

基于 ISRE 报告基因系统的清肺口服液黄酮类化合物筛选与验证

孙亚磊， 陶嘉磊， 赵佩佩， 朱城璧， 袁 斌*
(南京中医药大学附属医院儿科，江苏 南京 210000)

摘要：目的 以干扰素激活反应元件（ISRE）启动子为靶点，建立受 ISRE 调控稳定表达荧光素酶活性的细胞模型，用以清肺口服液黄酮类化合物筛选，并对筛选结果予以验证。**方法** 将高纯度 ISRE 荧光素酶报告基因质粒与海肾荧光质粒共同转染 293T 工具细胞，进行启动子活性检测。将 ISRE 报告基因质粒与病毒包装辅助质粒 Helper 1.0、2.0 共同转染工具细胞，收集慢病毒用于侵染 A549 细胞，经过药物筛选与 RT-qPCR 检测后得到稳定细胞株。利用稳定细胞株对清肺口服液中 32 个黄酮类化合物进行筛选，最后验证化合物对受 ISRE 正向调控的基因表达的影响。**结果** ISRE 启动子活性良好，通过慢病毒转染成功，构建受 ISRE 调控稳定表达荧光素酶活性的细胞模型，并通过双荧光素酶检测予以功能确认。从 32 个黄酮类化合物筛选出 6 个能够促使 ISRE 表达的化合物。RT-qPCR 与 Western blot 技术从受 ISRE 正向调控基因的转录水平与蛋白表达层面验证了筛选出的单体化合物能够促使 ISRE 的表达。**结论** 成功构建能够高效检测 ISRE 活性的报告基因系统，利用该系统成功筛选出能促使 ISRE 表达的清肺口服液黄酮类化合物，具有一定的理论与应用价值。

关键词：清肺口服液；黄酮类化合物；ISRE；报告基因系统

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2022)12-4053-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.055

天然免疫是机体抵御病原微生物入侵的首道生理防线，对于抵抗病毒侵袭具有重要意义^[1-2]，其依靠若干组模式识别受体来识别病毒侵袭，其中胞质 RNA 感受器视黄酸诱导基因 I（*RIG-I*），可识别细胞质中的病毒 RNA，诱导 I 型干扰素（IFN）表达^[3-5]。I 型干扰素通过与 IFN- α/β 受体的结合，继而可激活 JAK-STAT/TYK-STAT 及其下游的干扰素激活反应元件（ISRE），诱导大量抗病毒蛋白基因的转录，包括 *MX1*、*MX2*、*IP-10*、*OAS1*、*TRIM5* 等^[6-7]，起到抗病毒作用^[8]。

清肺口服液是南京中医药大学附属医院院内制剂，是抗呼吸道合胞病毒（RSV）的有效复方制剂^[9]。目前，其应用已扩展至抗博卡病毒、流感病毒等^[10-11]，清肺口服液之所以对常见的诸多病毒有着较好抗病毒效果，可能与其通过调控机体天然免疫来达到清除病原体存在密切联系。相关研究已证实清肺口服液中黄酮类化合物可上调 IFN- α/β 及其下游干扰素刺激基因表达，起到抗 RSV 作用^[12]，但黄酮类作为一类化合物，其所含的化合物繁多且生物作用各不相同。为了进一步研究清肺口服液黄酮类化合物抗病毒效应的物质基础，本研究通过构建包含 ISRE 启动子的双荧光素酶报告基因系统，进行激活 ISRE 单体化合物的高通量筛选，并根据筛选结果进行验证，为清肺口服液黄酮类化合物抗病毒效应的研究提供数据支持。

