

抗非洲猪瘟病毒制剂的研究进展

赵鸿远¹ 王朝¹ 成温玉¹ 马宁宁¹ 李曼² 魏小丽²

(1. 安康学院现代农业与生物科技学院, 安康 725000; 2. 安康市畜牧兽医中心, 安康 725000)

摘要: 非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 作为我国当前最为严重的外来猪病, 被列为一类动物传染病。2018 年 8 月沈阳暴发 ASF 疫情以来, 连续不断的感染疫情给我国养猪业造成重创, 严重威胁生猪养殖的健康发展。目前针对 ASF 尚无商品化的疫苗和经济有效的抗病毒药物, 猪群一旦感染只能依靠快速扑杀进行防控。从干扰素、抗生素、核苷类似物、植物天然产物及其他可能抗非洲猪瘟病毒制剂的研究现状进行详细概述, 以期为抗非洲猪瘟药物的创制提供借鉴及参考。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 抗病毒制剂; 干扰素; 核苷类似物; 植物天然产物

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1079

Progress on Antiviral Agents Against African Swine Fever Virus

ZHAO Hong-yuan¹ WANG Zhao¹ CHENG Wen-yu¹ MA Ning-ning¹ LI Man² WEI Xiao-li²

(1. School of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang 725000; 2. Animal Husbandry and Veterinary Bureau of Ankang, Ankang 725000)

Abstract: African swine fever (ASF), the most serious exotic pig disease, is listed as a class I animal disease in China. The continuous infection since the outbreak of ASF in Shenyang on August 2018 is now ravaging the development of China's pork industry, seriously threatening the healthy development of pig breeding. There is no commercialized vaccine or cost-effective antiviral drugs, thus only quick killing is reliable to control the disease once pigs are infected. This review summarized the recent research status of agents including interferons, antibiotics, nucleoside analogues, plant-derived products and other compounds that have been reported to inhibit ASFV replication, aiming to provide theoretical basis and reference for the development of potential anti-ASFV drugs.

Key words: African swine fever virus; antiviral agents; interferons; nucleoside analogues; plant-derived products

猪是人类摄取高质量蛋白质和肉品最为重要的来源。由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的非洲猪瘟是一种急性、热性、广泛出血性的高度接触传染性疾病, 对家猪和欧洲野猪的致死率可达 100%^[1], 严重危害当前养猪业的发展, 给多国的社会经济造成了严重的影响。世界动物卫生组织将 ASF 列为必须上报的动物疾病, 我国将其归为一类动物传染病。自 20 世纪初期于肯尼亚首次发现 ASF 以来, 经由非洲传播至欧洲地区, 随后在欧洲等国采取一系列强硬措施后根除了该病。然而

在 2007 年格鲁吉亚暴发 ASF 后并再次迅速殃及俄罗斯、乌克兰、波兰、立陶宛等多个欧洲国家。据不完全统计, 仅 2014-2017 年俄罗斯和东欧等国因 ASFV 感染就扑杀了 80 多万头猪, 造成多达数亿欧元的经济损失^[1]。2018 年 8 月沈阳一猪场爆发我国首例 ASF 疫情, 随后便席卷全国多个省、市、自治区, 对我国的养猪业造成了重创。

ASFV 是一种蛱传性的双链 DNA 病毒, 曾先后被划分为虹彩病毒科和痘病毒科, 最终因其结构和基因序列的差异被国际病毒学分类委员会列

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2020NY-027), 安康市主导产业重大科研攻关项目 (AK2019ZD-10), 安康市科技计划项目 (AK2019NY-1), 安康学院创新团队项目 (2019AKTD05)

作者简介: 赵鸿远, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 动物分子病毒学与免疫; E-mail: zhaohongyuan18@163.com

通讯作者: 成温玉, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 宿主抗病毒天然免疫; E-mail: wenyucheng1989@163.com

为非洲猪瘟病毒科 (*Asfarviridae*) 非洲猪瘟病毒属 (*Asfivirus*)^[2]。尽管 ASFV 被发现已有近百年的历史, 但目前尚无商品化的疫苗和经济有效的抗病毒药物, 猪群一旦感染只能依靠快速扑杀进行防控。作为我国当前猪群中最重要的烈性传染病, ASF 的防控主要以“早、快、严、小”为特征的处置方式进行, 也是目前国内外应对 ASF 疫情行之有效的措施。本文对抗非洲猪瘟病毒制剂的研究现状进行了总结, 以便为抗非洲猪瘟药物的创制和开发提供理论依据及重要参考。

