

• 动物及兽医生物技术 •

# DNA 损伤修复酶 OGG1/MTH1 抑制剂对非洲猪瘟病毒复制的影响

张小强<sup>1</sup>, 樊洁<sup>1,3</sup>, 杨吉飞<sup>1</sup>, 付竞生<sup>1</sup>, 吴梦丽<sup>1</sup>, 邵程祥<sup>1</sup>, 关贵全<sup>1</sup>, 殷宏<sup>1,2</sup>, 刘志杰<sup>1\*</sup>, 牛庆丽<sup>1\*</sup>

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室 国家非洲猪瘟区域实验室(兰州), 甘肃 兰州 730046
- 2 扬州大学 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009
- 3 西北民族大学 基础医学院, 甘肃 兰州 730030

张小强, 樊洁, 杨吉飞, 付竞生, 吴梦丽, 邵程祥, 关贵全, 殷宏, 刘志杰, 牛庆丽. DNA 损伤修复酶 OGG1/MTH1 抑制剂对非洲猪瘟病毒复制的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2136-2149.

ZHANG Xiaoqiang, FAN Jie, YANG Jifei, FU Jingsheng, WU Mengli, SHAO Chengxiang, GUAN Guiquan, YIN Hong, LIU Zhijie, NIU Qingli. Effects of inhibitors of DNA repair enzymes OGG1 and MTH1 on the replication of African swine fever virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2136-2149.

**摘要:** 非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种动物疫病。2018年传入我国后迅速波及国内多个省份,给我国养猪业带来了巨大的冲击。由于对 ASFV 致病机制了解有限,导致 ASF 疫苗及抗病毒药物的研发遇到了极大挑战。本课题组前期研究发现,ASFV 感染能引起宿主细胞内的氧化损伤应答,并且 DNA 氧化损伤修复酶在 ASFV 的感染中发挥重要作用,因此本研究采用 RNA 干扰、RT-qPCR、Western blotting、红细胞吸附(hemadsorption, HAD)、流式细胞技术等生物学方法,验证 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1)/8-羟基鸟嘌呤核苷酸酶 1 (8-oxoguanine nucleoside triphosphatase, MTH1)小分子抑制剂对 ASFV 复制的影响,以评估靶向 DNA 氧化损伤修复酶的抗 ASFV 感染效果。本研究为抗非洲猪瘟药物的研发提供了借鉴及参考。

**关键词:** 非洲猪瘟; 抗病毒药物; 碱基切除修复; 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 1 (OGG1); 8-羟基鸟嘌呤核苷酸酶 1 (MTH1)

资助项目: 国家自然科学基金(32072830); 国家重点研发计划项目(2021YFD1800101); 农业科技创新工程项目(ASTIP, CAAS-ASTIP-2016-LVRI); 甘肃省科技重大专项(22ZD6NA001); 甘肃省基础研究创新群体项目(22JR5RA024); 甘肃省优秀博士生项目(22JR5RA025)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072830), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800101), the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ASTIP, CAAS-ASTIP-2016-LVRI), the Science and Technology Major Project of Gansu Province (22ZD6NA001), the Science Fund for Creative Research Groups (22JR5RA024), and the Outstanding Doctoral Student Foundation of Gansu Province (22JR5RA025).

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Zhijie, liuzhijie@caas.cn; NIU Qingli, niuqingli@caas.cn

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-03-28

# Effects of inhibitors of DNA repair enzymes OGG1 and MTH1 on the replication of African swine fever virus

ZHANG Xiaoqiang<sup>1</sup>, FAN Jie<sup>1,3</sup>, YANG Jifei<sup>1</sup>, FU Jingsheng<sup>1</sup>, WU Mengli<sup>1</sup>,  
SHAO Chengxiang<sup>1</sup>, GUAN Guiquan<sup>1</sup>, YIN Hong<sup>1,2</sup>, LIU Zhijie<sup>1\*</sup>, NIU Qingli<sup>1\*</sup>

1 African Swine Fever Regional Laboratory, China (Lanzhou), State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, College of Veterinary Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 College of Medicine, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

**Abstract:** African swine fever virus (ASFV), as a contagious viral pathogen, is responsible for the occurrence of African swine fever (ASF), a rapidly spreading and highly lethal disease. Since ASFV was introduced into China in 2018, it has been quickly spread to many provinces, which brought great challenges to the pig industry in China. Due to the limited knowledge about the pathogenesis of ASFV, neither vaccines nor antiviral drugs are available. We have found that ASFV infection can induce oxidative stress responses in cells, and DNA repair enzymes play a key role in this process. This study employed RNA interference, RT-qPCR, Western blotting, Hemadsorption (HAD), and flow cytometry to investigate the effects of the inhibitors of DNA repair enzymes OGG1 and MTH1 on ASFV replication and evaluated the anti-ASFV effects of the inhibitors. This study provides reference for the development of anti-viral drugs.

**Keywords:** African swine fever; antiviral drugs; base excision repair; 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1); 8-oxoguanine nucleoside triphosphatase (MTH1)

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种高致病性疾病,以高热、共济失调、内脏出血为主要特征,致死率高达100%。ASFV可通过钝缘蜱进行传播,是已知的唯一虫媒DNA病毒<sup>[1]</sup>。ASF自1921年在肯尼亚首次暴发以来持续传播。20世纪中叶,该病侵入西非、西欧、加勒比、巴西、外高加索、东欧等地。2018年8月,ASF疫情首次出现在我国辽宁省<sup>[2]</sup>。目前,ASF已经呈现全球性流行,给世界养猪业造成了严重的经济损失,由于目前尚无商品化的疫苗和抗病毒药物,因此ASF的防控工作依然艰巨,亟需新的抗病毒策略。

ASFV是一种二十面体的DNA双链病毒,是非洲猪瘟病毒科(Asfarviridae)、非洲猪瘟病毒属(*Asrivirus*)的唯一成员。ASFV主要宿主细胞是单核-巨噬细胞,其基因组为线性双链DNA,约170–190 kb,可编码150–200种病毒蛋白<sup>[3]</sup>。ASFV结构由外膜、衣壳、内膜、核壳和核心组成。病毒感染需经历吸附、内化、脱衣壳、复制、包装和释放这6个步骤。ASFV通过网格蛋白介导的内吞(clathrin-dependent endocytosis, CME)和巨胞饮(macropinocytosis)进入细胞,在核内体的帮助下完成脱壳并释放基因组进入细胞质<sup>[4]</sup>。病毒基因的表达分为4个阶段:即刻期、早期、中期和晚期,即刻期、

早期基因可在 ASFV 的 DNA 复制开始之前表达, 而中期、晚期基因的转录则发生在复制之后, 这样的转录机制可帮助 ASFV 即时并精确地进行自身基因的表达<sup>[5]</sup>。最后, 病毒基因组及核心蛋白在病毒核心发生浓缩, 形成成熟的病毒粒子并以出芽的方式释放<sup>[6]</sup>。

氧化还原稳态是有氧生物生存的基本条件。有氧呼吸代谢及外界刺激(如微生物感染)会导致机体内产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)<sup>[7-8]</sup>。当体内 ROS 含量大大超过抗氧化酶的清除效率时, 就会打破氧化还原平衡状态, 发生氧化应激(oxidative stress, OS), 引起生物大分子的氧化与降解。由于 DNA 碱基鸟嘌呤的氧化电势最低, 极易被 ROS 攻击而发生氧化形成 8-羟基-脱氧鸟嘌呤(8-oxoguanine, 8-oxoG)<sup>[9]</sup>。碱基氧化损伤需要机体启动氧化损伤修复去修复, 其中碱基切除修复(base excision repair, BER)是清除氧化碱基的主要方式。8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1)是碱基切除修复途径中非常重要的酶, 主要通过切除 DNA 链上的 8-oxoG 达到修复基因的目的<sup>[10]</sup>。另外, ROS 除了直接攻击 DNA 双链中的碱基外, 还会攻击 dNTPs 池中的游离核苷酸使之氧化形成 8-oxoG<sup>[11]</sup>。8-羟基鸟嘌呤核苷酸酶 1 (8-oxoguanine nucleoside triphosphatase, MTH1)作为一种焦磷酸酶, 能够高效水解 dNTPs 池中的 8-oxoGTP 成 8-oxoGMP<sup>[12-13]</sup>, 保护细胞免受高水平 ROS 带来的致命损伤<sup>[14]</sup>。

