

DOI: 10.12264/JFSC2024-0264

大蓟水提物抗大口黑鲈虹彩病毒活性研究

马艳平, 郝乐, 冯国清, 王刚, 刘振兴

广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东 广州 510640

摘要: 为了探明大蓟水提物(*Cirsium japonicum* aqueous extract, CJAE)对大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV)的抑制活性, 本研究通过体内外实验分析 CJAE 的抗 LMBV 效果, CCK-8 实验证明 CJAE 在鳃脑细胞(*Siniperca chuatsi* brain cells, SCB3)上的安全浓度为 $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$, CC_{50} 值为 $1487.0 \mu\text{g/mL}$; qPCR 与间接免疫荧光实验表明 CJAE 可以有效抑制病毒核酸与 MCP 蛋白在 SCB3 细胞中的表达, EC_{50} 值为 $457.3 \mu\text{g/mL}$; 并且 CJAE 在 LMBV 的入侵与复制阶段对病毒抑制率分别达到 98.46%与 99.31%。CJAE 按 0.5%、1.0%与 1.5%剂量添加至基础饲料, 饲喂大口黑鲈 15 d 后, 以 $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ LMBV 攻毒, 结果表明 CJAE 可以提供 35%~60%的攻毒保护率; 攻毒后 6 d 测定大口黑鲈组织病毒拷贝数, 结果表明脾脏、肝脏、肾脏与肠道的病毒载量降低 87.57%~99.99%; 吞噬能力测定结果表明头肾白细胞的吞噬活力上调 35.88%~60.75%; mRNA 表达测定结果表明 CJAE 激活吞噬通路基因(*FcyR1a*、*CFL*、*Lyn*)的表达; 组织 H&E 染色结果表明 CJAE 明显减轻 LMBV 感染造成的大口黑鲈炎症, 进一步研究发现, CJAE 显著激活抗炎因子(*IL-10*)表达并抑制促炎因子(*TNF- α* 、*IL-1 β*)的表达。本研究初步揭示了 CJAE 抗 LMBV 效果与机制, 为其应用于抗 LMBV 提供了基础。

关键词: 大蓟提取物; 大口黑鲈虹彩病毒; EC_{50} ; 吞噬; 炎症

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2025)01–0103–14

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 又称加州鲈, 是我国重要的养殖鱼类, 养殖规模与产量居高不下。然而, 随着大口黑鲈养殖规模的不断攀升, 大口黑鲈虹彩病毒(largemouth bass ranavirus, LMBV)的流行也愈演愈烈, 并造成重大经济损失^[1-2]。LMBV 是隶属于虹彩病毒科、蛙虹彩病毒属的 20 面体双链 DNA 病毒, 基因组 99 kb 左右^[3], 最早在 1991 年美国佛罗里达州维尔湖发现^[4], 我国于 2009 年报道了 LMBV 引起的疫情^[5]。LMBV 感染大口黑鲈引起体表溃疡、内脏肿大^[6], 随病程发展, 病毒在体内大量增殖, 引发炎症因子风暴、炎性细胞浸润与组织损伤^[7-9], 最终导致机体死

亡。从中草药中筛选能够激活宿主天然免疫、抑制 LMBV 增殖与病毒诱导炎症的粗提物或单体在抗 LMBV 感染药物研究中展现出良好的应用前景。紫花地丁(*Viola philippica*)和黄连(*Coptis chinensis* Franch)醇提物^[7]、刺五加(*Acanthopanax senticosus*)水提物^[10]均表现出抗炎以及提高 LMBV 或 MRV 攻毒存活率的效果。白屈菜红碱(chelerythrine)^[8]、EGCG (epigallocatechin-3-gallate)^[11]、胡椒碱(piperine)^[12]、小檗碱(berberine)^[13]等中草药单体以及槲皮素(quercetin)等 5 种单体的混合物^[14]也表现出抑制 LMBV 增殖、降低攻毒死亡率的生物活性。

收稿日期: 2024-09-19; 修订日期: 2024-11-12.

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2022A1515012556; 广东省农业科学院协同创新中心项目(XT202305)); 广东省农业科学院动物卫生研究所青年科技人才培养项目(PY2024008, PY2024007); 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室项目(2023B1212060040).

作者简介: 马艳平(1984–), 女, 副研究员, 研究方向为水产病害防控. E-mail: mayanping@gdaas.cn

通信作者: 刘振兴, 研究员, 研究方向为水产病害防控, E-mail: liuzhenxing@gdaas.cn; 王刚, 研究员, 研究方向为动物疫病防控, E-mail: wanggang@gdaas.cn

大蓟(*Cirsium japonicum*)隶属于菊科蓟属,是多年生草本植物,在全国多地均有种植,被列入中国饲料原料目录以及《中国药典》,而且通过不同提取工艺获得的活性成分具有止血^[15]、抗氧化^[16]、抗炎^[17-18]、抗病毒活性^[19-20]的功效。大蓟水提取物(*Cirsium japonicum* aqueous extract, CJAE)为大蓟的地上部分水煎提取的水提取物干粉,含有黄酮、多糖等活性成分。杨星辰等^[19]研究大蓟提取的黄酮类化合物——芹菜素(apigenin)、柳穿鱼苷(pectolinarin)、蒙花苷(linarin)等成分对 B 型肝炎(hepatitis B virus, HBV)的抑制活性,发现芹菜素与柳穿鱼苷具有明显抑制 HBV 在 HepG 细胞内复制的活性,大蓟中含量最多的黄酮类物质柳穿鱼苷可通过直接抑制 3c 样蛋白酶(3CLpro)发挥抗 SARS-CoV-2 作用^[20-21],表明大蓟提取物可以直接抑制病毒复制。进一步研究表明大蓟黄酮类化合物通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路抑制炎症相关因子转录,从而调节炎症因子的分泌,发挥抗炎作用^[22]。前期对 LMBV 的研究发现,LMBV 引起鳊、鲈等淡水鱼大规模死亡,并表现为明显炎症^[6,23]。本研究通过体内外实验评价 CJAE 抗 LMBV 效果,以期为抗 LMBV 药物的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鳊脑细胞系(*Siniperca chuatsi* brain cell 3, SCB3)由广东省农业科学院动物卫生研究所水产病害研究室建立并保存,以含 10% FBS 的 L-15 培养基 25 °C 培养。LMBV 由本研究室分离自广东省佛山市某大口黑鲈养殖场。实验用大口黑鲈[(15.0±2.0) g]购自广东省佛山市某大口黑鲈养殖场,经 PCR 检测排除 LMBV^[10]、ISKNV^[24]、RSIV^[25]、SCRV^[25]感染。兔抗 LMBV MCP 多抗为本研究室制备^[26]。大蓟水提取物(CJAE) 10 : 1,为大蓟地上部分水溶部分浓缩物,购自广东顺安丰泰水产科技有限公司。

1.2 CJAE 对 SCB3 细胞毒性/安全性测定

CJAE 对 SCB3 细胞毒性/安全性测定采用 CCK-8 实验。参照文献[10]在 96 孔细胞培养板中

培养 SCB3 细胞至单层,每孔加入 100 μL L-15 稀释的 CJAE (终浓度分别为: 2000 μg/mL、1500 μg/mL、1000 μg/mL、500 μg/mL 与 250 μg/mL),设立未加药孔作为对照,孵育 48 h 后每孔加入 20 μL CCK-8 试剂,继续孵育 4 h,测定 OD₄₅₀,根据下列公式计算 CJAE 对 SCB3 细胞的毒性/安全性。

$$\text{细胞病变率}(\%) = (\text{对照组 OD}_{450} \text{ 值} -$$

$$\text{实验组 OD}_{450} \text{ 值}) / \text{对照组 OD}_{450} \text{ 值} \times 100\%$$

1.3 CJAE 体外抗 LMBV 活性测定

1.3.1 SYBRgreen qPCR 方法测定 CJAE 体外抗 LMBV 活性 参照文献[10]在 12 孔板中培养 SCB3 细胞至单层,每孔加入 LMBV 稀释液(2 mL, 100 TCID₅₀/mL)于 25 °C 孵育 1 h,弃掉上清液, PBS 清洗 3 次。每孔加入 2 mL L-15 稀释的 CJAE (终浓度分别为: 1000 μg/mL、800 μg/mL、600 μg/mL、400 μg/mL 与 200 μg/mL), 25 °C 继续孵育 48 h。随后,细胞培养板-80 °C-室温反复冻融 3 次,上清液采用天隆病毒核酸提取试剂盒提取 DNA 作为模板,按照诺维赞 ChamQ Universal SYBR qPCR 试剂盒配制反应体系,进行 SYBRgreen qPCR 扩增,计算 LMBV 病毒拷贝数。感染 LMBV 后不给药(CJAE)的 SCB3 细胞培养物为阳性对照。根据下列公式计算 CJAE 对 LMBV 的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A/B) \times 100\%$$