1 材料

1.1 质粒、细胞株及引物 高纯度 ISRE 荧光素酶报告基因质粒、慢病毒包装细胞 293T 细胞、病毒包装辅助质粒 Helper 1.0、病毒包装辅助质粒 Helper 2.0 等均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。人非小细胞肺癌 A549 细胞系由江苏省儿童呼吸疾病（中医药）重点实验室保存。*MX1*、*MX2*、*TRIM5*、*IP10*、*ISG15* 引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列	
基因	序列(5'→3')
<i>MX1</i>	正向 AAGCTCTTGGATGTGATCGCGAAC
	反向 GCTGCTCTTGGATGTCCTGCTG
<i>MX2</i>	正向 GAGGAGGAAGCTGAGGAGGAGAAG
	反向 GATGCGGTTGTGAGCCTCTTGG
<i>TRIM5</i>	正向 ACCATCGCCAGGGAACAAAGAAAG
	反向 GTTGAGCCTCTGTGACCTCTTGC
<i>IP10</i>	正向 CAACTGCATCCATATCGATGAC
	反向 GATTCCGGATTGACACATCTCT
<i>ISG15</i>	正向 CGATTTCCTGGTGTCCGTGACTAAC
	反向 TAAGACCGTCCTGGAGCACTGC
<i>GADPH</i>	正向 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反向 GGGTCGTTGATGGCAACA

1.2 仪器 ELX800 型多功能酶标仪（美国 BioTek 公司）；

收稿日期：2022-04-08

基金项目：国家自然科学基金委员会面上项目（82174436，81873340）；江苏省研究生科研与实践创新计划项目（KYCX22_1923）

作者简介：孙亚磊（1992—），男，博士生，从事小儿肺系疾病基础与临床研究。Tel：（025）86617141，E-mail：sunyalei7263@163.com

* 通信作者：袁 斌（1966—），男，博士，教授，主任中医师，博士生导师，从事小儿肺系疾病基础与临床研究。Tel：（025）86798182，E-mail：yfy0045@njucm.edu.cn

实时荧光定量 PCR 仪、大容量高速冷冻离心机、蛋白核酸分析仪（德国 Eppendorf 公司）；二氧化碳细胞培养箱（日本三洋公司）；Alpha 凝胶成像系统（美国 ProteinSimple 公司）；TE77 型半干转膜仪、电泳槽、制胶架（美国 GE 公司）；生物安全柜（新加坡 ESCO 公司）。

1.3 试剂 南美胎牛血清、双荧光素酶检测试剂盒（上海翊圣生物科技有限公司）；高糖 DMEM、胰蛋白酶、PBS（美国 Gibco 公司）；三联抗生素（上海源培生物科技股份有限公司）；X-tremegene HP 转染试剂（瑞士罗氏公司）；聚凝胺（上海吉凯基因医学科技股份有限公司）；嘌呤霉素（美国 Sigma 公司）；重组人 IFN- α 2A（上海普欣生物技术有限公司）；高效逆转录试剂盒、PCR 反应试剂盒（镇江爱必梦生物技术有限公司）；超敏 ECL 化学发光底物（南京沃利尔斯生物技术有限公司）；预制胶（美国 Bio-Rad 公司）；TRIM5、MX1 抗体（美国 CST 公司）。

1.4 药物 儿茶素、牡荆素、木犀草苷、当药黄素、槲皮素、山柰酚、芫花素、樱黄素、表儿茶素、光甘草定、苜蓿素、异甘草素、柳穿鱼黄素、紫云英苷、桑色素、木犀草素、芹菜素、草质素对照品（纯度 $\geq 98.0\%$ ，货号 ST01600120、ST00340120、ST00330120、ST17240120、ST00230120、ST00450120、ST04150120、ST80840105、ST01190120、ST06010120、STC3180105、ST09620120、ST07400120、ST07310120、ST79460120、ST00070120、ST00410120、ST78680120）购自上海诗丹德标准技术服务有限公司；异槲皮苷、槲皮苷、橙皮苷、桑辛素对照品（纯度 $\geq 98.0\%$ ，货号 LW18022308、LW8041101、LW80619-038、LW180729069）购自南京良纬生物科技有限公司；芦丁、金丝桃苷、橙皮素、异鼠李素、桑根酮 C 对照品（纯度 $\geq 98.0\%$ ，货号 BCY000507、BCY00450、BCY000162、BCY000856、BCY000719）购自江西佰草源生物科技有限公司；异鼠李素 3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚 7-*O*-鼠李糖苷、桑皮酮 E、山柰酚 3-*O*-鼠李糖苷对照品（纯度 $\geq 98.0\%$ ，货号 JBZ1463、JBZ1747、JBZ1746、JBZ1177）购自南京金益柏生物科技有限公司；异牡荆素对照品（纯度 $\geq 98.0\%$ ，货号 B21544）购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 ISRE 荧光素酶报告基因质粒 报告基因质粒所用载体为 CV130，其包含有嘌呤霉素抗性区与荧光基团，经其琼脂糖凝胶电泳成像与基因测序比对实验，证实报告基因质粒的准确与可靠性。

