



分类号 S859.3

学 号 S20212369

山西農業大學

全日制硕士学位论文

抗 FIPV 天然化合物的体外筛选及 其抗病毒机制研究

姓 名： 曹众达

指导教师： 孙耀贵 教 授

印春生 研究员

学科专业： 兽医学

培养单位： 动物医学学院

中 国 · 山 西 · 太 谷

二〇二四年五月

Shanxi Agricultural University

**Full-time Master Degree
Dissertation**

**In vitro screening of natural compounds against FIPV and
study of their antiviral mechanisms**

Name: Zhongda Cao

Supervisor: Professor Yaogui Sun

Researcher Chunsheng Yin

Major: Veterinary Medicine

Institute: College of Veterinary Medicine

Taigu Shanxi China

May, 2024

本研究由

山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目（2022TSGC2270）

山西省农业重大技术协同推广项目（2023XTTG01）

山西省科技创新人才团队专项（202204051001021）

“十四五”国家重点研发计划项目（2022YFD1800603）

提供资助

This research was supported by the Shandong Province Science and Technology-based Small and Medium-sized Enterprises Innovation Capacity Enhancement Project (2022TSGC2270), the Shanxi Provincial Agricultural Major Technology Synergistic Extension Project (2023XTTG01), the Shanxi Provincial Science and Technology Innovation Talent Team (202204051001021) and “The 14th Five-Year Plan” National Key Research and Development Program (2022YFD1800603).

目 录

第一章 文献综述	5
1 猫传染性腹膜炎概述.....	5
1.1 病原学.....	5
1.2 流行病学.....	5
1.3 临床症状及病理变化.....	5
1.4 病理变化.....	6
1.5 治疗与防控措施.....	6
2 FIPV 基因组结构和功能	6
2.1 FIPV	6
2.2 FIPV 基因组结构	6
2.3 FIPV 的致病机制	7
3 中药提取物抗病毒研究进展	7
3.1 中药提取物抗病毒概述.....	7
3.2 具有抗病毒作用的天然化合物.....	8
4 网络药理学和分子对接.....	10
4.1 概述.....	10
4.2 网络药理学和分子对接在中药领域的应用	11
5 蛋白质组学技术.....	11
5.1 概述.....	11
5.2 定量蛋白质组学在中药领域的应用.....	12
第二章 抗猫传染性腹膜炎(FIPV)天然化合物的体外筛选.....	13
前言.....	13
试验部分.....	14
1 试验材料.....	14
1.1 细胞与毒株.....	14
1.2 药物.....	14
1.3 主要试剂.....	14
1.4 主要仪器.....	14
1.5 试剂配制.....	14
2 试验设计与方法.....	15
2.1 CRFK 细胞	15
2.2 FIPV 毒株	16
2.3 药物.....	17
2.4 药物对 FIPV 感染细胞的抑制作用	18

2.5 药物对 FIPV 复制的影响	18
2.6 药物对 FIPV 吸附的影响	19
2.7 药物对 FIPV 的直接灭活作用	19
2.8 药物对 FIPV 诱发的细胞凋亡的影响	19
2.9 数据处理与统计分析	20
3 结果	20
3.1 FIPV 毒力测定结果	20
3.2 药物的细胞毒性试验结果	20
3.3 药物抑制 FIPV 感染的试验结果	21
3.4 药物影响 FIPV 复制的结果	22
3.5 药物影响 FIPV 吸附的结果	23
3.6 药物对 FIPV 直接灭活作用的结果	24
3.7 药物对细胞凋亡影响的结果	24
4 讨论	25
5 小结	28
第三章 基于网络药理学和分子对接预测黄芩苷抗 FIPV 的作用机制	29
前言	29
试验部分	30
1 试验材料	30
1.1 数据库	30
1.2 分析软件	30
1.3 绘图平台	30
2 试验设计与方法	31
2.1 药物靶点的收集	31
2.2 疾病靶点的收集	31
2.3 潜在作用靶点的筛选	31
2.4 蛋白相互作用(PPI)网络构建	31
2.5 关键作用靶点的筛选	32
2.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析	32
2.7 分子对接验证	32
3 结果	33
3.1 潜在作用靶点的筛选结果	33
3.2 潜在靶点 PPI 网络构建	34
3.3 关键作用靶点筛选结果	35
3.4 GO 功能富集分析结果	35
3.5 KEGG 通路富集分析结果	36
3.6 分子对接结果	37

4 讨论.....	38
5 小结.....	39
第四章 基于 4D-LFQ 蛋白质组学分析黄芩苷抗 FIPV 的作用机制.....	41
前言.....	41
试验部分.....	42
1 试验材料.....	42
1.1 细胞与毒株.....	42
1.2 药物.....	42
1.3 主要试剂.....	42
1.4 主要仪器.....	42
1.5 试剂配制.....	43
2 试验设计与方法.....	43
2.1 CRFK 细胞.....	43
2.2 FIPV 毒株.....	43
2.3 药物.....	43
2.4 药物最佳作用时间的确定.....	43
2.5 细胞总蛋白的提取与质量鉴定.....	46
2.6 4D-LFQ 蛋白质组学结果分析.....	48
2.7 通路蛋白的 Western blot 验证.....	49
2.8 数据处理与统计分析.....	50
3 结果.....	50
3.1 药物最佳作用时间的确定.....	50
3.2 细胞总蛋白的检验结果.....	51
3.3 4D-LFQ 蛋白质组学质谱鉴定结果.....	52
3.4 4D-LFQ 蛋白质组学蛋白质鉴定结果.....	52
3.5 GO 功能富集分析结果.....	53
3.6 KEGG 通路富集分析结果.....	54
3.7 候选通路分析结果.....	54
3.8 关键通路蛋白的筛选结果.....	56
3.9 关键通路蛋白的组学定量结果.....	56
3.10 Western Blot 验证结果.....	57
4 讨论.....	59
5 小结.....	61
全文结论.....	63
创新点.....	63
参考文献.....	65

中英文缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
FIP	Feline infectious peritonitis	猫传染性腹膜炎
FIPV	Feline infectious peritonitis virus	猫传染性腹膜炎病毒
FCoV	Feline Coronavirus	猫冠状病毒
CoV	Coronavirus	冠状病毒
FECV	Feline enteric coronavirus	猫肠道冠状病毒
ASFV	African swine fever virus	非洲猪瘟病毒
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
HCV	hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
EBV	epstein-barr virus	EB 病毒
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
IBDV	infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病病毒
DHAV-1	Duck hepatitis A virus type 1	鸭甲型肝炎病毒 1 型
HSV-1	Herpes simplex virus type 1	单纯疱疹病毒 1 型
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合症病毒
HSV-2	Herpes simplex virus type 2	单纯疱疹病毒 2 型
CVB3	Coxsackie virus B3	柯萨奇病毒 B3
VMC	viral myocarditis	病毒性心肌炎
PLpro	papain-like protease	木瓜蛋白酶样蛋白酶
MF	myocardial fibrosis	心肌纤维化
CAG	chronic atrophic gastritis	慢性萎缩性胃炎
CSVD	Cerebral small vessel disease	脑小血管病
iCCA	intrahepatic cholangiocarcinoma	肝内胆管癌
CPE	cytopathologic effect	细胞病变法
MNTC	maximum no-cytotoxic concentration	最大安全浓度

中英文缩略词表续表

缩写	英文全称	中文全称
CC ₅₀	50% cytotoxic concentration	50%细胞毒性浓度
EC ₅₀	50% effective concentration	50%药物有效浓度
IR	inhibition ratio	抑制率
MIR	maximum inhibition ratio	最大抑制率
SI	selection index	选择指数
TCID ₅₀	tissue culture infective dose	半数感染量
PPI	Protein-protein interaction	蛋白-蛋白相互作用
ORF	open reading frame	开放阅读框
UTR	Untranslated Region	非翻译区
TRS	Transcription regulating sequences	转录调控序列
TCM	Traditional Chinese Medicine	传统中药
SSA	Saikosaponin-A	柴胡皂苷-a
NP	Network pharmacology	网络药理学
MD	Molecular docking	分子对接
4D LFQ	4D Label free quantification	4D 非标记定量
TMT	Tandem Mass Tags	串联批量标签
iTRAQ	Isobaric Tag for Relative Absolute Quantitation	相对绝对定量的同位素标记

摘要

目的:从 9 种天然化合物中筛选出具有体外抗猫传染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus, FIPV) 作用的化合物, 并利用网络药理学、分子对接和 4D-LFQ 蛋白质组学技术初步探讨所筛化合物抗 FIPV 的机制。

方法: 1、采用细胞病变法 (cytopathologic effect, CPE) 和 CCK8 法来测定天然化合物在 CRFK 细胞上的最大安全浓度 (maximum no-cytotoxic concentration, MNTC)、50%细胞毒性浓度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀)、50%药物有效浓度 (50% effective concentration, EC₅₀) 以及化合物对 FIPV 的最大抑制率 (maximum inhibition ratio, MIR)。筛选出选择指数 (selection index, SI) 大于 3 同时最大抑制率高于 50%的化合物, 并通过复制抑制试验、吸附抑制试验、直接灭活病毒试验和凋亡检测试验来解释所筛选药物的抗病毒作用。

2、通过 PubChem 数据库和 GeneCards 数据库对黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点进行筛选; 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建靶点蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络, 并使用 Metascape 数据库对潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。利用 Cytoscape 软件进行九种拓扑分析, 获得关键作用靶点。之后利用 UCSF Chimera 软件进行分子对接分析, 筛选出最佳结合靶点, 并探讨黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用机制。

3、通过将药物和病毒共同孵育 CRFK 细胞, 制备黄芩苷抗 FIPV 感染的细胞模型, 利用实时荧光定量 PCR 检测不同感染时间细胞的病毒载量, 选择药物最佳作用时间, 之后收集细胞, 提取总蛋白, 进行 4D-LFQ 蛋白质组学分析。使用 NCBI Felis catus 数据库对肽段进行注释, 根据 $P < 0.05$ 的筛选标准筛选出差异表达蛋白 (differentially expressed proteins, DEPs), 利用 GO 数据库和 KEGG 数据库对 DEPs 进行富集分析。根据组学结果对黄芩苷抑制 FIPV 感染的机制通路进行分析, 并对通路中关键蛋白进行 Western blot 验证, 初步探讨黄芩苷抗 FIPV 感染的作用机制。

结果: 1、药物抑制 FIPV 感染的结果显示, 黄芩苷对 FIPV 感染的抑制率为 79.5%, SI 为 5.5, 其余药物抑制率均低于 50%; 药物影响 FIPV 复制的结果显示, 黄芩苷在病毒感染的 8 h 内有 50%以上的抑制作用; 药物影响 FIPV 吸附的结果显示, 黄芩苷不能阻止 FIPV 对 CRFK 细胞的吸附; 药物对 FIPV 直接灭活作用的结果显示, FIPV 有直接灭活作用, 且将药物和毒液共培养 150 min 时, FIPV 彻底灭活。药物对细胞凋亡的结果显示, 黄芩苷可显著抑制 FIPV 诱导的细胞凋亡 ($P < 0.05$)。

2、利用 PubChem 数据库和 GeneCards 数据库对黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶

点进行筛选,共筛选出17个潜在作用靶点。通过CytoHubba分析,最终获得2个关键作用靶点,分别为AKT1和ESR1。对关键作用靶点进行分子对接分析,结果显示,相比于ESR1靶点,AKT1靶点与黄芩苷药物分子有2条氢键,且结合自由能为-7.9 kcal/mol,具有更好的亲和力。

3、利用实时荧光定量PCR技术确定了细胞模型的最佳感染时间为48 h,之后按照该感染时间进行样品总蛋白的提取和质量检测。并在符合组学质谱条件后进行4D-LFQ蛋白质组学分析。组学结果显示,本次蛋白组学共检测到6546个蛋白质,其中Control组、FIPV组和Treatment组分别检测到6456、6430和6486个蛋白质,三组重叠蛋白有6346个;按照 $P < 0.05$ 筛选差异表达蛋白,Treatment/FIPV组中上调蛋白为257个,下调蛋白为238个;Treatment/Control组中上调蛋白为940个,下调蛋白为452个;FIPV/Control组中上调蛋白为678个,下调蛋白为390个;对差异蛋白进行富集分析,GO富集结果显示,差异表达蛋白主要富集在代谢过程、蛋白结合、核酸结合、细胞质、胞质部分等;KEGG富集结果显示,差异表达蛋白主要富集在PI3K-AKT信号通路、Apoptosis通路和HIF-1信号通路等。依据第1、2点结果,选择PI3K-AKT信号通路和Apoptosis通路进行后续研究。绘制PI3K-AKT信号通路和Apoptosis通路热图,结果显示,PIK3CA和CASP 9都有显著变化;利用火山图和组学定量结果对通路相关蛋白进行分析,火山图和定量分析结果显示,与FIPV处理组相比,Treatment组的EGFR、PIK3CA、AKT2蛋白都显著上调($P < 0.05$),AKT3和BCL2L1有上升趋势,CASP 9蛋白显著下调($P < 0.05$),Bax有下降趋势。最后利用Western blot对通路关键蛋白进行验证,结果显示,与FIPV处理组相比,Treatment组中的EGFR、PI3K、P-AKT和Bcl-2蛋白显著上调($P < 0.05$),C-Caspase 9和Bax蛋白显著下调($P < 0.05$),Bcl-2/Bax显著上调($P < 0.05$)。

结论:黄芩苷在体外具有抗FIPV感染的作用,其可通过调控PI3K-AKT信号通路和Apoptosis通路起到抑制FIPV感染的作用。

关键词:黄芩苷;猫传染性腹膜炎;网络药理学;分子对接;4D-LFQ蛋白质组学

第一章 文献综述

1 猫传染性腹膜炎概述

在猫的多种疾病中，猫传染性腹膜炎（Feline infectious peritonitis, FIP）作为猫的重要传染病之一，会引起猫的体温升高、食欲减退、体重减轻、呼吸困难和腹泻等症状，是一种全身性、致死性传染病^[1]。该病由猫传染性腹膜炎病毒（Feline infectious peritonitis virus, FIPV）感染引起，可分为干型和湿型两种类别^[2]，多见于 6-24 个月以内的幼猫和 11 岁以上的老年猫，并可引起明显的腹膜炎症状^[3]，对宠物业造成严重的危害。

1.1 病原学

猫冠状病毒（Feline Coronavirus, FCoV）属于冠状病毒（Coronavirus, CoV）亚科，其中包含有猫肠道冠状病毒（Feline enteric coronavirus, FECV）和猫传染性腹膜炎病毒（FIPV）等冠状病毒。通常情况下，由 FECV 感染所引起的患病猫的症状比较轻微，多数患病猫无明显的感染症状，少数会出现轻度腹泻，个别患病猫出现严重的肠炎症状^[4]。研究表明，随着 FECV 感染时间的增长，其可突变为高致死性传染病病原 FIPV^[5,6]。FIPV 是一种单链 RNA 病毒，呈线性，其基因组长度约为 27-32 kb^[7,8]。研究表明，缺少两个或多个核苷酸的 7b 基因的辅助基因可能是 FIPV 毒力增强的直接原因^[9-11]。Pedersen 等^[9]研究发现，7b 基因的缺失会导致 FIPV 的毒力丧失。

1.2 流行病学

FCoV 的感染受季节影响较大，秋季和冬季是其高发季节，一些品种猫如布偶猫、缅甸猫、孟加拉猫和苏格兰折耳猫等极易感染，除此之外，野猫以及猎豹也可成为感染对象，故该病毒成为了猫养殖业关注的焦点^[12]。有临床研究发现，过于密集的饲养密度可能会引发 FECV 向 FIPV 的突变，导致病情的恶化^[13]。除此之外，当宠物受到惊吓、环境突变或长途运输等应激时，也会导致 FECV 向 FIPV 的突变^[14]。

1.3 临床症状及病理变化

FIPV 感染可分为干性腹膜炎（实质性）和湿性腹膜炎（非实质性）两种^[15]。其中湿性腹膜炎为最常见的感染。有临床病例表明，干性腹膜炎可转变为湿性腹膜炎^[16]。

湿性腹膜炎，又称渗出型猫传染性腹膜炎，患病猫临床症状较为明显，在患病 7-40 d 左右，患病猫产生暗黄色腹水，可见腹部隆起，患病母猫隆起程度与怀孕类似，患病公猫可见阴囊肿大。在对腹部进行触诊时，有明显的水样波动感^[17]。在患病后 2-10 周，患病猫身体消瘦，并伴有贫血症状，最后机体各组织衰竭而致死亡。

干性腹膜炎，又称非渗出型猫传染性腹膜炎，患病猫出现嗜睡、食欲减弱和体重减轻等症状^[18]。干性腹膜炎不会使病猫产生腹水，但一些患病猫的眼房处会有出血，眼角膜出现水肿并伴有瞳孔缩小和视力减退等症状^[19]。一些患病猫在中枢神经系统受到损伤后，表现出精神不佳、大小便功能障碍、后驱运动障碍和休克等症状^[20]。

1.4 病理变化

干性腹膜炎和湿性腹膜炎都会使患病猫的淋巴结肿大^[21]。但与湿性腹膜炎相比，干性腹膜炎对机体的造成的损伤更加严重。多数患病猫出现脑水肿，并伴有不同程度的胸腔浆液性积液、腹腔浆液性积液、心包积液，且腹腔脏器出现肉芽肿性病理变化^[22]。在各积液中含有大量蛋白质、巨噬细胞和嗜中性粒细胞，积液呈无色透明或淡黄色的黏稠纤维状，容易凝固^[6,23]。患病猫体内各脏器均会出现实质性病变，并伴有白色、黄色和褐色的肉芽肿出现^[24]。此外，有的患病猫眼部眼房液中蛋白的含量会增加，脑脊液中的蛋白也会增加并伴有中枢神经系统病^[25]。

1.5 治疗与防控措施

研究表明，FIPV 感染产生的抗体水平是通过疫苗的接种而依赖性增强（ADE）的，这也成为了疫苗预防的难点^[26]。目前已有针对 FIP 的弱毒疫苗和灭活 FIPV 疫苗，但都没有足够的效力^[27,28]。目前，对于 FIP 治疗大多以对症治疗为主，暂无治疗 FIP 的特效药物。研究表明，核苷类似物 GS-441524 可对 FIPV 的感染起到抑制作用^[29]，但该药无法完全根治，对患病猫的治疗还需能使用具有免疫抑制剂或抗炎作用的药物。因此，对猫的居住环境的定期消毒与清洁是非常重要的预防措施，时刻保持干净卫生，并及时将患病猫与健康猫隔离，以降低传染几率。

2 FIPV 基因组结构和功能

2.1 FIPV

FCoV 根据其病理生物学分为两种生物型。通常引起轻度或亚临床消化症状的无毒菌株被称为猫肠道冠状病毒（FECV）。FECV 在猫中流行，血清阳性率为 20%-60%^[30]。毒株 FIPV 是导致 FIP 疾病的原因。FIPV 是由 FECV 的自发突变引起的，它修饰了刺突糖蛋白、3c 辅助蛋白和潜在的辅助蛋白 7b。虽然 FECV 主要局限于肠道，但 FIPV 能够感染单核细胞以及巨噬细胞^[31]，导致病毒扩散，直至形成全身感染。

2.2 FIPV 基因组结构

FIPV 是一种强毒病毒，它是由 FECV 的 ORF 3c、S 基因和 ORF 7b 等位点的突变

引起的,该突变改变了肠细胞向单核/巨噬细胞的嗜性^[32]。FIPV 基因组全长约 30 kb,共包含 11 个开放阅读框 (open reading frame, ORF),这些开放阅读框可编码 1 种病毒复制酶,4 种结构蛋白,5 种特异性的附属蛋白。研究表明,5'非翻译区(Untranslated Region, UTR)和整个复制酶基因是不容易发生突变的^[33]。5' UTR 由 311 个的核苷酸组成,包括前导序列(第 1 至 92 个氨基酸)和具有控制 mRNA 合成的核心 TRS 5'-CUAAAC-3' (第 93 至 98 个氨基酸)的转录调控序列(Transcription regulating sequences, TRS),其中转录调控序列在所有 FCoV 中都是保守的^[34,35]。3' UTR 包括 275 个氨基酸,其次是 poly(A)尾。FIPV 基因大约三分之二的基因组被包含 ORF1a(第 312 至 12407 个氨基酸)和 1b(第 12362 至 20407 个氨基酸)的复制酶基因覆盖。在剩余的三分之一基因组中,包含 9 个 ORF,其中 ORF2、4、5、6 分别编码 S、E、M 和 N 蛋白这 4 种结构蛋白。ORF3a、3b、3c、7a 和 7b 分别编码 5 种特异性附属蛋白 3a、3b、3c、7a 和 7b 的 5 种辅助基因序列^[4,36-40]。

2.3 FIPV 的致病机制

目前,对于 FIPV 的致病机制尚不明确。Shuid 等^[41]通过以 FIPV 感染 CRFK 细胞建立感染模型,并利用流式细胞术对细胞凋亡进行检测发现,FIPV 感染的 CRFK 细胞会发生早期凋亡,并且随感染时间的增加,凋亡细胞的数量持续增加,在晚期凋亡细胞中也观察到类似的趋势。之后利用该感染模型进行转录组学研究,研究表明,p53、p38、MAPK、VEGF 和趋化因子/细胞因子信号通路可能参与了细胞凋亡过程。KIPAR 等^[42]研究发现,FIPV 的持续感染会引起机体产生肉芽肿性静脉炎。被感染的单核细胞附着和迁移到血管/血管周围肉芽肿浸润并破坏血管基层。单核细胞和血管周围巨噬细胞被激活促进 CD18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 和基质金属蛋白酶-9 的表达,导致患病猫的血管及周围出现明显的炎性病变。

3 中药提取物抗病毒研究进展

3.1 中药提取物抗病毒概述

病毒的复制需在宿主细胞中进行,因此在灭活病毒的同时不损伤宿主细胞是一个难点^[43]。西方抗病毒药物主要通过抑制病毒的吸附、侵入、核酸合成和脱壳等过程发挥抗病毒作用^[44,45]。但在药物发挥抗病毒作用的同时,一些药物还引起宿主严重的不良反应,并产生耐药性^[46]。近年来,从传统中药(Traditional Chinese Medicine, TCM)中提取有效成分抗病毒成为了研究的热点。例如,Hakobyan 等^[47]建立非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染 Vero 细胞模型,从五种黄酮类化合物中筛选出芹菜素具有抗

ASFV 活性, ASFV 感染 Vero 细胞 1 h 时使用芹菜素处理, 可使 ASFV 的产率降低 99.99% 以上。因此, 从中药中筛选具有抗病毒作用的天然化合物成为了新的研究方向。

3.2 具有抗病毒作用的天然化合物

近年来, 已证明具有抗病毒作用的的中药有效成分有很多, 本试验选择 9 种化学结构明确、有良好抗病毒作用的有效成分进行研究, 分别为黄芩苷、苦参碱、盐酸川芎嗪、咖啡酸、甘草酸、葛根素、绿原酸、丹参酮 IIA 和二氢丹参酮 I。

3.2.1 黄芩苷

黄芩苷 (Baicalin) 是从黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 干燥根种提取的黄酮类化合物^[48], 具有抗炎^[49]、抗氧化^[50]、抗肿瘤^[51]和抗病毒等多种生物学作用。研究表明, 黄芩苷对多种病毒都有抑制作用。黄芩苷可激活 PKR/eIF2 α 通路中的 G3BP1 mRNA 的表达, 抑制鸡胚传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 的复制^[52]。黄芩苷可以通过降低肺组织中高表达炎性细胞因子的含量, 降低 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的比值, 平衡的宿主炎症反应, 并下调 RLR 信号通路, 起到抑制甲型流感病毒的作用^[53]。黄芩苷可通过抑制线粒体自噬, 触发 IFN 活化和 M1 极化, 抑制肾源性传染性支气管炎病毒 (Nephropathogenic infectious bronchitis virus, NIBV) 的复制^[54]。黄芩苷也可对冠状病毒起到抑制作用。Dinda 等^[55]研究表明, 黄芩苷可靶向抑制 SARS-CoV-2 的 S-, 3CL-, PL-, RdRp-和 nsp13-蛋白的活性以及宿主线粒体 OXPHOS, 进而抑制病毒感染。

3.2.2 苦参碱

苦参碱 (Matrine) 是从苦参 (*Sophora flavescens*) 的根皮中提取和分离出来的四环喹啉化合物^[56], 具有抗炎^[57]、抗肿瘤^[58]、心血管保护^[59]和抗病毒^[60]等多种生物学作用。苦参碱的抗病毒作用是通过多种途径实现。Zhao 等^[61]研究发现, 苦参碱可以抑制 HSPA8 和 HSP90AB1 的表达, 抑制 PRRSV 的感染作用。在牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhoea virus, BVDV) 研究中, Cai 等^[62]发现苦参碱可以通过上调 IFN- α 、IFN- β 、Toll 样受体 3、视黄酸诱导型基因 I 和干扰素调节因子 3 的基因表达水平, 抑制 BVDV 的复制, 并可在 BVDV 感染后提高 IFN- β 的浓度。Peng 等^[63]通过网络药理学和分子对接技术发现苦参碱通过靶向 TNF 信号通路中的 TNF- α 、IL-6 和 CASP3 来调节 SARS-CoV-2 的复制、宿主细胞凋亡和炎症。

