RNase-free ddH ₂ O	Up to 15 μL

②反应程序:

阶段	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间
阶段 1	50	15 min
阶段 2	80	5 s

逆转录产物可立即用于 qPCR 反应, 或于 -20°C 冻存, 并在半年内使用。

(4) qRT-PCR:

总体系为 20 μL , 根据样品量, 提前计算配好预混液, 先加 19 μL 预混液, 再加 cDNA。

试剂	用量
cDNA	1 μL
2 $\times$ Q3 SYBR qPCR Master Mix	10 μL
上游引物	0.4 μL
下游引物	0.4 μL
ddH ₂ O	8.2 μL

试剂配比并预混, 加入八联管中, 离心去气泡, 按以下反应条件进行检测。

阶段	循环数	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间
阶段 1 预变性	1	95	30 s
阶段 2 热循环	40	95	10 s
		60	30 s
阶段 3	5	95	15 s
		60	1 min
		95	1 s

2.2.8 计算机模拟

为了进一步验证视黄醛对 H1N1 流感病毒的直接作用，利用计算机模拟探究视黄醛分子和 H1N1 流感病毒的蛋白之间能否存在直接结合的可能。它们之间的分子对接使用 AutoDock 分子对接软件，AutoDock 是一种常用的分子对接软件，它通过计算和模拟来预测小分子与目标蛋白的结合模式和亲和力。Autodock 的分子对接原理主要包括灵敏度评分、柔性对接和搜索算法三个方面。Autodock 利用灵敏度评分来评估小分子与目标蛋白的结合能力。它通过计算分子间的亲和力和排斥力来确定分子的结合自由能。分子间的亲和力通常是由氢键、离子键、范德华力等非共价相互作用所贡献的，而排斥力则是由于空间位阻而产生的。Autodock 使用 Lamarckian 遗传算法来优化分子的构象，以找到最佳的结合模式。Autodock 采用柔性对接的策略，即考虑小分子和目标蛋白的柔性。在分子对接过程中，目标蛋白的活性位点可能发生构象变化，而小分子也可能在结合过程中发生构象变化。为了考虑这种柔性 Autodock 使用了灵敏度评分函数来评估不同构象的结合自由能，并选择能量最低的构象作为最终的结合模式。Autodock 使用搜索算法来寻找最佳的结合模式。搜索算法通过在搜索空间中探索不同的分子构象来寻找最优解。Autodock 使用了一种称为 Lamarckian 遗传算法的搜索算法。该算法使用遗传操作，如交叉和变异，来生成新的分子构象，并通过灵敏度评分函数来评估它们的结合能。通过不断迭代和优化，Autodock 能够找到最佳的结合模式。总的来说，Autodock 的分子对接原理是基于灵敏度评分、柔性对接和搜索算法的组合。通过计算和模拟，Autodock 能够预测小分子与目标蛋白的结合模式和亲和力，并为药物设计和发现提供重要的指导。

对接配体分子（ligand）为视黄醛分子，受体分子为 7 种蛋白质分子。视黄醛分子结构 Discovery Studio 4.0 可视化工具构建，H1N1 流感病毒蛋白结构从 PDB 数据库中获得，分别为 4YYL，3B7E，1EA3，3DZP，2GX9，3EE9，6DGK。通过遗传算法获得 10 种能量最低的构象。

借助 Bindimng-sier 来完成 H1N1 流感病毒蛋白与配体分子对接，采用 Affinity 程序，Affinity 是一款用于分子对接的计算机程序，可用于寻找最佳的配体和受体结合结构。它使用蒙特卡罗极小化和模拟退火的方法进行优化，每优

化 1000 步，并考虑了溶剂的影响，同时使用单元多模型计算了非键相互作用。在使用 Affinity 进行分子对接时，需要提供配体和受体的分子结构，程序将针对这两个分子进行计算，并输出最佳的配体和受体结合结构及其能量信息。该程序可以广泛用于药物发现和分子设计等领域。对接时在整个蛋白结构空间中搜索结合口袋。结合能（binding energy）越低，表示亲和力越高。

2.2.9 甘油菌制备质粒

具体步骤如下：

（1）首先将 2 mL 含有质粒的甘油菌，加入含 200 mL LB 培养基和 200 μ L 的氨苄霉素的 500 mL 锥形瓶中，封口。置于恒温细菌培养振荡器中，37℃，200rpm，培养 16 h；

（2）取过夜培养 16 h 的菌液 10000g 离心 3 分钟，弃上清。向 Maxi-Plasmid Spin Column with Collection Tube 离心柱膜中央加入 5 mL 激活溶液 AB，8000g 离心 1 min，弃流出液后静置备用；

（3）加入 10 mL 无色溶液 RB（使用前确认已加入 RNase A），充分振荡，彻底混匀，直至菌块完全消失；

（4）加入 10 mL 蓝色溶液 LB，缓慢地上下翻转混合 8 次（剧烈震荡将导致基因组 DNA 污染），直至菌体充分裂解，溶液形成蓝色透亮，代表完全裂解（不超过 5 min）；

（5）加入 10mL NB1 溶液，缓慢混合 8 次（上清液颜色由蓝色转变为无色，代表中和完全），直至形成紧实的凝集块，冰浴 2 min；

（6）10000g 离心 15 min，小心避开沉淀，将上清倒入 Push Filter 并推滤至全新的 50 mL 离心管中；

（7）向上清液中加入橙色溶液 5 mL ER 颠倒混匀 5 次至形成橙色悬液。冰浴 10 min，随后转入 60℃ 水浴 5 min，8000g 常温离心 4 分钟，使用移液器吸头贴管壁吸弃上层橙色油相；

（8）向其中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，颠倒混匀。将液体分多次转入离心柱，每次 8000g 离心 1 min，弃流出液，至全部液体通过离心柱；

（9）加入 5 mL 溶液 WB，8000g 离心 1 分钟，弃流出液；

- (10) 重复步骤 9 一次;
- (11) 8000g 离心 3 min, 彻底去除残留的 WB。将离心柱置于新的 50 mL Collection Tube 中, 离心柱开盖室温放置 5 min, 使乙醇挥发干净;
- (12) 在离心柱的中央滴加 1mL 在 60 - 70℃ 水浴预热后的 EB, 室温静置 5 min。
- (13) 8000g 离心 2 min, 洗脱 DNA。洗脱出的 DNA 于 -20℃ 保存;
- (14) 测质粒浓度。准备物品: 擦镜纸, EB 水, 样品, 2 μ L 枪及枪头, U 盘;
- (15) 打开程序;
- (16) 洗板: EB 水 2 μ L 洗每个孔, 待程序检测结果正常后, 进行下一步检测操作;
- (17) 上样: 擦净 EB 水, 每孔中加入 2 μ L 样品滴, 读板;
- (18) 记录结果。

2.2.10 质粒转染制备蛋白

通过哺乳动物细胞脂质体瞬时转染, 将构建好的质粒导入到 CHO 细胞内游离的载体上, 短时间内获得 H1N1 流感病毒蛋白基因的表达产物。

(1) 质粒转染

- ① CHO 细胞消化后按一定浓度铺于细胞培养皿中, 待细胞长至 60 - 70%即可开始进行转染;
- ② 准备 A 管, 16 μ g 的质粒和 500 μ L 的无血清 DMEM 混合;
- ③ 准备 B 管, 40 μ L 的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂和 500 μ L 的无血清 DMEM 混合;
- ④ A 管和 B 管均混匀室温放置 5 min;
- ⑤ 将 A 管和 B 管混合, 室温放置 20 min;
- ⑥ 弃掉 CHO 细胞中的培养液, 并用无血清 DMEM 洗一遍;
- ⑦ 将混合后的液体加入 CHO 细胞培养皿中, 并加入 4 mL 无血清 DMEM 培养液;
- ⑧ 培养 6 h 后, 换成含 2% 血清的 DMEM, 并加入 6 μ g/mL 的嘌呤霉素进行

