

焦文强, 徐引弟, 邢广旭, 等. 豌豆活性肽对猪流行性腹泻病毒复制的体外抑制作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 61-67.

JIAO W Q, XU Y D, XING G X, et al. *In vitro* inhibition effect of soybean oligopeptides on the replication of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 57 (10): 61-67.

豌豆活性肽对猪流行性腹泻病毒复制的体外抑制作用

焦文强¹, 徐引弟¹, 邢广旭², 王方雨², 赵攀登³, 郭振华²,
张家庆¹, 李栋梁⁴, 张立宪¹, 黄慧敏³, 白红杰¹, 雷亚楠¹

(1. 河南省农业科学院畜牧研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南省农业科学院动物疫病防控研究所, 河南 郑州 450002;

3. 河南牧业经济学院动物医药学院, 河南 郑州 450046;

4. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 旨在研究豌豆活性肽对猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 复制的体外抑制作用。合成豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK, 采用 CCK-8 试验测定该豌豆活性肽在 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 Vero 细胞的毒性, 将只含 DMEM 培养基、不含 Vero 细胞的样品设置为空白对照组, 将含 DMEM 培养基和 Vero 细胞的样品设置为未添加豌豆活性肽组, 将含有 Vero 细胞和豌豆活性肽的样品设置为添加豌豆活性肽组, 通过病毒拷贝数、Western blot、半数组织培养感染量 (TCID₅₀) 测定该豌豆活性肽对 PEDV 在 Vero 细胞中复制的抑制作用, 进一步采用 Western blot 分析该豌豆活性肽对 PEDV 生命周期的作用。结果: 与对照组相比, 该豌豆活性肽在 12.5~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对 Vero 细胞活性无显著性影响 ($P>0.05$); 200 $\mu\text{mol/L}$ 豌豆活性肽处理 Vero 细胞后, PEDV 感染细胞病毒拷贝数、N 蛋白灰度值和 TCID₅₀ 值均显著低于对照组 ($P<0.05$); Western blot 分析表明, 该豌豆活性肽可以促进 PEDV 吸附和入侵到 Vero 细胞 ($P<0.05$), 而抑制作用主要发生在病毒复制阶段 ($P<0.05$), 对于病毒释放无显著作用。Western blot 分析表明, 该活性肽主要通过抑制内质网氧化还原酶 (ERO1a) 表达抑制 PEDV 复制。本研究为新型抗 PEDV 小分子的研制提供了思路。

关键词: 豌豆活性肽; 抗病毒; 吸附; 入侵; 复制

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0061-07

In vitro inhibition effect of soybean oligopeptides on the replication of porcine epidemic diarrhea virus

JIAO Wenqiang¹, XU Yindi¹, XING Guangxu², WANG Fangyu², ZHAO Pandeng³, GUO Zhenhua²,
ZHANG Jiaqing¹, LI Dongliang⁴, ZHANG Lixian¹, Huang Huimin³, BAI Hongjie¹, LEI Yanan¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Academy of Agricultural Sciences,
Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Animal Health, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy,
Zhengzhou 450046, China;

4. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450046, China)

Abstract: In order to investigate the effects of soybean oligopeptides KYGPTPVRDGFK on the replication of porcine epidemic diarrhea virus, KYGPTPVRDGFK was synthesized. Cell counting kit-8 was employed to study KYGPTPVRDGFK at concentrations of 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$, respectively, on the cell viability of Vero. Then, viral copy, Western blot, 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) were used to measure the inhibitory effect of KYGPTPVRDGFK on the replication of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells. The results showed that KYGPTPVRDGFK significantly inhibited the replication of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells, as indicated by viral copy, Western blot, TCID₅₀ ($P<0.01$). Furthermore, Western blot indicated that KYGPTPVRDGFK promoted the PEDV adsorption

收稿日期: 2024-12-06; 修回日期: 2025-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32202826); 河南省科技攻关项目 (242102110036); 河南省农业科学院自主创新项目 (2024ZC130, 2025ZC71)

第一作者: 焦文强, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为动物传染病致病机制与防控, E-mail: wenqiangjiao@163.com。

and penetration into Vero cells ($P < 0.01$), but inhibited the replication of PEDV in the cells and had no effect on the release of PEDV. The Western blot analysis indicated that soybean oligopeptide inhibited the replication of PEDV through depressing the expression of ERO1a. This study would be helpful in the design of small molecular drugs against PEDV.

