



覃向谋, 黄静, 玉洁莹, 等. 小檗碱在体外抑制神经坏死病毒增殖的作用及机制研究 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059419.
Qin X M, Huang J, Yu J Y, *et al.* Effects and mechanisms of berberine on inhibiting nervous necrosis virus proliferation *in vitro* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059419 (in Chinese).

小檗碱在体外抑制神经坏死病毒增殖的作用及机制研究

覃向谋¹, 黄静¹, 玉洁莹¹, 余庆¹, 刘明珠¹, 高艳侠¹, 赖俊翔¹,
陈华谱², 韩书煜³, 常彦磊⁴, 黄琳^{1*}, 李鹏飞^{1,5*}

(1. 广西科学院广西海洋科学院, 广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室,

广西渔业重大疫病防控与高效健康养殖产业技术工程研究中心, 广西南宁 530007;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室, 广东湛江 524088;

3. 广西壮族自治区水产技术推广站, 广西南宁 530199;

4. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广东广州 510700;

5. 北部湾海洋产业研究院, 中国-东盟现代渔业产业技术转移示范中心,
农业农村部水产和畜禽养殖南宁野外科学观测研究站, 广西南宁 530007)

摘要: 【目的】在细胞水平探究小檗碱 (BBR) 对神经坏死病毒 (NNV) 的抗病毒效果并阐明其作用机制。【方法】以不同浓度梯度的 BBR 处理卵形鲳鲹脾脏成纤维细胞 (TOSF), 采用光镜观察及 CCK-8 法确定 BBR 的安全工作浓度。通过细胞病变观察、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 NNV 衣壳蛋白 (CP) 基因的表达, 评价 BBR 对 NNV 增殖的抑制作用。综合运用病毒预处理、时间点加药、RT-qPCR 和流式细胞术等多种实验策略, 系统分析 BBR 对病毒颗粒的直接作用及其在对 NNV 感染过程中吸附、侵入和复制阶段的影响。此外, 通过 RT-qPCR 检测促炎因子 IL-1 β 和 IL-8 的表达, 评估 BBR 对 NNV 感染诱导炎症反应的调节作用。【结果】确定了 6.25 ng/mL 为 BBR 在 TOSF 细胞中的最高安全浓度。安全浓度下 BBR 处理 TOSF 细胞, 能够显著减轻细胞病变效应及降低病毒 CP 基因的表达, 抑制 NNV 增殖。机制研究结果显示, BBR 可直接作用于 NNV 病毒颗粒降低其感染性, 有效抑制 NNV 对宿主细胞的吸附与侵入, 且在病毒侵入细胞后仍能显著抑制其胞内复制过程。此外, BBR 还能显著下调 NNV 感染引起的促炎因子 IL-1 β 和 IL-8 的表达。【结论】BBR 能够通过直接作用病毒颗粒、阻断病毒吸附与侵入、抑制病毒在细胞内复制, 并缓解宿主的炎症反应, 从而发挥抗 NNV 效应。

关键词: 神经坏死病毒; 小檗碱; 抗病毒活性; 作用机制; 炎症反应

中图分类号: Q 786; S 942

文献标志码: A

收稿日期: 2026-01-05 修回日期: 2026-02-08

资助项目: 广西自然科学基金 (2023GXNSFAA026325, 2022JJA130074); 广西科技计划项目 (桂科发 [2024]102-2); 来宾市科学研究与技术开发计划项目 (来科产 241519)

第一作者: 覃向谋, 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: qinxiangmou@163.com

通信作者: 黄琳, 从事鱼类病害与免疫研究, E-mail: hlin556@163.com;

李鹏飞, 从事水产种苗高效繁育与生态健康养殖技术研究, E-mail: pfl2014@126.com



石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) 是我国及东南亚地区重要的高经济价值海水养殖鱼类。然而, 病害问题严重制约了石斑鱼养殖业的健康发展, 其中由神经坏死病毒 (NNV) 引发的病毒性神经坏死症 (VNN) 危害尤为严重^[1]。NNV 是一种单股正链 RNA 病毒, 属于诺达病毒科 β 诺达病毒属^[2], 在石斑鱼苗种阶段具有高度致死性, 可导致 80%~100% 的死亡率, 已对全球水产养殖业造成重大损失^[3-4]。NNV 主要侵袭宿主中枢神经系统, 引起神经组织空泡化坏死, 典型症状包括游泳失衡、螺旋状游动及反应迟钝等^[1,5]。目前, 针对 NNV 的防控主要依赖疫苗接种与药物干预^[6], 但由于苗种在育苗阶段免疫系统尚未成熟, 疫苗效果有限, 药物治疗仍是关键手段^[7]。然而, 传统化学药物及抗生素的长期使用易引发耐药性与残留问题, 因此, 开发安全、高效的绿色替代药物迫在眉睫。

中草药因其多靶点、低毒性、不易产生耐药性等优势, 正逐渐成为水产养殖中重要的药物资源^[8]。中草药来源广泛, 其活性成分能通过多途径干扰病毒复制周期, 并调节宿主免疫与抗氧化等反应, 从而实现对疾病的综合防控^[9-10]。近年来, 利用天然药用植物防治水生动物病毒病已成为研究热点。大量研究表明, 多种植物提取物或活性成分对水产常见病毒, 如大口黑鲈虹彩病毒 (LMBV)^[11-12]、大口黑鲈弹状病毒 (MSRV)^[13]、锦鲤疱疹病毒 (KHV)^[14-15]、石斑鱼虹彩病毒 (SGIV)^[16-17] 及白斑综合征病毒 (WSSV)^[18-19] 等, 均表现出显著的抑制效果, 显示出中草药在水产病毒病绿色防控中的应用前景。在中草药抗 NNV 的研究中, 多种天然产物及提取物已被证实具有显著的抗病毒活性。例如, 齐墩果酸在体内外均具有抗 NNV 作用, 其通过抑制病毒诱导的细胞凋亡、上调宿主免疫基因表达等机制发挥抗病毒作用^[20]。大黄酸则可通过干扰 NNV 引起的 S 期细胞周期阻滞、抑制 ATP 合成, 从而有效抑制病毒复制^[21]。此外, 酸枣仁醇提取物及其活性成分白桦脂酸也被证实能够干扰 NNV 的吸附、侵入与复制过程, 并通过调节抗氧化相关基因的表达, 发挥抗病毒作用^[22]。这些研究为中草药来源的绿色抗 NNV 药物开发提供了重要依据。