鉴于 OGG1 与 MTH1 在碱基切除中发挥的关键作用, 其小分子抑制剂研究已经成为一种热点。例如 OGG1 抑制剂 O8, 能够与 OGG1 代谢的中间产物形成席夫碱复合物, 从而抑制 OGG1 的活性<sup>[10,15]</sup>。2014 年, *Nature* 首次报道化合物 S-克唑替尼(S-crizotinib)对 MTH1 具有高度亲和力, 研究显示 S-克唑替尼能够与 MTH1

活性口袋中的 Asp119 形成氢键, 从而抑制 MTH1 的活性<sup>[16]</sup>。另外, MTH1 的另一种抑制剂 TH588 能够与 MTH1 蛋白活性中心的 Asn33、Asp119 和 Asp120 结合, 从而抑制 MTH1 的酶活性<sup>[13,17-18]</sup>, 目前 S-克唑替尼和 TH588 主要用于癌症(包括抗神经胶质瘤、黑色素瘤、非小肺癌等)的研究<sup>[17,19-20]</sup>。

本课题组前期研究已经证实 OGG1 抑制剂 TH5487 和 SU0268 能够抑制 ASFV 的增殖, 但 MTH1 抑制剂对 ASFV 复制的影响还未见报道。因此, 本研究在评估了 O8、S-克唑替尼和 TH588 对细胞活性和细胞凋亡的基础上, 从 ASFV 的转录、翻译及病毒滴度水平等方面验证了 3 种小分子抑制剂对 ASFV 复制的抑制作用。结果表明 O8、S-克唑替尼和 TH588 在细胞水平上具有很好的抗 ASFV 感染效果, 有望成为预防性抗病毒药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

非洲猪瘟病毒(ASFV CN/GS/2018)由中国农业科学院兰州兽医研究所国家非洲猪瘟区域实验室(兰州)提供; 猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophages, PAMs)由本实验室分离保存; 永生化的猪肺泡巨噬细胞(immortalized porcine alveolar macrophages, IPAMs)由本实验室传代保存; ASFV-p30 抗体和 ASFV-p72 抗体均由本实验室制备并保存。MTH1 抗体和 OGG1 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司, TB Green Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II、RNAiso Plus 和 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 均购自上海百赛生物技术股份有限公司, Cell Counting Kit-8 购自武汉塞维尔生物科技有限公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640 和高糖培养基均购自 ThermoFisher Scientific 公司, 青霉素、链霉素、两性霉素 B 购自北京索莱宝科技

有限公司, 蛋白 marker、超敏化学发光显色液及 RIPA 裂解液购自 ThermoFisher Scientific 有限公司, O8 购自上海皓元生物医药科技有限公司, TH588 和 S-克唑替尼均购自上海伟寰生物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PAMs 细胞分离

将 3 周龄左右无特定病原体(specific pathogen free, SPF)家猪采用臂动脉丛放血处死(本实验由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准, 批准号为 LVRIAEC-2022-061), 打开胸腔, 取出完整肺脏, 放入装有 PBS+2% 三抗(青霉素、链霉素和两性霉素 B)的自封袋中。用灭菌水清洗肺脏表面后去除多余组织, 转移至生物安全柜操作。用 2-3 瓶肺泡冲洗液灌肺, 充分搓揉促使肺叶完全打开, 收集细胞悬液后, 200×g 离心 10 min; 用 5 mL 红细胞裂解液裂解红细胞 5 min, 加入 2 倍体积清洗液进行终止, 过细胞筛后 200×g 离心 10 min; 弃上清, 冲洗液重悬细胞后计数。分离的 PAMs 细胞使用 RPMI 1640 完全培养基(10%胎牛血清+1%青霉素、链霉素和两性霉素 B)在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。除已培养细胞外, 剩余细胞 200×g 离心 10 min 后, 以 2×10<sup>7</sup>/管的浓度冻存。

### 1.2.2 CCK-8 检测细胞活度

PAMs 接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 12 h, 按指定浓度向每孔中加入 10 μL O8、S-克唑替尼或 TH588 药物继续培养 24 h, 之后每孔避光加入 10 μL CCK-8 溶液, 在 37 °C 培养箱中孵育 3 h, 在摇床上混匀后使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

### 1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞接种在 6 孔板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h, 向孔中加入 O8、S-克唑替尼和 TH588 药物继续培养 24 h 后收集细胞,

200×g 离心 8 min, 用 1×Binding Buffer 300 μL 重悬细胞, 设置正常对照组、实验组(PI、FITC 双染)、PI 单染组和 FITC 单染组后上机检测并分析凋亡率。

### 1.2.4 Western blotting

收集细胞, 用 PBS 洗 2 遍后, 加入预冷的细胞裂解液 RIPA 冰上裂解 3 h, 置于摇床上轻轻摇晃以保证细胞被充分裂解。接着将细胞收集于离心管中, 4 °C、12 000×g 离心 15 min。取上清即为全蛋白, 利用 Qubit 法测定每份样品的总蛋白浓度, 之后加入 Loading buffer 将样品煮沸 10 min。然后进行蛋白电泳, 条件为 80 V 30 min、120 V 1.5 h。接下来进行转膜, 在 300 mA、120 min 的条件下将蛋白胶转印至聚偏氟丙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 之后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液对膜进行封闭, 室温 1 h。弃掉封闭液后加入 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。加入对应一抗 4 °C 孵育过夜, 次日, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 室温避光孵育 1 h 二抗。TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 显色液(ThermoFisher Scientific 公司), 利用凝胶成像仪(Bio-Rad 公司)进行曝光显色, 并利用 ImageJ 软件进行条带灰度分析。

### 1.2.5 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

按实验要求使用药物预处理细胞相应时间后, 感染 ASFV 24-48 h。收集细胞后提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA, 使用相应引物(表 1)进行相对定量的检测。反应体系(20 μL): TB Green Premix Ex Taq™ II 10 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物(10 μmol/L) 0.8 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL, cDNA 2 μL, ROX 0.4 μL。相对定量反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s、60 °C 34 s, 共 40 个循环, 同时进行溶解曲线分析, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法, 计算目的基因的相对表达量并进行计算分析。

表 1 本研究所用的实时荧光定量 PCR 引物  
Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primers sequences (5'→3')
OGG1 (PIG)	F: CCTACGAAGAGGCCACAAG R: TTTGCTGGTGGCTCCTGAGCTCG
CP204L (PIG)	F: GCGGTAGAATTGTTACGACCGCT R: CCTCCGATGAGGGCTCTTGC
B646L (PIG)	F: AGTTATGGGAAACCCGACCC R: CCCTGAATCGGAGCATCCT
MTH1 (PIG)	F: GAGCTGCAGGAAGAGAGCGG R: TGGTGTCTGGCCTTGGAAC
GAPDH (PIG)	F: TGGAAAGGCCATCACCATCT R: ATGGTCTGTAAGACACCACT

### 1.2.6 红细胞吸附试验(hemadsorption, HAD)

红细胞的分离与储存: 从猪场采集新鲜血液, 3 500 ×g 离心 10 min; 弃上清, RPMI 1640 基础培养基清洗后 3 500 ×g 离心 10 min, 重复上述操作 3 次后按照 1:10 的比例加入 RPMI 1640 基础培养基中, 4 °C 保存。将 PAMs 细胞铺入 96 孔板中, 加入相应浓度的抑制剂预处理 6 h 或者转染 siRNA 24 h, 再接种 10×梯度稀释的 ASFV (使得每列病毒浓度为 10<sup>-1</sup>–10<sup>-9</sup>), 稳定 2 h 后加入 1% 的猪红细胞, 连续观察 7 d, 采用 Reed-Muench 方法计算 50% HAD。

