

家蝇抗菌肽 MAF-1A 体外抗甲型流感病毒活性及机制研究

朱志翠^{1,2}, 邓思波^{1,2}, 张迎春¹, 吴 坤^{1,2}, 马晓琳^{1,2}, 吴建伟¹, 王 涛^{1,2}

摘要:目的 探讨家蝇抗菌肽 MAF-1A 体外抗甲型流感病毒(IAV)活性及其潜在机制。方法 通过观察 CPE、MTT 法及 qRT-PCR 评价 MAF-1A 体外抗 IAV 活性,采用 MTT 法测定 MAF-1A 对 MDCK 细胞的毒性;利用透射电镜(TEM)技术、血凝抑制试验和神经氨酸酶抑制试验进一步分析 MAF-1A 抗 IAV 的作用机制。结果 MAF-1A 对 IAV 的半数有效浓度(EC₅₀)为(89.8±2.97)μg/mL,而对 MDCK 细胞的毒性较小;MAF-1A 可直接破坏 IAV 形态结构的完整性;浓度为 1.56 μg/mL 的 MAF-1A 即可抑制 IAV 引起的红细胞凝集;对神经氨酸酶具有抑制作用,IC₅₀为(134.7±10.31)μg/mL。结论 抗菌肽 MAF-1A 具有体外抗 IAV 活性,除能直接破坏 IAV 的结构外,还可能通过与血凝素 HA1 亚基结合、抑制神经氨酸酶的活性而阻止 IAV 的感染,提示 MAF-1A 具有多靶点抗 IAV 的作用。

关键词:抗菌肽;MAF-1A;甲型流感病毒;抗病毒活性;作用机理

中图分类号: R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2019)09-0791-06

Effects and mechanisms of antimicrobial peptide MAF-1A from *Musca domestica* anti-influenza A virus *in vitro*

ZHU Zhi-cui^{1,2}, DENG Si-bo^{1,2}, ZHANG Ying-chun¹, WU Kun^{1,2},
MA Xiao-lin^{1,2}, WU Jian-wei¹, WANG Tao^{1,2}

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Medical microbiology and parasitology of Education Department of Guizhou, Guiyang, 550025, China)

Abstract: The purpose of our research was to explore the effects and potential mechanisms of antimicrobial peptide MAF-1A from *Musca domestica* on anti-influenza A virus (IAV) activity. In this research, activity of MAF-1A against IAV *in vitro* were detected with the CPE, MTT assay and quantitative real-time PCR. Cytotoxicity of MAF-1A on MDCK cells was determined by MTT assay. Transmission electron microscope (TEM), hemagglutination inhibition assay and neuraminidase inhibition assay were used to investigate the mechanism for its anti-IAV activities. MAF-1A could significantly inhibit the infection of IAV *in vitro*, and its median effective concentration (EC₅₀) was (89.8±2.97)μg/mL, and the low cytotoxicity showed on MDCK cells. The results of TEM indicated that MAF-1A had an obvious destructive effect on IAV. The hemagglutination induced by IAV was inhibited by MAF-1A concentration of 1.56μg/mL. MAF-1A had the inhibition on NA (IC₅₀ (134.7±10.31)μg/mL). This study suggests that MAF-1A have remarkably inhibitory effects on IAV, the mechanisms may be associated with the virion damage, combination with hemagglutinin (HA) HA1 subunit and neuraminidase inhibition, which suggest that the anti-IAV of MAF-1A may be through multi-targets.

Keywords: antimicrobial peptide; MAF-1A; influenza A virus; inhibitory effect; mechanism

国家自然科学基金(No.81360254)和贵阳市科技局-贵州医科大学联合基金(No.GY2015-23)联合资助

通讯作者: 王 涛, Email: wangtao309@163.com;

ORCID: 0000-0002-1388-5181

作者单位: 1. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025;

2. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室, 贵阳 550025

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81360254), the Guiyang Science and Technology Bureau and Guizhou Medical University United Foundation (No. GY2015-23).

