杨惠珍,李晓姣,孙家振,等.$ZnSO_4$通过干扰PRRSV的生命周期阶段抑制PRRSV的增殖[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(4):51-59.
Yang H Z, Li X J, Sun J Z,et al.Zinc sulfate inhibits PRRSV proliferation by interfering with different stages of PRRSV lifecycle[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(4):51-59.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202406010

$ZnSO_4$通过干扰PRRSV的生命周期阶段抑制PRRSV的增殖

杨惠珍,李晓姣,孙家振,吴子璇,范阔海,尹伟,孙娜,张振彪,李宏全*

(山西农业大学 动物医学学院/中兽医药现代化山西省重点实验室,山西 晋中 030801)

摘　要:[目的]本文旨在探究硫酸锌(Zinc sulfate, $ZnSO_4$)抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine respiratory and reproductive syndrome virus, PRRSV)复制的作用,明确Zn^{2+}载体槲皮素(Quercetin, QR)增强Zn抗PRRSV感染的作用,为进一步将$ZnSO_4$联合QR作为潜在预防和治疗PRRSV感染的有效策略提供理论支持。[方法]利用细胞培养半数感染量(Cell culture infective dose 50%, $CCID_{50}$)的方法检测$ZnSO_4$和$ZnCl_2$对PRRSV滴度的影响。利用实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)和蛋白印迹(Western blot, WB)检测$ZnSO_4$处理Marc-145和PAMs细胞后,PRRSV N基因和N蛋白表达量的变化。利用qRT-PCR检测$ZnSO_4$预处理24 h后,在4 ℃和37 ℃处理下PRRSV N基因表达量的变化。同时,利用qRT-PCR检测$ZnSO_4$处理不同时间,培养基上清中PRRSV N基因表达量的变化。利用qRT-PCR和WB检测$ZnSO_4$、QR以及两者联合处理,PRRSV N基因和N蛋白表达量的变化。[结果]$CCID_{50}$结果表明:$ZnSO_4$和$ZnCl_2$均可显著降低PRRSV滴度。在Marc-145和PAMs上,不同浓度$ZnSO_4$处理,均可显著抑制PRRSV N基因和N蛋白表达,且抑制作用呈明显的剂量-效应关系。不同浓度$ZnSO_4$预处理24 h,在4 ℃和37 ℃处理2 h后,均可显著降低PRRSV N基因表达,且呈明显的剂量-效应关系。100 μmol·$L^{-1}$$ZnSO_4$处理,在不同时间段,可显著抑制上清中PRRSV N基因的表达。$ZnSO_4$联合QR处理结果表明,$ZnSO_4$联合QR可显著抑制PRRSV N基因和N蛋白的表达。[结论]$ZnSO_4$能显著抑制PRRSV的复制,它不仅可以阻止PRRSV的黏附和进入,而且可以抑制PRRSV的复制和干扰PRRSV的释放。此外,QR可以增强$ZnSO_4$抗PRRSV感染的作用。本研究为进一步明确$ZnSO_4$抗PRRSV感染的分子机制奠定了理论基础。

关键词:硫酸锌; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 抗病毒; 槲皮素
中图分类号:S852　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)04-0051-09

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine productive and respiratory syndrome virus, PRRSV)是一种具有囊膜的单股正链RNA病毒,属于动脉炎病毒科动脉炎病毒属。它可诱发猪繁殖与呼吸综合征(Porcine productive and respiratory syndrome, PRRS),引起妊娠母猪的繁殖障碍和育肥猪、保育猪和仔猪的呼吸道疾病,是严重危害我国养猪业的疫病之一[1-2]。生产中主要通过严格的消毒措施、抗炎抗菌药物的使用和接种PRRSV疫苗控制PRRSV感染的发生[3]。目前,尚无有效的抗病毒药物用于治疗PRRSV的感染。锌(Zinc, Zn)是生物体第二丰富的必需微量元素,在多种生理过程中发挥重要作用。人类医学领域的许多学者发现Zn具有抗病毒感染的作用。然而,在兽医学领域鲜见关于Zn抗病毒感染作用的研究。仅见动物营养与饲料科学湖北省重点实验室的Zhang等[4]报告Zn具有抗猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染的作用。

Zn是生物体必需微量元素之一,它被证明对各种细胞酶和转录因子的正确折叠和活性至关重要[5]。Zn可能也是许多病毒蛋白的重要辅因子[5]。但是,研究表明:细胞中高浓度的Zn可以抑制多种

收稿日期:2024-06-05　　**修回日期**:2024-07-19
基金项目:山西省基础研究计划项目(20210302124138);山西省科技创新人才团队专项(202204051001021);山西农业大学科技创新基金博士科研启动项目(2020BQ66);山西农业大学大学生创新创业训练计划项目(S202410113049)
作者简介:杨惠珍(ORCID:0009-0008-2737-8149),讲师,博士,研究方向:中兽医药现代化,E-mail: hzyang2020@sxau.edu.cn
*通信作者:李宏全,博士,教授,E-mail: livets@163.com

RNA病毒的复制。Ghaffari等[6]和Tavakoli等[7]分别报道:在体外,纳米氧化锌可有效地抑制H1N1流感病毒(Influenza virus, IFV)和单纯疱疹病毒Ⅰ型(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)的感染。Khan等[8]也证明:在体外,增补Zn能够有效地抑制呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)的感染。艾滋病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)和丙型肝炎病毒(Hepatitis c virus, HCV)等感染的临床研究发现增补Zn可有效抑制组织中病毒的载量[9]。临床研究表明:在新型冠状病毒(2019 Novel Coronavirus, COVID-19)感染病人治疗中,增补$ZnSO_4$能增加患者的治愈率、减少死亡率[10-11]。在兽医学领域,Zhang等[4]报道:氧化锌可有效抑制PEDV对仔猪的感染,发挥抗病毒的作用。其中,H1N1、RSV、HIV、HCV和COVID-19和PEDV均是RNA病毒,这意味着,在病毒感染中,细胞或者血液中高浓度的Zn可有效抑制RNA病毒的感染。

