

• 治疗制剂 •

黄芪注射液对肠道病毒 71 型感染引起的细胞凋亡及自噬的抑制作用

郝晋芳^{1,2}, 孙晨曦^{1,2}, 杜建平^{1,2}, 韩倩^{1,2}, 张晓延¹

1. 山西医科大学汾阳学院医学检验系,山西 汾阳 032200;

2. 山西医科大学研究生院,山西 太原 030001

摘要: 目的 探讨黄芪注射液(*astragalus membranaceus*, AM)对肠道病毒 71 型(*enterovirus 71*, EV71)感染诱导的人胃上皮细胞(GES-1)凋亡及自噬的影响。方法 体外培养GES-1细胞,将细胞分为感染组(按 MOI = 3 感染EV71)和对照组(未感染病毒),倒置显微镜观察EV71感染后细胞形态变化;Western blot检测EV71感染后GES-1细胞中病毒结构蛋白VP1的水平;CCK-8法检测EV71感染后GES-1细胞活力;用DAPI进行细胞核染色,观察EV71感染的细胞核凋亡形态变化。再将GES-1细胞分为对照组(未感染病毒)、感染组及终浓度分别为1、2.5、5和10 μg / mL的AM干预组,Western blot检测AM干预对EV71感染的GES-1细胞凋亡相关蛋白Caspase-3、PARP及自噬相关蛋白LC3、P62表达的影响;CCK-8法检测AM干预对EV71感染的GES-1细胞活力的影响。结果 EV71感染引起了GES-1细胞变圆、皱缩,细胞核固缩,大小不均,细胞中VP1水平明显增高($t = 41.56, P < 0.01$),细胞活力明显降低($t = 19.07, P < 0.01$),细胞中Caspase-3和PARP蛋白均发生了明显的剪切(t 分别为35.29和3.648, P 分别为<0.01和0.0218),LC3 II / LC3 I比例显著增加($t = 10.16, P = 0.0005$),P62蛋白发生了降解($t = 68.68, P < 0.01$);AM干预后,抑制了EV71引起的Caspase-3、PARP、P62蛋白的降解(t 分别为52.66、59.60和40.22, P 均<0.01)及LC3 II / LC3 I比例增加($t = 5.521, P = 0.0053$),并减轻了EV71对GES-1细胞活力的抑制作用($t = 4.420, P = 0.0115$)。结论 EV71感染诱导了GES-1细胞凋亡,AM干预通过抑制EV71引起的细胞自噬来抑制EV71诱导的细胞凋亡。

关键词: 肠道病毒 71 型;黄芪注射液;GES-1 细胞;细胞凋亡;细胞自噬

中图分类号: R310.17 文献标志码: A 文章编号: 1004-5503(2023)01-0053-07

Inhibitory effect of *astragalus membranaceus* injection on apoptosis and autophagy induced by enterovirus 71

HAO Jin-fang, SUN Chen-xi, DU Jian-ping, HAN Qian, ZHANG Xiao-yan

Department of Medical Laboratory, Fenyang college, Shanxi Medical University,
Fenyang 032200, Shanxi Province, China

Corresponding author: ZHANG Xiao-yan, E-mail: sxfyzxy@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of *astragalus membranaceus* (AM) injection on apoptosis and autophagy of human gastric epithelial cell line (GES-1) induced by enterovirus 71 (EV71). Methods GES-1 cells were cultured in vitro and divided into infected group (EV71 infected at a MOI of 3) and control group (no virus infected). The morpho-logical changes of EV71 infected cells were observed by inverted microscope. The level of VP1 in GES-1 cells infected with EV71 was detected by Western blot; CCK-8 assay was used to detect the viability of GES-1 cells infected with EV71; Nuclear staining with DAPI was used to observe the morphological changes of nuclear apoptosis infected with EV71. GES-1 cells were divided into control group (without virus infection), infection group and AM intervention group with final concentration of 1, 2.5, 5 and 10 μg / mL, respectively. Western blot was used to detect the effect of AM intervention on the expression of apoptosis-related proteins Caspase-3, PARP and autophagy-related proteins LC3 and P62 in GES-1 cells infected with

基金项目: 国家自然科学基金(81301426);山西省自然科学基金(201901D111329);吕梁市重点研发计划(2020SHFZ38);临床分子诊断学重点实验室(2020ZDSYS17)。

通信作者: 张晓延, E-mail:sxfyzxy@163.com

EV71. CCK-8 method was used to detect the effect of AM intervention on the viability of GES-1 cells infected with EV71.

