

# Tilmicosin 在培養的豬肺泡巨噬細胞中 對第一型(歐洲株)及第二型(美洲株)PRRS 病毒 的抗病毒作用

翻譯：獸醫師 程嘉華 Jessie Cheng D.V.M

原文: Antiviral Activity of Tilmicosin for Type 1 and Type 2 Procine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Cultured Procine Alveolar Macrophages

出處: Journal Antivirals & Antiretrovirals Vol. 3(3):028-033 (2011)

作者: Yijun Di<sup>1</sup>, Dongwan Yoo<sup>1</sup>, Marie Anne Paradis<sup>2</sup> and Gail Scherba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, University of Illinois, Urbana, IL61802 USA

<sup>2</sup>Elanco Animal Health, St-Jean-sur-Richelieu, QC J3A 1S7, Canada

## 摘要

Tilmicosin 被研究能穩定存在於豬肺泡巨噬細胞中，發揮對抗第一型(歐洲株)及第二型(美洲株)PRRS 病毒(PRRSV)的作用，Tilmicosin 在培養的豬肺泡巨噬細胞中，對兩種基因型的 PRRS 病毒展現很強的抗病毒作用，其中對第一型(歐洲株)PRRS 病毒的抗病毒效果更強，對具感染性第一型(歐洲株)病毒可降低 43 倍、對第二型(美洲株)病毒可降低 14 倍，使用即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)檢測病毒核殼體(nucleocapsid)的基因，以確認 Tilmicosin 產生降低具感染病毒力價的作用，具有親溶酶體(lysosomotropic)及封閉離子通道的藥物，能有效抑制 PRRS 病毒的複製作用；推論 Tilmicosin 的作用機制是結合改變核內體(endosomal)的酸鹼度及病毒膜上的離子通道作用來產生抗病毒效果。本研究顯示 Tilmicosin 可能被使用於 PRRS 病毒流行地區，特別是第一型(歐洲株)，做為早期治療或預防感染之用。

## 引言

豬繁殖及呼吸道綜合症(PRRS)被視為是一種重新浮現的豬病，PRRS 在 1980 年代晚期第一次在美國和德國同時被確認，此後，PRRS 很快地在大部分養豬的國家散布，而且變成對全球豬肉產業造成經濟損失最嚴重的疾病之一，PRRS 影響種畜群和肉豬群，起初會出現繁殖問題，出生仔豬的死亡率增加、生長遲滯，每頭母豬因急性 PRRS 爆發導致的經濟損失從 250 美元到超過 500 美元，每年對美國豬肉生產者造成的經濟損失估計有 6 億美元。因此，PRRS 對養豬業者所導致的經濟衝擊非常龐大。

PRRS 病毒在歐洲和美國被分離出來，可以明顯的分為兩個基因分型(被稱為第一型和第二型)；兩者相似度只有 60%，自從此病出現，PRRS 病毒的研究已經有長足的進展。在美國，最近已經分離出一種能導致豬隻臨床疾病的新基因型 PRRS

病毒，此一新基因型病毒在基因分支上與第一型PRRS病毒接近，已經被稱為歐洲PRRS病毒(Euro-PRRSV)。在亞洲大陸上，2006年春天在中國發生的一種高病原性PRRS病毒，在中國國內廣泛的散布，並由中國擴散到越南及俄國，相對於先前的病毒，此一新的病毒株造成很高的發病率及死亡率，因此，被命名為豬高熱病(Porcine High Fever Disease, PHFD)，豬高熱病的爆發重創了中國的養豬業，也造成幾波的豬價上漲，像這樣高毒力PRRS病毒的突然出現是無法預測的，同時，在北美的豬群中也可能會出現高毒力的PRRS病毒，急需要準備好有效的控制方式。

目前疫苗可預期的效果離滿意還有相當遙遠的距離，無法減輕PRRS相關的損失。第一支PRRS的商業疫苗於1994年上市，此一疫苗是透過病毒在猴腎上皮細胞多次繼代減毒製成的(商品名稱是Ingelvac PRRS MLV，德國百靈佳生產)，雖然此疫苗可以提供適當程度對同型病毒感染的免疫保護，對異型病毒的保護則不周全，因此，在農場的保護力有相當的差異度。此外，減毒疫苗另一個重要的疑慮是它的安全性，疫苗病毒可能在接受免疫和未免疫的豬隻之間排放和散布，並且可能透過接受疫苗的種公豬之精液傳播，因此，可能在種畜群中散佈疾病。開業獸醫師和診斷專家曾經提出疾病爆發的報告，當豬群出現流產和死亡等症候群，被視為非典型PRRS；或在接受過百靈佳減毒疫苗免疫的豬群中出現急性PRRS，其中部分甚至接受過幾次的疫苗免疫。這些臨床的問題，其特點有一種母豬在懷孕中期或後期流產、肉豬出現呼吸道疾病，被歸因於PRRS病毒感染的典型傷害。這些豬群被確認唯一的病原就是PRRS病毒，且病毒的基因型與被使用於豬群的疫苗病毒在ORF1或ORF5基因序列高度相似。

