

· 研究论文 ·

沙粒病毒进入宿主细胞阻断剂3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮的发现及机制研究

唐 克, 张晓雨, 陈 勍, 郭 颖*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 沙粒病毒是有包膜的RNA病毒, 现已知其家族中的8种病毒可致人出血热。除胡宁病毒疫苗外, 目前尚无针对其他沙粒病毒的疫苗或特效药物批准上市。本研究是在首次发现黄酮类化合物桔皮素的抗沙粒病毒活性的基础上, 从34个桔皮素类似物中发现并确认了3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮的抗拉沙病毒的活性 (EC_{50} : $5.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并初步探讨了其构效关系。研究结果表明, 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮对拉沙病毒的抑制活性是通过阻断病毒融合过程实现的, 该化合物对除拉沙病毒外的另外7种致出血热沙粒病毒进入宿主细胞过程也有阻断活性 (EC_{50} : $0.84 \sim 10.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其抗病毒谱与现有沙粒病毒进入抑制剂相比有明显优势。本研究结果为应对致出血热沙粒病毒的药物研发提供了物质储备, 也为寻找和发现广谱抗沙粒病毒活性物质提供线索。

关键词: 沙粒病毒; 病毒性出血热; 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮; 进入抑制剂

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2019)05-0838-08

Effects and mechanism of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone for blocking arenavirus entry

TANG Ke, ZHANG Xiao-yu, CHEN Qing, GUO Ying*

(Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Arenaviruses are enveloped RNA viruses, and eight members in this family are known to cause human hemorrhagic fever. Treatments for the viral hemorrhagic fever (VHF) by arenaviruses are very limited. We have identified the first flavone, tangeretin, with broad-spectrum inhibitory activities on VHF-arenaviruses infection by blocking viral entry. In this study, we evaluated thirty-four tangeretin analogues and found 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone as a Lassa virus entry inhibitor, with EC_{50} of $5.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, by blocking the viral fusion process. The compound 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone is effective on all known VHF-arenaviruses, with EC_{50} range of $0.84 \sim 10.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. These results suggest that 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone is able to serve as a start point for discovery of arenavirus entry inhibitors from flavone natural products.

Key words: arenavirus; viral hemorrhagic fever; 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone; entry inhibitor

收稿日期: 2018-12-27; 修回日期: 2019-01-16.

基金项目: 国家“重大新药创制”专项 (2015ZX09102-023, 2018ZX09711001-003-002); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-1-014); 国家自然科学基金资助项目 (81473256, 81273561); 北京市科委全市成果转化统筹基金 (Z151100000115008); 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室资助项目 (BZ0150).

*通讯作者 Tel: 86-10-63161716, E-mail: yingguo6@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1152

病毒性出血热是一类严重危害公共安全和人类健康的传染疾病。目前已知沙粒病毒科 (*Arenaviridae*) 哺乳类沙粒病毒属 (*Mammarenavirus*) 中有多种病毒可致人出血热, 分别是拉沙病毒 (*Lassa virus*, LASV)、卢约病毒 (*Lujo virus*, LUJV)、马丘波病毒 (*Machupo virus*, MACV)、瓜纳瑞托病毒 (*Guanarito virus*, GTOV)、胡宁病毒 (*Junín virus*, JUNV)、萨比亚病毒 (*Sabia*

virus, SABV) 和查帕雷病毒 (Chapare virus, CHPV)^[1]。上述7种病毒均为A级病原, 活病毒须在生物安全4级实验室 (BSL-4) 进行操作^[2]; 此外, 还有报道哺乳类沙粒病毒属中的白水阿罗约病毒 (Whitewater Arroyo virus, WWAV) 感染也可能致人出血热^[3]。沙粒病毒是包膜病毒, 其基因组为双义编码RNA, 包括S和L两条链。L链编码基质蛋白Z和RNA聚合酶L; S链编码包膜糖蛋白GP和核蛋白NP, 其中包膜糖蛋白GP是唯一负责病毒进入宿主的病毒蛋白^[4]。

沙粒病毒潜伏期一般为7~21天, 患者在感染早期多出现发烧、头痛、结膜炎、恶心、呕吐和腹泻等流感样症状, 后期可出现黏膜出血、休克及多器官衰竭, 部分患者还出现神经病变^[5]。沙粒病毒致出血热具有发病快、致死率高的特点, 其中以拉沙病毒流行最广、危害最大, 疫区主要在西非^[6,7]。2018年爆发于尼日利亚的拉沙病毒疫情已确诊有588例感染患者, 其中149人死亡, 致死率达25.4%^[8]。马丘波病毒、瓜纳瑞托病毒、查帕雷病毒等新世界沙粒病毒主要流行于美洲, 致死率为15%~30%^[1]。除胡宁病毒外, 迄今尚无针对其他沙粒病毒的疫苗或特效药物批准上市。在沙粒病毒流行疫区, 通常采用隔离患者的方法控制疫情扩散。利巴韦林 (ribavirin) 是广谱抗病毒药物, 也是目前唯一用于治疗拉沙病毒出血热的药物, 但其效果有限且不良反应显著^[9,10]。

天然产物是抗病毒药物的重要来源。本实验室曾发现柑橘属植物果皮提取物桔皮素可阻断多种沙粒病毒进入宿主细胞, 其抗拉沙病毒活性也经活病毒感染实验得到确认^[11]。桔皮素是黄酮类化合物, 本研究以桔皮素为先导物, 对其34个结构类似物进行活性评价, 发现其中一个天然产物3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮也具有广谱抗沙粒病毒活性, 本研究明确了该化合物的作用机制并初步讨论了黄酮类化合物抗沙粒病毒活性的构效关系。