3.2.3 川芎嗪

川芎嗪 (Tetramethylpyrazine) 是从传统中药川芎中分离出的最广泛的药用化合物之一, 通常用于抗炎、抗氧化、抗氧化和活血化瘀等^[64-67]。近年来有研究发现, 川芎嗪具有良好的抗病毒作用。Sun 等^[68]发现盐酸川芎嗪对 IBV 的抑制率可达 80% 以上。Li 等

[69]发现川芎嗪衍生物 A9 具有良好的抗甲型和乙型流感病毒的作用，但作用机制尚不明确。

3.2.4 咖啡酸

咖啡酸 (Caffeic acid) 是羟基肉桂酸和苯丙类代谢物之一^[70]。咖啡酸具有抗炎^[71,72]、抗氧化^[73,74]、抗癌^[75,76]和抗病毒等多种生物活性。研究表明，咖啡酸可以通过直接作用于病毒而不是作用于被感染的细胞来抑制病毒的传播^[77]。例如，蚊媒黄病毒 Ilhéus virus (ILHV) 可被 500 M 咖啡酸灭活^[78]。咖啡酸可显著降低丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 颗粒的细胞附着及其与传染所必需的载脂蛋白 E 的相互作用，进而直接抑制 HCV 进入^[79]。

3.2.5 甘草酸

甘草酸 (Glycyrrhizic acid) 是甘草中分离出的可以反应甘草质量的药用活性成分^[80]，具有抗菌^[81]、抗炎^[82]和抗病毒等生物活性。研究表明，在 Raji 淋巴瘤和 EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 共感染的细胞中，甘草酸以剂量依赖的形式对 EBV 复制具有抑制作用^[83]。甘草酸纳米粒子可抑制鼠冠状病毒 MHV-A59 的增殖，并减少由 MHV-A59 或新型冠状病毒 N 蛋白引起的促炎细胞因子的产生^[84]。J Clinati 等^[85]从 5 种化合物中筛选出的甘草酸对 FFM-1 和 FFM-2 两株冠状病毒分离株具有明显的抑制作用。

3.2.6 葛根素

葛根素 (Puerarin) 为豆科植物野葛的干燥根提取物，其具有对糖尿病、骨质疏松等疾病的治疗^[86,87]和抗病毒作用。研究表明，葛根素可以通过抑制 NF- κ B、TNF 和 HIF-1 信号通路减少过度免疫反应和炎症，从而治疗 SARS-CoV-2 和汉坦病毒 (Hantavirus) 的混合感染^[88]。Wu 等^[89]利用定量蛋白质组学分析发现，葛根素可以抑制猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 诱导的 NF- κ B 激活，从而发挥抗病毒和抗炎作用。在小鼠中，Wang 等^[90]发现葛根素可以阻断新形成的 H1N1 病毒颗粒从感染细胞中释放出来，并且以 100-200 mg/kg/d 在小鼠中表现出有效的抗病毒活性，提供 50% 和 70% 的抗 H1N1 死亡保护，降低病毒滴度，并有效缓解肺部炎症。

3.2.7 绿原酸

绿原酸 (Chlorogenic acid) 是从金银花中提取出来的一种酚类化合物，可用于治疗由流感病毒、副流感病毒和呼吸道合胞病毒等引起的病毒性上呼吸道感染^[91]。Ding 等^[92]研究发现，绿原酸在体外和体内对 H1N1 和 H3N2 具有较强的抑制作用，分别为 60% 和 50%，并能够有效降低病毒滴度和减轻肺部炎症。Abaidullah 等^[93]研究发现，高浓度绿原酸是一种强效抗传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 化合物，可通过 MDA5、TLR7 和 NF- κ B 信号通路有效调节先天免疫，并有可能诱导 IBV 感染鸡的细

胞介导和体液免疫应答。Li 等^[94]使用黄芩素和绿原酸预处理鸡胚，可显著抑制 NF- κ B 活化，并抑制随后在传染性法氏囊病病毒（infectious bursal disease virus, IBDV）感染背景下促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生，结果表明黄芩素和绿原酸具有抗 IBDV 的特性。

3.2.8 丹参酮 IIA

丹参酮 IIA（Tanshinone IIA）是丹参中的重要特征成分和活性成分，药理作用广泛。Elebeedy 等^[95]从 6 种天然化合物中筛选出丹参酮 IIA 具有较强的抗 SARS-CoV-2 活性，IC₅₀ 等于 4.08 ng/ μ L。Du 等^[96]研究发现黄芪苷和丹参酮 IIA 联用通过下调 miR-223 并抑制 JAK2 和 STAT1 的表达来保护椎间盘髓核（nucleus pulposus, NP）细胞，减少炎症反应并抑制细胞损伤。Guo 等^[97]通过对 BALB/c 小鼠腹腔注射柯萨奇病毒 B3（Coxsackie virus B3, CVB3）建立病毒性心肌炎（viral myocarditis, VMC）动物模型，使用丹参酮 IIA 进行治疗，发现其可通过抑制炎症和调节 Th1/Th2 平衡，有效保护小鼠心肌免受 CVB3 诱导的心肌炎，从而抑制 CVB3 感染。

3.2.9 二氢丹参酮 I

二氢丹参酮 I（Dihydrotanshinone I）是从丹参中提取的脂溶性成分之一，其具有抗炎^[98,99]、心血管保护^[100]和抗肿瘤^[101]等作用。在抗病毒方面，Chew Theng Lim 等^[102]研究表明，二氢丹参酮 I 可以抑制 SARS-CoV-2 中的木瓜蛋白酶样蛋白酶（papain-like protease, PLpro）的合成并抑制病毒的复制。

4 网络药理学和分子对接

4.1 概述

网络药理学是一门综合性学科，它包含了系统生物学理论^[103]、药理学、信息网络和计算机科学，使用计算机模拟和各种数据库来筛选药物分子靶标和疾病相关靶标。它使用高通量、网络可视化和网络分析来揭示药物、靶点和疾病之间复杂的网络联系，分析和预测药物的作用机制。随着医学和生命科学中大量数据的产生，系统生物学、生物信息学和计算生物学等跨学科的出现，推动了网络药理学的发展^[104]。Han 等^[105]利用网络药理学分析，阐述了三七治疗心肌纤维化（myocardial fibrosis, MF）的机制；Zhou 等^[106]利用网络药理学分析，揭示了摩罗丹治疗慢性萎缩性胃炎（chronic atrophic gastritis, CAG）的机制。

分子对接是一种建立在计算机结构基础上的广泛应用于药物发现的方法。对接使得能够鉴定治疗感兴趣的新化合物，在分子水平上预测配体-靶标相互作用，或描绘结构-

活性关系 (SAR), 而不需要事先知道其他靶调节剂的化学结构^[107]。尽管它最初是为了帮助理解大小分子之间的分子识别机制而开发的, 但是在过去的几年中, 对接在药物发现中的用途和应用已经发生了很大的变化。Dong 等^[108]利用网络药理学从淫羊藿中筛选出 19 种与治疗抑郁症相关的活性化合物, 并筛选出 537 个与抑郁症相关的靶点。之后利用分子对接分析表明, 木犀草素、槲皮素和山奈酚等最重要的活性成分与关键靶标结合良好。

4.2 网络药理学和分子对接在中药领域的应用

近年来, 网络药理学和分子对接在中药有效成分的筛选和机制研究中成为了研究热点。Xia 等^[109]在莲花清瘟胶囊治疗 COVID-19 的研究中, 利用网络药理学筛选出莲花清瘟发挥抗病毒作用的关键作用靶点 AKT1, 并将该靶点和莲花清瘟胶囊中的有效成分进行分子对接, 最终筛选出 β -胡萝卜素、山奈酚、木犀草素、柚皮素、槲皮素和汉黄芩素为 AKT1 的最佳结合化合物, 预测了莲花清瘟胶囊抗病毒的可能机制。Li 等^[110]通过网络药理学对黄连解毒汤的有效成分及其作用靶点和脓毒症的致病靶点进行筛选, 构建了一个节点数为 237 个, 边数为 792 条的蛋白-蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络, 筛选出有效化合物为槲皮素、山奈酚和汉黄芩素, 潜在作用靶点为 JUN、TNF 和 RELA。之后利用分子对接证明, 上述化合物分别与潜在作用靶点的具有较高的亲和力, 并利用 GO 和 KEGG 富集分析探讨了其作用机制。在对大秦苳汤治疗脑小血管病 (Cerebral small vessel disease, CSVD) 的作用机制研究中, Wang 等^[111]通过网络药理学和分子对接分析得出, 大秦苳汤治疗 CSVD 的靶向通路网络中涉及 16 个靶点和 30 条通路, 其中包括 CASP 3 和 P53 在内的关键靶点以及黄芩素、槲皮素和汉黄芩素有效化合物。经分子对接和试验验证得出, 这些有效成分可以通过靶向 CASP 3 和 P53 等靶点调节多种信号通路, 并通过减少对脑神经细胞的损伤来治疗 CSVD。

5 蛋白质组学技术

5.1 概述

蛋白质组学是将凝胶和色谱分离技术与随后的基于质谱法 (MS) 的分析和生物信息学方法相结合, 研究单个蛋白质和复杂蛋白质样品的分析平台^[112]。生物样本中蛋白质鉴定的关键技术是 MS。MS 是一种测量带电粒子的质荷比的技术, 它不能对蛋白质进行量化。不同的肽和蛋白质表现出广泛的物理化学性质, 即大小、电荷和疏水性。因此, 它们的质谱响应不能用于一个样品中不同分子物种之间的定量比较。为了准确定量, 需要在分子上标记同位素, 当分子仅在同位素组成上存在差异且具有相同的物理和化学

性质时，可对实验之间（包括无标记的定量方法）或在单个实验中比较每个单独的分子^[113,114]。根据是否进行同位素标记，可将定量蛋白质组学分为非标记定量蛋白质组学和标记定量蛋白质组学。

5.1.1 标记定量蛋白质组学

基于同位素标签的方法，可以在质谱仪中反映其所在肽内的自然丰度^[115]，质谱仪能够识别标记和未标记形式的肽之间的质量差，通过比较它们各自的信号强度来实现定量。并且可以避免无标记方法的缺失值问题^[116]。目前常用的标记试剂有 iTRAQ (Isobaric Tag for Relative Absolute Quantitation) 和 TMT (Tandem Mass Tags) 两个，可与氨基（包括氨基酸 N 端及赖氨酸侧链氨基）反应实现连接，通过高精度质谱分析，同时实现多个样本蛋白组的定性和定量^[112]。

5.1.2 非标记定量蛋白质组学

4D 非标记定量 (4D Label free quantification, 4D LFQ) 蛋白质组是目前技术成熟的非标记定量蛋白质组学，该技术是在原有蛋白质组学的三个维度分离基础上（即保留时间 retention time、质荷比 m/z 和离子强度 intensity），增加了新一维度即离子淌度 (ion mobility) 的分离。根据肽段离子在漂移管中与缓冲气体碰撞时的碰撞截面不同，将离子可按大小形状进行分离，从而降低样本复杂度，进一步提高检测灵敏度、扫描速度，最终带来组学分析样本用量减少、鉴定深度提升、检测时长缩短等性能的升级。4D-LFQ 蛋白质组学技术已经成为重要的质谱定量方法^[117,118]。

5.2 定量蛋白质组学在中药领域的应用

近年来，利用定量蛋白质组学技术分析差异表达蛋白成为了研究的热点。在大黄治疗脑出血的机制研究中，Liu 等^[119]通过定量蛋白质组学共筛选出 1356 个差异表达蛋白，对其进行 GO 注释后发现大黄主要调节一些参与药物反应和神经系统发育的神经元投射蛋白的表达。KEGG 通路分析表明大黄可能通过调控氧化应激、钙结合蛋白调节、血管形成和能量代谢通路起到治疗作用。Tao 等^[120]在对疏风解毒胶囊抗 H1N1 感染的机制研究中，首先筛选出了疏风解毒胶囊中的有效化合物，之后利用定量蛋白质组学对有效化合物抗 H1N1 感染的机制进行研究，结果表明，三种有效化合物（连翘苷 E、马鞭草灵和大黄素）可通过调节促炎细胞因子、I 型干扰素 (IFN) 中 IFN 刺激的基因信号、TBK/IRF3 和 MAPK/NF- κ B 信号通路的水平起到抑制感染的作用。由此可见，定量蛋白质组学技术为中医中药的研究提供了新的方法。

第二章 抗猫传染性腹膜炎（FIPV）天然化合物的体外筛选

前 言

猫传染性腹膜炎（Feline infectious peritonitis, FIP）作为猫的重要传染病之一，会引起猫的体温升高、食欲减退、体重减轻、呼吸困难和腹泻等症状，是一种全身性、致死性传染病^[7]。该病由猫传染性腹膜炎病毒（Feline infectious peritonitis virus, FIPV）感染引起，可分为干型和湿型两种类别^[2]，多见于 6-24 个月以内的幼猫和 11 岁以上的老年猫，并可引起明显的腹膜炎症状^[3]，对宠物业造成严重的危害，但目前暂无有效的疫苗进行预防^[121]，药物治疗以对症治疗和核苷类似物 GS-441524 治疗为主^[29]，但治疗效果不佳，所以开发高效的抗 FIPV 新药是必要之举。

研究表明，中药在病毒性疾病的防治和增强免疫功能等方面具有显著作用^[122]。越来越多研究人员开始从中药中筛选抗病毒药物。例如，AI 等^[123]基于分子对接从中药系统药理学数据库中筛选出 56 个可以同时抑制两个流感作用靶点的药物；Hakobyan 等^[47]建立非洲猪瘟病毒（African swine fever virus, ASFV）感染 Vero 细胞模型，从五种黄酮类化合物中筛选出芹菜素具有抗 ASFV 活性，ASFV 感染 Vero 细胞 1 h 时使用芹菜素处理，可使 ASFV 的产率降低 99.99% 以上。Sirin 等^[124]通过虚拟筛选技术，发现三种化合物 NSC345647、NSC87511 和 NSC343256 可通过特异性靶向 FIPV 的 3CL^{pro} 并抑制其复制。

本试验选择了 9 种具有明确化学结构及中药来源的天然化合物，在 CRFK 细胞模型上进行抗 FIPV 的筛选，并通过药物的作用方式以及对 FIPV 诱导的细胞凋亡的影响，来初步解释药物的抗病毒机制。为后续新药的研发以及作用机制的深入探索奠定基础。

试验部分

1 试验材料

1.1 细胞与毒株

猫肾细胞 (CRFK) 和猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV-BJ-01) 均由中国兽医药品监察所保存。

1.2 药物

黄芩苷标准品、苦参碱标准品、盐酸川芎嗪标准品、咖啡酸标准品、甘草酸标准品、葛根素标准品、绿原酸标准品、丹参酮 IIA 标准品和二氢丹参酮 I 标准品购自上海源叶生物科技有限公司, 所有标准品纯度均高于 98%; GS-441524 购自 MCE, 纯度为 99.77%。

1.3 主要试剂

台盼蓝、DMEM、胰蛋白酶和双抗购自赛默飞世尔科技; 胎牛血清购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PBS 磷酸盐缓冲液干粉和 DMSO 购自北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司; CCK-8 试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 MCE。

1.4 主要仪器

DW-86L728ST 型-80℃冰箱 (海尔, 中国); 3-18K 型高速冷冻离心机 (Eppendorf, 美国); DMi8 型倒置荧光显微镜 (Leica, 德国); DNP-9022 型恒温培养箱 (精宏, 上海); TC20 全自动细胞计数仪 (Bio-Rad, 美国); Milli-Q 型超纯水仪 (Millipore, 美国); SYNERGY HTX 酶标仪 (BioTek, 美国)。

1.5 试剂配制

(1) PBS 缓冲液: 将 1 袋 PBS 磷酸盐缓冲液干粉倒入瓶中, 用尖嘴瓶冲洗袋内剩余干粉到瓶中, 加入 1.9 L 超纯水, 磁力搅拌器搅拌, 混匀溶解后用容量瓶定容至 2 L, 进行 121℃ 高压灭菌 15 min;

(2) 完全培养基: 含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 混合后涡旋震荡, 使用前 37℃ 温浴;

(3) 维持培养基: 含 2% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 混合后涡旋震荡, 使用前 37℃ 温浴;

(4) 细胞冻存液：含有 92% 的完全培养基和 8% 的 DMSO，现用现配。

2 试验设计与方法

2.1 CRFK 细胞

2.1.1 CRFK 细胞传代培养

(1) 将装有 CRFK 细胞的细胞培养瓶放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养，待细胞密度达到 80% 以上时，进行传代；

(2) 弃去原培养液，使用 PBS 吹洗 2 次，弃去；

(3) 按培养瓶底面积加入胰酶 (25 cm² 培养瓶加入 1 mL, 75 cm² 培养瓶加入 2 mL, 175 cm² 培养瓶加入 3 mL)，缓慢晃动，使胰酶浸润细胞，37℃ 消化 1 min；

(4) 显微镜观察发现细胞变圆后加入 2 倍胰酶体积的完全培养基终止消化，并用移液器缓慢吹打，将细胞吹散；

(5) 收集细胞悬液，1000 rpm 离心 1 min，弃去液体，用新鲜的完全培养基重悬细胞，根据实验安排按照 1:3-1:6 进行传代；

(6) 按培养瓶底面积加入完全培养基 (25 cm² 培养瓶加入 10 mL, 75 cm² 培养瓶加入 20 mL, 175 cm² 培养瓶加入 30 mL) 后，将细胞悬液按传代比例加入，绕“8”混匀，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。

2.1.2 CRFK 细胞冻存

(1) 待细胞密度达到 90% 以上时，弃去原培养液，按照 2.1.1 的方法进行细胞消化；

(2) 离心前进行细胞计数：将 3 μL 台盼蓝和 27 μL 细胞悬液混合，取 10 μL 滴入细胞计数板中；

(3) 1000 rpm 离心 1 min，弃去液体，加入适量的细胞冻存液，使得细胞终浓度为 3×10⁶ cells/mL，缓慢重悬细胞；

(4) 按照 1 mL/支将细胞悬液加入 2 mL 细胞冻存管中，放入梯度降温盒中，在 -80℃ 中过夜，次日转入液氮保存。

2.1.3 CRFK 细胞复苏

(1) 提前打开水浴锅 37℃ 预热；

(2) 从液氮中取出细胞后室温放置 1 min，使液氮挥发；

(3) 放入水浴锅中快速解冻，当管中还有小冰晶时停止解冻；

(4) 将细胞悬液全部加入含有新鲜的完全培养基的细胞培养瓶中，缓慢绕“8”混匀，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。

2.2 FIPV 毒株

2.2.1 FIPV 毒株扩增

(1) 使用 25 cm² 细胞培养瓶，待 CRFK 细胞长至密度 80%以上时，取两瓶细胞，一瓶用于病毒的扩增，一瓶用于阴性对照；

(2) 弃去原培养液，用 PBS 洗 2 次，弃去；

(3) 加入 1 mL FIPV 病毒液，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 2 h，弃去病毒液；

(4) 用 PBS 吹洗 2 次，弃去，加入 10 mL 维持培养基，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中继续培养，待 80%以上细胞出现病变时收集。

2.2.2 FIPV 毒株收获

(1) 将扩增病毒的细胞培养瓶放入 -80℃ 中，反复冻融三次；

(2) 第三次解冻后用移液器将细胞吹散，收集悬液；

(3) 将悬液 3000 rpm 离心 10 min；

(4) 收集上清液，经 0.22 μm 针式滤膜过滤后按 100 μL/管分装到 EP 管中，标记时间；

(5) 放入 -80℃ 保存。

2.2.3 FIPV 毒株毒力测定

(1) 将 CRFK 细胞按照 2.1.1 中方法进行消化，离心后用完全培养基重悬细胞，对细胞进行计数；

(2) 按照 1×10⁵ cells/孔将细胞加入 96 孔板；

(3) 放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养，待细胞密度达 90%以上时，弃去培养液，用 PBS 洗 2 次，弃去；

(4) 按照 100 μL/孔接种稀释度分别为 10⁻¹-10⁻⁹ 的病毒液（维持培养基稀释），每个稀释度设置 6 个重复，并设置病毒对照孔（原毒液）和细胞对照孔（只加维持培养基）；

(5) 放入培养箱中继续培养 72 h，每天观察细胞病变效应（Cytopathic effect, CPE）；

(6) 病毒的半数感染量（tissue culture infective dose, TCID₅₀）即为病毒的毒力，由公式 Reed-Muench 计算得到：

$$\lg \text{TCID}_{50} = \frac{>50\% \text{ 病变率的百分数} - 50\%}{>50\% \text{ 病变率的百分数} - <50\% \text{ 病变率的百分数}} \times \text{稀释度对数之间的差} \\ + >50\% \text{ 病变率的稀释度的对数}$$

(7) 本试验中所接种病毒液的终浓度均为 100TCID₅₀。

2.3 药物

2.3.1 药物溶解

- (1) 黄芩苷(Baicalin): 使用维持培养基溶解, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 2.0 mg/mL;
- (2) 苦参碱(Matrine): 使用维持培养基溶解, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 2.0 mg/mL;
- (3) 盐酸川芎嗪 (Ligustrazine hydrochloride): 使用维持培养基溶解, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 2.0 mg/mL;
- (4) 咖啡酸 (Caffeic acid): 使用维持培养基溶解, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 2.0 mg/mL;
- (5) 甘草酸 (Glycyrrhizic acid): 使用 1% DMSO 助溶, 溶解后用维持培养基稀释, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 2.0 mg/mL;
- (6) 葛根素 (Puerarin): 使用 1% DMSO 助溶, 溶解后用维持培养基稀释, 超声、涡旋震荡助溶, 终浓度为 1.0 mg/mL;
- (7) 绿原酸 (Chlorogenic acid): 使用维持培养基溶解, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 4.0 mg/mL;
- (8) 丹参酮 IIA (Tanshinone IIA): 使用维持培养基溶解, 37℃ 水浴加热、涡旋震荡助溶, 终浓度为 4.0 mg/mL;
- (9) 二氢丹参酮 I (Dihydrotanshinone I): 使用 1% DMSO 助溶, 溶解后用维持培养基稀释, 超声、涡旋震荡助溶, 终浓度为 4.0 mg/mL;
- (10) GS-441524: 使用 1% DMSO 助溶, 溶解后用维持培养基稀释, 涡旋震荡助溶, 终浓度为 1.2 mg/mL。

2.3.2 药物的细胞毒性试验

- (1) 将 CRFK 细胞按照 2.1.1 中方法进行消化, 离心后用完全培养基重悬细胞, 对细胞进行计数;
- (2) 按照 1×10^4 cells/孔将细胞加入 96 孔板;
- (3) 放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养, 待细胞密度达 90% 以上时, 弃去培养液, 用 PBS 洗 2 次, 弃去;
- (4) 将 2.3.1 中的药物用维持培养基连续 2 倍倍比稀释 10 个梯度, 加入细胞板中, 100 μL/孔, 每个浓度设 3 个重复; 同时设置空白组, 只加 100 μL PBS; 细胞对照组, 只加 100 μL 的维持培养基。放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 72 h;
- (5) 弃去培养液, 用 PBS 洗 2 次,
- (6) 利用 CCK-8 法测定各孔 OD 值: 每孔加入 100 μL 新的维持培养基和 10 μL

CCK 8 溶液，轻晃混匀，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 2 h，之后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度；

(7) 计算药物致细胞的病变率 (cytopathic ratio, CR)；

$$CR = \frac{\text{细胞对照组 OD 值} - \text{试验组 OD 值}}{\text{细胞对照组 OD 值}} \times 100\%$$

(8) 用 GraphPad Prism 10 计算药物可使 50% 细胞发生病变的半数安全浓度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀) 和药物可使 90% 以上的细胞存活的最大安全浓度 (maximum no-cytotoxic concentration, MNTC)。

2.4 药物对 FIPV 感染细胞的抑制作用

(1) 按照 2.3.2 中 (1-3) 方法进行细胞铺板操作；

(2) 分为四组：空白组，只加 100 μL PBS；细胞对照组，只加 100 μL 的维持培养基；病毒对照组，只加 100 μL 的病毒液；试验组，同时加入 50 μL 的药物和 50 μL 的病毒液。每组设 3 个重复，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养；