1 ASFV 简介

ASFV 是具有囊膜的双链 DNA 病毒, 包含 170–193 Kb 的线性基因组, 共编码 150–200 个蛋白, 属于核质巨 DNA 病毒。ASFV 病毒粒子从内至外由基因组、核心壳、内膜、衣壳和囊膜等构成了正二十面体对称结构, 直径大小约为 200 nm。该病毒具备严格的细胞嗜性, 主要在单核 – 巨噬细胞中完成复制^[2]。因此, 早期在分离培养病毒时只能依靠来源于外周血的单核 – 巨噬细胞原代细胞进行, 后来通过不断驯化, 个别毒株能够在非洲绿猴肾细胞 (Vero、COS-7 和 CV-1) 上进行增殖^[3]。然而这些细胞系不能反映靶动物对 ASFV 的应答机制, 因此学者建立了猪肺泡巨噬细胞源的永生化的猪肺泡巨噬细胞 (immortalized porcine alveolar macrophages, IPAM) 和野猪肺细胞 (wild swine lung cells, WSL), 并被广泛用于 ASFV 的研究中^[4]。此外, 2020 年, Portugal 等^[5]建立了一株源于猪胎儿肺脏的细胞系 ZMAC-4 (Zuckermann macrophage-4), 可促进多个 ASFV 分离株进行体外增殖。

ASFV 在侵入靶细胞的 (单核 – 巨噬细胞) 过程中通过受体依赖的调节模式和非受体依赖的两大类模式进入细胞内^[6]。在以受体依赖的调节模式侵入细胞时, 病毒粒子可与宿主细胞表面多个受体 (如 CD163、CD45、MHC II 和 Fc 等) 结合, 通过网格蛋白介导的内吞作用被包裹到内体中并进入到细胞内^[6]。内体中的酸性环境使得病毒粒子发生构象变化, 促使病毒粒子脱壳丢失衣壳和囊膜结构。脱壳后的病毒粒子进一步将其内膜结构与细胞内体膜进行融合, 释放出核心壳至细胞质中。在借助宿主蛋

白合成系统的情况下, ASFV 迅速在宿主细胞核附近建立“病毒工厂”并进一步合成病毒组装所需蛋白和基因组, 同时合成的一些非结构蛋白调控宿主的免疫应答。待“病毒工厂”中的病毒粒子装配成熟后经由病毒衣壳蛋白 pE120R 和驱动蛋白依赖的微管调节机制, 将病毒粒子转运至细胞膜表面完成出芽过程^[6–7]。ASFV 除了上述内化入胞机制外, 被发现其在 Vero 细胞中还可通过非受体依赖的巨胞饮 (macropinocytosis) 和直接吞噬的方式进入到细胞内^[6–7]。另外, ASFV 在感染宿主细胞的晚期会引发细胞裂解, 这也成为其出芽的一种方式^[6–7]。因此, ASFV 具有复杂的增殖过程, 目前对于其在宿主细胞中的复制过程认识不全, 尚需要进行深入研究才能全面了解该病毒的增殖机制。

2 抗病毒制剂

2.1 干扰素

干扰素 (interferon, IFN) 是机体重要的细胞因子, 具有广泛的抗病毒活性和免疫调节能力, 能够有效抑制病原微生物的复制。所有哺乳动物都能表达 IFNs, 且根据其序列、结构和功能的差异被划分为 I 型 (IFN- α 、 β 、 ϵ 、 κ 、 τ 、 ω 和 σ)、II 型 (IFN- γ) 和 III 型 (IFN- $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 和 $\lambda 3$)^[8–9]。IFNs 通过激活下游的 JAK-STAT 信号通路诱导一系列干扰素刺激基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 的转录, 产生大量的抗病毒蛋白^[8–9]。早前的感染研究表明, ASFV 能诱导细胞和机体产生 IFN- γ , 该因子无论是对 ASFV 弱毒株还是强毒株都有显著的抑制作用^[10]。IFN- α 也具有抗 ASFV 的活性, 连续使用 IFN- α 处理 ASFV 感染的 Vero 细胞可以缓解病毒造成的细胞溶解以及降低病毒对细胞的持续感染。混合使用 IFN- α 和 IFN- γ 可以增强二者单独使用时抗 ASFV 的能力, 表明 IFN- α 和 IFN- γ 具有协同抑制 ASFV 的功能^[11]。Fan 等^[12]利用原核表达分别获得猪源 IFN- α 和 IFN- γ 重组蛋白, 在使用不同剂量蛋白处理 ASFV 感染的 PAM 细胞后, 二者均表现出对 ASFV 复制过程的显著抑制性, 且也表现出协同作用。进一步利用猪源 IFN- α 和 IFN- γ 混合蛋白处理 ASFV 感染的猪时, IFNs 重组蛋白显著降低了宿主体内的病毒载量, 且刺激机体产生了大量的 ISGs。因此, 重组的猪源