材料与方 法

质粒 密码子优化的8种出血热沙粒病毒GP基因 (LASV-Josiah GP, Genbank NC_004296.1, 1 476 bp; LUJV GP, Genbank FJ952384.1, 1 365 bp; MACV-Carvalho GP, Genbank NC_005078.1, 1 491 bp; GTOV-S-56764 GP, Genbank AY572554.1, 1 440 bp; JUNV-XJ13 GP, Genbank FJ805378.1, 1 458 bp; SABV-SPH114202 GP, Genbank NC_006317.1, 1 467 bp; WWAV-9310141 GP, Genbank AF485264.1, 1 443 bp; CHPV-810419 GP, Genbank NC_010562.1, 1 455 bp) 由北京义翘神州生物技术有限公司合成^[12], 并克隆至pCMV3载体; 携带

荧光素酶报告基因的HIV-1质粒 (pNL4-3.Luc.R'E') 从美国NIH获得; 水泡性口膜炎病毒外壳糖蛋白 (vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G) 表达质粒由美国伊利诺伊大学Dr. Lijun Rong惠赠; pEGFP-N1质粒购自美国Clontech公司。

细胞 人胚胎肾上皮细胞HEK293T和人脑星形胶质母细胞瘤细胞U-87 MG购自国家实验细胞资源共享平台 (China Infrastructure of Cell Line Resource)。HEK293T细胞用含10%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素、100 μg·mL⁻¹链霉素的DMEM培养基培养, U-87 MG细胞用含10%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素、100 μg·mL⁻¹链霉素及1%非必需氨基酸的MEM培养基培养。

试剂 荧光素酶检测试剂盒、CellTiter-Glo细胞活力检测试剂盒购自Promega公司; jetPRIME®转染试剂购自Polyplus transfection公司; HIV-1 p24 ELISA试剂盒购自北京义翘神州生物技术有限公司; ST-193购自MCE公司; 巴弗洛霉素A1购自LC Laboratories公司; 天然产物库 (库容量526个)、多柔比星和地昔帕明盐酸盐购自上海陶素生化科技有限公司; DMSO购自美国Sigma公司; DMEM培养基、MEM培养基、胎牛血清、非必需氨基酸储液、青霉素/链霉素储液均购自美国Gibco公司。

CellTiter-Glo法检测化合物对细胞活力的影响 按细胞数每孔8 000个将HEK293T细胞接种至96孔板中, 培养24 h后, 将受试化合物、阳性对照药多柔比星和DMSO (0.1% v/v) 分别加至细胞培养液中。继续培养48 h后, 每孔加入CellTiter-Glo试剂并振荡混匀2 min, 于室温孵育10 min后, 测定各孔细胞的细胞存活率。以DMSO溶剂孔数值为100%细胞活力, 计算加药孔的细胞存活率^[11]。

重组病毒制备和病毒定量 转染前一天, 按照细胞数 2×10^6 接种HEK293T细胞至100 mm培养皿中。转染当天, 按照jetPRIME®转染试剂说明书所述方法将HIV-1核心质粒分别与各种沙粒病毒GP质粒或VSV-G质粒共转染, 转染后48 h的上清液中含有重组病毒, 收集上清并经0.45 μm滤膜过滤, 获得8种重组沙粒病毒 (LASV-GP/HIV-luc、LUJV-GP/HIV-luc、MACV-GP/HIV-luc、GTOV-GP/HIV-luc、JUNV-GP/HIV-luc、SABV-GP/HIV-luc、WWAV-GP/HIV-luc、CHPV-GP/HIV-luc) 和VSV-G/HIV-luc重组病毒, 所获得的重组病毒用HIV-1 p24 ELISA试剂盒定量^[12,13]。

化合物抗沙粒病毒活性检测 感染前一天, 按每孔 1.5×10^4 个细胞将HEK293T细胞或U-87 MG细胞接种于48孔板中。感染前15 min, 将受试化合物、阳性

对照药 (ST-193 和地昔帕明) 加至细胞培养液中, 以等量 DMSO (0.1% v/v) 作为溶剂对照, 再加入假病毒 (p24 $0.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。感染 48 h 后, 弃去细胞培养上清并裂解细胞, 测定细胞裂解液中的相对荧光素酶活性 (relative luminescence units, RLUs), 以 DMSO 溶剂孔 RLUs 值为 100% 病毒感染, 计算加药孔的病毒感染率。

不同时间点加药检测化合物抗拉沙病毒的活性感染前一天, 按每孔 1.5×10^4 个细胞将 U-87 MG 细胞接种于 48 孔板中。感染前 15 min 将细胞置于 4°C 预冷, 随后加入 LASV-GP/HIV-luc 重组病毒, 4°C 孵育 1 h 后, 洗去各孔中未结合的病毒并加入新鲜培养基继续培养。在病毒的吸附过程、吸附后及实验全程分别加入受试化合物和对照化合物。继续培养 48 h 后, 弃去上清, 裂解细胞, 测定细胞裂解液中的相对荧光素酶活性, 以 DMSO 溶剂孔 RLUs 值为 100% 病毒感染, 计算加药孔的病毒感染率^[11]。