式中, A 为加入不同浓度 CJAE 后 LMBV 的拷贝数; B 为阳性对照组 LMBV 的拷贝数。

1.3.2 间接免疫荧光法测定 CJAE 体外抗 LMBV 活性 按 5×10⁵ 个/mL SCB3 细胞接种至玻底共聚焦培养皿(25 mm), 25 °C 培养至单层后,弃掉培养液,加入 LMBV 细胞培养物(1 mL/孔, 100 TCID₅₀/mL)于 25 °C 孵育 1 h,弃掉上清液, PBS 清洗 3 次后加入 1000 μg/mL CJAE,于 25 °C 继续分别培养 48 h、72 h,去掉培养液, PBS 润洗 3 次,参照文献[26]依次进行多聚甲醛固定 20 min、0.1% Triton X100 通透 10 min、1% BSA 封闭 30 min、一抗(抗 MCP 多克隆抗体, 1 : 1000 稀释) 4 °C 孵育过夜、荧光二抗(AF647 标记羊抗兔单克隆抗体, 1 : 1000 稀释) 37 °C 避光孵育 1 h、1 mL DAPI 稀释液(1 : 1000 稀释) 37 °C 避光孵育

10 min, 最后加入抗荧光猝灭剂至玻璃皿中心圈内, 激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM710)下观察。

1.4 CJAE 在 LMBV 不同生命周期阶段的抗病毒效果比较

1.4.1 CJAE 在病毒黏附阶段抗病毒效果测定 参照 Tao 等^[26], 48 孔板培养细胞至单层后, 以 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CJAE 预处理细胞 1 h, 之后加入 LMBV 细胞毒上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h。PBS 润洗 3 次后, 换新鲜培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48 h, 收集细胞反复冻融 3 次提取总 DNA, 按 1.3.1 SYBRgreen qPCR 方法进行病毒拷贝数测定, 研究 CJAE 阻止病毒黏附的能力。

1.4.2 CJAE 在病毒入侵阶段抗病毒效果测定 参照 Tao 等^[26], 48 孔板培养细胞至单层后, 加入 LMBV 细胞毒上清, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。PBS 润洗 3 次后, 以 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CJAE 4 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 2 h, 之后更换新鲜培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 48 h 后, 收集细胞反复冻融 3 次后提取 DNA, 按 1.3.1 SYBRgreen qPCR 方法进行病毒拷贝数检测, 研究药物阻止病毒入侵的能力。

1.4.3 CJAE 在病毒复制阶段抗病毒效果测定 参照 Tao 等^[26], 48 孔板培养细胞至单层后, 加入 LMBV 细胞毒上清, 先于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min, 再转移至 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 4 h, 之后更换新鲜培养基, 以 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CJAE 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 48 h, 收集细胞反复冻融 3 次提取总 DNA, 按 1.3.1 SYBRgreen qPCR 方法进行病毒拷贝数检测, 研究药物阻止病毒复制的能力。

1.5 CJAE 体内抗 LMBV 活性测定

实验大口黑鲈随机分为 4 组, 每组 100 尾, 养殖于实验网箱(60 cm \times 100 cm \times 70 cm)。分别称取 5.0 g、10.0 g 和 15.0 g CJAE 充分溶解于 100 mL 灭菌 ddH₂O, 分别均匀喷洒至 1000 g 基础饲料中, 制备含有 0.5%、1.0%、1.5% CJAE 的饲料, 充分晾干后分组饲喂, 每日饱饲 2 次, 对照组饲喂基础饲料。连续饲喂 15 d 后, 每组随机取 40 尾鱼, 腹腔注射 100 μL LMBV 细胞培养物(1×10^7 TCID₅₀/mL), 攻毒后转移至水族箱(40 cm \times 30 cm \times 40 cm), 连续曝气, 水温维持在 25~28 $^{\circ}\text{C}$ 。每天观察、记录实验鱼死亡情况, 绘制生存曲线。剖解死亡大口黑鲈,

取攻毒各实验组大口黑鲈肝脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠和后肠组织以及攻毒 20 d 后存活的 0.5% CJAE 组、1.0% CJAE 组与 1.5% CJAE 组大口黑鲈肝脏、脾脏、肾脏、前肠、中肠和后肠组织, 提取组织 DNA, 按 1.3.1 SYBRgreen qPCR 方法测定病毒拷贝数。分别取感染发病死亡大口黑鲈、CJAE 组攻毒存活大口黑鲈制作肠道组织切片, H&E 染色后, 显微镜观察。

1.6 CJAE 对大口黑鲈头肾白细胞吞噬能力的影响

参考 Wang 等^[27], 以 FITC 标记的鳕鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)为颗粒抗原, 测定 CJAE 对大口黑鲈头肾白细胞吞噬能力的影响。CJAE 投喂 15 d 后, 每组随机取 5 尾鱼, 采用鱼组织白细胞分离液试剂盒(灏洋生物制品公司, 天津)提取头肾组织白细胞并计数。 2×10^6 个/mL 头肾白细胞与 2×10^7 cfu/mL FITC 标记的鳕鱼诺卡氏菌于 25 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 4 h 后, 1200 r/min 离心 30 min, 弃掉上清液, 沉淀细胞用 PBS 清洗 3 次后, 随后以 1 mL PBS 彻底悬浮细胞, 流式细胞术分析 CJAE 对大口黑鲈头肾白细胞吞噬能力的影响。

1.7 CJAE 对大口黑鲈免疫相关基因 mRNA 表达变化的影响

CJAE 饲喂 15 d 后, 每组随机取 5 尾鱼, 采用组织 RNA 提取试剂盒(Vazyme, 南京)分别提取脾脏、头肾组织 RNA, 反转录成 cDNA (Vazyme, 南京)。以 Wu 等^[28]建立的免疫相关基因 SYBR green qPCR 方法, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 CJAE 对大口黑鲈白介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-10*、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、Fc γ 受体 1a (Fc γ receptor 1a, *Fc γ RIa*)、*Fc γ RIIb*、酪氨酸激酶 (tyrosine-protein kinase, *Lyn*)、肌动蛋白相关蛋白 (actin related protein 2/3 complex, subunit 5, *ARPC5*)、肌动蛋白素 (cofilin, *CFL*)、嗜中性粒细胞胞浆因子 (neutrophil cytosolic factor 1, *NCF1*) 基因 mRNA 表达变化的影响, 引物序列如表 1 所示。

1.8 数据统计分析

对 CJAE 在鳃脑细胞系上的安全浓度分析、LMBV 拷贝数变化进行单因素方差分析(SPSS 23.0)。大口黑鲈免疫相关基因 mRNA 表达变化的

表 1 大口黑鲈免疫相关基因及其 LMBV 检测引物
Tab. 1 Primers for immune-related genes and LMBV detection genes of largemouth bass

