

张财盛, 陈欢, 司安琪, 等. 依福地平对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 62-68.

ZHANG C S, CHEN H, SI A Q, et al. Inhibition of efonidipine on porcine epidemic diarrhea virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 62-68.

依福地平对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究

张财盛, 陈欢, 司安琪, 赵普, 齐传翔, 钱莺娟, 郑龙三*, 戴建君

(南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室/农业农村部细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是猪流行性腹泻 (PED) 的病原。本研究通过 CCK-8、细胞 ELISA、Western blot、时间过程分析、药物抑制病毒吸附和入胞试验, 探究了依福地平对 PEDV 的抑制作用。结果表明, 依福地平在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 对 Vero-E6 和 Marc-145 细胞毒性较低; Western blot 结果表明, 依福地平能够显著降低宿主细胞中 PEDV-N 蛋白水平, 主要抑制 PEDV 感染的入胞阶段。研究还发现, 依福地平能抑制 I 型单纯疱疹病毒和猪伪狂犬病毒感染宿主细胞, 是一类潜在的广谱抗病毒药物。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 依福地平; 病毒入胞; 广谱抗病毒效应

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)03-0062-07

Inhibition of efonidipine on porcine epidemic diarrhea virus

ZHANG Caisheng, CHEN Huan, SI Anqi, ZHAO Pu, QI Chuanxiang,

QIAN Yingjuan, JUNG Yongsam*, DAI Jianjun

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/MOE Joint International Research Laboratory of Animal Health and Food Safety/Key Laboratory of Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is the causative agent of porcine epidemic diarrhea (PED). In this study, CCK-8, Cell-based ELISA, Western blot, Time-of-addition assay and viral binding and entry assay were performed to determine the inhibitory effect and molecular mechanism of efonidipine on PEDV infection. The results showed that efonidipine had low cytotoxicity on Vero-E6 and Marc-145 cells within the concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$. Meanwhile, the Western blot results showed that efonidipine significantly inhibited the expression level of the PEDV-N protein on the susceptible cells, mainly inhibiting the entry stage of PEDV. Also, efonidipine was able to inhibit the infection of host cells with herpes simplex virus type I (HSV-1) and porcine pseudorabies virus (PRV), making it a potential broad-spectrum antiviral drug.

Keywords: PEDV; efonidipine; viral entry; broad-spectrum antiviral effect

猪流行性腹泻病毒 (porcine Epidemic Diarrhea virus, PEDV) 是危害养猪业的重要疫病之一, 可感染各个年龄段的猪, 其中, 对哺乳仔猪的危害最为严重, 死亡率高达 100%。PEDV 属于 α -冠状病毒, 极易发生突变^[1-2]。高致病性 PEDV 自 2010 年底在我国猪场大规模暴发后, 呈持续流行趋势。美国、日本和韩国也相继发生严重疫情, 给养猪业造成了重大经

济损失。近年来, 多种突变株在不同地区不断出现, 突破现有疫苗保护, 加剧了防控难度^[3-4]。

依福地平是一种 L 型和 T 型钙离子通道阻滞剂, 化学名为: 5-(5, 5-二甲基-2-氧代-1, 3, 2-二氧杂环己-2-基)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-3-吡啶羧酸-2-[苯基(苄基)氨基]己酯^[5-6]。依福地平是由日产化学工业公司和泽里亚新药公司联合研发, 于 1994 年首次在日本上市。该药常用于原发性高血压、肾性高血压、心律失常、心力衰竭和心绞痛的治疗。除此之外, 最新研究表明, 依福地平还可用于地中海贫血患者铁螯合疗法中铁螯合剂的替代药物, 且副作用小^[7-9]。目前, 对于依福地平的抗病毒效果的研究较少。

本研究发现依福地平在体外具有抗 PEDV、I 型

收稿日期: 2023-05-29; 修回日期: 2024-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U19A2039, 31900141); 中央高校基本业务费项目 (KJQN202022); 江苏省高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

第一作者: 张财盛, 男, 硕士

* 通信作者: 郑龙三, 韩国, 教授, 研究方向: 动物传染病防控,

E-mail: ysjung@njau.edu.cn.

