



李晓哈,陈婧,周斌. 抗日本乙型脑炎病毒的线粒体靶向小分子化合物的筛选及鉴定[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):497-506.

LI Xiaohan, CHEN Jing, ZHOU Bin. Screening and identification of mitochondrial targeted small molecular compounds against Japanese encephalitis virus[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 497-506.

抗日本乙型脑炎病毒的线粒体靶向小分子化合物的筛选及鉴定

李晓哈,陈婧,周斌*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要: [目的]线粒体作为重要的能量代谢细胞器,不仅可以调控宿主先天免疫通路影响病毒复制,而且其生物学功能的改变与病毒生命周期密不可分。本文旨在确定抑制日本乙型脑炎病毒(JEV)的线粒体靶向化合物。[方法]通过体外 CCK-8、间接免疫荧光、蛋白免疫印迹、RT-qPCR 以及细胞因子检测等试验,对 382 种线粒体靶向化合物抗 JEV 的效果进行评价,筛选到的敏感药物在小鼠体内进行抗病毒效果验证。[结果]通过药物初筛,从 382 种药物中筛选出 9 种疑似抗 JEV 药物,进一步的体外分子试验筛选确定了其中 3 种药物对 JEV 复制有明显的抑制作用,分别为丙酮酸钠(sodium 2-oxopropanoate)、布喹那(brequinar)及松果菊苷(echinacoside)。动物试验结果表明,3 种药物有效抑制了 JEV 在小鼠体内的增殖,给药组小鼠体重增加明显高于对照组,血液中的病毒含量更低,死亡率更低,细胞因子水平出现显著变化,其中以布喹那给药组最为明显。[结论]成功筛选出 3 种抗 JEV 的线粒体靶向化合物,为探究线粒体在病毒复制中发挥的作用提供了借鉴,也为抗 JEV 的临床药物研发提供了新思路。

关键词: 线粒体;日本乙型脑炎病毒;抗病毒;药物筛选;小鼠;保护率

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)03-0497-10

Screening and identification of mitochondrial targeted small molecular compounds against Japanese encephalitis virus

LI Xiaohan, CHEN Jing, ZHOU Bin*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] Mitochondria, an important energy metabolism organelle, can not only affect virus replication by regulating host innate immunity, but also its biological function changes are significant involved in virus life cycle. This study aimed to search for mitochondrial targeting compounds that inhibited Japanese encephalitis virus (JEV). [Methods] In this study, 382 mitochondrial targeting compounds were identified *in vitro* through experiments such as CCK-8, indirect immunofluorescence, Western blot, RT-qPCR and cytokine detection tests, and the screening results were further validated in mice. [Results] Through preliminary screening of drugs, 9 suspected anti-JEV drugs were selected from 382 drugs. Further *in vitro* molecular screening determined that 3 of these drugs had significant inhibitory effects on JEV replication, namely sodium 2-oxopropanoate, brequinar and echinacoside. The results of mouse animal experiments showed that the three drugs effectively inhibited the proliferation of JEV in mice, and the body weight of the treated mice increased significantly compared to the control group. The virus content in the blood was lower, the mortality rate was lower, and the cytokine levels showed significant changes, with the most significant change in the brequinar-treated group. [Conclusions] This study successfully screened three anti-JEV mitochondrial targeting compounds, providing new idea for exploring the impact of mitochondria on viral replication, and also for clinical drug research on anti-JEV.

Keywords: mitochondrion; Japanese encephalitis virus; antiviral; drug screening; mouse; protection rate

日本乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 是由日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的一种人畜共患病^[1], JEV 属于黄病毒科 (Flaviridae) 黄病毒属 (*Flavivirus*)^[2]。乙型脑炎最早在日本发现,并于 1871 年开始流行^[3]。乙型脑炎病原体在 1935 年首次被日本研究者从发病马和人脑中分离出来^[4]。1940 年,中国研究者从乙脑患者的脑组织中成功分离出病原体,证实了该病的存在。JE 主要流行

收稿日期:2023-03-27

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1800100)

*通信作者:周斌,博士,教授,主要从事动物分子病毒学研究, E-mail: zhoubin@njau.edu.cn。

于亚洲,每年全球报道约 69 000 例 JE 感染^[5-6]。其中约一半的患者后期会导致永久的神经损伤,而有约 1/4 的患者最终会死亡^[7-8]。JEV 主要在蚊虫、飞禽、猪等脊椎动物中传播^[9],目前疫苗接种是预防 JEV 感染最有效的方法。然而,由于免疫策略或疫苗限制的失败,大约 80% 的 JE 病例发生在接种 JEV 疫苗计划覆盖的地区。目前,临床还没有有效的抗 JEV 感染药物^[10],因此,针对 JEV 的药物开发至关重要。

线粒体主要功能是参与细胞的能量代谢,是细胞内产生能量的重要场所^[11-12]。线粒体是一个双层膜结构,内膜上有许多褶皱,称为线粒体内膜嵴,这些嵴的存在增加了内膜表面积,有利于线粒体内的代谢反应。线粒体内膜中还有许多蛋白,这些蛋白参与线粒体内的氧化磷酸化反应^[13],将细胞内的葡萄糖、脂肪酸等物质转化为 ATP,供给细胞使用^[14-15]。线粒体在细胞的许多重要进程中发挥关键作用,包括能量产生、脂肪酸氧化、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、钙信号传导、通透性改变、凋亡和热产生等^[16-17]。越来越多的研究表明,许多疾病的发生都与线粒体功能受损有关,如活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累增加,氧化磷酸化及 ATP 产生减少^[18]。目前,线粒体被认为是癌症、心血管疾病、神经相关疾病新药设计的重要靶点之一。

病毒的复制是一个动态的过程,需要利用宿主细胞中的多种细胞器,而线粒体也参与多种病毒的复制过程。研究发现,通过抑制线粒体融合和增加线粒体膜电位,可以显著抑制线粒体抗病毒信号(mitochondrial antiviral signaling, MAVS)蛋白活性,从而拮抗 MAVS 蛋白抗病毒活性^[19]。线粒体对细胞凋亡的控制也是先天免疫的一个重要方面。病毒已经进化出了一些方式来调节线粒体膜电位,而线粒体膜电位的下降可以增加线粒体内膜通透性,导致线粒体膜的消失和线粒体生物能的丧失^[20]。此外,由于不同的病毒能够调节抗氧化酶,病毒感染会诱导控制复制的 ROS 产生。ROS 的增加可能有助于线粒体生物能学的改变。反过来,功能异常的线粒体可加剧氧化应激,导致能量崩溃和细胞死亡^[21]。因此,为了更好地理解线粒体在 JEV 复制中的作用,深入了解该病毒的感染机制,筛选针对 JEV 的线粒体靶向小分子化合物至关重要。