Results GES-1 cells were round, shrunken with nuclear pyknosis and uneven size; VP1 level increased ($t = 41.56, P < 0.01$), cell viability decreased ($t = 19.07, P < 0.01$), Caspase-3 and PARP proteins were cut off ($t = 35.29$ and $3.648, P < 0.01$ and 0.0218 , respectively), LC3 II / LC3 I ratio increased ($t = 10.16, P = 0.0005$) and P62 protein was degraded ($t = 68.68, P < 0.01$); AM inhibited the degradation of Caspase-3, PARP and P62 proteins induced by EV71 ($t = 52.66, 59.60$ and 40.22 , respectively, each $P < 0.01$) and increased the ratio of LC3 II / LC3 I ($t = 5.521, P = 0.0053$), and reduced the inhibitory effect of EV71 on the viability of GES-1 cells ($t = 4.420, P = 0.0115$). **Conclusion** EV71 infection induced apoptosis of GES-1 cells and AM intervention inhibited EV71 induced apoptosis by inhibiting EV71 induced autophagy.

Keywords: Enterovirus 71 (EV71); Astragalus membranaceus injection; GES-1 cells; Apoptosis; Autophagy

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)是引起小儿手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)的主要病原体^[1]。自 2008 年将 HFMD 纳入法定报告的丙类传染病以来,其发病率呈逐年上升趋势。细胞凋亡是由基因调控的细胞程序性死亡方式之一^[2]。病毒感染多引起细胞损伤,而此类病变以细胞程序性死亡方式中的细胞凋亡常见。细胞自噬是机体在应激状态下维持机体稳态的一种方式^[3]。黄芪(as-tragalus membranaceus, AM)注射液作为一种传统中药制剂,具有增强免疫力、抗心肌损伤、抗氧化损伤、抗肿瘤、抗病毒等作用^[4-8]。有研究表明,AM 可抑制红霉素诱导的新生儿心肌细胞凋亡^[9]。本研究旨在探讨 AM 能否抑制 EV71 感染引起的细胞凋亡从而减轻染毒组细胞的病变效应及其机制,进而在病毒感染中发挥保护作用。

1 材料与方法

1.1 病毒及细胞 EV71(Fuyang-0805)由中国医学科学院北京协和医学院赵振东教授惠赠,临床分子诊断学实验室扩增;人胃上皮细胞 GES-1 由山西医科大学汾阳学院张笑添老师惠赠,临床分子诊断学实验室液氮保存,用含 10% 血清的 DMEM 培养基培养。

1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胰蛋白酶和 BCA 蛋白测定试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司;胎牛血清购自以色列 BI 公司;DAPI 细胞核染料和 PARP 兔多抗(AP102)购自碧云天生物技术公司;CCK-8 试剂购自上海翊圣生物科技有限公司;PAGE 凝胶配置试剂购自北京索莱宝科技有限公司;NC 膜购自美国 PALL 公司;VP1 兔多抗(GTX132338)购自美国 GeneTex 公司;Caspase-3 兔多抗(WL02117)购自万类生物科技有限公司;P62 兔多抗(ab91526)和 LC3 兔多抗(ab51520)购自美国 Abcam 公司; β -actin 兔多抗(AP0060)购自美国 Bioworld 公司;HRP

标记的山羊抗兔 IgG(CW0103)购自康为生物技术公司;黄芪注射液购自正大青春宝药业有限公司,浓度以原药材计;荧光倒置显微镜(Nikon Ts2R)购自日本 Nikon 公司;酶标仪 Eon 购自美国 Bio Tek 公司。

1.3 EV71 感染对 GES-1 细胞形态影响的检测 将 GES-1 细胞接种于 24 孔板, 1×10^5 个 / 孔, 37°C 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 按 MOI = 3 感染 EV71, 24 h 后, 用倒置显微镜观察细胞形态, 以未感染病毒的细胞作为对照。

1.4 EV71 感染对 GES-1 细胞中 EV71 结构蛋白 VP1 表达影响的检测 采用 Western blot 法。细胞处理方法同 1.3 项, EV71 感染 GES-1 细胞 24 h 后, 收集感染组和对照组细胞, 加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, $4^\circ\text{C}, 13300 \times g$ 离心 10 min, 收集上清, BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。提取的蛋白经 12% SDS-PAGE 分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 室温封闭 2 h; 加入 VP1 兔多抗(1 : 2 000 稀释), 4°C 摆床过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1 : 5 000 稀释), 室温摇床孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 用 ECL 化学发光液对目的蛋白进行曝光显色。

1.5 EV71 感染对 GES-1 细胞活力影响检测 采用 CCK-8 法。将对数生长期的 GES-1 细胞接种于 96 孔板, 1×10^4 个 / 孔, 培养 12 h 后, 按 MOI = 3 感染 EV71, 培养 24 h, 按下式计算细胞活力。以仅有培养基无细胞组为空白组, 未感染病毒的细胞为对照组。

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_{\text{感染}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.6 EV71 感染对 GES-1 细胞凋亡影响的检测 采用 DAPI 核染色法。细胞处理方法同 1.3 项, EV71 感染 GES-1 细胞 24 h 后, 弃去培养基, PBS 洗涤 3 次, 3 min / 次, DAPI 染色 5 min, PBS 洗涤 3 次, 5 min / 次, 荧光显微镜观察细胞核的形态变化。