(3) 待病毒对照组 CPE 达到 80% 以上时，将培养板中液体弃去，PBS 洗 2 次；

(4) 利用 CCK-8 法测定各孔 OD 值：每孔加入 100 μL 新的维持培养基和 10 μL CCK 8 溶液，轻晃混匀，放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 2 h，之后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度；

(5) 通过公式计算药物对病毒的抑制率 (inhibition ratio, IR)：

$$IR = \frac{\text{试验组 OD 值} - \text{病毒对照组 OD 值}}{\text{细胞对照组 OD 值} - \text{病毒对照组 OD 值}} \times 100\%$$

(6) 筛选出 IR > 50% 的药物进行后续试验；

(7) 将药物稀释成 8 个浓度梯度，重复上述试验过程，通过 GraphPad Prism 10 计算能够有效抑制 50% 细胞感染 FIPV 的药物浓度 (50% effective concentration, EC₅₀)；

(8) 计算选择指数 (selection index, SI) = CC₅₀ / EC₅₀。从最大抑制率 (maximum inhibition ratio, MIR) > 50% 和 SI > 3 的筛选范围内选择抑制率最高的药物做后续研究。

2.5 药物对 FIPV 复制的影响

(1) 按照 2.3.2 中 (1-3) 方法进行细胞铺板操作；

(2) 先将 100TCID₅₀ 病毒液加入至 96 孔板中，每孔 100 μL，分别在含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中吸附 1、2、4、6、8、10、12 和 14 h，弃去病毒液，用 PBS 洗 2 次，弃去；

(3) 再加入药物 (最大安全浓度) 进行孵育，每孔 100 μL，每个时间设 3 个重复，同时设置空白组，只加 100 μL PBS；细胞对照组，只加 100 μL 的维持培养基；病毒对

照组，只加 100 μ L 的病毒液。放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养；

(4) 待病毒对照组 CPE 达到 80% 以上时，将培养板中液体弃去，PBS 洗 2 次；

(5) 利用 CCK-8 法测定各孔 OD 值，计算药物对病毒的抑制率，方法同 2.4。

2.6 药物对 FIPV 吸附的影响

(1) 按照 2.3.2 中 (1-3) 方法进行细胞铺板操作；

(2) 先将药物（最大安全浓度）加入至 96 孔板中，每孔 100 μ L，分别在含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 0.25、0.2、1、2、4 和 6 h，然后放入 4℃ 预冷 1 h，弃去液体，用 PBS 洗 2 次，弃去；

(3) 再加入 100TCID₅₀ 病毒液，每孔 100 μ L，每个时间设 3 个重复，同时设置空白组，只加 100 μ L PBS；细胞对照组，只加 100 μ L 的维持培养基；病毒对照组，只加 100 μ L 的病毒液。4℃ 培养 2.5 h 后放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养；

(4) 待病毒对照组 CPE 达到 80% 以上时，将培养板中液体弃去，PBS 洗 2 次；

(5) 利用 CCK-8 法测定各孔 OD 值，计算药物对病毒的抑制率，方法同 2.4。

2.7 药物对 FIPV 的直接灭活作用

(1) 按照 2.3.2 中 (1-3) 方法进行细胞铺板操作；

(2) 先将药物（最大安全浓度）和病毒液（100TCID₅₀）各 50 μ L 混合放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中孵育 30、60、90、120 和 150 min；

(3) 将不同时间点的混合液加入 96 孔板中，每孔 100 μ L，每个孵育时间设 3 个重复，同时设置空白组，只加 100 μ L PBS；细胞对照组，只加 100 μ L 的维持培养基；病毒对照组，只加 100 μ L 的病毒液。放入含有 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养；

(4) 待病毒对照组 CPE 达到 80% 以上时，将培养板中液体弃去，PBS 洗 2 次；

(5) 利用 CCK-8 法测定各孔 OD 值，计算药物对病毒的抑制率，方法同 2.4。

2.8 药物对 FIPV 诱发的细胞凋亡的影响

(1) 按照 2.4 中 (1-3) 方法进行药物抑制病毒感染的细胞模型制备；

(2) 感染 24 h 后收集细胞培养液上清，用 PBS 洗 2 次，弃去，按照 20 μ L/孔加入胰酶进行消化，放入 37℃ 孵育 1 min；

(3) 显微镜观察发现细胞变圆后加入收集的细胞培养液上清终止消化，并用移液器缓慢吹打，将细胞吹散，收集细胞悬液，1000 g 离心 5 min，弃去上清；

(4) 加入 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞沉淀，进行细胞计数，吸取 4 $\times$ 10⁵ 个细胞到新的 EP 管中，1000 g 离心 5 min，弃去上清；

（5）使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒进行凋亡检测：加入 195 μL Binding Buffer，轻轻重悬细胞；加入 5 μL Annexin V-FITC，轻轻混匀；加入 10 μL PI Stain，轻轻混匀；

（6）室温下避光孵育 15 min；

（7）荧光显微镜检测：1000 g 离心 5 min，弃去上清，加入 80 μL Binding Buffer 重悬细胞沉淀，涂片后使用荧光显微镜观察，并用 ImageJ 对平均荧光强度进行分析。

2.9 数据处理与统计分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 10（GraphPad Software, Inc.California, USA）软件进行分析，结果均以“mean ± SEM”表示，利用单因素方差分析（One-way ANOVA）比较各组之间的差异性，不同小写字母和“*”表示差异显著（*P* < 0.05）。

3 结果

3.1 FIPV 毒力测定结果

病毒毒力的测定结果如表 2-1 所示。按照公式计算可得，FIPV 在 CRFK 细胞上的 TCID₅₀=10^{-5.34}。

表 2-1 FIPV TCID50 测定结果

Table 2-1 The results of FIPV TCID₅₀

病毒稀释度	阳性孔数	阴性孔数	积累孔数		病变率（%）
			阳性	阴性	
10 ⁻¹	6	0	29	0	100
10 ⁻²	6	0	23	0	100
10 ⁻³	6	0	17	0	100
10 ⁻⁴	6	0	11	0	100
10 ⁻⁵	4	2	5	2	66.67
10 ⁻⁶	1	5	1	7	16.67
10 ⁻⁷	0	6	0	13	0
10 ⁻⁸	0	6	0	13	0
10 ⁻⁹	0	6	0	13	0

3.2 药物的细胞毒性试验结果

根据各药物对细胞产生 CPE 的情况和 CCK-8 法测量所得的数据，并利用 CR 计算

公式，确定各药物对 CRFK 细胞的 MNTC 和 CC₅₀，结果见表 2-2 所示。从 CPE 情况和 CCK-8 法测得的数据结果来看，九种待测药物和阳性药物均出现了剂量依赖关系，随着药物浓度的增加，细胞的 CPE 程度也增加：细胞开始变圆、聚团和脱落等。

表 2-2 细胞毒性试验结果

Table 2-2 Cytotoxicity test results

序号	化合物	MNTC (μg/mL)	CC ₅₀ (μg/mL)
1	黄芩苷	31.36	114.5
2	苦参碱	699.8	1110
3	盐酸川芎嗪	969.6	2709
4	咖啡酸	53.43	58.78
5	甘草酸	1412	3324
6	葛根素	83.77	208.8
7	绿原酸	1605	2170
8	丹参酮 IIA	290.9	806.6
9	二氢丹参酮 I	246.4	426.4
10	GS-441524	36.20	70.31

3.3 药物抑制 FIPV 感染的试验结果

将待测药物和病毒液共同加入细胞板中进行培养，结果如图 2-1A 所示，阳性药物 GS-441524 对 FIPV 的抑制率显著高于其他待测药物 ($P<0.05$)。在 9 个待测化合物中，二氢丹参酮 I、丹参酮 IIA、葛根素、苦参碱和盐酸川芎嗪对 FIPV 感染的抑制作用小于 20%，绿原酸、甘草酸、咖啡酸的抑制率在 20% ~ 50% 范围内，仅黄芩苷对 FIPV 的抑制率为 79.5% ($>50\%$)，且其抑制率显著高于其他待测试化合物 ($P<0.05$)。之后，将黄芩苷梯度稀释，进行抑制 FIPV 感染的试验，通过 GraphPad Prism 10 计算 EC₅₀，结果如图 2-1B 所示，黄芩苷的 EC₅₀ 为 20.8 μg/mL。按照公式计算 SI，黄芩苷的 SI 为 5.5 >3 ，符合筛选条件。通过对黄芩苷抗 FIPV 感染的细胞进行观察，与对照组相比，病毒对照组出现了明显的细胞病变（脱落、变圆、细胞碎片增多），而黄芩苷处理后的细胞出现少量的病变，基本与对照组一致（图 2-1C-E，红色箭头所指为病变）。故使用黄芩苷进行后续试验。

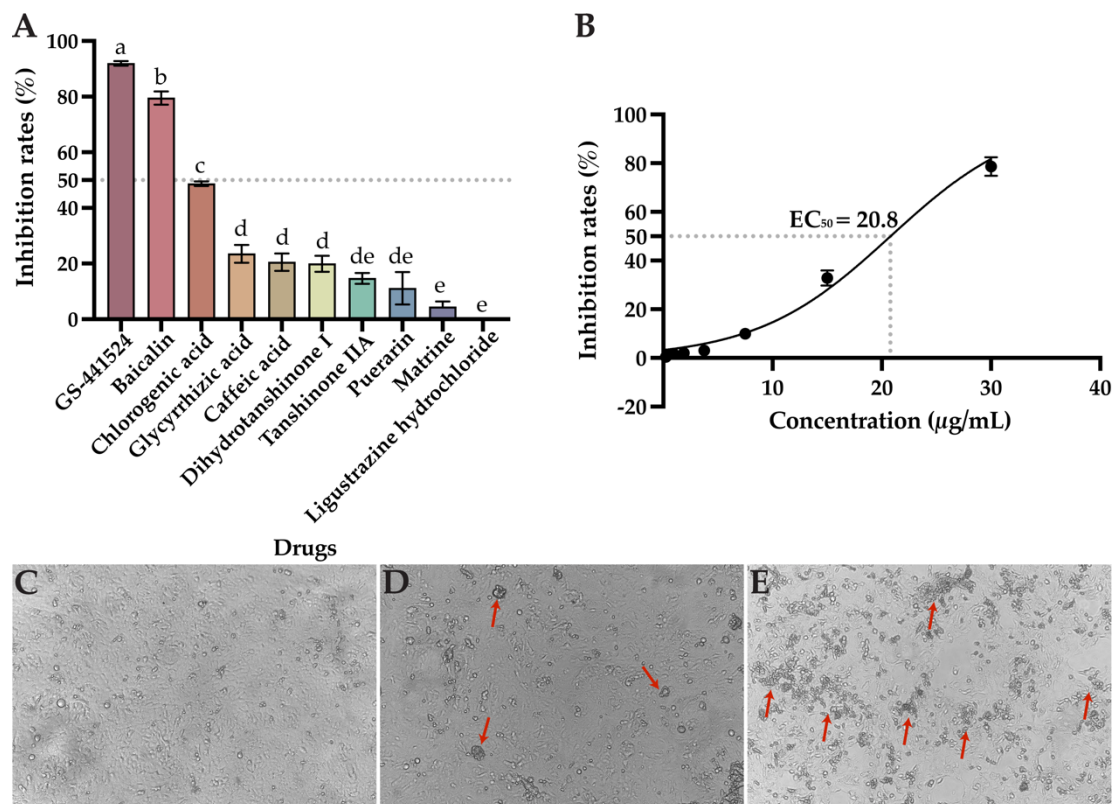


图 2-1 药物抑制 FIPV 感染结果

A. 药物抑制率；B. 黄芩苷对 FIPV 的浓度-抑制曲线；C. 细胞对照组（100 $\times$ ）；D. 黄芩苷处理组（100 $\times$ ）；E. 病毒对照组（100 $\times$ ）。

Fig. 2-1 Drugs inhibit FIPV infection results

A. Drug inhibition rate; B. The concentration-inhibition curve of baicalin on FIPV; C. Cell control group (100 $\times$); D. Baicalin treatment group (100 $\times$); E. Virus control group (100 $\times$).

注：数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示， $n = 3$ 。不同小写字母（a-e）表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 3$. Different lowercase letters (a-e) indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.4 药物影响 FIPV 复制的结果

黄芩苷对病毒复制阻断作用的测定结果如图 2-2 所示，随着 FIPV 感染时间的增加，黄芩苷对 FIPV 的抑制率逐渐降低，黄芩苷对细胞在 8 h 内的 FIPV 感染具有 50% 以上的抑制率，在感染 10 h 后抑制率显著降低（ $P < 0.05$ ）。这一结果表明，黄芩苷在病毒感染的 8 h 内有 50% 以上的抑制作用。

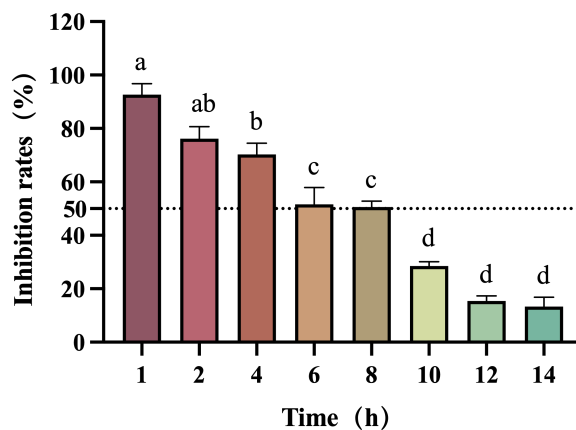


图 2-2 黄芩苷对 FIPV 复制的影响

Fig. 2-2 Effect of Baicalin on FIPV replication

注：数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示， $n = 3$ 。不同小写字母（a-d）表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 3$. Different lowercase letters (a-d) indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.5 药物影响 FIPV 吸附的结果

黄芩苷对 FIPV 吸附的影响结果见图 2-3。由图可知，黄芩苷对 FIPV 感染的抑制率随着与细胞共培养的时间增加而升高，但都没有超过 50%。由此可得，黄芩苷阻止 FIPV 对 CRFK 细胞的吸附效果不佳。

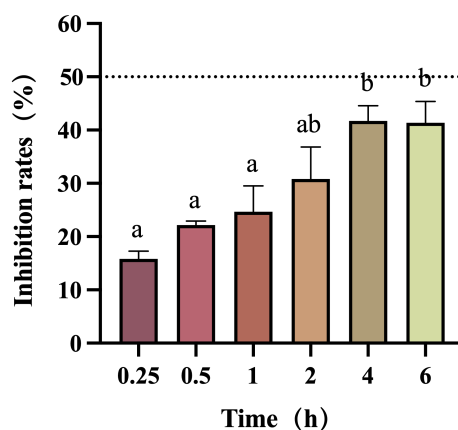


图 2-3 黄芩苷对 FIPV 吸附的影响

Fig. 2-3 Effect of Baicalin on FIPV adsorption

注：数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示， $n = 3$ 。不同小写字母（a-b）表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 3$. Different lowercase letters (a-b) indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.6 药物对 FIPV 直接灭活作用的结果

药物对 FIPV 直接灭活作用结果见图 2-4。由图可知，将黄芩苷与 FIPV 共培养后，黄芩苷对 FIPV 的抑制率会随着共培养的时间增加而升高，且抑制率都高于 50%。在共培养 150 min 时，黄芩苷对 FIPV 感染的抑制率趋于 100%。结果表明，黄芩苷对 FIPV 有直接灭活作用，且呈现时间依赖性。

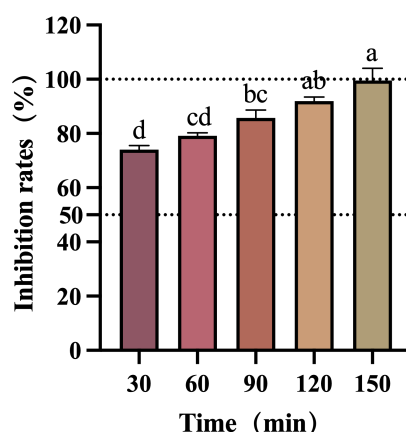


图 2-4 黄芩苷对 FIPV 的直接灭活作用

Fig. 2-4 Direct inactivation effect of Baicalin on FIPV

注：数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示， $n = 3$ 。不同小写字母（a-d）表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 3$. Different lowercase letters (a–d) indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.7 药物对细胞凋亡影响的结果

制备黄芩苷抗 FIPV 感染的 CRFK 细胞模型，感染 24 h 后使用 Annexin V-FITC 对细胞进行凋亡检测。结果由图 2-5 所示，与对照组相比，病毒对照组可检测到更多绿色荧光，而黄芩苷处理组所观测到的绿色荧光明显少于病毒对照组（图 2-5A）。使用 ImageJ 软件对细胞单位面积荧光强度进行计算，结果如图 2-5B 所示，黄芩苷处理组的细胞单位面积荧光强度显著低于细胞对照组（ $P < 0.05$ ），表明黄芩苷可抑制 FIPV 诱导的细胞凋亡。

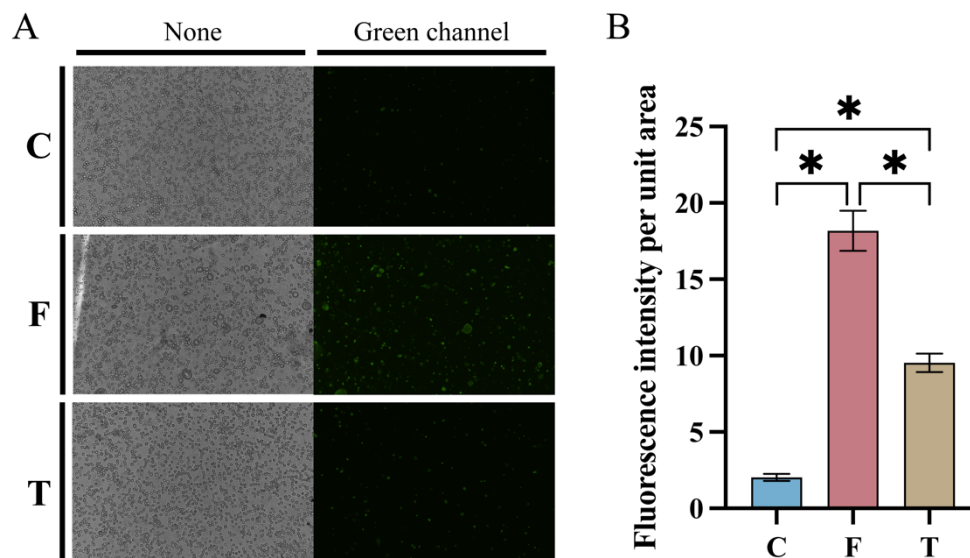


图 2-5 黄芩苷对 FIPV 诱导细胞凋亡的影响

A. 荧光显微镜观察结果 (100×); B. 荧光强度结果

Fig. 2-5 Effect of Baicalin on apoptosis induced by FIPV

A. Fluorescence microscope observation results (100 ×) ; B. Fluorescence intensity results.

注：C 表示细胞对照组，F 表示病毒对照组，T 表示黄芩苷处理组。数据以 mean ± SEM 表示，n = 3。“*” 表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note : C represents the cell control group, F represents the virus control group, and T represents the Baicalin treatment group. The data are represented as the mean ± SEM, n = 3. “*” indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

4 讨论

在筛选试验前，进行了 DMSO 对 CRFK 细胞的毒性预试验，DMSO 在 CRFK 细胞上的最大安全浓度为 0.83% (72 h 孵育时间)，以 DMSO 助溶的化合物按照最大安全浓度稀释后 DMSO 的含量均低于该浓度，故可排除 DMSO 对试验结果的干扰。本试验在研究药物对病毒感染的抑制作用中，使用病毒和药物同时加入细胞中共同孵育的方法，并在病毒对照组出现 80% CPE 时计算结果。该方法是参照 Li 等^[125]在检测天然化合物对 SARS 冠状病毒的抑制率时使用的方法，利用该方法，Li 等分别检测了石蒜、黄花蒿、石韦和乌药对病毒感染的抑制率。本试验中，利用该方法对 9 种天然化合物进行检测，最后测得黄芩苷的抑制率为 79.5%，其余药物的抑制率均低于 50%，按照 MIR > 50%和 SI > 3 的筛选标准^[126,127]，选择黄芩苷进行后续试验。

黄芩苷(Baicalin)是一种天然的化合物,研究表明,黄芩苷可通过 Caspase-3/GSDME 通路抑制甲型 H1N1 流感诱导的肺泡上皮细胞焦亡进而抑制流感病毒感染的作用^[128]。也可通过 PI3K/AKT/FoxO1 途径抑制 toll-like 受体 4 的表达,起到抑制神经炎症的作用^[129]。在抗病毒方面,黄芩苷可以通过降低神经氨酸酶活性抑制奥司他韦耐药甲型流感病毒^[130]。黄芩苷能抑制小鼠体内的流感病毒 H1N1/H3N2 的活性,其机制可能涉及神经氨酸酶活性的抑制^[131]。在肝病毒的抗微生物活性方面,黄芩苷和 ETV 联合使用在感染抗 NaHBV 的 HepG2 细胞中表现出显著疗效,通过抑制 HBV 复制所需的 HNF1 α 和 HNF4 α 的转录和表达来阻断 HBV-RNA 的转录,从而抑制 HBV RNA、病毒蛋白模板和 HBV-DNA 的合成^[132]。对于柯萨奇病毒,在 CVB3 构建的小鼠心肌炎模型中,黄芩苷可以通过抑制 AKT 和 P38 的活化来发挥抑制 CVB3 复制的生物学功能。黄芩苷可以显著抑制 CVB3 感染诱导的 HeLa 细胞中自噬体的形成并增加脂质含量。对于呼吸道合成病毒(RSV)感染的小鼠模型中,黄芩素可以减少由 RSV 感染引起的 T 淋巴细胞浸润和促炎因子基因表达,通过发挥抗炎和抗病毒作用抑制 RSV^[133]。研究表明,黄芩苷对冠状病毒也有良好的抑制作用,其可靶向抑制冠状病毒的刺突蛋白而影响病毒的复制^[134],也可以靶向宿主线粒体 OXPHOS 以抑制病毒的感染^[55]。

在研究黄芩苷对 FIPV 复制的影响中,参考了 Álvarez 等^[135]研究中的方法,其先使用病毒对细胞进行感染,之后弃去毒液加入药物进行孵育,并在病毒对照组出现 80% CPE 时计算结果。本试验中,利用该方法测得黄芩苷在 FIPV 感染的 8 h 内有较强的抑制效果,抑制率均高于 50%,但随着感染时间的增长,其抑制率均降至 50%以下,说明黄芩苷对 FIPV 感染的抑制作用可能是通过病毒感染初期,抑制病毒复制实现的。Chen 等^[136]在黄芩苷抑制鸭甲型肝炎病毒 1 型(Duck hepatitis A virus type 1, DHAV-1)感染的研究中,发现在 DHAV-1 感染细胞 2 h 后,黄芩苷对该病毒具有强抑制作用,该结果与本试验结果相似,但其作用机制尚不明确,还有待进一步研究。

在研究黄芩苷对 FIPV 吸附的影响中,采用先进行药物孵育,后病毒感染的方法,并在加入毒液后进行了短暂的 4℃低温孵育。Delputte 等^[137]研究证明,4℃低温孵育可以改变细胞膜的通透性,使病毒只可以进行吸附,而不可以进入细胞。Xiang 等^[138]利用该方法,发现 1246TGG 在对细胞孵育 12 h 后,其对单纯疱疹病毒 1 型(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)的吸附的抑制率上升至 50%以上,经 qPCR 验证得出病毒基因的拷贝随着药物对细胞孵育的时间增长而降低(与对照组相比)。由此证明,该方法可以检测药物对病毒吸附的影响。在本试验中,通过该方法测得不同药物孵育时间黄芩苷抗 FIPV 感染的抑制率均低于 50%,说明黄芩苷抑制 FIPV 吸附的效果不佳,黄芩苷对 FIPV 的抑制作用不完全是通过抑制病毒吸附实现的。

在研究黄芩苷对 FIPV 直接灭活作用的试验中,通过先将药物和病毒混合孵育,之后再接种至细胞中培养的方法,检测得出黄芩苷对 FIPV 的抑制率均在 50%以上,抑制作用呈现时间依赖性,且在药物和病毒共同孵育 150 min 后,抑制率趋于 100%,证明黄芩苷对 FIPV 具有直接灭活作用。孙娜^[139]利用该方法,测得甘草酸二钾、苦参碱和丹参酮 IIA 磺酸钠对猪繁殖与呼吸综合症病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的抑制率均高于 90%,但抑制作用没有呈现时间依赖性。Dong 等^[140]利用相同方法,测得天然化合物 BRP-2 和 BRP-4 对单纯疱疹病毒 2 型(Herpes simplex virus type 2, HSV-2)的抑制效果均不明显。造成此结果差异可能与病毒类型有关。