Corresponding authors: Wang Tao, Email: wangtao309@163.com

流行性感是一种急性呼吸道传染病,多由甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)引起。由于全球每年感染的病例数量庞大、传播速度快且病毒变异性强,流感已成为严重威胁公众健康的病毒性传染病之一^[1-2]。目前,对流感的主要防治措施主要是疫苗接种和化学药物治疗。流感病毒变异性强,增加了流感疫苗制备的难度,也使疫苗的有效性大大降低^[3-7]。随着耐药病毒株的不断出现,现有的抗流感病毒药物已无法满足临床需求^[8-11]。因此,寻求新型抗流感病毒药物已成为迫切需要解决的问题。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是生物体内对细菌、病毒、真菌等微生物和肿瘤细胞具有抑杀活性的小分子多肽。由于具有广谱抗微生物活性、低毒、不容易产生耐药性等特征,AMPs被认为是新型抗生素的理想候选者^[12-13]。MAF-1A(*Musca domestica* antimicrobial peptide-1A)来源于家蝇,由26个氨基酸残基构成的小分子抗菌肽^[14]。实验研究发现,MAF-1A具有抗流感病毒作用,具有研发新型抗流感病毒药物的潜力,但MAF-1A抗流感病毒活性及其作用机制尚未清楚^[15]。本文在此基础上,探讨MAF-1A抗IAV活性和作用机制,为MAF-1A的应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MAF-1A的化学合成 抗菌肽MAF-1A序列为KKFKETADKLIESAKQQLES LAKEMK,委托生工生物工程(上海)股份有限公司采用FMOC固相合成法合成,高效液相色谱(HPLC)纯化、液相色谱-质谱(LC-MS)验证,多肽合成纯度 $\geq 98\%$ 。

1.1.2 细胞和病毒 狗肾细胞(MDCK细胞)购自中国医学科学院基础医学院研究所;甲型流感病毒A/PR/8/34(H1N1)为本室保存。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清购自德国PAN公司;神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RNAiso Plus试剂盒、逆转录试剂盒(PrimeScriptTM RT Master Mix)、荧光定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM II)均购自TaKaRa(大连)有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京博奥拓达科技有限公司;磷酸奥司他韦购自上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物合成 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成IAV的qRT-PCR检测基因和内参基因引物 HA-F: CCTG CTCGAAGACAGCCA-CAACG, HA-R: GCTCCCTCAGCTCCTCAT-

AGTCG; GAPDH-F: AGGGCAATGCCAGCCC-CAG CG, GAPDH-R: AGGGCAATGCCAGCCCC-AGCG。

1.2 方法

1.2.1 MAF-1A抗IAV活性检测

1.2.1.1 病毒的增殖 按文献^[16]方法,将IAV稀释液接种于9日龄鸡胚尿囊腔,37℃培养箱内孵育至48 h,收获尿囊液,检测血凝效价。

1.2.1.2 MDCK细胞培养 MDCK细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃5%CO₂培养箱中培养,待细胞生长至70%~90%,取0.5%胰蛋白酶进行消化成单个细胞,按 2×10^4 个/孔接种于96孔板,待细胞生长至90%单层细胞时备用。

1.2.1.3 病毒对MDCK细胞半数感染量(TCID₅₀)测定 将上述96孔板生长的MDCK细胞,去培养液,PBS洗涤3次,将病毒液以10倍系列稀释,分别以100 μL/孔接种于单层MDCK细胞,2 h后去掉病毒液,PBS缓冲液洗涤3次,加入等量细胞维持液,每个稀释度重复6个复孔,设细胞培养组为阴性对照,48 h后观察并记录细胞的病变效应;并参照文献^[17]方法,按Reed-Muench法计算病毒对细胞的半数感染量TCID₅₀。试验共重复3次。

1.2.1.4 MAF-1A对IAV半数有效浓度(EC₅₀)检测 取100×TCID₅₀病毒稀释液50 μL与等体积MAF-1A溶液混匀,使MAF-1A终浓度为15.6 μg/mL、31.2 μg/mL、62.5 μg/mL、125 μg/mL、250 μg/mL、500 μg/mL。将混合液于37℃预处理30 min后,接种于单层MDCK细胞,2 h后去除液体,PBS缓冲液洗涤3次,以100 μL/孔加入细胞维持液,于37℃、5%CO₂培养箱中培养48 h,镜下观察细胞CPE效应;MTT法检测MAF-1A抗病毒有效率。同时,设置细胞培养组和病毒组为对照组,奥司他韦为药物对照组,MAF-1A对流感病毒抑制率(%)按公式计算,并参考文献^[18],采用Probit回归法计算半数有效浓度EC₅₀:

$$\text{有效率} = [(\text{药物组 OD} - \text{病毒组 OD}) / (\text{阴性对照组 OD} - \text{病毒组 OD})] \times 100\%$$