拉沙病毒包膜糖蛋白介导的细胞-细胞融合实验 转染前一天, 按照细胞数 2×10^6 接种 HEK293T 细胞至 100 mm 培养皿中。次日, 按照 jetPRIME® 转染试剂说明书所述方法将 $3 \mu\text{g}$ pEGFP-N1 质粒和 $3 \mu\text{g}$ pCMV3-LASV-GP 质粒共转染至 HEK293T 细胞, 24 h 后按每孔 1.5×10^5 个将被转染细胞铺至 48 孔板中。铺板后 24 h, 吸出各孔上清并加入 $300 \mu\text{L}$ PBS (pH 4.6) 酸化 20 min, 吸弃上清, 加入新鲜培养基。在用 pH 4.6 PBS 处理前和/或处理过程中加入受试化合物, 在酸化后 4 h 用荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司 IX71) 观察并记录细胞-细胞融合现象^[11]。

数据分析及统计方法 用 GraphPad Prism 软件分析实验数据, 以浓度-感染率、浓度-细胞存活率作散点图并用非线性拟合得到量效曲线, 计算半数有效浓度 (EC_{50}) 和半数细胞毒性浓度 (CC_{50}), 数据分析采用 Student's *t*-test 检验。

结果与讨论

1 抗拉沙病毒进入宿主细胞的黄酮类天然活性物质的发现

黄酮类化合物是广泛存在的一类重要天然产物, 其生物活性广泛, 如抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗病毒活性 (如 HIV-1、抗流感病毒、疱疹病毒和 HBV)^[14,15]。多甲氧基黄酮类化合物桔皮素 (tangeretin, 图 1) 是沙粒病毒进入宿主细胞广谱抑制剂, 该化合物是目前报道的唯一抗沙粒病毒黄酮类化合物^[11]。本研究以桔皮素为先导物, 通过与市售天然产物库中黄酮类化合物进行结构比对, 获得 34 个桔皮素类似物。

首先检测了受试化合物 (终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

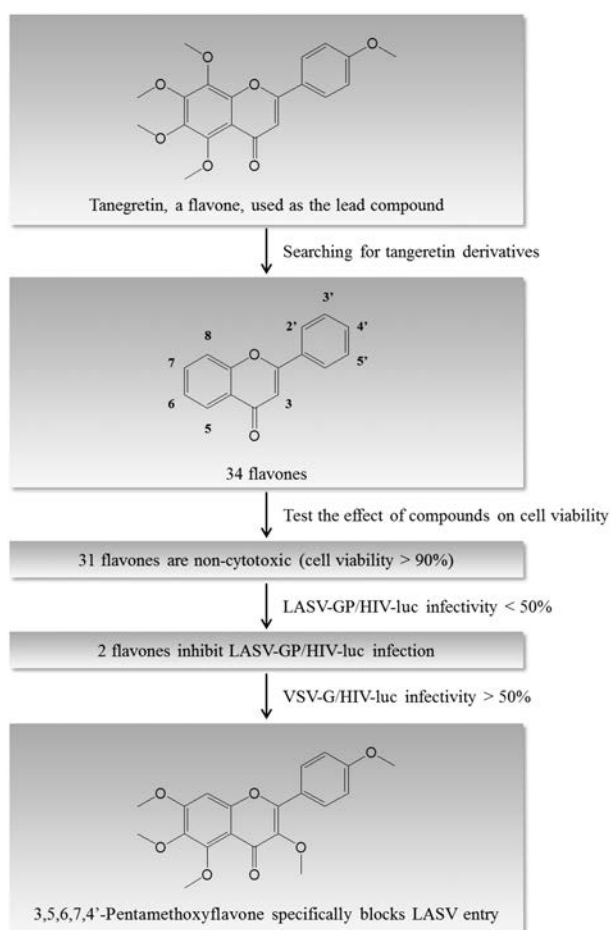
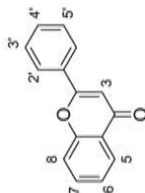


Figure 1 Identification of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone as a Lassa virus (LASV) entry inhibitor

对细胞活力的影响。结果显示, 有 3 个化合物显示细胞毒性 (7,8-二羟基黄酮、去水淫羊藿黄酮和夫拉平度的细胞毒性分别为 $62.76\% \pm 3.27\%$, $63.64\% \pm 8.46\%$ 和 $67.70\% \pm 4.77\%$), 其后, 本研究采用 LASV-GP/HIV-luc 体外感染模型对 31 个对细胞生长无显著影响的黄酮化合物 (终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的抗拉沙病毒进入宿主细胞活性进行评价 (图 1 和表 1)。结果显示, 化合物 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮 (3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone) 和去甲基川陈皮素 (demethylnobiletin) 可抑制 LASV-GP/HIV-luc 感染, 病毒感染率分别为 31.91% 和 20.07% (表 1), 即抑制率分别为 68.09% 和 79.93%。

沙粒病毒包膜糖蛋白 GP 是唯一负责病毒进入宿主的病毒蛋白, LASV-GP/HIV-luc 是以拉沙病毒 GP 为外壳包裹 HIV 核心的重组病毒, 该病毒仅能依赖 LASV-GP 与宿主细胞表面受体的特异性识别单次感染细胞, 荧光素酶报告基因可在被感染的细胞中表达, 通过检测其相对活性定量病毒感染水平^[11,12]。当荧光素酶活性下降时, 受试化合物可能影响如下环节: 即化合物抑制了 LASV-GP 介导的进入过程, 或化合物抑制

