



表没食子儿茶素没食子酸酯衍生物及过硫酸氢钾复合物粉体外抑制 I 型草鱼呼肠孤病毒的研究

徐伟^{1,2,3}, 闻金萱^{1,2,3}, 李鹏飞⁴, 吕利群^{1,2,3}, 王浩^{1,2,3*}

- 1 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306
- 2 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306
- 3 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306
- 4 广西科学院, 广西 南宁 530000

徐伟, 闻金萱, 李鹏飞, 吕利群, 王浩. 表没食子儿茶素没食子酸酯衍生物及过硫酸氢钾复合物粉体外抑制 I 型草鱼呼肠孤病毒的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1432-1446.

XU Wei, WEN Jinxuan, LI Pengfei, LYU Liqun, WANG Hao. Inhibition of genotype I GCRV by EGCG derivatives and compound potassium peroxymonosulfate powder *in vitro*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1432-1446.

摘要: 【目的】为了将表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)的 2 种衍生物和过硫酸氢钾复合物粉(compound potassium peroxymonosulfate powder, KMPS)运用于体外细胞实验中, 以评估这 3 种药物对 I 型草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)的抑制和杀灭效果。【方法】利用 MUSE 法和 CCK-8 法评估表没食子儿茶素没食子酸酯棕榈酸酯(epigallocatechin gallate palmitate, EGCG-P)、乙酰化表没食子儿茶素没食子酸酯(peracetylated epigallocatechin gallate, AcEGCG)和过硫酸氢钾复合物粉 3 种药物对细胞的安全浓度, 利用体外细胞感染病毒模型, 使用不同浓度测试物处理病毒或细胞后感染病毒, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)法分析不同测试物对病毒的抑制和杀灭效果。使用不同浓度测试物处理细胞后, 利用 qRT-PCR 法检测宿主免疫相关基因变化情况。【结果】EGCG-P 和 AcEGCG 对 GCRV-JX01 感染细胞的抑制作用呈剂量依赖性, 且 EGCG-P 的抑制效果优于 AcEGCG, EGCG-P 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时病毒量相对于对照组上清中病毒的滴度分别降低了 10^2 copies/ μL 和 10^3 copies/ μL , 而 AcEGCG 浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才能达到相同抑制效果。杀灭实验结果表明, EGCG-P、AcEGCG 和 KMPS 对 GCRV-I 毒株均有杀灭效果,

资助项目: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-45-16); 农业科研杰出人才培养计划(13210256)

This work was supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45-16) and the Chinese Outstanding Talents in Agricultural Scientific Research (13210256).

*Corresponding author. Tel: +86-21-61900453, E-mail: h-wang@shou.edu.cn

Received: 2022-06-26; Accepted: 2023-01-28; Published online: 2023-02-28

最低有效杀灭剂量 KMPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < EGCG-P (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < AcEGCG (180 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。草鱼白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)和髓样分化因子 (medullary differentiation factor, MyD88)相对于对照组在测试物中均有不同程度上调,其中 EGCG-P (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 AcEGCG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理组分别在 8 h 和 24 h 上调较为显著。【结论】EGCG-P、AcEGCG 和 KMPS 对 GCRV-I 均有良好的抑制效果和杀灭效果,其中 EGCG-P 和 KMPS 能够在 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 较低浓度下对 GCRV 发挥显著性的抑制和杀灭效果,且在 24 h 后不会引起机体产生炎症反应。本研究为拮抗草鱼呼肠孤病毒环境友好型消毒产品的开发提供参考。

关键词: 草鱼出血病; 草鱼呼肠孤病毒; 表没食子儿茶素没食子酸酯棕榈酸酯; 乙酰化表没食子儿茶素没食子酸酯; 过硫酸氢钾复合物粉

Inhibition of genotype I GCRV by EGCG derivatives and compound potassium peroxymonosulfate powder *in vitro*

XU Wei^{1,2,3}, WEN Jinxuan^{1,2,3}, LI Pengfei⁴, LYU Liqun^{1,2,3}, WANG Hao^{1,2,3*}

1 National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3 Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

4 Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530000, Guangxi, China

Abstract: [Objective] To evaluate the inhibitory and killing effects of two epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and compound potassium peroxymonosulfate powder (KMPS) on grass carp reovirus genotype I (GCRV) by *in vitro* cell experiments. [Methods] The safe concentrations of epigallocatechin gallate palmitate (EGCG-P), peracetylated epigallocatechin gallate (AcEGCG), and KMPS were assessed by MUSE and CCK-8 assays. Different concentrations of EGCG-P, AcEGCG, and KMPS were used to treat the cells infected with GCRV-JX01, and the inhibitory and killing effects of the three substances on the virus were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Furthermore, qRT-PCR was employed to determine the expression levels of the genes involved in host immune responses in the cells treated with the three substances and then infected with the virus. [Results] EGCG-P and AcEGCG suppressed the viral proliferation in a concentration-dependent manner, and EGCG-P outperformed AcEGCG. The EGCG-P of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased the titer of GCRV-JX01 by 10^2 copies/ μL and 10^3 copies/ μL , respectively, compared with the control group, while AcEGCG achieved the same inhibitory effect at the concentrations of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. EGCG-P, AcEGCG, and KMPS all had killing effect on GCRV-JX01, and the lowest dose for effective killing followed the trend of KMPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < EGCG-P (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < AcEGCG (180 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Moreover, EGCG-P, AcEGCG, and KMPS up-regulated the expression of interleukin-1 β (IL-1 β),

interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and myeloid differentiation factor (MyD88) compared with the control group. In particular, the up-regulation was more significant after the treatment with EGCG-P (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 h and AcEGCG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. **[Conclusion]** EGCG-P, AcEGCG, and KMPS have good inhibitory and killing effects on GCRV-I. EGCG-P and KMPS at a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can significantly inhibit GCRV replication without evoking an inflammatory response in 24 h. This study provides a reference for the development of environmentally friendly disinfection products for GCRV.

Keywords: grass carp hemorrhagic disease; grass carp reovirus (GCRV); epigallocatechin gallate palmitate (EGCG-P); peracetylated epigallocatechin gallate (AcEGCG); compound potassium peroxymonosulfate powder

草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)感染草鱼引起的病毒性草鱼出血病流行广、病死率高,是危害草鱼严重的疾病之一,且该病多发于鱼种阶段,给草鱼养殖业造成了严重的经济损失。草鱼呼肠孤病毒隶属呼肠孤病毒科、水生动物呼肠孤病毒属,是中国分离的第一株鱼类病毒。目前已经有 50 多株分离的毒株,其中包括 GCRV-JX01^[1]、GCRV-873^[2]、GCRV-104^[3]、GCRV-AH528^[4]、GCRV-HZ08^[5]等,依据病毒基因序列及毒株带型分析可以分为 3 种基因型: GCRV-I、GCRV-II 和 GCRV-III^[6]。不同基因型毒株间氨基酸与核苷酸序列同源性小于 30%,而同一基因型中,氨基酸与核苷酸序列同源性大于 95%。在已报道的草鱼细胞感染模型中,不同基因型 GCRV 分离株感染细胞引起不同的症状,GCRV-I 可以在细胞上产生经典的致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),细胞大量死亡皱缩呈破碎的渔网结构,因其感染症状典型且感染速度快,是开展药物筛选和评价的良好模型。GCRV-II 感染细胞后观察不到典型的 CPE,但病毒仍然能在细胞内增殖。GCRV-III 可以使细胞出现 CPE 现象,但感染速率较 GCRV-I 更慢^[3,7]。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是茶多酚中主要的活性成分,含量约占茶多酚总量的 27%–59%^[8]。EGCG 具有

广谱的抗病毒活性和增强免疫力作用,在不同的病毒中其抗病毒和抑制病毒机制不尽相同。前期研究显示,EGCG 能够通过阻断 I 型 GCRV 的 VP5 蛋白与草鱼的层粘连蛋白受体蛋白(laminin receptor)结合从而抑制病毒在宿主细胞中增殖^[8-12]。另外,EGCG 和茶多酚常作为饲料添加剂被广泛地应用于农业生产,如茶多酚对鱼体糖类与脂质代谢有促进作用^[13-14]。EGCG 同时也可作为消毒剂,如 EGCG 能通过影响产气荚膜梭菌的 DNA 分离和细胞分裂,达到一定的抗菌作用^[15];EGCG 在一定钙离子浓度条件下,能有效杀灭水中的大肠杆菌,EGCG 的这一抗菌性能使其适用于饮用水消毒^[16]。EGCG 分子结构中含有大量的活性酚羟基,在保持自身生物活性的同时,也使其存在脂溶性差、体内不稳定、生物利用率低、机体吸收缓慢等缺点,制约了 EGCG 的开发与应用^[17]。近期有研究显示,对 EGCG 的 8 个酚羟基进行结构修饰,使其部分酰基化或甲基化,其衍生物表没食子儿茶素没食子酸酯棕榈酸酯(epigallocatechin gallate palmitate, EGCG-P)和乙酰化表没食子儿茶素没食子酸酯(peracetylated epigallocatechin gallate, AcEGCG)具有良好的脂溶性,生物利用度也得到了明显提高,如在小鼠灌胃实验中,AcEGCG 组血浆中药时曲线下面积是 EGCG 组的 2.4 倍,说明 AcEGCG 在体内的生物利用度