研究表明, FIPV 可诱导细胞凋亡^[41]。在黄芩苷影响 FIPV 诱导的细胞凋亡试验中发现,与对照组相比,其可显著抑制 FIPV 诱导的细胞凋亡。细胞凋亡是指在不受控制的细胞增殖、DNA 损伤或由于病毒感染等某些疾病的刺激下,机体通过基因调控,激活内源性核酸内切酶,维护内环境稳定而导致细胞程序性死亡的过程^[141]。细胞凋亡分为三个阶段,凋亡早期表现为细胞膜结构与通透性的改变,此时起始 Caspase 被激活;凋亡中期表现为效应 Caspase 的激活和胞内特定蛋白的切割;凋亡晚期表现为 DNA 的断裂、凋亡小体形成及被吞噬细胞吞噬^[142]。在该试验中,使用黄芩苷处理可使细胞凋亡明显减少,该结果与 Yu 等^[143]在黄芩苷抑制因缺氧引起的 H9c2 细胞凋亡的研究中获得的结果一致。Zhang 等^[144]研究表明,黄芩苷可通过激活 PI3K-AKT 逆转凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 和 NF- κ B 的表达,起到抑制细胞凋亡的作用。故推测黄芩苷可能调控 PI3K-AKT 通路抑制细胞凋亡,进而抑制 FIPV 的感染。本试验中通过 Annexin V-FITC/PI 法对细胞凋亡进行检测,观察到细胞早起凋亡,但未观察到细胞晚期凋亡,可能与感染时间较短有关,故后续感染时间还有待优化。

综上所述,黄芩苷具有抑制 FIPV 感染的作用,可在 FIPV 感染细胞 8 h 内影响病毒的复制,也可直接灭活病毒,并且对 FIPV 诱导的细胞凋亡具有显著抑制效果。该结果为后续抗 FIPV 新药的研发提供基础,但黄芩苷抗 FIPV 感染的机制尚不明确,还有待进一步研究。

5 小结

本试验通过对抗病毒天然化合物的体外筛选和对药物发挥抗病毒作用的机理进行研究，得出以下结论：

- (1) 黄芩苷具有抑制 FIPV 感染的作用，抑制率为 79.5%；
- (2) 在 FIPV 感染细胞 8 h 内，黄芩苷对 FIPV 感染具有良好的抑制效果；
- (3) 黄芩苷可通过直接灭活 FIPV 达到抗病毒效果；
- (4) 黄芩苷可抑制 FIPV 感染诱导的细胞凋亡。

第三章 基于网络药理学和分子对接预测黄芩苷抗 FIPV 的作用机制

前 言

网络药理学 (Network Pharmacology, NP) 是基于系统生物学理论, 通过对药物活性成分以及靶点的筛选、药物或疾病靶点数据库的建立和富集分析等过程^[145], 将现有的系统生物学数据抽象表达为疾病-基因/疾病相互作用^[146]、药物-靶标/药物相互作用^[147,148]、疾病-药物网络^[149]和生物通路或途径^[150]等生物网络, 进行药物作用机制分析和新药研发设计的学科^[151]。分子对接 (Molecular docking) 是一种利用计算机分析, 在分子水平预测药物分子与靶点相互作用的一种技术手段^[107], 其可与网络药理学方法结合用于新药的开发和靶点与机制的探讨等研究^[152]。例如通过网络药理学和分子对接技术, 研究人员成功筛选出苦参碱治疗新型冠状病毒肺炎和肝损伤的潜在靶点, 并利用 qPCR 证明了分析结果的准确性^[153]。

黄芩苷 (Baicalin) 是从黄芩 (*Scutellaria baicalensis*) 的根部提取的黄酮类化合物, 研究表明其具有抗炎^[49]、抗氧化^[154]、抗病毒^[52]和抗凋亡^[155]等作用。第二章的研究中已经证实, 黄芩苷可以抑制 FIPV 感染 CRFK 细胞, 但其作用机制尚不明确。本试验基于网络药理学和分子对接技术, 通过 PubChem 数据库和 GeneCards 数据库对黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点进行筛选; 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建靶点蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络, 并使用 Metascape 数据库对潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。利用 Cytoscape 软件进行九种拓扑分析, 获得关键作用靶点。之后利用 UCSF Chimera 软件进行分子对接分析, 筛选出最佳结合靶点, 并探讨黄芩苷抗 FIPV 感染的作用机制。

试验部分

1 试验材料

1.1 数据库

本试验所用数据库网址及数据更新日期见表 3-1。

表 3-1 数据库信息

Table 3-1 Database information

序号	数据库	网址	数据更新日期
1	PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	2023.05.11
2	PharmMapper	http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/	2023.10.26
3	GeneCards	https://www.genecards.org/	2023.10.11
4	Uniprot	https://www.uniprot.org/	2023.10
5	STRING	https://cn.string-db.org/	2023.07.26
6	Metascape	https://metascape.org/	2023.06.23

1.2 分析软件

本试验所用分析软件版本号及官方网址见表 3-2。

表 3-2 分析软件信息

Table 3-2 Analysis software information

序号	软件	官方网址	版本
1	Cytoscape	https://cytoscape.org	3.9.1
2	CytoNCA	https://apps.cytoscape.org/apps/cytonca	2.1.6
3	cytoHubba	https://apps.cytoscape.org/apps/cytohubba	0.1
4	Autodock Vina	https://vina.scripps.edu/	1.1.2
5	UCSF Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/	1.16

1.3 绘图平台

本试验所用在线绘图平台信息见表 3-3。

表 3-3 在线绘图平台信息

Table 3-3 Online drawing platform information

序号	软件	官方网址
1	微生信	https://cytoscape.org
2	HILOT 作图平台	https://hiplot.com.cn/

2 试验设计与方法

2.1 药物靶点的收集

(1) 登录 PubChem^[156]数据库, 输入关键词“Baicalin”进行检索, 对结果进行相关性排序, 选择最佳相关结构, 下载该药物的 3D 结构文件 (.sdf 格式文件);

(2) 登录 PharmMapper^[157-159]数据库, 点击“Submit Job”, 上传黄芩苷的 3D 结构文件, 并进行参数设置: 最大构象生成数(Maximum Generated Conformations)为“300”, 靶点选择设置(Select Targets Set)为“Human Protein Targets Only (v2010, 2241)”, 预计匹配靶点数(Number of Reserved Matched Targets)为“300”, 其余为默认设置, 经数据库分析后获得黄芩苷作用靶点。

2.2 疾病靶点的收集

登录 GeneCards^[160,161]数据库, 输入关键词“Feline Infectious Peritonitis”进行检索, 获得 FIPV 致病的作用靶点。

2.3 潜在作用靶点的筛选

(1) 分别将获得的黄芩苷作用靶点和 FIPV 致病作用靶点上传至 Uniprot^[162]数据库的 ID mapping 检索引擎中, 将靶点名称从“UniprotKB AC/ID”转换为“Gene Name”;

(2) 将统一命名后的黄芩苷作用靶点和 FIPV 致病作用靶点取交集, 即为黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点, 并利用 HILOT 做图平台绘制韦恩图。

2.4 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

(1) 登陆 STRING^[163]数据库, 在“Multiple proteins”中上传黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点, 选择物种为“Homo sapiens”, 设置最低要求交互评分(minimum required interaction score)为“0.400”, 其余默认设置, 获得 PPI 网络节点信息。

(2) 将节点信息导入 Cytoscape^[164]软件, 利用 CytoNCA^[165]插件对节点信息进行分析, 计算其 degree 值, 将节点按照 degree 值大小进行颜色填充, 绘制 PPI 网络图。

2.5 关键作用靶点的筛选

(1) 将 2.4 中获得的节点信息导入 Cytoscape 软件, 利用 cytoHubba^[166]插件中的 Betweenness、Closeness、Degree、EPC、MCC、MNC、Radiality、BottleNeck 和 Stress 9 种分析方法进行拓扑分析, 获得按照 9 种不同方法排名的潜在作用靶点顺序;

(2) 将每种分析方法排名前 5 的靶点汇总后导入 HIPLLOT 在线作图平台, 进行数据分析并绘制 Upset 图, 获得关键靶点。

2.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

(1) 登录 Metascape^[167]数据库, 上传黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点, 选择自定义分析, 物种为“Homo sapiens”, 设置分析参数“Min Overlap”为 3、“P Value Cutoff”为 0.01、“Min Enrichment”为 1.5, 之后分别勾选“GO Molecular Functions”、“GO Biological Processes”、“GO Cellular Components”和“KEGG Pathway”进行富集分析;

(2) 将以上四种富集分析结果按照 P 值从小到大排序, 之后分别将三种 GO 功能富集分析结果的前 10 个上传至微生物信作图平台绘制富集桑基气泡图, 将 KEGG 通路富集分析结果的前 20 个上传至微生物信作图平台绘制富集桑基气泡图。

2.7 分子对接验证

2.7.1 关键靶点蛋白结构获取

登录 Uniprot 数据库, 分别输入关键靶点蛋白名称进行检索, 点击“Structure”, 在结构检索目录中选择“METHOD”为“X-ray”进行筛选, 选择分辨率 (Resolution) 值最小的结构下载并保存。

2.7.2 分子结构优化

(1) 将蛋白结构导入 UCSF Chimera 软件, 在选择窗格中去除溶剂分子和金属离子等无关元素;

(2) 在工具栏中选择结构编辑器进行结构简化, 选择添加氢原子和电荷, 其余参数设置保持默认。

2.7.3 分子对接与分析

2.7.3.1 分子对接

将药物分子和结构优化后的靶点蛋白导入 UCSF Chimera 软件, 在工具栏中选择“Surface/Binding Analysis”中的“AutoDock Vina”, 进行以下参数设置:

(1) Receptor 选择靶点蛋白分子, Ligand 选择药物分子;

(2) 设置对接空间大小为蛋白分子大小;

(3) 勾选 “Ignore waters” 和 “Ignore chains of non-standard residues” 选项;

(4) 将绑定模式个数 (Number of binding modes) 设置为 10, 穷尽性搜索 (Exhaustiveness of search) 设置为 8, 最大能量差 (Maximum energy difference) 设置为 3 kcal/mol;

(5) 勾选本地 Autodock Vina 插件进行分子对接。

2.7.3.2 结果分析

在上述分子对接得到的结果中, 选择结合自由能最低的结合构象进行氢键分析, 选择工具栏中的 “Surface/Binding Analysis”, 点击 “FindHBond” 添加氢键, 并标注氢键长度。

3 结果

3.1 潜在作用靶点的筛选结果

通过 PharmMapper 数据库获得 285 个黄芩苷作用靶点, 通过 GeneCards 数据库获得 304 个 FIPV 致病作用靶点。将上述收集到的靶点通过 Uniprot 蛋白数据库进行统一命名后, 上传到 HIPILOT 做图平台进行韦恩图的绘制 (图 3-1), 交集获得 17 个相同靶点, 结果见表 3-4, 该 17 个靶点即为黄芩苷抗 FIPV 的潜在作用靶点。

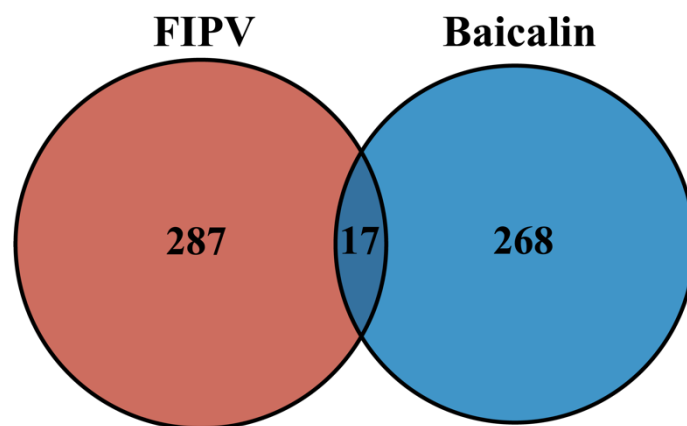


图 3-1 药物靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 3-1 Venn of Drug Target-Disease Target

表 3-4 黄芩苷抗 FIPV 的潜在作用靶点

Table 3-4 Potential targets of Baicalin against FIPV

S/N	Uniprot ID	Gene name	Protein name
1	P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
2	P08758	ANXA5	Annexin A5
3	P13501	CCL5	C-C motif chemokine 5
4	P23946	CMA1	Chymase
5	P35221	CTNNA1	Catenin alpha-1
6	P43235	CTSK	Cathepsin K
7	P27487	DPP4	Dipeptidyl peptidase 4
8	P00533	EGFR	Epidermal growth factor receptor
9	P03372	ESR1	Estrogen receptor
10	P60568	IL2	Interleukin-2
11	P02788	LTF	Lactotransferrin
12	P14555	PLA2G2A	Phospholipase A2, membrane associated
13	P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
14	P18031	PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
15	P02753	RBP4	Retinol-binding protein 4
16	P12724	RNASE3	Eosinophil cationic protein
17	P16109	SELP	P-selectin

3.2 潜在靶点 PPI 网络构建

将 17 个潜在靶点上传到 STRING 数据库, 获得一个节点数为 17, 边数为 43, 平均节点连接数为 5.06, 平均局部聚类系数为 0.656, 预期边数为 16, PPI 富集 P 值小于 3.63×10^{-8} 的 PPI 网络, 将节点信息导入 Cytoscape 软件, 将节点颜色按照 degree 值排序, 最终得到潜在靶点 PPI 网络图 (见图 3-2), 靶点 RBP4 与其余靶点未有联系。

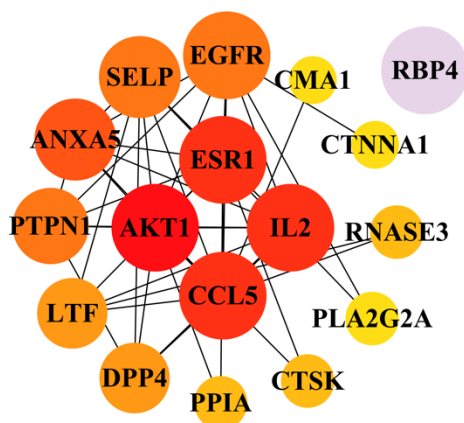


图 3-2 潜在靶点蛋白相互作用网络

Fig. 3-2 Potential targets PPI network

3.3 关键作用靶点筛选结果

将 9 种分析方法排名前 5 的靶点汇总后，导入 HIPILOT 作图平台，进行 Upset 绘制，并获得关键靶点，Upset 结果见图 3-3。由图可知，共同排在每种分析方法前 5 名的靶点有 2 个，这些靶点即为关键靶点，分别为 AKT1 和 ESR1。

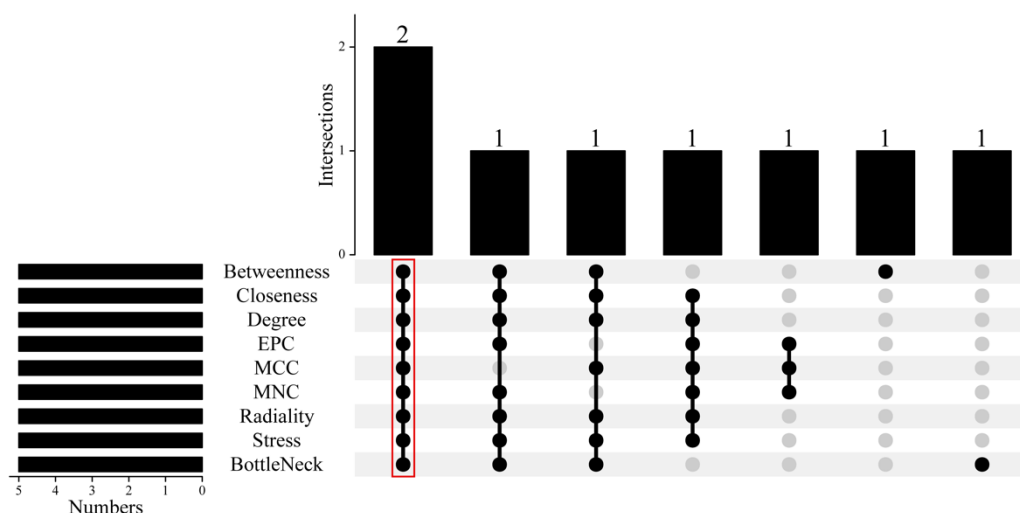


图 3-3 Upset 结果图

Fig. 3-3 Upset result

3.4 GO 功能富集分析结果

将筛选出的 17 个黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点上传至 Metascape 数据库进行 GO 功能富集分析，共获得 230 个功能富集结果。其中，生物进程（Biological Processes）有 182 个，主要富集在对蛋白激酶活性的正向调节、对参与共生相互作用的生物过程激素水平的调节、对激酶活性的正向调节、蛋白磷酸化正调控、磷酸化正调控和转移酶活性的正向调节等生物进程；细胞组分（Cellular Components）有 18 个，主要富集在黏着

斑、细胞-基质连接、囊泡腔、细胞前缘、片层、膜筏和膜微区等细胞组分；分子功能（Molecular Functions）有 30 个，主要富集在激酶调节活性、激酶激活剂活性、脂多糖结合、丝氨酸型内肽酶活性、酶激活剂活性和蛋白激酶激活剂活性等分子功能。三种 GO 功能富集分析 P 值排名前 10 的结果见图 3-4。

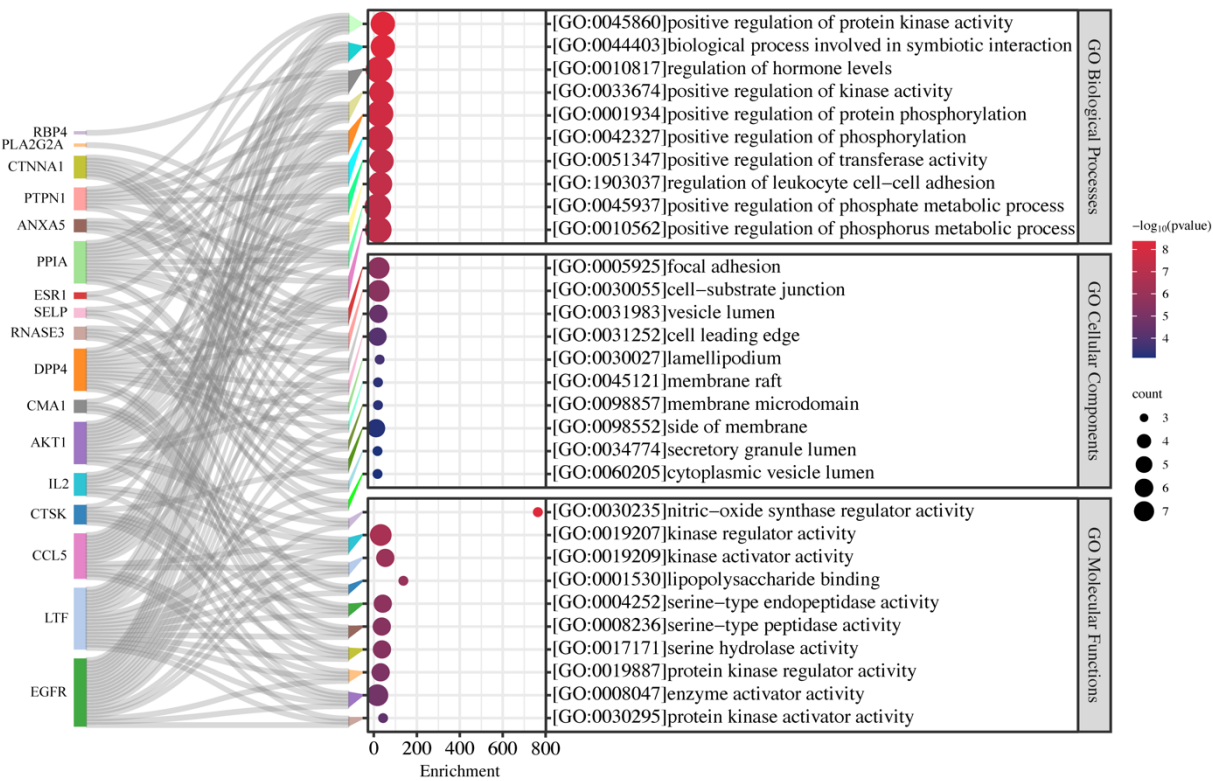


图 3-4 GO 功能富集结果桑基-气泡图

Fig. 3-4 Sankey-Bubble diagram of GO functional enrichment results

3.5 KEGG 通路富集分析结果

将筛选出的 17 个黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点上传至 Metascape 数据库进行 KEGG 通路富集分析，共获得 19 个通路富集结果，主要富集在癌症通路、Toll 样受体信号通路、雌激素信号通路、JAK-STAT 信号通路、Ras 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路等通路。KEGG 通路富集分析结果见图 3-5。

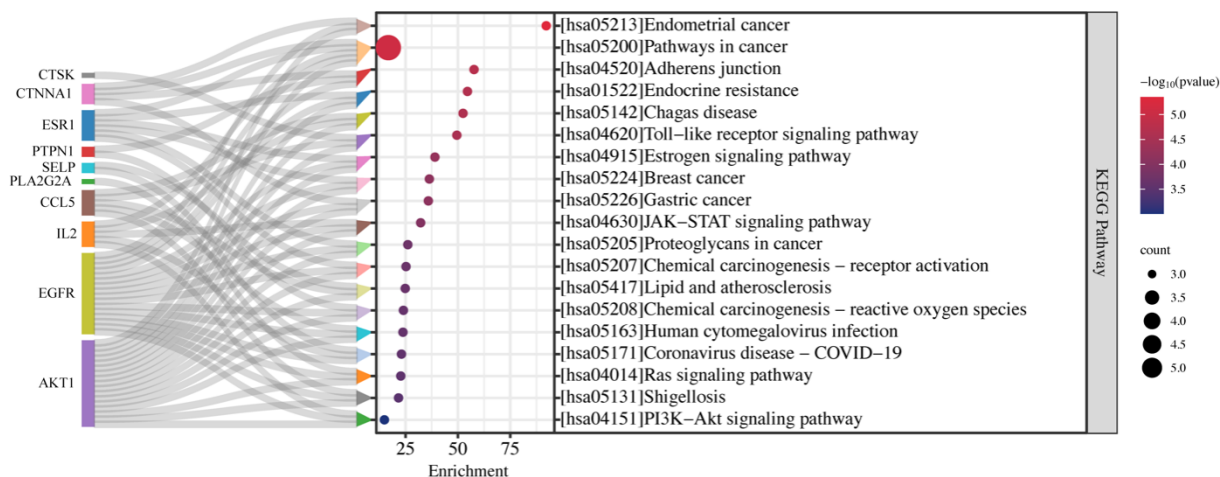


图 3-5 KEGG 通路富集结果桑基-气泡图

Fig. 3-5 Sankey-Bubble diagram of KEGG pathway enrichment results

3.6 分子对接结果

2 种关键靶点蛋白与药物分子的对接结合自由能和氢键数量结果见图 3-6，分子对接示意图见图 3-7。由图 3-6 可知，黄芩苷与 AKT1 靶点蛋白的对接结合自由能最低，为 -7.9 kcal/mol，形成的氢键数量最多（2 条），可形成稳定的复合物；黄芩苷与 ESR1 靶点蛋白的对接结合自由能为 -7.7 kcal/mol，形成的氢键数为 1 条。由图 3-7 可知，黄芩苷与 AKT1 蛋白（PDB ID: 1UNR）中的 GLY-10（甘氨酸）和 TRP-11（色氨酸）分别形成键长为 2.393 Å 和 1.929 Å 的氢键；与 ESR1 蛋白（PDB ID: 7BAA）中的 GLU-20（谷氨酸）形成键长为 2.117 Å 的氢键。由对接结果可知，黄芩苷最佳的对接靶点是 AKT1 蛋白。

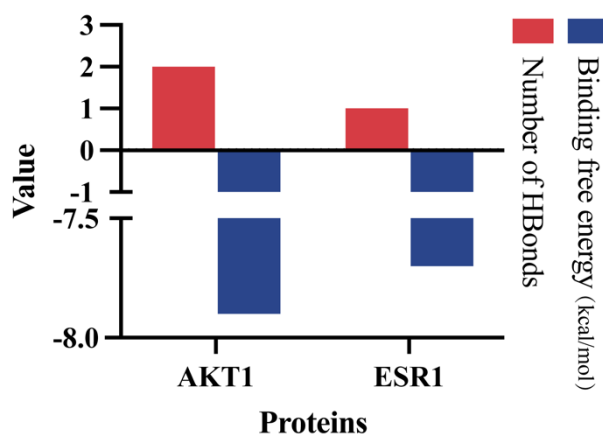


图 3-6 分子对接结合自由能和氢键数量结果

Fig. 3-6 The binding free energy and hydrogen bond number of molecular docking

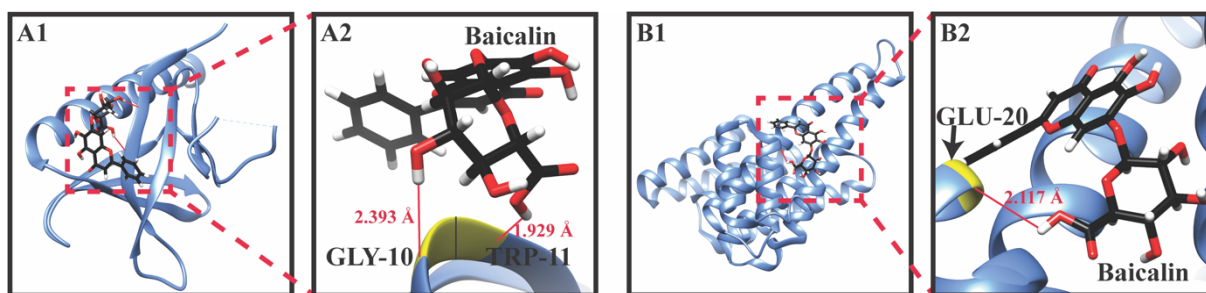


图 3-7 分子对接结果示意图

A1 和 B1 分别为黄芩苷与 AKT1 和 ESR1 对接整体图；A2 和 B2 分别为黄芩苷与 AKT1 和 ESR1 对接局部作用图。

Fig. 3-7 Schematic diagram of molecular docking results

A1 and B1 are the overall diagram of the docking of Baicalin with AKT1 and ESR1, respectively. A2 and B2 are the local action maps of Baicalin with AKT1 and ESR1, respectively.