2.2 启动子活性检测 于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 293T 细胞，生长密度达到约 70% 时，移除培养基并用 PBS 清洗。取 ISRE 报告基因质粒 1 μg，海肾荧光质粒 0.02 μg 及 X-tremegene HP 转染试剂共同于 2% 血清型培养基中混合，室温下放置 15 min，加入 293T 细胞中并放入细胞培养箱培养 6 h，更换为 10% 血清型培养基。设置对照组、转染组、转染+IFN- α 组（IFN- α 2A，10 ng/mL），转染后 48 h，采用双荧光素酶检测试剂盒检测启动子活性。

加入细胞裂解液并置于冰盒上裂解 5 min，抽取 20 μL 加入黑色酶标板孔中，设置 3 个复孔。分别加入 100 μL 萤火虫、海肾荧光素酶工作液振荡后检测，计算荧光素活性比值。

2.3 质粒转染与慢病毒收集 取生长密度达到约 70% 的 293T 细胞，PBS 清洗，将培养基更换为无血清型，2 种质粒（ISRE 报告基因质粒 20 μg、病毒包装辅助质粒 Helper 1.0 15 μg、病毒包装辅助质粒 Helper 2.0 10 μg）与 Lipofectamine 2000 转染试剂共 1 mL 进行混合，室温孵育 15 min 后共同转染 293T 细胞，6 h 后清洗并将培养基更换为含 10% 血清培养基，于细胞培养箱中培养 48 h，收集细胞上清液，经离心、过滤、浓缩后得到的慢病毒用于后续实验。

2.4 慢病毒侵染 A549 细胞 将 A549 细胞接种于 6 孔板，分别设置对照组与侵染组，取“2.3”项下慢病毒毒液与 A549 细胞共转染，培养基中加入聚凝胺（5 μg/mL）使其易感染，同时感染复数 MOI 设为 20，16 h 后更换培养基。

2.5 稳定细胞系的药物筛选 慢病毒侵染 48 h 后观察病毒感染细胞状态，要求细胞状态良好且未出现大面积死亡，并将 2 μg/mL 嘌呤霉素加入培养板中，进行药物筛选。96 h 后对细胞进行观察、拍照，对存活细胞进行收集、纯化，并采用 RT-qPCR 法检测目的基因的 mRNA 表达。若目的基因显著高表达则可作为稳定细胞株（记为 A549-ISRE 细胞），冷冻保存后用作下一步验证实验。

2.6 A549-ISRE 细胞的功能验证 阳性药物选择重组人干扰素（IFN- α 2A，10 ng/mL），设置对照组（构建细胞）与 IFN- α 组（IFN- α 2A，10 ng/mL 干预构建细胞），按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测其荧光素酶活性。

2.7 激活 ISRE 中药单体的筛选 将冷冻保存的 A549-ISRE 细胞复苏培养，制成细胞悬液接种于 96 孔板，药物选择前期定量分析得到的清肺口服液 26 个黄酮类化合物及其他 6 个定性分析得到的黄酮类化合物^[12]。L1（儿茶素）、L2（异槲皮苷）、L3（芦丁）、L4（牡荆素）、L5（木犀草苷）、L6（金丝桃苷）、L7（异鼠李素 3-*O*-葡萄糖苷）、L8（槲皮苷）、L9（当药黄素）、L10（橙皮苷）、L11（橙皮素）、L12（异鼠李素）、L13（槲皮素）、L14（山柰酚）、L15（芫花素）、L16（山柰酚 7-*O*-鼠李糖苷）、L17（樱黄素）、L18（桑根酮 C）、L19（桑辛素）、L20（表儿茶素）、L21（光甘草定）、L22（苜蓿素）、L23（异甘草素）、L24（柳穿鱼黄素）、L25（紫云英苷）、L26（桑色素）、L27（木犀草素）、L28（芹菜素）、L29（草质素）、L30（桑皮酮 E）、L31（异牡荆素）、L32（山柰酚 3-*O*-鼠李糖苷），按其最大无毒浓度进行干预处理。分别设置对照组、IFN 组（IFN- α 2A，10 ng/mL）、药物组，48 h 后吸弃培养液，加入细胞裂解液于冰上孵育 5 min，取 20 μL 细胞裂解液加入 96 孔板，依次加入萤火虫、海肾荧光素酶反应液，检测荧光素酶活性。