明显高于 EGCG^[18]。在某些方面, 其衍生物表现出更强的生物活性^[19], 如酯化 EGCG 较 EGCG 显著提升了抗 PRRSV 活性与抗流感病毒活性^[20]、乙酰化 EGCG 较 EGCG 显著提升了蛋白酶抑制活性^[21]等, 新官能团的引入可以提高 EGCG 的利用效率, 扩大其应用范围。

过硫酸氢钾复合物粉 (compound potassium peroxymonosulfate powder, KMPS) $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ 是一种平衡稳定的过氧化物、表面活性剂、有机酸及无机缓冲系统组成的混合物, 其主要成分为过硫酸氢钾三盐复合物 (KMPS)。过硫酸氢钾复合物粉具有广谱的杀灭病原微生物效果, 对鸡新城疫病毒^[22]、禽流感病毒^[23]、口蹄疫病毒^[24]和非洲猪瘟病毒^[25]均具有较好的杀灭效果。过硫酸氢钾复合物粉为氧化型消毒剂, 基本不会产生导致“致癌、致畸性、致突变”三致作用的消毒副产物, 最终消毒产物是大自然中存在的硫酸根离子、氧气等无机物, 对环境无毒害作用, 且活性氧的增加可用于养殖水体的解毒、降低应激反应、提高水能量等^[26], 有研究发现过硫酸氢钾复合物粉在饮用水消毒方面有较好的应用前景^[27]。因此, 过硫酸氢钾复合物粉使用安全性高, 且能用于控制多种病毒感染, 在水产养殖上具有潜在的消毒应用价值。

本研究应用 I 型 GCRV 体外感染 CIK 细胞模型, 比较分析 EGCG 衍生物及过硫酸氢钾复合物对 GCRV 病毒的抑制和杀灭效果, 以期为开发拮抗草鱼呼肠孤病毒的环境友好型消毒剂产品提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂及毒株

草鱼肾细胞系 (CIK) 和 I 型草鱼呼肠孤病毒 (GCRV-JX01) 由国家水生动物病原库 (上海海洋大学) 保藏。细胞培养使用的 M199 细胞培养

基购于上海吉诺生物医药技术公司, 胎牛血清购于杭州四季青生物工程公司, 胰蛋白酶购于上海吉诺生物医药技术公司。表没食子儿茶素没食子酸棕榈酸酯 (EGCG-P) 购于长兴三聚生物科技有限公司, 乙酰化表没食子儿茶素没食子酸 (AcEGCG) 购于成都普瑞法科技开发有限公司, 过硫酸氢钾复合物粉购于烟台金海药业有限公司。CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞毒性实验

MUSE 法检测将 CIK 细胞接种至 6 孔板, 27 °C 条件下培养至细胞贴壁, 将等量梯度稀释的加药培养基逐孔加入, 加药后在 27 °C 条件下培养 24 h, 收集细胞上清与消化后细胞至离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 将 2 管沉淀收集在 50 μL 培养基中, 与 450 μL MuseTM Count & Viability Reagent 混合, 避光反应 5 min, MuseTM Cell Analyzer 仪器上机检测并分析数据。

CCK-8 法检测, 将 CIK 细胞传至 96 孔板, 27 °C 条件下培养至细胞贴壁, 每孔加入 100 μL 梯度稀释的加药培养基, 每个浓度设置 5 个重复, 按照 1:10 的比例配制 CCK-8 和 M199 混合液, 设置 24、48、72 h 3 个时间点, 加入配制好的混合液 100 μL , 静置 5 min 后放入培养基中继续培养 2–4 h。避光条件下用酶标仪检测 450 nm 处的吸光值, 并计算各浓度药物干预下细胞的存活率。

1.3 药物对 I 型 GCRV 的抑制实验

将 CIK 细胞传至 6 孔板, 27 °C 条件下培养至细胞贴壁, 每孔加入 2 mL 梯度稀释的加药培养基, 并设置 DMSO 作为对照组用以排除药物溶剂对细胞毒性胁迫, 药物培养 1 h, 然后加入 GCRV-JX01 病毒 (MOI=1) 吸附 1 h, 弃病毒上清液, 使用 1 mL 1 \times PBS 洗 3 次, 继续加入等量加药培养基, 27 °C 培养直至阳性对照孔中细

胞全部死亡, 取各孔细胞上清样。

1.4 药物对 I 型 GCRV 的杀灭实验

等量梯度稀释药物中加入 GCRV-JX01 病毒 (MOI=1) 作用 15 min, 直接加入 12 孔板细胞中, 感染 2h 后弃上清, 使用 1 mL 1×PBS 洗 3 次, 加入 1 mL 无血清培养基, 27 °C 培养直至阳性对照孔中细胞全部死亡, 取各孔细胞上清样。

1.5 病毒 RNA 的提取与逆转录

将细胞上清 12 000 r/min 离心 1 min, 取 200 μL 上清液加入 20 μL Proteinase K 振荡混匀, 使用病毒基因组 RNA 提取试剂盒提取 RNA[天根生化科技(北京)有限公司, DP315], 然后使用逆转录试剂盒(TaKaRa, 6210A)进行 cDNA 合成。

1.6 药物调控细胞中炎症相关基因的表达

将 CIK 细胞传至 6 孔板, 27 °C 条件下培养至细胞贴壁, 每孔加入 2 mL 梯度稀释的加药培养基, 药物培养至不同时间点, 使用 Trizol 法提取细胞中 RNA, 500 μL Trizol 中添加 100 μL 氯仿, 剧烈振荡 30 s, 室温下静置 5 min。4 °C、12 000 r/min 离心约 15 min 至溶液分 3 层, 将上层水相转移至新的离心管, 加入等体积异丙醇, 振荡 30 s 室温静置 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 离心管底部见白色沉淀, 弃上清添

加 1 mL 75%乙醇, 轻微振荡, 4 °C、12 000 r/min 离心约 5 min, 弃上清, 室温静置 5 min 加入 20–30 μL 的 DEPC 水吹打至溶解, 将总量校准至 500 ng 后, 然后使用逆转录试剂盒(TaKaRa, 6210A)进行 cDNA 合成。

1.7 实时荧光定量 PCR

合成 cDNA 后, 参照 Wang 等^[1]的方法, 反应体系按照 Ssoadvanced SYBR Green Supermix 说明书进行: Ssoadvanced SYBR Green Supermix 6.5 μL, 引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 模板 cDNA 1 μL, ddH₂O 补足至 13 μL 体系。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)反应条件: 95 °C 预变性 3 s; 95 °C 变性 5 s, 55 °C 延伸 15 s, 共 40 个循环。由于翻译延伸因子 1α (elongation factors 1α, EF1α)在试验条件下表达水平稳定, 遂选用 EF1α 作为内参基因, 草鱼白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNFα)和髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)作为免疫相关基因, 引物是根据 GenBank 中登录的核酸序列, 利用 PrimerPremier 5.0 进行设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 qRT-PCR 分析中所用引物序列

Table 1 Primers used in analysis of qRT-PCR

Name	Sequence (5'→3')	GenBank accession No.
EF1α	F: CGCCAGTGTTCCTTCGT	GQ266394.1 ^[28]
	R: CGCTCAATCTCCATCCCTT	
IL-8	F: ATCCACGCTGTCGC	JN255694.1 ^[29]
	R: TCTTTACAGTGAGGGCTA	
MYD88	F: TCCAGTGGTAGACAGCTGCG	MW980918.1
	R: AGGCATCAAAGGTCTCCGGT	
IL-1β	F: TGTGCGGGCTTGAAGTCAT	JQ692172.1
	R: ACGACGTGCTGTGGAGGTAA	
TNFα	F: AAAAGTAACGCTGCCCTTGC	JQ670916.1 ^[28]
	R: GAGCCCAGTTGCACTTTCCT	
GCRV-JX01	F: CAAGACCATTCAAGACTC	JQ042807.1 ^[30]
	R: TCACTCACTTCGACTAAT	