PRRSV属于RNA病毒的一种,在细胞中增加Zn含量能否有效抑制PRRSV的感染,有待进一步探讨。鉴于此,本研究建立PRRSV感染Marc-145的细胞模型,研究$ZnCl_2$和$ZnSO_4$对PRRSV滴度的影响;明确细胞中添加不同浓度$ZnSO_4$对Marc-145和PAMs细胞中PRRSV复制的作用;探究$ZnSO_4$干扰PRRSV感染的生命周期阶段。为进一步明确Zn抗PRRSV感染的分子机制奠定理论基础。槲皮素(Quercetin, QR)是一种天然Zn^{2+}载体,可提高Zn在细胞中的生物利用度。探究QR增强Zn抗PRRSV感染的作用,为进一步将Zn和Zn^{2+}载体QR联合使用治疗PRRSV感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

Marc-145和PAMs细胞均由山西农业大学动物医学学院中兽医药现代化山西省重点实验室提供。Marc-145细胞用含有10%FBS和1%青霉素\链霉素的DMEM高糖培养基培养。当细胞生长至约80%~90%时,用胰蛋白酶消化,计数后接种至25 cm^2的细胞培养瓶中培养。当细胞长至约80%时,可用于后续试验。PAMs细胞用含有10%的FBS和1%的青霉素\链霉素的1640细胞培养基培养。

1.2 PRRSV的扩增和感染

PRRSV原液由山西农业大学动物医学学院中兽医药现代化山西省重点实验室提供。利用本文1.1节的方法培养Marc-145细胞,待细胞长至约80%时,取5 mL PRRSV悬液(原液经10倍稀释)接种于Marc-145细胞,培养2 h。之后,弃去培养液,用PBS冲洗3次,加入5 mL含有2% FBS的高糖DMEM细胞维持培养液,继续培养60 h。当大约80%~90%的细胞发生病变时,收集细胞。将细胞置于-20 ℃和室温之间反复冻融。然后,4 ℃、3000 $r\cdot min^{-1}$下离心30 min。收集上清,用0.22 μm的微孔滤器过滤,分装至无菌EP管内,-80 ℃保存备用。

1.3 细胞计数试剂盒法(Cell Counting Kit-8, CCK-8)检测细胞的活力

将Marc-145或PAMs细胞接种于96孔细胞培养板(密度为每孔6×10^3),待长至约80%时,接种100 $TCID_{50}\cdot mL^{-1}$的PRRSV,37 ℃培养2 h。之后,弃掉细胞培养基上清,分别用含200、100、50、25、12.5、6.25和0 $\mu mol\cdot L^{-1}$ $ZnSO_4$的2% FBS高糖DMEM细胞维持液培养48 h,每个$ZnSO_4$浓度设置4个重复组。之后,避光加入10 μL的CCK-8溶液,37 ℃培养30 min后,用酶标仪测定450 nm处的吸光度。根据以下公式计算细胞活力:细胞存活率=(试验组吸光度-空白组吸光度)/(细胞对照组吸光度-空白组吸光度)×100%。

1.4 实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测PRRSV N基因的拷贝数

将Marc-145细胞接种于6孔细胞培养板(密度为每孔1×10^5),待长至约80%时,接种100 $TCID_{50}\cdot mL^{-1}$的PRRSV,37 ℃培养2 h。弃掉细胞培养基上清,分别用含100、50、12.5 $\mu mol\cdot L^{-1}$ $ZnSO_4$的2% FBS高糖DMEM细胞维持液培养48 h后,弃掉细胞培养基,收集细胞。之后,用TRIzol(TaKaRa,北京)提取细胞总RNA。用反转录试剂盒(ABM,上海)获得cDNA。利用2×SYBR Green qPCR Master Mix(Bimake,上海),通过qRT-PCR测定Marc-145细胞内PRRSV N基因的拷贝数。PRRSV N基因上游引物为:5′-AGAAGCCCCATTTCCCTCTA-3′,下游引

物为：5′-CGGATCAGACGCACAGTATG-3′。绝对定量检测PRRSV载量时，将本实验室保存的PRRSV N基因重组质粒10倍倍比稀释8个梯度，作为标准曲线，加入PRRSV N基因上下游引物，进行扩增。其中，设置空白组和PRRSV对照组，试验单独重复3次。

1.5　Western blot(WB)检测PRRSV的表达

Marc-145细胞的培养和$ZnSO_4$的处理与本文1.4节一致。处理完成后，用无菌细胞刮片刮下细胞，4000 r·min^{-1}离心5 min，收集细胞，用PBS洗涤2次。将细胞裂解液(RIPA高效裂解液：蛋白磷酸酶抑制剂：PMSF=100:1:1)加入细胞，剧烈振荡15 s后，超声处理15 min，置于冰上静置40 min，其中，每隔10 min剧烈振荡15 s。之后4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min，收集上清。利用BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime Biotechnology，上海)测定上清中总蛋白浓度。

根据样品中细胞总蛋白浓度，分别取30 μg总蛋白，加入5×蛋白上样缓冲液，95 ℃变性10 min。利用12%的SDS-PAGE分离细胞中的蛋白。电泳结束后，根据蛋白Marker的指示，切下目的条带。将目的条带电转移至PVDF膜上，用5%脱脂牛奶封闭2 h。加1:10 000稀释的抗PRRSV N蛋白的单克隆抗体，4 ℃过夜。之后，用TBST洗涤3次，加入HRP标记的羊抗兔二抗，37 ℃孵育1 h。根据Meilunbio飞科特超敏ECL发光液(BOSTER，武汉)说明书，制备显色工作液并显色。采用Image Lab图像获取和分析软件分析数据。

