

DOI:10.13350/j.cjpb.220602

• 论著 •

# A型产气荚膜梭菌 KdpD/E 双组份系统调节毒素基因表达的研究\*

贺曦<sup>1,2</sup>, 陈晓慧<sup>1,2</sup>, 徐淑琴<sup>1,2</sup>, 贺晓龙<sup>1,2</sup>, 冶贵生<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 青海大学农牧学院动物医学系, 青海西宁 810016; 2. 青海省动物疾病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室)

**【摘要】** **目的** 明确 kdpD 基因编码的蛋白结构特点, 探究 A 型产气荚膜梭菌中 KdpD/E 系统与 alpha 和 cpe 毒素基因表达趋势的关联性。 **方法** 用试剂盒法提取 A 型 Cp 菌的基因组 DNA, PCR 扩增 kdpD 基因并测序, 对该基因测序结果进行分析及蛋白结构预测; 分别提取 A 型产气荚膜梭菌培养 2-9 h 8 个时间段的总 RNA, 采用电泳和核酸蛋白检测仪, 测定各个时间段总 RNA 的浓度和纯度; 将 RNA 反转录为 cDNA, 用实时荧光定量 PCR 检测 kdpD、kdpE 双组份系统与 alpha、cpe 毒素编码基因的相对表达量。 **结果** 生物信息学预测 KdpD 蛋白结构中  $\alpha$ -螺旋占 76.1%,  $\beta$ -折叠占 23.1%,  $\beta$ -转角占 0.855%, 无规则卷曲占 0.427%, 无跨膜区; 提取总 RNA 的质量较高, 其  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8~2.1 之间; 实时荧光定量 PCR 检测 kdpD、kdpE、alpha、cpe 基因扩增产物溶解曲线单一, 同时 kdpD/E 基因与 alpha 和 cpe 毒素基因表达趋势相似, 即随着细菌的生长, 信号基因和毒素基因的表达量均增加, 且在 3 h 和 4 h 增幅明显, 并在 4 h 时表达量最高, 随后逐渐降低, 其中 alpha 毒素基因表达量的变化更为明显。 **结论** 产气荚膜梭菌 kdpE 基因的蛋白结构预测符合其作为应答调节蛋白的结构功能, A 型 Cp 菌中 KdpD/E 双组份信号系统与 alpha 和 cpe 毒素基因的表达存在一定的相关性, alpha 毒素作为 A 型产气荚膜梭菌产生的主要毒素与 KdpD/E 系统的相关性更显著。

**【关键词】** A 型产气荚膜梭菌; 双组份系统; a 毒素基因; cpe 毒素基因

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)06-0626-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jun.; 17(6):626-630.]

## Study on the correlation between the expression of alpha and cpe toxin genes of Clostridium perfringens type A by kdpD/E two-component system

HE Xi<sup>1,2</sup>, CHENG Xiao-hui<sup>1,2</sup>, XU Shu-qin<sup>1,2</sup>, HE Xiao-long<sup>1,2</sup>, YE Gui-sheng<sup>1,2</sup> (1. Department of Animal Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease Pathogen Diagnosis and Green Prevention and Control Technology, Qinghai Province) \*\*

**【Abstract】** **Objective** In order to clarify the protein structure characteristics of kdpD gene synthesis. To explore the correlation of the KdpD/E system to the gene expression trends of alpha and cpe toxins in *C. perfringens* type A. **Methods** The genomic DNA of *C. perfringens* type A bacteria was extracted by kit method. The kdpD gene was amplified by PCR and sequence. Gene sequence results were analyzed and protein structure predicted. Total RNA was extracted from *C. perfringens* type A cultured for 2-9 h for 8 times periods. Electrophoresis and nuclei acid protein detector were used to detect the concentration and purity of total RNA in each time period. RNA was reversing transcribed for cDNA. The relative expression levels of kdpD, kdpE two-component system and alpha, cpe toxin encoding genes were detected by RT-qPCR. **Results** Bioinformatics predicts that  $\alpha$ -helix accounts for 76.1%,  $\beta$ -sheet accounts for 23.1%,  $\beta$ -turn accounts for 0.855%, random coil accounts for 0.427%, and there is no transmembrane region in the structure of KdpD protein. The  $A_{260}/A_{280}$  value of the extracted total RNA was between 1.8 and 2.1. Real-time fluorescence quantitative PCR detection of kdpD, kdpE, alpha, cpe gene amplification products has a single dissolution curve. At the same time, the expression trend of kdpD/E gene and alpha and cpe toxin gene was similar. That is, with the growth of bacteria, the expression levels of both signal genes and toxin genes increase. And the increase was obvious at 3 h and 4 h, and the expression level was the highest at 4 h, and then gradually decreased. Among them, the expression level of alpha toxin gene changed more obviously. **Conclusion** The protein structure prediction of the kdpE gene of *Clostridium perfringens* is consistent with its structural function as a response regulator protein. There is a certain correlation between the KdpD/E two-component signaling system and the expression of alpha and cpe toxin genes in *C. perfringens* type A. The alpha