4 讨论

在猫的多种疾病中，猫传染性腹膜炎（Feline infectious peritonitis, FIP）作为猫的重要传染病之一，逐渐成为了各宠物主人和猫养殖业的焦点，目前临床上对 FIP 仍缺乏有效的治疗手段。通过前期对抗病毒天然化合物的体外筛选，成功筛选出抗 FIPV 感染的天然化合物黄芩苷，但其抗感染的作用机制尚不明确，因而深入探索黄芩苷抗 FIPV 感染的分子机制尤为重要，对早期诊断、靶向治疗和预后评估具有指导作用。

目前通过网络药理学对药物作用靶点进行预测已有很好的研究成效。Duan 等^[168]通过对中药药理学数据库与分析平台（TCMSP）和 GEO 等数据库获得的靶点数据进行筛选，获得了乌梅丸治疗肠炎的潜在作用靶点，并结合体外试验 Western blot 验证得出乌梅丸可通过抑制 RAGE 的表达来减少 NF- κ B 的活化，达到调节炎症的作用。Wang 等^[111]通过网络药理学预测和试验验证，揭示了黄芩苷可能是大秦芩汤治疗脑小血管病（Cerebral small vessel disease, CSVD）的有效药物成分，其可通过抑制 P53 和 Caspase 3 的表达量来改善 CSVD 大鼠神经细胞凋亡的发生。

本试验利用 PubChem 数据库和 GeneCards 数据库对黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用靶点进行筛选，共筛选出 17 个潜在作用靶点。在筛选关键作用靶点时，为避免单一算法的计算偏差，使用基于 PPI 网络的 cytoHubba 插件中 9 种计算方法进行联合分析^[169]，以达到精确筛选黄芩苷抗 FIPV 感染的关键作用靶点的目的。通过分析，最终获得 2 个关键作用靶点，分别为 AKT1 和 ESR1。之后对关键作用靶点进行分子对接分析。分子对接结果显示，相比于 ESR1 靶点，AKT1 靶点与黄芩苷药物分子有 2 条氢键，且结合

自由能为-7.9 kcal/mol, 具有更好的亲和力, 证明 AKT1 为黄芩苷抗 FIPV 感染的关键作用靶点。

AKT1 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT 的一个亚型, 蛋白大小为 60 kDa, 由 PKB α 编码, 在多种组织中广泛表达^[170]。KEGG 通路富集分析结果显示, AKT1 富集在多个信号通路中。其中, 以 AKT 为关键蛋白的 PI3K-AKT 信号通路, 可促进通路下游蛋白的丝氨酸或苏氨酸磷酸化参与细胞生长、增值、凋亡和转录等多种生理过程^[171,172]。PI3K (磷酸肌醇激酶) 是 AKT 的上游蛋白, 是磷酸肌醇及肌醇的重要激酶, 其可促进 AKT 的激活, 被激活的 AKT 可磷酸化激活或抑制其下游蛋白, 例如与凋亡相关的 Caspase-9、Bcl-2 和 Bax 等蛋白^[173], 与炎症通路相关的 NF- κ B^[174]和与脂质代谢、自噬及蛋白质合成等相关的 mTOR 信号通路等^[175]。研究表明, PI3K-AKT 信号通路在抑制病毒感染中起到重要作用, 周协琛^[176]研究发现, 马齿苋多糖 (POL-P) 可通过调控 PI3K-AKT/mTOR 信号通路, 在复制过程抑制 p-AKT 的表达而抑制猪轮状病毒的感染。Lu 等^[177]研究表明, 在甲型流感病毒感染期间, PI3K-AKT 通路通过 ASK1 负调控 JNK 通路, 从而抑制 JNK 依赖的 Bax 介导的细胞凋亡。Tang 等^[178]在研究单纯疱疹病毒 (HSV-1) 时发现, 槐定碱可抑制 PI3K-AKT 信号通路进而抑制病毒的复制。

近年来, 众多研究表明, 黄芩苷可通过调控 PI3K-AKT 通路起到抑制凋亡^[179]、抗炎^[129]和抗肿瘤^[180]等作用。Zhang 等^[144]研究发现, 黄芩苷可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来逆转紧密连接蛋白 (occludin 和 ZO-1) 和凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2、Caspase-3、NF- κ B) 的表达趋势, 从而抑制脊髓损伤后血脊髓屏障通透性, 减少神经细胞凋亡。Zhao 等^[155]研究表明黄芩苷可在体内通过激活 PI3K-AKT 信号通路来抑制 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 诱导的视网膜神经节细胞 (RGCs) 凋亡、自噬和氧化应激, 从而减缓青光眼小鼠视网膜组织的病理改变。

综上所述, 通过网络药理学预测和分子对接分析, 预测出 AKT1 为黄芩苷抗 FIPV 感染的关键作用靶点。AKT 作为 PI3K-AKT 信号通路中的关键蛋白, 其表达水平的变化可影响通路所调控的生理过程的变化。结合目前对黄芩苷影响 PI3K-AKT 通路调控的研究, 合理推测, 黄芩苷可能通过调控 PI3K-AKT 通路来达到抑制 FIPV 感染的作用。

5 小结

网络药理学和分子对接分析表明, AKT1 为黄芩苷抗 FIPV 感染的主要作用靶点, 黄芩苷可能通过调控 PI3K-AKT 通路来达到抑制 FIPV 感染的作用。

第四章 基于 4D-LFQ 蛋白质组学分析黄芩苷抗 FIPV 的作用机制

前 言

4D-非标记定量（4D Label free quantification, 4D LFQ）蛋白质组是目前技术成熟的非标记定量蛋白质组学，该技术是在原有蛋白质组学的三个维度分离基础上，增加了新一维度即离子淌度（ion mobility）的分离。根据肽段离子在飘移管中与缓冲气体碰撞时的碰撞截面不同，将离子可按大小形状进行分离，从而降低样本复杂度，进一步提高检测灵敏度、扫描速度，最终带来组学分析样本用量减少、鉴定深度提升、检测时长降低等性能的升级。4D-LFQ 为差异蛋白的筛选^[181]、机体生理过程和通路机制的探索^[182]带来了新的研究方法，成为了重要的质谱定量方法^[117,118]。

前期试验证明，黄芩苷对 FIPV 感染 CRFK 细胞具有抑制作用，并可抑制因感染引起的细胞凋亡。之后通过网络药理学和分子对接技术，筛选出黄芩苷抗 FIPV 感染的关键作用靶点 AKT1，并推测黄芩苷可能通过调控 PI3K-AKT 信号通路起到抑制感染的作用。为了深入研究黄芩苷抗 FIPV 感染的机制，本试验通过将药物和病毒共同作用 CRFK 细胞，制备黄芩苷抗 FIPV 感染的细胞模型，利用实时荧光定量 PCR 检测不同感染时间细胞的病毒载量，选择最佳感染时间收集细胞，提取总蛋白，进行 4D-LFQ 蛋白质组学分析。根据组学分析结果对黄芩苷抑制 FIPV 感染的机制通路进行分析，并对通路中关键蛋白进行 Western blot 验证，确定黄芩苷抗 FIPV 感染的作用机制。

试验部分

1 试验材料

1.1 细胞与毒株

同第二章。

1.2 药物

黄芩苷（同第二章）

1.3 主要试剂

FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit Pro、HiScript IV RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)、Vazyme Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (12%)、BCA Protein Quantification Kit 和增强型 ECL 化学发光检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；全蛋白提取试剂盒（强）、脱脂乳、20×TBST 和 10×电泳转移缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司；甲醇购自国药集团化学试剂有限公司；快速考马斯亮蓝染色液购自博奥龙；NuPAGE™ LDS 样品缓冲液（4×）和 NuPAGE™ MES SDS 电泳缓冲液（20×）购自赛默飞世尔科技；Prestained Protein Marker II (10-200 kDa)购自赛维尔生物科技有限公司；PVDF 膜购自 Millipore；EGFR Monoclonal antibody、PI3 Kinase p85 Alpha Monoclonal antibody、AKT Polyclonal antibody、Phospho-AKT (Ser473) Monoclonal antibody、Caspase 9/p35/p10 Monoclonal antibody、Bcl2 Monoclonal antibody、BAX Polyclonal antibody、GAPDH Monoclonal antibody、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)和 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)购自 Proteintech。

其余试剂同第二章。

1.4 主要仪器

Roche LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪（Roche, 美国）；蛋白电泳仪（Bio-Rad, 美国）；DYY-6C 电泳仪电源（北京六一仪器厂，中国）；NANODROP ONE 核酸蛋白浓度测定仪（赛默飞世尔科技，美国）；Amersham Imager 680 照胶仪（GE, 美国）；Biometra TRIO 型 PCR 仪（耶拿，德国）；K0-260 恒温摇床（上海一恒科学仪器有限公司，中国）。

其余仪器同第二章。

1.5 试剂配制

(1) TBST 缓冲液：在瓶中加入 1.9 L 超纯水，量筒量取 100 mL 20×TBST 溶液，倒入瓶中，磁力搅拌器搅拌；

(2) 电泳缓冲液：在瓶中加入 1.9 L 超纯水，量筒量取 100 mL NuPAGE™ MES SDS 电泳缓冲液（20×），倒入瓶中，磁力搅拌器搅拌；

(3) 转膜缓冲液：在瓶中加入 100 mL 10×电泳转移缓冲液，加入 200 mL 无水甲醇混匀，加入超纯水定容至 1 L，磁力搅拌器搅拌；

(4) 封闭液：精准称量 5 g 脱脂乳，倒入瓶中，加入 100 mL TBST 缓冲液，磁力搅拌器搅拌。

其余试剂配制方法同第二章。

2 试验设计与方法

2.1 CRFK 细胞

细胞的培养、冻存和复苏方法同第二章 2.1。

2.2 FIPV 毒株

FIPV 毒株与第二章的毒株为同一批次毒株，毒力相同。

2.3 药物

黄芩苷的溶解方法同第二章 2.3。黄芩苷的最大安全浓度同第二章。

2.4 药物最佳作用时间的确定

2.4.1 黄芩苷抗 FIPV 感染的细胞模型的制备

2.4.1.1 分组

细胞模型分为 3 组，使用的药物终浓度为最大安全浓度，病毒液的终浓度为 100TCID₅₀，具体分组情况见表 4-1。

表 4-1 分组表

Table 4-1 Group

	Control (C)	FIPV (F)	Treatment (T)
Baicalin	-	-	+
FIPV	-	+	+

2.4.1.2 细胞模型的制备

(1) 将 CRFK 细胞用完全培养基混匀, 均匀铺至 96 孔板, 放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养;

(2) 待细胞密度达到 80% 以上时, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次;

(3) 按照表 4-1 的分组 Control 组只加 100 μL 维持培养液, FIPV 组只加 100 μL 病毒液, Treatment 组分别加入药物和病毒液各 50 μL, 每组设置 6 个重复, 轻晃混匀, 放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养;

(4) 分别在培养箱中培养 12、24、36、48、60 和 72 h, 弃去液体, 用 PBS 清洗 2 次;

(5) 每孔加入 20 μL 胰酶消化液, 37℃ 孵育 1 min, 每孔加入 100 μL 细胞维持液终止消化, 缓慢吹打细胞, 使细胞完全脱落, 收集细胞悬液;

(6) 使用离心机 1000 rpm/min 离心 1 min, 弃去液体, 保留细胞沉淀, 用于后续总 RNA 提取。

2.4.2 总 RNA 的提取

按照 Vazyme FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit Pro 病毒核酸提取试剂盒说明书操作步骤, 进行细胞总 RNA 提取, 步骤如下:

(1) 向收集到的细胞沉淀中加入 300 μL PBS 彻底重悬细胞;

(2) 向 RNase-free 管中依次加入 20 μL Proteinase K、300 μL 细胞悬液、300 μL Buffer VL Pro 工作液, 涡旋混匀 15-30 sec, 短暂离心收集管盖及管壁上的液体, 室温静置 5 min;

(3) 加入 200 μL 无水乙醇, 涡旋混匀 15-30 sec, 短暂离心收集管盖及管壁的液体;

(4) 将上述混合液全部转移至 FastPure DNA/RNA Columns, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;

(5) 向 FastPure DNA/RNA Columns 中加入 700 μL Buffer VW1 (已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃滤液;

(6) 向 FastPure DNA/RNA Columns 中加入 700 μL Buffer VW2 (已加入无水乙醇), 上下颠倒柱体, 清洗内壁残留的试剂, 12,000 rpm 离心 30 sec, 弃滤液;

(7) 12,000 rpm 空柱离心 2 min;

(8) 小心将 FastPure DNA/RNA Columns 转移至新的 RNase-free Collection Tubes 1.5 ml 中, 向膜中央悬空加入 65℃ 预热的 40 μL RNase-free ddH₂O, 室温静置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min;

(9) 弃去 FastPure DNA/RNA Columns, 管中液体即为提取的 RNA。

2.4.3 反转录合成 cDNA

按照 Vazyme HiScript IV RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒对提取到的 RNA 进行反转录，步骤如下：

(1) 基因组 DNA 去除，在 Rnase-free 离心管中按照表 4-2 配置混合液，并用移液器缓慢吹打混匀，反应条件为 42℃、2 min；

表 4-2 去除基因组 DNA 反应

Table 4-2 The reaction of removing genomic DNA

Regent	Application amount
Rnase-free ddH2O	to 15 μL
5 × gDNA wiper Mix	3 μL
模版 RNA	1 μg

(2) 配制逆转录反应体系，在第 1 步的反应管中直接加入 5 μL 4 × HiScript IV qRT SuperMix，用移液器缓慢吹打混匀；

(3) 进行逆转录反应，反应程序为 37℃、15 min，85℃、5 sec。

2.4.4 qPCR 检测

2.4.4.1 引物设计

在 NCBI 数据库中查找 FIPV-N 和 GAPDH 的基因序列，使用 SnapGene 6 设计引物，引物信息见表 4-3。

表 4-3 引物序列

Table 4-3 Primer sequences

Gene	Primer sequences (5'→3')
FIPV-N	F: TGCTTCGGCTAACTTTGGTG
	R: CAATCATCTCAACCTGTGTGTCAT
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTT
	R: TGCCGTGGGTGGAATCATAC

2.4.4.2 qPCR 检测

(1) 根据 Vazyme Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书，建立 qPCR 反应体系，如表 4-4 所示；

表 4-4 qPCR 反应体系

Table 4-4 qPCR Reaction System

Reagent	Application amount
2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μL
Primer 1 (10 μM)	1 μL
Primer 2 (10 μM)	1 μL
cDNA	1 μL
ddH ₂ O	7 μL

(2) 根据表 4-5 所示程序采用 Roche LightCycler 480 进行反应;

表 4-5 qPCR 反应程序

Table 4-5 qPCR Reaction Procedure

Steps	Reaction	Cycles	Temperature	Time
Stage 1	预变性	1	95℃	30 sec
Stage 2	循环反应	40	95℃	10 sec
			60℃*	30 sec
Stage 3	溶解曲线		仪器默认程序	

*荧光信号采集

(3) 以 GAPDH 为内参基因, 将得出的 CT 值通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算出 FIPV 的相对表达量, 比较不同感染时间的 FIPV 的病毒含量, 确定药物作用的最佳时间。

2.5 细胞总蛋白的提取与质量鉴定

2.5.1 黄芩苷抗 FIPV 感染的细胞模型的制备

2.5.1.1 分组

细胞模型分组情况同 2.4.1.1。药物及病毒液终浓度同 2.4.1.1。

2.5.1.2 细胞模型的制备

(1) 将 CRFK 细胞用完全培养基混匀, 均匀铺至 150 mm 细胞培养皿中, 放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养;

(2) 待细胞密度达到 80% 以上时, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次;

(3) 按照表 4-1 的分组 Control 组只加 30 mL 维持培养液, FIPV 组只加 30 mL 病毒液, Treatment 组分别加入药物和病毒液各 15 mL, 每组设置 3 个重复, 轻晃混匀, 放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养;

(4) 按照 2.4 中确定的最佳作用时间进行培养, 之后弃去液体, 并将培养皿倒置于

吸水纸上吸干培养液；

(5) 加入 4℃ 预冷的 PBS，平放缓慢摇动 1 min 洗涤细胞，然后弃去 PBS。重复以上操作两次以洗去培养液；

(6) 将培养皿置于冰上，向培养皿内加入 5 mL 4℃ 预冷的 PBS，用细胞刮棒将细胞刮于培养皿的一侧，移液管吸取细胞悬液至预冷的离心管内，4℃ 1000 rpm/min 离心 1 min，弃去上清，液氮速冻，备后续蛋白提取。

2.5.2 细胞总蛋白的提取

(1) 向收集到的细胞沉淀中加入 500 μL 裂解液，缓慢吹打混匀，冰上裂解 10 min；

(2) 将裂解后的样品 10,000 rpm/min 离心 5 min，取上清，即为蛋白样品。

2.5.3 蛋白质量鉴定

2.5.3.1 蛋白定量

按照 Vazyme BCA Protein Quantification Kit 蛋白浓度定量试剂盒说明书进行，步骤如下：

(1) BCA 工作液配制。根据样品数量，按 50 体积 BCA Reagent A 加 1 体积 BCA Reagent B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀；

(2) 按照说明书在 96 孔酶标板中加样，绘制标准曲线；

(3) 将待测蛋白样品用去离子水稀释至适当浓度，取 20 μL 样品加入孔中，再加入 200 μL BCA 工作液；

(4) 振荡混匀后，37℃ 放置 20-30 min；

(5) 用酶标仪测定 A562 nm 处的吸光值，以不含 BSA 的吸光值为空白对照，以蛋白含量 (μg) 为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线。根据测得的吸光值，在标准曲线上即可计算出样品的蛋白含量。

2.5.3.2 SDS-PAGE 凝胶电泳检测

按照 Vazyme One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (12%) 试剂盒配制 SDS-PAGE 凝胶，进行蛋白质量的检测，步骤如下：

(1) 上层凝胶配制：Stacker A 0.75 mL，Stacker B 0.75 mL，APS 15 μL；下层凝胶配制：Resolver A 2.7 mL，Resolver B 2.7 mL，APS 60 μL。各组分混合均匀；

(2) 将玻璃板洗净擦干，夹入制胶夹中，先将下层胶液注入，使液面距短玻璃板上沿约 1.5 cm，然后将上层胶液注入玻璃板中，缓慢插入梳齿；

(3) 待胶凝固后（室温约 15 min），拔去梳齿，放入电泳槽中，注入电泳液；

(4) 蛋白样品的制备：取 42 μL 定量的蛋白样品与 14 μL 蛋白上样缓冲液 (4×) 混合，金属浴 100℃ 加热 10 min，待样品冷却后进行蛋白上样；

（4）电泳：分离胶起始用 80 V 电压，带溴酚蓝指示条跑至浓缩胶时改为 120 V 电压，跑至结束；

（5）将凝胶放入考马斯亮蓝快速染色液中染色 30 min，用清水将染色液洗净后进行凝胶成像。

2.6 4D-LFQ 蛋白质组学结果分析

将检验合格的蛋白样品送至上海中科新生命生物科技有限公司进行 4D-LFQ 蛋白质组学分析，分析主要相关参数设定见表 4-6。分析结束后对结果按照表达倍数（Fold Change, FC）>1 或<1, $P<0.05$ 进行筛选，获得差异表达蛋白。基于筛选出的差异蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，并绘制热图、火山图和定量结果图对分析结果予以说明。

表 4-6 鉴定和定量参数表

Table 4-6 Table of identification and quantitative parameters

参数名称	参数
Enzyme	Trypsin
允许的最大漏切位点数目	2
一级离子质量容差	±6 ppm
预检索一级离子质量容差	±20 ppm
二级级离子质量容差	20 ppm
固定修饰	Carbamidomethyl (C)
可变修饰	Oxidation (M)
查库物种	Felin
用于计算 FDR 的数据库模式	Reverse
可信蛋白质的筛选标准	≤0.01
可信肽段的筛选标准	≤0.01
参与定量肽段	采用唯一肽段和 razor 肽段的定量强度值进行蛋白质定量

色谱对齐的时间窗口	2min
蛋白质定量方法	LFQ
用于蛋白质定量分析的最少比值数	1

2.7 通路蛋白的 Western blot 验证

试验分组和样品的制备同 2.5。根据 4D-LFQ 蛋白质组学分析结果，对相关通路蛋白进行 Western blot 验证，步骤如下：

(1) 按照 2.4.3.2 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，待溴酚蓝指示条带跑至玻璃板下沿时停止电泳；

(2) 从电泳槽拿出玻璃电泳板，轻轻撬开玻璃板，将胶条浸入转膜缓冲液中；

(3) 根据凝胶大小剪一块 PVDF 膜并在甲醇中浸泡 30 s 激活；

(4) 按照转膜夹负极面（黑色面）-海绵-转膜滤纸-胶条-PVDF 膜-转膜滤纸-转膜夹正极（白色面）的顺序装配转膜三明治，装配好后放入转膜槽；

(5) 在转膜槽中防止冰盒，加足量缓冲液没过转膜夹，设置电流为 200 mA，时间为 2 h；

(6) 封闭：预先配制 5%脱脂奶粉加入封闭孵育盒，转膜结束后，从转膜夹中取出 PVDF 膜孵育盒中进行封闭。室温条件下，80 rpm 摇床上反应 2 h 后，TBST 洗 6 次，每次 5 min；

(7) 一抗孵育：孵育盒中分别加入 TBST 稀释的目的抗体，将 PVDF 膜放入大小合适的孵育盒中，80 rpm 摇床上 4℃过夜孵育，抗体名称及稀释度见表 4-7。

(8) 二抗孵育：使用 TBST 洗膜 6 次，每次 5 min。加入 TBST 稀释的二抗，室温 80 rpm 摇床上孵育 2 h，之后 TBST 洗膜 6 次，每次 5 min；

(9) 曝光：使用 Vazyme 增强型 ECL 化学发光检测试剂盒，将其 A 液与 B 液等比例混合，倒入避光孵育盒中，PVDF 膜曝光前，放入孵育盒中浸润 30 s，把膜放在成像台上，用滤纸洗干多余工作液，进行凝胶成像系统曝光，拍照后用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

表 4-7 抗体信息汇总

Table 4-7 Summary of antibodies information

Name	Source	Dilution
EGFR	Mouse	1:20000
PI3K	Mouse	1:3000
AKT	Rabbit	1:6000
P-AKT	Mouse	1:5000
Caspase 9	Mouse	1:2000
Bcl-2	Mouse	1:20000
Bax	Rabbit	1:8000
GAPDH	Mouse	1:200000
Goat anti-Mouse	-	1:8000
Goat anti-Rabbit	-	1:8000

2.8 数据处理与统计分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc.California, USA) 软件进行分析, 利用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组之间的差异性, 不同小写字母和 “*” 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结果

3.1 药物最佳作用时间的确定

进行黄芩苷抗 FIPV 感染 CRFK 细胞模型的制备, 并分别收取 12、24、36、48、60 和 72 h 的细胞进行总 RNA 提取, 之后利用实时荧光定量 PCR 检测细胞中 FIPV 基因的表达。结果显示, 在 FIPV 感染 CRFK 细胞 36 h 时, FIPV 基因拷贝数达到最高 ($P < 0.05$), 在感染第 48 h 时显著降低 ($P < 0.05$)。故后续细胞模型样品的收集均在病毒感染 48 h 后进行。