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession number	片段长度/ bp fragment length	退火温度/°C annealing temperature	基因名称 gene description
LMBV 拷贝数分析用引物 primers for LMBV copies analysis					
MCP-F	TTGACAAAGCGTGTACGGTGA	FR682503.1	171	60	LMBV 主要壳蛋白
MCP-R	TGAGCACATAGTCGCCCCGACCTG				LMBV major caspid protein
实时定量 PCR 用引物 primers for real-time PCR					
TNF- α -F	GGCCTCCAGCATCACA	OK493793.1	149	60	大口黑鲈肿瘤坏死因子- α
TNF- α -R	TGGTTCACGGCATTAC				largemouth bass tumor necrosis factor α
IL-1 β -F	GGAAGCCGAGATGAAATACAAGATCCC	XM_038733429.1	204	60	大口黑鲈白介素-1 β
IL-1 β -R	CTGCGCTCAAACACTATATGCTCT				largemouth bass interleukin 1 β
IL-10-F	TCAGGAGGTGGAGCAGGAC	XM_038696252.1	187	55	大口黑鲈白介素-10
IL-10-R	AGGACCAAGATGGCAACG				largemouth bass interleukin-10
Fc γ R1a-F	GGTGCCCGAGTTAGACA	OK258092.1	255	60	大口黑鲈 Fc 受体 Fc γ R1a
Fc γ R1a-R	GGAGGACCTGGATTAGATT				largemouth bass Fc γ R1a
Lyn-F	TTATGTTGCCAAGTTGACACC	XM_038718775.1	282	60	大口黑鲈酪氨酸激酶
Lyn-R	TGTTTGATCATGCTGCCGAT				largemouth bass tyrosine-protein kinase lyn
ARPC5-F	TGAAGAACCCGCCAATCAACACA	XM_038718963.1	225	60	大口黑鲈肌动蛋白相关蛋白
ARPC5-R	CCAGAGCCTTTTCATGCCACT				largemouth bass Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
CFL-F	CACGCAGACGCTGACCT	XM_038699110.1	106	60	大口黑鲈肌动蛋白素
CFL-R	CCTGAGCCTTACGCACC				largemouth bass Cofilin-1
NCF1-F	TCATCAACCTGCCGCCTCA	XM_038707662.1	334	60	大口黑鲈嗜中性粒细胞胞浆因子
NCF1-R	TCCAAATAGGATGCAGGAACCC				largemouth bass Neutrophil cytosol factor 1
β -actin-F	CCACCACAGCCGAGAGGGAA	MH018565.1	255	60	大口黑鲈内参基因- β -actin
β -actin-R	TCATGGTGATGGGGCCAGG				largemouth bass housekeeping gene- β -actin

影响利用 SPSS 23.0 软件进行独立样本 t 检验分析。生存曲线采用 GraphPad prism version 8.0 软件分析, 并利用 Log-rank (Mantel-Cox) 进行显著性分析。 $P < 0.05$ 代表显著性差异, $P < 0.01$ 代表极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 CJAE 在 SCB3 细胞系上的安全浓度

采用 CCK-8 实验分析不同浓度 CJAE 对 SCB3 细胞的毒性, 结果如图 1 所示, 2000 $\mu\text{g/mL}$ 与 1500 $\mu\text{g/mL}$ CJAE 孵育 SCB3 细胞 48 h 后显著降低了 SCB3 的细胞活力; 而 CJAE ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的各组之间以及与对照组之间的细胞活力均无显著性差异, 因此本研究选择 1000 $\mu\text{g/mL}$ 作为 CJAE 在 SCB3 细胞上的最大安全浓度值。采用

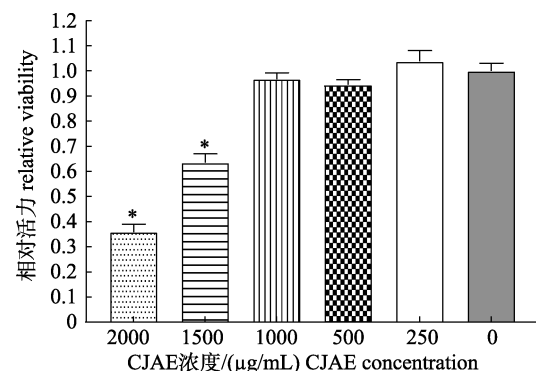


图 1 CCK-8 检测分析 CJAE 对 SCB3 细胞毒性分析结果与对照组相比, * 差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Toxicity analysis result of CJAE on SCB3 cell through CCK8 detection

Compared with control group, * significant difference ($P < 0.05$).

GraphPad prism version 8.0 计算 CJAE 的 CC_{50} 值为 1487.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 CJAE 体外抗 LMBV 活性与 EC₅₀ 测定

CJAE 体外抗 LMBV 活性测定分别采用 SYBRgreen qPCR 与 IFA 分析加药后病毒拷贝数差异与病毒 MCP 蛋白的胞内表达。结果如图 2a 所示, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CJAE 组 LMBV 的相对抑制率分别为 98.79%、96.12%、87.52%、56.16%, 均显著低于对照组($P<0.05$)。随后对各组抑制率进行拟合分析, 结果显示, CJAE 对 LMBV 的抑制作用 EC₅₀ 值为

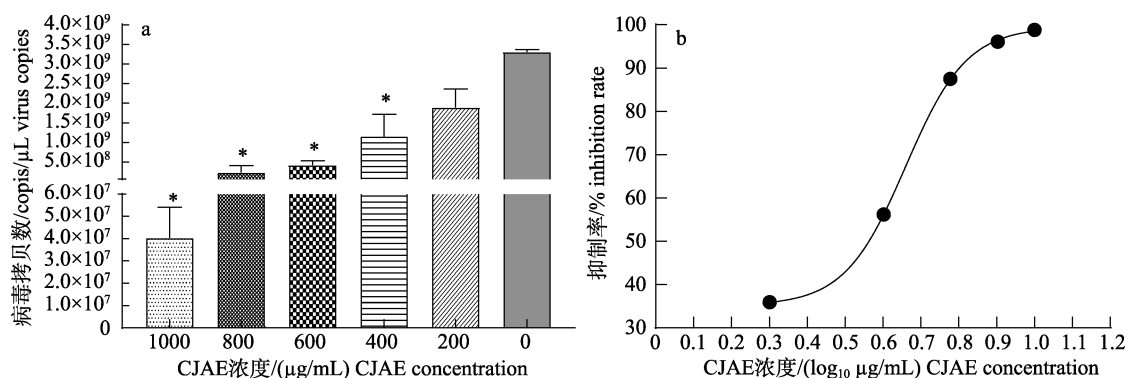


图 2 CJAE 抗 LMBV 抑制率与 EC₅₀ 值测定

a. CJAE 抗 LMBV 抑制率测定, 与对照组比较分析显著性, *差异显著($P<0.05$); b. CJAE 对 LMBV EC₅₀ 值测定结果。

Fig. 2 The determination of the inhibition rate of CJAE against LMBV and EC₅₀ value

a. Inhibition rate detection of anti-LMBV of CJAE, * significant difference ($P<0.05$) compared with control group; b. EC₅₀ value determination.

2.3 CJAE 抑制 LMBV 对 SCB3 细胞的入侵与胞内复制

本研究评价了在病毒黏附、入侵和复制阶段 CJAE 对 LMBV 病毒拷贝数的影响。结果表明在 LMBV 黏附阶段, CJAE 不能降低 LMBV 拷贝数, 但在入侵和复制阶段, CJAE 显著降低了 LMBV 拷贝数, 其中 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CJAE 在入侵和复制阶段, LMBV 拷贝数分别减少了 98.46% 和 99.31% (图 4)。

2.4 CJAE 抑制 LMBV 体内增殖并降低攻毒死亡率

分别以 0.5%、1.0% 和 1.5% CJAE 饲喂大口黑鲈 15 d 后, 腹腔注射 LMBV, 每天记录死亡率并绘制生存曲线, 结果如图 5 所示, CJAE 可以提供 35%~60% 的攻毒保护率, 0.5%、1.0% 和 1.5% CJAE 组在攻毒后第 3 天开始出现死亡, 至 20 d 死亡率分别为 50%、40% 和 65%, 而对照组自攻毒后第 3 天出现死亡后, 至第 6 天全部死亡, 统计学分析显示(Mantel-Cox), 给药组均与对照组存在极显

著差异($P<0.01$)。0.5%、1.0% 与 1.5% CJAE 组的相对保护率(RPS)分别为 50%、60% 与 35%。提取 DNA 测定 LMBV 拷贝数病毒载量, 结果如图 6 所示, 对照组攻毒 6 d 后全部死亡, 各组织 LMBV 拷贝数在 $9.24 \times 10^5 \sim 1.50 \times 10^8$ copies/mL 之间; 而 0.5%、1.0% 和 1.5% CJAE 组各组织 LMBV 拷贝数在 $7.49 \times 10^2 \sim 8.14 \times 10^5$ copies/mL 之间, 相较于对照组, 各组织病毒载量降低 87.57%~99.99%。统计学分析显示, 不同浓度的 CJAE (0.5%、1.0%、1.5%) 均可以极显著降低病毒载量($P<0.01$), 与未给药的对照组相比, 病毒载量最高可以降低 99.99%, 结果证明 CJAE 具有明显的体内抗 LMBV 活性。

