DOI:10.13300/j.cnki.cn42-1648/s.XXXX.XX.001

黄酮醇抗非洲猪瘟病毒活性及其作用靶点预测

胡晓通,代潇莹,蔡远蓉,程楚星,张强,金梅林*
华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院, 武汉 430070

摘要 [目的]评价黄酮醇对非洲猪瘟病毒(ASFV)的体外抑制活性,并初步探讨其潜在作用靶点,为抗ASFV候选药物的筛选与开发提供参考依据。[方法]以猪肺泡巨噬细胞(PAMs)为细胞模型,采用细胞活力检测评价黄酮醇的细胞毒性;以Ⅱ型ASFV SY-1和Ⅰ/Ⅱ型重组ASFV 819为研究对象,检测不同浓度黄酮醇处理后病毒的复制水平,计算半数细胞毒性浓度(CC_{50})、半数抑制浓度(IC_{50})及选择指数(SI);通过时间阶段试验分析黄酮醇的主要作用阶段,并采用AutoDock Vina进行黄酮醇与ASFV S273R蛋白的分子对接,分析预测结合能、结合构象及其与结合位点氨基酸残基之间的相互作用。[结果]黄酮醇处理PAMs 48 h后,10 μmol/L及以下浓度组细胞活率均高于90%。10 μmol/L黄酮醇对ASFV SY-1和819在PAMs上的复制均具有显著抑制作用。在PAMs中,黄酮醇的CC_{50}为16.71 μmol/L,IC_{50}为0.669 μmol/L,SI为24.98。时间阶段试验结果显示,黄酮醇主要在病毒与细胞共孵育阶段及感染后处理阶段发挥抑制作用。分子对接结果显示,黄酮醇与S273R蛋白的结合能为-25.9 kJ/mol,可与Asn187形成氢键,并与Pro194和His168形成π相互作用。[结论]黄酮醇在不明显影响PAMs细胞活力的浓度范围内能够抑制ASFV SY-1和819的复制,具有较好的体外抗ASFV活性。分子对接结果提示黄酮醇可能与pS273R蛋白发生相互作用,pS273R可能是其潜在作用靶点之一,但该推测仍需通过酶活实验、结合实验及关键位点突变实验进一步验证。

关键词 非洲猪瘟;非洲猪瘟病毒;黄酮醇;猪肺泡巨噬细胞;S273R蛋白;细胞毒性;体外抗ASFV活性;分子对接;潜在作用靶点

Investigation of the antiviral activity and target prediction of flavonol against African swine fever virus

Hu Xiaotong, Dai Xiaoying, Cai Yuanrong, Cheng Chuxing, Zhang Qiang, Jin Meilin*
College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070,China

Abstract [Objectives]To evaluate the *in vitro* antiviral activity of flavonol against African swine fever virus (ASFV) and explore its potential molecular targets, thereby providing a reference basis for the screening and development of candidate anti-ASFV drugs.[Methods]The cytotoxicity of flavonol was assessed in porcine

收稿日期:2026-09-02
基金项目:国家重点研发计划(2025YFD1800700)
作者简介:胡晓通,男,1997年生,博士。*通信作者:金梅林,女,1954年生,教授,博士生导师。

alveolar macrophages (PAMs) by cell viability assay. Viral replication was measured in ASFV genotype Ⅱ strain SY-1 and recombinant genotype Ⅰ/Ⅱ strain 819 following treatment with serial flavonol concentrations. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), 50% inhibitory concentration (IC_{50}), and selectivity index (SI) were then determined. A time-of-addition assay identified the main stage of flavonol action, and molecular docking between flavonol and ASFV pS273R protein was performed with AutoDock Vina to analyze and predict the binding energy, binding conformations, and their interactions with the amino acid residues at the binding site. [Results]After 48 h of flavonol treatment, PAM cell viability remained above 90% at concentrations up to 10 μmol/L. Flavonol at 10 μmol/L significantly suppressed replication of both ASFV SY-1 and 819 in PAMs. The CC_{50}, IC_{50}, and SI of flavonol were 16.71 μmol/L, 0.669 μmol/L, and 24.98, respectively. A time-of-addition assay showed that flavonol acted mainly during virus-cell coincubation and post-infection stages. Molecular docking gave a binding energy of −25.9 kJ/mol between flavonol and S273R, with a hydrogen bond to Asn187 and π-interactions with Pro194 and His168.[Conclusions]Flavonol inhibits replication of ASFV SY-1 and 819 at concentrations that do not markedly affect PAM viability, showing favorable *in vitro* anti-ASFV activity. Molecular docking suggests that flavonol may interact with the pS273R protein, which could be one of its potential targets. This hypothesis nonetheless requires verification by enzyme activity assays, binding assays, and site-directed mutagenesis.