1.8 统计学分析

通过 CCK-8 法检测 EGCG-P、AcEGCG 与过硫酸氢钾复合物粉的细胞毒性时, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光值, 使用 GrapPad Prism 软件进行折线图绘制。通过 MUSE 法检测细胞毒性时, Muse™ Cell Analyzer 仪进行阈值设置并上样后直接检测得出。参照前期实验建立的病毒标准曲线 $Y = -3.368X + 43.508$ 计算不同浓度药物处理组中细胞上清液的病毒拷贝数^[30]。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相关目的基因的相对表达量。使用 SPSS 软件对各组间数据进行 Tukey's HSD 检验, 使用星号(*)表示组间差异, 当 $P > 0.05$ 表示 2 组间的差异不显著, $0.05 \geq P > 0.01$ 表示 2 组间

差异显著, $P \leq 0.01$ 表示 2 组间差异极显著。使用 GrapPad Prism 软件进行折线图绘制。

2 结果与分析

2.1 药物对 CIK 细胞的毒性测试

探究 EGCG-P、AcEGCG 与过硫酸氢钾复合物粉对草鱼细胞 CIK 的安全浓度, 用不同浓度药物提前培养 24–36 h, 显微镜观察对比实验组与对照组细胞形态变化, 并通过 MUSE 法和 CCK-8 法测试 3 种药物的细胞毒性。图 1 显示, 10–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGCG-P 处理细胞后, 显微镜下细胞形态无明显变化, 且细胞死亡数量相当, 而 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EGCG-P 处理后显微镜下细胞相较于

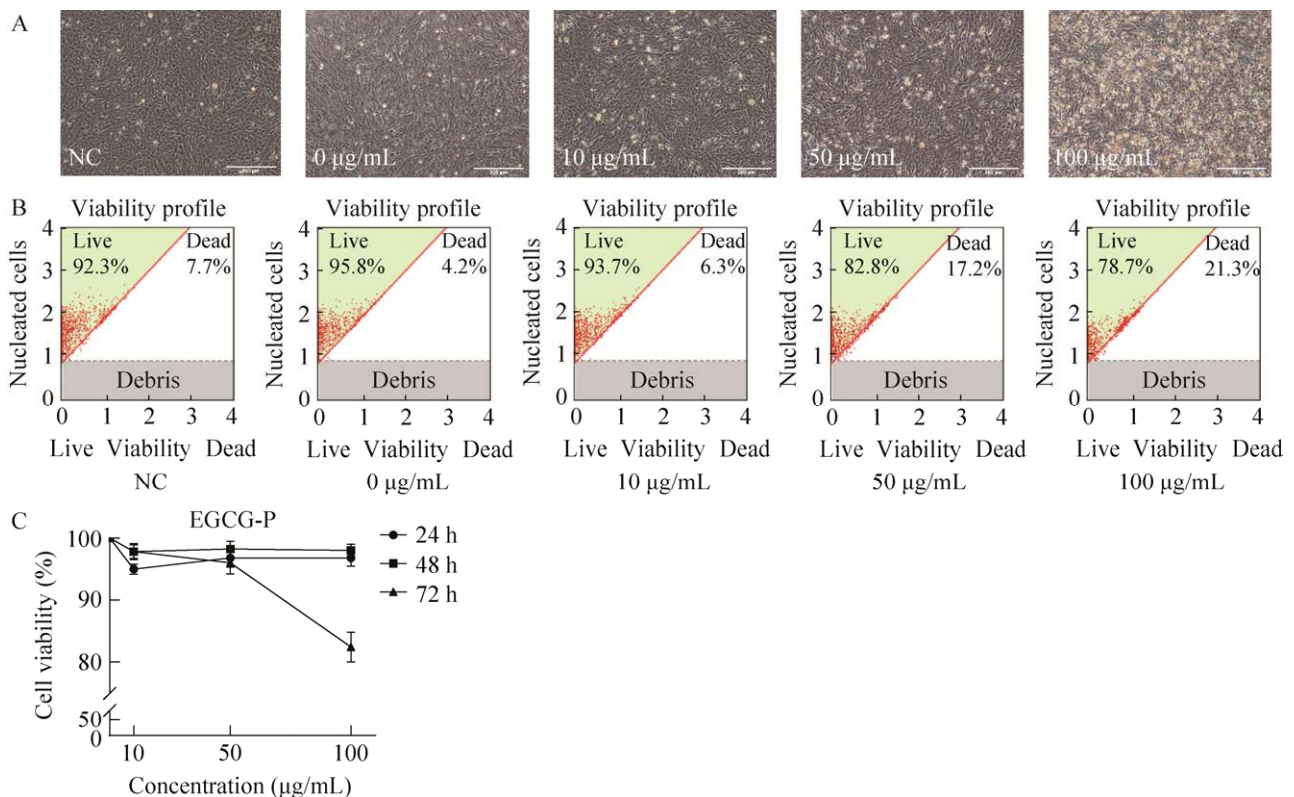


图 1 EGCG-P 对 CIK 细胞的毒性测试 A: 不同浓度 EGCG-P 处理组 CIK 细胞状态. B: 不同浓度 EGCG-P 处理组 MUSE 法检测细胞活力. C: 不同浓度 EGCG-P 处理组 CCK-8 法检测细胞活力

Figure 1 Toxicity test of EGCG-P on CIK cells. A: CIK cell condition in EGCG-P treated groups with different concentrations. B: Cell viability detected by MUSE method in different concentrations of EGCG-P treated groups. C: Cell viability detected by CCK-8 method in different concentrations of EGCG-P treated groups. The error bar indicated mean \pm SD. Standard deviation reflects the degree of dispersion of the data. The same below.

低浓度条件下大量死亡, MUSE 检测 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度以下, 处理组细胞存活率在 75%以上, CCK-8 法检测 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组与对照组的吸光度比值在 90%以上, 2 种方法联合检测表明 50 $\mu\text{g/mL}$ 及以下浓度 EGCG-P 处理细胞, 均无显著细胞毒性。图 2 显示, 10–120 $\mu\text{g/mL}$ AcEGCG 处理细胞后, 显微镜下细胞形态无明显变化, 且细胞死亡数量相当, MUSE 检测 120 $\mu\text{g/mL}$ 浓度以下, 处理组细胞存活率在 75%以上, CCK-8 法检测 120 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组与对照组的吸光度比值在 90%以上, 2 种方法联合检测表明 120 $\mu\text{g/mL}$ 及以下浓度 AcEGCG 处理细胞, 均无显著细胞毒性。图 3 显示, 25–100 $\mu\text{g/mL}$ 过硫酸氢钾复合物处理细胞后, 显

显微镜下细胞形态无明显变化, 且细胞死亡数量相当, 500 $\mu\text{g/mL}$ 过硫酸氢钾复合物处理后显微镜下细胞发生皱缩并大量死亡, MUSE 检测 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度以下, 处理组细胞存活率在 90%以上, CCK-8 法检测 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度实验组与阴性对照组的吸光度比值在 90%以上, 2 种方法联合检测表明 100 $\mu\text{g/mL}$ 及以下浓度过硫酸氢钾复合物处理细胞, 均无显著细胞毒性。

2.2 EGCG-P 和 AcEGCG 对 I 型 GCRV 的抑制作用

为研究 EGCG 衍生物对 GCRV-JX01 的体外抑制效果是否基于其对细胞的保护作用, 使用不同浓度的加药培养基预处理细胞 1 h 后, 加入病毒孵育 1 h, 弃上清后换加药培养基继续