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31760739); 青海省科技厅项目(No. 2022-NK-118); 2020年青海省“高端创新人才”千人计划项目。

\*\* **【通讯作者】** 冶贵生, E-mail: qhxjygs@163.com

**【作者简介】** 贺曦(1996-), 女, 四川人, 硕士研究生, 主要从事分子病原生物学与免疫学研究。E-mail: hexi7427@163.com

toxin produced by *C. perfringens* type A was more closely related to the KdpD/E system.

**【Key words】** *Clostridium perfringens* type A; Two-component system; alpha toxin gene; cpe toxin gene

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)是一种可产生孢子的革兰阳性菌条件致病菌,在自然界和动物肠道内广泛存在,主要引起人类和动物气性坏疽、肠道感染等疾病<sup>[1]</sup>,还能诱发人的食物中毒。其中A型Cp菌被认为是人类和动物最易感的病原体之一<sup>[2]</sup>,主要通过产生alpha毒素和肠毒素CPE,引起肠绒毛上皮及内皮细胞损伤,破坏细胞膜结构完整性,引发肠炎<sup>[3]</sup>;同时alpha毒素能诱导内皮细胞死亡导致严重的肌坏死<sup>[4]</sup>。Cp菌中存在许多参与生命活动调控的关键系统,其中双组份信号系统在感知、响应环境刺激和调控毒力基因表达方面发挥着核心作用。

双组份信号(Two-component signal, TCS)系统参与调控细菌的绝大部分生理活动,是细菌最基本、最关键的信号转导系统,主要参与调节细菌的生长繁殖、黏附、毒力、耐药性和宿主-病原体相互作用的反应等<sup>[5]</sup>。迄今为止在微生物中已发现有数百种TCS系统<sup>[6]</sup>,不同菌中TCS系统的数目差异显著,常见细菌一般含有20种以上的TCS系统,且不同的TCS系统间存在相互调控作用,共同维持细菌的各类生理活动。一个完整的TCS系统包含两个部分:组氨酸蛋白激酶(Histidine Kinase, HK)和应答调节蛋白(Response Regulator, RR)<sup>[7]</sup>。HK通常是一个跨膜蛋白,由信号感应结构域、跨膜区和信号传导结构域三部分构成<sup>[8]</sup>,该蛋白能通过感受外界环境刺激,激活自身产生信号转导。RR一般是由一个保守的N-末端接受区域和一个多变的C-末端输出区域组成<sup>[9]</sup>,该蛋白通常存在于胞膜内,无跨膜区,通过磷酸级联反应起作用。

KdpD/E双组份系统最初在大肠埃希菌中被发现,该系统感应环境中K<sup>+</sup>浓度和渗透压的变化<sup>[10-11]</sup>,通过调节下游相关基因的表达来适应胞外环境变化。KdpD/E系统参与Kdp-ATPase K<sup>+</sup>转运系统的功能调控<sup>[12]</sup>,对细菌细胞内存活机制也具有调节作用,同时与致病菌毒力基因的表达相关<sup>[13]</sup>。大量研究表明TCS系统的缺失会导致致病菌株毒力的普遍减弱<sup>[14-15]</sup>,致病性降低<sup>[16]</sup>。本研究对KdpD蛋白进行结构预测,同时采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术对kdpD、kdpE、alpha和cpe毒素基因表达水平进行检测,旨在为Cp菌KdpD/E双组份系统调控机制的研究提供基础数据,为Cp菌的感染防治提供思路。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 菌种 试验用A型产气荚膜梭菌(Cp)

