



基于 *Nrf2/HO-1* 启动子筛选抗水生病毒药物的方法

王靖雯¹, 吴苗苗¹, 李莉娟^{1,2}, 顾泽茂^{1,2}, 袁军法^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学, 水生动物疫病专业实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为建立基于 *Nrf2*、*HO-1* 启动子活性的抗病毒药物筛选方法, 实验以胖头鲮上皮细胞系 (FHM) 为材料, 构建 *Nrf2*、*HO-1* 启动子重组质粒, 利用双荧光素酶报告系统检测不同浓度 (0、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 的白藜芦醇、水飞蓟宾、穿心莲内酯及姜黄素对启动子活性的影响, 并利用鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 和蛙虹彩病毒 (rana grylio iridovirus, RGV) 验证阳性药物的抗病毒效果。结果显示, *Nrf2*、*HO-1* 启动子序列中存在 FOX 家族、IRF 家族等多种转录因子的结合位点, 并分别存在 1 个和 3 个与甲基化相关的 CpG 岛。双荧光素酶报告实验显示, 水飞蓟宾、穿心莲内酯及姜黄素可激活 *Nrf2*、*HO-1* 启动子。药物浓度梯度实验显示, 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素和穿心莲内酯可显著上调 *Nrf2* 和 *HO-1* 的启动子活性。病毒感染后的细胞病变效应、病毒的复制及病毒滴度结果均表明姜黄素和穿心莲内酯可抑制 SVCV 和 RGV 的感染。综上, 本实验建立的 pGL3-*Nrf2* 和 pGL3-*HO-1* 启动子报告质粒, 可用于抗水生病毒药物的筛选, 也为 *Nrf2*、*HO-1* 转录调控机制的研究提供了工具。

关键词: 水生病毒; 胖头鲮上皮细胞 (FHM); *Nrf2*; *HO-1*; 启动子; 抗病毒药物筛选

中图分类号: S 942

文献标志码: A

水生动物病毒病种类多、流行广、传播快、死亡率高, 是限制水产养殖业绿色发展的重要因素^[1-2]。因抗病毒药物缺失、疫苗种类有限, 水生动物病毒病的防控始终是水产养殖中的难点, 筛选绿色、广谱的抗病毒药物, 建立高效防控技术体系是水生动物病毒研究的核心目标^[3-4]。氧化应激是鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV)、草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 等多种病毒感染的主要病理机制之一^[5-6]。抗氧化通路作为一种内源性的防御机制, 除维持机体氧化-还原平衡稳态外, 还可拮抗丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 和 SVCV 等多种病毒, 而萝卜硫素、雷公藤红素等作为药食同源的抗氧化

化剂, 也被证实具有较好的抗病毒作用^[7-8]。因此, 靶向抗氧化通路, 筛选具有抗病毒作用的抗氧化剂, 可为开发绿色、广谱的抗水生病毒药物提供新思路^[9]。

核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是细胞中氧化应激的主要传感器, 可启动下游包括血红素加氧酶 1 (HO-1) 在内的抗氧化及解毒基因的转录与翻译^[10]。HO-1 是将血红素分解为胆绿素、 Fe^{2+} 和 CO 的关键酶, 在维持机体氧化还原平衡方面起关键作用^[11-12]。此外 *Nrf2*/*HO-1* 信号通路还广泛参与到机体的生长、分化、代谢、免疫等多种生命过程中, 通过其下游醌氧化还原酶 1 (NQO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶

收稿日期: 2022-03-18 修回日期: 2022-06-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31872598)

第一作者: 王靖雯 (照片), 从事水生动物病毒学方面研究, E-mail: 953913796@qq.com

通信作者: 袁军法, 从事水生动物医学方面研究, E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn



(SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化/二相解毒酶维持机体的稳态^[13-14]。Nrf2/HO-1 信号通路是机体最重要的抗氧化防御系统, 姜黄素、萝卜硫素、雷公藤红素等药物可通过激活 Nrf2 介导的 HO-1 表达来缓解病毒感染引起的氧化应激并抑制病毒复制^[7-8,15-16]。靶向 Nrf2/HO-1 信号通路的抗病毒药物, 通过激活抗氧化和抗炎症等内源性防御通路发挥作用, 具有广谱性。这些药物不直接作用于病毒本身, 减少了耐药性的产生, 为开发绿色高效的抗病毒药物提供了靶标。

胖头鲮上皮细胞 (FHM) 对 SVCV、RGV、大口黑鲈弹状病毒 (*Micropterus salmoides* rhabdovirus, MSRV)、传染性胰脏坏死病毒 (infectious ancreatic necrosis virus, IPNV) 等多种水生动物病毒敏感, 是病毒诊断、致病机制与病毒复制规律研究的重要材料^[17-19]。本实验利用胖头鲮 (*Pimephales promelas*) 基因组数据, 分析并构建了 Nrf2、HO-1 启动子报告质粒, 建立靶向其启动子活性的药物筛选方法, 为抗水生动物病毒的药物筛选提供了基础工具和新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用 FHM 细胞系、SVCV、RGV 均为本实验室保存。

1.2 药物与主要试剂

DNA 提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 2X M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix (with blue dye)、胶回收试剂盒购自北京聚合美生物科技股份有限公司; DNA Marker、DH5 α 菌株购自北京擎科新业生物技术有限公司; 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自武汉爱博泰克生物科技股份有限公司; 低内毒素真核质粒提取试剂盒购自 Magen 公司; 胎牛血清、M199 培养基、0.25%EDTA 胰酶以及 OPTI-MEM 培养液购自 Gibco; FishTrans 转染试剂购自武汉美森特生物科技股份有限公司; 姜黄素 [95%(HPLC), S19245]、白藜芦醇 (BR, 98%, S30630)、穿心莲内酯 (98%, S24818)、水飞蓟宾 [98%(HPLC), Y53945] 购自上海源叶生物科技股份有限公司; CCK-8 试剂盒购自 Biosharp 公司; pGL3- Basic、pRL-TK1、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司; pTOPO001 Simple Cloning Kit 载体试

剂盒购自北京金沙生物科技有限公司; TRIzol、反转录及定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 引物合成与测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.3 FHM Nrf2、HO-1 基因启动子的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库 [National Center for Biotechnology Information (nih.gov)] 获取 FHM Nrf2 (Gene ID: 120459756、NCBI Reference Sequence: XM_039647189.1) 和 HO-1 (Gene ID: 120467971、NCBI Reference Sequence: XM_039656609.1) 的基因组 DNA 序列及 mRNA 序列, 利用 AnimalTFDB3.0 [AnimalTFDB3 (hust.edu.cn)]、JASPAR (JASPAR - A database of transcription factor binding profiles (genereg.net)) 在线软件对转录因子结合位点进行预测。利用 MethPrimer 软件 [MethPrimer | Tools and Databases | The Li Lab (urogene.org)] 预测 CpG 岛。

1.4 质粒载体的构建

根据胖头鲮基因组序列设计扩增引物 (表 1), 上下游引物的酶切位点以下划线表示。提取 FHM 细胞的 DNA, 进行 PCR 扩增。PCR 体系共 20 μ L: 2X M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix (with blue dye) 10 μ L, DNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 25 s, 根据引物 T_m 值设置退火温度, 退火 25 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 (10~15 s / kb), 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测有明亮单一条带后切胶回收。将纯化后的扩增产物与 pGL3-basic 载体进行双酶切处理。回收纯化后的启动子片段和载体按物质的量 3 : 1 混合, T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄西林 (Amp) 抗性的平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h。对单菌落进行菌液 PCR 检测, 将阳性菌送测序, 验证序列是否正确。

