

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物科技研究所

碩士論文

Institute of Biotechnology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

以體外試驗評估具益生菌特性之芽孢桿菌

萃取物抗貓傳染性腹膜炎病毒活性

Evaluation of antiviral activity of probiotic *Bacillus*  
extracts against feline infectious peritonitis virus *in vitro*

梁孟群

Meng-Chun Liang

指導教授：劉嘉睿 博士

Advisor: Je-Ruei Liu, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July, 2023



## 致謝

首先，非常感謝劉囉睿老師在學生碩班兩年的悉心指教，在學業生涯給予學生知識與支持。同時也萬分感謝張惠雯老師與張晏禎老師在學生的碩班初期，不論在材料或實驗技術上給予最佳的幫助。另外也十分感謝擔任口委的劉啟德老師，即使觀賞線上畢業典禮也不忘截圖祝賀學生畢業快樂。感謝陳勁初總經理、謝建元老師在擔任學生的口試委員時提供了許多寶貴的建議，不論現今或未來都十分受用。

再者也十分感謝佳芳、淑婕、杰紜、乃瑄在我剛進碩班的時候帶我熟悉環境，也從不擺出學長姐的架子，讓我很快地融入實驗室生活，甚至愉快地一起唱歌吃飯，而淑婕卻是只能我們飛過去見了。畢業後佳芳免不了時常被我訊息打擾以探討學術問題；杰紜的名字則是路上遇到公司 HR 都說讚，至於乃瑄我只記得喝酒要找妳。接下來要感謝兩位陪伴我兩年最重要的學長姐又嘉和彥丞，就如同平常所說，我會把你們寫在致謝裡的，但要感謝的事太多了，篇幅不夠就謝天吧？祝福兩位今年都抽到 Air Pods，沒想到是我先離校吧！特別感謝斜對角的立廣、彭敏時常盛情地邀約學弟我一同增添碩班彩色記憶，這樣我就不怕催狂魔攻擊，還有在我需要染 IFA 的時候給予最大協助，讓病毒蛋白成功被路摸思。

接著感謝同窗晉哲、佳霖豐富了我的碩班生活，祝福闔家平安、健康，這是最平凡卻也是最重要的祝福，我會持續提供些許養孩子的費用的。感謝蘊德、庭屏、俊廷雖然三位個性截然不同，卻為實驗室帶來無邊無界的話題和想法。

最後感謝爸媽讓我暫時不用煩惱學費，讓我能專心念完碩班。回想起短短兩年，每個階段體驗都因人的來來去去都有所不同，而實驗雖然時常失敗，一路上跌跌撞撞卻也來到畢業這日，路上的貴人總是在我跌倒的時候攏扶一把，然後各自前往自己的道路，因此祝福這樣的善會循環，貴人也會遇到貴人。

## 中文摘要



貓傳染性腹膜炎是一種由 feline infectious peritonitis virus (FIPV) 的冠狀病毒所引起之高致死率疾病，目前僅有極少能夠治療的藥物。本研究藉由 MTT 試驗從 *Bacillus amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1(CK1) 芽孢桿菌萃取物挑選對 fcwf-4 細胞模型較不具細胞毒性之 AC、CK1 萃取物進行三種抗 FIPV 病毒策略效用評估，包含預防、治療及聯合處理。其中 AC 與 CK1 萃取物以預防模式處理下具有提升細胞存活率的效果；而治療模式下則是 CK1 萃取物處理組有較好的效果。利用即時螢光定量技術與免疫螢光染色法觀察在上述兩種模式中的 FIPV 表現量及分布，發現經芽孢桿菌萃取物處理之細胞與未處理組相比並無降低 FIPV-N 表現及陽性率。而結合預防及治療的聯合處理中，以 AC/CK1 進行的聯合處理不如 CK1/CK1 具有顯著提升存活率之效果。最後以即時螢光定量技術分析以芽孢桿菌萃取物進行預防與治療策略中以 FIPV 感染與未感染細胞之基因表現，證實具有預防效果的芽孢桿菌萃取物皆能提升 TNF- $\alpha$  的表現量；而 CK1 胞內液與細胞壁在治療模式且受感染的情況下，降低了受體 fAPN 並提升了抗病毒蛋白 Mx1 的表現。綜合上述，AC 與 CK1 萃取物未能降低 FIPV 複製能力，但能夠對 fcwf-4 細胞之免疫與抗病毒相關基因產生影響。

關鍵字：芽孢桿菌、抗病毒、貓傳染性腹膜炎病毒、胞外聚合物



## Abstract

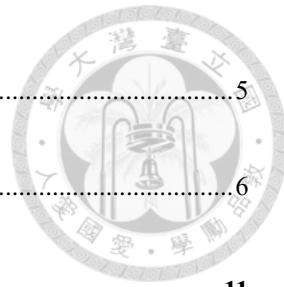
Feline infectious peritonitis (FIP) is a viral disease of cats caused by certain strains of a virus called the feline coronavirus (FCoV). This study aimed to evaluate the antiviral efficacy of extracts from probiotic strains, including *Bacillus amyloliquefaciens* LN (LN), *B. velezensis* AC (AC), and *B. licheniformis* CK1 (CK1) on the fcwf-4 cell model using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Three strategies, including pre-treatment, post-treatment, and combination treatment, were assessed for their effectiveness against FIPV, focusing on the extracts from AC, CK1 intracellular fluid (INT), cell wall (CW), and exopoly-substances (EPS), which showed lower cytotoxicity to the fcwf-4 cell model. AC and CK1 extracts demonstrated improvement of cell viability in the strategy of pre-treatment, while CK1 extract performed better in the post-treatment. However, analysis of FIPV-N expression showed both strategies had no reduction in FIPV-N expression and in cells treated with *Bacillus* extracts compared to the untreated group. In the combination therapy, the AC/CK1 combination did not present a significant increase in survival rate compared to the CK1/CK1 combination. Analysis of gene expression in FIPV-infected and uninfected cells treated with *Bacillus* extracts confirmed that the preventive *Bacillus* extracts increased TNF- $\alpha$  expression. In the post-treatment with infected cells, CK1\_INT and CK1\_CW reduced the receptor fAPN and increased the antiviral protein Mx1 expression. In conclusion, this study demonstrated that AC and CK1 extracts did not reduce FIPV replication but had regulations to antiviral and proinflammatory genes in fcwf-4 cells.

**Keywords:** Probiotic, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus licheniformis*, Feline infectious peritonitis virus, Antiviral

# 目錄



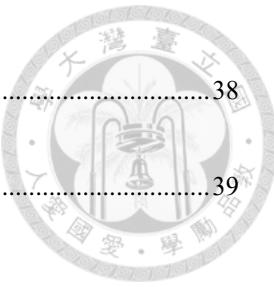
致謝.....	I
中文摘要.....	II
ABSTRACT .....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章、文獻探討 .....	1
第一節、益生菌 .....	1
一、益生菌之定義 .....	1
二、益生菌之特性 .....	1
三、益生菌之功能 .....	2
(一) 改善腸道健康與功能 .....	2
(二) 調節免疫系統 .....	2
(三) 抗氧化功能 .....	3
(四) 具抗病毒活性 .....	3
四、芽孢桿菌 .....	4
(一) 液化澱粉芽孢桿菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	4



(二) 貝萊斯芽孢桿菌 <i>Bacillus velezensis</i> .....	5
(三) 地衣芽孢桿菌 <i>Bacillus licheniformis</i> .....	6
<b>第二節、病毒.....</b>	<b>11</b>
一、病毒簡介 .....	11
二、貓冠狀病毒 .....	11
(一) 貓冠狀病毒簡介 .....	11
(二) 貓冠狀病毒之基因體特性 .....	12
(三) 貓傳染性腹膜炎 .....	13
(四) 貓冠狀病毒感染與複製 .....	13
(五) 抗貓冠狀病毒之藥物 .....	14
(六) 貓傳染性腹膜炎病毒引起之宿主免疫反應.....	15
<b>第三節、研究動機與目的 .....</b>	<b>20</b>
<b>第二章、材料與方法.....</b>	<b>21</b>
<b>第一節、實驗架構.....</b>	<b>21</b>
<b>第二節、芽孢桿菌萃取物之抗貓傳染性腹膜炎病毒能力評估 .....</b>	<b>22</b>
一、芽孢桿菌之培養與保存 .....	22
二、芽孢桿菌萃取物製備 .....	22
三、細胞與病毒培養 .....	24
四、病毒效價測定 .....	26



五、病毒感染之細胞存活率測定 .....	26
六、菌株萃取物之細胞毒性測試 .....	27
七、菌株萃取物於病毒感染之預防模式.....	27
八、菌株萃取物於病毒感染之治療模式.....	28
九、菌株萃取物於病毒感染之聯合模式.....	28
十、免疫螢光染色 .....	29
十一、病毒基因與促發炎基因分析 .....	29
十二、統計分析 .....	31
<b>第三章、實驗結果 .....</b>	<b>34</b>
<b>第一節、芽孢桿菌萃取物抗貓型腹膜炎病毒（FIPV）能力評估 .....</b>	<b>34</b>
一、芽孢桿菌萃取物毒性測試 .....	34
二、芽孢桿菌胞外聚合物醣類與蛋白含量分析 .....	34
三、FIPV NTU156 效價與存活率測定 .....	35
四、以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之預防模式 .....	35
五、以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之治療模式 .....	36
六、測定聯合處理之細胞存活率 .....	37
<b>第二節、芽孢桿菌萃取物與貓型腹膜炎病毒（FIPV）於宿主細胞抗病毒與促發炎基因相關 mRNA 表現量之影響 .....</b>	<b>38</b>
一、 病毒作用 .....	38

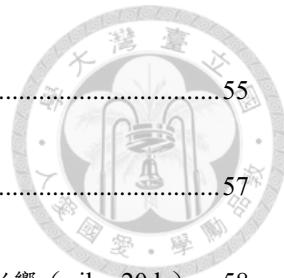


二、 預防模式 .....	38
三、 治療模式 .....	39
<b>第四章、討論 .....</b>	<b>60</b>
一、芽孢桿菌萃取物之抗病毒活性評估 .....	60
二、基因表現量分析 .....	62
<b>第五章、結論 .....</b>	<b>67</b>
<b>第六章、參考文獻 .....</b>	<b>68</b>



## 圖 目 錄

圖 1-1、益生菌有益於宿主之代謝機制。( Sanders et al., 2019 ) .....	10
圖 1-2、貓冠狀病毒複製與成熟機制之抑制標的。( Delaplace et al., 2021 ) .....	17
圖 1-3、Toll-like receptors ( TLRs ) 訊息傳遞與功能示意圖。( Capozza et al., 2021 ) .....	18
圖 2-1、實驗架構圖 .....	21
圖 2-2、預防、治療及聯合模式之細胞存活率測定與核酸抽樣時間點。 .....	32
圖 3-1、以芽孢桿菌萃取物處理 fcwf-4 細胞株 24 小時之細胞毒性測定。 .....	41
圖 3-2、Feline infectious peritonitis virus ( FIPV ) 病毒效價定量圖。 .....	43
圖 3-3、Fcwf-4 細胞於 FIPV 感染 24 小時之細胞存活率。 .....	44
圖 3-4、以芽孢桿菌萃取物預處理受 FIPV 感染之 fcwf-4 細胞 24 小時之細胞存活率。 .....	45
圖 3-5、以芽孢桿菌萃取物預處理受 FIPV 感染之 fcwf-4 細胞 20 小時之細胞病變效應。 .....	46
圖 3-6、預防模式下以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之免疫螢光染色圖。 .....	47
圖 3-7、芽孢桿菌萃取物於預防模式下對 FIPV-N 基因表現量之影響。 .....	49
圖 3-8、Fcwf-4 細胞於感染 FIPV 後以芽孢桿菌萃取物處理 24 小時之細胞存活率。 .....	50
圖 3-9、Fcwf-4 細胞受 FIPV 感染後以芽孢桿菌萃取物處理 20 小時之細胞病變效應。 .....	51
圖 3-10、治療模式下以 CK1 萃取物處理 FIPV 感染細胞之免疫螢光染色圖。 .....	52
圖 3-11、CK1 萃取物治療模式下對 FIPV-N 基因表現量之影響。 .....	54
圖 3-12、以芽孢桿菌萃取物聯合處理 FIPV 感染 ( MOI = 0.02 ) 24 小時後之 fcwf-4 細胞存活	



率。 ..... 55

圖 3-13、芽孢桿菌萃取物預處理對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響。 ..... 57

圖 3-14、芽孢桿菌萃取物於預防模式下對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響 (pih=20 h)。 .58

圖 3-15、CK1 萃取物於治療模式下對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響 (pih = 20 h)。 ....59



## 表目錄

表 1-1、常用益生菌種類列表。(Markowiak et al, 2018) .....	8
表 1-2、多種益生菌的抗病毒作用與潛在機制。(Wang et al., 2022) .....	9
表 1-3、FCoV NTU156 open reading frame 編碼與胺基酸數。(Lin et al., 2013) .....	19
表 2-1、即時定量聚合酶連鎖反應使用引子	33
表 3-1、芽孢桿菌胞外聚合物之醣類與蛋白含量 .....	42
表 3-2、Fcwf-4 細胞於 FIPV 感染後不同時間點之病毒受體、抗病毒基因及促發炎基因 mRNA 相對表現量 .....	56



# 第一章、文獻探討

## 第一節、益生菌

### 一、益生菌之定義

益生菌（probiotics）一詞源自於希臘語「for life」，意為對生命有益。根據 FAO/WHO 於 2002 年公布之定義，益生菌為「具有生命現象且施予適當的量能夠對宿主健康有益之微生物」。在 2013 年國際益生菌與益菌質科學協會（International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP）進而將其定義修訂，除了符合先前定義以外，還必須經由科學試驗確認菌株之功能性與安全性方可稱為益生菌（Hill et al., 2014）。自 2002 年以後，益生菌之應用、研究乃至臨床報告便迅速發展，目前益生菌的種類最主要為乳酸桿菌（*Lactobacillus*）及雙歧桿菌（*Bifidobacterium*），其餘如鏈球菌（*Streptococcus*）、糞腸球菌（*Enterococcus*）、大腸桿菌屬（*Escherichia*）及芽孢桿菌（*Bacillus*）中亦有些種類被列為益生菌（表 1-1）。

### 二、益生菌之特性

近年來科學上對於益生菌的研究日漸累積，人類也更加對其特性有所了解。益生菌能夠存活於宿主體內，根據世界衛生組織在 2002 年發表「Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food」用以評估益生菌特性之試驗，內容包含體外測試中益生菌應具備耐胃酸、耐膽鹽及具有膽鹽水解酶之活性，以證明菌株能夠通過腸胃環境而持續存活；益生菌還須對黏膜及人類上皮細胞具吸附性，能夠定殖於腸道而不易排出；另外對於潛在病原菌應具備抗菌活性，且減少病原菌對腸道表面之吸



附。除此之外，所有測試都經過體內試驗加以驗證，以證明其安全性和益生菌特性，方能篩選出較為適當的益生菌（FAO/WHO, 2002）。益生菌能夠利用碳水化合物與纖維素等作為碳源，產生一級與次級代謝物，例如乳酸與短鏈脂肪酸，而這些代謝物對宿主具有改變腸道菌相、促進腸黏膜屏障、調節免疫系統及抗氧化等功能。

### 三、益生菌之功能

#### （一）改善腸道健康與功能

部分乳酸菌 (*Lactobacillus spp.*) 具有生產細菌素與乳酸的能力，能夠抑制病原菌生長進而改變腸道中菌相的組成(Kim et al., 2019)。另外，短鏈脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA) 是經由益生菌代謝而產生，在腸道中不同菌種會以營養互補(cross-feeding)的生活模式進行共生，能夠塑造整個腸道中的環境，例如：乙酸是維繫肌肉的重要物質以及抑制腸病原體(Fukuda et al., 2011)；丙酸參與生化反應中的醣代謝並且能夠協助組織對胰島素做出反應；丁酸則為能提供腸道細胞吸收產生能量的重要物質，能夠透過降低腸黏膜通透性而改善黏膜屏障，幫助腸道維持健康(Stoeva et al., 2021)。根據研究指出，腸道中的益生菌能夠提高 ZO-1 蛋白表現以增加腸道上皮細胞間緊密程度，或是改變小腸細胞中粘蛋白的基因表達，因此影響黏液層的特性(La Fata et al., 2018)。

#### （二）調節免疫系統

腸道是微生物與體內循環的交界，也是動物體內重要的免疫器官。而在腸絨毛間存在之的微生物菌叢數量約  $10^{13}$  至  $10^{14}$ ，因此腸道中微生物的組成與免疫系統的表現密切相關，益生菌則能夠透過刺激腸道細胞進而降低病原體的生長，以平衡體內益菌與病原體的比例，避免病原菌產生過多脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)接觸 toll-like receptors (TLR 2 或 4) 進而誘導發炎反應(Cristofori et al., 2021)。



除此之外，益生菌能夠促進免疫 T 細胞對 Th2 的分化和細胞激素 interleukin( IL ) -4 和 IL-10 的表現，或通過控制 Treg 成熟及對應之細胞激素產生來刺激適應性免疫系統，已有研究已經證明利用 46 種 *Clostridia* clusters IV 和 XIVa 的混和菌株定殖於小鼠可以誘導局部和全身 Treg 細胞反應 (Atarashi et al., 2011)。另外已有研究證實益生菌 *Bifidobacterium* spp. 能夠改善 inflammatory bowel disease ( IBD )，IBD 是一種由於 Th1 與 Th2 失衡、腸膜通透性降低等原因所引發的疾病，據研究結果顯示 *Bifidobacterium bifidum* 能夠顯著上調結腸區 IL-10 表現與降低 IL-1β 表現，進而減緩 IBD 疾病的發生 (Satish et al., 2017)。

### (三) 抗氧化功能

氧化壓力為細胞中氧自由基濃度增高進而導致 DNA、脂質及蛋白質受損之情形 (Schieber & Chandel, 2014)，其中 reactive oxygen species ( ROS ) 包括超氧化陰離子自由基、羥基自由基和過氧化氫，是高活性氧自由基之一。雖然生物體中有許多天然抗氧化物質如 superoxide dismutase ( SOD )、glutathione peroxidase ( GPx )、glutathione reductase ( GR ) 及維生素 C 、維生素 E 等，仍難以避免氧化造成之傷害。根據研究指出，*Bifidobacterium animalis* 01 的培養上清液和細胞內液在體外試驗中可清除羥基自由基和超氧化陰離子，同時增強小鼠體內的抗氧化酶活性 (Shen et al., 2011)。而不同的菌株也有不同生成抗氧化物的機制，其中包含菌株本身能夠生產如 SOD 抗氧化物質，；或是在腸道中刺激宿主細胞以提升葉酸與 glutathione 濃度等方式 (Wang et al., 2017)。另外，來自芽孢桿菌 LBP32 的胞外多醣能夠通過抑制 NFκB 和 ROS 產生來預防脂多醣誘導的巨噬細胞發炎 (Diao et al., 2014)。

### (四) 具抗病毒活性

近年來微生物的發展不僅限於益生菌與宿主的研究，有鑑於病毒所引起的疫情而有更多研究投入在抗病毒之益生菌。具抗病毒活性之菌株能夠透過刺激宿主



之免疫調節訊號、與病毒直接作用及與病毒競爭 receptor 位點等方式達到抗病毒的效果 (Dicks et al., 2021)。根據表 1-2 顯示，在體外試驗中不同種類的微生物菌種以及病毒感染之細胞模型的不同其機制並非完全相同，其中包含刺激 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞、增強 IFNs 表現、提昇 ISG 表現量、競爭病毒接合細胞位點及改變 TLR 表現間接影響其訊號路徑等效果。以乳酸菌為例：*Lactobacillus plantarum* 能夠產生多種代謝物 plantaricin、lactic acid、acetic acid 及 gamma-aminobutyric acid 等被發現具有改變豬腸道上皮細胞中抗病毒因子 (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、OAS1、OASL、MX2 及 RNASEL) 與細胞激素之表現 (Albarracin et al., 2017)。另外研究發現，透過對感染流感病毒的小鼠鼻腔施以 *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 後，相較於未接受菌株之小鼠，其血清和呼吸道中流感病毒特異性 IgA、IgG 及 IFN- $\gamma$  的濃度皆有提升，且觀察到在受治療期間小鼠之 IL-17 濃度顯著降低與 IL-10 濃度顯著提高 (Tonetti et al., 2020)。除了乳酸菌以外，也有研究指出 *Bacillus licheniformis* 所產生之 exopolymer (EPSp) 能夠與病毒競爭細胞的結合受體 (receptor) 以阻礙 herpesviruses (HSV) 與 vesicular stomatitis (VSV) 等套膜病毒進入宿主細胞，而具有抑制病毒的功效 (Sanchez-Leon et al., 2020)。

#### 四、芽孢桿菌

##### (一) 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens*

液化澱粉芽孢桿菌最早於 1943 年首度自土壤分離，其命名來自於菌株本身可產生液化的澱粉酶 (Fukumoto et al., 1943)。此菌株適應環境能力佳，具有耐酸、耐高溫且可存在於食品、植物、土壤等環境，根據研究發現農作物根部幫助抵抗 *Staphylococcus aureus* 與真菌等病原菌 (Wu et al., 2015)，並且已被證實是安全、無毒性，甚至可以抑制食品工業中病原菌 *Bacillus cereus* 所產生的毒性，因此可運用於食品中發酵，藉此產生益生原以提供益生菌良好生存環境 (Yohannes et al.,



2020)。先前研究發現 *B. amyloliquefaciens* 除了具備預防大腸桿菌引起之嚴重發炎反應與抗氧化之能力 (Wu et al., 2017) 以外，而其次級代謝物更具有抗病毒之效果，由 *B. amyloliquefaciens* 產生的高濃度環狀抗菌肽枯草桿菌蛋白酶能抑制 herpes simplex virus type 1 (HSV-1) 複製，具有殺病毒作用 (Torres et al., 2013)。

根據本實驗室自發黴玉米中分離之 *B. amyloliquefaciens* LN (LN) 所進行之研究顯示，該菌株具有產生聚木糖酶 (xylanase)、羧甲基纖維素 (carboxymethyl cellulose)、澱粉酶 (amylase) 與蛋白酶 (protease) 的活性降解穀物中黴菌毒素玉米赤黴烯酮 (zearealenone, ZEN) 之能力，並且通過耐酸性、耐膽鹽及腸道貼附試驗，藉此證實具有益生菌之特性，可用於食品與飼料添加之微生物 (李，2014)。此外，LN 菌株萃取物經由預處理能使 Vero 細胞株在豬流行性下痢病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 感染後期透過免疫調節作用來減緩發炎反應，從而抑制病毒的複製及釋出，因此認為 LN 具有抗病毒活性之潛力菌株 (蔡，2021)，進而使用於抗貓冠狀病毒之研究。