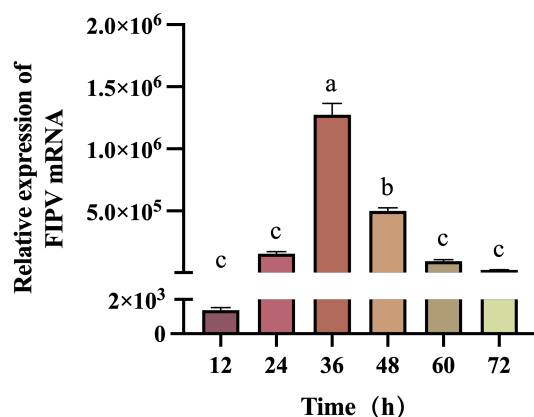


图 4-1 FIPV 病毒载量

Fig. 4-1 FIPV viral load

注：数据以 mean ± SEM 表示，n = 3。不同小写字母（a-c）表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the mean ± SEM, n = 3. Different lowercase letters (a-c) indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.2 细胞总蛋白的检验结果

确定模型样品收集时间后，进行细胞模型的大量制备，之后对提取到的细胞总蛋白进行 BCA 蛋白定量和 SDS-PAGE 检验。蛋白定量结果见表 4-8，SDS-PAGE 结果见图 4-2。定量结果表明，蛋白浓度及总量可满足后续试验。SDS-PAGE 结果表明，蛋白没有发生降解，样本条带组间不平行，组内平行。

表 4-8 BCA 定量结果

Table 4-8 BCA quantitative results

S/N	Sample	Volume (μL)	Concentration (μg/μL)	Total (μg)
1	C1	400	10.64	4256
2	C2	400	11.93	4772
3	C3	400	14.35	5740
4	V1	400	10.69	4276
5	V2	400	12.89	5156
6	V3	400	12.06	4824
7	T1	400	11.54	4616
8	T2	400	13.42	5368
9	T3	400	15.65	6260

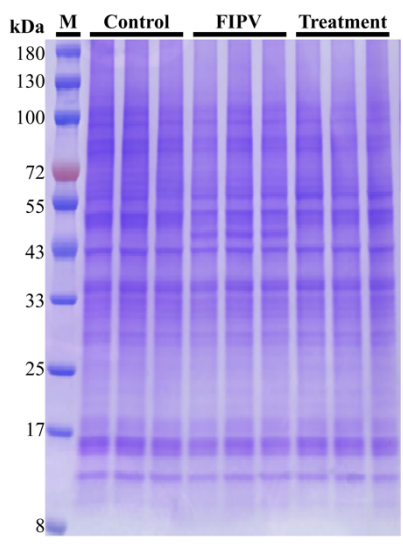


图 4-2 SDS-PAGE

Fig. 4-2 SDS-PAGE

3.3 4D-LFQ 蛋白质组学质谱鉴定结果

质谱鉴定如图 4-3 所示，结果显示，所有鉴定的肽段质量偏差主要分布在 10 ppm 以内（图 4-3A），说明鉴定结果准确可信；MS2 的 Andromeda 得分较为理想（图 4-3B），约 74.42% 以上的肽段得分在 60 以上，肽段得分中位数为 87.94，进一步说明 MS 试验数据的质量较高。

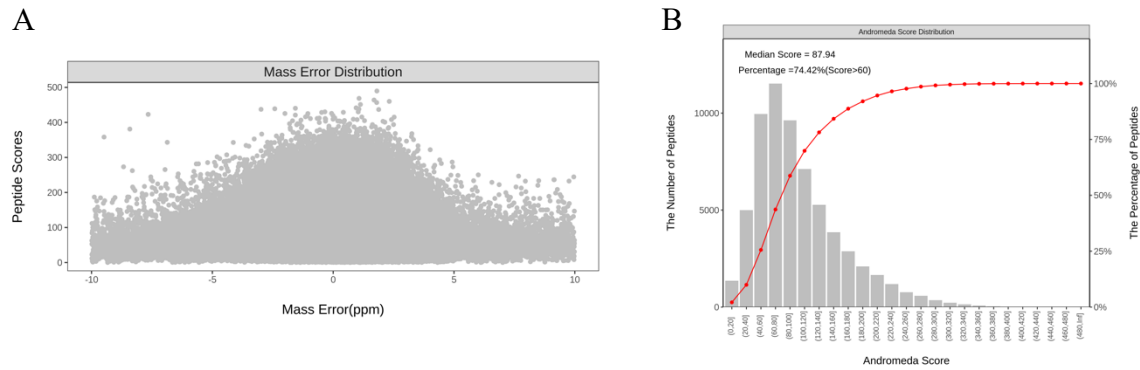


图 4-3 质谱质量控制说明。

A. 肽段质量误差分布；B. 鉴定肽段 Andromeda 评分。

Fig. 4-3 Quality control instructions for mass spectrometry analysis

A. Andromeda score of identified peptides; B. Mass error distribution of identified peptides.

3.4 4D-LFQ 蛋白质组学蛋白质鉴定结果

由图 4-4A 可知，本次蛋白组学共检测到 6546 个蛋白质，其中 Control 组、FIPV 组和 Treatment 组分别检测到 6456、6430 和 6486 个蛋白质，三组共同重叠蛋白有 6346 个。

程等过程；在分子功能（Molecular Function，MF）中差异蛋白主要富集在有机环化合物结合、杂环化合物结合、蛋白结合、核酸结合、碳水化合物衍生物结合、核糖核酸绑定和 DNA 结合等功能；在细胞组分（Cellular Component，CC）中差异蛋白主要富集在细胞部分、细胞质、胞质部分、核、细胞器内腔、胞内无膜结合的细胞器和核内腔等组分。

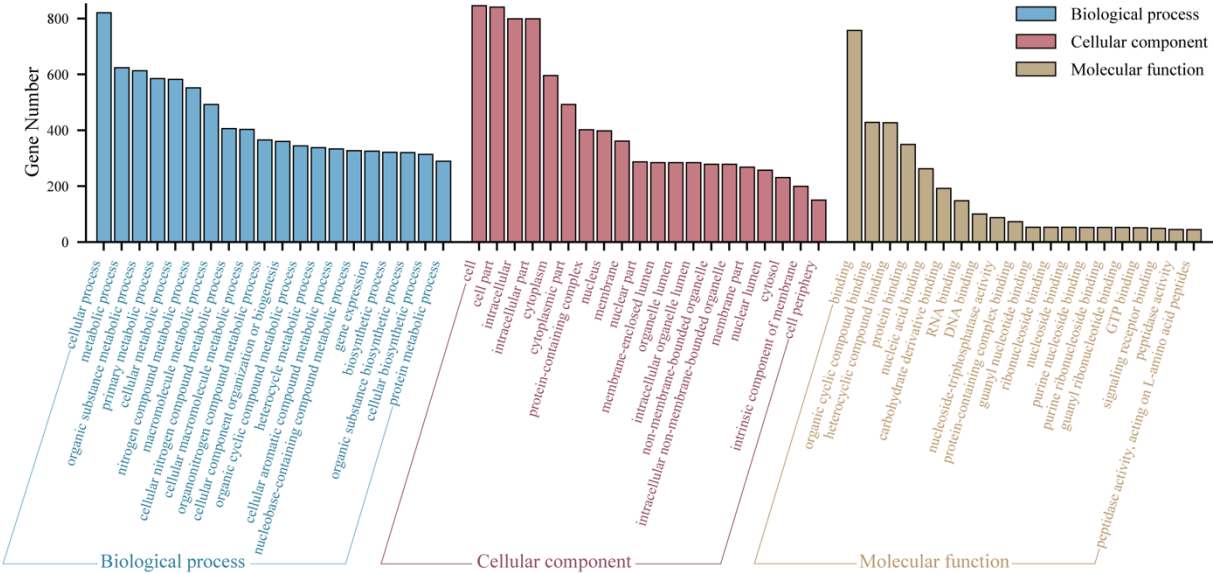


图 4-5 GO 富集分析结果

Fig. 4-5 GO enrichment analysis results

3.6 KEGG 通路富集分析结果

对差异表达蛋白进行 KEGG 富集分析，结果如图 4-6 所示，主要富集在 Apoptosis、DNA 复制、PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、RIG-I 样受体信号通路和细胞质 DNA 感应通路等。红框部分为 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路，均出现在了 *P* 值排名的前 20 中，且二者基因数量和所占比例相近。

3.7 候选通路分析结果

选择 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路上富集到的差异表达蛋白，经 Z-scores 标准化后绘制 Treatment/FIPV 比较组之间的差异热图，结果如图 4-7 所示，与 FIPV 组相比，红框部分 PIK3CA 在两个通路间都表现为显著上调 ($P < 0.05$)，CASP 9 在两个通路间都表现为显著下调 ($P < 0.05$)。

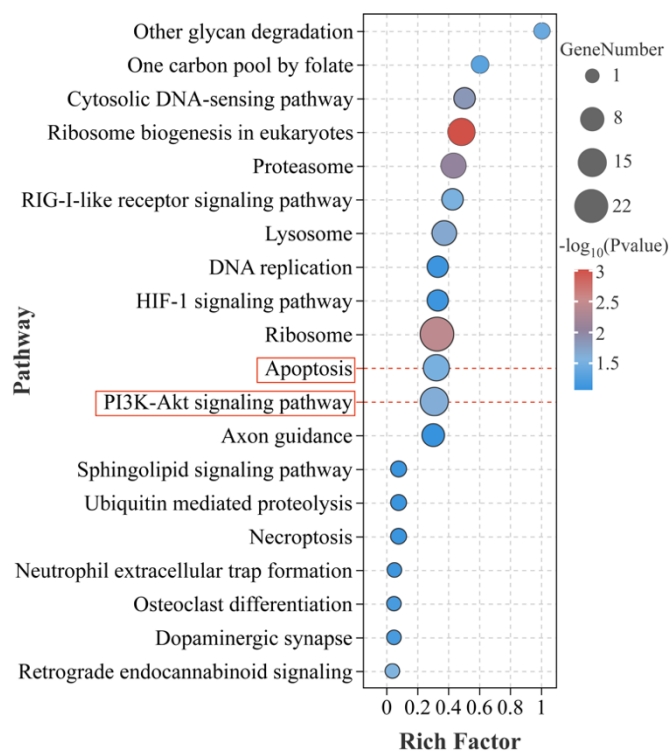


图 4-6 P 值排名前 20 的 KEGG 富集气泡图

Fig. 4-6 KEGG enrichment bubble diagram of the top 20 P values

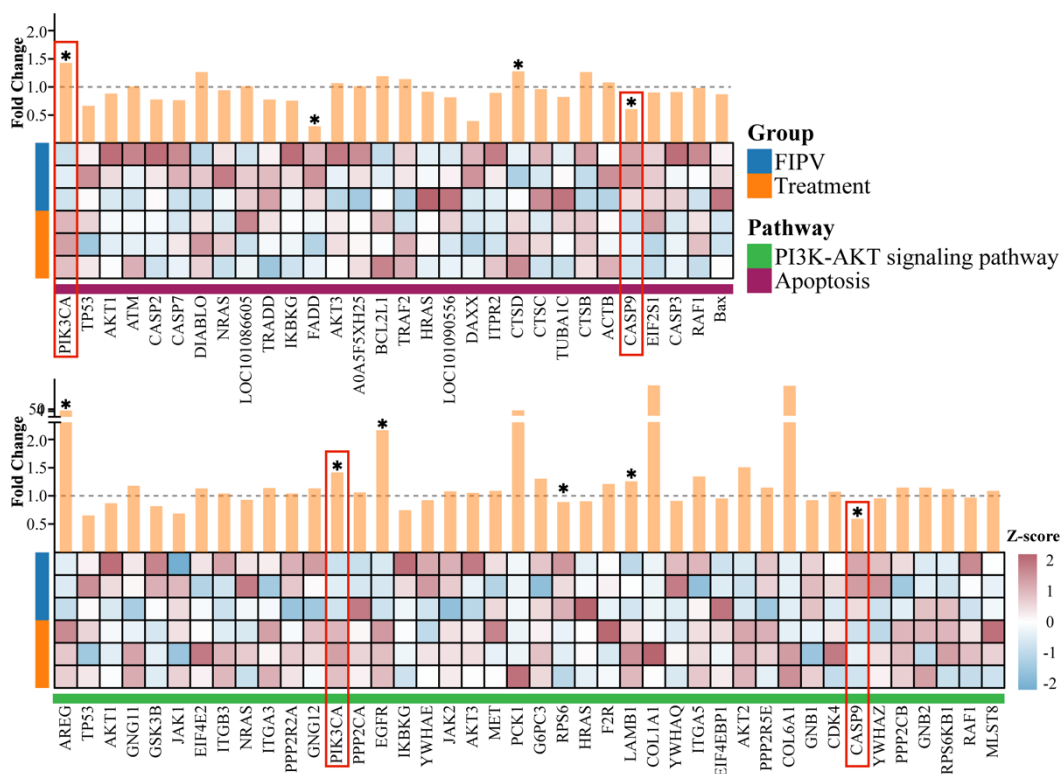


图 4-7 Treatment/FIPV 对比组 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路热图及各蛋白 FC

Fig. 4-7 PI3K-AKT signaling pathway and Apoptosis pathway heat map and protein FC in Treatment/FIPV comparison group

3.8 关键通路蛋白的筛选结果

将各组的差异蛋白进行两两对比，以 FC 和 P 值两个因素绘制火山图，其中红色代表上调，蓝色代表下调，结果如图 4-8 所示。在各比较组中，定位与 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路相关的关键通路蛋白，结果以绿色在图中标注。定位结果显示，在 FIPV/Control 比较组中，CASP 9 和 BAX 蛋白显著上调 ($P < 0.05$)，BCL2L1 和 EGFR 蛋白显著下调 ($P < 0.05$)，AKT2 蛋白有下调趋势但不显著；在 Treatment/Control 对比组中，AKT2、EGFR、PIK3CA 蛋白显著上调 ($P < 0.05$)，CASP 9 蛋白显著下调 ($P < 0.05$)；在 Treatment/FIPV 对比组中，AKT2、PIK3CA 和 EGFR 蛋白显著上调($P < 0.05$)，BCL2L 蛋白有上调趋势但不显著，CASP9 蛋白显著下调 ($P < 0.05$)，BAX 蛋白有下调趋势但不显著。

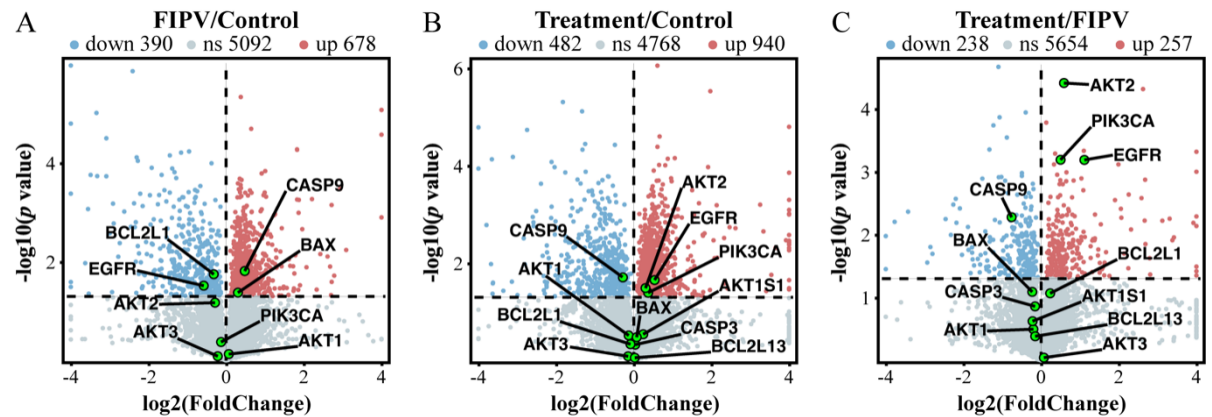


图 4-8 PI3K-AKT/Apoptosis 通路关键蛋白在各比较组火山图中的定位结果

Fig. 4-8 The localization results of the key proteins of PI3K-AKT/Apoptosis pathway in the volcanic plots of each comparison group

3.9 关键通路蛋白的组学定量结果

对 PI3K-AKT 通路的关键蛋白 EGFR、PIK3CA、AKT1、AKT2、AKT3 以及 Apoptosis 通路的关键蛋白 CASP 9、BCL2L1 和 Bax 的蛋白质组学定量结果进行分析，结果如图 4-9 所示。结果表明，与 FIPV 处理组相比，Treatment 组的 EGFR、PIK3CA、AKT2 蛋白都显著上调 ($P < 0.05$)，AKT3 和 BCL2L1 有上升趋势，CASP 9 蛋白显著下调 ($P < 0.05$)，Bax 有下降趋势。

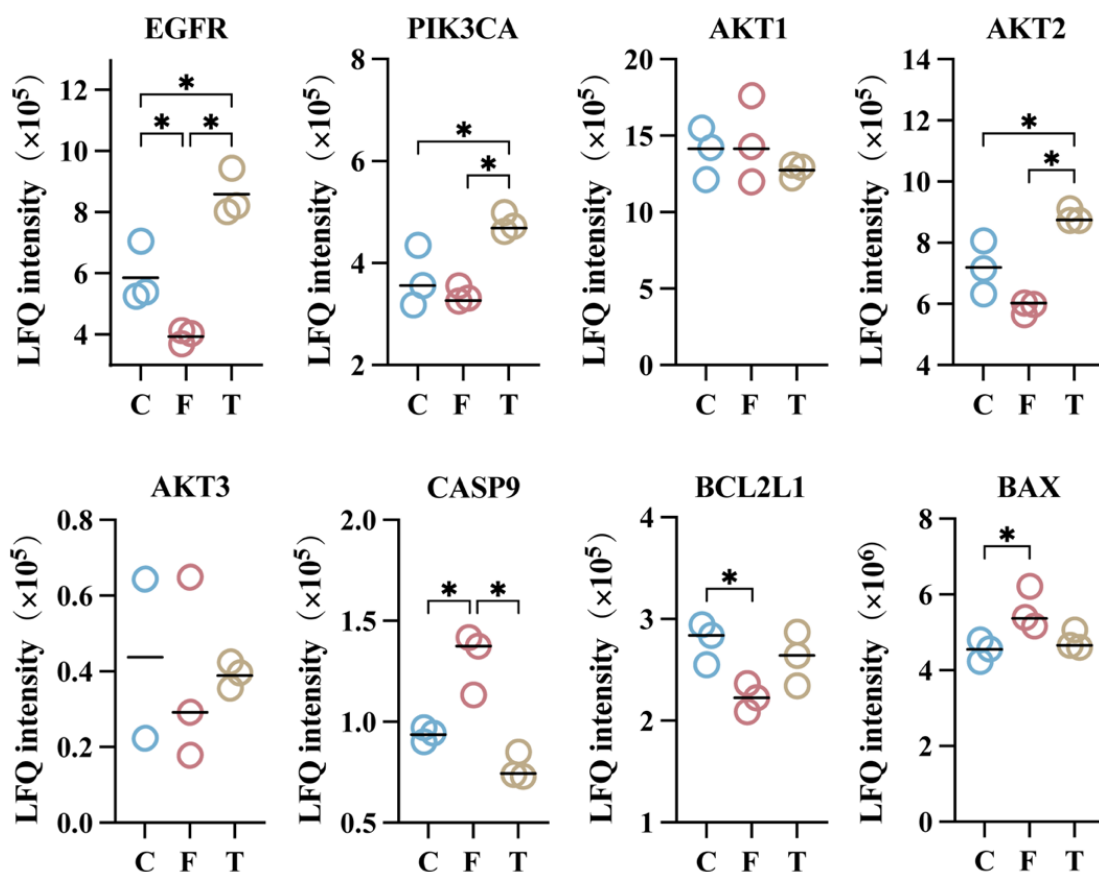


图 4-9 PI3K-AKT/Apoptosis 通路关键蛋白定量结果

Fig. 4-9 PI3K-AKT/Apoptosis pathway key protein quantitative results

注：数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示， $n = 2-3$ 。“*”表示组间差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: The data are represented as the $\text{mean} \pm \text{SEM}$, $n = 2-3$. “*” indicate significant differences between groups, $P < 0.05$.

3.10 Western Blot 验证结果

由 4D-LFQ 蛋白质组学结果可知，黄芩苷可能通过调控 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路来抑制 FIPV 感染，为对该结果进行验证，后续通过 Western blot 对 PI3K-AKT 通路的关键蛋白 EGFR、PI3K、AKT 和 P-AKT 以及 Apoptosis 通路的关键蛋白 Caspase 9、Bcl-2 和 Bax 进行蛋白表达水平检测，并以 GAPDH 作为内参蛋白进行相对表达量的计算。结果如图 4-10 所示，与 FIPV 处理组相比，Treatment 组中的 EGFR、PI3K、P-AKT 和 Bcl-2 蛋白显著上调 ($P < 0.05$)，C-Caspase 9 和 Bax 蛋白显著下调 ($P < 0.05$)，Bcl-2/Bax 显著上调 ($P < 0.05$)。该 WB 结果与蛋白质组学定量结果趋势一致。

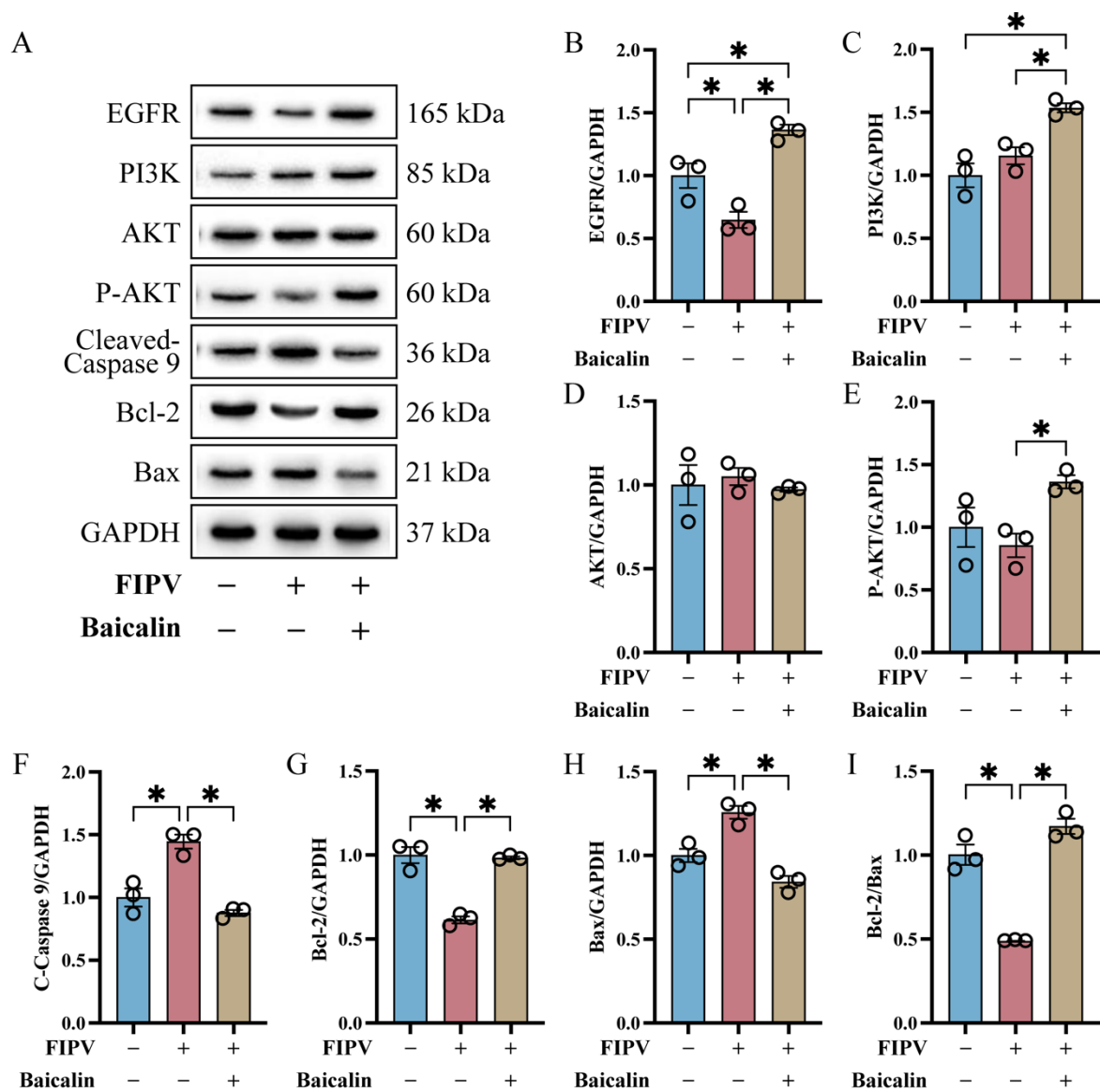


图 4-10 蛋白条带和相对表达量

A. EGFR、PI3K、AKT、P-AKT、Cleaved-Caspase 9、Bcl-2 和 Bax 蛋白条带；B-H. EGFR (B)、PI3K (C)、AKT (D)、P-AKT (E)、Cleaved-Caspase 9 (F)、Bcl-2 (G) 和 Bax (H) 蛋白相对表达量；I. Bcl-2 和 Bax 表达量的比值。

Fig. 4-10 Western blot bands and relative expression levels

A. Western blot bands of EGFR, PI3K, AKT, P-AKT, Cleaved-Caspase 9, Bcl-2 and Bax in CRFK cells ;
B-H. Relative expression levels of EGFR (B), PI3K (C), AKT (D), P-AKT (E), Cleaved-Caspase 9 (F), Bcl-2 (G) and Bax (H) ; I. The ratio of Bcl-2 and Bax expression.