Keywords: soybean oligopeptides; anti-virus; absorption; invasion; replication

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 感染引起的一种猪消化道传染病, 主要感染 1 周龄以内的哺乳仔猪, 临床主要表现为呕吐、水样腹泻和脱水, 死亡率最高可达到 100%^[1-4], 是一种严重威胁养猪业健康发展的烈性传染病^[5-6]。2010 年底, 变异 PEDV 引起的仔猪腹泻在我国大规模暴发, 死亡率在 50%~100%, 经济损失约数十亿元, 严重打击了我国生猪养殖业^[7-8]。韩国、日本、泰国、越南等亚洲国家以及美国之后也相继报道了 PEDV 变异毒株导致的仔猪腹泻的病例, 表明 PED 已呈现全球性流行。PEDV 基因组不断重组变异, 中和抗体无法有效中和病毒, 是 PEDV 持续感染的主要原因。时至今日, PED 仍然是威胁养猪业健康发展的重要疫病之一。

PEDV 属于冠状病毒科 (Coronaviridae)、 α 冠状病毒属 (*Coronavirus*), 基因组约 28 kb, 包括 7 个开放阅读框 (ORFs), 分别编码 ORF1、S、ORF3、E、M 和 N 蛋白^[9-10]。其中 ORF1 在蛋白翻译过程中经过移码产生 ORF1a 和 ORF1b 编码 2 个多聚大蛋白, 约占 PEDV 基因组全长的 2/3, 经病毒编码的木瓜蛋白酶和 3C 蛋白酶切割形成 16 个非结构蛋白 (nsp), 分别为 nsp1~nsp16, 参与病毒基因组的复制、转录和病毒粒子组装等生命活动。PEDV 感染 Vero 细胞, 激活活性氧 (ROS) 产生促进病毒复制^[11], 提示抑制 ROS 产生可能抑制 PEDV 复制。

豌豆 (*Pisum sativum* L.) 具有较高的经济价值, 富含膳食纤维、胰蛋白酶抑制剂、酚类化合物和植物凝集素, 可以用作粮食生产、食品加工和饲料等多种用途^[12]。将豌豆蛋白经过蛋白酶水解、纯化即可得到豌豆活性肽。豌豆活性肽具有多种生物学功能, 比如降血脂^[13]、抗氧化^[14]、抗炎^[15]等。然而关于豌豆活性肽对于 PEDV 复制的作用尚未见报道。此前, 潘芬^[16]通过碱性蛋白酶和胰蛋白酶水解, 超滤膜分离和分子筛层析等技术分离纯化得到豌豆活性肽 YGPTPVRDGFK, 并验证了该活性肽具有抗肿瘤活性。本团队前期研究发现, 豌豆活性肽 KYGPT-PVRDGFK 可以通过缓解氧化应激减轻铅对大鼠肾细胞 (PC12) 的损伤^[17], 证明了豌豆活性肽 KYGPT-PVRDGFK 具有抗氧化的能力。因此, 本研究旨在研究豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 在 Vero 细胞层面对

于 PEDV 复制的影响, 探究该豌豆活性肽对于 PEDV 生命周期, 包括吸附细胞、入侵细胞、细胞内复制和细胞内释放的作用, 并对该豌豆活性肽抑制 PEDV 复制的分子机制进行了初步探索, 从而为新型抗病毒小分子药物的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Vero 细胞, PEDV G2b 亚型毒株 CH-Hubei-2016 (GenBank 登录号: KY928065), G1 型毒株 CV777 (GenBank 登录号: AF353511), 由河南省农业科学院动物疫病防控研究所保存; 本研究使用的豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 根据参考文献 [16] 设计并由吉尔生化 (上海) 有限公司合成, 纯度 95% 以上, 使用超纯水稀释成 1 mmol/L, 0.22 μm 滤器过滤后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

胎牛血清 (FBS), 购自 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基、胰酶、蛋白质量标准品, 购自北京索莱宝生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒、ECL 超敏发光液, 购自上海碧云天生物公司; 抗 PEDV-N 蛋白鼠源单克隆抗体, 由河南省农业科学院动物疫病防控研究所保存; 兔抗内质网氧化还原酶 ERO1a 抗体、兔抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG, 购自武汉三鹰生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST viral RNA/DNA Extraction Kit、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 酶, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 乙酰半胱氨酸 (NAC) 购自于 MCE 公司。

