第45卷 第3期 华 中 农 业 大 学 学 报 Vol.45 No.3
2026年 5月 Journal of Huazhong Agricultural University May 2026,256~264

郝小龙,武卓雅,潘孝成,等.二氢丹参酮Ⅰ对猪流行性腹泻病毒的体外抑制作用[J].华中农业大学学报,2026,45(3):256-264.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.03.023

二氢丹参酮Ⅰ对猪流行性腹泻病毒的体外抑制作用

郝小龙[1,2],武卓雅[1,2],潘孝成[2],戴银[2],周杰[1],王洁茹[2]

1.安徽农业大学动物医学院,合肥 230031; 2.安徽省农业科学院畜牧兽医研究所/安徽省畜禽疫病研究中心/安徽省畜禽产品安全重点实验室,合肥 230031

摘要 为探究二氢丹参酮Ⅰ(dihydrotanshinoneⅠ,DiⅠ)在体外对猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)的抑制作用,采用CCK-8法检测不同浓度DiⅠ对Vero和IPEC-J2细胞活力的影响,通过实时荧光定量PCR、蛋白免疫印迹、间接免疫荧光、病毒滴度测定等方法评估DiⅠ的抗PEDV活性;并考察不同的给药方式对PEDV复制的影响,采用分子对接方法评估DiⅠ与PEDV M^{pro}的相互作用。结果显示,DiⅠ在后续实验浓度下,对Vero和IPEC-J2细胞无明显毒性,DiⅠ能够显著抑制PEDV的基因表达与蛋白合成,且呈现剂量依赖性,全处理、共处理与后处理均可显著抑制PEDV的复制。结果表明,DiⅠ具备抗PEDV活性,能够针对PEDV的入侵、复制、释放等关键阶段发挥抑制作用,可以作为一种潜在的针对PEDV感染的抗病毒治疗药物。

关键词 二氢丹参酮Ⅰ;猪流行性腹泻病毒;体外抑制;治疗剂

中图分类号 S852.65+1;S853.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)03-0256-09

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)引起的一种急性、高度接触性猪肠道传染病。该病对新生仔猪最易感,具有高发病率和高致死率,给全球养猪业造成巨大的经济损失[1]。PEDV属于α-冠状病毒属的有囊膜正链RNA病毒,其基因组全长约28 kb,共包含14个开放阅读框(open reading frame,ORF),其中ORF1ab所编码的多聚蛋白(replicase polyprotein,PP1a和PP1ab),在病毒主蛋白酶(main protease,M^{pro}也称为3C-like protease,$3CL^{pro}$)作用下,被切割加工成多个参与病毒复制和转录的非结构蛋白,从而启动病毒RNA的复制和转录[2]。由于M^{pro}在病毒感染和复制中不可或缺,且其底物识别位点在冠状病毒中高度保守,同时与人类蛋白酶无显著同源性,因此,该酶被视为极具开发潜力的抗冠状病毒药物靶点。自2010年以来,PEDV变异株在中国大规模暴发,疫情趋于复杂化,常出现与其他肠道病原混合感染的情况[3]。此外,病毒基因组的高变异性导致疫苗交叉保护效果不佳[4],在此背景下,开发新的防控策略以有效应对PEDV感染显得尤为迫切。

中药在抗病毒防治中应用前景广阔,其提取物可通过多种机制发挥作用,主要包括:直接抑制病毒复制关键环节[5]、阻断病毒入侵[6]、破坏病毒颗粒[7]及调节宿主免疫应答等。如木犀草素(*Reseda luteola* L.)可特异性抑制严重急性呼吸综合征病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus,SARS-CoV)以及PEDV的M^{pro}活性,从而阻碍病毒复制过程[2]。汉黄芩素(*Scutellaria baicalensis* Georgi)能够竞争性抑制SARS-CoV刺突蛋白(spike,S)与血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2,ACE2)受体的结合,有效阻断病毒侵入宿主细胞[6]。此外,多糖类中药成分可通过促进淋巴细胞增殖[8],上调炎性因子[9]及干扰素表达[10]等途径增强机体抗病毒免疫力,间接发挥抗病毒作用。

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)别称红根、赤参,是活血祛瘀类中药的代表药物,具有活血祛瘀,通经止痛的功效,其有效成分主要包括水溶性丹酚酸类和脂溶性丹参酮类化合物,在抗氧化[11]、抗炎[12]、抗肿瘤[13]、抗纤维化以及神经保护[14]等方面表现出广泛

收稿日期:2025-07-07
基金项目:国家自然科学基金项目(32202801);安徽省自然科学基金项目(2308085MC102);安徽省科技重大专项(202204c06020009);安徽省农业科学院青年英才计划(QNYC-202509)
郝小龙,E-mail:m18348001257@163.com
通信作者:王洁茹,E-mail:wangjr0317@163.com;周杰,E-mail:Zhoujie@ahau.edu.cn

的药理活性。二氢丹参酮Ⅰ(dihydrotanshinone Ⅰ，DiⅠ)是从丹参中提取的一种天然化合物。研究表明，DiⅠ对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)具有显著抗菌效果且不易诱导耐药性的产生[15]；同时，它还能够抑制甲型流感病毒(influenza A virus，IAV)蛋白表达及促炎因子生成[16]。值得关注的是，DiⅠ兼具成本低廉、安全性高以及低剂量下仍能发挥高效作用等优势。然而，目前关于DiⅠ是否对PEDV具有抗病毒活性尚不明确。本研究系统评估DiⅠ对PEDV的抑制效果，以期拓展丹参在防控猪流行性腹泻方面的应用潜力，为开发新型抗病毒策略提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验毒株与细胞系

PEDV AH2012/12 (GenBank accession KU646831)株，由江苏省农业科学院李彬研究员馈赠。非洲绿猴肾细胞(African green monkey kidney cells，Vero)和猪小肠上皮细胞(porcine small intestinal epithelial cell，IPEC-J2)由笔者所在实验室保存，用含1%双抗、10%胎牛血清(fetal bovine serum，FBS)的高糖DMEM培养基，于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养。