1.6　病毒滴度的测定

将Marc-145细胞接种于6孔细胞培养板，待长至80%时，接种100 $TCID_{50}$·mL^{-1}的PRRSV，37 ℃培养2 h。弃掉细胞培养基上清，分别用含100、50、12.5 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$的2% FBS高糖DMEM细胞维持液培养48 h，收集细胞，反复冻融，收集上清，即为PRRSV原液。将PRRSV原液按1:10、1:100、1:1000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000、1:10 000 000、1:100 000 000倍比稀释，制备为10^{-1}～10^{-8}稀释度的PRRSV悬液。然后，将Marc-145细胞接种于96孔细胞培养板，待长至单层时，每孔接种100 μL稀释度为10^{-1}～10^{-8}的PRRSV悬液。之后继续培养，直至观察到细胞病变，通过显微镜观察，记录病变细胞数量，按照Reed-Muench公式：$TCID_{50}$=(高于50%病变率百分数－50%)/(高于50%病变率百分数－低于50%病变率百分数)×稀释对数之间的差＋高于50%病变率的稀释倍数，计算样品的病毒滴度。同时，设置空白组，试验单独重复3次。

1.7　PRRSV黏附和进入的测定

将Marc-145细胞接种于6孔细胞培养板(密度为每孔1×10^5)，待长至80%时，分别用含100、50、12.5 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$的2% FBS高糖DMEM细胞维持液预处理Marc-145细胞24 h。然后，将不同浓度$ZnSO_4$处理24 h的Marc-145细胞置于4 ℃预冷30 min，弃掉细胞培养上清，接种100 $TCID_{50}$·mL^{-1}的PRRSV，分别置于4 ℃和37 ℃孵育2 h，置于4 ℃用于评定PRRSV的黏附，置于37 ℃用于评定PRRSV的进入[12]。

同时，设置$ZnSO_4$和PRRSV共孵育处理组。将不同浓度$ZnSO_4$和$TCID_{50}$·mL^{-1}的PRRSV在37 ℃共孵育2 h，然后，用混合液处理4 ℃预冷30 min的Marc-145细胞，分别置于4 ℃和37 ℃下处理2 h。最后，分别用PBS洗去未结合的PRRSV病毒粒子，收集细胞。提取总RNA，通过qRT-PCR测定PRRSV N基因的载量。其中，设置空白组、无$ZnSO_4$的缓冲液和PRRSV混合液的对照组，试验单独重复3次。

1.8　PRRSV释放的测定

将Marc-145细胞接种于6孔细胞培养板(密度为每孔1×10^5)，待长至80%时，接种100 $TCID_{50}$·mL^{-1}的PRRSV，37 ℃培养2 h，弃掉细胞培养基上清，用PBS洗涤3次。然后，用含100 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$的2% FBS高糖DMEM细胞维持液分别培养6、8、10、12、16、20、24、36、48、60和72 h，收集各组细胞培养液的上清液，提取上清中的总RNA，通过qRT-PCR测定PRRSV N基因的载量。其中，设置PRRSV对照组，试验单独重复3次。

1.9　数据分析

利用GraphPad Prism software 8.0(GraphPad Software, Inc. California, USA)分析试验数据，通过单因素方差分析法分析各组之间的差异性，$P<0.05$为差异显著，$P<0.01$、$P<0.001$和$P<0.000\,1$为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 $ZnSO_4$对Marc-145和PAMs细胞的最大安全浓度

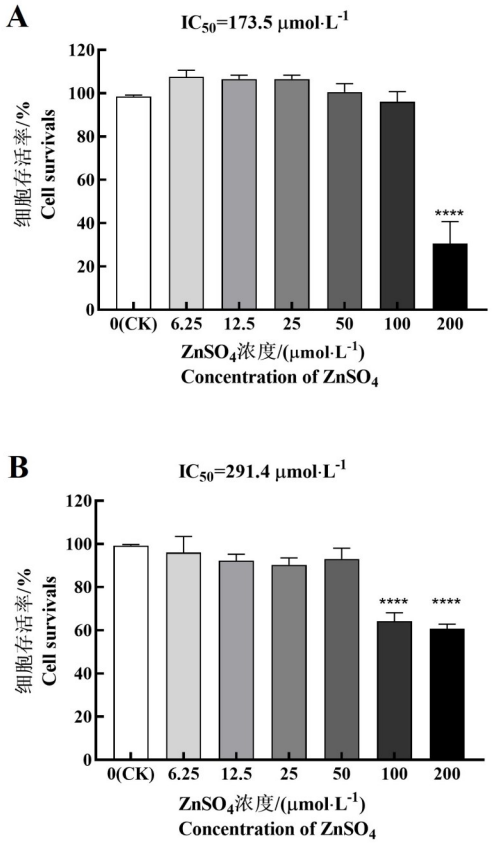
利用CCK-8法检测$ZnSO_4$对Marc-145(图1A)和PAMs(图1B)细胞活力的影响,由图1A可见,PRRSV接种Marc-145细胞48 h后,与对照组相比,200 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组细胞活力呈极显著性降低($P<0.0001$),细胞存活率低于50%;100 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组,细胞活力无显著性差异,细胞存活率高于90%;50、25、12.5、6.25 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组,细胞活力均呈升高趋势,但是,4个处理间无显著性差异。使用GraphPad prism 8.0计算可得$ZnSO_4$对Marc-145细胞的IC_{50}是173.5 μmol·L^{-1}。结果表明,可选用低于100 μmol·L^{-1}的$ZnSO_4$作为处理Marc-145细胞的浓度。由图1B可见,PRRSV接种PAMs细胞48 h后,与对照组相比,200和100 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组PAMs细胞活力呈极显著降低($P<0.0001$),细胞存活率分别是60.75%和64.25%,低于90%;50、25、12.5、和6.25 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组细胞活力无显著性差异,存活率均高于90%。使用GraphPad prism 8.0计算可得$ZnSO_4$对PAMs细胞的IC_{50}是291.4 μmol·L^{-1}。结果表明:试验可选用低于50 μmol·L^{-1}的$ZnSO_4$作为处理PAMs细胞的浓度。

2.2 $ZnSO_4$和$ZnCl_2$可降低PRRSV的滴度

利用$CCID_{50}$检测$ZnSO_4$(图2A)和$ZnCl_2$(图2B)对PRRSV滴度的影响,结果显示:与对照组相比,100、50、12.5 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$和$ZnCl_2$均可显著和极显著性降低PRRSV的滴度($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$,$P<0.0001$),且呈明显的剂量-效应关系。表明:$ZnSO_4$和$ZnCl_2$均可抑制PRRSV的复制,Zn^{2+}是抑制PRRSV的有效成分。