通过分析比较,我们选用的化合物库包含 382 种线粒体靶向的小分子化合物,主要靶点涉及线粒体代谢、ATP 合成酶(ATP synthase)、线粒体自噬(mitophagy)、ROS 等。这些小分子药物或生物制剂可以通过多种途径作用于线粒体,包括抑制电子传递链、氧化磷酸化解偶联、线粒体 Ca^{2+} 调节以及通过减少或增加线粒体 ROS 积累来控制氧化应激等,是进行线粒体相关药物开发及研究的重要工具。

本试验针对 JEV,在仓鼠肾细胞(BHK-21)上通过 CCK-8、蛋白印迹(Western blot)、荧光定量 PCR(RT-qPCR)和间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)等方法对线粒体靶向药物库的 382 种药物进行筛选,将筛选后的 3 种敏感药物在 C57BL/6 小鼠体内进行验证。这些研究不仅有助于确定候选药物的靶向特点,而且有助于研究病毒与宿主细胞的相互作用,揭示病毒复制和传播的关键步骤,并为设计更加有效的抗病毒药物提供指导,以控制病毒的传播和流行,保护公共卫生安全。

1 材料与方法

1.1 细胞和毒株

仓鼠肾细胞(BHK-21)和 JEV NJ-2008 株(GenBank 登录号:GQ918133)由本实验室保存。

1.2 试验动物、试剂及仪器

试验动物:SPF 级 C57BL/6 试验小鼠购自扬州大学实验动物中心(3 周龄/雌性/12 g)。

主要试剂:CCK-8 试剂购自爱必信(上海)生物科技有限公司(ABS50003,货号);JEV 荧光定量引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;TRIzol 试剂购自 TaKaRa(9109);JEV NS5 单克隆抗体由华中农业大学曹胜波教授馈赠;鼠源 β -actin 购自 Santa cruz 公司(SC-8432);线粒体靶向化合物库购自 MedChemExpress 公司(HY-L089);DMEM 细胞培养基及血清购自 Gibco 公司(8122778、10099141C);小鼠血清细胞因子检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司(SBJ-H0038-48T、SBJ-H0465-48T、SBJ-H0465-48T);细胞内 ROS 检测试剂盒购自 Sigma 公司(Mak143)。

主要仪器:全自动雪花制冰机(太仓市华美生化仪器厂,中国),超低温冰箱(SANYO,日本),二氧化碳培养箱、实时荧光定量 PCR 系统 QuantStudio 6(Thermo Fisher Scientific,美国),超净工作台和生物安全柜(苏州安泰仪器,中国),垂直电泳槽(Tanon,中国),超声破碎仪(南京先欧,中国),化学发光成像系统(Tanon,中国),微量移液器,离心机(Eppendorf,德国),ThermoNanoDrop 2000 分光光度计(Thermo

Scientific,美国)。

1.3 抗病毒药物体外筛选及鉴定

1.3.1 药物细胞毒性的测定 将药物库中的每种药物以二甲基亚砜(DMSO)进行稀释,每种药物从低浓度到高浓度共稀释5个梯度,同时设立DMSO对照组。将BHK-21细胞铺于96孔细胞培养板中,在细胞覆盖孔底面积约80%时,向培养板每孔加入10 μL不同浓度的药物,将细胞转至37℃培养箱。48 h后向每孔加入10 μL CCK-8试剂,将96孔板在37℃孵育1 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光值(A_{450}),再通过公式计算细胞存活率,确定药物最适浓度。

$$\text{细胞存活率} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%; \text{抑制率} = [(A_c - A_s) / (A_c - A_b)] \times 100\%。$$

式中: A_s 为试验孔(含有细胞的培养基、CCK-8试剂、药物)吸光值; A_c 为对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8试剂,无药物)吸光值; A_b 为空白孔(不含细胞和药物的培养基、CCK-8试剂)吸光值。

1.3.2 线粒体靶向抗日本乙型脑炎病毒药物初筛 将药物库中所有药物稀释成1.3.1节中所确定的最适浓度,再加入DMEM完全培养基(含体积分数为2%胎牛血清)中。将BHK-21细胞铺于96孔细胞培养板中,待细胞覆盖孔底面积约80%时,将JEV(MOI=0.1)感染细胞。1.5 h后更换含有药物的DMEM完全培养基,继续培养48 h,随后向每孔加入10 μL CCK-8试剂,将培养板在培养箱内孵育1 h,最后用酶标仪测定在450 nm处的吸光值(D_{450}),通过1.3.1节中公式计算细胞存活率,初步筛选抗JEV的药物。此外,确定9种药物的选择指数(SI)。首先设置最大药物浓度30 μmol·L⁻¹,根据CCK-8细胞毒性结果计算细胞半数致死浓度(CC_{50})(μmol·L⁻¹),然后设置0.1~1 μmol·L⁻¹药物浓度,确定9种药物的半数有效浓度(EC_{50} , μmol·L⁻¹)。根据如下公式计算选择指数(SI): $SI = CC_{50} / EC_{50}$ 。

1.3.3 间接免疫荧光法(IFA)验证初筛药物 根据1.3.2节中初筛得到的抗JEV药物,将其在适宜浓度范围内由低到高稀释成3个浓度梯度,并加入DMEM完全培养基中,将BHK-21细胞铺于24孔细胞培养板中,细胞覆盖面积约80%时,将JEV(MOI=0.1)感染细胞,1~1.5 h后更换含有药物的DMEM完全培养基。48 h后依次进行4%(体积分数)多聚甲醛室温固定,0.1%(体积分数)Triton透膜,20 g·L⁻¹BSA封闭,之后加抗小鼠的JEV-E一抗4℃孵育过夜,PBST洗3次,再加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗,室温孵育1 h,PBST洗3次,最后用DAPI染色8~10 min,PBST洗3次,于荧光显微镜下观察拍照。JEV-E被标记为绿色荧光。

1.3.4 蛋白印迹法(Western blot)验证初筛药物 根据1.3.2节中初筛得到的抗JEV药物,将其在适宜浓度范围内由低到高稀释成3个浓度梯度,加入DMEM完全培养基中,将BHK-21细胞接种于24孔细胞培养板中,待细胞覆盖孔底面积约80%时,加JEV(MOI=0.1)感染细胞。1.5 h后更换含有药物的DMEM完全培养基。48 h后将细胞用预冷的PBS洗3次,每孔加入160 μL RIPA裂解液,冰上裂解20~30 min。收集裂解液按比例加入5×SDS加样缓冲液,放入水浴锅中煮沸10 min后,通过SDS-PAGE分离裂解液中的蛋白质,将其转移到硝酸纤维素膜上,然后用JEV NS5的单抗进行Western blot检测,同时检测β-actin抗体作为对照。