1.7 细胞分组给药及凋亡和自噬相关蛋白表达的检测 将 GES-1 细胞接种于 6 孔板, 1×10^6 个 / 孔, 待

细胞贴壁后,用 MOI = 1、3、5 的 EV71 分别感染 24 h 或用终浓度为 1、2.5、5、10 μg / mL 的 AM 分别预处理 2 h 后,用 MOI = 3 的 EV71 干预,共培养 24 h,Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、PARP 和自噬相关蛋白 LC3、P62 的表达,步骤参考 1.4 项,一抗稀释比例分别为 1 : 500、1 : 1 000、1 : 5 000 和 1 : 5 000。以未感染的细胞作为对照。

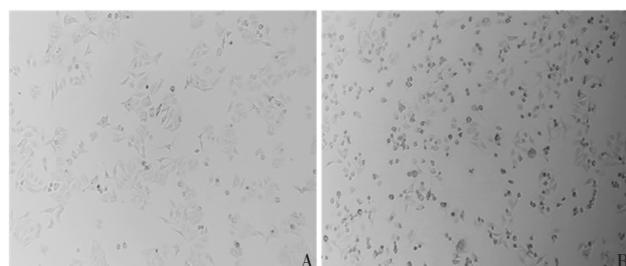
1.8 AM 对 EV71 感染的 GES-1 细胞活力影响的检测 采用 CCK-8 法。将对数生长期的 GES-1 细胞接种于 96 孔板,1 × 10⁴ 个 / 孔,培养 12 h 后,用终浓度为 1、2.5、5、10 μg / mL 的 AM 分别预处理 2 h,再用 MOI = 3 的 EV71 干预,共培养 24 h,以仅有培养基而无细胞组为空白组,有细胞而未干预组为 0 加药组。待细胞培养结束前 1 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,于酶标仪波长 450 nm 处测定吸光度(A)值,并按下式计算各孔细胞活力,以对照组细胞为 100% 作为参照。

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.9 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,组间均数比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EV71 感染对 GES-1 细胞形态的影响 显微镜下观察可见,与未感染病毒的对照组相比,EV71 感染组细胞变圆、皱缩,悬浮细胞明显增多,细胞病变明显,见图 1。

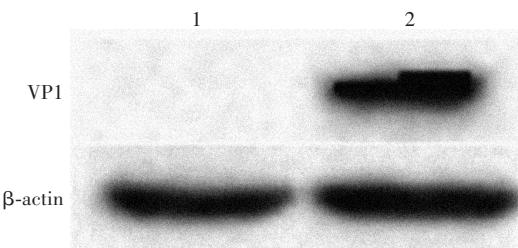


A:对照组;B:EV71感染组。

图 1 EV71 感染 GES-1 细胞的形态学变化(× 100)

Fig. 1 Morphological changes of GES-1 cells infected with EV71 (× 100)

2.2 EV71 感染对 GES-1 细胞中 EV71 结构蛋白 VP1 表达的影响 Western blot 分析显示,EV71 感染后,GES-1 细胞中 VP1 水平(VP1 / β-actin = 1.048)明显增高($t = 41.56, P < 0.01$),见图 2。



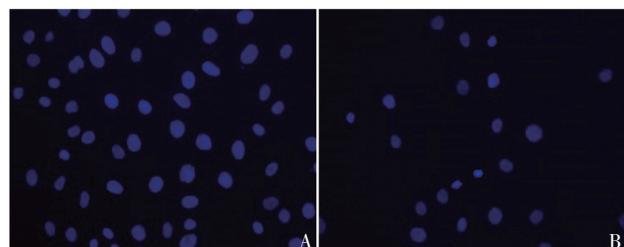
1:对照组;2:EV71感染组。

图 2 Western blot 分析 EV71 感染后 GES-1 细胞中 EV71 结构蛋白 VP1 的表达

Fig. 2 Expression of EV71 structural protein VP1 in GES-1 cells infected with EV71 by Western blot

2.3 EV71 感染对 GES-1 细胞活力的影响 EV71 感染后,GES-1 细胞活力降低为 80.2% ($t = 19.07, P < 0.01$)。

2.4 EV71 感染对 GES-1 细胞凋亡的影响 荧光显微镜下观察可见,EV71 感染后,细胞核固缩,大小不均,见图 3。表明 EV71 感染可诱导 GES-1 细胞凋亡的发生。



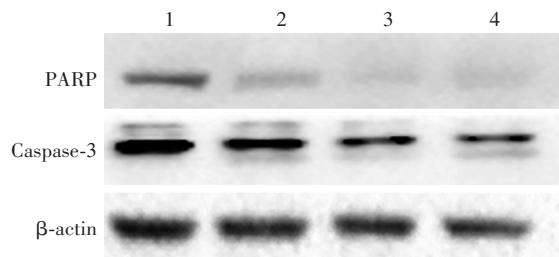
A:对照组;B:EV71感染组。

图 3 EV71 感染后 GES-1 细胞核的形态变化(× 400)

