

天然罗汉松二萜体外抗登革病毒活性研究

汪芳^{1,2}, 严欢³, 姚债文^{1,4}, 罗荣华¹, 刘海洋^{3*}, 郑永唐^{1*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 2. 昆明理工大学医学院, 云南 昆明 650500; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201; 4. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215021)

摘要: 登革病毒 (dengue virus, DENV) 是造成热带和亚热带地区登革热和登革出血热季节性大爆发的蚊媒病原体, 可导致严重威胁生命的疾病, 因此亟需研发 DENV 疫苗和药物。本研究发现从石栗枝叶中分离的罗汉松型二萜 (3 α ,5 β ,10 α)-13-methoxypodocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol (MPTD) 具有很强的体外抗 DENV 作用。噬斑抑制实验检测 MPTD 对 4 种不同血清型 DENV 的抑制作用; MTT 实验检测其对 Vero 和 Huh7 两种细胞的毒性; qRT-PCR 和 Western blot 实验分别在 RNA 和蛋白水平检测其抗 DENV 的活性。结果表明, MPTD 处理可显著降低 DENV 感染 Vero 细胞的病毒滴度, 其对 4 种 DENV (1~4) 的半数有效浓度 (50% effective concentration, EC₅₀) 值分别为 2.72 ± 0.39、10.99 ± 5.18、18.72 ± 0.21 和 0.48 ± 0.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。MPTD 显著抑制 DENV RNA 的合成和 E 蛋白的表达, 其可能抑制 DENV 复制的前期阶段而发挥抗病毒活性。进一步的研究显示, MPTD 对 DENV 感染的抑制作用不是靶向病毒进入细胞阶段。MPTD 对 DENV 具有显著抑制作用, 是一种有潜在应用价值的抗 DENV 化合物。

关键词: 石栗; 天然化合物; (3 α ,5 β ,10 α)-13-methoxypodocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol; 罗汉松型二萜; 登革病毒; 抗病毒活性

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2021)03-0793-06

Anti-dengue virus activity of natural podocarpane-type diterpenoid *in vitro*

WANG Fang^{1,2}, YAN Huan³, YAO Zhai-wen^{1,4}, LUO Rong-hua¹, LIU Hai-yang^{3*}, ZHENG Yong-tang^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. College of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 4. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215021, China)

Abstract: Dengue virus (DENV) is the most rapidly transmitted mosquito-borne pathogen, which is the main cause of seasonal outbreaks of dengue fever and dengue hemorrhagic fever in tropical and subtropical regions, and may cause serious life-threatening diseases. There is an urgent need to develop effective vaccines or antiviral therapies. In this paper, we found that a podocarpane-type diterpenoid, (3 α ,5 β ,10 α)-13-methoxypodocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol (MPTD), isolated from the stems and leaves of *Aleurites moluccana*, showed good effect against DENV. The anti-DENV activity of MPTD against four different DENV serotypes was studied by plaque assay. The cytotoxicity of MPTD in Vero and Huh7 cells was tested by MTT assay. qRT-PCR and Western blot assays were

收稿日期: 2020-09-04; 修回日期: 2020-10-27.

基金项目: 云南省重大科技专项计划课题 (2017ZF007).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-871-65195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn;

Tel / Fax: 86-871-65223246, E-mail: haiyangliu@mail.kib.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1451

used to investigate the anti-DENV activity of MPTD at RNA and protein levels, respectively. The results showed that MPTD greatly reduced the virus titer in DENV infected Vero cells, and its 50% effective concentration (EC_{50}) for DENV (1–4) were 2.72 ± 0.39 , 10.99 ± 5.18 , 18.72 ± 0.21 , and $0.48 \pm 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The results showed that MPTD inhibits DENV RNA level and the expression of E protein. In addition, MPTD may inhibit the early stage of DENV replication and exert antiviral activity. Further studies showed that the inhibitory effect of MPTD against DENV infection is not targeting the viral entry stage. Therefore, MPTD has a significant anti-dengue virus effect, and is an anti-DENV compound with potential application value.