Keywords African swine fever; African swine fever virus; flavonol; porcine alveolar macrophages; pS273R protein; cytotoxicity; *in vitro* anti-ASFV activity; molecular docking; potential target molecules

非洲猪瘟(African Swine Fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African Swine Fever virus,ASFV)引起的一种急性、烈性传染病,主要感染家猪和野猪[1]。ASFV 属于非洲猪瘟病毒科(Asfarviridae)非洲猪瘟病毒属(*Asfivirus*),是1种基因组较大的双链 DNA 病毒[2]。强毒株感染家猪后可引起高热、出血及多器官损伤,死亡率可达100%,对生猪养殖业、动物卫生和农产品贸易造成严重影响[3-4]。目前,ASF 防控仍主要依赖早期监测、快速诊断、扑杀和严格生物安全措施,安全有效的商业化疫苗和抗病毒药物仍然不足[1,5]。因此,筛选具有较好安全性和抗病毒活性的候选化合物,对于完善 ASF 综合防控体系具有重要意义[6-7]。

近年来,针对ASFV复制过程及宿主—病毒相互作用的抗病毒研究不断开展,已有研究报道了核苷类化合物、天然产物及宿主靶向化合物等多种候选物[8-9]。然而,许多候选药物仍主要停留在体外细胞评价阶段,其作用靶点、抗病毒谱和体内有效性尚需进一步研究。天然产物结构类型多样、生物活性广泛,是ASFV抗病毒药物筛选的重要来源[10-11]。黄酮类化合物是植物中广泛存在的多酚类次生代谢产物,具有抗病毒、抗炎和抗氧化等多种生物活性。已有研究表明,山奈酚可在非细胞毒性浓度下抑制ASFV复制,主要作用于病毒进入和感染后阶段[12];黄酮类化合物芫花素也可抑制ASFV在Vero细胞和猪源巨噬细胞中的感染[13]。黄酮醇类化合物杨梅素及其糖苷衍生物杨梅苷能够抑制 ASFV 蛋白酶活性,提示黄酮醇骨架可能具有开发抗 ASFV 候选药物的价值[14]。

ASFV*S273R*基因编码的pS273R蛋白是1种病毒半胱氨酸蛋白酶,参与pp220和pp62多聚蛋白前体的加工,对病毒核心结构形成和病毒成熟具有重要作用[15]。已有结构研究解析了pS273R蛋白的晶体结构,并据此开展了针对其底物结合区域的抑制剂设计,说明S273R具有成为抗ASFV药物作用靶点的潜在价值[16]。本研究以猪肺泡巨噬细胞(PAMs)为细胞模型,评价黄酮醇对Ⅱ型ASFV SY-1及Ⅰ/Ⅱ型重组ASFV 819复制的抑制作用,分析其细胞毒性、剂量依赖性和主要作用阶段,并通过分子对接初步探讨黄酮醇与ASFV S273R蛋白的潜在相互作用,以期为黄酮醇作为抗ASFV候选化合物的进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1)细胞与病毒。原代猪肺泡巨噬细胞(porcine

alveolar macrophages, PAMs）均取自ASFV抗体和抗原检测阴性的断奶仔猪，分离方法参照文献[17]。Ⅱ型ASFV SY-1株（GenBank登录号：OM161110）和Ⅰ/Ⅱ型重组ASFV 819株由本实验室保存，经PAMs扩增后置于−80 ℃冰箱保存备用。

2）主要试剂。RPMI 1640培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司；青霉素—链霉素双抗溶液（100 μg/mL链霉素、100 IU/mL青霉素）购自北京索莱宝科技有限公司；CCK-8细胞毒性检测试剂盒购自美国GlpBio公司；FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Perfectstart II Probe qPCR Supermix UDG购自北京全式金生物技术有限公司；黄酮醇（纯度≥98%）购自美国Sigma-Aldrich公司，用二甲基亚砜（DMSO）配制成10 mmol/L储备液，−20 ℃避光保存，使用时用培养基稀释至所需工作浓度，DMSO含量超过0.1%。

3）主要仪器。CO_2细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）；酶标仪（美国Bio-Tek公司）；QuantStudio 6实时荧光定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司）；高速冷冻离心机（德国Eppendorf公司）。

所有试验在华中农业大学动物生物安全三级实验室开展。

1.2 细胞培养

PAMs和BMDMs均采用含10%胎牛血清、100 μg/mL链霉素和100 IU/mL青霉素的RPMI 1640完全培养基，置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期时用于后续试验。

1.3 细胞毒性检测

采用CCK-8法检测黄酮醇对PAMs的细胞毒性。取对数生长期的PAMs，以每孔1×10^5个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中，每孔100 μL，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后，分别加入终浓度为1、5、10、15、20、25、30 μmol/L的黄酮醇溶液，每个浓度设4个复孔，同时设置细胞对照组（只加培养基和细胞，不加药物）和空白对照组（只加培养基，不加细胞和药物）。继续培养48 h后，每孔加入10 μL CCK-8试剂，37 ℃避光孵育2 h，用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度（OD）值。按下列公式计算细胞存活率：

$$细胞存活率=[(A_s-A_b)/(A_c-A_b)]\times100\%$$

式中：A_s为实验孔OD值（含细胞、培养基、CCK-8和药物）；A_c为对照孔OD值（含细胞、培养基和CCK-8）；A_b为空白孔OD值（仅含培养基和CCK-8）。

对于CC_{50}（50% cytotoxic concentration, CC_{50}）测定，初始浓度200 μmol/L进行倍比稀释至2^{-10}，每个梯度药物稀释液加至PAMs，每孔做四孔重复，培养72 h后通过CCK8测定细胞活力。

采用GraphPad Prism 8.0软件，以药物浓度对数为横坐标、细胞存活率为纵坐标，拟合剂量—效应曲线，计算半数细胞毒性浓度。

1.4 黄酮醇对ASFV复制的抑制率测定

取对数生长期的PAMs，以每孔2×10^5个细胞的密度接种于24孔细胞培养板中，培养过夜。分别以感染复数（multiplicity of infection, MOI）为0.1的SY-1株和819株感染PAMs，37 ℃吸附2 h后，用无菌PBS洗涤3次，去除未吸附的病毒，然后加入含10 μmol/L黄酮醇的新鲜培养基继续培养72 h。同时设置DMSO溶剂对照组。收集细胞培养上清液，采用qPCR检测ASFV基因组DNA拷贝数，计算病毒复制抑制率。

