

DOI:10.13350/j.cjpb.230303

• 论著 •

巴弗洛霉素 A1 体外广谱抗冠状病毒作用研究*

魏秉洁¹, 张翠玲², 尚超², 李霄^{2**}, 金宁一^{1,2**}

(1. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所)

【摘要】 目的 寻求针对 SARS-CoV-2、PEDV、TGEV 等冠状病毒的广谱抗病毒药物, 保障公共卫生安全。 方法 在细胞水平上评价内体酸化抑制剂巴弗洛霉素 A1(bafilomycin A1, Baf-A1)对 SARS-CoV-2、PEDV、TGEV 3 种冠状病毒的抗病毒效果。其中, SARS-CoV-2 的相关试验在其易感细胞 Vero E6 和 Caco-2 细胞上进行, PEDV 的相关试验在易感细胞 Vero E6 细胞上进行, TGEV 的相关试验在易感细胞 ST 细胞上进行。通过结晶紫染色试验和 CCK8 (Cell Counting Kit-8, 细胞计数试剂)评价 Baf-A1 对细胞的毒性作用, 通过病毒滴度测定、RT-qPCR 检测和 CCK8 试验评价 Baf-A1 对 SARS-CoV-2、PEDV、TGEV 等冠状病毒的抗性。 结果 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Baf-A1 表现出对 Vero E6 细胞的毒性作用, 能显著抑制 Vero E6 细胞增殖, 而 Baf-A1 对 Caco-2 细胞和 ST 细胞的毒性作用浓度分别为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 及以上。Baf-A1 在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 可抑制 SARS-CoV-2 在 Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞中的复制, 显著提高接毒细胞的存活率; 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 的 Baf-A1 可抑制 PEDV 感染 Vero E6 细胞, 提高该细胞存活率; 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 的 Baf-A1 可抑制 TGEV 在 ST 细胞中复制, 提高 ST 细胞存活率。 结论 Baf-A1 具有对 SARS-CoV-2、PEDV、TGEV 等冠状病毒的广谱抗病毒效果。

【关键词】 Bafilomycin A1; SARS-CoV-2; PEDV; TGEV; 广谱抗性

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0260-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Mar;18(3):260-264,270.]

Broad-spectrum antiviral effect of bafilomycin A1 on coronavirus

WEI Bing-jie¹, ZHANG Cui-ling², SHANG Chao², LI Xiao², JIN Ning-yi^{1,2} (1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)***

【Abstract】 **Objective** To seek broad spectrum antiviral drugs against SARS-CoV-2, PEDV, TGEV and other coronaviruses to ensure public health security. **Methods** In this study, we evaluated the antiviral effect of bafilomycin A1 (Baf-A1), an endosomal acidification inhibitor, against SARS-COV-2, PEDV and TGEV coronaviruses at the cellular level. Among them, SARS-CoV-2 related tests were performed on its susceptible cells Vero E6 and Caco-2, PEDV related tests were performed on its susceptible cells Vero E6, and TGEV related tests were performed on its susceptible cells ST. The cytotoxic effect of Baf-A1 was investigated by crystal violet staining assay and CCK8 (Cell Counting KIT-8) assay. The resistance of Baf-A1 to SARS-CoV-2, PEDV and TGEV was explored by virus titer determination, RT-qPCR and CCK8 assay. **Results** The results showed that 12.5 $\mu\text{mol/L}$ Baf-A1 began to significantly exhibit toxic effect on Vero E6 cells and inhibit their proliferation, while the toxic concentration of Baf-A1 on Caco-2 cells and ST cells was ≥ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and ≥ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Therefore, the toxicity concentration of Baf-A1 to different cell lines was different, and the antiviral effect of Baf-A1 should be evaluated according to this. The results also indicated that Baf-A1 at 0.5 $\mu\text{mol/L}$ could effectively inhibit the replication of SARS-CoV-2 in Vero E6 cells and Caco-2 cells, and could significantly improve the infected cells viability. 0.02 $\mu\text{mol/L}$ Baf-A1 could effectively inhibit PEDV infection in Vero E6 cells and improve their viability. 0.04 $\mu\text{mol/L}$ Baf-A1 could significantly inhibit the replication of TGEV in ST cells, and could improve the infected cells viability markedly. Hence, the concentration of Baf-A1 exerted the best antiviral effect on different viruses was different. **Conclusion** Baf-A1 has a broad-spectrum antiviral effect against SARS-CoV-2, PEDV and TGEV coronaviruses.

