



畜牧兽医学报

Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica

ISSN 0366-6964, CN 11-1985/S

《畜牧兽医学报》网络首发论文

题目：盐霉素体外对猪流行性腹泻病毒的抑制效果
作者：马亚娟，苏恺，林依丹，王亚文，张亚楠，袁洪兴，袁晨，宋勤叶
收稿日期：2023-07-10
网络首发日期：2024-02-27
引用格式：马亚娟，苏恺，林依丹，王亚文，张亚楠，袁洪兴，袁晨，宋勤叶. 盐霉素体外对猪流行性腹泻病毒的抑制效果[J/OL]. 畜牧兽医学报. <https://link.cnki.net/urlid/11.1985.s.20240223.1421.010>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

盐霉素体外对猪流行性腹泻病毒的抑制效果



马亚娟¹, 苏 恺¹, 林依丹¹, 王亚文¹, 张亚楠¹, 袁洪兴², 袁 晨^{1*},

宋勤叶^{1*}

(1. 河北农业大学动物医学院, 保定 071000; 2. 馆陶县农业农村局, 邯郸 057750)

摘 要: 猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种以水样腹泻、呕吐和脱水为主要特征的猪肠道传染病, 给全球养猪业造成巨大的经济损失, 但目前仍无有效的疫苗和治疗药物。盐霉素 (salinomycin, SLM) 是一种常用的抗生素, 具有不易产生耐药性、排泄迅速、残留量极低的优点。为明确 SLM 对 PEDV 的抑制作用, 首先通过 TCID₅₀ (tissue culture infective dose) 检测 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖规律, 进一步经 CCK-8 试验和细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 测定 SLM 的半数细胞毒性浓度 (half-cytotoxic concentration, CC₅₀) 和其对 PEDV 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀), 最后建立 SLM、PEDV 和 Vero 细胞的作用模型, 利用 RT-qPCR、免疫印迹 (Western blot, WB) 和间接免疫荧光 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 技术检测 SLM 对 PEDV 复制周期的影响。结果表明 PEDV 感染 Vero 细胞后 24 h 病毒滴度最高 ($10^{7.7}$ ·mL⁻¹); SLM 对 Vero 细胞的 CC₅₀ 为 $7.698 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 PEDV 的 IC₅₀ 为 $1.617 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 随着 SLM 浓度的增加, PEDV 滴度、N 蛋白和 N 基因 mRNA 的表达量逐渐下降; SLM 抑制 PEDV 的复制阶段, 对病毒的吸附、入侵和释放阶段无明显影响。该研究结果可以为进一步挖掘 PEDV 抑制药物提供新思路。

关键词: PEDV CV777 毒株; Vero 细胞; 盐霉素; 复制周期

中图分类号: R978.7

文献标志码: A

The Inhibitory Effect of Salinomycin on Porcine Epidemic Diarrhea Virus *in vitro*

MA Yajuan¹, SU Kai¹, LIN Yidan¹, WANG Yawen¹, ZHANG Yanan¹, YUAN Hongxing²,

YUAN Chen^{1*}, SONG Qinye^{1*}

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 河北省自然科学基金-青年科学基金项目 (C2022204136)

作者简介: 马亚娟 (1998-), 女, 河北定州人, 硕士生, 主要从事动物传染病与新型生物制品方面的研究,

E-mail: 848322670@qq.com

*通信作者: 袁 晨, 主要从事动物传染病致病机制和动物黏膜免疫方面的研究, E-mail:

yuanchen060624@163.com; 宋勤叶, 主要从事动物传染病与新型生物制品方面的研究, E-mail:

songqinye@126.com

(1. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Guantao County Agriculture and Rural Bureau, Handan 057750, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea (PED) is a porcine intestinal infectious disease caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), characterized by watery diarrhea, vomiting and dehydration. It has caused huge economic losses to the global pig industry, but there are still no effective vaccines and treatments. Salinomycin (SLM) is a commonly used antibiotic with the advantages of low resistance, rapid excretion and very low residue. To explore the inhibitory effect of SLM on PEDV, firstly, the proliferation pattern of PEDV on Vero cells was detected by TCID₅₀, and then the CC₅₀ and IC₅₀ of SLM were measured by CCK-8 test and cytopathic effect (CPE). Finally, the co-culture models of SLM, PEDV and Vero cell were established. The effects of SLM on the replication cycle of PEDV were determined by RT-qPCR, WB and IFA. The results showed that the highest virus titer ($10^{7.7}$ mL⁻¹) was observed in Vero cells at 24 hours after PEDV infection. The CC₅₀ of SLM on Vero cells was 7.698 μmol·L⁻¹, and the IC₅₀ for PEDV was 1.617 μmol·L⁻¹. The study showed that viral titer, N protein and N gene mRNA expression of PEDV gradually decreased with the increase of SLM concentration. SLM mainly inhibited the replication phase of PEDV, and had no significant effect on the adsorption, invasion and release phases of the virus. The research results could provide new ideas for further exploring PEDV inhibitory drugs.

Key words: PEDV CV777; Vero; salinomycin; replication cycle

*Corresponding author: YUAN Chen, E-mail: yuanchen060624@163.com; SONG Qinye, E-mail: songqinye@126.com

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种肠道传染性疾病^[1], 该病毒可感染所有年龄段的猪, 但 7 日龄以内的仔猪最易感, 主要引起仔猪急性腹泻、呕吐、脱水甚至死亡, 发病率和死亡率可高达 100%。自 2010 年以来, PEDV 变异毒株引起的仔猪腹泻呈现新的流行特征, 即使免疫过 PEDV 疫苗的猪场也未能幸免, 给养猪业造成了巨大的经济损失, 因此, 当务之急是采取有力的措施加强对 PED 的防控。

目前 PED 的防控除了加强饲养管理外, 主要以疫苗预防为主, 但由于病毒的高变异性, 现有疫苗已不能提供足够的保护力, 因此, 开发可抑制 PEDV 感染的药物迫在眉睫。PEDV 与经典冠状病毒生命周期一致^[2-3], 该病毒的 S 蛋白与宿主细胞表面的受体结合并吸附, 从而启动病毒粒子的生命周期^[4-5]。PEDV 基因组与细胞核糖体结合后翻译非结构蛋白 (Non-

structural protein 1-16, nsp1-16) 和逆转录复合物 (reverse transcription complex, RTC), 不连续的基因组可翻译结构蛋白: 纤突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白)、包膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)、核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N 蛋白) 和辅助蛋白 (ORF3 蛋白)。与 N 蛋白结合的病毒基因组在内质网-高尔基体中间区室 (ERGIC) 进行组装并进入含有病毒结构蛋白 (S、E 和 M 蛋白) 的 ERGIC 膜, 导致成熟病毒体的形成, 完成病毒粒子的复制过程, 最后病毒粒子经细胞膜以胞吐的方式释放到细胞外, 又可开始新一轮的感染^[6]。尽管目前国内外科研者针对 PEDV 生命周期的不同阶段已发现多种能够抑制 PEDV 活性的抗病毒药物, 但多数正处于实验室的研究阶段, 尚未获得批准。