单纯疱疹病毒 (HSV-1) 和伪狂犬病毒 (PRV) 的活性, 是一类广谱抗病毒药物, 并初步探索了依福地平抑制 PEDV 感染的作用阶段, 为后续研究依福地平抗病毒感染的机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 细胞

非洲绿猴肾细胞系 Vero-E6 和 Marc-145 以及猪肾细胞系 PK-15 均为本实验室保存。

1.2 病毒

猪流行性腹泻病毒 HLJBY 毒株和 CV777 毒株, I 型单纯疱疹病毒 HSV-F 毒株和伪狂犬病毒 JSY13 毒株, 均为本实验室保存。

1.3 抗体及其他试剂

抗体: PEDV-N 兔多克隆抗体、PRV-UL42 鼠多克隆抗体和 HSV-UL42 鼠多克隆抗体由本实验室制备并保存。actin 抗体购自美国 Proteintech Group 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自美国 Millipore 公司。

其他试剂: 依福地平购自美国 Selleck 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒购自美国 APEXBio 公司; 多聚甲醛购自德国 MERCK 公司; TMB 显色液购自中国天根生化科技 (北京) 有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Biological 公司; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 购自美国 Invitrogen 公司; 青霉素-链霉素购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 胰酶购自美国 Amresco 公司。蛋白 Marker 和增强型化学发光试剂 (Enhanced Chemiluminescence, ECL) 购自美国 Thermo 公司; RNA 提取试剂盒购自上海浦迪生物科技有限公司; 半定量 RT-PCR 试剂盒和 2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.4 药物的细胞毒性测定

以 1.5×10^4 个细胞/孔的密度将细胞接种到 96 孔板中, 37 °C 培养 12 h。弃掉原培养基, 用 PBS 润洗 3 遍。然后向 96 孔板中加入 100 μ L 含不同浓度药物的完全培养基, 每个药物浓度设置 3 个重复孔, 继续培养 14 h。弃掉含有药物的培养基, 用 PBS 润洗 3 遍。然后, 在避光条件下, 向 96 孔板中每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 的完全培养基, 将培养板在培养箱中放置 2 h。最后, 在摇床上缓慢摇晃 5 min 后, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度, 使用以下公式计算药物的细胞毒性: 细胞存活率 = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$, 其中 A_s 表示试验孔的吸光度 (含有细胞、培养基、CCK-8 和待测化合物孔的吸光度), A_b 表示空白孔的吸光度 (含有培养基和 CCK-

8 孔的吸光度), A_c 表示对照孔的吸光度 (含有细胞、培养基、CCK-8 和二甲基亚砷孔的吸光度)。

1.5 药物的抑制率测定

以 1.5×10^4 个细胞/孔的密度将细胞接种到 96 孔板中, 37 °C 培养 12 h。弃掉原培养基, 用 PBS 润洗 3 遍。然后向 96 孔板中加入 100 μ L 含不同浓度药物的完全培养基, 每个药物浓度设置 3 个复孔, 继续培养 2 h。弃掉培养基并用 PBS 润洗 3 遍, 随后向 96 孔板中加入 100 μ L 含不同浓度药物以及 1 倍感染复数 (MOI) 病毒的不完全培养基。将 96 孔板放入培养箱中继续培养 1 h。弃培养基用 PBS 润洗 3 遍, 随后加入 100 μ L 含不同浓度药物的病毒维持培养基, 将培养板放在培养箱继续培养至 12 h。弃培养基并用 PBS 润洗 3 遍, 每孔加入 100 μ L 多聚甲醛固定液, 37 °C 固定 30 min。弃掉固定液, 用 Glycine-PBS 溶液润洗 3 遍, 再用 PBS 润洗 3 遍, 随后加入 3% 的 BSA 并置于 37 °C 培养箱封闭 1 h。弃封闭液, 以 100 μ L/孔的量加入一抗, 37 °C 继续孵育 1 h。回收一抗并用 PBS 润洗 3 遍。以 100 μ L/孔的量加入二抗, 37 °C 孵育 1 h。弃去二抗并用 PBS 润洗 3 遍。以 50 μ L/孔的量加入 TMB 显色液, 室温避光显色 30 min。每孔加入 50 μ L 2% H_2SO_4 溶液终止显色。最后在摇床上缓慢摇晃 5 min 后, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度, 使用以下公式计算药物的抑制率: 药物的抑制率 = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$, 其中 A_s 表示试验孔的吸光度 (不同浓度药物处理细胞感染病毒孔的吸光度), A_b 表示空白孔的吸光度 (只含有显色液和终止液的孔的吸光度), A_c 表示对照孔的吸光度 (二甲基亚砷处理细胞感染病毒孔的吸光度)。使用 OriginPro® 2022 统计学软件绘图并计算出半抑制浓度 (IC_{50})。