### 1.2.7 RNA 干扰试验

细胞铺入 6 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 12 h。向 120 μL 1×riboFECT<sup>TM</sup> CP Buffer 中加入 5 μL 浓度为 20 μmol/L 的 siOGG1、siMTH1 和 siMTH1+siOGG1 混合物, 混匀后加入 12 μL riboFECT<sup>TM</sup> CP Reagent, 混匀后室温孵育 15 min; 孵育完成后加入到无抗完全培养基的细胞中。

### 1.2.8 彗星电泳试验

加入抑制剂处理 24 h 后收取样品, 200×g 离心 5 min, PBS 清洗 2 遍; 用 450 μL 低熔点琼脂糖凝胶重悬 50 μL 细胞(1:10, 体积比)并涂片, 使用前载玻片 37 °C 预热, 水平放入 4 °C 暗盒中至凝固后加入 lysis buffer 过夜裂解; 次日

将载玻片沥干后放入到碱性裂解液(pH>13.0)中室温孵育 20 min 后进行彗星电泳, 条件是电压 21 V 30–60 min, 温度 4 °C; 用 ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次, 每次 5 min, 放入 75%乙醇中浸泡 5 min 后 37 °C 烘干, 避光染色 30 min 用荧光显微镜观察。

### 1.2.9 引物设计和 RNA 干扰序列设计

根据 GenBank 公布的猪 *MTH1* 基因序列(NM\_001244568.1)、猪 *OGG1* 基因序列(GenBank 登录号: XM\_001928192.7)、非洲猪瘟病毒 *CP204L* 基因序列(GenBank 登录号: MK333184.1)、*B646L* 基因序列(GenBank 登录号: MK333180.1)、猪 *GAPDH* 基因序列(GenBank 登录号: NM\_001206359.1)设计特异性引物(表 1), 根据 GenBank 公布的猪 *MTH1* 基因序列(NM\_001244568.1)和猪 *OGG1* 基因序列(GenBank 登录号: XM\_001928192.7)设计特异性 siRNA (表 2)。

### 1.2.10 统计学分析

试验数据均来自 3 次以上独立重复试验, 试验数据采用平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示, 数据间的显著性差异利用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)或 Student's *t* 检验, 当  $P < 0.05$  时, 表示具有统计学显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 OGG1/MTH1 抑制剂对细胞活性、凋亡和 DNA 损伤的影响

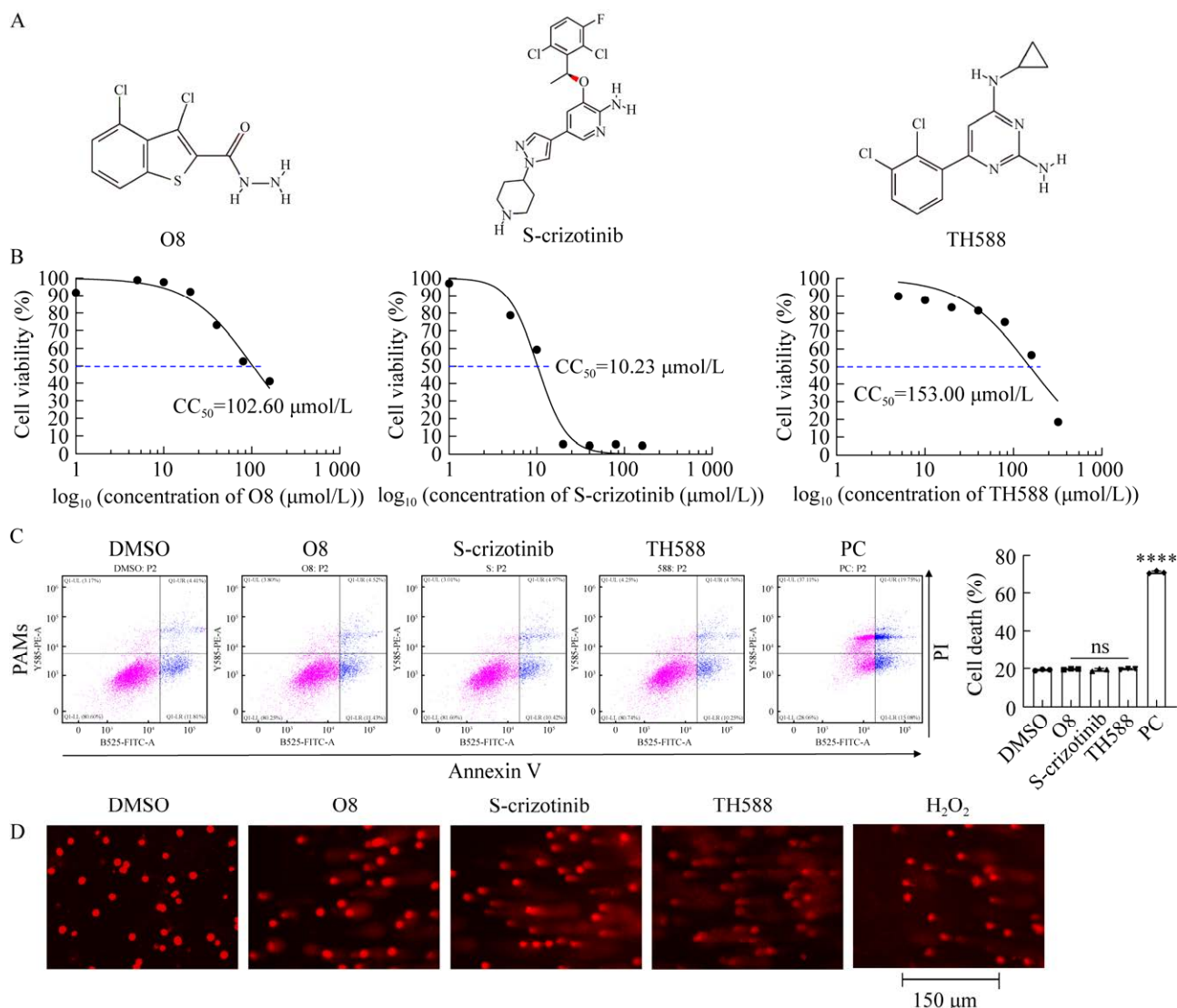
本研究选用已有研究报道的 3 种化合

表 2 本研究所使用的 siRNA 序列

Table 2 Sequences of siRNAs used in this study

Products name	Target sequences
si-OGG1	TTCGGCTCCTGCAACAAGA
si-MTH1	GGTTCAGCTGGACCAGAT

物: O8 (OGG1 的抑制剂)和 S-克唑替尼、TH588 (MTH1 的抑制剂, 图 1A)<sup>[11-13]</sup>。为了筛选出适宜后续实验的化合物浓度, 本研究分析了这 3 种化合物的细胞毒性(CC<sub>50</sub>), 结果显示, O8、S-克唑替尼和 TH588 的半数致死浓度分别为 102.60、10.23 和 153.00 μmol/L (图 1B)。为了验



**图 1 OGG1/MTH1 抑制剂对细胞毒性、凋亡和 DNA 损伤的影响** A: O8、S-克唑替尼和 TH588 的化合物结构. B: CCK-8 检测 O8、S-克唑替尼和 TH588 的 CC<sub>50</sub>. C: 流式细胞技术检测 O8、S-克唑替尼和 TH588 的细胞凋亡率. D: 彗星电泳检测 O8、S-克唑替尼和 TH588 对细胞 DNA 的损伤. 统计学分析采用 *t* 检验. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: 不显著

**Figure 1** Effect of O8, S-crizotinib and TH588 on cytotoxicity, apoptosis and DNA damage of cells. A: The structure of O8, S-crizotinib, and TH588. B: CC<sub>50</sub> of O8, S-crizotinib, and TH588 detected by CCK-8 assay. C: Detection of the apoptosis rates caused by O8, S-crizotinib or TH588 by flow cytometry. D: Detection of the DNA damage caused by O8, S-crizotinib or TH588 by comet electrophoresis. Statistical analysis adopts *t*-test. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: Not significant.