抑制率=（1—给药组病毒拷贝数/对照组病毒拷贝数）×100%

1.5 半数抑制浓度测定

取对数生长期的PAMs，以每孔2×10^5个细胞的密度接种于24孔细胞培养板中，培养过夜。以MOI=0.1的ASFV感染PAMs，37 ℃吸附2 h后，用无菌PBS洗涤3次，加入含不同浓度黄酮醇（78.1、156.3、312.5、625、1 250、2 500、5 000、10 000 nmol/L，共8个浓度梯度）的新鲜培养基，每个浓度设3个复孔，同时设置DMSO对照组。继续培养72 h后，收集细胞培养上清液，采用红细胞吸附（haemadsorption, HAD）实验测定病毒滴度。

以药物浓度对数为横坐标、病毒抑制率为纵坐标，采用GraphPad Prism 6.0软件拟合剂量—效应曲线，计算半数抑制浓度（50% inhibitory concentration, IC_{50}）和选择指数（selectivity index, SI）。

$$SI=CC_{50}/IC_{50}$$

1.6 时间阶段试验

为分析黄酮醇抑制ASFV复制的主要作用阶段，设置药物预处理（pre-treatment）、共处理（co-treatment）和感染后处理（post-treatment）3种给药

方式。

1）预处理组。PAMs先用含10 μmol/L黄酮醇的培养基于37 ℃孵育2 h，用无菌PBS洗涤3次后，以MOI=0.1的ASFV感染2 h，再用无菌PBS洗涤3次，更换为不含药物的新鲜培养基继续培养至感染后72 h。

2）共处理组。将ASFV（MOI＝0.1）与10 μmol/L黄酮醇同时加入PAMs中，37 ℃共孵育2 h后，无菌PBS洗涤3次，更换为不含药物的新鲜培养基继续培养72 h。

3）感染后处理组。PAMs先以MOI=0.1的ASFV感染2 h，用无菌PBS洗涤3次后，加入含10 μmol/L黄酮醇的培养基持续培养至感染后72 h。

各组均设置相应的DMSO溶剂对照组。培养72 h后收集细胞培养上清液，采用qPCR检测病毒基因组DNA拷贝数，比较不同给药方式下黄酮醇对ASFV复制的抑制效果。

1.7　RT-qPCR/qPCR检测病毒蛋白mRNA表达及病毒拷贝

根据制造商的说明，使用TRIzol (Invitrogen)从PAMs中提取总RNA。使用Olig 18t引物，用AMV逆转录酶（Takara Bio，日本）对vRNA进行逆转录。使用QuantStudio 6实时荧光定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司）和SYBR Green PCR试剂盒（罗氏，瑞士）进行qRT-PCR。将ASFV的相对p72 mRNA水平标准化为GAPDH mRNA，并通过阈值循环计算方法（$2^{-\Delta\Delta CT}$）进行分析。引物序列如下：Olig18t 5′-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3′，p72上游引物：5′- GGCAGGATGCTCCGATTCA -3′，p72下游引物：5′-CGGGGTATTCGCAGTAGTAA-3′，以及GAPDH上游引物：5′-GCACAGTCAAGGCGGAGAAC-3′，GAPDH下游引物：5′- TCGGCAGAAGGGGCAGAGAT-3′。

采用FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit提取细胞培养上清液中的ASFV基因组DNA，操作严格按照试剂盒说明书进行。以ASFV *p72*基因为靶基因，引物和探针的序列依次如下：上游引物：5′-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3′，下游引物：5′-GATACCACAAGATCAGCCGT-3′，探针：5′-FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-3′-BHQ1。qPCR反应体系（20 μL）：Perfectstart Ⅱ Probe qPCR Supermix UDG 10 μL，上下游引物各0.2 pmol/μL，探针0.2 pmol/μL，DNA模板2 μL，无核酸酶水补足至20 μL。反应条件：50 ℃ 2 min；94 ℃ 5 min；94 ℃ 5 s，58 ℃ 30 s，共40个循环。以已知浓度的标准品绘制标准曲线，根据Ct值计算样品中ASFV基因组DNA拷贝数。

1.8　分子对接

从PDB数据库（https://www. rcsb. org/）下载ASFV S273R蛋白酶的三维晶体结构（PDB ID：6LJB，链A，含267个氨基酸残基、2 700个原子），使用AutoDockTools 1.5.7软件对受体蛋白进行去水、加氢、计算Gasteiger电荷等预处理，保存为6LJB.pdbqt文件。从PubChem数据库下载黄酮醇（flavonol，PubChem CID：11349）的三维结构（SDF格式），转换为PDBQT格式并设置可旋转键（共2条可旋转键，每个构象含19个原子）。采用AutoDock Vina软件进行分子对接，网格中心坐标根据S273R蛋白的活性口袋设置，网格盒子大小覆盖整个活性位点区域，对接输出20个构象。对接完成后，选取结合能最低的构象（最佳结合能为−25.9 kJ/mol，能量范围为−25.9～ −23.01 kJ/mol，平均结合能为−24.162 6 kJ/mol）进行分析，使用PyMOL软件可视化黄酮醇与S273R蛋白之间的氢键和π相互作用。