IFN- α 和 IFN- γ 具有紧急治疗临床上 ASFV 感染猪的潜能^[12]。除了猪源 IFNs 具有抗 ASFV 感染的作用之外, 人源 IFNs 也具备抑制 ASFV 在 Vero 和 PAM 细胞中复制的能力, 表明 IFNs 具有广谱的抗病毒效应^[10-11]。目前, 尚无关于 IFN- β 和 IFN- λ 等 IFNs 对 ASFV 作用的研究, 但这些 IFNs 对其他多种病毒的抑制作用暗示其也具有抗 ASFV 功能。

ISGs 作为 IFNs 抗病毒的主要执行分子, 在 IFNs 刺激的 PAM 和猪体内均显著上调。黏液病毒抗性蛋白 A (myxovirus resistance protein A, MxA) 是 ISGs 之一, 属于大分子 GTP 酶超家族的成员^[9]。Netherton 等^[13]通过构建稳定表达人源 MxA 蛋白的 Vero 细胞证实, 人源 MxA 显著性地抑制 ASFV 的增殖, 且与 ASFV 的小 DNA 结合蛋白 pA104R 相互作用共同定位于“病毒工厂”。同样, 猪的 MxA 同源性蛋白 Mx1 也表现出相似的结果, 表明 MxA 具有广谱的抗病毒活性^[13]。除了 Mx 蛋白之外, 干扰素诱导跨膜蛋白 (interferon-inducing transmembrane proteins, IFITMs) 也表现出对 ASFV 的抑制能力^[14]。稳定表达人源 IFITM1、IFITM2 和 IFITM3 的 Vero 细胞明显降低了 ASFV 的传染性, 其中 IFITM2 和 IFITM3 主要限制了病毒的侵入或者脱壳, 其很可能与 IFITM 破坏了 ASFV 侵入时依赖的内吞机制并造成胆固醇流失有关^[14]。另外, 胆固醇-25-羟化酶 (cholesterol-25-hydroxylase, CH25H) 也属于 ISGs 家族的成员, 其催化形成的产物 25-羟基胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25-HC) 也具有广泛的抗病毒能力。25-HC 被证实具有抗 ASFV 的活性, 其与氧化固醇结合蛋白 (oxysterol-binding protein, OSBP) 具备高亲和结合能力^[15]。而 OSBP 是病毒构建“病毒工厂”时脂质交换的重要蛋白, 25-HC 与 OSBP 的结合阻碍了“病毒工厂”的形成, 从而抑制了病毒的增殖^[15]。除了上述 ISGs 之外, OASL、ISG15、PKR、GBP1、Viperin、BST2、IFR1 和 CXCL10 等 ISGs 在 IFNs 诱导的 PAM 中出现了显著上调, 同时在 ASFV 弱毒猪感染细胞中 ISG15、PKR 和 BST2 的表达也出现了明显上调, 意味着这些 ISGs 也可能参与了抗 ASFV 的应答^[12], 但其作用机制有待进一步研究。

尽管上述 IFNs 和 ISGs 在抗 ASFV 感染中起到

重要作用, 然而病毒在长期进化中形成了一系列逃逸宿主免疫应答以及拮抗 IFNs 抗病毒应答的策略^[16]。因此我们必须从宿主和病毒两方面全面探究二者之间的相互作用, 才能开发出高效的抗病毒药物。

2.2 抗生素

抗生素是一类主要抑制细菌生长的次生代谢产物, 而一部分抗生素也具有抗病毒的活性。利福平是一种广谱的抗菌药, 同时也能靶向作用于痘苗病毒和巨细胞病毒的 DNA 依赖的 RNA 聚合酶阻碍病毒转录, 发挥抗病毒的功能^[17]。同样, 利福平也能抑制 ASFV 的增殖, 在不同处理剂量下能够显著降低感染 ASFV 细胞中的病毒滴度^[10]。利福平抑制 ASFV 增殖的靶点也是病毒的 DNA 依赖的 RNA 聚合酶。一些利福平的衍生物也以同样的方式发挥抗 ASFV 的功能^[10]。II 型拓扑异构酶是 ASFV 复制的关键性蛋白, 香豆霉素 (coumermycin) A1 作为细菌 DNA 旋转酶的专型抑制剂, 也能够靶向抑制 ASFV II 型拓扑异构酶的活性, 从而阻碍病毒增殖^[18-19]。此外, 阿霉素 (doxorubicin)、安吡啶 (amsacrine) 和氟喹诺酮类药物也可以靶向作用于 ASFV 的 II 型拓扑异构酶, 表现出对酶活较高的抑制性^[18-19]。目前已经筛选到 30 种氟喹诺酮类药物具有抗 ASFV 的活性, 其中 6 种药物能够显著降低 ASFV 感染 Vero 细胞引起的细胞病变, 连续使用药物可以清除 Vero 细胞中的病毒^[20]。浅蓝菌素 (cerulenin) 是由真菌蓝色头孢霉 (*Cephalosporium ceruleans*) 产生的代谢产物, 属于脂肪酸合酶的抑制剂。de León 等^[21]研究证实浅蓝菌素在 ASFV 感染的早期具有抑制作用, 其可能在病毒与细胞粘附过程中阻碍了膜之间融合发挥抗 ASFV 的功能。ASFV 入侵细胞依赖宿主细胞中的胆固醇, 而胆固醇转运至病毒入侵位点则需要多种蛋白质 (如 OSBP、ORP4) 的参与。伊曲康唑 (itraconazole) 是一种抗霉菌的抗生素, 能够靶向破坏霉菌胞内的细胞色素 p450 酶发挥杀菌功能, 同时它也是 OSBP 的抑制剂^[15]。利用伊曲康唑处理 ASFV 感染的 Vero 细胞后, 显著抑制了病毒的增殖, 同时细胞中“病毒工厂”的数量也明显减少, 表明伊曲康唑对 ASFV “病毒工厂”的形成起到阻碍