2.3 $ZnSO_4$抑制PRRSV在Marc-145细胞中的复制

利用qRT-PCR和WB检测$ZnSO_4$对Marc-145细胞中PRRSV N基因和N蛋白表达的影响(图3A~图3C),结果显示:利用PRRSV N基因重组质粒构建的标准曲线$R^2=1$。与对照组相比,不同浓度$ZnSO_4$处理组均可极显著抑制PRRSV N基因的表达($P<0.01$,$P<0.0001$)。与对照相比,100和50 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$能极显著抑制PRRSV N蛋白的表达($P<0.01$,$P<0.0001$)。结果表明:成功构建了PRRSV N基因的标准曲线,可用于后续PRRSV N基因绝对定量的标曲。100、50和12.5 μmol·L^{-1}的$ZnSO_4$均能抑制PRRSV在Marc-145细胞中的复制,且抑制作用呈明显的剂量-效应关系。



A:不同浓度$ZnSO_4$对Marc-145细胞存活率的影响;B:不同浓度$ZnSO_4$对PAMs细胞存活率的影响。误差棒代表标准误,*表示$P<0.05$;**表示$P<0.01$;***表示$P<0.001$;****表示$P<0.0001$

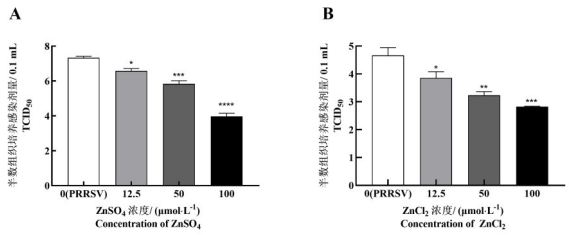
A: Effects of different concentrations of zinc sulfate on Marc-145 survival rate. B: Effects of different concentrations of zinc sulfate on PAMs cells survival rate. Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图1 不同浓度$ZnSO_4$对Marc-145和PAMs细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of zinc sulfate on the survival rates of Marc-145 and PAMs cells

2.4 $ZnSO_4$抑制PRRSV在PAMs上的复制

在PRRSV的靶细胞PAMs上,观察了$ZnSO_4$对PRRSV复制的作用。利用qRT-PCR和WB检测$ZnSO_4$对PAMs细胞中PRRSV N基因和N蛋白表达的影响(图4A~图4B)。结果显示:与对照



A：$ZnSO_4$对PRRSV滴度的影响；B：$ZnCl_2$对PRRSV滴度的影响。误差棒代表标准误，*表示$P<0.05$；**表示$P<0.01$；***表示$P<0.001$；****表示$P<0.0001$

A: Effects of ZnSO4 on PRRSV titers. B: Effects of ZnCl2 on PRRSV titers. Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图2　$ZnSO_4$和$ZnCl_2$对PRRSV滴度的影响

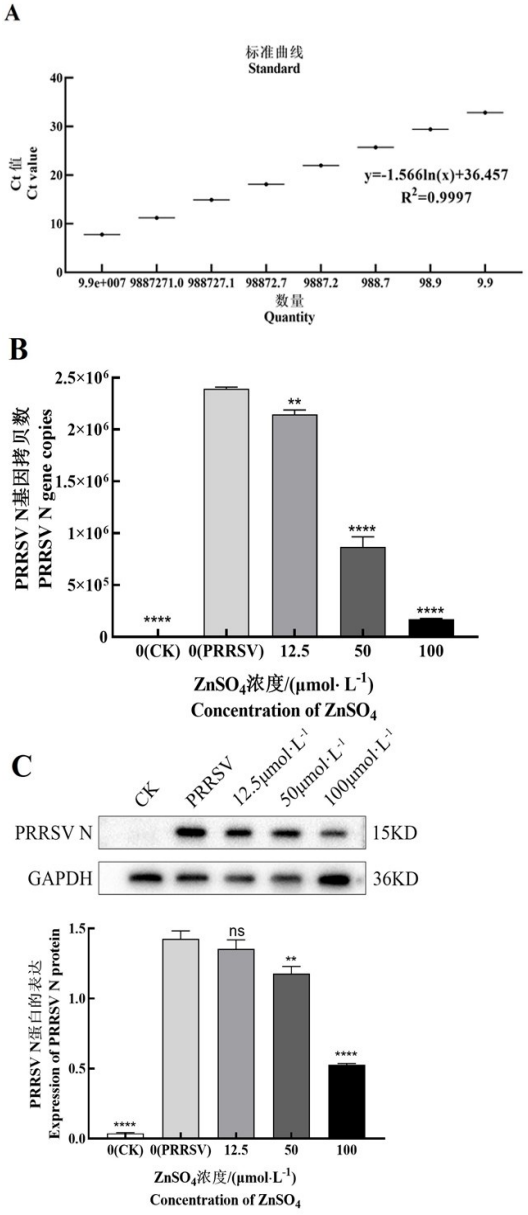
Fig.2　Effects of $ZnSO_4$ and $ZnCl_2$ on PRRSV titers

组相比，50、25和12.5 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理组均可极显著抑制PRRSV N基因的表达（$P<0.0001$）。同时，也极显著抑制了PRRSV N蛋白的表达（$P<0.0001$）。结果表明：50、25和12.5 μmol·L^{-1}的$ZnSO_4$均能抑制PRRSV在靶细胞PAMs中的复制，且抑制作用呈明显的剂量-效应关系。

2.5　$ZnSO_4$干扰PRRSV的黏附和进入

为了确定$ZnSO_4$干扰PRRSV生命周期的阶段，本研究探索了$ZnSO_4$对PRRSV黏附和进入的影响。$ZnSO_4$预处理Marc-145细胞24 h后，接种PRRSV，分别置于4 ℃和37 ℃孵育2 h，利用qRT-PCR检测PRRSV N基因表达量的变化（图5A、5B）。由图5A和图5B可见，与对照组相比，100和50 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$预处理24 h，接种PRRSV，4 ℃和37 ℃孵育2 h后，PRRSV N基因的表达量均呈极显著性降低（$P<0.0001$）；12.5 μmol·L^{-1}的$ZnSO_4$预处理组仅在37 ℃孵育2 h后，PRRSV N基因的表达量呈极显著性降低（$P<0.0001$）。结果表明：$ZnSO_4$既可干扰PRRSV的黏附，也可阻止PRRSV的进入，且干扰作用呈明显的剂量-效应关系。同时，也证明了$ZnSO_4$对PRRSV的感染具有预防作用。