Key words: *Aleurites moluccana*; natural compound; (3 α ,5 β ,10 α)-13-methoxypodocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol; podocarpane-type diterpenoid; dengue virus; antiviral activity

登革病毒 (dengue virus, DENV) 属于黄病毒科黄病毒属, 基因组为 11 kb 的单义正链 RNA。DENV 基因组编码 3 种结构蛋白 (核壳蛋白 C、膜结合蛋白 M、胞膜蛋白 E) 和 7 种非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)。根据抗原的不同, DENV 病毒包括 4 个血清型 (DENV-1、-2、-3、-4), 不同血清型之间的基因序列仅具有 65%~70% 的同源性^[1,2]。临床上, DENV 感染可分为普通登革热 (dengue fever, DF)、登革出血热 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合症 (dengue shock syndrome, DSS) 3 种病型。人体感染任何一种血清型时, 通常只会引起较轻型的发热并能产生特异性中和抗体, 而非中和性异型抗体可引起抗体依赖性增强作用 (antibody-dependent enhancement, ADE)。流行病学研究表明, 90% 的 DHF 和 DSS 病例发生于继发性异型血清型 DENV 感染^[3-6]。

在过去 50 年中, 全球每年大约有 128 个国家、3.9 亿人口感染, 其中有 9 600 万人被确诊为不同严重程度的登革热, 全球近一半人口处于 DENV 感染的风险中^[7]。近年来, 我国多个地区发生登革热暴发流行而且有蔓延趋势。尽管 DENV 感染导致的发病率和死亡率使全球经济和卫生负担日益增加, 但目前尚无批准上市的抗 DENV 疫苗和药物^[8,9]。因此, 开发有效的抗登革热药物迫在眉睫。

天然产物特有的化学结构使其具有复杂性和生物活性多样性, 其经过了“进化预选”, 是创新药物的重要来源之一。石栗 [*Aleurites moluccana* (L.) Willd] 为大戟科石栗属乔木植物, 主要产于亚洲的热带和亚热带地区。大戟科植物药用价值显著, 在抗菌、抗炎、抗病毒、抗结核、抗肿瘤以及神经生长因子促进作用等方面都有优良的药理活性^[10]。石栗的果实石栗子和枝叶都是传统中药材, 主要成分含有脂肪酸类和萜类化合物, 有镇痛、止血、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等功效^[11]。石栗树叶提取的半固体药物具有镇痛、抗炎和促进伤口愈合作用^[12], 树叶和树皮提取物均具有抗 HIV-1 病毒活性^[13]以及抗金葡菌和绿脓杆菌作用^[14], 其树叶提取物

在大鼠体内有降血脂作用^[15]。至今未检索到石栗及其提取物的抗 DENV 作用的研究报道。据《中药大辞典》记载, 石栗叶具有活血通经, 止血之功效, 主治闭经、金疮出血。作者前期对其枝叶的化学成分开展了研究, 发现了罗汉松烷型二萜 (podocarpane diterpenoids)、3,4-断裂罗汉松烷型二萜 (3,4-*seco*-podocarpane diterpenoids)、对映-海松烷型二萜 (*ent*-pimarane diterpenoids) 等多种类型的二萜化合物^[16]。作者筛选了这些二萜化合物的抗 DENV 活性, 发现 (3 α ,5 β ,10 α)-13-methoxypodocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol (MPTD) 对 DENV 具有显著抑制作用^[17]。本研究旨在探索 MPTD 抗 DENV 活性, 并对其作用机制进行初步研究, 期望为开发有效的抗 DENV 药物奠定科学基础。