证 3 种化合物对细胞凋亡的影响, 利用流式细胞术进行分析, 结果显示 3 种抑制剂不影响细胞的凋亡(图 1C)。同时, 通过使用 DMSO、O8 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、S-克唑替尼 (5  $\mu\text{mol/L}$ )、TH588 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 和阳性对照  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别处理细胞后, 利用彗星电泳试验验证了化合物对细胞 DNA 损伤的影响, 结果发现, 相比于 DMSO, 3 种抑制剂的处理可显著诱导 DNA 损伤(图 1D)。

## 2.2 OGG1/MTH1 抑制剂对 ASFV 的复制具有明显的抑制作用

为了研究 OGG1 和 MTH1 抑制剂对 ASFV 复制的影响, 用 O8、S-克唑替尼或 TH588 预处理 PAMs 6 h 后感染 ASFV (MOI=1), 分别在 0.5、1、3、6、9、12、24 和 48 hours post-infection (hpi) 收集样品, 通过 RT-qPCR 检测 ASFV-CP204L 和 ASFV-B646L 基因的转录水平, 结果显示, O8、S-克唑替尼和 TH588 对早期基因 CP204L 的转录具有显著抑制效果, 对晚期基因 B646L 的抑制效果在 12 hpi 前并不显著, 12 hpi 后呈现显著抑制(图 2A、2B)。此外, 我们还利用 siRNA 干扰 OGG1 或 MTH1 表达水平后验证其对病毒复制的作用。首先利用流式细胞术检测了 RNA 干扰对细胞凋亡率的影响, 发现 siRNA-OGG1 和/或 siRNA-MTH1 并不会造成细胞凋亡率的升高, 排除了细胞凋亡对实验结果的影响(图 2C)。通过 RT-qPCR 和 Western blotting 评估靶向 OGG1 和 MTH1 的 siRNA 的干扰效果, 结果显示, siRNA-OGG1 或 siRNA-MTH1 处理细胞 48 h 后干扰效果很显著(图 2D、2E)。在 siOGG1 和/或 siMTH1 干扰 24 h 后, 感染 ASFV (MOI=1) 24 h, 验证 OGG1 和/或 MTH1 抑制剂对 ASFV 复制的影响, 结果显示, 干扰 OGG1 或 MTH1 的表达可以显著降低 ASFV-CP204L 和 ASFV-B646L 的转录与翻译, 尤其是 siRNA-OGG1 和 siRNA-MTH1

联合使用, 抑制效果更为显著(图 2F、2G)。以上结果表明, OGG1 和 MTH1 在 ASFV 感染过程中发挥着重要作用, 靶向 OGG1 和 MTH1 抑制剂具有抑制 ASFV 复制的效果。

## 2.3 OGG1/MTH1 抑制剂剂量依赖性抑制 ASFV 的复制

用不同浓度的抑制剂验证其对 ASFV 复制的影响, 结果显示, S-克唑替尼和 TH588 对 ASFV 蛋白的翻译呈现剂量依赖性的抑制作用, 其中, S-克唑替尼的作用效果明显强于 TH588, 在 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度时几乎完全抑制了 p30 的表达, 但 O8 在 24 hpi 时对 ASFV p30 蛋白表达的抑制并不显著, 48 hpi 较为显著, 并表现出剂量依赖性(图 3A–3C), 另外, O8、S-克唑替尼和 TH588 这 3 种抑制剂处理可以显著抑制 ASFV-CP204L 和 ASFV-B646L 基因的转录, 并呈现剂量依赖性(图 3D–3F), 在 IPAM 细胞评价抑制剂对 ASFV 感染的影响上, 显示出类似的结果(图 3H)。另外, 从病毒滴度上分析 O8、S-克唑替尼和 TH588 对 ASFV 的抑制效果, 发现它们可降低 ASFV 的  $\text{HAD}_{50}$ , 并且呈现剂量依赖性, 其中 S-克唑替尼的抑制效果最为显著, 在最大浓度 5  $\mu\text{mol/L}$  时, 病毒滴度从 7.60 降低到 4.90  $\log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mL}$ , 在 O8 最大浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 病毒产量从 8.09  $\log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mL}$  降低到 6.68  $\log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mL}$ , 在 TH588 最大浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时, 病毒滴度从 7.00  $\log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mL}$  降低到 5.20  $\log_{10} \text{HAD}_{50}/\text{mL}$  (图 3G)。该结果表明, O8、S-克唑替尼和 TH588 可以剂量依赖的方式抑制 ASFV 的复制。