1.3.5 细胞活性氧(ROS)水平的检测 根据试剂盒说明,将细胞接种到底部透明的96孔黑色平板上,于37℃、5%CO₂培养,待细胞覆盖孔底面积约80%时,将JEV感染细胞(MOI=0.1),1.5 h后更换含有药物的DMEM完全培养基,继续培养24 h,每孔加入100 μL含荧光传感器的主反应混合物,孵育1 h,以加0.5 nmol·L⁻¹ H₂O₂为阳性对照,测定525 nm处的吸光值(A_{450})。通过如下公式计算ROS的相对水平: $ROS \text{ 相对水平} = A_{450 \text{ 样本}} / A_{450 \text{ 阳性}}$ 。

1.3.6 细胞内二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)表达水平的检测 将细胞接种于6孔细胞板,37℃、5%CO₂培养,待细胞覆盖孔底面积约80%时,将JEV感染细胞(MOI=0.1),1.5 h后更换含有药物的DMEM完全培养基,继续培养24 h。使用TRIzol试剂提取感染小鼠血液中的总RNA,逆转录得到cDNA,通过实时荧光定量PCR(qPCR)检测DHODH mRNA的表达水平。利用DNAMAN 6.0软件设计DHODH基因和内参β-actin基因引物(表1)。

1.4 动物试验

1.4.1 试验设计 根据1.3.3和1.3.4节中所鉴定的3种抗病毒药物丙酮酸钠、布喹那和松果菊苷,参照药物的体内适宜剂量,用无菌PBS分别稀释成高剂量组(200 mg·mL⁻¹)和低剂量组(20 mg·mL⁻¹),每只小鼠注射0.1 mL,每组10只小鼠;同时设立PBS对照组。小鼠采用3周龄SPF级C57BL/6小鼠,用微量注

射器刺破小鼠脑壳后,以每只 10^4 PFU 进行腹腔攻毒。分组情况见表 2。攻毒后每天按时灌胃给药,直到发病死亡。每天经眼眶静脉采血 $500 \mu\text{L}$ 并记录小鼠体重变化及存活率。

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 Primers sequence for real-time PCR

基因名称 Gene Name	上游引物序列 Forward primer sequence(5'→3')	下游引物序列 Reverse primer sequence(5'→3')
JEV E	AGAGCGGGGAAAAGGTCAT	TTTCACGCTCTTCTACAGT
β -actin	CTGCATCATGAAGTGCCGACGT	CTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC
DHODH	AGATCTGTGACCCAGACGA	CTCCAATGGCGTCTGTCACT

表 2 试验分组

Table 2 Grouping of experiments

药物 Drug	攻毒 Virus infection	每只药物剂量 Drug dosage per mouse	动物数量 Number of mice
丙酮酸钠	是 Yes	$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
Sodium 2-oxopropanoate	是 Yes	$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
布喹那	是 Yes	$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
Brequinar	是 Yes	$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
松果菊苷	是 Yes	$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
Echinacoside	是 Yes	$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.1 mL	10
对照	是 Yes	PBS, 0.1 mL	10
Control	否 No	PBS, 0.1 mL	5

1.4.2 荧光定量 PCR 法检测小鼠体内病毒含量 使用 TRIzol 试剂提取感染小鼠血液中的总 RNA, 逆转录得到 cDNA。在 Q6 实时 PCR 系统中, 使用 Eva green 2×qPCR master mix 通过 qPCR 检测 JEV E mRNA 的表达量, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 JEV E mRNA 的相对表达水平。

1.4.3 蚀斑法检测小鼠体内的病毒含量 将 BHK-21 细胞培养于 6 孔细胞培养板中, 待细胞覆盖孔底面积约 80% 时, 利用 DMEM 培养基将采集的小鼠血液进行 10 倍比稀释, 取各浓度稀释液加入 BHK-21 细胞培养孔中, 每孔 1 mL, 每个稀释度重复 3 孔。37 °C 吸附 1.5 h 后弃培养液, 加入 40 °C 左右的含低熔点琼脂糖的 2×DMEM 培养基, 每孔 2 mL, 完全凝固后继续培养 72 h。每孔加入 1 mL 结晶紫溶液染色 4 h 后冲洗干净, 根据蚀斑数计算病毒滴度。计算公式: 蚀斑形成单位 (PFU·mL⁻¹) = 每个稀释度蚀斑平均数×病毒稀释度的倒数/每孔病毒接种量 (mL)。

1.4.4 小鼠体内炎症细胞因子浓度的检测 采集的小鼠血液在室温下自然凝固 10~20 min, 3 000 g 条件下离心 20 min, 收集上清液, 按照 TNF- α 、IFN- α 和 IL-6 试剂盒说明书进行相应操作, 最后依序测量各孔的吸光值 (A_{450}) 并计算相应细胞因子浓度。

2 结果与分析

2.1 线粒体靶向抗日本乙型脑炎病毒药物初筛结果

根据药物细胞毒性初筛结果, 382 种药物浓度在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下均无细胞毒性, 因此采用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行药物抗 JEV 的初筛试验。使用 CCK-8 法测定并根据公式计算细胞相对活性。结果表明, 对 382 个药物进行处理, 有 9 个药物处理后细胞存活率明显高于攻毒对照组, 可作为抗 JEV 候选药物。根据初筛结果, 设置最大药物浓度为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果显示在此浓度下药物没有明显的细胞毒性, 根据 $SI = CC_{50}/EC_{50}$, 所有药物 SI 值均大于 15 (图 1), 具有临床应用意义。

2.2 筛选出的 3 种药物的体外抗病毒效果鉴定

通过 IFA 观察 JEV 复制情况, 结果 (图 2) 显示: 初筛的 9 种药物中有 3 种对 JEV 的复制有明显抑制作用, 分别为丙酮酸钠 (sodium 2-oxopropanoate)、布喹那 (brequinar) 及松果菊苷 (echinacoside)。对 JEV 感染率的计算结果表明, 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药剂量下, 布喹那对 JEV 的抑制程度最高, JEV 感染率仅有 17%, 其次则是丙酮酸钠与松果菊苷给药组, JEV 的感染率分别为 41% 和 33%。