Fig. 3 Morphological changes of nuclei in GES-1 cells infected with EV71 (× 400)

2.5 EV71 感染对 GES-1 细胞凋亡的影响 与对照组相比,分别用 MOI = 5 的 EV71 感染 GES-1 细胞 24 h 后,细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白均发生了明显的剪切(t 分别为 35.29 和 3.648, P 分别 < 0.01 和 = 0.0218),见图 4 和图 5。表明 EV71 感染可诱导 GES-1 细胞发生凋亡。

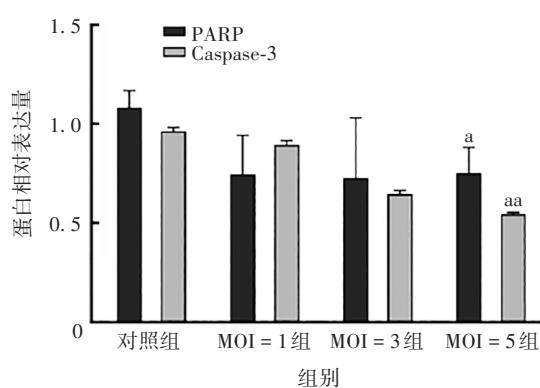
2.6 EV71 感染对 GES-1 细胞自噬的影响 与对照组相比,分别用 MOI = 5 的 EV71 感染 GES-1 细胞 24 h 后,细胞中 LC3 II / LC3 I 比例显著增加($t = 10.16, P = 0.0005$),P62 蛋白发生了降解($t = 68.68, P < 0.01$),见图 6 和图 7。表明 EV71 感染可诱导 GES-1 细胞自噬。



1:对照组;2~4:MOI分别为1、3、5的EV71感染的细胞。

图4 Western blot分析不同MOI EV71感染的GES-1细胞凋亡相关蛋白的表达

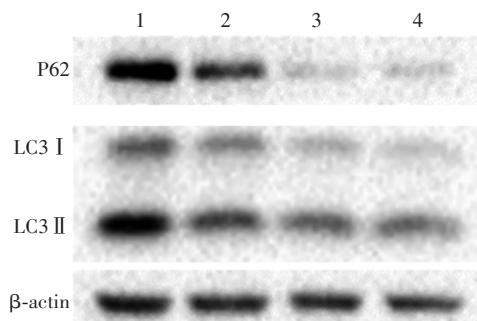
Fig. 4 Expression of apoptosis - related proteins in GES - 1 cells infected with different MOI EV71 by Western blot



注:与对照组比较,a表示 $P < 0.05$,aa表示 $P < 0.01$ 。

图5 不同MOI EV71感染的GES-1细胞凋亡相关蛋白的表达量

Fig. 5 Expression of apoptosis - related proteins in GES - 1 cells infected with different MOI EV71



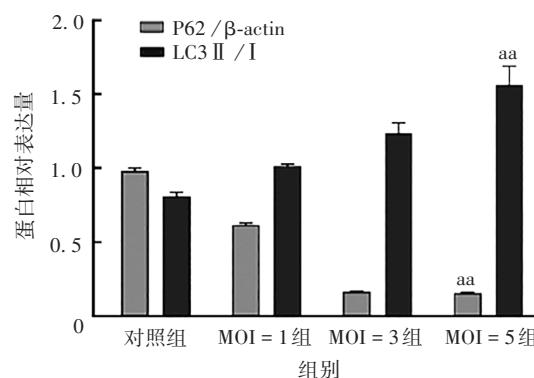
1:对照组;2~4:MOI分别为1、3、5的EV71感染的细胞。

图6 Western blot分析不同MOI EV71感染的GES-1细胞自噬相关蛋白的表达

Fig. 6 Expression of autophagy-associated proteins in GES - 1 cells infected with different MOI EV71 by Western blot

2.7 AM对EV71感染的GES-1细胞凋亡的影响

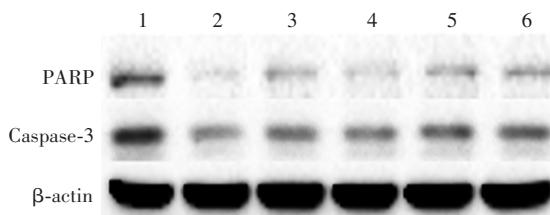
与对照组相比,经10 μg / mL AM干预后,细胞中Caspase-3和PARP蛋白的降解均明显减少(t 分别为52.66和59.60, P 均 < 0.01),见图8和图9。表明AM可抑制EV71感染诱导的GES-1细胞凋亡。



