

北京交通大学

硕士学位论文

小分子化合物 RSV-A-4 和 6-MMP_r 抗呼吸道合胞病毒的药效学
及机制研究

The pharmacodynamics and mechanism of RSV-A-4 and 6-MMP_r
against respiratory syncytial virus

作者：程宁宁

导师：郑妍鹏

北京交通大学

2021 年 6 月

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解北京交通大学有关保留、使用学位论文的规定。特授权北京交通大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，提供阅览服务，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。学校可以为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递服务和交换服务。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：程宇宁 导师签名：郑母鹏

签字日期：2021年06月04日 签字日期：2021年06月04日

学校代码: 10004

密级: 公开

北京交通大学

硕士学位论文

小分子化合物 RSV-A-4 和 6-MMP_r 抗呼吸道合胞病毒的药效学
及机制研究

The pharmacodynamics and mechanism of RSV-A-4 and 6-MMP_r
against respiratory syncytial virus

作者姓名: 程宁宁

学 号: 18121611

导师姓名: 郑妍鹏

职 称: 副教授

学位类别: 理学

学位级别: 硕士

学科专业: 生物学

研究方向: 生物药物基础与应用

北京交通大学

2021 年 6 月

致谢

韶华易逝，岁月流年，随着毕业论文的修订工作接近尾声，我的三年硕士研究生学习阶段也即将画上一个圆满的句号，即将告别校园生活，真正踏入社会去打拼属于自己的一片天地。时光如白驹过隙，弹指一瞬间，最美好的青葱岁月留在了北京交通大学生研院，能在这里与各位优秀同学和老师们的共同学习，我深感荣幸。这三年来勤勤恳恳、求是笃学，虽然没有特别闪光的成就，但是在各位老师、同学的帮助下，也学到了很多专业上的系统知识和生活中的为人处世，以及一些思维方法，看待问题的角度和处理方式，受益颇多，在此深表谢意。

感谢郑妍鹏老师在我三年的硕士学习期间，不仅在学业上给我以指导，同时还在思想、生活上给我以关怀，郑老师在我实验过程经常给予我督促与指导，能够成为您的学生，我倍感荣幸，感谢您这三年来的付出与教诲。

感谢付远辉老师对我的课题选题和设计提出了重要的指导意见，在日常实验过程中及时提出许多宝贵建议，为我课题的顺利开展提供了重要保障。

感谢何金生老师的耐心指导，何老师严谨的治学态度、精益求精的工作作风让我获得了除专业知识外更为宝贵的财富，必将使我受益终生。

感谢课题组每一位老师的教育和培养，感谢生研院每一位老师的指导和帮助。感谢徐竹欣师姐、苏彦斌师兄在开展相关实验工作中给我的帮助，感谢赵敏师妹和丁惠如师妹对我科研和生活上的帮助和支持，感谢实验室所有师兄师姐、师弟师妹和同窗同学们的关心和帮助。

感谢中国医学科学院医药生物技术研究所以岑山教授和王玉成教授，法国巴黎-萨克雷大学 Jean-Francois Eleouet 教授和圣康丁昂伊夫利纳-凡尔赛大学的 Marie-Anne Rameix-Welti 博士，在实验材料、实验方法和论文撰写等方面，他们提供了宝贵的支持和帮助。

最后感谢父母对我的养育之恩，正是在父母精神上给予支持和物质上提供保障的帮助下，我才能够有机会踏入科研的大门，继续进行深造。

摘要

目的: 将课题组前期经抗人呼吸道合胞病毒 (Human respiratory syncytial virus, RSV) 药物高通量筛选平台筛选出的先导化合物6344B-E6进行结构优化后, 继续筛选出活性骨架化合物RSV-A-4, 并将其与免疫抑制剂代谢产物6-MMPr分别用于抗RSV活性的体内外药效学研究, 以期探寻安全、有效的抗RSV小分子化合物并探讨其可能的抗病毒作用机制。

方法: (1) 采集志愿者呼吸道上皮细胞样本, 分离细胞后, 进行原代人呼吸道上皮细胞 (HAEC) 的培养, 并进行细胞形态、活性鉴定; (2) 在人喉表皮样癌细胞系 (HEp-2) 上, 将前期筛选的 6344B-E6 经免疫斑法和 MTS 法验证其体外抗 RSV 活性及细胞毒性后, 将其进行结构优化, 获得 29 种衍生化合物; (3) 应用上述同样的免疫斑法和 MTS 法在 HEp-2 细胞系上筛选衍生化合物库; 选取安全系数 (SI 值) 大于 10 的 15 种衍生化合物在正常人支气管上皮细胞系 (BEAS-2B) 上验证其体外抗 RSV 活性及细胞毒性, 最后选取安全系数最高的 3-硫代吡啶类 RSV-A-4 做为活性骨架化合物, 并在 HAEC 上进一步验证其抗 RSV 活性及细胞毒性; (4) 在 HAEC 细胞株上, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 与 Time-of-addition assay 技术探讨 RSV-A-4 抑制 RSV 复制的作用机制; (5) 以 BALB/c 小鼠为模型, 结合活体成像技术探讨 RSV-A-4 体内抗 RSV 的药效学效果; (6) 按照上述同样方法, 对 6-MMPr 进行 HEp-2、BEAS-2B 及 HAEC 三种细胞系的体外药效学及 BALB/c 小鼠体内药效学效果检测, 并探讨 6-MMPr 抑制 RSV 复制的作用机制。

结果: (1) 培养的 HAEC 经鉴定后, 其体外培养存活率可达 93.51%, 完全满足后续实验要求; (2) 6344B-E6 的衍生化合物 RSV-A-4 在 HEp-2、BEAS-2B 和 HAEC 细胞的半数抑制浓度 (Half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 $2.51 \pm 0.64 \mu\text{M}$, $0.41 \pm 0.19 \mu\text{M}$ 和 $207.3 \pm 4.77 \mu\text{M}$, 在 HEp-2 和 BEAS-2B 细胞的半数细胞毒性浓度 (Half maximal cytotoxic concentration, CC_{50}) 分别为 $3038.00 \pm 193.24 \mu\text{M}$ 和 $2192.67 \pm 168.20 \mu\text{M}$, 而对 HAEC 细胞则几乎无毒性; 6-MMPr 在 HEp-2、BEAS-2B 和 HAEC 细胞的 IC_{50} 分别为 $11.25 \pm 0.54 \mu\text{M}$, $1.25 \pm 1.17 \mu\text{M}$ 和 $3191 \pm 6.106 \mu\text{M}$, CC_{50} 则分别为 $119.1 \pm 23.76 \mu\text{M}$, $148.13 \pm 11.90 \mu\text{M}$ 和 $95526 \pm 10.97 \mu\text{M}$; (3) 在 HAEC 细胞中, RSV-A-4 和 6-MMPr 均是在 RSV 病毒基因组复制阶段抑制 RSV 的复制; (4) BALB/c 小鼠体内药效学实验结果显示,

RSV-A-4 和 6-MMP_r 均未能在小鼠体内显示其抗 RSV 感染活性。

结论: (1) 成功建立了可用于抗 RSV 药物体外评价的 HAEC 的培养方法; (2) RSV-A-4 和 6-MMP_r 在细胞水平均能有效抑制 RSV 复制, 且都是在病毒基因组复制阶段抑制 RSV 活性; (3) RSV-A-4 和 6-MMP_r 均不能在 BALB/c 小鼠模型上有效抑制 RSV 复制。

关键词: 抗病毒化合物; 人呼吸道合胞病毒; 人原代呼吸道上皮细胞; 构效优化; 药效学; 作用机制

ABSTRACT

Objective: The active molecule RSV-A-4 was screened from the derivatives of the lead compound 6344B-E6, which was screened by the previous high-throughput screening assay for compounds against human respiratory syncytial virus (RSV). Then the anti-RSV activities of RSV-A-4 and the immunosuppressant metabolites 6-MMP_r were investigated *in vivo* and *in vitro*, and the mechanism of anti-RSV activity was also studied as to find safe and effective compounds inhibiting RSV replication and explore the possible antiviral mechanism.

Methods: (1) The respiratory tract epithelial cells from volunteers were collected and cultured, then the morphology, activity and purity were identified. (2) After the anti-RSV activity and cytotoxicity of 6344B-E6 were evaluated by immunospot and MTS methods on human laryngeal carcinoma epithelioid cell line (HEp-2), 6344B-E6 were designed and synthesized and 29 derivatives were obtained. (3) The same immunospot and MTS methods were used to detect the anti-RSV activity and cytotoxicity of 29 derivatives on HEp-2. And 15 derivatives with safety factor (SI value) greater than 10 were selected to verify the anti-RSV activity and cytotoxicity on normal human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). Finally, 3-thioindole RSV-A-4 with the highest SI was selected as the active compound, and its anti-RSV activity and cytotoxicity were further verified on HAEC. (4) Fluorescence real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Time-of-addition assay were used to explore the mechanism of RSV-A-4 inhibiting RSV replication on HAEC cell. (5) The *in vivo* anti-RSV activity of RSV-A-4 was studied in BALB/c mice by small animal imaging technology. (6) Based on the above methods, the *in vivo* and *in vitro* anti-RSV activities of 6-MMP_r were performed on HEp-2, BEAS-2B, HAEC and in BALB/c mice, the mechanism of 6-MMP_r inhibiting RSV replication was also explored.

Results: (1) After identification, the survival rate of cultured HAEC *in vitro* reached 93.51%. (2) The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the 6344B-E6

derivative RSV-A-4 in HEp-2, BEAS-2B and HAEC cells were $2.51 \pm 0.64 \mu\text{M}$, $0.41 \pm 0.19 \mu\text{M}$ and $207.3 \pm 4.77 \mu\text{M}$, respectively, The half maximal cytotoxic concentration (CC_{50}) of HEp-2 and BEAS-2B cells were $3038.00 \pm 193.24 \mu\text{M}$ and $2192.67 \pm 168.20 \mu\text{M}$, respectively, while it was almost non-toxic to HAEC cells; 6-MMP_r was found in HEp- 2. The IC_{50} of BEAS-2B and HAEC cells are $11.25 \pm 0.54 \mu\text{M}$, $1.25 \pm 1.17 \mu\text{M}$ and $3191 \pm 6.106 \mu\text{M}$, respectively, while CC_{50} is $119.1 \pm 23.76 \mu\text{M}$, $148.13 \pm 11.90 \mu\text{M}$ and $95526 \pm 10.97 \mu\text{M}$, respectively; (3) The investigations of the anti-RSV mechanisms of RSV-A-4 and 6-MMP_r indicate that both of them inhibit RSV replication in the genome replication/transcription phase of RSV. (4) The results of pharmacodynamics in BALB/c mice showed that RSV-A-4 and 6-MMP_r failed to inhibit RSV infection *in vivo*.

Conclusion: (1) The culture method of HAEC, which can be used to evaluate the anti-RSV drugs *in vitro*, was successfully established. (2) Both RSV-A-4 and 6-MMP_r could effectively inhibit RSV replication at the cellular level, and they inhibit RSV replication at the viral genome replication stage. (3) Both RSV-A-4 and 6-MMP_r could not inhibit RSV infection in BALB/c mice.

Keywords: Antiviral compounds; human respiratory syncytial virus; human respiratory epithelial cells; structure-activity optimization; pharmacodynamics; mechanism of action.

目录

摘要.....	iii
ABSTRACT.....	v
1 引言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 抗 RSV 药物研发现状.....	3
1.3 人呼吸道上皮细胞.....	5
1.4 研究内容及意义.....	6
2 实验材料.....	8
2.1 细胞株、病毒株和质粒.....	8
2.2 抗 RSV 化合物.....	8
2.3 主要耗材、抗体与试剂盒.....	8
2.4 主要生化试剂.....	10
2.5 主要实验仪器.....	12
2.6 主要溶液配制.....	13
3 实验方法.....	16
3.1 HEp-2、NIH/3T3 细胞培养.....	16
3.1.1 HEp-2、NIH/3T3 细胞复苏.....	16
3.1.2 HEp-2、NIH/3T3 细胞传代.....	16
3.1.3 HEp-2、NIH/3T3 细胞冻存.....	17
3.2 BEAS-2B 细胞培养.....	17
3.2.1 预处理细胞培养瓶.....	17
3.2.2 BEAS-2B 细胞复苏.....	17
3.2.3 BEAS-2B 细胞传代.....	18
3.2.3 BEAS-2B 细胞冻存.....	18
3.3 人原代呼吸道上皮细胞 (HAEC) 培养.....	19
3.3.1 滋养层细胞制备.....	19
3.3.2 HAEC 标本获取.....	19
3.3.3 HAEC 传代.....	20
3.3.4 HAEC 冻存.....	21
3.3.4 HAEC 复苏.....	21

3.3.5 HAEC 形态学观察	22
3.3.6 HAEC 活力鉴定	22
3.3.7 HAEC 免疫荧光染色鉴定	23
3.3.8 RSV 感染 HAEC.....	24
3.4 RSV 病毒培养、纯化及检测	24
3.4.1 RSV 病毒培养	24
3.4.2 RSV 病毒纯化	25
3.4.3 免疫斑法检测 RSV 病毒滴度	25
3.4.4 结晶紫法检测病毒滴度	26
3.4.5 荧光定量分析检测纯化后 RSV 病毒滴度	27
3.4.6 RT-qPCR 分析检测 RSV 病毒滴度	27
3.5 RSV-A-4 和 6-MMPr 体外抗病毒活性分析	29
3.6 RSV-A-4 和 6-MMPr 体外抗 RSV 机制研究.....	31
3.6.1 Time of addition assay 分析复制环节.....	31
3.7 RSV-A-4 和 6-MMPr 体内抗 RSV 活性分析	32
3.7.1 实验动物分组、病毒感染剂量和给药途径	32
3.7.2 小鼠肺组织匀浆制备	33
3.7.3 免疫斑法检测肺脏病毒滴度	34
3.7.4 RT-qPCR 检测小鼠肺脏病毒滴度	35
3.8 统计学分析.....	37
4 实验结果.....	38
4.1 HEp-2、BEAS-2B 细胞培养	38
4.2 HAEC 细胞培养	39
4.2.1 HAEC 形态学观察	39
4.2.2 HAEC 活力测定	41
4.2.3 HAEC 免疫荧光染色鉴定	41
4.3 RSV 感染 HAEC	42
4.4 RSV-A-4 和 6-MMPr 抗 RSV 活性及机制研究.....	43
4.4.1 先导化合物 6344B-E6 的理化性质.....	43
4.4.2 6344B-E6 具有较好的抗 RSV 活性	43
4.4.3 6344B-E6 衍生化合物库抗 RSV 活性分析.....	44
4.4.4 6-MP, 6-TI 及 6-MMPr 的体外抗病毒活性.....	47

4.4.5 基于 HAEC 的 RSV-A-4 与 6-MMP _r 体外抗病毒活性	48
4.4.6 RSV-A-4 与 6-MMP _r 的体外抗病毒机制研究	49
4.5 RSV-A-4 与 6-MMP _r 的体内抗病毒活性研究	50
4.5.1 RSV-A-4 无明显体内抗病毒活性	50
4.5.2 6-MMP _r 无明显体内抗病毒活性	52
5 讨论	54
6 结论	56
附录	61
作者简介	63
独创性声明	64
学位论文数据集	65

1 引言

1.1 研究背景

人呼吸道合胞病毒 (Human Respiratory syncytial virus, hRSV) 是人类呼吸道疾病的重要病原体, 是导致儿童下呼吸道疾病和毛细支气管炎的主要原因, 也是老年人和免疫功能低下者发病和死亡的重要原因^[1, 2]。有研究表明^[3], RSV 是引起 2 岁以下儿童住院治疗最常见的原因之一, 并且明显与发病率和死亡率相关。在老年人、免疫功能低下的成年人或患有其它呼吸道疾病的患者中, RSV 感染者的发病率和死亡率明显更高^[4]。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计, 全球每年约有 3380 万人感染 RSV, 其中约有 20 万婴幼儿因感染 RSV 而死亡^[5], 且 RSV 感染致死患者主要集中在发展中国家, 因此, 与 RSV 相关的呼吸道感染成为了全世界主要的公共卫生问题之一。

RSV 是一种非节段的单股负链、有包膜的 RNA 病毒, 属肺病毒科、正肺病毒属^[6-8], 直径范围为 60~200 nm, 其基因组全长约 15.2 kb, 含 10 个基因, 可编码 11 种蛋白质^[9], M2 基因有两个重叠的 ORFs, 编码 M2-1 (转录加工因子) 和 M2-2 (转录到基因组复制转换的调控蛋白质), 见图 1-1。最先转录的基因是非结构蛋白 1 (Nonstructure protein 1, NS1) 和非结构蛋白 2 (Nonstructure protein 2, NS2), 其功能是抑制凋亡和干扰素反应。在 RSV 病毒颗粒的脂质双分子层镶嵌有小疏水蛋白 (Small hydrophobic protein, SH)、黏附糖蛋白 (Attachment glycoprotein, G) 和融合糖蛋白 (Fusion glycoprotein, F), SH 形成五聚体离子通道参与延迟感染细胞凋亡, G 参与病毒的吸附过程, F 在细胞表面介导膜融合。Viral envelope 由一层基质蛋白 (Matrix protein, M) 和 M2-1 支撑, M 蛋白是一种非糖基化结构蛋白, 位于 viral envelope 内, 与 F 蛋白胞内区连接在一起; M2-1 介导 M 与核糖核蛋白复合物 (Ribonucleoprotein complexes, RNPs) 之间的联系, RNPs 包含有与核蛋白 (Nucleoprotein, N) 紧密结合的病毒基因组 RNA, RNPs 也与由大聚合酶亚基 (Large polymerase subunit, L)、磷酸蛋白聚合酶辅助因子 (Phosphoprotein polymerase cofactor, P) 和 N 组成的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase complex, RdRp) 连接在一起。

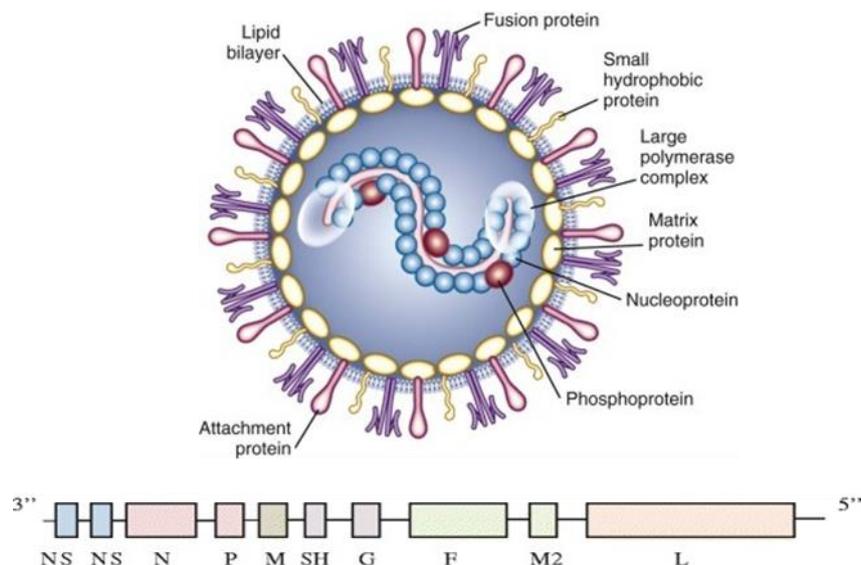


图 1-1 RSV 结构及基因组图示^[12]

Figure 1-1 RSV structure and genome diagram^[12]

RSV 感染宿主细胞时，首先在 G 蛋白介导的吸附作用下，吸附于宿主细胞表面，随后，在 F 蛋白介导的融合作用下，与宿主细胞膜融合，进而将病毒 RNA 释放到细胞质中，利用病毒自身的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶进行转录，同时利用宿主细胞成份进行翻译和复制，装配成 RSV 病毒颗粒后，以出芽的方式释放到细胞外^[13-15]，感染过程如图 1-2 所示。

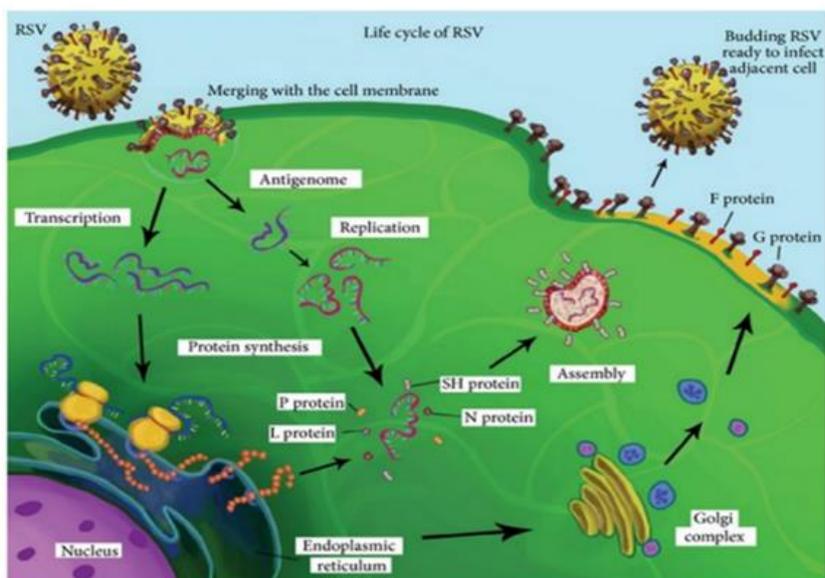


图 1-2 RSV 感染细胞的全过程^[16]