盐霉素 (salinomycin, SLM) 又名沙利霉素, 1968 年首次由日本科研株式会社发现的一元羧酸聚醚类广谱抗生素^[7-8], 其对癌症^[9-10]、球虫原虫^[11]、革兰阳性细菌和耐药菌株^[12]都具有抑制活性。SLM 作用之多的原因可能是因为它可以参与多种信号通路的调节, 例如, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[13]和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路^[14], 启动细胞的自噬^[15], 降低三磷酸腺苷 (ATP) 的水平, 促进活性氧 (ROS) 的产生^[16], 触发 DNA 损伤和预防 DNA 修复^[17], 抑制核转录因子 (NF- κ B) 信号通路^[18]。以上信号通路和病毒感染靶细胞后的增殖密切相关, 说明 SLM 可能是一种抗病毒候选药物, 然而 SLM 对 PEDV 的抑制效果尚不清楚。

本研究旨在探索 SLM 体外对 PEDV 的抑制效果及其对病毒复制周期的影响, 为 SLM 作为一种新的抗 PEDV 药物的开发提供理论支持, 并为后期 SLM 抑制 PEDV 感染机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和主要试剂

非洲绿猴肾细胞 (Vero)、PEDV CV777 毒株均由本实验室保存。MEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS)、胰酶 (TRYPsin/EDTA) 购自 Multicell 公司; PEDV N 蛋白单克隆抗体由本实验室制备并保存; 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、ECL 化学发光超敏显色试剂盒购自翌圣公司; HRP-山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自博奥龙公司; CCK-8 试剂盒购自 biosharp 公司; 2×AugeGreen Master Mix 购自 UE 公司; 盐霉素购自 MCE 公司。

1.2 病毒滴度的测定

将 Vero 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 置于 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱中, 待细胞长到 90% 后, 每孔接种 100 μ L 倍比稀释 (10^{-2} ~ 10^{-7}) 的 PEDV 病毒液, 接毒后 72 h 统计细胞病

变效应 (cytopathic Effect, CPE)。用 Reed-Muench 两式法计算病毒滴度 (TCID₅₀)。

1.3 病毒生长曲线的测定

将 Vero 细胞接种于细胞培养皿,待细胞长到 90%,将细胞上清液换为维持液培养 12 h,吸出细胞上清液,用 0.01 mol·L⁻¹ pH 7.2~7.4 的 PBS 洗涤细胞,然后感染 0.5 MOI PEDV,对照组加入等量维持液,37°C 孵育 2 h 后更换新维持液继续培养,最后收集感染后 1、12、24、48、60 h 的病毒液,测定病毒的 TCID₅₀。

1.4 RT-qPCR

使用 Trizol 法提取总 RNA,取病毒液和 TriQuick Reagent 混匀后静置,加入三氯甲烷分离有机相和无机相,离心后取上清,加入等量异丙醇萃取 RNA,使用经 DEPC 水处理的 75% 酒精洗去残留的异丙醇,加入 9.5 μL 无 RNA 酶水重悬管底核酸,按试剂盒说明书进行反转录后,使用 SYBE Green 染料法检测。其中,RT-qPCR 反应体系如下:1 μL cDNA,10 μL 2×AugeGreen qPCR Master Mix,上、下游引物各 0.5 μL,8 μL 无菌纯化水。扩增条件为酶激活 95°C 120 s,然后采用三步法,即 95°C 5 s,56°C 5 s,72°C 25 s,共进行 45 次循环,每个样品重复 3 次。

1.5 免疫印迹 (Western blot, WB)

待 Vero 细胞长满单层后首先用 PEDV 感染或 SLM 处理细胞,然后用预冷的 PBS 洗涤细胞,再用含有蛋白酶抑制剂混合物的 WB 裂解缓冲液裂解,4°C 离心后收集上清液,加入上样缓冲液,混匀后 105°C 变性 10 min,然后用 SDS-PAGE 分离蛋白样品,并转移到 PVDF 膜上,再用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液在室温将 PVDF 膜封闭 2 h,然后加入 PEDV N 蛋白单克隆抗体 (1:500)、小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:10 000) 4°C 孵育过夜,再用 TBST 洗涤 PVDF 膜,然后加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG (1:10 000) 室温孵育 1.5 h,再次洗膜后用 ECL 发光液检测目的蛋白。

1.6 间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescent assay, IFA)

将 Vero 细胞接种于 96 孔细胞培养板,待单层细胞长到 90% 后用 PBS 洗涤细胞并分组,首先用冰冷的甲醇于 -20°C 固定细胞 10 min,然后用 PBS 洗涤,使用 2% BSA-PBS 溶液 37°C 封闭 1 h,然后弃上清,加入 PEDV N 蛋白单克隆抗体 (1:200) 37°C 孵育 1 h,再用 PBS 洗涤后加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:500) 37°C 孵育 45 min,再次用 PBS 洗涤后加入 DAPI 染色溶液 (Bisben Iimde) 室温避光显色,洗涤后拍干,最后用荧光显微镜观察结果并拍照,使用 Image J 统计阳性细胞率。阳性细胞率 (%) = 阳性细胞数/总细胞数 × 100。

1.7 半数细胞毒性浓度 (CC₅₀) 的测定

待 96 孔细胞培养板中长满单层 Vero 细胞后用 PBS 洗涤细胞并分组, 然后用不同浓度 SLM 处理细胞, 并设置只含营养液而没有细胞的孔作为空白对照, 继续培养 24 h。根据增强型 CCK-8 细胞活性试剂盒说明书, 每孔加入 10 μL 工作液后再置于 37°C 孵育 1 h, 最后使用酶标仪读取 OD_{450 nm} 值。

$$\text{细胞活力}(\%) = (\text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{天然产物孔} - \text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{空白对照}) / (\text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{阴性对照} - \text{OD}_{450 \text{ nm}} \text{空白对照}) \times 100。$$

将细胞活力与药物浓度的数据导入到 GraphPad Prism 5.0 中, 使用 Analyze 下的 transform 功能, 转换成细胞活力与 lg (药物浓度) 的关系, 进一步使用 Analyze 下的 XY analyses 的 Nonlinear regression 非线性拟合功能, 利用 log (inhibitor) vs. response - Variable slope (four parameters) 选项, 得到拟合曲线和 CC₅₀ 值。

1.8 半数抑制浓度 (IC₅₀) 的测定

待 96 孔细胞培养板中长满单层的 Vero 细胞后用 PBS 洗涤细胞, 然后用不同浓度 SLM 处理细胞, 每个浓度重复 8 个孔, 每孔加入 100 μL 含有相应 SLM 浓度的维持液预处理细胞 1 h, 弃掉孔内液体, 再用含有 0.2 MOI PEDV 和相应 SLM 浓度的混合液处理细胞 1 h, 并设置仅含有维持液的阴性对照孔和仅接毒不加药的阳性对照孔, 最后将孔内液体更换为含有相应 SLM 浓度的维持液继续培养 72 h, 肉眼观察 CPE 并统计。