筛选；

⑨48 h 后，用 PBS 洗一遍，提取细胞蛋白。

(2) 提取蛋白质

①加入 3 mL 4°C 预冷的 PBS 溶液清洗细胞，然后吸除洗液，2 次，最后一次不吸除上清液；

②用刮刀将细胞轻轻刮下收集，400g 离心 5 min，弃去上清液。与此同时，另取一管，加入蛋白酶抑制剂（complete）：蛋白裂解液（RIPA）=16：100，预混；

③加入 50 μ L 预混液，吹打均匀，冰浴 30 min，每 10 min 摇晃一下；4°C 12000rpm 30 min 离心，吸取上清，20-30 μ L 每管封存。

(3) 蛋白质纯化

由于我们的蛋白上带有有六个组氨酸组成的 HIS 标签，使用 Ni NTA Sepharose 6FF 重力柱进行蛋白纯化，原理是利用 Ni^{2+} 与蛋白侧链上的组氨酸相互作用进而进行分离纯化。

首先准备好使用的 Buffer：

平衡液：0.02M PB、0.5M NaCl，调节 pH 7.4，室温保存。

洗杂液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.03M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

洗脱液：0.02M PB、0.5M NaCl、0.5M 咪唑，调节 pH 7.4，室温保存。

①水洗：固定，去掉胶塞，当剩余液面略高于筛板时，向柱中加入 10 个柱体积的 ddH₂O，去除残留的保护液；

②平衡：当液面略高于上筛板，向柱管中加入 5 个柱体积的平衡液，进行平衡；

③上样：将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证目的蛋白与介质充分接触，提高目的蛋白的回收率。收集流出液，用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况；

④洗杂：加入 15 倍柱体积的洗杂液，并收集；

⑤洗脱：加入 10 倍柱体积的洗脱液进行目的蛋白的洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白；

⑥水洗：依次加入 3 倍柱体积的平衡液和 5 倍柱体积的 ddH₂O。将重力柱保存在等体积的 20%乙醇中，置于 2-8℃；

⑦测蛋白浓度：

a. 标准品 BSA 即用即稀释成 0.5μg/μL，按下表加样；

标准品 (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
PBS (μL)	20	19	18	16	12	8	4	0
样品 (μL)	5	5	5					
PBS (μL)	15	15	15					

b. BCA 蛋白定量试剂盒中 A 液：B 液=50：1 预混，每孔加 200 μL，37℃ 孵育 30 min；

c. 酶标仪测浓度，制订标准曲线 ($y=kx+b$)，根据样品的 OD 值，计算蛋白的浓度。R²>0.99 越接近 1 越好，波长 562nm。

2.2.11 聚丙烯酰胺蛋白电泳

(1) 样本制备

每孔蛋白上样量为 40 μg，每个样品加入 4 μL 的 5×上样缓冲液 (loading buffer)，加入 RIPA 至体系为 20 μL。100℃金属浴加热 10 min，然后放在冰上备用。

(2) 配胶

①首先需要擦干净玻璃板及其他所用物品，并安装好。在安装的过程中，需要注意短板放在内部，长板放在外部，并缓慢放入夹子卡槽中。根据实验需要，选择适当浓度的配胶试剂盒进行配制即可；

②先配制分离胶。按照比例加入各种试剂，最后加入四甲基乙二胺 (TEMED)。混匀后加入玻璃板中。之后，加入 1 mL 无水乙醇压边，然后将其放置在 37℃的烘干箱中进行 15 min 的处理；

③在进行 DNA 凝胶电泳等实验前，需要检查分离胶是否已经凝固。一般倾斜玻璃板，观察分离胶的状态，如果其已经凝固，那么即可进行下一步操作。在这之后，需要将无水乙醇弃去并且使用滤纸吸干；

④按比例配制浓缩胶，最后加入 TEMED。混匀后加入到玻璃板中。垂直插

入梳子，避免产生气泡，然后将其放置在 37℃ 的烘干箱中进行 20 min 处理。直至浓缩胶完全凝固后，取下玻璃板进行后续试验。

(3) 上样和电泳

①将配好胶的玻璃板安装好，在内部加入 1× 电泳液直至没过玻璃板，外部没过下面的电阻丝；

②在 1× 电泳液中小心地垂直拔出梳子，两侧加入 10μL 的 1×SDS 上样缓冲液，然后两侧加入 35 μL 的蛋白 Marker，中间每孔加入 20 μL 的样品蛋白；

③上样完成后，首先以恒定的电压（60-80V）进行持续 30 min 的电泳，直到目标物种蛋白的 Marker 分离。然后，将电压调至 100 - 120V，并继续持续 1 - 2 h 的电泳，直到 Marker 跑至目的蛋白以下并且分离较为明显时停止电泳。

(4) 染色、脱色

①电泳结束后，取出胶并切掉多余部分，使用 0.25% 的考马斯亮蓝染液，染色 2 - 4h，必要时可过夜；

②染色完成的胶在脱色液中进行脱色，直至蛋白条带清晰，必要时可加热脱色。

2.2.12 表面等离子共振技术

(1) 试剂准备

①将 PBST (10×)，pH7.4 用去离子水稀释 10 倍，制备成运行缓冲液 PBST (2mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 5% DMSO, 0.05% Tween-20, pH7.4)，0.22μM 滤膜过滤后使用；

②氨基偶联试剂盒，包含：115 mg N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)，750 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 10.5 mL 1 M 乙醇胺 (pH8.5)。每管 EDC 和 NHS 分别加入 10 mL 去离子水，分装保存到-18℃ 至更低温度，保质期两个月。

(2) 芯片准备

将配体 1EA3、4YYL、3ZDP、3B7E 用固定试剂 (10 mM 醋酸钠，pH 4.0) 稀释 10 倍。首先，CM5 芯片的表面用 400 mM EDC 和 100 mM NHS 以 10 μL/min 的流速进行 900 s 的活化。其次，分别将稀释后的配体 1EA3、4YYL、

3ZDP、3B7E 以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速分别注入到实验通道 (Fc2、Fc3、Fc4)，固定量分别约 5700 RU、6200 RU、9900 RU。最后，芯片用 1 M 乙醇胺以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进行 900s 封闭。参比通道 (Fc1) 只进行活化与封闭，不偶联配体。

(3) 分析物多循环分析

①配制 5%DMSO-PBST 作为运行缓冲液 2 (2mM KH_2PO_4 , 137mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2.7mM KCl, 5% DMSO, 0.05%Tween-20, pH7.4)；

②按下表配制不同 DMSO 浓度的溶剂校准品；

表 2.2 不同 DMSO 浓度的溶剂校准品配制

Buffer/Vial	1	2	3	4	5	6	7	8
4.5%DMSO (μL)	0	200	400	600	800	1000	1200	1400
3.8%DMSO (μL)	1400	1200	1000	800	600	400	200	0

③先用 DMSO 将分析物溶解成 10mM 母液，再使用 PBST (10 $\times$) 及超纯水将分析物配制成 500 μM ，缓冲液组分与运行缓冲液 2 保持一致 (2mM KH_2PO_4 , 137mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2.7mM KCl, 5%DMSO, 0.05%吐温, pH7.4)，将分析物用运行缓冲液 2 进行梯度稀释 (100 μM 、50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.13 μM 、1.56 μM 、0.78 μM 、0.39 μM 、0.19 μM 、0.09 μM 、0 μM)。将稀释后的分析物依次以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注入到实验通道 (Fc2、Fc3、Fc4) 与参比通道 (Fc1)，结合时间 60s，解离时间 60s。NaOH 用去离子水稀释为 0.5mM 作为再生液，流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，再生时间 5s。结合解离再生步骤均在运行缓冲液 2 中进行。