为了排除$ZnSO_4$和PRRSV的直接相互作用对$ZnSO_4$干扰PRRSV黏附和进入的影响，设置了$ZnSO_4$和PRRSV的共孵育试验。两者共孵育2 h后，在Marc-145细胞中接种PRRSV，分别置于4 ℃和37 ℃，利用qRT-PCR检测PRRSV N基因表达量的影响（图5C、5D）。由图5C可见，不同浓度$ZnSO_4$和PRRSV共孵育2 h后，置于4 ℃，



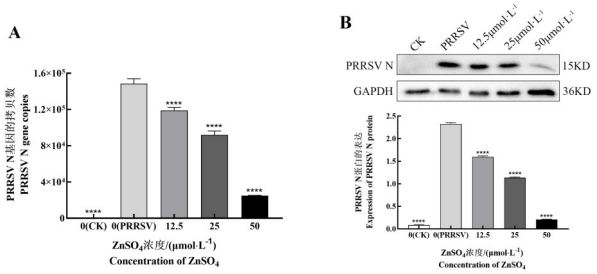
A：PRRSV N基因的标准曲线；B：$ZnSO_4$对PRRSV N基因表达量的影响；C：$ZnSO_4$对PRRSV N蛋白表达量的影响。误差棒代表标准误，*表示$P<0.05$；**表示$P<0.01$；***表示$P<0.001$；****表示$P<0.0001$

A: The standard curve of PRRSV N gene; B: Effect of $ZnSO_4$ on PRRSV N gene copies C: Effect of $ZnSO_4$ on expression of PRRSV N protein. Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图3　$ZnSO_4$抑制PRRSV在Marc-145细胞中的复制

Fig.3　Zinc sulfate inhibited PRRSV replication in Marc-145 cells

PRRSV N基因的表达量无显著变化。表明：$ZnSO_4$和PRRSV的共孵育不干扰PRRSV的黏附。图5D结果显示：与对照相比，仅100 μmol·L^{-1}



A:$ZnSO_4$对PRRSV N基因表达量的影响;B:$ZnSO_4$对PRRSV N蛋白表达量的影响。误差棒代表标准误,*表示$P<0.05$;**表示$P<0.01$;***表示$P<0.001$;****表示$P<0.0001$

A: Effects of ZnSO4 on the expression of PRRSV N gene; B: Effects of ZnSO4 on expression of PRRSV N protein. Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图4 $ZnSO_4$抑制PRRSV在PAMs细胞中的复制

Fig.4 Zinc sulfate inhibited PRRSV replication in PAMs cells

$ZnSO_4$和PRRSV的共孵育处理组在37 ℃孵育2 h后,PRRSV N基因的表达量呈极显著性降低($P<0.001$, $P<0.000\ 1$)。表明:仅100 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$和PRRSV的共孵育可显著抑制PRRSV的进入。从而,排除了$ZnSO_4$干扰PRRSV的黏附和进入是由于$ZnSO_4$对PRRSV的直接杀灭作用。

2.6 $ZnSO_4$阻止PRRSV的释放

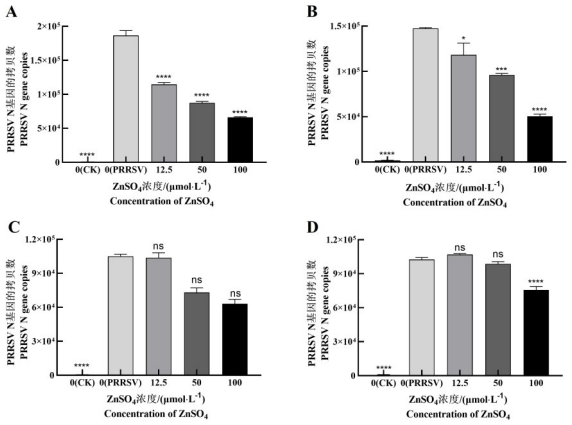
利用qRT-PCR检测$ZnSO_4$对Marc-145细胞培养基上清中PRRSV N基因表达的影响(图6)。结果显示:与对照相比,除8、20和60 h之外,在6、10、12、16、20、36、48和72 h,100 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$可显著和极显著抑制细胞培养基上清中PRRSV N基因的表达量。表明:$ZnSO_4$可阻止PRRSV的释放。$ZnSO_4$对PRRSV的感染具有治疗作用。

2.7 QR增强$ZnSO_4$抗PRRSV感染的作用

利用qRT-PCR和WB检测$ZnSO_4$、QR以及两者联合处理,PRRSV N基因和N蛋白表达量变化。结果显示:与对照相比,3.125 μmol·L^{-1} QR和0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$单独处理,PRRSV N基因表达量和N蛋白表达量无显著变化。然而,与对照组相比,3.125 μmol·L^{-1} QR和0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$联合处理,PRRSV N基因和N蛋白的表达量呈显著性降低($P<0.05$)。表明:QR可增强$ZnSO_4$抗PRRSV感染的作用。

3 讨论与结论

PRRSV是一种单股正链RNA病毒,具有高



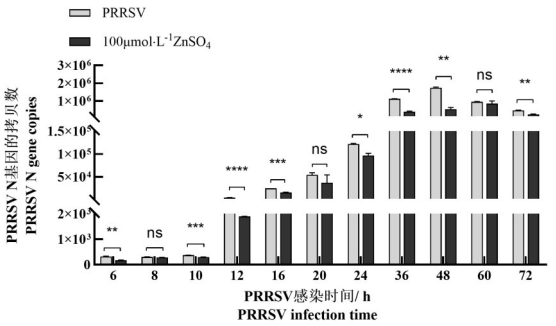
A:$ZnSO_4$预处理Marc-145细胞24 h后将Marc-145细胞置于4 ℃预冷30 min。之后接种PRRSV,将细胞置于4 ℃中2 h后,PRRSV N基因表达量;B:将细胞置于37 ℃中2 h后,PRRSV N基因表达量;C:PRRSV与$ZnSO_4$在37 ℃共孵育2 h,之后将混合物接种于预冷的Marc-145细胞。4 ℃处理2 h后,PRRSV N基因表达量;D:37 ℃处理2 h后,PRRSV N基因表达量。误差棒代表标准误,*表示$P<0.05$;**表示$P<0.01$;***表示$P<0.001$;****表示$P<0.000\ 1$