1.9　伦理声明

所有涉及感染性ASFV的操作均在华中农业大学动物生物安全三级实验室（ABSL-3）内完成，实验操作严格遵守生物安全相关规定。

1.10　统计分析

采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行数据统计分析和绘图。两组间比较采用非配对Student's *t*、one-way ANOVA及two-way ANOVA检验。所有试验均独立重复3次，数据以“平均值±标准差”表示。$P<0.05$为差异具有统计学意义，其中$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$和$P<0.000\ 1$分别用“*”“**”“***”“****”标注。

2　结果与分析

2.1　黄酮醇对PAMs的细胞毒性测定结果

黄酮醇的化学结构见图1A。CCK-8检测结果显示，黄酮醇处理PAMs 48 h后，1～10 μmol/L各浓度组的细胞活力均保持在90%以上；当浓度升至15～30 μmol/L时，细胞活力随黄酮醇浓度增加而逐渐下降（图1B）。剂量—效应曲线拟合结果显示，黄

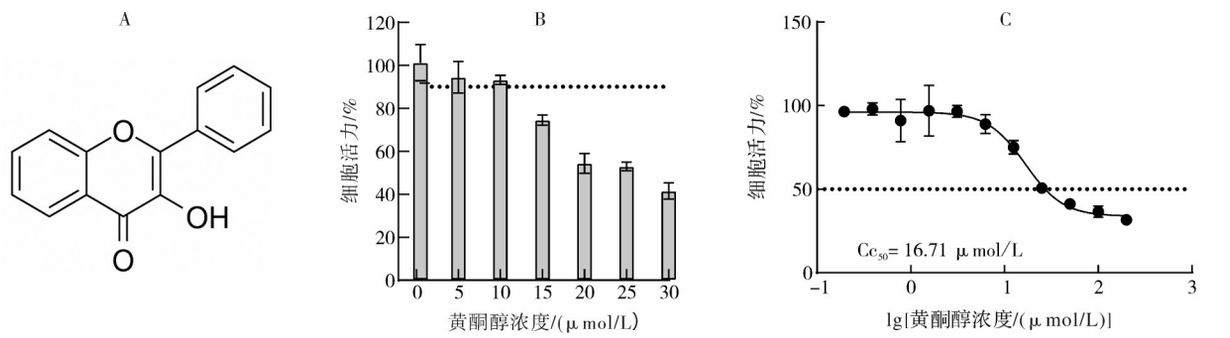
酮醇对PAMs的半数细胞毒性浓度(CC_{50})为16.71 μmol/L(图1C)。

综合细胞活力和CC50结果,选择10 μmol/L作为后续试验的最高工作浓度。

2.2 黄酮醇对ASFV复制的抑制作用

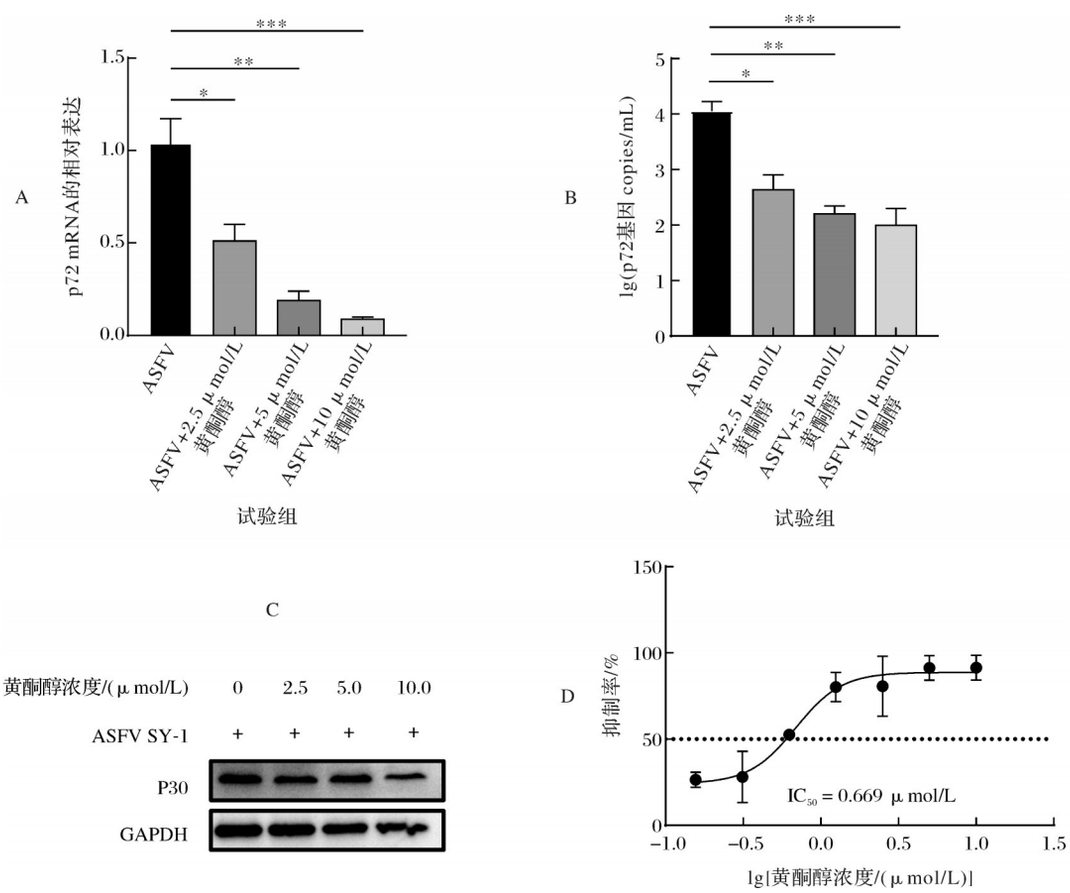
为了评估黄酮醇对ASFV病毒复制的影响,使用不同浓度黄酮醇处理ASFV SY-1感染的PAMs后,病毒p72 mRNA相对表达量随黄酮醇浓度增加而下降;2.5、5和10 μmol/L组与ASFV对照组比较差异分别达到$P<0.05$、$P<0.01$和$P<0.001$(图2A)。