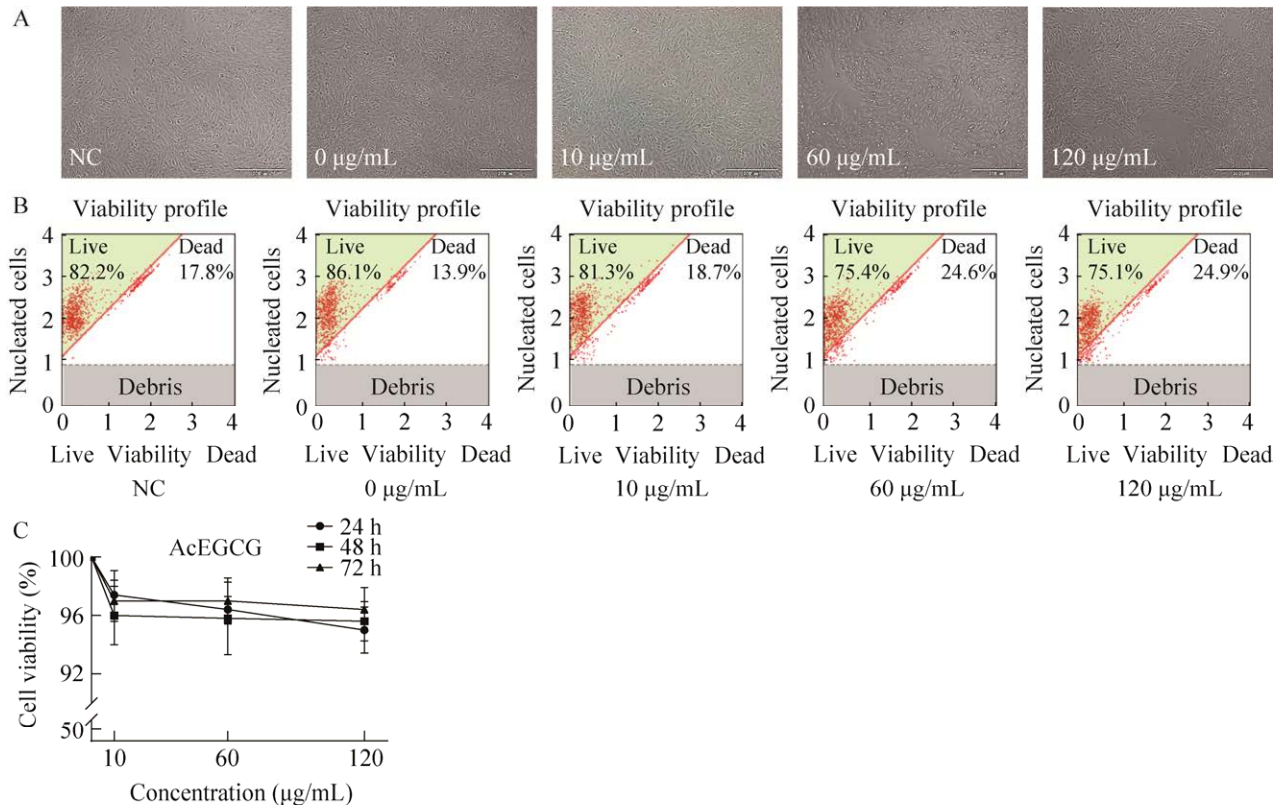


图 2 AcEGCG 对 CIK 细胞的毒性测试 A: 不同浓度 AcEGCG 处理组 CIK 细胞状态. B: 不同浓度 AcEGCG 处理组 MUSE 法检测细胞活力. C: 不同浓度 AcEGCG 处理组 CCK-8 法检测细胞活力

Figure 2 Toxicity test of AcEGCG on CIK cells. A: CIK cell condition in AcEGCG treated groups with different concentrations. B: Cell viability detected by MUSE method in different concentrations of AcEGCG treated groups. C: Cell viability detected by CCK-8 method in different concentrations of AcEGCG treated groups.

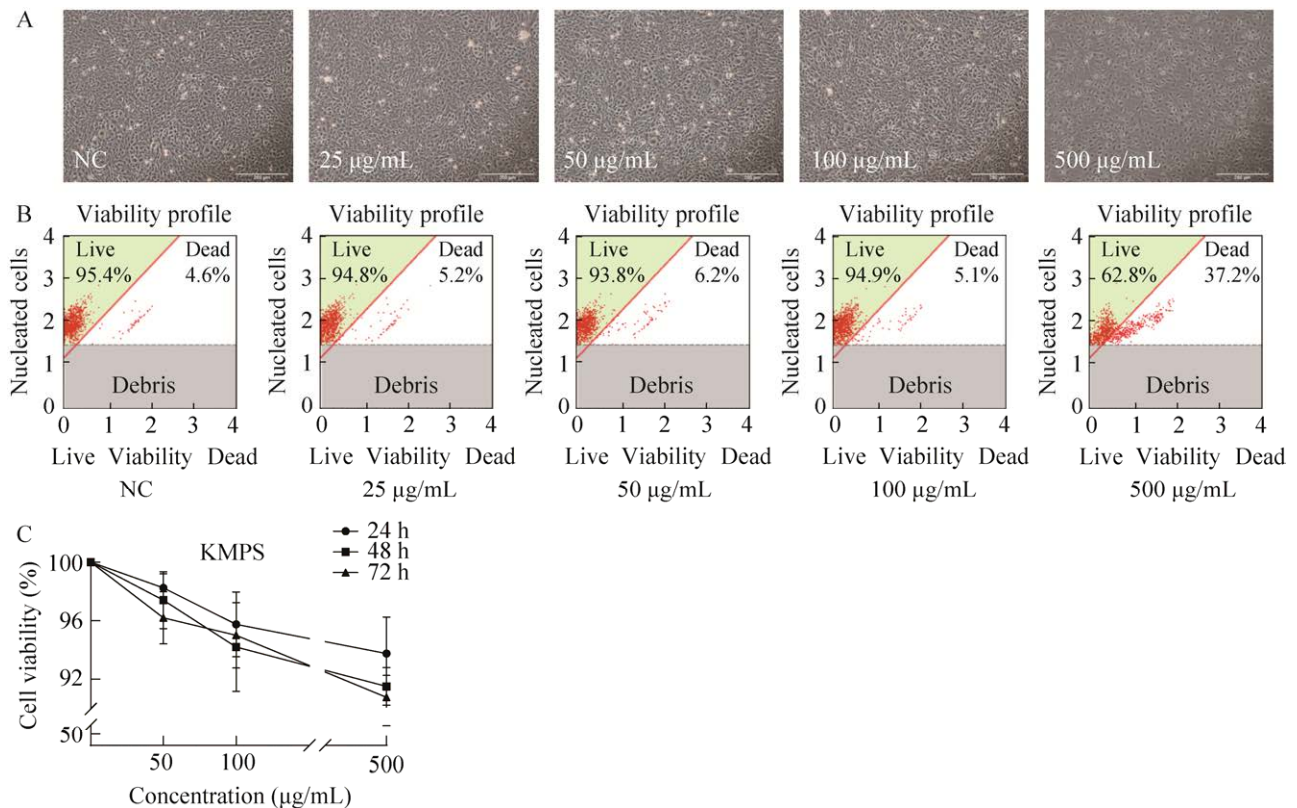


图 3 KMPS 对 CIK 细胞的毒性测试 A: 不同浓度 KMPS 处理组 CIK 细胞状态. B: 不同浓度 KMPS 处理组 MUSE 法检测细胞活力. C: 不同浓度 KMPS 处理组 CCK-8 法检测细胞活力

Figure 3 Toxicity test of KMPS on CIK cells. A: CIK cell condition in KMPS treated groups with different concentrations. B: Cell viability detected by MUSE method in different concentrations of KMPS treated groups. C: Cell viability detected by CCK-8 method in different concentrations of KMPS treated groups.

培养至阳性对照组出现明显 CPE, 提取细胞上清中的病毒 RNA, qRT-PCR 检测细胞上清中病毒的复制情况。如图 4 所示, 2 种 EGCG 衍生物均表现出抑制病毒感染细胞的效果, 随着药物浓度的升高, 相较于对照组, 加药处理组中细胞 CPE 现象明显减弱。当 EGCG-P 和 AcEGCG 浓度分别达到 10 µg/mL 和 30 µg/mL 时, 细胞未出现明显 CPE 现象。且随着浓度提高, 50 µg/mL EGCG-P 处理组的细胞中病毒量较对照组由 4.31×10^5 copies/µL 显著下降至 7.25×10^2 copies/µL, 120 µg/mL AcEGCG 处理组的细胞中病毒量较阳性对照组由 5.91×10^6 copies/µL 显著下降至 9.94×10^3 copies/µL, 证明 10–50 µg/mL

EGCG-P 和 30–120 µg/mL AcEGCG 对 CIK 细胞有明显的保护效果。

2.3 EGCG-P、AcEGCG 和 KMPS 对 I 型 GCRV 的杀灭作用

为了研究 EGCG 衍生物对 GCRV-JX01 的体外抑制效果是否基于其对病毒的杀灭作用, 将不同浓度的加药培养基中加入病毒处理 15 min, 直接加入细胞中作用 2 h, 弃上清后加入培养基继续培养至阳性对照组出现明显 CPE, 提取细胞上清中的病毒 RNA, qRT-PCR 检测细胞上清中病毒的复制情况。如图 5 所示, 2 种 EGCG 衍生物和 KMPS 表现出杀灭病毒效果不同, 其中 KMPS 浓度达到 10 µg/mL 时, 细