【Key words】 Bafilomycin A1; SARS-CoV-2; PEDV; TGEV; broad-spectrum resistance

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82151221); 培育资助基金项目(No. AMMS-QNPY-2021-018); 吉林省重大疾病防治重大科技专项(No. 20210303002SF)。

** **【通讯作者】** 李霄, E-mail: lixiao06@mails.jlu.edu.cn; 金宁一, E-mail: skylee6226@163.com

【作者简介】 魏秉洁(1996-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士。主要研究方向: 抗冠状病毒药物的筛选。E-mail: 1301135790@qq.com

冠状病毒(coronavirus, CoVs)属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒亚目(Cornidovirineae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、正冠状病毒亚科(Orthocoronavirinae)^[1],是一类具有囊膜包裹的单股正链RNA病毒,也是目前已知基因组(27-31.5kb)最大的RNA病毒^[2]。冠状病毒可感染多种哺乳动物(如人、猫、犬、猪、蝙蝠、鼠等)、鸟类、鱼类等,常引起呼吸系统、胃肠道疾病及多器官功能障碍^[3]。

SARS-CoV-2属于 β -CoV,主要感染人的呼吸道,常引起严重的呼吸系统相关疾病^[4],给人类生命健康带来了严重威胁,同时导致全球经济下滑。疫苗具有预防作用,目前已经获批的新冠疫苗主要有灭活疫苗、病毒载体疫苗、mRNA疫苗、蛋白亚单位疫苗,但是SARS-CoV-2变种往往可实现免疫逃逸^[5],降低以上疫苗的保护效果。与此同时,人类也正在致力于研发可防治新型冠状病毒的药物。然而,现阶段临床上被批准用于预防和治疗SARS-CoV-2的小分子药物种类仍然十分有限,且这些药物对未成年、孕妇及重症COVID-19患者的疗效和安全性还有待进一步验证,高效、特异性高、适用人群范围广且安全的抗SARS-CoV-2药物还有待进一步研发。

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)属于 α -CoV,常引起仔猪肠道疾病,主要表现为腹泻症状^[6],这是导致仔猪发病甚至死亡的重要原因之一^[7],给全球养猪业带来巨大的经济损失。研究发现PEDV和TGEV之间不存在病毒中和交叉反应^[8],所以预防这两种非常相似的猪疾病需要研发相应病毒的特异性疫苗产品。目前用来预防TGEV和PEDV的疫苗主要是灭活疫苗和弱毒疫苗,但这两种疫苗免疫效果较差,并且由于TGEV突变株的流行和PEDV的高度遗传多样性,进一步导致其效果甚微^[7,9]。因此,针对TGEV和PEDV的疫苗仍需进一步研发,同时寻找高效且安全的抗病毒药物用来防治TGEV和PEDV仍然迫在眉睫。

巴弗洛霉素(bafilomycins, Baf)是一类由链霉菌发酵产生的含有16元环骨架的多烯大环内脂类抗生素,化学结构极为特殊,大部分此类化合物侧链结构中都含有1个六元环的半缩醛结构^[10]。目前已报道的bafilomycins化合物有Baf-A1、A2、B1、B2、C1、C2、D、E、F、G、H、I、J、K、L等^[11]。其中Baf-A1是从灰色链霉菌中分离得到的大环内酯类抗生素的一个亚类,在20世纪80年代被确定为第一种特异性V-ATP酶强抑制剂^[12-13]。研究表明,V-ATP酶介导的酸化也是某些病毒感染细胞的必要条件之一,比如流感和埃博拉病毒^[14]。因此,V-ATP酶有望成为开发广谱抗病毒

药物的新靶点。本实验将SARS-CoV-2、PEDV和TGEV一同作为研究对象,观察在易感细胞上Baf-A1对SARS-CoV-2、PEDV和TGEV的体外抗病毒效果。

材料与方 法

1 材 料

1.1 细胞 Vero E6细胞(非洲绿猴肾细胞),Caco-2细胞(人结肠癌肿瘤细胞)和ST细胞(猪睾丸细胞)由本实验室保存,用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM培养基培养,置于37℃、5%CO₂的湿润细胞培养箱中。

1.2 病毒 新型冠状病毒SARS-CoV-2 BetaCoV/Beijing/IME-BJ01/2020,猪流行性腹泻病毒PEDV和猪传染性胃肠炎病毒TGEV由本实验室保存。SARS-CoV-2在Vero E6细胞和Caco-2细胞上进行分离、传代和毒力测定等试验(所有与SARS-CoV-2相关的活毒试验均在生物安全三级实验室进行);PEDV在Vero E6细胞上进行分离、传代和毒力测定等试验;TGEV在ST细胞上进行分离、传代和毒力测定等试验。