2.8 中药单体效应验证

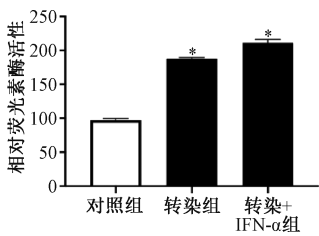
2.8.1 RT-qPCR 分析 将阳性单体药物与构建的 A549-ISRE 细胞共培养, 48 h 后收集细胞, TRIzol 提取法获取细胞总 RNA, 选择 GAPDH 作为对照, 采用常规 RT-qPCR 分析方法对受 ISRE 正向调控的基因 MX1、MX2、TRIM5、IP10、ISG15 进行转录水平的检测。

2.8.2 Western blot 分析 将阳性单体药物与构建的 A549-ISRE 细胞共培养, 48 h 后收集细胞, 冰上裂解获取细胞蛋白, BCA 蛋白定量, 采用常规 Western blot 技术对受 ISRE 正向调控的基因 MX1、TRIM5 等进行蛋白表达的检测。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组内两两比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 启动子活性 转染 293T 细胞 48 h 后进行荧光素酶活性检测, 如图 1 所示, 转染组荧光素酶活性相对值为 187.6 $\pm$ 2.1, 转染+IFN- α 组荧光素酶活性相对值为 211.1 $\pm$ 5.0, 高于对照组的活性相对值 97.3 $\pm$ 2.3 (*P*<0.05), 提示 IFN- α 能够增强启动子的活性。



注: 与对照组比较, * *P*<0.05。

图 1 启动子活性检测结果 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

3.2 稳定表达细胞系的构建 如图 2 所示, 侵染组细胞因其能够对嘌呤霉素产生抗性而能正常生长; 而对照组细胞由于无法对抗生素产生抵抗, 故无法正常生长。如图 3 所示, 侵染组 ISRE 启动子表达丰度高于对照组 (*P*<0.05), 证实慢病毒能够有效侵染 A549 细胞。通过克隆稳定株构建, 获得稳定表达细胞株 (记为 A549-ISRE 细胞), 见图 4。

3.3 A549-ISRE 细胞功能验证 如图 5 所示, 与对照组比较, 在 IFN- α 的作用下, A549-ISRE 细胞裂解液中的荧光素酶活性升高 (*P*<0.05), 从功能层面验证了 A549-ISRE

细胞构建成功。

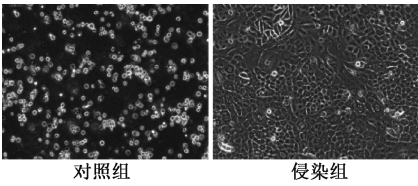
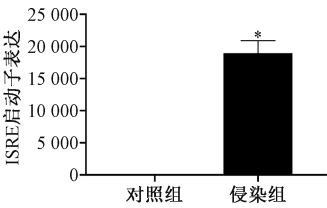


图 2 各组细胞生长形态 ($\times 100$)



注: 与对照组比较, * *P*<0.05。

图 3 各组 ISRE 启动子表达 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

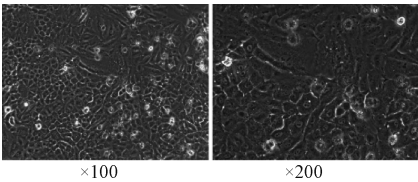
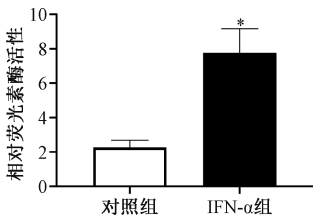