CICC22949于中国工业微生物菌种保藏管理中心购买。

1.2 主要试剂 液体硫乙醇(FT)培养基购自北京陆桥公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自TIANGEN(中国)公司;EASYspin Plus细菌RNA快速提取试剂盒,购自艾德莱(北京)生物科技公司;Premix Ex Taq II和反转录试剂盒购自TaKaRa(中国)公司。

### 2 方法

2.1 A型Cp菌基因组DNA提取 复苏A型Cp菌株,然后按1%接种量接种于FT培养基,在170 r/min,37℃条件恒温过夜培养。吸取3-5 mL菌液,10 000 r/min离心5 min,收集菌体。用试剂盒提取A型Cp菌基因组DNA,并通过1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量。

2.2 Cp菌kdpE基因PCR扩增和序列测定 根据NCBI中已发表的Cp菌kdpE基因序列设计引物,引物序列为kdpE-F:5'-ATGAAACCAGCAATTTTA-3'; kdpE-R:5'-TTAAAGTTCACATCCTTAT-3',并交由生工生物工程(上海)公司合成,kdpE基因扩增片段大小为704 bp。PCR扩增以Cp菌基因组DNA为模板。PCR反应条件:95℃ 1 min;47℃ 1 min,72℃ 1 min,共35个循环;72℃ 10 min,PCR产物4℃保存。用胶回收法纯化PCR,纯化产物交由生工公司测序。

2.3 KdpE蛋白结构分析 用DNA Star软件分析KdpE蛋白的二级结构,SWISS-MODEL分析KdpE蛋白的三级结构。

2.4 Cp菌总RNA的提取 复苏Cp菌株,然后按1:100比例接种于FT培养基,在170 r/min,37℃条件培养。收集培养2-9 h的菌液,10 000 r/min离心5 min,收集菌沉淀,用试剂盒法分别提取不同时间段细菌总RNA。用1%的琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白检测仪测定所提取RNA的纯度和浓度,并将RNA放至-80℃保存。

2.5 cDNA的合成 对培养各时间段提取的Cp菌株总RNA稀释到均一浓度后,用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,于-20℃保存。

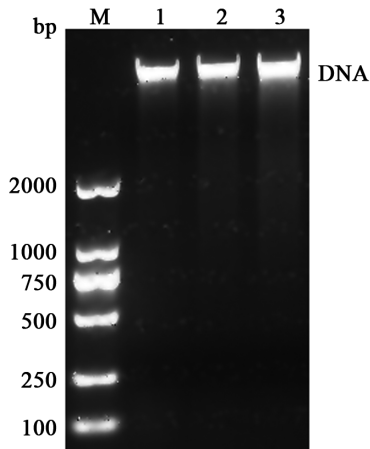
2.6 引物合成和RT-qPCR检测 根据NCBI中已发表的Cp菌kdpD/E、alpha和cpe基因序列设计荧光定量引物。kdpD-F:5'-ATGAGGGAAACTCGTCCTAA-3'; kdpD-R:5'-TCAATAACTAAAATTGCTGGTTTCA-3'。kdpE-F:5'-ATGAAACCAGCAATTTTA-3'; kdpE-R:5'-TTAAAGTTCAC-

TATCCTTAT-3'。alpha-F: 5'-GTGGTGAGAA-AGATGCTGGAAC-3'。alpha-R: 5'-TTCCTGGGT-TGCCATTTCCC-3'；cpe-F: 5'-TCCAATGGTGT-TCGAAAATGCT-3'。cpe-R: 5'-GGGTTCCCCTA-ATATCCAACCA-3'。RT-qPCR 反应以 16S rRNA 基因为内参基因。反应体系(25 μL):12.5 μL TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×), 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2 μL cDNA 溶液, 8.5 μL RNase free dH<sub>2</sub>O。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,50 °C 34 s,共 40 个循环;95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,应用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算目的基因的相对表达量。