Table 1 Tangeretin derivatives structures, cytotoxicity, and their activities against LASV-GP/HIV-luc and VSV-G/HIV-luc infection. ^aThe active compounds were shown in shadow. ^{**}ST-193 was used as the reference compound for LASV-GP/HIV-luc infection assay. ^{***}Doxorubicin was used as the reference compound for cell viability assay. Brief of substitutions in table: -glu: -glucoside; -man: -mannoside; -rha: -rhamnoside; -rut: -rutinoside. VSV: Vesicular stomatitis virus



Compound	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	LASV-GP/HIV-luc infectivity \pm SD/%	VSV-G/HIV-luc infectivity \pm SD/%	Cell viability/%
Tangeretin*	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	31.85 \pm 1.15	79.63 \pm 9.25	104.67 \pm 3.20
Gardenin B	-H	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	93.56 \pm 6.84	-	107.40 \pm 5.55
Nobiletin	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	72.76 \pm 6.51	-	104.58 \pm 5.48
3,5,6,7,4'-Pentamethoxyflavone*	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	31.91 \pm 0.68	82.57 \pm 8.65	101.81 \pm 4.07
5,7,4'-Trimethoxyflavone	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	133.17 \pm 4.42	-	94.47 \pm 2.84
Demethylnobiletin	-H	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	20.07 \pm 1.65	30.03 \pm 0.22	104.65 \pm 7.65
7,8-Dimethoxyflavone	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	75.20 \pm 4.76	-	93.14 \pm 1.66
Chrysin dimethyl ether	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H	149.74 \pm 14.41	-	103.35 \pm 4.63
Hexamethylquercetin	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	90.87 \pm 8.08	-	90.55 \pm 4.26
Galangin trimethyl ether	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H	57.69 \pm 6.59	-	106.95 \pm 1.86
Eupatilin	-H	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	116.48 \pm 3.42	-	92.72 \pm 4.50
Apigenin	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	84.34 \pm 3.35	-	98.18 \pm 4.91
Baicalin	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	142.10 \pm 4.31	-	99.78 \pm 0.47
Baicalin	-H	-OH	-OH	-O-glu	-H	-H	-H	-H	-H	102.74 \pm 3.31	-	106.11 \pm 6.33
Chrysin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	75.53 \pm 2.16	-	95.64 \pm 2.94
Diosmin	-H	-OH	-H	-O-rut	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	94.68 \pm 1.31	-	95.94 \pm 1.56
Diosmetin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	120.90 \pm 2.13	-	97.86 \pm 1.86
Diosmetin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OCH ₃	-H	120.90 \pm 2.13	-	97.86 \pm 1.86
7,2'-Dimethoxyflavone	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	108.43 \pm 13.20	-	101.82 \pm 8.19
3,7-Dimethoxyflavone	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H	62.36 \pm 4.66	-	100.65 \pm 2.12
Flavone	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	128.97 \pm 23.77	-	96.53 \pm 5.19
Icaritin	-O-man	-OH	-H	-O-glu	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-H	-H	-OCH ₃	-H	93.72 \pm 2.40	-	96.18 \pm 7.37
Kaempferol	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H	177.39 \pm 6.18	-	101.48 \pm 2.12
Kaempferitrin	-O-rha	-OH	-H	-O-rha	-H	-H	-H	-OH	-H	104.84 \pm 4.34	-	108.92 \pm 3.65
Luteolin	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	-OH	-OH	-H	248.33 \pm 2.17	-	109.64 \pm 2.37
Quercetin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	247.66 \pm 2.97	-	90.26 \pm 2.82
Quercitrin	-O-rha	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	110.47 \pm 5.08	-	97.27 \pm 5.51
Morin hydrate	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	123.77 \pm 1.81	-	90.66 \pm 7.72
Fisetin	-OH	-H	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	190.58 \pm 8.82	-	99.48 \pm 6.37
Rutin	-O-rut	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H	120.31 \pm 8.91	-	98.04 \pm 1.42
Troloxerutin	-O-rut	-OH	-H	-OC ₂ H ₄ OH	-H	-H	-OC ₂ H ₄ OH	-OC ₂ H ₄ OH	-H	114.83 \pm 3.99	-	100.03 \pm 1.46
Myricetin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-OH	123.56 \pm 6.29	-	99.25 \pm 8.25
Myricitrin	-O-rha	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-OH	109.63 \pm 6.44	-	103.59 \pm 2.59
DMSO										100.00 \pm 4.44	100.00 \pm 2.18	100.00 \pm 4.01
ST-193**										EC ₅₀ : 4.4 nmol·L ⁻¹	97.94 \pm 1.56	109.73 \pm 8.82
Doxorubicin***												CC ₅₀ : 0.55 μ mol·L ⁻¹

了病毒进入后 HIV-1 的逆转录、整合、转录过程, 或化合物直接抑制了荧光素酶的活性。为获得 LASV 特异性进入抑制剂, 本研究采用以水泡性口膜炎病毒外壳糖蛋白包裹 HIV 核心的重组病毒 (VSV-G/HIV-luc) 作为特异性对照模型进行评价。结果显示, 化合物 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 VSV-G/HIV-luc 感染无显著性影响 (图 1, 表 1), 提示该化合物是拉沙病毒进入宿主细胞的特异性抑制剂; 而去甲基川陈皮素 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 VSVG/HIV-luc 重组病毒感染有抑制作用, 感染率为 30.03 % (表 1), 提示该化合物不是 LASV 感染宿主细胞的特异性抑制剂。