作用^[15]。

2.3 核苷类似物

核苷酸作为生物个体遗传信息复制和转录的重要载体，被广泛用于化疗和抗病原感染治疗的靶点。核苷类似物具有天然核苷酸相似的结构，能竞争性地结合到生物体的 DNA 或者 RNA 大分子中，从而干扰生物体遗传信息的复制和转录，引起核苷酸链复制终止或突变位点的产生。碘苷(iododeoxyuridine)是第一个被发现具有抗 ASFV 活性的核苷类似物，在 100 $\mu\text{g/mL}$ 的工作浓度下显著抑制了 ASFV 在 Vero 细胞中的增殖，并且连续使用碘苷处理 ASFV 感染的 Vero 细胞可以达到清除病原的目的，但该化合物对细胞有一定的毒性^[22]。9-[(S)-3-羟基-2-(磷酸甲氧基)丙基]腺嘌呤(9-[(S)-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)] adenine, (S)-HPMPA)是一种广谱的抗病毒化合物，能够抵抗多种 DNA 病毒。利用斑点分子杂交技术证实 (S)-HPMPA 及其衍生物通过干扰病毒 DNA 的合成发挥抗 ASFV 的功能，其中 (S)-HPMPA 的效果最显著^[23]。ASFV 在 mRNA 合成过程中需要对其 5' 端进行加帽修饰，此过程需要 S-腺苷高半胱氨酸水解酶参与转甲基反应^[24]。部分腺苷酸类似物具有抑制 S-腺苷高半胱氨酸水解酶活性的作用，因此这些腺苷酸类似物即可阻碍 ASFV mRNA 的加帽反应起到抑制病毒增殖的目的^[25]。刚性两亲融合抑制剂(rigid amphipathic fusion inhibitors, RAFIs)是具有大芳环尿嘧啶的小分子化合物，属于尿嘧啶类似物。鉴于病毒感染宿主细胞时存在膜融合反应，RAFIs 被证实能够靶向作用于病毒包膜中的脂质抑制其与宿主细胞膜的融合，从而抵抗包膜病毒的感染^[26]。ASFV 也含有包膜结构，Hakobyan 等^[27]证实 aUY11 和 cm1UY11 两种 RAFIs 在 ASFV 内化阶段发挥重要的抗病毒活性，二者无论是在 Vero 还是在 PAM 细胞中都对 ASFV 展现出剂量依赖性的抑制活性。尽管上述核苷类似物在细胞层面展现出良好的抗 ASFV 活性，但这些药物制剂并未在活体动物上进行验证，化合物的安全性、实用性、生产工艺尚需全面探究。