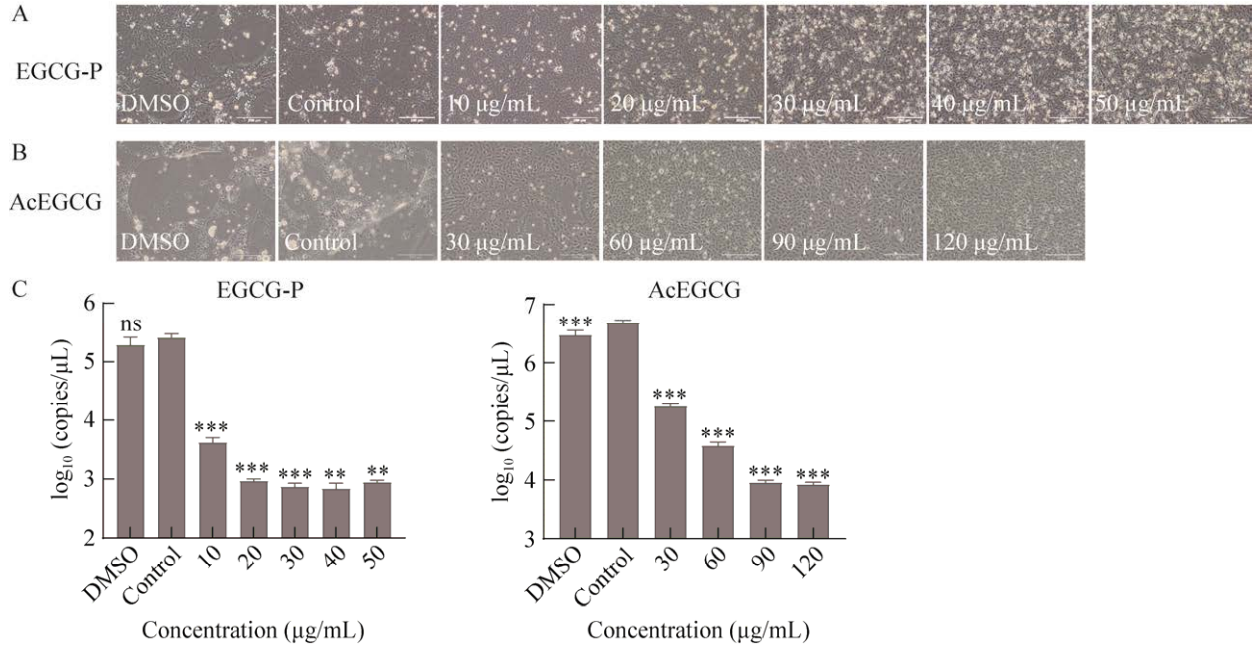


图 4 EGCG-P 和 AcEGCG 对 CIK 细胞的保护作用 A: GCRV 感染后不同浓度 EGCG-P 处理组 CIK 细胞状态. B: GCRV 感染后不同浓度 AcEGCG 处理组 CIK 细胞状态. C: qRT-PCR 检测各浓度药物组 GCRV 病毒复制水平

Figure 4 Protective effect of EGCG-P and AcEGCG on CIK cells. A: CIK cell condition in the group treated with different concentrations of EGCG-P after GCRV infection. B: CIK cell condition in the group treated with different concentrations of AcEGCG after GCRV infection. C: qRT-PCR detection of GCRV virus replication level in each concentration of drug group. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. The same below.

胞中未出现明显 CPE 现象, EGCG-P 和 AcEGCG 浓度分别升高至 120 µg/mL 和 250 µg/mL 时, 细胞 CPE 现象才能消失。随着浓度提高, 加药处理组的细胞中病毒量显著下降, 其中 50 µg/mL KMPs 中病毒量为 1.8×10^2 copies/µL 相较于对照组 1.27×10^6 copies/µL 显著下降, 120 µg/mL EGCG-P 中病毒量为 6.81×10^3 copies/µL 相较于对照组 1.60×10^6 copies/µL 显著下降, 而 250 µg/mL AcEGCG 中病毒量为 1.21×10^5 copies/µL 相较于对照组 3.30×10^6 copies/µL 显著下降, 证明高浓度 KMPs 和 EGCG-P 对 GCRV-JX01 有较好的杀灭效果, 而高浓度 AcEGCG 对 GCRV-JX01 有杀灭效果, 但杀灭效果较弱。

2.4 药物对草鱼免疫相关基因表达的影响

药物对 IL-1β 基因表达的影响, 由图 6A 可以看出, 加入 EGCG-P 处理细胞后, 细胞中 IL-1β 基因表达量与对照组相比随时间呈先下降后上升趋势, 24 h 后各浓度实验组 IL-1β 基因的表达量无显著差异 ($P > 0.05$); 加入 AcEGCG 处理细胞后, 低浓度组 (10 µg/mL) 中 IL-1β 基因表达量与对照组相比随时间呈先下降后上升趋势, 24 h 后 IL-1β 的表达量极显著上升 ($P < 0.001$), 而中浓度 (50 µg/mL) 与高浓度 (100 µg/mL) IL-1β 的表达量极显著下降 ($P < 0.01$); 加入过硫酸氢钾复合物粉处理细胞, 2h 后低浓度组 IL-1β 表达量显著上升 ($P < 0.05$), 然而随着药物处理时

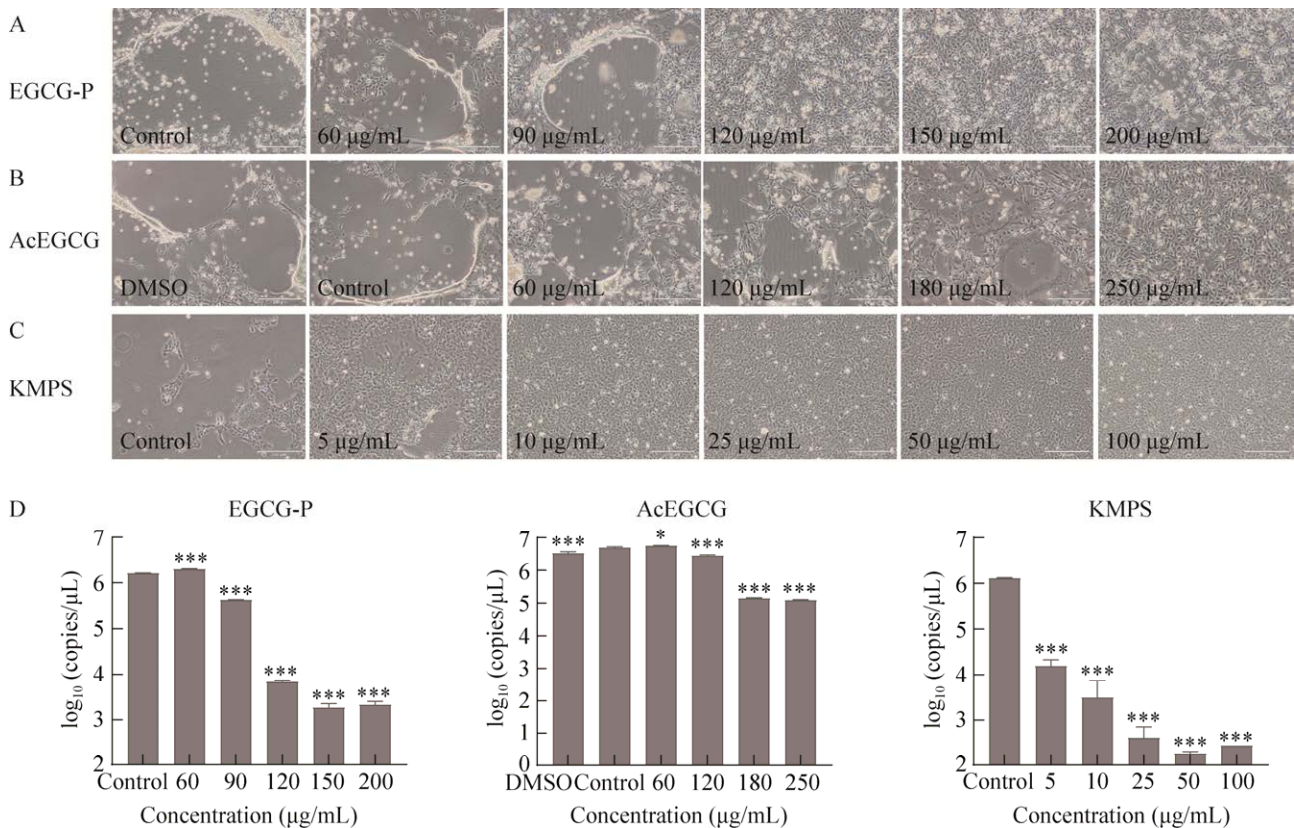


图 5 EGCG-P、AcEGCG 和 KMPS 对 I 型 GCRV 的杀灭作用 A: GCRV 感染后不同浓度 EGCG-P 处理组 CIK 细胞状态. B: GCRV 感染后不同浓度 AcEGCG 处理组 CIK 细胞状态. C: GCRV 感染后不同浓度 KMPS 处理组 CIK 细胞状态. D: qRT-PCR 检测各浓度药物组 GCRV 病毒复制水平

Figure 5 Inactivation of genotype IGCRV by EGCG-P, AcEGCG and KMPS. A: CIK cell condition in the group treated with different concentrations of EGCG-P after GCRV infection. B: CIK cell condition in the group treated with different concentrations of AcEGCG after GCRV infection. C: CIK cell condition in the group treated with different concentrations of KMPS after GCRV infection. D: qRT-PCR detection of GCRV virus replication level in each concentration of drug group.