抑制率 (%) = $(1 - \text{FL}_{\text{天然产物孔}} / \text{FL}_{\text{阴性对照}}) \times 100$ 。将抑制率与药物浓度的数据导入到 GraphPad Prism 5.0 中, 使用 Analyze 下的 transform 功能, 转换成抑制率与 lg (药物浓度) 的关系, 进一步使用 Analyze 下的 XY analyses 的 Nonlinear regression 非线性拟合功能, 利用 lg (inhibitor) vs. response-Variable slope (four parameters) 选项得到拟合曲线和 IC₅₀ 值。

1.9 SLM 对 PEDV 增殖的抑制作用

将 Vero 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 待长满单层细胞后, 弃上清, 用 PBS 洗涤细胞加入含有不同 SLM 浓度 (0.05、0.5、5 μmol·L⁻¹) 的维持液, 在 37°C 培养箱预处理细胞 1 h, 随后用 PBS 洗涤细胞, 再用 0.2 MOI PEDV 感染细胞 1 h, 然后将病毒液更换为含有相应 SLM 浓度的维持液, 继续培养 24 h, 收集细胞上清液测定 TCID₅₀, 提取核酸和蛋白用于测定病毒 N 基因水平和 N 蛋白含量, IFA 观察病毒分布并计算阳性细胞率。

1.10 SLM 对 PEDV 复制周期的影响

1.10.1 SLM 对病毒粒子的作用 将 Vero 细胞接种于 12 孔细胞培养板, 待细胞长到 90% 后, 将以下四管溶液 (A: 0.2 MOI PEDV 和 5 μmol·L⁻¹ SLM 混合液, B: 0.2 MOI PEDV 稀释液, C: 维持液, D: 5 μmol·L⁻¹ SLM 稀释液) 各设置两组, 分别放置在培养箱中作用 3 h

和 5 h, 将以上溶液接种于 Vero 细胞, 然后置于 37°C 孵育 1 h, 用 PBS 洗涤细胞, 再加入维持液继续培养 12 h, 然后收集病毒液, 提取核酸, RT-qPCR 检测 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平。通过比较 SLM 处理组与 PEDV 感染组的 PEDV *N* 基因 mRNA 水平的高低, 判断 SLM 是否对 PEDV 病毒粒子具有直接灭活作用。

1.10.2 SLM 对病毒吸附的影响 将 Vero 细胞接种到 12 孔细胞培养板, 待细胞长到 90% 后, 用含有 0 或 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SLM 的维持液在 37°C 预处理细胞 1 h, 然后用含有 0.2 MOI PEDV 和相应 SLM 浓度的混合液在 4°C 处理细胞 15、30 和 60 min, 再用冰冷的 PBS 洗涤后收集细胞, 提取核酸, 使用 RT-qPCR 检测细胞中 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平。通过比较同一时间段 SLM 处理组与 PEDV 感染组的 PEDV *N* 基因 mRNA 水平的相对高低, 判断 SLM 是否影响病毒的吸附。

1.10.3 SLM 对病毒入胞的影响 将 Vero 细胞接种到 12 孔细胞培养板, 待细胞长到 90% 后, 首先将细胞板放入 4°C 预冷, 然后用 0.2 MOI PEDV 在 4°C 感染细胞 2 h, 再更换含有 0 或 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SLM 的维持液, 37°C 继续孵育 0.5、1 和 2 h, 用预冷的 PBS 洗涤细胞, 以去除未入胞的病毒, 最后收集细胞, 提取核酸, 使用 RT-qPCR 检测 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平。通过比较 SLM 处理组与 PEDV 感染组的 PEDV *N* 基因 mRNA 水平的相对高低, 判断 SLM 是否影响 PEDV 的入胞。

1.10.4 SLM 对病毒复制的影响 将 Vero 细胞接种于 12 孔细胞培养板, 待细胞长到 90% 后, 将细胞上清液更换为含有 0.2 MOI PEDV 的维持液, 在 37°C 培养箱中孵育 1 h, 用 PBS 洗涤细胞后补充维持液, 继续在 37°C 培养箱中培养, 在接毒后 4 h 将培养基更换为含有 0 或 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SLM 的维持液, 置于 37°C 继续孵育 2、4 和 6 h, 然后用 PBS 洗涤细胞, 收集细胞后提取 RNA, 并反转录成 cDNA, RT-qPCR 检测 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平。通过比较 SLM 处理组与 PEDV 感染组的 PEDV *N* 基因 mRNA 水平的相对高低, 判断 SLM 是否影响病毒的复制。

1.10.5 SLM 对病毒释放的影响 将 Vero 细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 待细胞长到 90% 后, 用 0.2 MOI PEDV 在 37°C 感染细胞 1 h, 然后更换为维持液继续培养 10 h, 再将培养基更换为含有 0 或 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SLM 的维持液继续孵育 0.5、1 和 2 h 后收集样品, 提取核酸, RT-qPCR 检测 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平。通过比较 SLM 处理组与 PEDV 感染组的 PEDV *N* 基因 mRNA 水平的相对高低, 判断 SLM 是否影响 PEDV 的释放。

1.11 统计学分析

所有试验至少重复 3 次, 使用 SPSS 26 软件对数据进行统计分析, 并使用 GraphPad Prism

5.0 软件作图，结果表示为平均值±标准偏差。使用单因素方差分析（ANOVA）检查组间差异的统计显著性。图中星号表示显著差异（* $P < 0.05$ 表示差异显著；** $P < 0.01$ 表示差异非常显著；*** $P < 0.001$ 表示差异极显著；ns 代表差异不显著）。

2 结果

2.1 PEDV 的 TCID₅₀ 及其在 Vero 细胞上的生长曲线

用 Reed-Muench 两式法测定 PEDV 感染 Vero 细胞不同时间的 TCID₅₀，绘制病毒生长曲线，结果如图 1 所示，PEDV 感染细胞后 24 h 病毒滴度最高，约 $10^{7.7}$ ·mL⁻¹，随后病毒滴度缓慢下降，感染后 60 h 的 TCID₅₀ 约 $10^{7.2}$ ·mL⁻¹。

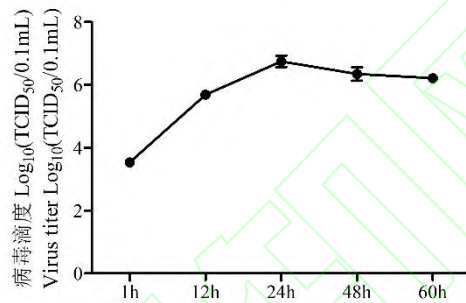


图 1 PEDV 在 Vero 细胞上的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of PEDV on Vero cells