1.2.1.5 qRT-PCR检测MDCK细胞内的病毒载量

取100×TCID₅₀病毒稀释液50 μL与等体积MAF-1A溶液混匀,使MAF-1A终浓度为250 μg/mL、125 μg/mL、62.5 μg/mL、31.2 μg/mL、15.6 μg/mL。将混合液于37℃预处理30 min后,接种于6孔板中90%单层MDCK细胞,2 h后去混合液,用PBS缓冲液洗涤3次,每孔加入100 μL细胞维持液,于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养24 h

后,根据 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 和 Prime-Script™ RT Master Mix 试剂盒使用说明书,提取细胞 Total RNA 并逆转录为 cDNA,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。参考文献[19],使用 qRT-PCR 反应试剂盒以管家基因 *GAPDH* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 *HA* 基因 mRNA 水平进行相对定量。反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。

1.2.2 MAF-1A 对 MDCK 细胞的毒性检测 将 MDCK 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板,待其长成 90% 单层细胞备用;将 MAF-1A 溶液进行倍比稀释至 $10\sim 2\ 500\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 以上浓度梯度的 MAF-1A 以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入细胞中,每个浓度设置 6 个复孔,并设正常对照组(只加入细胞维持液),置 CO_2 培养箱中培养至 24 h 后倒置显微镜下观察 CPE。弃孔内培养基后用 PBS 洗涤 3 遍,以 $10\ \mu\text{L}/$ 孔加入 $5\ \text{mg}/\text{mL}$ 的 MTT 液,继续培养 4 h 后去上清液,每孔加入 DMSO $150\ \mu\text{L}$,振荡摇匀 15 min,在酶标仪 $490\ \text{nm}$ 波长下测定各孔吸光度值(OD),按公式计算 MAF-1A 对 MDCK 细胞的抑制率^[18]。

抑制率 = $[1 - (\text{药物处理组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}) / (\text{阴性对照组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.2.3 MAF-1A 抗流感病毒作用机制分析

1.2.3.1 MAF-1A 对 IAV 形态结构的影响 按文献[20]方法,采用醛化鸡红细胞吸附释放法对含甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 鸡胚尿囊液进行纯化,并检测纯化后病毒的血凝效价。将纯化的病毒液 $50\ \mu\text{L}$ 与等体积 MAF-1A 系列稀释液充分混合, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,用 0.1% 甲醛溶液于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 48 h,以 2% 磷钨酸负染色液进行染色,经透射电镜观察病毒形态结构。

1.2.3.2 血凝抑制试验 将 $25\ \mu\text{L}$ 不同浓度的 MAF-1A 与等体积 4 倍血凝效价的病毒液混合,于室温孵育 30 min 后,每孔加入 1% cRBC 悬液 $50\ \mu\text{L}$,室温 ($20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 静置 40 min 后观察结果,每个浓度作 3 个复孔。同时,设置病毒组和 PBS 阴性对照组,试验重复 3 次。

1.2.3.3 神经氨酸酶抑制试验 按试剂盒说明书操作,在 96 孔荧光酶标板内每孔加 $70\ \mu\text{L}$ 神经氨酸酶检测缓冲液,然后每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 神经氨酸酶,再每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 各浓度的 MAF-1A,振动摇匀 1 min 后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min;加入 $10\ \mu\text{L}$ 的神经氨酸酶荧光底物,再振荡 1 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 进行荧光测定。根据试剂盒方法计算出样品对神经氨酸酶的抑制百分比。

1.2.4 统计学处理 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS20.0 软件以方差分析检验各组间的统计学差异, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒滴度及毒力的检测 经检测发现,甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 在鸡胚中扩增后,其血凝效价为 $1:1\ 280$;甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 对 MDCK 细胞的 TCID₅₀ 为 $1.0\times 10^{-5.2}/\text{mL}$ 。