通过Western检测了PAMs中p30蛋白的表达



A:黄酮醇的化学结构;B:不同浓度黄酮醇处理PAMs 48 h后的细胞活力;C:黄酮醇的细胞毒性剂量—效应曲线。图B和图C中的虚线分别表示90%和50%细胞活力。

图1 黄酮醇的化学结构及其对PAMs细胞活力的影响



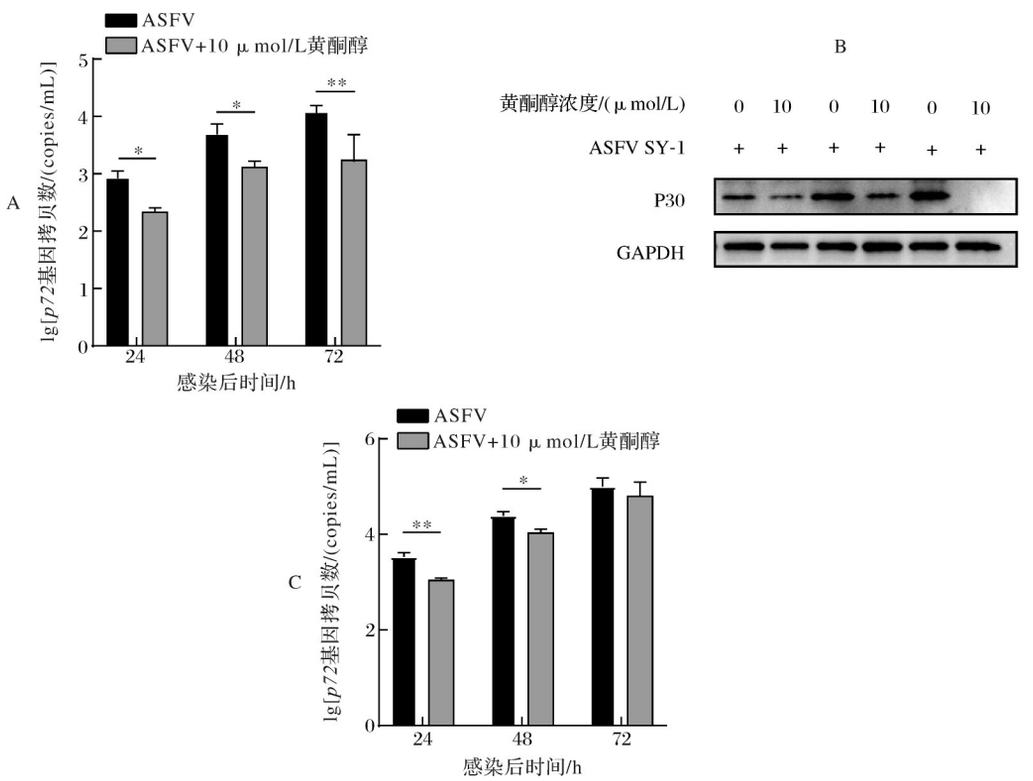
A:不同浓度黄酮醇处理后病毒p72 mRNA的相对表达量;B:不同浓度黄酮醇处理后病毒*p72*基因拷贝数;C:不同浓度黄酮醇处理后病毒P30蛋白的表达,GAPDH为内参;D:黄酮醇抗ASFV的剂量—效应曲线。

图2 黄酮醇对ASFV SY-1复制的剂量依赖性抑制作用

情况，结果显示，2.5～10 μmol/L 黄酮醇处理后ASFV p30蛋白表达量逐渐降低（图2B）。此外，qPCR检测结果显示，2.5、5和10 μmol/L黄酮醇均可显著降低ASFV感染PAMs细胞上清中病毒*p72*基因拷贝数（图2C）。剂量—效应曲线拟合得到黄酮醇对ASFV的半数抑制浓度（IC_{50}）为0.669 μmol/L（图2D）；根据CC_{50}和IC_{50}计算，其选择指数（SI）为24.98。结果表明，黄酮醇可在较低细胞毒性的浓度范围内呈剂量依赖性抑制ASFV SY-1复制。

为评价黄酮醇抑制ASFV复制的持续性及其对不同毒株的作用，以10 μmol/L黄酮醇处理病毒感染的PAMs。对于SY-1株，黄酮醇处理组在感染后24、48和72 h的*p72*基因拷贝数均低于对应时间点的ASFV对照组，其中24、48 h达到差异显著（$P<0.05$），72 h差异达到极显著（$P<0.01$）（图3A）；Western blot结果显示，黄酮醇处理在感染后不同时间点均明显抑制PAMs中P30蛋白的表达（图3B）。