1.2　试剂和抗体

DiⅠ购于MCE(MedChemExpress)公司，溶于二甲基亚砜(DMSO)，于－80 ℃储存；DMEM培养基、FBS、1×PBS缓冲液均购自Gibco公司；细胞增殖及毒性检测试剂盒(cell counting Kit-8，CCK-8)、2X M5 HiPer Realtime PCR Super mix试剂盒购于北京聚合美科技有限公司；NovoScript®Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix试剂盒购于近岸蛋白质科技股份有限公司；牛血清白蛋白(BSA)购于上海桥星贸易有限公司；10% PAGE彩色凝胶超快速配制试剂盒、PVDF膜购于塞维尔生物科技有限公司；鼠源PEDV-N蛋白单克隆抗体由笔者所在实验室保存；鼠源β-actin单克隆抗体、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、病毒RNA抽提试剂盒、极超敏ECL化学发光试剂盒(BeyoECL Moon)购于碧云天生物技术有限公司；DAPI溶液、曲拉通X-100购于北京索莱宝科技有限公司；HRP标记山羊抗小鼠IgG、绿色荧光标记IFkine驴抗小鼠IgG购于武汉亚科因生物技术有限公司。

1.3　细胞毒性测定

将生长至完整单层的Vero和IPEC-J2细胞接种于96孔板，分别加入含不同浓度DiⅠ(0.000 4～400 μmol/L)的DMEM培养液。将细胞置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养48 h后，每孔加入CCK-8试剂并继续孵育2 h，最后于450 nm波长下检测吸光度，并计算细胞活力(C_V)。

$$C_V=\frac{D_{给药组}-D_{空白组}}{D_{对照组}-D_{空白组}}\times 100\%$$

1.4　DiⅠ抗PEDV活性检测

1)病毒感染。将Vero或IPEC-J2细胞接种于12孔板，待细胞长成单层后，因PEDV在2种细胞系中感染效率以及细胞对胰酶的耐受力不同，按不同条件接种PEDV：Vero细胞(MOI=0.01，胰酶质量浓度8 μg/mL)与IPEC-J2细胞(MOI=0.1，胰酶质量浓度5 μg/mL)，使2种细胞在相同时间点达到相近的感染程度/病毒载量。在维持液中分别加入不同质量浓度的DiⅠ，每个质量浓度设3个重复孔，并设置病毒对照孔(仅加病毒培养液)。将细胞板置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h后，收集细胞或上清液用于后续检测。数据用Graphpad处理，计算出抑制剂的半数细胞毒性浓度(concentration of cytotoxicity 50%，CC_{50}，即在细胞毒性实验中导致50%的细胞发生病变时的受试物浓度)。

2)荧光定量RT-PCR。收集的细胞或上清液分别使用Trizol法或病毒RNA提取试剂盒提取总RNA，用于绝对和相对荧光定量RT-PCR检测，随后进行反转录获得cDNA。以2×M5 HiPer Realtime PCR Super mix为预混液，使用针对*PEDV*－*N*基因的特异性引物进行扩增(其中，正向引物P1：5′-TACTAAGCGTAACATCCTGCC-3′；反向引物P2：5′-GTAGTACCAATAACAACCGAAGC-3′)。反应程序为：95 ℃预变性1 min；95 ℃变性10 s、60 ℃退火15 s、72 ℃延伸34 s，共45个循环。通过构建含有PEDV-186片段的重组质粒作为标准品，对病毒基因组拷贝数进行绝对定量RT-PCR检测，计算出抑制剂DiⅠ的半数最大效应浓度(half maximal inhibitory concentration，IC_{50}，即药效实验中能引起50%最大效应时的受试物浓度)，最终计算选择性指数SI(公式中用S_I表示)，$S_I=C_{C50}/I_{C50}$。

3)$TCID_{50}$测定病毒滴度。将感染的细胞悬液经3次冻融后，取上清进行检测。在长满单层Vero细胞的96孔板中，将待测病毒液进行10倍系列稀释

(10^{-1}～10^{-8})，每个梯度加入96孔板(100 μL/孔)，于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。每日观察并记录细胞病变效应(CPE)，直至病毒对照孔细胞不再出现新的病变。最后采用Reed-Muench法计算病毒的$TCID_{50}$。

4)蛋白质免疫印迹(Western blot，WB)。使用RIPA裂解液裂解细胞，离心收集上清并经变性处理后，进行SDS-PAGE电泳。随后将蛋白湿转至PVDF膜，用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。分别加入鼠抗PEDV-N蛋白单克隆抗体(1∶10 000)和鼠抗β-actin单克隆抗体(1∶10 000)，4 ℃孵育过夜。回收一抗后，加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1∶10 000)，室温孵育1 h。最后使用ECL发光液显影，并通过Image J软件对条带进行灰度值分析。

5)间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay，IFA)。细胞经4%多聚甲醛固定15 min后，用0.3% Triton X-100透化处理10 min，随后以含5% BSA的封闭液37 ℃封闭1 h。加入鼠抗PEDV-N蛋白单克隆抗体，4 ℃孵育过夜。之后加入绿色荧光标记的驴抗小鼠IgG二抗，室温避光孵育1 h。最后使用DAPI对细胞核进行染色，室温避光孵育10～15 h。在荧光倒置显微镜下观察并采集图像。

1.5 PEDV复制周期中DiⅠ作用阶段的鉴定

1)病毒吸附。将4.0 μmol/L DiⅠ与5倍MOI的PEDV混合后感染Vero细胞，4 ℃吸附1 h，收集细胞样本，通过RT-qPCR进行病毒基因组相对定量。