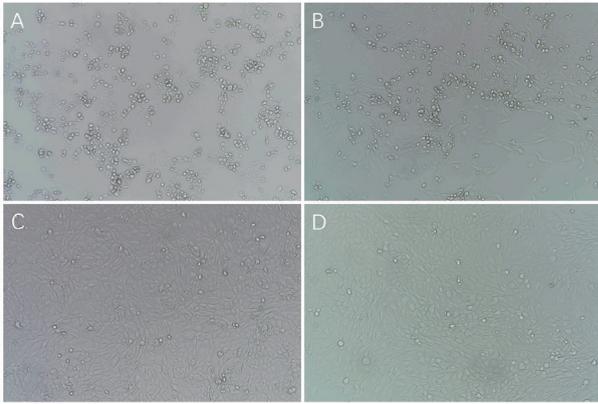
2.2 MAF-1A 对 MDCK 细胞的毒性 MTT 结果显示,当 MAF-1A 的浓度达 $2\ 500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,仍对 MDCK 细胞的生长无明显抑制作用;镜下可见,经 MAF-1A 作用后细胞的形态和结构完整性与对照组相比未见明显差异。MAF-1A 对 MDCK 细胞表现出较小的细胞毒性。

2.3 MAF-1A 抗流感病毒活性 镜下可见,甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 可导致 MDCK 细胞变圆,坏死脱落,漂浮在培养液表面。但随 MAF-1A 浓度的增高,甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒所致的 CPE 不断减弱,当浓度达 $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MDCK 细胞完整性好,形态规则,正常细胞数量与阴性对照组无明显差异(图 1)。经 MTT 法检测,MAF-1A 具有抗甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 活性,MAF-1A 对病毒的 EC₅₀ 值为 $(89.8\pm 2.97)\ \mu\text{g}/\text{mL}$,且浓度越大,对甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 的抑制率越高(图 2)。qRT-PCR 检测结果显示,与 IAV 组比较,不同剂量 ($250\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $125\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $62.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $31.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $15.6\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 MAF-1A 显著抑制了 IAV HA mRNA 的表达 ($t=7.39, 6.66, 5.78, 4.75, 5.26$, $P < 0.01$),并呈剂量依赖性(图 3)。

2.4 MAF-1A 对病毒形态结构的影响 透射电镜检测结果显示,未经药物处理的病毒对照组病毒颗粒结构完整,而在 MAF-1A 的作用下,病毒的结构出现变化,随着 MAF-1A 作用浓度升高,变化更加明显,当浓度达 $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,病毒颗粒被完全破坏(图 4)。

2.5 血凝抑制试验 MAF-1A 对流感病毒引起的鸡红细胞凝集具有明显抑制作用,当浓度为 $1.56\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时即可抑制流感病毒引起的鸡红细胞凝集(图 5A)。而 MAF-1A 与鸡红细胞单独作用时,不会引起鸡红细胞的凝集(见图 5B)。

2.6 神经氨酸酶抑制试验 结果显示,MAF-1A 与阳性对照药物奥司他韦相似,也具有抑制甲型流感



MAF-1A 浓度为 A:0 μg/mL;B:125 μg/mL;C:500 μg/mL; D 为阴性对照组。

图 1 MAF-1A 抑制流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 在 MDCK 细胞中诱导的 CPE (×400)

Fig.1 MAF-1A inhibited the influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus induced CPE in MDCK cells(×400)

● 奥司他韦 ▲ MAF-1A

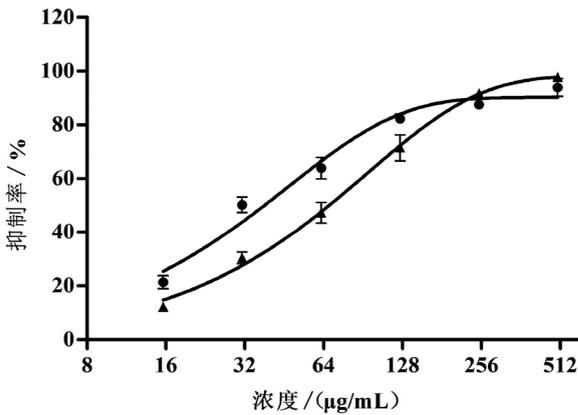
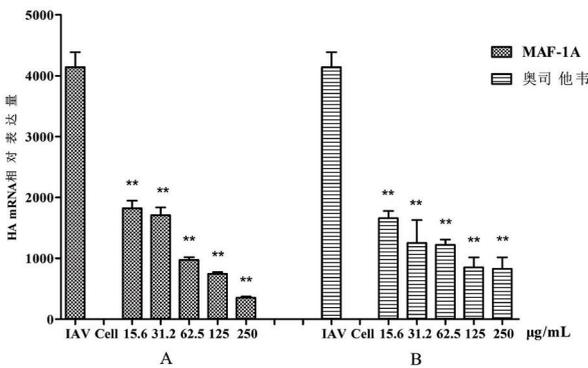