为进一步探究黄酮醇对ASFV的抑制作用是否具有广谱性，使用Ⅰ/Ⅱ型重组ASFV 819感染PAMs，结果显示，尽管黄酮醇处理组在感染72 h时*p72*基因拷贝数与对照组差异不明显，但在感染24 h和48 h时显著降低了细胞上清液中ASFV 819的拷贝数（$P<0.01$）（图3C），表明黄酮醇对Ⅱ型及Ⅰ/Ⅱ型重组ASFV均具有抑制作用。



A：10 μmol/L黄酮醇处理后不同感染时间点SY-1株的*p72*基因拷贝数；B：10 μmol/L黄酮醇处理后不同感染时间点SY-1株P30蛋白的表达，GAPDH为内参；C：10 μmol/L黄酮醇处理后不同感染时间点819株的*p72*基因拷贝数。

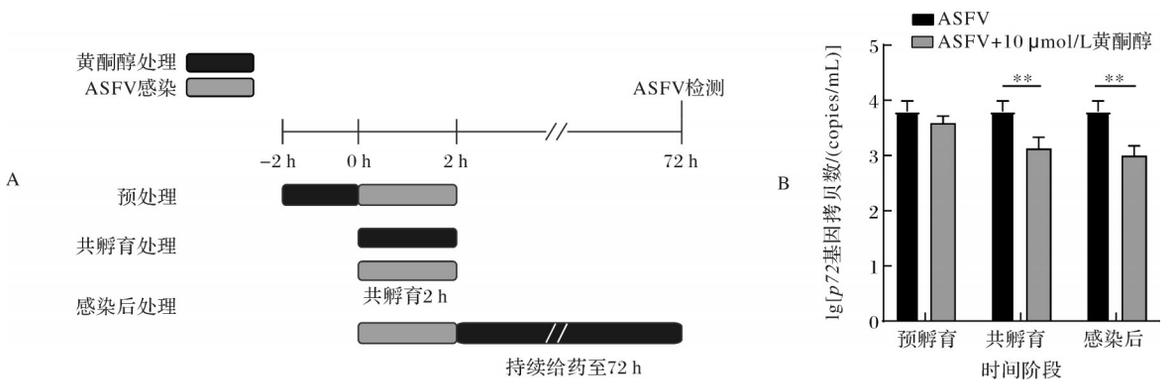
图3　黄酮醇对ASFV SY-1株和819株复制的时间依赖性影响

2.3　黄酮醇发挥抗ASFV作用的时间阶段

为了探究黄酮醇发挥抗病毒作用的时间阶段，在感染的不同阶段添加黄酮醇并检测其对ASFV复制的影响，具体方案见图4A。qPCR检测结果显示，与相应ASFV对照组相比，黄酮醇预处理组的病毒*p72*基因拷贝数虽有下降趋势，但差异无统计学意义；共孵育处理组和感染后处理组的病毒*p72*基因拷贝数均显著降低（$P<0.01$，图4B）。该结果表明，黄酮醇对ASFV的抑制作用主要发生于病毒与细胞共孵育阶段及感染后复制阶段，单独对细胞进行预处理的抑制作用相对有限。

2.4　黄酮醇与ASFV S273R蛋白的分子对接分析

为初步探究黄酮醇抗ASFV活性的潜在作用靶点，本研究采用AutoDock Vina对黄酮醇与ASFV pS273R蛋白进行分子对接。共获得20个对接构象，预测结合能范围为−25.9～−23.01 kJ/mol，

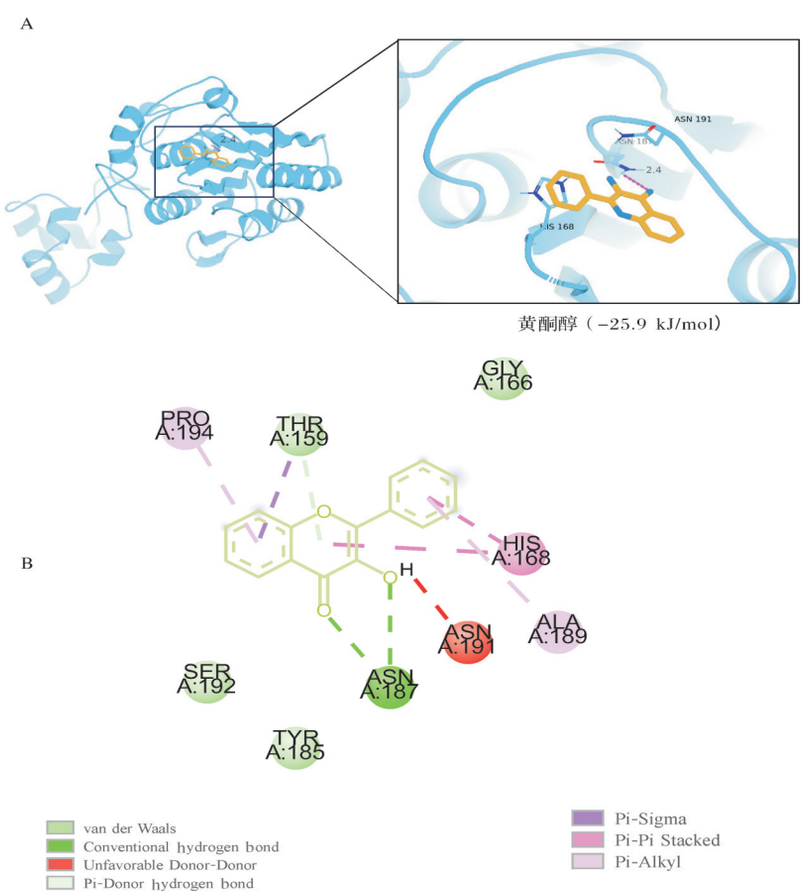


A：时间阶段实验设计，分别为黄酮醇预处理2 h、黄酮醇与ASFV共孵育2 h，以及病毒感染2 h后持续给予黄酮醇至感染后72 h；B：不同给药阶段下病毒*p72*基因拷贝数。