2 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮可阻断拉沙病毒的融合过程

拉沙病毒是典型的沙粒病毒, 其进入宿主细胞的过程包括 GP1 介导的病毒与宿主细胞受体的识别、吸附过程, 宿主细胞对病毒的内吞, 以及 GP2 介导的 pH 依赖型融合过程^[16]。有研究显示, 在 4°C 条件下, 拉沙

病毒可对宿主受体识别并吸附, 但不会发生病毒进入和膜融合过程^[17]; 而当温度升至 37°C 后, 病毒对宿主细胞的感染随即恢复^[17]。本研究通过在拉沙病毒感染的不同环节加入受试化合物, 并与已知机制的阳性药物比较, 考察 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮的作用环节。

本研究以拉沙病毒进入抑制剂 ST-193 和巴弗洛霉素 A1 (bafilomycin A1) 作为阳性对照。ST-193 是拉沙病毒融合抑制剂, 可直接作用于拉沙病毒 GP2 序列, 稳定 SSP-GP2 空间构象, 抑制病毒的融合过程^[18]; 巴弗洛霉素 A1 是通过内体膜上 V 型 ATP 酶 (V-ATPase) 活性, 抑制 H^+ 的内流, 抑制内体酸化从而阻断 pH 依赖型膜融合过程^[19]。结果显示, 不论在拉沙病毒吸附过程加药、吸附后加药还是全程加药, ST-193 均可显著降低 LASV-GP/HIV 的感染 (图 2A); 巴弗洛霉素 A1 可抑制 LASV-GP/HIV-luc 吸附后感染, 而对 LASV-GP/HIV-luc 吸附过程无影响 (图 2A)。与巴弗洛霉素 A1 相似, 在病毒吸附过程加入 3,5,6,7,4'-五甲氧

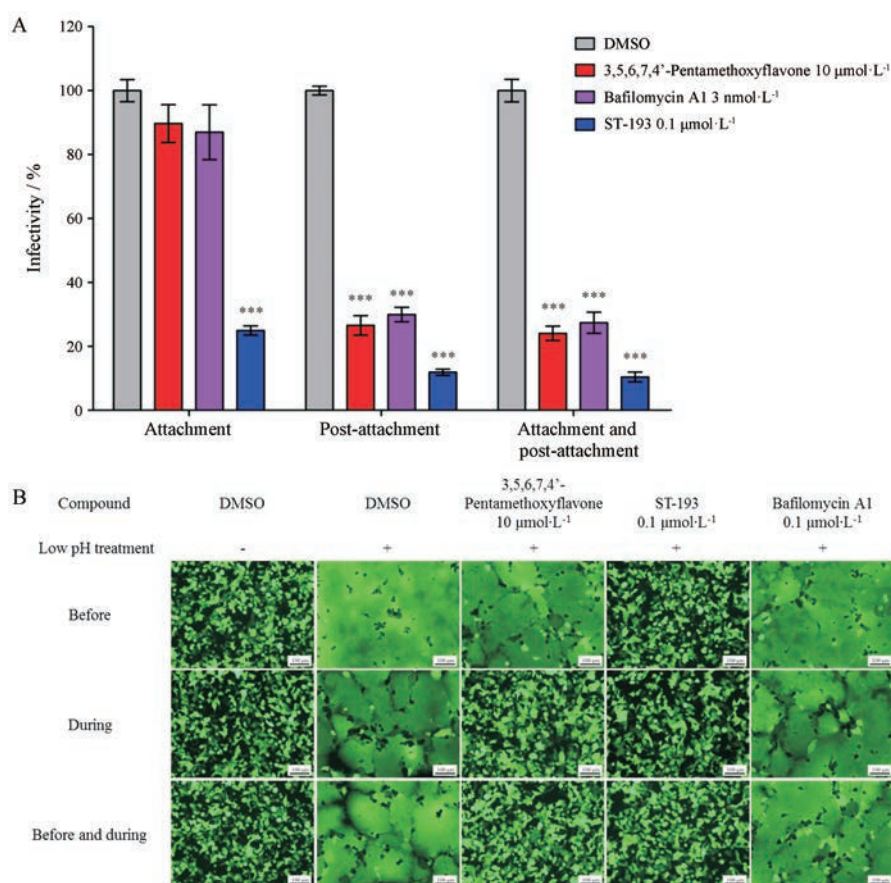


Figure 2 The compound 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone blocks LASV GP-mediated fusion. A: Time-of-addition assay. The averages were from triplicate wells, and the error bars represented the standard deviation. The experiments were repeated once, and similar results were obtained. *** $P < 0.001$ vs DMSO group. B: The compound 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone inhibits low-pH triggered LASV-GP-mediated cell-cell fusion. Syncytium was formed by low pH treatment of cells co-expressing LASV-GP and enhanced green fluorescent protein (EGFP). The panels correspond to representative fields observed. The experiment was repeated twice, and the same results were obtained

基黄酮对病毒的感染无影响,而在病毒吸附后加药则对感染过程有显著抑制作用 ($P < 0.001$, 图 2A), 提示 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮作用于拉沙病毒吸附后的环节,即病毒的融合过程。