图 2 MAF-1A 抗甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1)活性
Fig.2 Inhibition rate of the influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus by MAF-1A

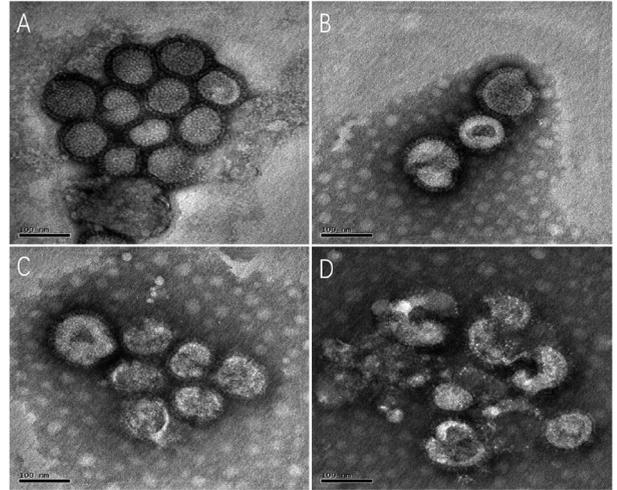


(A)MAF-1A(μg/mL) (B)奥司他韦

注: ** 与 IAV 组比较 P<0.01。

图 3 MAF-1A 处理后甲型流感病毒 HA 基因 mRNA 水平的变化

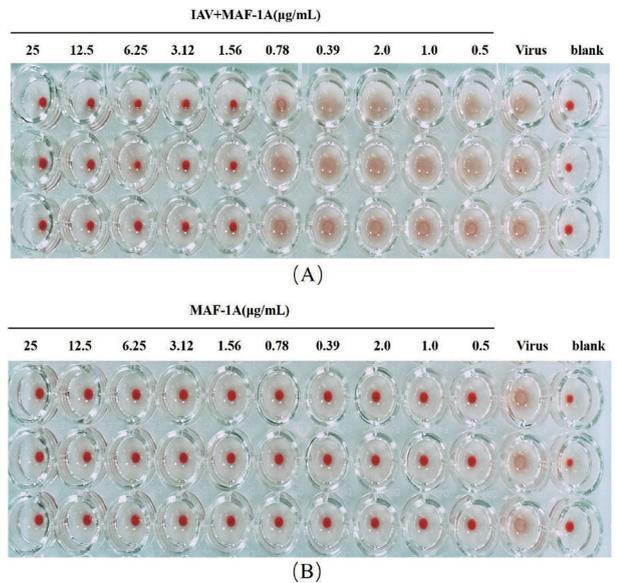
Fig.3 The mRNA level of influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus HA gene after treatment with MAF-1A



MAF-1A 浓度为 A: 0 μg/mL; B: 125 μg/mL; C:250 μg/mL; D:500 μg/mL。

图 4 不同浓度 MAF-1A 对甲型流感病毒 H1N1 形态结构的影响 (×30 000)

Fig.4 Effects of MAF-1A on morphological structure of virus(×30 000)