小檗碱 (BBR) 是一种从黄连、黄柏等中药材中提取的异喹啉类生物碱。现代药理研究表明, BBR 具有广谱的抗病原微生物、抗炎、抗氧化及

免疫调节等多重药理活性, 已被广泛应用于人类医学领域^[23]。在抗病毒方面, BBR 对包括严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2)、流感病毒、乙型肝炎病毒 (HBV) 在内的多种病毒均有抑制作用^[24-26]。其作用机制兼具直接抗病毒效应, 如阻断病毒吸附与复制等, 以及间接宿主调控效应, 如抑制炎症通路与缓解氧化应激等。在水产养殖中, BBR 的抗病毒潜力也已初步得到验证, 例如其对鲤春病毒血症病毒 (SVCV)^[27]、LMBV^[28] 和 SGIV^[29] 的感染具有明显的抑制效果。然而, 关于 BBR 是否对石斑鱼的重要病原 NNV 具有抗病毒活性, 目前尚未见报道。

因此, 本研究旨在探究 BBR 对 NNV 在细胞水平的抑制作用, 并初步阐明其潜在的作用机制, 为开发针对 NNV 的绿色防控策略提供新的候选药物与理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

小檗碱 (BBR, CAS 号: 2086-83-1) 购于上海麦克林生化科技股份有限公司, 根据说明书使用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解并配制成 100 mg/mL 母液, 随后使用 Leibovitz's L15 培养基将其稀释至各工作浓度。实验所用的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 脾脏成纤维细胞 (TOSF)^[30] 及 NNV 均为广西水产生物技术与现代生态养殖重点实验室保存。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 小檗碱在 TOSF 细胞中安全浓度的确定

将 TOSF 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔细胞培养板, 置于 28 °C 培养 18 h。用 L15 培养基将 BBR 稀释至 100、50、25、12.5 和 6.25 ng/mL, 分别加入孔中 (100 μ L / 孔), 以未加药细胞作为对照, 每组设 4 个复孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 室温避光孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光值 (OD_{450}), 并按以下公式计算细胞相对存活率: 细胞相对存活率 (%) = (实验组 OD_{450} / 对照组 OD_{450}) \times 100%。为进一步确定 BBR 的细胞安全浓度, 选取与对照组存活率无显著性差异的 BBR 浓度 (6.25 ng/mL) 处理细胞, 分别于 24、48 和 72 h 在光学显微镜下观察形态, 并同上方方法测定各时间点的细胞存活率。

1.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取细胞总 RNA。取 1 μg RNA, 按照反转录试剂盒 (Vazyme) 说明书合成 cDNA, 反应体系包含: 1 μL random primer、4 μL 4 \times gDNA wiper Mix, 用无 RNase 水补足至 16 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min 后, 加入 4 μL 5 \times select qRT supermix II, 依次在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min、85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s。定量 PCR 反应体系为 20 μL , 包含 10 μL AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Cwbio)、1 μL cDNA 模板、0.4 μL 正向与反向引物以及 8.2 μL ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 共 40 个循环; 最后进行熔解曲线分析 (从 65 $^{\circ}\text{C}$ 升至 95 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率 5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$)。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 的引物

Tab. 1 Primers of RT-qPCR

引物名称 primers	序列(5'-3') sequence
CP-F	CAACTGACAACGATCACACCTTC
CP-R	CAATCGAACACTCCAGCGACA
β -actin-F	ACGAGCTGCCTGACGGACA
β -actin-R	GGCTGTGATCTCCTTCTGCA
IL-1 β -F	GGCGTCGTTTCAGAGTCTCTCT
IL-1 β -R	GCGGGCAGACATGAAGGTG
IL-8-F	CCGATCAACAGGGACTTCAA
IL-8-R	GAGGACCGAGGGTTCAGACAG

1.4 小檗碱在细胞水平抗 NNV 效果评估

将 TOSF 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔细胞培养板, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。实验组分别加入 6.25、3.125 或 1.562 5 ng/mL BBR 及 0.8 μL NNV 病毒液 ($\text{TCID}_{50} = 10^{-6} \text{ mL}^{-1}$); 阴性对照组仅加培养基, 阳性对照组仅加等量病毒。各组混合液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后加入细胞, 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48 h, 于光学显微镜下观察细胞病变并拍照。

将 TOSF 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板中, 其余处理与上述实验一致。培养结束后提取 RNA 并反转录为 cDNA, 以 β -actin 为内参, 通过 RT-qPCR 检测 NNV CP 基因的表达水平。每组设 3 个生物学重复, qPCR 设 4 个技术重复。

1.5 小檗碱抗 NNV 直接作用机制

小檗碱对 NNV 病毒颗粒的直接作用 将

TOSF 细胞接种于 12 孔板中, 过夜培养。将 BBR 与 NNV 病毒液混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 000 \times g 离心 30 min, 弃上清液, 用 100 μL TN 缓冲液 (pH 7.5) 重悬病毒颗粒。取 20 μL 病毒悬液感染细胞, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后收集细胞, 提取 RNA 并通过 RT-qPCR 检测 CP 基因的表达。

小檗碱对 NNV 吸附宿主细胞的影响 将 TOSF 细胞接种于 12 孔板中, 过夜培养。将 BBR 与 NNV 病毒液混合后加入细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。孵育结束后, 弃去上清液, 使用 PBS 清洗细胞 2 次, 洗去 BBR 及未吸附的 NNV, 更换新鲜 L15 培养基并于 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 12 h, 通过 RT-qPCR 检测 CP 基因的表达。以仅感染 NNV 的细胞作为阳性对照。

使用花菁染料 (Cy5) 标记 NNV。取 100 μL NNV 病毒液与 2.5 μL Cy5 染料在冰上避光孵育 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、24 000 \times g 条件下离心 1.5 h, 弃上清液以去除游离染料。向沉淀中加入 300 μL TN 缓冲液重悬, 再次于相同条件下离心 1.5 h, 弃上清液以进一步洗涤。最后, 使用 100 μL TN 缓冲液重悬, 获得 Cy5 标记的 NNV(Cy5-NNV)。

将 TOSF 细胞接种于 6 孔板中, 过夜培养。阴性对照组在细胞中仅加入 L15 培养基; 阳性对照组仅加入 Cy5-NNV; 实验组则同时加入 BBR 及 Cy5-NNV。各组细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h 后, 弃去上清液, 使用细胞刮刀收集细胞, 并用 PBS 洗涤 2 次, 最后用 PBS 重悬细胞。利用流式细胞仪检测细胞的荧光强度。

小檗碱对 NNV 侵入宿主细胞的影响 将 TOSF 细胞接种于 12 孔板中, 过夜培养。先将 NNV 与细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 使病毒吸附于细胞表面。用 PBS 洗涤细胞, 弃去未吸附的病毒, 加入 BBR, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h。随后, 用 PBS 洗去 BBR, 更换为新鲜 L15 培养基, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养至 12 h, 通过 RT-qPCR 检测 CP 的表达。以仅感染 NNV 的细胞作为阳性对照。