2.4 植物天然产物

植物天然产物种类繁多，具有丰富的生物活

性，其中多种成分具有抗病原微生物的作用，被广泛用于药物研发和感染治疗中。黄酮类成分作为植物次生代谢产物的一大类天然产物，广泛存在于蔬菜、水果、药用植物、种子、坚果以及红酒和茶中。来源于植物中的黄酮类天然产物具有广泛的抗病毒活性，Hakobyan 等^[28]从 5 种黄酮化合物(芹黄素、儿茶素、金雀异黄素、毛地黄黄酮和槲皮素)筛选到芹黄素(apigenin)具有较强的抗非洲猪瘟病毒的能力。芹黄素通过抑制 ASFV 特异性蛋白的合成以及“病毒工厂”的形成，于感染早期表现出对病毒的抑制能力，且能够显著抑制 ASFV 感染的细胞病变形成^[28]。因此芹黄素可作为抗非洲猪瘟病毒药物开发的候选。然而，芹黄素化学性质不稳定，多以糖苷的形式存在于植物中，纯的芹黄素只能在 -20℃ 以下的环境中储存，而且在极性溶液(如水、生理盐水)中几乎不能溶解，仅可溶于 KOH 溶液和二甲基亚砜(DMSO)以及微溶于热酒精中，因此在实践应用中具有较大的难度。Hakobyan 等^[29]进一步从糖基化和甲基化的芹黄素衍生物中筛选到芫花黄素(genkwanin)具有显著的抗 ASFV 的活性。芫花黄素属于芹黄素的甲基化衍生物，易溶于极性溶液。研究证实，芫花黄素能够在 ASFV 病毒感染细胞的吸附和内化阶段发挥阻碍作用，同时也能抑制病毒出宿主细胞中释放^[29]。除了芹黄素和芫花黄素之外，ASFV 对大豆中的黄酮化合物金雀异黄素也很敏感。Arabyan 等^[30]通过细胞试验证实，金雀异黄素(genistein)通过阻碍 ASFV 晚期蛋白的合成使得病毒的生命周期停滞在侵入细胞的后期。ASFV 能够编码 II 型拓扑异构酶，主要参与病毒 DNA 的复制和基因转录。金雀异黄素被发现能够与 ASFV II 型拓扑异构酶上 4 个 ATP 结合位点的氨基酸特异性作用，发挥病毒拓扑异构酶毒性剂的功能^[30]。杨梅酮(myricetin)和杨梅苷(myricitrin)被发现也具有抗病毒的活性。Jo 等^[31]利用荧光共振能量转移对 ASFV 蛋白酶在 65 种黄酮类化合物的文库中进行抑制剂的筛选发现，杨梅酮和杨梅苷对 ASFV 蛋白酶表现出明显的抑制性，暗示二者对 ASFV 也具有抗性作用。钩枝藤(*Ancistrocladus uncinatus*)是南非地区常见的一种藤蔓植物，民间用于饲喂猪，可降低猪的发病率和死亡情况。Fasina 等^[32]从钩枝藤的提

取物检测到 35 种化合物,证实这些提取物具有较好的抗 ASFV 活性。白藜芦醇因其广泛的药理学作用被用于治疗癌症、心脏疾病、神经退行性疾病以及炎症性疾病。同时该化合物也具有清除氧自由基、抗氧化和抗病毒的功能。Galindo 等^[33]从细胞水平对比了白藜芦醇和氧化白藜芦醇对 ASFV 的抑制活性,结果显示二者都对 ASFV 具有抑制能力,可减少感染细胞中 98%–100% 病毒滴度。白藜芦醇和氧化白藜芦醇主要通过阻碍 DNA 复制、抑制病毒蛋白合成以及“病毒工厂”的形成发挥抗 ASFV 的作用^[33]。此外,从海洋微藻中提取的硫酸多糖以及从大戟属植物 (*Euphorbia segetalis*) 分离的三萜类化合物也表现出对 ASFV 的剂量依赖性抑制活性^[34–35]。尽管上述植物天然化合物都对 ASFV 具有很好抑制效果,但缺乏活体动物的验证试验,无法保证其安全性。另外植物化合物结构复杂,提取工艺繁琐,其分离后的活性也有所变化。因此,不仅需要加强对植物化合物的活体试验研究外,还需要对其提取工艺和安全性进行全面探究。

2.5 RNA 干扰和 CRISPR/Cas9

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是由双链 RNA 诱导,引起靶基因转录后特异性沉默的一种调节机制,被广泛应用到抗病毒和基因沉默的研究中。人医临床上也有针对 RNAi 技术的上市药物,具有较广的应用前景。Keita 等^[36]针对 ASFV 的关键基因 *A151R* 和 *B646 L* 分别设计了多条 siRNA,通过脂质体转染 ASFV 感染的细胞后,部分单一的 siRNA 显著降低了细胞中病毒滴度,而对两个基因的多条 siRNA 混合作用时,对 ASFV 的抑制作用并不明显。与此类似,Frouco 等^[37]在探究 ASFV 基因 *pA104R* 的功能时,设计的 siRNA 转染细胞后能够降低 82% 病毒滴度,同时也影响了病毒晚期蛋白的表达,由此看见 *pA104R* 蛋白在 ASFV 的增殖中起到重要作用。

CRISPR/Cas 系统是细菌抵抗噬菌体感染的一种防御机制,经过人为不断改造已广泛应用基因的敲除、敲入和沉默等技术。近年来,CRISPR/Cas 系统在抗病毒的应用研究中备受关注。Hübner 等^[38]构建了针对 ASFV 磷蛋白 *p30* 基因 (*CP204L*) 的