1.5 细胞培养及瞬时转染

FHM 细胞用含有 10% FBS 的 M199 培养基培养, 培养温度为 28 $^{\circ}$ C, 待细胞平铺长满孔板的 80%~90% 进行转染。转染试剂、质粒的配比及操作步骤按 FishTrans 转染试剂使用说明进行。

1.6 启动子活性分析

为评价药物的细胞毒性, 使用含不同浓度药物的培养基 (0、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0、100.0、

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物名称 primers name	序列(5'-3') sequences (5'-3')	引物长度/bp primer length	用途 purpose
<i>Nrf2</i> -F1	CGGGGTACCTGACGGAAGAAGA	22	启动子片段扩增
<i>Nrf2</i> -R1	CCGCTCGAGAAACAGGCGACTAT	23	启动子片段扩增
<i>HO-1</i> -F1	CTTTCATCGGTACCTTCAGCCG	22	启动子片段扩增
<i>HO-1</i> -R1	TACCTGTCTGTGATTGCTGTCTGTGTTTCTCAATC GTCTCCATGAAGTCCAGGTTTACTCA	62	启动子片段扩增
<i>HO-1</i> -F2	CCCCTCGAGCTTTCATCGGTACCTTC	26	启动子片段扩增
<i>HO-1</i> -R2	CCCAGCTTTACCTGTCTGTGATTGCT	27	启动子片段扩增
RGV-MCP-F1	CACCTCCATCCCAGTCAGC	19	MCP片段扩增
RGV-MCP-R1	TCCCATCGAGCCGTTC	17	MCP片段扩增
qRGV-MCP-F1	CATCCCAGTCAGCACCG	17	实时荧光定量PCR (qPCR)
qRGV-MCP-R1	CCCAGAGTTGTTACCTCCAC	20	qPCR
qSVCV-G-F1	TGCTGTGTTGCTTGCACTTATYT	23	qPCR
qSVCV-G-R1	TCAAACKAARGACCGCATTTTCG	22	qPCR
β -actin-F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCGA	22	qPCR
β -actin-R	CCGTCAGGCAGCTCATAGCT	20	qPCR

200.0 $\mu\text{g/mL}$) 对 FHM 进行药物处理, 同时设置阴性对照 (negative control, NC) 和二甲基亚砷 (DMSO) 组, 每个浓度设置 6 个重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂在培养箱内继续孵育 2.5 h, 酶标仪于 450 nm 处测量吸光值, 计算细胞活力。

转染重组启动子质粒及 pRL-TK 质粒 24 h 后, 将白藜芦醇、水飞蓟宾、穿心莲内酯和姜黄素 4 种药物以 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度同细胞孵育, 28 $^{\circ}\text{C}$ 作用 24 h 后, 按双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作说明进行荧光素酶活性检测。再次转染重组启动子质粒及 pRL-TK 质粒, 24 h 后将上述初步筛选有效的药物——水飞蓟宾、穿心莲内酯、姜黄素, 进行梯度稀释, 选取基于药物细胞毒性实验确定的 6 个药物浓度 (0、3.1、6.3、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 对细胞进行处理, 28 $^{\circ}\text{C}$ 作用 24 h 后, 检测药物浓度梯度对启动子活性的影响。

1.7 抗病毒实验

以 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素和穿心莲内酯分别预处理细胞 6 h, 再分别以 0.1 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的 SVCV 和 RGV 进行感染, 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后更换为含相应药物浓度的培养基继续培养。收取细胞上清液及细胞样, 测定病毒滴度及病毒复制水平, 验证基于启动子活性的药物筛选策略。将收集的细胞培养上清连续 10 倍稀释 ($10^{-1}\sim 10^{-10}$), 每个梯度 6 个重复, 加入细胞培养板, 每孔 100 μL , 同时用稀释液做阴性对照,

培养 7 d 后观察并记录全部孔的细胞病变, 再根据 Reed-Muench 两氏法计算出病毒滴度。

以 RGV9506 (GenBank: JQ654586.1) 的 MCP 序列 (ORF97R) 设计引物, 建立 RGV 的绝对定量方法, 评价药物对 RGV 感染的影响。提取细胞样 DNA, 以 RGV 感染组 DNA 样品为模板进行 PCR 扩增, 回收后按 pTOPO001 Simple Cloning Kit 载体试剂盒说明进行连接、转化及阳性克隆的鉴定。提取标准重组质粒并测量浓度, 然后依据公式计算每微升样品中质粒拷贝数: 每微升质粒拷贝数 (拷贝 / μL) = 质粒总质量 (μg / μL) / 质粒分子量; 质粒分子量 = $2 \times 330 \times \text{nt}$ (其中 nt 为质粒的碱基数)。标准重组质粒进行 10 倍的梯度稀释后定量检测, 得到标准曲线。提取细胞样的 DNA, 进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 实验对 RGV 进行定量, RGV 定量引物如表 1 所示。定量检测 SVCV-G 的转录水平, 评价药物对 SVCV 复制的影响。提取细胞样的总 RNA 并反转录为 cDNA 后进行 qPCR, 对 SVCV G 蛋白的 mRNA 水平进行定量检测, SVCV-G 定量引物如表 1 所示。

1.8 统计分析

所有实验数据均采用双样本等方差 t 检验进行处理, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 或 ***, $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 *Nrf2*、*HO-1* 基因启动子的生物信息学分析

通过 NCBI 数据库获取 *Nrf2* 和 *HO-1* 的 DNA

序列, 分别选取编码区 (CDS 区) 起始密码子 ATG 前后 2 482 和 2 104 bp 作为 *Nrf2* 和 *HO-1* 基因启动子候选区, 利用 Animal TFDB3.0、JASPAR 等软件分别对 *Nrf2* 和 *HO-1* 启动子区的转录因子结合位点进行预测, 结果显示, *Nrf2* 和 *HO-1* 启动子区存分别存在 FOXO、ATF、IRF、AP-1、FOS 和 Nrf2、Bach1、SP-1、STAT 等多种潜在转录因子结合位点 (图 1)。利用 MethPrimer 预测到

Nrf2 启动子中存在一个 CpG 岛, 位于 2 125~2 243 bp, 而 *HO-1* 启动子中存在 3 个 CpG 岛, 分别位于 53~156 bp、704~852 bp、1 156~1 276 bp (图 2)。