2)病毒内化。PEDV感染Vero细胞，4 ℃吸附1 h后弃去病毒液，加入DiⅠ，37 ℃作用1 h，收集细胞并进行RT-qPCR相对定量分析。

3)病毒复制。PEDV感染细胞2 h后加入DiⅠ，继续培养至10 h，收集细胞样本，通过RT-qPCR检测病毒RNA复制水平。

4)病毒释放。PEDV感染细胞10 h后加入DiⅠ，继续培养至24 h，收集上清液，采用绝对定量RT-PCR检测释放的病毒基因组拷贝数。

1.6 不同给药方式下DiⅠ抗PEDV效果评估

为评估DiⅠ在不同作用时序下的抗病毒效果，设置了4种给药方式进行试验。

1)预处理。细胞经DiⅠ预处理2 h后，接种PEDV(MOI=0.05)吸附1 h，弃病毒液，PBS清洗后更换维持液继续培养24 h，收集上清。

2)共处理。将DiⅠ与PEDV(MOI=0.05)混合后同步加入细胞，吸附1 h后弃去混合液，PBS清洗，更换含相应质量浓度DiⅠ的维持液继续培养24 h，收集上清。

3)后处理。PEDV吸附1 h后弃病毒液，PBS清洗，加入不同浓度DiⅠ，继续培养24 h，收集上清。

4)全处理。细胞经不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L)DiⅠ预处理2 h后，更换为含相同浓度DiⅠ与PEDV(MOI=0.05)的维持液，共孵育24 h，收集上清进行病毒绝对定量RT-PCR。

1.7 DiⅠ与PEDV M^{pro}蛋白亲和力评估

为评估DiⅠ与PEDV M^{pro}的结合潜力，使用AutoDock Vina 1.2.2(http://autodock.scripps.edu/)进行分子对接分析[17]。DiⅠ的分子结构取自PubChem数据库(CID：11425923)，PEDV M^{pro}晶体结构来源于PDB(ID：5HYO，分辨率2.10 Å)。利用PyMOL软件对分子对接结果进行可视化展示，分析其结合模式与相互作用。

1.8 统计方法

试验结果以“平均值±标准差”方式表示。使用GraphPad Prism 9.0进行绘图及统计分析。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，显著性水平设定为*，$P<0.05$；**，$P<0.01$；***，$P<0.001$。

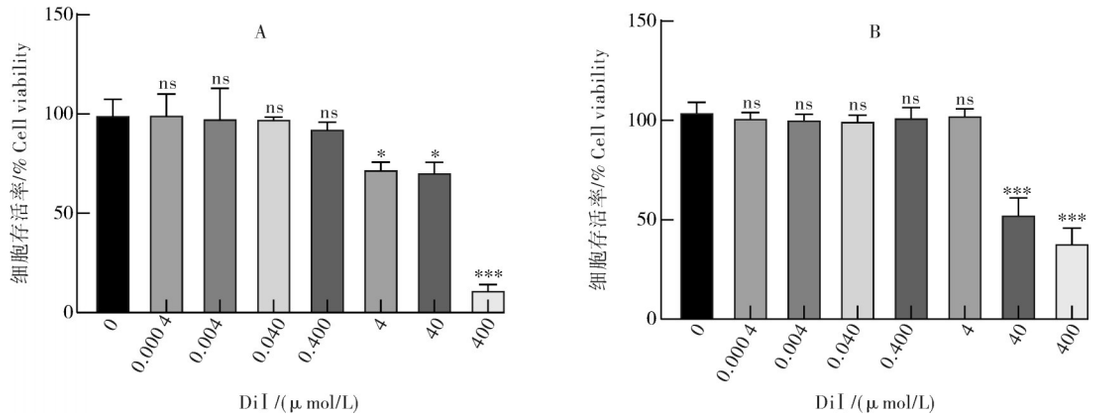
2 结果与分析

2.1 DiⅠ的细胞毒性分析

细胞毒性试验结果显示，随着DiⅠ浓度的升高，Vero与IPEC-J2细胞的存活率均呈逐渐下降趋势。在Vero细胞中，0.4 μmol/L DiⅠ处理组细胞存活率高于95%，而4.0 μmol/L处理组也保持在80%以上(图1A)。在IPEC-J2细胞中，即使DiⅠ浓度达到4.0 μmol/L，细胞存活率仍维持在100%以上(图1B)。结果表明，当DiⅠ浓度不高于4.0 μmol/L时，对2种细胞形态与活性均未产生显著毒性作用。因此，后续试验选择4.0 μmol/L作为最高作用浓度，且DiⅠ对Vero和IPEC-J2细胞的CC50分别为49.92和111.8 μmol/L。

2.2 DiⅠ对PEDV感染增殖抑制效果

为评估DiⅠ对PEDV复制的抑制作用，通过绝对定量RT-PCR、$TCID_{50}$、Western blot及IFA等方法进行验证。绝对定量RT-PCR结果显示，在Vero和IPEC-J2细胞中，随着DiⅠ浓度升高，PEDV基因组拷贝数逐渐降低；当浓度达到2.0 μmol/L及以上时，病毒拷贝数极显著低于病毒对照组($P<0.001$，

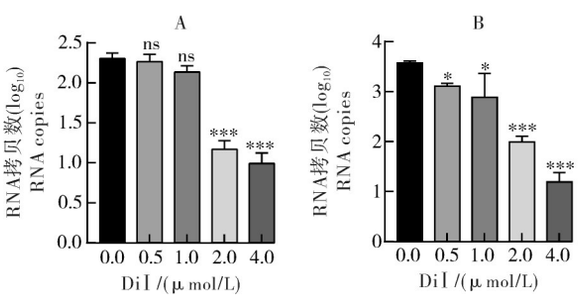


A：Vero细胞 Vero cells；B：IPEC-J2细胞 IPEC-J2 cells. 星号表示处理与对照组间存在显著性差异。Asterisks indicate significant differences compared with the control group.ns，$P>0.05$. *，$P<0.05$；***，$P<0.001$. 下同 The same below.