## (二) 貝萊斯芽孢桿菌 *Bacillus velezensis*

貝萊斯芽孢桿菌於西班牙 Vélez River 首度被分離，是一種好氧且廣泛在於土壤、發酵食物中的菌種，具有形成內孢子的特性。此菌種已被證實其基因中帶有 *srfABCD*、*dhbABCDEF* 能夠藉由產生 surfactin 或 bacillibactin 等勝肽以生成生物膜和抵抗病原菌、真菌生長。此菌種產生之二次代謝物能夠透過引發植物本身 immune systemic resistance (ISR) 之防禦能力抵抗微生物之感染避免致病 (Rabbee et al., 2019)。此外，該菌種添加於飼料進行動物試驗發現，含有貝萊斯芽孢桿菌的益生菌補充劑可增強鴿子中針對鴿子圓環病毒的免疫調節基因的表達，包含 interferon-gamma (*IFN-γ*)、myxovirus resistance 1 (*Mx1*) 及 signal transducers and activators of transcription 1 (*STAT1*) 等抗病毒相關基因都有顯著上升 (Tsai et



al., 2021)。本實驗室先前所分離之菌株 *B. velezensis* AC 透過實驗證實具有耐酸及耐膽鹽能力，對其功能性進行評估發現該菌株能透過改變酚氧化酵素 (phenoloxidase) 及 SOD 的活性以提升澳洲淡水龍蝦感染白點症病毒之存活率 (葛, 2018)，也能夠藉由清除氫氧自由基與 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 提升抗氧化能力，並在面臨氧化壓力時刺激超氧化物歧化酶 (SOD) 及穀胱甘肽過氧化物酶 (GPx) 等抗氧化酵素的分泌 (黃, 2018)。另外，AC 菌株萃取物對 Vero 細胞株進行預處理，能夠降低細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 IL-8 表現量並減少細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE) 產生 (蔡, 2021)，故使用此菌株進行抗貓冠狀病毒活性之評估。

### (三) 地衣芽孢桿菌 *Bacillus licheniformis*

地衣芽孢桿菌屬於革蘭氏陽性菌，由於能生成內孢子以適應極端環境使其適應力強，在土壤與植物樣本中十分常見。此菌種的功能應用廣泛，不僅可用於人類、水生、禽畜類之飼料添加，亦可用於生產酵素與生物抗癌分子 (Muras et al., 2021)。先前研究證實，*B. licheniformis* 添加於雞隻飼料或飲水中相較於控制組有較高的產蛋率 (Deng et al., 2012)、蛋白質與胺基酸生成以及較低的脂肪堆積 (Liu et al., 2012)。在水生研究方面，研究數據顯示此菌種添加於飼養水中能夠抑制魚類病原菌生長，例如 *B. licheniformis* DHAB1 能夠透過 *aiaA* 基因產生之 lactonases 降低腸炎弧菌導致蝦類的死亡率 (Vinoj et al., 2014)。除此之外，亦有研究指出 *B. licheniformis* 具有抗病毒效果，根據研究顯示 *B. licheniformis* 所產生之 exopolymer substrate (EPSP) 具對套膜病毒之抗病毒效果，如 herpesviruses (HSV) 與 vesicular stomatitis (VSV)，其機制為透過藉由競爭病毒接合位點抑制病毒進入細胞，經免疫螢光染色可見由 EPSP 處理之細胞有較低的病毒感染量 (Sanchez-Leon et al., 2020)。



本實驗室分離之 *B. licheniformis* CK1 具有多項益生菌之特性，該菌除了可產生胞外聚木糖酶 (xylanase)、羧甲基纖維素酶 (carboxymethyl cellulose) 與蛋白酶 (protease) 於酸性及膽鹽環境中生存，對於抗生素克林黴素 (clindamycin) 與紅黴素 (erythromycin) 具有抗性，並能抑制病原菌 *Escherichia coli* 與 *Listeria monocytogenes* 生長，並且不會產生內毒素與溶血性 (易, 2010)。另外，小鼠餵食 CK1 菌株可提升血液中吞噬細胞活性、脾臟細胞增殖反應及自然殺手細胞活性，並透過改善腸道菌相來影響腸腦軸的功能 (徐, 2018)。



表 1-1、常用益生菌種類列表。(Markowiak et al, 2018)

Table 1-1. Commonly used probiotic list.

Type <i>Lactobacillus</i>	Type <i>Bifidobacterium</i>	Other lactic acid bacteria	Other microorganisms
<i>L. brevis</i> <sup>a</sup>	<i>B. animalis</i> <sup>a</sup>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i> <sup>a</sup>	<i>B. longum</i> <sup>a</sup>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <sup>a</sup>
<i>L. crispatus</i> <sup>a</sup>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <sup>a</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>
<i>L. farcimini</i> <sup>a</sup>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> <sup>a</sup>	<i>Propionibact. Freudenreichi</i> <sup>a</sup>
<i>L. fermentum</i> <sup>a</sup>		<i>Leuconostoc lactis</i> <sup>a</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i> <sup>a</sup>
<i>L. murinus</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <sup>a</sup>	<i>Saccharomyces pastorianus</i> <sup>a</sup>
<i>L. gallinarium</i> <sup>a</sup>		<i>Pediococcus acidilactici</i> <sup>a</sup>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
<i>L. paracasei</i> <sup>a</sup>		<i>Pediococcus pentosaceus</i> <sup>a</sup>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> <sup>a</sup>
<i>L. pentosus</i> <sup>a</sup>		<i>Streptococcus infantarius</i>	<i>Aspergillus orizae</i>
<i>L. plantarum</i> <sup>a</sup>		<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>L. reuteri</i> <sup>a</sup>		<i>Streptococcus thermophilus</i> <sup>a</sup>	
<i>L. rhamnosus</i> <sup>a</sup>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. salivarius</i> <sup>a</sup>			

<sup>a</sup> QPS microorganisms



表 1-2、多種益生菌的抗病毒作用與潛在機制。( Wang et al., 2022 )

Table 1-2. Antiviral effects and underlying mechanisms of various probiotics.

Probiotics	Tested virus	Models	Mechanisms	References
<i>Bf. MCC12 and MCC1274</i>	RV	PIEs	Activating the NF-κB signaling pathway; Increasing the expression of IFN-β; Increasing the expression of ISGs.	Ishizuka et al., 2016
<i>Lactobacillus acidophilus (LB')</i>	HIV	CEM cells	Producing H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Klebanoff and Coombs, 1991
<i>L. crispatus BC3 and L. gasseri BC12</i>	HIV	CD4 <sup>+</sup> T cell lines, MT-4 and Jurkat; Human cervix, vaginal and tonsillar tissues <i>in vitro</i> .	Reducing virus entry/attachment to target cells.	Nahui et al., 2019
<i>B. subtilis</i> OKB105	TGEV	IPEC-J2 cells	Competing with entry receptors.	Wang et al., 2013
<i>Lp. plantarum</i> Lp-1	TGEV	IPEC-J2 cells	Increasing the expression of IFN-β; Activating the JAK-STAT1 pathway.	Wang et al., 2019
<i>Ll. reuteri</i>	PCV2	Mouse	Increasing the expression of cytokines (chemokines, IFN-γ, and IgA).	Karaffova et al., 2017
<i>Ll. reuteri</i>	PCV2	Mouse	Increasing the percentage of CD8 <sup>+</sup> and CD49b <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cells; Increasing the expression of cytokines (RANTES, GM-CSF, IFN-γ, and IgA).	Mudronova et al., 2018
<i>B. velezensis</i>	PICV	Pigeon	Increasing the expression of cytokines (IFN-γ, Mx1, STAT1, TLR2, and TLR4).	Tsai et al., 2021
<i>Lc. rhamnosus</i> CRL1505	RSV	Mouse	Increasing the expression of cytokines (IFN-α, IFN-β, IFN-γ, and ISGs).	Villena et al., 2014
<i>L. gasseri</i> SBT2055	RSV	Mouse	Increasing the expression of ISGs.	Eguchi et al., 2019
Probiotic mixture ( <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 and VSL#3)	RSV	Mouse	Increasing the expression of IFNs; Restoring of gut microbiota balance.	Krishnan et al., 2016
<i>Lp. plantarum</i>	PMV	Mouse	Activating the NOD2 and TLR2 pathways.	Rice et al., 2016

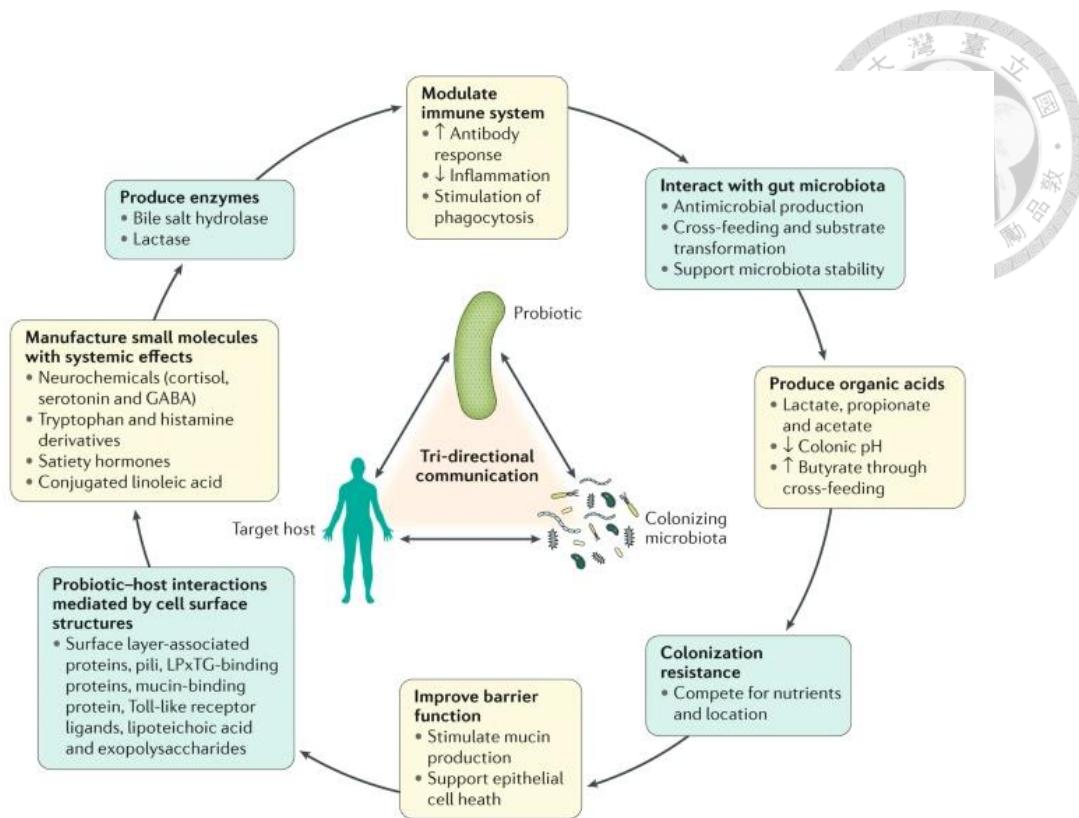


圖 1-1、益生菌有益於宿主之代謝機制。( Sanders et al., 2019 )

Figure 1-1. Mechanisms of probiotic benefits to host.



## 第二節、病毒

### 一、病毒簡介

病毒是一種由 DNA 或 RNA 及蛋白外殼所組成之結構，病毒無法表現生命現象，但是在宿主細胞中可以進行複製、釋出等動作，因此介於生命體與非生命體之間。病毒的直徑約為 10 奈米至 300 奈米之間，因此需藉由電子顯微鏡方能觀察。第一個已知的病毒於 1899 年發現，名為菸草鑲嵌病毒。而後陸續有近五千種病毒被鑑定並且進行分類。根據國際病毒分類委員會（International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV）公布之分類方法，依據病毒的顆粒特性、抗原特性及生物特性可分為域 (*viria*)、界 (*viriae*)、門 (*viricota*)、綱 (*viricetes*)、目 (*virales*)、科 (*viridae*)、屬 (*virus*) 及種 (*species*)。以 2019 年底流行於全球的 SARS-CoV-2 為例，該病毒屬於正冠狀病毒亞科 (*Orthocoronavirinae*)。病毒可藉由多種方式進行傳播，如飛沫、空氣及體液皆可成為傳遞媒介，當病毒進入到宿主細胞後即開始以複製遺傳基因为目的，包含 DNA 與 RNA 兩種形式，由於 RNA 病毒傳染力強、變異較快，因此許多疾病是由 RNA 病毒感染造成，例如 2019 年底盛行全球的 SARS-CoV-2。

## 二、貓冠狀病毒

### (一) 貓冠狀病毒簡介

冠狀病毒科可以分為四個屬，包括 Alpha-、Beta-、Gamma-、及 Deltacoronavirus。貓冠狀病毒 (feline coronavirus, FCoV) (Nidovirales; Coronaviridae; Coronavirinae; *Alphacoronavirus 1*) 為具有封套蛋白 (envelope protein) 之單股 RNA 病毒，其基因體大小約為 29 kb。在雙層磷脂膜表面具有與細胞受體接合之棘蛋白 (spike protein)、膜蛋白 (membrane protein) 及 RNA 上的核殼蛋白 (nucleocapsid protein)。而同屬的病毒包含犬冠狀病毒 (canine coronavirus,



CCoV)、豬流行性下痢病毒 (porcine epidemic diarrhea virus) 及傳染性腸胃炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV)。根據研究，此貓冠狀病毒造成兩種致病型，其一為主要感染腸道的 feline enteric coronavirus (FECV)；其二為造成貓傳染性腹膜炎之 feline infectious peritonitis virus (FIPV) (Tekes & Thiel, 2016)。FIPV 能夠感染單核細胞與巨噬細胞，進而形成系統性地散播，導致宿主受到嚴重感染甚至死亡；而 FECV 受限於感染腸道上皮細胞而較無致命性 (Hora et al., 2016)。FCoV 在接觸到宿主細胞表面後會經由細胞吞噬作用進入到細胞質中，並引起一系列的免疫反應。

## (二) 貓冠狀病毒之基因體特性

第一株完成全基因定序之貓冠狀病毒 FCoV-SB22 分離自巴西家貓，擁有 11 個開放讀碼區 (open reading frame, ORF) (de Barros et al., 2019)，其中 ORF1a 與 ORF1b 約佔總基因體之三分之二，其中有 16 個非結構蛋白 nsp1-nsp16 包含 3a、3b、3c、7a、7b，其餘為結構蛋白 S (spike)、E (envelope)、N (nucleocapsid)、M (membrane) 基因。FCoV 基因體 5' 端與 3' 端之末端皆具有非轉譯區 (untranslated region, UTR)。根據病毒 S 基因序列的差異可將 FIPV 血清型分為兩種: serotype I 與 II，而基於部分基因組序列分析指出 II 型 FCoV 之產生來自 I 型 FCoV 和 CCoV 的基因重組 (Herrewegh et al., 1998)。根據 2013 年 FCoV-NTU156 全基因分析結果 (表 1-2)，此病毒株於 3' 端之末端含有轉錄調節序列 (transcription regulatory sequence, TRS) motif: 5'-CUAAC-3' (Lin et al., 2013)，為尿苷酸特異性內切酶之切位點，與病毒複製與轉錄負回饋調控有關 (Wang et al., 2017)。研究指出 FIPV 為於腸道複製相關基因之 3c gene 突變株，根據分析 27 隻 FECV 與 28 隻 FIPV 感染患貓之 3c 蛋白的表達，發現 3c 基因在突變為 FIPV 之比例中佔 71.4%，意即 3c 基因突變並非完全是造成 FIP 之單一變數 (Chang et



al., 2010)。而非結構性蛋白 7a 與 7b 之功能至今仍不明確，但是在患有 FIP 之貓隻當中能夠檢測到點突變，而是否對其毒力產生影響則需要更進一步釐清。(Kennedy et al., 2001)。

### (三) 貓傳染性腹膜炎

貓傳染性腹膜炎 (feline infectious peritonitis, FIP) 是由 FIPV 感染後產生之炎症，好發於一歲以下之幼貓。由於目前能夠治療之藥物較少，因此仍為絕症，通常死亡於發病後一年內。根據患貓症狀之不同，將患症分為乾性與濕性兩類，若於胸腔及腹腔出現積液為濕性症狀，容易阻礙呼吸，且其積液外觀粘稠、泛黃，混雜蛋白質、白血球及血漿，這些積液並非病毒腹膜炎病毒的產物，而是由於體液免疫系統過度反應而形成 (Evermann et al., 1995)；而乾性傳染性腹膜炎則較常感染如眼部與神經系統等導致其具有行走不穩、精神萎靡等症狀 (Olsen, 1993)。宿主自身的狀態在病徵的表現上佔有重要的角色，其中包含宿主本身之基因特性、年齡及免疫力狀態，如主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 變異性、細胞激素生產情況及免疫血球自體凋亡之狀態皆能影響疾病之發展。

### (四) 貓冠狀病毒感染與複製

貓冠狀病毒接觸宿主細胞表面後利用受體媒介的胞噬作用與 feline aminopeptidase N (fAPN) 結合位點接合，以胞吞 (endocytosis) 的方式進入細胞。病毒顆粒的套膜會分解並釋放 viral RNA 至細胞質，並由初級內體 (early endosome) 進行包裹與運送，接著由 replicase-transcriptase complex (RTC) 進行轉錄形成反股 RNA 與 subgenomic (sg) RNA。反股 RNA 為正股 RNA 複製之模板，而病毒蛋白則是利用 sgRNA 進行轉譯。在核酸複製完成以後會於 endoplasmic Reticulum (ER) 與 endoplasmic reticulum-golgi apparatus intermediary compartment (ERGIC) 成熟形成新的病毒顆粒。完全成熟的病毒會藉由胞吐作



用 (exocytosis) 離開宿主細胞進行感染循環 (Delaplace et al., 2021) (Takano et al., 2007) (Takano et al., 2019)。

## (五) 抗貓冠狀病毒之藥物

由於病毒攻擊宿主細胞後有許多階段，其中包含貼附、複製、功能蛋白合成等，現今已存在一些藥物具有抗 FCoV 的活性，能藉由針對病毒生存之不同階段進行活性抑制進而達到抗病毒效果。

### (1) 抑制病毒進入細胞

冠狀病毒的表面上具有貼附細胞功能的棘蛋白 (spike protein)，而 FCoV 可以經由接觸細胞膜上 receptor binding domain (RBD) 進行細胞通透或胞吞作用的方式進入細胞。研究發現， peptide I-S1-9、peptide I-S1-16 及 peptide I-S1-22 三種勝肽在 fcwf-4 細胞株中對 FIPV-I KU-2 病毒株具有約 80%之抑制效果，其作用原理即勝肽能與病毒顆粒競爭接合位點以降低病毒貼附進入細胞之機率 (Doki et al., 2015)。此外，chloroquine (CQ) 與 hydroxychloroquine (HCQ) 也屬於在病毒感染早期能夠減少病毒顆粒自內體 (endosome) 酸化而釋出，以減少其進入轉錄後修飾的機會，這類用藥也應用於對抗流感病毒 (Kono et al., 2008)。

### (2) 抑制病毒複製與轉錄

冠狀病毒自 genomic RNA 釋放以後會首先轉錄 ORF1a 與 ORF1b 片段，其中包含非結構性蛋白。病毒以正股 RNA 為模板並藉由 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 進行複製合成能夠轉錄出與各種蛋白相關之 mRNA 的反股 sgRNA。由於 RdRp 於病毒複製的過程至關重要，因此有許多抗病毒藥物係針對 RdRp 進行抑制以達到抗病毒效果。核苷酸類似物是一種類似於核苷酸的化合物，其中例如 GS-441524 是一種類似於腺嘌呤 (adenosine) 之病毒抑制劑，其作用原理為核苷酸類似物能與病毒自身核苷酸競爭，進而欺騙 RdRp 作用導致病毒複製失敗 (Murphy et al., 2018)，目前在臨床作為治療 FIP 之藥物使用；另一種被廣



泛用於人類的藥物 Ribavirin 為鳥嘌呤（guanosine）類似物，經研究證實能夠於 FIPV 79-1146 感染一小時後有效抑制病毒效價約 10,000 倍，不過 ribavirin 具有細胞毒性，在動物試驗中也發現給予藥物處理之患貓生存率與控制組無差異，因此不被建議使用於臨床（Weiss et al., 1993）。除此之外，基因靜默法 siRNA 被應用於防止病毒複製，其透過特定的小片段 RNA 與病毒 RNA 耦合使之降解進而抑制病毒複製，根據體外試驗研究顯示，使用 30 nM 之 siRNA 前處理之 crandell-rees feline kidney (CRFK) 細胞能夠有效降低 FIPV 79-1146 效價約 100 倍（McDonagh et al., 2015）。不過由於 RNA 病毒容易產生基因變異使得 siRNA 不容易應對於持續變種之病毒。

### (3) 免疫刺激分子

刺激免疫調節是一種常見的抗病毒策略，干擾素（interferons, IFN）時常被使用在臨床治療，然而干擾素本身不具有抗病毒作用，並不能完全依賴其使用。現今已能夠透過 recombinant interferon omega (rFeIFN- $\omega$ ) 誘發先天性免疫反應以治療受貓白血病病毒（feline leukemia virus, FeLV）與貓免疫缺陷病毒（feline immunodeficiency virus, FIV）感染之患貓，在雙盲試驗下成功降低其死亡率（de Mari et al., 2004）。根據 Takano (2020) 等人對 FIPV 進行抗病毒體外試驗的結果顯示，將 100  $\mu$ M Hydroxychloroquine (HCQ) 與  $10^4$  U/mL rFeIFN- $\omega$  組合進行治療能夠降低 FIPV-I 感染的活性（Takano et al., 2020）。不過根據以 rFeIFN- $\omega$  治療感染貓傳染性腹膜炎患貓之生存時長試驗結果顯示，患貓在接受重組干擾素治療後與給予安慰劑之組別並無顯著性差異，僅在血液檢測中發現接受 rFeIFN- $\omega$  組之淋巴細胞數量顯著降低（Ritz et al., 2007）。

## （六）貓傳染性腹膜炎病毒引起之宿主免疫反應

FIPV 作為抗原除了接觸宿主細胞 fAPN 以外，也會與一種位於細胞表面或



內體中可識別各種病原體相關分子的識別受體 Toll-like receptors (TLRs) 接觸而誘導 NF- $\kappa$ B 信號通路或 interferon regulatory factor (IRF) 的表現量，進而影響發炎症狀和控制病毒複製。根據 Khair et al. (2022) 於體外試驗結果指出 CRFK 細胞受 FIPV-II 79-1146 感染後 24 小時相較於感染後 4 小時，其 TLR9、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及 IL-10 之基因表現有顯著提升。而在同時加入 FIPV 和其 S 抗體後，細胞中 TNF- $\alpha$  表現量與單純以病毒感染相比具有顯著地提升，並且會伴隨 fAPN 表現量的上調進而增加 FIPV 感染的敏感性 (Takano et al., 2007)。不過另外也有研究發現 FIPV 感染會抑制第一型干擾素 (IFN-I) 的產生，其病毒 Nsp5 蛋白可以在 NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) 蛋白的多個位置進行切割，進而抑制 NF- $\kappa$ B 信號通路和 IFN-I 的產生，其中 IFN- $\beta$  與 interferon stimulated gene (ISG) 在 FIPV-DF2 感染後皆無法被誘導 (Khair et al., 2022)。

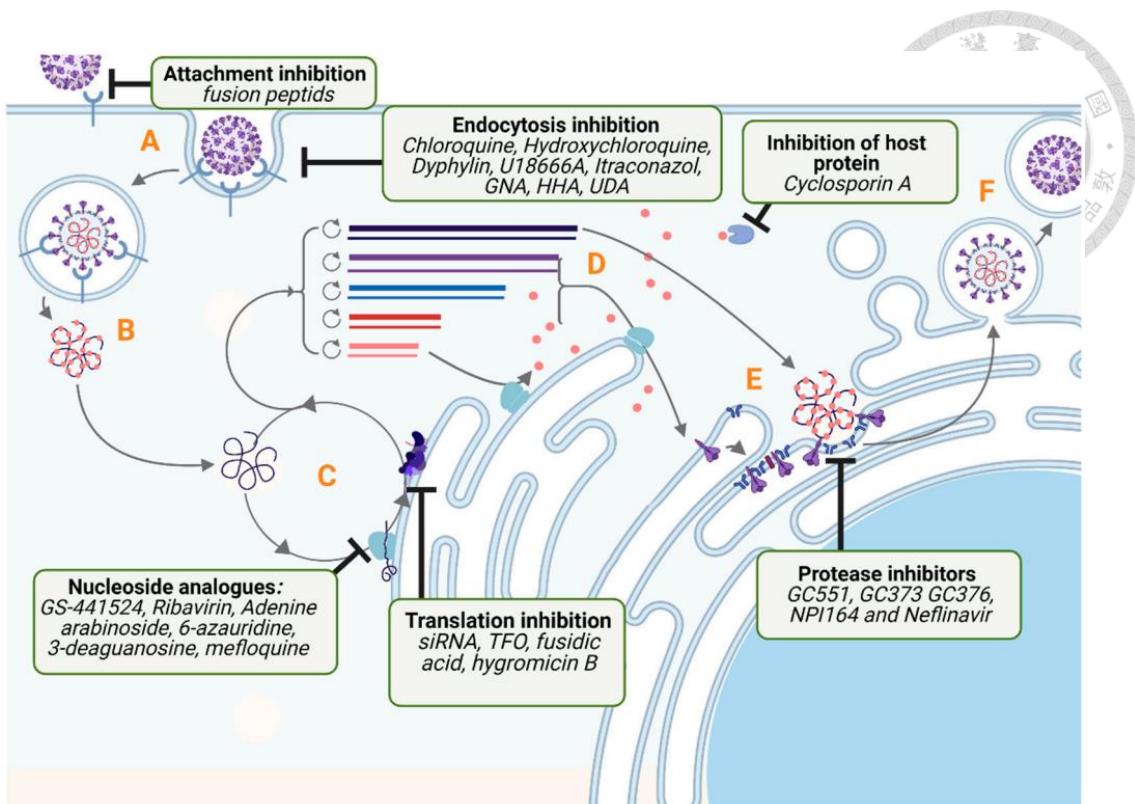


圖 1-2、貓冠狀病毒複製與成熟機制之抑制標的。( Delaplace et al., 2021 )

Figure 1-2. Targets for the inhibition of feline infectious peritonitis virus replication and maturity.