2.2 *Nrf2* 和 *HO-1* 基因启动子片段的扩增和报告载体的构建

构建 FHM *Nrf2*、*HO-1* 启动子报告质粒 (图 3-a)。PCR 扩增 *Nrf2* 和 *HO-1* 基因启动子片段, 回

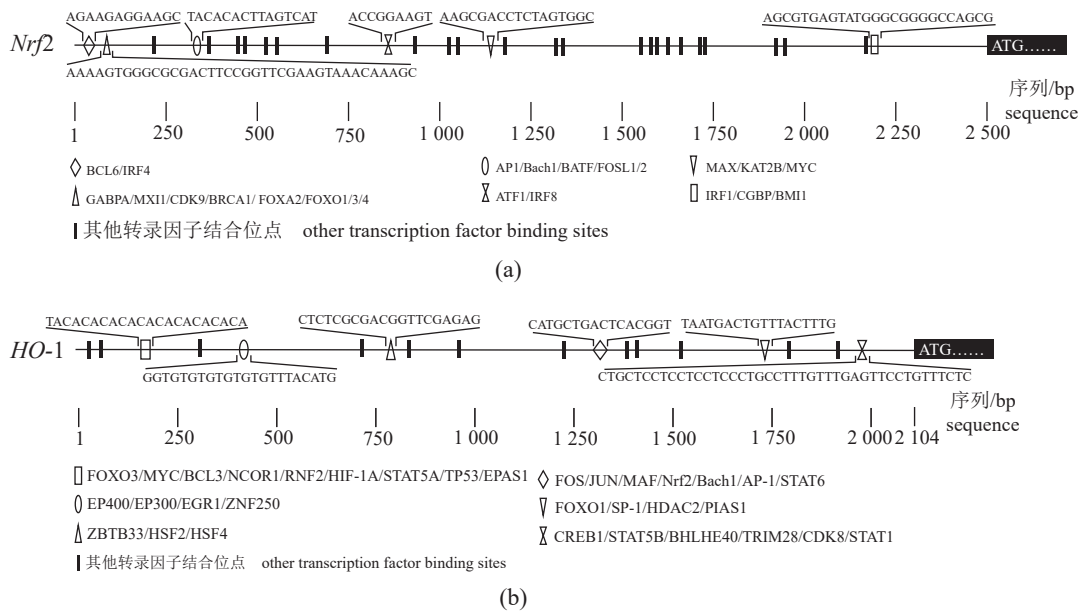


图 1 FHM *Nrf2*(a) 和 *HO-1*(b) 基因启动子区转录因子结合位点预测

Fig. 1 Predicted transcription factor binding sites in the promoter region of FHM *Nrf2* (a) and *HO-1* (b) genes

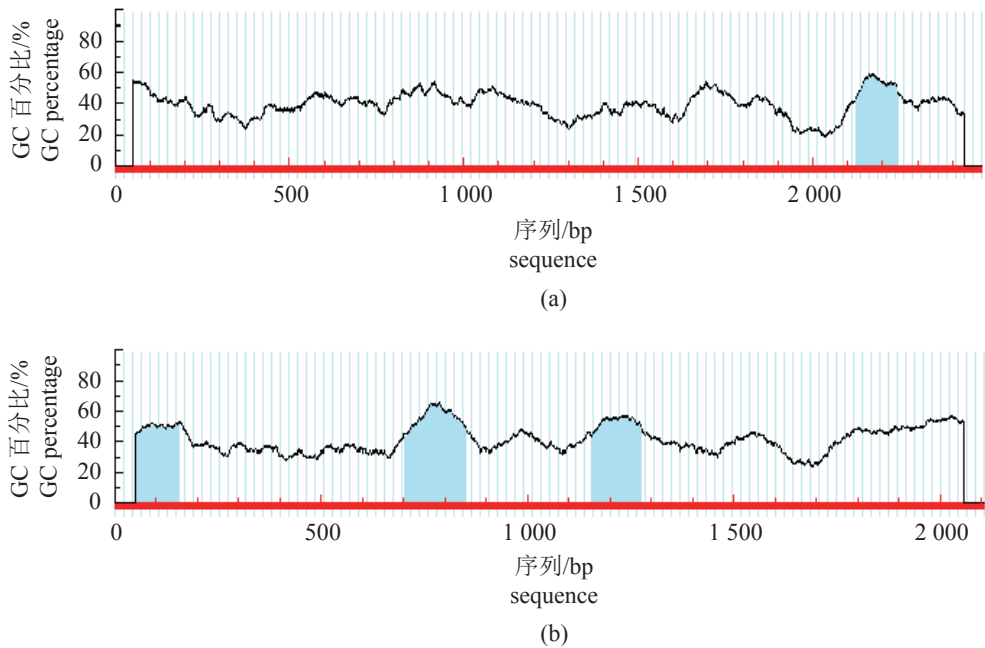


图 2 FHM *Nrf2*(a) 和 *HO-1*(b) 基因启动子序列 CpG 岛预测结果

Fig. 2 Predicted results of CpG islands of promoter sequences of FHM *Nrf2* (a) and *HO-1* (b) genes

收后分别使用 *Kpn* I、*Xho* I 和 *Xho* I、*Hind* III 限制性内切酶对扩增片段及 pGL3-Basic 进行双酶切, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果 (图 3-b)。结果显示, 在 2 000 bp 附近及 2 000~3 000 bp 存在单

一明亮的特异性条带, 与预期的大小一致, 经连接、转化、阳性单克隆菌液 PCR 及测序后确认获得 pGL3-Nrf2 和 pGL3-HO-1 重组双荧光素酶质粒。

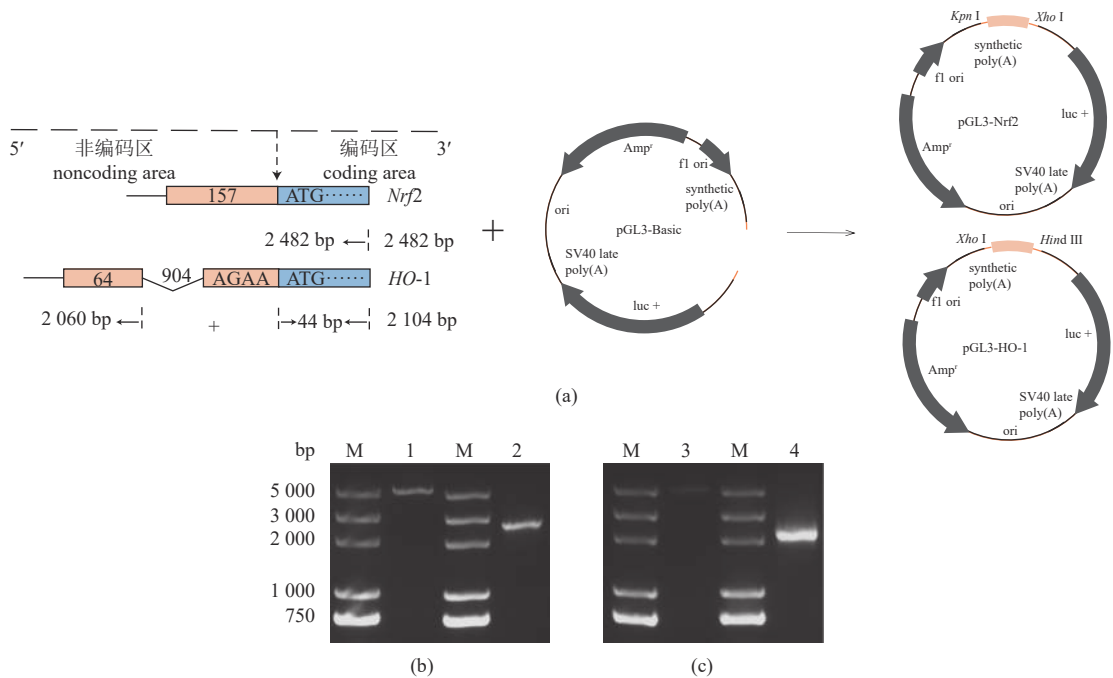


图 3 FHM *Nrf2*、*HO-1* 启动子报告质粒的构建

(a) *Nrf2*、*HO-1* 启动子报告质粒构建流程图, (b) *Nrf2* 基因启动子片段及 pGL3-Basic 质粒的双酶切, (c) *HO-1* 基因启动子片段及 pGL3-Basic 质粒的双酶切; 1. pGL3-Basic 质粒双酶切产物, 2. *Nrf2* 基因启动子片段双酶切产物, 3. pGL3-Basic 质粒双酶切产物, 4. *HO-1* 基因启动子片段双酶切产物, M. 分子质量标准 DL5000。