间的延长, 低浓度组 IL-1 β 基因的表达量无显著差异($P>0.05$), 中浓度细胞中 IL-1 β 基因表达量与对照组相比随时间呈先下降后上升再下降趋势, 8 h 后高浓度组 IL-1 β 表达量显著上升($P<0.05$), 在 24 h 后中浓度与高浓度的药物处理组中 IL-1 β 的表达量极显著下降($P<0.01$).

药物对 IL-8 基因表达的影响, 由图 6B 可以看出, 加入 EGCG-P 处理细胞后, 除 8 h 时中浓度组(25 $\mu\text{g/mL}$) IL-8 表达量显著下降

($P<0.05$), 其余各浓度实验组在各时间点 IL-8 基因的表达量无显著差异($P>0.05$); AcEGCG 处理后, 除 2h 时低浓度组(10 $\mu\text{g/mL}$) IL-8 表达量显著上升($P<0.05$), 其余各浓度实验组在各时间点 IL-8 基因的表达量无显著差异($P>0.05$); 加入过硫酸氢钾复合物粉处理后, 在 8 h 时高浓度组(100 $\mu\text{g/mL}$)与对照组相比, IL-8 表达量显著上升($P<0.05$), 在 24 h 时中浓度组(50 $\mu\text{g/mL}$) IL-8 表达量极显著下降($P<0.01$).

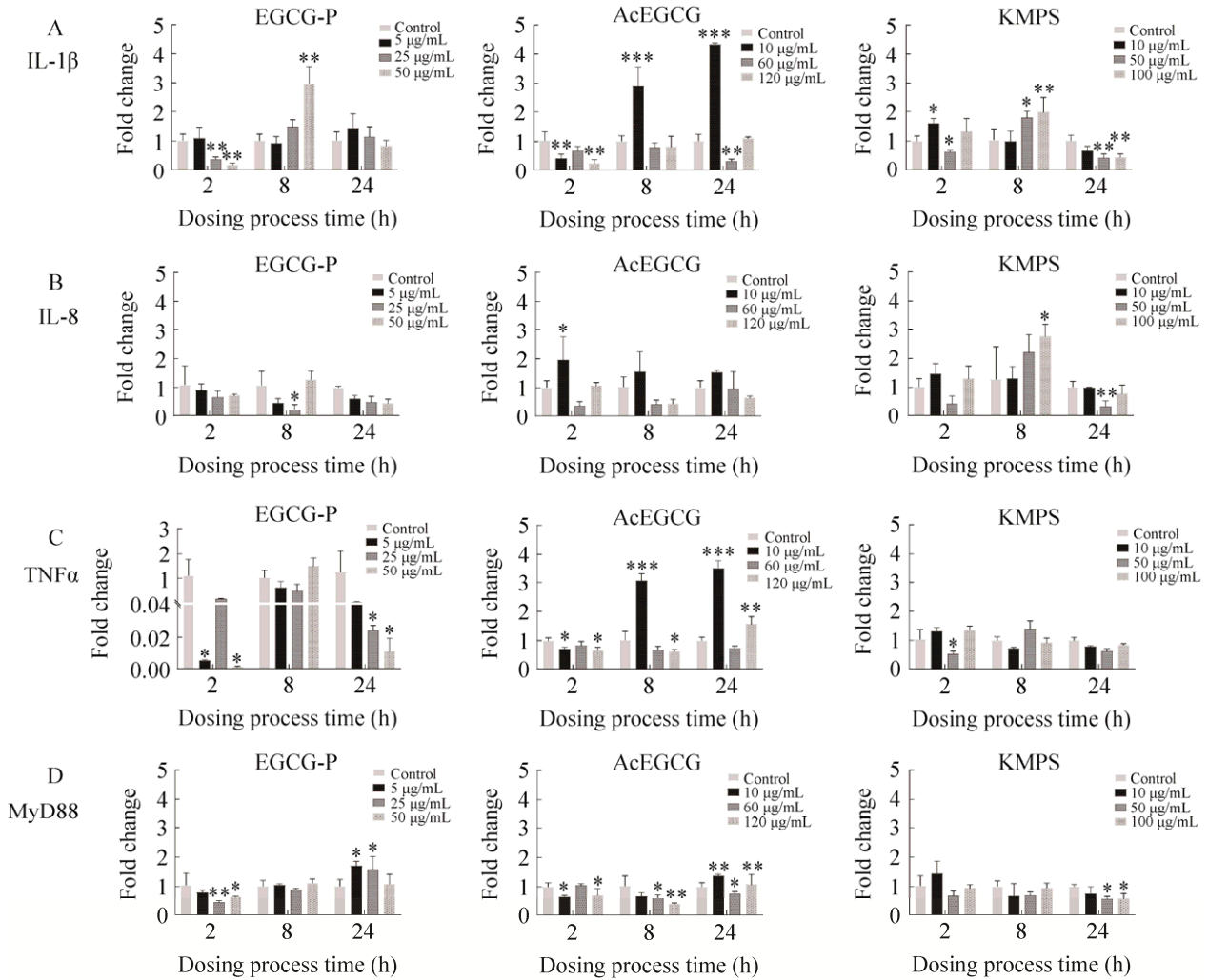


图 6 EGCG-P、AcEGCG 和 KMPS 对 CIK 细胞中 IL-1 β (A)、IL-8 (B)、TNF- α (C)、MyD88 (D) mRNA 转录表达的影响

Figure 6 Expression of IL-1 β (A), IL-8 (B), TNF- α (C), MyD88 (D) mRNA in CIK cells stimulated with EGCG-P, AcEGCG and KMPS.

药物对 TNF- α 基因表达的影响, 由图 6C 可以看出, EGCG-P 处理 2 h 和 24 h 后, 显著下调细胞中 TNF- α mRNA 的转录水平; 加入 AcEGCG 处理细胞后, 低浓度(5 μ g/mL)和高浓度(120 μ g/mL) TNF- α 基因表达量与对照组相比随时间呈先下降后上升趋势, 于 24 h 达最高值, 中浓度(60 μ g/mL) TNF- α 的表达量与对照组相比在各时间点试验组中无显著差异($P > 0.05$); 过硫酸氢钾复合物粉处理细胞后, 除中浓度组

2 h 时 TNF- α 表达量随时间显著下降($P < 0.05$), 其余实验组在各时间点对细胞中 TNF- α 基因的表达量无显著差异($P > 0.05$).

药物对 MyD88 基因表达的影响如图 6D 所示, 加入 EGCG-P 处理细胞后, 细胞中 MyD88 基因表达量与对照组相比随时间呈先下降后上升趋势, 24 h 后低浓度(5 μ g/mL)和中浓度(25 μ g/mL)处理组 MyD88 的表达量显著上升($P < 0.05$); AcEGCG 组细胞中 MyD88

基因变化趋势与 EGCG-P 组类似, 低浓度组 (10 $\mu\text{g/mL}$) 与高浓度组 (120 $\mu\text{g/mL}$) 随时间呈先下降后上升趋势, 而中浓度组 (60 $\mu\text{g/mL}$) MyD88 的表达量随时间显著下降 ($P < 0.05$); 加入过硫酸氢钾复合物粉处理后, 细胞中的 MyD88 的表达量与对照组相比在 2 h 与 8 h 试验组中无显著差异 ($P > 0.05$), 24 h 后中浓度组 (50 $\mu\text{g/mL}$) 和高浓度组 (100 $\mu\text{g/mL}$) MyD88 的表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

草鱼是我国重要的淡水养殖鱼类, 年产量达到 553 万 $\text{t}^{[31]}$ 。而 GCRV 导致的草鱼出血病危害最大, 重点养殖场的 GCRV 阳性检出率高达 15.7%, 而良种场阳性率也达到 14.3%。目前针对草鱼出血病的防控手段主要有注射疫苗、使用抗病毒药物和生态养殖等^[32], 由于 3 种基因型 GCRV 的同源性低于 30%^[5], 而生产中 GCRV 混合感染使得疫苗难以有效防治。所以, 生产上急需环境友好型渔药和消毒剂产品对 GCRV 等水产病原进行有效防控。