图4　不同给药阶段下黄酮醇对ASFV复制的影响

平均结合能为−24.16 kJ/mol，最佳构象的结合能为−25.9 kJ/mol。

最佳结合构象显示，黄酮醇可进入S273R蛋白的潜在结合口袋，并与Asn187形成氢键，同时与Pro194和His168形成π相互作用（图5）。上述结果提示黄酮醇可能与S273R蛋白发生相互作用，但该结果属于计算预测，仍需通过酶活性、直接结合及关键氨基酸位点突变试验进一步验证。



A：黄酮醇与S273R蛋白最佳结合构象的三维示意图及结合口袋局部放大图；B：黄酮醇与S273R蛋白周围氨基酸残基的二维相互作用。

图5　黄酮醇与ASFV S273R蛋白的分子对接结果

3 讨 论

本研究以原代PAMs为细胞模型，评价了黄酮醇对ASFV SY-1株和819株的体外抑制活性。结果显示，黄酮醇在10 μmol/L及以下浓度对PAMs细胞活力无明显影响，且能够显著抑制两种ASFV的增殖。黄酮醇对ASFV SY-1株的IC_{50}为0.669 μmol/L，选择指数达24.98，说明其在较低细胞毒性浓度下仍有较好的抗ASFV活性。近年来，黄酮类化合物因来源广泛、结构类型多样、可修饰位点丰富且具有多靶点潜力，已成为抗ASFV天然产物筛选的重要类群[11]。已有研究报道山奈酚、杨梅素及其糖苷衍生物等黄酮醇类化合物均具有不同程度的抗ASFV活性[12,14]，说明黄酮醇骨架在抗ASFV药物开发中具有一定的研究价值。然而，黄酮类化合物普遍存在水溶性较差、口服生物利用度低、体内代谢稳定性不足以及体内抗病毒有效性数据缺乏等问题[11]，限制了其直接成药的可能性。目前已有报导具有黄酮醇支架的黄酮类化合物杨梅素及其衍生物杨梅苷能够显著抑制ASFV p273R蛋白酶的活性，且黄酮醇的3-羟基可能有助于与ASFV蛋白酶相互作用[14]。

黄酮醇（3-羟基黄酮）是黄酮类化合物中结构最为简单的亚型之一，其C环3位羟基和A、B环的多个可修饰位点为构效关系研究和衍生物开发提供了基础。已有文献表明，黄酮醇及其衍生物在多种病毒中表现出广谱抗病毒活性，其机制涵盖抑制病毒吸附与进入、干扰病毒蛋白酶或聚合酶活性、抑制病毒核酸与蛋白合成，以及调节宿主炎症、氧化应激和抗病毒信号通路等多个层面[14,18-20]。例如，黄芩素和quercetagetin可抑制基孔肯雅病毒对细胞的吸附并影响胞外病毒颗粒[20]；黄酮醇类化合物还可靶向SARS-CoV-2的3CLpro、PLpro等关键蛋白酶[18]。本研究的时间阶段试验结果显示，黄酮醇在病毒与细胞共孵育阶段和感染后处理阶段均发挥显著抑制作用，而单独预处理细胞的效果有限。这一结果提示，黄酮醇除可能靶向S273R蛋白酶外，还可能在病毒吸附、进入或其他早期复制阶段发挥作用，其抗ASFV机制具有多靶点特征，尚需通过病毒进入实验、结合实验等进一步明确。

ASFV编码的pS273R蛋白是一种SUMO-1样半胱氨酸蛋白酶，负责催化pp220和pp62多聚蛋白前体的切割加工，对病毒核心壳层形成和感染性病毒颗粒的成熟至关重要[15,21]。已有研究解析了pS273R的晶体结构，并证实其活性抑制可阻断多聚蛋白加工、产生缺陷性病毒颗粒[15-16]，小分子抑制剂E-64也被证实可通过共价结合pS273R的Cys232抑制其酶活性[22]，表明S273R是抗ASFV药物开发具有潜力的靶点。本研究分子对接结果显示，黄酮醇与S273R的最佳结合能为－25.9 kJ/mol，可与Asn187形成氢键，并与Pro194和His168形成π相互作用，提示黄酮醇可能结合于S273R的活性口袋区域。本研究发现黄酮醇对基因Ⅱ型毒株SY-1和Ⅰ/Ⅱ型重组毒株819均有明显的抑制作用，可能由于S273R属于ASFV核心基因组编码蛋白，在不同基因型间高度保守[23]；这间接表明开发针对pS273R靶点的抑制剂可能具有跨基因型应用潜力。然而，两株病毒均受抑制不能直接证明S273R就是黄酮醇的作用靶点，分子对接结果仅为计算预测，仍需通过酶活实验、表面等离子共振或生物层干涉等直接结合实验以及Asn187、His168、Pro194等关键位点突变实验加以验证。