Western blot 检测 JEV NS5 蛋白的表达情况, 通过 ImageJ 软件进行扫描灰度分析, 结果 (图 3) 显示: 9 种线粒体药物中有 3 种对 JEV 有明显的抑制作用, 分别为丙酮酸钠、布喹那及松果菊苷, 与 IFA 鉴定结果一致。

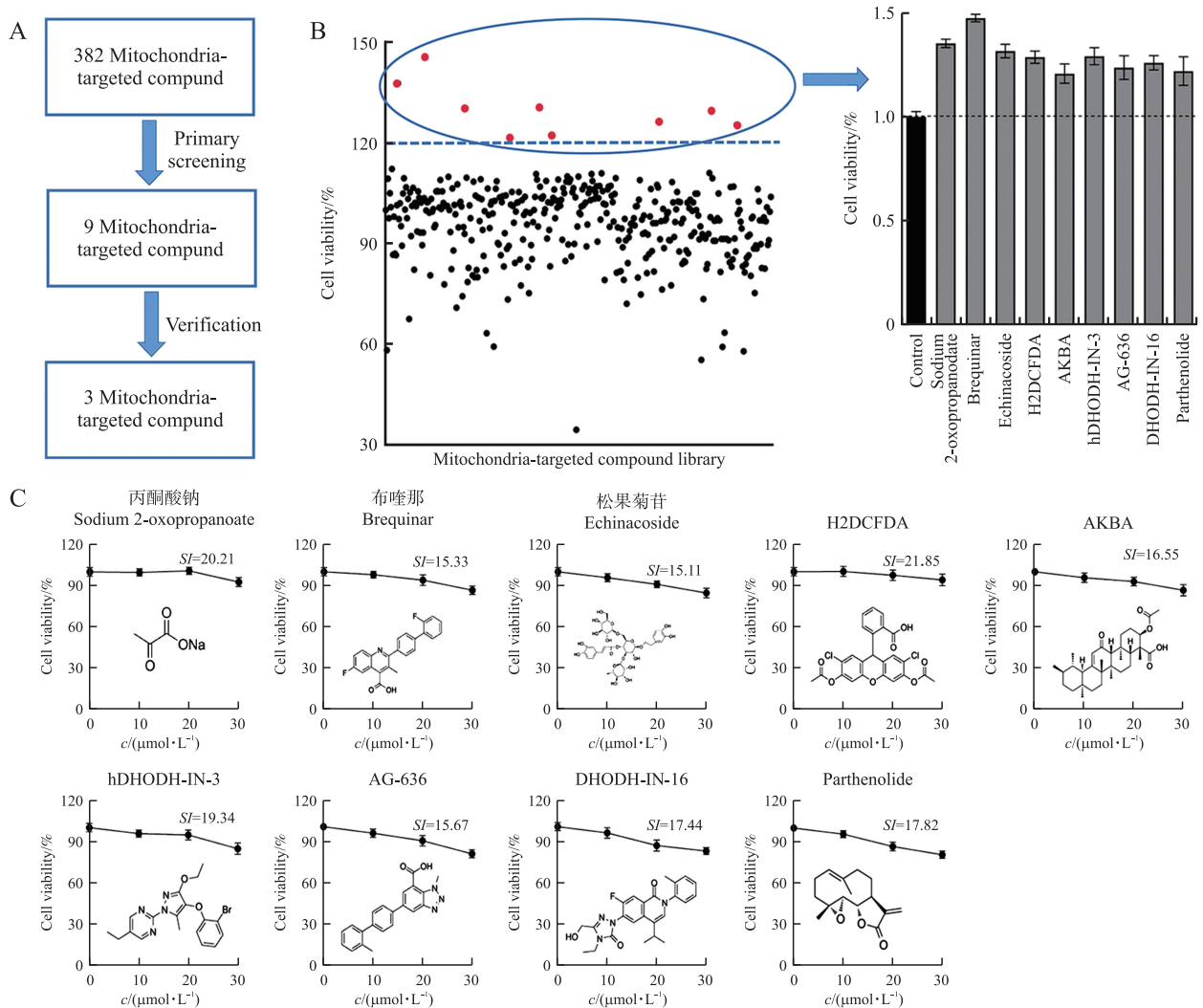


图1 抗日本乙型脑炎病毒(JEV)复制的线粒体靶向化合物库筛选

Fig. 1 Screening of mitochondrial targeted compound libraries against Japanese encephalitis virus (JEV) replication

A. 药物筛选流程图; B. CCK-8 法药物初筛结果; C. 9 种初筛药物选择指数及分子式。

A. Drug screening flow chart; B. Preliminary drug screening results by CCK-8 method; C. Selectivity index and molecular formula of 9 primary screening drugs.

2.3 细胞的活性氧(ROS)水平及二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)基因表达水平

由于 Sodium 2-oxopropanoate 和 Echinacoside 为 ROS 抑制剂,而 Brequinar 为 DHODH 抑制剂,我们分别对其抑制效果进行了检测。结果(图4)显示:在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物浓度下,丙酮酸钠和松果菊苷处理组 ROS 水平分别下降 50% 和 47%,布喹那处理组的 DHODH 表达水平下降 50%,表明这 3 种小分子化合物均成功抑制了其靶点相关基因的表达。

2.4 3 种药物的体内抗病毒效果鉴定

根据细胞试验的结果,我们选择具有明显抗 JEV 复制作用的 3 种药物丙酮酸钠、布喹那及松果菊苷进行动物试验,分高、低 2 个药物浓度。根据每日统计的小鼠体重变化情况(图5),从感染 JEV 后 5 d 起,对照组小鼠体重增长逐渐变缓;12 d,相较对照组,3 种药物低剂量组出现差异,而 3 种药物高剂量给药组出现显著差异($P < 0.05$)。死亡率统计显示,感染后 14 d,对照组存活率为 30%,丙酮酸钠、布喹那及松果菊苷低剂量给药组存活率分别为 50%、60% 和 50%,高剂量给药组存活率分别为 60%、80% 和 60%,表明 3 种药物在小鼠体内均对 JEV 复制有明显的抑制作用,且 Brequinar 抗 JEV 效果最佳。

利用 TRIzol 法分别提取小鼠 JEV 感染后 7~10 d 的全血总 RNA,反转录后通过 qPCR 检测 JEV mRNA 的水平。结果(图6)显示:3 种药物中布喹那组小鼠体内病毒含量最低,显著低于对照组,其余 2 个药物组小鼠体内病毒含量也均有所下降,表明 3 种药物在小鼠体内均抑制了 JEV 的复制。