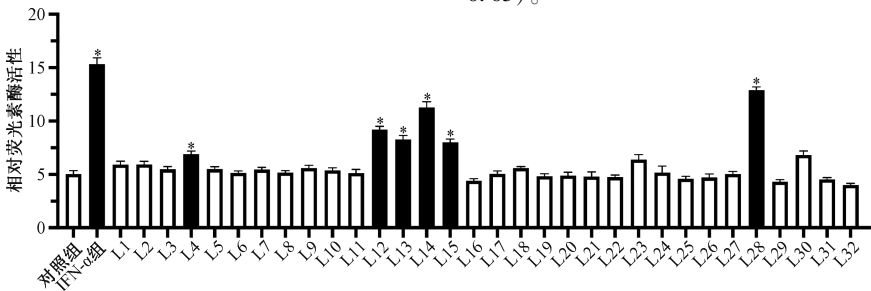
图 4 构建稳定细胞系



注: 与对照组比较, * *P*<0.05。

图 5 各组荧光素酶活性比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

3.4 促使 ISRE 表达的化合物筛选 A549-ISRE 细胞经过阳性药 IFN- α 及 32 个中药单体化合物刺激后, 对其进行荧光素酶活性检测, 如图 6 所示, 与对照组比较, IFN- α 组和 L4 (牡荆素, 5 μ mol/L)、L12 (异鼠李素, 47 μ mol/L)、L13 (槲皮素, 130 μ mol/L)、L14 (山柰酚, 22 μ mol/L)、L15 (芫花素, 53 μ mol/L)、L28 (芹菜素, 7 μ mol/L) 组均能提高荧光酶活性, 促进 ISRE 表达 (*P*<0.05)。

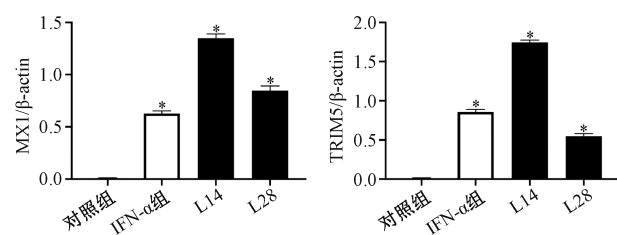
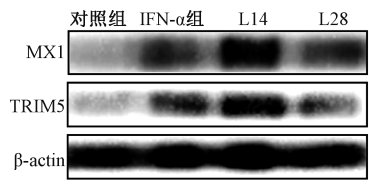


注: 与对照组比较, * *P*<0.05。

图 6 促使 ISRE 表达化合物的筛选结果 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

3.5 阳性化合物对 ISRE 表达效果的验证 为了验证筛选出的化合物的作用效果,选择受 ISRE 正向调控的 5 个基因,分别为 *MX1*、*MX2*、*TRIM5*、*IP10*、*ISG15*;干预药物选择 L14 (山柰酚, 22 $\mu\text{mol/L}$)、L28 (芹菜素, 7 $\mu\text{mol/L}$);阳性药物选择 IFN ($\text{IFN-}\alpha 2\text{A}$, 10 ng/mL),药物干预后进行基因转录水平的检测。如图 7 所示,与对照组比较,药物 L14、L28 组受调控基因 *MX1*、*MX2*、*TRIM5* mRNA 表达升高 ($P<0.05$),L14 组 *IP10*、*ISG15* mRNA 表达升高 ($P<0.05$),结果证实了基于 A549-ISRE 细胞成功筛选出了促使 ISRE 表达的单体化合物。

为了验证药物干预后 ISRE 正向调控基因在蛋白表达上的差异,选择了 *MX1*、*TRIM5* 蛋白,结果如图 8 所示,与对照组比较,药物 L14、L28 组 *MX1*、*TRIM5* 蛋白表达升



注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。
图 8 化合物对 ISRE 下游基因蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