Figure 1-2 The whole process of RSV infection of cells^[16]

1.2 抗 RSV 药物研发现状

RSV 感染引起的急性下呼吸道综合征 (RSV-ALRI) 是威胁全球健康的重要问题之一, 治疗该疾病的费用给全球带来了极大的经济负担^[17]。全球每年因 RSV 感染引发急性下呼吸道疾病约 3300 万人, 其中约 20 万人因感染 RSV 而死亡, 其中在 6 月龄以下的儿童中, 因 RSV-ALRI 导致住院的有 1400 万人, 导致死亡约有 2.8 万人^[18]。

尽管从 20 世纪 60 年代起就已开始开发 RSV 疫苗和研发治疗药物, 但遗憾的是, 目前不仅仍无安全、有效的疫苗问世, 且针对 RSV 感染的抗病毒治疗药物也非常有限, 到目前为止, 也仅有利巴韦林 (Ribavirin) 和帕利珠单抗 (Palivizumab) 两种药物用于防治 RSV 感染。Ribavirin 是一种广谱抗病毒药物, 用于治疗急性 RSV 感染, 已被美国食品和药物监督管理局 (FDA) 批准以雾化形式用于治疗严重感染 RSV 的婴幼儿, 但因 Ribavirin 疗效欠佳, 副作用大, 有一定的健康风险, 并不建议常规使用^[19,20]。Palivizumab 是特异性针对 RSV F 蛋白的人源化单克隆抗体, 已获 FDA 批准, 可用于预防高危婴幼儿因 RSV 感染而引发严重下呼吸道疾病, 但其价格昂贵且不能用于 RSV 感染后的治疗^[21-23]。因此, 综上可知, 市售的 Ribavirin 和 Palivizumab 因其固有缺陷, 大大限制了其临床应用。

截至目前, 已经相继设计了多种抗 RSV 的药物, 并开展了临床前或临床试验研究, 为了简单起见, 我们将其主要分为抗体药物、核苷类似物、融合抑制剂及炎症靶向药物等, 具体如下:

(1) 抗体药物: 1996 年, 免疫球蛋白 RSV-IGIV (RespiGam) 被用于预防患有支气管肺发育不良或早产的幼儿中严重的 RSV 相关下呼吸道疾病^[24]。但 RSV-IGIV 于 2003 年停产, 取而代之的是识别 RSV F 中和抗原表位 siteII 的人源化单克隆抗体 palivizumab (Synagis), 在 RSV 流行季节, 用于预防高危婴幼儿因 RSV 感染引起的严重下呼吸道疾病, 但不能用于 RSV 感染后治疗, 且费用昂贵。Palivizumab 不能阻止 F 构象变化的触发, 它可能通过阻止中间体向融合后构象的转化来阻止病毒进入和膜融合。2015 年, 识别 RSV F 中和抗原表位 site V 的 REGN2222 也被 FDA 授予了预防 RSV 引起的严重下呼吸道疾病的快速通道地位, 但 III 期临床实验结果显示, REGN2222 在婴儿中并不能有效预防 RSV 感染, 在一个亚组患者中甚至未能表现出疗效^[25]。识别 RSV F 中和抗原表位 siteO 的 MEDI8897 能够阻止 RSV F 由融合前构象向融合后构象转变, 且因基因工程改造的 Fc 区, 具有更长的血清半衰期, IIb 期临床实验显示, 单剂量 MEDI8897 能够预防婴幼儿因 RSV 感染引起的严重下呼吸道疾病^[26-27]。ALX-0171 是一种

三价 RSV-F 特异性纳米抗体, 耐受性良好, 对呼吸频率, 喘息, 体温等临床参数产生积极影响, 但 IIb 期临床试验显示其并不能改善临床病程、降低肺病毒载量^[28-31]等。这些结果提示, RSV 单克隆抗体的研究应集中于早期干预和在下呼吸道炎症发生前, 一旦 RSV 下呼吸道感染发生, RSV 单克隆抗体可能无法改善临床病程。识别 RSV F 中和抗原表位 siteIV 的 MK-1654 I 期临床试验显示具有较好的安全性, 目前正在开展 II 期临床试验^[32]。

(2) 核苷类似物: ALS-008176 是一种核苷类似物, 是针对 RSV 聚合酶的一种抑制剂, 具有较高的口服生物利用度, 经口服治疗的非洲绿猴临床前研究证明了其有效的抗病毒活性^[33, 34]。

(3) 融合抑制剂: Presatovir (GS-5806) 是口服 RSV 融合抑制剂, 目前临床试验阶段已完成, 可通过阻断病毒-细胞融合过程来阻止 RSV 进入, 口服 Presatovir 可降低病毒载量和减轻疾病的严重程度^[35-37]。MDT-637 临床试验阶段已完成, 可抑制 RSV 进入细胞, 以吸入的干粉形式进行治疗, 结果表明其在健康成年人中具有较高的安全性和理想的药代动力学特征^[38, 39]。JNJ-53718678 是有效的 RSV 特异性融合抑制剂, 体外和动物模型实验结果显示其具有较高的抗 RSV 活性, 正处于 Ib 期临床试验阶段^[40]。AK-0529 是一种新型化合物, 可通过阻断病毒进入靶细胞来抑制 RSV 复制, I 期临床试验表明, 该药物不仅具有良好的耐受性, 并且符合标准的安全性要求, 目前正处于婴幼儿 II 期临床试验阶段^[41]。TMC353121 是取代苯并咪唑 RSV 融合抑制剂, 临床前研究结果显示病毒载量以剂量依赖的方式减少并降低了肺部炎症, 其可能是治疗 RSV 感染的候选药物, 但仍需要进行安全性研究和更多的临床评估^[42, 43]。JNJ-2408068、JNJ-49153390、TMC-353121、BMS-433771 及 BTA-9881 等融合抑制剂都是通过与 RSV F 融合前构象结合而起抗病毒作用^[44]。

(4) 炎症靶向药物: 因 RSV 感染而产生的炎症反应被认为是 RSV 发病机理的主要组成部分, 因此, 靶向发炎反应的药物已被作为治疗 RSV 相关疾病的策略。Danirixin (GSK1325756) 是一种可逆的 CXCR2 拮抗剂, 最初是作为与中性粒细胞积聚相关疾病的抗炎药开发的, 之后用来抑制 RSV 感染婴儿中嗜中性粒细胞活化, 但研究数据仍待发布^[45-48]。RV568 是用于治疗类风湿关节炎类的炎症性疾病, 近期已将其重新定位用于治疗 RSV 感染^[49]。

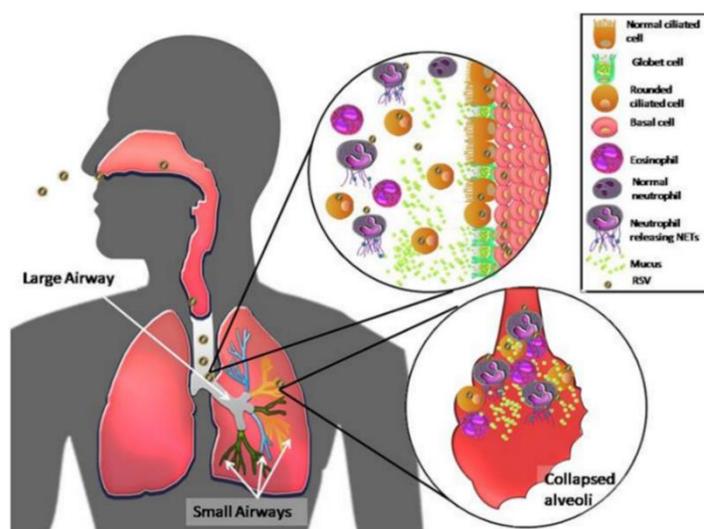
尽管 RSV 感染导致的社会和经济负担已经引起了人们的关注, 但是目前针对因 RSV 感染引发的疾病仍无尚可靠、高效的治疗方法或治疗药物, 因此, 探寻有效的治疗 RSV 感染的药物具有极其重要的临床意义。

1.3 人呼吸道上皮细胞

呼吸道上皮是呼吸道重要天然屏障,作为人类呼吸道与外界环境相连的第一道免疫防线,人呼吸道上皮细胞(Human Airway Epithelial Cell, HAEC)对维持防御功能和各项生理功能的运行起关键作用^[50],存在于呼吸道中的不同上皮细胞(包括纤毛细胞、杯状细胞、柱状细胞和基底细胞等^[51-53],其中,人呼吸道上皮腔表面 60%到 90%都是纤毛细胞)具有不同的特性,并且具有高度特异性功能。

RSV 进入上呼吸道后,病毒主要感染上呼吸道的纤毛细胞,病毒 NS 2 蛋白在呼吸道上皮的顶端区域诱导细胞变圆、挤出从而脱离,在呼吸道导管内腔中积累这些细胞^[54],如图 1-3 所示。RSV 还通过感染分化的基底细胞来诱导杯状细胞的增殖,这种分化会导致黏液的大量产生和嗜酸性粒细胞的募集以及呼吸道中大量嗜中性粒细胞的聚集,免疫细胞响应 RSV 感染释放中性粒细胞胞外陷阱(Neutrophil extracellular trap, NET),所有这些成分积聚并移至远端呼吸道,导致狭窄导管的支气管阻塞和肺泡塌陷,从而引起肺部急性炎症和肺病理^[55-57]。严重的 RSV 下呼吸道感染特征主要在于大量呼吸道上皮细胞的损伤,以及血管周围和细支气管周的单核细胞浸润^[58]。

由于缺乏合适的 RSV 感染动物模型,极大阻碍了对 RSV 感染的认识和抗 RSV 药物开发,目前,人们主要使用永生化的非极化上皮细胞系或 RSV 复制半允许动物模型开展抗 RSV 药物研究。永生化的呼吸道来源的细胞系(如:HEp-2、BEAS-2B 和 A549 细胞)虽然在抗 RSV 药物体外药效评价具有一定价值,但很难反映呼吸道上皮细胞的复杂性。啮齿动物模型(如:小鼠)对 RSV 感染是半允许的,也不能很有说服力地再现人类 RSV 感染特征,作为抗病毒药物功效评价具有一定的局限性。早期研究表明,在允许细胞极化的条件下培养时,原代呼吸道上皮细胞会发生显著的形态变化、准确地重现其正常的体内形态,与非极化的上皮细胞相比,极化的呼吸道上皮细胞能够最大程度地模拟体内呼吸道情况,因此,原代培养的呼吸道上皮细胞,尤其是分化良好的原代培养上皮细胞在抗 RSV 药物筛选、药效评价等受到广泛青睐。

图 1-3 人类呼吸道中 RSV 发病机理模型^[59]Figure 1-3 The pathogenesis model of RSV in the human respiratory tract^[59]

1.4 研究内容及意义

鉴于当前普遍严重的 RSV 感染现状及抗病毒药物的匮乏，本论文拟通过对课题组前期筛选的先导化合物 6344B-E6 进行结构优化后，再次筛选安全系数高的活性骨架化合物，不仅在体内外考察其抗 RSV 活性，也将探讨其中可能的作用机制；鉴于分化良好的原代培养上皮细胞在抗 RSV 药物筛选、药效评价方面的优越性，拟建立可用于抗 RSV 药物体外评价的 HAEC 的培养方法；鉴于硫唑嘌呤（AZA）及其三级代谢产物的广谱抗病毒作用，本论文还将对 6-MP、6-TI 及 6-MMP_r 进行同样的抗 RSV 的体内外药效学和抗病毒活性机制的初步探讨等研究工作。这些工作将为探寻安全、有效的抗 RSV 小分子化合物及阐明其可能的抗病毒作用机制提供重要的实验基础。

本研究的技术路线如下（图 1-4 所示）：

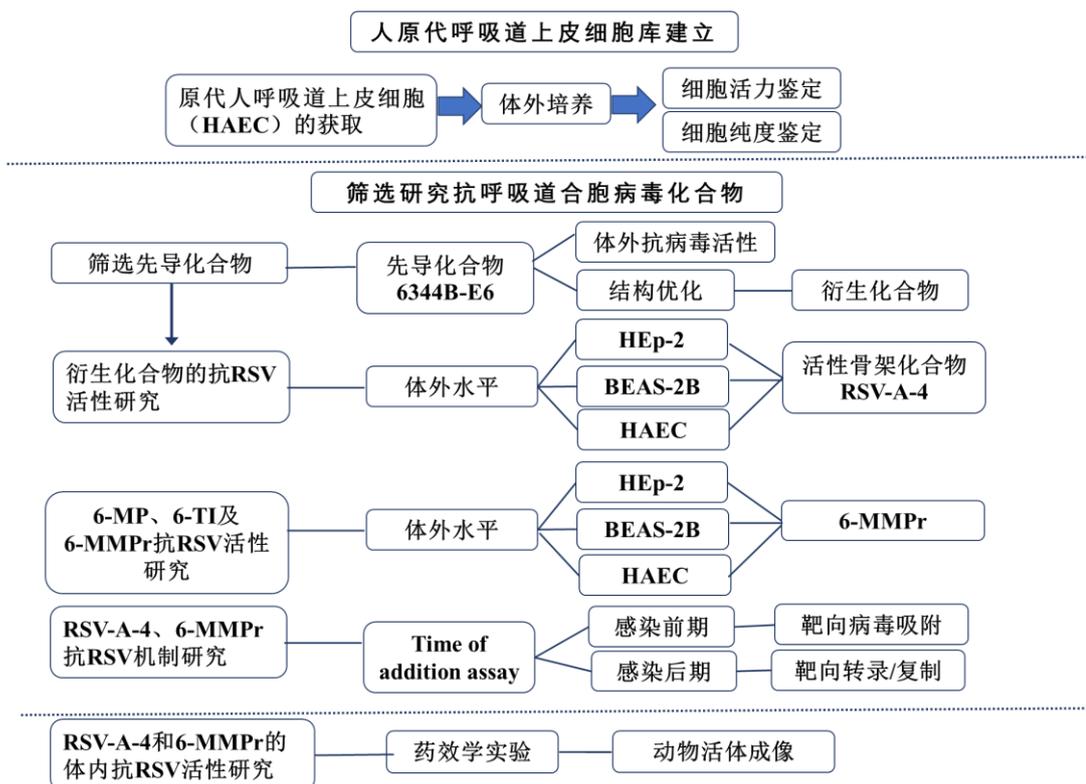


图 1-4 实验流程图

Figure 1-4 Experimental flow chart

2 实验材料

2.1 细胞株、病毒株和质粒

HEp-2 细胞（人喉表皮样癌细胞）为本研究院保存；BEAS-2B 细胞（正常人支气管上皮细胞）购自武汉大学中国典型培养物保藏中心；NIH/3T3 细胞（小鼠胚胎成纤维细胞）购自中国科学院上海细胞库；HAEC（Human Primary Airway Epithelial Cell，人原代呼吸道上皮细胞）本实验实培养；

野生型 RSV Long 株购自 ATCC, Rockefeller, MD, USA；RSV-mGFP、RSV-Luciferase 由法国圣康丁昂伊夫利纳-凡尔赛大学的 Marie-Anne Rameix-Welti 博士馈赠；

pMD-18T-N, pBR322B-RSV-Gluc 由本实验室保存；

2.2 抗 RSV 化合物

Ribavirin (TOPSCIENCE Cat.No.: T0684) 购自上海陶素生化科技有限公司；GS-5806 (Cat.No.: HY-16727) 和 RSV-604 (Cat.No.: A-60444) 购自 MCE, USA。

2.3 主要耗材、抗体与试剂盒

表 2-1 实验耗材、抗体与试剂盒
Table 2-1 Experimental materials, antibodies and kits

耗材、抗体与试剂盒名称	生产厂家
96 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
黑色透明底 96 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
48 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
24 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
12 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
6 孔细胞培养板	美国 Corning 公司
60 mm 细胞培养皿	美国 Corning 公司
100 mm 细胞培养皿	美国 Corning 公司

表 2-1 (续表)

150 mm 细胞培养皿	美国 Corning 公司
T75 细胞培养瓶	美国 Corning 公司
T25 细胞培养瓶	美国 Corning 公司
15、50 mL 离心管	美国 Corning 公司
2 mL 细胞冻存管	美国 Corning 公司
5 mL、10 mL、25 mL 移液管	美国 Corning 公司
0.22、0.45、0.8 μm 一次性针头滤器	美国 Millipore 公司
1 mL、5 mL、10 mL 医用注射器	美国 BD 公司
Nexcelom 细胞计数板	达科为生物有限公司
细胞刮刀	耐思公司
病毒冻存管	耐思公司
加样槽	耐思公司
细胞爬片 ($\phi 20\text{mm}$)	耐思公司
10、200、1000 μL 吸头 (带滤芯)	美国 Axygen 公司
灌胃针	北京泰瑞星生物有限公司
手术剪刀	北京泰瑞星生物有限公司
镊子	北京泰瑞星生物有限公司
一次性橡胶手套	北京宝如亿生物有限公司
一次性医用外科口罩	斯科赛斯公司
HRP-兔抗山羊 IgG	北京博奥龙生物科技有限公司
HRP-山羊抗小鼠 IgG	北京博奥龙生物科技有限公司
山羊抗人 RSV 多抗	美国 Millipore 公司
兔抗人角蛋白 8 单克隆抗体	英国 Abcam 公司
山羊抗兔 DyLight488 荧光二抗	英国 Abcam 公司
RNA 提取试剂盒	美国 Promega 公司
反转录试剂盒	美国 Promega 公司
SYBR Green 试剂盒	天根生化科技有限公司
QUBIT RNA HS ASSAY KIT	美国 Thermo 公司
RT Master Mix for qPCR	美国 MCE 公司

2.4 主要生化试剂

表 2-2 实验试剂
Table 2-2 Experimental reagents

试剂名称	生产厂家
谷氨酰胺	美国 Sigma 公司
沉淀型 TMB	美国 Sigma 公司
PMS 粉末	美国 Sigma 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma 公司
3',3',5,5'-四甲基联苯胺	美国 Sigma 公司
台盼蓝	美国 Sigma 公司
蔗糖 (v900116)	美国 Sigma 公司
EDTA	美国 Sigma 公司
胰岛素	美国 Sigma 公司
丝裂霉素 C	美国 Sigma 公司
表皮生长因子	美国 Sigma 公司
氢化可的松	美国 Sigma 公司
霍乱毒素	美国 Sigma 公司
腺嘌呤	美国 Sigma 公司
Y-27632	美国 Sigma 公司
2,2,2-三溴乙醇	美国 Sigma 公司
I-胶原蛋白	美国 Sigma 公司
沉淀型 TMB 溶液	美国 Promega 公司
MTS 粉末	美国 Promega 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
HEPES	美国 Gibco 公司
DMEM	美国 Gibco 公司
DMEM/F12	美国 Gibco 公司
0.05%EDTA 胰酶	美国 Gibco 公司
庆大霉素	美国 Gibco 公司
BEGM 培养基	瑞士 Lonza 公司
Bullet Kit™ Medium	瑞士 Lonza 公司
Reagent Pack™ Subculture Reagents	瑞士 Lonza 公司
PBS	北京索莱宝生物有限公司

表 2-2(续表)

RIPA 裂解液	Biosharp 公司
DAPI 荧光染核剂	Biosharp 公司
纤连蛋白	北京宝如亿生物有限公司
牛血清白蛋白	北京宝如亿生物有限公司
青霉素-链霉素双抗	Biological Industries 公司
青霉素-链霉素-两性霉素 B 三抗	Biological Industries 公司
免疫染色通透液 (Triton X-100)	上海碧云天生物技术有限公司
Dnase I	上海浩洋生物技术公司
胰酶	上海英潍捷基生物有限公司
小牛血清 (FCS)	上海英潍捷基生物有限公司
叔戊醇	Aladdin 公司
Avicel (FMC) RC581	Pythonbio 公司
柠檬酸	北京化工厂
氯化钠	北京化工厂
十二水合磷酸氢二钠	北京化工厂
磷酸二氢钾	北京化工厂
氯化钾	北京化工厂
乙二胺四乙酸 (EDTA)	北京化工厂
氯化镁	北京化工厂
氯化钙	北京化工厂
无水乙醇	北京化工厂
碳酸氢钠	北京化工厂
异丙醇	北京化工厂
氯仿	北京化工厂
HEPES 粉末	北京化工厂
硫酸镁	北京化工厂
无水硫酸铜	北京化工厂