1.6 Western blot 检测

用适量 2×SDS 缓冲液裂解细胞, 98 °C 煮样 10 min 后即样品准备完毕。按照目的蛋白大小配制不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶, 将 SDS-PAGE 凝胶装置于电泳槽内, 并在电泳槽内加入电泳缓冲液, 随后将制备的蛋白样品加入胶孔内, 当样品处于浓缩胶时, 电泳仪电压为 50 V; 当样品处于分离胶时, 调节电压至 120 V。电泳结束后, 根据目的蛋白大小及蛋白 Marker 剪切凝胶、NC 膜和滤纸。按正极到负极的顺序放置滤纸-NC 膜-蛋白凝胶-滤纸, 并加入转印液, 以 200 mA 的电流转膜 2 h。转印结束后, 将 NC 膜置于抗体孵育盒内, 用 3% 脱脂牛奶在室温封闭 40 min。弃去封闭液, 用 3% 脱脂乳稀释的目的蛋白一抗在 4 °C 摇床孵育过夜。回收一抗, 用 PBST 洗膜 3 次以去除未结合的一抗, 每次洗膜时间分别为 10 min、

10 min和15 min;再加入3%脱脂乳稀释的二抗,置于4℃摇床孵育4~6 h,回收二抗,用PBST洗膜3次以去除未结合的二抗,洗膜方法同上。用滤纸吸净NC膜上残余PBST,然后将ECL A液与B液1:100混合后浸润NC膜,最后将NC膜置于UVP发光成像仪中进行显影成像。

1.7 半定量 RT-PCR

按照试剂盒说明书提取细胞总RNA,反转录获得cDNA。半定量RT-PCR反应体系为25 μL,其中12.5 μL 2×Taq Master Mix, 1 μL正向引物, 1 μL反向引物, 1 μL cDNA和9.5 μL ddH₂O。反应程序为95℃预变性3 min; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 10 s, 72℃ 5 min,共20个循环。用于半定量RT-PCR的引物序列如表1所示。

表1 半定量 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
PEDV-N	F: CTAACCTGGGTGTGACAAAGGC	22
	R: GACCCTGGTTATTTCACGATT	22
actin	F: ACACTGTGCCCATCTACGAGG	21
	R: TTGCCAATGCTGATGACCTG	20

1.8 药物直接靶向病毒试验

参考文献中常用的药物直接靶向病毒试验^[10-11],并进行适当优化。

将Vero-E6细胞按照 5×10^5 个/孔接种到6孔板中,37℃培养12 h,弃营养液,用PBS润洗3遍。将1 MOI HLJBY病毒液与不同浓度的药物混合,在37℃孵育1 h,随后使用2 mL无血清DMEM稀释病毒与药物的混合液,将稀释后的混合液加入到6孔板中,37℃孵育1 h, PBS润洗3遍。每孔加入2 mL PEDV维持培养基,37℃继续培养至12 h,弃掉培养基,用PBS润洗3遍。加入适量2×SDS上样缓冲液收集细胞样品,进行Western blot检测病毒蛋白PEDV-N表达水平。

1.9 药物抑制病毒吸附试验

参考文献中常用的药物抑制病毒吸附试验^[11-13],并进行适当的优化。

将Vero-E6细胞按照 8×10^5 个/孔接种到6孔板中,37℃培养12 h,弃掉营养液, PBS润洗3遍,换成含有药物的细胞完全培养基继续培养2 h,其中1 h在37℃,另外1 h在4℃(在4℃条件下,细胞膜变脆性, PEDV粒子只能吸附在细胞表面,而不能入胞)。弃掉培养基,用4℃ PBS润洗3遍,接着用1 MOI HLJBY感染细胞,并处理药物,在4℃继续培

养1 h。随后弃去培养基,用4℃ PBS润洗3遍,充分洗掉未吸附在细胞表面的病毒粒子。随后使用RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,反转录获得cDNA,进行半定量RT-PCR试验检测细胞中病毒蛋白PEDV-N mRNA水平。

1.10 药物抑制病毒入胞试验

参考文献中常用的药物抑制病毒入胞试验^[11-13],并进行适当优化。

将Vero-E6细胞按照 8×10^5 个/孔接种到6孔板中,37℃培养12 h。将细胞培养板在4℃预冷1 h后用4℃ PBS润洗3遍,并用1 MOI HLJBY在4℃吸附细胞1 h,随后用4℃ PBS润洗3遍,将未吸附在细胞表面的病毒粒子洗去,接着处理药物,在37℃继续培养2 h使病毒入胞。随后,使用pH=3的柠檬酸盐缓冲液润洗3遍,再用PBS润洗3遍,洗去未能入胞的病毒粒子。最后,每孔加入2 mL PEDV维持培养基,37℃继续培养3 h,用PBS润洗3遍,加入适量2×SDS上样缓冲液收集细胞样品,进行Western blot检测病毒蛋白PEDV-N表达水平。