使用分析软件 “Biacore T200 Evaluation Software” 对实验结果进行数据分析。根据蛋白与小分子配体的 KD 值，分析两者之间是否能够相结合及结合力的大小。

2.2.13 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析及相关结果作图，计量资料采用 $\bar{X} \pm S$ 表示。组间比较采用单因素 ANOVA 检验和 Student' s T 检验。 $P < 0.05$ ，表示差异存在统计学意义。

第3章 结 果

3.1 扩增的 H1N1 流感病毒测定

3.1.1 扩增的 H1N1 具有血凝抑制作用

经过鸡胚扩增的 H1N1 流感病毒，血凝实验如图 3.1 所示，在稀释到 1:256 倍的时候 50% 的鸡红细胞（RBC）发生血凝，表现为鸡红细胞在孔底呈一环状，四周有小凝集块。以使 50% 的红细胞发生凝集的最高稀释倍数，为病毒的血凝效价。扩增后的 H1N1 流感病毒血凝效价测定为 1:256。

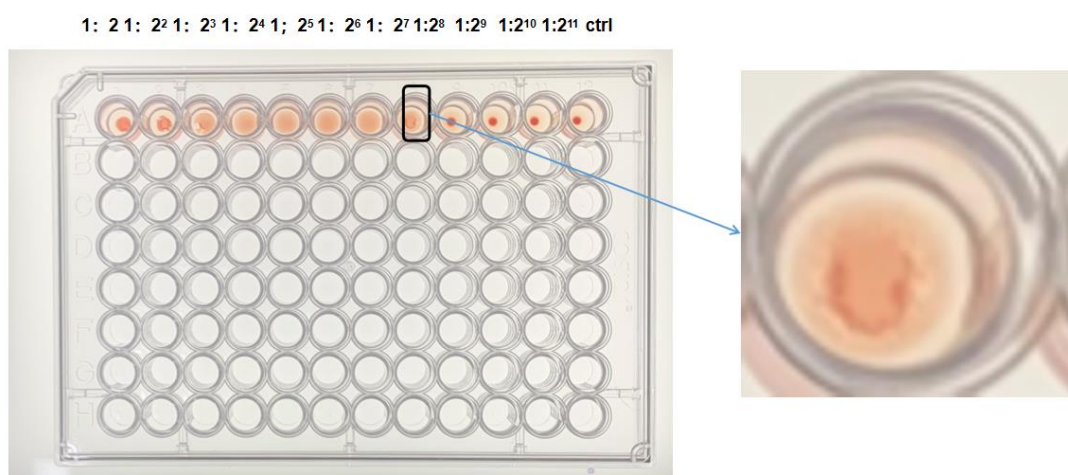


图 3.1 H1N1 流感病毒血凝实验

3.1.2 扩增的 H1N1 具有蚀斑毒性

经过鸡胚扩增的 H1N1 流感病毒，空斑实验如图 3.2 所示，感染 H1N1 流感病毒的 MDCK 细胞经过 72 h 培养后，固定染色，在 125 倍稀释的情况下，出现 20 个空斑，经计算，扩增后的 H1N1 流感病毒 PFU 为 $1.25 \times 10^4/\text{mL}$ 。

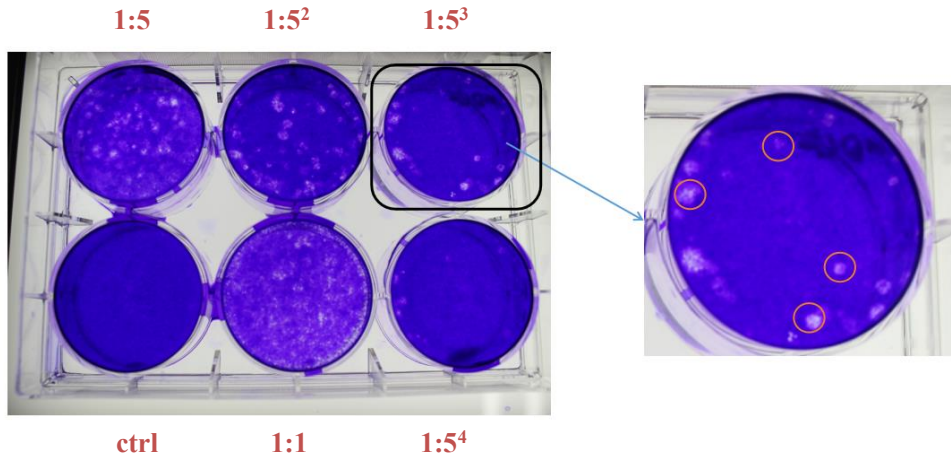


图 3.2 H1N1 流感病毒空斑实验

3.2 视黄醛对 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞的影响

3.2.1 视黄醛浓度的确定

如图 3.3 所示，在 MDCK 细胞中加入视黄醛共同孵育，根据公式计算得到，随着视黄醛浓度的增加，MDCK 细胞的增殖率逐渐降低，并在浓度为 $0.1\mu\text{M}$ 时开始出现明显下降， $0.03\mu\text{M}$ 浓度时视黄醛对 MDCK 细胞无增殖毒性影响。因此选用 $0.03\mu\text{M}$ 浓度的视黄醛作为实验用浓度。

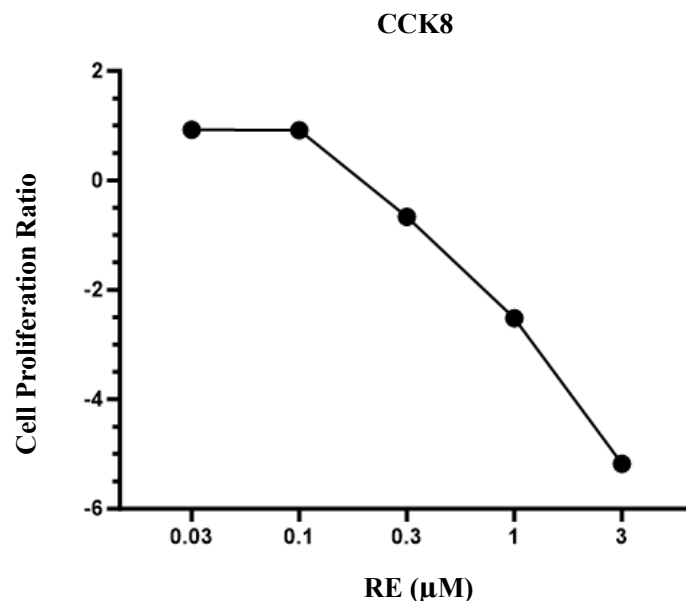


图 3.3 CCK8 测定视黄醛对 MDCK 细胞毒性作用

3.2.2 视黄醛对 H1N1 感染细胞具有抑制作用

视黄醛对 H1N1 感染 MDCK 细胞的抑制作用如图 3.4 所示，qRT-PCR 检测 H1N1 流感病毒的 NA 基因。与 H1N1 组相比，H1N1+RE 组的 H1N1 流感病毒表达量明显降低 ($P<0.01$)；与 H1N1+RE 组相比，H1N1+RE+RAa 组的 H1N1 流感病毒表达量明显升高 ($P<0.05$)。