1.2 豌豆活性肽的细胞活性检测

将生长状态良好的 Vero 细胞按照 10^5 /孔接种至 96 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养至 80% 融合度左右, 使用培养基将豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 稀释到 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$, 并接种细胞培养 24 h, 弃去培养基, 加入含 10% CCK-8 溶液的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h 后, 使用酶标仪于波长 450 nm 读取吸光度 (A), 计算细胞活性。

细胞活性 = $(A_{\text{加肽}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{未加肽}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$, 其中, $A_{\text{加肽}}$ 表示含有细胞、CCK-8 溶液和豌豆活性肽孔的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 表示含有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞孔的吸光度; $A_{\text{未加肽}}$ 表示含有细胞、CCK-8 溶液而没有豌豆活性肽孔的吸光度。

1.3 Western blot 检测

将状态良好的 Vero 细胞按照 3×10^5 /孔平铺到 24 孔细胞板中,待细胞融合度达到 80% 的时候加入终浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 的豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK。培养 24 h 后分别加入感染比 (MOI) 为 0.1 的 PEDV Hubei-2016 毒株和 CV 777 毒株,接毒后 18 h 收取细胞。使用 RIPA 裂解液于冰上裂解细胞 30 min,加入适量 Loading buffer,于沸水中煮 10 min。然后使用 SDS-PAGE 分离蛋白并转印至 PVDF 膜,50 g/L 的脱脂奶粉于 37°C 温箱中封闭 1 h, TBST 洗 3 次后加入相应的抗体, 4°C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 抗体孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次后使用 ECL 超敏发光液进行 Western blot 检测。

1.4 半数组织培养感染量 (TCID₅₀) 检测

取状态良好的 Vero 细胞按照 10^5 /孔平铺至 96 孔板, PBS 洗涤细胞后,将阴性对照组 (NC)、豌豆活性肽处理后 PEDV 感染组 (加肽组)、PEDV 感染组 (未加肽组) 的样品进行 10 倍倍比稀释后加入培养板中,每组 8 个重复。 37°C 培养 1 h 后,弃去病毒液,加入含 2% 胰酶的 DMEM 继续培养 5~7 d,每天观察病变,采用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.5 病毒拷贝数检测

取状态良好 Vero 细胞按照 3×10^5 /孔平铺 24 孔板, 37°C 培养 12 h 后用无菌 PBS 洗细胞 3 次,加入豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 至终浓度 $200 \mu\text{mol/L}$,培养 24 h 后分别加入 0.1 MOI 的 PEDV Hubei-2016 毒株和 CV777 毒株,18 h 后收获细胞,提取 RNA 后取 $1 \mu\text{g}$ 进行反转录,病毒拷贝数按照 Xu 等^[18]方法进行。

1.6 豌豆活性肽对 PEDV 生命周期的作用

取状态良好 Vero 细胞按照 3×10^5 /孔平铺 24 孔板, 37°C 培养至细胞融合度 90% 的时候用无菌 PBS 洗细胞 3 次,将 0.1 MOI 的 Hubei-2016 毒株与 $200 \mu\text{mol/L}$ 豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 共同加入到细胞中,置于 4°C 吸附 1 h 后弃去病毒液, PBS 缓慢清洗细胞 1 遍,加入维持液 37°C 继续培养 18 h,加入适量 Loading buffer 进行 Western blot,检测豌豆活性肽对于 PEDV 吸附到细胞的作用;将 0.1 MOI PEDV Hubei-2016 毒株加入到细胞中,置于 4°C 吸附 1 h 后,弃去病毒液, PBS 洗 1 遍,加入含有 $200 \mu\text{mol/L}$ 豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 的 DMEM 培养基, 37°C 培养 1 h 后用无菌 PBS 清洗细胞,加入维持液于 37°C 继续培养 18 h,加入适量 Loading buffer 进行 Western blot,检测豌豆活性肽对于 PEDV 入侵到细胞内部的作用;将 0.1 MOI PEDV Hubei-2016 毒株加

入到 Vero 细胞, 37°C 吸附 1 h 后, PBS 清洗细胞 1 遍,加入含有豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 的培养基于 37°C 继续培养 18 h,加入适量 Loading buffer 进行 Western blot,检测豌豆活性肽对于 PEDV 在细胞内的复制作用,同时取细胞上清液,采用 TCID₅₀ 测定豌豆活性肽对于病毒释放的作用。