Fig. 3 Construction of FHM *Nrf2* and *HO-1* promoter reporter plasmids

(a) flow chart for the construction of FHM *Nrf2*, *HO-1* promoter reporter plasmid, (b) double digestion of *Nrf2* gene promoter fragment and pGL3-Basic plasmid, (c) double digestion of *HO-1* gene promoter fragment and pGL3-Basic plasmid; 1. pGL3-Basic plasmid double digestion product, 2. *Nrf2* gene promoter fragment double digestion product, 3. pGL3-Basic plasmid double digestion product, 4. *HO-1* gene promoter fragment double digestion product, M. molecular quality standard DL5000.

2.3 基于启动子活性的药物筛选

选取白藜芦醇、水飞蓟宾、穿心莲内酯和姜黄素 4 种中草药有效成分来探究药物对 *Nrf2* 和 *HO-1* 启动子活性的影响, 验证启动子的活性。细胞毒性实验显示, 4 种药物的浓度在 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 以下时对细胞无明显毒性 (图 4), 当浓度升至 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 除姜黄素外, 其他 3 种药物的细胞存活率均大于 70%。

以 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度进行初步筛选实验。结果显示, 水飞蓟宾和姜黄素可显著上调 *Nrf2* 的启动子活性, 而穿心莲内酯和姜黄素则可显著上调 *HO-1* 的启动子活性 (图 5)。选取以上 3 种有效药物, 对不同浓度药物刺激下的启动子活性进行检测, 结果显示, 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 的水飞蓟宾可有效上

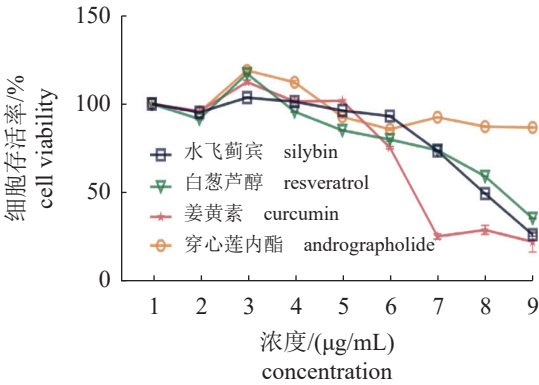


图 4 药物的细胞毒性检测

Fig. 4 Cytotoxicity assay of drugs

1. NC, 2. DMSO, 3. 3.1 $\mu\text{g/mL}$, 4. 6.3 $\mu\text{g/mL}$, 5. 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 6. 25.0 $\mu\text{g/mL}$, 7. 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 8. 100.0 $\mu\text{g/mL}$, 9. 200.0 $\mu\text{g/mL}$.

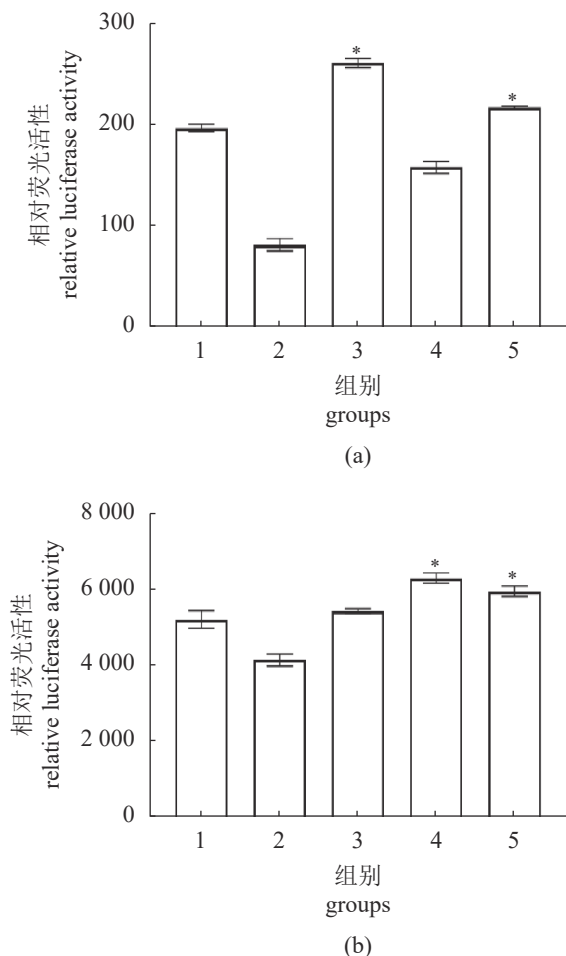


图5 四种药物对 *Nrf2* (a)、*HO-1* (b) 启动子活性的影响

1. 对照, 2. 白藜芦醇, 3. 水飞蓟宾, 4. 穿心莲内酯, 5. 姜黄素; *表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。

Fig. 5 Effects of four drugs on *Nrf2* (a) and *HO-1* (b) promoter activity

1. control, 2. resveratrol, 3. silybin, 4. andrographolide, 5. curcumin; * means the difference is significant ($P<0.05$); the same below.

调 *Nrf2* 和 *HO-1* 的启动子活性; 穿心莲内酯各浓度均未能显著激活 *Nrf2* 的启动子, 相反, 3.1~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的穿心莲内酯均可显著激活 *HO-1* 启动子, 其中 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 的效果最为显著; 姜黄素中除因药物毒性导致细胞大量死亡的 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 其他浓度均可显著上调 *Nrf2* 的启动子活性, 但只有 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素浓度可显著上调 *HO-1* 的启动子活性 (图 6)。

2.4 抗病毒活性

为验证姜黄素和穿心莲内酯激活 *Nrf2* 和 *HO-1* 的启动子是否与抗病毒活性关联, 分别以姜黄素和穿心莲内酯对 FHM 细胞进行孵育, 再分别以 RGV 和 SVCV 感染 FHM, 以含相应浓度药物

的维持培养基继续培养。结果显示, SVCV 和 RGV 感染可诱导细胞产生明显的 CPE, 姜黄素和穿心莲内酯的处理可显著缓解病毒感染引起的细胞病变 (图版)。

构建的 RGV 荧光定量标准曲线 ($y=-3.413x+40.60$) 具有较好的线性关系 (图 7)。姜黄素处理组和穿心莲内酯处理组可分别减少约 40% 和 60% 的 RGV 拷贝量; 姜黄素处理组和穿心莲内酯处理组较对照组分别下调约 20% 和 60% 的 SVCV-G 水平。滴度结果也证实, 药物处理可减少培养基上清中的病毒粒子含量, 其中穿心莲内酯的效果更为显著, RGV 和 SVCV 的病毒滴度分别下降了 25% 和 23% (图 8)。