## 2.4 OGG1/MTH1 抑制剂联合使用对 ASFV 复制的影响

随后检测 OGG1 和 MTH1 的抑制剂联合使用对病毒增殖的影响。本研究通过流式细胞术检测了化合物联合使用对细胞凋亡的影响, 结



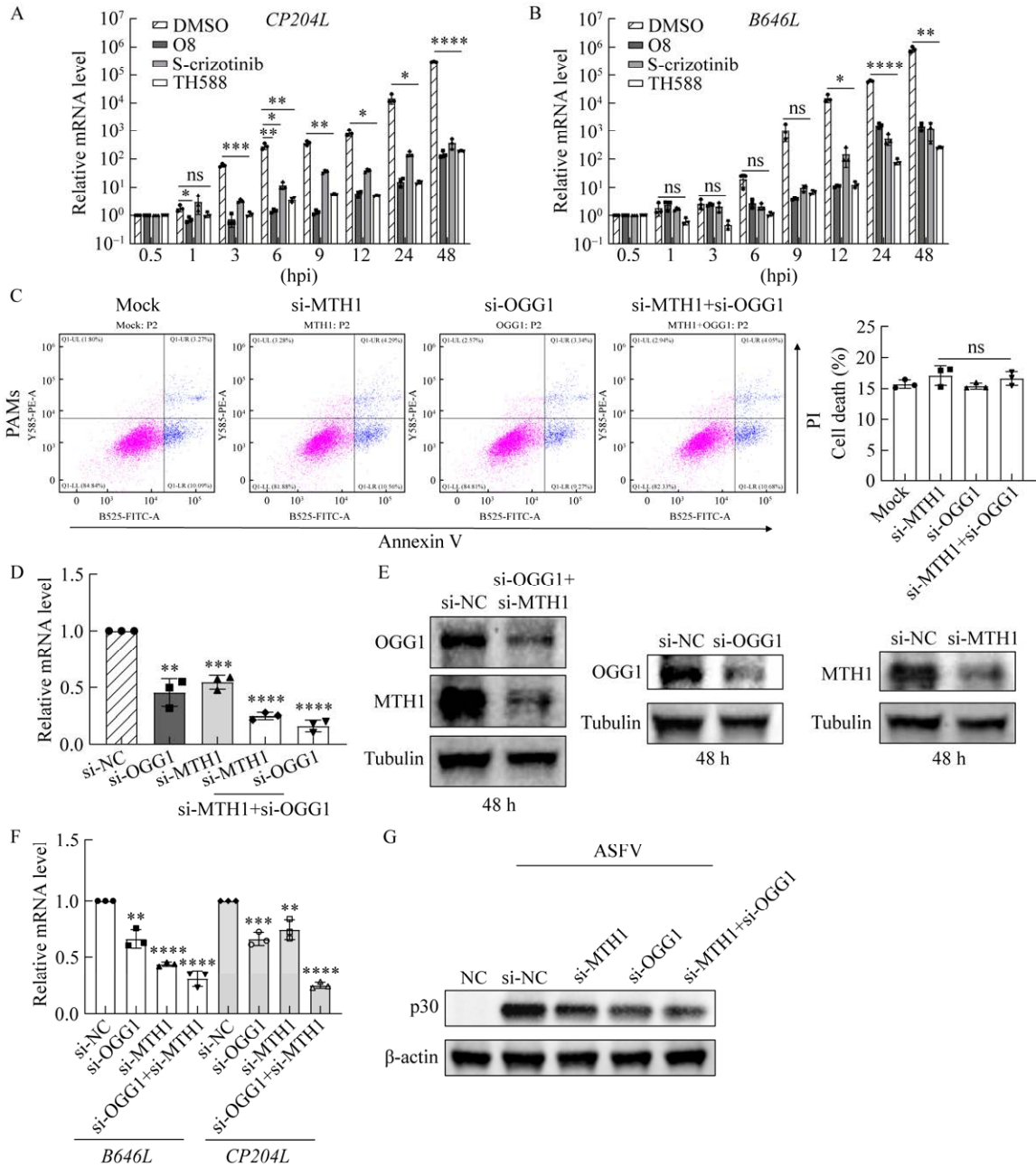
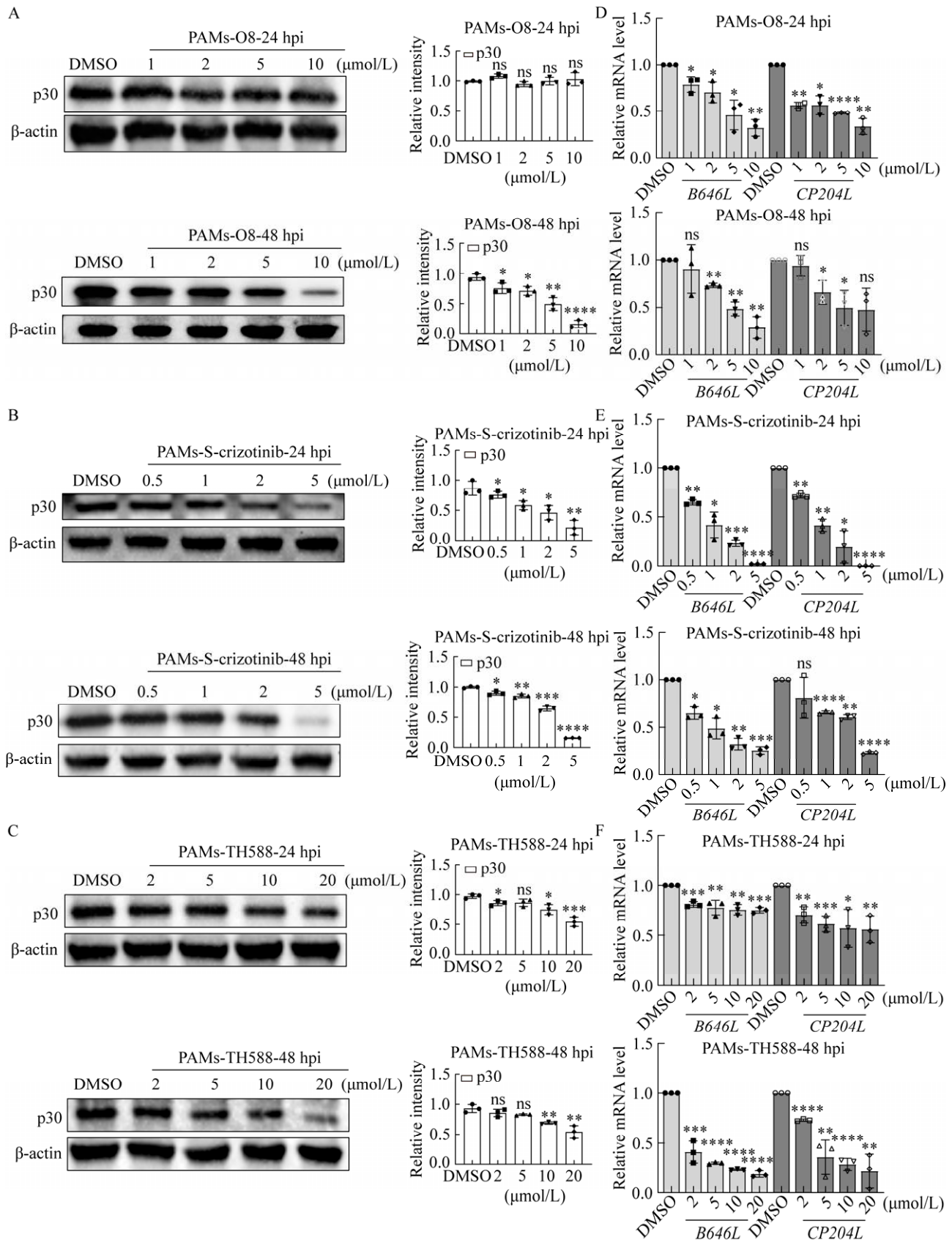
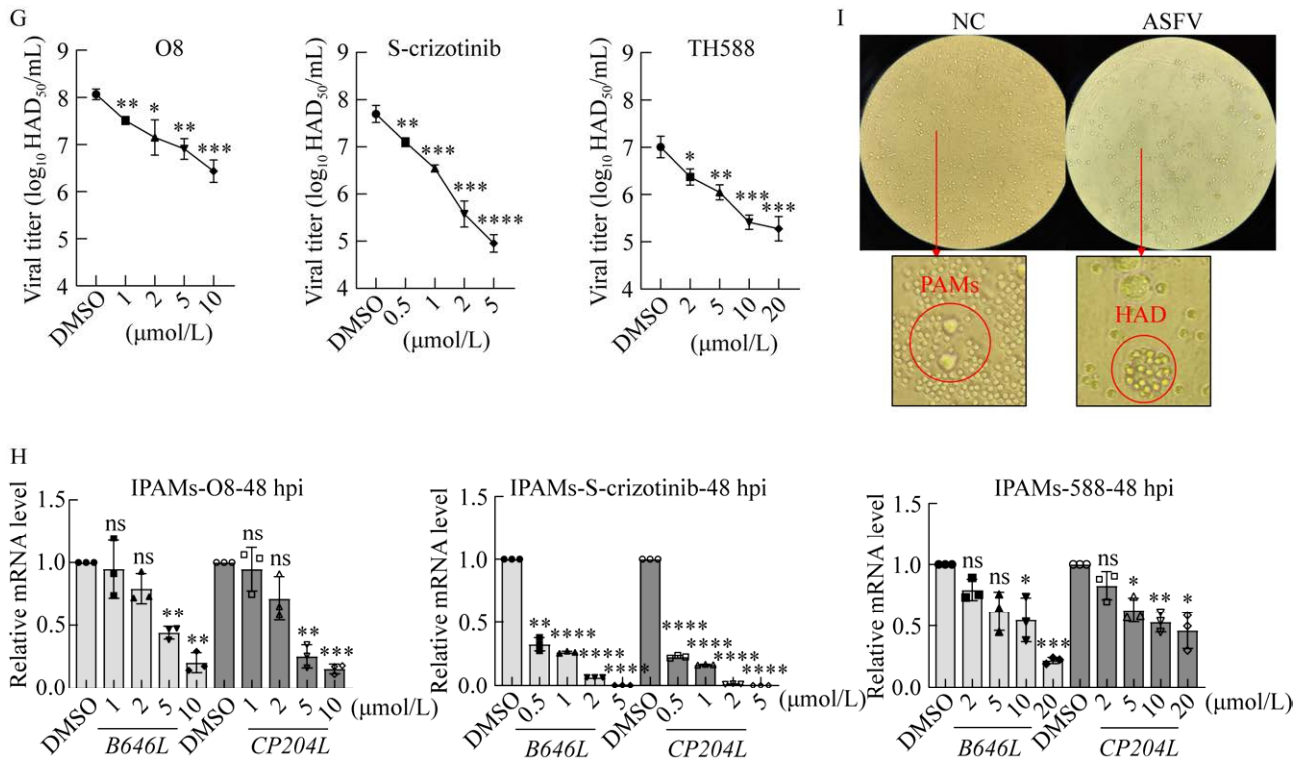