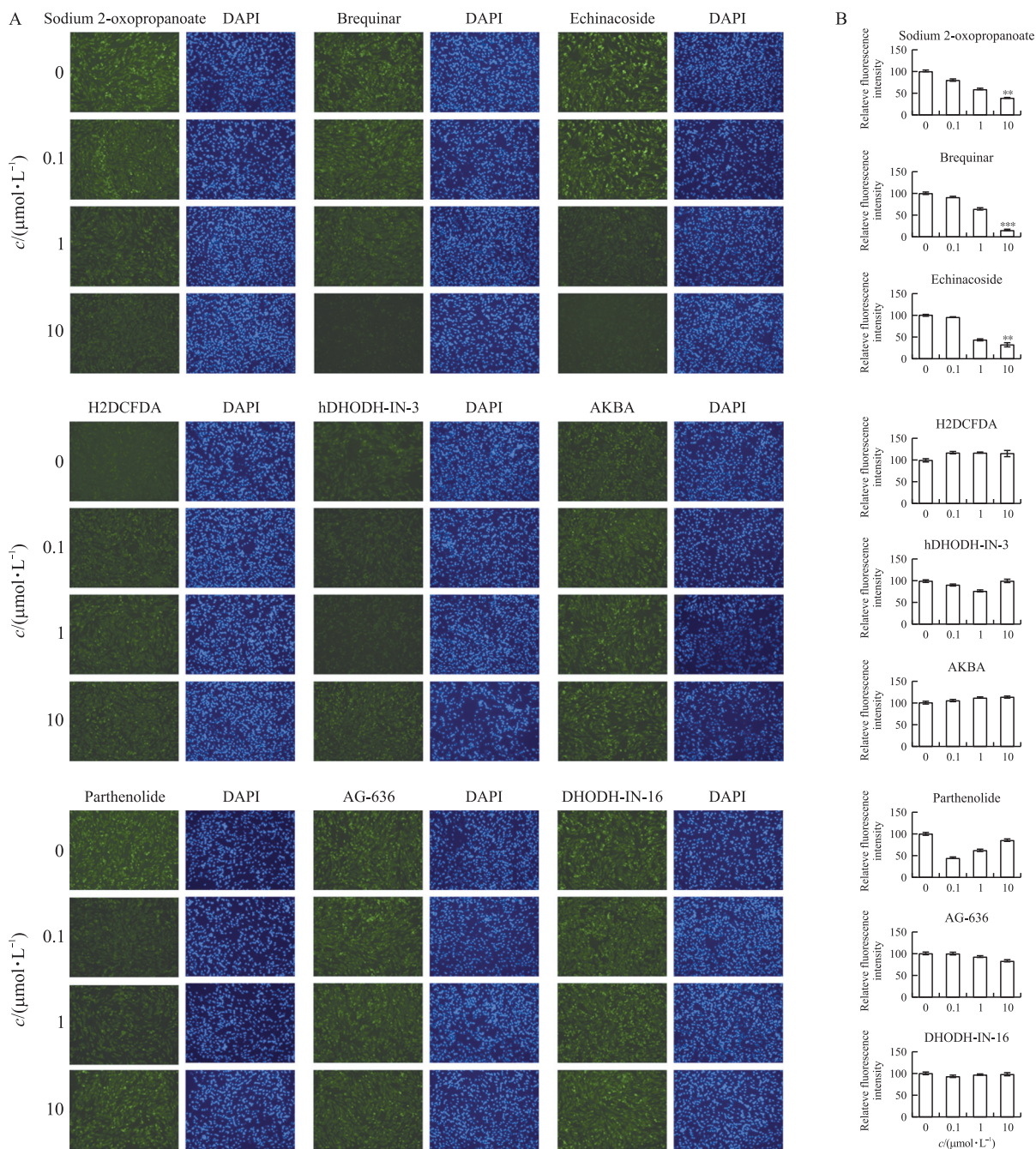


图 2 间接免疫荧光(IFA)检测 9 种药物对 JEV 复制的影响

Fig. 2 Indirect immunofluorescence (IFA) detection of the effects of nine drugs on JEV replication

A. 初筛药物的间接免疫荧光结果;B. 初筛药物影响下 JEV 感染的相对荧光强度。

A. Indirect immunofluorescence assay results of 9 primary screening drugs;B. JEV infection relative fluorescence intensity (RFI) under the influence of primary screening drugs.

取各组感染 JEV 后 10 d 的血液样本,过滤后进行蚀斑试验,根据公式计算感染 JEV 后 10 d 小鼠体内的病毒感染性滴度。结果(图 7)显示:3 种药物中,高剂量组的布喹那给药后,小鼠体内的病毒滴度最低,与上述荧光定量检测结果趋于一致。

利用细胞因子试剂盒检测感染 10 d 的小鼠血清中细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\alpha$ 和 IL-6 水平,结果(图 8)显示:感染 JEV 后,小鼠体内细胞因子水平出现明显上升,而分别经过 3 种药物作用后,无论是低剂量还是高剂量给药组,几种细胞因子水平均明显下降,其中抑制 JEV 复制最明显的 Brequinar 组下降最为明显,高剂量给药组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\alpha$ 和 IL-6 水平分别下降了 50%、39%和 48%, $\text{TNF-}\alpha$ 与 IL-6 水平的下降表明药物抑制病毒复制后,减少了机体对病毒产生的炎症反应,而 $\text{IFN-}\alpha$ 水平的下降则可能意味着治疗或免疫应答已经生效,机体对病毒已经产生了有效应对,免疫系统不再需要大量的 $\text{IFN-}\alpha$ 来控制病毒的复制和传播。