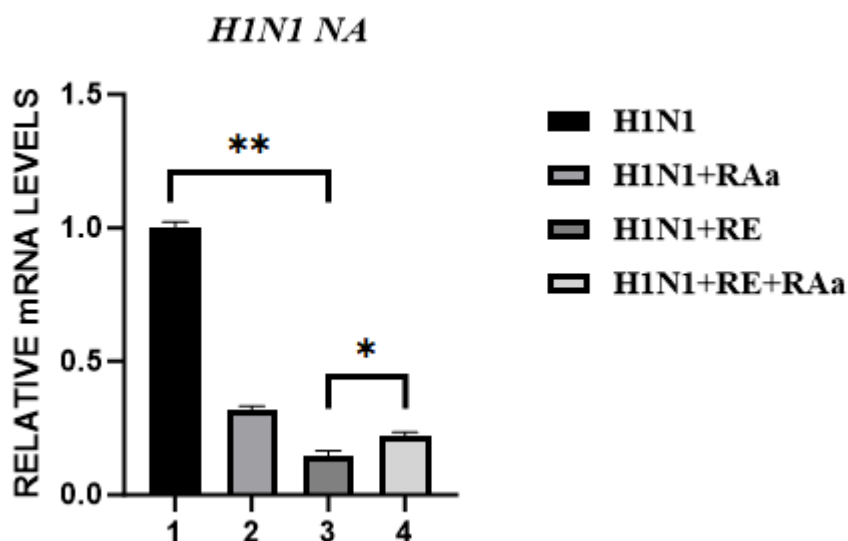


图 3.4 视黄醛抑制 H1N1 流感病毒感染 MDCK 细胞

(** $P<0.01$ H1N1 vs H1N1+RE, * $P<0.05$ H1N1+RE vs H1N1+RE+RAa)

3.3 计算机模拟 H1N1 四种蛋白与视黄醛存在结合位点

根据 3.2 的研究结果可知，体外试验中，视黄醛对 H1N1 流感病毒毒性起到直接抑制作用。但是其抑制的过程和机制尚未明确，这些机制的缺失一定程度上限制了视黄醛对 H1N1 流感治疗方面的假设和预测。因此，我们拟运用理论化学方法建立可预测分子间相互作用的模拟模型，探讨视黄醛与 H1N1 流感病毒蛋白之间的结合情况，为视黄醛对 H1N1 流感病毒的作用和实际应用提供理论基础和实验参考。

3.3.1 视黄醛和 H1N1 流感病毒蛋白分子结构建模

视黄醛分子结构借助 Discovery Studio 4.0 可视化工具构建，H1N1 流感病

毒蛋白的结构来自于蛋白质数据库（PDB ID: PA protein: 4YYL, M1 protein: 1EA3, NP protein: 3ZDP, NA protein: 3B7E），视黄醛分子结构式如图 3.5。

研究采用 B3LYP 方法，在 6-311+g (d,p) 基组条件下，使用 Gaussian 09 软件包对两种分子结构进行了优化。经优化后的分子结构用于后续研究。

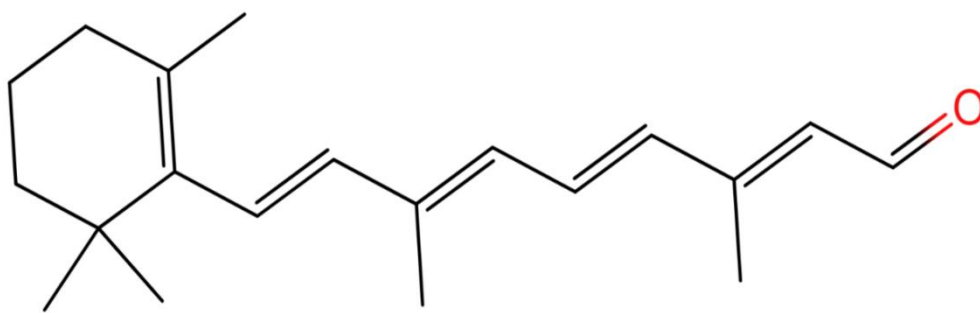


图 3.5 视黄醛分子结构式

3.3.2 视黄醛和 H1N1 流感病毒蛋白分子对接

从结构上来看，视黄醛配体与 H1N1 流感病毒蛋白分子的相互作用情况分别如图 3.6 所示。白色为 H1N1 蛋白结构，蓝色为视黄醛分子，红色为可能结合的位点。分子对接结果表明，视黄醛配体与四种蛋白均有结合位点。

从结合能上来看，视黄醛配体与 H1N1 流感病毒蛋白分子的相互作用能如表 3.1 所示。结合能 (binding energy) 越低，表示亲和性越高。可见视黄醛与 4 种蛋白均有亲和性，且结合强度接近。

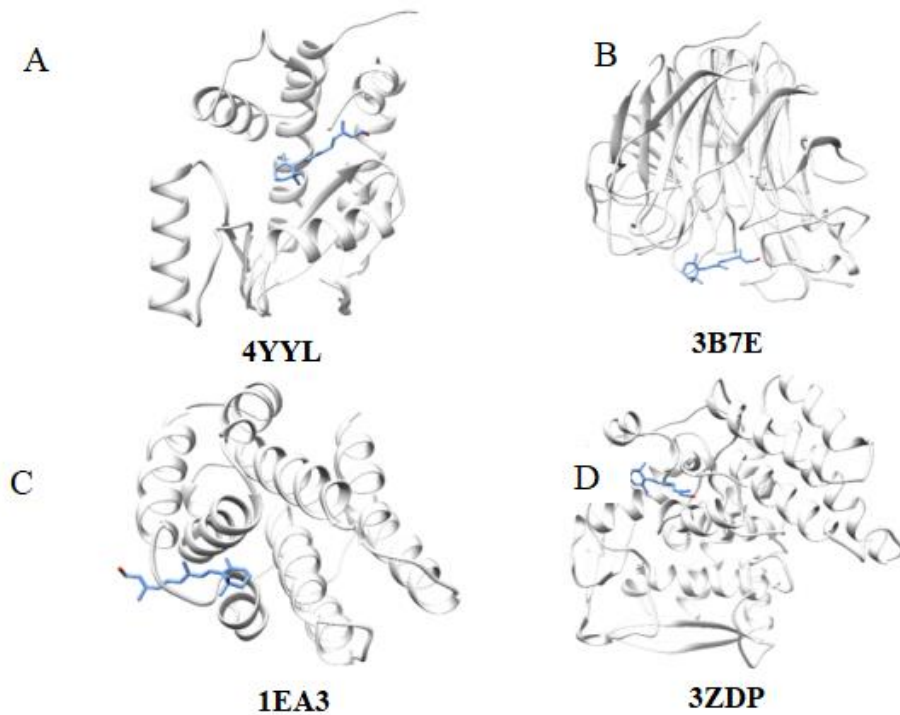


图 3.6 视黄醛配体与 H1N1 流感病毒蛋白结合结构示意图

(A:4YYL B:3B7E C:1EA3 D:3ZDP)

表 3.1 视黄醛配体与 H1N1 流感病毒蛋白结合能

3.4	Protein	PDB ID	Binding energy (kcal/mol)
	PA	4YYL	-7.79
	NA	3B7E	-7.03
	M1	1EA3	-6.69
	NP	3ZDP	-6.64

H1N1 蛋白与视黄醛结合能力的验证

3.4.1 qRT-PCR 鉴定 H1N1 基因转染成功

为了鉴定质粒转染后得到的蛋白是否是目的蛋白，采用 qRT-PCR 法检测，结果如图 3.7 所示。目的蛋白的 RNA 水平表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$)，说明转染构建的目的蛋白表达成功。