A: 实验组;B:MAF-1A 对照组

图 5 MAF-1A 血凝抑制试验

Fig.5 Hemagglutinin inhibition assay for MAF-1A

病毒神经氨酸酶的作用,MAF-1A 浓度增高,抑制效果越明显,其半数抑制浓度 IC₅₀ 为(134.7±10.31) μg/mL(图 6)。

3 讨论

目前流感的防治主要依靠药物和疫苗,但由于耐药病毒株的不断出现以及疫苗作用的局限性,探寻新型、有效的抗流感药物已成为必然。MAF-1A

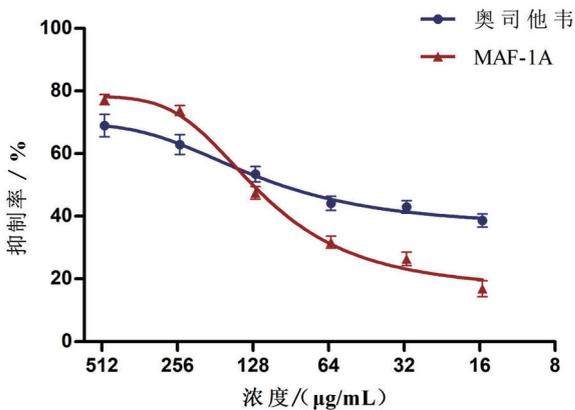


图 6 MAF-1A 对神经氨酸酶活性的影响

Fig.6 Neuraminidase inhibition assay for MAF-1A

是来源于家蝇幼虫体内的一类新型小分子 AMPs, 实验研究发现其对多种病毒、真菌具有的抑杀活性, 具有新型肽类药物的开发潜能^[15]。本实验研究结果显示, MAF-1A 可抑制甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 在 MDCK 细胞中诱导的 CPE, 能有效降低 MDCK 细胞内的病毒载量; MAF-1A 对甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 的 EC_{50} 值为 $(89.8 \pm 2.97) \mu\text{g}/\text{mL}$, 其对病毒的抑制作用呈剂量相关性, 而 MAF-1A 对 MDCK 细胞的毒性小。本实验结果证实, MAF-1A 具有较强的抗甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 活性, 且毒性较低, 表明其具有进一步研究的价值。

探明 AMPs 的抗病毒作用机制对研究 AMPs 生物学特性、开发新的抗病毒药物非常重要。研究报道, BPI、LL-37 等抗菌肽可破坏病毒颗粒的结构, 直接杀灭流感病毒^[21-23]。本实验通过透射电镜观察发现, MAF-1A 在低浓度下即可改变流感病毒的结构, 随着浓度增加, 对病毒结构破坏越明显, 表明 MAF-1A 能够直接破坏流感病毒形态结构的完整性, 导致其不能正常复制增殖。

流感病毒的包膜蛋白包括 HA 和 NA。病毒进入靶细胞是由病毒包膜上的 HA 介导的。HA 由 HA1 和 HA2 两个亚基构成, 其中 HA1 亚基与易感细胞膜表面的唾液酸受体结合, 病毒通过胞吞作用进入细胞内。有文献报道, AMPs 可以通过与流感病毒 HA 相互作用, 阻断其与宿主细胞的吸附或融合过程, 从而有效抑制流感病毒感染^[24-26]。本实验发现, MAF-1A 能阻止血凝素 HA1 亚基的血凝作用, 因此认为血凝素 HA1 亚基是其抗流感病毒的作用位点, MAF-1A 可能通过与血凝素 HA1 亚基结合而阻止流感病毒吸附宿主细胞。

流感病毒由细胞内出芽释放时, 需借助自身的

NA 切断病毒蛋白和宿主细胞表面唾液酸之间的连接, 才能使子代病毒释放至胞外, 感染其他宿主细胞^[21-25]。奥司他韦是 NA 抑制剂, 选择性地抑制其活性, 干扰流感病毒从细胞的释放, 从而达到抗流感病毒的作用^[27]。实验结果显示, MAF-1A 也能抑制 NA 的活性, 表明对 NA 的抑制可能也是其抗流感病毒作用机制之一。

综上, MAF-1A 不仅能够直接破坏流感病毒的结构, 还可以阻止流感病毒的吸附, 干扰流感病毒的释放, 提示 MAF-1A 是通过对多靶点作用而发挥抗流感病毒效应, 但其抗流感病毒关键机制及其与靶点的结合模式有待进一步研究。本研究为 MAF-1A 的深入探讨和开发、利用提供了实验依据。

利益冲突: 无

引用本文格式: 朱志翠, 邓思波, 张迎春, 等. 家蝇抗菌肽 MAF-1A 体外抗甲型流感病毒活性及机制研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35 (9): 791-796. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.085

参考文献:

- [1] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study [J]. *The Lancet*, 2018, 391(10127): 1285-1300. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2
- [2] Hutchinson EC. Influenza virus [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26 (9): 809-810. DOI: 10.1016/j.tim.2018.05.013
- [3] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls [J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-2822. DOI: 10.1128/JVI.79.5.2814-2822.2005
- [4] Novel Swine-Origin Influenza A Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (25): 2605-2615. DOI: 10.1056/NEJMoa0903810
- [5] Perez LJ, Perera CL, Coronado L, et al. Molecular epidemiology study of swine influenza virus revealing a reassorted virus H1N1 in swine farms in Cuba [J]. *Prev Vet Med*, 2015, 119(3/4): 172-178. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.02.013
- [6] Zhou L, Tan Y, Kang M, et al. Preliminary epidemiology of human infections with highly pathogenic Avian Influenza A (H7N9) Virus, China, 2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23 (8): 1355-1359. DOI: 10.3201/eid2308.170640
- [7] 严延生. 流感疫苗的研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(8): 677-683. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.153
- [8] Amarelle L, Lecuona E, Sznajder JI. Anti-influenza treatment: drugs currently used and under development [J]. *Archivos De Bronconeumologia*, 2017, 53 (1): 19-26. DOI: 10.1016/j.arbres.2016.07.004