图1　DiⅠ细胞毒性试验

Fig.1　DiⅠ cytotoxicity test

图2）。$TCID_{50}$试验结果进一步表明，在0.5～4.0 μmol/L时，DiⅠ可剂量依赖性地降低病毒滴度（图3）。Western blot结果显示，PEDV N蛋白表达水平随DiⅠ浓度增加而明显下降，在2.0 μmol/L及以上时蛋白表达被显著抑制（图4）。IFA结果同样显示，病毒绿色荧光信号随药物浓度增加而减弱，在4.0 μmol/L DiⅠ处理组中荧光信号基本消失（图5）。经计算，其在Vero和IPEC-J2细胞中针对PEDV复制的IC_{50}分别是3.871、2.443 μmol/L，IS值分别为12.9和45.8。上述结果表明，DiⅠ能够以剂量依赖方式有效抑制PEDV的增殖。



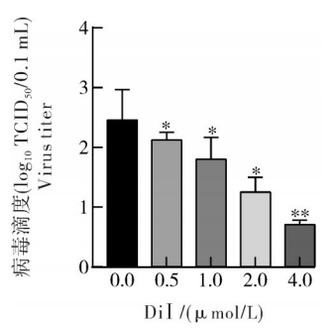
A：Vero细胞中PEDV拷贝数 PEDV copy number in Vero cells；B：IPEC-J2细胞中PEDV拷贝数 PEDV copy number in IPEC-J2 cells.

图2　不同浓度DiⅠ对PEDV拷贝数的影响

Fig.2　Effects of different concentrations of DiⅠ on PEDV copy number

2.3　DiⅠ对PEDV生命周期各个阶段的影响

为明确DiⅠ在病毒生命周期中各阶段的作用，分别检测了其对病毒吸附、内化、复制及释放过程的影响（图6A）。在吸附阶段，DiⅠ处理组PEDV mRNA水平与对照组相比无显著差异（$P>0.05$，图6B），说明DiⅠ不影响病毒吸附。而在内化阶段，病毒mRNA水平显著下降（$P<0.01$，图6C）；在复制阶段，病毒mRNA水平极显著下降（$P<0.001$，图6D）；释放阶段的绝对定量结果也显示病毒拷贝数显著降低（$P<0.001$，图6E）。这些结果表明，DiⅠ



星号表示处理与对照组间存在显著性差异。Asterisks indicate significant differences compared with the control group.**，$P<0.01$. 下同 The same below.

图3　不同浓度DiⅠ对PEDV病毒滴度的影响

Fig.3　Effects of different concentrations of DiⅠ on the virus titer of PEDV

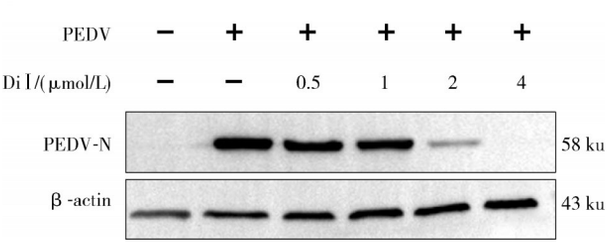
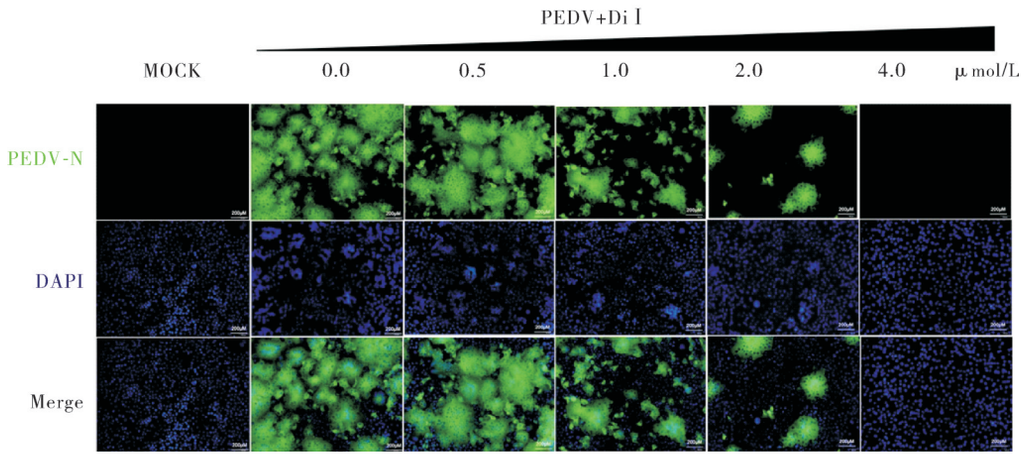


图4　Western blot检测不同浓度DiⅠ对PEDV-N蛋白表达的影响

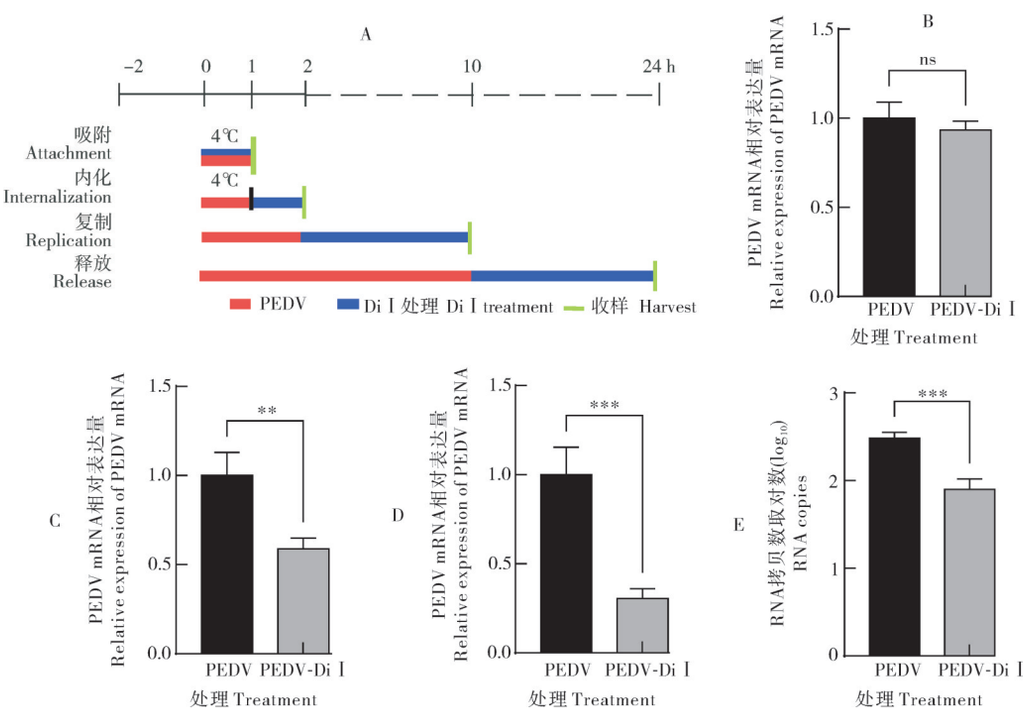
Fig.4　Effects of different concentrations of DiⅠ on PEDV-N protein expression were determined by Western blot



绿色荧光，PEDV-N蛋白阳性信号Green fluorescence，PEDV-N protein positive signal；蓝色荧光，细胞核Blue fluorescence，nucleus.