EGCG 是茶多酚中含量最丰富的儿茶素类单体物质, 其结构中富含酚羟基, 具有抗氧化、抗炎、抗病毒等多种生物活性^[33-34], 但 EGCG 的多羟基结构使其存在化学性质不稳定、脂溶性差、生物利用度低等问题, 在体内易被生物转化或者肠道菌群降解^[35], 且高浓度 EGCG 表现出一定的生理毒性, 因而限制了 EGCG 的深度开发利用。EGCG 衍生物改性为脂溶性, 生物利用度高, 其生物活性和生物安全性优于 EGCG, 是潜在的抗病毒原料药物。本研究探究了体外使用 EGCG 衍生物控制 I 型 GCRV 的可行性, 确定了 EGCG 衍生物对 CIK 细胞的安全浓度, 在安全浓度范围内, 2 种 EGCG 衍生物均在减轻细胞病理变化程度和降低病毒粒子增殖方面呈现出剂量依赖性, 说明 2 种 EGCG 衍

生物对 I 型 GCRV 有良好的体外抑制效应。

过硫酸氢钾复合物粉是 2020 年农业农村部公布的水产养殖白名单消毒剂产品, 其能够作用于病毒粒子的多个位点, 包括囊膜、纤突、蛋白衣壳和核酸, 进而干扰病毒自身 DNA 或 RNA 的合成, 并使病毒核衣壳蛋白变性、凝固。过硫酸氢钾复合物粉水中溶解后仅产生硫酸根离子及钾离子, 不产生毒副产物, 具有安全、无残留的优势, 适用于水产动物养殖过程中水体消毒^[36]。本研究探究了体外使用过硫酸氢钾复合物粉杀灭 I 型 GCRV 的可行性, 在安全浓度范围内, 在 10 $\mu\text{g/mL}$ 低浓度处理时细胞不产生病理变化, 50 $\mu\text{g/mL}$ KMPS 与 I 型 GCRV 接触作用 15 min 后, 与对照组相比病毒量降低 10^4 copies/ μL , 说明 KMPS 对 I 型 GCRV 有良好的杀灭效果。

通过研究不同测试物浓度及作用时间条件下细胞中部分免疫相关基因的表达, 可进一步分析测试物对宿主免疫相关信号因子的影响, 从基因水平检测 3 种测试物的生物安全性。髓样分化因子 (MyD88) 是 TLR 信号通路中的关键接头分子, 参与 IL-1 受体和 IL-18 受体介导的信号通路。膜受体激活后, 引起该受体胞内的 ToIL 样受体 IL-1 受体结构域 (TIR-domain) 与 MyD88 蛋白上相同结构域发生同源结合, 从而导致 IL-1 受体相关激酶 (IRAK) 的活化, 最终使得核转录因子 (NF- κB) 游离并进入细胞核内, 调控相应靶基因的转录等。相关研究发现, GCRV 感染草鱼后, MyD88 基因在肌肉、肝胰脏、中肾、皮肤、鳃、脾脏、肠和心脏等组织中的表达量均有上调^[37]。白细胞介素 8 (IL-8) 则能够诱导中性粒细胞向机体损伤部位迁移, 在机体抵抗病原入侵及组织损伤中起重要作用^[38]。IL-1 β 是中枢性的促炎症反应细胞因子, 可通过诱导级联效应, 间接介导其他细胞因子的表达, 最终导致炎症反应^[39]。肿瘤坏死因子 α 是调节

细胞免疫的促炎症因子,能通过基因表达形成受体及相关因子,从而诱导白细胞的增殖、分化及诱导其他细胞因子的产生^[40]。本研究结果表明,3种测试物显著影响炎症因子相关基因的表达,其中低浓度 AcEGCG 对 CIK 细胞中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF α 基因有先上调后下调的作用,但在中高浓度 AcEGCG 组,这一趋势并未持续,相较于低浓度组表达更稳定,评估 60–120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AcEGCG 的使用不会引起草鱼产生炎症反应;培养 24 h 后,EGCG-P 对 TNF α 的基因表达量显著性下调,而对 IL-1 β 、IL-8 基因表达量无显著差异,评估 EGCG-P 的使用不会引起草鱼产生炎症反应;培养 8 h 后,过硫酸氢钾复合物粉上调 CIK 细胞中 IL-1 β 与 IL-8 的 mRNA 转录水平,且诱导效应与药物浓度呈正相关;但培养 24 h 后,与空白对照组相比,MyD88 及 IL-1 β 、IL-8 种细胞因子的基因表达量均显著性下调,评估过硫酸氢钾复合物粉的使用不会引起草鱼产生炎症反应。因此,本研究中 EGCG-P、AcEGCG 和过硫酸氢钾复合物粉 3 种药物的试验结果,可能为生产上草鱼呼肠孤病毒环境友好型药物的开发奠定基础并提供新的思路。

使用消毒剂进行水环境的消毒,可以有效杀灭传播媒介中的病原微生物。而植物提取物具有生物安全性好、无药物残留等优点,进行机体病毒防控的同时还具有一定的营养价值。EGCG 及其衍生物在进入机体后,与宿主细胞膜表面 LamR 蛋白发生相互作用,而 GCRV 病毒粒子需借助 LamR 作为膜受体蛋白质介导进入宿主细胞,因此,EGCG 及其衍生物可通过封闭宿主细胞,形成竞争性结合从而拮抗病毒感染。而过硫酸氢钾复合物粉具备的高效、安全、无残留的优势,使用过硫酸氢钾复合物消毒剂对器具器械及养殖水体环境等进行消毒,

联合使用 EGCG-P 和 AcEGCG 等植物提取物对病鱼进行拌饲投喂,以更为科学的应用达到对病毒的防控及消杀。

参考文献

- [1] WANG T, LI JL, LU LQ. Quantitative *in vivo* and *in vitro* characterization of co-infection by two genetically distant grass carp reoviruses[J]. *The Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 6): 1301-1309.
- [2] RANGELAAC, ROCKEMANN DD, HETRICK FM, SAMALSK. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus[J]. *The Journal of General Virology*, 1999, 80(Pt 9): 2399-2402.
- [3] FAN YD, RAO SJ, ZENG LB, MA J, ZHOU Y, XU J, ZHANG H. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. *The Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 10): 2266-2277.
- [4] WU ML, CUI K, LI HY, HE JX, CHEN HL, JIANG YY, REN J. Genomic characterization and evolution[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(5): 1385-1387.
- [5] WANG Q, ZENG WW, LIU C, ZHANG C, WANG YY, SHI CB, WU SQ. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [6] 李贤, 曾伟伟, 王庆, 王英英, 李莹莹, 石存斌, 吴淑勤. 草鱼呼肠孤病毒研究进展[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(7): 94-101.
LI X, ZENG WW, WANG Q, WANG YY, LI YY, SHI CB, WU SQ. Progress on grass carp reovirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(7): 94-101 (in Chinese).
- [7] 方勤, 肖调义, 李旅, 邹桂平, 章怀云, 汪亚平. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究[J]. *中国病毒学*, 2002, 17(2): 182-184.
FANG Q, XIAO TY, LI L, ZOU GP, ZHANG HY, WANG YP. Infection characterizations of four grass carp reovirus (GCRV) strains[J]. *Virologica Sinica*, 2002, 17(2): 182-184 (in Chinese).
- [8] 王增明, 郭庆东, 谢芳, 王幸平, 梅兴国. HPLC 测定茶多酚中儿茶素类及咖啡因含量[J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(21): 1674-1676.
WANG ZM, GUO QD, XIE F, WANG XP, MEI XG. Determination of catechins and caffeine in tea polyphenols by HPLC[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(21): 1674-1676 (in Chinese).