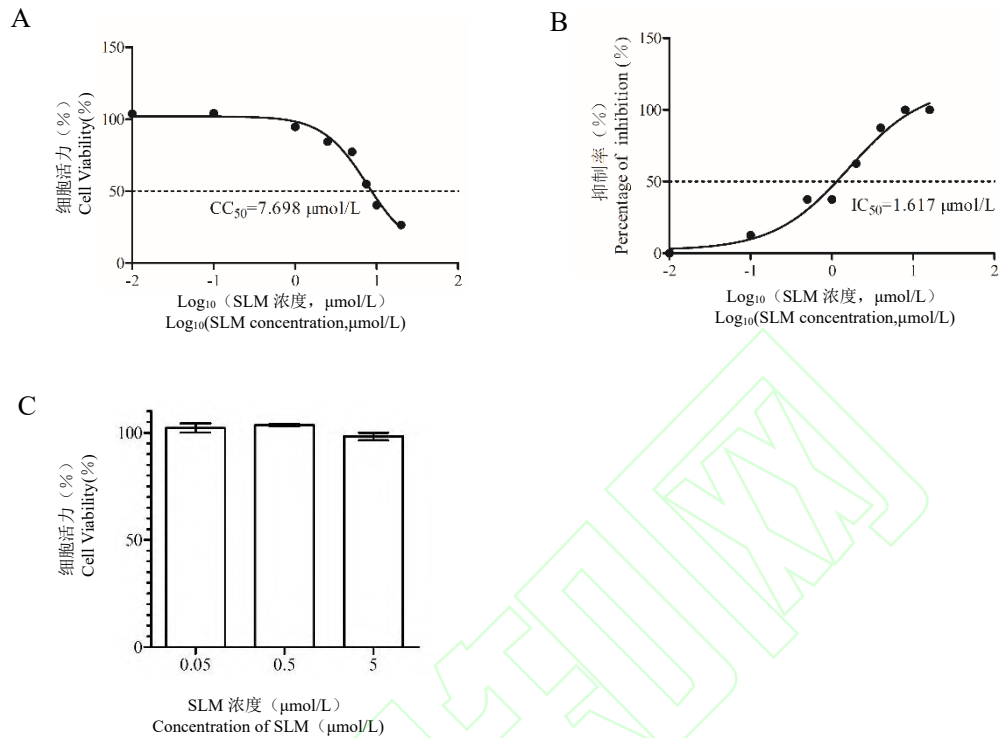
2.2 CC₅₀ 和 IC₅₀

为了确定后期试验所使用的 SLM 浓度，首先使用 CCK-8 试剂盒测定不同 SLM 浓度下的细胞活力，结果表明 SLM 的 CC₅₀ 为 $7.698 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （图 2A）；经统计不同浓度 SLM 处理组的 CPE，结果表明 SLM 对 PEDV 的 IC₅₀ 为 $1.617 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （图 2B）。同时，经 CCK-8 试剂盒测定所用 SLM 浓度（0.05、0.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）处理后的细胞活力，结果如图 2C 所示，以上浓度的 SLM 对 Vero 细胞活力无影响。

2.3 SLM 对 PEDV 增殖的抑制作用

如图 3A 所示，为 PEDV 感染和 SLM 作用示意图，为了进一步确认 SLM 对 PEDV 增殖的影响，使用 RT-qPCR、病毒滴度测定、WB、IFA 多种技术进行检测。WB 和 RT-qPCR 结果显示，与 PEDV 感染组相比，SLM 能够显著降低 PEDV N 蛋白和 N 基因的表达和转录（ $P < 0.01$ ）（图 3B 和图 3C）。病毒滴度的结果显示，与 PEDV 感染组相比，SLM 可以显著降低病毒含量（ $P < 0.01$ ）（图 3D）。IFA 的结果表明，PEDV 感染组的绿色阳性细胞最多，而随着 SLM 含量的增加，阳性细胞逐渐减少（图 3-E）；与 PEDV 感染组相比，不同浓度

SLM (0.05、0.5、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组的阳性细胞率均显著降低, 且差异极显著 ($P < 0.001$) (图 3-F)。