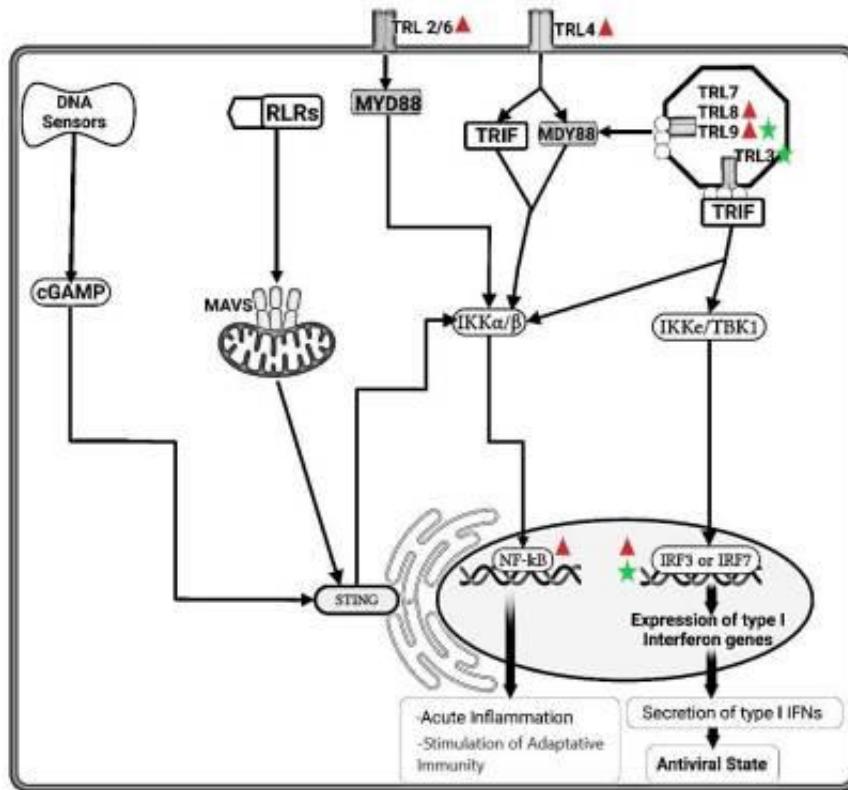


圖 1-3、Toll-like receptors (TLRs) 訊息傳遞與功能示意圖。(Capozza et al., 2021 )

Figure 1-3. Schematic diagram of Toll-like receptors (TLRs) signaling pathway and functions.

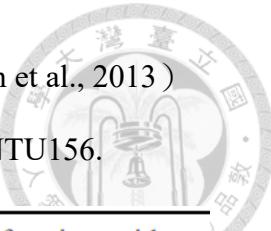


表 1-3、FCoV NTU156 open reading frame 編碼與胺基酸數。(Lin et al., 2013)

Table 1-3. Open reading frame and numbers of amino acid of FCoV NTU156.

ORFs	Start–end (nucleotide position)	No. of nucleotides	No. of amino acids
ORF 1a	313–2,417	12,105	4,035
ORF 1ab	313–20,417 (shift at 12,381)	20,105	6,701
S	20,414–24,775	4,362	1,453
ORF 3a	24,840–25,076	237	78
ORF 3b	25,021–25,236	216	71
ORF 3c	25233–25,433	201	66
E	25,512–25,760	249	82
M	25,771–26,556	786	261
N	26,569–27,687	1,119	372
ORF 7a	27,692–27,997	306	101
ORF 7b	28,002–28,622	621	206



### 第三節、研究動機與目的

隨著近年經濟成長、人口結構改變及城市化發展，伴侶動物逐漸取代經濟動物成為家庭結構的一環，因此伴侶動物的健康與疾病亦漸漸受到重視。由於貓傳染性腹膜炎屬於嚴重病毒性疾病，並且僅有少數臨床用藥能夠進行治療，雖然流行率較低，但致死率極高，因此評估可添加於飼料中之益生菌是否具有抗貓傳染性腹膜炎病毒之活性十分具有價值。故本論文利用分離自本實驗室且具益生菌潛力之三株芽孢桿菌，評估是否能藉由調節宿主免疫力或影響病毒感染能力來提升細胞存活率或降低病毒含量，以期許未來能將益生菌株應用於添加飼料中，進而成為取代疫苗與藥物之方案。



## 第二章、材料與方法

### 第一節、實驗架構

本研究首先將 *Bacillus amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1 (CK1) 三株菌株進行萃取，將樣品分別製作成胞內液 (intracellular fluid, INT)、細胞壁 (cell wall, CW) 及胞外聚合物 (exopoly-substances, EPS)，再將其加入細胞株中進行毒性測定。確認細胞毒性後選取低毒性之樣品分別以預防模式、治療模式及聯合處理進行細胞存活率之評估。接著對細胞存活率顯著升高之處理組進行病毒 gRNA 與宿主細胞 mRNA 表現量分析，探討菌株處理對細胞抗病毒基因與促發炎基因之影響。另外，利用免疫螢光染色觀察病毒於細胞中存在位置與感染陽性率之比較。

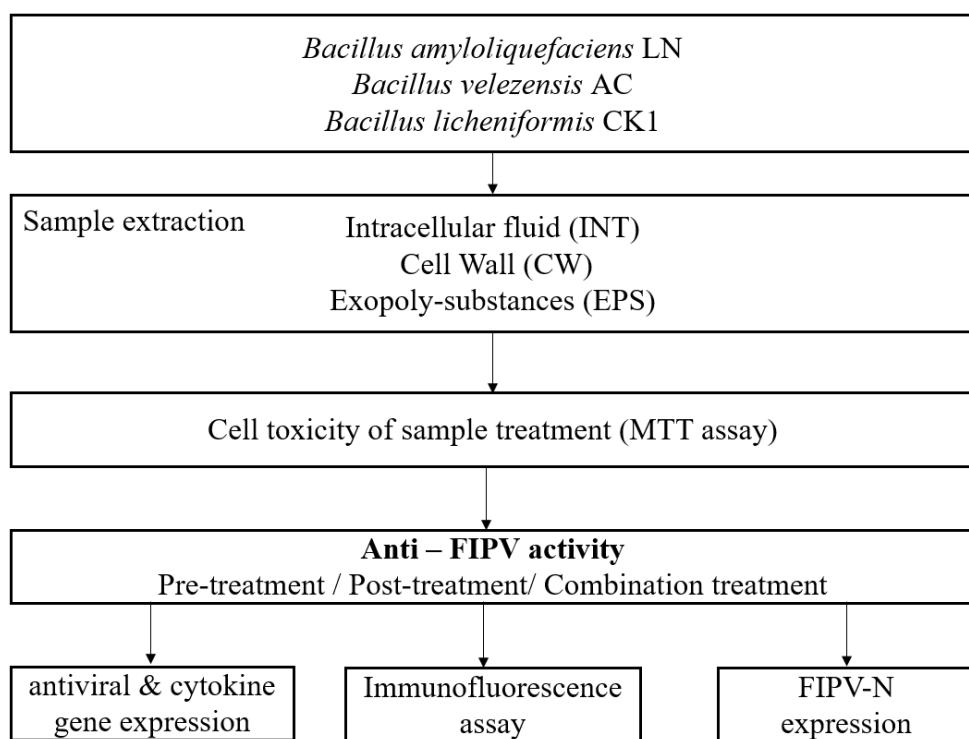


圖 2-1、實驗架構圖

Figure 2-1. Framework of the present study.



## 第二節、芽孢桿菌萃取物之抗貓傳染性腹膜炎病毒能力評估

### 一、芽孢桿菌之培養與保存

本研究使用自實驗室分離出之三株芽孢桿菌分離自本實驗室的 *B. amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1 (CK1) 進行抗病毒分析。以無菌接種環沾取少量菌液並塗抹至 LB agar (Neogen, America) 培養盤進行分區劃盤，使之形成單一菌落。挑選單一菌落接種至 3 mL LB broth 後以 37°C、120 rpm 搖晃培養 16 至 18 小時活化菌株。以 1% (v/v) 接種於新鮮 LB broth 中進行第二次活化完成後，將 50% 無菌甘油以 1:1 (v/v) 加入菌液中，冰凍於 -80°C 以利後續實驗使用。

### 二、芽孢桿菌萃取物製備

#### (一) 胞內液

根據 Mehmeti et al. (2011) 之方法並稍做修改。將三株菌株以 1% (v/v) 接種於 400 mL LB broth 中搖瓶培養 24 小時，以 5000×g、4°C 離心 20 分鐘並將培養液去除，沉澱後的菌體團塊以 1 mL 無菌磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 懸浮清洗 2 次，最後將菌體懸浮於 1 mL 無菌 PBS 中。將上述細菌懸浮液與體積約 0.3 mL 的 0.1 mm zirconia/silica beads (BioSpec Products, USA) 混合，於震盪機 (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) 以最高震盪強度震盪 30 分鐘進行破菌。破菌完成後的樣品保持於冰上並進行 12000×g、4°C 離心 10 分鐘以沉澱菌體碎片後，用 0.22 μm 無菌濾膜 (Sartorius, Germany) 將上清液過濾，即完成胞內液，並且小量分裝保存於 -80°C 冷凍冰箱。



## (二) 細胞壁

將上述沉澱的菌體團塊以 1 mL 無菌 PBS 回溶，再透過  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  無菌濾膜過濾後即取得菌體細胞壁，最後將樣品小量分裝並於 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍保存。

## (三) 胞外聚合物

將活化完成之菌株以 1% (v/v) 接種培養於 400 mL LB broth 中有氧培養 48 小時，以  $5000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 20 分鐘收集上清液體於錐形瓶中，再加入三倍體積且已預冷之 95% 乙醇，置於  $4^{\circ}\text{C}$  冷藏一日。將沉澱後之液體以  $12000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  離心 30 分鐘並去除上清液，留下之團塊以二次水回溶，冰凍於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。將結凍完成之樣品以冷凍乾燥機進行凍乾兩日後，以 PBS 回溶使樣品濃度為  $10\text{ mg/mL}$  (100X)。樣品皆小量分裝並冷凍保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

## (四) 蛋白質濃度定量

胞內液與胞外聚合物之蛋白濃度以 BCA assay 進行測定。將  $2\text{ mg/ml}$  bovine serum albumin (BSA) 標準品以 2 倍進行序列稀釋，以獲得濃度為 2、1、0.5、0.25、0.125 mg/ml 及空白組 0 mg/ml。將  $10\text{ }\mu\text{L}$  之樣品與標準品與  $100\text{ }\mu\text{L}$  之 working solution (Thermo Fisher, USA) 混合於 96 孔盤中並放置於  $37^{\circ}\text{C}$  作用 30 分鐘後，讀取吸收光波長  $562\text{ nm}$  數值。利用標準品製作之標準曲線 ( $R^2 > 0.99$ ) 計算出樣品蛋白濃度後，以預冷 PBS 溶液稀釋胞內液 (INT) 至蛋白濃度為  $1\text{ mg/ml}$  (10X)，並以同體積 PBS 加入至細胞壁 (CW) (10X) 作為樣品備用。



### (五) 總糖含量定量-酚硫法

參考 M. Dubois (1956) 並稍作修改。以葡萄糖作為標準品，以水稀釋使其濃度為  $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ 、 $25 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $6.25 \mu\text{g/ml}$  並以此作為標準曲線。將  $200 \mu\text{l}$  樣品加入試管中，接著加入  $200 \mu\text{l}$  之 5% phenol 以及  $1 \text{mL}$  之濃硫酸，再將其混和物靜置 1 小時。最後使用酵素免疫分析儀 (ELISA Reader) 以  $492 \text{ nm}$  偵測其吸光值以換算含糖濃度。

## 三、細胞與病毒培養

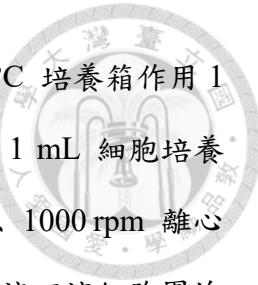
本研究使用之細胞株 fcwf -4 與病毒株 serotype II FIPV NTU-156 由國立臺灣大學分子暨比較病理生物學研究所張惠雯老師與張晏禎老師提供。

### (一) 細胞活化

配製含有 10% fetal bovine serum (FBS, Peak Serum, USA)、1% penicillin-streptomycin-amphotericin B solution (PSA, Biological Industries, Israel) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) 作為細胞培養液。將液態氮中 fcwf -4 細胞至於  $37^\circ\text{C}$  中迅速解凍，並加入  $1 \text{mL}$  之細胞培養液。於室溫離心  $1000\times g$ 、4 分鐘後去除含有 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 之上清液，以新鮮培養基回溶後放入 T25 培養瓶中，並靜置於入含有  $5\% \text{CO}_2$  之  $37^\circ\text{C}$  培養箱中培養至滿盤，即可進行繼代。

### (二) 細胞繼代

當細胞生長至九成滿 (約 2 天) 即可繼代，以玻璃吸管及真空幫浦緩慢吸除舊細胞培養液，經 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 潤洗並加入  $1 \text{mL}$



0.25% (w/v) trypsin-EDTA (Biological Industries, Israel)，於 37°C 培養箱作用 1 分鐘。稍微拍打並以顯微鏡觀察細胞懸浮確認細胞狀態後，加入 1 mL 細胞培養液終止 trypsin-EDTA 作用，並將細胞收集至 15 mL 離心管中。以 1000 rpm 離心 3 分鐘後去除含 trypsin-EDTA 的上清液，加入 1 mL 的細胞培養液回溶細胞團塊使其分布均勻，吸取微量細胞與等體積的 trypan blue stain (0.4%, Gibco) 混合均勻進行細胞染色，再利用血球計數器於顯微鏡下計算細胞數。最後取 20% 細胞數種入含有 10 mL 細胞培養液的 T75 細胞培養角瓶 (Corning, USA) 中，搖晃均勻後靜置於 37°C 培養箱中進行培養。

### (三) 細胞株冷凍保存

將培養至滿盤之細胞以玻璃吸管及真空幫浦緩慢吸除細胞培養液，加入 1 mL 0.25% (w/v) trypsin-EDTA，置於 37°C 培養箱作用 1 分鐘，待細胞懸浮後加入 1 mL 細胞培養液，並將細胞收集至 15 mL 離心管中，再以 1000 rpm 離心 3 分鐘後去除含 trypsin-EDTA 的上清液，加入適量體積的細胞培養液回溶細胞團塊，吸取微量細胞與等體積的 trypan blue stain 混合均勻進行細胞染色，再利用血球計數器計數細胞。以含有 7% (v/v) DMSO 之細胞培養液將細胞濃度調整至  $10^6$  cells/mL，並每 1 mL 分裝至細胞凍管 (Corning, USA)，置入細胞漸凍盒中 (Corning, USA) 於 -80°C 冷凍隔夜，再轉移至液態氮桶中長久保存。

### (四) 病毒培養

配製含有 2% FBS 與 1% PSA 的 DMEM 培養基作為病毒培養液。待種於 T75 培養瓶中細胞培養至九成滿，將舊培養液體去除後以適量 DEAE-Dextran 潤洗兩次。將 2 mL 病毒液與 10 mL 細胞培養液置入 T75 培養瓶中，放置於細胞培養箱感染約 20 小時，觀察細胞出現 CPE 與大多數細胞凋亡後，將培養瓶放入-



80°C 中冷凍隔夜。將病毒液解凍之後離心將細胞殘骸沉澱後，以 0.22 μm 無菌濾膜將病毒液過濾，並以每管 100 μL 小量分裝後冰存於-80°C。

#### 四、病毒效價測定

以二次水配製 1% gelatin 於血清瓶中，經高溫、高壓滅菌後待之冷卻。將細胞培養 6 孔盤以 Gelatin 溶液潤洗兩次後風乾 2 小時。將 trypsin-EDTA 加入至 fcwf-4 細胞中作用使細胞脫落，隨後加入細胞培養液中和後移除上清液。以新鮮培養液調整至  $6.5 \times 10^5$  cells/2 mL 後加入至孔盤中搖晃使之均勻散佈，放入細胞培養箱中培養 20 小時。以顯微鏡觀察細胞貼盤完整後，將舊的細胞培養液移除，並於孔壁緩慢加入預先以十倍序列稀釋完成之 1 mL 病毒液並搖晃使之均勻，放入細胞培養箱中感染 1 小時，每隔 15 分鐘搖晃孔盤使之均勻。將病毒培養液放入恆溫水浴槽中使之維持 42°C，配製含有 3% agarose 之病毒培養液並以預熱之病毒培養液稀釋 10 倍後，移除孔盤中的病毒液。緩慢加入含有 0.3% agarose 培養膠體後，放置室溫約 20 分鐘待其冷卻形成膠體，再移入細胞培養箱中約 24 小時。以光學顯微鏡觀察細胞出現明顯病毒斑塊後，加入 10% buffered formalin ( Thermo Scientific, MA ) 與 1% 結晶紫溶液 ( Thermo Scientific, MA ) 固定 4 小時。拍打移除孔盤中膠體後置於室溫風乾，並計算病毒斑塊 ( plaque forming unit, PFU ) 形成之濃度。

#### 五、病毒感染之細胞存活率測定

本實驗以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ( MTT ) 評估細胞存活率。將 fcwf-4 細胞以 trypsin-EDTA 作用使其脫落，並將  $2.5 \times 10^4$  細胞量加入至 96 孔盤中，放入細胞培養箱培養 20 至 24 小時。以 10 倍序列稀釋病毒液至  $10^{-9}$  倍，接著在移除舊培養液後加入稀釋完成之病毒液於培養箱感作一



小時，同時含有偽感染（mock）組別。移除病毒液並加入新鮮培養基，置於培養箱 24 小時。移除含有病毒之上清液後，加入含有  $0.5 \text{ mg/mL}$  MTT 之病毒培養液（MTT solution），置於培養箱反應約 3 至 4 小時等待其形成紫色結晶，移除上清液後再加入  $50 \mu\text{L}$  DMSO 將結晶溶解，最後利用酵素免疫分析儀（ELISA Reader）以  $590 \text{ nm}$  偵測其吸光值以換算細胞存活率。計算方式為：細胞存活率 (%) =  $\left[ \left( \text{病毒感染組 } \text{OD}_{590} - \text{Blank } \text{OD}_{590} \right) \right] / \left[ \left( \text{偽感染組 } \text{OD}_{590} - \text{Blank } \text{OD}_{590} \right) \right]$ 。

## 六、菌株萃取物之細胞毒性測試

本實驗以 MTT assay 進行評估。將細胞  $2.5 \times 10^4$  細胞量加入至 96 孔盤中，放入細胞培養箱培養 20 至 24 小時。將菌株萃取物以總體積之 10% 加入至培養液中稀釋為 1X、0.1X 及 0.01X，再分別加入至細胞中，其中以 10% PBS 作為控制組（control），於細胞培養箱培養 24 小時。移除含有樣品之上清液，再加入 MTT solution 於培養箱中反應約 3 至 4 小時等待其形成紫色結晶，移除上清液後再加入  $50 \mu\text{L}$  DMSO 將結晶溶解，最後利用酵素免疫分析儀（ELISA Reader）以  $590 \text{ nm}$  偵測其吸光值以換算細胞存活率。

## 七、菌株萃取物於病毒感染之預防模式

本實驗參考 Barzoki et al. (2022) 預防模式實驗且稍作修改，並以 MTT assay 評估菌株萃取物於受 FIPV 感染之細胞是否具有預防效果。首先將 fcwf-4 細胞以  $2.5 \times 10^4$  細胞量加入至 96 孔盤中，放入細胞培養箱培養 20 至 24 小時，待細胞貼附。移除舊細胞培養液，接著加入不同菌株萃取物，濃度為 1X、0.1X 及 0.01 倍，其中偽感染組以含 10% PBS 之病毒培養液進行處理，放入細胞培養箱中培養 24 小時後，移除含有樣品之上清液，接著以 multiplicity of infection (MOI) = 0.02 之 FIPV 病毒液感染細胞，置於細胞培養箱中靜置一小時，使病毒貼附於細胞。移除