457.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 2b)。为了进一步验证药物的抗病毒效果, 采用免疫荧光法检测了 LMBV MCP 蛋白的表达水平, 结果显示, SCB3 细胞添加 CJAE (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 明显降低了荧光强度(图 3), 统计结果显示, CJAE 添加极显著降低了荧光密度值, 其中 CJAE 48 h 组相较于 LMBV 48 h 组荧光密度值降低了 85.81%, CJAE 72 h 组相较于 LMBV 72 h 组荧光密度值降低了 75.82%, 证明 CJAE 显著抑制了 LMBV 增殖。

著差异($P<0.01$)。0.5%、1.0% 与 1.5% CJAE 组的相对保护率(RPS)分别为 50%、60% 与 35%。提取 DNA 测定 LMBV 拷贝数病毒载量, 结果如图 6 所示, 对照组攻毒 6 d 后全部死亡, 各组织 LMBV 拷贝数在 $9.24 \times 10^5 \sim 1.50 \times 10^8$ copies/mL 之间; 而 0.5%、1.0% 和 1.5% CJAE 组各组织 LMBV 拷贝数在 $7.49 \times 10^2 \sim 8.14 \times 10^5$ copies/mL 之间, 相较于对照组, 各组织病毒载量降低 87.57%~99.99%。统计学分析显示, 不同浓度的 CJAE (0.5%、1.0%、1.5%) 均可以极显著降低病毒载量($P<0.01$), 与未给药的对照组相比, 病毒载量最高可以降低 99.99%, 结果证明 CJAE 具有明显的体内抗 LMBV 活性。

2.5 CJAE 明显减轻 LMBV 感染引起的大口黑鲈肠道损伤

解剖 LMBV 感染死亡实验大口黑鲈, 可见明显肠道炎症, 肠腔充满脓液(图 7a、7b), 随后取死亡大口黑鲈肠道制作组织切片并进行 H&E 染色

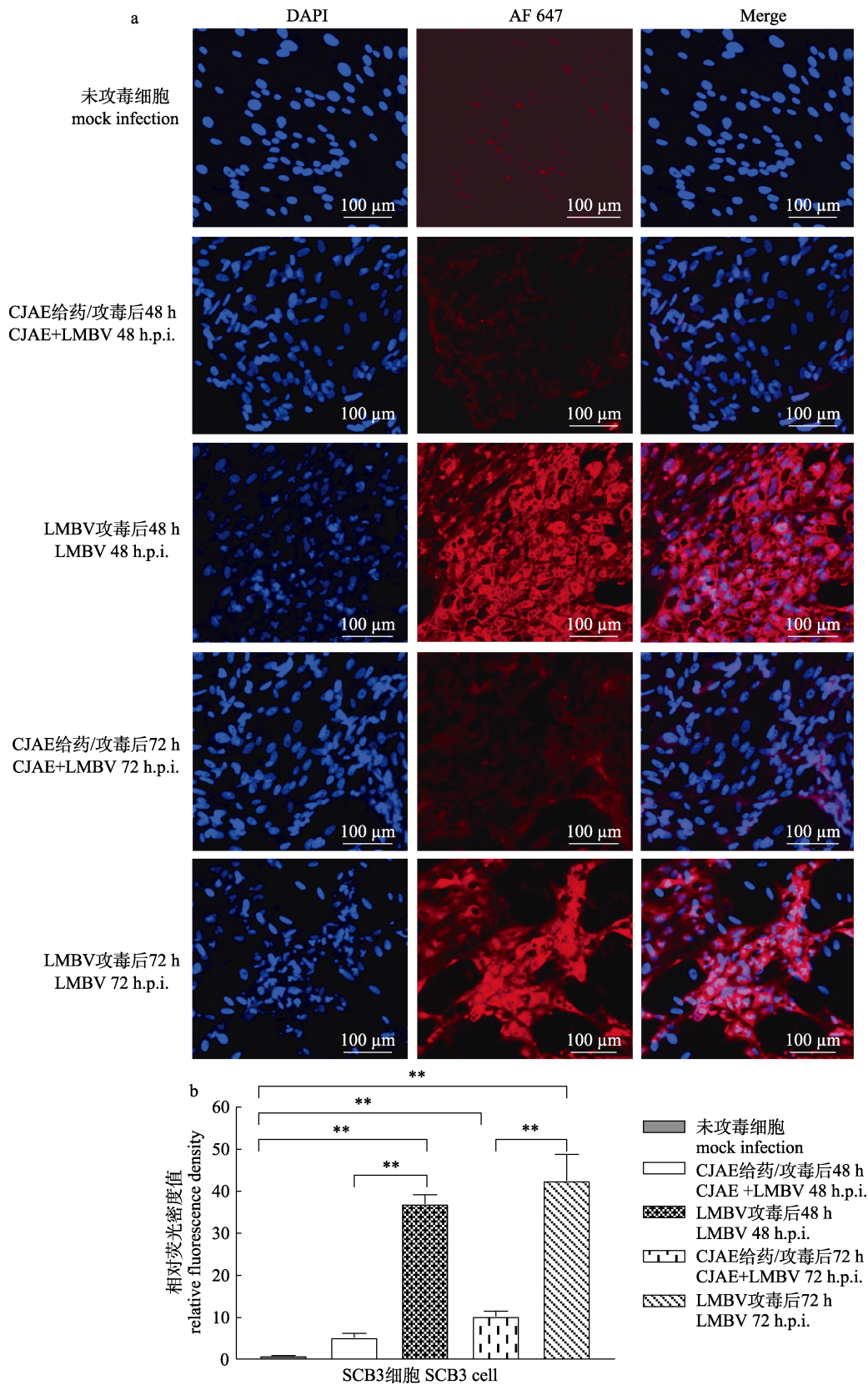


图 3 CJAE 抗 LMBV MCP 蛋白表达的影响

a. 荧光强度; b. 相对荧光密度值差异, **差异极显著 ($P < 0.01$).

Fig. 3 Effects of CJAE on the expression of LMBV MCP protein

a. Fluorescence intensity; b. Differences in relative fluorescence intensity value, with ** indicating highly significant difference ($P < 0.01$).

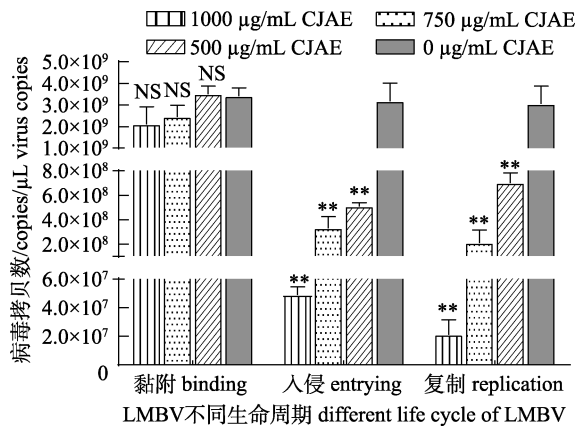


图 4 CJAE 对 LMBV 不同生命周期抑制活性影响研究结果

*表示与对照组比较差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 4 Effects of CJAE on different life cycle inhibition activities of LMBV

* denotes significant difference compared with control group ($P<0.05$), ** denotes highly significant difference ($P<0.01$).