图5 IFA评估Di Ⅰ对PEDV增殖的影响

Fig.5 Effects of Di Ⅰ on the replication of PEDV assessed by IFA



A：PEDV生命周期的简化示意图 Simplified schematic of the PEDV life cycle；B：吸附阶段PEDV mRNA的相对表达量 Relative expression of PEDV mRNA during the attachment phase；C：内化阶段PEDV mRNA的相对表达量 Relative expression of PEDV mRNA during the internalization phase；D：复制阶段PEDV mRNA的相对表达量 Relative expression of PEDV mRNA during the replication phase；E：释放阶段PEDV拷贝数 PEDV copy number during the release phase.

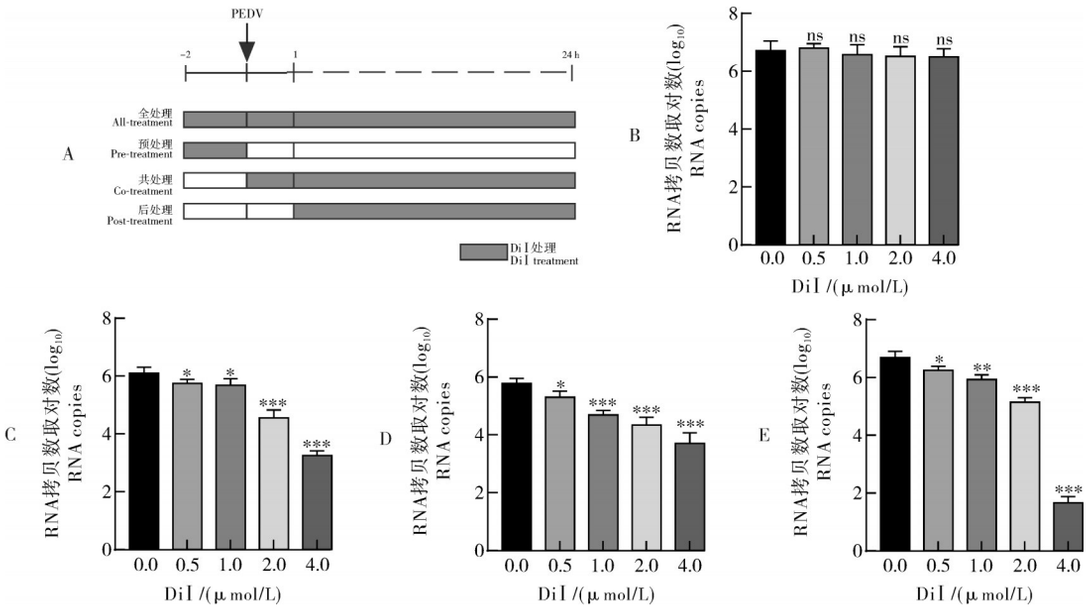
图6 Di Ⅰ对PEDV生命周期各个阶段的影响

Fig.6 Effects of Di Ⅰ on stages of the PEDV life cycle

主要在病毒内化、复制及释放阶段发挥抗病毒作用。

2.4 不同给药方式下Di Ⅰ对PEDV的影响

通过比较4种给药方式下Di Ⅰ对PEDV增殖的影响（图7A），发现除预处理方式外，共处理、后处理及全处理方式均能显著抑制病毒复制（图7C～E）。在预处理方式中，各浓度Di Ⅰ均未表现出明显抑制作用（$P>0.05$，图7B）。结果表明，Di Ⅰ在与病毒同时或感染后加入时抗病毒效果最为显著，提示其作用机制主要发生在病毒内化及复制阶段。



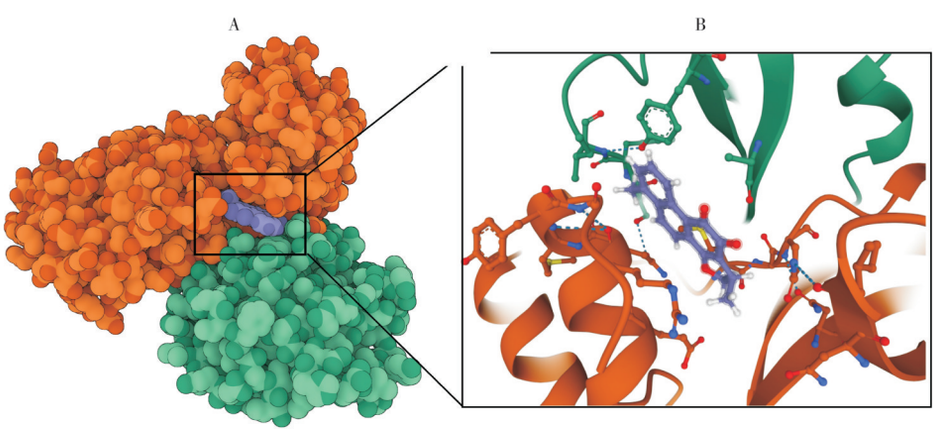
A：不同给药方式的简化示意图 Simplified schematic of different administration routes；B：预处理给药方式下 PEDV 拷贝数 PEDV copy number under pre-treatment administration；C：共处理给药方式下 PEDV 拷贝数 PEDV copy number under co-treatment administration；D：后处理给药方式下 PEDV 拷贝数 PEDV copy number under post-treatment administration；E：全处理给药方式下 PEDV 拷贝数 PEDV copy number under all-treatment administration.