2.5 主要实验仪器

表 2-3 实验仪器

Table 2-3 Experimental Instruments

仪器及型号	生产厂家
高压灭菌锅 SINCE-1889	日本 YAMATO 公司
电子天平 YP1002N	上海菁海仪器有限公司
Orion pH 计	美国 Thermo 公司
水平离心机 3K15	德国 SIGMA 公司
超速离心机 cp100wx	日本 HIMAC 公司
高速冷冻离心机 CR22G	日本 HIMAC 公司
紫外可见分光光度计 U-2800	日本 HITACHI 公司
微型高速冷冻离心机 3K30	德国 SIGMA 公司
制冰机	日本 Cornelius 公司
电热恒温水浴锅 KT622	上海精宏实验设备有限公司
磁力搅拌器 90-3	上海振荣科学仪器有限公司
台式振荡器 HZQ-C	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
普通冰箱 BCD-315TNGS	青海海尔股份有限公司
医用低温冰箱 DW-401278	青海海尔特种电器有限公司
医用冷藏冰箱 HYC-356	青海海尔特种电器有限公司
超低温冰箱 MTD225	日本 SANYO 公司
超纯水制备仪 F9NN7	美国 Millipore 公司
倒置显微镜 TS100	日本 Nikon 公司
倒置荧光显微镜 IEC-62471	日本 Nikon 公司
Qubit 4 荧光计	美国赛默飞世尔科技
细胞计数仪 MA01843	美国 Nexcelom Bioscience 公司
恒温二氧化碳细胞培养箱 4111	美国 Thermo SCIENTIFIC 公司
移液器 (全套)	法国 GILSON 公司
生物安全柜 HR1500-IIA2YK	青海海尔生物医疗股份有限公司
生化培养箱 SHP-150	上海精宏实验设备有限公司
酶标仪 Sunrise	瑞士 TECAN 公司
多功能酶标仪	美国 Thermo 公司
恒温培养振荡器 ZHWY-200B	上海智城分析仪器制造有限公司
迷你离心机 LX-300	海门市其林贝尔仪器制造有限公司

表 2-3 (续表)

PCR 仪 PTC-220	美国 BIO-RAD 公司
RT-qPCR 仪 q225-0189	北京酷博科技有限公司
高温烘烤箱	美国 Thermo SCIENTIFIC 公司
超微量分光光度计 T181246	德国 IMPLEN 公司
小动物活体成像系统 IVIS Lumina II	美国 PerkinElmer 公司

2.6 主要溶液配制

(1) 谷氨酰胺 (100×:100 mL) 溶液

称取 5.854 g 的 L-谷氨酰胺粉末, 加入 200 mL 超纯水中入, 搅拌充分, 待其完全溶解后, 用 0.22 μm 滤器过滤, 以 1 mL/支分装, 冻存于 -20°C 备用。

(2) 人原代呼吸道上皮细胞培养基 (F 培养基)

分别量取 400 mL 的 DMEM/F12 培养基、25 mL 未灭活的 FBS、500 μL 腺嘌呤 (24 mg/mL)、4.2 μL 霍乱毒素 (1 mg/mL)、250 μL 表皮生长因子 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、552.5 μL 氢化可的松 (0.362 mg/mL)、500 μL 胰岛素 (5 mg/mL)、1% 的 PS (100×) 和 1% 的 L-谷氨酰胺 (100×) 配制成 500 mL 人原代呼吸道上皮细胞培养基, 混匀后保存于 4°C 备用。

(3) 丝裂霉素 C 溶液

将 4 mL 无菌水加入到 2 mg 丝裂霉素 C 的瓶子中, 待丝裂霉素 C 溶解, 瞬离, 用 0.22 μm 滤器过滤至 15 mL 离心管中, 冻存于 -20°C 或短期保存于 4°C 备用。

(4) 腺嘌呤溶液

称取 24 mg 腺嘌呤, 溶解于 3 mL 的 NaOH 溶液 (1M) 中, 然后缓慢加入 7 mL DMEM, (如果腺嘌呤没有完全溶解在 3 mL 的 NaOH 中, 可以继续滴加 NaOH, 涡旋, 使腺嘌呤全部溶解后补加 DMEM, 终体积为 10 mL), 用 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 以 500 μL /支分装, 冻存于 -80°C 备用。

(5) 霍乱毒素溶液

将 0.5 mL 无菌水加入到 0.5 mg 霍乱毒素小瓶中, 霍乱毒素溶解后, 瞬离, 用注射器吸出溶液 (不要打开瓶盖, 以减少配制者与霍乱毒素的接触), 然后用 0.22 μm 滤器过滤到 15 mL 离心管中, 以 20-50 μL /支分装, 冻存于 -80°C 备用。

(6) 表皮生长因子溶液

在装有 0.1 mg 表皮生长因子(EGF)的小瓶中注入 5 mL 无菌水,溶解 EGF,瞬离或轻拍,使所有液体到达瓶底,用注射器将溶液吸出,然后用 0.22 μm 滤器过滤到 15 mL 离心管中,以 250 μL /支分装,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(7) 氢化可的松溶液

称取 7.24 mg 氢化可的松,溶解于 2 mL 95%乙醇中,然后加入 18 mL DMEM,然后用 0.22 μm 滤器过滤除菌,以 500 μL /支分装,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(8) 胰岛素溶液

称取 100 mg 胰岛素,溶解于 20 mL HCl 溶液(0.1N)中,然后用 0.22 μm 的滤器过滤除菌,以 500 μL /支分装,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(9) ROCK 抑制剂 Y-27632

将装有 10 mg ROCK 抑制剂 Y-27362 瓶中注入 624.5 μL 的 DMSO,轻轻摇晃溶解 Y-27632,以 10 μL /支分装,冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(10) BEAS-2B 细胞冻存液

在 10 mL 的 BEGM 培养基中加 1% PVP 和 7.5% DMSO,混匀于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(11) NIH/3T3 细胞冻存液(20 mL)

分别量取 10 mL FCS、2 mL DMSO 和 8 mL DMEM 配制成 10 mL 细胞冻存液,混匀于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(12) DPBS 溶液(500 mL)

称取 0.1 g KCl、4 g NaCl、0.1 g KH_2PO_4 和 1.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 加到约 400 mL 的去离子水中,用玻璃棒充分搅拌使其完全溶解,再加入 50 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 66.5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 搅拌使其溶解,调节 pH 至 7.35,用容量瓶定容到 500 mL 后备用。

(13) MTS 溶液

在光线较暗的环境中,称取 21 mg MTS 粉末于棕色试剂瓶里,然后量取 10.5 mL DPBS 溶液加入到该棕色试剂瓶中,室温条件下磁力搅拌,直至 MTS 粉末完全溶解,用 pH 计调节 pH 至 6.5,用 0.22 μm 滤器过滤除菌,以 1 mL/支分装至棕色 EP 管,保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(14) PMS 溶液

在光线较暗的环境中,称取 4.6 mg PMS 粉末于棕色试剂瓶里,然后加入 5 mL DPBS 溶液,充分搅拌,以 200 μL /支分装至棕色 EP 管,保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(15) 10% (w/w) 蔗糖溶液

称取 20 g 蔗糖, 溶解于 180 g PBS (1×) 缓冲液中, 充分搅拌, 配制成 10% 蔗糖溶液, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 保存于 4°C 备用。

(16) 1% 甲基纤维素维持液

称取 2 g 甲基纤维素粉末于干燥的试剂瓶中, 连同磁力搅拌子一起高压蒸汽灭菌后, 加入 200 mL 2% 细胞维持液, 4°C 条件下磁力搅拌至甲基纤维素完全溶解后, 保存于 4°C 备用。

(17) Avertin 溶液

100% Avertin 储存液: 称取 5 g 三溴乙醇, 加入 5 mL 叔戊醇, 充分搅拌直至充分溶解, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 室温避光密闭保存, 使用期限为 1 个月。

2.5% Avertin 工作液: 量取 1 mL 100% Avertin 储存液于 50 mL 离心管底, 缓慢贴壁加入 39 mL 无菌生理盐水, 将其放入 37°C 培养箱中静置加热 3~4 h 后, 充分摇匀, 室温放凉后, 4°C 避光密闭保存。(注: 未加热之前不可摇晃混合液)

(18) 微晶纤维素溶液

2.4% 微晶纤维素原液: 称取 2.4 g 的 Avicel RC581 高温灭菌后, 加入 100 mL 无菌水, 室温涡旋 1 h;

微晶纤维素覆盖液 (现配现用): 1/4 的 2× DMEM, 1/4 的 2.4% Avicel RC581 以及 1/2 的 2% FBS-DMEM-PS。

(19) 结晶紫染液:

分别取 25 mL 2% 结晶紫原液、10 mL 福尔马林溶液、20 mL 无水乙醇以及 45 mL 无菌水充分混匀, 配置成 100 mL 结晶紫工作液, 室温保存备用, 可反复使用。

3 实验方法

3.1 HEp-2、NIH/3T3 细胞培养

3.1.1 HEp-2、NIH/3T3 细胞复苏

1. 生物安全柜使用紫外灯照射 30 min，打开风机 3 min 后，使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面；
2. 将细胞由液氮罐中快速取出，立即放入 40°C 温水中进行融化；
3. 待细胞悬液完全融化之后，擦干细胞冻存管上的水，喷洒 75% 酒精，在生物安全柜中先在 15 mL 离心管中加入适量的培养基后，将细胞悬液转移至其中；
4. 150g，离心 5 min；
5. 弃上清，用 2 mL 细胞完全培养基缓慢吹打，重悬细胞沉淀，将其转移到装培养皿/培养瓶中，添加适量的培养基，“十”字摇匀，在倒置显微镜下观察细胞分布均匀后，37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.1.2 HEp-2、NIH/3T3 细胞传代

1. 观察细胞，当汇合度达到 90% 左右，进行传代；
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min，打开风机 3 min 后，使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面；
3. 弃去原培养基，用 PBS 洗涤后，加入适量胰酶后，放细胞培养箱中，37°C 下进行消化；
4. 倒置显微镜下观察细胞形态，当细胞变圆时，弃掉胰酶，轻轻拍打培养皿/培养瓶壁使细胞完全脱落，加培养基终止消化；
5. 按照所需比例吸取细胞悬液，转移至含有适量细胞完全培养基的新培养皿/培养瓶中，“十”字摇匀，在倒置显微镜下观察细胞分布均匀后，37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.1.3 HEp-2、NIH/3T3 细胞冻存

1. 观察细胞，当汇合度达到约 90%，且细胞状态良好时，准备冻存；
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min，打开风机 3 min 后，使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面；
3. 弃去原培养基，用 PBS 洗涤后，加入适量胰酶后，放细胞培养箱中，37°C 下进行消化；
4. 倒置显微镜下观察细胞形态，当细胞变圆时，弃掉胰酶，轻轻拍打培养皿/培养瓶壁使细胞完全脱落，加培养基终止消化，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中；
5. 150g，离心 5 min；
6. 弃去上清，用冻存液重悬细胞沉淀，细胞分散均匀后，按比例分装至细胞冻存管中，补加冻存液至冻存管体积的 2/3，注意标明细胞名称、冻存日期、细胞代数、培养皿/培养瓶型号、冻存者姓名等信息后，放入冻存盒中，置于 -80°C，24 h 后将细胞转移至液氮罐中保存备用。

3.2 BEAS-2B 细胞培养

3.2.1 预处理细胞培养瓶

1. 配制包被液：分别将 0.01 mg/mL 纤连蛋白、0.03 mg/mL I-胶原蛋白和 0.01 mg/mL 牛血清白蛋白（BSA）加入到 BEGM 培养基中混匀，4°C 条件下短期保存备用。
2. 将 2 mL 包被液加入到 T25 瓶中（4 mL/T75），轻轻摇动，使包被液涂满整个底面，将细胞培养瓶放入 37°C 培养箱中包被过夜（封闭瓶口，防止混合物蒸发），之后转到 4°C 保存备用（注：接种 BEAS-2B 细胞之前，要将包被液吸出）。

3.2.2 BEAS-2B 细胞复苏

1. 生物安全柜使用紫外灯照射 30 min，打开风机 3 min 后，使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面；
2. 将细胞由液氮罐中取出放入 37°C 温水中，轻轻摇动使其解冻（约 2 min），解冻后立即从温水中取出，喷洒 75% 酒精，在生物安全柜中将细胞悬液转移到

含有 BEGM 的 15 mL 离心管中；

3. 125g, 离心 10 min;
4. 小心去除上清, 用 BEGM 重悬沉淀, 转移至预处理的 T25 瓶中, 补加 8 mL BEGM 培养基, 轻轻摇匀, 在倒置显微镜下观察细胞分布均匀后, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.2.3 BEAS-2B 细胞传代

1. 待细胞长到 70~80%时进行传代 (注: 需在细胞达到完全汇合之前进行传代培养, 因为细胞汇合后会迅速进行鳞状末端分化);
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 弃去原培养基, 加入 2 mL Trysin/EDTA, 在显微镜下观察, 直到细胞变圆 (一般 5 min, 切记不可撞击和用力摇晃培养瓶), 加入 5 mL TNS (Trysin Neutralizing Solution) 终止消化, 轻轻晃动培养瓶, 使细胞完全脱落, 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中;
4. 125g, 离心 10 min;
5. 小心去除上清, 用 BEGM 培养基重悬细胞沉淀, 按 3000 cells/cm² 传代到预处理的培养瓶中, 轻轻摇匀, 在倒置显微镜下观察细胞分布均匀后, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

3.2.4 BEAS-2B 细胞冻存

1. 观察细胞, 当汇合度达到约 70%, 且细胞状态良好时, 准备冻存;
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 弃去原培养基, 加 2 mL Trysin/EDTA, 在显微镜下观察, 直到细胞变圆, 加入 5 mL TNS 终止消化, 轻轻晃动培养瓶, 使细胞完全脱落, 将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中;
4. 125g, 离心 10 min;
5. 小心去除上清, 用 BEAS-2B 细胞冻存液重悬沉淀, 转移到冻存管中, 补加冻存液至冻存管体积的 2/3, 注意标明细胞名称、冻存日期、细胞代数、培养皿/培养瓶型号、冻存者姓名等信息, 置于 -80°C, 24 h 后转移到液氮罐中保存备用。

3.3 人原代呼吸道上皮细胞 (HAEC) 培养

3.3.1 滋养层细胞制备

1. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
2. 配制丝裂霉素 C 溶液 (终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 量取 200 μL 的 0.5 mg/mL 丝裂霉素 C 原液至 10 mL DMEM (含 5% FBS), 混匀后备用;
3. 培养 NIH/3T3 细胞于 T75 培养瓶中, 直至汇合度为 90%;
4. 吸出培养瓶中的原培养基, 加入 10 mL 丝裂霉素 C 溶液, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中孵育 3 h;
5. 吸出丝裂霉素 C 溶液, PBS 洗涤 4 次; (将使用过的丝裂霉素 C 溶液收集到特别标记废液瓶中)
6. 加入 2 mL 胰酶, 室温消化 2 min, 在显微镜下观察, 直到细胞变圆, 轻拍瓶壁使细胞脱落;
7. 加入 10 mL NIH/3T3 培养基到培养瓶中, 将细胞转移到 50 mL 离心管中, 再用 10 mL NIH/3T3 培养基清洗培养瓶;
8. 300g, 离心 5 min, NIH/3T3 培养基重悬沉淀, 细胞计数;
9. 300g, 离心 5 min;
10. 冻存液重悬细胞沉淀, 按 2.5×10^6 cells /管, 转移到细胞冻存管中, 补加冻存液至冻存管体积的 2/3, 标明细胞名称、冻存日期、培养皿/培养瓶型号、冻存者姓名等信息, 放入冻存盒中, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$, 24 h 后转移到液氮罐中保存备用。

3.3.2 HAEC 标本获取

1. 准备工作: 取 HAEC 标本前一天, 复苏滋养层 NIH/3T3 细胞于 T25 细胞培养瓶中, 以 2.5×10^6 cells /瓶, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中过夜培养, 使细胞贴壁;
2. HAEC 标本获取: 请耳鼻喉医生将 2 个鼻拭子分别插入志愿者左右鼻孔, 至上鼻甲位置, 转动鼻拭子 6 圈, 尽可能多的获得细胞标本, 将同一个志愿者的 2 个鼻拭子放入同一个装有 NIH/3T3 培养基的 15 mL 离心管中, 立即放置于冰上;

3. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
4. 在生物安全柜中, 含有细胞样本的培养基同鼻拭子一起倒入培养皿中, 将鼻拭子浸入到培养基液面下, 使用无菌的镊子将鼻拭子上的细胞和粘液充分刮下来;
5. 将鼻拭子转移到原离心管中, 加入 2 mL PBS-EDTA 浸泡, 同时收集细胞-粘液混合物转移到新的离心管中, 用 2 mL PBS-EDTA 洗涤培养皿 2 次, 并转移到同一离心管中;
6. 1000 rpm, 涡旋 PBS-EDTA 浸泡的鼻拭子 30 s, 将上清 PBS-EDTA 转移到有细胞-粘液混合物的离心管中;
7. 450g, 离心 5 min, 小心倒掉上清 (不要吸取), 用 1 mL PBS-EDTA 重悬沉淀, 然后加入 4 mL PBS-EDTA, 细胞计数;
8. 450g, 离心 5 min, 加入 6 mL F 培养基重悬后, 铺在有滋养层细胞的 T25 培养瓶中, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱进行培养;
9. 每天更换 F 培养基, 吸出原培养基后, 逐滴加入新鲜的培养基;
10. 培养 HAEC 5 d 后, 更换为不加 Pen/strep 的培养基;
11. 待培养的 HAEC 汇合度达 50% 以上时进行传代, 若滋养层细胞出现死亡, 则需提前传代。

3.3.3 HAEC 传代

1. HAEC 传代前一天, 复苏滋养层细胞于 T25 培养瓶中, 以 2.5×10^6 cells/瓶, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中过夜培养, 使细胞贴壁;
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 吸出原培养基, 用 5 mL PBS-EDTA 洗涤后, 室温震荡, 同时观察滋养层细胞的脱落情况;
4. 5 min 后, 更换 PBS-EDTA, 继续震荡, 在显微镜下观察, 直至只有 HAEC 留在培养瓶表面;
5. 吸出 PBS-EDTA, 再加入 PBS-EDTA 洗涤 1 次;
6. 吸出 PBS-EDTA, 加入 2 mL 胰酶, 37°C 条件下消化 5 min, 轻拍瓶壁使 HAEC 脱落 (若大多数细胞未脱落, 则需在 37°C 下继续消化, 但总消化时间不超过 10 min), 用移液枪轻吹瓶壁, 使 HAEC 完全脱落;
7. 加入 5 mL NIH/3T3 培养基, 终止胰酶消化, 然后将细胞转移至 15 mL 离心

管中;

8. 5 mL NIH/3T3 培养基或 PBS-EDTA, 洗涤培养瓶 1 次, 转移到同一个离心管中;
9. 150g, 离心 5 min;
10. 用 F 培养基重悬后, 按相应的比例接种于滋养层细胞上。

3.3.4 HAEC 冻存

1. 观察细胞, 当汇合度达到约 80%, 且细胞状态良好时, 准备冻存;
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 吸出原培养基, 用 5 mL PBS-EDTA 洗涤, 室温震荡, 同时观察滋养层细胞的脱落情况, 5 min 后, 更换 PBS-EDTA, 继续震荡, 显微镜下观察, 直至只有 HAEC 留在培养瓶表面;
4. 吸出 PBS-EDTA, 再加入 PBS-EDTA 洗涤 1~2 次;
5. 吸出 PBS-EDTA, 加入 2 mL 胰酶, 37°C 条件下消化 5 min, 轻拍瓶壁使细胞脱落 (若大多数细胞未脱落, 则需在 37°C 下继续消化, 但总消化时间不超过 10 min), 用移液枪轻吹瓶壁, 使 HAEC 完全脱落;
6. 加入 5 mL NIH/3T3 培养基, 终止胰酶消化后, 将其转移至 15 mL 离心管中;
7. 使用 5 mL NIH/3T3 培养基或 PBS-EDTA, 洗涤培养瓶 1 次后, 转移到同一离心管中;
8. 150g, 离心 5 min, 使用 NIH/3T3 培养基重悬, 细胞计数;
9. 4°C, 150g, 离心 5 min;
10. 冻存液重悬细胞沉淀, 按 5×10^6 或 2.5×10^6 cells/管, 转移到细胞冻存管中, 补加冻存液至冻存管体积的 2/3, 标明细胞名称、冻存日期、细胞代数、培养皿/培养瓶型号、冻存者姓名等信息, 放入冻存盒中, 置于 -80°C, 24 h 后转移到液氮罐中保存备用。