### 结 果

#### 1 Cp 菌株基因组 DNA 的提取与鉴定

提取的 A 型 Cp 菌基因组 DNA 经电泳检测结果 显示,目的条带单一,亮度合适(图 1)。



M DNA 标志物 1~3 A 型 Cp 菌基因组 DNA

图 1 Cp 菌基因组 DNA 电泳图

M DNA Marker 1-3 Type A Cp bacterial genome DNA

Fig. 1 Cp bacteria genomic DNA electrophoresis

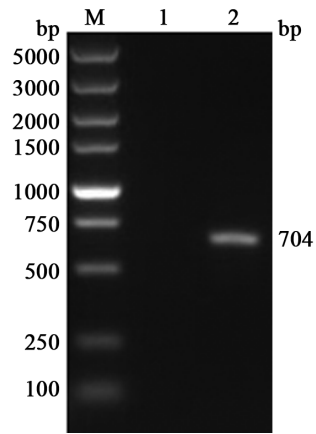
#### 2 Cp 菌 kdpE 基因的扩增

PCR 扩增 Cp 菌 kdpE 基因,扩增片段大小约 704 bp(图 2),与预期相符。阴性对照无相应扩增片段。

#### 3 KdpE 蛋白结构预测

Garnier 法预测蛋白的二级结构(图 3),KdpE 蛋白中存在许多 α-螺旋和 β-折叠,以及少量 β-转角和无规则卷曲;其中 α-螺旋占 76.1%,β-折叠占 23.1%,β-转角占 0.855%,无规则卷曲占 0.427%。

通过 SWISS-MODEL 工具对 KdpE 蛋白进行三级结构预测(图 4)。KdpE 蛋白结构中 α 螺旋占据绝大部分,存在部分 β 转角,可见少量的 β 折叠和无规则卷曲。



M DNA 标志物 1 阴性对照 2 kdpE 基因 PCR 产物

图 2 kdpE 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA Marker 1 Negative Control 2 kdpE gene PCR product

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of kdpE gene

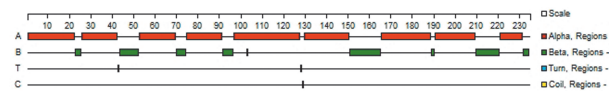


图 3 KdpE 蛋白二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure of KdpE protein

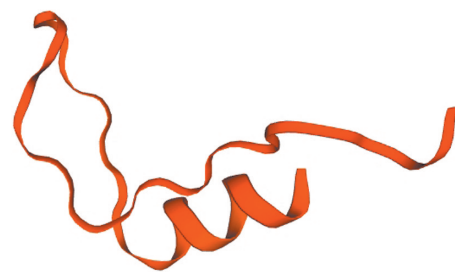
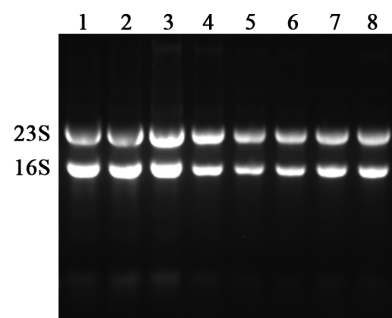


图 4 KdpE 蛋白三级结构

Fig. 4 Tertiary structure of KdpE protein

#### 4 Cp 菌株总 RNA 的提取及鉴定

提取的 Cp 菌株总 RNA 电泳结果显示(图 5),不同时间段 RNA 条带均明亮,浓度和纯度较高。不同时间段 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值均在 1.8~2.1 之间,表明提取的 RNA 纯度较好。



1~8 分别为 2-9 h

图 5 培养 2-9 h 的 Cp 菌总 RNA 提取物 1%琼脂糖凝胶电泳分析  
1-8 2-9 h respectively

Fig. 5 2-9 h total RNA electrophoresis results

## 5 RT-qPCR 检测 kdpD、kdpE、alpha 和 cpe 毒素基因表达情况

kdpD 和 kdpE 基因的 RT-qPCR 溶解曲线峰值均较窄且单一,说明扩增产物单一,不存在非特异性扩增(图 6)。随着 Cp 菌培养时间的增加,kdpD 和 kdpE 基因的相对表达量均逐渐升高,培养 4 h 时达到峰值,随后逐渐降低(图 7)。