拉沙病毒的 GP1 与细胞表面受体结合后,细胞膜内陷形成内体进入胞浆,随着内体中 H^+ 浓度升高^[20], LASV-GP 的空间构象发生改变,疏水性融合肽暴露,进而发生膜融合过程^[16,20-23]。为进一步确认 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮对拉沙病毒融合过程的抑制,本研究采用 LASV-GP 诱导的细胞-细胞融合实验进行验证: 首先向 HEK293T 细胞共转 pEGFP-N1 质粒和 pCMV3-LASV-GP 质粒,使细胞表达绿色荧光蛋白和 LASV-GP。当升高培养液的 H^+ 浓度时,细胞表面 LASV-GP 构象改变,GP2 疏水性融合肽暴露,引起细胞-细胞融合,该融合现象可通过荧光显微镜观察并记录。本研究以 ST-193 和巴弗洛霉素 A1 为对照药,结果显示,不论何时加入 ST-193 都呈可显著抑制 LASV-GP 介导的细胞-细胞融合(图 2B); 与之相反,巴弗洛霉素 A1 对细胞膜外高 H^+ 浓度和 LASV-GP 介导的细胞-细胞融合过程无显著影响(图 2B); 当在酸化过程中加入 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮,可显著抑制 LASV-GP 介导的细胞-细胞融合现象,但在酸化前加药无效,上述结果显示,3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮是 LASV 融合抑制剂,但作用机制与 ST-193 和巴弗洛霉素 A1 均不相同,即 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮抑制 LASV 融合,但不是通过稳定 SSP-TM 结构或抑制酸化的机制发挥作用。

3 黄酮类天然产物 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮具有广谱抗出血热沙粒病毒活性

沙粒病毒科 (Arenaviridae) 一共包含 40 种病毒^[24], 根据病毒的地理分布和病毒血清学可将其分为旧世界沙粒病毒 (old world arenavirus, OWA) 和新世界沙粒病毒 (new world arenavirus, NWA)。旧世界沙

粒病毒中拉沙病毒、卢约病毒,以及新世界沙粒病毒中的马丘波病毒、白水阿罗约病毒、瓜纳瑞托病毒、胡宁病毒、萨比亚病毒和查帕雷病毒等 8 种病毒可致人出血热^[1,3]。

在发现 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮具有抗 LASV 活性后,本研究考察了该化合物对另外 7 种致出血热沙粒病毒的广谱抗病毒活性。结果显示,3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮可剂量依赖地降低 LUJV-GP/HIV-luc、MACV-GP/HIV-luc、WWAV-GP/HIV-luc、GTOV-GP/HIV-luc、JUNV-GP/HIV-luc、SABV-GP/HIV-luc 和 CHPV-GP/HIV-luc 等 7 种重组病毒对宿主细胞的感染, EC_{50} 在 $0.84 \sim 10.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间(图 3 和表 2)。

目前虽未有抗沙粒病毒特效药,但已有多个小分子沙粒病毒融合阻断剂报告,其中苯磺酰胺类化合物 ST-294 可阻断新世界沙粒病毒融合过程,但对拉沙病毒等旧世界沙粒病毒的感染无显著影响^[25]; 苯并咪唑类化合物 ST-193 是广谱沙粒病毒融合阻断剂,但对卢约病毒的感染无效^[18]; 地昔帕明可阻断卢约病毒的感染,但对胡宁病毒、萨比亚病毒和查帕雷病毒的感染无效^[19]。本研究发现的 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮对 8 种出血热沙粒病毒的进入过程均有阻断作用,有广谱抗沙粒病毒活性,与现有活性化合物相比有明显优势。

4 黄酮类天然产物抗拉沙病毒的初步构效关系分析

桔皮素是多甲氧基取代的黄酮类化合物,3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮是以桔皮素为先导物,通过对市售天然产物库中黄酮类化合物进行结构比对,获得了 34 个桔皮素类似物进行评价而得到的广谱抗沙粒病毒进入活性物质。在表 1 中,根据 34 个黄酮化合物与桔皮素差异,按相似度由高到低的顺序排列并进行了初步构效关系分析,得出如下推论:

① 根据梔子黄素 B (gardenin B) 与桔皮素的结构差异和活性比较,推测黄酮类化合物 5 位的 $-OCH_3$ 为

Table 2 Summary of the activities of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone against entry of eight viral hemorrhagic fever-arenaviruses. *ST-193 was not detected for LUJV-GP/HIV-luc infection. Instead, desipramine hydrochloride was used as a reference compound, which gave an EC_{50} of $3.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **TI was calculated as $TI = CC_{50}/EC_{50}$. EC_{50} : Half maximal effective concentration; CC_{50} : Half maximal cytotoxic concentration; TI: Therapeutic index

Pseudovirus	3,5,6,7,4'-Pentamethoxyflavone				ST-193	
	EC_{50} / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CC_{50} / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TI**	EC_{50} / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
LASV-GP/HIV-luc	5.2	4.3-6.2	> 30	> 5.7	0.004 4	0.002 3-0.008 3
LUJV-GP/HIV-luc	10.2	9.0-11.4	> 30	> 2.9	Not detected*	-
MACV-GP/HIV-luc	4.2	3.2-5.5	> 30	> 7.1	0.001 5	0.001 3-0.001 6
WWAV-GP/HIV-luc	2.2	1.6-3.2	> 30	> 13.6	0.010 7	0.008 0-0.014 2
GTOV-GP/HIV-luc	0.84	0.76-0.93	> 30	> 35.7	0.000 42	0.000 41-0.000 43
JUNV-GP/HIV-luc	2.8	1.9-4.2	> 30	> 10.7	0.000 66	0.000 66-0.000 67
SABV-GP/HIV-luc	3.1	2.2-4.4	> 30	> 9.6	0.009 2	0.005 7-0.014 9
CHPV-GP/HIV-luc	6.3	5.1-7.7	> 30	> 4.7	0.029	0.017-0.050