将 TOSF 细胞接种于 6 孔板中, 过夜培养。先将 Cy5-NNV 与细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 使病毒吸附于细胞表面。用 PBS 洗涤细胞, 弃去未吸附的病毒, 加入 BBR, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h。培养结束后弃去上清液, 加入蛋白酶 K 消化细胞 10 min, 收集细胞。细胞收集后再次用 PBS 清洗 2 次, 最后用适量 PBS 重悬。利用流式细胞仪检测细胞荧光强度。以仅感染 Cy5-NNV 的细胞作为阳性对照。

小檗碱对 NNV 在细胞内复制的影响 将 TOSF 细胞接种于 12 孔板中, 过夜培养。先在 4 °C 条件下加入 NNV 孵育 1 h, 弃去上清液, 加入新鲜 L15 培养基, 于 28 °C 培养 2 h。随后加入 BBR, 继续在 28 °C 培养 8 h。待 NNV 在 TOSF 细胞内复制后, 弃去药液, 用 PBS 清洗细胞, 补充新鲜 L15 培养基, 继续在 28 °C 培养 2 h 后, 通过 RT-qPCR 检测 CP 基因的表达。以仅感染 NNV 的细胞作为阳性对照。

1.6 小檗碱对宿主促炎因子表达的影响

将 TOSF 细胞接种于 12 孔板中, 过夜培养。在 28 °C 条件下同时加入 NNV 和 BBR, 培养 48 h。培养结束后, 通过 RT-qPCR 检测 IL-1 β 和 IL-8 基因的表达水平。以仅感染 NNV 的细胞作为对照。

1.7 数据分析

细胞存活率数据经反正弦转换后再进行统计分析。实验数据以平均值 \pm 标准误表示 (mean \pm SE), 采用 GraphPad Prism 9 和 Excel 2010 软件处理数据并制作图表, 利用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 比较各组数据之间差异的显著性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗碱在 TOSF 细胞中安全浓度的测定

将不同浓度梯度的 BBR 处理 TOSF 细胞 48 h。显微观察结果显示, BBR 浓度高于 6.25 ng/mL 时, TOSF 细胞形态发生明显改变, 细胞活力下降; 而 BBR 浓度为 6.25 ng/mL 的实验组细胞形态与对照组一致, 仍维持正常的形态结构 (图 1-a)。CCK-8 实验检测细胞活性结果显示, BBR 浓度高于 6.25 ng/mL 时细胞活性显著降低, 而 6.25 ng/mL 浓度下的细胞活力与对照组相比无显著性差异 (图 1-b)。此外, 使用 6.25 ng/mL BBR 分别处理 TOSF 细胞 24、48 和 72 h 后, 显微镜下观察显示其细胞形态始终与对照组一致, 未见明显异常 (图 1-c)。CCK-8 细胞活性检测进一步证实, 6.25 ng/mL BBR 在 72 h 内对 TOSF 细胞未产生显著毒性影响。综上所述, 本实验选择 6.25 ng/mL 作为 BBR 在 TOSF 细胞上的最高安全工作浓度。

2.2 小檗碱对 NNV 增殖的抑制作用

在 6.25、3.125 和 1.562 5 ng/mL 3 种不同浓度

的 BBR 处理下, NNV 感染所引起的细胞病变效应 (CPE) 均较阳性对照组有所减轻 (图 2-a)。进一步通过 RT-qPCR 检测发现, 各 BBR 处理组细胞内 NNV CP 基因的表达显著低于阳性对照组 (图 2-b), 且呈现剂量依赖。结果表明, BBR 能够有效抑制 NNV 的增殖, 且其抑制作用具有浓度依赖性。

2.3 小檗碱抗 NNV 直接作用机制

小檗碱对 NNV 病毒颗粒的影响 为探究 BBR 是否能直接作用于病毒颗粒, 将 6.25 ng/mL BBR 与 NNV 共孵育, 经离心洗涤去除游离药物后, 用 BBR 处理后的病毒悬液感染 TOSF 细胞。RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组相比, BBR 处理组细胞中 NNV CP 基因的表达量显著降低 (图 3-a)。结果表明, BBR 能与病毒颗粒发生直接相互作用, 可能通过破坏病毒结构完整性或降低其感染能力, 从而抑制病毒活性。

小檗碱对 NNV 吸附 TOSF 细胞的影响 为了探究 BBR 能否干扰 NNV 在宿主细胞上的吸附, 首先将 TOSF 细胞与 6.25 ng/mL BBR 及 NNV 在 4 °C 条件下共孵育, 允许病毒附着但阻断内化。随后洗去药物以及未结合的病毒, 并将细胞转至 28 °C 培养。RT-qPCR 结果显示, 与仅接受 NNV 处理的对照组相比, BBR 处理组中 NNV CP 基因的相对表达量显著降低 (图 3-b)。为进一步验证该结果, 利用 Cy5 标记的 NNV 进行上述吸附实验, 并进行流式细胞术检测。结果表明, BBR 处理组细胞的 Cy5 荧光强度显著低于仅感染 Cy5-NNV 的对照组 (图 3-c)。结果表明, BBR 能够有效抑制 NNV 在 TOSF 细胞的吸附过程。

小檗碱对 NNV 侵入 TOSF 细胞的影响 为了探究 BBR 对 NNV 侵入过程的影响, 首先将 NNV 与细胞在 4 °C 孵育后, 加入 6.25 ng/mL BBR 并转移至 28 °C 培养 2 h。随后洗去药物, 继续在 28 °C 培养。RT-qPCR 结果显示, 与仅接受 NNV 处理的对照组相比, BBR 处理组中 NNV CP 基因的相对表达量显著降低 (图 3-d)。此外, 利用 Cy5 标记的 NNV 进行上述侵入实验, 并用流式细胞术定量分析。结果表明, 与仅接受 Cy5-NNV 处理的阳性对照组相比, BBR 处理组细胞内的荧光信号较对照组显著减少 (图 3-e)。结果表明, 在病毒吸附于细胞表面后, BBR 仍能有效干扰其后续的侵入过程。