图 2 OGG1/MTH1 对 ASFV 复制的影响

Figure 2 Effect of OGG1 and/or MTH1 on ASFV replication. A and B: PAMs were pretreated by DMSO, O8 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), S-crizotinib (5  $\mu\text{mol/L}$ ) or TH588 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6 h, then infected by ASFV (MOI=1) for 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 h. The expression levels of ASFV-CP204L and ASFV-B646L genes were detected by RT-qPCR. C: The effects of small RNA interference on cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. D and E: Detection of the interference effects of *OGG1* and *MTH1* by RT-qPCR and Western blotting. F and G: PAMs were transfected with siRNA-OGG1 and/or siRNA-MTH1 for 24 h, then infected with ASFV (MOI=1) for 24 h. The relative expression levels of ASFV-CP204L and ASFV-B646L were detected using RT-qPCR, and the expression levels of ASFV-p30 were detected using Western blotting. The control group was only infected with ASFV (MOI=1). Statistical analysis using *t*-test. \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*:  $P<0.05$ ; ns: Not significant.





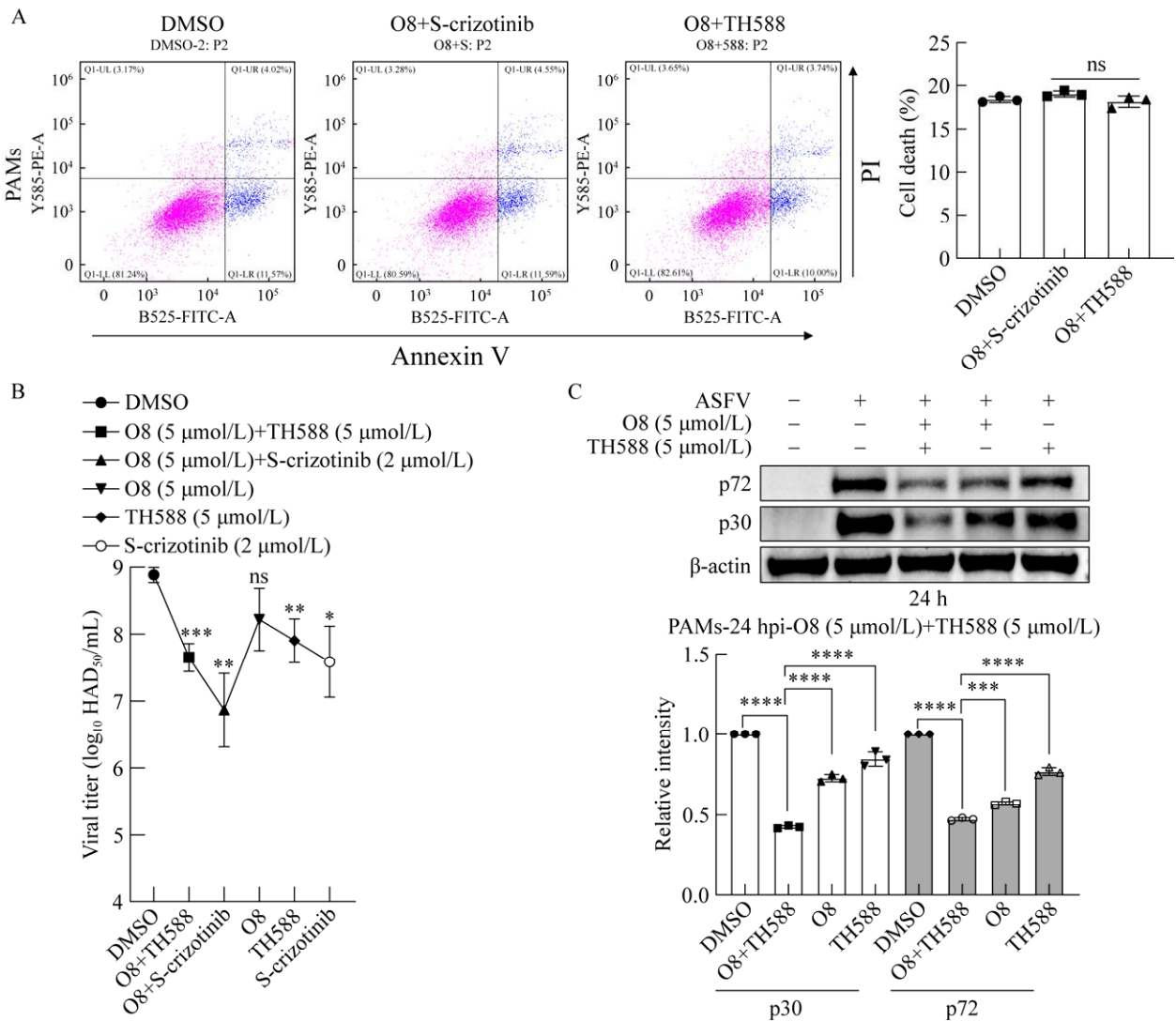


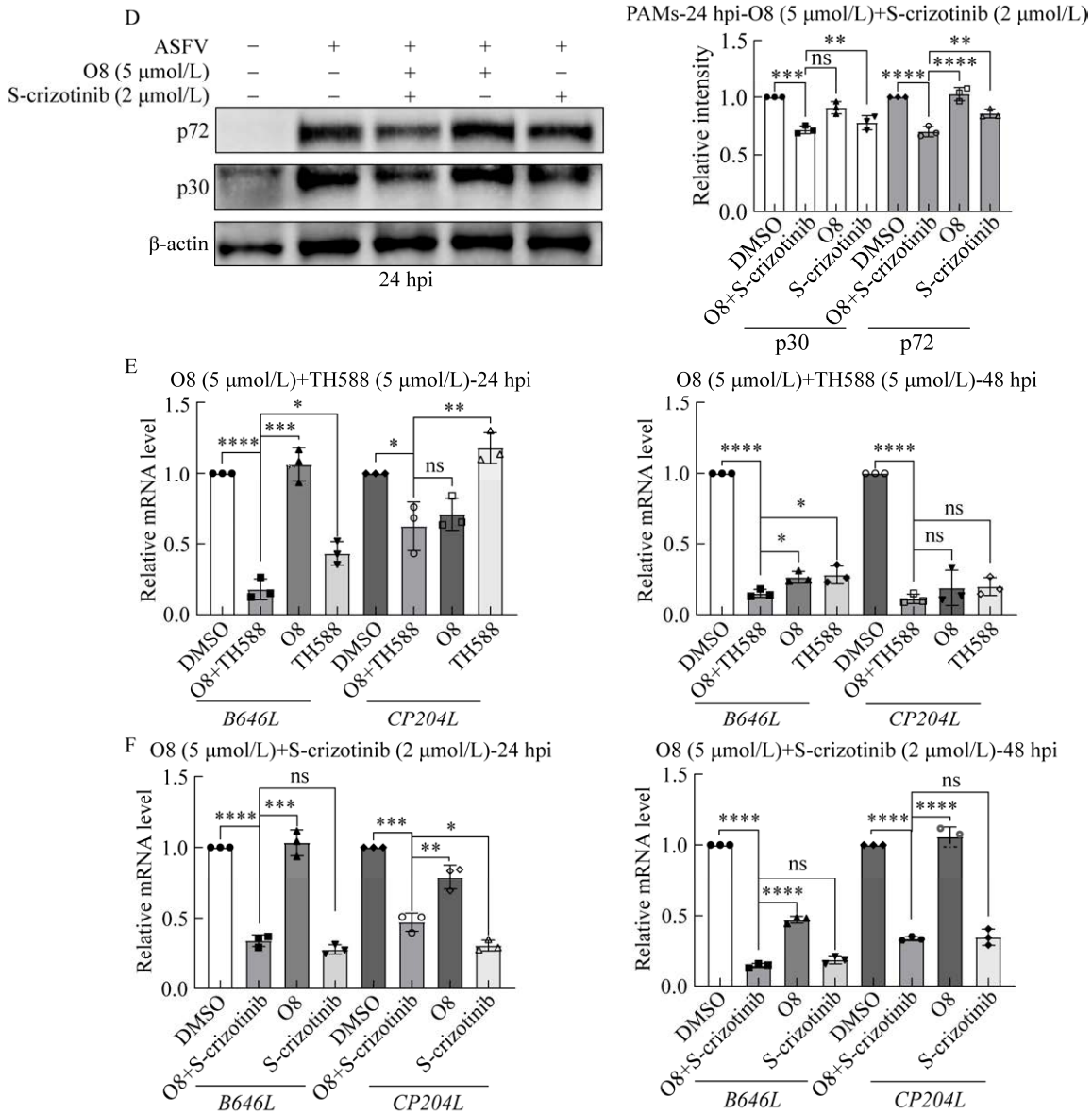
**图 3 O8、S-克唑替尼和 TH588 剂量依赖性的抑制 ASFV 的复制** A-C: 用 3 种不同浓度的抑制剂处理 PAMs 6 h 并感染 ASFV (MOI=1) 24、48 h 后, Western blotting 检测病毒蛋白 p30 的表达水平, DMSO 作为对照组. D-F: O8、S-克唑替尼和 TH588 在不同浓度下处理 PAMs, 并感染 ASFV (MOI=1) 24、48 h, 检测 *B646L* 和 *CP204L* 的 mRNA 水平, 对照组为 DMSO. G: 病毒滴度检测, 用 HAD<sub>50</sub> 检测 ASFV 的病毒滴度, O8、S-克唑替尼和 TH588 分别处理 PAMs 6 h 后加入 ASFV 原液, 用 10 倍连续稀释测量 3 次, 感染后 7 d, 选取最具代表性定量 HAD. H: O8、S-克唑替尼和 TH588 在不同浓度下处理 IPAM 细胞, 并感染 ASFV (MOI=1) 48 h, 检测 *B646L* 和 *CP204L* 的 mRNA 水平, 对照组为 DMSO. I: 最具代表性 HAD 图片. 统计学分析采用 *t* 检验. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: 不显著