3 讨论

启动子是基因的开关, 位于结构基因 5' 端的上游, 与转录因子一起, 从起始时间和表达程度上对基因的转录进行调控^[20]。本实验对 *Nrf2*、*HO-1* 启动子区的转录因子结合位点及 CpG 岛进行了预测。*Nrf2* 启动子序列中预测到的潜在转录因子结合位点较为分散, 其中存在与细胞增殖、凋亡、分化和炎症相关的 ATF 家族, 涉及细胞生长发育及代谢周期调控的 FOX 家族, 以及 IRF 家族的结合位点。*HO-1* 启动子序列中的潜在转录因子结合位点较为集中, 其中 FOS、JUN、MAF、BACH1、AP-1、*Nrf2* 等 *HO-1* 转录调控中常见的转录因子集中在 1 240~1 260 bp。在人 (*Homo sapiens*) 的 *HO-1* 启动子序列中同样预测到 IRF-1、AP-1 和 STAT 的结合位点^[21]。CpG 岛主要分布在启动子区, CpG 岛的甲基化可影响转录因子的结合, 对基因的表达产生负调控作用^[22]。牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 的 *Nrf2* 启动子中存在 2 个 CpG 岛, 且急性缺氧可显著降低 CpG 岛的甲基化, 促进 *Nrf2* 的表达。与牙鲈不同, 胖头鲮的 *Nrf2* 启动子中预测到 1 个 CpG 岛^[10]。人类的 *HO-1* 启动子区中存在一个长 307 bp 的 CpG 岛, 而胖头鲮的 *HO-1* 启动子中预测到 3 个预测的 CpG 岛^[21]。此外研究表明, *Nrf2* 启动子区域 rs13005431 位点的多态性变化会改变 *Nrf2* 的转录活性, 影响对结核病的易感性; 哺乳动物的 *HO-1* 启动子的多态性也被证明与肺部和心脑血管等疾病密切相关^[23-24]。但水生动物鲜有启动子多态性与疾病联系的相关研究, 相关研究的展开将对抗病育种具有积极意义。