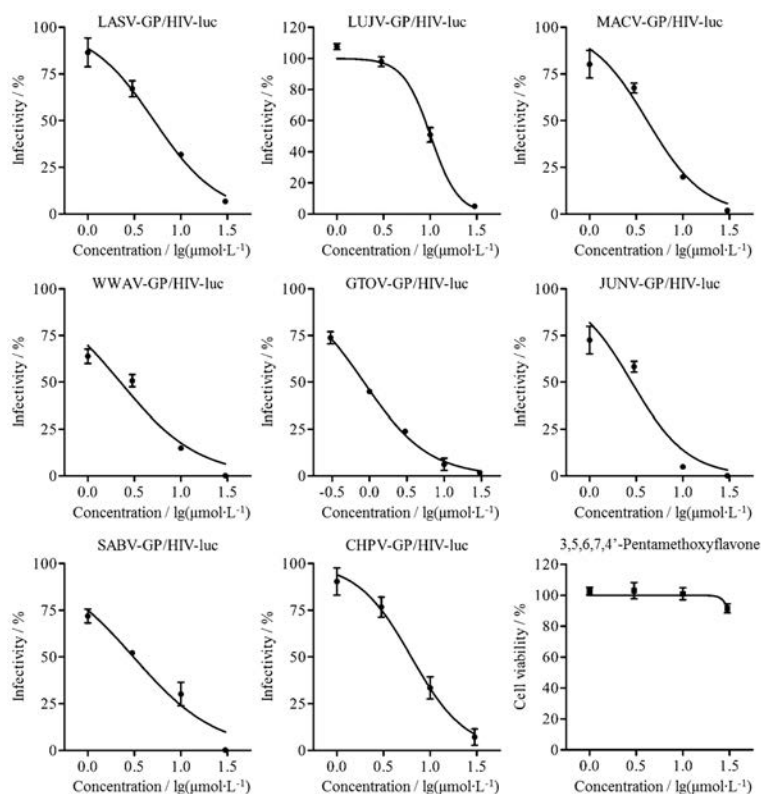


Figure 3 Activities of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone against entry of eight viral hemorrhagic fever-arenaviruses. U-87 MG cells were treated with 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone ($0.3\text{--}30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, threefold dilutions) fifteen min prior arenavirus-GP/HIV-luc infection, and the luciferase activity was measured 48 h post-infection. LUJV: Lujó virus; MACV: Machupo virus; WWAV: Whitewater Arroyo virus; GTOV: Guanarito virus; JUNV: Junín virus; SABV: Sabia virus; CHPV: Chapare virus

抗拉沙病毒活性所必需;

② 根据川陈皮素 (nobiletin) 与桔皮素的结构差异和活性比较, 推测黄酮类化合物 3'位若被 $-\text{OCH}_3$ 取代, 抗拉沙病毒活性可能会降低;

③ 根据 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮与桔皮素的结构差异和活性比较, 推测黄酮类化合物 3 位的 $-\text{H}$ 和 8 位的 $-\text{OCH}_3$ 不是抗拉沙病毒所必需;

④ 根据第③条构效分析以及 5,7,4'-三甲氧基黄酮 (5,7,4'-trimethoxyflavone) 与桔皮素的结构差异和活性比较, 推测黄酮类化合物 6 位的 $-\text{OCH}_3$ 为抗拉沙病毒活性所必需; 其他几个位置的取代基与抗拉沙病毒活性之间的关系, 尚待进一步研究。

天然产物是抗病毒药物的重要来源^[26], 如从红厚壳属植物 *Calophyllum lanigerum* 中分离到的香豆素类化合物 Calanolide A^[27,28] 和海绵真菌来源的五环苯并倍半萜类化合物 MXH-X73^[29] 被确认为 HIV-1 非核苷类逆转录酶抑制剂; 从栗豆树属植物 *Castanospermum australe* 中分离得到的生物碱 castanospermin 具有抗 HCV 的活性^[30]; 齐墩果酸、合欢酸、白桦脂酸等三萜天然产物显示抗流感病毒和 HIV-1 的活性^[31]。

黄酮化合物是广泛存在的一类重要天然产物, 桔皮素是富含于柑橘属植物果皮的一种黄酮化合物。本课题组前期研究发现并确认了桔皮素的抗拉沙病毒活性^[11], 以此为基础, 本研究通过对桔皮素类似物的活性评价, 发现来源于菊科蚤草属植物^[32]的 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮也具有抗拉沙病毒的活性, 且该化合物抗病毒的作用环节与桔皮素相同, 都是拉沙病毒融合抑制剂; 此外, 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮抗沙粒病毒谱与桔皮素也一致, 即对包括拉沙病毒在内的 8 种沙粒病毒的感染过程均有阻断作用。