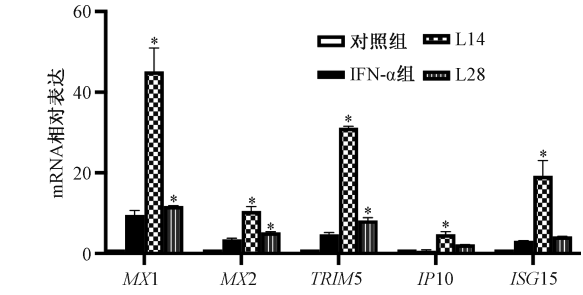
4 讨论

RSV 属于负义单链 RNA 病毒,其进入机体后可被胞质中的 RIG-I 等识别,进而启动下游信号级连反应^[13-15]。在病毒感染早期阶段,天然免疫所发挥的抗病毒作用是机体最为重要的抵抗外来病原体的免疫反应^[16-17]。RIG-I 可诱导关键抗病毒细胞因子 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 的释放^[18],激活 ISRE 及其效应靶点 ISGs 的大量表达,ISGs 中的 *MX1*、*MX2*、*IP10* 为抗黏病毒蛋白,可在病毒入侵细胞阶段起到阻止病毒核酸进入的作用^[19-21]; *ISG15*、*TRIM5* 则在病毒的复制、脱壳阶段起到抗病毒作用^[22-23]。然而 RSV 在感染机体过程中存在免疫逃逸行为,其可通过扰乱 RIG-I 的正常信号传导,抑制 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 的释放,使得下游 ISRE、ISGs 等效应靶点不能得到激活,因而难以起到有效的抗病毒作用^[24-26]。因此,抗 RSV 药物研发、中医药药效作用探究等均可以此着手研究。

目前 RSV 依然是导致儿童时期下呼吸道感染的最主要原因^[27-30]。清肺口服液作为应用于临床抗 RSV 的复方制剂,已有数十年历史,其对其他类型病毒性肺炎(如流感病毒、博卡病毒等)也有良好的治疗作用^[9-11],提示其可能与调控机体最基本的、最原始的天然免疫存在关联。黄酮类化合物已被证实可通过调控天然免疫途径达到抗 RSV 目的^[12],但其仍然存在所含化合物复杂等问题,因此迫切需要建立起能够快速筛选调控天然免疫物质的报告基因系统。

本次研究获得含有 ISRE 启动子的慢病毒质粒,其在报告基因质粒的载体上包含有嘌呤霉素抗性区,故可借助嘌呤

霉素进行细胞的筛选与确证,通过药筛后获得了慢病毒侵染成功的 A549-ISRE 细胞株。利用 $\text{IFN-}\alpha$ 能够激活 ISRE 的生物功能,对构建的稳定细胞系进行验证,最终证实 A549-ISRE 细胞具有受 ISRE 调控稳定表达荧光素酶活性的功能。基于 A549-ISRE 细胞对前期定量分析得到的清肺口服液 26 个黄酮类化合物及其他 6 个定性分析得到的黄酮类化合物进行筛选,发现牡荆素、异鼠李素、槲皮素、山柰酚、芫花素、芹菜素等 6 个能够激活 ISRE 的化合物,并选择山柰酚、芹菜素进行验证,通过对受 ISRE 正向调控的基因转录水平及蛋白表达的检测分析,验证山柰酚、芹菜素的生物效应,也再次确认 A549-ISRE 细胞的功能特点。



注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。
图 7 化合物对 ISRE 下游基因转录水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

该报告基因系统灵敏度高、检测方便,能够特异性地筛选出对目的基因具有调控活性的单体化合物,在高通量的药物筛选中具有显著的优越性,对于目前的中医药研究具有广阔的应用前景。该报告基因系统的构建思路也可应用于今后中医药领域更广泛的药物筛选中,筛选获得的药物有可能进一步发展成为疾病治疗的化学药物。因此,本研究具有较好的理论及应用价值,可被用于更广泛的中医药领域研究当中,为中医药今后的研究提供借鉴思路。

参考文献:

[1] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection[J]. Immunol Rev, 2009, 227: 75-86.
[2] Iwasaki A, Pillai P. Innate immunity to influenza virus infection [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(5): 315-328.

[3] Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition[J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(1): 17-22.

[4] Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors[J]. *Immunol Rev*, 2009, 227(1): 54-65.