3.3.5 HAEC 复苏

1. HAEC 传复苏前一天, 复苏滋养层细胞于 T25 培养瓶中, 以 2.5×10^6 cells / 瓶, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中过夜培养, 使细胞贴壁;
2. 生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡

- 过的纱布擦拭台面；
3. 将细胞由液氮罐中取出后放入 37°C 温水中，轻轻摇动使其解冻（约 2 min），解冻后立即从温水中取出，喷洒 75% 酒精后，在生物安全柜中将细胞从冻存管转移到含有 10 mL NIH/3T3 培养基的 15 mL 离心管中；
 4. 150g，离心 5 min；
 5. 使用 6 mL F 培养基重悬细胞沉淀后，接种于滋养层细胞上，37°C，5% CO₂ 细胞培养箱进行培养；
 6. 每天更换 F 培养基，吸出原培养基后，逐滴加入新鲜的培养基；
 7. 培养 HAEC 5 d 后，将 F 培养基换为不加 Pen/strep 的培养基；
 8. 待培养 HEAC 汇合度达到 80% 以上时，进行传代若滋养层细胞出现死亡，则需提前传代。

3.3.6 HAEC 形态学观察

在 HAEC 体外培养过程中，需要每天在倒置显微镜下观察处于不同时期的 HAEC 细胞形态，并及时拍照做好实验记录。

3.3.7 HAEC 活力鉴定

1. 待 HAEC 生长密度达到 80% 时，进行活力鉴定；
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min，打开风机 3 min 后，使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面；
3. 弃去原培养基后，使用 PBS-EDTA 洗涤 HAEC 一次，用含 0.05% EDTA 的胰酶消化，37°C 条件下消化 5 min，之后加入 5 mL NIH/3T3 培养基终止胰酶消化，吹打，使细胞分散均匀后，收集细胞于 15 mL 离心管中；
4. 150g，离心 5 min，弃去上清液，加入 F 培养基重悬沉淀；
5. 取 2 μL 0.4 % 台盼蓝染液与 18 μL 细胞悬液充分混匀，取混合液滴于细胞计数板上，置于倒置显微镜下观察，死细胞被台盼蓝染成蓝色，活细胞不被染色；
6. 显微镜下对细胞进行观察，随机拍照记录，随机取三个视野分别统计死细胞与活细胞的数目，进而计算 HAEC 的细胞存活率，并做好实验记录。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{活细胞数量}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

3.3.8 HAEC 免疫荧光染色鉴定

1. 制作 HAEC 细胞爬片

- (1) 当 HAEC 生长密度 80% 时, 制作细胞爬片;
- (2) 37°C 下预热 F 培养基, 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
- (3) 弃去原培养基后, 使用 PBS-EDTA 洗涤 HAEC 一次, 用含 0.05% EDTA 的胰酶消化, 37°C 条件下消化 5 min, 之后加入 5 mL NIH/3T3 培养基终止胰酶消化, 吹打, 使细胞分散均匀后, 收集细胞于 15 mL 离心管中;
- (4) 150g, 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 F 培养基重悬沉淀;
- (5) 吸取 20 μ L 细胞悬液, 用细胞计数仪估算细胞密度, 计算制作细胞爬片需要 F 培养基的体积;
- (6) 将剩余的细胞混合液, 150g, 离心 5 min;
- (7) 弃上清液, 加入 (6) 计算的 F 培养基的体积, 混匀;
- (8) 使用无水乙醇将细胞爬片清洗三次, 每次静置 5 min, 最后一次取出爬片后, 在安全柜自然晾干;
- (9) 取 5×10^4 个消化好的 HAEC 细胞, 接种于爬片上进行培养;
- (10) 每天换液, 显微镜下观察 HAEC 的生长状况, 记录细胞状态;
- (11) 观察当细胞丰度达到 80% 左右时, HAEC 细胞爬片制作完成。

2. HAEC 细胞免疫荧光染色

- (1) 吸出细胞孔板中培养基后, 向其中加入 500 μ L PBS, 静置 4 min, 然后再次吸出培养基, 重复 3 次;
- (2) 每个爬片上加入 500 μ L 95% 冰乙醇, 固定 30 min;
- (3) 固定好的细胞爬片, 去除 95% 冰乙醇, PBS 洗涤 3 次;
- (4) 将 50 μ L 胎牛血清加入到 950 μ L 通透液中, 配制成 5% 胎牛血清溶液, 并将其加入到细胞孔板中, 固定 30 min;
- (5) 弃胎牛血清溶液, PBS 洗涤 3 次;
- (6) 按照浓度为 1:1000 稀释兔抗人角蛋白单克隆抗体(Abcam, Cat.No: ab53280), 每孔加入 30 μ L 进行标记, 37°C 孵育 1 h;
- (7) PBS 洗涤 3 次, 按照浓度为 1:5000 稀释山羊抗兔 DyLight488 荧光二抗, (Abcam, Cat.No: ab96899), 每孔加入 30 μ L 进行标记, 37°C 孵育 1 h;
- (8) PBS 洗涤 3 次, 再加入含 0.3% 吐温 20 的 PBS 洗涤一次, 静置 5 min;
- (9) 再用 PBS 洗涤 3 次;

- (10) 加入 DAPI 核染剂进行染色 15 min, 弃 DAPI 核染剂, PBS 洗涤 3 次;
- (11) 甘油封片; 用 90%甘油进行封片后, 显微镜下进行观察, 并拍照记录。

3.3.9 RSV 感染 HAEC

1. 将状态良好的 HAEC 细胞传代到 T25 培养瓶中;
2. 观察细胞, 当丰度达到 60%左右时, 准备接毒;
3. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
4. 弃去原培养基, 用 2 mL PBS 洗涤 1 次, 加入 7 mL 2%细胞维持液;
5. 将保存的提前取出, 放于 4°C冰箱中进行融化, 取 7 μ L 病毒液接种到细胞中, 轻轻混匀后, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱进行培养;
6. 接种病毒约 20 h 后, 更换细胞维持液;
7. 每天观察 HAEC 病变情况, 24 h 拍照记录一次, 待细胞完全病变后, 收集病毒。

3.4 RSV 病毒培养、纯化及检测

3.4.1 RSV 病毒培养

1. 将生长状态良好的 HEp-2 细胞传代至 T25 培养瓶中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;
2. 观察细胞, 当丰度达到 60%左右时, 准备接毒;
3. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
4. 弃去原培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入 7 mL 2%细胞维持液;
5. 将冻存 RSV 取出, 置于 4°C冰箱融化, 取 7 μ L 病毒液接种到细胞中, 轻轻混匀后, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱进行培养;
6. 接种病毒约 20 h 时, 更换细胞维持液;
7. 接种病毒约 60 h 左右, 细胞完全病变, 用细胞刮将细胞全部刮下后, 转移到病毒冻存管中, 标明病毒种类、冻存日期、病毒代数、冻存者姓名等信息, -80°C冷冻备用。

3.4.2 RSV 病毒纯化

1. 将生长状态良好的 HEp-2 细胞传至 6 个 15 cm 培养皿中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;
2. 观察细胞, 当丰度达到 70%左右时, 准备接毒;
3. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
4. 弃去原培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入 26 mL 2%细胞维持液, 将冻存 RSV 取出, 置于 4°C冰箱融化, 每皿接种 25 μ L 病毒液, 轻轻混匀后, 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱进行培养;
5. 接种病毒约 20 h 时, 更换细胞维持液;
6. 接种 RSV 约 60 h, 细胞完全病变, 用细胞刮将细胞全部刮下, 将细胞悬液转移至 4 个 50 mL 离心管, 5000 rpm, 离心 15 min, 将上清液转移到新 50 mL 离心管中, 液氮反复冻融沉淀 3 次后, 用收集的上清液, 重悬沉淀, 5000 rpm, 离心 15 min 后, 收集上清;
7. 用 0.8 μ m 滤器过滤病毒上清;
8. 紫外灯照射塑料离心管 30 min 后, 每管加入 10 mL 10%蔗糖至底部 (壁上不可有溶液残留), 然后缓慢地加入过滤后的病毒上清液 (上清液与蔗糖溶液不可混匀);
9. 4 °C, 17000 rpm, 离心 2 h;
10. 弃去上清, 加入 150 μ L 上述蔗糖溶液重悬沉淀, 20 μ L/支分装于 EP 管中, 标明病毒种类、病毒代数、病毒体积、冻存日期、冻存者姓名等信息, -80°C 冷冻保存。

3.4.3 免疫斑法检测 RSV 病毒滴度

1. 将 HEp-2 细胞按 1.5×10^4 cells/孔接种到 96 孔板中, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜;
2. 观察细胞, 当密度达到 70%左右 (约 20 h 后), 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 弃去原培养基, PBS 洗涤 1 次后, 按照 10 倍梯度稀释 RSV 病毒液, 共设置 8 个稀释梯度, 3 个复孔/梯度, 100 μ L/孔, 依次接种在 HEp-2 细胞上, 同时设置阴性对照组, 100 μ L 维持液/孔, 设置阳性对照组 (已知滴度病毒液),

- 37°C, 孵育 1 h;
4. 弃去病毒液, 每孔加入适量的 1% 甲基纤维素维持液, 于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d;
 5. 在生物安全柜中, 弃去甲基纤维素溶液, PBS 洗涤 3 次, 每次静置 3 min;
 6. 每孔加入 100 μL 预冷 95% 乙醇, 4°C 放置 30 min;
 7. 弃去乙醇, PBS 洗涤 3 次;
 8. 配制封闭液 (5% 脱脂牛奶), 每孔加入 100 μL 封闭液, 于 37°C 封闭 30 min;
 9. 去除封闭液, 按照 1:500 稀释 RSV 多抗 (Milliore, Cat.No: AB1128), 每孔加入 100 μL RSV 多抗稀释液, 37°C 孵育 1 h;
 10. 弃去 RSV 多抗, PBS 洗涤 3 次, 按照 1:5000 稀释兔抗山羊抗体 (博奥龙, Cat.No: BF03015) 作为二抗, 每孔加入 100 μL 二抗, 37°C 孵育 1 h;
 11. 弃去二抗, PBS 洗涤 5 次, 避光加入 TMB 溶液 (沉淀型), 50 μL/孔, 避光显色 15 min;
 12. 在倒置显微镜下观察, 选择 3 个复孔中斑点数在 10~100 内的孔计数, 求 3 个复孔的平均值, 计算病毒滴度。

病毒滴度 (PFU/mL) = 最高稀释倍数复孔蚀斑平均数 × 最高稀释倍数 × 10

3.4.4 结晶紫法检测病毒滴度

1. 将 HEp-2 细胞按照 4×10^5 cells /孔接种到 12 孔板中, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中进行培养;
2. 观察细胞, 当密度达到 100% 左右, 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 弃去原培养基, PBS 洗涤 1 次;
4. 无血清 DMEM (补加双抗) 10 倍梯度稀释 RSV 病毒液, 共稀释 8 个梯度;
5. 将稀释的病毒液接种在细胞上, 每孔 400 μL, 每个梯度设置 2 个复孔, 同时设置阴性对照组, 加入 DMEM, 400 μL/孔, 置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h;
6. 加入微晶纤维素覆盖液 2 mL/孔, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 6 d (注: 在此期间不要晃动板子);
7. 染色前吸出覆盖液, 用 PBS 洗涤两次, 每孔加 2 mL 结晶紫染液, 室温染色 5 min 后, 将结晶紫染液收回到原瓶中, 用超纯水充分洗涤至水清澈为止, 统计空白斑个数, 选择斑点数在 10~100 内的孔计数, 求两个复孔的平均值, 并计算病毒滴度。

病毒滴度 (PFU/mL) = 最高稀释倍数复孔蚀斑平均数 × 最高稀释倍数 × 2.5

3.4.5 荧光定量分析检测纯化后 RSV 病毒滴度

1. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
2. 取少量纯化后 RSV, 用 Triol 裂解病毒包膜后, 提取病毒 RNA, 并按照合适比例稀释纯化后 RNA 样品, 混匀后瞬离;
3. 配制加有荧光染料的 RNA buffer (每个样品 199 μ L RNA buffer + 1 μ L 荧光染料);
4. 准备 0.5 mL PCR 管, 做好标记, 在各管中分别加入标准品和样品各 10 μ L;
5. 在 PCR 管中加入含有荧光染料的 RNA buffer, 使每管终体积为 200 μ L;
6. 充分震荡 (小心不要产生气泡), 室温放置 2 min, 使用 Qubit 4 荧光计测定 RNA 浓度后, 计算病毒滴度。

$$\text{纯化后 RSV 病毒滴度 (copies/mL)} = \frac{6.02 \times 10^{23} \times \text{浓度 (g/}\mu\text{L)}}{\text{RSV 碱基数} \times 340}$$

3.4.6 RT-qPCR 分析检测 RSV 病毒滴度

1. 提取细胞总 RNA 操作如下 (以 6 孔板为例, 试剂盒为 Promega 产品):
 - (1) 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面
 - (2) 用细胞刮将 6 孔板中细胞全部刮下, 转移到 EP 管中, PBS 冲洗一次, 将冲洗液转移到同一 EP 管中;
 - (3) 500g, 离心 5 min;
 - (4) 弃去上清, 向沉淀中加入 175 μ L RNA 裂解液, 反复吹打, 混匀;
 - (5) 加入 350 μ L RNA Dilution Buffer (蓝色), 颠倒混匀;
 - (6) 70°C 水浴, 孵育 3 min;
 - (7) 室温, 12000g, 离心 10min, 将上清吸取到无菌 EP 管中 (避免触碰到沉淀);
 - (8) 向 EP 管中加入 200 μ L 95%乙醇, 反复吹打;
 - (9) 装离心柱装配体, 将混合物移至离心柱装配体中;
 - (10) 12000g, 离心 1 min, 弃去收集管中液体;

(11) 加 600 μL RNA Wash Solution, 12000g, 离心 1 min, 弃去液体;

(12) 制备 DNase 孵育混合物 (现用现配):

Yellow Core Buffer	40 μL
0.09 M MnCl_2	5 μL
DNase I	5 μL
总体积	50 μL

(13) 将 DNase 孵育混合物加到离心柱膜上, 室温孵育 15 min 之后, 加入 200 μL DNase Stop Solution, 12000g, 离心 1 min, 不清空收集管;

(14) 加 600 μL RNA Wash Solution, 12000g, 离心 1 min;

(15) 清空收集管, 加入 250 μL RNA Wash Solution, 14000g, 离心 2 min;

(16) 将离心柱放到 1.5 mL 带盖洗脱管上, 加入 100 μL 无核酸酶水, 12000g, 离心 1 min;

(17) 盖好洗脱管, 进行反转或保存于 -80°C 备用。

2. 测定 RNA 浓度后, 使用 RT Master Mix for PCR 试剂盒 (MCE) 来合成 cDNA;

(1) 反转录反应体系配置 (20 μL 体系)

在 RNase-free PCR 管中, 按下列组分配置 RT 反应液, 反应液配置操作在冰上进行;

组分	使用量
2xSuper RT Mix	10 μL
总 RNA 样品	1 μg
RNase-free H_2O	To 20 μL

(2) 反转录程序设置

将上述配好的 Mix 混合均匀后, 置于 PCR 仪中进行反应, 具体程序如下:

温度	时间
25°C	5 min
42°C	60 min
85°C	2 min
4°C	Forever

(3) 反应结束后, 合成的 cDNA 可立即进行后续的 qPCR, 或 -20°C 短期保存, 或 -80°C 长期保存。

3. RT-PCR 合成 cDNA

(1) 设计引物:

设计的扩增引物如下:

引物名称	引物序列
RSA-1	5'-AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA-3'
RSA-2	5'-GCACATCATAATTAGGAGTATCAAT-3'

(2) 制备标准品:

标准品为质粒 pMD-18T-N;

(3) 准备 qPCR 反应体系, 如下:

cDNA 样品/标准品/ DEPC 水	0.5 μ L
SYBR Green supermix	5 μ L
引物 RSA-1(10 μ mol/L)	0.3 μ L
引物 RSA-2(10 μ mol/L)	0.3 μ L
DEPC 水	3.9 μ L
总体积	10 μ L

注: 每个 cDNA 样品设立 3 个复孔。

(4) 按以下反应程序进行 qPCR:

在程序运行每个循环的最后一步结束时收集荧光, 运行结束后, 根据 Ct 值计算定量结果。

程序	温度	时间	循环数
热启动	50°C	120 s	
预变性	95°C	10 min	1 cycle
变性	95°C	15 s	40 cycles
退火延伸	60°C	1 min	

程序结束后, 进行数据处理, 首先绘制标准曲线, 求出每个实验组的 3 个复孔的平均值 (去除特异值), 通过标准曲线来计算各实验组的拷贝数, 以标准品中最大 Ct 值所对应的拷贝数作为检测下限, 使用 GraphPad Prism 8.0 做图。

3.5 RSV-A-4 和 6-MMP_r 体外抗病毒活性分析

3.5.1 RSV-A-4 和 6-MMP_r 抑制 RSV 复制活性分析

1. 免疫斑法

- (1) 将 HEP-2 或 BEAS-2B 细胞按照 1.5×10^4 cells/孔的密度铺在 96 孔板, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜;

- (2) 24 h 后, 观察细胞密度约 70%时, 可用于实验;
- (3) 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
- (4) 弃去培养基, PBS 洗涤后, 使用 2%维持液, 将待测化合物按 0.01 μM 、0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 稀释 5 个梯度, 同 RSV 一起加入到 96 孔板中, 100 μL /孔 (含 RSV 50 PFU), 设置阴性对照 (无化合物), 阳性对照 (化合物为 Ribavirin), 每种化合物的不同稀释度各设 3 个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h;
- (5) 在此期间, 将 1%甲基纤维素维持液稀释以同样稀释倍数稀释待测小分子化合物, 涡旋振荡, 使分散均匀;
- (6) 弃去培养基, 加入 (5) 配制的稀释液, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 d;
- (7) 测定病毒滴度, 方法同上 3.2.3;
- (8) 使用 Graphpad Prism 8 软件计算半数病毒抑制浓度值 (IC_{50}): 点击 “Analyze”-“Transform, Normalize...”-“Transform”, 选择 “Transform X values using X=Log[X]”, 将药物浓度值转换为 log 值, 点击 “Analyze”-“XY analyses”-“Nonlinear regression (curve fit)” -“Dose-response-Inhibition”-“log(inhibitor) vs. nomalized response--Variable slope”, 得到 IC_{50} 值。

2. 荧光检测法^[60]

- (1) 将 HEp-2 细胞按 2×10^4 cells /孔接种于黑色透明底 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养进行培养;
- (2) 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
- (3) 在接种细胞 24 h 后, 使用 2%维持液, 将待测化合物按 0.02 μM 、0.2 μM 、2 μM 、20 μM 、200 μM 稀释 5 个梯度, 50 μL /孔加到 96 孔板中, 同时设立阴性对照组, 即 DMSO 先用水稀释 10 倍后再用维持液进行 5 倍梯度稀释, 之后 50 μL /孔加到 96 孔板中, 每个稀释度设 3 个复孔, 另外设病毒感染对照组, 只加 50 μL 维持液;
- (4) 加入用 2%维持液稀释的 RSV 病毒液 (每孔 3000 PFU), 50 μL /孔;
- (5) 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中培养 48 h;
- (6) 感染约 48 h 后, 用多功能酶标仪检测绿色荧光蛋白的表达量;
- (7) 使用 Graphpad Prism 8 软件计算 IC_{50} , 方法同上。

3.5.2 细胞活性检测 (MTS)

1. 将 HEP-2 细胞按照 0.5×10^4 cells /孔的密度铺在 96 孔板上, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养过夜;
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 弃去原培养基, 用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 1 次, 使用 2% 维持液, 将待测化合物按 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $1000 \mu\text{M}$ 稀释 5 个梯度, 按照 $100 \mu\text{L}$ /孔加到 96 孔板中, 每个稀释度设 3 个复孔, 分别设置阴性对照和阳性对照 (Ribavirin), 并留有空白对照孔, 37°C 培养 2 d;
4. 弃去原培养基, 用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 1 次, 使用先将 MTS 和 PMS 按照 20:1 的体积比混合, 此过程避光处理, 再将 $20 \mu\text{L}$ 混合液与 $100 \mu\text{L}$ 2% 细胞维持液混合均匀后, 加到 96 孔板中, 37°C 孵育 3 h;
5. 使用多能酶标仪检测 490 nm 处 OD 值, 检测前振荡培养板 10 s, 并据此计算细胞活性;

$$\text{细胞活性} = \frac{\text{实验组吸光度值} - \text{空白对照组吸光度值}}{\text{细胞阴性对照组吸光度值} - \text{空白对照组吸光度值}} \times 100\%$$

