

A Brief Analysis of China's Recent Progress in Drug Prevention and Control of African Swine Fever

Heliang Xiao

Dongkou County Bureau of Animal Husbandry and Aquatics, Shaoyang Hunan
Email: 961248670@qq.com

Received: Sep. 9th, 2019; accepted: Oct. 1st, 2019; published: Oct. 8th, 2019

Abstract

China has carried out research on the basic theory of Africa swine fever virus and the development of drugs for the prevention and control of Africa swine fever. The study showed that the African swine fever virus is a double-stranded DNA structure, 24 genotypes, and more than 150 proteins encoded by the virus. The genome is protected by two capsids and two outer membranes. The capsid is mainly composed of viral coding proteins p72. The study of the DNA ligase (Asfv DNAL) structure and p72 protein folding structure of the African swine fever virus, the correct folding of the p72 protein, and the determination of its high-resolution structure help to develop drugs that target viral capsid assembly. In China the research on the basic theory of African swine fever virus is at an advanced level in the world, which has laid a solid foundation for the development and prevention of African swine fever drugs. We have targeted research on African swine fever virus DNA repair pathway proteins, inhibition and blocking of African swine fever virus replication, inhibition of type II topoisomerase drugs, or drugs that directly kill viruses and prevent drug effects. In this paper, marine organisms, viral DNA repair pathway protein drugs, Itraconazole, 25-hydroxycholesterol hydrochloric acid, Ennuoshaxing, acanthopanax, silver wolfberry powder and other drugs, the prevention and treatment of African swine fever virus are highly targeted for the prevention and treatment of African swine fever, and the mechanism of action is clear. It represents the direction of combining traditional Chinese medicine with modern veterinary pharmaceutical technology. It is expected that the drug control effect of preventing and controlling swine fever in Africa will reach more than 85%, and it will reach a high of 92%. Within one year, a drug product for the prevention and control of Africa swine fever will be formed, and it will play a huge role in preventing and controlling Africa swine fever.

Keywords

African Swine Fever, Drug Control, Marine Drug, Itraconazole, Silver Toad Powder, Viral DNA Repair Pathway Protein Drug, Targeting Virus Capsid Assembly Drug, Latest Progress

浅析中国防控非洲猪瘟药物最新进展

肖和良

湖南省洞口县畜牧水产局, 湖南 邵阳
Email: 961248670@qq.com

收稿日期: 2019年9月9日; 录用日期: 2019年10月1日; 发布日期: 2019年10月8日

摘要

中国开展了对非洲猪瘟病毒基础理论研究和防控非洲猪瘟药物研制。研究表明: 非洲猪瘟病毒, 为双链DNA结构、24个基因型、病毒编码150多种蛋白, 基因组由两层衣壳和两层外膜保护, 衣壳主要由病毒编码蛋白p72构成。研究出非洲猪瘟病毒的DNA连接酶(AsfvDNAL)结构和p72蛋白折叠结构, 正确折叠的p72蛋白以及确定其高分辨率结构有助于开发靶向病毒衣壳组装的药物。中国对非洲猪瘟病毒基础理论研究处于世界先进水平, 为研制防治非洲猪瘟药物打下了坚实基础。针对性研究非洲猪瘟病毒DNA修复通路蛋白, 抑制和阻断非洲猪瘟病毒复制, 抑制II型拓扑异构酶药物, 或直接杀灭病毒和预防药物作用的药物。本文介绍的海洋生物、病毒DNA修复通路蛋白药物、伊曲康唑、25-羟基胆固醇盐酸、恩诺沙星、刺五加、银蟾散等防治非洲猪瘟药物, 对非洲猪瘟病毒防治针对性强, 作用机理明确, 代表了中国传统中医药与现代兽药制药技术结合的方向。展望中国防控非洲猪瘟的药物防治效果达85%以上, 高的可达92%, 在1年内形成防控非洲猪瘟药物产品, 将发挥防治非洲猪瘟巨大作用。