1.3 主要试剂与仪器 Bafilomycin A1(Med Chem Express公司, HY-12481);CCK-8细胞活性检测试剂盒(日本同仁公司, CK04);结晶紫染料(碧云天, C0121);QIAamp病毒RNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司, 52906);HiScript II U⁺一步RT-qPCR探针试剂盒(南京诺唯赞生物科技公司, Q223-01)。ABI 7500 RT-qPCR仪(Applied Biosystems, CA, USA)。

2 方 法

2.1 病毒滴度测定 试验前1d将Vero E6细胞、Caco-2细胞或ST细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种到6孔培养板中置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,加毒前2h每孔加入Baf-A1(SARS-CoV-2、PEDV和TGEV的药物处理组中Baf-A1终浓度分别为0.5 μ mol/L, 0.02 μ mol/L和0.04 μ mol/L),接毒剂量为SARS-CoV-2病毒0.008 MOI, PEDV 3.89×10^{-3} MOI, TGEV 1.0×10^{-4} MOI,培养72h后收取上清和细胞沉淀,置于-80℃冰箱保存。

在96孔板的每个标准孔内均匀铺入 7×10^3 个Vero E6细胞或Caco-2细胞,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养24h,上清用DMEM培养基10倍梯度稀释后接种到96孔板中(每孔100 μ L),设置正常细胞组作为对照;感染2h后,补加100 μ L含有5%胎牛血清、1%青链霉素双抗的DMEM培养基后将细胞置于细胞培养箱(37℃, 5%CO₂)中,依照Reed-

Muench 法计算被测样品的病毒 TCID₅₀。

2.2 SARS-CoV-2 实时定量 PCR(RT-qPCR)检测
使用 QIAamp 病毒 RNA 提取试剂盒对收取的细胞沉淀提取 RNA,使用 ABI 7500 RT-qPCR 仪和 HiScript II U⁺ 一步 RT-qPCR 探针试剂盒,通过 RT-qPCR 方法检测病毒 N 基因和 E 基因拷贝数。RT-qPCR 程序:50 °C 15 min,95 °C 30 s;95 °C 10 s,63 °C 35 s,共 45 个循环。根据 CT 值计算病毒 N 基因和 E 基因拷贝数。检测 N 基因和 E 基因的特异性引物如下:N 基因上游引物:5'-GGGGAACCTCTCCTGCTAGAAT-3';N 基因下游引物:5'-CAGACATTTTGCTCTCAA GCT-3';E 基因上游引物:5'-CGATCTCTTGTA GATCTGTTCTC-3';E 基因下游引物:5'-ATATTGCA TTGCAGCAGTACGCACA-3'。TaqMan 探针序列如下:N gene:5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGA TTTAMRA-3';E gene:5'-FAM-ACACTAGCCAT CCTTACTGCGCTTCG-BHQ1-3'。

2.3 Baf-A1 的细胞毒性和抗病毒活性测定 应用 CCK-8 试剂盒和结晶紫染料检测 Baf-A1 对 Vero E6 细胞、Caco-2 细胞或 ST 细胞的毒性以及抗病毒效果,按说明书操作。

在 96 孔板的每个标准孔内铺入 7×10³ 个细胞,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。用 DMEM 倍比稀释 Baf-A1, Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞的浓度设置为:0.02,0.1,0.5,2.5,12.5 μmol/L; ST 细胞的浓度设置为 0.008,0.04,0.2,1.0,5.0 μmol/L。

CCK8 试验:前 1 d 铺有 Vero E6 细胞、Caco-2 细胞或 ST 细胞的 96 孔板弃去旧培养基,每孔加入 150 μL 含有 5% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基,然后按 50 μL/孔加入稀释的对应浓度 Baf-A1,检测抗病毒效果在加毒前 2 h 给药,加毒剂量为 SARS-CoV-2 病毒 0.008 MOI, PEDV 3.89×10⁻³ MOI, TGEV1.0×10⁻⁴ MOI;置于 37 °C、5% CO₂ 的湿润细胞培养箱中培养 48~72 h,显微镜观察并拍摄代表性图像,用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

具体步骤:(1)用无血清 DMEM 培养基将 CCK-8 试剂稀释 10 倍,注意 CCK-8 试剂需避光;(2)弃去 96 孔板中的培养基,加入稀释的 CCK-8 试剂,100 μL/孔;(3)在 37 °C 恒温箱中避光培养 2 h;(4)取出 96 孔板,用 TECAN-Spark 多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值;(5)检测数据结果转化为正常细胞对照组的百分比。使用 GraphPad Prism 6 软件处理数据。