6. 使用 Graphpad Prism 8 软件计算半数细胞毒性浓度值 (CC_{50}): 点击“Analyze”-“Transform, Normalize...”-“Transform”, 选择“Transform X values using X=Log[X]”, 将药物浓度值转换为 log 值, 点击“Analyze”-“XY analyses”-“Nonlinear regression (curve fit)”-“Does-response-Stimulation”-“log(agonist) vs. normalized response--Variable slope”, 得到 CC_{50} 值。

3.6 RSV-A-4 和 6-MMP_r 体外抗 RSV 机制研究

3.6.1 Time of addition assay 分析复制环节

RSV 在感染细胞内的复制周期约为 14~16 h, 感染后 4~6 h, 在细胞内可以检测到病毒 mRNAs 和 NS1 等蛋白质, 当 M2-2 表达水平达到峰值时, 基因的转录会下调, RNA 基因组的开始复制; 感染后 10~12 小时, 子代病毒开始释放出细胞。基于对 RSV 的生活周期的认识, 可人为的将 RSV 感染后 0~4 h 划分为 RSV 感染早期, RSV 感染后 4~16 h 划分为 RSV 感染晚期, 其中, RSV 感染细胞的早期阶段主要包括将病毒体吸附到靶细胞的表面、病毒脂质包膜与靶细胞膜融合, 以及病毒基因组进入细胞等步骤。

根据相关文献报道^[61], Time of addition assay 分析化合物抑制 RSV 复制的关

键环节实验操作如下:

1. 将 HAEC 细胞按 1.5×10^4 cells/孔接种于 96 孔板, 37°C 培养过夜;
2. 将生物安全柜使用紫外灯照射 30 min, 打开风机 3 min 后, 使用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 24 h 后, 弃去培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入用 2% 维持液稀释的 100 μ L 的 RSV 病毒液 (5 pfu/细胞), 此时间点定位第 0 h, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h;
4. 弃去培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入 90 μ L 维持液, 37°C 培养;
5. 将化合物用 2% 维持液稀释, 使用浓度低于其 CC₅₀、高于 IC₅₀, (RSV-A-4、6-MMP_r、RSV-604、GS-5806 (Presatovir) 及 Ribavirin 分别为 1 mM、50 μ M、10 μ M、1 mM 和 100 μ M), 并设立阴性对照组;
6. 分别于 -1、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 及 14 h 加入 10 μ L 不同化合物及 DMSO 溶液;
7. 加入病毒约 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 收细胞, 提取细胞与病毒总 RNA, 用 RT-qPCR 测定 RSV 病毒滴度。

3.7 RSV-A-4 和 6-MMP_r 体内抗 RSV 活性分析

3.7.1 实验动物分组、病毒感染剂量和给药途径

1. 准备 6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 饲养于清华大学实验动物中心 P2 动物房;
2. 饲养一周后将小鼠进行随机分组, 实验方案设有不同化合物的不同剂量组, 详见表 3-1;
3. 第 0 天, 通过灌胃给药给予小鼠 RSV-A-4 和 6-MMP_r, 1 h 后将小鼠经腹腔注射 Avertin (240 mg/kg) 深度麻醉后, 按 5×10^5 PFU/50 μ L/只的剂量经滴鼻途径给予 RSV-Luciferae^[62];
4. 感染 RSV-Luciferae 后, 每隔 24 h, 使用 2% 异氟烷将小鼠经气体麻醉方式麻醉, 再按 75 mg/kg 的剂量, 将 D-荧光素经滴鼻途径给予实验组小鼠, 10 min 后, 使用小动物活体成像系统 IVIS Lumina II 检测各实验组小鼠鼻腔和肺部病毒复制的荧光信号, 且拍照记录;
5. 第 1、2、3、4、5 天, 继续以灌胃给药方式给予小鼠相应剂量的 RSV-A-4 和

- 6-MMP_r, 一天 2 次, 连续给药 5 天;
6. 在感染 RSV 的第 5 天, 处死小鼠, 解剖后取其肺组织, 制备肺匀浆, 用 RT-qPCR 测定 RSV 病毒滴度。

表 3-1 化合物 RSV-A-4 和 6-MMP_r 体内抗病毒活性研究Table 3-1 Study on the antiviral activity of compounds RSV-A-4 and 6-MMP_r *in vivo*

组别	剂量 (mg/kg)	给药途径	数量
RSV-A-4	90	灌胃	3
RSV-A-4	30	灌胃	3
RSV-A-4	10	灌胃	3
6-MMP _r	90	灌胃	3
6-MMP _r	30	灌胃	3
6-MMP _r	10	灌胃	3
DMSO	90	灌胃	3
Ribavirin	90	灌胃	3

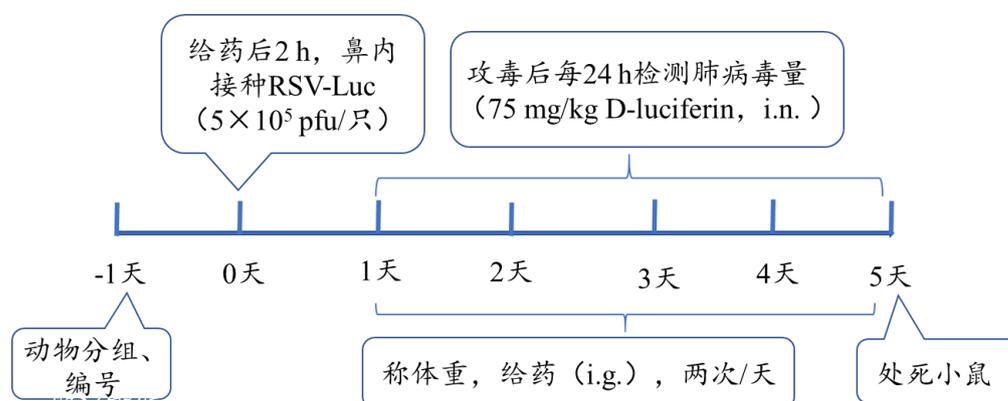


图 3-1 化合物体内抗 RSV 活性实验流程图

Figuer 3-1 Experimental flow chart of compound anti-RSV activity *in vivo*

3.7.2 小鼠肺组织匀浆制备

1. 紫外灯照射生物安全柜 30 min, 打开风机 3 min 后, 用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
2. 在生物安全柜中将小鼠脱颈处死;
3. 迅速将小鼠解剖取出肺组织, 放入预冷的 EP 管中, 称重后立刻置于冰上;

4. 按照每 0.1 g 肺组织加入 100 μ L PBS (1% BSA), 液氮速冻后, 用匀浆器在冰上进行研磨 (注: 按照小鼠肺中病毒含量从低到高的组别进行研磨);
5. 把肺匀浆液在 12000g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10 min, 收上清, 立即检测或-80 $^{\circ}$ C保存备用。

3.7.3 免疫斑法检测肺脏病毒滴度

1. 将 HEp-2 细胞按照 1.5×10^4 cells/孔接种到 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞密度达到 70%左右时, 可用于实验;
2. 紫外灯照射生物安全柜 30 min, 打开风机 3 min 后, 用新洁尔灭浸泡过的纱布擦拭台面;
3. 将肺匀浆上清用 2%维持液进行 10 倍梯度稀释 (冰上操作), 每次稀释后更换枪头;
4. 弃去原培养基, PBS 洗涤 1 次, 按照 10 倍梯度稀释 RSV 病毒液, 共设置 8 个稀释梯度, 每个梯度设置 3 个复孔, 100 μ L/孔, 依次接种在 HEp-2 细胞上, 同时设置阴性对照组, 100 μ L 维持液/孔, 设置阳性对照组 (已知滴度的病毒液), 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h;
5. 弃去病毒液, 每孔加入适量的 1%甲基纤维素维持液, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 3~4 d;
6. 弃去甲基纤维素溶液, PBS 洗涤 3 次, 每次静置 3 min;
7. 加入预冷的 100 μ L 95%乙醇, 4 $^{\circ}$ C, 放置 30 min;
8. 弃去乙醇溶液, PBS 洗涤 3 次;
9. 配制封闭液 (5%脱脂牛奶), 每孔加入 100 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C, 封闭 30 min;
10. 去除封闭液, 用封闭液按照 1:500 稀释 RSV 多抗 (Milliore, Cat.No: AB1128), 每孔加入 100 μ L RSV 多抗稀释液, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h;
11. 弃去 RSV 多抗, PBS 洗涤 3 次, 用封闭液按照 1:5000 稀释兔抗山羊抗体 (博奥龙, Cat.No: BF03015) 作为二抗, 每孔加入 100 μ L 二抗, 37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 h;
12. 弃去二抗, PBS 洗涤 5~6 次, 避光条件下, 向每孔中加入 TMB 溶液 (沉淀型) 50 μ L, 避光显色 15 min;
13. 选择三个复孔中斑点数在 10~100 内的孔计数, 求三个复孔的平均值, 计算病毒滴度。

3.7.4 RT-qPCR 检测小鼠肺脏病毒滴度

1. Trizol 法提取小鼠肺匀浆总 RNA (Promega 试剂盒, Cat.#Z3105);

- (1) 取 100 μL 小鼠肺匀浆上清至 1.5 mL EP 管(做好标记), 加入 175 μL RNA 裂解液, 反复吹打, 混匀;
- (2) 加入 350 μL RNA Dilution Buffer (蓝色), 颠倒 3~4 次;
- (3) 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 孵育 3 min;
- (4) 室温 12000g, 离心 10 min, 将上清吸取到无菌 EP 管中 (避免触碰到沉淀);
- (5) 向上清 EP 管中加入 200 μL 95%乙醇, 反复吹打 3~4 次;
- (6) 装备离心柱装配体, 将混合物移至离心柱装配体中;
- (7) 12000g, 离心 1 min, 弃去收集管中液体;
- (8) 加入 600 μL RNA Wash Solution, 12000g, 离心 1 min, 弃去液体;
- (9) 制备 DNase 孵育混合物 (现用现配):

Yellow Core Buffer	40 μL
0.09 M MnCl_2	5 μL
DNase I	5 μL
总体积	50 μL

- (10) 将 DNase 孵育混合物加到离心柱膜上, 室温孵育 15 min 之后, 加入 200 μL 的 DNase Stop Solution, 12000g, 离心 1 min, 不清空收集管;
- (11) 加入 600 μL RNA Wash Solution, 12000g, 离心 1 min;
- (12) 清空收集管, 加入 250 μL RNA Wash Solution, 14000g, 离心 2 min;
- (13) 将离心柱放到 1.5 mL 带盖洗脱管上, 加入 100 μL 无核酸酶水, 12000g, 离心 1 min;
- (14) 盖好洗脱管, 进行反转或保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2. RT-PCR 合成 cDNA

- (1) 测定 RNA 浓度后, 使用 RT Master Mix for PCR 试剂盒 (MCE) 合成 cDNA;
- (2) 配置反转录反应体系 (20 μL 体系)
在 RNase-free PCR 管中, 按下列组分配置 RT 反应液, 操作需在冰上进行;

组分	使用量
2xSuper RT Mix	10 μ L
总 RNA 样品	1 μ g
RNase-free H ₂ O	To 20 μ L

(3) 设置反转录程序

将上述配好的 Mix 混合均匀后,置于 PCR 仪中进行反应,具体程序如下:

温度	时间
25°C	5 min
42°C	60 min
85°C	2 min
4°C	Forever

(4) 反应结束后,合成的 cDNA 可立即进行后续的 qPCR,或-20°C短期保存,或-80°C长期保存。

3. 实时定量荧光 PCR (RT-qPCR)

(1) 每孔的反应体系如下:

cDNA 样品/标准品/ DEPC 水	0.5 μ L
SYBR Green supermix	5 μ L
引物 RSA-1(10 μ mol/L)	0.3 μ L
引物 RSA-2(10 μ mol/L)	0.3 μ L
DEPC 水	3.9 μ L
总体积	10 μ L

注:每个 cDNA 样品设立 3 个复孔。

(2) 按以下反应程序进行 qPCR:

在每个循环的最后一步结束时收集荧光,运行结束后,根据 Ct 值计算定量的结果。

程序	温度	时间	循环数
热启动	50°C	120 s	
预变性	95°C	10 min	1 cycle
变性	95°C	15 s	40 cycles
退火延伸	60°C	1 min	

程序结束后,进行数据处理,首先绘制标准曲线,求每个实验组的 3 个复孔的平均值(去除特异值),通过标准曲线来计算各实验组的拷贝数,以标准品中最大 Ct 值所对应的拷贝数作为检测下限,使用 GraphPad Prism 8.0 做图。

3.8 统计学分析

正态分布数据选用 t 检验和单因素方差分析方法，非正态分布数据采用非参数检验，通过 IBM SPSS statistics 22 软件进行统计学分析，通过 GraphPad Prism 8 作图，以 $p < 0.05$ 作为不同组间差异具有显著性的标准。

4 实验结果

4.1 HEp-2、BEAS-2B 细胞培养

良好状态的 HEp-2 细胞呈不规则多边形，大小均匀，贴壁生长，细胞饱满，透光性良好，如图 4-1 所示。

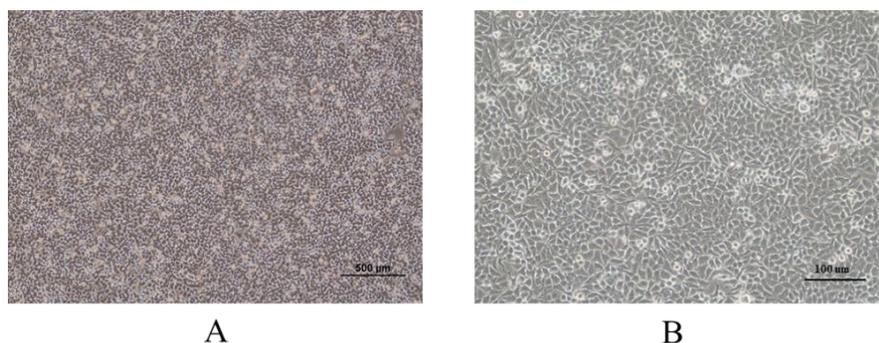


图 4-1 生长状态良好的 HEp-2 细胞形态 (4×, 10×)

Figure 4-1 The morphology of HEp-2 cells in good growth condition (4×, 10×)

良好状态的 BEAS-2B 细胞大小均匀，细胞边缘光滑且清晰，胞质清晰透亮，呈现不规则梭形，贴壁生长，如图 4-2 所示。

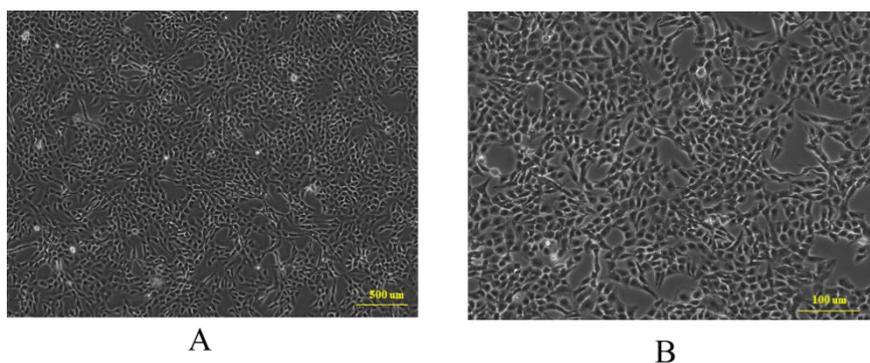


图 4-2 生长状态良好的 BEAS-B 细胞形态 (4×, 10×)

Figure 4-2 The morphology of BEAS-B cells in good growth condition (4×, 10×)

4.2 HAEC 细胞培养

4.2.1 HAEC 形态学观察

首先培养 NIH/3T3 细胞，待其状态良好时制备滋养层细胞，如图 4-3，随后将采集的人 HAEC 标本接种于预先培养的滋养层细胞上，在 F 培养基中进行培养，隔天更换培养基，同时在显微镜下观察其生长情况并拍照记录。在显微镜下观察发现（图 4-4），接种 HAEC 标本第 2 d，即可见有原代细胞出现；培养 HAEC 第 3~5 d，细胞团逐渐变大，细胞聚集成团；培养 HAEC 第 5~8 d，细胞数量逐渐增多，细胞团面积也逐渐变大，细胞呈扁平状、多边形，密集呈鹅卵石铺路样分布生长（图 4-5），约占细胞培养瓶的 80%以上；培养 HAEC 第 10 d 时，细胞汇合度达 90%以上，对原代细胞进行传代，将细胞接种于滋养层细胞上。

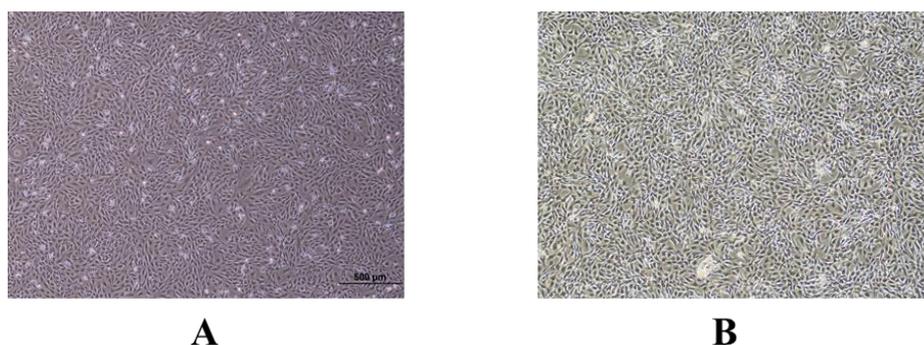


图 4-3 滋养层细胞状态

图 A 为 NIH/3T3 细胞（小鼠胚胎成纤维细胞）形态（4×）；

图 B 为丝裂霉素 C 处理的 NIH/3T3 细胞（滋养层细胞 mc3T3 细胞）状态（4×）

Figure 4-3 The state of trophoblast cells

Figure A The cell morphology of NIH/3T3 cells (mouse embryonic fibroblasts) (4×);

Figure B The state of NIH/3T3 cells treated with mitomycin C (trophoblast cells mc3T3 cells) (4×)

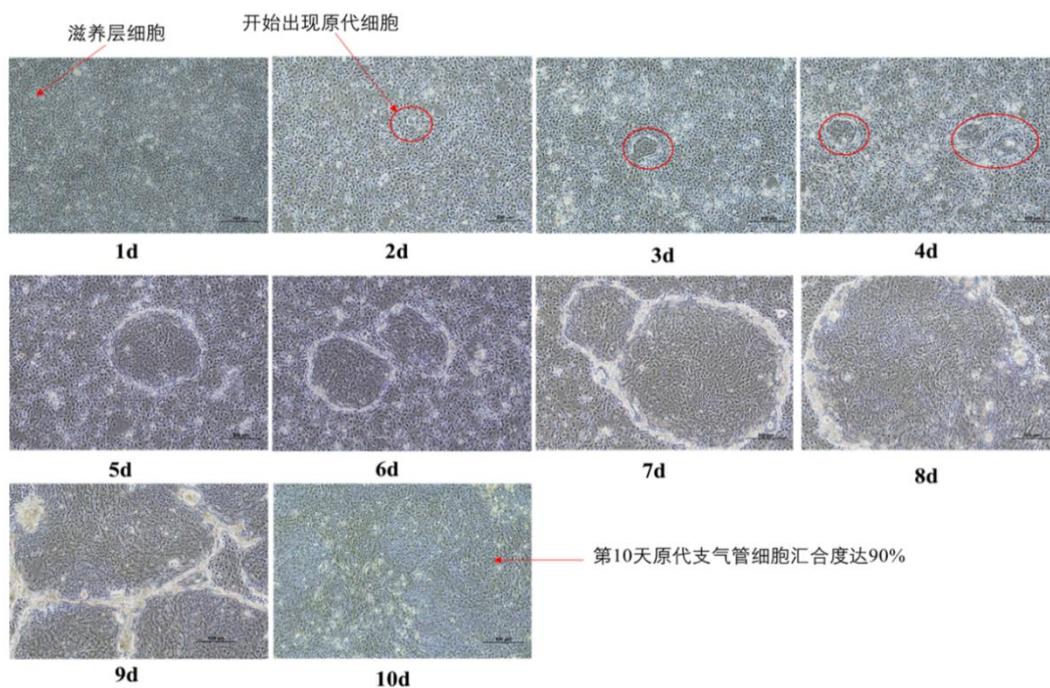


图 4-4 HAEC 细胞的连续培养状态 (4×)

Figure 4-4 The continuous culture of HAEC cells (4×)

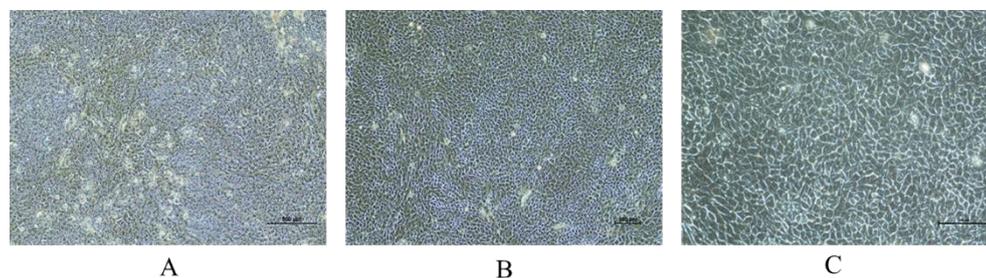


图 4-5 不同放大倍数下的 HAEC 细胞形态

A, 4×; B, 10×; C, 20×.