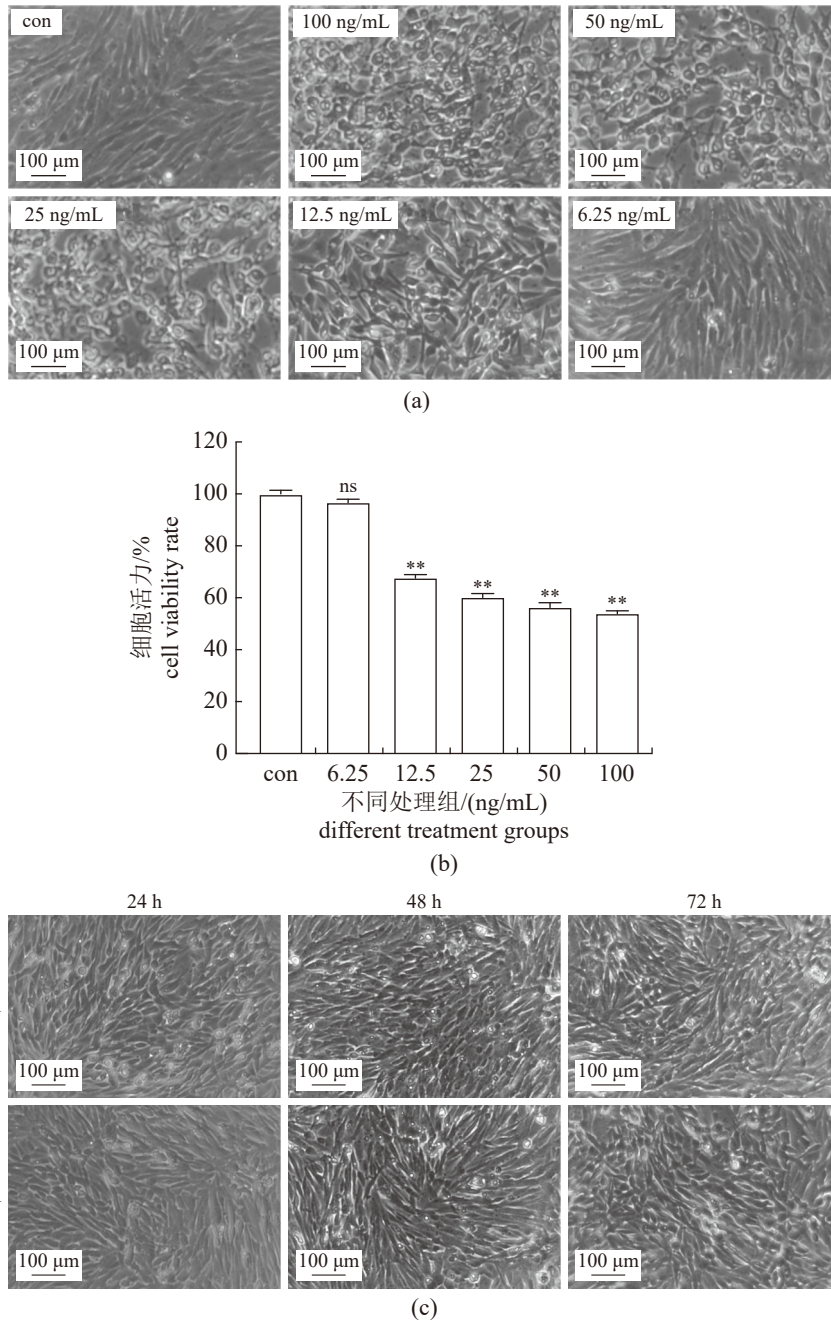


图 1 小檗碱在 TOSF 细胞中安全浓度的测定

(a) 不同浓度 BBR 处理下 TOSF 细胞的形态变化; (b) 通过 CCK8 试剂检测不同浓度 BBR 处理后 TOSF 的细胞活力; (c) TOSF 细胞与 6.25 ng/mL BBR 共孵育 24、48 和 72 h 后的细胞形态。与对照组比较, ns. $P>0.05$; **, $P<0.01$, con. 对照组。

Fig. 1 Determination of safe concentration of BBR in TOSF cells

(a) morphological changes of TOSF cells under different concentrations of BBR; (b) cell viability under different concentrations of BBR; (c) morphological changes of TOSF cells incubated with 6.25 ng/mL BBR for 24, 48, 72 h. Compared with the control group, ns. $P>0.05$; **, $P<0.01$, con. control group.

小檗碱对 NNV 在 TOSF 细胞中复制的影响

为了探究 BBR 对 NNV 在细胞内复制的影响, 在 NNV 完成吸附与侵入步骤后加入 BBR。RT-qPCR 结果显示, 与仅接受 NNV 处理的对照组相比, 6.25 ng/mL BBR 处理组中 NNV CP 基因的相对表

达量显著降低 (图 3-f), 表明 BBR 能够有效抑制 NNV 在 TOSF 细胞内的复制过程。

2.4 小檗碱对 NNV 感染诱导的炎症反应的影响

有研究报道 BBR 可以通过调控宿主炎症反应

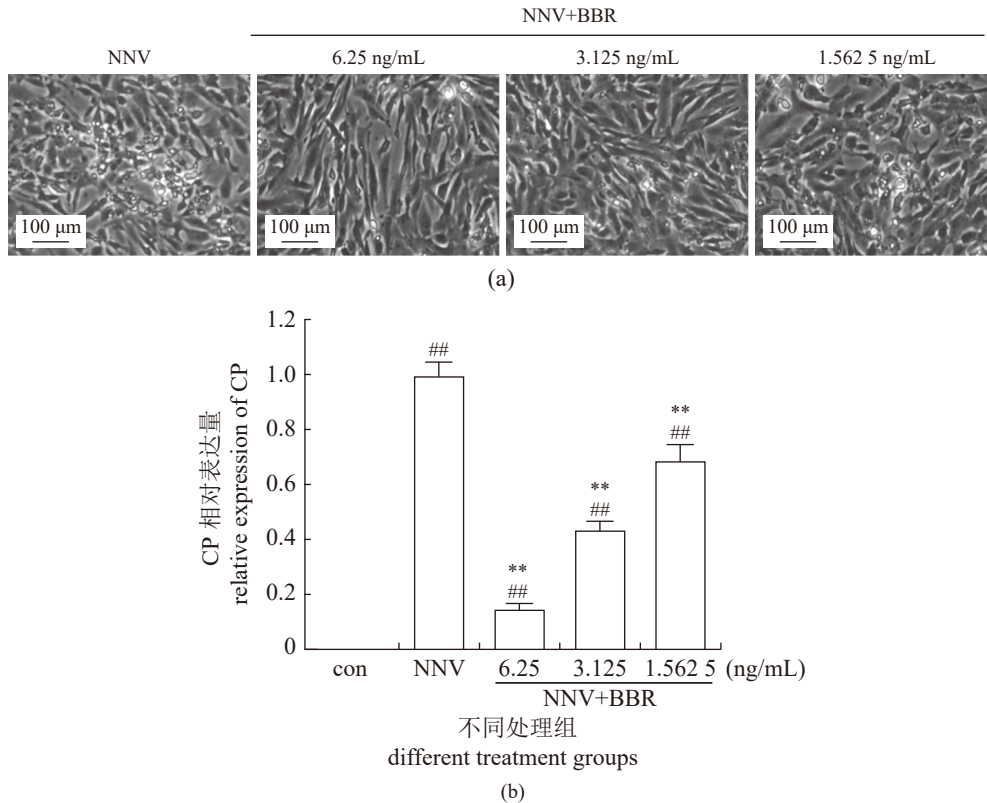


图 2 小檗碱抗 NNV 作用效果评估

将不同浓度 (6.25、3.125 和 1.5625 ng/mL) BBR 处理 TOSF 细胞, 并感染 NNV, 通过光学显微镜观察 TOSF 细胞的 CPE(a), 通过 RT-qPCR 检测 CP 的相对表达量 (b)。与阴性对照组 (con) 比较, ##. $P < 0.01$; 与阳性对照组 (NNV) 比较, **. $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Evaluation of the anti-NNV effect of BBR

TOSF cells were treated with different concentrations (6.25、3.125 and 1.5625 ng/mL) of BBR and infected with NNV, CPEs were observed under a light microscope (a) and the expression levels of CP were detected by RT-qPCR (b). Compared with the negative control group (con), ##. $P < 0.01$; compared with the positive control group (NNV), **. $P < 0.01$.