1.7 豌豆活性肽对细胞氧化应激相关指标及 PEDV 复制的影响

取状态良好 Vero 细胞按照 3×10^5 /孔平铺 24 孔板, 37°C 培养 12 h 后用无菌 PBS 洗细胞 3 次,加入 0.1 MOI 的 PEDV Hubei-2016 毒株, 37°C 吸附 1 h 后, PBS 洗细胞 1 次;加入含有 $200 \mu\text{mol/L}$ 豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 的培养基于 37°C 继续培养 18 h,弃去培养基, PBS 洗细胞 1 次;加入适量 Loading buffer 进行 Western blot,检测细胞 ERO1a 蛋白和 PEDV N 蛋白表达情况,推测豌豆活性肽是否可能通过抑制氧化应激抑制 PEDV 复制。

1.8 数据统计和分析

每组数据均设定 3 组平行。使用 Image J 软件分析 Western blot 结果灰度值,数值以“平均值 \pm 标准差”表示。采用单因素方差分析比较多组间的差异,用 GraphPad Prism 9.0 分析作图。

2 结果

2.1 豌豆活性肽对 Vero 细胞活性检测

结果显示 (图 1), $12.5 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 的豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 对于 Vero 细胞没有明显毒性作用 ($P > 0.05$),细胞活力都在 90% 以上,故选择 $200 \mu\text{mol/L}$ 进行后续试验。

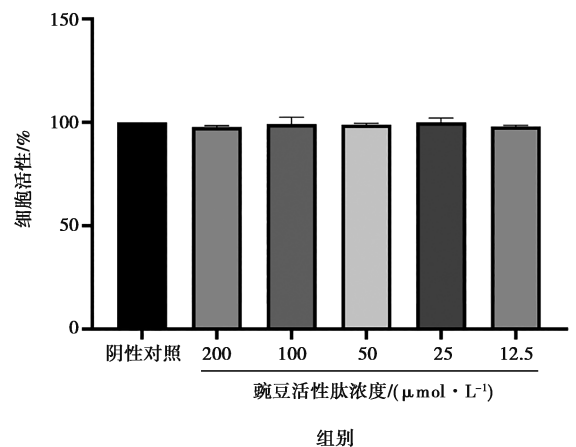


图 1 CCK-8 检测细胞活性

2.2 豌豆活性肽对 PEDV 在 Vero 细胞中复制的影响

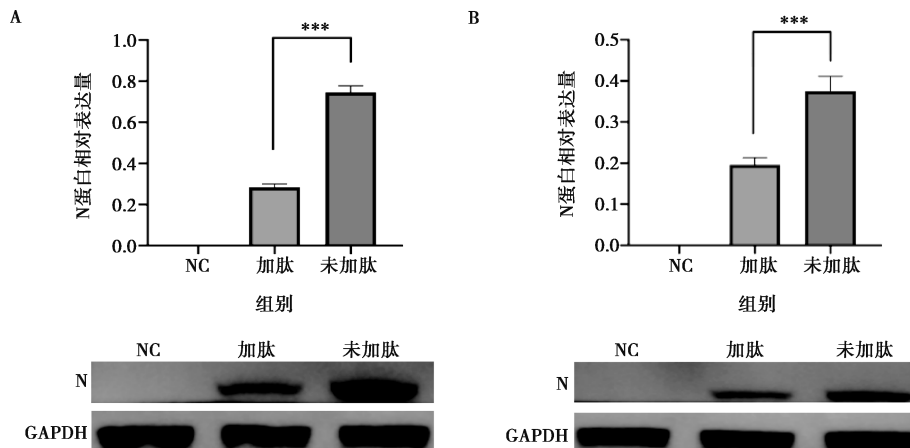
由图 2 可知,孵育豌豆活性肽 KYGTPVRDGFK 后,能显著抑制 PEDV Hubei-2016 毒株和 PEDV