病毒液後，加入病毒培養液培養 24 小時後，加入 MTT solution 於細胞反應 3 至 4 小時。於反應終點移除反應試劑後，以 50  $\mu$ L DMSO 回溶，最後利用 ELISA Reader 以 590 nm 偵測其吸光值以換算細胞存活率。

## 八、菌株萃取物於病毒感染之治療模式

本實驗參考 Barzoki et al. (2022) 治療模式且稍作修改，並以 MTT assay 評估菌株萃取物是否對 FIPV 之感染具有治療效果。將 fcwf-4 細胞以  $2.5 \times 10^4$  細胞量加入至 96 孔盤中，放入細胞培養箱培養 20 至 24 小時，待細胞貼附。移除舊細胞培養液，接著以 MOI=0.02 之 FIPV 病毒液感染細胞，置於細胞培養箱中靜置一小時，使病毒貼附於細胞。接著移除病毒液，並以 DPBS 潤洗後加入不同菌株萃取物，濃度為 1X、0.1X 及 0.01X，其中偽感染組以含 10% PBS 之病毒培養液進行處理，放入細胞培養箱中培養 24 小時後，移除含有樣品之上清液，再加入 MTT solution 於細胞反應 3 至 4 小時。於反應終點移除反應試劑後，以 50  $\mu$ L DMSO 回溶，最後利用 ELISA Reader 以 590 nm 偵測其吸光值以換算細胞存活率。

## 九、菌株萃取物於病毒感染之聯合模式

本實驗以 MTT assay 評估在預防模式與治療模式中具有效果之菌株萃取物在聯合模式中受 FIPV 感染細胞之存活率。首先將 fcwf-4 細胞以  $2.5 \times 10^4$  細胞量加入至 96 孔盤中，放入細胞培養箱培養 20 至 24 小時，待細胞貼附。移除舊細胞培養液，接著加入不同菌株萃取物（預防模式中細胞存活率顯著上升之樣品）與細胞培養 24 小時。移除含有樣品之細胞上清液後，以 MOI = 0.02 之病毒液感染細胞 1 小時。在移除病毒液後，加入不同菌株萃取物（治療模式中細胞存活率顯著上升之樣品）並於培養箱中培養 24 小時。加入 MTT solution 於細胞反應 3 至 4 小



時。於反應終點移除反應試劑後，以  $50 \mu\text{L}$  DMSO 回溶，最後利用 ELISA Reader 以  $590 \text{ nm}$  偵測其吸光值以換算細胞存活率。

## 十、免疫螢光染色

本實驗參考 Ng et al. (2020) 並稍作修改。將滅菌之  $12 \text{ mm}$  小圓玻片置於  $24$  孔盤中，並將 fcwf-4 細胞以每孔盤  $2 \times 10^5$  細胞量種植於  $24$  孔盤中，培養  $20$  至  $24$  小時。根據預防、治療及聯合模式添加不同菌株萃取物（細胞存活率顯著上升之組別），並以  $\text{MOI} = 0.001$  之病毒液感染細胞  $1$  小時。在時間點 post-infection hour (pih) =  $16$  hour 移除上清液，接著以預冷  $80\%$  acetone 加入孔盤中於  $-20^\circ\text{C}$  放置  $10$  分鐘。將 acetone 清除並置於室溫風乾後，加入預冷 blocking 緩衝液 ( $1\%$  BSA,  $22 \text{ mg/ml}$  glycine in PBST buffer) 靜置  $30$  分鐘。移除 blocking 緩衝液後於細胞加上  $40 \mu\text{L}$  以 PBS 稀釋  $400$  倍之 anti-FIPV3-70 mouse monoclonal IgG2A (NOVUS, USA) 於室溫作用  $1$  小時，並以 PBS 作為負控制組。接著以 PBS 潤洗  $3$  次，再加上以  $40 \mu\text{L}$  以 PBS 稀釋  $400$  倍之 Alexa Fluor 488 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG 於室溫作用  $1$  小時。以 PBS 潤洗  $3$  次後，以  $4 \mu\text{L}$  Mounting Medium with DAPI (Abcam, UK) 將樣本封片。樣本玻片以螢光顯微鏡 (Nikon 80i) 觀察，使用相機與濾光片將 DAPI (激發波長  $358 \text{ nm}$ ；發射波長  $461 \text{ nm}$ ) 與 Alexa Fluor 488 (激發波長  $493 \text{ nm}$ ；發射波長  $519 \text{ nm}$ ) 產生之螢光拍攝並紀錄，並以 ImageJ 進行圖層合成。

## 十一、病毒基因與促發炎基因分析

本實驗目的為探討芽孢桿菌萃取物與 FIPV 感染之 fcwf-4 細胞產生之 RNA 基因表現，進而釐清萃取物、病毒、宿主之交互關係。首先將細胞以每孔盤  $4 \times 10^5$  / $500 \mu\text{L}$  細胞量種植於  $12$  孔盤中，培養  $20$  至  $24$  小時。接著將細胞以病毒感染  $1$  小

時 (MOI =0.001) 並且以偽感染組作為控制組，再以萃取物處理 20 小時。



### (一) 細胞 RNA 抽取

細胞 RNA 抽取時間點如圖 2-1 所示。將細胞上清液留取 200 μL 作為病毒液檢體，再移除剩餘上清液並以 dPBS 潤洗後，加入 350 μL GENEzol reagent(Geneaid Biotech, Taiwan)，反覆沖打細胞以破壞細胞，置於室溫五分鐘後轉移至 1.5 mL 微量離心管中並加入等體積絕對酒精並震盪使之均勻，接著以 GENEzol TriRNA Pure Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) 進行 RNA 純化。將約 700 μL 溶液轉移至 RB column，以 15,000×g 離心 1 分鐘後倒掉廢液，並更換新的接液管。加入 400 μL Wash Buffer 並以 15,000×g 離心 1 分鐘後倒掉廢液。接著以 DNase I (Geneaid Biotech, Taiwan) 進行去除 DNA 步驟，每個樣品加入含有 5 μL DNase I (2 U/μL) 與 45 μL 緩衝液之混和液於膜中，於室溫中放置 15 分鐘後，加入 400 μL Pre-wash Buffer 並以 15,000×g 離心 1 分鐘後倒掉廢液。最後以兩次 600 μL Wash Buffer 洗淨後以 15,000×g 離心 4 分鐘，在轉移至乾淨離心管。加入 45 μL DEPC-treated water 至管中央使核酸溶解 3 分鐘，最後以 15,000×g 離心 1 分鐘收集 RNA 萃取液。樣本 RNA 以微量光度計(Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行定量與品質檢測，並將濃度調整至 4 ng/μL，保存於-80°C。

### (二) cDNA 之合成

使用 GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Mix (Promega, USA) 將樣本 RNA 反轉錄成 cDNA。取樣本 20 ng RNA 加入離心管中，另外加入 2 μL Reaction Buffer (Random primer)、2 μL Nuclease-Free Water 及 1 μL Enzyme Mix 並混和均勻。反轉錄程序設定條件為 25°C 5 分鐘、42°C 60 分鐘、70°C 15 分鐘，反轉錄完成之 cDNA 保存於 -20°C 以供後續使用。



### (三) 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR, qPCR)

本研究使用 qPCR 對 FIPV-N RNA 與 fcwf-4 細胞 mRNA 進行相對定量分析。將調整好濃度之樣品 cDNA 加入至 384 孔盤中，與 4.6 μL SYBR FAST Master Mix (KAPA, South Africa)、最終濃度為 0.2 μM 之對應引子 (表 2-1) 混合，使反應總體積為 10 μL。將 384 孔盤以 2000 xg 離心 1 分鐘後，設定 CFX384 高通量即時螢光定量 PCR 儀器 (Bio-Rad, USA) 條件:Enzyme activation 95°C 3 分鐘。Denaturing 95°C 10 秒、Annealing 60°C 20 秒、檢測螢光 72°C 2 秒重複循環 40 次。細胞所測得之基因皆以 *felis catus* GAPDH 作為內標，並依照下列公式進行計算:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene of interest}) - Ct (\text{GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{reference sample})$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 十二、統計分析

本研究數據與統計結果以 GraphPad Prism 6 軟體進行分析與繪圖，數據皆以 Mean ± SD (standard deviation) 作為繪圖依據，並使用 one-way ANOVA 單因子變異數分析多組資料進行比較，方法為 Tukey's test 進行統計以探討平均數差異，並將各組間的統計結果以英文字母表示，標有相同'的英文字母代表彼此間不具顯著差異 ( $p > 0.05$ ) 或以 Students t-test 方式將各處理組與控制組進行統計比較，並以 \* 表示具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

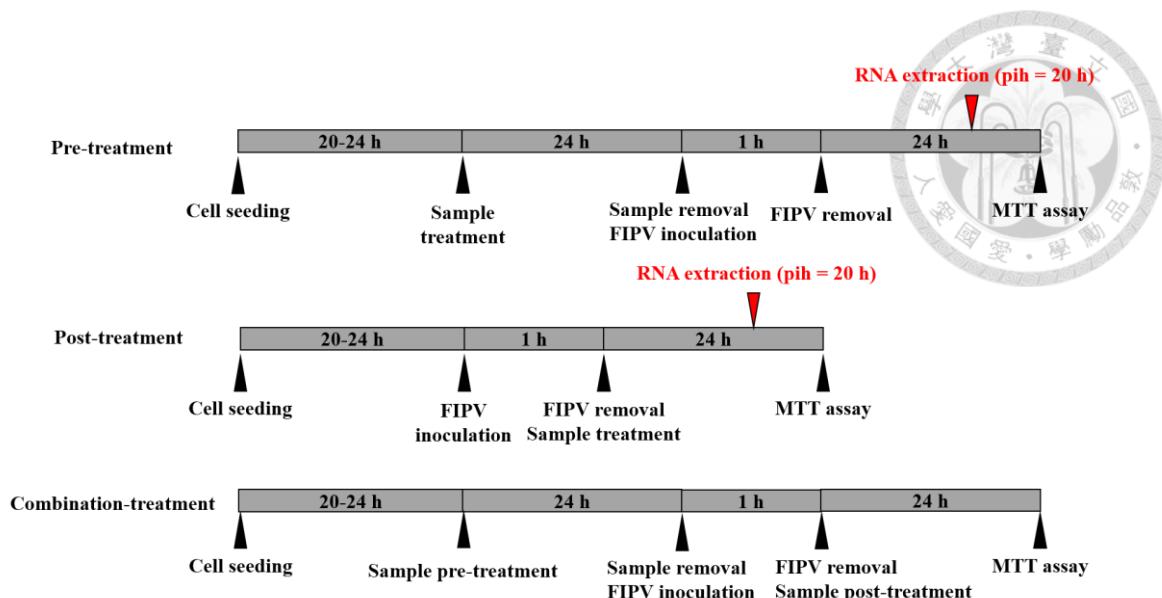


圖 2-2、預防、治療及聯合模式之細胞存活率測定與核酸抽樣時間點。

Figure 2-2. Experimental timepoints of pre-treatment, post-treatment and combination treatment.



表 2-1、即時定量聚合酶連鎖反應使用引子

Table 2-1. Primers for real-time PCR reaction

Amplicon	Forward/Reverse	Primer Sequence (5' to 3')	Lenth (bp)	Reference
FIPV-N	F	GCGTCAACTGGGGAGATGAA	207	
	R	AACGCACCTGTCTGTTCAA		
GAPDH	F	AATTCCACGGCACAGTCAAGG	97	Avery and Hoover (2004)
	R	CATTGATGTTGGCGGGATC		
Mx1	F	ACCAGAGCTCGGGCAAGAG	96	
	R	TTCAGCACCAGAGGACACCTT		
ISG15	F	GCTGGAAGCTGAGAGGCAG	77	
	R	TCCCCGCCCATGGCT		
TNF-a	F	CTTCTGCCTGCTGCACTTG	156	
	R	TCAGCTTCGGGGTTTGCTAC		
IL-6	F	GCAGAAAACAACCTGAATCTCG	426	Takano et al. (2009)
	R	GAGAAAGGAATGCCGTGAAC		
fAPN	F	AGGCTACAGATGCTCGGAAA	249	Takano et al. (2007)
	R	ACTGGGAGCTCTGTCTCCA		
IFN-β	F	CCACTGTTGAGAACCTCCTTG	119	Khair et al. (2022)
	R	CAGGTTCAGAAGGGTCGTATTG		



## 第三章、實驗結果

### 第一節、芽孢桿菌萃取物抗貓型腹膜炎病毒（FIPV）能力評估

#### 一、芽孢桿菌萃取物毒性測試

本研究使用的芽孢桿菌萃取物分為三種，分別為胞內液（intracellular fluid, INT）、細胞壁（cell wall, CW）及胞外聚合物（exopoly-substances, EPS）。其中胞內液的劑量以 BCA 蛋白質定量後，將最高萃取濃度  $100 \mu\text{g/mL}$  作為 1X 濃度；細胞壁則是根據胞內液體稀釋倍率隨之調整；胞外聚合物則是依凍乾粉末淨重  $100 \mu\text{g/mL}$  作為 1X 濃度。

為評估適當給予細胞之樣品劑量以確認不會對細胞造成生長傷害，故將芽孢桿菌萃取物進行三次 10 倍稀釋後與 fcwf-4 細胞共同培養 24 小時，選用與控制組相比存活率高於 80% 之樣品組別作為後續評估樣品。根據圖 3-1 結果顯示，不論何種稀釋濃度的 *Bacillus amyloliquefaciens* LN 胞內液與細胞壁處理下皆顯著降低了細胞存活率；胞外聚合物則是稍微降低其存活率但並不具統計差異；而細胞經 *B. velezensis* AC 與 *B. licheniformis* CK1 三種濃度倍率之胞內液、細胞壁及胞外聚合物處理下皆無顯示具細胞毒性，顯示這些樣品不會對細胞產生毒殺作用，故後續使用 AC 與 CK1 之胞內液、細胞壁及胞外聚合物進行抗病毒試驗。

#### 二、芽孢桿菌胞外聚合物糖類與蛋白含量分析

根據表 3-1 結果顯示，三株芽孢桿菌胞外聚合物之萃取回收率約在 0.09% 至 0.16% 之間，其差異並不大。其中依照定量結果顯示，LN 樣品中總糖含量約佔其 EPS 的 2.333%，總蛋白含量為 12.82%；AC 樣品中總糖含量為 1.85%，總蛋白量為 14.28%；CK1 樣品中總糖含量為 0.476%，總蛋白量為 8.23%。整體來說相較於 LN 與 AC，CK1 其胞外聚合物中糖含量與蛋白含量皆較少，不過其樣品黏稠度較高。



### 三、FIPV NTU156 效價與存活率測定

根據圖 3-2 計算結晶紫染色空斑形成 (plaque forming unit, PFU) 之結果，病毒原液之效價約為  $5.3 \times 10^5$  PFU/mL ( $n = 2$ )。圖 3-3 則顯示 FIPV 在不同稀釋倍率下感染 24 小時後造成細胞凋亡之情形，在  $10^{-3}$  倍稀釋濃度下死亡率達 60%；在 100 倍與 10 倍稀釋濃度下存活率僅剩餘約 20%，為突顯病毒致死與受樣品影響之效果，後續實驗皆以稀釋濃度  $10^{-3}$  倍進行抗病毒活性試驗，其效價為  $5.3 \times 10^2$  PFU/mL。

### 四、以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之預防模式

本實驗為探討芽孢桿菌萃取物是否能藉由與 fcwf-4 細胞作用進一步影響 FIPV 感染而達到預防效果。在預防模式中細胞會先與芽孢桿菌萃取物接觸 24 小時，病毒介入之前再移除樣品，以屏除樣品直接對病毒干擾之因素。在細胞存活率試驗中，受到 FIPV 感染 ( $MOI = 0.02$ ) 之前以 AC 胞內液 (1X)、細胞壁 (1X) 及 CK1 胞內液 (0.1X)、細胞壁 (1X)、胞外聚合物 (0.1X) 做預防處理之細胞與 FIPV 感染組相比有顯著更高的存活率 ( $p < 0.05, n=3$ )，而 AC 胞外聚合物之預處理組則無明顯的效果 (圖 3-4)。以顯微鏡觀察受感染細胞 (圖 3-5) 可發現 FIPV 感染控制組大片細胞凋亡，而使用 AC 與 CK1 萃取物預處理組則減少了細胞脫落的情形，不過仍然可以觀察到 CPE 產生。透過螢光免疫染色法觀察 FIPV 感染情形 (圖 3-6)，以 10% PBS 預處理之病毒控制組其 FIPV-N 均勻表現在受感染之細胞質中；而 GS-441524 正控制組明顯比 FIPV 病毒控制組產生更少螢光信號；而以 AC 與 CK1 萃取物預處理組相較於 FIPV 控制組更具有區塊性的感染，細胞與細胞之間因病毒引起的細胞融合情形普遍，並沒有觀察到較低的陽性率。為確認並量化存在於細胞中與游離在細胞外之病毒基因表現量，因此使用 qPCR 對



FIPV-N viral RNA 進行分析。實驗結果顯示（圖 3-7），以 AC 與 CK1 芽孢桿菌萃取物預處理細胞內之病毒表現量與未經處理之負控制組無顯著差異；而以 AC 胞內液處理之細胞外之上清培養液中更是測得較高的病毒量，其他處理組則與負控制組無顯著差異。綜合上述，不論是從基因分析或是螢光染色圖所得到的結果皆顯示，經由芽孢桿菌萃取物處理之受感染細胞並無較低的感染陽性率或病毒量，說明病毒的複製能力並沒有受到樣品影響而遭到抑制，但是依然能夠有效提升其感染後第 24 小時內之細胞存活率。

## 五、以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之治療模式

本實驗目的為評估在病毒感染 fcwf-4 細胞 ( $MOI = 0.02$ ) 後使用菌株萃取物處理是否具有治療效果。在細胞存活率的試驗中（圖 3-8）偽感染組細胞存活率為 100%，而 FIPV 組為感染病毒後以含有 10% PBS 培養液做處理之負控制組，正控制組為感染病毒後以  $3 \mu\text{M}$  GS-441524 處理之組別。受 FIPV 感染之細胞在 AC 胞內液、細胞壁及胞外聚合物於稀釋濃度分別為 1X、0.1X、0.01X 處理下皆無法顯著增加細胞存活率；相反地，細胞在 CK1 胞內液、細胞壁及胞外聚合物處理下，受 FIPV 感染之細胞存活率有顯著自 49% 提升至 70% 以上 ( $p < 0.05, n=3$ )，唯 CK1-CW 0.1X 處理組不具統計差異。利用顯微鏡觀察受感染細胞（圖 3-9），在 PBS 處理之負控制組有較少的細胞貼附，意即有較多的細胞凋亡；而在 CK1 萃取物的處理下仍然可以觀察到細胞病變效應（cytopathogenic effect, CPE），受感染的細胞會與鄰近的細胞嵌合形成多核細胞；而單一細胞獨立存在的情形則降低。不過與感染組相比其細胞凋亡之情形較不明顯，顯示 FIPV 仍然感染到細胞內，但受樣品影響使其致死率降低。為近一步確認病毒於細胞中感染情形，使用免疫螢光染色法將 FIPV-N 單株抗體嵌合螢光抗體，並以螢光顯微鏡觀察之影像結果顯示（圖 3-10）CK1 胞內液、細胞壁及胞外聚合物處理組皆沒有明顯降低 FIPV 感染陽性率，



但是有較為集中分布的趨勢，不如 FIPV 感染控制組均勻散布。另外，根據即時定量聚合酶連鎖反應 (qPCR) 定量試驗之結果（圖 3-11），受感染細胞在 CK1 細胞壁 (1X) 處理下會顯著增加細胞中 FIPV-N 的 RNA 表現量，CK1 胞內液 (0.1X) 與胞外聚合物 (1X) 則無顯著性差異；而在細胞上清液中檢測到的病毒量則是以 CK1 胞外聚合物處理組為最高並具有顯著的提升 ( $p < 0.05$ )，這項結果顯示病毒量的提升並不直接代表細胞死亡率會隨之增加。綜合上述實驗結果，CK1 菌株萃取物雖然並未降低細胞外與細胞內病毒量，卻能夠提升受感染細胞的細胞存活率，此結果顯示其無法直接抑制 FIPV 病毒顆粒複製活性或是減少病毒自宿主細胞釋放，但是能夠延長細胞之生物活性或減緩細胞死亡。

## 六、測定聯合處理之細胞存活率

聯合處理為結合感染 FIPV 前處理與感染後處理有效提升細胞存活率之樣品進行交叉處理以評估是否能夠維持或增加其效果。根據 MTT assay 試驗結果顯示（圖 3-12），AC/CK1 菌株萃取物交叉處理組皆不能顯著增加其細胞存活率；而 CK1/CK1 方面除了 INT (0.1X) /EPS (1X) 與 EPS (0.1X) /EPS (1X) 處理組未有顯著效果，其餘處理組的細胞存活率皆有顯著的提升 ( $p < 0.05$ )，尤其以 INT (0.1X) /CW (1X) 處理組提升了約 45% 的存活率，其抑制凋亡效果最佳。此結果表示做為聯合處理策略，AC/CK1 不同菌株的組合並不如預期。儘管 AC 萃取物能在感染前的預防方面顯示出良好的效果，在 CK1 介入作為感染後之治療組合反而互相削弱彼此增加宿主細胞存活的功效；而部分 CK1 本身萃取物的交叉組合確實能夠加強宿主存活的能力。



## 第二節、芽孢桿菌萃取物與貓型腹膜炎病毒（FIPV）於宿主細胞抗病毒與促發炎基因相關 mRNA 表現量之影響

本實驗利用即時定量聚合酶連鎖反應（qPCR）針對病毒與宿主細胞特定 RNA 基因片段進行控制組、病毒感染控制組及芽孢桿菌處理組（AC、CK1）的相對定量，包含病毒接合受體 feline aminopeptidase N（fAPN）、抗病毒相關基因 MX Dynamin Like GTPase 1（Mx1）與 interferon-stimulated gene 15（ISG15）、促發炎相關基因 tumor necrosis factor alpha（TNF- $\alpha$ ）、interleukin 6（IL-6）、interferon- $\beta$ （IFN- $\beta$ ），進一步了解病毒作用與芽孢桿菌萃取物作用下對宿主細胞產生之影響。