近年来, 关于 *Nrf2*/*HO-1* 信号通路参与病毒

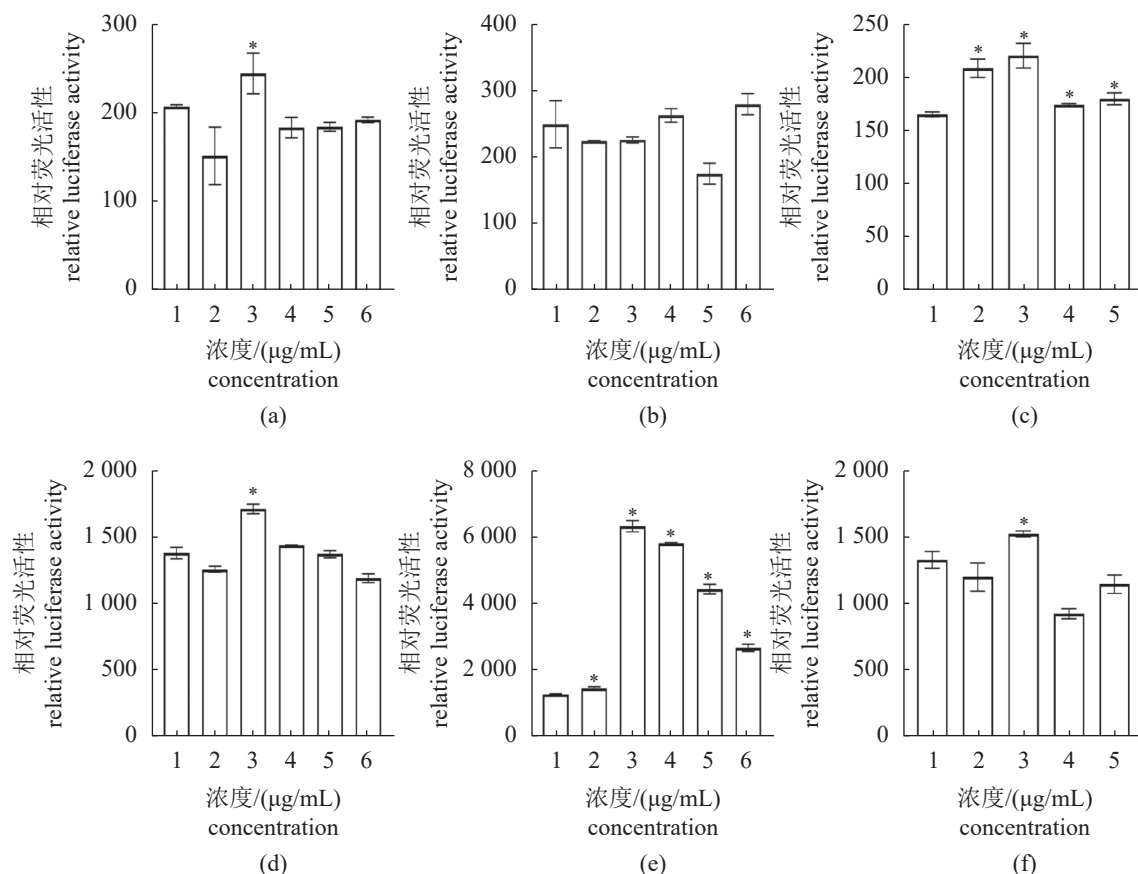


图6 不同药物浓度对 *Nrf2*、*HO-1* 启动子活性的影响

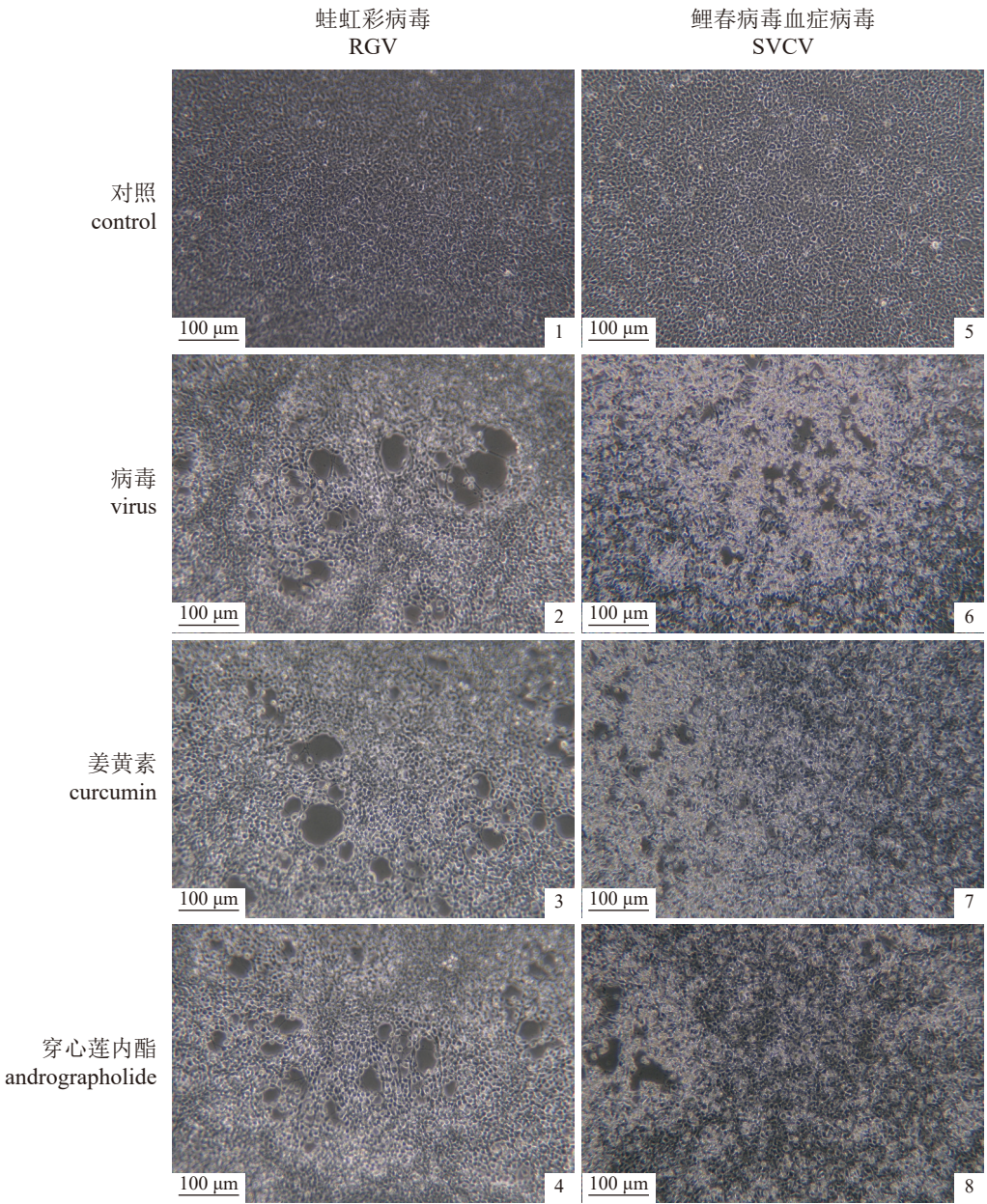
(a)~(c) 分别表示不同浓度的水飞蓟宾、穿心莲内酯和姜黄素对 *Nrf2* 启动子活性的影响, (d)~(f) 分别表示不同浓度的水飞蓟宾、穿心莲内酯和姜黄素对 *HO-1* 启动子活性的影响; 1. NC, 2. 3.1 μg/mL, 3. 6.3 μg/mL, 4. 12.5 μg/mL, 5. 25.0 μg/mL, 6. 50.0 μg/mL。

Fig. 6 Effect of different drug concentrations on the activity of *Nrf2* and *HO-1* promoters

(a)~(c) the effects of different concentrations of silybin, andrographolide and curcumin on *Nrf2* promoter activity, (d)~(f) the effects of different concentrations of silybin, andrographolide and curcumin on *HO-1* promoter activity; 1. NC, 2. 3.1 μg/mL, 3. 6.3 μg/mL, 4. 12.5 μg/mL, 5. 25.0 μg/mL, 6. 50.0 μg/mL.

复制及病理机制的研究逐渐深入。*Nrf2* 和 *HO-1* 具有广谱的抗病毒活性, *HO-1* 可诱导 IFN-1 表达并抑制 HCV 的 NS3/4A 蛋白酶活性; *Nrf2* 介导的 *HO-1* 表达还可抑制寨卡病毒 (Zika virus, Zika) 及单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus-1, HSV-1) 等病毒的增殖^[7,25-26]。研究已证实多种药物可靶向 *Nrf2* 和 *HO-1* 信号通路发挥抗病毒作用: 青蒿的类黄酮衍生物 DMO-CAP 处理可诱导 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、JNK/MAPK 和 ERK/MAPK 磷酸化, 激活 *Nrf2*/*HO-1*, 抑制甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 的增殖^[27]; 青蒿琥酯通过激活 AMPK 依赖的 *Nrf2*/*HO-1* 信号通路来抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 的复制^[28]。鱼类中也有研究表明, 萝卜硫素、香豆素衍生物

BBC 和 α -脂质酸可靶向于 *Nrf2*/*HO-1* 通路抑制 SVCV 和病毒性出血败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)^[8,29-30]。靶向内源性防御通路 *Nrf2*/*HO-1* 的抗病毒策略为广谱抗病毒药物的筛选提供了新的思路, 基于此, 本实验构建了 *Nrf2*/*HO-1* 的启动子报告质粒, 评价了靶向 *Nrf2*/*HO-1* 启动子活性的抗病毒药物筛选方法。该方法利用灵敏度高、检测线性范围广的荧光素酶报告系统, 以荧光信号强度定量表示启动子活性的强弱。与靶向病毒基因的药物筛选方式相比, 该方法不受病毒种类的限制, 适用于所有可引起氧化应激的水生生物病毒, 具有广谱性, 也不易产生耐药性^[31]。与基于活体实验及细胞病变程度的传统药物筛选方法相比, 该方法筛选周期短, 易于操作与重复, 可用于抗水生病毒药物初筛^[32]。



图版 细胞病变分析

1~4. 分别表示 RGV 未感染组、RGV 感染组、RGV 感染姜黄素组和 RGV 感染穿心莲内酯组, 5~8. 分别表示 SVCV 未感染组、SVCV 感染组、SVCV 感染姜黄素和 SVCV 感染穿心莲内酯组。

Plate Cytopathic analysis

1~4. respectively represent RGV uninfected group, RGV infected group, RGV infected curcumin group and RGV infected andrographolide group, 5~8. respectively represent SVCV uninfected group, SVCV infected group, SVCV infected curcumin group and SVCV infected andrographolide group.

姜黄素可通过 PKC 的磷酸化激活 Nrf2; 穿心莲内酯可通过 p38/MAPK 的磷酸化促使 Nrf2 入核介导 HO-1 的表达, 以发挥其抑制 HCV、COVID-19 等多种病毒的抗病毒作用^[15,33-35]。本研究也证实姜黄素和穿心莲内酯可激活 FHM Nrf2、HO-1 的启动子活性, 抑制 RGV 和 SVCV 的增殖。白藜

芦醇是常见的多酚之一, 被普遍认为具有抗氧化、抗癌症等功能。研究表明白藜芦醇在 3.1~100.0 μmol/L 时均可显著激活 HEK293T 细胞中抗氧化元件 (ARE) 的启动子活性, 在 50.0 μmol/L 时可激活 PI3K/Akt 介导的 Nrf2 信号通路以减轻氧化应激诱导的肠道屏障损伤。本实验以 10.0 μg/mL 的浓