一般而言，病毒僅攜帶少量的基因，因此，它們必須盜用被感染細胞的細胞內機制來複製自己，理所當然地，病毒複製必須嚴格依賴宿主細胞的代謝途徑，理想的安全治療和有效抗病毒藥物會選擇影響目標病毒的特殊作用機制，同時，對正常細胞內代謝途徑的副作用極少。因此，相較於獸醫用的疫苗主要著重在預防疾病，發展出特殊病毒的抗病毒藥物更加困難；在令人滿意的疫苗尚未出現前，對改善PRRS的經濟損失來說，抗病毒的化學治療還是划算的選項。

Tilmicosin就是一種有潛在抗病毒效果的藥物，它是Tylosin經過*Streptomyces fradiae*化學合成的衍生物，Tilmicosin已經被研發成為牛及綿羊使用的針劑，及豬所使用的飼料預混劑，它的抗菌效果是針對格蘭氏陽性菌和部分格蘭氏陰性菌，同時對某些細胞內寄生菌，如*Rodococcus spp.*和*Mycoplasma spp.*也有效果，Tilmicosin已經被研究證實對PRRS病毒的抗病毒作用有限，在先前的研究中，Tilmicosin在培養的豬肺泡巨噬細胞中可以以劑量相關的方式(dose-dependent manner)抑制PRRS病毒複製；一種巨環類衍生物Tylvalosin，在培養細胞內可以同時抑制歐洲型和北美型的PRRS病毒。在豬隻感染PRRS病毒的試驗中，以Tilmicosin以飼料添加的方式給予治療後，相較於未投藥的感染組，降低了嚴重的淋巴結腫大、肺部病變和病毒血症。在PRRS病毒感染保育豬的試驗中，相較於未投藥的感

染組，Tilmicosin降低了疾病的嚴重程度、有較少的臨床症狀、有較多的飼料採食量和增重、同時肺臟和血清中的病毒滴度也有降低的趨勢。最近，Tilmicosin也在田間用於母豬來進行評估。針對PRRS病毒使用血清治療，對暴露於現有病毒株的種畜群來說，接種血清可能是一個有效控制PRRS的選項。無論如何，這樣的操作可能導致死亡率或流產增加，並且因此出現某種程度的風險。若合併Tilmicosin飼料添加及血清接種給懷孕母豬，對照於沒有飼料加藥的母豬，則可以降低死亡率和流產率。另一個試驗在控制的環境中對保育豬進行Tilmicosin飲水投藥，與未投藥的對照組相比，用藥的豬隻可降低50%的死亡率、有較低的體溫、明顯的增加平均日增重、並降低肺部損傷。大家都知道，Tilmicosin在巨噬細胞中的濃度很高，同時巨噬細胞也是PRRS病毒複製的主要目標細胞，所以，這就可能解釋了為什麼投與Tilmicosin的豬隻會降低臨床疾病嚴重程度的原因。

在這次的近期研究中，以Tilmicosin在培養的豬肺泡巨噬細胞中，測試其對第一型(歐洲株)與第二型(美洲株)PRRS病毒的抗病毒效果，Tilmicosin對病毒的影響以具感染力的滴度分析和量化病毒基因的方式來測量，結果顯示Tilmicosin可抑制病毒的複製，並且對第一型(歐洲株)PRRS病毒有較強的抗病毒效果，Tilmicosin具有抑制病毒複製的效果，使得它在對PRRS病毒感染可能可以作為治療或預防之用。

## 試驗材料和方法

### 細胞和病毒

使用保存DMEM(Dulbecco's Modified Eagles's Medium)細胞培養基中的非洲綠猴腎臟上皮細胞(MARC-145)，提供10%熱處理使之不活化的胎牛血清(FBS, Fetal Bovine Serum)在37°C、5%CO<sub>2</sub>培養箱中培養；同時，由伊利諾大學的Zuckemann博士提供一株穩定的豬肺泡巨噬細胞(稱為Z-mac細胞)，此細胞生長於含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute)培養基中；另外，所使用的PRRS病毒，第一型(歐洲株)是選用Lelystad virus(LV)株、第二型(美洲株)是選用PA8株。