抑制 SGIV 增殖^[29]。为进一步探究 BBR 是否通过调节细胞炎症反应来抑制 NNV 增殖, 本研究检测了 NNV 感染后促炎因子 IL-1 β 和 IL-8 的表达。RT-qPCR 结果显示, 与仅感染 NNV 的对照组相比, BBR 处理组中促炎因子 IL-1 β 和 IL-8 的相对表达量显著降低 (图 4)。以上结果表明, 除了直接抗病毒作用外, BBR 还能够有效减轻 NNV 感染诱导的炎症反应。

3 讨论

NNV 作为一种对全球水产养殖业构成严重威胁的病原体, 开发有效的防控策略对降低其感染所造成的损失具有重要意义。本研究报道了天然产物 BBR 在细胞水平对 NNV 具有显著的抗病毒活性, 并初步揭示了其直接作用于病毒颗粒、干扰病毒吸附与侵入、抑制病毒在细胞内复制以及调节宿主炎症反应等多重作用机制。

确定药物的安全浓度是将其应用于水产健康养殖的前提。药物浓度过低可能无法发挥疗效, 而过高则可能引起细胞毒性, 抑制生长甚至导致死亡。本研究通过细胞毒性实验, 确定 6.25 ng/mL 为 BBR 在 TOSF 细胞上的安全作用浓度。在此浓度下, BBR 对细胞的形态和活力均无显著影响, 为后续抗病毒机制研究提供了可靠的浓度依据。

BBR 的抗病毒活性已在多种病毒中被广泛报道, 例如丙型肝炎病毒 (HCV)^[31-32]、登革病毒 (DENV)^[33]、寨卡病毒 (ZIKV)^[33] 和 SARS-CoV-2 等^[34-35]。这些研究表明 BBR 是一种广谱抗病毒天然产物。近年来, BBR 在水产病毒防控中的应用也逐渐受到关注, 有报道 BBR 对 LMBV 和 SGIV 均具有显著的抑制效果^[28-29]。本研究发现, BBR 对 NNV 同样表现出显著的抗病毒效果。本研究将 BBR 的抗病毒作用延伸至新的重要水产病原体 NNV, 相关发现也与已有研究互为补充, 为

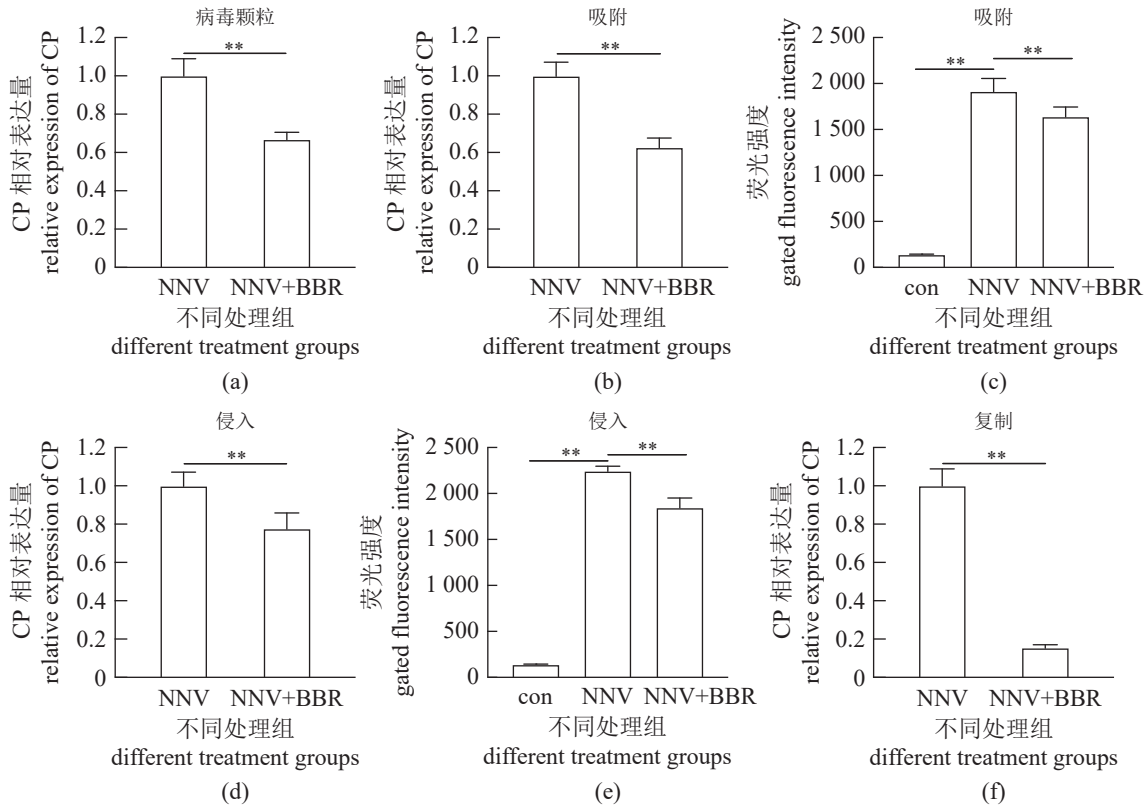


图 3 小檗碱对 NNV 病毒颗粒及其感染周期关键环节的影响

(a) 将 BBR 处理 NNV 病毒颗粒, 然后感染 TOSF 细胞, 通过 RT-qPCR 检测 CP 的相对表达量。将 BBR 与 NNV 处理 TOSF 细胞, 4 °C 孵育 1 h, 弃去上清液并洗涤后, 加入新鲜 L15 培养基置于 28 °C 继续培养, 然后通过 RT-qPCR 检测 CP 的相对表达量 (b), 通过流式细胞术检测细胞的荧光强度 (c)。将 NNV 处理 TOSF 细胞, 在 4 °C 孵育 1 h, 孵育结束后弃去上清液, 加入 BBR 并置于 28 °C 培养 2 h, 待 NNV 侵入细胞后, 弃去上清液并洗涤, 加入新鲜 L15 培养基于 28 °C 继续培养, 然后通过 RT-qPCR 检测 CP 的相对表达量 (d), 通过流式细胞术检测细胞的荧光强度 (e)。(f) 将 NNV 在 4 °C 条件下处理 TOSF 细胞 1 h, 弃去上清液并加入新鲜 L15 培养基, 于 28 °C 培养 2 h, 随后加入 BBR, 继续在 28 °C 培养, 通过 RT-qPCR 检测 CP 的相对表达量。**. P < 0.01。