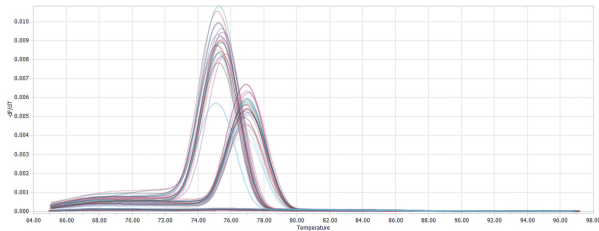


图 6 kdpD 和 kdpE 基因溶解曲线  
Fig. 6 Dissolution curves of kdpD and kdpE gene

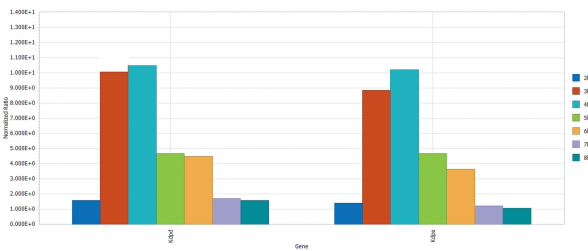


图 7 kdpD 和 kdpE 基因相对表达量  
Fig. 7 Relative expression of kdpD and kdpE gene

kdpD、kdpE、alpha 毒素基因 RT-qPCR 检测溶解曲线见图 8。kdpD/E 双组份信号基因与 alpha 毒素基因表达趋势相同,随着培养时间的延长,kdpD、kdpE、alpha 毒素基因呈现先上调表达,后下调表达,在培养 4 h 时均呈现表达量最大,随后均表现为下调表达(图 9),表明 Cp 菌 kdpD/E 双组份信号系统对 alpha 毒素基因有一定的正向调节作用。

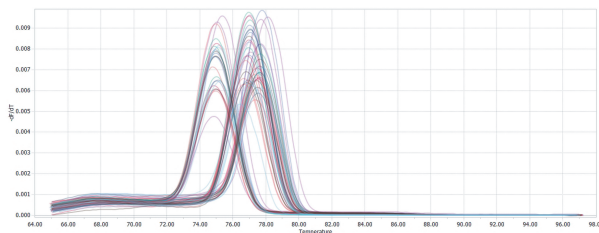


图 8 kdpD、kdpE 和 alpha 毒素基因溶解曲线  
Fig. 8 kdpD, kdpE and alpha toxin gene dissolution curves

kdpD、kdpE、cpe 毒素基因 RT-qPCR 检测溶解曲线见图 10。kdpE 双组份信号基因与 cpe 毒素基因表达趋势相同,随着培养时间的延长,kdpE 和 cpe 基因呈先上调表达,后下调表达,在培养 4 h 时基因表达量达到最大,随后均表现为下调表达,其中 kdpD 基因的表达除了在 6 h 时出现一定波动,其余时间段均与

kdpE 基因的表达一致(图 11)。

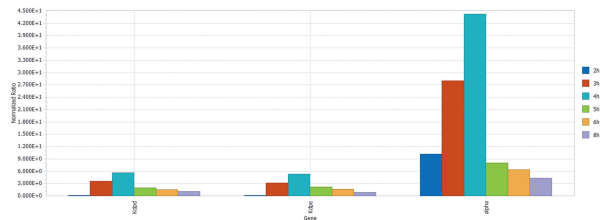


图 9 kdpD、kdpE 和 alpha 毒素基因相对表达量  
Fig. 9 Relative expression of kdpD, kdpE and alpha toxin gene