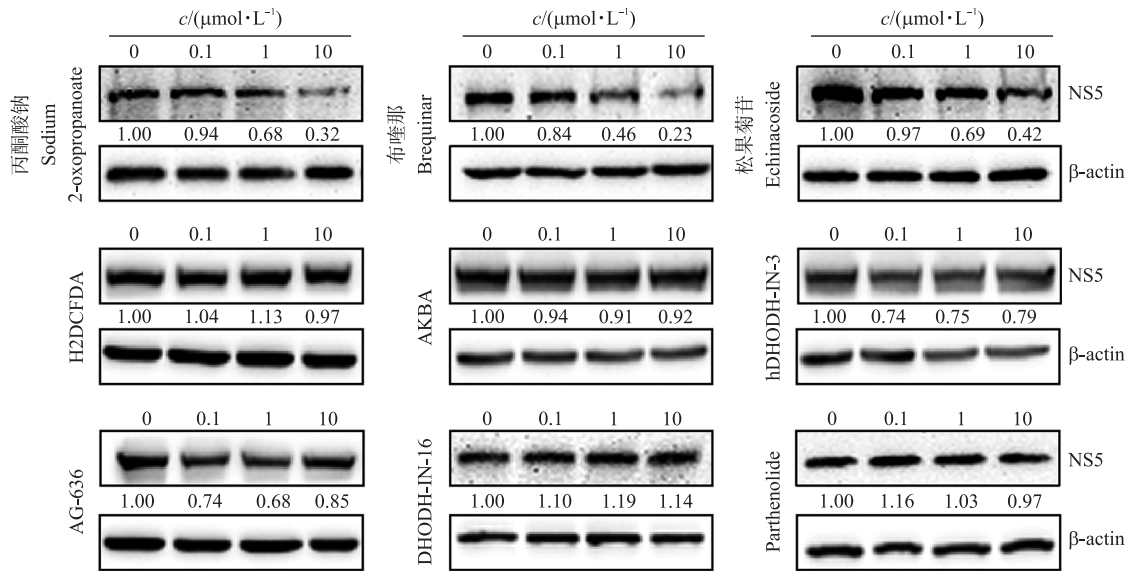


图 3 蛋白印迹法检测 9 种药物对 JEV NS5 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Detection of the effects of 9 drugs on JEV NS5 protein expression level by Western blot

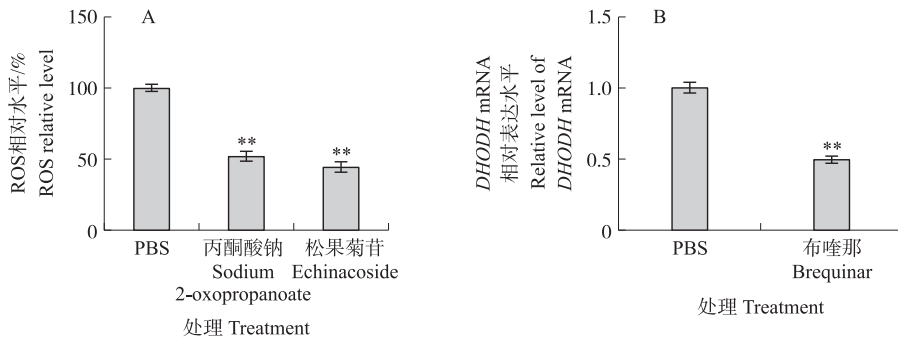


图 4 细胞的活性氧 (ROS) 水平和二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH) 基因 mRNA 表达水平检测结果

Fig. 4 Detection results of cellular reactive oxygen species (ROS) and mRNA expression level of dihydrowey dehydrogenase (DHODH) gene

A. 丙酮酸钠和松果菊苷处理组 ROS 水平; B. 布喹那处理组的 DHODH mRNA 表达水平。

A. ROS levels in the sodium 2-oxopropanoate and echinacoside treatment groups; B. The DHODH mRNA expression level of brequinar treatment group.

药物处理组与对照组进行比较, ** 表示在 0.01 水平上差异显著。Compared the drug treatment group with the control group, ** indicates significant differences at 0.01 level.

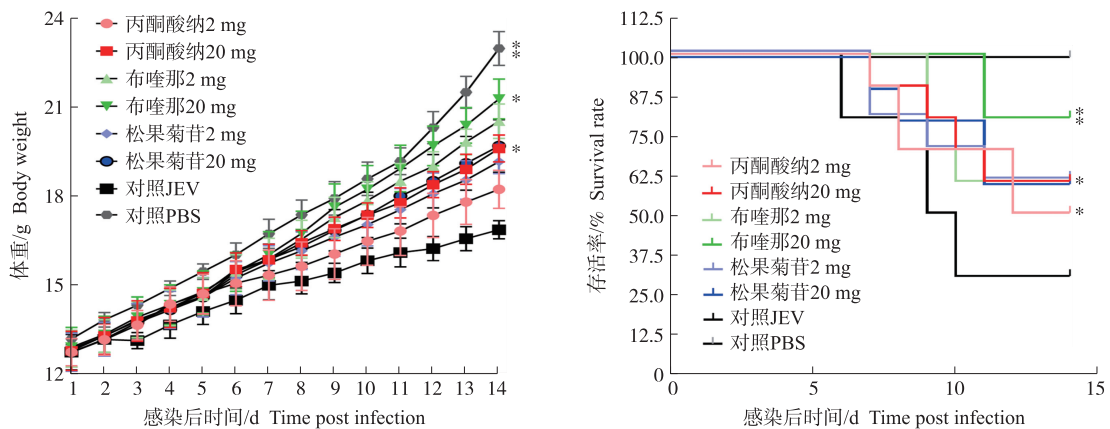


图 5 3 种药物对小鼠攻毒 14 d 体重变化和存活率影响

Fig. 5 The effects of three drugs on the weight change and survival rate of mice infected with the virus for 14 d

药物处理组与 PBS 对照组进行比较, * 和 ** 表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著,下同。Compared the drug treatment group with the PBS control group, * and ** indicate significant differences at the 0.05 and 0.01 levels. The same below.

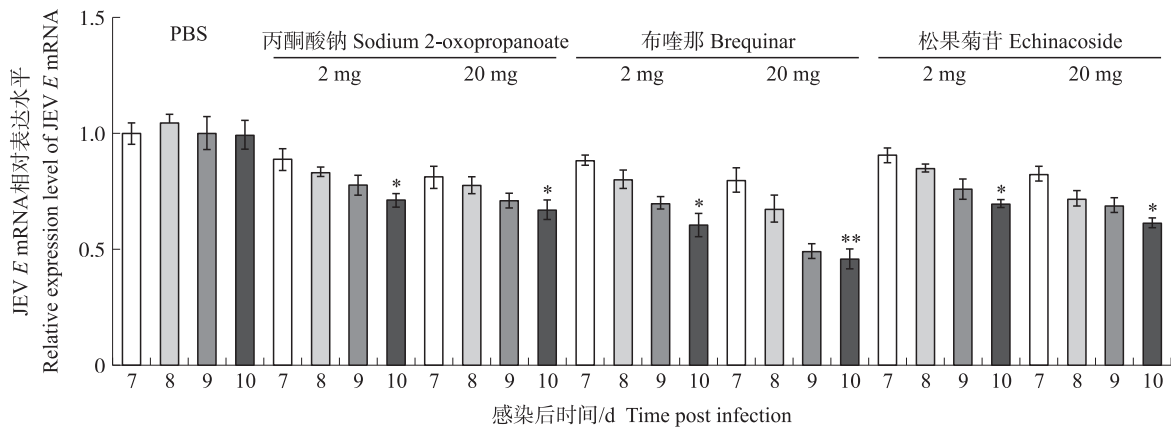


图 6 qPCR 法检测小鼠体内 JEV E mRNA 相对表达水平

Fig. 6 RT-qPCR method for detecting mRNA relative expression levels of JEV E in mice