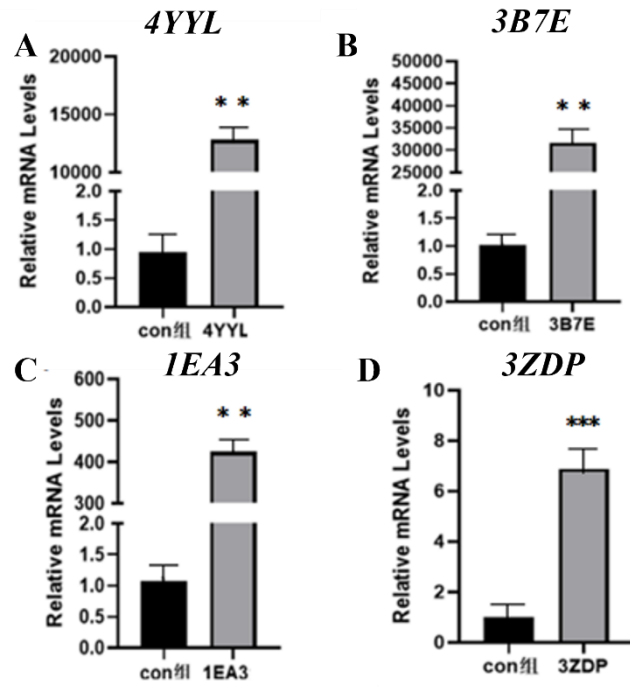


图 3.7 qRT-PCR 鉴定 H1N1 基因转染成功

(A: 4YYL, B: 3ZDP, C: 3ZDP, D: 3B7E, ** $P < 0.05$ vs Con 组)

3.4.2 SDS-PAGE 鉴定 H1N1 蛋白纯化成功

为了鉴定 HIS 重力柱纯化后得到蛋白的效率，采用 SDS-PAGE 法检测，结果如图 3.8 所示。纯化后的蛋白表达出相应的单一的条带，表明纯化成功，可以用于后续实验。

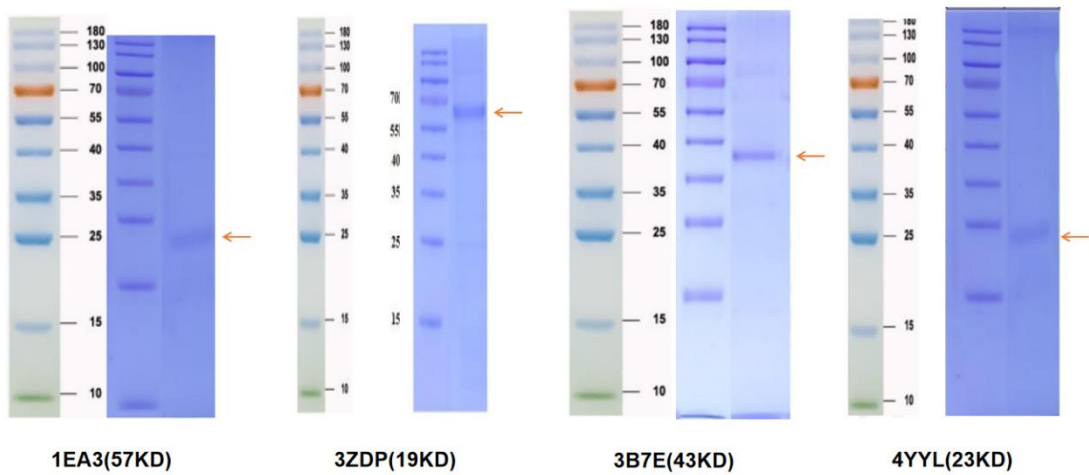


图 3.8 SDS-PAGE 鉴定 H1N1 蛋白纯化成功

3.4.3 表面等离子共振技术测定 H1N1 蛋白与视黄醛的结合力

根据 SDS-PAGE 和 qRT-PCR 鉴定转染、纯化后的蛋白为计算机模拟对应的病毒蛋白。为了检验计算机模拟结果的 H1N1 流感病毒蛋白和视黄醛是否能够直接结合，表面等离子共振技术测定 H1N1 蛋白与视黄醛的结合力，根据响应-浓度曲线评估平衡解离常数（KD）。结果如图 3.9 所示，上图是仪器记录的传感图，每个浓度的分析物进样后随着时间变化会时刻记录响应值；下图是拟合图，分析软件根据传感图拟合出亲和力，亲和力落在检测样品浓度范围内就是有效的。拟合图中一直向右延伸到响应值的最高处就是 Rmax。结果显示，4YYL 与全反式视黄醛在本次条件下没有结合、1EA3 与全反式视黄醛在本次条件下亲和力 KD 大于 0.029mM、3ZDP 与全反式视黄醛在本次条件下亲和力 KD 大于 0.181mM、3B7E 与视黄醛在本次条件下亲和力 KD 大于 0.227mM。表明三者与视黄醛具有很强的结合力。

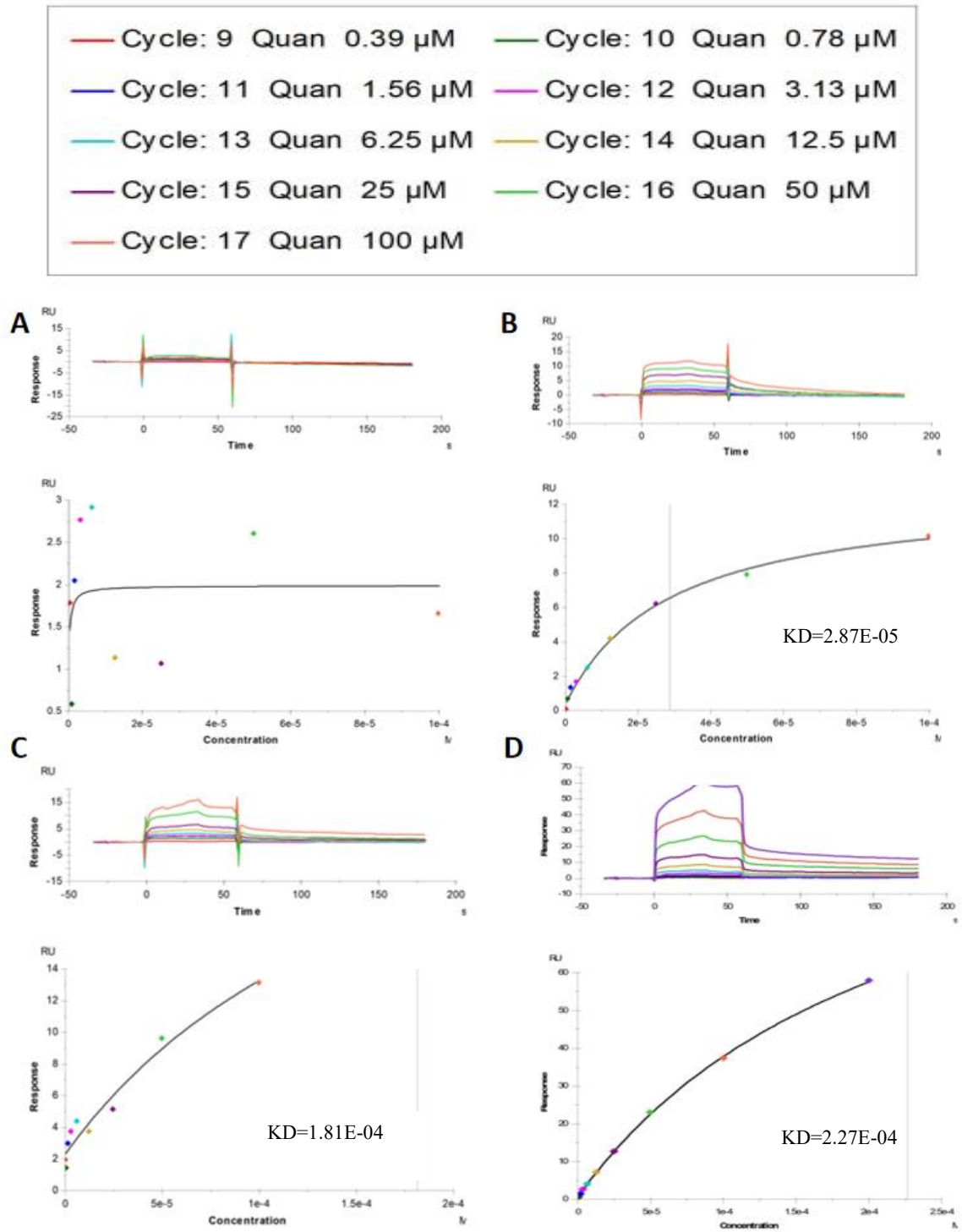


图 3.9 H1N1 流感病毒蛋白与视黄醛结合传感图及亲和力拟合图

(A: 4YYL B: 1EA3 C: 3ZDP D: 3B7E)