A: Marc-145 cells pretreated with $ZnSO_4$ for 24 h. Marc-145 cells were precooled at 4°C for 30 min before challenging with PRRSV, and the cells were kept at 4℃ for 2 h. The cells were collected at 2 h for qRT-PCR assay. PRRSV N genes copies were detected to evaluated the attachment of PRRSV on Marc-145 cells; B: the cells were kept at 37℃ for 2 h. PRRSV N genes copies were detected to evaluated the entry of PRRSV in Marc-145 cells; C: PRRSV was incubated with $ZnSO_4$ at 37°C for 2 h. The precooled Marc-145 cells were treated with the mixture at 4°C for 2 h. The cells were collected at 2 hpi for qRT-PCR assay. PRRSV N genes copies were detected to evaluated the attachment of PRRSV on Marc-145 cells; D: the precooled Marc-145 cells were treated with the mixture at 37°C for 2 h. The cells were collected at 2 h for qRT-PCR assay. PRRSV N genes copies were detected to evaluated the entry of PRRSV in Marc-145 cells. Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.000 1, respectively

图5 $ZnSO_4$抑制PRRSV的黏附和进入

Fig.5 Zinc sulfate suppressed PRRSV adhesion and entry

度变异性[13]。我国猪群中存在多种PRRSV谱系,包括谱系1、3、5和8[1]。因此,在生产中,接种PRRSV疫苗并不能持续有效控制PRRS的发生[3]。所以,研发抗PRRSV感染的药物具有重要的科学实践意义。研究表明:Zn能有效抑制RNA病毒的复制[14]。本研究发现:在Marc-145细胞中,$ZnSO_4$能显著地抑制PRRSV的滴度和病毒载量,且抑制作用呈一定的剂量依赖性效应。这与Kubo等[15]报道$ZnSO_4$具有抗H1N1和SARS-CoV-2病毒的作用和Khan等[8]报道Zn能有效地抑制呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)的复制的结果是一致的。这意味着$ZnSO_4$是一种潜



误差棒代表标准误,*表示$P<0.05$;**表示$P<0.01$;***表示$P<0.001$;****表示$P<0.0001$

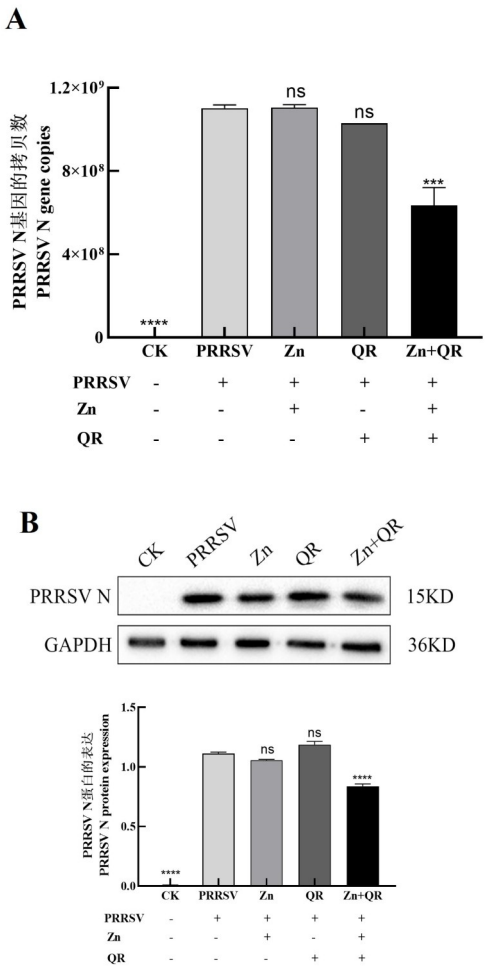
Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图6　$ZnSO_4$干扰PRRSV的释放

Fig.6　Zinc sulfate interfered with the release of PRRSV

在抗PRRSV感染的药物。

Zn抗病毒感染的作用可能是干扰了病毒复制的不同阶段。本研究发现:$ZnSO_4$预处理能显著阻断PRRSV的黏附和进入,且阻断作用呈一定的剂量依赖效应,同时,排除了$ZnSO_4$对PRRSV的直接杀灭作用。这一结果与Rahaman等[16]证明的Zn通过抑制RSV的吸附和渗透抗RSV的结果是一致的。Liu等[17]也证实:Zn可以抑制肠道病毒D68(Enterovirus D68, EV-D68)的黏附、进入和释放。Zn阻断病毒黏附和进入的分子机制可能是由于Zn干扰了病毒糖蛋白介导的膜融合[16],或者由于Zn与受体中的氨基酸发生配位结合,影响了病毒糖蛋白-受体的识别和相互作用[18],进而抑制了病毒的复制。除此之外,$ZnSO_4$也能显著抑制PRRSV在Marc145细胞和靶细胞PAMs中的复制,且抑制作用较$ZnSO_4$对PRRSV黏附和进入的抑制作用显著。提示了升高细胞中Zn含量可能是一种潜在治疗PRRSV感染的有效策略。这一结论与te Velthuis等[5]证明Zn可以抑制马动脉炎病毒(Equine arteritis virus, EAV)和SARS-CoV病毒在细胞中的复制的结论是一致的。Zn抑制病毒的复制机制具有多面性。研究表明:Zn可诱导干扰素刺激基因的表达,合成干扰素,发挥抗病毒的作用[19]。Panchariya等[20]报道,Zn可以抑制SARS-CoV-2主要蛋白激酶发挥抗SARS-CoV-2的作用。te Velthuis等[5]证明Zn通过抑制EAV和SARS-CoV RNA合成酶的活性发挥抗EAV和SARS-CoV病毒的作用。Zn也可以与SARS-