关键词

非洲猪瘟, 防控药物, 海洋生物药物, 伊曲康唑, 银蟾散, 病毒DNA修复通路蛋白药物, 靶向病毒衣壳组装药物, 最新进展

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 研制防控非洲猪瘟药物成为公众关注的热点

非洲猪瘟是全球猪业头号杀手。研制防控非洲猪瘟病毒疫苗和药物成为防制非洲猪瘟重要的、有效的手段。

2019年5月24日传来喜讯, 由中国农科院哈尔滨兽医研究所自主研发的非洲猪瘟疫苗取得阶段性成果。中国在非洲猪瘟疫苗创制阶段主要取得五项进展: 1) 分离中国第一株非洲猪瘟病毒。建立了病毒细胞分离及培养系统和动物感染模型, 对其感染性、致病力和传播能力等生物学特性进行了较为系统的研究。2) 创制了非洲猪瘟候选疫苗, 实验室阶段研究证明其中两个候选疫苗株具有良好的生物安全性和免疫保护效果。3) 两种候选疫苗株体外和体内遗传稳定性强。分别将两种候选疫苗株在体外原代细胞中连续传代, 其生物学特性及基因组序列无明显改变, 猪体内连续传代, 也未发现明显毒力返强现象。4) 明确了最小保护接种剂量, 证明大剂量和重复剂量接种安全。5) 临床前中试产品工艺研究初步完成, 已建立两种候选疫苗的生产种子库, 初步完成了疫苗生产种子批纯净性及外源病毒检验, 初步优化了候选疫苗的细胞培养及冻干工艺[1]。

由于非洲猪瘟病毒是一种DNA病毒, 拥有双链DNA结构, 结构复杂、基因组庞大, 24个基因型; 病毒编码超过150多种蛋白。基因不稳定, 随时有突变的可能, 并有着躲避机体免疫系统监视与免疫反

应的多种能力。可以预测，研发的非洲猪瘟疫苗还处于实验室阶段，要成为安全有效的疫苗产品，还需至少 2 年或更长的时间。

而防控非洲猪瘟药物最新进展如何？研制成产品需要多长时间？成为大家关注研制疫苗热点之后另一热点，也是本文研究综述的内容。

2. 中国防控非洲猪瘟药物最新进展

2.1. 防控非洲猪瘟海洋生物药物研究

2018 年 6 月，海洋试点国家实验室的王卓亚等[2]，开展以非洲猪瘟病毒 DNA 聚合酶 X 为靶点的海洋药物计算机虚拟筛选项目，筛选出中国境内分布有 13 种潜在的具抑制非洲猪瘟效果的天然产物，其中大部分来源于海洋生物。如白穗软珊瑚(*Nephthea* sp.)，海蛞蝓(*Nembrotha* sp.)，芥菜(*Capsella bursa-pastoris*)、辣根(*Armoracia rusticana*)等天然产物，具有潜在的抑制非洲猪瘟病毒的活性分子，有望开发成生物饲料或者生物制品乃至兽药，用于控制非洲猪瘟疫情。

2.2. 针对非洲猪瘟病毒 DNA 修复通路蛋白的药物设计研究

2019 年 1 月 23 日，国际知名学术期刊《自然·通讯》(Nature Communications)在线发表了复旦大学甘建华“关于非洲猪瘟病毒(ASFV)来源的 DNA 连接酶(AsfvDNAL)的研究成果”[3]。该研究用 X-射线晶体学方法解析了 AsfvDNAL 与不同类型 DNA 复合物的结构，揭示了 AsfvDNAL 结合和催化底物连接的分子机制，为针对非洲猪瘟病毒 DNA 修复通路蛋白的药物设计提供了结构基础。该研究成功解析了 AsfvDNAL 与不同 DNA 底物的高分辨率结构(图 1)晶体结构显示，AsfvDNAL 的 N-端具有一个独特的 DNA 结合结构域(NTD)，该结构域对底物结合十分重要。虽然 AsfvDNAL 与常见的 DNA 连接酶在催化机制方面保守，AsfvDNAL 在底物催化位点附近具有一些明显不同的氨基酸组成。蛋白突变、体外 DNA 结合以及活性研究显示，催化位点附近的氨基酸对催化形式 AsfvDNAL-DNA 复合物的形成及活性至关重要。目前，该团队又与北京大学研究人员组合新团队，联合攻关，开展防控非洲猪瘟复合物的筛选工作。