第4章 讨论

4.1 维生素 A 与视黄酸受体的关系

维生素 A 的作用主要由 2 个核激素受体家族介导——RAR 和 RXR。但 RAR 和 RXR 均由 α 、 β 和 γ 三种不同的亚型组成，每种 RAR 与 RA 结合具有不同的亲和力，扮演着不同的角色及发挥不同的功能。细胞中的大多数视黄醇信号传导被认为是由全反式视黄酸结合 RAR/RXR 异二聚体中的 RAR 介导的。与全反式视黄酸（RAR $\alpha/\beta/\gamma$ K_d=15/13/18 nM）相比，其靶向所有三种 RAR 亚型的亲和力更高（RAR $\alpha/\beta/\gamma$ K_d=3/2/5 nM），且不影响 RXR 亚型。

人们普遍认为，维生素 A 本身是无活性的，它的大部分功能是由靶细胞中产生的活性氧化代谢物发挥的。在眼睛中，活性代谢物是 11-顺式-视黄醛，它作为发色团起作用并与光敏膜结合的 G 蛋白偶联受体视蛋白共价结合，从而形成视觉色素视紫红质起到维护视觉的作用。在其他组织器官中，由视黄醛转化形成的全反式视黄酸是维生素 A 发挥作用的主要代谢产物，与视黄酸受体结合发挥生物学效应，例如细胞增殖和分化、胚胎发生和体内平衡。

综上所述，结合维生素 A 在体内的代谢途径以及本课题组前期研究结果，采用视黄醛模拟维生素 A 发挥作用，采用视黄酸受体阻断剂建立了维生素 A 阻断模型，降低维生素 A 在细胞内发挥的作用。从机制上讲，视黄酸除了与视黄酸受体结合，还可以在核外以非转录的形式影响基因表达。尽管维生素 A 通过多种途径及代谢产物发挥其生理功能，但在大多数细胞中，视黄酸是发挥维生素 A 主要生理功能的物质。因此，我们通过阻断主要活性物质视黄酸，以一定程度上模拟降低外源性维生素 A 的作用。

4.2 H1N1 流感病毒与免疫反应

既往研究表明，当 H1N1 流感病毒感染呼吸道后，机体通过树突状细胞和巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-12、IL-18 等来协调有效的先天免疫反应并激活 NK 细胞和 CD4⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞来对抗病毒感染^[62]。已经证实，H1N1 流感病毒的发病机制和严重程度与不同水平的 IFN- β 和 IL-6 有关^[63]，感染患者的血清和感染小鼠的肺部中观察到促炎细胞因子和单核因子（如 IL-6）增加。IFN- β 作为一种重要的细胞因子，参与机体的免疫调节，可以增强 NK 细胞、巨噬细胞和 T

淋巴细胞的活性,从而提高抗病毒能力^[64]。它还通过诱导抗病毒蛋白的表达在抗病毒和免疫调节中发挥重要作用。有一项关于体外抗 H1N1 流感病毒的研究显示,MDCK 细胞感染流感病毒后,细胞上清液中 IFN- β 和 IL-6 的含量以及 Toll 样受体 7 (Toll-like receptor, TLR7)、髓系分化初级反应蛋白 (88Myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)、应激活化蛋白激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 和 p65 核因子 κ B (RelA Nuclear factor- κ B, p65 NF- κ B) 基因表达水平显著上调 ($P < 0.01$),提示流感病毒感染激活了 TLR7-MyD88 通路,诱导了炎症反应,并导致 MDCK 细胞中细胞因子和趋化因子的产生。高、中剂量处理流感病毒感染 MDCK 细胞后,细胞上清液中 IFN- β 和 IL-6 含量以及细胞 TLR7、MyD88、TRAF6、JNK、p38 MAPK 和 p65 NF- κ B 基因表达显著降低 ($P < 0.01$)^[65]。

本研究显示,不同处理组的 MDCK 细胞感染 H1N1 流感病毒后,病毒 NA 蛋白基因表达量被视黄醛抑制。这表明,视黄醛抑制了 H1N1 流感病毒在 MDCK 细胞中感染复制的过程。在这个过程中,虽然未存在免疫系统发挥作用,但是相关细胞因子的改变仍然存在。这为我们进一步的相关机制研究提供了方向。

4.3 维生素 A 与 H1N1 流感病毒

迄今,甲型流感已造成全球超过 5000 万人感染,维生素 A 缺乏也广泛存在于全年龄段人群,特别是婴幼儿^[66]。为了应对两项重大公共卫生事件,制定预防和治疗方法至关重要。已有研究通过基于硅片的分子对接和 MD 模拟技术证实维生素 A 可以抑制新型冠状病毒 SARS-CoV-2 病毒 e 蛋白活性并影响病毒组装和感染^[67]。又基于现有研究表明,维生素 A 能够增强机体免疫系统改善 H1N1 流感病毒感染,那么,维生素 A 能否像抑制 SARS-CoV-2 一样抑制 H1N1 流感病毒。

在本研究中,我们先在体外试验中证实维生素 A 的重要中间代谢产物视黄醛能够抑制 H1N1 流感病毒感染细胞,然后将视黄醛与 H1N1 流感病毒各蛋白进行对接和模拟研究。结果表明,维生素 A 很有可能与 H1N1 流感病毒蛋白直

接结合, 在 H1N1 流感病毒-宿主的过程中产生影响。最后为了验证计算机模拟的结果, 我们通过哺乳动物蛋白表达系统将可能与视黄醛结合的 H1N1 流感病毒蛋白进行转录翻译, 然后通过表面等离子共振技术证实它们与视黄醛之间存在相互作用的可能。我们的研究结果表明视黄醛分子可能优先与 H1N1 流感病毒的 NA protein (PDB ID:3B7E)、M1 protein (PDB ID:1EA3) 和 NP protein (PDB ID:3ZDP) 蛋白结合, 并具有较高的亲和力。这三种病毒蛋白影响着 H1N1 病毒-宿主过程中的复制和释放, 在病毒的生命周期过程中扮演者极为重要的角色。这又进一步印证了我们体外试验的结果, 维生素 A 不仅仅通过维持黏膜屏障完整性和增强机体免疫系统来改善 H1N1 流感病毒的感染, 还可以直接与 H1N1 流感病毒蛋白相结合影响病毒宿主的感染过程。这一研究结果, 为 H1N1 流感的膳食预防提供了新的可能。另一方面, 结合位点预测可用于对 H1N1 流感病毒抗原突变后新药的研制。