### 透過TCID<sub>50</sub>滴定分析來判定有效劑量

大約 $1 \times 10^5$ 的Z-mac細胞培養於96孔盤，細胞立刻以20~80  $\mu$ g/ml不同濃度的Tilmicosin(由禮來公司提供)處理，二十四小時後，存在Tilmicosin的細胞以100TCID<sub>50</sub>的PRRS病毒PA8或LV感染，控制組(未投藥)也進行一致的病毒感染，感染後18小時，浮在表面的感染性病毒被收集在MARC-145細胞中進行滴定，滴度以TCID<sub>50</sub>/ml來記錄，對每一個不同濃度Tilmicosin處理過的細胞都有三個重複組，整個試驗至少被重複兩次，三個重複組的數值都進行統計變異數分析和t-test。

### 病毒RNA萃取及即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)

試驗中受到PRRS病毒處理或沒有進行Tilmicosin處理的Z-mac細胞，未受感染

的細胞可做為負對照組，病毒的RNA以QIAamp套組(Qiagen公司提供)由培養細胞的懸浮液中萃取，使用M-MLV反轉錄酶(M-MLV Reverse Transcriptase)在25  $\mu$ l的反應混合物中進行反轉錄(Reverse Transcription)反應，反應混合物中含有12  $\mu$ l RNA、3  $\mu$ l反置引子、5  $\mu$ l五倍緩衝劑、1.5  $\mu$ l dNTP混合物、2  $\mu$ l IDTT、0.5  $\mu$ l RNases抑制劑和1  $\mu$ l的M-MLV反轉錄酶；接著，在一個總體積25  $\mu$ l含有2.5  $\mu$ l cDNA template、12.5  $\mu$ l SYBR<sup>®</sup> Green PCR混合劑與每種引子5  $\mu$ l的混合物中進行即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)。溫度循環的條件是95<sup>°</sup>C、2分鐘、1次循環，接著以95<sup>°</sup>C、15秒，延續60<sup>°</sup>C、1分鐘的溫度循環40次，即時聚合酶連鎖反應所使用的寡核酸配對引子，是設計用來放大病毒核蛋白殼基因的ORF7區，供第一型(歐洲株)PRRS病毒LV株的引子是LV-Rtime-Fwd: 5'-TCACCCAGACTGAACGCTCCC-3'和LV-Rtime-Rev: 5'-CACCTGACTGGCGGATGTAG-3'；第二型(美洲株)PRRS病毒PA8株的引子是PA8-Rtime-Fwd: 5'-AATAACAACGGCAAGCAGCAG-3'和PA8-Rtime-Rev: 5'-CCTCTGGACTGGTTTTGCTGA-3'。

### 化學物質對PRRS病毒產生抑制離子通道及提升核內體酸鹼度的作用

由Sigma-Aldrich採購Verapamil、Chloroquine、Amantadine、和Ammonium chloride這幾種試驗用藥物，使用蒸餾水分別配製成50  $\mu$ M、20  $\mu$ M、0.4 mM和5 mM的最適儲存濃度，然後利用0.25  $\mu$ m的針筒過濾器來去除細菌。在96孔盤中的每個孔中種植 $1 \times 10^5$ 的Z-mac細胞，個別添加試劑以37<sup>°</sup>C培養24小時，後續在不同的藥物中以100TCID<sub>50</sub>的PRRS病毒PA8株或LV株進行感染。感染後18小時，收集上清液測定TCID<sub>50</sub>，並以即時聚合酶連鎖反應進行基因組定量，未添加化學藥物並進行病毒感染的細胞則當成控制組。