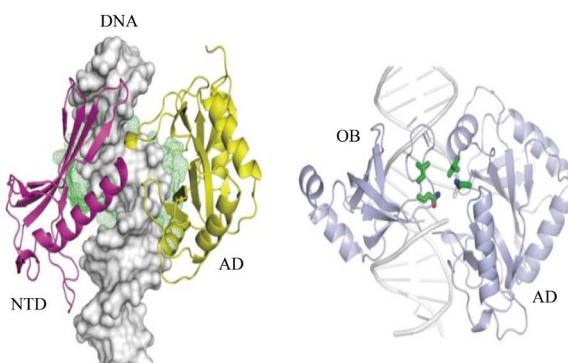


Figure 1. Crystal structure of AsfvDNAL and DNA substrates complex

图 1. AsfvDNAL 与 DNA 底物复合物的晶体结构

2.3. 清华大学取得非洲猪瘟病毒结构突破性进展

2019 年 9 月 17 日，清华大学向焯研究团队在国际顶级期刊《细胞研究》(Cell Research)在线发表题为“非洲猪瘟病毒衣壳蛋白 p72 的结构”(Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72)的学术论文[4]。该研究采用冷冻电镜单颗粒三维重构的方法首次解析了非洲猪瘟病毒衣壳蛋白 p72 的高

分辨率结构, 揭示了非洲猪瘟病毒衣壳可能的组装机理, 为非洲猪瘟病毒亚单位疫苗和防治非洲猪瘟药物的开发迈出了坚实的一步。

非洲猪瘟病毒是一种双链 DNA 病毒, 拥有复杂的结构, 其基因组由两层衣壳和两层外膜保护, 衣壳主要由病毒编码蛋白 p72 构成, 同时 p72 是被病毒感染猪血液中能检测到的主要抗原, 针对 p72 的抗体对家猪具有保护作用。研究组使用冷冻电镜单颗粒三维重构的方法确定了 p72 蛋白 2.67 Å 的高分辨率三维结构, 结果显示三个 p72 分子形成了稳定的三聚体形式。每个 p72 包含两个串联的卷筒蛋糕样结构域, 每个结构域由 8 个 β 折叠片组成, 这种结构域在大正二十面体病毒衣壳蛋白结构中很常见。三聚体 p72 的六个卷筒蛋糕样结构一起形成了一个伪六聚体的底部锚定在病毒的内膜上。三聚体 p72 折叠片之间的插入片段一起形成了一个类似于螺旋桨一样的顶部结构伸向病毒外部, 极有可能是细胞表面受体结合区域。

获取正确折叠的 p72 蛋白以及确定其高分辨率结构有助于开发靶向病毒衣壳组装的药物以及亚单位疫苗。

2.4. 抑制非洲猪瘟病毒复制化学生化药品研究

胡鹏飞, 周盼伊[5]译文“伊曲康唑和 25-羟基胆固醇显著降低了非洲猪瘟病毒复制”指出: 添加 25-HC 显著减少非瘟感染, 其效果在后期更加显著。用 ITZ 处理, 病毒蛋白 P30 和 P72 减少, 病毒滴度降低 1 log, 实时荧光定量 PCR 实验显示非瘟病毒基因组拷贝数减少。降低感染性和病毒复制, 显著降低了晚期 P72 蛋白的表达, 通过靶向氧甾醇结合蛋白(OSBP)和 OSBP 相关蛋白 4(ORP4)来抑制肠道病毒和丙型肝炎(HCV)的复制。ITZ 与 OSBP 直接结合, 定位于病毒复制细胞器, 破坏其脂质转运功能, 这就是 ITZ 抗病毒机理。为了验证 OSBP 是非瘟感染的相关靶点, 用 25-HC 预处理感染细胞, 25-HC 与 OSBP 结合, 具有很高的亲和力, 可作为 OSBP 胆固醇转移的抑制剂。所以 ITZ 和 25-HC 抗病毒活性, 是由于阻断了胆固醇通向病毒工厂的通路, 而非瘟严格依赖这些脂质供应进行复制。