注:aa表示与对照组比较, $P < 0.01$ 。

图7 不同MOI EV71感染的GES-1细胞自噬相关蛋白的表达量

Fig. 7 Expression of autophagy-associated proteins in GES - 1 cells infected with different MOI EV71



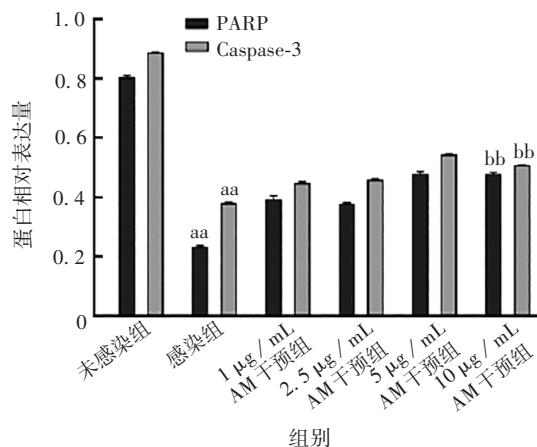
1:未感染组;2:感染组;3~6:AM终浓度分别为1、2.5、5、10 μg / mL组。

图8 Western blot分析不同浓度AM对EV71感染的GES-1细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of different concentrations of AM on the expression of apoptosis-related proteins in GES - 1 cells infected with EV71 by Western blot

2.8 AM对EV71感染的GES-1细胞自噬的影响 与感染组相比,10 μg / mL AM干预抑制了EV71引起的LC3 II / LC3 I比例增加($t = 5.521$, $P = 0.0053$)和P62的降解($t = 40.22$, $P < 0.01$),见图10和图11。表明AM可抑制EV71感染引起的GES-1细胞自噬。

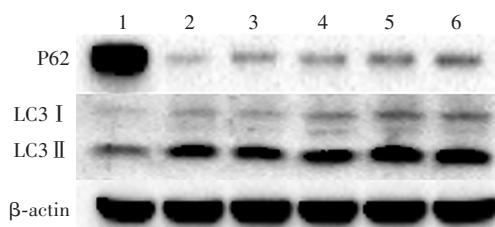
2.9 AM对EV71感染的GES-1细胞活力的影响 AM干预可减轻EV71对GES-1细胞活力的抑制作用($t = 4.420$, $P = 0.0115$),见图12。



注: aa 表示与未感染组比较, $P < 0.01$; bb 表示与感染组比较, $P < 0.01$ 。

图 9 不同浓度 AM 对 EV71 感染的 GES-1 细胞中凋亡相关蛋白表达量的影响

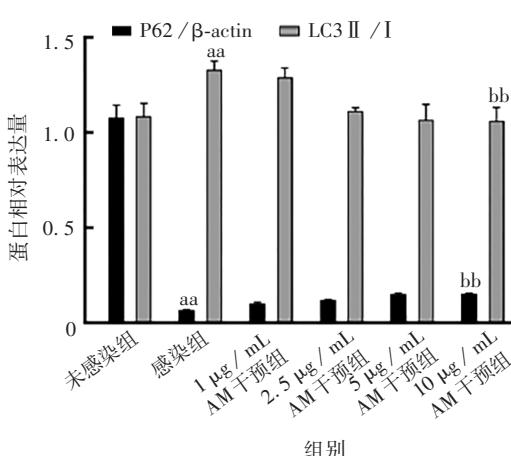
Fig. 9 Effect of different concentrations of AM on the expression of apoptosis-related proteins in GES-1 cells infected with EV71



1:未感染组;2:感染组;3 ~ 6:AM终浓度分别为1、2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 10 Western blot 分析不同浓度 AM 对 EV71 感染的 GES-1 细胞中自噬相关蛋白表达的影响

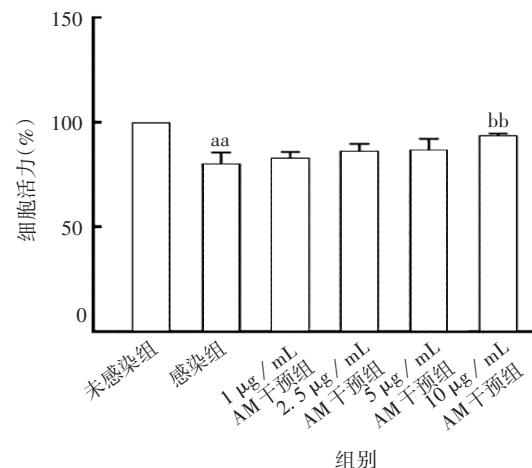
Fig. 10 Effect of different concentrations of AM on the expression of autophagy - related proteins in GES - 1 cells infected with EV71 by Western blot