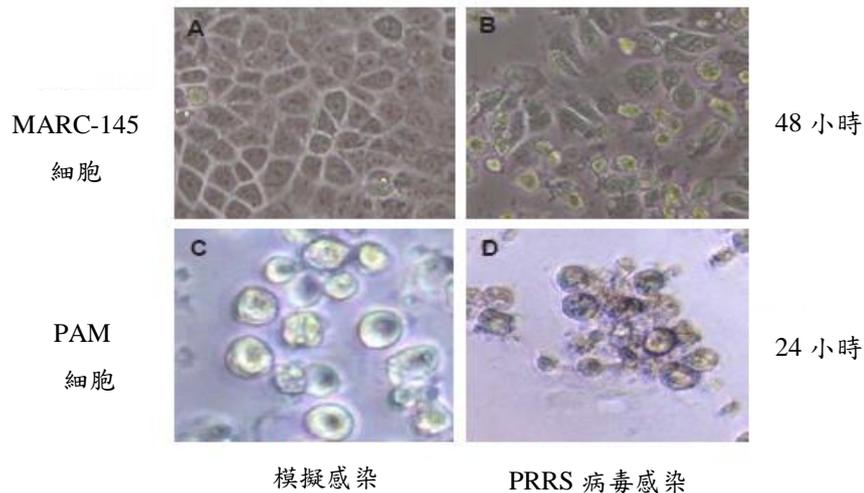
### 統計分析

所有數據都進行都進行變異數分析和t-test。其p-value小於0.05者被視為有顯著性差異。

## 結果

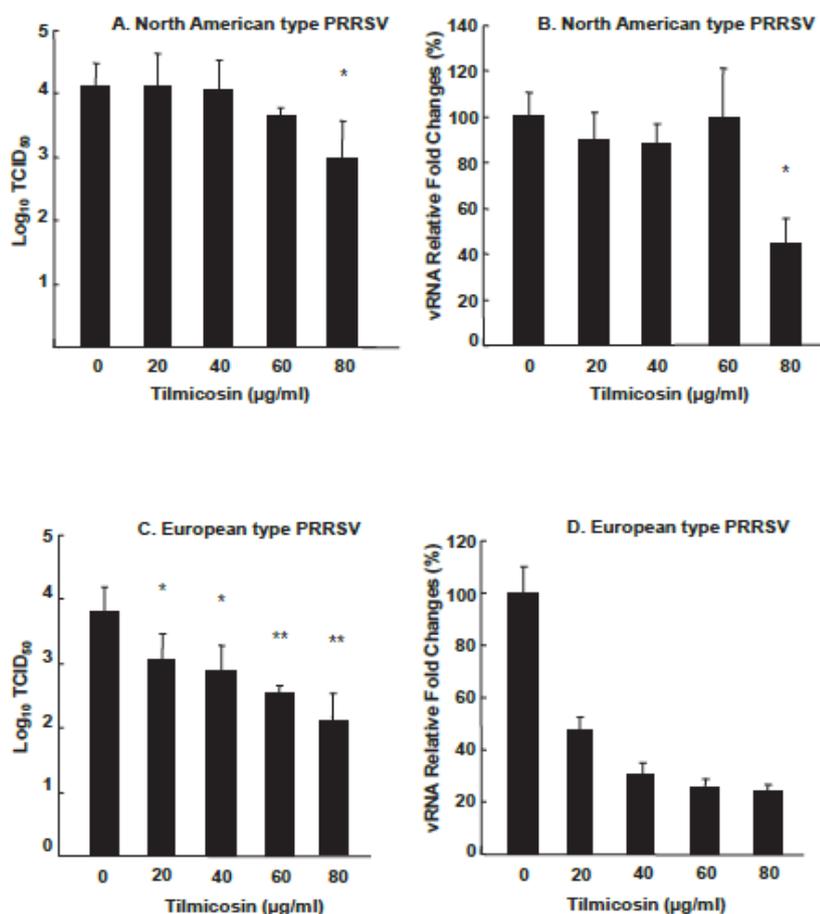
### Tilmicosin對第二型PRRS病毒的抗病毒作用

在Z-mac細胞中使用第二型(美洲株)PRRS病毒來評估Tilmicosin的抗病毒效果，這些細胞，最初來自於豬肺泡巨噬細胞並被建立為不朽化細胞株(immortalize cell line)，是完全能讓PRRS病毒複製的細胞，最近的研究認為Z-mac細胞與每次試驗由不同豬隻取出的初級豬肺泡巨噬細胞(PAMs)的基因差異很小，可以被當作標準細胞株，當PRRS病毒感染Z-mac細胞時，感染後16小時會明顯出現細胞病變效應(CPEs, Cytopathic Effects)，並且大部分細胞會在感染後24小時死亡(請見圖一D)。48小時內，Z-mac產生明顯細胞病變效應(CPE)的速度比MARC-145更快(請見圖一B)，使用第一型和第二型PRRS病毒進行感染所產生的細胞病變效應(CPE)並無不同。



圖一、以PRRS病毒對MARC-145細胞株(A、B)和豬肺泡巨噬(PAM)細胞(C、D)進行5小時多重感染，豬肺泡巨噬(PAM)細胞經過24小時培養、MARC-145細胞株經過48小時培養後，在豬肺泡巨噬(PAM)細胞中產生細胞病變效應(CPE)比MARC-145更快。