A:QR和$ZnSO_4$单独以及联合处理对PRRSV N基因表达量的影响;B:QR和$ZnSO_4$单独以及联合处理对PRRSV N蛋白表达的影响。Zn代表0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$,QR代表3.125 μmol·L^{-1} QR,Zn+QR代表0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$和3.125 μmol·L^{-1} QR。误差棒代表标准误,*表示$P<0.05$;**表示$P<0.01$;***表示$P<0.001$;****表示$P<0.0001$

A: Effects of QR and $ZnSO_4$ alone and in combination on PRRSV N genes expression. B: Effects of QR and $ZnSO_4$ alone and in combination on PRRSV N protein expression. Zn: $ZnSO_4$ at 0.781 μmol·L^{-1}; QR: 3.125 μmol·L^{-1}; Zn+QR: 0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$+3.125 μmol·L^{-1} QR; Error bars indicated the SE; Bars with *, **, ***, and **** indicated the significant difference at $P<0.05$, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively

图7　QR增强$ZnSO_4$抗PRRSV感染的作用

Fig.7　Enhancement of zinc sulfate's antiviral effect against PRRSV infection by QR

CoV-2的RNA依赖性RNA聚合酶和类3C蛋白酶相互作用抑制SARS-CoV-2的复制[21]。说明Zn可以干扰病毒的黏附和进入、阻碍病毒蛋白的加工和阻断病毒RNA依赖性RNA聚合酶的活性等多种途径,有效阻断病毒的感染。

在生产中,日粮中常添加一定量的Zn促进猪

的生产性能[22]。但是,只有10%～20%的摄入Zn可被吸收。研究表明:在25～60 kg的育肥猪日粮中添加50、75和100 mg·kg^{-1} $ZnSO_4$,其血液中Zn的浓度分别为2.9、6.6和7.4 μmol·L^{-1},其中,75和100 mg·kg^{-1} $ZnSO_4$这2组间并无显著差异($P>0.05$)[23]。同时,仔猪、断奶仔猪和育肥猪日粮中分别添加50、75和100 mg·kg^{-1} $ZnSO_4$,血清中Zn的最高浓度也仅为7.4 μmol·L^{-1}[23]。所以,即便日粮中添加一定量的Zn,由于Zn的吸收率较低,生产中也并不能观察到明显的抗PRRSV的作用。QR是一种重要的黄酮类化合物,在洋葱、芦笋等水果和苹果樱桃等水果中含量较高[24-25]。Dabbagh-Bazarbachi等[24]报道:QR可作为Zn^{2+}载体,促进Zn的跨膜转运,增加Zn在细胞内的生物利用率。本研究发现:用0.781 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$处理Marc-145细胞,无显著抑制PRRSV复制的能力。然而,添加3.125 μmol·L^{-1} QR之后,则能显著抑制PRRSV的复制。意味着QR可以显著增强$ZnSO_4$抑制PRRSV复制的能力。Panchariya等[20]报道:QR可以促进细胞内Zn含量的升高,增强Zn抗SARS-CoV-2的作用,且是Zn单独抗SARS-CoV-2的2倍,这与本研究的结论是一致的。同时,te Velthuis等[5]利用Zn^{2+}载体吡啶硫酮(Pyrithione, PT)增加细胞内Zn浓度,可有效抑制EVA和SARS-CoV病毒的复制。Liu等[17]利用Zn^{2+}载体二硫代氨基甲酸吡咯烷(Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)促进细胞内Zn浓度升高,降低EV-D68的载量。说明:利用Zn和QR联合使用,通过QR增加细胞内Zn的含量,可能是抗PRRSV病毒治疗的潜在有效策略。

综上所述,$ZnSO_4$通过抑制PRRSV的黏附、进入和复制发挥抗PRRSV感染的作用,且Zn离子载体QR能促进细胞Zn的吸收,增强Zn抑制PRRSV的作用。为进一步明确$ZnSO_4$抗PRRSV感染的分子机制奠定了坚实的基础;为进一步将$ZnSO_4$作为潜在预防和治疗PRRSV感染的有效策略提供理论支持;同时,也为进一步探索Zn^{2+}载体QR联合Zn抗PRRSV感染的作用和分子机制提供了依据。

参 考 文 献

[1]Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of Porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J].Archives of Virology,2004,149(7):1341-1351.

[2]Ye N, Wang B, Feng W, et al. PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion[J].Virus Research,2022,320:198885.

[3]Xu H L, Liu Z H, Zheng S Y, et al. CD163 antibodies inhibit PRRSV infection via receptor blocking and transcription suppression[J].Vaccines,2020,8(4):592.

[4]Zhang Q, Wu T, Li S Y, et al. Protective effect of zinc oxide and its association with neutrophil degranulation in piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2021,2021:3055810.

[5]te Velthuis A J W, van den Worm S H E, Sims A C, et al. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture[J].PLoS Pathogens,2010,6(11):e1001176.

[6]Tavakoli A, Ataei-Pirkooh A, Sadeghi G M, et al. Polyethylene glycol-coated zinc oxide nanoparticle: an efficient nanoweapon to fight against herpes simplex virus type 1[J]. Nanomedicine,2018,13(21):2675-2690.

[7]Ghaffari H, Tavakoli A, Moradi A, et al. Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine[J].Journal of Biomedical Science,2019,26(1):70.

[8]Khan N A, Singla M, Samal S, et al. Respiratory syncytial virus-induced oxidative stress leads to an increase in labile zinc pools in lung epithelial cells[J].mSphere,2020,5(3):e00447-e00420.

[9]Fani M, Khodadad N, Ebrahimi S, et al. Zinc sulfate in narrow range as an in vitro anti-HSV-1 assay [J]. Biological Trace Element Research,2020,193(2):410-413.

[10]Carlucci P M, Ahuja T, Petrilli C, et al. Zinc sulfate in combination with a zinc ionophore may improve outcomes in hospitalized COVID-19 patients [J]. Journal of Medical Microbiology,2020,69(10):1228-1234.