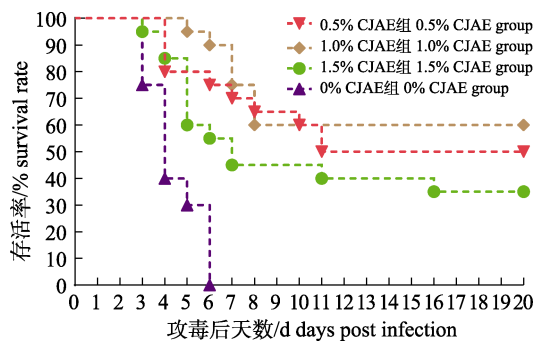


图 5 CJAE 抗 LMBV 存活率曲线分析

Fig. 5 Survival rate curve analysis of anti-LMBV effect of CJAE

分析, 结果可见肠道结构弥散, 大量炎性细胞浸润(图 7c、7d), 取 CJAE 组攻毒后存活大口黑鲈制作组织切片进行 H&E 染色分析, 结果可见肠道结构完整, 相较于未攻毒大口黑鲈(图 7g, 7h), 肠绒毛结构仅见少许断裂, 未见大量炎性细胞(图 7e, 7f)。

2.6 CJAE 提高大口黑鲈头肾白细胞吞噬活力

吞噬活力测定是评价天然免疫水平的重要指标之一, 本研究评价了 CJAE 添加对大口黑鲈白细胞吞噬能力的影响。如图 8 所示, 0.5%、1.0% 与 1.5% CJAE 组均提高了大口黑鲈白细胞对外来抗原的吞噬能力, 吞噬率分别为 51.6%、64.2% 与 39.3%; 而对照组吞噬率仅为 25.2%, 吞噬活力上调 35.88%~60.75%。由结果可见, 1.0% 的 CJAE 提

升头肾白细胞吞噬活力的效果最为显著。

2.7 CJAE 对大口黑鲈免疫相关水平的影响

鉴于 1.0% 的 CJAE 表现出最佳的攻毒保护效果与最高吞噬率, 本研究进一步采用 qPCR 分析 1.0% CJAE 添加量对免疫相关基因 mRNA 表达水平的影响。如图 9 所示, 在脾脏组织中, 1.0% CJAE 显著激活吞噬相关基因 *FcγR1a*、*Lyn*、*CFL* 与抗炎基因 *IL-10* 表达水平, 并显著抑制促炎基因 *IL-1β* 和 *TNF-α* 的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$); 在头肾组织中, 1.0% CJAE 显著激活吞噬相关基因 *FcγR1a*、*Lyn*、*CFL*、*ARPC5* 与抗炎基因 *IL-10* 表达水平, 并显著抑制促炎基因 *IL-1β* 和 *TNF-α* 的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

3.1 CJAE 具有显著的抗 LMBV 活性

中草药是我国传染医学的瑰宝, 因其具有来源广、副作用低、多靶点及不易产生耐药性等特点, 越来越多抗病药物的研发开始关注中草药提取物。近年来, 中草药提取物在防治水生动物病毒感染中表现出优异的效果, 成为抗病毒药物筛选的重要目标。在抗 LMBV 感染研究中, 李秋语等^[7]评价了 29 种中草药粗提物(醇提物)的体外抗 LMBV 效果, 其中紫花地丁和黄连表现出优异的抗 LMBV 效果, 进一步体内实验表明, 两种粗提物可以提供 40% 的攻毒保护率, 体内用药后病毒在肝组织的抑制率分别可达 71.5% 和 67.0%; 刺五加水提物抗 LMBV/MRV 的研究显示, 刺五加水提物表现出显著的体内外抗 LMBV 效果, 可以提供 30.48% 的攻毒保护率^[10]; 牛晨^[8]评价了白屈菜红碱的抗 LMBV 活性, 白屈菜红碱对感染 LMBV 的 EPC 细胞的保护率为 21%~24%, 体内抗 LMBV 实验表明白屈菜红碱对大口黑鲈的保护率高达 40%。本研究在 CJAE 体外抗 LMBV 活性研究基础上, 评价 CJAE 作为饲料添加剂抗 LMBV 效果, 结果显示 CJAE 显著提高了大口黑鲈对 LMBV 的相对保护率(1.0% 添加量 RPS 最高 60%), 且病毒载量分析结果显示, CJAE 显著降低 LMBV 靶器官肝、脾、肾、前肠、中肠、后肠的病毒含量, 发挥了体内抑制 LMBV 增殖的效果,

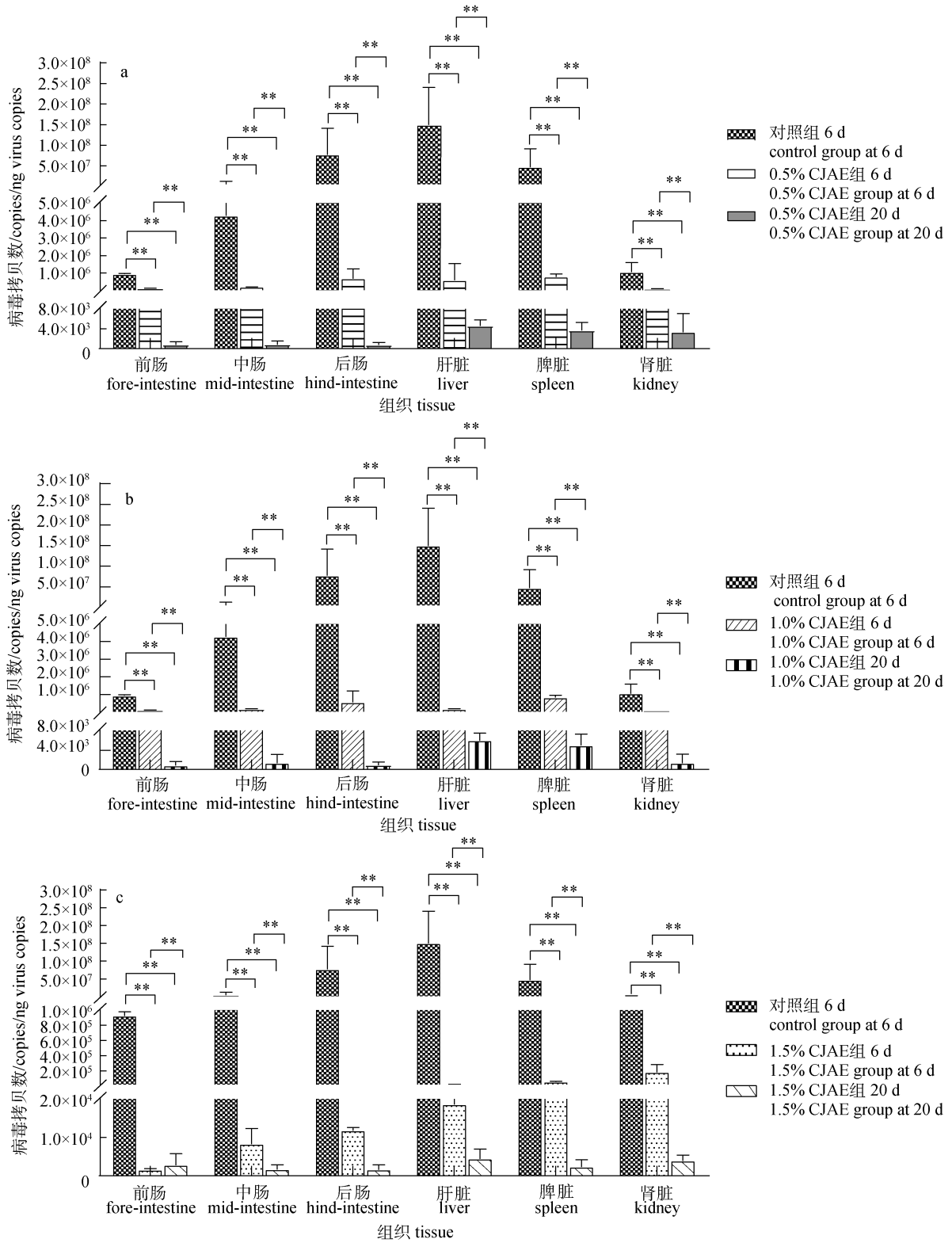


图 6 CJAE 抗 LMBV 组织病毒含量分析结果

*表示与对照组比较差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 6 Tissue virus load analysis of anti-LMBV effect of CJAE

* denotes significant difference compared with control group ($P<0.05$), ** denotes highly significant difference ($P<0.01$).