周应培介绍了 2007 年来美国道勤 Dogain Biosciences, 以分子生物学手段对阻断非洲猪瘟感染的相关研究。研究表明, 要抑制非洲猪瘟病毒核酸复制一定要关注组蛋白乙酰转移酶, 其活跃可造成病毒大量复制。从细胞实验来看, 抑制组蛋白乙酰转移酶可实现足够的阻断复制效果, 结合使用阻断剂阻断拓扑异构酶活性, 可以更好地抑制病毒复制[6]。

非瘟病毒感染猪只后, 会侵入细胞(特别是巨噬细胞和单核细胞)细胞质中, 大量的复制, 增加个体。几个病毒感染在短时间内就可以复制成几万、几十万个, 并迅速地扩散到全身。发现非瘟病毒的复制依赖于一种 II 型拓扑异构酶, 它的作用就是帮助解开处于超螺旋状态的非瘟病毒 DNA 链, 解开后的 DNA 才能进行复制。这为研究非瘟治疗药物提供了思路, 可以将 II 型拓扑异构酶作为靶点研制药物。

研究人员发现, 非洲猪瘟病毒 II 型拓扑异构酶会受几种喹诺酮类药物(抗菌药中的一个大类)的抑制。在体外实验中, 氟喹诺酮(喹诺酮中的一种)能抑制非瘟病毒对细胞的感染, 对已经感染的细胞能抑制病毒 DNA 的复制, 但不能切断病毒 DNA。同时氟喹诺酮能扰乱病毒合成蛋白质, 这意味着病毒不能正常的组装成新的有毒害作用的病毒, 无法扩大感染范围。并且达到抗病毒浓度时, 氟喹诺酮不会毒害健康细胞。另一种喹诺酮——盐酸恩诺沙星也能阻碍非瘟病毒复制, 切断非瘟病毒 DNA 链[7]。

2.5. 中药以及中药组方产品的研制

案例一(刺五加应用):

湖南农业大学的刘自逸等[8], 研究抗非瘟药物产品康之源, 主要组成及含量: 刺五加、女贞子、越橘。其中紫丁香苷 $\geq 0.01\%$, 齐墩果酸 $\geq 0.05\%$ 。是对张娜, 袁学千等[9] [10], 对刺五加抗病毒作用机理研究成果的运用。对刺五加研究表明: 刺五加富含多种糖类及刺五加苷是理想的干扰素(IFN)促诱生剂,

可提高 5~7 倍机体 IFN 水平, 增强免疫力, 通过双向免疫调节, 将猪群的免疫力和免疫应答调节到一个合适水平, 解除免疫抑制, 避免低免疫亢奋(超敏反应)的发生, 明显对抗环磷酰胺所致免疫抑制作用。抗非瘟产品康之源使用方案: 感染场的病死猪无害化处理, 其余猪饲料每吨添加 4 kg, 猪场稳定后每吨添加 2 kg, 用 1 周停 1 周交替使用。

案例二(银蟾散应用):

银蟾散是江西尚博制药按照中药组方原则, 用银环蛇毒、蟾酥、斑蝥素、黄芪、淫羊藿、绞股蓝、人参叶、党参等 12 种名贵中药材组方。其中银环蛇毒、蟾酥、斑蝥素主导防控病毒、细菌多种病原; 绞股蓝、党参、人参叶等药材具有补中益气、提升免疫力、消除亚健康的作用。银环蛇毒含抗菌杀毒的物质如裂解因子、细胞毒素等, 现代研究表明 L-氨基酸氧化酶(LAAO)为其主要的抗菌杀毒武器。该酶是黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN)结合的糖蛋白同源二聚体分子, 通过催化氧化 L-氨基酸产生 H₂O₂, 诱导细菌膜破裂, 致使细胞质流出, 从而杀灭细菌。蛇毒同样具有广谱杀毒作用, 其中的磷脂酶 A₂ 能与病毒粒子结合, 分解病毒囊膜脂质双分子并杀灭病部分阻断非瘟病毒感染和复制的研究在细胞层面有效[11]。与抗体杀毒有异曲同工之妙, 而且蛇毒为广谱杀毒, 对感染的病毒均有杀灭作用。银蟾系列产品使用方案: 肌注银蟾(针), 肥猪每头注射 5 ml, 母猪每头注射 10 ml, 只注射一次, 可有效切断病毒的复制和传播; 同时每吨饲料添加银蟾散 6~8 kg, 首次使用连用 20 天, 以后每月连用 7~10 天。