### 一、病毒作用

在 fcwf-4 細胞受到 FIPV 感染（MOI=0.001）後第 0 小時、10 小時、20 小時抽取細胞中 RNA 並對 FIPV-N 與上述基因進行分析並以 feline GAPDH 作為內標，除了 FIPV-N 表現量以病毒感染組第 0 小時作為比較基準，其餘的目標基因皆與同時間之偽感染組進行比較。根據表 3-2 結果顯示，FIPV-N 表現量在感染後第 10 小時顯著增加了約  $10^4$  倍，而在感染後第 20 小時則顯著增加至約  $10^6$  倍。病毒接合受體 fAPN 在受病毒感染後第 10 個小時顯著上升約 2.13 倍 ( $p < 0.05$ )，不過在感染後第 20 小時與偽感染組不具顯著差異。受 FIPV 感染之細胞中抗病毒基因 Mx1、ISG15 及促發炎相關基因 IL-6、IFN- $\beta$  皆沒有產生較偽感染組高的表現量，此結果與 Khair 等人於 2022 年提出之結果並不相似，此現象可能與細胞株不同有關；另外，TNF- $\alpha$  則是於感染後第 20 小時才檢測出其 mRNA 之表現，因此後續以芽孢桿菌做處理之實驗皆選擇此時間點進行相對定量實驗。

### 二、預防模式

在預防模式中，首先以芽孢桿菌萃取物與 fcwf-4 細胞進行共培養 24 小時後



以 FIPV 進行感染，並於萃取物處理後第 20 小時（圖 3-13）或者病毒感染後第 20 小時（圖 3-14）抽取宿主細胞核酸進行試驗，以探討在預防策略處理下病毒感染前後的基因表現差異。圖 3-13 顯示 AC 與 CK1 萃取物處理後以即時螢光定量相關基因之表現，根據實驗結果顯示，fAPN 的表現量在受到 AC 細胞壁與 CK1 萃取物預處理的影響下都有些微的降低（圖 3-13.A），不過在病毒感染後第 20 個小時並未觀察到差異（圖 3-14.A），因此在感染後期的細胞受器仍與未感染細胞無異；在抗病毒相關基因方面，細胞受 FIPV 感染之前 AC、CK1 胞內液和細胞壁處理組相比於控制組能夠顯著提升 Mx1 的表現量，而其誘導基因 ISG15 之表現量同樣受到影響而有些微的上升（圖 3-13.B、C），不過在樣品移除 20 個小時後，不論是否有感染病毒任何芽孢桿菌萃取物處理組接不具有顯著差異（圖 3-14.B、C）。另外，在促發炎基因 TNF- $\alpha$  方面，細胞在感染病毒前以 AC、CK1 之胞內液與細胞壁處理能夠劇烈提升其表現量約 20 至 60 倍，而 CK1 胞外聚合物亦提升了約 12 倍（圖 3-13.D）。儘管在移除樣品並且感染 FIPV 20 小時後，AC 胞內液與細胞壁處理組仍能檢測出顯著高於控制組的表現量，這是在 CK1 桿菌萃取物處理組中未觀察到的現象（圖 3-14.D）；至於 IL-6 與 IFN- $\beta$  部分，在兩株芽孢桿菌萃取物處理下則無明顯變化（圖 3-13、圖 3-14.E、F）。總括以上敘述，在 FIPV 感染前 AC、CK1 之菌體萃取物能夠預防性提升 Mx1 與 TNF- $\alpha$  表現量，其中 AC 胞內液處理下更能伴隨 ISG15 的提升；而在 FIPV 感染後第 20 小時，TNF- $\alpha$  的表現量稍微下降，不過仍然能觀察到 AC 菌體萃取物處理組比起控制組含有較高的檢測量。

### 三、治療模式

在治療模式下，核酸萃取的時間點為受到 FIPV 感染後第 20 個小時，同時也有未經 FIPV 感染而仍以芽孢桿菌萃取物處理之組別進行比較，以探討病毒介入



與否所造成之影響。根據即時螢光定量（qPCR）結果顯示不論是否有受到 FIPV 感染，在 fcwf-4 細胞以 CK1 胞內液與細胞壁處理後第 20 個小時，其 fAPN 表現量顯著低於偽感染組與感染控制組，儘管病毒接合受體表現量降低，於細胞中反而測得較高的病毒表現量（圖 3-15.A）。Mx1、ISG15 皆為抗病毒相關基因，ISG15 在細胞感染 FIPV 的情況下並不會刺激此類基因有更高表現，不過在 CK1 胞內液與細胞壁處理後的細胞中卻分別檢測出提升約 15 倍以及 4 倍的表現量，並且 Mx1 亦有相同上升的趨勢，而未經病毒感染的芽孢桿菌萃取物處理組則未發現此現象（圖 3-15.B、C）。另外，透過 CK1 胞內液、細胞壁及胞外聚合物處理之組別其促發炎基因 TNF- $\alpha$  的表現量不論是否感染 FIPV 皆有顯著的提升，尤其在未感染病毒且以 CK1 胞內液與細胞壁處理組中檢測到劇烈提升，並且其提升效果都是以 CK1 細胞壁處理組為最佳（圖 3-15.D）；相對地，另外兩項基因 IL-6、IFN- $\beta$  不論感染或以 CK1 桿菌萃取物處理與否，皆未觀測到與控制組具有不同的表現量，並且其檢測到之 Ct 值皆為 30 以上，能夠偵測到之 mRNA 表現量相對較低（圖 3-15.E、F）。總結來說，CK1 菌體萃取物能夠降低病毒接合受體 fAPN、提升抗病毒基因 Mx1、ISG15 表現；而包含胞外聚合物在內更具有刺激細胞激素 TNF- $\alpha$  的效果，由此可知 CK1 在宿主細胞之先天性免疫調節中活化巨噬細胞扮演重要的角色。

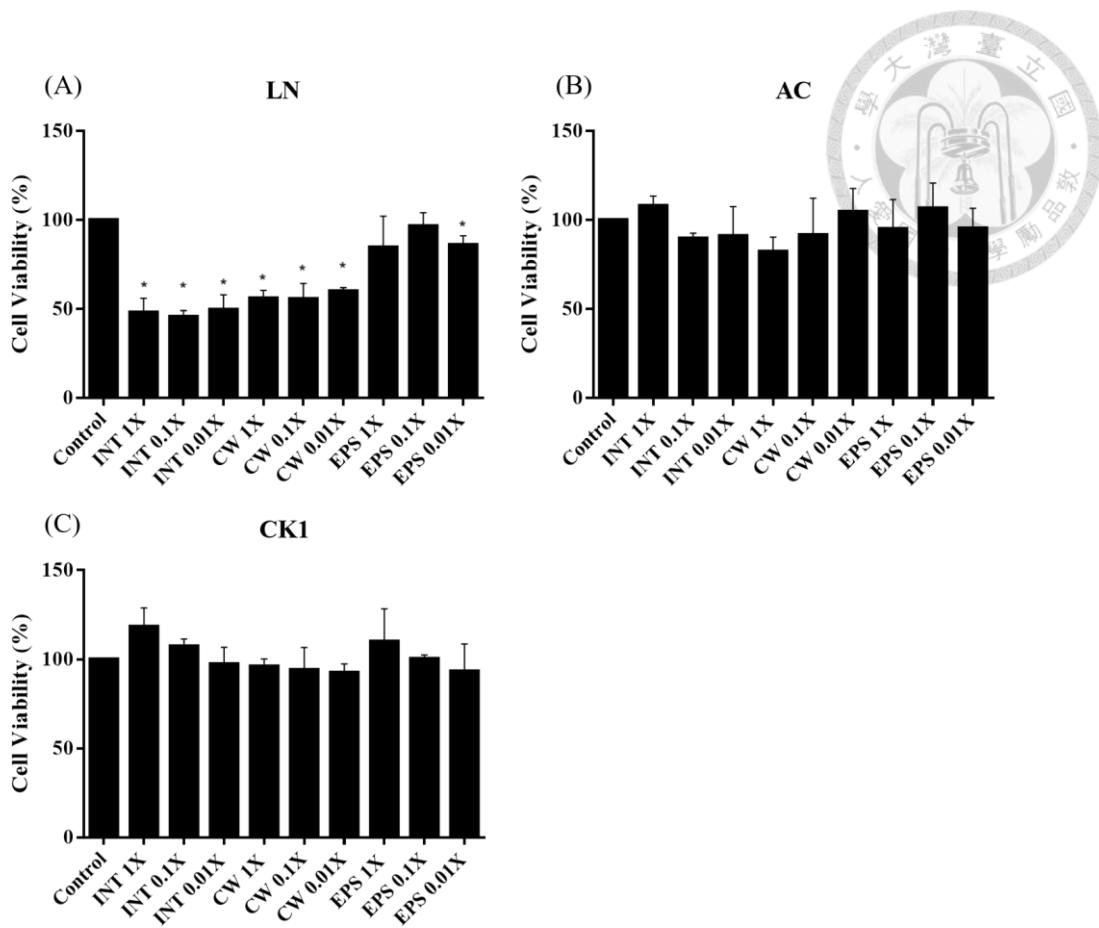


圖 3-1、以芽孢桿菌萃取物處理 fcwf-4 細胞株 24 小時之細胞毒性測定。

Figure 3-1. The cytotoxicity of *Bacillus* extracts on fcwf-4 cells for 24 hours administration. The data are shown as the cell viability of fcwf-4 cells co-cultured with the strain extracts from (A) *Bacillus amyloliquefaciens* LN, (B) *B. velezensis* AC, and (C) *B. licheniformis* CK1 for 24 hours. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by Student's *t*-test. \* represent significant differences comparing to control group ( $p < 0.05$ ). INT: intracellular fluid, CW: cell wall fractions, EPS: exopoly-substances. 1X: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.1X: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.01X 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS.

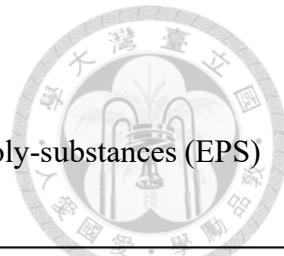


表 3-1、芽孢桿菌胞外聚合物之醣類與蛋白含量

Table 3-1. Total sugar and total protein contents (%) of *Bacillus* exopoly-substances (EPS)

	EPS recovery (%)	Total sugar contents (%)	Total protein contents(%)
<i>B. amyloliquefaciens</i> LN	0.101±0.026	2.333±0.179	12.82±0.36
<i>B. velezensis</i> AC	0.094±0.01	1.85±0.299	14.28±0.176
<i>B. licheniformis</i> CK1	0.157±0.021	0.476±0.05	8.23±0.219

Values are mean ± SD from three independent experiments. EPS recovery referred to the percentage of EPS crude extract weight to the culture medium. Total sugar or total protein contents were expressed as the proportion of sugar or protein concentration to the EPS extract.

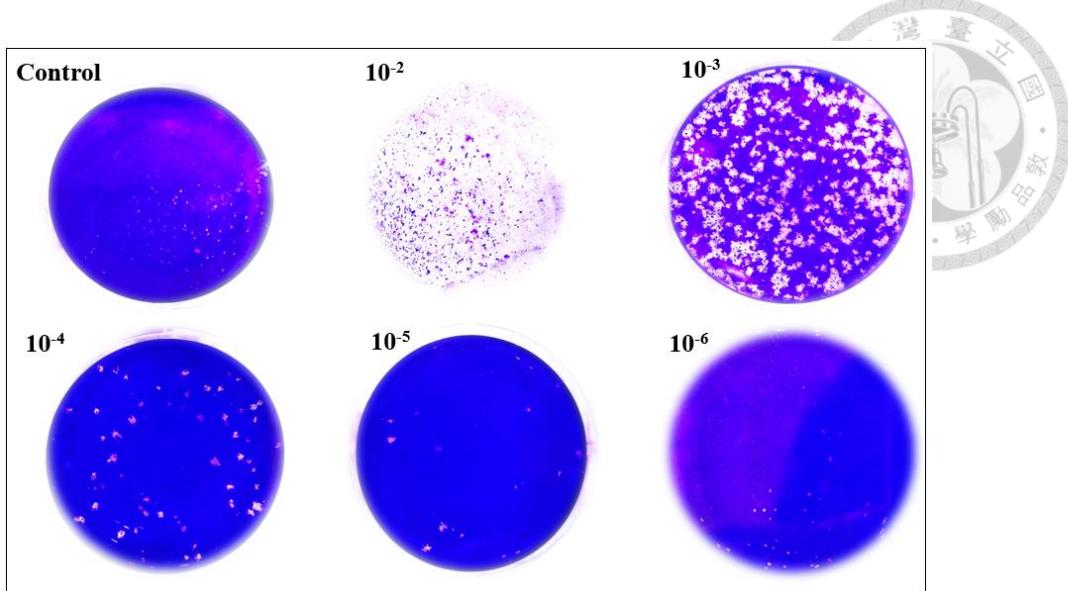


圖 3-2、Feline infectious peritonitis virus (FIPV) 病毒效價定量圖。

Figure 3-2. FIPV titration by performing plaque assay. The numbers show the dilution levels from original virus stocks. The results were recorded as plaque forming unit (PFU)/mL.

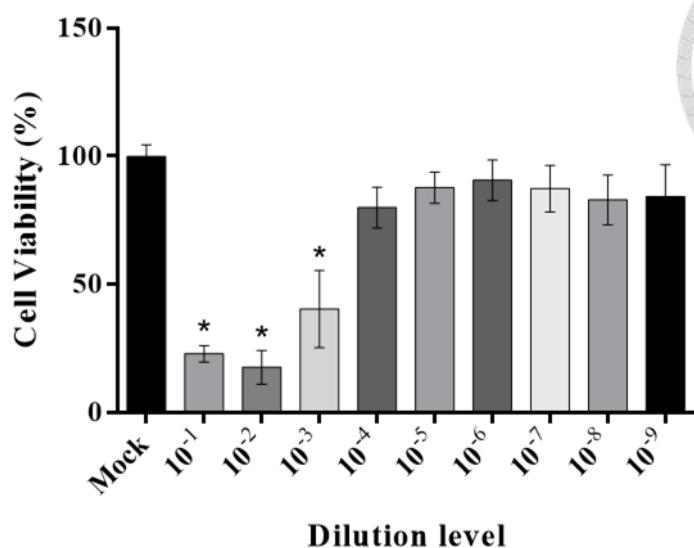


圖 3-3、Fcwf-4 細胞於 FIPV 感染 24 小時之細胞存活率。

Figure 3-3. Cell viability of FIPV infected fcwf-4 cells at post-infection 24 hour. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by Student's *t*-test. \* represents significant differences comparing to mock group ( $p < 0.05$ ).

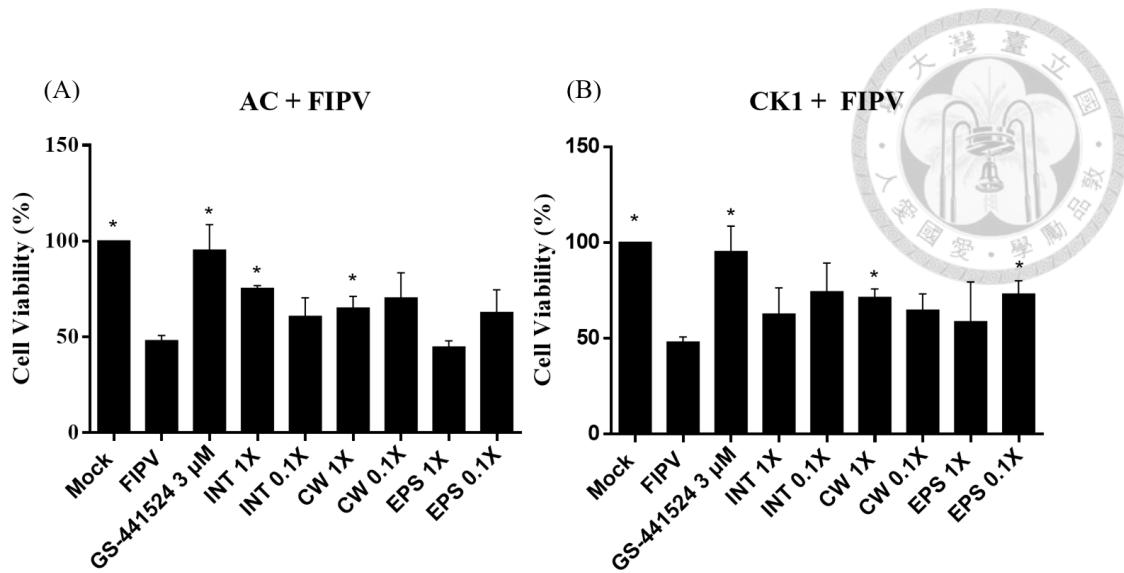


圖 3-4、以芽孢桿菌萃取物預處理受 FIPV 感染之 fcwf-4 細胞 24 小時之細胞存活率。

Figure 3-4. The cell viability of fcwf-4 cells infected with FIPV after pre-treatment with *Bacillus* extracts for 24 hours. (A) AC and (B) CK1 post-treatment were administrated before FIPV infection (MOI = 0.02). Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by Student's *t*-test. \* represents significant differences comparing to FIPV group ( $p < 0.05$ ). INT: intracellular fluid, CW: cell wall fractions, EPS: exopoly-substances. 1X: 100  $\mu$ g/mL, 0.1X: 10  $\mu$ g/mL, 0.01X: 1  $\mu$ g/mL.

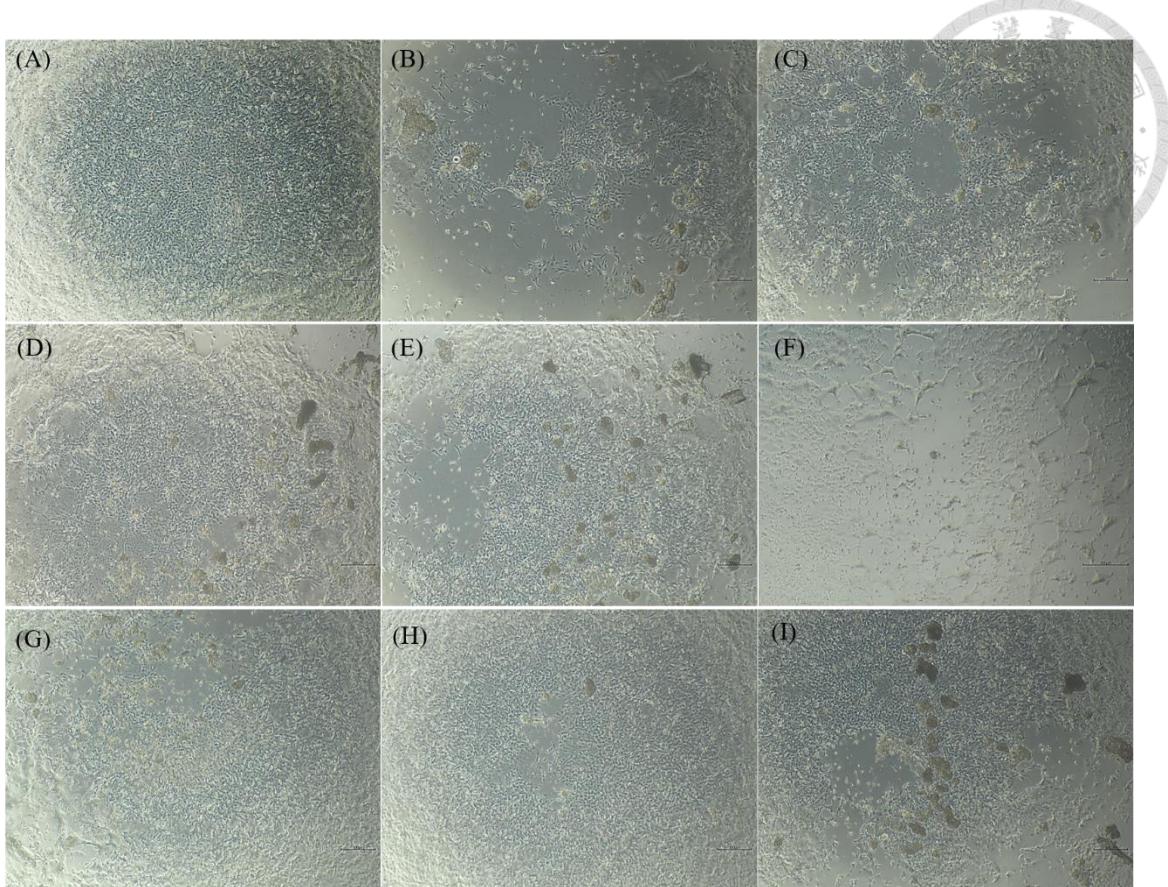


圖 3-5、以芽孢桿菌萃取物預處理受 FIPV 感染之 fcwf-4 細胞 20 小時之細胞病變效應。

Figure 3-5. Cytopathic effect (CPE) of FIPV-infected cells after pre-treatment with *Bacillus* extracts for 20 hours. (A) Mock, (B) FIPV, (C) GS-441524+FIPV, (D) AC intracellular fluid 1X+FIPV, (E) AC cell wall fraction 1X+FIPV, (F) AC exopolysubstances 1X+FIPV, (G) CK1 intracellular fluid 0.1X+FIPV, (H) CK1 cell wall fraction 1X+FIPV, (I) CK1 exopoly-substances 0.1X+FIPV. The black bar equivalents to 300  $\mu$ m in pictures.