黄酮醇结构相对简单、易于合成和衍生化修饰，本研究初步预测了其与S273R的结合模式，可作为基于靶点结构优化先导化合物的起点。后续研究可围绕作用靶点、抗病毒机制和成药性开展研究。通过S273R重组蛋白酶活性试验验证黄酮醇对酶活的直接抑制并结合生物层干涉（BLI）或微量热泳动（MST）测定其与S273R的结合亲和力。在此基础上，构建Asn187、His168和Pro194等关键位点突变体，确认这些残基在配体结合和抑制作用中的贡献。此外，通过病毒吸附、内吞和融合等分阶段实验，明确黄酮醇在共孵育条件下发挥抗病毒作用的具体阶段和机制。围绕黄酮醇母核开展构效关系研究，通过结构修饰提高抗病毒活性和选择性，并改善溶解性和药代动力学性质，最终在动物模型中评价黄酮醇及其衍生物的体内抗ASFV药效和安全性。总体而言，本研究为黄酮醇作为抗ASFV候选先导化合物的进一步研究提供了初步实验依据，同时提示S273R可能是其潜在作用靶点之一，但其直接靶向关系仍有待进一步试验验证。

参 考 文 献

[1] Dixon L K, Stahl K, Jori F, et al. African swine fever epidemiology

and control[J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2020, 8: 221-246.

[2] Karger A, Pérez-Núñez D, Urquiza J, et al. An update on African swine fever virology[J/OL]. Viruses, 2019, 11(9): 864. https://doi.org/10.3390/v11090864.

[3] Tao D,Sun D,Liu Y,et al.One year of African swine fever outbreak in China[J/OL]. Acta Tropica, 2020, 211: 105602. https://doi. org/10.1016/j.actatropica.2020.105602.

[4] Zhang Y,Wang Q,Zhu Z,et al.Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis[J/OL]. Transboundary and Emerging Diseases, 2023, 2023: 4820809. https://doi.org/10.1155/2023/4820809.

[5] Blome S, Franzke K, Beer M. African swine fever: a review of current knowledge[J/OL]. Virus Research, 2020, 287: 198099. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099.

[6] Wang F,Zhang H,Hou L,et al.Advance of African swine fever virus in recent years[J]. Research in Veterinary Science, 2021, 136: 535-539.

[7] 孟玉学,杨为敏.非洲猪瘟对全球养猪业的影响及应对措施[J].养殖与饲料,2026,25(6): 24-28.

[8] Arabyan E,Kotsynyan A,Hakobyan A,et al.Antiviral agents against African swine fever virus[J/OL].Virus Research,2019,270: 197669. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197669.

[9] 张子怡,耿彬彬,朱振博,等.中药及其提取物抗非洲猪瘟研究进展[J].养殖与饲料,2026,25(6):1-7.

[10] Guo Y,Ma A,Wang X,et al.Research progress on the antiviral activities of natural products and their derivatives: structure-activity relationships[J/OL].Frontiers in Chemistry,2022,10:1005360.https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1005360.

[11] Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, et al. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections[J]. Archives of Virology, 2017, 162(9):2539-2551.

[12] Arabyan E,Hakobyan A,Hakobyan T,et al.Flavonoid library screening reveals kaempferol as a potential antiviral agent against African swine fever virus[J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 736780. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736780.

[13] Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, et al. Inhibition of African swine fever virus Infection by Genkwanin[J]. Antiviral Research, 2019,167:78-82.

[14] Jo S,Kim S,Shin D H,et al.Inhibition of African swine fever virus protease by myricetin and myricitrin[J].Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry,2020,35(1):1045-1049.

[15] Alejo A,Andrés G,Salas M L.African swine fever virus proteinase is essential for core maturation and infectivity[J].Journal of Virology,2003,77(10):5571-5577.

[16] Li G,Liu X,Yang M,et al.Crystal structure of African swine fever virus pS273R protease and implications for inhibitor design[J/OL]. Journal of Virology,2020,94(10):e02125-19.https://doi.org/10.1128/JVI.02125-19.

[17] Carrascosa A L,Santarén J F,Viñuela E.Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages[J].Journal of virological methods,1982,3(6):303-310.

[18] Mouffouk C, Mouffouk S, Mouffouk S, et al. Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-Dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2)[J/OL].European Journal of Pharmacology, 2021, 891: 173759. https://doi. org/10.1016/j.ejphar.2020.173759.

[19] Morimoto R,Hanada A,Matsubara C,et al.Anti-influenza a virus activity of flavonoids *in vitro*: a structure-activity relationship[J].Journal of Natural Medicines,2023,77(1):219-227.

[20] Lani R, Hassandarvish P, Shu M H, et al. Antiviral activity of selected flavonoids against chikungunya virus[J]. Antiviral Research, 2016,133:50-61.

[21] Andrés G, Alejo A, Simón-Mateo C, et al. African Swine fever virus protease,a new viral member of the SUMO-1-specific protease family[J].Journal of Biological Chemistry,2001,276(1):780-787.

[22] Liu B, Cui Y, Lu G, et al. Small molecule inhibitor E-64 exhibiting the activity against African swine fever virus pS273R[J/OL]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2021, 35: 116055. https://doi. org/10.1016/j.bmc.2021.116055.

[23] Wang Z,Jia L,Li J,et al.Pan-Genomic analysis of African swine fever virus[J].Virologica Sinica,2020,35(5):662-665.

【责任编辑:赵琳琳】