材料与amp;方法

药物 化合物 MPTD 从石栗枝叶分离得到, 为无色方晶 (CHCl_3), 纯度 $\geq 98\%$; 根据质谱 ESI-MS m/z 313 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 推断其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_3$, 相对分子质量为 290。核磁波谱数据为: ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 1.50 (ddd, $J = 13.2, 8.8, 4.0$ Hz, H-1a), 2.22 (ddd, $J = 12.8, 7.0, 3.2$ Hz, H-1b), 1.75 (m, H-2a), 1.83 (m, H-2b), 3.31 (dd, $J = 12.9, 3.7$ Hz, H-3), 1.30 (dd, $J = 10.0, 1.6$ Hz, H-5), 1.75 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, H-6a), 1.85 (m, H-6b), 2.60 (ddd, $J = 17.0, 7.2, 5.2$ Hz, H-7a), 2.78 (ddd, $J = 16.8, 6.8, 4.0$ Hz, H-7b), 6.80 (s, H-11), 6.51 (s, H-14), 1.07 (s, Me-18), 0.88 (s, Me-19), 1.17 (s, Me-20), 3.83 (s, OMe); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ_{C} 37.0 (C-1, t), 28.0 (C-2, t), 78.7 (C-3, d), 38.9 (C-4, s), 49.9 (C-5, d), 18.9 (C-6, t), 30.5 (C-7, t), 126.4 (C-8, s), 142.2 (C-9, s), 37.1 (C-10, s), 110.5 (C-11, d), 143.4 (C-12, s), 144.4 (C-13, s), 110.6 (C-14, d), 28.1 (C-18, q), 15.3 (C-19, q), 24.8 (C-20, q), 55.8 (OMe)。结构如图 1 所示。表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG, 上海麦克林生化科技有限公司); 利巴韦林 (ribavirin, 大连美仑生物技术有限公司); MPTD 溶于 100% 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide,

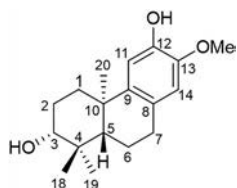


Figure 1 The chemical structure of (3 α , 5 β , 10 α)-13-methoxy-podocarpa-8,11,13-triene-3,12-diol (MPTD)

DMSO) 中, 保存于 4 °C 备用。

主要试剂 低熔点琼脂糖 (美国 Amresco 公司); 结晶紫 (北京索莱宝公司); DMEM、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Thermo Fisher 公司); DENV-2 蛋白 E 抗体 (义翘神州公司); 抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (北京康为世纪公司); MTT (Sigma 公司); 二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethyl formamide, DMF) (西陇化工股份有限公司); 逆转录 cDNA 试剂盒、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒、引物及 TaqMan 探针 (Takara 公司), RNA 提取试剂盒 Roche High Pure Viral RNA Kit (Roche 公司)。

细胞与病毒 非洲绿猴肾细胞 (Vero)、人肝癌细胞 (HepG2) 和人肝细胞系 (Huh7) 均购自中国科学院昆明动物研究所细胞库。白纹伊蚊细胞 (C6/36) 购自中国科学院上海细胞库。Vero、Huh7 和 HepG2 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养, C6/36 细胞于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养, 细胞维持液含 2% FBS。所有培养液均含有 100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 μ g·mL⁻¹ 硫酸链霉素。DENV-1 D06063 株 (GenBank: JQ3177413.1)、DENV-2 New Guinea C 株 (GenBank: KM204118.1)、DENV-3 YNSW1 株 (GenBank: KR296743.1) 和 DENV-4 LD34 株 (GenBank: 未发表) 均由中国医学科学院昆明医学生物研究所孙明强研究员提供。采用 C6/36 细胞进行病毒扩增, 噬斑法测定病毒滴度。实验用 DENV-1、-2、-3 和 -4 病毒滴度分别为 1.07 \times 10⁴、5.6 \times 10⁴、8.69 \times 10³ 和 2.32 \times 10³ PFU·mL⁻¹。

噬斑法检测 MPTD 对 DENV 的抑制活性 将对数生长期 Vero 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬并调浓度为每毫升 3 \times 10⁵ 个, 每孔 1 mL 加至 12 孔板, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养过夜。待细胞长至单层后弃掉培养上清, 加入 DENV 感染 2 h, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤细胞 3 次以除去游离病毒, 待测 MPTD 用 4% FBS 进行 5 倍梯度稀释, 每个浓度设 3 个复孔, 分别设置含病毒和细胞的阳性对照孔 (positive control, PC) 和仅含细胞的阴性对照孔 (blank control, BC)。每孔加入 1 mL 药物稀释