- [9] Canini L, Conway JM, Perelson AS, et al. Impact of different oseltamivir regimens on treating influenza A virus infection and resistance emergence: insights from a modelling study [J]. PLoS Comput Biol, 2014, 10(4): e1003568. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003568
- [10] Vires VED, Schutten M, Fraaij P, et al. Influenza virus resistance to antiviral therapy [J]. Adv Pharmacol, 2013, 67: 217-246. DOI: 10.1016/B978-0-12-405880-4.00006-8
- [11] 陈涛, 杨静, 汪立杰, 等. 2016—2017 年度中国大陆流行性感冒监测分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(3): 193-199. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.036
- [12] Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo* [J]. Biomolecules, 2018, 8(1): pii: E4. DOI: 10.3390/biom8010004
- [13] Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides [J]. Curr Biol, 2016, 26(1): R14-9. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.017
- [14] 马晓琳, 朱志翠, 张迎春, 等. 家蝇抗菌肽 MAF-1A 的串联表达与抗白念珠菌体外活性检测 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 45-49. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.056
- [15] Zhou J, Kong L, Fang N, et al. Synthesis and functional characterization of MAF-1A peptide derived from the larvae of housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) [J]. J Med Entomol, 2016, 53(6): 1467-1472. DOI: 10.1093/jme/tjw110
- [16] Lin D, Luo Y, Yang G, et al. Potent influenza A virus entry inhibitors targeting a conserved region of hemagglutinin [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 144(10): 35-51. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.07.023
- [17] Jiang Y, Yang D, Li W, et al. Antiviral activity of recombinant mouse beta-defensin 3 against influenza A virus *in vitro* and *in vivo* [J]. Antivir Chem Chemother, 2012, 22(6): 255-262. DOI: 10.3851/IMP2077
- [18] 杨艳, 彭璇, 朱蕙. 荔枝核黄酮类化合物的体外抗腺病毒作用 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2016, 35(1): 41-45. DOI: 1671-8852(2014)-01-0041-05
- [19] Wu W, Li R, Li X, et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry [J]. Viruses, 2015, 8(6): 1-18. DOI: 10.3390/v8010006
- [20] 曹康, 张卫东, 施桥发. 2 种纯化流感病毒方法的比较研究 [J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(3): 179-181. DOI: 1007-3205(2005)03-0179-03
- [21] Pinkenburg O, Meyer T, Bannert N, et al. The Human Antimicrobial Protein Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) Inhibits the Infectivity of Influenza A Virus [J]. PLoS One, 2016, 11(6): 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0156929
- [22] Tripathi S, Teclé T, Verma A, et al. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins [J]. J Gen Virol, 2013, 94(1): 40-49. DOI: 10.1099/vir.0.045013-0
- [23] Tripathi S, Wang G, White M, et al. Antiviral Activity of the Human Cathelicidin, LL-37, and Derived Peptides on Seasonal and Pandemic Influenza A Viruses [J]. PLoS One, 2015, 10(4): 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0124706
- [24] Nicol MQ, Ligertwood Y, Bacon MN, et al. A novel family of peptides with potent activity against influenza A viruses [J]. J Gen Virol, 2012, 93(5): 980-986. DOI: 10.1099/vir.0.038679-0
- [25] Hoffmann J, Schneider C, Heinbockel L, et al. A new class of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides inhibits influenza A virus replication by blocking cellular attachment [J]. Antivir Res, 2014, 104(4): 23-33. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.01.015
- [26] Ullmann AJ, Dolan MC, Sackal CA, et al. Immunization with adenoviral-vectored tick salivary gland proteins (SALPs) in a murine model of Lyme borreliosis [J]. Ticks Tick-borne Dis, 2013, 4(1/2): 160-163. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.08.006
- [27] Heneghan CJ, Onakpoya I, Jones MA, et al. Neuraminidase inhibitors for influenza: a systematic review and meta-analysis of regulatory and mortality data [J]. Health Technol Assess, 2016, 20(42): 1-242. DOI: 10.3310/hta20420

收稿日期:2019-01-24 编辑:张智芳