[11]Joachimiak M P. Zinc against COVID-19? Symptom surveillance and deficiency risk groups [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases,2021,15(1):e0008895.

[12]Xu Y Q, Zhu Z B, Zhang M, et al. Tubercidin inhibits PRRSV replication via RIG-I/NF- κB pathways and interrupting viral nsp2 synthesis [J]. Microbiology Spectrum, 2024,12(3):e0347923.

[13]Zhang X X, Guo C H. Recent advances in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through targeting CD163[J].Frontiers in Microbiology,2022,13:1006464.

[14]Kaushik N, Subramani C, Anang S, et al. Zinc salts block hepatitis E virus replication by inhibiting the activity of viral RNA-dependent RNA polymerase [J]. Journal of Virology, 2017,91(21):e00754-e00717.

[15]Kubo A L, Rausalu K, Savest N, et al. Antibacterial and antiviral effects of Ag, Cu and Zn metals, respective nanoparticles and filter materials thereof against coronavirus SARS-CoV-2 and influenza A virus[J].Pharmaceutics,2022,14(12):2549.

[16]Suara R O, Jr Crowe J E. Effect of zinc salts on respiratory syncytial virus replication [J]. Antimicrobial Agents and

Chemotherapy，2004，48(3)：783-790.
[17]Liu S N，Cao X，Guo H R，et al. Zinc influx restricts enterovirus D68 replication[J].Frontiers in Microbiology，2021，12：748546.
[18]Pelucelli A，Peana M，Orzeł B，et al. Zn^{2+} and Cu^{2+} interaction with the recognition interface of ACE2 for SARS-CoV-2 spike protein [J]. International Journal of Molecular Sciences，2023，24(11)：9202.
[19]Schoggins J W，Wilson S J，Panis M，et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J].Nature，2011，472：481-485.
[20]Panchariya L，Khan W A，Kuila S，et al. $Zinc^{2+}$ ion inhibits SARS-CoV-2 main protease and viral replication in vitro[J]. Chemical Communications，2021，57(78)：10083-10086.
[21]Pormohammad A，Monych N K，Turner R J. Zinc and SARS-CoV-2：a molecular modeling study of Zn interactions with RNA-dependent RNA-polymerase and 3C-like proteinase enzymes[J].International Journal of Molecular Medicine，2021，47(1)：326-334.
[22]Holen J P，Urriola P E，Schwartz M，et al. Effects of supplementing late-gestation sow diets with zinc on preweaning mortality of pigs under commercial rearing conditions [J]. Translational Animal Science，2020，4(2)：519-530.
[23]Ding H X，Zhang Q，Xu H G，et al. Selection of copper and zinc dosages in pig diets based on the mutual benefit of animal growth and environmental protection [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety，2021，216：112177.
[24]Dabbagh-Bazarbachi H，Clergeaud G，Quesada I M，et al. Zinc ionophore activity of quercetin and epigallocatechin-gallate：from Hepa 1-6 cells to a liposome model[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry，2014，62(32)：8085-8093.
[25]Di Petrillo A，Orrù G，Fais A，et al. Quercetin and its derivates as antiviral potentials：a comprehensive review [J]. Phytotherapy Research：PTR，2022，36(1)：266-278.

Zinc sulfate inhibits PRRSV proliferation by interfering with different stages of PRRSV lifecycle

Yang Huizhen，Li Xiaojiao，Sun Jiazhen，Wu Zixuan，Fan Kuohai，Yin Wei，Sun Na，Zhang Zhenbiao，Li Hongquan*

(*Shanxi Key Laboratory for Modernization of TCVM/College of Veterinary Medicine，Shanxi Agricultural University，Jinzhong 030801，China*)

Abstract：[Objective]This study mainly aimed to investigate the role of $ZnSO_4$ in inhibiting the replication of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV)，clarify the enhancement of Zn's antiviral effect against PRRSV by Zn^{2+} carrier quercetin (QR)，and provide theoretical support for using $ZnSO_4$ combined with QR as a potential effective strategy for preventing and treating PRRSV infection. [Methods]The effects of $ZnSO_4$ and $ZnCl_2$ on PRRSV titers were detected using the cell culture infective dose 50% ($CCID_{50}$) method. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) and Western Blot (WB) were used to determine changes in PRRSV N gene and N protein expression in $ZnSO_4$-treated Marc-145 and PAMs cells. The expression of the PRRSV N gene was measured using qRT-PCR after pretreatment with $ZnSO_4$ for 24 hours at 4 ℃ and 37 ℃. Additionally，the changes in PRRSV N gene expression in the culture supernatant at different treatment time points following $ZnSO_4$ treatment were also measured using qRT-PCR. The expression changes of PRRSV N gene and N protein with $ZnSO_4$，QR alone，and in combination were detected using qRT-PCR and WB. [Results]$CCID_{50}$ results indicated that both $ZnSO_4$ and $ZnCl_2$ significantly reduced PRRSV titers. In Marc-145 and PAMs cells，different concentrations of $ZnSO_4$ significantly inhibit the expression of PRRSV N gene and N protein in a dose-dependent manner. After 24 hours of pretreatment with different concentrations of $ZnSO_4$，the expression of PRRSV N gene was significantly reduced following two hours of treatment at 4 ℃ and 37 ℃，also showing a dose-dependent relationship. Treatment with 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $ZnSO_4$ significantly inhibited the expression of PRRSV N gene at different time points. Results from the combined treatment of $ZnSO_4$ and QR indicated that the combination significantly inhibited the expression of the PRRSV N gene and N protein. [Conclusions]$ZnSO_4$ significantly inhibited PRRSV replication by preventing the virus's attachment and entry，inhibiting replication，and interfering with its release. Additionally，QR enhanced the antiviral effect of $ZnSO_4$ against PRRSV. This finding provided a theoretical basis for further elucidating the molecular mechanisms of $ZnSO_4$'s antiviral effects against PRRSV.

Keywords：Zinc sulfate，Porcine respiratory and reproductive syndrome virus，Antiviral，Quercetin

(编辑：郭玥微)