1.11 依福地平对不同 MOI HSV-1 和 PRV 复制影响的检测

将Vero-E6细胞和PK15细胞按照 8×10^5 个/孔接种到6孔板,37℃培养12 h,弃营养液, PBS润洗3遍,将0.1、0.5和1 MOI HSV-1或PRV与10 μmol/L药物混合,37℃培养1 h, PBS润洗3遍,加入2 mL药物继续培养12 h,再进行Western blot检测。

1.12 数据统计分析

每组试验设立3个重复,并利用GraphPad Prism 5软件对数据进行方差分析。数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 依福地平的细胞毒性及对 PEDV 有效抑制浓度的测定

采用CCK-8法测定依福地平对Vero-E6和Marc-145细胞的毒性。结果表明,在Vero-E6(图1A)和Marc-145细胞(图1B)中,依福地平浓度低于20 μmol/L时,细胞毒性较低,细胞存活率保持在90%以上。

采用基于细胞的ELISA测定依福地平对PEDV的抑制率。结果表明,在Vero-E6细胞中,依福地平对PEDV HLJBY和CV777毒株的IC₅₀分别为13 μmol/L(图2A)和11 μmol/L(图2B);在Marc-145细胞中,依福地平对PEDV HLJBY和CV777毒株的IC₅₀分别为13 μmol/L(图2C)和6 μmol/L

(图 2D)。选取细胞毒性较低且抑制效果较明显的药物浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续研究。

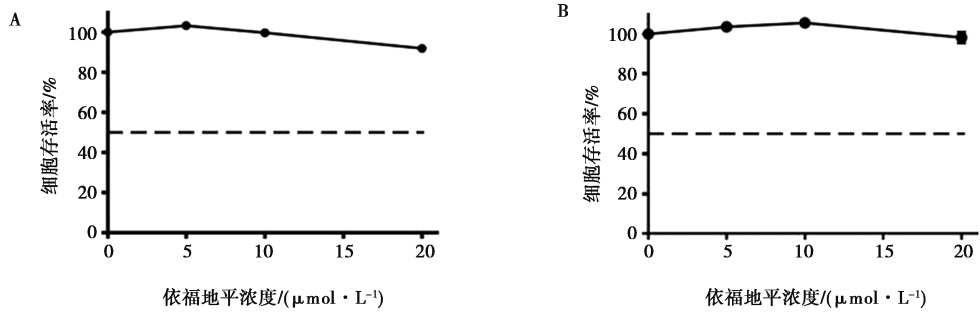


图 1 依福地平对 Vero-E6 (A) 和 Marc-145 细胞 (B) 的毒性测定

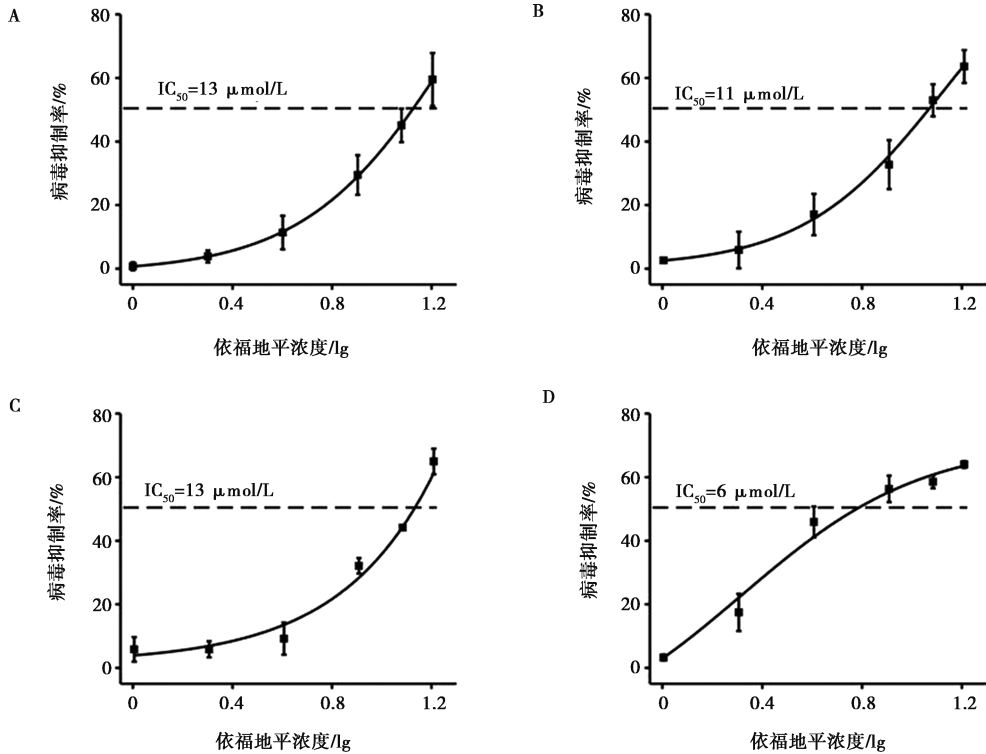


图 2 依福地平对 PEDV 的抑制率
A. Vero-E6 细胞中依福地平对 HLJBV 的抑制率; B. Vero-E6 细胞中依福地平对 CV777 的抑制率; C. Marc-145 细胞中依福地平对 HLJBV 的抑制率; D. Marc-145 细胞中依福地平对 CV777 的抑制率。