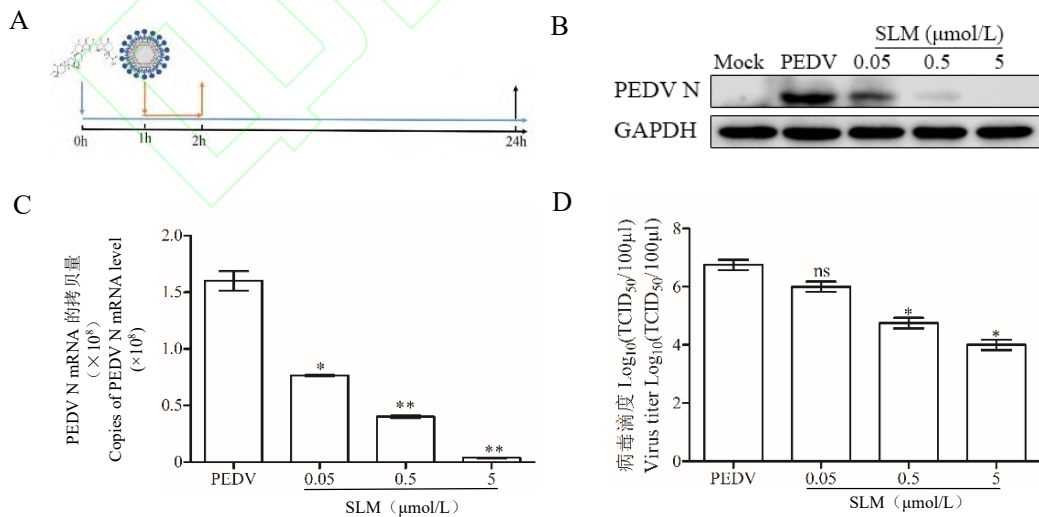


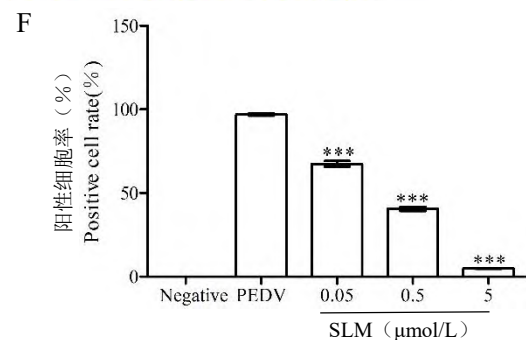
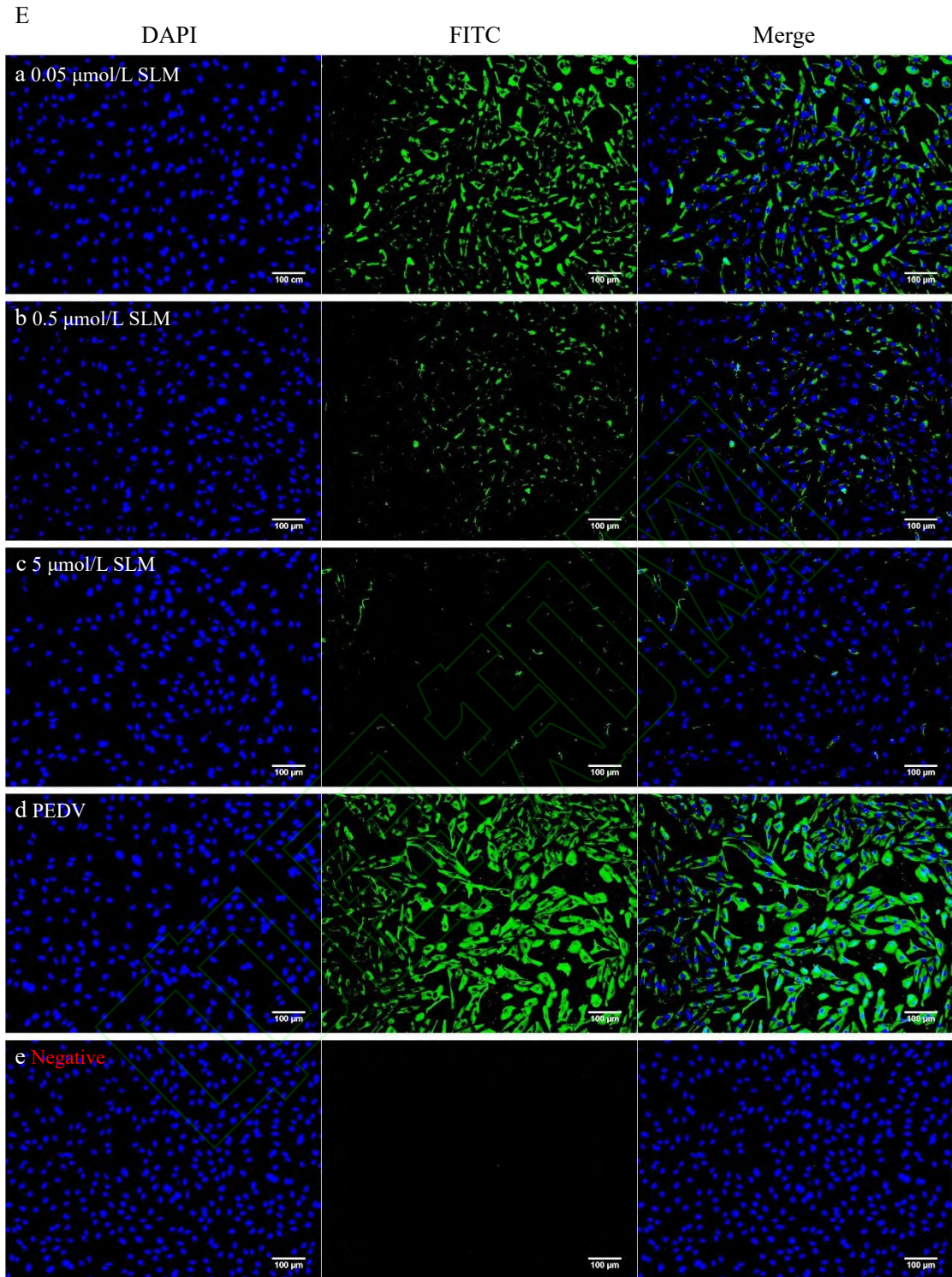
A. CC₅₀的测定; B. IC₅₀的测定; C. SLM对Vero细胞活力的影响

A. Determination of CC₅₀; B. Determination of IC₅₀; C. Effects of SLM on Vero cell viability

图2 SLM对Vero和PEDV的影响

Fig. 2 The impact of SLM on Vero and PEDV





A. 病毒感染和药物作用示意图；B. PEDV N 蛋白翻译水平；C. PEDV N 基因转录水平；D. 病毒粒子释放水平；E. IFA 检测 SLM 对 PEDV 感染 Vero 细胞的抑制率；F. Image J 测定阳性细胞率

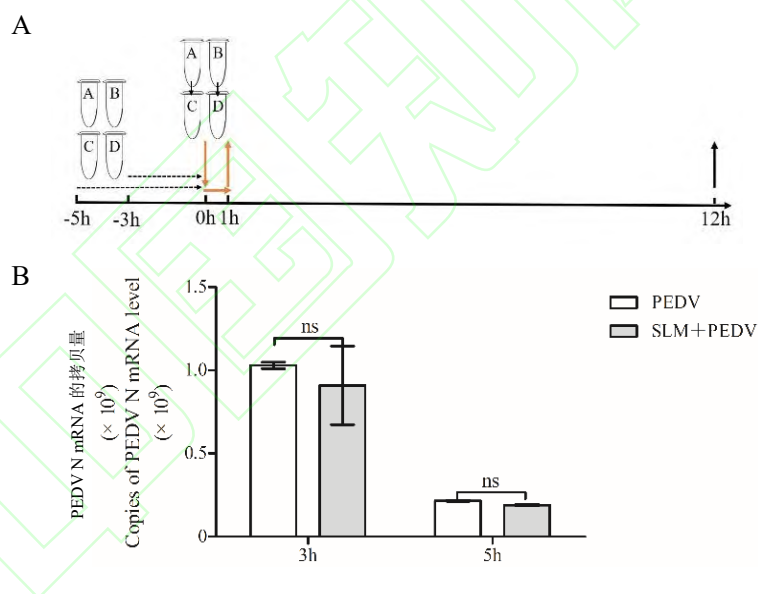
A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. PEDV N protein translation level; C. PEDV N gene transcription level; D. The level of virion release; E. Detection of inhibition rate of SLM on PEDV-infected Vero cells by IFA; F. determination of positive cell rate by Image J

图 3 SLM 抑制 PEDV 在 Vero 上增殖

Fig. 3 SLM inhibited PEDV proliferation in Vero

2.4 SLM 对 PEDV 复制周期的影响

2.4.1 SLM 不能直接作用于 PEDV SLM 和 PEDV 直接作用的方式如图 4A 所示，RT-qPCR 测定各组的核酸含量并进行统计学分析，结果如图 4B 所示，分别比较 SLM 与 PEDV 作用不同时间段后的结果，SLM 处理组与 PEDV 感染组的病毒 mRNA 水平在统计学上差异不显著 ($P > 0.05$)，表明 SLM 不能直接作用于 PEDV。



A. 病毒感染和药物作用示意图；B. RT-qPCR 检测 PEDV 感染和 SLM 处理后 N 基因水平

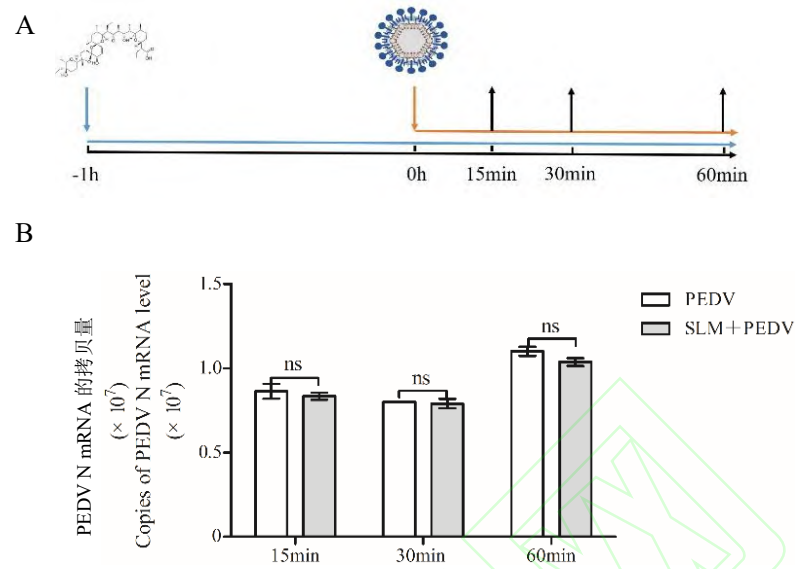
A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. The N gene level was detected by RT-qPCR after PEDV infection and SLM treatment