案例三(双黄连应用):

双黄连是由金银花、连翘和黄芩提取的混合液, 具有辛凉解表, 清热解毒的功效, 已有研究表明双黄连体外抗内毒素效果较好。双黄连在体外对中性粒细胞 cAMP-PDE (PDE 为磷酸二酯酶)活性具有显著的抑制作用, 从而使细胞内 cAMP 含量升高, 抑制中性粒细胞活化, 发挥抗炎作用[12][13]。中草药复方如黄连解毒汤可破坏、降解内毒素。双黄连具有广谱抗菌、抗病毒感染作用及增强机体免疫力等作用, 成为中草药复方抗非瘟药物的代表之一。

案例四(笔者设计三黄抗菌保肝健脾方):

笔者设计中药组方: 黄连 30 g, 黄柏 30 g, 黄芩 30 g, 大青叶 30 g, 刺五加 20 g, 千里光 20 g, 金银花 30 g, 连翘 20 g, 党参 30 g, 黄芪 20 g, 茵陈 30 g, 青蒿 20 g, 山药 20 g, 茯苓 20 g, 上述为 70 kg 生猪用量。煎药口服, 1d1 剂, 到猪场稳定为止。复养期用 1 周停 1 周交替使用。本组方优选三黄等 8 味抗病毒中药, 党参、黄芪提高免疫细胞免疫力的补药, 茵陈、青蒿护肝良药, 山药、茯苓健脾良药 6 味中药为辅药, 形成抗菌保肝健脾方, 是针对非洲猪瘟破坏免疫细胞功能, 损坏肝脾, 造成内脏器官出血病症而设计的中药组方。正在洞口县 7 个养猪户进行试验。

3. 对中国防控非洲猪瘟药物前景展望

综上所述, 中国的科研院校和兽药企业, 开展了对非洲猪瘟病毒基础理论和防控非洲猪瘟药物研究。研究表明: 非洲猪瘟病毒, 为双链 DNA 结构、24 个基因型、病毒编码 150 多种蛋白, 基因组由两层衣壳和两层外膜保护, 衣壳主要由病毒编码蛋白 p72 构成, 非洲猪瘟病毒(ASFV)来源的 DNA 连接酶(AsfvDNAL), 研究出 DNA 连接酶(AsfvDNAL)结构和 p72 蛋白折叠结构, 正确折叠的 p72 蛋白以及确定其高分辨率结构有助于开发靶向病毒衣壳组装的药物以及亚单位疫苗。这些非洲猪瘟病毒基础理论研究, 为防治非洲猪瘟药物作用机理和药物研制打下了坚实基础。如病毒蛋白 P30、P72 和蛋白乙酰转移酶复制尤为活跃, 非瘟病毒的复制依赖于一种 II 型拓扑异构酶, 它的作用就是帮助解开处于超螺旋状态的非瘟病毒 DNA 链, 解开后的 DNA 才能进行复制, 针对性地研究非洲猪瘟病毒 DNA 修复通路蛋白, 抑制和阻断非洲猪瘟病毒复制, 抑制 II 型拓扑异构酶的药物, 这些药物代表有海洋生物药物、病毒 DNA 修复通路蛋白药物、伊曲康唑、25-羟基胆固醇盐酸、恩诺沙星等。另外就是对非瘟病毒直接杀灭作用和预防

作用的药物,如银蟾散、刺五加、双黄连、三黄抗菌保肝健脾方药物等药物代表。

药物按来源分为天然药物、合成药物、生物技术药物三大类,其中天然药物又为植物性药物(Plants)、动物性药物(Animals)、矿物性药物(Minerals)、抗生素(Antibiotics)四类。中国是植物性药物研究最古老、最传统的国家,形成了中华民族瑰宝——中医药库,如《神农本草经》和《本草纲目》。清代的李时珍《本草纲目》52卷,190万字,收集中草药1892种,插图1160幅,药方11,096个。中国近代前发生人畜瘟疫,就是用中草药药汤药剂灭瘟的。现代兽药制药技术成功地运用了兽医药理学、动物生理学、兽医病理学、免疫学、细胞学、微生物学、自动化机械、电子学等学科理论。