在使用高濃度Tilmicosin(200 $\mu$ g/ml)處理的Z-mac細胞，以血球計數器觀察細胞毒性，可見細胞總數減少約20%，相對地，以較低濃度Tilmicosin(80 $\mu$ g/ml)處理組之細胞毒性則不明顯。所以，在有效劑量滴定試驗中，就選定使用0~80 $\mu$ g/ml的Tilmicosin。當以100TCID<sub>50</sub>的PRRS病毒PA8株進行感染未使用Tilmicosin處理組，感染後18小時可產生4.11log<sub>10</sub>/ml(相當於1.29X10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/ml)的病毒量(請見圖二A)；相對於使用80 $\mu$ g/ml Tilmicosin處理組，病毒量則只有2.98log<sub>10</sub>/ml(相當於9.55X10<sup>2</sup>TCID<sub>50</sub>/ml)，統計分析有顯著性差異( $p < 0.05$ )，相當於降低了14倍。若低於80 $\mu$ g/ml濃度的Tilmicosin處理組，其降低病毒產生的效果則無統計性差異。



圖二、在96孔盤培養的Z-mac細胞中，用 $100\text{TCID}_{50}$ 第一型(歐洲株)LV(C、D)與第二型(美洲株)PA8(A、B)的PRRS病毒感染後，再以20和80 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度Tilmicosin處理24小時，能抑制病毒的複製作用。感染18小時後，收集培養懸浮液測定感染性病毒的產量，病毒RNA會由細胞釋放進培養液中，再使用即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)測定病毒的核殼體(N, nucleocapsid)基因(B、D)，對照於病毒感染的未給藥組。圖表顯示病毒滴度(A、C)和病毒RNA相對改變量(B、D)，圖A及C所顯示的數據為平均值和標準偏差、圖B及D所顯示RNA相對量及標準偏差。一個星號(\*)表示統計分析有顯著性差異( $p < 0.05$ )、兩個星號(\*\*)表示統計分析有顯著性差異( $p < 0.01$ )。

為確認Tilmicosin降低病毒產生的作用，試驗也進行了病毒基因RNA相對量分析，以使用與病毒滴定相同樣品所擷取的病毒基因RNA，進行即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)分析PRRS病毒PA8的核殼體(N, nucleocapsid)基因，由感染力滴定分析檢測的結果，作為基因定量的指標，顯示在80 $\mu\text{g/ml}$  Tilmicosin處理組會明顯降低PRRS病毒的活性，因為Tilmicosin影響了病毒基因的合成機制。

### 對第一型(歐洲株)PRRS病毒的抗病毒作用

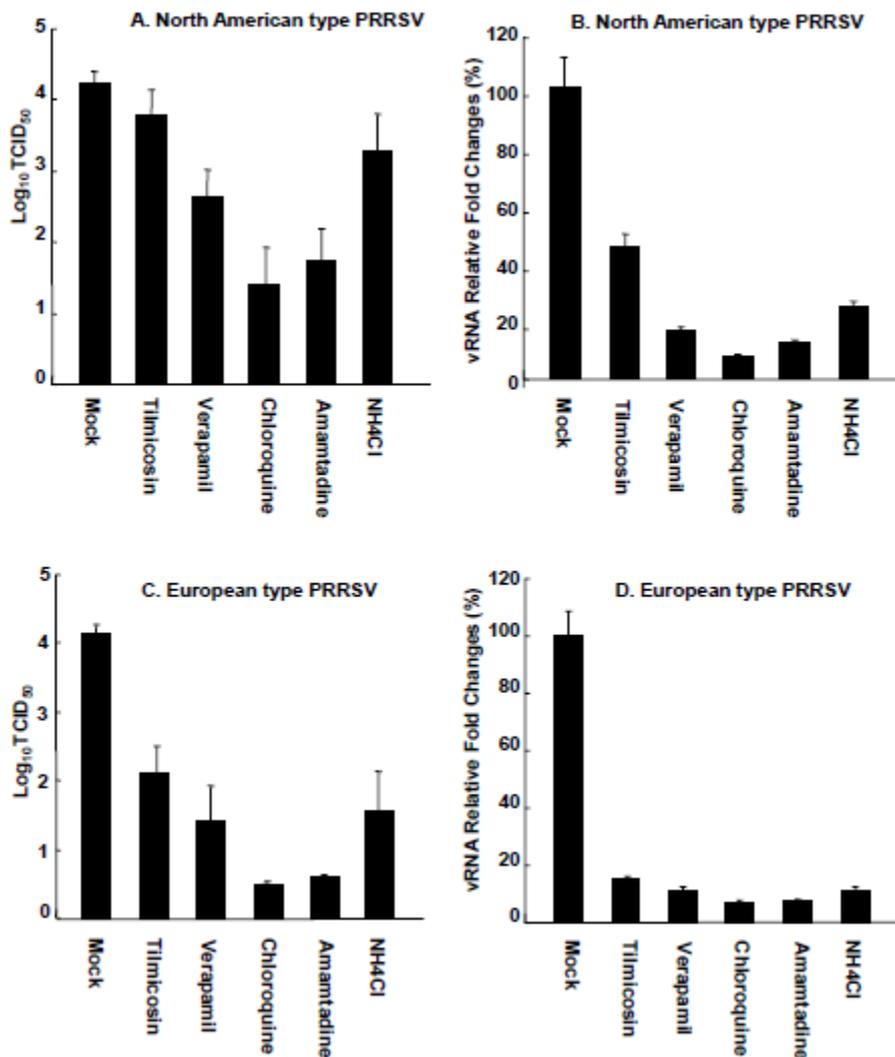
在美國及加拿大，兩種基因型的PRRS病毒都在豬場中傳播，因為Tilmicosin對第二型(美洲株)PRRS病毒具有抗病毒的作用，所以，對第一型(歐洲株)PRRS病毒的作用需要進行試驗確認。Lelystad virus(LV)病毒株是歐洲基因型的病毒，因此，被選為使用於本次研究之用，如同PA8病毒株，各種濃度的Tilmicosin都可以抑制LV病毒株的複製(請見圖二C)。在80 $\mu\text{g/ml}$  Tilmicosin處理組，LV病毒株濃度是2.17