CRISPR/Cas9 系统,破坏了 *p30* 在病毒感染过程中的表达,几乎完全抑制了病毒在感染细胞中的增殖。同时该研究也充分说明 *p30* 基因在 ASFV 增殖过程中起到关键性的作用。CRISPR/Cas 系统除了用于抗病毒研究之外,研究者多用该技术对 ASFV 基因组进行编辑,通过靶向敲除或插入等手段探究某个基因的功能或改造形成 ASFV 突变毒株用于疫苗开发研究。

2.6 其他抗病毒化合物

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 是宿主修饰染色体结构和调控基因表达的一类重要蛋白酶,多种病毒被发现能够与 HDACs 相互作用破坏宿主基因表达和蛋白修饰。苯基丁酸钠和丙戊酸是 HDAC 的抑制剂,二者明显抑制 ASFV 的增殖,其中苯基丁酸钠可完全破坏 Vero 细胞中病毒的增殖,丙戊酸也可降低 74% 病毒滴度^[39]。通过检测病毒晚期蛋白的表达和宿主组蛋白的乙酰化水平,表明苯基丁酸钠阻碍了病毒晚期蛋白的表达以及破坏了病毒对宿主蛋白的修饰作用^[39]。同时,苯基丁酸钠与 ASFV 的 II 型拓扑异构酶抑制剂——恩诺沙星具有协同作用,二者共同作用极大地增强了单一使用时对 ASFV 的抑制能力,这也暗示宿主的乙酰化蛋白与 ASFV 的拓扑异构酶对病毒的增殖具有相互促进作用^[39]。Ziem 等^[40]以石墨烯为支架合成了聚合甘油硫酸盐功能性石墨烯二维多价大分子,该分子能够结合 ASFV 阻止其黏附细胞,发挥很强的抑制效应。此外,饲料添加剂中的中链脂肪酸和甲醛衍生物也具有抗 ASFV 的能力,无论是在细胞培养物还是在跨海航运的成品饲料中,二者都能使 ASFV 失活^[41]。

计算机虚拟筛选是药物开发的重要新手段之一,借助于计算机强大的计算能力在已知受体生物大分子结构的基础上,通过分子对接的方式寻找具有高亲和力的小分子配体,从而筛选具有苗头的抑制剂或者药物。王卓亚等^[42]以 ASFV DNA 聚合酶的 X AsfvPolX 的 DNA 结合区为靶点,分别在天然药物库和海洋化合物库中进行分子对接筛选,发现 75 种潜在的具抑制 ASFV 效果的天然产物,其中 15 种分布在中国。类似地,Kinyanyi 等^[43]以 ASFV DNA 的

AT 富集区为靶点,用纺锤菌素、刚果素 2 和 3 以及三羟甲基氨基苯并咪唑等 4 种化合物进行分子对接,结果显示刚果素和三羟甲基氨基苯并咪唑具有潜在的抑制 ASFV 功能。上述通过虚拟筛选的药物或抑制剂尚未经过体内、外实验验证,对药物的安全性也未知,因此从庞大的分子库中获得高效实用的抗 ASFV 药物还需要大量的工作。

3 总结与展望

ASF 的防控是世界养猪业急需解决的重要难题,当前,以落实生物安全防护措施、消灭传染源和做好饲养管理的措施是防控 ASF 的关键。尽管国内外的研究人员针对 ASFV 疫苗的研发进行了较多工作,也取得了一定的成果,但目前仍未研制出具有高免疫原性和完全保护效果的疫苗。除了疫苗研发,抗 ASF 药物制剂的开发也是应对 ASF 疫情的一个重要措施。基于药物及化合物制剂的作用机制,针对抗 ASFV 药物制剂的研发主要集中在两方面:(1) 药物制剂直接作用于 ASFV 编码的蛋白影响其复制;(2) 抑制剂作用于病毒复制时所需的宿主蛋白因子从而间接发挥抗 ASFV 的作用。本文中阐述了多种药物及化合物制剂都是通过上述两种方式发挥抗 ASFV 活性,但这些药物及抑制剂缺乏在活体动物上的效果验证。来自人类药物开发的成功案例表明,一些化合物制剂具有良好的抗病毒作用乃至完全能够清除患者体内感染的病原。然而这些药物往往需要花费高昂的研发成本和生产成本,远比动物的养殖成本高。因此,植物天然产物是开发抗 ASFV 药物良好的途径,具有来源广、结构独特等优点,而且我国天然产物资源丰富,具有悠久的中草药历史。利用计算机虚拟筛选,结合分子对接可以高效地从数量庞大的天然产物数据库中筛选到苗头化合物,进一步通过试验验证可提高药物研发的进程。值得注意的是,ASF 作为猪的烈性传染病,我国农业农村部仅允许全国 8 个动物生物安全三级实验室从事病毒分离、鉴定、活病毒培养、动物接种(感染)试验等实验活动,其生物安全操作必须遵守《病原微生物实验室生物安全管理条例》的相关规定。