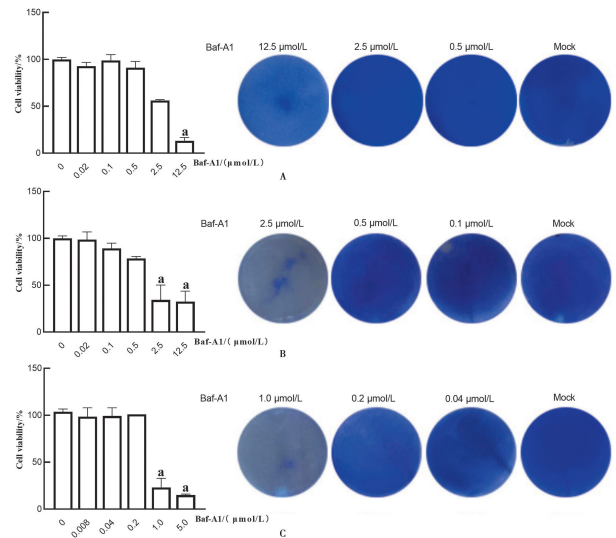
结晶紫染色试验:试验处理完成后的细胞培养板弃去培养基,加入结晶紫染料,染色 20~30 min,弃去结晶紫染料,用 PBS 洗涤 3-5 遍,拍照。

2.4 统计学分析 所用数据均设有 3 个重复,所有值均以平均数±标准差表示。利用 GraphPad Prism 8 对试验数据进行 t 检验和单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 不同浓度 Baf-A1 对 Vero E6、Caco-2 和 ST 细胞的毒性

通过 CCK-8 和结晶紫染色试验测定不同浓度的 Baf-A1 对 3 种细胞的毒性作用。结果显示,Baf-A1 在 12.5 μmol/L 时开始表现出对 Vero E6 细胞的毒性作用(图 1A),在 ≥2.5 μmol/L 时对 Caco-2 细胞产生明显毒性作用(图 1B),在 ≥1.0 μmol/L 时对 ST 细胞产生明显毒性作用(图 1C)。结晶紫结果与 CCK-8 结果相符。



A Baf-A1 处理 Vero E6 细胞的 CCK8 结果(前)和结晶紫染色结果(后) B Baf-A1 处理 Caco-2 细胞的 CCK8 结果(前)和结晶紫染色结果(后) C Baf-A1 处理 ST 细胞的 CCK8 结果(前)和结晶紫染色结果(后)。a 与正常细胞对照组比较,P<0.01。

图 1 不同浓度 Baf-A1 对 Vero E6、Caco-2 和 ST 细胞的毒性

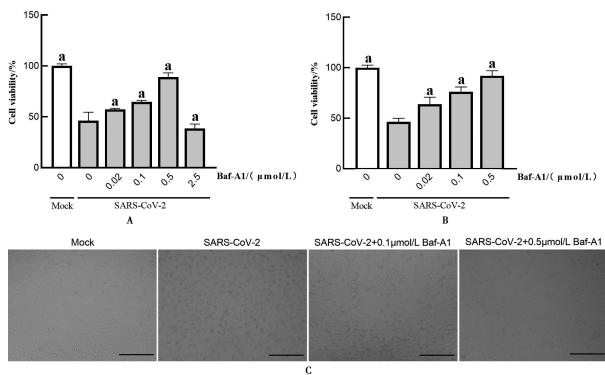
A CCK8 results (front) and crystal violet staining results (back) of Vero E6 cells treated with BAF-A1 B CCK8 results (front) and crystal violet staining results (back) of Caco-2 cells treated with BAF-A1 C CCK8 results (front) and crystal violet staining results (back) of ST cells treated with BAF-A1. a P<0.01.

Fig. 1 Toxicity of different concentrations of Baf-A1 on Vero E6, Caco-2 and ST cells

2 Baf-A1 抑制 SARS-CoV-2 在 Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞中复制的作用

采用 RT-qPCR 试验检测 SARS-CoV-2 感染后细胞内的 N 基因和 E 基因拷贝数。结果显示,0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L 的 Baf-A1 显著降低 SARS-CoV-2 在 Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞中的 N 基因拷贝数(图 3A)和 E 基因拷贝数(图 3B),以 0.5 μmol/L 的 Baf-A1 保护效果最好。通过病毒滴度试验测定