Figure 4-5 HAEC cell morphology under different magnifications

A, 4×; B, 10×; C, 20×.

待细胞汇合度达到 90%以上时,对培养的 HAEC 进行传代,结果显示,在首次传代的第 1 d,即可见有小的原代细胞团出现,待细胞长到第 4 d 时,汇合度可达 90%左右(见图 4-6),首次传代的细胞长势比原代培养的细胞生长更快。

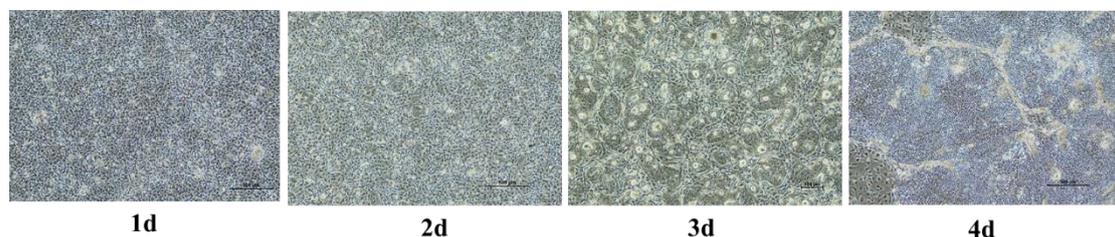


图 4-6 HAEC 首次传代后生长状态
Figure 4-6 The growth status after the first passage of HAEC

4.2.2 HAEC 活力测定

HAEC 经胰酶消化后,进行台盼蓝染色,台盼蓝可穿透死细胞的细胞膜,使其 DNA 着色,将死细胞染成蓝色;而台盼蓝不能穿透活细胞的细胞膜,活细胞则不能被染色,根据此原理可计算出培养的 HAEC 细胞存活率。使用 0.4%台盼蓝染液对体外分离培养的 HAEC 进行染色,在显微镜下可观察到多数为强光点,只有少数为蓝色点,由此可以知道,原代培养的 HAEC 细胞活性较高。

随机选取三个样本(如图 4-7),计算活细胞与总细胞数的百分比分别为 94.23%、90.10%和 95.19%,HAEC 平均细胞活力则为 93.51%。

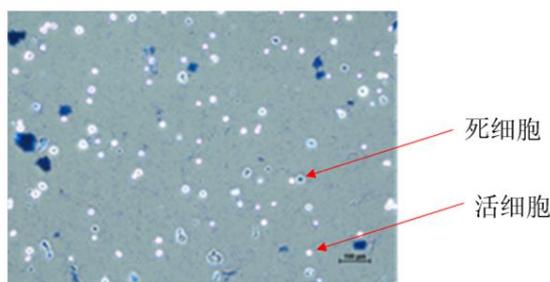


图 4-7 台盼蓝染色检测 HAEC 存活率 (10×)
Figure 4-7 The HAEC survival rate detected by Trypan blue staining (10×)

4.2.3 HAEC 免疫荧光染色鉴定

原代培养 HAEC,制成细胞爬片后,进行细胞免疫荧光染色鉴定。在显微镜

下进行观察, HAEC 经兔抗人角蛋白单克隆抗体与山羊抗兔 DyLight488 荧光二抗结合孵育后呈阳性, 胞浆着色为绿色, 细胞经 DAPI 复染后, 细胞核为蓝色(如图 4-8), 鉴定结果显示, 人角蛋白单克隆抗体能与培养的原代细胞特异性结合, 提示培养的细胞为 HAEC。

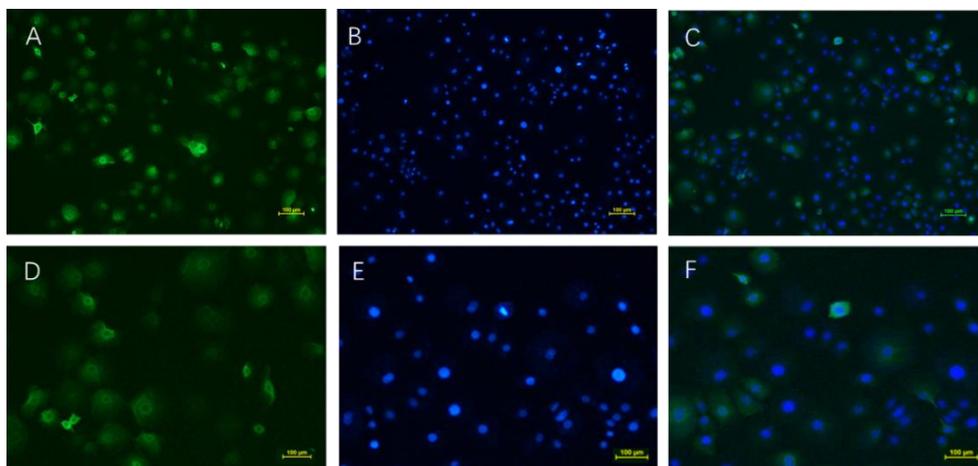


图 4-8 免疫荧光染色鉴定 HAEC 细胞

- A. HAEC 细胞胞浆着色 (10×), D. HAEC 细胞胞浆着色 (20×); B. HAEC 细胞核经 DAPI 复染后着色 (10×), E. HAEC 细胞核经 DAPI 复染后着色 (20×); C. merge 后的图像 (10×), F. merge 后的图像 (20×)

Figure 4-8 Identification of HAEC cells by immunofluorescence staining

- A. HAEC cell cytoplasm staining (10×), D. HAEC cell cytoplasm staining (20×); B. HAEC cell nuclei are stained after DAPI counterstaining (10×), E. HAEC cell nuclei are stained (20×) after DAPI counterstaining; C. The image after merge (10×), the image after F. merge (20×)

4.3 RSV 感染 HAEC

待 HAEC 传代到 P3 代, 细胞丰度达到 70%时, 接种 RSV-mGFP, 每天观察细胞状态和病毒复制情况, 并拍照记录。结果显示(图 4-9), 接种 RSV-mGFP 24 h 后 HAEC 开始出现极小的融合现象, 接种 RSV-mGFP 72 h 时, HAEC 出现大面积细胞融合、细胞核聚集等典型的 RSV 病变效应(Cytopathic effect, CPE), 表明 RSV 能够在 HAEC 有效复制。因此, 原代培养的 HAEC 可作为一种较为理想的 RSV 体外感染模型。

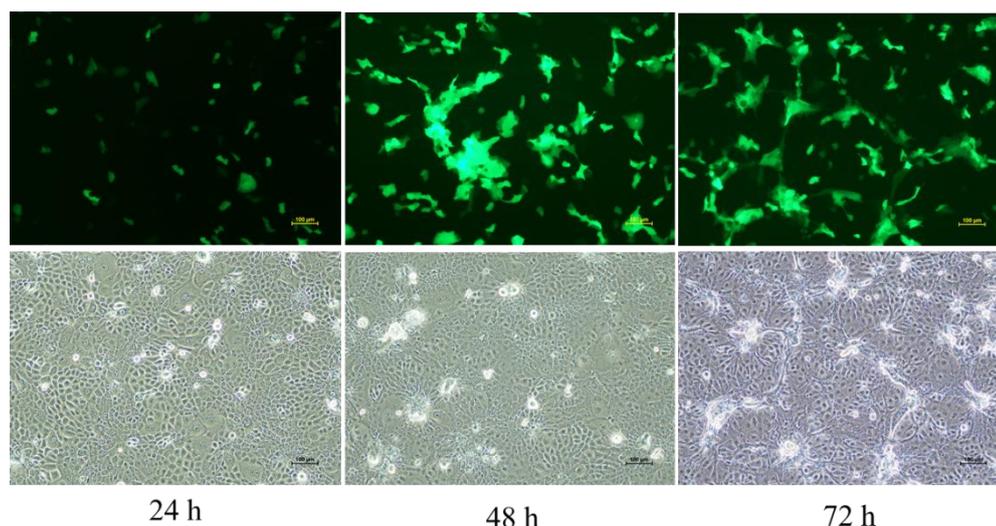


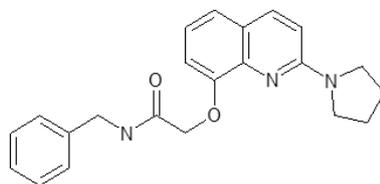
图 4-9 RSV-mGFP 感染 HAEC 引起的细胞病变

Figure 4-9 Cytopathic effect caused by RSV-mGFP infection HAEC

4.4 RSV-A-4 和 6-MMP_r 抗 RSV 活性及机制研究

4.4.1 先导化合物 6344B-E6 的理化性质

课题组前期工作中, 利用构建的抗 RSV 药物高通量筛选平台, 由国家新药化合物库中筛选出了 29 种具有抑制 RSV 活性的小分子化合物。本研究是以其中的 6344B-E6 为先导化合物, 对其抗 RSV 活性确证后, 将其进行构效优化, 获得 6344B-E6 衍生化合物库, 进而在衍生化合物库中筛选更为安全有效的抗 RSV 的活性骨架化合物。6344B-E6 是 2-氨基喹啉类衍生物, 呈白色颗粒状, 化学性质稳定, 可溶于有机溶剂, 室温保存。

图 4-10 先导化合物 6344B-E6 结构式 (分子式: $C_{21}H_{22}O_2N_3$, MW: 348)Figure 4-10 The structural formula of the lead compound 6344B-E6 (Molecular formula: $C_{21}H_{22}O_2N_3$, MW: 348)

4.4.2 6344B-E6 具有较好的抗 RSV 活性

分别采用 MTS 法和免疫斑法检测 6344B-E6 对 HEp-2 细胞的毒性作用及其抗 RSV 活性效果, 结果如表 4-1 和图 4-11 所示。实验结果显示, 66344B-E6 的 CC_{50} 值为 $336.50 \mu\text{M}$, IC_{50} 值则为 $2.65 \mu\text{M}$, 6344B-E6 的安全系数 SI 值为 126.98, 由此可知, 6344B-E6 对 RSV 存在抑制效果, 且存在一定的量效关系。

表 4-1 先导化合物的细胞活性 CC_{50} 、半数抑制浓度 IC_{50} 及安全系数 SI

Table 4-1 The CC_{50} , IC_{50} and safety factor of the lead compounds

化合物	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	SI
6344B-E6	336.50	2.65	126.98

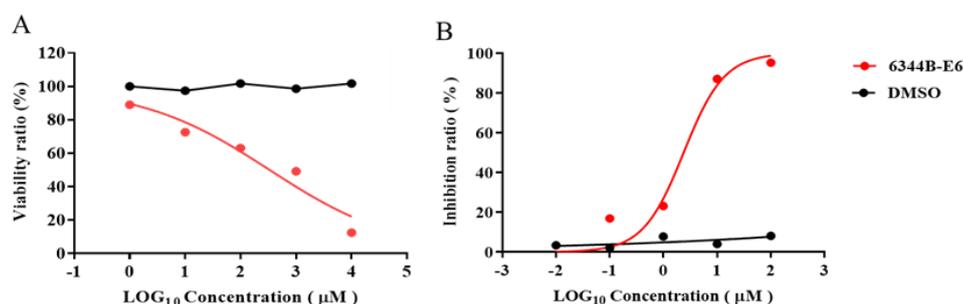


图 4-11 先导化合物 6344B-E6 的抗 RSV 活性和细胞毒性

A 为 6344B-E6 的细胞毒性检测结果; B 为 6344B-E6 的抗 RSV 活性检测结果。

抑制率 (%): (对照组病毒 pfu-实验组病毒 pfu) / 对照组病毒 pfu \times 100%; 细胞活性 (%): 实验组吸光度值/细胞阴性对照组吸光度值 \times 100%。

Figure 4-11 The anti-RSV activity and cytotoxicity of 6344B-E6, respectively

A was the cytotoxicity of 6344B-E6 respectively; B was the anti-RSV activity of 6344B-E6 respectively.

Inhibitory rate (%) = (virus plaque number in control group - virus plaque number in experimental group) / virus plaque number in control group \times 100%; cell activity (%) = absorbance value in experimental group / absorbance value in cell negative control group \times 100%

4.4.3 6344B-E6 衍生化合物库抗 RSV 活性分析

将 6344B-E6 进行结构优化后, 获得 29 种衍生物, 基于 HEp-2 细胞检测其 CC_{50} 与 IC_{50} , 结果如表 4-2 所示。我们选择其中 SI 值大于 10 的 15 种化合物, 在 BEAS-2B 细胞上进一步检测其 CC_{50} 和 IC_{50} , 结果如表 4-3 所示。经过两轮筛选发现, RSV-A-4 无论是在 HEp-2 细胞还是在 BEAS-2B 细胞检测结果中, 其 SI 值都是最高的, 因此, 最终确定 RSV-A-4 为活性骨架化合物, 对其进行后续实验

研究。RSV-A-4 为性质稳定的 3-硫代吡啶类化合物，其结构式如图 4-12 所示。

表 4-2 6344B-E6 衍生物化合物库基于 HEp-2 细胞的 CC_{50} 、 IC_{50} 及 SI

Table 4-2 The CC_{50} , IC_{50} and SI of derivative compound library of 6344B-E6 based on HEp-2

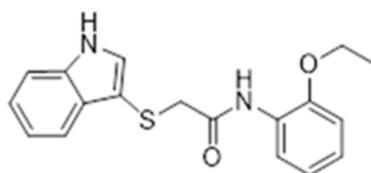
cells			
化合物	CC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)	SI 值
RSV-A-0	815.56 ± 51.44	43.16 ± 4.72	18.89
RSV-A-1	1864.83 ± 102.40	7.79 ± 0.87	239.47
RSV-A-2	231.00 ± 20.20	1801.33 ± 73.63	0.13
RSV-A-4	3038.00 ± 193.24	2.51 ± 0.64	1211.74
RSV-A-5	317.61 ± 31.15	22.77 ± 4.72	13.95
RSV-A-6	849.61 ± 55.18	1.90 ± 0.40	446.73
RSV-A-9	176.64 ± 10.49	12.65 ± 0.63	13.96
RSV-A-10	1419.00 ± 90.42	18.97 ± 4.84	74.80
RSV-A-12	31.87 ± 2.89	4.29 ± 0.62	7.44
RSV-A-13	26.21 ± 2.28	14.04 ± 1.72	1.87
RSV-A-14	422.28 ± 26.07	14.48 ± 2.02	29.17
RSV-A-15	376.88 ± 22.76	88.25 ± 1.97	4.27
RSV-A-16	131.24 ± 29.08	36.77 ± 3.66	3.57
RSV-A-17	98.85 ± 16.93	22.37 ± 3.20	4.42
RSV-A-18	166.83 ± 17.05	57.48 ± 8.42	2.90
RSV-A-20	1385.43 ± 184.86	237.8 ± 23.82	5.83
RSV-B-1-1	537.60 ± 59.19	15.97 ± 3.10	33.67
RSV-B-2-1	89.51 ± 3.04	18.05 ± 3.60	4.96
RSV-B-3-1	80.05 ± 8.05	40.16 ± 4.61	1.99
RSV-D-0	634.60 ± 54.29	29.41 ± 1.51	21.58
RSV-D-2	1688.33 ± 85.48	34.12 ± 6.20	49.48
RSV-D-3	29.65 ± 1.28	25.89 ± 1.54	1.15
RSV-D-4	263.25 ± 26.35	21.34 ± 2.18	12.34
RSV-D-5	2533.00 ± 315.76	24.88 ± 4.19	101.82

表 4-2 (续表)

RSV-D-6	203.35±45.44	1.92±0.35	105.94
RSV-D-7	20.32±2.26	7.69±0.90	2.64
RSV-D-8	31.19±2.57	6.22±1.21	5.01
RSV-D-9	84.72±10.12	41.97±1.46	2.02
RSV-I-1	911.66±49.02	28.65±2.31	31.82

表 4-3 15 种化合物 (SI>10) 基于 BEAS-2B 细胞的 CC₅₀、IC₅₀ 及 SITable 4-3 The CC₅₀, IC₅₀ and SI of 15 compounds (SI>10) based on BEAS-2B cells

化合物	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI 值
RSV-A-1	2095 ± 37.97	0.40 ± 0.23	5238.81
RSV-A-4	2192.67 ± 168.20	0.41 ± 0.19	5356.24
RSV-A-5	139.2 ± 4.76	0.21 ± 0.07	675.07
RSV-A-6	82.91 ± 5.72	0.21 ± 0.04	406.49
RSV-A-9	99 ± 16.74	0.44 ± 0.29	226.35
RSV-A-10	1094 ± 55.97	0.48 ± 0.03	2348.14
RSV-A-12	105.97 ± 6.14	0.89 ± 0.38	118.67
RSV-A-14	110.97 ± 10.79	4.67 ± 1.75	23.79
RSV-D-0	139.7 ± 13.03	0.26 ± 0.23	537.78
RSV-D-2	1915.67 ± 248.98	2.76 ± 1.70	694.25
RSV-D-4	100.31 ± 12.17	22.27 ± 4.30	4.51
RSV-D-5	851.1 ± 67.78	0.73 ± 0.24	1090.45
RSV-D-6	73.21 ± 12.82	0.48 ± 0.19	152.46
RSV-D-7	89.79 ± 5.57	9.08 ± 4.68	9.89
RSV-B-1-1	117.63 ± 3.44	0.88 ± 0.78	133.63
RSV-B-2-1	131.67 ± 9.94	7.62 ± 3.00	17.27
RSV-I-1	182.53 ± 35.70	6.30 ± 2.46	28.98

图 4-12 RSV-A-4 结构式 (分子式: $C_{15}H_{17}O_2N_2S$, MW: 289)Figure 4-12 Structural formula of RSV-A-4 (Molecular formula: $C_{15}H_{17}O_2N_2S$, MW: 289)

4.4.4 6-MP, 6-TI 及 6-MMPr 的体外抗病毒活性

除了国家新化合物库的药物筛选和评价工作, 本论文也比较分析了免疫抑制剂 6-MP 及其代谢产物 6-TI 和 6-MMPr 的体外抗病毒活性。6-MP、6-TI 和 6-MMPr 的体外抗病毒活性检测也是分别基于 HEp-2 和 BEAS-2B 两种细胞系, 实验结果如表 4-4 所示, 鉴于我们课题组前期已经探讨过 6-MP 体内药效, 以及文献中报道的 6-MMPr 对非 RSV 的包膜病毒具有很好的体内抑制效果, 因此, 虽然本研究中 6-MMPr 的 SI 值不是最高的, 但仍选取 6-MMPr 进行后续体内研究。

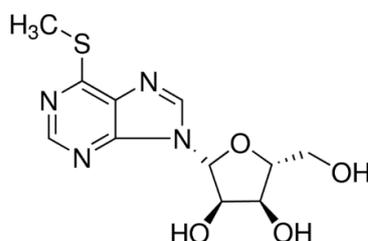
图 4-13 6-MMPr 结构式 (分子式: $C_{11}H_{14}N_4O_4S$, MW: 298.32)Figure 4-13 The structural formula of 6-MMPr (Molecular formula: $C_{11}H_{14}N_4O_4S$, MW: 298.32)

表 4-4 6-MP 及其代谢产物 6-TI, 6-MMPr 基于 HEp-2、BEAS-2B 细胞的 CC_{50} 、 IC_{50} 及 SI
Table 4-4 The CC_{50} , IC_{50} and SI of 6-MP and its metabolites 6-TI, 6-MMPr based on HEp-2 cells and BEAS-2B cells

	HEp-2			BEAS-2B		
	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	SI 值	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	SI 值
6-MP	133.51 ± 31.28	1.29 ± 0.30	103.50	169.47 ± 6.53	0.27 ± 0.14	632.10
6-TI	126.2 ± 9.53	0.92 ± 0.09	137.20	126.96 ± 9.05	0.45 ± 0.23	280.55
6-MMPr	119.1 ± 23.76	11.25 ± 0.54	10.59	148.13 ± 11.90	1.25 ± 1.17	118.76