图 2 依福地平对 PEDV 的抑制率

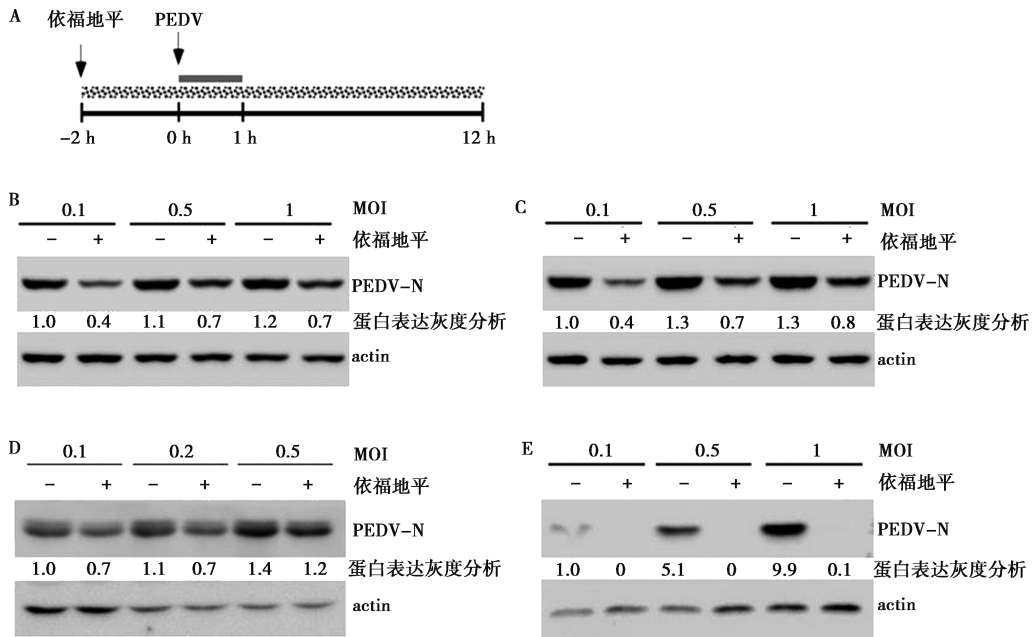
2.2 依福地平抑制 PEDV 病毒蛋白的表达

为了进一步验证依福地平对 PEDV 的抑制作用, 如图 3A 所示, 用药物处理细胞并感染不同 MOI 的 PEDV。免疫印迹试验结果表明, 依福地平可以显著降低 PEDV HLJBV 毒株和 CV777 毒株感染 Vero-E6 细胞 (图 3B、C) 和 Marc-145 细胞 (图 3D、E) 中 PEDV-N 蛋白的表达水平。

2.3 依福地平不直接靶向 PEDV 病毒粒子

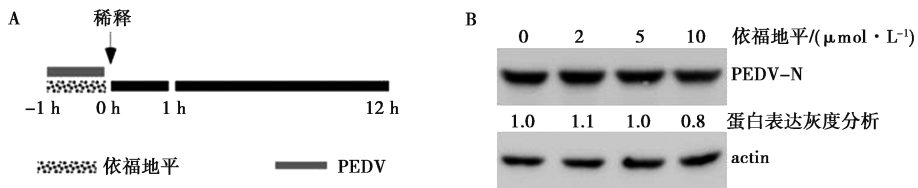
抗病毒药物主要是通过药物直接靶向病毒粒子或

通过靶向宿主细胞调节宿主细胞的防御系统来发挥抗病毒作用。因此, 首先通过药物直接靶向病毒试验, 检测药物是否可以直接靶向 PED 病毒粒子。如图 4A 所示, 用药物处理细胞并感染 PEDV。免疫印迹试验结果表明, 试验组与对照组病毒蛋白 PEDV-N 表达水平无明显变化, 表明依福地平抑制 PEDV 感染不直接靶向病毒粒子 (图 4B)。因此, 下一步从药物靶向宿主细胞的角度, 研究依福地平抑制 PEDV 病毒感染的机制。