图 4 SLM 对 PEDV 病毒粒子的影响

Fig. 4 Effect of SLM on PEDV

2.4.2 SLM 不影响 PEDV 吸附 SLM 作用于 PEDV 吸附阶段的过程如图 5A 所示，在病毒吸附的同时加入 SLM，孵育相应的时间后 SLM 处理组与 PEDV 感染组相比，PEDV N 基因 mRNA 水平没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 5B)，表明 SLM 对 PEDV 的吸附没有显著影

响。



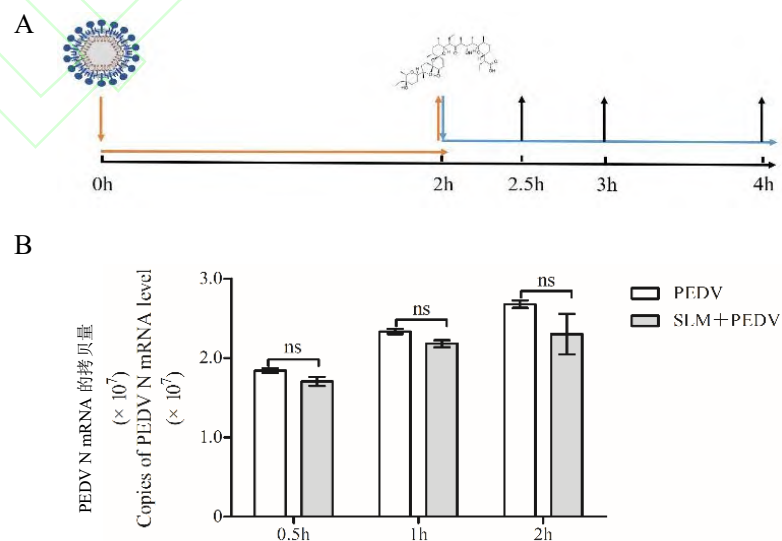
A. 病毒感染和药物作用示意图； B. RT-qPCR 检测 PEDV 吸附阶段加入 SLM 后 PEDV *N* 基因水平

A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. The PEDV *N* gene level was detected by RT-qPCR after the addition of SLM in PEDV adsorption stage

图 5 SLM 对 PEDV 吸附 Vero 细胞的影响

Fig. 5 Effect of SLM on PEDV adsorption of Vero cells

2.4.3 SLM 不影响 PEDV 入胞 如图 6A 所示，在 PEDV 入侵细胞阶段加入 SLM，孵育相应的时间后 SLM 处理组与 PEDV 感染组相比，细胞内 PEDV *N* 基因 mRNA 水平无显著差异 ($P > 0.05$) (图 6B)，表明 SLM 对 PEDV 的入胞没有显著影响。



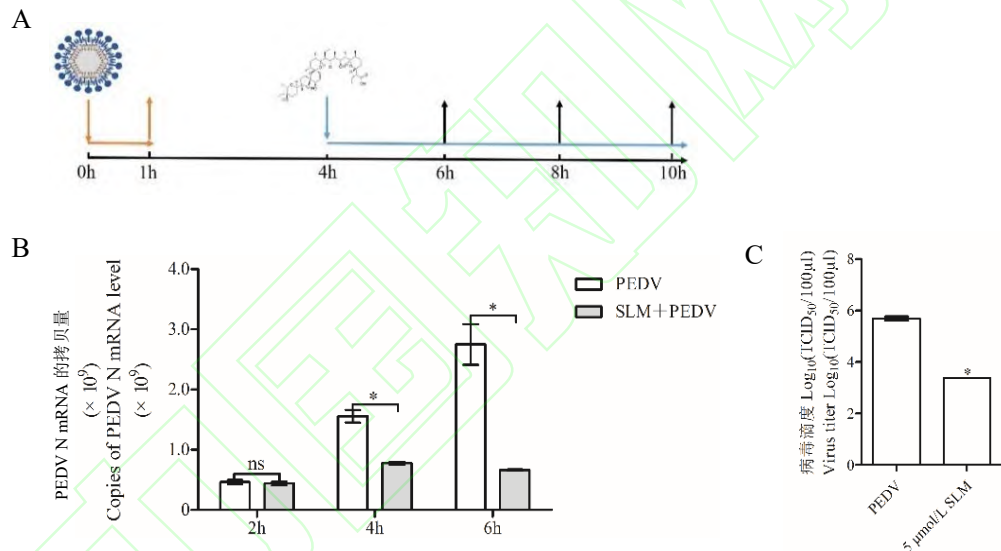
A. 病毒感染和药物作用示意图; B. RT-qPCR 检测 PEDV 入胞阶段加入 SLM 后 PEDV *N* 基因水平

A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. The PEDV *N* gene level was detected by RT-qPCR after the addition of SLM in PEDV entry stage

图 6 SLM 对 PEDV 入侵 Vero 细胞的影响

Fig. 6 Effect of SLM on PEDV entry Vero cells

2.4.4 SLM 抑制 PEDV 复制阶段 SLM 作用于 PEDV 复制阶段的过程如图 7A 所示, 在病毒复制阶段加入 SLM, 孵育 4 或 6 h 后, SLM 处理组与 PEDV 感染组之间 PEDV *N* 基因的 mRNA 水平差异显著 ($P < 0.05$) (图 7B), 病毒滴度的结果表明在病毒复制阶段加入 SLM 可以显著降低细胞内病毒粒子的数量 ($P < 0.05$) (图 7C), 以上结果均表明 SLM 影响 PEDV 的复制阶段。



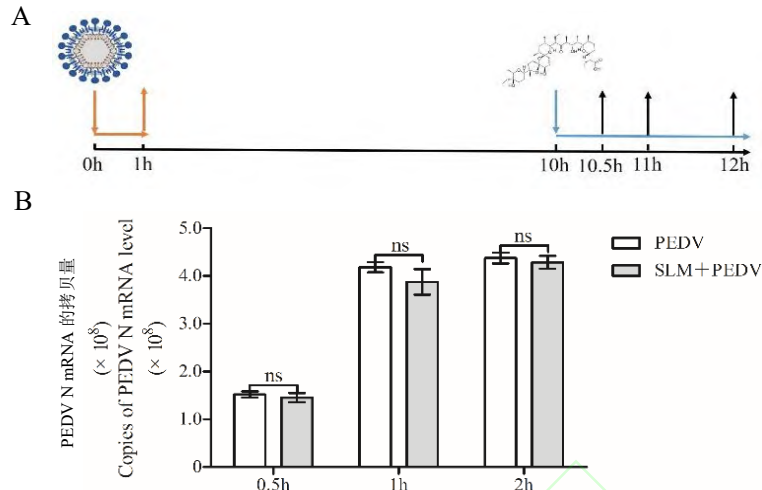
A. 病毒感染和药物作用示意图; B. RT-qPCR 检测 PEDV 复制阶段加入 SLM 后 PEDV *N* 基因水平; C. 病毒粒子释放水平