CV777 毒株 N 蛋白的表达水平, 差异极显著 ($P < 0.001$), 证明该豌豆活性肽能够抑制 PEDV 复制。

豌豆活性肽组显著降低 PEDV Hubei-2016 和 CV777 病毒滴度, 差异极显著 ($P < 0.001$)。

2.3 TCID₅₀ 检测

由图 3 可知, 与未添加豌豆活性肽组相比, 添加



注: * * * 表示 $P < 0.001$, 下同。

图 2 豌豆活性肽对 PEDV Hubei-2016 毒株 (A) 和 CV777 毒株 (B) N 蛋白表达的影响

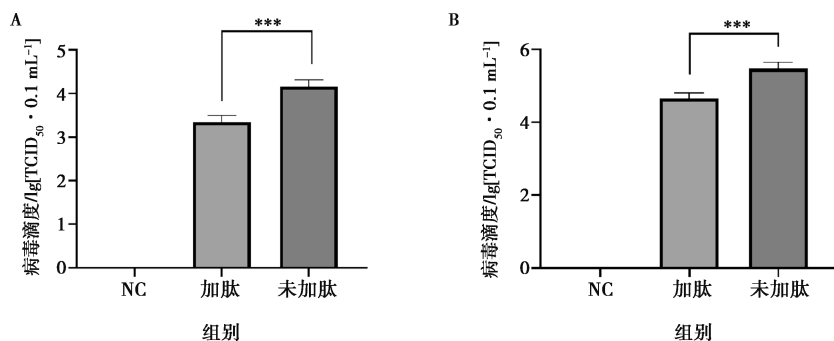


图 3 豌豆活性肽对 PEDV Hubei-2016 毒株 (A) 和 CV777 毒株 (B) 滴度的影响

2.4 病毒拷贝数检测

图 4 结果表明, 与未添加豌豆活性肽组相比, 添

加豌豆活性肽组显著降低 PEDV Hubei-2016 和 CV777 拷贝数, 差异极显著 ($P < 0.001$)。

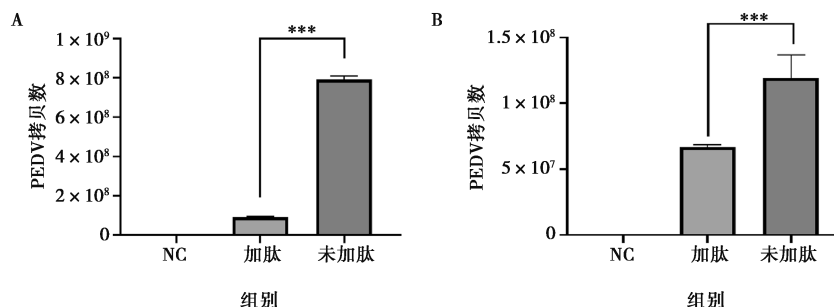


图 4 豌豆活性肽对 PEDV Hubei-2016 毒株 (A) 和 CV777 毒株 (B) 拷贝数的影响

2.5 豌豆活性肽对 PEDV 生命周期的作用

通过时间过程分析试验测定豌豆活性肽对于 PEDV 生命周期不同阶段的作用,如图 5 所示。Western blot 结果表明,豌豆活性肽可以显著促进 PEDV hubei-2016 毒株吸附和入侵到 Vero 细胞 ($P < 0.05$),但是显著抑制病毒在细胞内的复制 ($P < 0.05$) (图 6),而对于病毒的释放无显著影响 (图 7)。

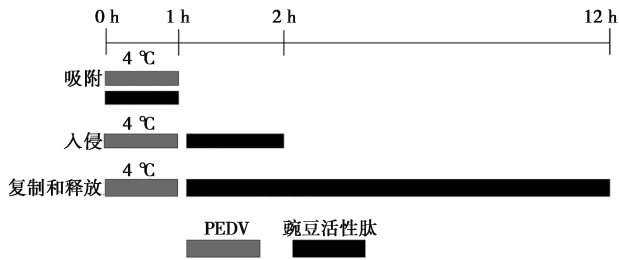
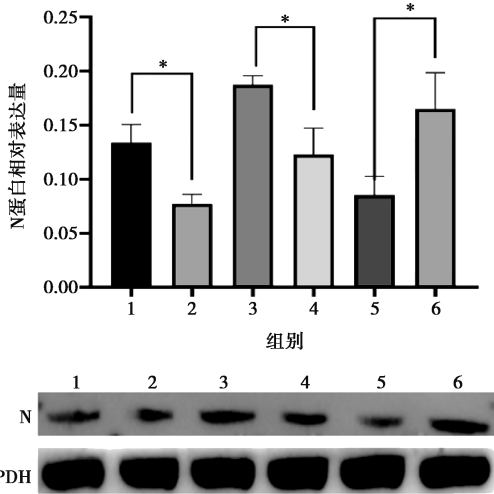