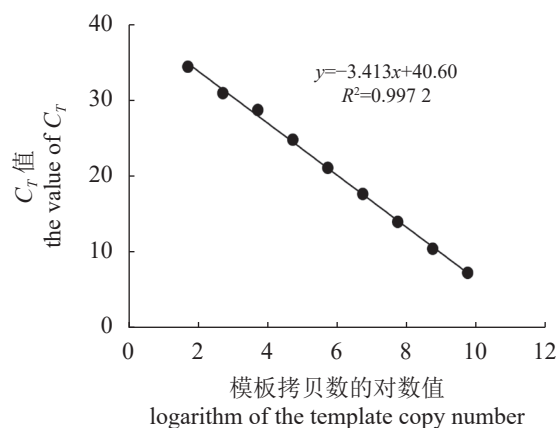


图7 靶向MCP基因的RGV定量标曲

Fig. 7 Quantitative standard curve of RGV targeting MCP gene

度进行药物初筛时, 白藜芦醇并未激活 FHM *Nrf2*、*HO-1* 的启动子活性^[36-38]。随着对白藜芦醇研究的逐渐深入, 其保护作用开始出现争议: 白藜芦醇可增强 HCV 的复制, 不适用于慢性丙型肝炎的抗氧化治疗; 存在双相刺激剂量依赖性反应及昼夜节律, 即在低剂量下及暗期为抗氧化剂, 存在保护作用, 高剂量下及光照期作为促氧化剂, 通过下调 PKB/Akt 的磷酸化增加氧化应激^[36,39-41]。这些均表明白藜芦醇的抗氧化效应在不同细胞、浓度、状态下不同。

本实验分析并构建了胖头鲮 *Nrf2*、*HO-1* 启动子报告质粒, 并在此基础上建立了基于抗氧化信号通路的抗病毒药物筛选方式, 分别以 DNA 病毒 RGV 和 RNA 病毒 SVCV 验证了该药物筛选方

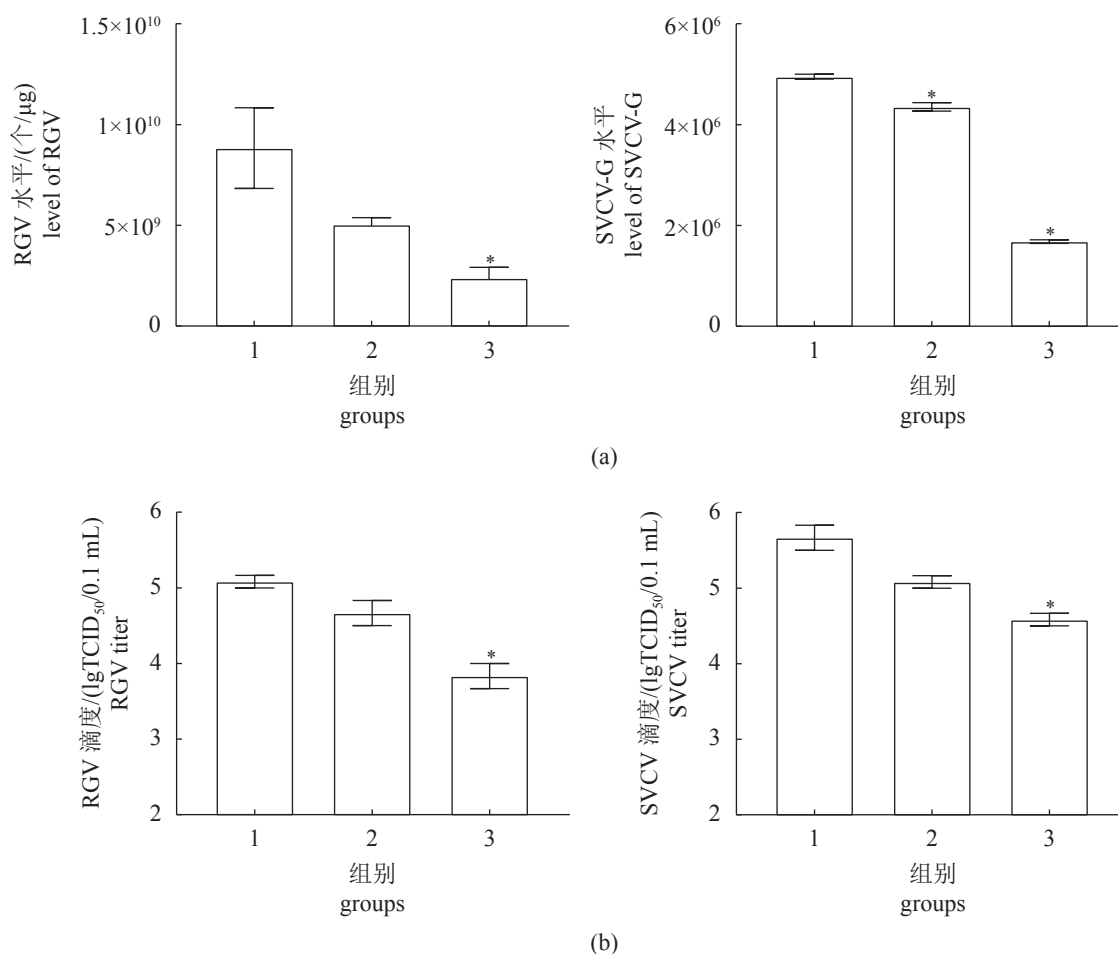


图8 药物的抗病毒活性检测

(a) 绝对/相对定量检测病毒的复制水平, (b) 药物处理后病毒的滴度检测; 1. 病毒感染组, 2. 姜黄素组, 3. 穿心莲内酯组。

Fig. 8 Detection of antiviral activity of drugs

(a) absolute/relative quantification of viral replication levels, (b) titer detection of viruses after drug treatment; 1. virus infection group, 2. curcumin group, 3. andrographolide group.

式的有效性, 为鱼类抗病毒药物的高效快速筛选提供了新方法。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 桂朗, 张奇亚. 中国水产动物病毒学研究概述[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 168-187.
Gui L, Zhang Q Y. A brief review of aquatic animal virology researches in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 168-187 (in Chinese).
- [2] Oidtmann B, Dixon P, Way K, *et al.* Risk of waterborne virus spread - review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(3): 641-669.
- [3] Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar J L. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(11): 896-903.
- [4] 刘敬先, 杜柏林, 王丽娜. 浅谈利巴韦林[J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(5): 24-25, 27.
Liu J X, Du B L, Wang L N. Discuss on ribavirin[J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2013, 36(5): 24-25, 27 (in Chinese).
- [5] Jia R, Cao L P, Du J L, *et al.* Grass carp reovirus induces apoptosis and oxidative stress in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) kidney cell line[J]. *Virus Research*, 2014, 185: 77-81.
- [6] Zhao L T, Qi L, Li C, *et al.* SVCV impairs mitochondria complex III resulting in accumulation of hydrogen peroxide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 58-65.
- [7] Tseng C K, Hsu S P, Lin C K, *et al.* Celastrol inhibits hepatitis C virus replication by upregulating heme oxygenase-1 via the JNK MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells[J]. *Antiviral Research*, 2017, 146: 191-200.
- [8] Shao J H, Huang J, Guo Y N, *et al.* Up-regulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) represses the replication of SVCV[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 474-482.
- [9] 王雅丽, 王语同, 吴丛迪, 等. 渔用中草药的研究进展(上)[J]. 科学养鱼, 2020(6): 46-47.
Wang Y L, Wang Y T, Wu C D, *et al.* Research progress for Chinese herbal medicine in the fishery (continued)[J]. *Scientific Fish Farming*, 2020(6): 46-47 (in Chinese).
- [10] Liu B H, Wen H S, Li X H, *et al.* Acute hypoxia effects on Keap1/Nrf2 (Mafs)-GST pathway related oxidative metabolism in muscle of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 795: 148646.
- [11] Choi A M, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1996, 15(1): 9-19.
- [12] Durante W. Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 195(3): 373-382.
- [13] 王甜甜, 陈淳媛, 杨雷, 等. Nrf2/HO-1信号轴在氧化应激性疾病中的机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(1): 74-80.
Wang T T, Chen C Y, Yang L, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 signal axis in the mechanisms for oxidative stress-relevant diseases[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2019, 44(1): 74-80 (in Chinese).
- [14] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [15] Dai J P, Gu L M, Su Y, *et al.* Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-κB pathways[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 54: 177-187.
- [16] Yu J S, Chen W C, Tseng C K, *et al.* Sulforaphane suppresses hepatitis C virus replication by up-regulating heme oxygenase-1 expression through PI3K/Nrf2 pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152236.
- [17] Chinchar V G, Bryan L, Wang J, *et al.* Induction of apoptosis in frog virus 3-infected cells[J]. *Virology*, 2003, 306(2): 303-312.
- [18] Lorenzen E, Carstensen B, Olesen N J. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 37(2): 81-88.