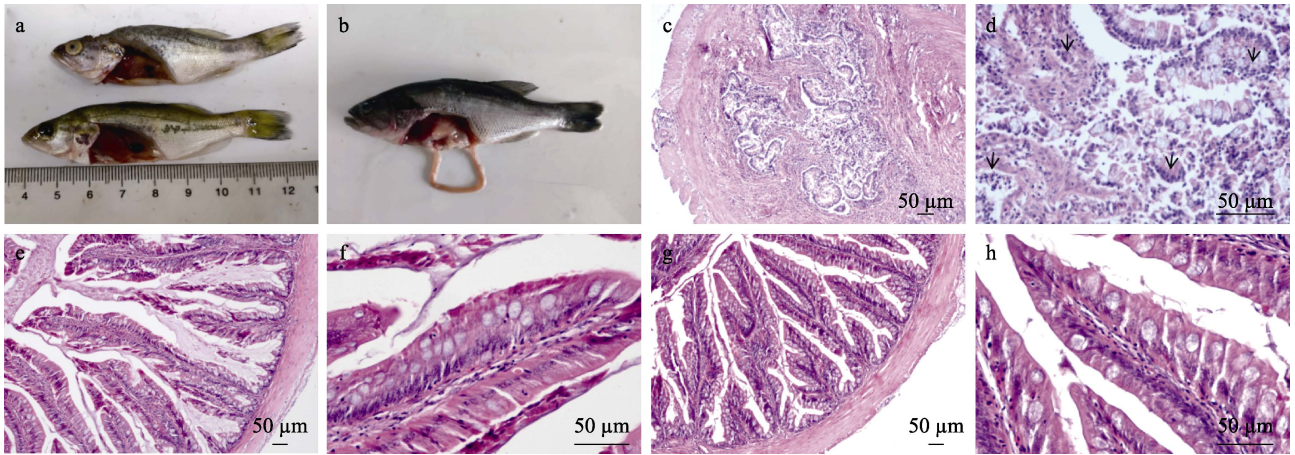


图 7 大口黑鲈肠道组织 H&E 染色

a, b. LMBV 攻毒死亡大口黑鲈肠道解剖图; c, d. LMBV 攻毒死亡大口黑鲈肠道切片;
e, f. CJAE 组攻毒存活大口黑鲈肠道组织切片; g, h. 未攻毒大口黑鲈肠道组织切片.

Fig. 7 H&E staining of intestinal tissue of largemouth bass

a, b. Intestinal anatomical illustration of dead largemouth bass by LMBV infection; c, d. Intestinal slice of dead largemouth bass by LMBV infection; e, f. Intestinal slice of survival largemouth bass after CJAE feeding; g, h. Intestinal slice of unchallenged largemouth bass.

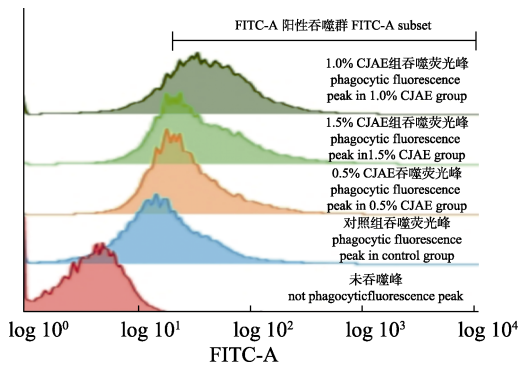


图 8 CJAE 对大口黑鲈头肾白细胞吞噬流式分析结果

Fig. 8 Flow cytometry analysis of phagocytic effect of CJAE on leukocytes of largemouth bass head kidney

证明 CJAE 具有更优异的抗 LMBV 效果, 可以在水产养殖中作为饲料添加剂预防 LMBV 的感染, 1.0%添加量效果最佳, 具有剂量依赖性。

中草药提取物作为水产饲料添加剂在发挥免疫调节^[29]与提高生长性能^[30-31]方面已获得广泛应用。但鱼类抗病毒药物研究多采用浸泡给药^[31]或腹腔注射^[14,32-33], Haetrakul 等^[32]用浸泡给药方式证实鳄嘴花粗提物(*Clinacanthus nutans*)对鲤疱疹病毒 3 型(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV3)的抑制活性, Yu 等^[33]通过注射给药方式证实了紫花地丁水提物对石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus, GIV)的抑制活性, Niu 等^[14]在体外实验评价 20 种

中草药提取物(单体)抑制 LMBV 活性的基础上, 通过注射给药方式证实了两种单体混合物对 LMBV 体内抑制活性, 可能通过激活大口黑鲈 I 型和 III 型干扰素通路发挥抗病毒活性。但鉴于鱼类养殖特征, 饲喂(口服)是最理想的给药方式, 越来越多的研究也表明饲喂给药方式的有效性。Li 等^[34]用饲喂给药方式证实了柴胡皂苷(saikosaponin)的抗 LMBV 活性, Xue 等^[35]用饲喂给药方式证实了七叶苷(esculin)对 LMBV 的体内抑制活性, 本研究采用饲粮添加方式, 研究 CJAE 对 LMBV 的抑制活性, 更具有生产意义。综上所述, 本研究通过体内外实验证明 CJAE 可以直接抑制 LMBV 的增殖, 发挥抗 LMBV 活性。

3.2 CJAE 通过提高大口黑鲈头肾白细胞吞噬活力发挥抗 LMBV 活性

中草药因其多作用靶点、系统性的特点为揭示其作用机制增加了困难。抗病毒药物的作用机制分为直接抗病毒作用与间接抗病毒作用。直接抗病毒作用表现为药物直接杀灭病毒、阻止病毒吸附、入侵或抑制病毒在体内转录与复制。间接抗病毒作用表现为药物激活机体免疫系统^[36-37]、参与机体/细胞炎症调节^[38]、或抗氧化^[39]等。鱼类先天性免疫被认为在帮助机体

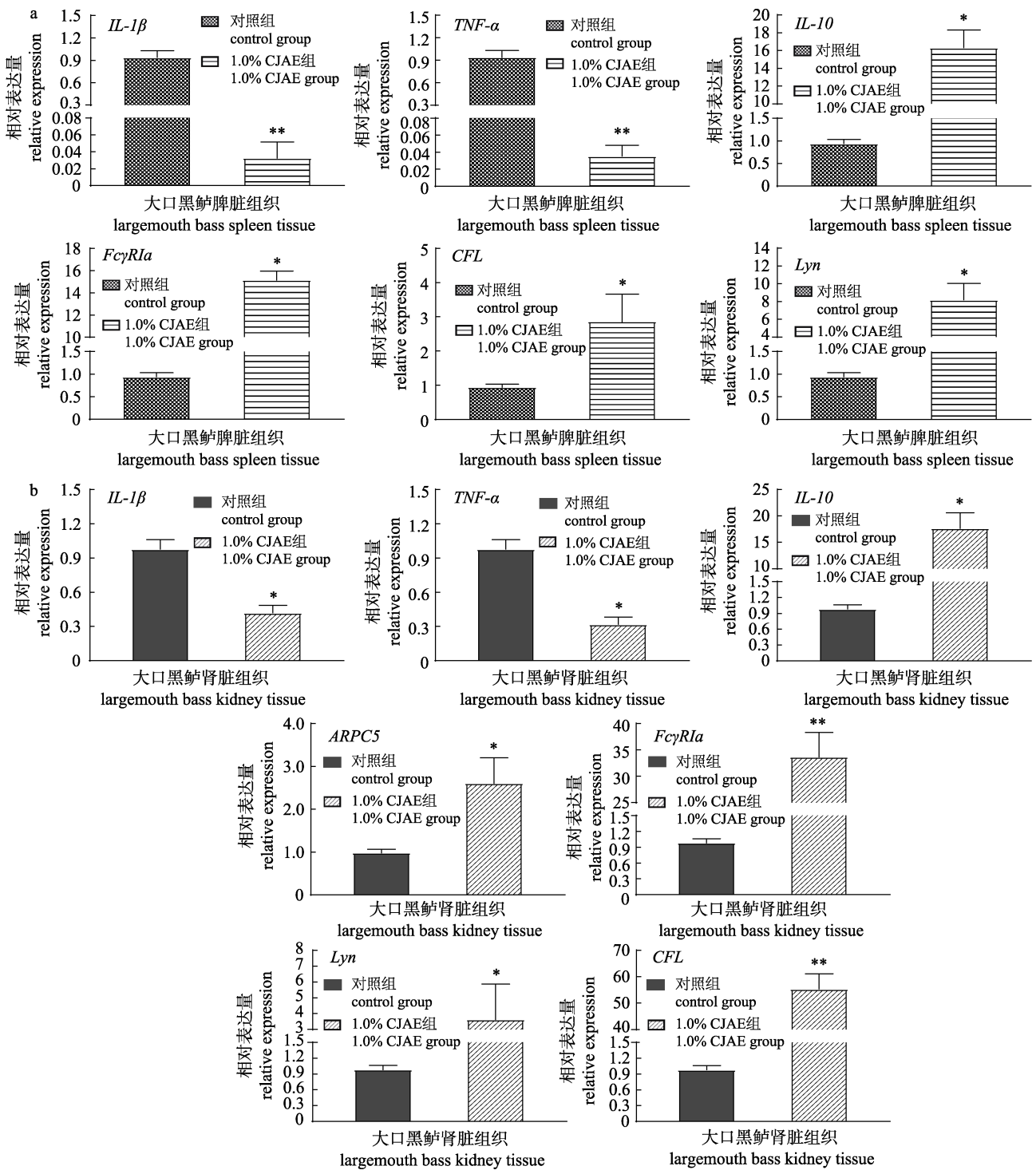


图 9 CJAE 对大口黑鲈组织免疫相关基因表达水平的影响

a. 脾脏; b. 头肾. *表示与对照组比较差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$).