图 5 时间过程分析试验示意



1. 吸附时肽与 PEDV 共孵育; 2. 吸附时未孵育肽; 3. 入侵时肽与 PEDV 共孵育; 4. 入侵时未孵育肽; 5. 复制时肽与 PEDV 共孵育; 6. 复制时肽未孵育肽; * 表示 $P < 0.05$, 下同。

图 6 豌豆活性肽对 PEDV 吸附、入侵和复制的作用

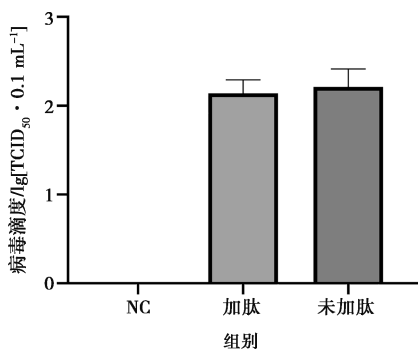
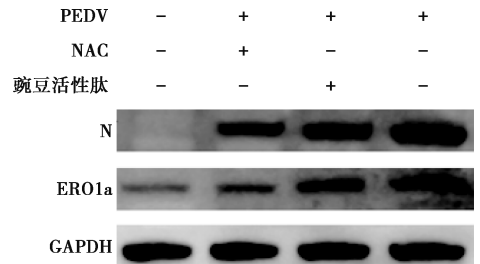


图 7 豌豆活性肽对 PEDV 释放的作用

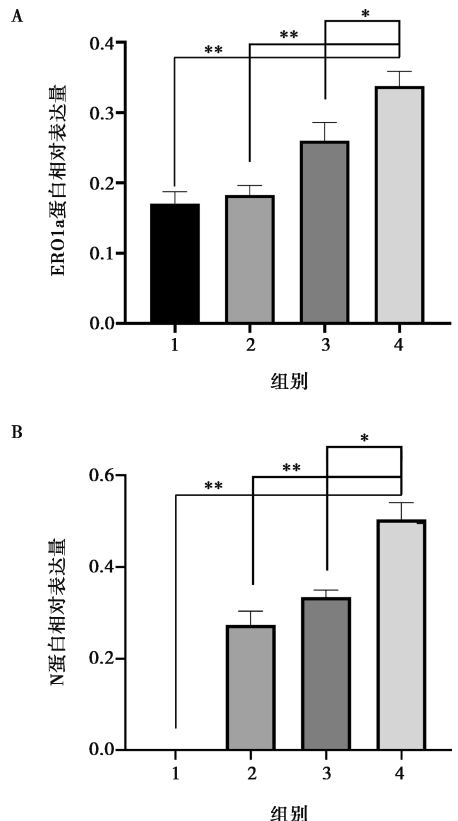
2.6 豌豆活性肽对细胞 ERO1a 和病毒 N 蛋白表达的影响

将 NAC、豌豆活性肽与 PEDV 采用不同的孵育方式孵育后 (图 8), 提取活性肽处理过的细胞蛋白样本, 采用 Western blot 检测 ERO1a 和 N 蛋白的表达。与阴性对照处理组相比, PEDV 感染 Vero 细胞上调 ERO1a 蛋白表达 ($P < 0.01$), 豌豆活性肽显著抑制 PEDV 引起的 ERO1a 上调以及 N 蛋白的表达 ($P < 0.01$) (图 9), 这与 NAC 处理组结果一致。结果表明, 豌豆活性肽可能通过抑制活性氧 (ROS) 的产生抑制 PEDV 的复制。



注: +表示添加, -表示未添加。

图 8 Western blot 检测豌豆活性肽与 PEDV 共孵育细胞中病毒 N 蛋白和宿主 ERO1a 蛋白的表达



1. 阴性对照; 2. PEDV 与 NAC 共孵育; 3. PEDV 与豌豆活性肽共孵育; 4. PEDV; ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 9 ERO1a (A) 和 N (B) 蛋白相对表达量

3 讨论

G1 经典型 PEDV 毒株和 G2 变异型 PEDV 毒株序列之间存在显著变异^[19], 这种差异可能会导致抗原性变化, 基于传统毒株的疫苗针对变异毒株无法提供足够的保护力^[20]。同时, 不同变异毒株之间不断重组产生新的毒株, 导致病毒序列多样性更加复杂, 并可能进一步影响毒株的抗原性^[1]。因此, 研发新型广谱 PED 防控策略就显得尤为迫切。使用广谱抗病毒药物被广泛认可是一种潜在的抗病毒方式, 其中抗非洲猪瘟病毒药物已经有过尝试^[21]。目前, 关于抗 PEDV 药物和小分子的研究已有报道^[22-30], 但是这些研究只是采用物理方法提取抗病毒成分, 对于药物中抗病毒的活性成分研究未见报道。这种方法不仅提高了成本, 对于药物中蕴含的其他抗病毒成分也是一种缺失。