A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. The *N* gene level was detected by RT-qPCR after the addition of SLM in PEDV replication stage; C. Level of virion release

图 7 SLM 对 PEDV 在 Vero 细胞中复制的影响

Fig. 7 Effect of SLM on PEDV replication in Vero cells

2.4.5 SLM 不影响 PEDV 释放 如图 8A 所示, 在 PEDV 释放阶段加入 SLM, 孵育相应时间后 SLM 处理组与 PEDV 感染组之间的病毒含量没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 8B), 表明 SLM 对 PEDV 的释放没有显著影响。



A. 病毒感染和药物作用示意图；B. RT-qPCR 检测 PEDV 释放阶段加入 SLM 后 N 基因水平

A. Schematic diagram of viral infection and drug action; B. The N gene level was detected by RT-qPCR after the addition of SLM in PEDV release stage

图 8 SLM 对 PEDV 从 Vero 细胞释放的影响

Fig. 8 Effect of SLM on PEDV release from Vero cells

3 讨论

PED 一直是困扰养猪业的一大问题，尽管疫苗免疫是防控 PEDV 感染的有效措施，但随着 PEDV 变异株的出现，经典 PEDV 毒株的疫苗根本无法控制新毒株的致病性^[19]。同时临床上尚无治疗 PEDV 感染的特效药，但现已发现有效的抗病毒药物可以在预防性治疗中发挥重要作用，因此，临床上迫切需要开发抗 PEDV 药物。回顾文献可知 PEDV 吸附和侵入靶细胞的时间为 30~60 min，PEDV 侵入细胞完成一个生命周期大约需要 6 h^[20]。已有研究者针对病毒感染过程中的各个阶段筛选或设计了新型抗病毒药物。例如，槲皮素(Quercetin)可以通过抑制 PEDV 3C 样蛋白酶 (3C-like protease, 3CLpro) 的活性来抑制 PEDV 在 Vero 细胞中的复制^[21]，甘草中的甘草甜素 (glycyrrhizin, GLY) 提取物可以通过依赖 HMGB1/TLR4-MAPK p38 途径来阻止高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的结合，从而抑制 PEDV 的感染^[22]。金鸡宁 (cinchonine) 可以对 PEDV 生命周期的早期阶段表现出显著的抗病毒活性^[23]，Buddlejasaponin IVb 主要抑制 PEDV 的复制和释放阶段^[24]，Epigallocatechin-3-Gallate 可以抑制 PEDV 吸附、入侵和复制等生命环节^[25]，Griffithsin 通过抑制 PEDV 的吸附来抑制病毒的感染^[26]，番茄碱 (Tomatidine) 可通

过靶向 3CLpro 并抑制其蛋白活性来减少 PEDV 的复制^[27]。在本研究中, 作者发现 SLM 以剂量依赖的方式显著抑制 PEDV 的复制, 基于病毒生命周期筛选抗病毒药物, 为其后期抗病毒机制的研究奠定了基础。

药物对病毒的抑制作用不仅与药物作用机制有关, 还与病毒增殖特性有关。SLM 对甲型和乙型流感病毒表现出一致的抑制作用, 其主要作用于流感病毒生命周期的早期阶段, 在流感病毒侵入过程中限制了病毒核蛋白 (NP) 的核迁移, 进而破坏内体酸化。同时 SLM 能够阻断病毒基质蛋白 2 (M2) 的质子通道活性, 因此, SLM 可以通过影响流感病毒脱壳的关键步骤进而抑制病毒增殖^[28]。PEDV 与流感病毒同属于 RNA 病毒, 其复制过程相似, SLM 是否也通过该机制抑制 PEDV 增殖还有待探究。Wnt/ β -catenin 信号通路属于 Wnt 经典信号通路, 该通路在细胞迁移、遗传稳定性和凋亡中具有重要作用^[29-30]。据报道, 多种病毒在感染宿主细胞后均可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 使 β -catenin 的含量增加, 进而影响病毒的增殖^[31]。Zhu 等^[32]发现, 当 β -catenin 的含量受到抑制后, 可降低牛疱疹 I 型病毒 (BoHV-1) 的增殖。左叶雯^[31]研究发现细胞内 β -catenin 表达量增加后, 进而抑制 N 蛋白的表达发挥抗 PEDV 的作用。SLM 是 Wnt/ β -catenin 信号传导的有效抑制剂, 可以通过阻断 Wnt/ β -catenin 通路抑制肿瘤的生长^[33], 因此, SLM 可能通过调控 β -catenin 发挥抗病毒作用。

PEDV 属于冠状病毒科、冠状病毒属, 目前治疗冠状病毒感染的药物主要包括广谱抗病毒药、靶向病毒核酸的抗病毒药和靶向病毒关键复制酶的抗病毒药等。聚醚离子载体属于广谱抗病毒药, 据报道, 其对人体免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)^[12]、流感病毒 (influenza virus, IV)^[28]、寨卡病毒 (Zika virus, ZV)^[34]和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[35-37]具有抗病毒活性。SLM 是一种聚醚离子载体类的广谱抗生素, 已经是欧洲食品和药品管理局 (EFSA 和 EMEA) 批准用于动物饲料的药物, 在正常的喂养剂量下, SLM 不会在动物中引起明显的异常, 在动物的治疗水平上通常是安全有效的^[38]。SLM 常用于动物饲料中, 以预防球虫病, 提高家禽和牛的饲料效率, 还可作为仔猪、育肥猪的新一代离子型促生长剂, 其作用机制主要是通过干扰有害微生物, 进而改善饲料转化率, 提高营养物质的吸收, SLM 对动物机体来说是相对安全的, 严格控制其用量即可发挥预防疾病的作用, 方便临床应用^[38, 39]。与新的抗病毒治疗化合物的开发相比, 针对 PEDV 的药物再利用是一种有价值的战略, 因为其成本更低, 审批时间更快。因此, 选取 SLM 作为 PEDV 的治疗药物进行研究大大缩短了新药研发周期, 节省了人力、物力、财力。

本研究以 PEDV 感染 Vero 细胞为体外模型, 在病毒生命周期的吸附、入侵、复制和释

放四个不同阶段添加 SLM, 发现 SLM 显著抑制 PEDV 在 Vero 细胞中复制的过程, 而对病毒吸附、入侵和释放阶段没有显著的影响。此外, SLM 体外抑制 PEDV 复制的机制和 SLM 在体内的抗 PEDV 效果需进一步探讨。本研究结果为 PEDV 的防治提供新的策略。

4 结 论

SLM 以剂量依赖的方式显著抑制 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖, 并且其主要作用于 PEDV 的复制阶段, 而对 PEDV 的吸附、入侵和释放阶段没有显著影响。

参考文献(References):