[5] Zhang Z K, Fang X X, Wu X J, et al. Acetylation-dependent deubiquitinase OTUD3 controls MAVS activation in innate antiviral immunity[J]. *Mol Cell*, 2020, 79(2): 304-319.

[6] Schoggins J W. Interferon-stimulated genes: What do they all do? [J]. *Annu Rev Virol*, 2019, 6(1): 567-584.

[7] Lukhele S, Boukhaled G M, Brooks D G. Type I interferon signaling, regulation and gene stimulation in chronic virus infection[J]. *Semin Immunol*, 2019, 43: 101277.

[8] Schneider W M, Chevillotte M D, Rice C M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 513-545.

[9] 袁 斌, 任现志, 孙轶秋, 等. 清肺口服液治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎 166 例多中心单盲对照临床观察[J]. 中医杂志, 2009, 50(3): 221-223.

[10] 王明明, 邢吴敏, 张 蕾, 等. 清肺口服液联合喜炎平注射液治疗小儿博卡病毒肺炎的临床研究[J]. 中草药, 2017, 48(18): 5.

[11] 汪受传, 孙轶秋, 卞国本, 等. 清肺口服液治疗小儿病毒性肺炎痰热闭肺证 507 例临床研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(9): 1649-1653; 1658.

[12] 陶嘉磊. 基于 I 型干扰素信号通路探讨清肺口服液类黄酮组分抗 RSV 研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.

[13] Barik S. Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 372: 173-191.

[14] Hijano D R, Vu L D, Kauvar L M, et al. Role of type I interferon (IFN) in the respiratory syncytial virus (RSV) immune response and disease severity [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 566.

[15] Stephens L M, Varga S M. Function and modulation of type I interferons during respiratory syncytial virus infection [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(2): 177.

[16] Unterholzner L, Almine J F. Camouflage and interception: how pathogens evade detection by intracellular nucleic acid sensors [J]. *Immunology*, 2019, 156(3): 217-227.

[17] Tatematsu M, Funami K, Seya T, et al. Extracellular RNA sensing by pattern recognition receptors [J]. *J Innate Immun*, 2018, 10(5-6): 398-406.

[18] Schijf M A, Lukens M V, Kruijsen D, et al. Respiratory syncytial virus induced type I IFN production by pDC is regulated by RSV-infected airway epithelial cells, RSV-exposed monocytes and virus specific antibodies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81695.

[19] Xiao J, Yan J, Chen H, et al. Mx1 of black carp functions importantly in the antiviral innate immune response [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 58: 584-592.

[20] 白思宇, 杨 倩, 仇华吉. 干扰素刺激基因的抗病毒机制 [J]. 微生物学报, 2018, 58(3): 361-371.

[21] Brown M G, McAlpine S M, Huang Y Y, et al. RNA sensors enable human mast cell anti-viral chemokine production and IFN-mediated protection in response to antibody-enhanced dengue virus infection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34055.

[22] Morales D J, Lenschow D J. The antiviral activities of ISG15 [J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(24): 4995-5008.

[23] Nakayama E E, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha [J]. *Rev Med Virol*, 2010, 20(2): 77-92.

[24] Sedeyn K, Schepens B, Saelens X. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: Exceptional disrupters of innate immune responses[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(10): e1007984.

[25] Ban J, Lee N R, Lee N J, et al. Human respiratory syncytial virus NS 1 targets TRIM25 to suppress RIG-I ubiquitination and subsequent RIG-I-mediated antiviral signaling [J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 716.

[26] Whelan J N, Tran K C, van Rossum D B, et al. Identification of respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 residues essential for exploitation of the host ubiquitin system and inhibition of innate immune responses [J]. *J Virol*, 2016, 90(14): 6453-6463.

[27] Hall C B, Weinberg G A, Iwane M K, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(6): 588-598.

[28] Hall C B, Simes E A F, Anderson L J. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 372: 39-57.

[29] Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) study group. causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia; the PERCH multi-country case-control study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10200): 757-779.

[30] Tapia M D, Sylla M, Driscoll A J, et al. The etiology of childhood pneumonia in Mali: Findings from the Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) study [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2021, 40(9S): S18-S28.