液和 1 mL 2% 低熔点琼脂的混合培养基, 待琼脂糖凝固后转移至培养箱连续培养 5 天, 用 4% 多聚甲醛固定琼脂块 10~15 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 再用 0.8% 的结晶紫染色, 用清水清洗残余结晶紫溶液后烘干。酶联荧光斑点分析仪计数噬斑, 用 GraphPad Prism 软件计算化合物的半数有效浓度 (50% effective concentration, EC₅₀)^[18]。

细胞毒性检测 将 Vero 细胞接种到 96 孔板中培养过夜, 加入 5 倍梯度的化合物稀释液 (每孔 100 μ L), 设置实验组和空白对照组, 每个浓度设 3 个复孔。在 37 °C 培养箱中孵育 72 h 后, 加入 20 μ L 5 mg·mL⁻¹ MTT, 于 37 °C 孵育 4 h, 再加入 100 μ L 的 12% SDS-50% DMF 溶液并在 37 °C 孵育过夜。待结晶甲臞完全溶解后, 使用 Elx800 酶标仪测量吸光度 (A) 值, 波长为 570 nm, 参比波长为 630 nm, 计算其半数细胞毒性浓度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀)。

qRT-PCR 检测 DENV-2 RNA 用试剂盒 Roche High Pure Viral RNA Kit 提取细胞上清中的病毒 RNA, Trizol 法提取细胞内的 RNA, 实验步骤遵循试剂盒说明书。在 37 °C 下, DENV-2 分别感染 Vero 和 Huh7 细胞 2 h, PBS 洗涤 3 次, 然后加入待测 MPTD, 并使用 DMSO 和未感染的细胞分别作为阳性和阴性对照, 设置 3 个复孔。在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中共同培养 72 h 后, 收获细胞上清液提取病毒 RNA。使用一步法试剂盒 RNA-direct™ Real-time PCR Master Mix 和 TaqMan 探针定量检测培养上清中释放的子代病毒 RNA。应用 DENV-2 引物 (序列为 5'-TTCCTATCCATGTGATAAT GACTCCTA-3' 和 5'-AGGCTCTCCACCAAGTTTTCG G-3') 及 TaqMan 探针 (序列为 5'-FAM/TCCAGGCTCAGATGCTTTTT/TAMRA-3') 进行扩增。qRT-PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。

Western blot 实验 检测 MPTD 对 DENV-2 E 蛋白表达的抑制作用。将 Vero 细胞加入 12 孔板 (3 \times 10⁵ 个/孔), 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养过夜。待细胞长成单层, 经 DENV-2 感染和梯度稀释的 MPTD 处理后继续共培养 72 h, 弃上清并用 PBS 洗涤 3 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液 (每孔 200 μ L) 于冰上裂解 30 min, 每 10 min 晃动细胞板, 轻轻将贴壁细胞吹下后转移至 1.5 mL 离心管中。离心机提前预冷设置 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 所得上清即细胞内总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 法检测, 并将其转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, 将 PVDF 膜

与抗DENV-2 E抗体于4 °C孵育过夜。用化学发光底物呈现特异性信号,并使用Tanon-5200 Multi Imaging System软件进行分析。

分时给药实验 采用分时给药实验观察MPTD作用的DENV生命周期阶段。将Vero细胞加入到12孔板(3×10^5 个/孔),在5% CO₂、37 °C条件下培养过夜。DENV-2感染Vero细胞2 h,用PBS洗去游离病毒。分别在感染后(0、1、2、4、6、12、24 h)加入50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPTD,培养24 h后收集病毒上清。qRT-PCR定量检测上清中的DENV-2 RNA。

病毒结合实验 Vero细胞接种DENV-2后,将MPTD和细胞添加到12孔板中,并在4 °C下孵育2 h, PBS洗涤未结合的病毒颗粒和残留MPTD。然后,Trizol法提取细胞内的RNA并通过qRT-PCR方法检测细胞中DENV的载量。