Fig. 3 Effect of BBR on NNV viral particles and key steps of its infection cycle

(a) TOSF cells were infected with BBR-treated NNV particles, and the relative expression of CP was detected by RT-qPCR. TOSF cells were treated with BBR and NNV and incubated at 4 °C for 1 h. After removing the supernatant and washing, fresh L15 medium was added, and the cells were further cultured at 28 °C. The relative expression of CP was then detected by RT-qPCR (b), and the fluorescence intensity of the cells was measured by flow cytometry (c). TOSF cells were treated with NNV and incubated at 4 °C for 1 h. The supernatant was then removed, BBR was added, and the cells were cultured at 28 °C for 2 h to allow viral entry. After discarding the supernatant and washing, fresh L15 medium was added for continued culture at 28 °C. The relative expression of CP was detected by RT-qPCR (d), and the fluorescence intensity was measured by flow cytometry (e). (f) TOSF cells were treated with NNV at 4 °C for 1 h. After removing the supernatant and adding fresh L15 medium, the cells were cultured at 28 °C for 2 h, followed by the addition of BBR and continued culture. The relative expression of CP was detected by RT-qPCR. Compared with the group treated with NNV alone, **. P < 0.01.

BBR 作为广谱性抗水生动物病毒天然分子的应用提供了新的支持。

抗病毒药物通常通过干预病毒生命周期的关键阶段来发挥抗病毒作用。本研究发现, BBR 在 NNV 复制周期的多个阶段具有显著的抑制作用。BBR 既能够直接破坏 NNV 病毒颗粒的感染性, 也能阻断 NNV 对宿主细胞的吸附与侵入。此外, 即使在病毒侵入细胞后给药, BBR 仍可显著抑制 NNV 在细胞内的复制。这表明 BBR 能够通过多

靶点方式发挥作用, 不仅作用于感染早期, 还可能通过调节宿主细胞内环境来干扰病毒的复制过程。这一多靶点作用模式在 BBR 抑制其他病毒的报道中也有类似体现。例如, BBR 能够同时影响病毒侵入、复制等多个阶段, 从而抑制 HCV 及一些冠状病毒的增殖^[31, 34]。本研究的结果进一步证实了 BBR 作为一种多靶点抗病毒分子的潜力, 为其在水产病毒防控中的应用提供了依据。

除了直接抑制病毒作用外, BBR 还能够通过

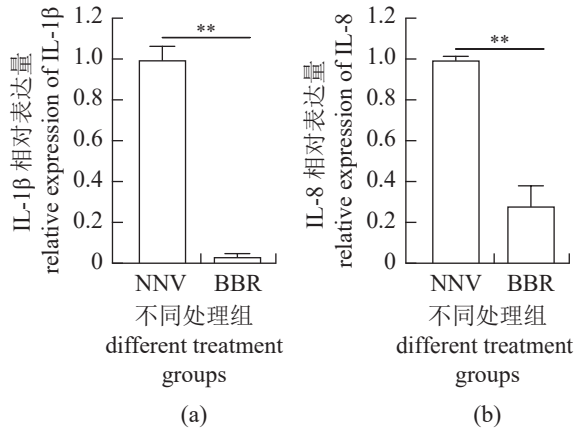


图 4 小檗碱对 NNV 感染 TOSF 细胞中促炎因子表达的影响

将 BBR 与 NNV 同时处理 TOSF 细胞, 通过 RT-qPCR 检测 IL-1 β (a) 和 IL-8 (b) 的相对表达量。与仅接受 NNV 处理组相比, **, $P < 0.01$ 。

Fig. 4 The effect of BBR on pro-inflammatory cytokines expression in TOSF cells

TOSF cells were treated with BBR and infected with NNV, and the expression levels of IL-1 β (a) and IL-8 (b) were detected by RT-qPCR. Compared with the group treated with NNV alone, **, $P < 0.01$.

调节宿主炎症反应间接影响病毒感染进程。已有大量研究表明, BBR 可通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 等信号通路, 下调 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等促炎细胞因子的表达, 从而发挥抗炎作用^[36-41]。在水产病毒研究领域, BBR 也被报道能够抑制 SGIV 和 LMBV 感染所引起的过度炎症反应^[28-29]。本研究发现, BBR 能够显著抑制 NNV 感染所诱导的 IL-1 β 和 IL-8 的表达, 这一结果与上述研究相符, 提示 BBR 在 NNV 感染中也能够通过调节炎症反应发挥辅助抗病毒作用。但是, 本研究仅初步证实了 BBR 对 IL-1 β 和 IL-8 的抑制作用, BBR 是否同样影响其他关键炎症因子及通路(如 TNF- α 、IL-6 及 MAPK 相关分子), 以及其在 NNV 感染中具体的抗炎调控机制尚未完全阐明, 仍有待进一步探索。

综上所述, 本研究在细胞水平阐明了 BBR 通过多靶点、多环节发挥抗 NNV 作用, 兼具直接抗病毒与调节宿主反应的潜力。这些结果为进一步开发 BBR 作为一种绿色、高效的抗 NNV 候选药物提供了重要的理论依据。未来的研究可进一步深入探索 BBR 作用的具体宿主靶点与信号通路, 并通过体内实验评估其在实际养殖环境中的防控效果与安全性。