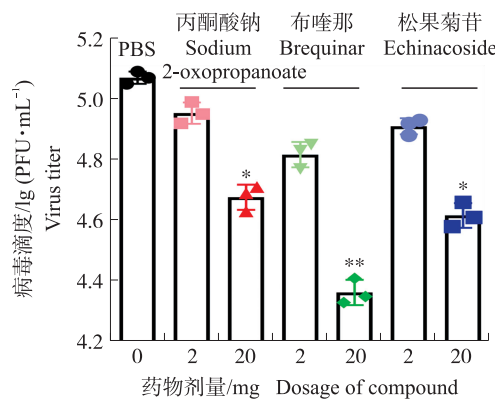


图 7 蚀斑法检测小鼠感染 JEV 10 d 后体内病毒滴度

Fig. 7 Detection of virus titers in mice infected with JEV for 10 days using plaque assay

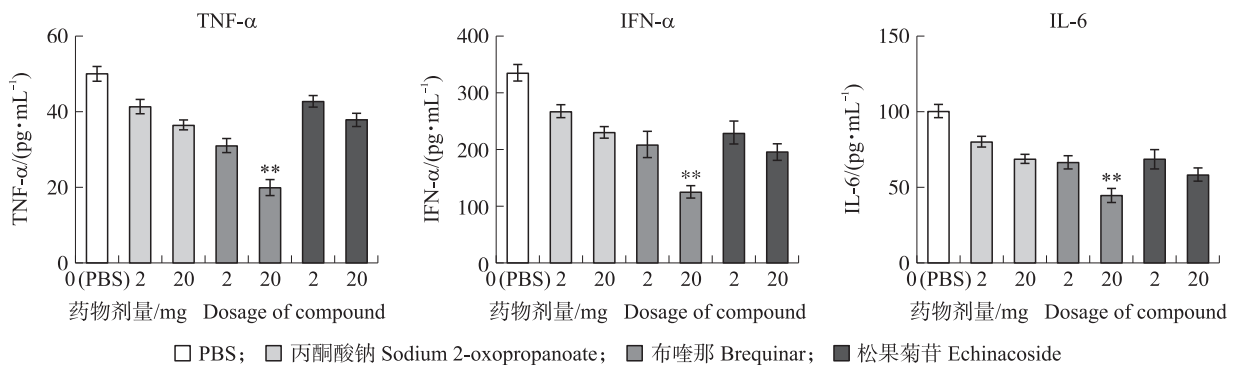


图 8 感染 JEV 10 d 后小鼠血清细胞因子水平

Fig. 8 Serum cytokine levels in mice infected with JEV for 10 days

3 讨论

线粒体是细胞内的重要器官,不仅参与能量代谢,还具有调节细胞死亡、细胞周期等多种生理功能^[22-23]。病毒感染会导致线粒体功能的损伤和线粒体内途径的改变^[24],因此,针对线粒体的治疗策略成为了研究热点。目前,已经有一些靶向线粒体的抗病毒药物在临床治疗中得到了应用。例如,环孢霉素 A 和立昂滨等药物可以通过抑制线粒体钙离子内流来减少病毒的复制^[25],这些药物虽然在临床治疗中显示出了一定的效果,但是副作用也比较明显,例如会产生一定的肝毒性、肾毒性等。因此,寻找更加有效、安全的线粒体靶向的抗病毒药物仍然是当前的研究热点,本研究首先通过体外细胞活性试验,从 382 种线粒体靶向化合物中筛选出 9 种疑似抗 JEV 小分子化合物,进一步通过 Western blot 及 qPCR 试验对 9 种小分子化合物进行了验证,确定了 3 种靶向线粒体的抗 JEV 药物,即丙酮酸钠(sodium 2-oxopropanoate)、布喹

那(brequinar)和松果菊苷(echinacoside),它们在体外细胞上可以有效抑制JEV的复制,其中以Brequinar效果最为明显。由于丙酮酸钠和Echinacoside为ROS抑制剂,而Brequinar为DHODH抑制剂,我们分别对其抑制效果进行了检测,结果显示,丙酮酸钠和Echinacoside的ROS抑制率分别为50%和47%,Brequinar对DHODH抑制率为50%,表明这些小分子化合物成功抑制了其靶点相关基因的表达,造成了线粒体相关功能的改变,对JEV的复制产生了影响。为了验证细胞试验的结果,随即在小鼠体内进行了相应的药物试验,试验结果表明,经过3种药物处理后,特别是高剂量给药组,小鼠体重增长均显著高于对照组,而且表现出更高的生存率(60%、80%和60%),这表明3种药物成功抑制了JEV在小鼠体内的增殖,同样以Brequinar最为明显;进一步的病毒滴度和细胞因子(TNF- α 、IFN- α 和IL-6)检测结果证明了这一点。体内外试验结果的相互佐证,为我们筛选的3种抗JEV药物提供了有力的依据。

Brequinar是一种二氢乳清酸脱氢酶抑制剂,此外,研究发现它还是一种抑制腺苷酸合成酶(IMPDH)的药物,该酶在多种病毒的复制和传播中起着重要作用:包括乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)、人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒(Influenza virus, IAV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)等。因此,Brequinar被认为具有广泛的抗病毒的潜力^[26]。Brequinar抑制病毒复制的机制主要是通过抑制IMPDH功能,从而干扰病毒核苷酸的合成和RNA病毒的复制^[27]。丙酮酸钠是一种已知的代谢物质,它在细胞内参与能量代谢和脂肪酸合成等过程。研究表明,丙酮酸钠能有效阻止视网膜膜中活性氧自由基诱导的糖酵解失调,有效去除ROS,丙酮酸钠在神经病理学中起着显著的抗氧化作用,还能通过抗氧化实现细胞保护的作用^[28]。此外,在很多医学的试验中被证实,外源性的丙酮酸钠可以在体内发挥明显的抗炎作用,但其抗病毒效果及功能还鲜有报道^[29-30]。Echinacoside是一种从紫锥菊植物中提取的天然化合物,它在传统中药和保健品中被广泛应用。研究表明,Echinacoside可以通过抑制NADPH/ROS/ER应激抑制心肌细胞凋亡,改善心功能^[31]。Echinacoside还具有一定的抗病毒作用,主要通过调节宿主细胞的免疫系统和炎症反应,减少病毒感染引起的细胞损伤^[32]。