注: aa 表示与未感染组比较, $P < 0.01$; bb 表示与感染组比较, $P < 0.01$ 。

图 11 不同浓度 AM 对 EV71 感染的 GES-1 细胞中凋亡相关蛋白表达量的影响

Fig. 11 Effect of different concentrations of AM on the expressions of P62, LC3 proteins in EV71 infected GES-1 cells



注: aa 表示与未感染组比较, $P < 0.01$; bb 表示与感染组比较, $P < 0.01$ 。

图 12 不同浓度 AM 对 EV71 感染的 GES-1 细胞活力的影响

Fig. 12 Effect of different concentrations of AM on proliferation of GES-1 cells infected with EV71

3 讨论

HFMD 在亚太地区广泛流行,其发病率居于我国丙类传染病之首,对公共卫生造成重大威胁。HFMD 主要是由 EV71 和柯萨奇病毒 A16 型(Coxsackievirus A16, CoxA16)感染引起的一种儿童常见传染病^[10]。EV71 感染患者病情进展迅速,常引起神经系统严重并发症,甚至导致死亡^[11],但其发病机制尚未明确,且针对此类疾病仍无特异性的药物。

细胞凋亡作为细胞程序性死亡的一种方式,是机体对入侵病原体的一种免疫反应。Caspase-3、PARP 蛋白均为凋亡相关蛋白,细胞发生凋亡时,凋亡效应酶 Caspase-3 在多种蛋白水解酶的作用下,发生裂解而活化,PARP 是凋亡的底物,可被活化的凋亡效应酶剪切。病毒感染诱导细胞凋亡的发生,一方面造成机体损伤,另外也可能是病毒为了逃逸机体免疫反应,更利于其自身复制。研究表明,EV71、HCV、HIV 感染均会诱导细胞凋亡的发生^[12-14]。继往也有研究表明,HCV 通过诱导 T 淋巴细胞凋亡,促进自身的复制^[15]。EV71 诱导的细胞凋亡会促使 EV71 的释放,使其继续在机体扩散感染,而凋亡抑制剂 N-苄氧羰基-缬氨酰-丙氨酰-门冬酰氟甲基酮(Z-VAD-FMK)通过抑制 EV71 感染引起的细胞凋亡,可控制病毒的扩散感染^[16]。 β -硫磺菌素修饰的纳米砷粒子(Se@TP)可抑制甲型流感病毒(H1N1)诱导的细胞凋亡从而抑制 H1N1 的复制^[17]。

研究发现,中药及其成分具有抗细胞凋亡的作

用,如环黄芪醇通过抑制脑缺血引起的细胞凋亡对神经细胞起到保护作用^[18]。鞣花酸可抑制糖尿病引起的细胞凋亡^[19]。黄芪对流感病毒感染的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞具有保护作用(Raw264.7)^[20]。黄芪可抑制小鼠病毒性心肌炎导致的心肌细胞凋亡^[21]。黄芪提取物具有抗H9禽流感病毒的作用^[8]。本研究发现,AM可抑制EV71诱导的细胞凋亡。

细胞自噬是维持细胞稳态高度保守的细胞过程,LC3 II /LC3 I 比例增加,标志着自噬的起始,P62作为自噬的底物,其降解标志着自噬进入效应阶段。机体在病原体感染的异常情况下会诱导细胞自噬的发生,如甲型流感病毒(influenza A virus,IAV)、HCV、H1N1感染均可诱导细胞自噬的发生^[22-24]。EV71感染诱导的细胞自噬,可促进EV71的复制^[25-26]。猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)感染诱导的细胞自噬也可促进PEDV的复制^[27]。我们前期研究表明,抑制EV71诱导的细胞自噬可抑制EV71诱导的细胞凋亡^[28]。研究中发现,EV71感染引起人胃上皮细胞GES-1损伤,引起细胞凋亡,而AM可减轻EV71引起的GES-1细胞损伤,且AM可抑制EV71诱导的细胞自噬和凋亡,这可能是AM通过抑制EV71诱导的自噬进而抑制EV71诱导的细胞凋亡并发挥保护作用,其保护作用的具体机制需继续研究。