中国对非洲猪瘟病毒基础理论研究处于世界先进水平,其研究成果都发表在国际顶级期刊上,为研制防治非洲猪瘟药物打下了坚实基础。虽然目前中国的防控非洲猪瘟药物,还处于实验室和实验动物阶段,没有进入临床试验,未形成药物产品,但这些防控非洲猪瘟药物研究代表了中国传统中医药和现代兽药制药技术结合的方向,对非洲猪瘟病毒针对性强,作用机理明确。可以展望中国防控非洲猪瘟的药物防治效果达85%以上,高的可达92%,加上国家对防控非洲猪瘟的药物审批为绿色通道,只要谁率先研究出防治非洲猪瘟效果达85%以上的药物,谁都能最先得到快速审批和获得药品生产许可证,形成防控非洲猪瘟药物产品,并发挥防治非洲猪瘟巨大作用。

防控非洲猪瘟有效药物研究渠道较多,防控非洲猪瘟有效药物研制相比防控非洲猪瘟疫苗研制,难度要少得多,预期科学家在1年内研制出防控非洲猪瘟有效药物,防控非洲猪瘟药物成果比疫苗来得更早。

参考文献

- [1] 肖和良. 浅析中国非洲猪瘟疫苗研制最新进展[J]. 今日养猪业, 2019(4): 66-69.
- [2] 王卓亚, 李阳阳, 徐锡明, 等. 开展以非洲猪瘟病毒 DNA 聚合酶 X 为靶点的海洋药物计算机虚拟筛选[J]. 中国海洋药物, 2018(6): 1-7.
- [3] 非洲猪瘟病毒研究获进展, 为药物设计提供结构基础[EB/OL]. <http://www.feedtrade.com.cn/livestock/pigs/2019-02-28/2254056.html>, 2019-02-28.
- [4] 清华团队在非洲猪瘟病毒项目中取得突破性进展[EB/OL]. http://www.sohu.com/a/342465364_452927, 2019-09-21.
- [5] 研究进展: 伊曲康唑和 25-羟基胆固醇显著降低了非洲猪瘟病毒复制[EB/OL]. http://www.sohu.com/a/304047825_299363, 2019-03-27.
- [6] 道勤周应培: 不能神话和依赖 α -单月桂酸甘油酯, 对已感染猪只毫无作用[EB/OL]. <http://dy.163.com/v2/article/detail/EDABMDNQ0514E1NL.html>, 2019-04-21.
- [7] 你必须知道 | 这些疫苗和药物或能有效控制非洲猪瘟![EB/OL]. http://www.sohu.com/a/291070614_769261, 2019-01-23.
- [8] 迂斌, 饶文敏, 朱中平, 刘自逵, 张世新, 黄建平, 谭辉, 刘辉旺. 生物安全措施结合中药防控非洲猪瘟经验分享[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2019(6): 65-70.
- [9] 张娜, 杨晓丹, 刘树民. 刺五加多糖对 2、4 一二硝基氟苯(DNFB)诱发的超敏反应作用及初步机制研究[J]. 中医药信息, 2015(3): 26-28.
- [10] 袁学千, 王淑梅, 高权国. 刺五加多糖增强小鼠免疫功能的实验研究[J]. 中医药学报, 2004(4): 48-49.
- [11] 蛇毒也能提高免疫力?尚博罗军荣: 以毒攻毒防未病, 帮助猪群抵御病毒入侵[EB/OL]. https://mp.weixin.qq.com/s?_biz=MzUyMDk4MjM5Ng%3D%3D&idx=2&mid=2247501894&sn=48f19f3ce7f608d1156a35ba936c5689, 2019-04-30.
- [12] 王莉莉. 双黄连对小鼠白细胞及其分类的影响[J]. 中国畜牧业, 2019(4): 52-54.
- [13] 道列提汗. 双黄连制剂在兽医临床上的应用[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014(5): 143.