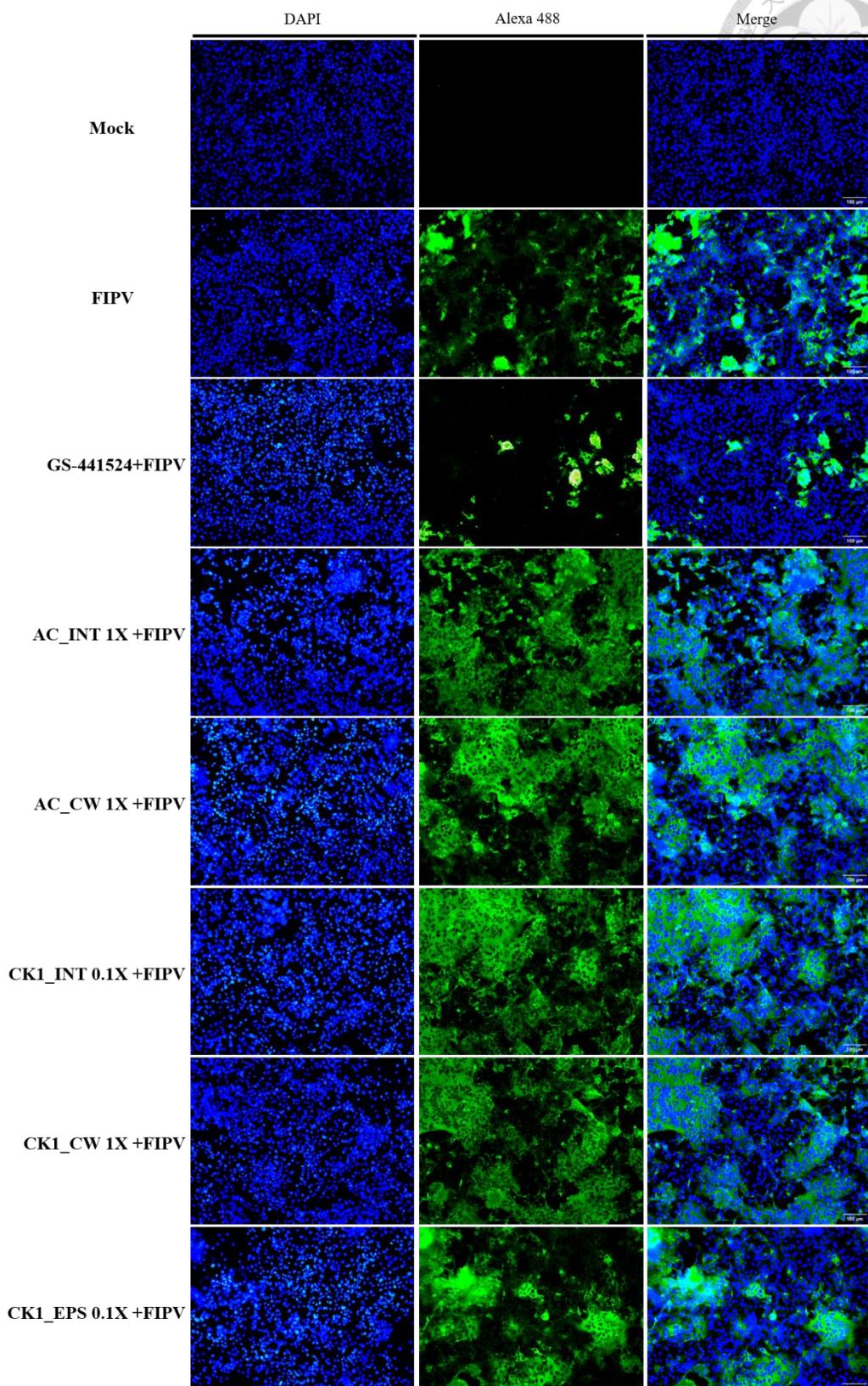
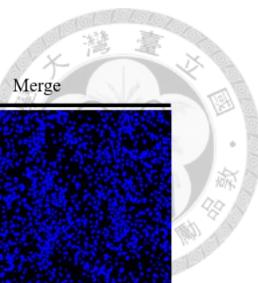


圖 3-6、預防模式下以芽孢桿菌萃取物處理受 FIPV 感染細胞之免疫螢光染色圖。

Figure 3-6. Immunofluorescence staining for FIPV infected fcwf-4 cells pre-treated with *Bacillus* extracts. Cells were treated with 10% PBS (Mock and FIPV), GS-441524 3  $\mu$ M (GS-441524), AC intracellular fluid 1X (AC\_INT), AC cell wall fraction 1X (AC\_CW), CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), CK1 exopoly-substances 0.1X (CK1\_EPS) for 24 hours before FIPV infection (MOI=0.001). Distribution of FIPV was visualized by immunofluorescence at post-infection hour = 16 h. The second antibody used for FIPV-N was labeled by Alexa 488 (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). The white bar equivalents to 100  $\mu$ m in pictures.

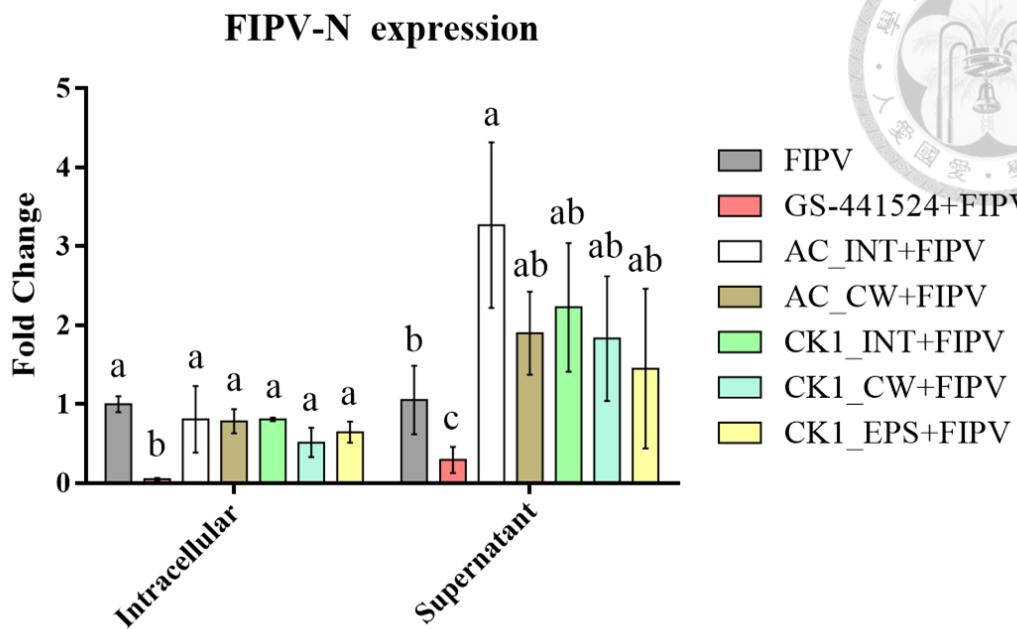


圖 3-7、芽孢桿菌萃取物於預防模式下對 FIPV-N 基因表現量之影響。

Figure 3-7. The effect of *Bacillus* extracts on the RNA expression level of FIPV-N under pre-treatment strategy. Cells were pre-treated with 10% PBS (FIPV), GS-441524 3  $\mu$ M (GS-441524), AC intracellular fluid (AC\_INT), AC cell wall fraction 1X (AC\_CW), CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), CK1 exopoly-substances 1X (CK1\_EPS). Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ).

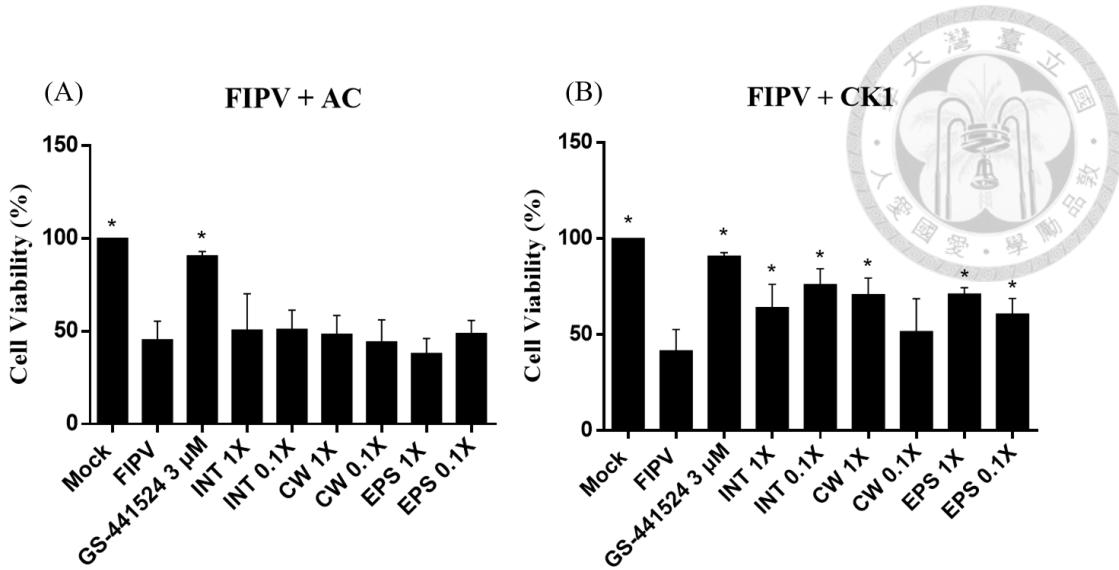


圖 3-8、Fcwf-4 細胞於感染 FIPV 後以芽孢桿菌萃取物處理 24 小時之細胞存活率。

Figure 3-8. The cell viability of fcwf-4 cells post-treated with *Bacillus* extracts after FIPV infection at post-infection hour = 24 hours. (A) AC and (B) CK1 post-treatment were administrated after FIPV infection (MOI = 0.02). Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by Student's *t*-test. \* represent significant differences comparing to Mock group ( $p < 0.05$ ). INT: intracellular fluid, CW: cell wall fractions, EPS: exopoly-substances. 1X: 100  $\mu$ g/mL, 0.1X: 10  $\mu$ g/mL, 0.01X: 1  $\mu$ g/mL.

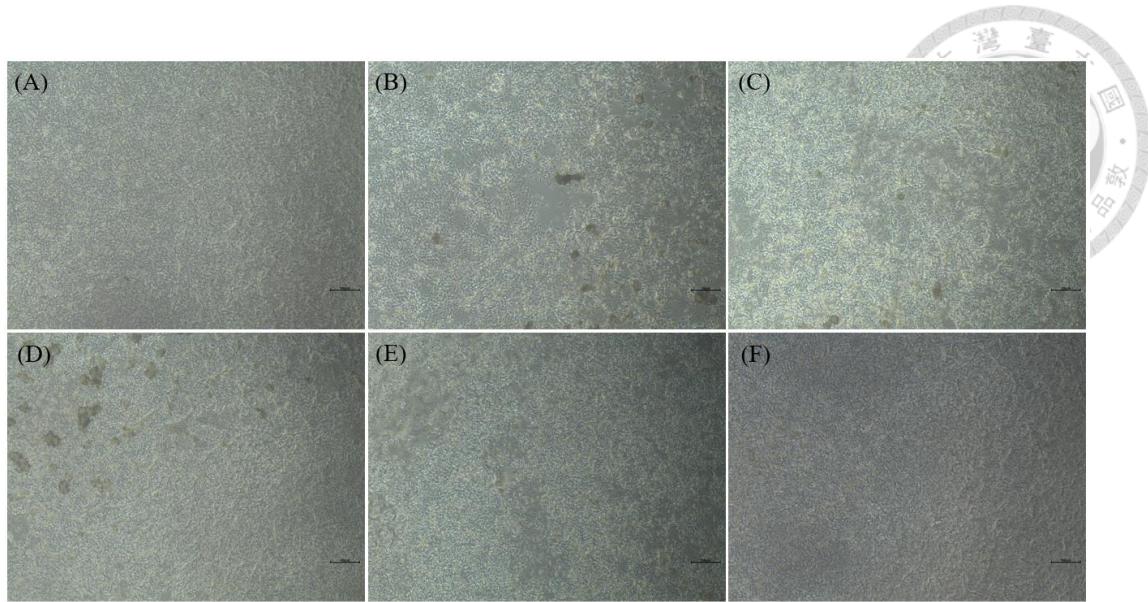


圖 3-9、Fcwf-4 細胞受 FIPV 感染後以芽孢桿菌萃取物處理 20 小時之細胞病變效應。

Figure 3-9. Cytopathic effect (CPE) of FIPV-infected cells after 20 hours of CK1 extracts treatment. (A) Mock, (B) FIPV, (C)FIPV+GS-441524 3  $\mu$ M, (D) FIPV+CK1 intracellular fluid 0.1X, (E) FIPV+CK1 cell wall fraction 1X, (F) FIPV+CK1 exopoly-substances 1X. The black bar equivalents to 300  $\mu$ m in pictures.

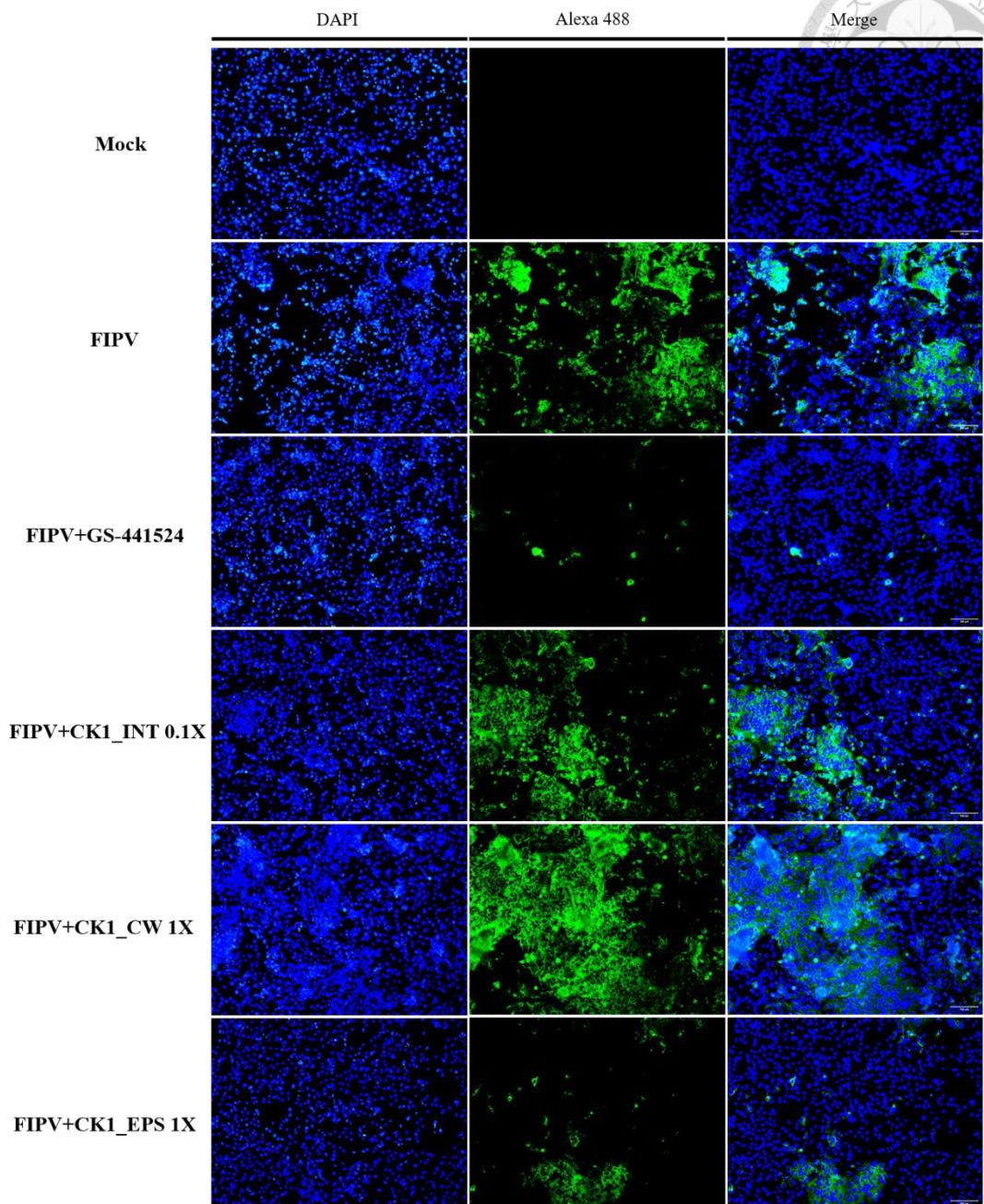
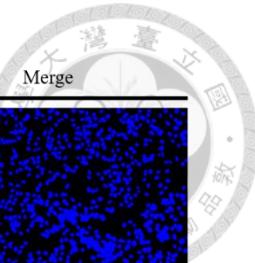


圖 3-10、治療模式下以 CK1 萃取物處理 FIPV 感染細胞之免疫螢光染色圖。

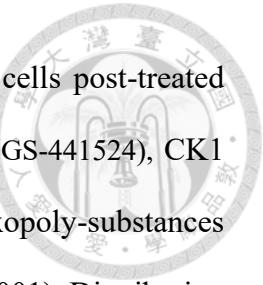


Figure 3-10. Immunofluorescence staining for FIPV infected fcwf-4 cells post-treated with CK1 treatment. 10% PBS (Mock and FIPV), GS-441524 3  $\mu$ M (GS-441524), CK1 intracellular fluid (INT) 0.1X, CK1 cell wall fraction (CW) 1X, CK1 exopoly-substances (EPS) 1X treatment were administrated after FIPV infection (MOI = 0.001). Distribution of FIPV was visualized by immunofluorescence at post-infection hour = 16 h. The second antibody used for FIPV-N was labeled by Alexa 488 (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). The white bar equivalents to 100  $\mu$ m in pictures.

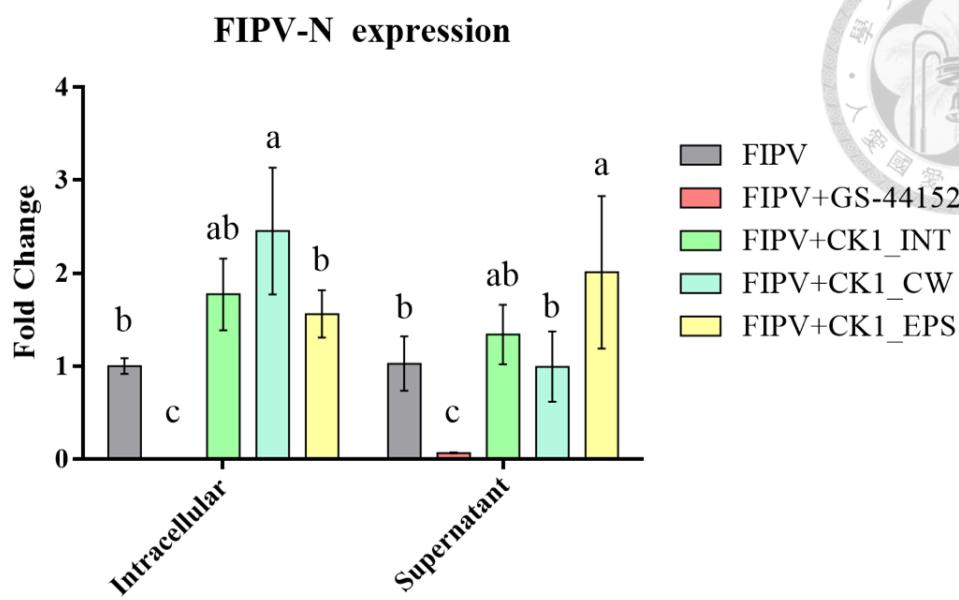


圖 3-11、CK1 萃取物治療模式下對 FIPV-N 基因表現量之影響。

Figure 3-11. The effect of *Bacillus* extracts on the RNA expression level of FIPV-N under post-treatment strategy. Cells were post-treated with 10% PBS (FIPV), GS-441524 3  $\mu$ M (GS-441524), CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), CK1 exopolysubstances 1X (CK1\_EPS). Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ).

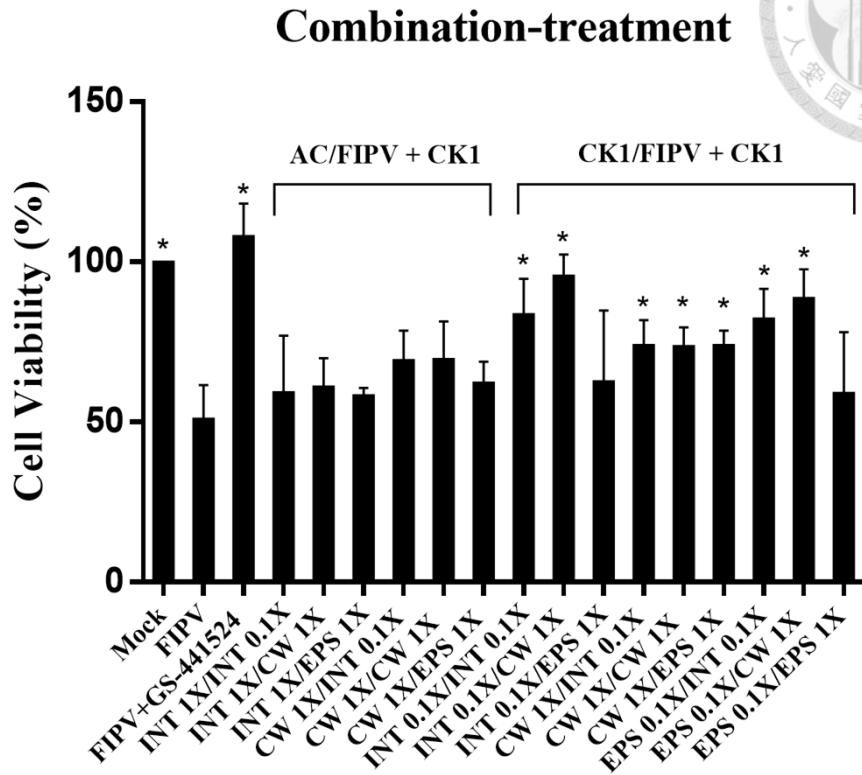


圖 3-12、以芽孢桿菌萃取物聯合處理 FIPV 感染 (MOI = 0.02) 24 小時後之 fcwf-4 細胞存活率。

Figure 3-12. The cell viability of fcwf-4 cells treated with AC and CK1 extracts combination before or after FIPV infection (MOI = 0.02) at post-infection hour = 24 h. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by Student's *t*-test. \* represents significant differences comparing to FIPV group ( $p < 0.05$ ). INT: intracellular fluid, CW: cell wall fractions, EPS: exopolysubstances. 1X: 100  $\mu$ g/mL, 0.1X: 10  $\mu$ g/mL, 0.01X: 1  $\mu$ g/mL.



表 3-2、Fcwf-4 細胞於 FIPV 感染後不同時間點之病毒受體、抗病毒基因及促發炎基因 mRNA 相對表現量

Table 3-2. The mRNA expression level of virus binding receptors, antiviral genes, and pro-inflammatory genes at different time points following FIPV infection in fcwf-4 cells

Amplicons	pih = 0 h		pih = 10 h		pih = 20 h	
	Mock	FIPV	Mock	FIPV	Mock	FIPV
FIPV-N	N.D	(log <sub>10</sub> ) 0.016±0.56 <sup>c</sup>	N.D	(log <sub>10</sub> ) 4.24±3.46 <sup>b</sup>	N.D	(log <sub>10</sub> ) 6.28±5.93 <sup>a</sup>
fAPN	1.22±0.81	1.96±1.11	1.10±0.46	2.13±0.09 <sup>*</sup>	1.91±1.27	1.70±0.18
Mx1	1.05±0.32	0.99±0.2	1.03±0.25	1.24±0.3	1.05±0.32	1.08±0.12
ISG15	1.05±0.31	0.79±0.18	1.00±0.12	1.27±0.32	1.01±0.15	1.51±0.34
IL-6	1.18±0.6	0.36±0.18	1.02±0.2	0.86±0.17	1.11±0.51	1.69±0.63
TNF-α	N.D	N.D	N.D	N.D	1.03±0.23	1.29±0.5
INF-β	1.16±0.54	0.27±0.18	1.01±0.17	1.54±0.19	1.16±0.65	2.46±1.03

Values are mean ± SD from three independent experiments. Statistical analysis for FIPV-N is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis for others genes is performed by Students' T-test comparing to Mock at the same post-infection hours (\*  $p < 0.05$ ). N.D represents None detected, pih represents post-infection hour.