Figure 3 The replication of ASFV was inhibited by O8, S-crizotinib and TH588 in dose-dependent manner. A-C: PAMs were treated with three different concentrations of inhibitors for 6 hours and infected with ASFV (MOI=1) for 24 and 48 h. Western blotting was used to detect the expression level of viral protein p30, with DMSO as the control group. D-F: PAMs were treated with O8, S-crizotinib and TH588 at different concentrations and infected with ASFV (MOI=1) for 24 and 48 h. The mRNA levels of *B646L* and *CP204L* were detected, while the control group was DMSO. G: Virus titer detection, detect the viral titer of ASFV using HAD<sub>50</sub>, and treat PAMs with inhibitors for 6 hours. Add ASFV stock solution and measure three times with 10 times continuous dilution. After 7 days of infection, select the most representative quantitative HAD. H: IPAM cells were treated with O8, S-crizotinib and TH588 at different concentrations and infected with ASFV (MOI=1) for 48 h. The mRNA levels of *B646L* and *CP204L* were detected, while the control group was DMSO. I: The picture of representative HAD phenomenon. The data is represented as mean and standard deviation. Statistical analysis using *t*-test. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: Not significant.

果发现浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的化合物 O8 分别与 5  $\mu\text{mol/L}$  的 TH588 和 2  $\mu\text{mol/L}$  的 S-克唑替尼联合使用对细胞凋亡的影响并不显著, 表明该浓度能够进行后续实验(图 4A)。在病毒滴度水平, O8 (5  $\mu\text{mol/L}$ )和 TH588 以及 O8 和 S-克唑替尼协同处理细胞能显著降低病毒的滴度, 相较于抑制剂单一使用, 具有更强的抗 ASFV 感染效果(图 4B)。在蛋白翻译水平, O8 和 TH588 联合或 O8 和 S-克唑替尼协同预处理细胞后, 对 ASFV 复制的抑制效果相较于单一抑制剂处理都较为显

著(图 4C、4D)。从转录水平上看, O8 和 TH588 及 O8 和 S-克唑替尼的协同使用对 ASFV-*B646L* 基因转录水平的抑制效果更为显著(图 4E、4F)。O8 和 TH588 的协同处理对 ASFV-*CP204L* 基因转录的抑制效果与单一抑制剂处理细胞效果相当(图 4F)。以上结果表明, O8 和 TH588 的联合使用在细胞感染 ASFV 过程中能够产生协同作用, 同样 O8 和 S-克唑替尼的联合使用与 S-克唑替尼单独使用相比, 对病毒早期基因(*ASFV-CP204L*)的表达没有明显抑制作用。





**图 4 OGG1/MTH1 抑制剂的联合使用对 ASFV 复制的影响** A: 流式细胞仪评估抑制剂联合对细胞的凋亡影响. B: 联合使用抑制剂对病毒滴度的影响. 用 HAD<sub>50</sub> 检测 ASFV 的病毒滴度, 抑制剂联合使用处理 PAMs 6 h 后加入 ASFV 原液, 用 10 倍连续稀释测量 3 次, 感染后 7 d, 选取最具代表性定量 HAD, 以 DMSO 作为对照. C、D: 联合使用对 ASFV 蛋白表达水平的影响. E、F: 联合使用对 ASFV 基因转录的影响. 统计学分析采用 *t* 检验. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: 不显著

Figure 4 Effect of inhibitors combination on ASFV replication. A: Evaluate the effect of inhibitor combination on cell apoptosis using flow cytometry. B: The effect of combined use of inhibitors on virus titer. Detect the viral titer of ASFV using HAD<sub>50</sub>, and treat PAMs with inhibitors for 6 h. Add ASFV stock solution and measure three times with 10 times continuous dilution. After 7 days of infection, select the most representative quantitative HAD and use DMSO as the control. C and D: The impact of joint use of inhibitors on the translation level of ASFV. E and F: The effect of combined use of inhibitors on ASFV gene transcription. Statistical analysis using *t*-test. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ ; ns: Not significant.

### 3 讨论

ASF 疫情属重大动物疫情,一旦发生,死亡率高,是我国生猪产业生产安全的最大威胁。当前,ASFV 的研究虽然取得了一定的成果,但 ASF 的疫情防控依然严峻。如何有效地控制病毒的增殖与传播是攻克难关的关键<sup>[21]</sup>。病毒蛋白与宿主 DNA 损伤应答途径间存在广泛的相互作用,这种相互作用发生在病毒生命周期的多个阶段,并且会对病毒复制产生影响。病毒基因组编码能力有限,需要利用细胞因子促进其基因组复制并产生子代病毒粒子,因此 DNA 损伤修复通路中的关键蛋白往往是潜在的抗病毒药物设计靶点。病毒感染常常会造成宿主细胞内的活性氧升高,导致宿主细胞内出现氧化现象,而这一过程中的损伤修复酶往往在病毒复制中发挥关键作用,因此靶向 DNA 损伤修复酶具有很好的抗病毒效果<sup>[20]</sup>。本课题组前期工作证明了 ASFV 在入侵细胞后会诱导 ROS 产生,导致 DNA 上的氧化损伤标志物 8-oxoG 升高<sup>[22]</sup>,说明氧化损伤修复在 ASFV 的感染中非常关键。目前,关于 ASFV 与氧化损伤修复间的相互作用关系研究还很少,为了进一步探究同样具有相似功能的碱基切除修复酶 MTH1 是否具有抑制 ASFV 复制的功能,本研究使用了小分子化合物和小 RNA 来抑制 MTH1 的表达,验证其对 ASFV 复制的影响,结果证明 MTH1 的抑制剂能够剂量依赖性抑制 ASFV 的增殖,同时干扰 MTH1 的基因也能够降低 ASFV 的复制,但具体作用机制还需要进一步研究。同时,我们利用 OGG1 和 MTH1 的抑制剂联合使用发现,在翻译水平, O8 (5  $\mu\text{mol/L}$ )和 TH588 (5  $\mu\text{mol/L}$ )联合使用在感染早期比单一使用效果更好,可能是因为病毒粒子在感染前期同时利用 OGG1 和 MTH1 来抵消活性氧超负荷所造成的 DNA 氧化损伤,保证其复制能够顺利进行。O8 (5  $\mu\text{mol/L}$ )和 S-克唑