(作者声明本文无利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈俊羽, 张婧. 石斑鱼神经坏死病毒研究进展 [J]. *水产养殖*, 2023, 44(3): 36-40.
Chen J Y, Zhang J. Research progress on grouper nerve necrosis virus[J]. *Journal of Aquaculture*, 2023, 44(3): 36-40 (in Chinese).
- [2] Lampert Y, Berzak R, Davidovich N, *et al.* Indigenous versus Lessepsian hosts: nervous necrosis virus (NNV) in eastern Mediterranean Sea fish[J]. *Viruses*, 2020, 12(4): 430.
- [3] 李淼, 许尤厚, 谢瑾琨, 等. 基于核酸适配体 TNA1c 构建靶标激活式探针用于特异性检测石斑鱼神经坏死病毒的感染 [J]. *渔业科学进展*, 2026, 47(1): 161-171.
Li M, Xu Y H, Xie J K, *et al.* Construction of a target-activatable aptamer TNA1c for specific detection of grouper nervous necrosis virus infection[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2026, 47(1): 161-171 (in Chinese).
- [4] 黄琳, 刘明珠, 余庆, 等. 石斑鱼养殖病原混合感染研究与分析 [J]. *水产学报*, 2025, 49(3): 039416.
Huang L, Liu M Z, Yu Q, *et al.* Study and analysis of pathogen co-infection in grouper culture[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, 49(3): 039416 (in Chinese).
- [5] 谢海舟, 王朝溪, 欧阳松应. 鱼类神经坏死病毒研究进展 [J]. *福建师范大学学报 (自然科学版)*, 2023, 39(1): 101-110.
Xie H Z, Wang Z X, Ouyang S Y. Research progress of fish nervous necrosis virus[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 39(1): 101-110 (in Chinese).
- [6] Padrós F, Caggiano M, Toffan A, *et al.* Integrated management strategies for viral nervous necrosis (VNN) disease control in marine fish farming in the mediterranean[J]. *Pathogens*, 2022, 11(3): 330.
- [7] 陈文捷, 刘晓丹, 胡先勤, 等. 鱼类神经坏死病毒研究进展与发展趋势 [J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1666-1672.
Chen W J, Liu X D, Hu X Q, *et al.* Trend and research progress of nervous necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1666-1672 (in Chinese).
- [8] 韩琪琪, 张杰. 中药对水产动物免疫应答、抗氧化功能及抗病力影响的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2024(22): 17-22.
Han Q Q, Zhang J. Research progress on the effects of traditional Chinese medicine on immune response, antioxidant function and disease resistance in aquatic animals[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2024(22): 17-22 (in Chinese).
- [9] 李鹏飞, 刘明珠, 肖贺贺, 等. 药用植物在水产养殖动物病原防控中的应用进展 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(7): 2015-2024.

- Li P F, Liu M Z, Xiao H H, *et al.* Application of medicinal plants in prevention and control of aquatic animal pathogens[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(7): 2015-2024 (in Chinese).
- [10] Chen Z, Ye S Y. Research progress on antiviral constituents in traditional Chinese medicines and their mechanisms of action[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2022, 60(1): 1063-1076.
- [11] 姚清. 南阳艾提取物抗嗜水气单胞菌和大口黑鲈虹彩病毒的作用研究 [D]. 南阳: 南阳师范学院, 2024.
- Yao Q. Inhibitory effect of Nanyang *Artemisia* extract against *Aeromonas hydrophila* and largemouth bass ranavirus[D]. Nanyang: Nanyang Normal University, 2024 (in Chinese).
- [12] 张帅帅, 刘明珠, 黄静, 等. 基于核酸适体的高通量模型筛选抗大口黑鲈虹彩病毒药物 [J]. *广东海洋大学学报*, 2024, 44(3): 9-16.
- Zhang S S, Liu M Z, Huang J, *et al.* Aptamer-based high-throughput screening model for efficient selection and evaluation of medicines against largemouth bass virus infection[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2024, 44(3): 9-16 (in Chinese).
- [13] 玉洁莹, 顾屹, 黄琳, 等. 单宁酸抗大口黑鲈弹状病毒的作用机制 [J]. *南方农业学报*, 2025, 56(6): 1823-1833.
- Yu J Y, Gu Y, Huang L, *et al.* Mechanism of tannic acid against *Micropterus salmoides* rhabdovirus (MSRV)[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2025, 56(6): 1823-1833 (in Chinese).
- [14] 李俊超. 锦鲤疱疹病毒诱导的细胞凋亡与抗病毒药物筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- Li J C. Studies on the apoptosis induced by Koi herpesvirus and the screening of anti-virus drugs[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [15] Haetrakul T, Dunbar S G, Chansue N. Antiviral activities of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau extract against Cypripinid herpesvirus 3 in koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(4): 581-587.
- [16] Liu M Z, Yu Q, Yi Y, *et al.* Antiviral activities of *Lonicera japonica* Thunb. Components against grouper iridovirus *in vitro* and *in vivo*[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734882.
- [17] 黄琳, 匡估辉, 余庆, 等. 仙鹤草水提取物对石斑鱼虹彩病毒的作用途径与机制研究 [J]. *广西科学院学报*, 2024, 40(4): 389-399.
- Huang L, Kuang J H, Yu Q, *et al.* Study on the role and mechanism of *Agrimonia pilosa* Ledeb. water extract in the infection of grouper iridovirus[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2024, 40(4): 389-399 (in Chinese).
- [18] 杨正飞. 海藻及其提取物对克氏原螯虾抗白斑综合征病毒 (WSSV) 的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- Yang Z F. The effect of seaweed and its extract on *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus (WSSV)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [19] 陈辉辉, 涂晨凌, 唐杨, 等. 复方中草药对白斑综合征病毒感染下凡纳滨对虾免疫活性的影响 [J]. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 2017, 56(5): 686-692.
- Chen H H, Tu C L, Tang Y, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on immune activities of *Litopenaeus vannamei* after infected with white spot syndrome virus[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2017, 56(5): 686-692 (in Chinese).
- [20] Liu Q X, Liu X, Yang B, *et al.* Evaluation of the antiviral activity of oleanolic acid against nervous necrosis virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 153: 109847.
- [21] Liu X, Li B K, Liu Q X, *et al.* *In vivo* and *in vitro* antiviral effect and mechanisms of Rhein against nervous necrosis virus[J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740207.
- [22] 徐伟强, 玉洁莹, 黄琳, 等. 酸枣仁醇提物及白桦脂酸抗神经坏死病毒的作用机制 [J]. *南方农业学报*, 2025, 56(6): 1787-1801.
- Xu W Q, Yu J Y, Huang L, *et al.* Action mechanism of *Semen Ziziphi Spinosae* alcohol extracts and betulinic acid against nervous necrosis virus[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2025, 56(6): 1787-1801 (in Chinese).
- [23] 陈楷珊, 蔡郭瀚, 陈相宇, 等. 中药提取物小檗碱和肉桂醛的抑菌活性进展综述 [J]. *工业微生物*, 2024, 54(4): 164-166.
- Chen K S, Cai G H, Chen X Y, *et al.* A review on the antibacterial activity of traditional Chinese medicine extracts berberine and cinnamaldehyde[J]. *Industrial Microbiology*, 2024, 54(4): 164-166 (in Chinese).
- [24] 田艳, 齐孟和. 基于网络药理学研究小檗碱抗新型冠状病毒感染的作用机制 [J]. *中国处方药*, 2024, 22(10): 12-15.
- Tian Y, Qi M H. Study on the mechanism of berberine against novel coronavirus infection based on network pharmacology[J]. *Journal of China Prescription Drug*, 2024, 22(10): 12-15 (in Chinese).
- [25] 南亚楠. 小檗碱对流感病毒导致肺损伤的保护作用及其机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- Nan Y N. Study on the protective effect of berberine against influenza virus-induced lung and intestinal injury and its mechanism[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021 (in Chinese).
- [26] 张明发, 沈雅琴. 小檗碱抗病毒药理作用的研究进展 [J]. *抗感染药学*, 2023, 20(3): 223-227.