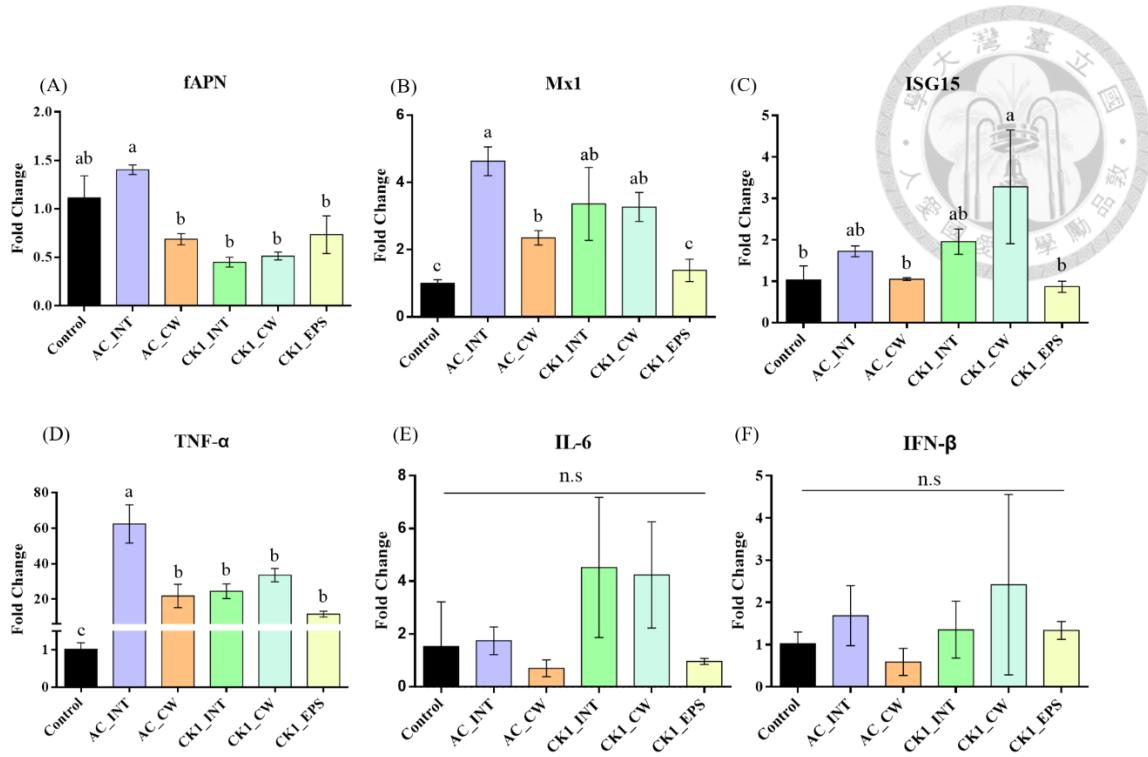


圖 3-13、芽孢桿菌萃取物預處理對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響。

Figure 3-13. The influences of mRNA expression level in fcwf-4 cells pre-treated with *Bacillus* extracts. (A) fAPN, (B) Mx1, (C) ISG15, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-6, and (F) IFN- $\beta$  were quantified by qPCR and compared to control group. 10% PBS (Control), AC intracellular fluid 1X (AC\_INT), AC cell wall fraction 1X (AC\_CW), CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), and CK1 exopoly-substances 1X (CK1\_EPS) were treated to cells for 20 hours. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ).

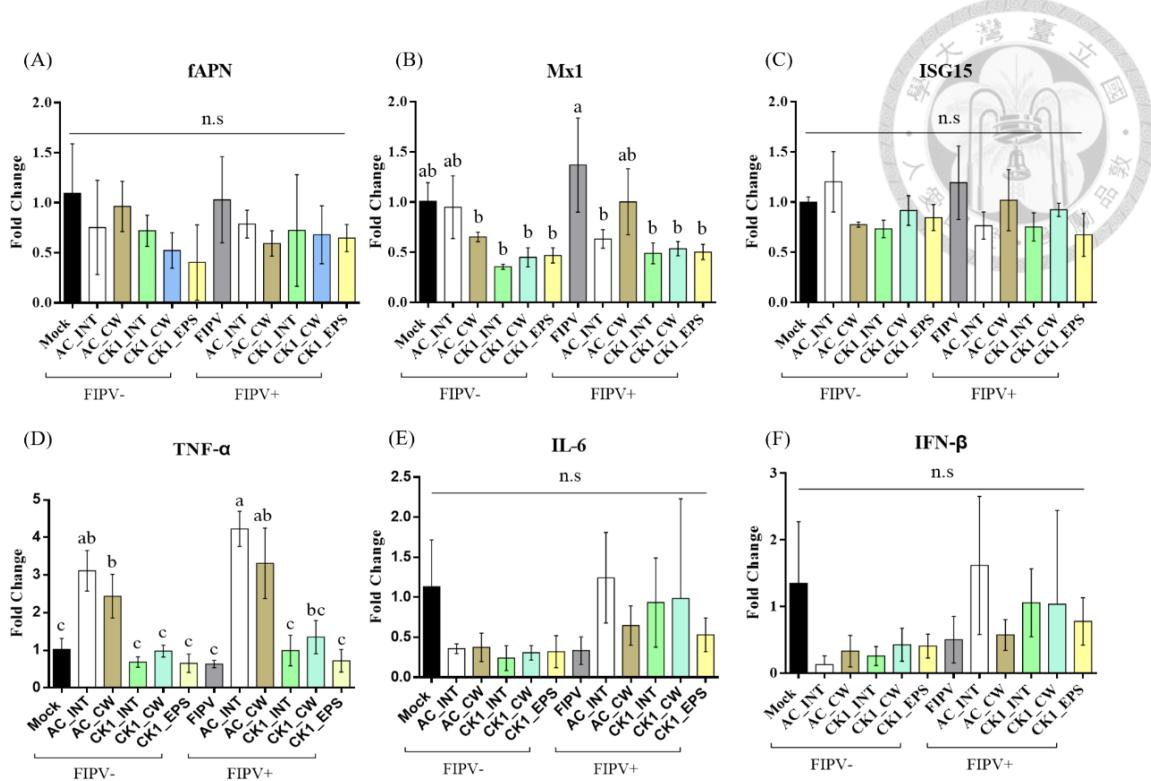


圖 3-14、芽孢桿菌萃取物於預防模式下對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響  
(pih = 20 h)。

Figure 3-14. The influence of *Bacillus* extracts pre-treatment on the mRNA expression levels of virus binding receptors, antiviral genes, and pro-inflammatory genes, with or without FIPV infection. The quantification of (A) fAPN, (B) Mx1, and (C) ISG15, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-6, and (F) IFN- $\beta$ , were performed using qPCR at 20 hours post-infection. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ). AC intracellular fluid 1X (AC\_INT), AC cell wall fraction 1X (AC\_CW), CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), CK1 exopoly-substances 0.1X (CK1\_EPS).

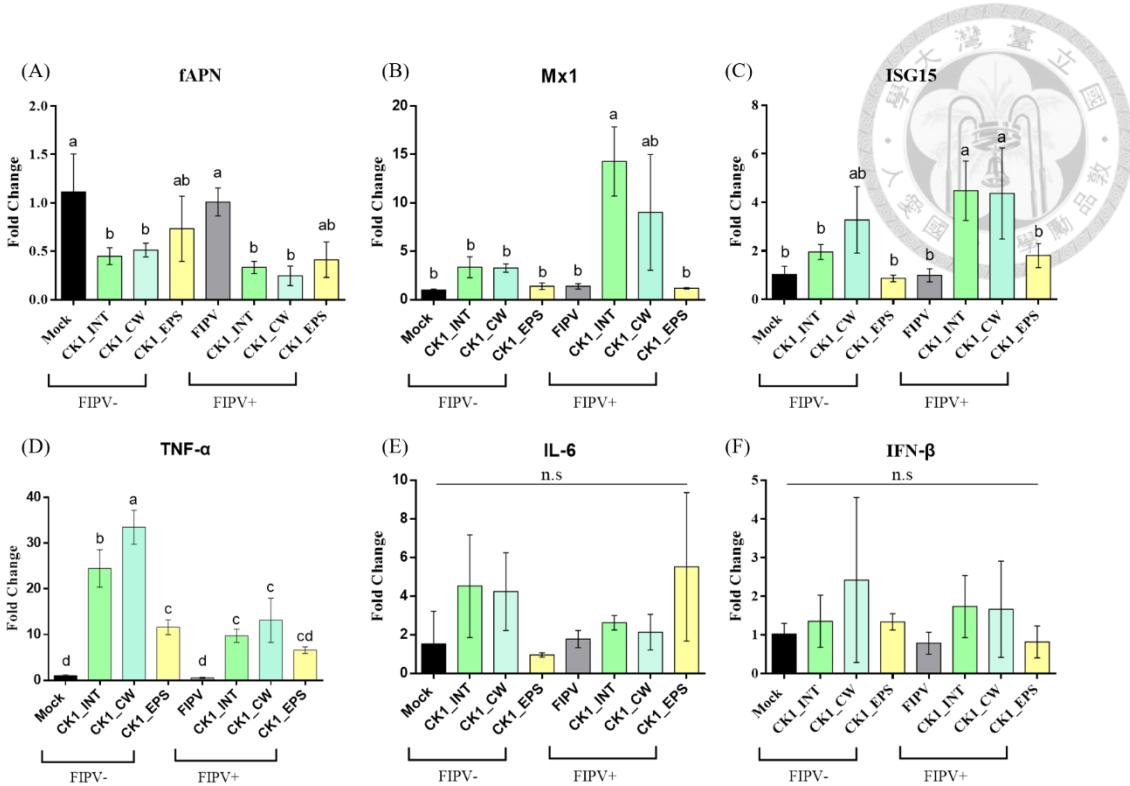


圖 3-15、CK1 萃取物於治療模式下對 fcwf-4 細胞中 mRNA 表現量之影響 (pih = 20 h)。

Figure 3-15. The influence of CK1 extracts post-treatment on the mRNA expression levels of virus binding receptors, antiviral genes, and pro-inflammatory genes, with or without FIPV infection. The quantification of (A) fAPN, (B) Mx1, and (C) ISG15, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-6, and (F) IFN- $\beta$ , were performed using qPCR at 20 hours post-infection. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical analysis is performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Different letters denote significant differences among groups ( $p < 0.05$ ). CK1 intracellular fluid 0.1X (CK1\_INT), CK1 cell wall fraction 1X (CK1\_CW), CK1 exopoly-substances 1X (CK1\_EPS).



## 第四章、討論

貓傳染性腹膜炎病毒（FIPV）是一種具致命性的冠狀病毒，對幼貓來說其產生之毒力非常強，因此致死率非常高（Tanaka et al., 2022）。儘管已經有疫苗被生產，但效果仍然不足。目前已有研究指出一些如 GC376、GS-441524 等藥物能夠賦予治療與減緩症狀，不過藥物取得難易度較高、價格高且不適合長期使用。益生菌屬於飼料添加物，近年來有越來越多研究證實益生菌具有抗病毒能力，包含透過調節宿主免疫系統、直接抑制病毒活性或競爭接合點位等多種方式。伴侶動物在現代人的生活中日漸重要，而目前以益生菌作為伴侶寵物之飼料添加物逐漸成為現代趨勢，故本研究針對三株具益生菌特性之芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1 (CK1) 萃取物，包含胞內液 (INT)、細胞壁 (CW) 及胞外聚合物 (EPS) 之抗 FIPV 能力與宿主細胞免疫因子之影響進行實驗結果探討。

### 一、芽孢桿菌萃取物之抗病毒活性評估

本篇研究首先透過細胞毒性試驗發現在三株具益生菌特性之芽孢桿菌 *B. amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1 (CK1) 菌體與胞外聚合物中，AC 與 CK1 對 fcwf-4 細胞株不具有毒性，且適合用於評估抗病毒試驗；LN 胞內液與細胞壁則是顯示對細胞具有相當的毒性，雖然其菌株為益生菌株，但是曾有研究報導其產生的短鏈勝肽 amylosin 會導致哺乳動物細胞鉀離子流出以及粒線體的去極化（Rasimus-Sahari et al., 2015），不過體外試驗檢測出之毒性並不完全代表對哺乳動物本身有害。在本研究中使用了三種策略進行受 FIPV 感染細胞之存活率，包含預防、治療及聯合處理。CK1 菌株胞內液、細胞壁及胞外聚合物在上述三種策略中皆能提高細胞存活率，其中又以 CK1 胞內液 (0.1X) 的效果為最佳；而 AC 胞內液與細胞壁則是在預防策略中有較好的效果，



而非治療。第三種策略為聯合處理，通常以兩種或多種藥物的組合對疾病治療，在本篇研究中藉由預防與治療的試驗結果，將有效的樣品進行組合以測試聯合處理。令人出乎意料的是在聯合處理中，以 AC 菌體萃取物預防搭配 CK1 萃取物治療的策略並不如預期能提高細胞存活率，反而比單純使用 CK1 萃取物搭配組合之效果還要低，這項結果顯示 AC 與 CK1 對宿主細胞作用的機制可能因拮抗而互相抵消效果；反之 CK1 萃取物的搭配組合則使受病毒感染之細胞具有更加良好的存活率，顯示在聯合處理的情況下 CK1 能使細胞存活效果增強，利用光學顯微鏡觀察也能發現細胞凋亡的情形也較低。藥物組合可能導致不同的結果，包括功能拮抗作用、藥物毒性增加和協同/加成效應。儘管藥物組合有可能因藥物間相互作用而引起不良反應，但謹慎使用可帶來許多優點 (Shyr et al., 2021)。不過利用免疫螢光染色法觀察病毒分布和即時螢光定量分析細胞中與外泌 FIPV-N 的表現量，在預防與治療策略中皆未觀察到下降的趨勢，這顯示芽孢桿菌萃取物無法抑制 FIPV 複製功能，病毒顆粒依然能在宿主細胞中增殖並釋放。

在本篇研究中以 CK1 萃取物處理之受感染細胞在三種策略中皆展現出使 fcwf-4 細胞存活提升的能力。*B. licheniformis* 在許多研究中皆顯示其具有抗病毒能力，此菌種能夠分泌類似名為 surfactin 的抗病毒短鏈勝肽能夠降低 Vero 細胞中豬流行性下痢病毒的表現 (Peng et al., 2019)，或是其產生之胞外多醣聚合物 (EPSp) 能夠抑制 enveloped 病毒進入宿主細胞，不過對 non-enveloped 病毒便無相同效果 (Sanchez-Leon et al., 2020)，因此病毒的種類與藥物的特性不同，可能導致效用的不同。本研究尚未針對芽孢桿菌萃取物所含成分進行分析，據研究報導其 EPS 所含的成分中(圖 4-1):通常為碳水、蛋白混和物以及少量的油脂與核酸。其中較為熱門的探討對象為胞外多醣，這類聚合物中若具抗病毒活性，其分子可能帶有羧基、磷酸或硫酸鹽基團等陰離子基團進而影響病毒顆粒之貼附，而低分子量之 EPS 通常能有效地刺激宿主細胞免疫系統 (Bello-Morales et al, 2022)；而芽孢



桿菌細胞壁成分主要為肽聚醣，目前已被證明可以與單核細胞和巨噬細胞表面的受體結合，從而間接刺激免疫細胞產生細胞因子；而胞內液主要為豐富的胞內蛋白與代謝物，包括菌種產生之特異胜肽、短鏈或中鏈脂肪酸等小分子化合物，使宿主細胞能夠以被動運輸或主動運輸將其滲入至細胞中使用，進一步影響碳源利用或基因表達。

有鑑於能夠提升受 FIPV 感染細胞之細胞存活率的芽孢桿菌萃取物並未減少病毒效價，甚至有上升的情形，因此推測這些樣品具有影響其毒力（virulence）的作用。儘管病毒的毒力和效價都與病毒的特性有關，但它們代表不同的概念。病毒的毒力是描述病毒對宿主的致病能力，而效價則是用於測量病毒在特定樣品中的數量或濃度。目前雖有許多病毒毒力相關之基因被提出，例如棘蛋白（spike）、膜蛋白（membrane）以及附屬基因（accessory gene）3c 及 7b，這些基因於毒力上影響之角色雖不清楚，不過根據選殖試驗結果推測 3c 基因可能與抑制病毒複製相關（謝，2014）。病毒毒力可以通過死亡率、疾病或病理損傷等多種方式進行量化，而其受影響的因素包含病毒基因和宿主的免疫調節。病毒若發生變異可能導致其毒力下降，而同時提高了其複製能力，這可能是因為病毒在進行複製時產生了缺陷，使其對宿主細胞的破壞能力減弱，但在複製和感染方面表現出更高的效能。而樣品對於毒力的影響可能包含感染貼附、入侵宿主、複製增殖及成熟釋出等階段，本研究尚未對各階段之影響進行分析，因此樣品是在何種階段影響，或者是否使病毒基因組變異使其結構上之蛋白結構改變以致影響毒力，都需要進一步試驗才能證實。

## 二、基因表現量分析

第一型干擾素（type I interferons）為病毒入侵細胞後所發出的第一道警訊，RNA 病毒在接觸宿主細胞膜上 toll-like receptors（TLRs）並且辨識到外來病原



體入侵後，會透過 MyD88 dependent pathway 或 TRIF dependent pathway 將訊號傳遞並激活下游轉錄因子（IRF-3、5、6 和 NF- $\kappa$ B）表現，進而促進第一型干擾素 IFN- $\alpha$  及 IFN- $\beta$  分泌，接著下游基因如 Mx1 與 ISG 等基因受到激活後會表現並作用，而不同的病原體會被不同的 TLR 所辨識，其引發免疫反應的路徑不盡相同（Lund et al., 2004）。FIPV 屬於單股 RNA 病毒，依據病原體特性與實驗結果發現其可能由 TLR3 和 TLR9 辨識。而另外有研究顯示 FIPV nsp5 蛋白會透過切割 NEMO 複合物抑制 IRF3 磷酸化進而抑制第一型干擾素的產生，導致 FIPV 病毒能夠逃避刺激免疫反應（Chen et al., 2019）（圖 4-2）。更有結果指出，fcwf-4 細胞中 IFN- $\beta$  的表現量在感染 type II FCoV (79-1146、79-1683) 後會顯著低於受 type I FCoV (KU-2、UCD-2、UCD-4、Black) 之細胞，並且在經過 UV-inactivated 後與偽感染組皆低於偵測極限 (Doki et al, 2018)。由於 type II FCoV 係由 type I FCoV 和 type II 犬冠狀病毒 (CCoV) 之間的基因組重組所產生 (Herrewegh et al., 1998)，而在重組基因區域裡存在於其他冠狀病毒的 ORF1b 中的 nsp14 (核酸外切酶)、nsp15 (核糖核酸內切酶) 和 nsp16 (2'-O-甲基轉移酶) 會抑制 IFN $\beta$  基因表達，這些 nsps 被認為可以防止宿主 PRR 識別病毒 RNA。這些結果與表 3-2 所測得的結果類似，根據即時螢光定量分析結果，不論是否有以芽孢桿菌萃取物處理，在 FIPV 感染細胞後於 20 小時內並沒有觀察到 IFN- $\beta$  表現量變化。此外，一篇有關於 FIPV 感染與 fAPN、TNF- $\alpha$  表現量的研究顯示，以巨噬細胞為模型的試驗中，偽感染組與感染組的 fAPN 表現量並無顯著差異，不過在 S 蛋白之中和抗體介入後會顯著增加其表現量，並且與重組 TNF- $\alpha$  的濃度呈現正相關 (Takano et al., 2007)。在本研究中以 FIPV 感染後的細胞中 fAPN、TNF- $\alpha$  基因之表現量確實與偽感染組無差異，不過在經由 CK1 菌體萃取物處理後兩者並沒有正相關，TNF- $\alpha$  表現量受刺激而提升的情況下反而擁有較低的 fAPN 表現，到了感染後期更沒有觀察到明顯差異，這是 CK1 胞外聚合物處理下



沒有被觀察到的現象（圖 3-13）；而經 AC 胞內液與細胞壁處理儘管能使 TNF- $\alpha$  表現量劇烈提升，仍未發現有伴隨著較高的 fAPN 表現，因此 fAPN 的表現可能不僅與 TNF- $\alpha$  有關，不過這並不能確定芽孢桿菌萃取物中是否含有 S 抗體之類似物。另外，近年受到研究的基因為具有抗病毒特性的 ISG 包括 2',5'-寡腺苷酸合成酶 (2', 5'-OAS) /RNase L、蛋白激酶 R (PKR) 和 Mx 基因。與 2', 5'-OAS 和 PKR 等基因相反，Mx 表達僅受 IFN- $\alpha/\beta$  或 IFN- $\lambda$  的刺激，並且不對其他細胞激素如 IL-1 或 TNF- $\alpha$  作出反應 (Pletneva et al., 2008)。另外，也有研究指出在 IFN- $\alpha$  刺激下 ISG15 能夠隨之上升，而且同時以 FIPV (MOI = 1、0.1、0.01) 感染的組別則沒有發現其表現量的改變 (Chen et al., 2019)。同樣地，在本研究中可以觀察到 fcwf-4 細胞受 FIPV 感染後並沒有觸發 ISG15 與 Mx1 的反應；不過在 CK1 胞內液、細胞壁及 AC 胞內液的處理後能夠觀察到 ISG15 與下游抗病毒基因 Mx1 有同步變化的現象，這可能是導致細胞存活率上升的原因之一。而在動物模式中亦有研究表明，受到鴿子環狀病毒 (PiCV) 感染的宿主，在給予 *B. velezensis* 益生菌株進行兩個月的療程後能夠降低糞便與脾臟中病毒檢出量，並且提升了 IFN- $\gamma$ 、Mx1 及 signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) 的表現量 (Tsai et al., 2021)。

總結來說，AC 與 CK1 萃取物對 fAPN、ISG15、Mx1 及 TNF- $\alpha$  有不同程度的影響與調節，而未來可使用轉錄體分析以更進一步探討的部分包含其他干擾素 IFN- $\alpha$  與受體 TLR 及受其影響之其他基因表現，釐清病毒、宿主及芽孢桿菌萃取物三者之交互作用。

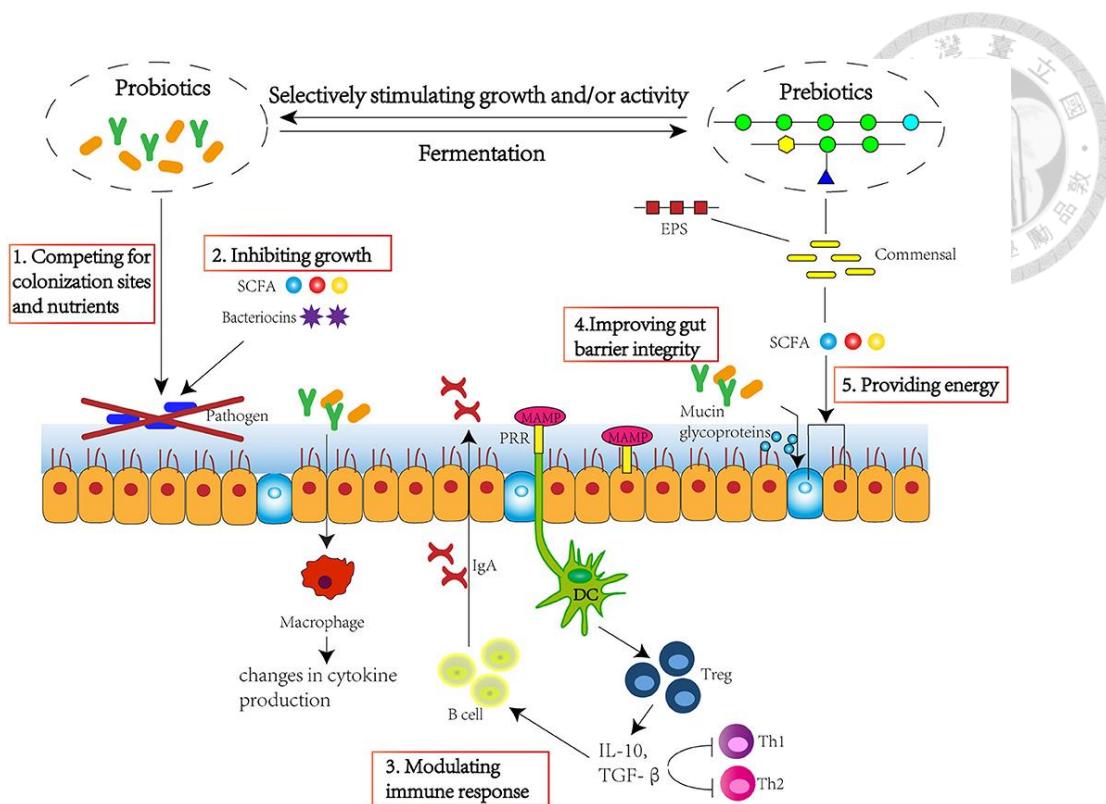


圖 4-1、益生菌之胞外聚合物對宿主免疫系統之影響。(Liu et al., 2022)

Figure 4-1. Effects of probiotic exopoly-substances (EPS) influences to immune system

of host.