log<sub>10</sub>/ml (1.48×10<sup>2</sup>/ml TCID<sub>50</sub>)，相對於未給予Tilmicosin對照組的病毒濃度是3.8 log<sub>10</sub>/ml (6.31×10<sup>3</sup>/ml TCID<sub>50</sub>)，可計算出具感染力病毒的產生量降低43倍。曾經有學術報告提出，在培養的細胞中，第一型(歐洲株)PRRS病毒滴度一般都會低於第二型(美洲株)，本次的試驗中也有一樣的發現。很有趣的是，Tilmicosin對LV病毒株的抑制效果比PA8病毒株更具有劑量相關性。

Tilmicosin對第一型(歐洲株)PRRS病毒複製的抑制作用，可以使用即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)分析其病毒基因來確定。使用80μg/ml Tilmicosin處理組的病毒RNA有明顯的下降(請見圖二D)，兩組數據可確認Tilmicosin的抗PRRS病毒作用，對第一型(歐洲株)比第二型(美洲株)PRRS病毒的效力更強。

### 不同化合物對PRRS病毒的抗病毒作用

Tilmicosin的生化性質是基於其結構中的兩個胺基(pKa7.4及8.5)，因此，Tilmicosin產生抗病毒作用的可能機制是它改變了細胞核內體的酸鹼度。根據這個推論，離子由核內體流入病毒內腔必須通過病毒膜上的孔狀離子通道，而PRRS病毒的小封套蛋白已經被證實具有離子通道的類蛋白特性，更加支持這個機制的推論。所以，本試驗就是為了證明PRRS病毒感染的離子通道阻斷劑效應而進行的。Verapamil是一種鈣離子通道阻斷劑，Amantadine則是一種質子通道抑制劑，這兩種藥物都被選來測試它們對PRRS病毒複製的影響。除此之外，其他兩項化合物是Chloroquine和Ammonium Chloride，兩者都是親溶酶體藥劑，可以增加溶小體和核內體的酸鹼度，因此被選入進行測試。試驗開始時，分別在不同的藥劑中培養Z-mac細胞24小時，再以PRRS病毒PA8株或LV株對細胞進行感染。感染後18小時，收集懸浮液測量所產生的病毒滴度，四種化合物都對第二型(美洲株)PRRS病毒產生不同程度的抗病毒作用(請見圖三A)，因此，確認了核內體的酸鹼度和離子通道的功能對PRRS病毒複製的重要性。這些化合物的抗病毒作用也可以用即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)分析PA8病毒基因RNA的相對量來確定(請見圖三B)。這些結果顯示，對PRRS的抑制作用是通過提高核內體的酸鹼度所形成的。親溶酶體藥劑的抗病毒作用和離子通道阻斷劑的抗病毒作用，都使用第一型(歐洲株)PRRS病毒進行測試，對感染性病毒的產生(請見圖三C)和病毒基因相對量(請見圖三D)都有進行分析。與Tilmicosin的數據一致，每一種化合物同時對兩型PRRS病毒都具有抗病毒作用，且對第一型(歐洲株)的效果比對第二型(美洲株)PRRS病毒更強。