- [19] Yang M, Wang Y X, Chen J P, *et al.* Functional analysis of *Epinephelus coioides* peroxisome proliferative-activated receptor α (PPAR α): involvement in response to viral infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 102: 257-266.
- [20] Heintzman N D, Ren B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(4): 386-400.
- [21] 王凡, 徐世明, 古同男, 等. 人HO-1基因启动子区生物信息学分析[J]. *重庆医学*, 2021, 50(9): 1581-1585.
Wang F, Xu S M, Gu T N, *et al.* Bioinformatic analysis of human heme oxygenase 1 gene promoter region[J]. *Chongqing Medicine*, 2021, 50(9): 1581-1585 (in Chinese).
- [22] Deaton A M, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(10): 1010-1022.
- [23] Ji G Y, Zhang M M, Liu Q Q, *et al.* Functional polymorphism in the NFE2L2 gene associated with tuberculosis susceptibility[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 660384.
- [24] Ma L L, Sun L, Wang Y X, *et al.* Association between HO-1 gene promoter polymorphisms and diseases (review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2022, 25(1): 29.
- [25] Huang H X, Falgout B, Takeda K, *et al.* Nrf2-dependent induction of innate host defense via heme oxygenase-1 inhibits Zika virus replication[J]. *Virology*, 2017, 503: 1-5.
- [26] Zhang L, Wang J, Wang Z, *et al.* Upregulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) represses the replication of herpes simplex virus type 1[J]. *Virology Journal*, 2022, 19(1): 23.
- [27] Zhong M, Wang H Q, Ma L L, *et al.* DMO-CAP inhibits influenza virus replication by activating heme oxygenase-1-mediated IFN response[J]. *Virology Journal*, 2019, 16(1): 21.
- [28] Long F X, Zhang M X, Yang X, *et al.* The antimalaria drug artesunate inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by activating AMPK and Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(3): e0148721.
- [29] Zhang W W, Chen X Q, Yu F Z, *et al.* α -Lipoic acid exerts its antiviral effect against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by promoting upregulation of antiviral genes and suppressing VHSV-induced oxidative stress[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(6): 1520-1531.
- [30] Liu L, Shen Y F, Hu Y, *et al.* Antiviral effect of 7-(4-benzimidazole-butoxy)-coumarin on rhabdoviral clearance via Nrf2 activation regulated by PKC α/β phosphorylation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 386-396.
- [31] Xu X, Zhang Q Y, Chu X Y, *et al.* Facilitating antiviral drug discovery using genetic and evolutionary knowledge[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2117.
- [32] 温小菁, 温红玲, 黄维金. 抗病毒药物筛选研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2020, 48(2): 59-63.
Wen X J, Wen H L, Huang W J. Advances on antiviral drug screening[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2020, 48(2): 59-63 (in Chinese).
- [33] Park J Y, Sohn H Y, Koh Y H, *et al.* Curcumin activates Nrf2 through PKC δ -mediated p62 phosphorylation at Ser351[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 8430.
- [34] Zahedipour F, Hosseini S A, Sathyapalan T, *et al.* Potential effects of curcumin in the treatment of COVID - 19 infection[J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(11): 2911-2920.
- [35] Lee J C, Tseng C K, Young K C, *et al.* Andrographolide exerts anti-hepatitis C virus activity by up-regulating haeme oxygenase-1 via the p38 MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171(1): 237-252.
- [36] Shaito A, Posadino A M, Younes N, *et al.* Potential adverse effects of resveratrol: a literature review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2084.
- [37] 刘阳, 陈剑清, 舒特俊, 等. 一种基于抗氧化反应元件的抗氧化药物筛选模型的制备[J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2112-2117.
Liu Y, Chen J Q, Shu T J, *et al.* Establishment of a drug screening model based on anti-oxidative response element[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(15): 2112-2117 (in Chinese).
- [38] Zhuang Y, Wu H R, Wang X X, *et al.* Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 2019.

- 7591840.
- [39] Gadacha W, Ben-Attia M, Bonnefont-Rousselot D, *et al.* Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night[J]. *Redox Report*, 2009, 14(4): 154-158.
- [40] Posadino A M, Giordo R, Cossu A, *et al.* Flavin oxidase-induced ROS generation modulates PKC biphasic effect of resveratrol on endothelial cell survival[J]. *Bio-molecules*, 2019, 9(6): 209.
- [41] Nakamura M, Saito H, Ikeda M, *et al.* An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(2): 184-192.

A screening method of anti-aquatic viral drugs based on *Nrf2/HO-1* promoter

WANG Jingwen¹, WU Miaomiao¹, LI Lijuan^{1,2}, GU Zemao^{1,2}, YUAN Junfa^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National Aquatic Animal Diseases Para-reference laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to establish an antiviral drug screening method targeting to *Nrf2* / *HO-1* pathway, the recombinant plasmids of *Nrf2* and *HO-1* promoter were constructed, respectively. The effects of different concentrations (0.0, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0 and 50.0 µg/mL) of resveratrol, silybin, andrographolide and curcumin on promoter activity were detected by the dual luciferase reporter system in fathead minnow cells (FHM). Further, spring viremia of carp virus (SVCV) and rana grylio iridovirus (RGV) were used to verify the antiviral effect of positive drugs in FHM cells. The results showed that a variety of binding sites for transcription factors were found in the *Nrf2* and *HO-1* promoter sequences, including FOX family and IRF family. As well, 1 and 3 methylation-related CpG islands were found, respectively. The dual luciferase reporter assay showed that silybin, andrographolide and curcumin could activate the *Nrf2* and *HO-1* promoters. Drug concentration gradient experiments showed that curcumin and andrographolide at a concentration of 6.3 µg/mL could significantly up-regulate the promoter activities of *Nrf2* and *HO-1*. The cytopathic effect observation, virus replication tests and virus titration assay confirmed that curcumin and andrographolide can inhibit the infection of SVCV and RGV significantly. In conclusion, the pGL3-*Nrf2* and pGL3-*HO-1* promoter reporter plasmids established in this experiment can be used for the screening of anti-aquatic virus drugs, and also provide tools for the study of the transcriptional regulation mechanism of *Nrf2* and *HO-1*.

Key words: aquatic virus; fathead minnow cells (FHM); *Nrf2*; *HO-1*; promoter; screening of antiviral drugs

Corresponding author: YUAN Junfa. E-mail: jfyuan@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872598)