A. 药物处理细胞和感染病毒示意图，黑色虚线表示药物处理细胞，黑色实线表示接种病毒；B、C. 依福地平对不同 MOI HLJBY 和 CV777 毒株感染 Vero-E6 细胞中 N 蛋白表达的影响；D、E. 依福地平对不同 MOI HLJBY 和 CV777 毒株感染 Marc-145 细胞中 N 蛋白表达的影响。“-”代表未加药，“+”代表加药，下同。

图 3 依福地平抑制 PEDV 感染



A. 药物处理细胞和感染病毒示意图，黑色虚线表示药物处理细胞，黑色实线表示感染病毒；B. 依福地平直接靶向 PED 病毒粒子 Western blot 分析。

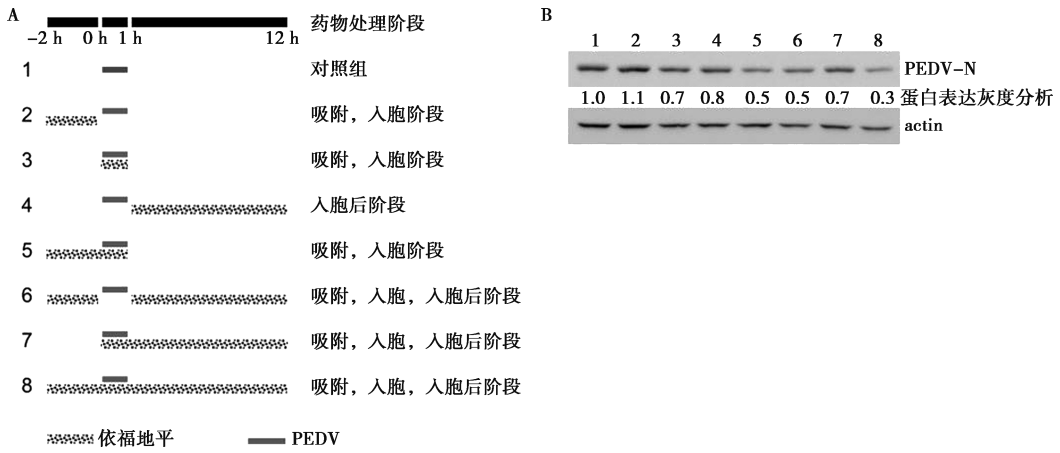
图 4 依福地平直接靶向 PEDV 的验证

2.4 依福地平抑制 PEDV 感染阶段的测定

PEDV 的复制周期主要包括病毒的吸附、入胞、复制与转录、组装和释放的过程。通过时间过程分析试验测定依福地平抑制 PEDV 生命周期的具体阶段。如图 5A 所示，用药物处理细胞并感染 1 MOI 的 PEDV。蛋白印迹试验表明，在感染过程中和感染后给药都会降低病毒蛋白 PEDV-N 的表达水平，但在病毒入胞阶段给药，病毒蛋白 PEDV-N 的下降最明显（图 5B），表明依福地平主要抑制病毒生命周期的早期阶段。

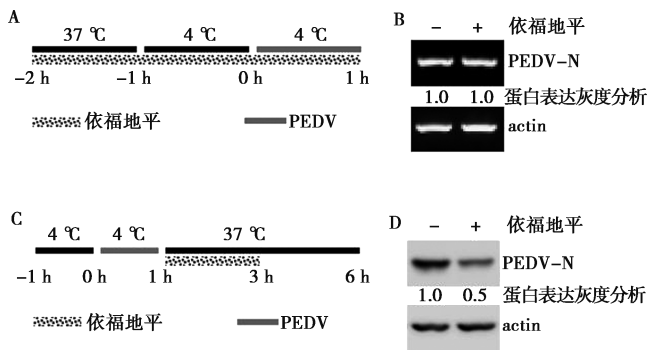
2.5 依福地平对 PEDV 入胞的抑制作用

PEDV 病毒感染的早期阶段包括病毒的吸附阶段和入胞阶段。根据图 6A（药物抑制病毒吸附试验）和图 6C（药物抑制病毒入胞试验）处理细胞，进一步确定依福地平对 PEDV 吸附和入胞的影响。药物抑制 PEDV 吸附试验结果显示，依福地平对 PEDV-N 的 mRNA 水平没有影响（图 6B）；在药物抑制 PEDV 入胞试验中，依福地平可以显著降低 PEDV 感染细胞中 PEDV-N 蛋白水平（图 6D）。综上，依福地平可以抑制 PEDV 入胞。