圖三、親溶酶體藥劑和離子通道阻斷劑對第一型(LV)與第二型(PA8)PRRS病毒複製的抑制作用。先以不同的化合物在96孔盤培養Z-mac細胞24小時，再用100TCID<sub>50</sub>第一型(歐洲株)LV(C、D)與第二型(美洲株)PA8(A、B)的PRRS病毒進行感染。感染18小時後，收集培養懸浮液測定感染性病毒的產量，病毒RNA會由細胞釋放進培養液中，再使用即時聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)測定病毒的核殼體(N, nucleocapsid)基因(B、D)，這些化合物的種類和濃度如下:Tilmicosin 80 μg/ml、Verapamil 50 μM、Chloroquine 0.4 μM、Amantadine 0.4 mM和Ammonium Chloride 5 mM，對照於病毒感染的未給藥組。圖表顯示病毒滴度(A、C)和病毒RNA相對改變量(B、D)，圖A及C所顯示的數據為平均值和標準偏差、圖B及D所顯示RNA相對量及標準偏差。

## 討論

巨環類抗生素，其作用機制有很大一部分還不清楚，其中紅黴素算是例外，因為它所有的功能相對都已經被了解。這類抗生素會與細菌的核糖體50S結合，而抑制蛋白質的合成。Tilmicosin不同於紅黴素，因為紅黴素的化學結構中僅有一個胺基(pKa7.4)，而Tilmicosin的化學結構則有兩個胺基(pKa7.4及8.5)。Tilmicosin有很高的親脂性，這也許可以解釋為何它很容易通過細胞脂膜被巨噬細胞攝入，Tilmicosin從肺泡巨噬細胞流出的速度很慢，經過24小時之後仍有37%的Tilmicosin在細胞內，只要此藥被攝入巨噬細胞中，Tilmicosin會進入溶小體，溶小體內的藥

物濃度可以達到細胞內藥物濃度的85%。

這些資料讓我們假設Tilmicosin也許可能在巨噬細胞內發揮抑制PRRS病毒複製的作用機制。感染的第一個步驟，通常是病毒辨識出細胞表面的一種特殊細胞接受體，當病毒與細胞接受體接合，有封套病毒進入細胞的方式不是病毒膜與細胞膜的直接融合，就是透過接受體的胞吞作用(endocytosis)，依據不同的病毒而定。對PRRS病毒的感染方式，幾種可能的接受體已經被提出，包括CD163、Haparan、Sulphate、Vimentin、CD151和Sialoadhesin。PRRS病毒就是一種有封套且透過接受體胞吞方式感染的病毒，因此，PRRS病毒的顆粒的內化是以依賴clathrin蛋白的方式被傳送到核內體，核內體與溶小體融合，才進行病毒顆粒的去封套作用。溶小體是含有分解蛋白質酵素的細胞內胞器，那些被收集的外來入侵物(如細菌)、顆粒、破舊胞器都會被溶小體中的酵素消化成碎片，再做其他利用或釋出；這些蛋白質酵素是由顆粒內質網(rough endoplasmic reticulum)特別為溶小體所製造的，而且只能在酸性條件下發揮生物活性。當PRRS病毒顆粒透過接受體胞吞作用傳送到核內體中，核內體與溶小體融合，酸性會引發酵素的作用，導致病毒蛋白的結構變形，進一步使病毒脫去封套，最終使得病毒基因的RNA釋放進入細胞質中。當核內體提高了酸鹼度，酵素的運作被抑制，病毒蛋白的結構變形因此被抑制，脫去封套的作用就被阻止，導致PRRS病毒無法進行下一步的複製。因此，我們斷定當肺泡巨噬細胞中Tilmicosin累積就導致了核內體的酸鹼度上升，使得後續的脫封套程序受到抑制，因而阻止了PRRS病毒的複製。同時，關於Tilmicosin也有研究報告指出，會誘發支氣管及肺泡白血球的細胞凋亡(apoptosis)，這個方式可減弱肺臟的發炎反應，因而降低了肺臟的損傷。細胞凋亡是正常的細胞機制，是將受感染、損傷或潛在傷害的細胞清除的作用，越來越多的證據證明溶小體的蛋白酶參與了細胞凋亡的作用，在海拉細胞(HeLa cells)中，運用裂解Bcl-2家族的抗促凋亡蛋白因子，將溶小體的蛋白酶易位到細胞液中，證明選擇性的瓦解溶小體會導致細胞凋亡。因此，Tilmicosin導致的細胞凋亡可能也是基於相似的機制：Tilmicosin在溶小體中累積，接著促使溶小體釋放蛋白酶進入細胞質中，活化了細胞凋亡的作用。這可能也解釋了，為何使用高濃度的Tilmicosin培養Z-mac細胞時所觀察到的細胞毒性反應。