图 7　不同给药方式下 DiⅠ对 PEDV 的影响

Fig. 7　Effects of DiⅠ on PEDV under different administration routes

2.5　DiⅠ与 PEDV M^{pro} 蛋白亲和力

研究表明，DiⅠ可靶向 SARS 冠状病毒的 M^{pro} 并抑制其活性[18]。鉴于 PEDV 同属冠状病毒，采用分子对接方法评估 DiⅠ与 PEDV M^{pro} 的相互作用。使用 AutoDock Vina v.1.2.2 进行对接模拟显示，DiⅠ能够稳定结合于 PEDV M^{pro} 的活性口袋，并与多个氨基酸残基（包括 Q8、N112、Y117、I140、I151、E291、R294、Q295、G298）形成良好相互作用，结合能为 -3.70×10^{4} J/mol，提示二者之间具有较强亲和力与结合稳定性（图 8）。



A：DiⅠ与 PEDV M^{pro} 的结合方式 Binding mode of DiⅠ and PEDV M^{pro}；B：PyMOL 软件显示的结合袋的三维结构 Three-dimensional structures of the binding pockets were showed by PyMOL software；紫色表示 DiⅠ，橘色和绿色表示 PEDV M^{pro} 蛋白 Purple indicates DiⅠ, while orange and green indicate PEDV M^{pro} protein.

图 8　DiⅠ与 PEDV M^{pro} 结合示意图

Fig.8　Schematic diagram of DiⅠ binding to PEDV M^{pro}

3　讨　论

近年来，PEDV 毒株高变异性引发的交叉保护力不足，导致疫苗难以有效控制与预防 PEDV，对全球生猪养殖造成了巨大的经济损失。因此，开发能够有效预防和治疗 PEDV 感染的药物显得尤为迫切。目前，越来越多的研究表明，天然产物在抑制 PEDV

复制方面具有广阔的潜力。丹参作为一种价廉、应用广泛的中药材，富含有丹酚酸C、丹酚酸B、DiⅠ等多种活性成分。前期研究显示，这些活性成分在抗病毒方面作用显著。丹酚酸C可通过抑制SARS-CoV-2 S蛋白六螺旋束核心的形成，有效阻断病毒感染[19]；丹酚酸B及其镁盐能干扰病毒融合过程，从而抑制SARS-CoV-2侵入靶细胞[20]；大黄素可通过激活TLR3/NF-κB信号通路促进干扰素表达，从而有效抑制PRRSV感染[21]；而DiⅠ作为SARS-CoV M^{pro}和类木瓜蛋白酶（papain-like protease，PL^{pro}）的特异性抑制剂[18]，在抗SARS-CoV方面已显示出较强的抗病毒活性。基于丹参活性成分在抗病毒方面的显著效果，推测DiⅠ可能同样具备抗PEDV的潜力。因此，本研究通过CCK-8法证实了DiⅠ在有效浓度下对Vero和IPEC-J2细胞无显著毒性。进一步的抗病毒实验（包括荧光定量RT-PCR、Western blot、IFA和$TCID_{50}$测定）表明，DiⅠ能以剂量依赖的方式显著抑制PEDV的基因组复制和蛋白合成。研究发现，DiⅠ主要作用于病毒的内化、复制及释放阶段。在不同给药方式中，共处理、后处理及全处理均显示出显著的病毒抑制效果。同时采用分子对接方法评估了DiⅠ稳定结合于PEDV M^{pro}的活性口袋，并与多个氨基酸残基形成良好相互作用，提示DiⅠ对PEDV的抑制作用可能与其靶向M^{pro}有关，为其用于PEDV防控提供了重要依据。

在中药抗PEDV研究方面，Li等[22]发现高浓度（50 μmol/L）槲皮素可使PEDV病毒滴度降低1～2个数量级，而本研究中DiⅠ在2 μmol/L即可达到相近抑制效果，在4 μmol/L时病毒滴度降幅更达2～3个数量级，显示出更强活性。赵诗莹等[23]研究表明，黄腐酚在5 μmol/L时对PEDV总RNA的抑制率为56.73%，而DiⅠ在4 μmol/L时抑制率高达70.63%，进一步表明其优越的抗病毒能力。本研究中IS值均高于相同MOI条件下的木犀草素[2]和汉黄芩素[6]，由此可见，DiⅠ在抗PEDV方面具有良好的应用前景。PEDV的生命周期始于病毒S蛋白与宿主细胞受体的结合[24-25]，随后通过膜融合或内吞作用进入细胞[26]。病毒基因组随后翻译产生非结构蛋白[27-28]，启动转录与复制，结构蛋白在内质网合成后[29]，于内质网-高尔基体中间体组装成成熟病毒粒子[30-31]。针对这一过程，现有研究已探索多种干预策略，如Huan等[32]证实表没食子儿茶素没食子酸酯可抑制PEDV吸附、内化、复制和组装；叶跃天等[33]发现黄连素不仅能抑制病毒复制与组装，还可缓解PEDV诱导的细胞凋亡。本研究中，DiⅠ在病毒吸附阶段和预处理细胞时，对PEDV的mRNA表达无显著影响，提示其预防作用有限。然而，在病毒内化、复制及释放阶段加入DiⅠ，均能显著降低PEDV mRNA水平，说明其抗病毒机制主要通过阻断感染中后期关键环节实现。且DiⅠ在全处理、共处理及后处理方式下均能有效抑制PEDV复制，进一步表明其在感染后治疗方面具有良好潜力。

本研究为DiⅠ的抗PEDV活性提供了有力证据，但其具体作用机制仍有待深入解析。未来可以通过表面等离子共振等技术直接评估DiⅠ与PEDV M^{pro}的结合特性，并借助荧光共振能量转移等酶活实验验证其对M^{pro}的抑制能力。体外探究DiⅠ对PEDV生命周期各阶段影响时，复制阶段（2～10 h）仍包含部分晚期内化或脱壳过程，时间窗口需要更明确的界定。此外，DiⅠ作为丹参中多种复杂活性成分之一，其分离与纯化难度较大。本研究仅在细胞水平上证实了DiⅠ具有显著的抗PEDV活性，但体外试验条件相对单一，无法完全模拟机体复杂的免疫环境、药物代谢动力学以及潜在的毒副作用，其是否能在活体动物体内发挥同等功效仍有待明确。因此，后续研究需要通过建立仔猪PEDV感染模型，进一步评估DiⅠ的体内抗病毒效果。

参考文献 References

[1] 张玉杨. 猪流行性腹泻病毒基因组和诊断方法研究进展[J]. 河南农业科学，2024，53(10)：12-20.ZHANG Y Y.Research progress in genome and diagnostic methods of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Henan agricultural sciences，2024，53(10)：12-20(in Chinese with English abstract).