统计学方法 实验数据采用GraphPad Prism 6软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 MPTD抑制不同血清型DENV的复制

据文献报道^[19],利巴韦林具有抗DENV作用,因此将其设置为阳性对照。应用噬斑法检测利巴韦林和MPTD对不同血清型DENV的抑制效果,通过统计在不同药物浓度下的噬斑数并与PC组进行比较,计算化合物对DENV的抑制率。结果显示(图2),利巴韦林和MPTD对DENV的抑制均呈剂量依赖关系。利巴韦林对DENV-2的EC₅₀为 $40.78 \pm 1.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,MPTD对DENV-1、-2、-3和-4的EC₅₀分别为 2.72 ± 0.39 、 10.99 ± 5.18 、 18.72 ± 0.21 和 $0.48 \pm 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,表明MPTD的抗DENV活性优于利巴韦林。

2 MPTD对宿主细胞的毒性

应用MTT法测定MPTD对病毒感染宿主细胞Vero和Huh7的细胞毒性。结果显示,MPTD对Vero和Huh7细胞的毒性都很小,其CC₅₀均大于200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图3)。MPTD对DENV 1~4血清型的治疗指数(CC₅₀/EC₅₀)分别为: > 73.53 、 > 18.2 、 > 10.68 和 > 416.67 。