4.4.5 基于 HAEC 的 RSV-A-4 与 6-MMP_r 体外抗病毒活性

相对于永生化的细胞系,原代培养的呼吸道上皮细胞能够最大程度地模拟体内真实的生理状态和个体之间的差异,因此,原代培养的呼吸道上皮细胞可能比 HEp-2 和 BEAS-2B 细胞系更适合用于体外抗病毒药物研究,所以在 HEp-2 和 BEAS-2B 细胞系之后,我们也利用 HAEC 探讨了 RSV-A-4 与 6-MMP_r 的体外抗 RSV 活性。同样的,也分别采用免疫斑法检测 RSV-A-4 与 6-MMP_r 对 RSV 的抑制效果(图 4-14A)及 MTS 法检测了二者对 HAEC 的细胞毒性(图 4-14B)。结果显示,RSV-A-4 与 6-MMP_r 在 HAEC 上的 IC₅₀ 值分别为 $207.3 \pm 4.766 \mu\text{M}$ 和 $3191 \pm 6.106 \mu\text{M}$,6-MMP_r 的 CC₅₀ 值为 $95526 \pm 10.97 \mu\text{M}$,而 RSV-A-4 则显示在 HAEC 上无毒性,表明 RSV-A-4 与 6-MMP_r 在 HAEC 上具有很好的抗 RSV 作用及安全性。

表 4-5 RSV-A-4 和 6-MMP_r 基于 HAEC 的 CC₅₀、IC₅₀ 及 SI
Table 4-5 RSV-A-4 and 6-MMP_r based on CC₅₀, IC₅₀ and SI of HAEC

化合物	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
RSV-A-4	207.3 ± 4.766	---	---
6-MMP _r	3191 ± 6.106	95526 ± 10.97	29.94

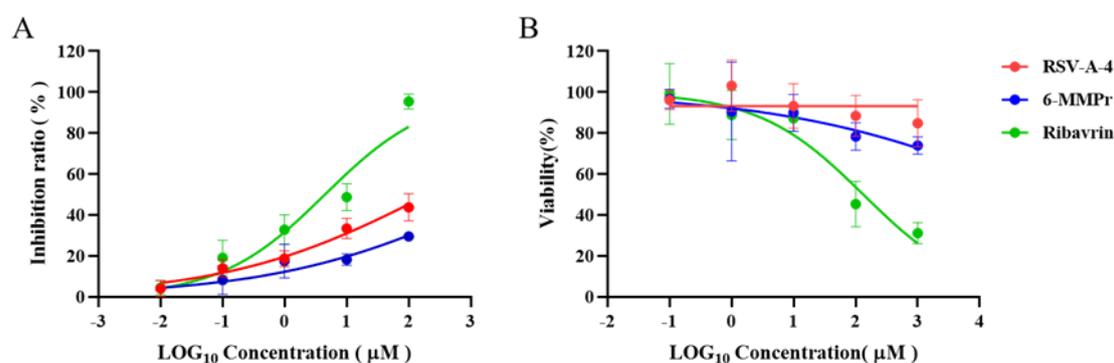


图 4-14 基于 HAEC 的 RSV-A-4 和 6-MMP_r 抗 RSV 活性和细胞毒性

A 图为 RSV-A-4 和 6-MMP_r 的细胞毒性检测结果; B 图为 RSV-A-4 和 6-MMP_r 的抗 RSV 活性检测结果。

Figure 4-14 HAEC-based RSV-A-4 and 6-MMP_r anti-RSV activity and cytotoxicity

Panel A shows the cytotoxicity test results of RSV-A-4 and 6-MMP_r; Panel B shows the anti-RSV activity test results of RSV-A-4 and 6-MMP_r.

4.4.6 RSV-A-4 与 6-MMPr 的体外抗病毒机制研究

鉴于筛选的 RSV-A-4 和 6-MMPr 在体外实验中具有良好的抗 RSV 活性，因此，我们对其体外抗病毒的作用机制进行了初步探讨。为明确 RSV-A-4 和 6-MMPr 抑制 RSV 复制是发生在 RSV 感染细胞早期亦或是在感染晚期，采用 Time of addition assay 在 HAEC 细胞上进行了初步研究。在 RSV 感染 HAEC 细胞 2 h 后，洗去未吸附的 RSV 病毒，并分别在感染 RSV 的-1 h、0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、11 h、12 h、13 h、14 h 时加入药物 RSV-A-4、6-MMPr、GS-5806（融合抑制剂）、RSV 604（靶向 N 蛋白）、Ribavirin（鸟苷类似物，终止复制时链的延伸）以及 DMSO 溶液。在感染 RSV 24 h 后，提取细胞与病毒总 RNA，采用 RT-qPCR 检测各组 RSV 病毒滴度，结果如图 4-15 所示，在-1 h、0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 给予 RSV-A-4 或 6-MMPr 均可有效抑制显著 RSV 复制，与靶向 N 蛋白药物 RSV 604 相似，由此，我们推测 RSV-A-4 和 6-MMPr 主要是在 RSV 的感染晚期或进入细胞后发挥抗感染作用。

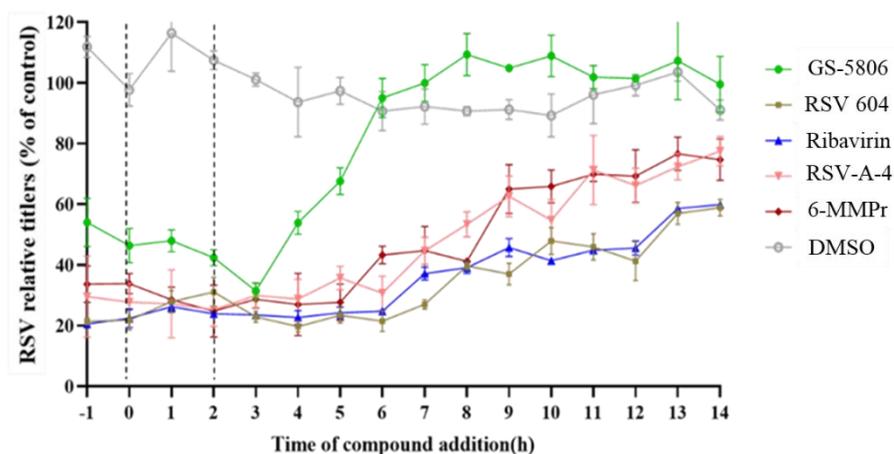


图 4-15 RSV-A-4 和 6-MMPr 抑制 RSV 复制周期实验结果

图中虚线指示的为 RSV 感染细胞的时间为 2h

Figure 4-15 The experimental results of RSV-A-4 and 6-MMPr inhibit RSV replication cycle.

The dotted line in the figure indicates that the time for RSV to infect cells is 2h.

4.5 RSV-A-4 与 6-MMP_r 的体内抗病毒活性研究

4.5.1 RSV-A-4 无明显体内抗病毒活性

根据课题组前期实验结果, 确定 BALB/c 小鼠 RSV 感染剂量为 5×10^5 PFU/只, 将小鼠随机分组后, 将 RSV-Luciferase 以 5×10^5 PFU/只剂量感染 BALB/c 小鼠, 随后以 30 mg/kg 和 90 mg/kg 两个不同剂量, 将 RSV-A-4 以灌胃方式给药, 并以 DMSO 组为阴性对照, Ribavirin 组为阳性对照, 进行 RSV-A-4 的体内药理学研究。具体给药过程如下, BALB/c 小鼠感染 RSV 当天的前 1 h 给第一次药, 此后连续 5 天, 每天给药 2 次, 并应用小动物活体成像系统实时观测并记录小鼠体内的荧光强度变化 (图 4-16A), 以评价 RSV-A-4 的体内抗病毒活性。与阴性对照 DMSO 组相比, Ribavirin 组由第三天起荧光强度显著降低为极小的荧光信号, 而两组 RSV-A-4 的荧光强度则无明显变化; 30 mg/kg RSV-A-4 组在第四天时, 无论是相对于 DMSO 组, 还是相对于本组第三天的情况, 均表现出荧光强度降低的现象, 但第五天的荧光强度又出现升高情况; 90 mg/kg RSV-A-4 组也是同样类似情况, 且 90 mg/kg RSV-A-4 组荧光强度高于 30 mg/kg RSV-A-4 组。但是将上述荧光强度做进一步的统计学处理后 (图 4-16B), 发现无论是 30 mg/kg RSV-A-4 还是 90 mg/kg RSV-A-4 组, 与阴性对照 DMSO 组相比, 均无显著性差异。因此, 为进一步确认 RSV-A-4 体内抗 RSV 活性效果, 应用 RT-qPCR 法进一步检测了小鼠处死后肺组织中病毒滴度, 结果如 4-16C 所示。与阴性对照 DMSO 组相比, 无论是 30 mg/kg RSV-A-4 还是 90 mg/kg RSV-A-4 组, 均无显著性差异。因此综合上述可知, RSV-A-4 不能在体内有效抑制 RSV 的复制。

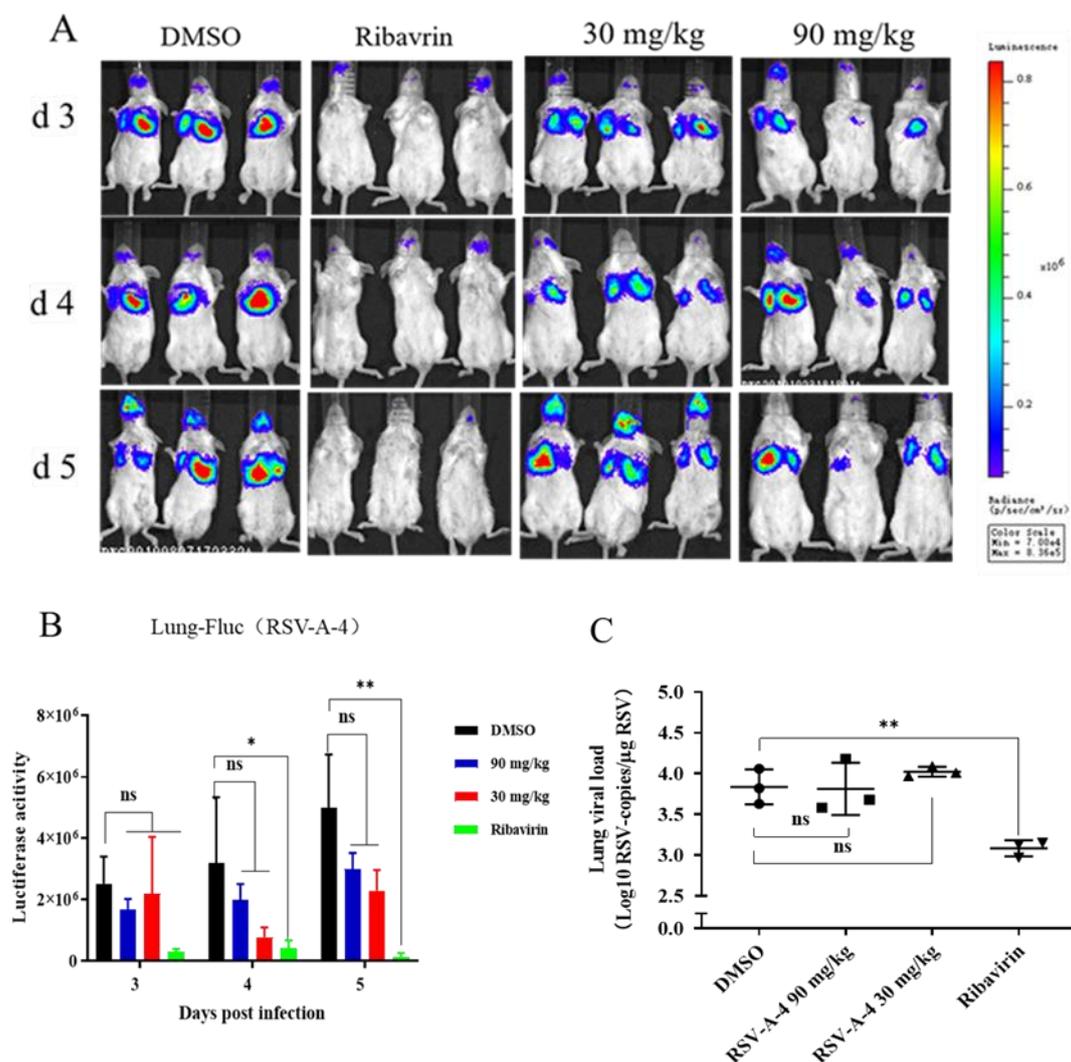


图 4-16 RSV-A-4 的 BALB/c 小鼠体内抗 RSV 活性研究结果

BALB/c 小鼠感染 RSV-Luciferase 后的肺组织和鼻腔活体成像结果 (A); 肺部荧光信号的统计学处理结果 (B); RT-qPCR 分析肺组织中病毒滴度 (C)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: 无统计学差异。

Figure 4-16 Analysis of anti-RSV activities of RSV-A-4 in BALB/c mice.

In vivo imaging results of lung tissues and the nasal cavity of BALB/c mice infected with RSV-Luciferase (A); Statistical results of lung fluorescence signal values (B); RT-qPCR analysis of virus titer in lung tissue(C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: no statistical difference.

4.5.2 6-MMPr 无明显体内抗病毒活性

将小鼠随机分组后,将 RSV-Luciferase 以 5×10^5 PFU/只剂量感染 BALB/c 小鼠,随后以 30 mg/kg 和 90 mg/kg 两个不同剂量,将 6-MMPr 以灌胃方式给药,并以 DMSO 组为阴性对照, Ribavirin 组为阳性对照,进行 6-MMPr 的体内药效学研究。具体给药过程如下, BALB/c 小鼠感染 RSV 当天的前 1 h 给第一次药,此后连续 5 天,每天给药 2 次,并应用小动物活体成像系统实时观测并记录小鼠体内的荧光强度变化(图 4-17A),以评价 6-MMPr 的体内抗病毒活性。与阴性对照 DMSO 组相比, Ribavirin 组由第三天起荧光强度显著降低为极小的荧光信号,而两组 6-MMPr 的荧光强度则无明显变化;30 mg/kg 6-MMPr 组在第四天时,无论是相对于 DMSO 组,还是相对于本组第三天的情况,均表现出荧光强度降低的现象,但第五天的荧光强度又出现升高情况。但是,90 mg/kg 6-MMPr 组在给药第三天小鼠开始出现中毒死亡的迹象,在第四天全部死亡(图 4-17A),因此,为进一步确认 6-MMPr 体内抗 RSV 活性效果,应用 RT-qPCR 法进一步检测了小鼠处死后肺组织中病毒滴度,结果如 4-17C 所示。与阴性对照 DMSO 组相比,30 mg/kg 6-MMPr 组,无显著性差异。因此综合上述可知,6-MMPr 也不能在体内有效抑制 RSV 的复制。

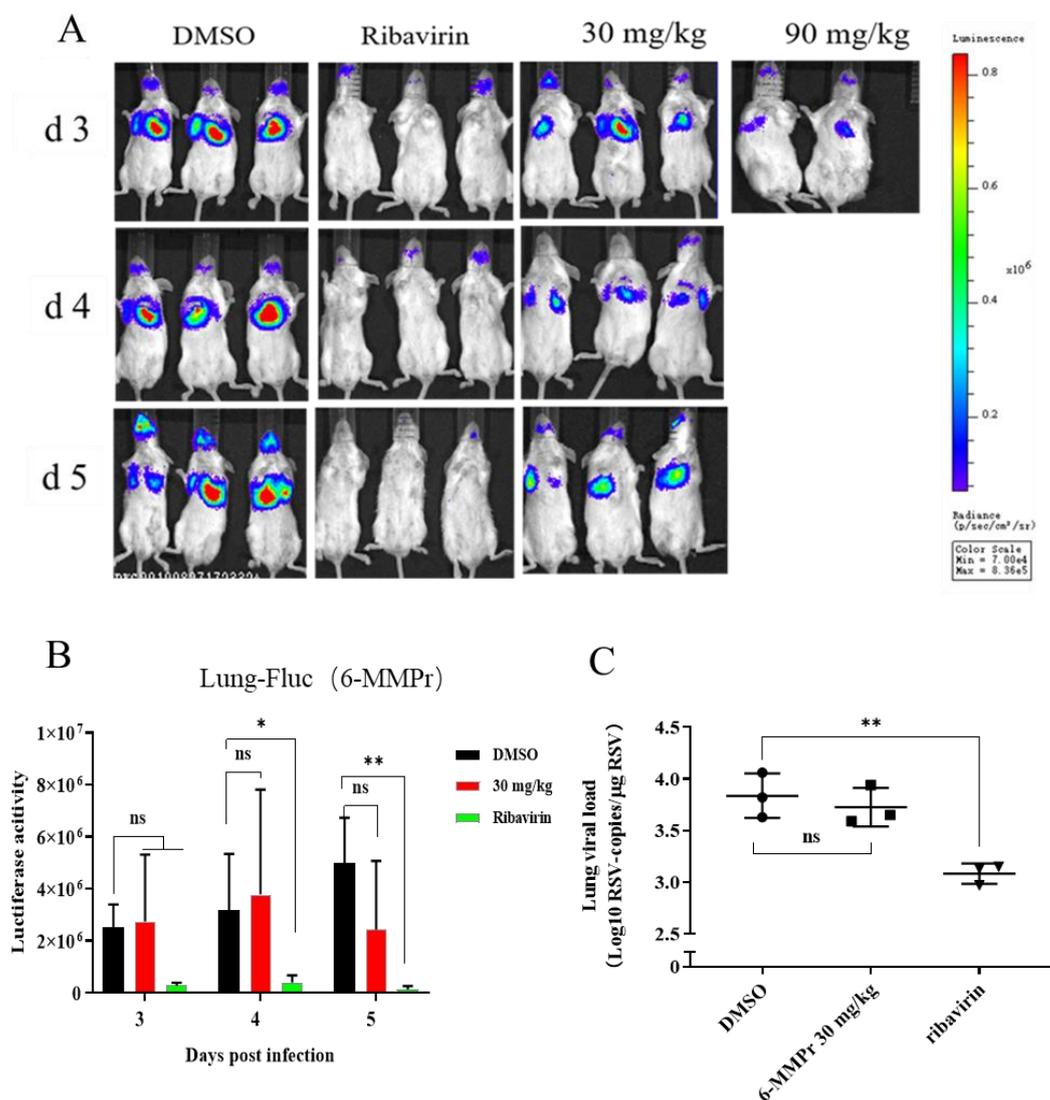


图 4-17 6-MMPPr 的 BALB/c 小鼠体内抗 RSV 活性研究结果

BALB/c 小鼠感染 RSV-Luciferase 后的肺组织和鼻腔活体成像结果 (A); 肺部荧光信号的统计学处理结果 (B); RT-qPCR 分析肺组织中病毒滴度 (C)。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: 无统计学差异。

Figure 4-17 Analysis of anti-RSV activities of 6-MMPPr in BALB/c mice.

In vivo imaging results of lung tissues and the nasal cavity of BALB/c mice infected with RSV-Luciferase(A); Statistical results of lung fluorescence signal values (B); RT-qPCR analysis of virus titer in lung tissue(C)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: no statistical difference.