A. 时间过程分析试验示意图，黑色虚线表示药物处理细胞，黑色实线表示接种病毒；B. 时间过程分析试验（Western blot）。

图5 依福地平抑制 PEDV 感染阶段的测定



A. 药物抑制病毒吸附试验示意图；B. 依福地平抑制 PEDV 吸附的半定量 RT-PCR 检测结果；C. 药物抑制病毒入胞的示意图；D. 依福地平抑制 PEDV 入胞的 Western blot 检测结果。

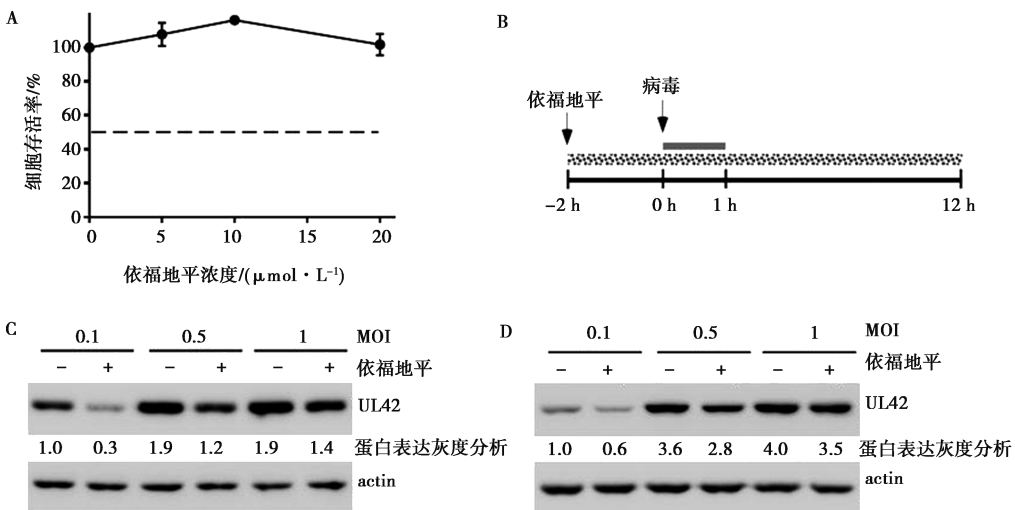
图6 依福地平抑制 PEDV 入胞阶段的验证

2.6 依福地平对其他病毒的抑制作用

为测定依福地平是否可以抑制其他病毒如 HSV-

1 和 PRV 感染宿主细胞，首先采用 CCK-8 法测定依福地平对 PK15 细胞的细胞毒性。结果表明，在 PK15 细胞中，依福地平在药物浓度低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞毒性较低，细胞存活率保持在 90% 以上（图 7A）。

随后，验证了依福地平对 HSV-1 和 PRV 的抑制作用，如图 7B 所示，用药物处理细胞并感染不同 MOI 的 HSV-1 和 PRV。免疫印迹试验结果表明，依福地平可以显著降低 HSV-1 感染 Vero-E6 细胞和 PRV 感染 PK15 细胞中病毒蛋白 UL42 的表达水平。由此可见，依福地平不仅可以抑制冠状病毒（PEDV）还可以抑制疱疹病毒（HSV-1 和 PRV）感染宿主细胞，是一类潜在的广谱抗病毒药物。



A. 依福地平对 PK15 细胞的毒性测定；B. 药物处理细胞和感染病毒的示意图；C. 依福地平对不同 MOI HSV-1 感染 Vero-E6 细胞中病毒蛋白 UL-42 蛋白表达的影响；D. 依福地平对不同 MOI PRV 感染 PK15 细胞中病毒蛋白 UL-42 蛋白表达的影响。

图7 依福地平抑制 HSV-1 和 PRV 感染易感细胞

3 讨论

近年来, PED 频频暴发给我国乃至全世界养猪业造成严重的经济损失。在抗 PEDV 药物方面, 芦荟、槲皮素、甘草酸和银杏果提取物等被证明在体外具有抗 PEDV 的活性, 但这类药物多局限于实验室研究, 尚未有有效商品化药物可用于 PED 的预防与治疗^[16-19]。目前已经研制出多种 PED 疫苗, 并应用到临床, 在一定程度上控制了 PED 流行, 但由于 PEDV 频繁变异, 使得现有的疫苗无法完全控制 PED 疫情的暴发, 有些疫苗免疫过的猪场 PED 疫情仍时常发生。因此研究和开发新型疫苗与具有抗 PEDV 活性的药物具有重要意义。