本研究通过在体外对线粒体靶向化合物的筛选及鉴定,得到了3种对JEV复制有明显抑制作用的药物,并通过小鼠进行了验证。结果表明,3种药物可以作为潜在的抗JEV药物,但还需要进一步的研究来确定其在体内的生物活性和毒副作用,以及对其临床应用的可行性进行评估。总之,我们的研究结果为寻找新的抗病毒药物提供了重要的线索和思路。

参考文献 References:

- [1] Solomon T. Neurological aspects of tropical disease: Japanese encephalitis[J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2000, 68(4): 405-415.
- [2] 潘俊慧,刘亚林,梁真洁,等. 日本脑炎病毒 NS1 蛋白致脑内皮损伤初探[J]. *南京农业大学学报*, 2023, 46(6): 1107-1115. DOI: 10.7685/jnau.202206025.
Pan J H, Liu Y L, Liang Z J, et al. Preliminary study on brain endothelial damage caused by NS1 protein of Japanese encephalitis virus[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2023, 46(6): 1107-1115. (in Chinese with English abstract).
- [3] Luca V C, AbiMansour J, Nelson C A, et al. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(4): 2337-2346.
- [4] Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 1966, 41(3): 445-502.
- [5] Daep C A, Muñoz-Jordán J L, Eugenin E A. Flaviviruses, an expanding threat in public health; focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus[J]. *Journal of NeuroVirology*, 2014, 20(6): 539-560.
- [6] Le Flohic G, Porphyre V, Barbazan P, et al. Review of climate, landscape, and viral genetics as drivers of the Japanese encephalitis virus ecology[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, 7(9): e2208.
- [7] Qiu X D, Lei Y F, Yang P, et al. Structural basis for neutralization of Japanese encephalitis virus by two potent therapeutic antibodies[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3: 287-294.
- [8] Zheng Y Y, Li M H, Wang H Y, et al. Japanese encephalitis and Japanese encephalitis virus in mainland China[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2012, 22(5): 301-322.
- [9] 张秋婷,关如婷,潘俊慧,等. 日本脑炎病毒感染仔猪扁桃体的细胞嗜性研究[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(2): 315-321. DOI: 10.7685/jnau.202002010.
Zhang Q T, Guan R T, Pan J H, et al. Cellular tropism of Japanese encephalitis virus in the tonsils of piglets[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(2): 315-321 (in Chinese with English abstract).

- [10] Turtle L, Bali T, Buxton G, et al. Human T cell responses to Japanese encephalitis virus in health and disease[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(7): 1331–1352.
- [11] Chance B, Williams G R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1955, 217(1): 383–393.
- [12] Jahan F, Vasam G, Green A E, et al. Placental mitochondrial function and dysfunction in preeclampsia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4177.
- [13] Cogliati S, Enriquez J A, Scorrano L. Mitochondrial cristae; where beauty meets functionality[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(3): 261–273.
- [14] Gohil V M, Greenberg M L. Mitochondrial membrane biogenesis: phospholipids and proteins go hand in hand[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 184(4): 469–472.
- [15] Rambold A S, Kostecky B, Lippincott-Schwartz J. Together we are stronger[J]. *Autophagy*, 2011, 7(12): 1568–1569.
- [16] 孙立晨, 许晓玲, 白佳桦, 等. 哺乳动物体外成熟卵母细胞的线粒体调控机制研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(10): 116–120.
Sun L C, Xu X L, Bai J H, et al. Progress in research on mitochondrial regulation mechanism of mammalian *in vitro* maturation oocyte[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10): 116–120 (in Chinese with English abstract).
- [17] Brand M D, Nicholls D G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells[J]. *The Biochemical Journal*, 2011, 435(2): 297–312.
- [18] McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse[J]. *Current Biology*, 2006, 16(14): R551–R560.
- [19] Koshiba T, Yasukawa K, Yanagi Y, et al. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling[J]. *Science Signaling*, 2011, 4(158): ra7.
- [20] Ohta A, Nishiyama Y. Mitochondria and viruses[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(1): 1–12.
- [21] Kowaltowski A J, de Souza-Pinto N C, Castilho R F, et al. Mitochondria and reactive oxygen species[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, 47(4): 333–343.
- [22] Zong W X, Rabinowitz J D, White E. Mitochondria and cancer[J]. *Molecular Cell*, 2016, 61(5): 667–676.
- [23] Chen H, Chan D C. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases [J]. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18(R2): R169–R176.
- [24] Lupberger J, Zeisel M B, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17: 589–595.
- [25] de Wilde A H, Jochmans D, Posthuma C C, et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(8): 4875–4884.
- [26] Schnellrath L C, Damaso C R. Potent antiviral activity of brequinar against the emerging Cantagalo virus in cell culture[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38(5): 435–441.
- [27] Pospisil P, Kuoni T, Scapozza L, et al. Methodology and problems of protein-ligand docking: case study of dihydroorotate dehydrogenase, thymidine kinase, and phosphodiesterase 4[J]. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 2002, 22(1/2/3/4): 141–154.
- [28] Moriguchi N, Hinoi E, Tsuchihashi Y, et al. Cytoprotection by pyruvate through an anti-oxidative mechanism in cultured rat calvarial osteoblasts[J]. *Histology and Histopathology*, 2006, 21(9): 969–977.
- [29] 张贺铭, 白卫平, 李江静, 等. 丙酮酸钠在脑缺血-再灌注损伤中的神经保护作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(9): 909–912.
Zhang H M, Bai W P, Li J J, et al. Neuroprotective effect of sodium pyruvate in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Clinical Anesthesiology*, 2020, 36(9): 909–912 (in Chinese).
- [30] 张梅, 郑海伦. 丙酮酸钠药理作用及其临床应用前景研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*, 2021, 42(5): 115–117.
Zhang M, Zheng H L. Research progress on pharmacological action and clinical application prospect of sodium pyruvate [J]. *Journal of Mudanjiang Medical University*, 2021, 42(5): 115–117 (in Chinese with English abstract).
- [31] Ni Y J, Zhang J, Zhu W J, et al. Echinacoside inhibited cardiomyocyte pyroptosis and improved heart function of HF rats induced by isoproterenol via suppressing NADPH/ROS/ER stress[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022, 26(21): 5414–5425.
- [32] Liu J J, Yang L L, Dong Y H, et al. Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1213.

责任编辑: 周广礼