注：所有数据由 3 次重复所得，以 “mean ± SEM” 表示，“*” 表示 $P < 0.05$ 。

Note : Each value represents the mean± SEM of three replications, “*” indicates $P < 0.05$.

4 讨论

在本章研究中, 首先利用实时荧光定量 PCR 技术确定了黄芩苷在细胞模型的最佳作用时间, 之后按照该感染时间进行样品总蛋白的提取和质量检测。并在符合组学质谱条件后进行 4D-LFQ 蛋白质组学分析。按照 $P < 0.05$ 筛选差异表达蛋白, 并对得到的差异蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析结果显示, 差异表达蛋白在生物过程 (Biological Process, BP)、分子功能 (Molecular Function, MF) 和细胞组分 (Cellular Component, CC) 各组分中富集密集, 不便对关键差异蛋白进行筛选并对后续机制进行讨论。Duan 等^[183]在药物抗病的蛋白组学的分析中, GO 功能富集的差异蛋白数量与该试验类似, 对于后续机制的研究, Duan 选择 KEGG 通路富集进行分析验证。因此, 为了缩小差异表达蛋白范围, 本试验将从 KEGG 通路富集结果进行机制的研究。

KEGG 通路富集分析结果显示, 差异表达蛋白主要富集在 Apoptosis、DNA 复制、PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、RIG-I 样受体信号通路和细胞质 DNA 感应等通路。对于后续研究通路的选择, Chen 等^[184]在外泌体促进糖尿病伤口修复的研究中发现, 利用尿源性干细胞外泌体 (USC-Exos) 处理后的细胞可以在细胞划痕试验中大量增殖, 故在 GO 和 KEGG 富集分析结果中, 选择可调控细胞增殖的通路进行研究, 并利用体外试验进行验证, 结果表明 USC-Exos 可通过促进 DMBT1 的表达调控细胞的增殖, 进而促进糖尿病伤口的修复。在本试验的前期研究中已经证明, 黄芩苷可显著抑制 FIPV 感染 CRFK 细胞产生的凋亡。之后利用网络药理学和分子对接对黄芩苷抗 FIPV 感染的关键作用靶点进行挖掘, 筛选出 AKT1 为关键作用靶点, 推测黄芩苷可能调控 PI3K-AKT 信号通路达到抑制 FIPV 感染的作用。因此, 基于前期的研究结果, 并结合蛋白质组学 KEGG 富集分析结果, 最终确定选择 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路进行后续的研究 (图 4-6 红色框选部分)。

选择 Treatment/FIPV 比较组中 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路上富集到的差异表达蛋白绘制热图, 结果显示, 与 FIPV 组相比, PIK3CA 在两个通路间都表现为显著上调, CASP9 在两个通路间都表现为显著下调, EGFR 在 PI3K-AKT 信号通路中显著上调。PIK3CA 是编码 PI3K 催化亚基 α 的基因, PI3K 为 PI3K-AKT 通路的关键蛋白, 在不同的肿瘤类型中会发生体细胞突变, 大多数突变 (>80%) 位于螺旋结构域和激酶结构域的保守区域^[185], 这些突变导致 PI3K α 酶磷酸化肌苷激酶活性增加^[186-188], 导致下游蛋白上调, 从而调节参与细胞存活、细胞周期进程和细胞生长的许多底物的功能^[189]。EGFR 是表皮生长因子受体, 在 PI3K-AKT 通路中, EGFR 是 PIK3CA 的上游蛋白^[190]。Tiemin 等^[191]研究表明, 高甲基化诱导的 miR-212-3p 异常下调可导致人肝内胆管癌

(intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA) 中粘蛋白 (MUC13) 过表达, 进而激活 EGFR/PI3K/AKT 信号通路。Shi 等^[192]研究表明, 柴胡皂苷-a (Saikosaponin-A, SSA) 可以通过靶向抑制 EGFR, 进而抑制 PI3K-AKT 通路, 起到抑制胰腺癌细胞增殖的作用。在 Treatment/FIPV 比较组热图中, 该通路中的关键靶点蛋白还有 AKT 的三个亚型, AKT1、AKT2 和 AKT3。因此, 在 PI3K-AKT 通路中, 选择 EGFR、PIK3CA、AKT1、AKT2 和 AKT3 进行验证。CASP9 作为凋亡细胞的启动子 Caspase 亚基, 在凋亡反应中是一个至关重要的调节因子, 在线粒体释放细胞色素 C 后被激活^[193]。激活的 CASP9 可通过二聚化产生活性, 其二聚化导致快速自催化裂解, 从而产生 Cleaved-Caspase 9 (p35/p12), 故 Cleaved-Caspase 9 蛋白的表达量即可反映 CASP9 的活化水平^[194,195]。活化的 CASP9 可刺激效应蛋白 CASP3 的激活, 从而导致细胞凋亡^[196]。在细胞凋亡中, 由线粒体损伤引起的 Bcl-2 家族蛋白平衡的改变, 也参与细胞凋亡。促凋亡蛋白如 Bax/Bak 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的不平衡诱导线粒体通透性增加, 导致线粒体膜电位紊乱和细胞色素 C 释放^[197], 细胞色素 C 又可激活 CASP9, 进而促进细胞凋亡。研究表明, Bcl-2/Bax 的比值对决定细胞是否进入凋亡状态具有重要意义^[198]。因此在 Apoptosis 通路中, 选择 CASP9、Bcl-2 和 Bax 进行验证。结合蛋白质组学定量结果, 对两条通路中的关键蛋白进行分析。由火山图和定量结果可知, 与 FIPV 处理组相比, Treatment 组的 EGFR、PIK3CA、AKT2 蛋白都显著上调, AKT3 和 BCL2L1 有上升趋势, CASP9 蛋白显著下调, Bax 有下降趋势。

研究表明, PI3K-AKT 信号通路可调控多种靶蛋白对细胞凋亡产生影响。Zhou 等^[199]研究表明 PI3K-AKT 通路的激活, 可抑制 p53 蛋白的表达, 进而抑制 B 细胞自发凋亡。Li 等^[200]研究发现, 可通过 PI3K-AKT 和 NF- κ B 的激活, 上调 HIF-1 α , 降低细胞凋亡。PI3K-AKT 通路也可直接影响下游凋亡相关蛋白的表达。例如 Chen 等^[201]在对非小细胞肺癌的研究中发现, PGRN 可通过激活 PI3K-AKT 通路, 促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。在对大鼠的研究中, Zhang 等^[202]研究发现异丙酚通过激活 PI3K-AKT 通路而使 Bcl-2 表达, 产生对蒽环类药物诱导大鼠心肌细胞凋亡的保护作用。Lin 等^[203]研究发现, 可通过抑制 PI3K-AKT 通路的激活, 从而促进 cleaved-Caspase 9/Caspase 9、cleaved-Caspase 3/Caspase 3 的升高, 促进直肠癌细胞的凋亡。Yuan 等^[204]研究表明, BMP4 基因的表达, 可使 PI3K-AKT 通路激活, 进而抑制 Caspase-9 蛋白的表达, 抑制细胞凋亡。以上这些研究都证明了 PI3K-AKT 通路可对细胞凋亡起到负调控作用, 与 4D-LFQ 蛋白质组学定量分析结果一致, 因此, 之后进行 Western blot 试验对所推测通路进行验证, 结果表明, 与 FIPV 处理组相比, Treatment 组中的 EGFR、PI3K、P-AKT 和 Bcl-2 蛋白显著上调, Cleaved-Caspase 9 和 Bax 蛋白显著下调, Bcl-2/Bax 比值显著上升。该 WB 结果与蛋白

质组学定量结果趋势一致。这一结果证明了黄芩苷可促进 PI3K-AKT 通路的上调，与 Zhang^[144]和 Zhao^[155]的研究结果相同。

综上所述，黄芩苷可通过刺激 EGFR 的表达，促进 PI3K 对 AKT 的磷酸化激活，活化的 AKT 可抑制 Caspase 9 和 Bax 促凋亡蛋白的活化，并促进 Bcl-2 抗凋亡蛋白表达以抑制细胞凋亡，进而起到抑制 FIPV 感染的作用。

5 小结

黄芩苷可通过调控 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路来抑制细胞凋亡，进而达到抗 FIPV 感染的作用。包括促进受 FIPV 感染的细胞中 EGFR、PI3K、P-AKT 和 Bcl-2 蛋白的表达，抑制 C-Caspase 9 和 Bax 蛋白的表达。

全文结论

黄芩苷在体外具有抗 FIPV 感染的作用，其可通过调控 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路来抑制细胞凋亡，进而达到抗 FIPV 感染的作用（图 5-1）。

图 5-1 黄芩苷抑制 FIPV 感染的机制

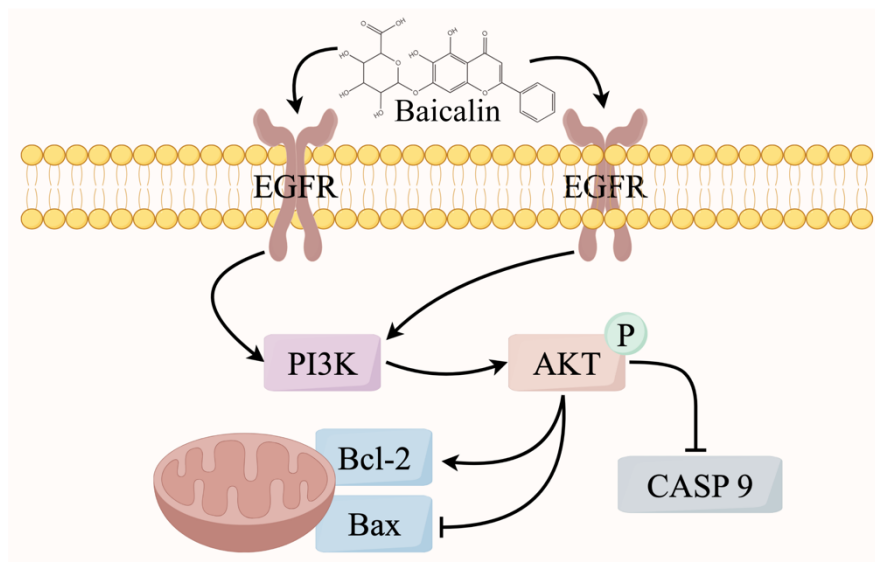


Fig.5-1 Mechanism of Baicalin inhibition of FIPV infection

创新点

- 1、在体外筛选出具有抗猫传染性腹膜炎病毒（FIPV）感染的天然化合物黄芩苷；
- 2、利用网络药理学、分子对接和 4D-LFQ 蛋白质组学联合分析，发现黄芩苷抗 FIPV 感染的潜在作用机制，即通过调控 PI3K-AKT 信号通路和 Apoptosis 通路起到抑制 FIPV 感染的作用，为后续机制的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 尹伊娅, 刘晓雅, 王朝好, 等. 猫传染性腹膜炎研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(5): 933–942.
- [2] Kennedy M A, Kennedy M A. Feline Infectious Peritonitis[J]. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 2020, 50(5): 1001–1011.
- [3] 师志海, 邢会杰, 张一帆, 等. 猫传染性腹膜炎的诊断与防治[J]. 中国兽医杂志, 2006, (8): 48–49.
- [4] Tekes G, Thiel H-J. Feline Coronaviruses[J]. Coronaviruses, 2016, 96: 193–218.
- [5] Lewis C S, Porter E, Matthews D, et al. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(6): 1358–1368.
- [6] Pedersen N C, Eckstrand C, Liu H, et al. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(2–4): 157–166.
- [7] Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong F J, et al. Feline Coronavirus in Multicat Environments[J]. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 2011, 41(6): 1133–1169.
- [8] Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al. Feline Infectious Peritonitis: ABCD Guidelines on Prevention and Management[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(7): 594–604.
- [9] Pedersen N C, Liu H, Gandolfi B, et al. The influence of age and genetics on natural resistance to experimentally induced feline infectious peritonitis[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2014, 162(1–2): 33–40.
- [10] Lin C-N, Su B-L, Huang H-P, et al. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(6): 413–419.
- [11] Takano T, Ohyama T, Kokumoto A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP[J]. Virus Research, 2011, 158(1–2): 161–168.
- [12] Foley J E, Poland A, Carlson J, et al. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1997, 210(9): 1313–1318.
- [13] WANG H, HIRABAYASHI M, CHAMBERS J K, et al. Immunohistochemical studies on meningoencephalitis in feline infectious peritonitis (FIP)[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2018, 80(12): 1813–1817.
- [14] Riemer F, Kuehner K A, Ritz S, et al. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010)[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2016, 18(4): 348–356.
- [15] Montali R J, Strandberg J D. Extraperitoneal Lesions in Feline Infectious Peritonitis[J]. Veterinary Pathology, 1972, 9(2): 109–121.
- [16] 郭力伟, 程亚辉, 魏志超, 等. 猫传染性腹膜炎的流行病学、临床症状、诊断和治疗[J]. 现代畜牧科技, 2021, (8): 85–87.
- [17] 张佳韧, 仇爽, 韦人月, 等. 一例猫传染性腹膜炎的诊断报告[J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(1): 72–74.

- [18] 黄金龙. 抗猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及抗体竞争 ELISA 方法的建立[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2024.
- [19] 黄欣, 侯忠勇, 李浩运, 等. 非渗出型猫传染性腹膜炎的诊断[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(12): 84–85.
- [20] 赵国华, 张爱国, 张健. 猫传染性腹膜炎的诊治体会[J]. 畜牧兽医科技信息, 2009, (12): 91–92.
- [21] 张智文. 大连地区湿性猫传染性腹膜炎发病情况调查与病例分析[D]. 吉林农业大学, 2020.
- [22] Kipar A, Meli M L. Feline Infectious Peritonitis[J]. Veterinary Pathology, 2014, 51(2): 505–526.
- [23] Davidson B J, Paling A C, Lahmers S L, et al. Disease Association and Clinical Assessment of Feline Pericardial Effusion[J]. Journal of the American Animal Hospital Association, 2008, 44(1): 5–9.
- [24] Redford T, Al-Dissi A N. Feline infectious peritonitis in a cat presented because of papular skin lesions[J]. The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne, 2019, 60(2): 183–185.
- [25] Dickinson P J, Bannasch M, Thomasy S M, et al. Antiviral treatment using the adenosine nucleoside analogue GS-441524 in cats with clinically diagnosed neurological feline infectious peritonitis[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2020, 34(4): 1587–1593.
- [26] Weiss R C, Scott F W. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: Comparisons with dengue hemorrhagic fever[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 1981, 4(2): 175–189.
- [27] Satoh R, Furukawa T, Kotake M, et al. Screening and identification of T helper 1 and linear immunodominant antibody-binding epitopes in the spike 2 domain and the nucleocapsid protein of feline infectious peritonitis virus[J]. Vaccine, 2011, 29(9): 1791–1800.
- [28] Pedersen N C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(4): 225–258.
- [29] Murphy B G, Perron M, Murakami E, et al. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 219: 226–233.
- [30] Leibowitz J, Kaufman G, Liu P. Coronaviruses: Propagation, Quantification, Storage, and Construction of Recombinant Mouse Hepatitis Virus[J]. Current Protocols in Microbiology, 2011, 21(1): Unit 15E.1.
- [31] Rottier P J M, Nakamura K, Schellen P, et al. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein[J]. Journal of Virology, 2005, 79(22): 14122–14130.
- [32] Pedersen N C. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis[J]. The Veterinary Journal, 2014, 201(2): 123–132.
- [33] Tekes G, Hofmann-Lehmann R, Stallkamp I, et al. Genome Organization and Reverse Genetic Analysis of a Type I Feline Coronavirus[J]. Journal of Virology, 2008, 82(4): 1851–1859.
- [34] Dye C, Siddell S G. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(8): 2249–2253.
- [35] DEGROOT R, ANDEWEG A, HORZINEK M, et al. Sequence analysis of the 3' end of the feline coronavirus FIPV 79-1146 genome: Comparison with the genome of porcine coronavirus TGEV reveals large insertions[J]. Virology, 1988, 167(2): 370–376.
- [36] Crawford A H, Stoll A L, Sanchez-Masian D, et al. Clinicopathologic Features and Magnetic Resonance Imaging Findings in 24 Cats With Histopathologically Confirmed Neurologic Feline

- Infectious Peritonitis[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2017, 31(5): 1477–1486.
- [37] Wrapp D, Wang N, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260–1263.
- [38] De Wilde A H, Snijder E J, Kikkert M, et al. Host Factors in Coronavirus Replication[J]. *Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection*, 2017, 419: 1–42.
- [39] Yamanaka M, Crisp T, Brown R, et al. Nucleotide sequence of the inter-structural gene region of feline infectious peritonitis virus[J]. *Virus Genes*, 1998, 16(3): 317–318.
- [40] Dedeurwaerder A, Olyslaegers D A J, Desmarests L M B, et al. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- α -induced antiviral response[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(2): 393–402.
- [41] Shuid A N, Safi N, Haghani A, et al. Apoptosis transcriptional mechanism of feline infectious peritonitis virus infected cells[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(11): 1457–1470.
- [42] Kipar A, May H, Menger S, et al. Morphologic Features and Development of Granulomatous Vasculitis in Feline Infectious Peritonitis[J]. *Veterinary Pathology*, 2005, 42(3): 321–330.
- [43] Weitzman M D, Fradet-Turcotte A. Virus DNA Replication and the Host DNA Damage Response[J]. *Annual Review of Virology*, 2018, 5(1): 141–164.
- [44] Wong J P. Broad-spectrum and virus-specific nucleic acid-based antivirals against influenza[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2010, S2(2): 791–800.
- [45] Wang C, Wang T, Dai J, et al. 1-Formyl- β -carboline Derivatives Block Newcastle Disease Virus Proliferation through Suppressing Viral Adsorption and Entry Processes[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1687.
- [46] Amarelle L, Lecuona E, Sznajder J I. Tratamiento antigripal: fármacos actualmente utilizados y nuevos agentes en desarrollo[J]. *Archivos de Bronconeumología*, 2017, 53(1): 19–26.
- [47] Hakobyan A, Arabyan E, Avetisyan A, et al. Apigenin inhibits African swine fever virus infection in vitro[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3445–3453.
- [48] Bao M, Ma Y, Liang M, et al. Research progress on pharmacological effects and new dosage forms of baicalin[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(6): 2773–2784.
- [49] Fu Y, Xu B, Huang S, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(1): 88–96.
- [50] Pan Y, Chen D, Lu Q, et al. Baicalin prevents the apoptosis of endplate chondrocytes by inhibiting the oxidative stress induced by H₂O₂[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(3): 2985–2991.
- [51] Zhang Y, Li X, Ciric B, et al. Therapeutic effect of baicalin on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by SOCS3 regulatory pathway[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 17407.
- [52] Feng H, Zhang K, Zhang K, et al. Antiviral activity and underlying mechanisms of baicalin against avian infectious bronchitis virus *in vitro*[J]. *Avian Pathology*, 2022, 51(6): 574–589.
- [53] Pang P, Zheng K, Wu S, et al. Baicalin Downregulates RLRs Signaling Pathway to Control Influenza A Virus Infection and Improve the Prognosis[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 1–10.
- [54] Tian G, Huang C, Li Z, et al. Baicalin mitigates nephropathogenic infectious bronchitis virus infection-induced spleen injury via modulation of mitophagy and macrophage polarization in Hy-Line chick[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 286: 109891.

- [55] Dinda B, Dinda M, Dinda S, et al. An overview of anti-SARS-CoV-2 and anti-inflammatory potential of baicalein and its metabolite baicalin: Insights into molecular mechanisms[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 258: 115629.
- [56] Sun X-Y, Jia L-Y, Rong Z, et al. Research Advances on Matrine[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 867318.
- [57] Li M, Ying M, Gu S, et al. Matrine alleviates hypoxia-induced inflammation and pulmonary vascular remodelling via RPS5/NF- κ B signalling pathway[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2024, 38(1): e23583.
- [58] Wang J, Zhao B, Wang M, et al. Anti-tumor and Phenotypic Regulation Effect of Matrine on Dendritic Cells through Regulating TLRs Pathway[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2021, 27(7): 520–526.
- [59] Zhang S, Guo S, Gao X, et al. Matrine attenuates high-fat diet-induced in vivo and ox-LDL-induced in vitro vascular injury by regulating the PKC α /eNOS and PI3K/Akt/eNOS pathways[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(4): 2731–2743.
- [60] Yang M-W, Chen F, Zhu D-J, et al. Clinical efficacy of Matrine and Sodium Chloride Injection in treatment of 40 cases of COVID-19[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(10): 2221–2231.
- [61] Zhao Y, Ling X, Zhang H, et al. Network pharmacology and experimental validation to reveal the target of matrine against PRRSV[J]. *iScience*, 2023, 26(4): 106371.
- [62] Cai D, Shen Z, Tian B, et al. Matrine and icariin can inhibit bovine viral diarrhoea virus replication by promoting type I interferon response *in vitro*[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2024, 68(1): 35–44.
- [63] Peng W, Xu Y, Han D, et al. Potential mechanism underlying the effect of matrine on COVID-19 patients revealed through network pharmacological approaches and molecular docking analysis[J]. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2023, 129(1): 253–260.
- [64] Li Y, Cheng Y, Xia H, et al. Study on the controlled release and synergistic anti-oxidant activity in vitro and ex vivo of ligustrazine hydrochloride encapsulated into liposomes[J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 35(6): 1503–1512.
- [65] Jiang R, Xu J, Zhang Y, et al. Ligustrazine Alleviate Acute Lung Injury Through Suppressing Pyroptosis and Apoptosis of Alveolar Macrophages[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 680512.
- [66] Yan S, Yue Y, Zong Y, et al. Tetramethylpyrazine Improves Postoperative Tissue Adhesion: A Drug Repurposing[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2019, 25(7): 554–560.
- [67] Shi X, Zhao S, Chen S, et al. Tetramethylpyrazine in Chinese baijiu: Presence, analysis, formation, and regulation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1004435.
- [68] Sun Y, Song M, Niu L, et al. Antiviral effects of the constituents derived from Chinese herb medicines on infectious bursal disease virus[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51(9): 1137–1143.
- [69] Li P, Ju H, Zhang Y, et al. Discovery of ligustrazine and chalcone derivatives as novel viral nucleoprotein nuclear export inhibitors against influenza viruses[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(7): e28968.
- [70] Singla R K, Dubey A K, Garg A, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures[J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 102(5): 1397–1400.
- [71] Paciello F, Di Pino A, Rolesi R, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of caffeic acid: in vivo evidences in a model of noise-induced hearing loss[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020,

- 143: 111555.
- [72] Zielińska D, Zieliński H, Laparra-Llopis J M, et al. Caffeic Acid Modulates Processes Associated with Intestinal Inflammation[J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 554.
 - [73] Tajner-Czopek A, Gertchen M, Rytel E, et al. Study of Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants Having High Content of Caffeic Acid Derivatives[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(5): 412.
 - [74] GULCIN I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)[J]. *Toxicology*, 2006, 217(2–3): 213–220.
 - [75] Mirzaei S, Gholami M H, Zabolian A, et al. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 171: 105759.
 - [76] Alam M, Ahmed S, Elasbali A M, et al. Therapeutic Implications of Caffeic Acid in Cancer and Neurological Diseases[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 860508.
 - [77] Ogawa M, Shirasago Y, Ando S, et al. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2018, 24(8): 597–601.
 - [78] Saivish M V, Pacca C C, Da Costa V G, et al. Caffeic Acid Has Antiviral Activity against Ilhéus Virus In Vitro[J]. *Viruses*, 2023, 15(2): 494.
 - [79] Shirasago Y, Inamori Y, Suzuki T, et al. Inhibition Mechanisms of Hepatitis C Virus Infection by Caffeic Acid and Tannic Acid[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 42(5): 770–777.
 - [80] Sun Z-G, Zhao T-T, Lu N, et al. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(10): 826–832.
 - [81] Chung J G. Inhibitory Actions of Glycyrrhizic Acid on Arylamine N-Acetyltransferase Activity in Strains of *Helicobacter Pylori* from Peptic Ulcer Patients[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 1998, 21(3): 355–370.
 - [82] Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, et al. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(8): 1905–1914.
 - [83] Lin J-C. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro[J]. *Antiviral Research*, 2003, 59(1): 41–47.
 - [84] Zhao Z, Xiao Y, Xu L, et al. Glycyrrhizic Acid Nanoparticles as Antiviral and Anti-inflammatory Agents for COVID-19 Treatment[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(18): 20995–21006.
 - [85] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9374): 2045–2046.
 - [86] Li B, Wang Y, Gong S, et al. Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics[J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154198.
 - [87] She S, Liu W, Li T, et al. Effects of puerarin in STZ-induced diabetic rats by oxidative stress and the TGF- β 1/Smad2 pathway[J]. *Food Funct.*, 2014, 5(5): 944–950.
 - [88] Liang W, Li X, Wang H, et al. Puerarin: A Potential Therapeutic for SARS-CoV-2 and Hantavirus Co-Infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 892350.
 - [89] Wu M, Zhang Q, Yi D, et al. Quantitative Proteomic Analysis Reveals Antiviral and Anti-inflammatory Effects of Puerarin in Piglets Infected With Porcine Epidemic Diarrhea Virus[J].