Fig. 9 Effect of CJAE on immune-related gene expression in largemouth bass tissues

a. Spleen tissue; b. Head kidney tissue.

* denotes significant difference compared with control group ($P < 0.05$), ** denotes highly significant difference ($P < 0.01$).

清除病毒、细菌、寄生虫等病原体发挥重要作用, 复杂的天然免疫网络、大量先天性免疫细

胞及非特异性免疫因子为鱼类提供最为重要的免疫屏障, 发挥重要的间接抗病毒作用。吞噬

(Phagocytosis)是机体天然免疫中一种重要防御机制,是评价大口黑鲈天然免疫的重要指标之一^[40-41]。病原体入侵机体,吞噬细胞吞噬受体与病原体结合,继而被吞噬细胞吞噬,激活酪氨酸激酶家族蛋白,启动信号转导,发生抗原内化和病原体降解,并将病原体加工成具有抗原决定簇的肽段,完成抗原递呈与免疫应答^[42],是机体免疫系统最为重要的激活机制。本研究通过体内、体外实验,证实了 CJAE 的直接抗病毒作用,采用吞噬率评价 CJAE 对大口黑鲈天然免疫的影响,进一步 qPCR 方法验证了 CJAE 对大口黑鲈吞噬相关基因的表达调控。结果发现 CJAE 饲喂后,显著提高大口黑鲈头肾白细胞的吞噬能力,激活 Fc 受体介导的吞噬通路关键基因——*FcγR1a*、*Lyn*、*CFL*、*ARPC5* 的表达,推测 CJAE 可能通过激活 Fc 受体介导的吞噬通路发挥免疫调节作用。对刺五加水提物抗病毒研究表明,刺五加水提物提高了大口黑鲈白细胞对抗原的吞噬活性(吞噬率: 80.9%)^[10],与此一致, CJAE 也显著提高了大口黑鲈的吞噬率(吞噬率: 64.2%),推测 CJAE 通过调控吞噬细胞吞噬作用激活大口黑鲈天然免疫,发挥间接抗 LMBV 作用,可能还存在其他抗 LMBV 机制。

3.3 CJAE 通过减轻 LMBV 感染引起的大口黑鲈肠道损伤发挥抗 LMBV 活性

抑制病毒引起的组织炎症损伤是抗病毒药物评价的关键指标,也是药物能否控制病毒感染成功与否的关键。前期研究证明,炎症是 LMBV 的重要致病机制^[6,8]。LMBV 感染大口黑鲈引起体表溃疡、内脏肿大^[5],随病程发展,组织病毒载量逐渐增加,发生炎性细胞浸润,引发多组织炎症反应最终导致机体死亡^[6,8]。Gao 等^[23]研究发现 LMBV/MRV 感染引起明显的肠道炎症,前、中和后肠组织炎症细胞大量浸润。大蓟具有优异的抗炎功效,前期研究显示在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞、PC12 细胞和小鼠炎症模型中,大蓟提取物显著下调 *IL-1β*、*TNF-α* 和 *iNOS* 等促炎细胞因子的表达^[18,43]。在本研究中笔者发现投喂 CJAE 明显减轻肠道组织损伤与炎性细胞浸润,进一步采

用 qPCR 方法验证了 CJAE 对大口黑鲈炎症相关因子的调控,结果显示 CJAE 显著降低大口黑鲈关键促炎细胞因子(*TNF-α* 与 *IL-1β*)的表达,并显著提高抗炎细胞因子(*IL-10*)的表达,证明 CJAE 可能通过抗炎作用发挥抗病毒活性。前期牛晨^[8]研究发现,白屈菜红碱能有效抑制 LMBV 感染造成的组织器官炎性细胞浸润与组织炎症损伤,揭示白屈菜红碱通过抑制 LMBV 相关的炎症损伤,发挥抗 LMBV 活性,与笔者的研究结果一致。但 CJAE 究竟通过何种信号通路发挥抗炎活性,值得进一步深入研究。

4 结论

综上所述, CJAE 具有显著的体内、体外抗 LMBV 活性;直接抗 LMBV 活性表现为 CJAE 抑制 LMBV 在 SCB3 细胞中的增殖与大口黑鲈组织病毒载量;间接抗 LMBV 活性表现为 CJAE 提高大口黑鲈吞噬细胞吞噬活性与改善 LMBV 感染造成的大口黑鲈组织炎症;进一步研究发现, CJAE 最佳添加量为 1.0%。本研究为生产中采用 CJAE 预防 LMBV 感染以及进一步分析 CJAE 中的抗 LMBV 活性成分提供了基础。

参考文献:

- [1] Dong H X, Zeng W W. Research progress on largemouth bass ranavirus disease[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(3): 746-756. [董寒旭, 曾伟伟. 大口黑鲈蛙虹彩病毒病研究进展[J]. 病毒学报, 2022, 38(3): 746-756.]
- [2] Zhao L N, Zhong Y, Luo M J, et al. Largemouth bass ranavirus: Current status and research progression[J]. Aquaculture Reports, 2023, 32: 101706.
- [3] Yu X D, Ke F, Zhang Q Y, et al. Genome characteristics of two ranavirus isolates from mandarin fish and largemouth bass[J]. Pathogens, 2023, 12(5): 730.
- [4] Grizzle J M, Altinok I, Fraser W A, et al. First isolation of largemouth bass virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 50(3): 233-235.
- [5] Deng G C, Xie J, Li S J, et al. Isolation and preliminary identification of the pathogen from largemouth bass ulcerative syndrome[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 871-877. [邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871-877.]