- [9] WANG H, CHEN Y, RU G, XU Y, LU L. EGCG: potential application as a protective agent against grass carp reovirus in aquaculture[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(8): 1259-1267.
- [10] WANG H, LIU WS, YU F, LU LQ. Identification of (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential agent for blocking infection by grass carp reovirus[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(4): 1053-1059.
- [11] WANG H, YU F, LI JL, LU LQ. Laminin receptor is an interacting partner for viral outer capsid protein VP5 in grass carp reovirus infection[J]. *Virology*, 2016, 490: 59-68.
- [12] ZHANG YT, WANG H, SU MZ, LU LQ. (-)-epicatechin gallate, a metabolite of (-)-epigallocatechin gallate in grass carp, exhibits antiviral activity *in vitro* against grass carp reovirus[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(4): 1673-1680.
- [13] YUAN XC, CHEN F, YUE DD, XIE SQ, HUANG SJ, JIN SZ, CHEN HT, YANG YO. Tea polyphenols act as a natural antihyperglycemic feed additive candidate in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, 27(6): 2712-2725.
- [14] QIAN YC, WANG X, REN J, WANG J, LIMBU SM, LI RX, ZHOU WH, QIAO F, ZHANG ML, DU ZY. Different effects of two dietary levels of tea polyphenols on the lipid deposition, immunity and antioxidant capacity of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed a high-fat diet[J]. *Aquaculture*, 2021, 542: 736896.
- [15] MOHAMMADI TN, MAUNG AT, SATO J, SONODA T, MASUDA Y, HONJOH K, MIYAMOTO T. Mechanism for antibacterial action of epigallocatechin gallate and theaflavin-3,3'-digallate on *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(2): 633-640.
- [16] XU Z, LIU XQ, FENG CM, ZHU S, LI Y, GUO ZY, CHEN XY. Disinfection properties of the tea polyphenol epigallocatechin gallate in the presence of calcium ions[J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 2021, 70(5): 731-740.
- [17] 吕晨慧, 赵海峰. 表没食子儿茶素没食子酸酯体内代谢[J]. *卫生研究*, 2022, 51(1): 145-148.
LU CH, ZHAO HF. Metabolism of epigallocatechin gallate *in vivo*[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2022, 51(1): 145-148 (in Chinese).
- [18] LAMBERT JD, SANG SM, HONG J, KWON SJ, LEE MJ, HO CT, YANG CS. Peracetylation as a means of enhancing *in vitro* bioactivity and bioavailability of epigallocatechin-3-gallate[J]. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 2006, 34(12): 2111-2116.
- [19] 伍妍俊. 甲基化 EGCG 的合成及其稳定性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2010.
WU YJ. Study on the synthesis and stability of methylated EGCG[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [20] 刘帅华. EGCG 棕榈酸酯抗 PRRSV 活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2013.
LIU SH. The study on anti-prrsv activity of EGCG palmitate[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2013 (in Chinese).
- [21] MEERAN SM, PATELSN, CHAN TH, TOLLEFSBOLTO. Abstract 3206: a novel prodrug of the green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits the telomerase gene by modifying DNA methylation and histone acetylation in breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(8_supplement): 3206.
- [22] 王娟, 卞国志, 袁建丰, 王贵平. 过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒杀灭效果观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2018, 35(8): 563-565.
WANG J, BIAN GZ, YUAN JF, WANG GP. Observation on inactivation efficacy of potassium monopersulfate to Newcastle disease virus[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2018, 35(8): 563-565 (in Chinese).
- [23] 张玉霞, 蔡李萌, 孟凯, 袁小远, 王友令. 两种过硫酸氢钾复合物对禽流感病毒和新城疫病毒的灭活效果观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2019, 36(7): 484-486.
ZHANG YX, CAI LM, MENG K, YUAN XY, WANG YL. Inactivation effect of two kinds of potassium peroxomonosulfate compound on avian influenza virus and Newcastle disease virus[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2019, 36(7): 484-486 (in Chinese).
- [24] 乔莉萍, 黄银君, 薛飞群, 张强, 周卫, 马全鸿, 牟克斌, 刘学荣. 过硫酸氢钾复合物粉对口蹄疫病毒杀灭效果试验[J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(8): 1877-1879.
QIAO LP, HUANG YJ, XUE FQ, ZHANG Q, ZHOU W, MA QH, MU KB, LIU XR. Efficacy of potassium monopersulfate compound powder on inactivation of FMDV[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(8): 1877-1879 (in Chinese).
- [25] 张交儿, 罗玉子, 孙玥, 孙锋, 孙元, 王涛, 杨耀智, 郝凯, 仇华吉. 一种过硫酸氢钾复合物粉对非洲猪瘟病毒的灭活效果研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2020, 37(5): 321-322, 325.
ZHANG JE, LUO YZ, SUN Y, SUN F, SUN Y, WANG T, YANG YZ, HAO K, QIU HJ. Inactivation effect of potassium peroxomonosulfate compound powder on African swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2020, 37(5): 321-322, 325 (in Chinese).

- [26] 刘元元, 张志勇, 车传燕, 王艳玲, 苗晋锋, 邓旭明. 过硫酸氢钾复合盐颗粒中有效氯测定方法的研究[J]. 中国家禽, 2020, 42(11): 109-112.
LIU YY, ZHANG ZY, CHE CY, WANG YL, MIAO JF, DENG XM. Research on detecting method of available chlorine in a new disinfectant: potassium hydrogen persulfate compound salt particles[J]. *China Poultry*, 2020, 42(11): 109-112 (in Chinese).
- [27] 李世康, 陈贵秋, 胡冀, 宋江南, 高琼, 尹进, 易亮. 一种复方单过硫酸氢钾消毒剂对水体消毒效果及其稳定性观察[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(8): 736-738.
LI SK, CHEN GQ, HU J, SONG JN, GAO Q, YIN J, YI L. Observation on the effect of water disinfection and the stability of a potassium monopersulfate compound disinfectant[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2017, 34(8): 736-738 (in Chinese).
- [28] 张祎桐. EGCG 及其代谢产物 ECG 抗草鱼呼肠孤病毒及白斑综合征病毒的研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.
ZHANG YT. Study on the resistance of EGCG and its metabolite ECG to GCRV and WSSV[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [29] 吴宗凡. 厌氧芽孢杆菌代谢产物对草鱼免疫相关基因表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2012.
WU ZF. The secondary metabolites of *Anoxybacillus flavithermus* SX-4 and their influence on expression of immune-related genes in grass carp[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2012 (in Chinese).
- [30] 王土. 草鱼呼肠孤病毒混合感染及其致细胞病变效应的蛋白组学分析[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2013.
WANG T. Study on the co-infection of grass carp reovirus and proteomic analysis of cytopathic effect[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [31] 吴明林, 李海洋, 崔凯, 蒋阳阳, 周蓓蓓, 汪翔, 李波. 草鱼病毒性出血病流行情况及防控措施[J]. 现代农业科技, 2021(10): 196-198.
WU ML, LI HY, CUI K, JIANG YY, ZHOU BB, WANG X, LI B. Epidemic situation and prevention and control measures of grass carp viral hemorrhage disease[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021(10): 196-198 (in Chinese).
- [32] 姜志勇, 翁如柏, 郭晓奇, 吴郁丽. 预防和控制草鱼出血病的主要措施[J]. 海洋与渔业, 2016(7): 64, 66-67.
JIANG ZY, WENG RB, GUO XQ, WU YL. Main measures to prevent and control grass carp hemorrhagic disease[J]. *Ocean and Fishery*, 2016(7): 64, 66-67 (in Chinese).
- [33] ZHAO ZJ, FENG MY, WAN J, ZHENG X, TENG CQ, XIE XY, PAN WJ, HU BZ, HUANG JN, LIU ZH, WU JH, CAI SX. Research progress of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on anti-pathogenic microbes and immune regulation activities[J]. *Food & function*, 2021, 12(20): 9607-9619.
- [34] ZHAO F, WANG XC, LI Y, CHEN XY, GENG ZY, ZHANG C. Effects of dietary supplementation with epigallocatechin gallate on meat quality and muscle antioxidant capacity of broilers subjected to acute heat stress[J]. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(11): 3296.
- [35] ZHU S, MENG N, CHEN SW, LI Y. Study of acetylated EGCG synthesis by enzymatic transesterification in organic media[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13(12): 8824-8834.
- [36] 付维星. 过硫酸氢钾复合粉消毒剂的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011.
FU WX. Study on disinfection of the compound peroxymonosulphate powder[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese).
- [37] 董捷. 草鱼四个候选内参基因稳定性比较及两个免疫相关基因的克隆与表达研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
DONG J. Studies on the stability of four candidate internal reference genes and molecular cloning and expression of two immunization-associated genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2010 (in Chinese).
- [38] ZHAO MH, LIU YZ, GAO YJ, WANG XY, ZHOU H, ZHANG AY. Insights into the functional role of grass carp IL-8 in head kidney leukocytes: pro-inflammatory effects and signalling mechanisms[J]. *Journal of Fish Biology*, 2022, 100(1): 192-202.
- [39] WANG XY, YANG X, WEN C, GAO YJ, QIN L, ZHANG SN, ZHANG AY, YANG K, ZHOU H. Grass carp TGF- β 1 impairs IL-1 β signaling in the inflammatory responses: evidence for the potential of TGF- β 1 to antagonize inflammation in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 59: 121-127.
- [40] ZHANG AY, CHEN DY, WEI H, DU LY, ZHAO TQ, WANG XY, ZHOU H. Functional characterization of TNF- α in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- κ B signaling[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(5): 1123-1132.