生物活性肽是指不同氨基酸以不同的方式组合在一起构成的具有复杂结构, 且具有生理调节功能的多肽链。生物活性肽具有抗肿瘤、抗感染、降胆固醇等多种生理学功能。本研究中使用的豌豆生物活性肽 KYGPTPVRDGFK 是通过碱性蛋白酶和胰蛋白酶水解, 超滤膜分离和分子筛层析等技术分离纯化而得到, 具有显著的抗肿瘤活性。本研究在蛋白和 RNA 两个层面报道豌豆蛋白酶水解物, 生物活性肽 KYGPTPVRDGFK 在 Vero 细胞能显著降低 PEDV 复制, 本研究使用的 CV777 毒株为 G1 经典亚型 PEDV 毒株, Hubei-2016 为变异型的 G2b 基因亚型 PEDV 毒株, 通过 Western blot、TCID₅₀ 和病毒拷贝数综合分析表明, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 能够有效抑制 PEDV 在 Vero 细胞复制。

病毒作为严格的细胞内寄生物, 其吸附到细胞表面、入侵到细胞、在胞内复制和释放必须依赖宿主细胞的各种资源, 以完成病毒自身的生命周期, 并造成持续性感染。要注意的是, 在病毒与宿主细胞长期的共进化过程中, 病毒逐步演化出操控细胞的种种策略, 创造有利于病毒生存的环境。本研究发现, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 能够促进 PEDV 吸附到 Vero 细胞表面和入侵到细胞内部。对于冠状病毒来讲, 病毒表面 S 蛋白识别宿主细胞表面受体, S 蛋白被切割为 S1 亚基和 S2 亚基, 后者参与与宿主细胞膜融合, 释放病毒的基因组进入细胞。有研究显示, S1 亚基与细胞受体结合后, S2 亚基介导网格蛋白依赖的细胞内吞作用, 改变细胞表面形态, 有利于 PEDV 完成内化和基因组释放过程^[32]。鉴于目前对于 PEDV 感染 Vero 细胞受体仍存在争议, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 是否通过促进细胞受体与 S1 亚基结合,

进而促进 PEDV 与细胞吸附不得而知, 后续试验将检测豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 对于网格蛋白介导内吞的影响, 进而阐明活性肽促进 PEDV 入侵 Vero 细胞的机制。

本研究表明, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 可以显著抑制 PEDV 在 Vero 细胞内复制。结合活性肽促进 PEDV 吸附和入侵到 Vero 细胞, 以及对 PEDV 释放无明显作用, 表明活性肽抑制 PEDV 复制主要是抑制病毒在细胞内复制。研究表明, PEDV 感染 Vero 细胞以后会诱发细胞产生 ROS^[32-33], 而我们前期研究表明, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 可以通过缓解铅诱发的氧化应激减轻对 PC12 细胞的损伤^[17]。本研究表明, 豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 抑制 PEDV 复制, 同时降低 PEDV 感染诱发的 ERO1a 蛋白的表达上调, 这与 NAC 处理的结果一致。表明豌豆活性肽 KYGPTPVRDGFK 可能通过降低 PEDV 诱发的 Vero 细胞的 ROS 水平, 进而抑制病毒复制。当然, KYGPTPVRDGFK 可能通过调控某种尚未报道的信号通路提高细胞先天性免疫水平, 并且这种信号通路与 ROS 的通路是彼此独立的。后续研究将针对 KYGPTPVRDGFK 抑制 PEDV 在 Vero 细胞复制的分子机制进行探索, 以期深入了解病毒与宿主细胞互作机制, 为抗病毒药物研发提供有力的理论依据。

参考文献:

- [1] LIN C M, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. *Virus Res*, 2016, 226: 20-39.
- [2] CHOUDHURY B, DASTJERDI A, DOYLE N, et al. From the field to the lab - An European view on the global spread of PEDV [J]. *Virus Res*, 2016, 226: 40-49.
- [3] WANG D, FANG L, XIAO S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus Res*, 2016, 226: 7-13.
- [4] SUN D, WANG X, WEI S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review [J]. *J Vet Med Sci*, 2016, 78 (3): 355-363.
- [5] BERTASIO C, GIACOMINI E, LAZZARO M, et al. Porcine epidemic diarrhea virus shedding and antibody response in swine farms: a longitudinal study [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2009.
- [6] GERBER P F, XIAO C T, LAGER K, et al. Increased frequency of porcine epidemic diarrhea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge [J]. *Vet Res*, 2016, 47 (1): 118.
- [7] 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.
- [8] TIAN P F, JIN Y L, XING G, et al. Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013

- [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20 (10): 1735-1738.
- [9] LI R, QIAO S, YANG Y, et al. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China [J]. *Virus Genes*, 2016, 52 (1): 91-98.
- [10] ZHANG Q, SHI K, YOO D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1 [J]. *Virology*, 2016, 489: 252-268.
- [11] ZHOU Y, ZHANG Y, DONG W, et al. Porcine epidemic diarrhea virus activates PERK-ROS axis to benefit its replication in Vero E6 cells [J]. *Vet Res*, 2023, 54 (1): 9.
- [12] 孙冬阳, 呼鑫荣, 薛文通. 豌豆功效成分及其生理活性的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40 (2): 316-320.
- [13] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review [J]. *Peptides*, 2010, 31 (10): 1949-1956.
- [14] SONKLIN C, ALASHI A M, LAOHAKUNJIT N, et al. Functional characterization of mung bean meal protein-derived antioxidant peptides [J]. *Molecules*, 2021, 26 (6): 1515.
- [15] UTRILLA M P, PEINADO M J, RUIZ R, et al. Pea (*Pisum sativum* L.) seed albumin extracts show anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59 (4): 807-819.
- [16] 潘芬. 豌豆抗肿瘤活性肽的分离纯化及结构鉴定 [D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- [17] LI N, WEN L, WANG F, et al. Alleviating effects of pea peptide on oxidative stress injury induced by lead in PC12 cells via Keap1/Nrf2/TXNIP signaling pathway [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 964938.
- [18] XU Q, WANG F, JIAO W, et al. Virtual screening - based peptides targeting spike protein to inhibit porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection [J]. *Viruses*, 2023, 15 (2): 381.
- [19] ZHU T, DU S, CAO D, et al. Isolation and identification of a variant subtype G 2b porcine epidemic diarrhea virus and S gene sequence characteristic [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 71: 82-90.
- [20] WANG J, ZHAO P, GUO L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19 (12): 2048-2049.
- [21] ARABYAN E, KOTSYNYAN A, HAKOBYAN A, et al. Antiviral agents against African swine fever virus [J]. *Virus Res*, 2019, 270: 197669.
- [22] CHEN Y, LUO Q, LI S, et al. Antiviral activity against porcine epidemic diarrhea virus of *Pogostemon cablin* polysaccharide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259: 113009.
- [23] SONG J H, SHIM J K, CHOI H J. Quercetin 7 - rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species [J]. *Virol J*, 2011, 8: 460.
- [24] 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.
- [25] ZENG W, REN J, LI Z, et al. Levistolide A inhibits PEDV replication via inducing ROS generation [J]. *Viruses*, 2022, 14 (2): 258.
- [26] WANG Y, LI J R, SUN M X, et al. Triggering unfolded protein response by 2-Deoxy-d-glucose inhibits porcine epidemic diarrhea virus propagation [J]. *Antivir Res*, 2014, 106: 33-41.
- [27] 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.
- [28] CHEN Z, CHEN J, WEI X, et al. Antiviral activities of carbazole derivatives against porcine epidemic diarrhea virus *in vitro* [J]. *Viruses*, 2021, 13 (12): 2527.
- [29] CHOI H J, KIM J H, LEE C H, et al. Antiviral activity of quercetin 7 - rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Antivir Res*, 2009, 81 (1): 77-81.
- [30] LI H J, GAO D S, LI Y T, et al. Antiviral effect of lithium chloride on porcine epidemic diarrhea virus *in vitro* [J]. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 288-294.
- [31] 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.
- [32] ZHAO S, GAO J, ZHU L, et al. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells [J]. *Virus Res*, 2014, 192: 34-45.
- [33] XU X, XU Y, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce apoptosis in Vero cells *via* a reactive oxygen species (ROS) /p53, but not p38 MAPK and SAPK/JNK signalling pathways [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 232: 1-12.