在最近的研究中，Tilmicosin對兩種基因型的PRRS病毒的抗病毒效果都有被探討，根據研究數據證實，Tilmicosin對豬肺泡巨噬細胞中的PRRS病毒有抑制效果，也支持原始假設Tilmicosin的可能作用機制是提升核內體的酸鹼度，因抑制了病毒體。具體的來說，增加核內體的酸鹼度將導致病毒脫去封套的無效化和不完全，使得病毒的增殖受到中止。很有趣的是，雖然Tilmicosin對兩種基因型的PRRS病毒都有抑制作用，但對第一型比第二型的效果更強。PRRS病毒第二型(美洲株)的核殼體(N, nucleocapsid)蛋白是一個只有123個胺基酸的小蛋白分子，其中有三個半胱胺酸殘基(cysteine residues)分布在第23、75和90胺基酸的位置上。這些半胱胺酸

殘基對PRRS病毒核殼體蛋白的多聚合體形成是必須的，並且嚴重影響病毒的組裝和感染力。相對的，PRRS病毒第一型(歐洲株)的外殼蛋白(capsid protein)則只含有兩個半胱氨酸殘基(cysteine residues)分布在第23和75胺基酸的位置上(請見圖四)。因為PRRS病毒第一型(歐洲株)的外殼結構上第90胺基酸的位置上缺少一個半胱氨酸，可以想見它的穩定度就比PRRS病毒第二型(美洲株)稍差，只要酸鹼度有微弱的改變就可能破壞其外殼結構。所以，因為Tilmicosin是一種微鹼性物質，可能對第一型(歐洲株)PRRS病毒的影響比第二型(美洲株)PRRS病毒更強。

		23	
PA8-NA	MPNNNGKQTEEEKK----	GDGQPVNQ	LCQMLGKIIVQQNQSRGKGP
Lelystad	MAGKNQSQK	KKKSTAPMGNGQPVNQ	LCQLLGAMIKSQRQQPRGGQAKK-KK---EKPHFPLAA
SD01-08	MAGKNQSQK	KKKSTAPMGNGQPVNQ	LCQLLGAMIKSQRQQPRGGQAKK-KK---EKPHFPLAA
		75	90
PA8-NA	EDDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVFESLPHHTVRLIRVTASPSA----		123
Lelystad	EDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQGAN		128
SD01-08	EDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQGAN		128

圖四、針對PA8病毒株(美洲株)的核殼體蛋白、Lelystad(歐洲株)、歐洲SD01-08的基因型進行序列比對，半胱氨酸殘基(cysteine residues)有被特別標示出來，圖中可見PA8病毒株(美洲株)含有三個半胱氨酸殘基(cysteine residues)在殼蛋白的第23、75和90胺基酸的位置上；而在北美洲的歐洲株和歐系病毒株都只含有兩個半胱氨酸殘基(cysteine residues)在殼蛋白的第23和75胺基酸的位置上。

在本次的研究中，鈣離子通道拮抗劑Verapamil也可以降低PRRS病毒的複製(請見圖三)，鈣是一種是普遍參與許多細胞反應的信號分子，至於Verapamil產生抗病毒作用的可能解釋是此藥物使得細胞膜產生第一級的屏障，因此阻止了病毒的感染，在細胞膜上的鈣離子通道是負責將細胞外的鈣離子送往細胞質內的途徑。在感染過程中，細胞膜的鈣離子訊號組件成為病毒攻擊的中間目標，所以，將細胞內的鈣離子釋放進入細胞質和增加細胞質內的鈣離子濃度可能可以使鈣離子通道失效，因此可以減少對病毒感染的敏感度。這個理論解釋了Verapamil的抗病毒作用，也就是說，藉著藥物作用使細胞的離子通道失效，因而減少對病毒感染的敏感度。所以，限制鈣離子的流動，產生了細胞對病毒感染的部分保護力。在本次的研究中，Chloroquine和Ammonium chloride也出現了抗病毒的作用，再次證實改變核內體的酸鹼度可以抑制PRRS病毒的複製，也支持我們對Tilmicosin抗病毒機制的假設，因為Tilmicosin是靠著提高核內體的酸鹼度當病毒要進入細胞時，阻止病毒的去封套作用。總而言之，本研究提供了試驗的確認，證明在臨床上觀察到Tilmicosin效果的可能作用機制，因為目前疫苗的效果仍然相當有限，Tilmicosin用於早期治療或預防PRRS病毒感染的潛力應該繼續被研究。

參考文獻(略)