TCID₅₀ (药物处理组中 Baf-A1 终浓度为 0.5 μmol/L), 结果显示 0.5 μmol/L 的 Baf-A1 能够显著降低 Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞中的病毒载量 (图 3C)。CCK-8 试验结果显示, Baf-A1 在 0.02、0.1、0.5 μmol/L 浓度下对感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞 (图 2A 和 C) 和 Caco-2 细胞 (图 2B) 均有保护效果, 且在该范围内随着浓度升高保护效果加强, 当 Baf-A1 的浓度 ≥ 2.5 μmol/L 时保护效果显著减弱甚至产生毒性作用。表明 Baf-A1 在 0.5 μmol/L 浓度下对 Vero E6 细胞和 Caco-2 细胞中 SARS-CoV-2 的复制抑制效果最好, 病毒感染后细胞的存活率最高。

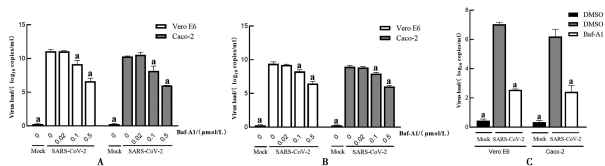


A, C Baf-A1 提高 SARS-CoV-2 感染 Vero E6 细胞的存活率 B Baf-A1 提高 SARS-CoV-2 感染 Caco-2 细胞的存活率。黑色标尺 = 300 μm。a 与只接毒组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 Baf-A1 提高 SARS-CoV-2 感染细胞的存活率

A, C Baf-A1 increased the survival rate of Vero E6 cells infected by SARS-CoV-2 B Baf-A1 increased the survival rate of Caco-2 cells infected by SARS-CoV-2. Black scale = 300 μm. $a P < 0.01$.

Fig. 2 Baf-A1 increased the survival rate of SARS-CoV-2 infected cells



A SARS-CoV-2 的 N 基因拷贝数检测 B SARS-CoV-2 的 E 基因拷贝数检测 C SARS-CoV-2 的病毒滴度测定。a 与只接毒组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 Baf-A1 抑制 SARS-CoV-2 在 Vero E6 和 Caco-2 细胞中的复制

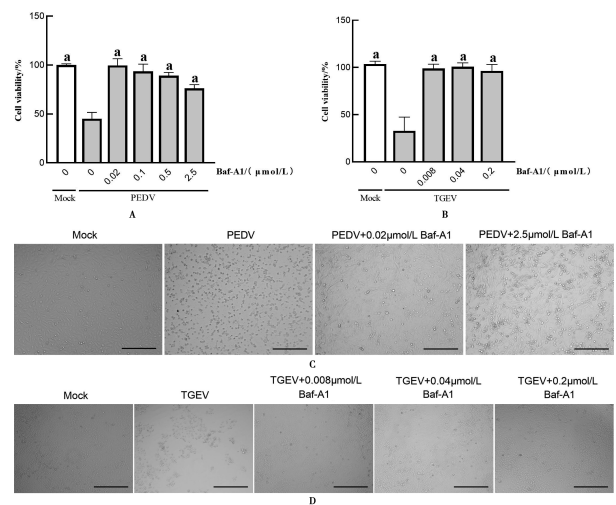
A N gene copies number of SARS-CoV-2 B E gene copies number of SARS-CoV-2 C Virus titer determination of SARS-CoV-2. $a P < 0.01$.

Fig. 3 Baf-A1 inhibited SARS-CoV-2 replication in Vero E6 and Caco-2 cells

3 Baf-A1 抑制 PEDV 和 TGEV 在 Vero E6 细胞和 ST 细胞中复制的作用

通过 CCK-8 试验检测不同浓度 Baf-A1 对感染 PEDV 的 Vero E6 细胞以及感染 TGEV 的 ST 细胞存活率的影响。结果显示, Baf-A1 在 0.02、0.1、0.5、2.5 μmol/L 浓度下对感染 PEDV 的 Vero E6 细胞产

生了较好的保护效果, 显著提高了被感染细胞存活率, 其中 0.02 μmol/L 的 Baf-A1 保护效果最好 (图 4A 和 C); 在 0.008、0.04、0.2 μmol/L 浓度下对感染 TGEV 的 ST 细胞表现出较好的保护效果, 显著提高了被感染细胞存活率, 其中 0.04 μmol/L 的 Baf-A1 保护效果最好 (图 4B 和 D)。病毒滴度试验测定 TCID₅₀ (PEDV 和 TGEV 的药物处理组中 Baf-A1 终浓度分别为 0.02 μmol/L 和 0.04 μmol/L), 结果显示 0.02 μmol/L 的 Baf-A1 能够显著降低 Vero E6 细胞中 PEDV 病毒载量 (图 5A), 0.04 μmol/L 的 Baf-A1 显著降低 ST 细胞中 TGEV 病毒载量 (图 5B)。表明 Baf-A1 在 0.02 μmol/L 浓度下对 Vero E6 细胞中 PEDV 的复制抑制效果最好, 病毒感染后细胞的存活率最高; Baf-A1 在 0.04 μmol/L 浓度下对 ST 细胞中 TGEV 的复制抑制效果最好, 病毒感染后细胞的存活率最高。