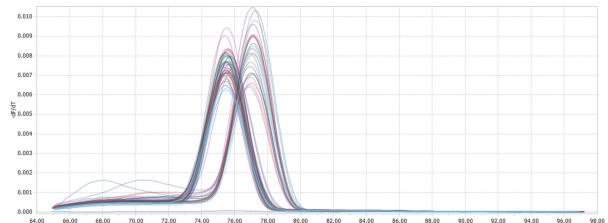


图 10 kdpD、kdpE 和 cpe 基因溶解曲线  
Fig. 10 kdpD, kdpE and cpe gene dissolution curves

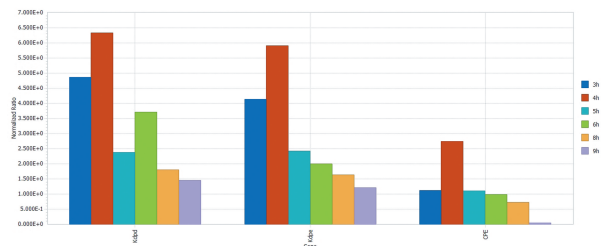


图 11 kdpD、kdpE 和 cpe 基因相对表达量  
Fig. 11 Relative expression of kdpD, kdpE and cpe gene

## 讨论

TCS 系统是细菌感受细胞内外环境最普遍的一个系统,由 HK 和 RR 组成。在 KdpD/E 系统中,KdpD 作为一个跨膜蛋白通常位于细胞膜上,该蛋白主要作用是捕捉并且翻译细胞外的环境信号<sup>[17]</sup>;RR 仅存在于胞膜内,无跨膜区,其功能主要是依据胞外信号分子的变化对特定基因进行调控或使细菌作出一系列适应性行为<sup>[18]</sup>。KdpD/E 系统参与细菌对环境耐受力的调控<sup>[19]</sup>,也对部分细菌的运动和毒素产生密切相关<sup>[20]</sup>。在金黄色葡萄球菌,KdpD/E 系统参与调控荚膜多糖毒素的产生<sup>[21-22]</sup>。在结核分枝杆菌,kdpD/E 基因缺失导致其毒力增强<sup>[9]</sup>。在溶藻弧菌,KdpD/E 系统参与毒力因子的调控及致病过程<sup>[23]</sup>。本研究中 Cp 菌株的 KdpE 蛋白预测结果符合其作为 RR 的结构功能。

本实验中,kdpD 和 kdpE 基因在 A 型 Cp 菌生长过程中的表达趋势相同,在 4 h 表达量达到最高,这也被认为与 2-4 h 作为 Cp 菌快速生长期相关。kdpD/E 基因对 A 型 Cp 菌 alpha 毒素和 cpe 毒素基因具有一

程度的正相关作用,且作用趋势相同,均在4 h时表达量达到最大值,其中可能由于alpha毒素作为A型Cp菌主要的毒素,所以KdpD/E系统对其调控作用相对要突出。以上表明KdpD/E双组份信号系统对A型产气荚膜梭菌主要毒素基因的表达具有一定的调控作用。建议在此基础上构建A型Cp菌kdpD/E基因缺失菌株,进一步了解KdpD/E双组份信号系统对Cp菌的调控机制,从而为A型Cp菌新型活苗的研究提供理论支撑。