本研究值得注意的是, ①以视黄醛分子作为维生素 A 的主要活性代谢产物与 H1N1 流感病毒进行作用; ②以视黄酸受体阻断剂阻断维生素 A 发挥作用; ③H1N1 流感病毒蛋白中存在许多膜蛋白以及多聚体结构蛋白, 由于其功能特点及复杂性被排除在研究之外; ④维生素 A 与 H1N1 流感病毒蛋白结合后, 究竟在病毒宿主结合的哪一个过程中发挥作用是我们后续研究的重点。

4.4 计算机模拟的优势

在以往的研究过程中, 需要通过多种生化分析手段全面判定小分子之间的相互作用, 这些结果数据的获得漫长且具有不确定性, 并且难以确定小分子相互间作用的具体位点和方式。随着理论化学领域的不断发展, 计算机模拟成为脱颖而出的新兴研究手段之一。它可以利用经典的理化定理和计算机高效的运算能力, 快速产生大量计算数据, 对数据进行优化, 并得到符合研究假设要求的实验结果, 而不受研究环境的限制。该手段既节约物料成本, 又极大地缩短了研究进程。作为计算机模拟技术的一种, 分子对接技术能够在原子水平上预测小分子和蛋白质之间的相互作用, 研究小分子和靶蛋白结合位点内的行为, 并了解相互作用背后的基本生化过程。分子对接技术已经广泛应用在药物研发、生物修复、分子动力学模拟和蛋白结果后解析和预测小分子吸收、分布、代谢、排泄和毒性特性等领域。

因此, 本文选择计算机模拟分子对接技术, 探索视黄醛分子和 H1N1 流感病毒蛋白之间的相互作用关系。首先通过模拟视黄醛和 H1N1 流感病毒蛋白复合物的化学构象, 预测能够相互作用的有效靶点。然后计算模拟其结合能, 即二者通过强有力的氢键相结合时释放的能量。二者的结果说明分子对接的可靠性较高。虽然计算机模拟的研究结果不能完全代替实验结果, 但是通过大量演算得到的优化结果符合相关的理化原理基础, 并且与实际分析化学表征的结果互为印证, 对后续试验研究提供了思路。为视黄醛预防和治疗 H1N1 流感病毒的研究和实际应用提供了理论基础。

第 5 章 结 论

5.1 结论

1. 视黄醛能够抑制 H1N1 流感病毒体外感染细胞。
2. 视黄醛与 H1N1 流感病毒的 NA protein (PDB ID: 3B7E)、M1 protein (PDB ID: 1EA3) 和 NP protein (PDB ID: 3ZDP) 存在结合位点, 并能够结合。
3. 视黄醛通过直接与 H1N1 病毒蛋白结合, 抑制 H1N1 流感病毒感染复制的过程。

5.2 创新性

本研究在已有对维生素 A 抑制 H1N1 流感病毒毒性的基础上, 从新的分子学机制发现了维生素 A 对 H1N1 流感病毒毒性的抑制作用途径。更加完善了维生素 A 和 H1N1 流感病毒的相关性作用。在营养与疾病的方向中, 为维生素 A 的预防和治疗流感提出了新的思路, 也为相关药物的研发提供了新的理论基础。

5.3 局限性与展望

本研究仍然有一些需要完善的地方, ①由于试验的繁琐, 我们的研究并没有将 H1N1 流感病毒全部蛋白的靶点进行验证; ②没有进行体内实验, 缺乏动物模型的验证; ③维生素 A 与 H1N1 流感病毒蛋白结合后, 究竟在病毒宿主结合的哪一个过程中发挥作用是我们后续研究的重点; ④我们仍然在探究相关的分子学机制及通路, 以期望在将来通过营养素食源性解决 H1N1 流感的预防及治疗问题。

参考文献

- [1] FUJIYOSHI Y, KUME N P, SAKATA K, et al. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy[J]. EMBO J, 1994, 13(2): 318-326.
- [2] PLESCHKA S. Overview of influenza viruses[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013, 370: 1-20.
- [3] YAO J, ZHANG H, MA L, et al. Effect of traditional Chinese medicine Bupleurum in the treatment of influenza A (H1N1)[J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(4(Special)): 1713-1717.
- [4] 陈闻天, 黄鹤, 于汉杰. 甲型流感病毒基因组的进化与变异[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(05): 411-420.
- [5] MA W, RICHT J A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives[J]. Anim Health Res Rev, 2010, 11(1): 81-96.
- [6] SAMJI T. Influenza A: understanding the viral life cycle[J]. Yale J Biol Med, 2009, 82(4): 153-159.
- [7] SANTOS L A, ALMEIDA F, GIRIA M, et al. Adaptive evolution of PB1 from influenza A(H1N1)pdm09 virus towards an enhanced fitness[J]. Virology, 2023, 578: 1-6.
- [8] TURRELL L, LYALL J W, TILEY L S, et al. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1591.
- [9] ZHANG B, XU S, LIU M, et al. The nucleoprotein of influenza A virus inhibits the innate immune response by inducing mitophagy[J]. Autophagy, 2023, 19(7): 1916-1933.
- [10] SALAHUDDIN P, KHAN A U. Structural and functional analysis of NS1 and NS2 proteins of H1N1 subtype[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2010, 8(3): 190-199.
- [11] HATADA E, SAITO S, OKISHIO N, et al. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs[J]. J Gen Virol, 1997, 78 (Pt 5): 1059-1063.
- [12] O'NEILL R E, TALON J, PALESE P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins[J]. EMBO J, 1998, 17(1): 288-296.

-
- [13] HUI X, CAO L, XU T, et al. PSMD12-Mediated M1 Ubiquitination of Influenza A Virus at K102 Regulates Viral Replication[J]. *J Virol*, 2022, 96(15): e0078622.
- [14] WOHLGEMUTH N, LANE A P, PEKOSZ A. Influenza A Virus M2 Protein Apical Targeting Is Required for Efficient Virus Replication[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(22): e01425-18.
- [15] YANG X Y, STEUKERS L, FORIER K, et al. A Beneficiary Role for Neuraminidase in Influenza Virus Penetration through the Respiratory Mucus[J]. *Plos One*, 2014, 9(10): e110026.
- [16] MCAULEY J L, GILBERTSON B P, TRIFKOVIC S, et al. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10:39.
- [17] DE VRIES E, DU W, GUO H, et al. Influenza A Virus Hemagglutinin-Neuraminidase-Receptor Balance: Preserving Virus Motility[J]. *Trends Microbiol*, 2020, 28(1): 57-67.
- [18] VAHEY M D, FLETCHER D A. Influenza A virus surface proteins are organized to help penetrate host mucus[J]. *Elife*, 2019, 8:e43764.
- [19] YIP T F, SELIM A S M, LIAN I, et al. Advancements in Host-Based interventions for influenza Treatment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:1547.
- [20] RUST M J, LAKADAMYALI M, ZHANG F, et al. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(6): 567-573.
- [21] PIELAK R M, CHOU J J. Influenza M2 proton channels[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(2): 522-529.
- [22] ZHIRNOV O P, IKIZLER M R, WRIGHT P F. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(17): 8682-8689.
- [23] YE Z P, LIU T, OFFRINGA D P, et al. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(9): 7467-7473.
- [24] EISFELD A J, NEUMANN G, KAWAOKA Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 28-41.
- [25] LAKDAWALA S S, WU Y, WAWRZUSIN P, et al. Influenza a virus assembly intermediates fuse in the cytoplasm[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(3): e1003971.