- [6] Wang Q, Li K B, Zeng W W, et al. Progress on viral disease caused by largemouth bass ranavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(2): 73-76. [王庆, 李凯彬, 曾伟伟, 等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(2): 73-76.]
- [7] Li Q Y, Huang X H, Hao G J, et al. Construction of efficacy model against largemouth bass virus and screening of antiviral Chinese medicine[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2022, 53(6): 1513-1522. [李秋语, 黄小红, 郝贵杰, 等. 抗大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)蛙虹彩病毒药效模型的构建及其抗病毒中药筛选[J]. *海洋与湖沼*, 2022, 53(6): 1513-1522.]
- [8] Niu C. Study on the anti-LMBV activity of chelerythrine[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021. [牛晨. 白屈菜红碱抗大口黑鲈蛙虹彩病毒活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.]
- [9] Liu X D, Zhang Y B, Zhang Z L, et al. Isolation, identification and the pathogenicity characterization of a Santee-Cooper ranavirus and its activation on immune responses in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 135: 108641.
- [10] Ma Y P, Xu J J, Yang H W, et al. Anti-MRV activity of *Acanthopanax senticosus* aqueous extract (ASAE) and its immunomodulatory effects on *Micropterus salmoides*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(3): 1207-1217. [马艳平, 徐晶晶, 杨宏伟, 等. 刺五加水提取物抗鳊蛙虹彩病毒活性及其对大口黑鲈免疫调节作用的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(3): 1207-1217.]
- [11] Cheng Y, Liu M Z, Yu Q, et al. Effect of EGCG extracted from green tea against largemouth bass virus infection[J]. *Viruses*, 2023, 15(1): 151.
- [12] Wang M M, Yang B, Ren Z Y, et al. Inhibition of the largemouth bass virus replication by piperine demonstrates potential application in aquaculture[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2023, 46(3): 261-271.
- [13] Yang B, Liu T, Yang F, et al. Mitochondrial apoptotic pathway-mediated suppression of largemouth bass virus proliferation by berberine[J]. *Aquaculture*, 2024, 588: 740881.
- [14] Niu Y J, Fu X Z, Lin Q, et al. *In vivo* and *in vitro*, antiviral effects of two mixture of Chinese herbal drug active monomers against MSRV and LMBV in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 577: 739977.
- [15] Chen Q, Gong Q F. Study on hemostatic mechanism of carbonized *Cirsium japonicum* DC.[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2013, 28(6): 602-604. [陈泣, 龚千锋. 大蓟炭的止血机制的初步研究[J]. *西北药学杂志*, 2013, 28(6): 602-604.]
- [16] Yoo Y M, Nam J H, Kim M Y, et al. Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(4): 760-764.
- [17] Lee J H, Choi S I, Lee Y S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract from leaves of *Cirsium japonicum*[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2008, 17(1): 38-45.
- [18] Jang M, Kim K H, Kim G H. Antioxidant capacity of thistle (*Cirsium japonicum*) in various drying methods and their protection effect on neuronal PC12 cells and *Caenorhabditis elegans*[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(3): 200.
- [19] Yang X C. Studies on the chemical constituents, biological activity and processing method of *Cirsium japonicum* DC.[D]. Shanghai: Fudan University, 2009. [杨星辰. 大蓟化学成分、生物活性及炮制方法的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.]
- [20] Jo S, Kim S, Shin D H, et al. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 145-151.
- [21] Zhu D F, Su H X, Ke C Q, et al. Efficient discovery of potential inhibitors for SARS-CoV-2 3C-like protease from herbal extracts using a native MS-based affinity-selection method[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 209: 114538.
- [22] Ma Q. Bioactivity analysis of ingredients and flavonoids compounds from *Cirsium japonicum* DC[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019. [马勤. 大蓟化学成分及其黄酮类化合物的生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.]
- [23] Gao X R, Zhang Z Y, Ma Y P, et al. Mandarin fish ranavirus (MRV) infection induced inflammation and histologic lesions in the gut of mandarin fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2024: e14029.
- [24] Liu X D, Chen N, Gao X J, et al. The infection of red seabream iridovirus in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and the host immune related gene expression profiles[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 474-484.
- [25] He J, Xie T L, Li X, et al. Molecular cloning of Y-Box binding protein-1 from mandarin fish and its roles in stress-response and antiviral immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 406-415.
- [26] Tao Z Q, Ma Y P, Hao L, et al. Epigallocatechin gallate exerts *in vitro* anti-MRV effect via activation of interferon-stimulated genes[J]. *Fish Pathology*, 2024, 59(2): 54-62.
- [27] Wang J Y, Wu J, Ma Y P, et al. Characterization of a

- membrane Fc γ receptor in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and its response to bacterial challenge[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2024, 50(3): 1123-1140.
- [28] Wu J, Nie Y F, Ma Y P, et al. Analysis of phagocytosis by mIgM⁺ lymphocytes depending on monoclonal antibodies against IgM of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 399-408.
- [29] Vallejos-Vidal E, Reyes-López F, Teles M, et al. The response of fish to immunostimulant diets[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 34-69.
- [30] Awad E, Awaad A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 40-54.
- [31] Zhou Y L, Guo J L, Tang R J, et al. High dietary lipid level alters the growth, hepatic metabolism enzyme, and anti-oxidative capacity in juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(1): 125-134.
- [32] Haetrakul T, Dunbar S G, Chansue N. Antiviral activities of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau extract against Cyprinid herpesvirus 3 in koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(4): 581-587.
- [33] Yu Q, Liu M Z, Xiao H H, et al. The inhibitory activities and antiviral mechanism of *Viola philippica* aqueous extracts against grouper iridovirus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(6): 859-868.
- [34] Li J Y, Xue M Y, Xu C, et al. Saikosaponin C as an antiviral agent inhibits the largemouth bass ranavirus *in vitro* and *in vivo*[J]. *Aquaculture*, 2024, 585: 740632.
- [35] Xue M Y, Li J Y, Meng Y, et al. Antiviral effects of esculin on largemouth bass ranavirus *in vivo* and *in vitro*[J]. *Aquaculture Reports*, 2024, 34: 101882.
- [36] Zhang X, Xue M Y, Liu L, et al. Rhein: A potent immunomodulator empowering largemouth bass against MSRV infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 144: 109284.
- [37] Mohapatra G, Sahoo B M, Chowdhury B, et al. Herbal drugs as immune booster against viral infections[J]. *Current Nutrition & Food Science*, 2022, 18(2): 132-143.
- [38] Manayi A, Nabavi S M, Khayatkashani M, et al. Argabin could target inflammasome-induced ARDS and cytokine storm associated with COVID-19[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(12): 8221-8225.
- [39] Checconi P, de Angelis M, Marcocci M E, et al. Redox-modulating agents in the treatment of viral infections[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 4084.
- [40] Zhu W T, Su J G. Immune functions of phagocytic blood cells in teleost[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(2): 630-646.
- [41] Zhang M J, Chen X Y, Xue M Y, et al. Oral vaccination of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) against largemouth bass ranavirus (LMBV) using yeast surface display technology[J]. *Animals*, 2023, 13(7): 1183.
- [42] Sun H, Xu X Y, Tian X L, et al. Activation of NF- κ B and respiratory burst following *Aspergillus fumigatus* stimulation of macrophages[J]. *Immunobiology*, 2014, 219(1): 25-36.
- [43] Park J C, Yoo H, Kim C E, et al. Hispidulin-7-O-neohesperidoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* attenuates the production of inflammatory mediators in LPS-induced raw 264.7 cells and HT-29 cells[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2017, 13(52): 707-711.

Antiviral activity of *Cirsium japonicum* aqueous extract (CJAE) against largemouth bass ranavirus (LMBV)

MA Yanping, HAO Le, FENG Guoqing, WANG Gang, LIU Zhenxing

Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China

Abstract: Largemouth bass ranavirus (LMBV) is widely prevalent in China, seriously threatening the safety of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) aquaculture. Chinese herbal medicines have become important for screening LMBV prevention and treatment drugs. Many natural medicine plants have been shown to have direct or indirect antiviral effects. Natural medicine plants can directly impair the virus architecture, hinder the virus invasion, or block the virus entry. In multiple cases, natural medicine plant ingredients have been confirmed to inhibit the virus by stimulating the host's innate immune responses. *Cirsium japonicum* has many biological activities such as antivirus and anti-inflammation properties. The anti-LMBV effect of *Cirsium japonicum* aqueous extract (CJAE) was analyzed *in vitro* and *in vivo* to investigate the inhibitory effect on LMBV. CCK-8 tests determined that the safe concentration of CJAE on *Siniperca chuatsi* brain cells (SCB3) was ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$, and CC_{50} value was 1487.0 $\mu\text{g/mL}$. The qPCR and indirect immunofluorescence assay showed that CJAE could effectively inhibit the synthesis of viral nucleic acid and MCP protein in SCB3 cells, and the EC_{50} value was 457.3 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the inhibition rates of CJAE on LMBV invasion and replication were 98.46% and 99.31%, respectively. CJAE was added to the basal diet at 0.5%, 1.0%, and 1.5% to feed largemouth bass twice daily for 15 days. Then a challenge test (1×10^6 TCID_{50} LMBV) was conducted. Feeding CJAE could provide 35%–60% RPS and reduced the viral load of spleen, liver, kidney and intestine of largemouth bass by 87.57%–99.99% through tissue virus copy number determination, which differed significantly from that in the control group ($P < 0.01$). CJAE increased the phagocytic activity of head kidney leukocytes by 35.88%–60.75% through phagocytosis assay, and activated the expression of phagocytosis-related genes (*Fc γ RIa*, *CFL* and *Lyn*) through mRNA expression determination; CJAE significantly improved the inflammation of largemouth bass caused by LMBV infection through tissue H&E staining. Further studies showed that CJAE significantly activated the expression of anti-inflammatory factors (*IL-10*) and inhibited the expression of pro-inflammatory factors (*TNF- α* and *IL-1 β*). This study explored the anti-LMBV activity and underlying mechanisms of CJAE and supplied new insights for screening anti-LMBV drugs. This study provides a basis for using CJAE to prevent LMBV infection in production and further analysis of anti-LMBV active ingredients in CJAE.

Key words: *Cirsium japonicum* aqueous extract; largemouth bass ranavirus; EC_{50} ; phagocytosis; inflammation

Corresponding author: LIU Zhenxing, E-mail: liuzhenxing@gdaas.cn; WANG Gang, E-mail: wanggang@gdaas.cn