本研究首先在 PEDV 易感细胞 Vero-E6 和 Marc-145 中测定依福地平细胞毒性和对 PEDV 的半数有效浓度, 最终选取一个细胞毒性较低且对 PEDV 有明显抑制效果的药物浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续研究。通过 Western blot 检测进一步验证了药物对 PEDV 的抑制效果, 发现依福地平能够有效降低细胞中病毒蛋白 PEDV-N 的表达量。抗病毒药物主要是通过药物直接靶向病毒粒子或通过靶向宿主细胞调节宿主细胞的防御系统来发挥抗病毒作用^[14]。因此, 本试验首先通过药物直接靶向病毒试验发现依福地平并不能直接靶向病毒粒子, 随后从药物靶向宿主细胞的角度考虑, 设计了时间过程分析试验, 发现在病毒感染前、感染过程中和感染后处理药物都能够降低病毒蛋白 PEDV-N 的表达量, 但在病毒感染过程中给药抑制效果最为明显, 表明依福地平主要抑制 PEDV 感染的早期阶段。随后, 通过药物抑制病毒吸附试验和药物抑制病毒入胞试验发现在依福地平能够抑制 PEDV 入胞而不能抑制 PEDV 的吸附阶段。另外, 本研究还发现依福地平也可以降低疱疹病毒 (HSV-1 和 PRV) 感染宿主细胞中病毒蛋白 UL42 水平。

综上所述, 本研究证明依福地平能够在体外抑制 PEDV、HSV-1 和 PRV 感染宿主细胞, 是一种潜在的广谱抗病毒药物。后续应进行动物试验, 验证依福地平在易感动物体内是否具有抗 PEDV、HSV-1 和 PRV 的活性。

参考文献:

[1] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (1): 161-163.

[2] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (8): 1350-1353.

[3] TAKAHASHI K, OKADA K, OHSHIMA K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan [J]. Nihon Juigaku Zasshi, 1983, 45 (6): 829-832.

[4] CHEN Q, LI G, STASKO J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52 (1): 234-243.

[5] ISHIMITSU T, KAMEDA T, AKASHIBA A, et al. Efonidipine reduces proteinuria and plasma aldosterone in patients with chronic glomerulonephritis [J]. Hypertens Res, 2007, 30 (7): 621-626.

[6] LIU M, DENG M, ZHANG D, et al. A chiral LC-MS/MS method for the stereospecific determination of efonidipine in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 35-41.

[7] KUMFU S, CHATTIPAKORN S C, FUCHAROEN S, et al. Dual T-type and L-type calcium channel blocker exerts beneficial effects in attenuating cardiovascular dysfunction in iron-overloaded thalassemic mice [J]. Exp Physiol, 2016, 101 (4): 521-539.

[8] NGUYEN N M, DUONG M T H, NGUYEN P L, et al. Efonidipine inhibits JNK and NF- κ B pathway to attenuate inflammation and cell migration induced by lipopolysaccharide in microglial cells [J]. Biomol Ther (Seoul), 2022, 30 (5): 455-464.

[9] XU F, XIONG W, HUANG Y, et al. Structural basis for efonidipine block of a voltage-gated Ca^{2+} channel [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513 (3): 631-634.

[10] DIOSA-TORO M, TROOST B, VAN DE POL D, et al. Tomatidine, a novel antiviral compound towards dengue virus [J]. Antiviral Res, 2019, 161: 90-99.

[11] ZHAI X, WANG N, JIAO H, et al. Melatonin and other indoles show antiviral activities against swine coronaviruses *in vitro* at pharmacological concentrations [J]. J Pineal Res, 2021, 71(2): e12754.

[12] HO Y J, LU J W, HUANG Y L, et al. Palmatine inhibits Zika virus infection by disrupting virus binding, entry, and stability [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518 (4): 732-738.

[13] ZHU Z, GUO Y, YU P, et al. Chlorine dioxide inhibits the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by blocking viral attachment [J]. Infect Genet Evol, 2019, 67: 78-87.

[14] ZHU J D, MENG W, WANG X J, et al. Broad-spectrum antiviral agents [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 517.

[15] 徐慧玲. 基于病毒受体阻断的广谱抗病毒策略研究及其在 CSFV 和 PRRSV 防治中的应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021.

[16] HUAN C C, WANG H X, SHENG X X, et al. Glycyrrhizin inhibits porcine epidemic diarrhea virus infection and attenuates the proinflammatory responses by inhibition of high mobility group box-1 protein [J]. Arch Virol, 2017, 162 (6): 1467-1476.

[17] LEE J H, PARK J S, LEE S W, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infection; inhibition by polysaccharide from Ginkgo biloba exocarp and mode of its action [J]. Virus Res, 2015, 195: 148-152.

[18] LI Z, CAO H, CHENG Y, et al. Inhibition of porcine epidemic diarrhea virus replication and viral 3C-Like protease by quercetin [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (21): 8095.

[19] XU Z, LIU Y, PENG P, et al. Aloe extract inhibits porcine epidemic diarrhea virus *in vitro* and *in vivo* [J]. Vet Microbiol, 2020, 249: 108849.