- Frontiers in Immunology, 2020, 11: 169.
- [90] Wang H, Zeng M, Ye Y, et al. Antiviral activity of puerarin as potent inhibitor of influenza virus neuraminidase[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(1): 324–336.
 - [91] Guo Y-J, Luo T, Wu F, et al. Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia[J]. *Life Sciences*, 2015, 127: 12–18.
 - [92] Ding Y, Cao Z, Cao L, et al. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 45723.
 - [93] Abaidullah M, Peng S, Song X, et al. Chlorogenic acid is a positive regulator of MDA5, TLR7 and NF- κ B signaling pathways mediated antiviral responses against Gammacoronavirus infection[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 96: 107671.
 - [94] Li Y, Yang D, Jia Y, et al. Research Note: Anti-inflammatory effects and antiviral activities of baicalein and chlorogenic acid against infectious bursal disease virus in embryonic eggs[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(4): 100987.
 - [95] Elebeedy D, Elkhatib W F, Kandeil A, et al. Anti-SARS-CoV-2 activities of tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid, baicalein, and glycyrrhetinic acid between computational and *in vitro* insights[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(47): 29267–29286.
 - [96] Du X, Wang X, Cui K, et al. Tanshinone IIA and Astragaloside IV Inhibit miR-223/JAK2/STAT1 Signalling Pathway to Alleviate Lipopolysaccharide-Induced Damage in Nucleus Pulposus Cells[J]. *Disease Markers*, 2021, 2021: 1–12.
 - [97] Guo G, Zhao Q, Wang Q, et al. Tanshinone IIA Ameliorate Coxsackie Virus B3-Induced Viral Myocarditis through the Inhibition of Inflammation and Modulation T Helper 1/T Helper 2 Balance in Mice[J]. *Pharmacology*, 2019, 103(3–4): 136–142.
 - [98] Wang F, Ma J, Wang K S, et al. Blockade of TNF- α -induced NF- κ B signaling pathway and anti-cancer therapeutic response of dihydrotanshinone I[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(1): 764–772.
 - [99] Li X, Yang J H, Jin Y, et al. 15,16-Dihydrotanshinone I suppresses IgE-Ag stimulated mouse bone marrow-derived mast cell activation by inhibiting Syk kinase[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 169: 138–144.
 - [100] Zhao W, Li C, Zhang H, et al. Dihydrotanshinone I Attenuates Plaque Vulnerability in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Role of Receptor-Interacting Protein 3[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 34(5): 351–363.
 - [101] Filippova N, Yang X, Ananthan S, et al. Hu antigen R (HuR) multimerization contributes to glioma disease progression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(41): 16999–17010.
 - [102] Lim C T, Tan K W, Wu M, et al. Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of Nsp3 papain-like protease[J]. *Biochemical Journal*, 2021, 478(13): 2517–2531.
 - [103] Friboulet A, Thomas D. Systems Biology—an interdisciplinary approach[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(12): 2404–2407.
 - [104] Yuan Z, Pan Y, Leng T, et al. Progress and Prospects of Research Ideas and Methods in the Network Pharmacology of Traditional Chinese Medicine[J]. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2023, 25: 218–226.
 - [105] Han J, Hou J, Liu Y, et al. Using Network Pharmacology to Explore the Mechanism of Panax notoginseng in the Treatment of Myocardial Fibrosis[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2022, 2022:

1–13.

- [106] Zhou W, Zhang H, Wang X, et al. Network pharmacology to unveil the mechanism of Moluodan in the treatment of chronic atrophic gastritis[J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153837.
- [107] Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4331.
- [108] Dong Y, Tao B, Xue X, et al. Molecular mechanism of Epicedium treatment for depression based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 222.
- [109] Xia Q, Xun Y, Lu J, et al. Network pharmacology and molecular docking analyses on Lianhua Qingwen capsule indicate Akt1 is a potential target to treat and prevent COVID-19[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(12): e12949.
- [110] Li X, Wei S, Niu S, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2022, 144: 105389.
- [111] Wang Z, Li M, Li W, et al. Mechanism of action of Daqinjiao decoction in treating cerebral small vessel disease explored using network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154538.
- [112] Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, et al. Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2228: 85–116.
- [113] Trautwein-Schult A, Bartel J, Maaß S, et al. Metabolic Labeling of *Clostridioides difficile* Proteins[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2228: 271–282.
- [114] Bantscheff M, Lemeer S, Savitski M M, et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(4): 939–965.
- [115] Silbern I, Fang P, Ji Y, et al. Relative Quantification of Phosphorylated and Glycosylated Peptides from the Same Sample Using Isobaric Chemical Labelling with a Two-Step Enrichment Strategy[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2228: 185–203.
- [116] Meier F, Geyer P E, Virreira Winter S, et al. BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(6): 440–448.
- [117] Cox J, Neuhauser N, Michalski A, et al. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(4): 1794–1805.
- [118] Cox J, Hein M Y, Lubner C A, et al. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(9): 2513–2526.
- [119] Liu T, Zhou J, Cui H, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics reveals the neuroprotection of rhubarb in experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 232: 244–254.
- [120] Tao Z, Chen J, Su J, et al. Quantitative Proteomics Analysis of Systemic Responses and Biological Mechanisms of ShuFengJieDu Capsule Using H1N1-Infected RAW264.7 Cells[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(25): 15417–15423.
- [121] Felten S, Hartmann K. Diagnosis of Feline Infectious Peritonitis: A Review of the Current Literature[J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 1068.
- [122] Zhang Z, Morris-Natschke S L, Cheng Y, et al. Development of anti-influenza agents from natural

- products[J]. Medicinal Research Reviews, 2020, 40(6): 2290–2338.
- [123] Ai H, Wu X, Qi M, et al. Study on the Mechanisms of Active Compounds in Traditional Chinese Medicine for the Treatment of Influenza Virus by Virtual Screening[J]. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2018, 10(2): 320–328.
- [124] Theerawatanasirikul S, Kuo C J, Phetcharat N, et al. In silico and in vitro analysis of small molecules and natural compounds targeting the 3CL protease of feline infectious peritonitis virus[J]. Antiviral Research, 2020, 174: 104697.
- [125] LI S, CHEN C, ZHANG H, et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus[J]. Antiviral Research, 2005, 67(1): 18–23.
- [126] Chávez J H, Leal P C, Yunes R A, et al. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 116(1–3): 53–59.
- [127] Glatthaar-Saalmüller B, Rauchhaus U, Rode S, et al. Antiviral activity in vitro of two preparations of the herbal medicinal product Sinupret® against viruses causing respiratory infections[J]. Phytomedicine, 2011, 19(1): 1–7.
- [128] Wei Z, Gao R, Sun Z, et al. Baicalin inhibits influenza A (H1N1)-induced pyroptosis of lung alveolar epithelial cells via caspase-3/GSDME pathway[J]. Journal of Medical Virology, 2023, 95(5): e28790.
- [129] Guo L-T, Wang S-Q, Su J, et al. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway[J]. Journal of Neuroinflammation, 2019, 16(1): 95.
- [130] Jin J, Chen Y, Wang D, et al. The inhibitory effect of sodium baicalin on oseltamivir-resistant influenza A virus via reduction of neuraminidase activity[J]. Archives of Pharmacal Research, 2018, 41(6): 664–676.
- [131] Ding Y, Dou J, Teng Z, et al. Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase[J]. Archives of Virology, 2014, 159(12): 3269–3278.
- [132] Xia C, Tang W, Geng P, et al. Baicalin down-regulating hepatitis B virus transcription depends on the liver-specific HNF4 α -HNF1 α axis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2020, 403: 115131.
- [133] Shi H, Ren K, Lv B, et al. Baicalin from *Scutellaria baicalensis* blocks respiratory syncytial virus (RSV) infection and reduces inflammatory cell infiltration and lung injury in mice[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 35851.
- [134] Boozari M, Hosseinzadeh H. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies[J]. Phytotherapy Research, 2021, 35(2): 864–876.
- [135] Álvarez Á L, Habtemariam S, Juan-Badaturge M, et al. *In vitro* anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds: An approach to their mechanisms of action[J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(2): 296–301.
- [136] Chen Y, Yuan W, Yang Y, et al. Inhibition mechanisms of baicalin and its phospholipid complex against DHAV-1 replication[J]. Poultry Science, 2018, 97(11): 3816–3825.
- [137] Delputte P L, Costers S, Nauwynck H J. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(5): 1441–1445.
- [138] Xiang Y, Pei Y, Qu C, et al. In vitro Anti-Herpes Simplex Virus Activity of 1,2,4,6-Tetra-O-galloyl- β -D-glucose from *Phyllanthus emblica* L. (Euphorbiaceae)[J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(7): 975–982.

- [139] 孙娜. 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 天然化合物的体外筛选及其抗病毒机制研究[D]. 山西农业大学, 2013.
- [140] Dong C-X, Hayashi K, Mizukoshi Y, et al. Structures of acidic polysaccharides from *Basella rubra* L. and their antiviral effects[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(3): 1084–1092.
- [141] Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals—A review[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 81(4): 1133–1143.
- [142] D’Arcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(6): 582–592.
- [143] Yu H, Chen B, Ren Q. Baicalin relieves hypoxia-aroused H9c2 cell apoptosis by activating Nrf2/HO-1-mediated HIF1 α /BNIP3 pathway[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 3657–3663.
- [144] Zhang Q, Zhao R, Wu X, et al. Baicalin attenuates blood-spinal cord barrier disruption and apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway after spinal cord injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2022, 17(5): 1080.
- [145] Jiashuo W U, Fangqing Z, Zhuangzhuang L I, et al. Integration strategy of network pharmacology in Traditional Chinese Medicine: a narrative review[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2022, 42(3): 479–486.
- [146] Zhao Y, Tao J, Chen Z, et al. Functional drug–target–disease network analysis of gene–phenotype connectivity for curcumin in hepatocellular carcinoma[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e12339.
- [147] Han X, Xie R, Li X, et al. SmileGNN: Drug–Drug Interaction Prediction Based on the SMILES and Graph Neural Network[J]. *Life*, 2022, 12(2): 319.
- [148] Amiri Souri E, Laddach R, Karagiannis S N, et al. Novel drug-target interactions via link prediction and network embedding[J]. *BMC Bioinformatics*, 2022, 23(1): 121.
- [149] Sadegh S, Skelton J, Anastasi E, et al. Network medicine for disease module identification and drug repurposing with the NeDRex platform[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6848.
- [150] Castresana-Aguirre M, Guala D, Sonnhammer E L L. Benefits and Challenges of Pre-clustered Network-Based Pathway Analysis[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 855766.
- [151] CSERMELY P, AGOSTON V, PONGOR S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, 26(4): 178–182.
- [152] Jiao X, Jin X, Ma Y, et al. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine[J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2021, 90: 107402.
- [153] Liu F, Li Y, Yang Y, et al. Study on mechanism of matrine in treatment of COVID-19 combined with liver injury by network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Drug Delivery*, 2021, 28(1): 325–342.
- [154] Ma L, Wu F, Shao Q, et al. Baicalin Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Nephropathy via Nrf2 and MAPK Signaling Pathway[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, Volume 15: 3207–3221.
- [155] Zhao N, Shi J, Xu H, et al. Baicalin suppresses glaucoma pathogenesis by regulating the PI3K/AKT signaling in vitro and in vivo[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10187–10198.
- [156] Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D1388–D1395.
- [157] Wang X, Shen Y, Wang S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target

- p>identification with a comprehensive target pharmacophore database[J].
- Nucleic Acids Research*
- , 2017, 45(W1): W356–W360.
- [158] Liu X, Ouyang S, Yu B, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(suppl_2): W609–W614.
 - [159] Wang X, Pan C, Gong J, et al. Enhancing the Enrichment of Pharmacophore-Based Target Prediction for the Polypharmacological Profiles of Drugs[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2016, 56(6): 1175–1183.
 - [160] Safran M, Rosen N, Twik M, et al. The GeneCards Suite[G]//ABUGESSAISA I, KASUKAWA T. *Practical Guide to Life Science Databases*. Singapore: Springer Nature, 2021: 27–56.
 - [161] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1.30.1-1.30.33.
 - [162] UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D523–D531.
 - [163] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D638–D646.
 - [164] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498–2504.
 - [165] Tang Y, Li M, Wang J, et al. CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67–72.
 - [166] Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Systems Biology*, 2014, 8(S4): S11.
 - [167] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1523.
 - [168] Duan Z, Wang Y, Lu Z, et al. Wumei Wan attenuates angiogenesis and inflammation by modulating RAGE signaling pathway in IBD: Network pharmacology analysis and experimental evidence[J]. *Phytomedicine*, 2023, 111: 154658.
 - [169] Zhong M, Zhu E, Li N, et al. Identification of diagnostic markers related to oxidative stress and inflammatory response in diabetic kidney disease by machine learning algorithms: Evidence from human transcriptomic data and mouse experiments[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1134325.
 - [170] Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis[J]. *Archives of Dermatological Research*, 2019, 311(2): 83–91.
 - [171] Hers I, Vincent E E, Tavaré J M. Akt signalling in health and disease[J]. *Cellular Signalling*, 2011, 23(10): 1515–1527.
 - [172] Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, et al. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2008, 8(3): 187–198.
 - [173] Zhou B, Tan P, Jia L, et al. PI3K/AKT signaling pathway involvement in fluoride-induced apoptosis in C2C12 cells[J]. *Chemosphere*, 2018, 199: 297–302.
 - [174] Long X, Wong C C, Tong L, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* promotes colorectal carcinogenesis and modulates tumour immunity[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2319–2330.
 - [175] Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(9): 797.

- [176] 周协琛. 马齿苋多糖抗 PoRV 感染作用及其调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路机制研究[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2023.
- [177] Lu X, Masic A, Li Y, et al. The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1[J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91(6): 1439–1449.
- [178] Tang Q, Luan F, Yuan A, et al. Sophoridine Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Blocking the Activation of Cellular PI3K/Akt and p38 MAPK Pathways[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 872505.
- [179] Hou Y, Pi C, Feng X, et al. Antitumor Activity In Vivo and Vitro of New Chiral Derivatives of Baicalin and Induced Apoptosis via the PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2020, 19: 67–78.
- [180] Huang Y, Hu J, Zheng J, et al. Down-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of apoptosis in CA46 Burkitt lymphoma cells by baicalin[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2012, 31(1): 48.
- [181] Ding Y, Li J, Shan H, et al. Biomarker study of symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis in patients with acute ischemic stroke[J]. *Frontiers in Neurology*, 2023, 14: 1291929.
- [182] Li Y, Shi X, Xu J, et al. Proteomics-based analysis on the stress response mechanism of *Bidens pilosa* L. under cadmium exposure[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 462: 132761.
- [183] Duan S, Zhang M, Zeng H, et al. Integrated proteomics and phosphoproteomics profiling reveals the cardioprotective mechanism of bioactive compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* Burge[J]. *Phytomedicine*, 2023, 117: 154897.
- [184] Chen C-Y, Rao S-S, Ren L, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1607–1623.
- [185] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers[J]. *Science*, 2004, 304(5670): 554–554.
- [186] Carson J D, Van Aller G, Lehr R, et al. Effects of oncogenic p110 α subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 409(2): 519–524.
- [187] Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, et al. Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(11): 4562–4567.
- [188] Zhao L, Vogt P K. Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(7): 2652–2657.
- [189] Kang S, Bader A G, Vogt P K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(3): 802–807.
- [190] Horn D, Hess J, Freier K, et al. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2015, 19(6): 795–805.
- [191] Tiemin P, Fanzheng M, Peng X, et al. MUC13 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression via EGFR/PI3K/AKT pathways[J]. *Journal of Hepatology*, 2020, 72(4): 761–773.
- [192] Li Q, Shi C, Sun L, et al. Saikosaponin-A Exhibits Antipancreatic Cancer Activity by Targeting the EGFR/PI3K/Akt Pathway[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2023, 24(4): 579–588.
- [193] Parrish A B, Freel C D, Kornbluth S. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(6): a008672–a008672.

- [194] Robertson G S, Crocker S J, Nicholson D W, et al. Neuroprotection by the Inhibition of Apoptosis[J]. Brain Pathology, 2000, 10(2): 283–292.
- [195] Würstle M L, Laussmann M A, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome[J]. Experimental Cell Research, 2012, 318(11): 1213–1220.
- [196] Unnisa A, Greig N H, Kamal M A. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 Mediated Apoptosis: A Multimodal Therapeutic Target in Traumatic Brain Injury[J]. Current Neuropharmacology, 2023, 21(4): 1001–1012.
- [197] Brunelle J K, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. Journal of Cell Science, 2009, 122(4): 437–441.
- [198] Maarouf R E, Azab K S, El Fatih N M, et al. Withania *somnifera* Alter BCL2/Bax signaling and trigger apoptosis of MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells exposed to γ -radiation[J]. Human & Experimental Toxicology, 2023, 42: 096032712311808.
- [199] Zhou Y, Zhen H, Mei Y, et al. PI3K/AKT Mediated P53 Down-Regulation Participates in CpG DNA Inhibition of Spontaneous B Cell Apoptosis[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2009, 6(3): 175–180.
- [200] Li Y, Xia J, Jiang N, et al. Corin protects H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/AKT and NF- κ B pathway in cardiomyocytes[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 594–599.
- [201] Chen S, Bie M, Wang X, et al. PGRN exacerbates the progression of non-small cell lung cancer via PI3K/AKT/Bcl-2 antiapoptotic signaling[J]. Genes & Diseases, 2022, 9(6): 1650–1661.
- [202] Zhang X, Wang X, Liu X, et al. Myocardial protection of propofol on apoptosis induced by anthracycline by PI3K/AKT/Bcl-2 pathway in rats[J]. Annals of Translational Medicine, 2022, 10(10): 555–555.
- [203] Lin F, Zhang G, Yang X, et al. A network pharmacology approach and experimental validation to investigate the anticancer mechanism and potential active targets of ethanol extract of Wei-Tong-Xin against colorectal cancer through induction of apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 303: 115933.
- [204] Yuan J, Deng Y, Zhang Y, et al. Bmp4 inhibits goose granulosa cell apoptosis via PI3K/AKT/Caspase-9 signaling pathway[J]. Animal Reproduction Science, 2019, 200: 86–95.

In vitro screening of natural compounds against FIPV and study of their antiviral mechanisms

Abstract

Objective: To screen compounds with in vitro anti-Feline infectious peritonitis virus (FIPV) effects from nine natural compounds and to preliminarily explore the anti-FIPV mechanisms of the screened compounds using network pharmacology, molecular docking and 4D-LFQ proteomics techniques.

Methods: 1. The cytopathologic effect (CPE) and CCK8 methods were used to determine the maximum non-cytotoxic concentration (MNTC), 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), 50% effective concentration (EC_{50}) and the maximal inhibition ratio (MIR) of the compounds on FIPV. The compounds with a selection index (SI) greater than 3 and MIR higher than 50% were selected, and then the antiviral effects of the screened drugs were explained by replication inhibition assay, adsorption inhibition assay, direct virus inactivation assay and apoptosis detection assay.

2. The potential targets of Baicalin against FIPV infection were screened by PubChem and GeneCards; the target protein-protein interaction (PPI) network was constructed using STRING and Cytoscape, and the potential targets were analysed using Metascape for GO and KEGG enrichment analysis. Nine topological analyses were performed using Cytoscape to obtain the key targets of action. Afterwards, Molecular Docking analysis was performed using UCSF Chimera to screen the best binding targets and explore the potential mechanism of action of Baicalin against FIPV infection.

3. The cell model of Baicalin against FIPV infection was prepared by co-incubating CRFK cells with the drug and the virus, and the viral load of cells at different infection times was detected using RT-qPCR to select the optimal time for the drug's action, after which the cells were collected, the total proteins extracted, and 4D-LFQ proteomics analyses were performed. Peptides were peptide annotated using the NCBI *Felis catus* database, differentially expressed proteins (DEPs) were screened according to the screening criterion of $P < 0.05$, and DEPs were enriched and analysed using the GO database and the KEGG database.

Results: 1. The results of drug inhibition of FIPV infection showed that Baicalin inhibited FIPV infection by 79.5% with an SI of 5.5, and the rest of the drugs inhibited it by less than 50%; the results of drug influence on FIPV replication showed that Baicalin had an inhibitory effect of more than 50% within 8 h of viral infection; the results of the drug affecting FIPV adsorption showed that Baicalin was ineffective in preventing

FIPV adsorption to CRFK cells; the results of direct inactivation of FIPV by the drug showed complete inactivation of FIPV when the drug and venom were co-cultured for 150 min. The results of the drug on apoptosis showed that Baicalin significantly inhibited FIPV-induced apoptosis ($P < 0.05$).

2. PubChem and GeneCards were used to screen the potential targets of Baicalin against FIPV infection, and a total of 17 potential targets were screened. Through CytoHubba analysis, two key targets, AKT1 and ESR1, were finally obtained, and Molecular Docking analysis was performed on the key targets, which showed that compared with the ESR1, the AKT1 had two hydrogen bonds with Baicalin drug molecules and a better affinity with a binding free energy of -7.9 kcal/mol.

3. The optimal infection time of the cell model was determined to be 48 h using RT-qPCR, after which the total protein of the samples was extracted and quality assayed according to this infection time. 4D-LFQ proteomics analysis was performed after satisfying the histological mass spectrometry conditions. The histological results showed that a total of 6546 proteins were detected by 4D-LFQ proteomics, among which 6456, 6430 and 6486 proteins were detected in the Control group, FIPV group and Treatment group, respectively, with a total of 6346 proteins among the three groups. The DEPs were screened according to $P < 0.05$, and there were 257 up-regulated proteins and 238 down-regulated proteins in the Treatment/FIPV group; 940 up-regulated proteins and 452 down-regulated proteins in the Treatment/Control group; and 678 up-regulated proteins and 390 down-regulated proteins in the FIPV/Control group. Enrichment analysis of DEPs was performed, and the GO enrichment results showed that metabolic process, protein binding, nucleic acid binding, cytoplasmic and cytoplasmic parts, etc.; the KEGG enrichment results showed that the DEPs were mainly enriched in the PI3K-AKT signaling pathway, Apoptosis pathway and HIF-1 signaling pathway, etc. Based on the results of points 1 and 2, the PI3K-AKT signaling pathway and Apoptosis pathway were selected for subsequent studies. The heat map of the PI3K-AKT signaling pathway and Apoptosis pathway was drawn, and the results showed that there were significant changes in PIK3CA and CASP 9; pathway-associated proteins were analyzed using volcano plots and quantitative histological results. Volcano plots and quantitative analyses showed that compared with the FIPV group, the Treatment group showed significant up-regulation of EGFR, PIK3CA, and AKT2 proteins ($P < 0.05$), a trend towards an increase in AKT3 and BCL2L1, significant down-regulation of CASP 9 proteins ($P < 0.05$), and a significant down-regulation of Bax. Finally, Western blot was used to validate the key proteins of the pathway, and the results showed that compared with the FIPV group, EGFR, PI3K, P-AKT and Bcl-2 proteins were significantly up-regulated in

the Treatment group ($P < 0.05$), C-Caspase 9 and Bax proteins were significantly down-regulated ($P < 0.05$) and Bcl-2/Bax significantly upregulated ($P < 0.05$).

Conclusions: Baicalin has an anti-FIPV infection effect in vitro, possibly by regulating the PI3K-AKT signaling pathway and Apoptosis pathway.

Keywords: Baicalin; Feline infectious peritonitis; Network Pharmacology; Molecular Docking; 4D-LFQ proteomics