尽管 ASFV 已被发现已有近百年的历史,但我

们对该病毒认识还很少,尤其是病毒编码的蛋白数量庞大,其功能还不清楚;病毒逃逸宿主的免疫机制、宿主对病毒应答机制以及病毒的致病机制都不甚了解。这是制约当前疫苗研发和药物开发的关键。因此,持续开展 ASFV 与宿主间的相互作用研究,有助于疫苗开发和抗病毒药物的研制。

参考文献

- [1] 张睿,黄旖童,鲍晨沂,等.非洲猪瘟流行病学及其在中国扩散的因素分析[J].病毒学报,2019,35(3):512-522.
Zhang R, Huang YT, Bao CY, et al. Epidemiology of African swine fever and analysis of risk factors of its spread in China: An overview[J]. Chinese J Virol, 2019, 35(3): 512-522.
- [2] 欧云文,刘俐君,代军飞,等.非洲猪瘟病毒结构蛋白在病毒感染过程中的作用[J].生物技术通报,2019,35(6):156-163.
Ou YW, Liu LJ, Dai JF, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. Biotech Bulletin, 2019, 35(6): 156-163.
- [3] Hurtado C, Bustos MJ, Carrascosa AL. The use of COS-1 cells for studies of field and laboratory African swine fever virus samples[J]. J Virol Methods, 2010, 164(1-2): 131-134.
- [4] de León P, Bustos MJ, Carrascosa AL. Laboratory methods to study African swine fever virus[J]. Virus Res, 2013, 173(1): 168-179.
- [5] Portugal R, Goatley LC, Husmann R, et al. A porcine macrophage cell line that supports high levels of replication of OURT88/3, an attenuated strain of African swine fever virus[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1245-1253.
- [6] Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, et al. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus[J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 215.
- [7] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt JA. African swine fever virus biology and vaccine approaches[J]. Adv Virus Res, 2018, 100: 41-74.
- [8] Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2061.
- [9] Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: what do they all do? [J] Annu Rev Virol, 2019, 6(1): 567-584.
- [10] Arabyan E, Kotsynyan A, Hakobyan A, et al. Antiviral agents against African swine fever virus[J]. Virus Res, 2019, 270:

- 197669.
- [11] Paez E, Garcia F, Gil Fernandez C. Interferon cures cells lytically and persistently infected with African swine fever virus *in vitro* [J] . Arch Virol, 1990, 112 (1-2) : 115-1127.
- [12] Fan W, Jiao P, Zhang H, et al. Inhibition of African swine fever virus replication by porcine type I and type II interferons [J] . Front Microbiol, 2020, 11 : 1203.
- [13] Netherton CL, Simpson J, Haller O, et al. Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein [J] . J Virol, 2009, 83 (5) : 2310-2320.
- [14] Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MÁ, Martínez-Romero C, et al. Antiviral role of IFITM proteins in African swine fever virus infection [J] . PLoS One, 2016, 11 (4) : e0154366.
- [15] Galindo I, Cuesta-Geijo MÁ, Del Puerto A, et al. Lipid exchange factors at membrane contact sites in African swine fever virus infection [J] . Viruses, 2019, 11 (3) : 199.
- [16] 孙茂文, 王涛, 孙元, 等. 非洲猪瘟病毒的免疫逃逸策略 [J] . 微生物学报, 2020. DOI : <https://DOI.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20200166>.
- Sun MW, Wang T, Sun Y, et al. Immuno-evasion strategies of African swine fever virus [J] . Acta Microbiologica Sinica, 2020. DOI : <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20200166>.
- [17] Garriga D, Headey S, Accurso C, et al. Structural basis for the inhibition of poxvirus assembly by the antibiotic rifampicin [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115 (33) : 8424-8429.
- [18] Coelho J, Ferreira F, Martins C, et al. Functional characterization and inhibition of the type II DNA topoisomerase coded by African swine fever virus [J] . Virology, 2016, 493 : 209-216.
- [19] Coelho J, Leitão A. The African swine fever virus (ASFV) topoisomerase II as a target for viral prevention and control [J] . Vaccines (Basel) , 2020, 8 (2) : 312.
- [20] Mottola C, Freitas FB, Simões M, et al. *In vitro* antiviral activity of fluoroquinolones against African swine fever virus [J] . Vet Microbiol, 2013, 165 (1-2) : 86-94.
- [21] de León P, Bustos MJ, Torres E, et al. Inhibition of porcine viruses by different cell-targeted antiviral drugs [J] . Front Microbiol, 2019, 10 : 1853.
- [22] Gil-Fernández C, Páez E, Vilas P, et al. Effect of disodium phosphonoacetate and iododeoxyuridine on the multiplication of African swine fever virus *in vitro* [J] . Chemotherapy, 1979, 25 (3) : 162-169.
- [23] Arzuza O, García-Villalón D, Tabarés E, et al. Inhibition of African swine fever virus DNA synthesis by (S) -9- (3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine [J] . Biochem Biophys Res Commun, 1988, 154 (1) : 27-32.
- [24] Parrish S, Hurchalla M, Liu SW, et al. The African swine fever virus g5R protein possesses mRNA decapping activity [J] . Virology, 2009, 393 (1) : 177-182.
- [25] Villalón MD, Gil-Fernández C, De Clercq E. Activity of several S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against African swine fever virus replication in Vero cells [J] . Antiviral Res, 1993, 20 (2) : 131-144.
- [26] St Vincent MR, Colpitts CC, Ustinov AV, et al. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (40) : 17339-17344.
- [27] Hakobyan A, Galindo I, Nañez A, et al. Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus [J] . J Gen Virol, 2018, 99 (1) : 148-156.
- [28] Hakobyan A, Arabyan E, Avetisyan A, et al. Apigenin inhibits African swine fever virus infection *in vitro* [J] . Arch Virol, 2016, 161 (12) : 3445-3453.
- [29] Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, et al. Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin [J] . Antiviral Res, 2019, 167 : 78-82.
- [30] Arabyan E, Hakobyan A, Kotsinyan A, et al. Genistein inhibits African swine fever virus replication *in vitro* by disrupting viral DNA synthesis [J] . Antiviral Res, 2018, 156 : 128-137.
- [31] Jo S, Kim S, Shin DH, et al. Inhibition of African swine fever virus protease by myricetin and myricitrin [J] . J Enzyme Inhib Med Chem, 2020, 35 (1) : 1045-1049.
- [32] Fasina FO, Olaokun OO, Oladipo OO, et al. Phytochemical analysis and *in vitro* anti-African swine fever virus activity of extracts and fractions of *Ancistrocladus uncinatus*, Hutch and Dalziel (Ancistrocladaceae) [J] . BMC Vet Res, 2013, 9 : 120.
- [33] Galindo I, Hernández B, Berná J, et al. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication [J] . Antiviral Res, 2011, 91 (1) : 57-63.
- [34] Fabregas J, García D, Fernandez-Alonso M, et al. *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)

- and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae [J]. Antiviral Res, 1999, 44 (1): 67-73.
- [35] Madureira AM, Ascenso JR, Valdeira L, et al. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis* [J]. Nat Prod Res, 2003, 17 (5): 375-380.
- [36] Keita D, Heath L, Albina E. Control of African swine fever virus replication by small interfering RNA targeting the A151R and VP72 genes [J]. Antivir Ther, 2010, 15 (5): 727-736.
- [37] Frouco G, Freitas FB, Coelho J, et al. DNA-binding properties of African swine fever virus pA104R, a histone-like protein involved in viral replication and transcription [J]. J Virol, 2017, 91 (12): e02498-16.
- [38] Hübner A, Petersen B, Keil GM, et al. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L) [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 1449.
- [39] Frouco G, Freitas FB, Martins C, et al. Sodium phenylbutyrate abrogates African swine fever virus replication by disrupting the virus-induced hypoacetylation status of histone H3K9/K14 [J]. Virus Res, 2017, 242: 24-29.
- [40] Ziem B, Rahn J, Donskyi I, et al. Polyvalent 2D entry inhibitors for pseudorabies and African swine fever virus [J]. Macromol Biosci, 2017. DOI: 10.1002/mabi.201600499.
- [41] Niederwerder MC, Dee S, Diel DG, et al. Mitigating the risk of African swine fever virus in feed with anti-viral chemical additives [J]. Transbound Emerg Dis, 2020. DOI: 10.1111/tbed.13699.
- [42] 王卓亚, 李阳阳, 徐锡明, 等. 以非洲猪瘟病毒 DNA 聚合酶 X 为靶点的海洋药物计算机虚拟筛选 [J]. 中国海洋药物, 2018, 37 (6): 1-7.
- Wang ZY, Li YY, Xu XM, et al. Virtual drug screening of marine natural products targeting African swine fever virus DNA polymerase X [J]. Chinese J Marine Drugs, 2018, 37 (6): 1-7.
- [43] Kinyani D, Amwayi P, Wamalwa M, et al. Comparative in silico study of congocidine congeners as potential inhibitors of African swine fever virus [J]. PLoS One, 2019, 14 (8): e0221175.

(责任编辑 张婷婷)