5 讨论

RSV 是人类呼吸道疾病的重要病原体，不仅是导致儿童下呼吸道疾病和毛细支气管炎的主要原因，也是老年人和免疫功能低下者发病和死亡的重要原因，RSV 感染更在发展中国家造成巨大的死亡率，但遗憾的是，目前不仅仍无安全、有效的疫苗问世，且针对 RSV 感染的抗病毒治疗药物也非常有限。因此为解决当前 RSV 感染药物治疗的困境，在课题组前期工作基础上，本论文对先导化合物 6344B-E6 进行构效优化后筛选出具有抑制 RSV 增殖的活性骨架化合物 RSV-A-4，不仅对其体内外药效学进行了评价，并对其抗病毒活性的作用机制进行了初步探讨。同时，鉴于硫唑嘌呤（AZA）的三级代谢产物 6-MMP_r 的广谱抗病毒作用^[63]，本论文也对该化合物进行了同样的抗 RSV 的体内外药效学和抗病毒活性机制的初步探讨等研究工作。

首先在永生化的呼吸道来源细胞系 HEp-2 中考察了 6344B-E6 结构优化后的 29 种衍生物的抗病毒活性和细胞毒性，从中选取 SI 值大于 10 的 15 种化合物进一步在 BEAS-2B 细胞系上验证其有效性，最后选取了 SI 值最高的，性质稳定的 3-硫代吡啶类化合物 RSV-A-4 作为活性骨架化合物进行后续研究。实验结果显示：RSV-A-4 在 HEp-2 和 BEAS-2B 细胞中的 CC₅₀ 分别为 $3038.00 \pm 193.24 \mu\text{M}$ 和 $2192.67 \pm 168.20 \mu\text{M}$ ，说明 RSV-A-4 在两种不同细胞系中具有相似的细胞毒性；而 RSV-A-4 在 HEp-2 和 BEAS-2B 细胞中的 IC₅₀ 分别为 $2.51 \pm 0.64 \mu\text{M}$ 和 $0.41 \pm 0.19 \mu\text{M}$ ，说明相对于 CC₅₀ 和 IC₅₀ 在两种细胞系上有明显的差异。同样的，6-MMP_r 在 HEp-2 和 BEAS-2B 中的 CC₅₀ 分别为 $119.1 \pm 23.76 \mu\text{M}$ 和 $148.13 \pm 11.90 \mu\text{M}$ ，IC₅₀ 则分别为 $11.25 \pm 0.54 \mu\text{M}$ 和 $1.25 \pm 1.17 \mu\text{M}$ ，也是在两种不同细胞系中有相似的细胞毒性而差别明显的 IC₅₀。出现此种情况的原因可能是因为针对 RSV 感染，BEAS-2B 比 HEp-2 表现的更为敏感，感染相同浓度的 RSV，细胞病变的特征和时间可能有所不同。因此，由上述结果可以得出结论，虽然 HEp-2 和 BEAS-2B 两种不同细胞系对 RSV 的敏感度有所差异，但 RSV-A-4 和 6-MMP_r 均可在细胞水平上有效地抑制 RSV 增殖，显示出它们体外水平的药效学效果。

然后在原代培养的 HAEC 细胞上对 RSV-A-4 的体外药效学效果进行了评价并探讨了其抗 RSV 活性的可能作用机制。永生化的细胞系远没有人呼吸道上皮细胞复杂，且代表性相对较差，而分化良好的 HAEC 由多层上皮细胞组成，包括纤毛、杯状细胞和基底细胞等，可模仿人呼吸道的生理功能和形态环境，因此，HAEC 是研究 RSV 感染的更为合适的体外模型，有助于揭示 RSV 感染复制等工作机制。因此，本论文采集志愿者呼吸道上皮细胞样本，分离细胞后，成功的完

成了 HAEC 的培养, 并进行了细胞形态、活性及纯度的鉴定; 之后在 HAEC 细胞上对 RSV-A-4 与 6-MMPr 的体外药效学进行了进一步的验证, 并对二者抗 RSV 活性的可能作用机制进行了探讨。实验结果显示, RSV-A-4 与 6-MMPr 的 IC_{50} 值分别为 $207.3 \pm 4.766 \mu M$ 和 $3191 \pm 6.106 \mu M$, 6-MMPr 的 CC_{50} 值为 $95526 \pm 10.97 \mu M$, 而 RSV-A-4 在 HAEC 上则显示无毒性; Time-of-addition assay 等实验结果揭示, RSV-A-4 和 6-MMPr 的体外抗病毒活性主要是作用于 RSV 的复制阶段, 二者均是于 RSV 感染早期抑制 RSV 活性, 均是于 RSV 复制阶段抑制病毒增殖, 还需要进一步阐明 RSV-A-4 和 6-MMPr 的有效作用靶点和确切分子机制等, 这些将有待于今后进一步的工作。

体内抗病毒活性检测是对化合物抗病毒活性的进一步鉴定, 相比 RSV-A-4 和 6-MMPr 的体外抗病毒活性研究, 体内实验能够更好的反应化合物抗病毒作用的研究价值, 所以, 选用 RSV 感染常用模型 BALB/c 小鼠为研究对象, 进一步探讨 RSV-A-4 和 6-MMPr 的体内抗病毒活性。小动物活体成像检测技术能够实时检测小鼠体内的病毒复制情况, 并且可以简单直观地分析实验结果。我们利用小动物活体成像系统 IVIS Lumina II 实时检测了实验组小鼠体内 RSV 的复制情况, 结果发现 RSV-A-4 不能有效地抑制 RSV 的复制, 6-MMPr 也不能有效地抑制 RSV 复制, 且较高剂量的 6-MMPr 在给药第三天时即出现小鼠死亡的现象。此外, 在动物实验过程中, 我们发现 RSV-A-4 水溶性一般, 这可能会影响小鼠对其吸收和利用。因而, 需要今后进一步开展体内代谢实验, 了解 RSV-A-4 和 6-MMPr 吸收率和代谢情况。另外, 本实验采用的小鼠数量较少, 可能对结果影响较大, 再加上实验操作等因素, 数据统计结果可能不能反应真实情况, 因此, 需要进一步扩大动物使用量开展体内药效实验的研究, 同时, 还需要进一步对 RSV-A-4 进行结构优化, 改善其水相溶解度, 提高药物利用度。

本论文评价了 2 种体外有效的抗 RSV 活性的药物 RSV-A-4 和 6-MMPr, 并初步明确了其抗 RSV 活性的机制, 为进一步研发抗 RSV 药物奠定了重要基础, 但遗憾的是, 二者的体内药效学活性尚未被证实, 这其中的原因或机理还有待于进一步的探讨和研究。

6 结论

1. 成功建立了可用于药物体外抗 RSV 活性验证的较为理想的人原代呼吸道上皮细胞（HAEC）模型；
2. RSV-A-4 和 6-MMP_r 均能在体外有效地抑制 RSV 复制，且均是在病毒基因组复制早期阶段抑制 RSV 活性；
3. RSV-A-4 和 6-MMP_r 均不能在体内有效地抑制 RSV 复制。

参考文献

- [1] Ambrose, C.S. Is it RSV? [J] Health Sci Rep, 2018. 1(12): e97.
- [2] Baum, S.G. RSV---Another Serious Respiratory Infection. [J] Clin Infect Dis, 2020.
- [3] Griffiths, C, S.J. Drews and D.J. Marchant. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. [J] Clin Microbiol Rev, 2017. 30(1): 277-319.
- [4] Mejias, A. and O. Ramilo. Respiratory syncytial virus treatment and the respiratory microbiome. [J] Lancet Respir Med, 2020. 8(10): 941-943.
- [5] Zhang, T, et al. Clinical characteristics and direct medical cost of respiratory syncytial virus infection in children hospitalized in Suzhou, China. [J] Pediatr Infect Dis J, 2014. 33(4): 337-341.
- [6] Obando-Pacheco, P, et al. Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. [J] Infect Dis, 2018. 217(9): 1356-1364.
- [7] Schweitzer, J.W. and N.A. Justice. Respiratory Syncytial Virus Infection. 2021.
- [8] Woodland, D.L. Respiratory Syncytial Virus. [J] Viral Immunol, 2019. 32(2): 75.
- [9] Tsergouli, K, et al. Respiratory Syncytial Virus in Greece, 2016-2018. [J] Intervirology, 2019. 62(5-6): 210-215.
- [10] Griffiths, C.D, et al. IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. [J] Nature, 2020. 583(7817): 615-619.
- [11] Schweitzer, J.W. and N.A. Justice. Respiratory Syncytial Virus Infection. 2021.
- [12] Borchers, A.T, et al. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. [J] Clin Rev Allergy Immunol, 2013. 45(3): 331-379.
- [13] Everard, M.L, et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. [J] Arch Dis Child, 1994. 71(5): 428-432.
- [14] Krilov, L.R, et al. Respiratory virus infection of peripheral blood monocytes: correlation with ageing of cells and interferon production in vitro. [J] Gen Virol, 1987. 68 (Pt 6): 1749-1753.
- [15] Steck, F.T. and H. Rubin. The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. [J] Virology, 1966. 29(4): 642-653.
- [16] Bawage, S.S, et al. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. [J] Adv Virol, 2013. 2013: 595-768.
- [17] Bawage, S.S, et al. Gold nanorods inhibit respiratory syncytial virus by stimulating the innate immune response. [J] Nanomedicine, 2016. 12(8): 2299-2310.
- [18] Abadia, O.J, et al. Respiratory syncytial virus burden of disease in hospitalized patients in a Spanish tertiary hospital. [J] Infect Dis (Lond), 2020. 52(6): 434-436.
- [19] El-Bietar, J, et al. RSV infection without ribavirin treatment in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. [J] Bone Marrow Transplant, 2016. 51(10): 1382-1384.
- [20] Zhang, C, N. Li and F. Niu. Baicalein triazole prevents respiratory tract infection by RSV through suppression of oxidative damage. [J] Microb Pathog, 2019. 131: 227-233.
- [21] Acero-Bedoya, S, et al. Recent Trends in RSV Immunoprophylaxis: Clinical Implications for the Infant. [J] Am J Perinatol, 2019. 36(S 02): S63-S67.
- [22] Alansari, K, et al. Monoclonal Antibody Treatment of RSV Bronchiolitis in Young Infants: A Randomized Trial. [J] Pediatrics, 2019. 143(3).
- [23] Priante, E, et al. Restricted Palivizumab Recommendations and the Impact on RSV

- Hospitalizations among Infants Born at > 29 Weeks of Gestational Age: An Italian Multicenter Study. [J] *Am J Perinatol*, 2019. 36(S 02): S77-S82.
- [24] American Academy of Pediatrics. Respiratory syncytial virus immune globulin intravenous: indications for use. Committee on Infectious Diseases, Committee on Fetus and Newborn. [J] *Pediatrics*, 1997. 645-650.
- [25] Hayes, C, et al. Effectiveness of RSV-IVIG in premature infants: success in the home. [J] *Pediatrics*, 1999. 103(3): 698-709.
- [26] Domachowske, J.B, et al. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MEDI8897, an Extended Half-life Single-dose Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-targeting Monoclonal Antibody Administered as a Single Dose to Healthy Preterm Infants. [J] *Pediatr Infect Dis J*, 2018. 37(9): 886-892.
- [27] Griffin, M.P, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. 61(3).
- [28] Zhu, Q. and B. Lu, et al. "Prevalence and Significance of Substitutions in the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Resulting in Neutralization Escape From Antibody MEDI8897." [J] *The Journal of infectious diseases*, 218 (4): 572-580.
- [29] Broadbent, L, et al. Comparative Therapeutic Potential of ALX-0171 and Palivizumab against Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolate Infection of Well-Differentiated Primary Pediatric Bronchial Epithelial Cell Cultures. [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 2020. 64(2).
- [30] Cunningham, S, et al. Nebulised ALX-0171 for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in hospitalised children: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. [J] *Lancet Respir Med*, 2021. 9(1): 21-32.
- [31] Detalle, L, et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016. 60(1): 6-13.
- [32] Larios, M.A, et al. Delivery of ALX-0171 by inhalation greatly reduces respiratory syncytial virus disease in newborn lambs. [J] *MAbs*, 2018. 10(5): 778-795.
- [33] Bergeron, H.C, et al. Respiratory Syncytial Virus (RSV) G Protein Vaccines With Central Conserved Domain Mutations Induce CX3C-CX3CR1 Blocking Antibodies. [J] *Viruses*, 2021. 13(2).
- [34] Arasaratnam, R. ALS-008176 for Respiratory Syncytial Virus Infection. [J] *N Engl J Med*, 2016. 374(14): 1391.
- [35] DeVincenzo, J.P, et al. Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. [J] *N Engl J Med*, 2015. 373(21): 2048-2058.
- [36] DeVincenzo, J, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). [J] *Antiviral Res*, 2008. 77(3): 225-231.
- [37] Gottlieb, J, et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. [J] *Heart Lung Transplant*, 2016. 35(2): 213-21.
- [38] Chemaly, R.F, et al. A Phase 2, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial of Presatovir for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Upper Respiratory Tract Infection

- in Hematopoietic-Cell Transplant Recipients. [J] Clin Infect Dis, 2020. 71(11): 2777-2786.
- [39] Marty, F.M, et al. A Phase 2b, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Multicenter Study Evaluating Antiviral Effects, Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Presatovir in Hematopoietic Cell Transplant Recipients with Respiratory Syncytial Virus Infection of the Lower Respiratory Tract. [J] Clin Infect Dis, 2020. 71(11): 2787-2795.
- [40] Xin, Y, et al. The Drug-Drug Interaction Profile of Presatovir. [J] Clin Pharmacol, 2018. 58(6): 771-780.
- [41] Kim, Y.I, et al. The antiviral effects of RSV fusion inhibitor, MDT-637, on clinical isolates, vs its achievable concentrations in the human respiratory tract and comparison to ribavirin. [J] Influenza Other Respir Viruses, 2017. 11(6): 525-530.
- [42] Martínón-Torres, F. and S. Rusch, et al. (2020). "Pharmacokinetics, Safety, and Antiviral Effects of Multiple Doses of the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Inhibitor, JNJ-53718678, in Infants Hospitalized With RSV Infection: A Randomized Phase 1b Study." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 71 (10): e594-e603.
- [43] Broadbent, L, et al. Comparative Therapeutic Potential of ALX-0171 and Palivizumab against Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolate Infection of Well-Differentiated Primary Pediatric Bronchial Epithelial Cell Cultures. [J] Antimicrob Agents Chemother, 2020. 64(2).
- [44] Bonfanti, J.F, et al. Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate. 2. Discovery of a morpholinopropylaminobenzimidazole derivative (TMC353121). [J] Med Chem, 2008. 51(4): 875-896.
- [45] Ispas, G, et al. Antiviral Activity of TMC353121, a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor, in a Non-Human Primate Model. [J] PLoS One, 2015. 10(5): e0126959.
- [46] Keir, H.R, et al. CXCL-8 dependent and independent neutrophil activation in COPD: experiences from a pilot study of the CXCR2 antagonist danirixin. [J] ERJ Open Res, 2020. 6(4).
- [47] Lloyd, R.S, et al. Negative Food Effect of Danirixin: Use of PBPK Modelling to Explore the Effect of Formulation and Meal Type on Clinical PK. [J] Pharm Res, 2020. 37(12): 233.
- [48] Madan, A, et al. Efficacy and Safety of Danirixin (GSK1325756) Co-administered With Standard-of-Care Antiviral (Oseltamivir): A Phase 2b, Global, Randomized Study of Adults Hospitalized With Influenza. [J] Open Forum Infect Dis, 2019. 6(4): ofz163.
- [49] Charron, C.E, et al. RV568, a narrow-spectrum kinase inhibitor with p38 MAPK-alpha and -gamma selectivity, suppresses COPD inflammation. [J] Eur Respir J, 2017. 50(4).
- [50] Hirota, J.A, D.A. Knight, et al. Human airway epithelial cell innate immunity: relevance to asthma. [J] Curr Opin Immunol, 2012. 24(6): 740-6.
- [51] Rayner, R.E, et al. Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. [J] Scientific Reports, 2019. 9(1).
- [52] Luengen, A.E, et al. Choosing the Right Differentiation Medium to Develop Mucociliary Phenotype of Primary Nasal Epithelial Cells In Vitro. [J] Scientific Reports, 2020. 10(1).
- [53] Zhou, X, et al. Sialylation of MUC4beta N-glycans by ST6GAL1 orchestrates human airway epithelial cell differentiation associated with type-2 inflammation. [J] Cell Insights, 2019. 4(5).
- [54] Pickles, R.J. Human airway epithelial cell cultures for modeling respiratory syncytial virus infection. [J] Curr Top Microbiol Immunol, 2013. 372: 371-87.

- [55] Jonsdottir, H.R, et al. Establishment of Primary Transgenic Human Airway Epithelial Cell Cultures to Study Respiratory Virus-Host Interactions. [J] *Viruses*, 2019. 11(8).
- [56] Gobel, J, et al. A Phenotypic High-Throughput Screen with RSV-Infected Primary Human Small Airway Epithelial Cells (SAECs). [J] *Biomol Screen*, 2015. 20(6): 729-38.
- [57] Mirabelli, C, et al. Differential antiviral activities of respiratory syncytial virus (RSV) inhibitors in human airway epithelium. [J] *Antimicrob Chemother*, 2018. 73(7): 1823-1829.
- [58] Qin, L, et al. Bronchial Epithelial Cells Promote the Differentiation of Th2 Lymphocytes in Airway Microenvironment through Jagged/Notch-1 Signaling after RSV Infection. [J] *Int Arch Allergy Immunol*, 2019. 179(1): 43-52.
- [59] Carvajal, J, et al. Host Components Contributing to Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. [J] *Front Immunol*, 2019. 10: 2152.
- [60] 一种抗呼吸道合胞病毒药物的高通量筛选方法和应用, 2017.
- [61] Daelemans, D, et al. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds.[J] *Nature Protocols*, 2011. 6(6): 925-933.
- [62] 焦月盈. 呼吸道合胞病毒样颗粒单次滴鼻途径免疫小鼠诱导的免疫保护作用研究.[D]
- [63] Hoover, S. and R. Striker. Thiopurines inhibit bovine viral diarrhea virus production in a thiopurine methyltransferase-dependent manner. [J] *Journal of General Virology*, 2008. 89(4): 1000-1009.

附录

英文缩略词表

AZA	Azathioprine	硫唑嘌呤
Bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus	牛病毒性腹泻病毒
CDV	Caninedistempervirus	犬瘟热病毒
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
CC ₅₀	Half maximal cytotoxic concentration	半数细胞毒性浓度
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco 改良的 Eagle 培养液
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸二钠
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
ERD	Enhanced RSV disease	RSV 疾病增强作用
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCS	Fetal calf serum	小牛血清
HAEC	Human Primary Airway Epithelial Cell	人原代呼吸道上皮细胞
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonicacid	4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
M	Mole per liter	摩尔每升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NET	Neutrophil extracellular trap	中性粒细胞胞外陷阱
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PVP	Polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮

RSV	Respiratory syncytial virus	呼吸道合胞病毒
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR	实时定量 PCR
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
WNV	West Nile Virus	西尼罗河病毒
YFV	Yellow fever virus	黄热病毒
6-MP	6-Mercaptopurine	6-巯基嘌呤
6-TI	6-Thioinosine	6-巯基嘌呤核苷
6-MMPr	6-Methylmercaptopurine riboside	6-甲基巯基嘌呤核糖核苷酸

作者简介

一、作者简介

姓名：程宁宁

性别：女

出生日期：1993.11.27

籍贯：山西省朔州市

教育经历：

2018.09-2021.07 北京交通大学，生物学，获硕士学位

2014.09-2018.07 山西大同大学，生物工程，获学士学位

二、发表论文情况

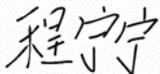
- [1] **Ningning Cheng**^{*}, Nan Jiang^{*}, Yuanhui Fu, Zhuxin Xu, Guoning Zhang, Xianglei Peng, Jiemei Yu, Shan Cen, Yucheng Wang, Yanpeng Zheng, Jinsheng He. The mechanism in vitro and pharmacodynamics in vivo of 2-((1H-indol-3-yl) thio)-N-phenyl-acetamides as a novel inhibitor against respiratory syncytial virus. Chinese chemical letters, submitted. (*共同第一作者)
- [2] Yu-cheng Wang^{*}, Guoning Zhang, Jianyuan Zhao, **Ningning Cheng**, Yuanhui Fu, Yanpeng Zheng, Jinsheng He, et al. Synthesis and antiviral activity of a series of novel quinoline derivatives as anti-RSV or anti-IAV agents. Eur J Med Chem, 2021(3), 214:113208. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113208.
- [3] **程宁宁**^{*}, 万常青^{*}, 付远辉, 何金生, 郑妍鹏, 人呼吸道合胞病毒感染不同细胞差异表达基因的筛选及生物信息学分析(撰写中), (*共同第一作者)。

三、参与科研项目

参与十二五国家艾滋病和病毒性肝炎等重大传染防治专项(2013ZX10004601)课题, 基于化学基因组学的病原诊治生物标志物高通量筛选平台。

独创性声明

本人声明所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果,除了文中特别加以标注和致谢之处外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得北京交通大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名:  签字日期: 2021年 06 月 04 日

学位论文数据集

表 1.1: 数据集页

关键词*	密级*	中图分类号	UDC	论文资助
人呼吸道合胞病毒；原代人呼吸道上皮细胞；抗病毒化合物；构效优化；药效学；作用机制	公开			
学位授予单位名称*		学位授予单位代码*	学位类别*	学位级别*
北京交通大学		10004	理学	硕士
论文题名*		并列题名		论文语种*
小分子化合物 RSV-A-4 和 6-MMP _r 抗呼吸道合胞病毒的药效学及机制研究				中文
作者姓名*	程宁宁		学号*	18121611
培养单位名称*		培养单位代码*	培养单位地址	邮编
北京交通大学		10004	北京市海淀区西直门外上园村 3 号	100044
学科专业*		研究方向*	学制*	学位授予年*
生物学		生物药物基础与应用	三年	2021
论文提交日期*				
导师姓名*	郑妍鹏		职称*	副教授
评阅人	答辩委员会主席*		答辩委员会成员	
电子版论文提交格式 文本 () 图像 () 视频 () 音频 () 多媒体 () 其他 () 推荐格式: application/msword; application/pdf				
电子版论文出版 (发布) 者		电子版论文出版 (发布) 地		权限声明
论文总页数*				
共 33 项, 其中带*为必填数据, 为 21 项。				