综上所述,AM可抑制EV71诱导的细胞凋亡和自噬,对EV71感染引起的细胞损伤起到保护作用。本研究为临床EV71感染的治疗提供了参考。

参考文献

- [1] WANG Y, ZHANG S, SONG W, et al. Exosomes from EV71-infected oral epithelial cells can transfer miR - 30a to promote EV71 infection [J]. Oral Diseases, 2020, 26 (4): 778-788.
- [2] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407 (6805): 770-776.
- [3] MEIJER A J, CODOGNO P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2004, 36 (12): 2445-2462.
- [4] LI S, SUN Y, HUANG J, et al. Anti-tumor effects and mechanisms of Astragalus membranaceus (AM) and its specific immunopotentiation: Status and prospect [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 258: 112797.
- [5] LI S, NONG Y, GAO Q, et al. Astragalus Granule Prevents Ca(2+) Current Remodeling in Heart Failure by the Downregulation of CaMKII [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017: 7517358. DOI:10.1155 / 2017 / 7517358.
- [6] JIANG M, NI J, CAO Y, et al. Astragaloside IV Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury from Oxidative Stress by Regulating Succinate, Lysophospholipid Metabolism, and ROS Scavenging System [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 9137654.
- [7] CHANG HL, KUO YH, WU LH, et al. The extracts of Astragalus membranaceus overcome tumor immune tolerance by inhibition of tumor programmed cell death protein ligand-1 expression [J]. International Journal of Medical Sciences, 2020, 17 (7): 939-945.
- [8] KHAN H M, RAZA S M, ANJUM A A, et al. Antiviral, embryo toxic and cytotoxic activities of Astragalus membranaceus root extracts [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 32 (1): 137-142.
- [9] LUO Z G, ZHONG L, HAN X F, et al. Astragalus membranaceus prevents daunorubicin - induced apoptosis of cultured neonatal cardiomyocytes: role of free radical effect of Astragalus membranaceus on daunorubicin cardiotoxicity [J]. Phytotherapy Research, 2010, 23 (6): 761-767.
- [10] LI H, BAI Z, LI C, et al. EV71 infection induces cell apoptosis through ROS generation and SIRT1 activation [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121 (10): 4321-4331.
- [11] HU Y, XU Y, HUANG Z, et al. Transcriptome sequencing analysis of SH-SY5Y cells infected with EV71 reveals the potential neuropathic mechanisms [J]. Virus Research, 2020, 282: 197945.
- [12] BAI Z, ZHAO X, LI C, et al. EV71 virus reduces Nrf2 activation to promote production of reactive oxygen species in infected cells [J]. Gut Pathogens, 2020, 12: 22.
- [13] PATRA T, MEYER K, RAY RB, et al. Hepatitis C Virus Mediated Inhibition of miR-181c Activates ATM Signaling and Promotes Hepatocyte Growth [J]. Hepatology, 2020, 71 (3): 780-793.
- [14] LI M, LIU W, BAUCH T, et al. Clearance of HIV infection by selective elimination of host cells capable of producing HIV [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 4051.
- [15] TOSON EA, SHIHA GE, EL-SHARKAWY AM, et al. Diagnostic performance of extrinsic apoptosis pathway in hepatitis C virus patients: apoptosis fibrosis crosstalk [J]. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2020, 32 (8): 990-997.
- [16] ZHANG X Y. The research of EV71 induced autophagy, apoptosis and the regulation between them [D]. Beijing: Peking Union Medical College (Chinese Academy of Medical Sciences), 2011. (in Chinese)
- 张晓延. 肠道病毒71型诱导细胞自噬,凋亡及相互调控关系的研究 [D]. 北京:北京协和医学院(中国医学科学院), 2011.
- [17] WANG C, CHEN H, CHEN D, et al. The Inhibition of H1N1 Influenza Virus-Induced Apoptosis by Surface Decoration of Selenium Nanoparticles with β-Thujaplicin through Reactive Oxygen Species - Mediated AKT and p53 Signaling Pathways [J]. ACS Omega, 2020, 5 (47): 30633-30642.

(下转第69页)