[2] WANG J R，ZENG X Y，GOU J J，et al.Antiviral activity of luteolin against porcine epidemic diarrhea virus in silico and *in vitro*[J/OL]. BMC veterinary research，2024，20(1)：288[2025-07-07].https://doi.org/10.1186/s12917-024-04053-4.

[3] LUO L，CHEN J，LI X M，et al.Establishment of method for dual simultaneous detection of PEDV and TGEV by combination of magnetic micro-particles and nanoparticles[J]. Journal of infection and chemotherapy，2020，26(5)：523-526.

[4] LI W T，LI H，LIU Y B，et al.New variants of porcine epidemic diarrhea virus，China，2011[J].Emerging infectious diseases，2012，18(8)：1350-1353.

[5] 权鑫. 苦参碱抗牛乳头状瘤病毒感染C127细胞研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学，2015.QUAN X.Effect of matrine span C127 cells infected by bovine papillomavirus[D]. Harbin：Northeast Agricultural University，2015(in Chinese with Eng-

lish abstract).

[6] WANG J R, ZENG X Y, YIN D D, et al. In silico and *in vitro* evaluation of antiviral activity of wogonin against main protease of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2023, 13: 1123650[2025-07-07]. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1123650.

[7] 丁媛媛,赵钢涛,杨凡,等.桂皮醛及其代谢产物肉桂酸体外抗柯萨奇病毒B3的作用机制研究[J].中国病原生物学杂志,2010,5(5):321-324. DING Y Y, ZHAO G T, YANG F, et al. Study on the mechanism of cinnamaldehyde and its metabolite cinnamic acid against Coxsackie virus B3 *in vitro*[J]. Journal of pathogen biology, 2010, 5(5): 321-324(in Chinese with English abstract).

[8] CAO Y G, HAO Y, LI Z H, et al. Antiviral activity of polysaccharide extract from *Laminaria japonica* against respiratory syncytial virus[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2016, 84: 1705-1710.

[9] 尹震花,张娟娟,郭庆丰,等.夏枯草多糖的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(18):334-339. YIN Z H, ZHANG J J, GUO Q F, et al. Research progress of *Prunella vulgaris* polysaccharide[J]. Science and technology of food industry, 2019, 40(18): 334-339(in Chinese with English abstract).

[10] 李声方,王兮,桂希恩,等.当归多糖对乙肝病毒转基因小鼠树突状细胞功能状态的影响[J].实用诊断与治疗杂志,2005,19(5):313-314. LI S F, WANG X, GUI X E, et al. Effects of angelica polysaccharide on the functional status of dendritic cells in HBC trans-genie mice[J]. Journal of practical diagnosis and therapy, 2005, 19(5): 313-314(in Chinese with English abstract).

[11] 徐卓婧,郝思杨.丹参川芎嗪注射液对冠心病不稳定型心绞痛患者心血管功能、抗氧化功能的影响[J].临床医学研究与实践,2022,7(10):122-125. XU Z J, HAO S Y. Effects of salviae miltiorrhizae and ligustrazine hydrochloride injection on cardiovascular function and antioxidant function in patients with unstable angina pectoris of coronary heart disease[J]. Clinical research and practice, 2022, 7(10): 122-125(in Chinese with English abstract).

[12] 陈卓.从TLR4/MyD88/NF-κB通路探讨丹参酮ⅡA干预动脉粥样硬化易损斑块的抗炎及免疫调节机制[D].北京:北京中医药大学,2016. CHEN Z. To explore the anti-inflammatory and immunomodulatory mechanism of tanshinone ⅡA in the intervention of atherosclerotic vulnerable plaques from the TLR4/MyD88/NF-κB pathway[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016(in Chinese with English abstract).

[13] 孙志远.丹参酮ⅡA固体分散体的制备及其抑制大肠癌细胞增殖的机制研究[D].长春:长春中医药大学,2022. SUN Z Y. The preparation of tanshinone ⅡA solid dispersion and its mechanism of inhibiting colon cancer cell proliferation[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2022(in Chinese with English abstract).

[14] 黄梓洋,王志一,李自波,等.丹参及有效成分的抗抑郁药理作用及机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(4):288-296. HUANG Z Y, WANG Z Y, LI Z B, et al. Pharmacological effects and mechanisms of salviae miltiorrhizae *Radix* et *rhizoma* and its active components in treating depression: a review[J]. Chinese journal of experimental traditional medical formulae, 2025, 31(4): 288-296(in Chinese with English abstract).

[15] LUO P P, HUANG Y Q, HANG X D, et al. Dihydrotanshinone Ⅰ is effective against drug-resistant *Helicobacter* pylori *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2021, 65(3): e01921-e01920[2025-07-07]. https://doi.org/10.1128/AAC.01921-20.

[16] 徐国双.二氢丹参酮Ⅰ及PA-X单抗对A型流感病毒感染介导的肺损伤的保护作用研究[D].长春:吉林大学,2020. XU G S. Protective effects of dihydrotanshinone Ⅰ and PA-X monoclonal antibody on lung injury mediated by influenza a virus infection[D]. Changchun: Jilin University, 2020(in Chinese with English abstract).

[17] MORRIS G M, HUEY R, OLSON A J. Using AutoDock for ligand-receptor docking[J/OL]. Current protocols in bioinformatics, 2008, 8: 24[2025-07-07]. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0814s24.