A, C Baf-A1 提高 PEDV 感染 Vero E6 细胞存活作用 B, D Baf-A1 提高 TGEV 感染 ST 细胞存活作用。黑色标尺 = 300 μm, a 与只接毒组比较, $P < 0.01$ 。

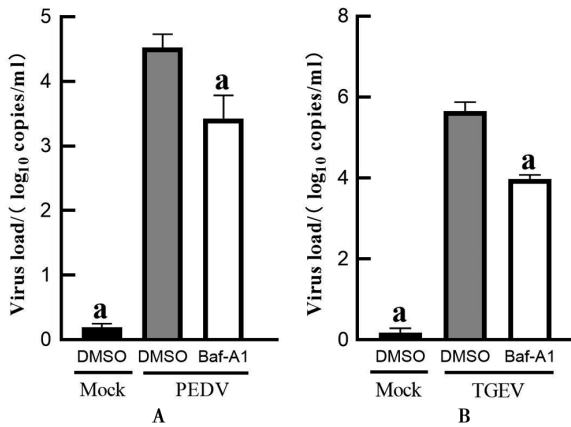
图 4 Baf-A1 提高 PEDV 和 TGEV 感染细胞的存活率作用

A, C Baf-A1 increased the survival rate of Vero E6 cells infected by PEDV B, D Baf-A1 increased the survival rate of ST cells infected by TGEV. Black scale = 300 μm. $a P < 0.01$.

Fig. 4 Baf-A1 increased the survival rate of PEDV and TGEV infected cells

讨论

SARS-CoV-2 已有 Alpha (B. 1. 1. 7)、Beta (B. 1. 351)、Gamma (P. 1)、Delta (B. 1. 617. 2)、Epsilon (B. 1. 427/ B. 1. 429)^[15-16]、Lota (B. 1. 526)^[17] 和 Omicron (B. 1. 1. 529)^[18] 等变异株, 这些变异株的传播性加快加强, 毒力增加, 降低了现有诊断技术、疫苗及疗法的有效性^[19], 给新冠疫情防控带来了新的巨大挑战。与 SARS-CoV-2 一样, PEDV 和 TGEV 也在不断突变, 降低了现有疫苗的保护效果。因此, 开发广谱、高效且安全的抗冠状病毒药物来防治 SARS-CoV-2、TGEV 和 PEDV 势在必行。



A PEDV的病毒滴度测定 B TGEV的病毒滴度测定。a与只接毒组比较, $P < 0.01$ 。

图5 Baf-A1抑制PEDV和TGEV在易感细胞中的复制

A Virus titer determination of PEDV B Virus titer determination of TGEV. a $P < 0.01$ 。

Fig.5 Baf-A1 inhibited PEDV and TGEV replication in susceptible cells

V-ATP酶是一种杂多聚酶,广泛分布于内体、溶酶体等细胞器膜上,可使质子(H^+)跨膜转运,进而调节pH值、自噬、酶活性、蛋白质降解等细胞过程。此外,V-ATP酶介导的酸化可靶向抑制结核分枝杆菌、嗜肺军团菌或副溶血弧菌等微生物病原体。同时,V-ATP酶介导的酸化也是某些病毒感染细胞的必要条件之一,比如流感和埃博拉病毒^[14]。因此,V-ATP酶有望成为开发广谱抗病毒药物的新靶点。Baf-A1是来源于灰色链霉菌的一种大环内酯类抗生素,是靶向内体和溶酶体而抑制细胞自噬的药物,其通过特异性抑制V-ATP酶活性,阻止内体和溶酶体腔内酸化、溶酶体蛋白酶活化及自噬体内容物降解^[20]。研究显示,Baf-A1基于该机制发挥其对甲型流感病毒、乙型流感病毒^[21]、呼吸道合胞病毒^[22]、SARS-CoV^[23]、寨卡病毒^[24]和水痘带状疱疹病毒^[25]等的抗病毒效果。