替尼(2  $\mu\text{mol/L}$ )的联合使用无协同作用,由于 O8 是抑制中间体席夫碱的合成抑制 OGG1,而 S-克唑替尼是直接作用于 MTH1 的活性中心,我们猜测可能是细胞对 S-克唑替尼的敏感性高于 O8,使得 O8 在与 S-克唑替尼同时处理细胞时失去效果。同时, RNA 干扰试验证明,联合干扰 OGG1 和 MTH1 的表达比单一干扰更显著。

### 4 结论

本研究表明 OGG1 和 MTH1 的抑制剂能够抑制 ASFV 的复制,但具体的作用机制需要进一步研究,同时,部分抑制剂的联合使用能够产生协同作用,OGG1 和 MTH1 蛋白的联合干扰能够比单一的干扰更能抑制 ASFV 的复制。综上所述,本研究为 ASFV 的抗病毒策略提供了新的思路,为 ASFV 抗病毒药物的筛选和设计提供新的靶点。

### REFERENCES

- [1] DIXON LK, SUN H, ROBERTS H. African swine fever[J]. *Antiviral Research*, 2019, 165: 34-41.
- [2] BLOME S, FRANZKE K, BEER M. African swine fever-a review of current knowledge[J]. *Virus Research*, 2020, 287: 198099.
- [3] WANG N, ZHAO DM, WANG JL, ZHANG YL, WANG M, GAO Y, LI F, WANG JF, BU ZG, RAO ZH, WANG XX. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 640-644.
- [4] BASTA S, GERBER H, SCHAUB A, SUMMERFIELD A, McCULLOUGH KC. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1/2): 9-17.
- [5] RODRÍGUEZ JM, SALAS ML. African swine fever virus transcription[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 15-28.
- [6] WANG Y, KANG WF, YANG WP, ZHANG J, LI D, ZHENG HX. Structure of African swine fever virus and associated molecular mechanisms underlying infection and immunosuppression: a review[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 715582.



- [7] PANIERI E, SANTORO MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells[J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(6): e2253.
- [8] BRIEGER K, SCHIAVONE S, MILLER FJ Jr, KRAUSE KH. Reactive oxygen species: from health to disease[J]. Swiss Medical Weekly, 2012, 142: w13659.
- [9] 许希雪, 袁建辉, 柯跃斌, 唐焕文. DNA 氧化损伤及其修复基因 OGG1 和 MTH1 的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(2): 193-198.
- XU XX, YUAN JH, KE YB, TANG HW. Research progress of DNA oxidative damage and its repair genes OGG1 and MTH1[J]. Journal of Medical Science in Central South China, 2012, 40(2): 193-198 (in Chinese).
- [10] DONLEY N, JARUGA P, COSKUN E, DIZDAROGLU M, McCULLOUGH AK, LLOYD RS. Small molecule inhibitors of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGG1)[J]. ACS Chemical Biology, 2015, 10(10): 2334-2343.
- [11] 马骏, 顾梦月, 刘煜, 赖宜生. DNA 修复酶 MTH1 抑制剂研究进展[J]. 药学进展, 2017, 41(2): 140-150.
- MA J, GU MY, LIU Y, LAI YS. Research advances in inhibitors of DNA repair enzyme MTH1[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2017, 41(2): 140-150 (in Chinese).
- [12] FUJIKAWA K, KAMIYA H, YAKUSHIJI H, NAKABEPPU Y, KASAI H. Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(2): 449-454.
- [13] GAD H, KOOLMEISTER T, JEMTH AS, ESHTAD S, JACQUES SA, STRÖM CE, SVENSSON LM, SCHULTZ N, LUNDBÄCK T, EINARSDOTTIR BO, SALEH A, GÖKTÜRK C, BARANCZEWSKI P, SVENSSON R, BERNTSSON RPA, GUSTAFSSON R, STRÖMBERG K, SANJIV K, JACQUES-CORDONNIER MC, DESROSES M, et al. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool[J]. Nature, 2014, 508: 215-221.
- [14] 康从民, 王晓丽. 核酸氧化损伤修复酶 MTH1 及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1044-1048.
- KANG CM, WANG XL. Research progress of repair enzyme MTH1 and its inhibitors[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(8): 1044-1048 (in Chinese).
- [15] VISNES T, CÁZARES-KÖRNER A, HAO WJ, WALLNER O, MASUYER G, LOSEVA O, MORTUSEWICZ O, WIITA E, SARNO A, MANOILOV A, ASTORGA-WELLS J, JEMTH AS, PAN L, SANJIV K, KARSTEN S, GOKTURK C, GRUBE M, HOMAN EJ, HANNA BMF, PAULIN CBJ, et al. Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation[J]. Science, 2018, 362(6416): 834-839.
- [16] HUBER KVM, SALAH E, RADIC B, GRIDLING M, ELKINS JM, STUKALOV A, JEMTH AS, GÖKTÜRK C, SANJIV K, STRÖMBERG K, PHAM T, BERGLUND UW, COLINGE J, BENNETT KL, LOIZOU JI, HELLEDAY T, KNAPP S, SUPERTI-FURGA G. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy[J]. Nature, 2014, 508(7495): 222-227.
- [17] DAI XX, GUO GL, ZOU P, CUI R, CHEN WQ, CHEN X, YIN CT, HE W, VINOTHKUMAR R, YANG F, ZHANG XH, LIANG G. (S)-crizotinib induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells by activating ROS independent of MTH1[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR, 2017, 36(1): 120.
- [18] WANG JY, JIN L, YAN XG, SHERWIN S, FARRELLY M, ZHANG YY, LIU F, WANG CY, GUO ST, YARI H, LA T, McFARLANE J, LEI FX, TABATABAEE H, CHEN JZ, CROFT A, JIANG CC, ZHANG XD. Reactive oxygen species dictate the apoptotic response of melanoma cells to TH588[J]. The Journal of Investigative Dermatology, 2016, 136(11): 2277-2286.
- [19] CHEN Z, CHEN C, ZHOU TT, DUAN C, WANG QQ, ZHOU XH, ZHANG X, WU FR, HUA YF, LIN F. A high-throughput drug combination screen identifies an anti-glioma synergism between TH588 and PI3K inhibitors[J]. Cancer Cell International, 2020, 20: 337.
- [20] ABBAS HHK, ALHAMOUDI KMH, EVANS MD, JONES GDD, FOSTER SS. MTH1 deficiency selectively increases non-cytotoxic oxidative DNA damage in lung cancer cells: more bad news than good?[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 423.
- [21] ZAKARYAN H, REVILLA Y. African swine fever virus: current state and future perspectives in vaccine and antiviral research[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 185: 15-19.
- [22] FAN J, LV XQ, YANG SX, GENG SX, YANG JF, ZHAO YR, ZHANG ZH, LIU ZJ, GUAN GQ, LUO JX, ZENG QY, YIN H, NIU QL. OGG1 inhibition suppresses African swine fever virus replication[J]. Virologica Sinica, 2023, 38(1): 96-107.

(本文责编 郝丽芳)