[18] PARK J Y, KIM J H, KIM Y M, et al. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2012, 20(19): 5928-5935.

[19] YANG C, PAN X Y, XU X F, et al. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein[J/OL]. Signal transduction and targeted therapy, 2020, 5: 220[2025-07-07]. https://doi.org/ 10.1038/s41392-020-00325-1.

[20] 傅海霞,张梦佳,马海龙,等.大黄素对重组毒株rPRRSV-DV-EGFP的抑制作用研究[J/OL].华中农业大学学报,1-13[2026-03-28]. https://link. cnki. net/urlid/42.1181.s.20251126.1416.002. FU H X, ZHANG M J, MA H L, et al. The effects of emodin on inhibiting the recombinant strain PRRSV-DV-EGFP[J/OL]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1-13 [2026-03-28]. https://link. cnki. net/urlid/42.1181.s.20251126.1416.002(in Chinese with English abstract).

[21] XU Z, HUANG M, XIA Y, et al. Emodin from aloe inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus via toll-like receptor 3 activation[J/OL]. Viruses, 2021, 13(7): 1243[2025-07-07]. https://doi.org/10.3390/v13071243.

[22] LI Z H, CAO H, CHENG Y F, et al. Inhibition of porcine epidemic diarrhea virus replication and viral 3C-like protease by quercetin[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(21): 8095[2025-07-07]. https://doi.org/10.3390/ijms21218095.

[23] 赵诗莹,陈新,陈欢,等.黄腐酚对猪流行性腹泻病毒的体外抑制作用[J].病毒学报,2020,36(5):907-912. ZHAO S Y, CHEN X, CHEN H, et al. Inhibitory effect of xanthohumol on porcine epidemic diarrhea virus *in vitro*[J]. Chinese journal of virology, 2020, 36(5): 907-912(in Chinese with English abstract).

[24] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus [J/OL]. Virology journal, 2015, 12 (1): 193 [2025-07-07]. https://doi. org/10.1186/s12985-015-0421-2.

[25] WEI X N, SHE G L, WU T T, et al. PEDV enters cells through clathrin-, caveolae-, and lipid raft-mediated endocytosis and traffics via the endo-/lysosome pathway[J/OL]. Veterinary research, 2020, 51(1): 10[2025-07-07]. https://doi.org/10.1186/s13567-020-0739-7.

[26] LIN F, ZHANG H Y, LI L Q, et al. PEDV: insights and advances into types, function, structure, and receptor recognition [J/OL]. Viruses, 2022, 14(8): 1744 [2025-07-07]. https://doi.org/10.3390/v14081744.

[27] CHEN X N, CAI S T, LIANG Y F, et al. Subcellular localization of viral proteins after porcine epidemic diarrhea virus infection and their roles in the viral life cycle [J/OL]. International journal of biological macromolecules, 2024, 274: 133401[2025-07-07]. https://doi.org/ 10.1016/j.ijbiomac.2024.133401.

[28] SAWICKI S G, SAWICKI D L. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands [J]. Advances in experimental medicine and biology, 1995, 380: 499-506.

[29] LI X, WU Y W, YAN Z B, et al. A comprehensive view on the protein functions of porcine epidemic diarrhea virus [J/OL]. Genes, 2024, 15(2): 165[2025-07-07]. https://doi.org/10.3390/genes15020165.

[30] ZHENG L, YANG Y, MA M X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus E protein induces unfolded protein response through activating both PERK and ATF6 rather than IRE1 signaling pathway[J]. Virus genes, 2024, 60(6): 652-666.

[31] HU Y, XIE X H, YANG L C, et al. A comprehensive view on the host factors and viral proteins associated with porcine epidemic diarrhea virus infection [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2021, 12: 762358[2025-07-07]. https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2021.762358.

[32] HUAN C C, XU W Y, NI B, et al. Epigallocatechin-3-gallate, the main polyphenol in green tea, inhibits porcine epidemic diarrhea virus *in vitro*[J/OL]. Frontiers in pharmacology, 2021, 12: 628526 [2025-07-07]. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628526.

[33] 叶跃天，郇文彬，陈欢，等. 黄连素抑制猪流行性腹泻病毒复制和组装[J]. 中国兽医学报，2019，39(9)：1829-1835. YE Y T, HUAN W B, CHEN H, et al. Berberine inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication and assembly[J]. Chinese journal of veterinary science, 2019, 39(9): 1829-1835(in Chinese with English abstract).

Inhibitory effect of dihydrotanshinone Ⅰ on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) *in vitro*

HAO Xiaolong[1,2], WU Zhuoya[1,2], PAN Xiaocheng[2], DAI Yin[2], ZHOU Jie[1], WANG Jieru[2]

1. *College of Veterinary Medicine, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, China*;
2. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences/ Anhui Province Livestock and Poultry Epidemic Diseases Research Center/ Anhui Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Product Safety, Hefei 230031, China*

Abstract The CCK-8 assay was used to detect the effect of different concentrations of dihydrotanshinone Ⅰ (DiⅠ) on the viability of Vero and IPEC-J2 cells to study the inhibitory effect of DiⅠ on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) *in vitro*. Methods including real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), Western blot, indirect immunofluorescence, and virus titer assay were used to evaluate the anti PEDV activity of DiⅠ. The effects of different administration methods on the replication of PEDV were investigated. Molecular docking method was used to evaluate the interaction between DiⅠ and PEDV M^{pro}. The results showed that DiⅠ had no significant toxicity to Vero and IPEC-J2 cells at the concentrations used in subsequent experiments. DiⅠ significantly inhibited the gene expression and protein synthesis of PEDV in a dose-dependent manner. Full-treatment, co-treatment, and post-treatment all significantly inhibited the replication of PEDV. It is indicated that DiⅠ has anti PEDV activity and can exert inhibitory effects on key stages including invasion, replication, and release of PEDV, making it a potential candidate drug against PEDV infection.

Keywords dihydrotanshinone I(DiI); porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); inhibition *in vitro*; therapeutic agent

(责任编辑：陆文昌)