前期研究表明,Baf-A1在体外(Vero E6、hACE2-293T、Huh-7)及体内(hACE2转基因小鼠)可以有效抑制SARS-CoV-2复制,发挥抗SARS-CoV-2作用^[26]。在此基础上进一步通过结晶紫染色试验、CCK8试验、病毒滴定试验和RT-qPCR检测,分别在Caco-2、Vero E6、ST细胞上评价了Baf-A1的细胞毒性作用及对SARS-CoV-2、PEDV、TGEV的抗病毒效果。结果显示,Baf-A1在12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时开始显著表现出对Vero E6细胞的毒性作用,在大于等于2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时对Caco-2细胞产生明显毒性作用,在大于等于1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时对ST细胞产生明显毒性作用,表明Baf-A1对不同细胞系的毒性作用浓度不同,评价其抗病毒效果时应据此设置相应的药物浓度梯度。结果还显示,Baf-A1在0.02,0.1,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对攻毒0.008 MOI SARS-CoV-2的Vero E6细胞和Caco-

2细胞均有保护效果,特别是在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对Vero E6细胞和Caco-2细胞中SARS-CoV-2的复制抑制效果最好,被感染细胞的存活率最高。Baf-A1在0.02,0.1,0.5,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对攻毒 3.89×10^{-3} MOI PEDV的Vero E6细胞产生了较好的保护效果,显著提高了感染细胞的存活率,其中0.02 $\mu\text{mol/L}$ 的Baf-A1保护效果最好,可显著降低被感染细胞的病毒载量。Baf-A1在0.008,0.04,0.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对攻毒 1.0×10^{-4} MOI TGEV的ST细胞表现出较好的保护效果,显著提高了感染细胞的存活率,其中0.04 $\mu\text{mol/L}$ 的Baf-A1保护效果最好,可显著降低被感染细胞的病毒载量。由此可见Baf-A1对不同病毒发挥最佳抗病毒效果的浓度有所不同。

尚超等^[27]采用hACE2转基因小鼠评价Baf-A1的抗病毒效果,结果显示(0.1 mg/kg)Baf-A1给药6d能抑制SARS-CoV-2在小鼠肺组织中的复制,并改善病毒所致肺炎样病理改变。值得注意的是,高浓度的Baf-A1会展现出毒性作用,在进一步将其开发为临床抗SARS-CoV-2、PEDV和TGEV治疗药物之前,需进一步明确其作用机制,并在非人灵长类、猪群等易感动物模型上全面深入研究其安全性和有效性。

本研究联合应用Vero E6、Caco-2、ST细胞评价了bafilomycin A1的体外抗SARS-CoV-2、PEDV、TGEV作用,结果表明在有效浓度范围内Baf-A1显著抑制SARS-CoV-2在Vero E6和Caco-2细胞、PEDV在Vero E6细胞、TGEV在ST细胞中的复制,发挥明显的抗病毒效果,显著提高被感染细胞的存活率,表明Baf-A1具有广谱抗冠状病毒效果,但需要在动物模型上作进一步验证。

【参考文献】

[1] 楚侃侃,郭玲,陈利,等. 冠状病毒分类、宿主动物与所致人类疾病研究进展[J]. 中国公共卫生,2022,38(6):815-820.
 [2] 王石雷. 新型广谱冠状病毒抑制剂的开发及其抑制机制研究[D]. 武汉:武汉大学,2017.
 [3] Zhai X,Wang N,Jiao H,et al. Melatonin and other indoles show antiviral activities against swine coronaviruses *in vitro* at pharmacological concentrations [J]. J Pineal Res, 2021 (71): e12754.
 [4] Petrosillo N,Viceconte G,Ergonul O,et al. COVID-19,SARS and MERS:are they closely related? [J]. Clin Microbiol Infect, 2020(26):729-734.
 [5] Huang HY,Liao HY,Chen X,et al. Vaccination with SARS-CoV-2 spike protein lacking glycan shields elicits enhanced protective responses in animal models[J]. Sci Transl Med 2022 (14):eabm0899.
 [6] Turlewicz-Podbielska H, Pomorska-Mol M. Porcine coronaviruses:Overview of the state of the Art[J]. Virol Sin, 2021(36):833-851.

(下转 270 页)

380.

[14] Dutta D, Jana M, Majumder M, et al. Selective targeting of the Tlr2/Myd88/Nf-Kb pathway reduces A-synuclein spreading *in vitro* and *in vivo*[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):5382.