拉沙病毒、卢约病毒、马丘波病毒、白水阿罗约病毒、瓜纳瑞托病毒、胡宁病毒、萨比亚病毒和查帕雷病毒等 8 种沙粒病毒感染所致的病毒性出血热是严重危害公共安全和人类健康的传染病。此次发现的 3,5,6,7,4'-五甲氧基黄酮及前期研究发现的桔皮素对上述沙粒病毒的感染过程均有阻断作用, 提示具有多甲氧基特征的黄酮类化合物有广谱抗沙粒病毒活性的可能。本研究结果不仅为应对致出血热沙粒病毒的药物研发提供了物质储备, 也为寻找和发现广谱抗沙粒病毒的天产物提供了线索。

致谢: 感谢加拿大公共卫生局国家微生物实验室 Xiang-guo Qiu 教授对本研究的大力支持和无私帮助。

References

- [1] Sarute N, Ross SR. New world arenavirus biology [J]. *Annu Rev Virol*, 2017, 4: 141-158.
- [2] Dept, Health U.S. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories [M]. 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, USA, 2010: 246-265.
- [3] Enserink M. Emerging diseases. New arenavirus blamed for recent deaths in California [J]. *Science*, 2000, 289: 842-843.
- [4] Gunther S, Lenz O. Lassa virus [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41: 339-390.
- [5] Yun NE, Walker DH. Pathogenesis of Lassa fever [J]. *Viruses*, 2012, 4: 2031-2048.
- [6] Coyle AL. Lassa fever [J]. *Nursing*, 2016, 46: 69-70.
- [7] Houlihan C, Behrens R. Lassa fever [J]. *BMJ*, 2017, 358: j2986.
- [8] Nigeria Centre for Disease Control. An Update of Lassa Fever Outbreak in Nigeria [EB/OL]. *Disease Situation Reports* [2018-12-09]. <http://www.ncdc.gov/diseases/sitreps/>.
- [9] Roberts L. Nigeria hit by unprecedented Lassa fever outbreak [J]. *Science*, 2018, 359: 1201-1202.
- [10] Crotty S, Cameron C, Andino R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? [J] *J Mol Med*, 2002, 80: 86-95.
- [11] Tang K, He S, Zhang X, et al. Tangeretin, an extract from *Citrus* peels, blocks cellular entry of arenaviruses that cause viral hemorrhagic fever [J]. *Antiviral Res*, 2018, 160: 87-93.
- [12] Zhang X, Tang K, Guo J, et al. Establishment of evaluation system for a cell-based arenavirus entry inhibitor [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 735-742.
- [13] Chen Q, Tang K, Zhang X, et al. Establishment of pseudovirus infection mouse models for *in vivo* pharmacodynamics evaluation of filovirus entry inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 200-208.
- [14] Gong J, Zhang Y, Wu X. Advances in studies on antiviral activities of flavonoids [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2008, 39: 623-627.
- [15] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview [J]. *ScientificWorldJournal*, 2013, 2013: 162750.
- [16] Burri DJ, da Palma JR, Kunz S, et al. Envelope glycoprotein of arenaviruses [J]. *Viruses*, 2012, 4: 2162-2181.
- [17] Tai CJ, Li CL, Tai CJ, et al. Early viral entry assays for the identification and evaluation of antiviral compounds [J]. *J Vis Exp*, 2015, 105: e53124.
- [18] Larson RA, Dai D, Hosack VT, et al. Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor [J]. *J Virol*, 2008, 82: 10768-10775.
- [19] Tani H, Iha K, Shimojima M, et al. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus [J]. *J Virol*, 2014, 88: 7317-7330.
- [20] Li S, Sun Z, Pryce R, et al. Acidic pH-induced conformations and LAMP1 binding of the Lassa virus glycoprotein spike [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005418.
- [21] Shao J, Liang Y, Ly H. Human hemorrhagic fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis [J]. *Pathogens*, 2015, 4: 283-306.
- [22] Igonet S, Vaney MC, Vornrhein C, et al. X-ray structure of the arenavirus glycoprotein GP2 in its postfusion hairpin conformation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 19967-19972.
- [23] Willard KA, Alston JT, Acciani M, et al. Identification of residues in Lassa virus glycoprotein subunit 2 that are critical for protein function [J]. *Pathogens*, 2018. DOI: 10.3390/pathogens8010001.
- [24] Wikipedia. Arenavirus [EB/OL]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Arenavirus>.
- [25] Bolken TC, Laquerre S, Zhang Y, et al. Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever new world arenaviruses [J]. *Antiviral Res*, 2006, 69: 86-97.
- [26] Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery [J]. *Metabolites*, 2012, 2: 303-336.
- [27] Zheng D, Han L, Huang X, et al. Natural products in clinical trials: antiparasitic, antiviral and neurological drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 576-582.
- [28] Galinis DL, Fuller RW, McKee TC, et al. Structure-activity modifications of the HIV-1 inhibitors (+)-calanolide A and (-)-calanolide B [J]. *J Med Chem*, 1996, 39: 4507-4510.
- [29] Ma X, Li L, Zhu T, et al. Phenylspirodrimanes with anti-HIV activity from the sponge-derived fungus *Stachybotrys chartarum* MXH-X73 [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76: 2298-2306.
- [30] Whitby K, Taylor D, Patel D, et al. Action of celgosivir (6*O*-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVDV: implications for the treatment of hepatitis C [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2004, 15: 141-151.
- [31] Si L, Meng K, Tian Z, et al. Triterpenoids manipulate a broad range of virus-host fusion *via* wrapping the HR2 domain prevalent in viral envelopes [J]. *Sci Adv*, 2018, 4: eaau8408.
- [32] Williams C, Harborne J, Greenham J, et al. Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 275-283.