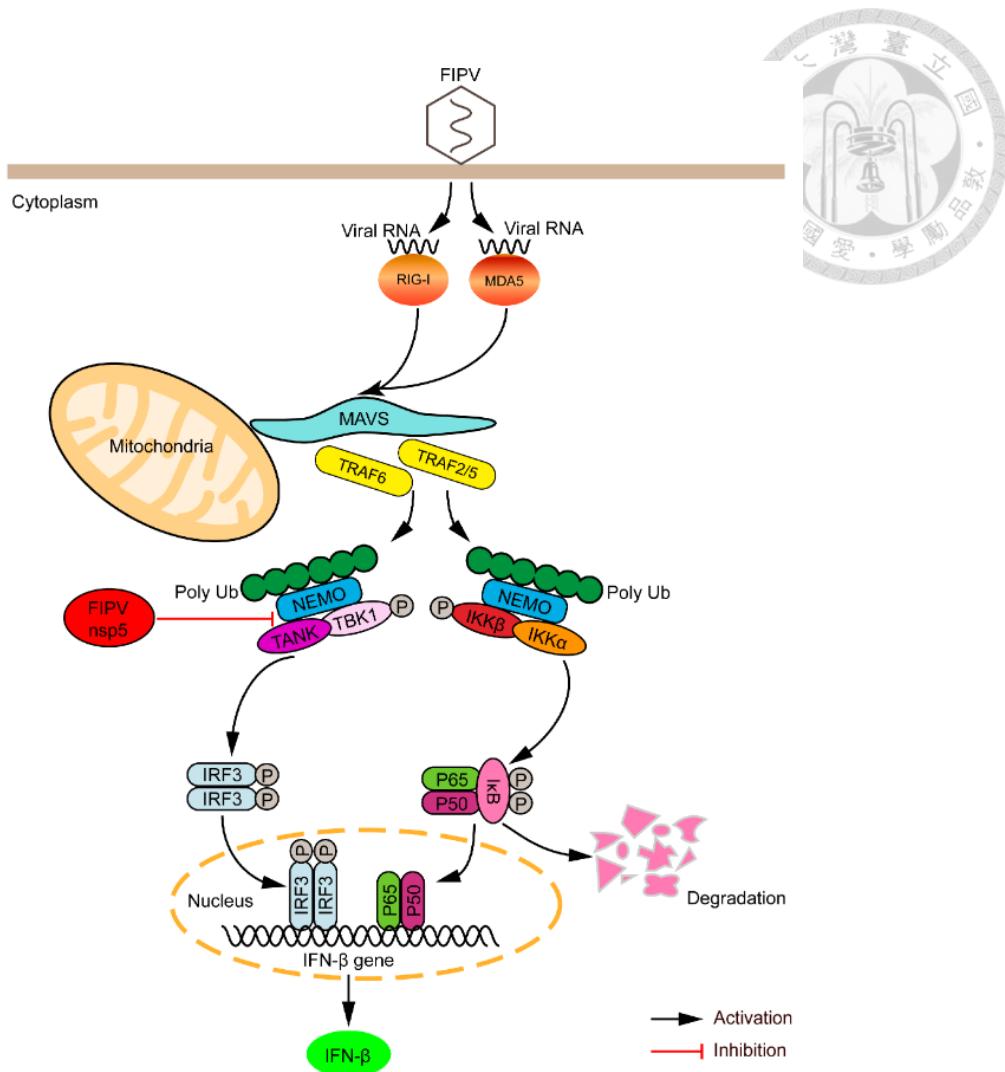


圖 4-2、以 FIPV nsp5 介導的 I 型干擾素信號通路抑制示意圖。(Chen et al., 2019)

Figure 4-2. Schematic model of FIPV nsp5-mediated inhibition of the type I IFN

signaling pathway during FIPV infection.



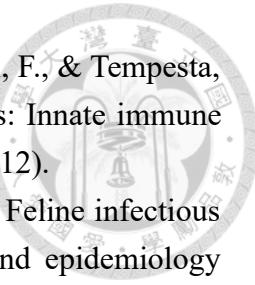
## 第五章、結論

本研究藉由細胞毒性試驗從 *Bacillus amyloliquefaciens* LN (LN)、*B. velezensis* AC (AC) 及 *B. licheniformis* CK1 (CK1) 芽孢桿菌萃取物挑選對 fcwf-4 細胞模型較不具細胞毒性之 AC、CK1 胞內液、細胞壁及胞外聚合物進行三種抗 feline infectious peritonitis virus (FIPV) 病毒策略效用評估，包含預防、治療及聯合處理。在預防模式中，AC 與 CK1 之胞內液和細胞壁以及 CK1 胞外聚合物具有提升細胞存活率的功效；治療模式中則是 CK1 之胞內液、細胞壁及胞外聚合物具有提升的效果；而將預防和治療結合進行聯合處理的結果發現 AC/CK1 的聯合處理不如 CK1/CK1 的效果顯著。藉由即時螢光定量技術分析存在於細胞內以及產生於細胞外之病毒，以及使用免疫螢光染色觀察細胞內受病毒感染之分布，發現有效提升細胞存活率之樣品雖不具有抑制病毒複製之功效，但是以光學顯微鏡觀察以樣品處理後受感染細胞確實有減少細胞病變的情形。透過檢測細胞所產生之 mRNA 基因表現量，發現在感染 FIPV 前後芽孢桿菌萃取物對 feline aminopeptidase N (fAPN)、MX Dynamin Like GTPase 1 (Mx1)、interferon-stimulated gene 15 (ISG15)、tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) 有不同程度的影響。因此 AC 與 CK1 雖不能抑制 FIPV 複製，但是否能藉由調節宿主免疫功能影響其強大的逃避免疫系統能力以降低致病力和致死率是未來能夠持續研究的目標。

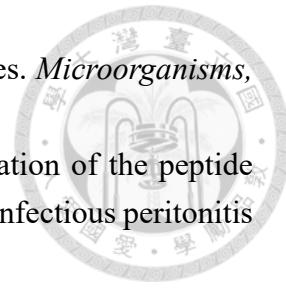


## 第六章、參考文獻

- 易秉蓉。2010。以地衣芽孢桿菌去除黴菌毒素之研究。國立臺灣大學動物科學技術學研究所碩士論文，台北市。
- 李恩。2014。具黴菌毒素分解能力之芽孢桿菌的鑑定與特性分析。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文，台北市。
- 黃晨瑀。2018。中草藥及其芽孢桿菌發酵產物之抗氧化和抗衰老功效。國立臺灣大學動物科學技術學研究所碩士論文，台北市。
- 葛文聖。2018。益生菌促進澳洲淡水龍蝦特定免疫活性及抗白點病毒之潛力。國立臺灣大學生物科技股份研究所碩士論文，台北市。
- 徐翠君。2018。地衣芽孢桿菌 CK1 清除黴菌毒素 zearalenone 之機制及其益生功能的研究。國立臺灣大學動物科學技術學研究所博士論文，台北市。
- 蔡佳芳。2021。具益生菌潛力之芽孢桿菌抗病毒與抗過敏功效評估。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文，台北市。
- 謝立恩。2014。貓傳染性腹膜炎病毒毒力、抗病毒藥物及宿主基因感受性之探討。國立臺灣大學獸醫學研究所博士論文，台北市。
- J. Fukumoto (1943). Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. *J. Agric. Chem.* 19 (7): 487–503.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., & Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 331(6015), 337-341.
- Bello-Morales, R., Andreu, S., Ruiz-Carpio, V., Ripa, I., & Lopez-Guerrero, J. A. (2022). Extracellular polymeric substances: still promising antivirals. *Viruses*, 14(6).
- Bergmann, M., Ballin, A., Schulz, B., Dorfelt, R., & Hartmann, K. (2019). Treatment of acute viral feline upper respiratory tract infections. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 47(2), 98-109.
- Barzoki, M. G., Malekshahi, S. S., & Shayestehpour, M. (2022). *In vitro* evaluation of antiviral activity of *Shouchella clausii* probiotic strain and bacterial supernatant against herpes simplex virus type 1. *Arch. Microbiol.*, 204(8), 522.

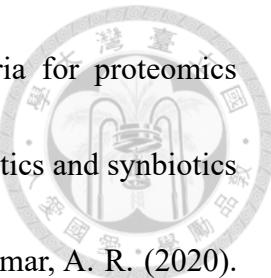


- Capozza, P., Pratelli, A., Camero, M., Lanave, G., Greco, G., Pellegrini, F., & Tempesta, M. (2021). Feline coronavirus and alpha-herpesvirus infections: Innate immune response and immune escape mechanisms. *Animals (Basel)*, 11(12).
- Chang, H. W., de Groot, R. J., Egberink, H. F., & Rottier, P. J. (2010). Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol*, 91(Pt 2), 415-420.
- Chen, S., Tian, J., Li, Z., Kang, H., Zhang, J., Huang, J., Qu, L. (2019). Feline infectious peritonitis virus Nsp5 inhibits type I interferon production by cleaving NEMO at multiple sites. *Viruses*, 12(1).
- Cristofori, F., Dargenio, V. N., Dargenio, C., Miniello, V. L., Barone, M., & Francavilla, R. (2021). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Front Immunol*, 12, 578386.
- Chen, S., Tian, J., Li, Z., Kang, H., Zhang, J., Huang, J., Yin, H., Hu, X., & Qu, L. (2019). Feline Infectious Peritonitis Virus Nsp5 Inhibits Type I Interferon Production by Cleaving NEMO at Multiple Sites. *Viruses*, 12(1), 43.
- Dawson, S., Bennett, D., Carter, S. D., Bennett, M., Meanger, J., Turner, P. C., Gaskell, R. M. (1994). Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res Vet Sci*, 56(2), 133-143.
- de Barros, B. C. V., de Castro, C. M. O., Pereira, D., Ribeiro, L. G., Junior, J., Casseb, S. M. M., Mascarenhas, J. D. P. (2019). First complete genome sequence of a feline alphacoronavirus 1 strain from Brazil. *Microbiol Resour Announc*, 8(10).
- de Mari, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B., & Eun, H. M. (2004). Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med*, 18(4), 477-482.
- Delaplace, M., Huet, H., Gambino, A., & Le Poder, S. (2021). Feline coronavirus antivirals: A Review. *Pathogens*, 10(9).
- Deng, W., Dong, X. F., Tong, J. M., & Zhang, Q. (2012). The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. *Poult Sci*, 91(3), 575-582.
- Diao, Y., Xin, Y., Zhou, Y., Li, N., Pan, X., Qi, S., & Yin, Z. (2014). Extracellular polysaccharide from *Bacillus* sp. strain LBP32 prevents LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF-kappaB and MAPKs activation and ROS production. *Int Immunopharmacol*, 18(1), 12-19.
- Dicks, L. M. T., & Grobbelaar, M. J. (2021). Double-barrel shotgun: probiotic lactic acid

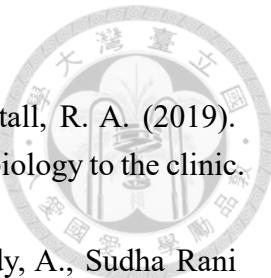


- bacteria with antiviral properties modified to serve as vaccines. *Microorganisms*, 9(8).
- Doki, T., Takano, T., Koyama, Y., & Hohdatsu, T. (2015). Identification of the peptide derived from S1 domain that inhibits type I and type II feline infectious peritonitis virus infection. *Virus Res*, 204, 13-20.
- Doki, T., Yabe, M., Takano, T., & Hohdatsu, T. (2018). Differential induction of type I interferon by type I and type II feline coronaviruses in vitro. *Res Vet Sci*, 120, 57-62.
- Enosi Tuipulotu, D., Fumian, T. M., Netzler, N. E., Mackenzie, J. M., & White, P. A. (2019). The adenosine analogue NITD008 has potent antiviral activity against human and animal caliciviruses. *Viruses*, 11(6).
- Evermann, J. F., Henry, C. J., & Marks, S. L. (1995). Feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc*, 206(8), 1130-1134.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.
- Fumian, T. M., Tuipulotu, D. E., Netzler, N. E., Lun, J. H., Russo, A. G., Yan, G. J. H., & White, P. A. (2018). Potential therapeutic agents for feline calicivirus infection. *Viruses*, 10(8).
- Gaskell, R., Dawson, S., Radford, A., & Thiry, E. (2007). Feline herpesvirus. *Vet Res*, 38(2), 337-354.
- Herrewegh, A. A., Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J., & de Groot, R. J. (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol*, 72(5), 4508-4514.
- Heyman, M., & Menard, S. (2002). Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*, 59(7), 1151-1165.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506-514.
- Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P., & Kania, S. (2001). Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 81(3), 227-234.

- Kim, J. A., Bayo, J., Cha, J., Choi, Y. J., Jung, M. Y., Kim, D. H., & Kim, Y. (2019). Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry. *PLoS One*, 14(6), e0218922.
- Kono, M., Tatsumi, K., Imai, A. M., Saito, K., Kuriyama, T., & Shirasawa, H. (2008). Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine: involvement of p38 MAPK and ERK. *Antiviral Res*, 77(2), 150-152.
- La Fata, G., Weber, P., & Mohajeri, M. H. (2018). Probiotics and the gut immune system: indirect regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 10(1), 11-21.
- Lin, C. N., Chang, R. Y., Su, B. L., & Chueh, L. L. (2013). Full genome analysis of a novel type II feline coronavirus NTU156. *Virus Genes*, 46(2), 316-322.
- Liu, X., Yan, H., Lv, L., Xu, Q., Yin, C., Zhang, K., Hu, J. (2012). Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. *Asian-Australas J Anim Sci*, 25(5), 682-689.
- Liu, Y., Wang, J., & Wu, C. (2022). Modulation of gut microbiota and immune system by probiotics, pre-biotics, and post-biotics. *Frontiers in nutrition*, 8, 634897.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci*, 101(15), 5598-5603.
- M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.(1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, vol. 28, pp. 350–356.
- McDonagh, P., Sheehy, P. A., & Norris, J. M. (2015). Combination siRNA therapy against feline coronavirus can delay the emergence of antiviral resistance in vitro. *Vet Microbiol*, 176(1-2), 10-18.
- Megat Mazhar Khair, M. H., Selvarajah, G. T., Omar, A. R., & Mustaffa-Kamal, F. (2022). Expression of toll-like receptors 3, 7, 9 and cytokines in feline infectious peritonitis virus-infected CRFK cells and feline peripheral monocytes. *J Vet Sci*, 23(2), e27.
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit Rev Biotechnol*, 41(4), 609-627.
- Murphy, B. G., Perron, M., Murakami, E., Bauer, K., Park, Y., Eckstrand, C., Pedersen, N. C. (2018). The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. *Vet Microbiol*, 219, 226-233.
- Mehmeti, I., F. Kiran, & O. Osmanagaoglu. (2011). Comparison of three methods for



- determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *Afr J Adv Biotechnol* 10:2178-2185.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, 10, 21.
- Ng, S. W., Selvarajah, G. T., Cheah, Y. K., Mustaffa Kamal, F., & Omar, A. R. (2020). cellular metabolic profiling of CrFK cells infected with feline infectious peritonitis virus using phenotype microarrays. *pathogens (Basel)*, 9(5), 412.
- Olsen, C. W. (1993). A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol*, 36(1-2), 1-37.
- Peng, J. Y., Horng, Y. B., Wu, C. H., Chang, C. Y., Chang, Y. C., Tsai, P. S., Chang, H. W. (2019). Evaluation of antiviral activity of *Bacillus licheniformis*-fermented products against porcine epidemic diarrhea virus. *AMB Express*, 9(1), 191.
- Pletneva, L. M., Haller, O., Porter, D. D., Prince, G. A., & Blanco, J. C. G. (2008). Induction of type I interferons and interferon-inducible Mx genes during respiratory syncytial virus infection and reinfection in cotton rats. *J Gen Virol*, 89(Pt 1), 261-270.
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6).
- Rasimus-Sahari, S., Teplova, V. V., Andersson, M. A., Mikkola, R., Kankkunen, P., Matikainen, S., Salkinoja-Salonen, M. (2015). The peptide toxin amylosin of *Bacillus amyloliquefaciens* from moisture-damaged buildings is immunotoxic, induces potassium efflux from mammalian cells, and has antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol*, 81(8), 2939-2949.
- Reynolds, B. S., Poulet, H., Pingret, J. L., Jas, D., Brunet, S., Lemeter, C., Boucraut-Baralon, C. (2009). A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J Feline Med Surg*, 11(8), 633-644.
- Ritz, S., Egberink, H., & Hartmann, K. (2007). Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med*, 21(6), 1193-1197.
- Russell, P. H., & Jarrett, O. (1978). The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses. *Int J Cancer*, 21(6), 768-778.
- Sanchez-Leon, E., Bello-Morales, R., Lopez-Guerrero, J. A., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Girones, N., & Abrusci, C. (2020). Isolation and characterization of an exopolymer produced by *Bacillus licheniformis*: In vitro antiviral activity



- against enveloped viruses. *Carbohydr Polym*, 248, 116737.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(10), 605-616.
- Satish Kumar, C. S., Kondal Reddy, K., Boobalan, G., Gopala Reddy, A., Sudha Rani Chowdhary, C. H., Vinoth, A., Srinivasa Rao, G. (2017). Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium bifidum* 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Res Vet Sci*, 110, 40-46.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10), R453-462.
- Shen, Q., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. *Curr Microbiol*, 62(4), 1097-1103.
- Shyr, Z. A., Cheng, Y. S., Lo, D. C., & Zheng, W. (2021). Drug combination therapy for emerging viral diseases. *Drug Discov Today*, 26(10), 2367-2376.
- Stoeva, M. K., Garcia-So, J., Justice, N., Myers, J., Tyagi, S., Nemchek, M., Eid, J. (2021). Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1-28.
- Takano, T., Hohdatsu, T., Toda, A., Tanabe, M., & Koyama, H. (2007). TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*, 364(1), 64-72.
- Takano, T., Satoh, K., Doki, T., Tanabe, T., & Hohdatsu, T. (2020). Antiviral effects of hydroxychloroquine and type I interferon on in vitro fatal feline coronavirus infection. *Viruses*, 12(5).
- Takano, T., Wakayama, Y., & Doki, T. (2019). Endocytic pathway of feline coronavirus for cell entry: Differences in Serotype-Dependent Viral Entry Pathway. *Pathogens*, 8(4).
- Tanabe, T., Fukuda, Y., Kawashima, K., Yamamoto, S., Kashimoto, T., & Sato, H. (2021). Transcriptional inhibition of feline immunodeficiency virus by alpha-amanitin. *J Vet Med Sci*, 83(1), 158-161.
- Tanaka, Y., Tanabe, E., Nonaka, Y., Uemura, M., Tajima, T., & Ochiai, K. (2022). Ionophore antibiotics inhibit type II feline coronavirus proliferation in vitro. *Viruses*, 14(8).
- Tekes, G., & Thiel, H. J. (2016). Feline coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *Adv Virus Res*, 96, 193-218.

- Tonetti, F. R., Islam, M. A., Vizoso-Pinto, M. G., Takahashi, H., Kitazawa, H., & Villena, J. (2020). Nasal priming with immunobiotic lactobacilli improves the adaptive immune response against influenza virus. *Int Immunopharmacol*, 78, 106115.
- Torres, N. I., Noll, K. S., Xu, S., Li, J., Huang, Q., Sinko, P. J., Chikindas, M. L. (2013). Safety, formulation, and in vitro antiviral activity of the antimicrobial peptide subtilosin against herpes simplex virus type 1. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 5(1), 26-35.
- Tsai, C. Y., Hu, S. Y., Santos, H. M., Catulin, G. E. M., Tayo, L. L., & Chuang, K. P. (2021). Probiotic supplementation containing *Bacillus velezensis* enhances expression of immune regulatory genes against pigeon circovirus in pigeons (*Columba livia*). *J Appl Microbiol*, 130(5), 1695-1704.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., Thomas, S., Spiers, A. J., & Shanthi, S. (2014). Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Mar Biotechnol (NY)*, 16(6), 707-715.
- Wang, C., Meng, H., Gao, Y., Gao, H., Guo, K., Almazan, F., Abrahamyan, L. (2017). Role of transcription regulatory sequence in regulation of gene expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res*, 48(1), 41.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5).
- Weiss, R. C., Cox, N. R., & Martinez, M. L. (1993). Evaluation of free or liposome-encapsulated ribavirin for antiviral therapy of experimentally induced feline infectious peritonitis. *Res Vet Sci*, 55(2), 162-172.
- WoldemariamYohannes, K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y., Sun, B. (2020). Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Agric Food Chem*, 68(50), 14709-14727.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Lin, L., Borri, R., & Gao, X. (2015). Bacilysin overproduction in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 markerless derivative strains FZBREP and FZBSPA enhances antibacterial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(10), 4255-4263.
- Wu, Y., Wang, Y., Zou, H., Wang, B., Sun, Q., Fu, A., Li, W. (2017). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 induces autophagy to protect against pathogens in macrophages. *Front Microbiol*, 8, 469.

Wang, Y., Moon, A., Huang, J., Sun, Y., & Qiu, H. J. (2022). Antiviral effects and underlying mechanisms of probiotics as promising antivirals. *Front. cell. infect* 12, 928050.