-
- [26] PATEL N, PENKERT R R, JONES B G, et al. Baseline Serum Vitamin A and D Levels Determine Benefit of Oral Vitamin A&D Supplements to Humoral Immune Responses Following Pediatric Influenza Vaccination[J]. *Viruses*, 2019, 11(10):907.
- [27] SANCHEZ-DE PRADA L, SANZ-MUNOZ I, DE LEJARAZU R O, et al. Immunodominance hierarchy after seasonal influenza vaccination[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 2670-2679.
- [28] FERRUCCI L, FABBRI E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2018, 15(9): 505-522.
- [29] SONG J Y, CHEONG H J, HWANG I S, et al. Long-term immunogenicity of influenza vaccine among the elderly: Risk factors for poor immune response and persistence[J]. *Vaccine*, 2010, 28(23): 3929-3935.
- [30] ISON M G. Antivirals and resistance: influenza virus[J]. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(6): 563-573.
- [31] THAI K M, LE D P, TRAN N V K, et al. Computational assay of Zanamivir binding affinity with original and mutant influenza neuraminidase 9 using molecular docking[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 385: 31-39.
- [32] PHANICH J, RUNGROTMONGKOL T, SINDHIKARA D, et al. A 3D-RISM/RISM study of the oseltamivir binding efficiency with the wild-type and resistance-associated mutant forms of the viral influenza B neuraminidase[J]. *Protein Sci*, 2016, 25(1): 147-158.
- [33] SINGH A, SOLIMAN M E. Understanding the cross-resistance of oseltamivir to H1N1 and H5N1 influenza A neuraminidase mutations using multidimensional computational analyses[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 4137-4154.
- [34] BAEK Y H, SONG M S, LEE E Y, et al. Profiling and characterization of influenza virus N1 strains potentially resistant to multiple neuraminidase inhibitors[J]. *J Virol*, 2015, 89(1): 287-299.
- [35] TANDEL K, SHARMA S, DASH P K, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus associated with high case fatality, India 2015[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(5): 836-843.

- [36] LA GRUTA N L, KEDZIERSKA K, STAMBAS J, et al. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection[J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(2): 85-92.
- [37] MCLAREN D S, KRAEMER K. Vitamin A in nature[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2012, 103: 7-17.
- [38] TIMONEDA J, RODRIGUEZ-FERNANDEZ L, ZARAGOZA R, et al. Vitamin A Deficiency and the Lung[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9):1132.
- [39] POLCZ M E, BARBUL A. The Role of Vitamin A in Wound Healing[J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2019, 34(5): 695-700.
- [40] CLUGSTON R D, BLANER W S. Vitamin A (Retinoid) Metabolism and Actions: What We Know and What We Need to Know About Amphibians[J]. *Zoo Biology*, 2014, 33(6): 527-535.
- [41] FUTTERMAN S, ANDREWS J S. The Composition of Liver Vitamin a Ester and the Synthesis of Vitamin a Ester by Liver Microsomes[J]. *J Biol Chem*, 1964, 239: 4077-4080.
- [42] GONZALEZ-FERNANDEZ F. Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins[J]. *J Endocrinol*, 2002, 175(1): 75-88.
- [43] CABEZUELO M T, ZARAGOZA R, BARBER T, et al. Role of Vitamin A in Mammary Gland Development and Lactation[J]. *Nutrients*, 2019, 12(1):80.
- [44] PENNISTON K L, TANUMIHARDJO S A. The acute and chronic toxic effects of vitamin A[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 191-201.
- [45] GRUNE T, LIETZ G, PALOU A, et al. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans[J]. *J Nutr*, 2010, 140(12): 2268S-2285S.
- [46] O'CONNOR C, VARSHOSAZ P, MOISE A R. Mechanisms of Feedback Regulation of Vitamin A Metabolism[J]. *Nutrients*, 2022, 14(6):1312.
- [47] JONES B G, OSHANSKY C M, BAJRACHARYA R, et al. Retinol binding protein and vitamin D associations with serum antibody isotypes, serum influenza virus-specific neutralizing activities and airway cytokine profiles[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183(2): 239-247.
- [48] BLACK R E, VICTORA C G, WALKER S P, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries[J]. *Lancet*, 2013, 382(9890): 427-451.

-
- [49] HURWITZ J L, JONES B G, PENKERT R R, et al. Low Retinol-Binding Protein and Vitamin D Levels Are Associated with Severe Outcomes in Children Hospitalized with Lower Respiratory Tract Infection and Respiratory Syncytial Virus or Human Metapneumovirus Detection[J]. *J Pediatr*, 2017, 187: 323-327.
- [50] SCHAIBLE U E, KAUFMANN S H. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(5): e115.
- [51] MA J, LIU Y, LI Y, et al. Differential role of all-trans retinoic acid in promoting the development of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(2): 275-283.
- [52] CANTORNA M T, SNYDER L, ARORA J. Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2019, 54(2): 184-192.
- [53] OLIVEIRA L D, TEIXEIRA F M E, SATO M N. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases[J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 8(9).
- [54] LI Y, LIN Q M, LU X J, et al. Post-Diagnosis use of Antioxidant Vitamin Supplements and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Clinical Breast Cancer*, 2021, 21(6): 477-485.
- [55] PODELL B K, AIBANA O, HUANG C C, et al. The Impact of Vitamin A Deficiency on Tuberculosis Progression[J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 75(12): 2178-2185.
- [56] ALEEBRAHIM-DEHKORDI E, Molavi B, Mokhtari M, et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses[J]. *Transpl Immunol*, 2022, 70: 101495.
- [57] PENKERT R R, SMITH A P, HRINCIUS E R, et al. Effect of Vitamin A Deficiency in Dysregulating Immune Responses to Influenza Virus and Increasing Mortality Rates After Bacterial Coinfections[J]. *J Infect Dis*, 2021, 223(10): 1806-1816.
- [58] FISKEER A B, BALE C, JORGENSEN M J, et al. High-dose vitamin A supplementation administered with vaccinations after 6 months of age: sex-differential adverse reactions and morbidity[J]. *Vaccine*, 2013, 31(31): 3191-3198.

- [59] HANEKOM W A, YOGEV R, HEALD L M, et al. Effect of vitamin A therapy on serologic responses and viral load changes after influenza vaccination in children infected with the human immunodeficiency virus[J]. *J Pediatr*, 2000, 136(4): 550-562.
- [60] THURNHAM D I, NORTHROP-CLEWES C A, McCullough F S, et al. Innate immunity, gut integrity, and vitamin A in Gambian and Indian infants[J]. *J Infect Dis*, 2000, 182 September 2000: S23-28.
- [61] WIEDERMANN U, HANSON L A, Bremell T, et al. Increased translocation of *Escherichia coli* and development of arthritis in vitamin A-deficient rats[J]. *Infect Immun*, 1995, 63(8): 3062-3068.
- [62] GEROSA F, GOBBI A, ZORZI P, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(2): 727-734.
- [63] LAMICHHANE P P, SAMARASINGHE A E. The Role of Innate Leukocytes during Influenza Virus Infection[J]. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019.
- [64] MIYAUCHI K. Helper T Cell Responses to Respiratory Viruses in the Lung: Development, Virus Suppression, and Pathogenesis[J]. *Viral Immunology*, 2017, 30(6): 421-430.
- [65] CHEN T H, DU H X, ZHOU H F, et al. Screening of Antiviral Components of Yinhuapinggan Granule and Protective Effects of Yinhuapinggan Granule on MDCK Cells with Influenza A/H1N1 Virus[J]. *Biomed Research International*, 2022:1040129.
- [66] SAAD F, ROGERS L, DOGGUI R, et al. Assessment of Vitamin A Supplementation Practices in Countries of the Eastern Mediterranean Region: Evidence to Implementation[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2021, 67(1): 1-12.
- [67] DEY D, BORKOTOKY S, BANERJEE M. identification of Tretinoin as a SARS-CoV-2 envelope (E) protein ion channel inhibitor[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2020, 127:104063.