[15] Zhou M, Xu W, Wang J, et al. Boosting mtor-dependent autophagy via upstream Tlr4-Myd88-Mapk signalling and downstream Nf-Kb pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury[J]. EBioMedicine, 2018 (35): 345-360.

[16] Qiao CX, Xu S, Wang DD, et al. Microrna-19b Alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human intestinal cells by up-regulation of Runx3[J]. Eur Rev Med

Pharmacol Sci, 2018, 22(16):5284-5294.

[17] Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008(1143):21-34.

[18] Bomfim CCB, Fisher L, Amaral EP, et al. *Mycobacterium Tuberculosis* Induces Irg1 in murine macrophages by a pathway involving both Tlr-2 and Sting/Ifnar signaling and requiring bacterial phagocytosis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022 (12):862582.

[19] 徐金瑞, 郑雪迪, 马伯利, 等. Lxr-Abca1/Abcg1 通路对 bcg 感染的巨噬细胞凋亡和炎症反应的调控作用[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(5):401-406.

【收稿日期】 2022-08-31 【修回日期】 2022-11-19

(上接 264 页)

[7] 伊立超, 李乐天, 郝嘉翼, 等. TGEV-RBD 基因在昆虫杆状病毒中的表达及鉴定[J]. 动物医学进展, 2021, 42(9):65-70.

[8] Lin CM, Gao X, Oka T, et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains[J]. J Virol, 2015(89):3332-3342.

[9] 郝建伟, 薛春宜, 曹永长. 猪流行性腹泻病毒全病毒灭活疫苗量效关系研究[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(5):1536-1543.

[10] 周剑, 陈秀明, 江红. HPLC 法测定 *Streptomyces sp.* 发酵液中 bafilomycin A1 的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4):730-734.

[11] Intra B, Euanorasetr J, Nihira T, et al. Characterization of a gamma-butyrolactone synthetase gene homologue (stcA) involved in bafilomycin production and aerial mycelium formation in *Streptomyces sp.* SBI034[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016 (100):2749-2760.

[12] Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin and cell death: the " a-B-cs " of plecomacrolide-induced neuroprotection [J]. Autophagy, 2006(2):228-230.

[13] Xie X, Lu S, Pan X, et al. Antiviral bafilomycins from a feces-inhabiting *Streptomyces sp*[J]. J Nat Prod, 2021(84):537-543.

[14] Khan MM, Lee S, Couoh-Cardel S, et al. Oxidative stress protein Oxr1 promotes V-ATPase holoenzyme disassembly in catalytic activity-independent manner[J]. EMBO J, 2022(41):e109360.

[15] Collier DA, De Marco A, Ferreira I, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B. 1. 1. 7 to mRNA vaccine-elicited antibodies[J]. Nature, 2021(593):136-141.

[16] Wang P, Nair MS, Liu L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B. 1. 351 and B. 1. 1. 7[J]. Nature, 2021(593):130-135.

[17] 顾望, 于世寰. 新型冠状病毒变异谱系的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(6):932-935.

[18] Ma C, Chen X, Mei F, et al. Drastic decline in sera neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variant in Wuhan COVID-19

convalescents[J]. Emerg Microbes Infect, 2022(11):567-572.

[19] Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, et al. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B. 1. 617. 2) compared with alpha (B. 1. 1. 7) variants of concern: a cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2022(22):35-42.

[20] Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion [J]. Autophagy, 2015(11):1437-1438.

[21] Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, et al. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells[J]. Antiviral Res, 1995(270):425-430.

[22] Niimi K, Asano K, Shiraiishi Y, et al. TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA [J]. J Immunol, 2007(178):489-495.

[23] Wang H, Yang P, Liu K, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway[J]. Cell Res, 2008(18):290-301.

[24] Sabino C, Basic M, Bender D, et al. Bafilomycin A1 and U18666A efficiently impair ZIKV infection[J]. Viruses, 2019, 11(6):524.

[25] Girsch JH, Walters K, Jackson W, et al. Progeny varicella-zoster virus capsids exit the nucleus but never undergo secondary envelopment during autophagic flux inhibition by Bafilomycin A1 [J]. J Virol, 2019, 93(17):e00505-19.

[26] Shang C, Zhuang X, Zhang H, et al. Inhibition of autophagy suppresses SARS-CoV-2 replication and ameliorates pneumonia in hACE2 transgenic mice and xenografted human lung tissues[J]. J Virol, 2021(95):e0153721.

[27] 尚超. 新型冠状病毒干扰宿主细胞自噬过程及其潜在治疗靶点研究[D]. 北京:军事科学院, 2021.

【收稿日期】 2022-08-30 【修回日期】 2022-11-15