- Zhang M F, Shen Y Q. Research progress in antiviral pharmacological effects of berberine[J]. *Anti-Infection Pharmacy*, 2023, 20(3): 223-227 (in Chinese).
- [27] 万偲佳, 黄文吉, 邵玲. 抗 SVCV 中草药提取物的体外筛选及对宿主免疫基因表达的影响研究 [J]. *病毒学报*, 2025, 41(3): 880-888.
- Wan S J, Huang W J, Shao L. Screening of Chinese herbal extracts for antiviral activity against SVCV and effects on host immune gene expression[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2025, 41(3): 880-888 (in Chinese).
- [28] 杨彬. 抗大口黑鲈虹彩病毒的中草药筛选及小檗碱的活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- Yang B. Screening of Chinese herbal medicine against largemouth bass virus and study on the activity of berberine[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023 (in Chinese).
- [29] Jiang Y X, Han C Z, Gong H N, *et al.* Berberine inhibits SGIV replication by suppressing inflammatory response and oxidative stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024, 149: 109522.
- [30] Huang L, Liu M Z, Lu X H, *et al.* Establishment a cell line of splenic fibroblasts from golden pompano and its application in heavy metal toxicology and pathogen infection[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2025, 10(6): 1050-1061.
- [31] Hung T C, Jassey A, Liu C H, *et al.* Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein[J]. *Phytomedicine*, 2019, 53: 62-69.
- [32] Hung T C, Jassey A, Liu C H, *et al.* Corrigendum to Berberine inhibits hepatitis C virus entry by targeting the viral E2 glycoprotein[J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154128.
- [33] Warowicka A, Nawrot R, Goździcka-Józefiak A. Antiviral activity of berberine[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(9): 1935-1945.
- [34] Kim H Y, Shin H S, Park H, *et al.* In vitro inhibition of coronavirus replications by the traditionally used medicinal herbal extracts, *Cimicifuga rhizoma*, *Meliae cortex*, *Coptidis rhizoma*, and *Phellodendron cortex*[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 41(2): 122-128.
- [35] Suryavanshi S V, Kulkarni Y A. NF- κ B: a potential target in the management of vascular complications of diabetes[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 798.
- [36] Choi B H, Kim Y H, Ahn I S, *et al.* The inhibition of inflammatory molecule expression on 3T3-L1 adipocytes by berberine is not mediated by leptin signaling[J]. *Nutrition Research and Practice*, 2009, 3(2): 84-88.
- [37] Fu K Q, Lv X P, Li W S, *et al.* Berberine hydrochloride attenuates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by suppressing activation of NF- κ B signal pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 24(1): 128-132.
- [38] Chen L W, Liu X Y, Wang X T, *et al.* Berberine alleviates acute lung injury in septic mice by modulating Treg/Th17 homeostasis and downregulating NF- κ B signaling[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2023, 17: 1139-1151.
- [39] Pei C Z, Zhang Y, Wang P, *et al.* Berberine alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage activation by downregulating galectin-3 via the NF- κ B and AMPK signaling pathways[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(2): 294-308.
- [40] Zhu L P, Han J K, Yuan R R, *et al.* Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Biological Research*, 2018, 51(1): 9.
- [41] Wang Z G, Chen Z, Yang S S, *et al.* Berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats associated with anti-inflammatory and anti-angiogenic effects[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1789-1798.

Effects and mechanisms of berberine on inhibiting nervous necrosis virus proliferation *in vitro*

QIN Xiangmou¹, HUANG Jing¹, YU Jieying¹, YU Qing¹, LIU Mingzhu¹, GAO Yanxia¹, LAI Junxiang¹, CHEN Huapu², HAN Shuyu³, CHANG Yanlei⁴, HUANG Lin^{1*}, LI Pengfei^{1,5*}

(1. Guangxi Academy of Marine Sciences,

Guangxi Key Laboratory of Aquatic Biotechnology and Modern Ecological Aquaculture,

Guangxi Engineering Research Center for Fishery Major Diseases Control and

Efficient Healthy Breeding Industrial Technology (GERCFT), Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Fisheries College,

Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. Guangxi Fisheries Technology Extension Station, Nanning 530199, China;

4. Guangzhou Double Helix Gene Technology Co., Ltd., Guangzhou 510700, China;

5. Aquatic and Livestock Farming Field Scientific Observation and Research Station (Nanning),

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China-ASEAN Modern Fishery Industry Technology Transfer Demonstration Center,

Beibu Gulf Marine Industrial Research Institute, Nanning 530007, China)

Abstract: Nervous necrosis virus (NNV) is a highly pathogenic agent that threatens global aquaculture. Berberine (BBR) is a natural alkaloid with broad-spectrum antiviral activity, yet its effect and mechanism against NNV remain unclear. This study investigated the antiviral effect and mechanism of BBR against NNV *in vitro*. The safe concentration of BBR was determined via CCK-8 assay. Antiviral activity was assessed through cytopathic observation and RT-qPCR detection of NNV capsid protein gene expression. Mechanistic insights were gained through virus pretreatment, time-of-addition assays, RT-qPCR, and flow cytometry, evaluating BBR's direct virucidal effect and its interference with viral adsorption, entry, and intracellular replication. Additionally, RT-qPCR was used to examine BBR's modulation of NNV-induced expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. Results showed that BBR significantly inhibited NNV proliferation at non-cytotoxic concentrations. Mechanistically, BBR directly inactivated viral particles, blocked viral adsorption and cellular entry, and suppressed intracellular replication. It also downregulated NNV-induced overexpression of IL-1 β and IL-8. In conclusion, BBR exerts anti-NNV effects through multi-target actions, including direct antiviral activity, inhibition of key infection steps, and attenuation of host inflammatory response. These findings provide a theoretical foundation for developing BBR as a green antiviral agent against NNV in aquaculture.

Key words: nervous necrosis virus; berberine; antiviral activity; mechanism of action; inflammatory response

Corresponding authors: HUANG Lin. E-mail: hlin556@163.com;

LI Pengfei. E-mail: pfli2014@126.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Guangxi (2023GXNSFAA026325, 2022JJA130074); Guangxi Science and Technology Program (Guikefa[2024]102-2); Laibin Science and Technology Program (Laikechan241519)