## 【参考文献】

- [1] 龚霄,陈盼. 革兰氏阳性食源性致病菌[J]. 肉类研究,2008(05):52-60.
- [2] 董洁,张红垒,许信刚,等. 产气荚膜梭菌 $\beta$ 毒素研究进展[J]. 动物医学进展,2012,33(8):81-85.
- [3] Rood JI. Virulence genes of *Clostridium Perfringens*[J]. Ann Rev Microbiol,1998(52):333-360.
- [4] Takehara M, Bandou H, Kobayashi K, et al. *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin specifically induces endothelial cell death by promoting ceramide-mediated apoptosis [J]. Anaerobe, 2020, 65: 102262.
- [5] Alwis PA, Treerat P, Gong L, et al. Disruption of the *Burkholderia pseudomallei* two-component signal transduction system BbeR-BbeS leads to increased extracellular DNA secretion and altered biofilm formation[J]. Vet Microbiol,2020(242):108603.
- [6] 陈宝花,邹婷婷,黄运红,等. 嗜根考克氏菌双组分信号转导系统的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2020,39(8):3524-3531.
- [7] James AH. Two-component and phosphorelay signal transduction [J]. Current Opinion Microbiol,2000,3(2):165-170.
- [8] 郝艳华,张维,陈明. 细菌双组分系统的研究进展[J]. 中国农业科技导报,2012,14(2):67-72.
- [9] 李雷,卫科科,姜卫红,等. 细菌双组分系统应答调控蛋白调控策略的多样性[J]. 中国科学:生命科学,2017,47(5):462-469.
- [10] 李亮. 结核分枝杆菌双组分调控系统 KdpD/E 基因缺失株的构建及功能的初步研究[D]. 华中农业大学,2016.
- [11] Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K homeostasis and virulence[J]. PLoS pathogens,2013,9(3):e1003201.
- [12] Damn JB, Apell HJ. Role of protons in the pump cycle of Kdp-FABC investigated by time-resolved kinetic experiments[J]. Biochemistry,2014,53(19):3218-3228.
- [13] Iqbal Z, Seleem MN, Hussain HI, et al. Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals[J]. Scientific Reports,2016(6):35442.
- [14] Parish T, Smith DA, Kendall S, et al. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infect Immun,2003b,71(3):1134-1140.
- [15] Haydel SE, Clark-Curtiss JE. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages [J]. FEMS Microbiol Lett,2004,236(2):341-347.
- [16] Yang RL, Deng CY, Wei JW, et al. A large-scale mutational analysis of two-component signaling systems of *Lonsdalea quercina* revealed that KdpD-KdpE regulates bacterial virulence against host poplar trees[J]. Mol Plant-Microbe Interact,2018,31(7):724-736.
- [17] 张华伟,于丽佳,张春民,等. 外泌体 miRNA 的生物学功能及其在肺纤维化疾病中的调控作用[J]. 生物化学与生物物理进展,2019,46(11):1073-1084.
- [18] Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems[J]. Ann Rev Microbiol,2012(66):325-347.
- [19] Xie MQ, Wu MY, Han AD. Structural insights into the signal transduction mechanism of the K<sup>+</sup>-sensing two-component system KdpDE[J]. Sci Signaling,2020,13(643):eaaz2970.
- [20] Mei X, Muhammad AR, Yi G, et al. The KdpD/KdpE two-component system contributes to the motility and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Res Vet Sci,2020,131:24-30.
- [21] 赵丽萍. 金黄色葡萄球菌 AI-2 群体感应系统的调控[D]. 中国科学技术大学,2010.
- [22] Xue T, You Y, Hong D, et al. The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K<sup>+</sup> sensing and Agr signaling to infection programming. Infect Immun. 2011,79(6):2154-67.
- [23] 张燕飞,庞欢瑛,简纪常,等. 溶藻弧菌双组分调控系统 KdpDE 减毒活疫苗的构建及其免疫效果评价[J]. 水产学报,2015,39(10):1558-1568.
- [17] Gao J, Chen J, Lu W, et al. Construction of an infectious clone of Zika virus stably expressing an EGFP marker in a eukaryotic expression system[J]. Virol J,2021,18(1):151.
- [18] Cheng YL, Lin YS, Chen CL, et al. Dengue virus infection causes the activation of distinct NF- $\kappa$ B pathways for inducible nitric oxide synthase and TNF- $\alpha$  expression in RAW264.7 cells[J]. Mediators Inflamm,2015(2015):274025.
- [19] Abraham S, Nagaraj AS, Basak S, et al. Japanese encephalitis virus utilizes the canonical pathway to activate NF- $\kappa$ B but it utilizes the type I interferon pathway to induce major histocompatibility complex class I expression in mouse embryonic fibroblasts [J]. J Virol,2010,84(11):5485-5493.
- [20] Refaat H, Mady FM, Sarhan HA, et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19[J]. Int J Pharm,2021(592):120028.
- [21] Burke TR Jr, Fesen MR, Mazumder A, et al. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase[J]. J Med Chem,1995,38(21):4171-4178.
- [22] de Sousa JR, Azevedo RDS, Martins Filho AJ, et al. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases[J]. Cytokine,2018(111):255-264.

【收稿日期】 2022-02-11 【修回日期】 2022-05-05

【收稿日期】 2022-03-10 【修回日期】 2022-05-16

(上接 625 页)