- [1] 邝燕齐, 莫梅君, 何红玲, 等. PEDV N蛋白单克隆抗体的制备及间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5):27-35.
KUANG Y Q, MO M J, HE H L, et al. Preparation of monoclonal antibody against N protein of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of indirect immuno-fluorescence assay[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(5):27-35. (in Chinese)
- [2] STADLER K, MASIGNANI V, EICKMANN M, et al. SARS-beginning to understand a new virus[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1(3):209-218.
- [3] CHI S S, CHEN S, JIA W J, et al. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus[J]. *Virus Genes*, 2022, 58(6):491-500.
- [4] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus:an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology*, 2015, 52:193.
- [5] WEI X N, SHE G L, WU T T, et al. PEDV enters cells through clathrin-, caveolae-, and lipid raft-mediated endocytosis and traffics via the endo-/lysosome pathway[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1):10.
- [6] PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS:update on replication and pathogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(6):439-450.
- [7] ANTOSZCZAK M, HUCZYŃSKI A. Salinomycin and its derivatives - A new class of multiple-targeted "magic bullets"[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 176:208-227.
- [8] 孙 霏, 毕菲菲, 郝振凯, 等. 盐霉素在鸡球虫病防控中的应用:概述[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2021:1-8.
SUN P, BIFF, HAO Z K, et al. Application of salinomycin in the prevention and control of chicken coccidiosis:overview[J]. *Journal of Parasites and Medical Entomology*, 2021:1-8. (in Chinese)
- [9] 黎莹斯, 刘博昕, 孙 琦, 等. 抗肿瘤干细胞药物盐霉素对Wnt/ β -catenin信号通路的抑制[J]. 中国科学:生命科学, 2022, 52(2):223-236.
LI Y S, LIU B X, SUN Q, et al. Inhibition of anti-cancer stem cells drug salinomycin on Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2022, 52(2):223-236. (in Chinese)
- [10] HUCZYŃSKI A. Salinomycin:a new cancer drug candidate[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 79(3):235-238.
- [11] CHAPMAN H D, JEFFERS T K, WILLIAMS R B. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry[J]. *Poult Sci*, 2010, 89(9):1788-1801.
- [12] KEVIN II D A, MEUJO D A, HAMANN M T. Polyether ionophores:broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4(2):109-146.

- [13] ANTOSZCZAK M. A medicinal chemistry perspective on salinomycin as a potent anticancer and anti-CSCs agent[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164:366-377.
- [14] PARAJULI B, SHIN S J, KWON S H, et al. Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(4):1457-1462.
- [15] HUANG X L, BORGSTRÖM B, STEGMAYR J, et al. The molecular basis for inhibition of stemlike cancer cells by salinomycin[J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(6):760-767.
- [16] MAI T T, HAMA ĪA, HIENZSCH A, et al. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes[J]. *Nat Chem*, 2017, 9(10):1025-1033.
- [17] HUCZYŃSKI A, ANTOSZCZAK M, KLECZEWSKA N, et al. Synthesis and biological activity of salinomycin conjugates with floxuridine[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 93:33-41.
- [18] PARAJULI B, LEE H G, KWON S H, et al. Salinomycin inhibits Akt/NF- κ B and induces apoptosis in cisplatin resistant ovarian cancer cells[J]. *Cancer Epidemiol*, 2013, 37(4):512-517.
- [19] CHEN N H, LI S J, ZHOU R Y, et al. Two novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) recombinants from a natural recombinant and distinct subtypes of PEDV variants[J]. *Virus Res*, 2017, 242:90-95.
- [20] 闫清源, 周书亭, 谢洋洋, 等. 猪流行性腹泻病毒感染Vero细胞的细胞病理学研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2018, 36(2):39-42.
YAN Q Y, ZHOU S T, XIE Y Y, et al. Cytopathology study on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected Vero cells[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2018, 36(2):39-42. (in Chinese)
- [21] LI Z H, CAO H, CHENG Y F, et al. Inhibition of porcine epidemic diarrhea virus replication and viral 3C-like protease by quercetin[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8095.
- [22] GAO R Y, ZHANG Y S, KANG Y H, et al. Glycyrrhizin inhibits PEDV infection and proinflammatory cytokine secretion via the HMGB1/TLR4-MAPK p38 pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2961.
- [23] REN J P, ZENG W, JIANG C S, et al. Inhibition of porcine epidemic diarrhea virus by cinchonine via inducing cellular autophagy[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:856711.
- [24] SUN P, WANG M G, LI J, et al. Inhibitory effect of Buddlejasonin IVb on porcine epidemic diarrhea virus *in vivo* and *in vitro*[J]. *Vet Microbiol*, 2022, 272:109516.
- [25] HUAN C C, XU W Y, NI B, et al. Epigallocatechin-3-gallate, the main polyphenol in Green Tea, inhibits porcine epidemic diarrhea virus *in vitro*[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:628526.
- [26] LI L, YU X M, ZHANG H M, et al. *In vitro* antiviral activity of Griffithsin against porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(2):174-181.
- [27] WANG P C, BAI J, LIU X W, et al. Tomatidine inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication by targeting 3CL protease[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1):136.
- [28] JANG Y, SHIN JS, YOON YS, et al. Salinomycin inhibits influenza virus infection by disrupting endosomal acidification and viral matrix protein 2 function[J]. *J Virol*, 2018, 92(24):e01441-18.
- [29] FRISCH S M, SCHALLER M, CIEPLY B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 1):21-29.
- [30] WEBSTER M R, WEERARATNA A T. A Wnt-er migration:the confusing role of β -catenin in melanoma metastasis[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(268):pe11.
- [31] 左叶雯. GSK-3介导 β -catenin调控猪流行性腹泻病毒增殖[D]. 北京:中国农业科学院, 2018.
ZUO Y W. GSK-3 mediated β -catenin regulating the proliferation of PEDV[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018. (in Chinese)

- [32] ZHU L Q, THUNUGUNTLA P, LIU Y L, et al. The β -catenin signaling pathway stimulates bovine herpesvirus 1 productive infection[J]. *Virology*, 2017, 500:91-95.
- [33] ZHANG Y S, LIU L G, LI F, et al. Salinomycin exerts anticancer effects on PC-3 cells and PC-3-derived cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:4101653.
- [34] RAUSCH K, HACKETT B A, WEINBREN N L, et al. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against Zika Virus[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(3):804-815.
- [35] SVENNINGSSEN E B, THYRSTED J, BLAY-CADANET J, et al. Ionophore antibiotic X-206 is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 infection *in vitro*[J]. *Antiviral Res*, 2021, 185:104988.
- [36] IANESKI A, YAO R A, FENSTAD M H, et al. Potential antiviral options against SARS-CoV-2 infection[J]. *Viruses*, 2020, 12(6):642.
- [37] YANG C W, PENG T T, HSU H Y, et al. Repurposing old drugs as antiviral agents for coronaviruses[J]. *Biomed J*, 2020, 43(4):368-374.
- [38] DORNE J L C M, FERNÁNDEZ-CRUZ M L, BERTELSEN U, et al. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 270(3):196-208.
- [39] 陈利国. 盐霉素对猪生产性能的影响[J]. 当代畜牧, 2017(20):76-77.
CHEN L G. The effect of salinomycin on pig production performance[J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2017(20):76-77. (in Chinese)

(编辑 白永平)