- 备与鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50 (17): 192-197.
- [4] XIAO G Y, GUO H X, LOU X S, et al. Simultaneous determination of four nitrofuran medicines in feedstuff and veterinary drugs by high performance liquid chromatography [J]. Analytical Instrumentation, 2010, (3): 30-33. (in Chinese)
- 肖桂英, 郭海霞, 娄喜山, 等. 高效液相色谱法同时测定饲料及兽药中四种硝基呋喃类药物 [J]. 分析仪器, 2010, (3): 30-33.
- [5] ZHOU K N, TANG Y, LAN C F, et al. Preparation of monoclonal antibody against furazolidone metabolite and novel immunochromatographic strips [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27 (7): 927-931. (in Chinese)
- 周克楠, 唐勇, 蓝彩凤, 等. 呋喃唑酮代谢物单克隆抗体及其新型免疫层析检测试纸条的制备 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (7): 927-931.
- [6] ZHAO X L, CHEN W Q, LI J M, et al. Preparation of human antibodies to TNF- α using ribosome display technology [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2009, 25 (2): 145-149. (in Chinese)
- 赵小玲, 陈伟强, 李静梅, 等. 应用核糖体展示技术筛选制备抗TNF- α 人源抗体的研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25 (2): 145-149.
- [7] ZHANG Y X, WANG B C, YU X, et al. Ribosome display screening of a novel human anti-IgE scFv fragment [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2012, 47 (10): 1329-1335. (in Chinese)
- 张勇侠, 王保成, 余馨, 等. 应用核糖体展示技术高效筛选人源抗IgE单链抗体 [J]. 药学学报, 2012, 47 (10): 1329-1335.
- [8] WANG X H, ZHOU S F. Advances in Research on Genetically Engineered Antibody [J]. Letters in Biotechnology, 2007, 18 (2): 304-306. (in Chinese)
- 王秀红, 周素芳. 基因工程抗体研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18 (2): 304-306.
- [9] WANG X Y, YU P. Construction of single-chain Fv antibody and its application in the medicine [J]. Journal of Pathogen Biology, 2009, 4 (10): 790-792. (in Chinese)
- 汪希雅, 余平. 单链抗体的构建及其在医学上的应用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4 (10): 790-792.
- [10] CHEN Y N, CHEN H, SHI X A, et al. Preparation and Application of Monoclonal Antibody against Furazolidone [J]. Food Science, 2016, 37 (3): 157-163. (in Chinese)
- 陈荫楠, 陈华, 石贤爱, 等. 抗呋喃唑酮单克隆抗体的制备及其应用 [J]. 食品科学, 2016, 37 (3): 157-163.
- [11] WANG SH, ZHANG JB, ZHANG ZP, et al. Construction of single chain variable fragment (ScFv) and BiscFv-alkaline phosphatase fusion protein for detection of *Bacillus anthracis* [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78 (4): 997-1004.
- [12] SHIMA S B, FOROUZANDEH M M, MOUSAVI G S L, et al. Isolation and characterization of a novel GRP78-specific single-chain variable fragment (scFv) using ribosome display method [J]. Medical Oncology, 2021, 38 (9): 115.
- [13] YUAN Q, XIA Y, NIAN S, et al. Selection of single chain fragments against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by ribosome display [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41 (3): 383-389.
- [14] YAN H, WANG F, MAO W P, et al. Construction of Anti-ICOSL Ribosome Display Library [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41 (33): 12819-12822. (in Chinese)
- 严浩, 王芳, 毛伟平, 等. 抗 ICOSL 核糖体展示单链抗体库的构建 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (33): 12819-12822.
- [15] HOERNES T, CLEMENTI N, JUEN M, et al. Atomic mutagenesis of stop codon nucleotides reveals the chemical prerequisites for release factor-mediated peptide release [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115 (3): E382-E9.
- [16] XU M, ZHANG B, ZHANG M, et al. Clinical relevance of expression of B7-H1 and B7-H4 in ovarian cancer [J]. Oncol Lett, 2016, 11 (4): 2815-2819.
- [17] MAHMUDA A, BANDE F, KADHIM A Z, et al. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2017, 16 (3): 713.
- [18] SHI X A, PEI S F, LI X N, et al. Establishment and Comparison of Immunoassays for Detecting Furazolidone Metabolite Based on Different Haptens [J]. Food Science, 2014, 35 (8): 174-180. (in Chinese)
- 石贤爱, 裴世锋, 李向楠, 等. 基于不同半抗原的呋喃唑酮代谢物免疫检测方法的建立与比较 [J]. 食品科学, 2014, 35 (8): 174-180.
- [19] REN H T, SHEN Y D, XU Z L, et al. Production and Identification of Monoclonal Antibody Against Furazolidone Metabolites and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40 (5): 745-751. (in Chinese)
- 任海涛, 沈玉栋, 徐振林, 等. 呋喃唑酮代谢物单克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法 [J]. 分析化学研究报告, 2015, 40 (5): 745-751.
- [20] LI Z Y, ZHENG T, YUAN Z G, et al. Preparation and application of monoclonal antibody against furazolidone metabolite residues AOZ [J]. Food Science and Technology, 2013, 38 (4): 309-313. (in Chinese)
- 李子颖, 郑婷, 袁志刚, 等. 呋喃唑酮代谢物AOZ的抗体制备及初步应用 [J]. 食品科技, 2013, 38 (4): 309-313.
- [21] CHEN Q, CHEN Y N, CHEN D H, et al. Establishment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Detecting Furazolidone Based on Single Chain Fragment Antibody [J]. Food Science, 2017, 38 (20): 242-247. (in Chinese)
- 陈倩, 陈荫楠, 陈东海, 等. 基于单链抗体的呋喃唑酮酶联免疫检测方法的建立 [J]. 食品科学, 2017, 38 (20): 242-247.
- [22] CHEN X Z, WANG Y B, WANG D, et al. Gene Construction, Protein Structure Analysis and Activity Evaluation of Single-Chain Variable Fragment against 3-Amino-2-oxazolidinone Derivatives [J]. Food Science, 2021, 42 (24): 67-73. (in Chinese)
- 陈薪竹, 王玉波, 王丹, 等. 抗呋喃唑酮代谢物单链抗体基因构建及蛋白结构分析和活性鉴定 [J]. 食品科学, 2021, 42 (24): 67-73.