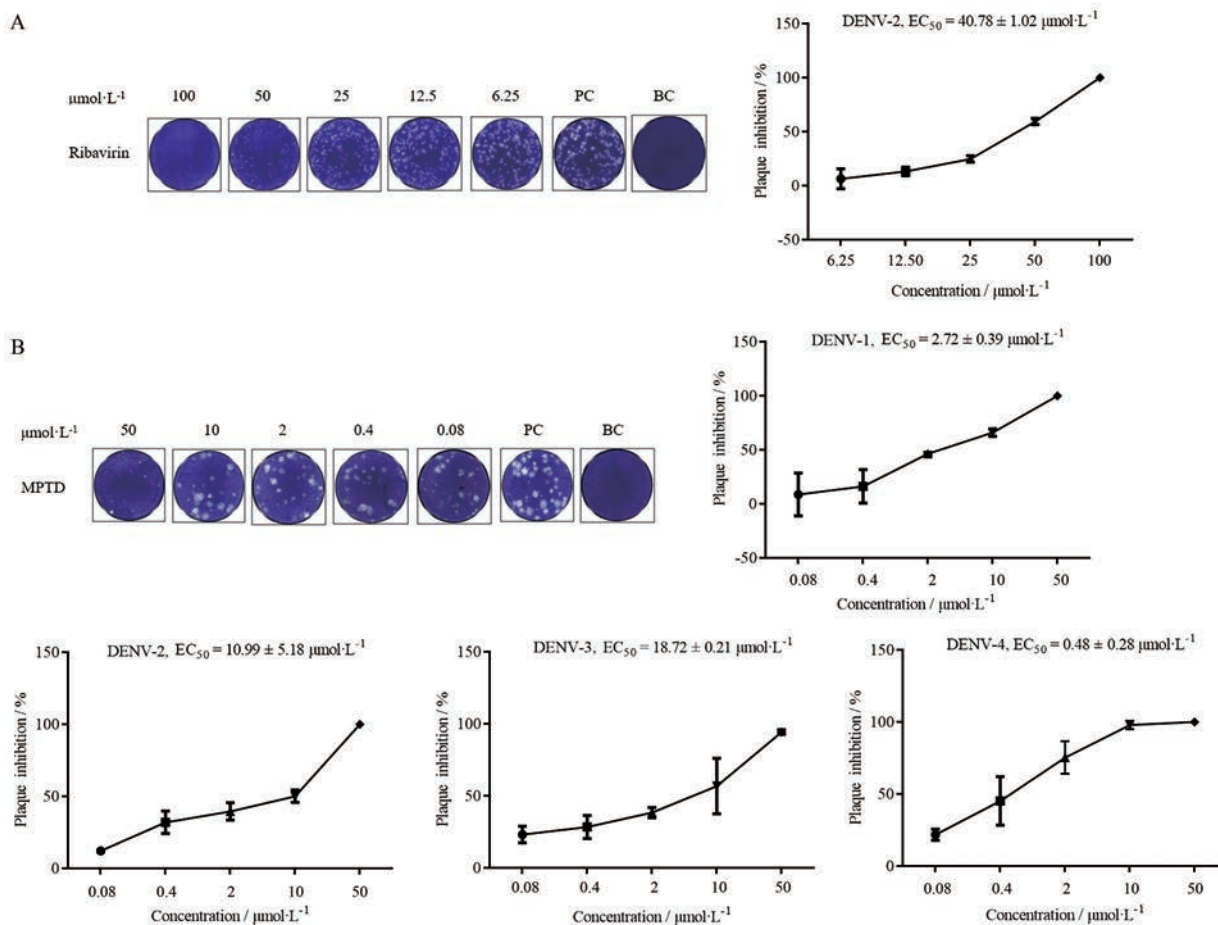


Figure 2 Inhibitory effects of MPTD on dengue viruses (DENVs) by plaque assay. A: Inhibition of plaque formation of ribavirin on DENV-2; B: Dosage-dependent inhibition of MPTD on different DENV serotypes by plaque assay. PC: Positive control; BC: Blank control; EC₅₀: 50% effective concentration

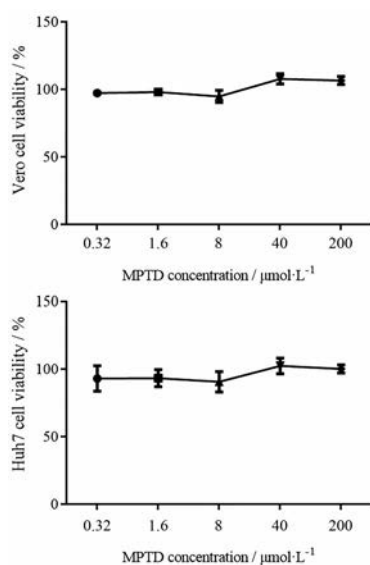


Figure 3 The cytotoxicity of MPTD on Vero and Huh7 cells by MTT assay

3 MPTD抑制DENV-2复制和病毒E蛋白表达

采用实时荧光定量PCR法检测MPTD对DENV-2的RNA复制的抑制作用,以利巴韦林给药组为对照实验组。结果表明,利巴韦林在Vero细胞和Huh7细胞中抑制DENV-2产生病毒RNA的 EC_{50} 分别为 > 50 和 $7.28 \pm 1.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,MPTD在Vero细胞和Huh7细胞中抑制DENV-2产生病毒RNA的 EC_{50} 分别为 3.88 ± 0.24 和 $4.125 \pm 0.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图4A)。因此,MPTD能够有效抑制DENV-2病毒的复制,其活性略优于利巴韦林。应用免疫印迹实验检测MPTD对DENV-2 E蛋白表达的作用,结果表明,MPTD对DENV-2 E蛋白的表达呈剂量依赖性抑制作用(图4B)。以上结果提示,MPTD对DENV-2 RNA的复制及E蛋白的表达均具有显著抑制作用。

4 MPTD作用于DENV-2复制周期的早期阶段

应用分时给药实验研究MPTD在不同时间点处理感染细胞的作用,以观察其作用于DENV生命周期的阶段(图5A)。结果显示,用MPTD在病毒感染Vero细胞后的早期阶段(0、2、6 h)处理,DENV-2 RNA的产生显著减少(图5B),提示MPTD对DENV-2的抑制作用可能在病毒复制的早期阶段。已有研究证实EGCG是DENV-E蛋白抑制剂^[20],因此分别设置EGCG给药组和MPTD给药组,检测MPTD对病毒结合宿主细胞的影响,分别与感染DENV-2的Vero细胞于 4°C 条件下共培养2 h。结果显示,MPTD组和EGCG组的DENV-2 RNA水平无显著差异,提示MPTD可能不会影响DENV的结合(图5C)。

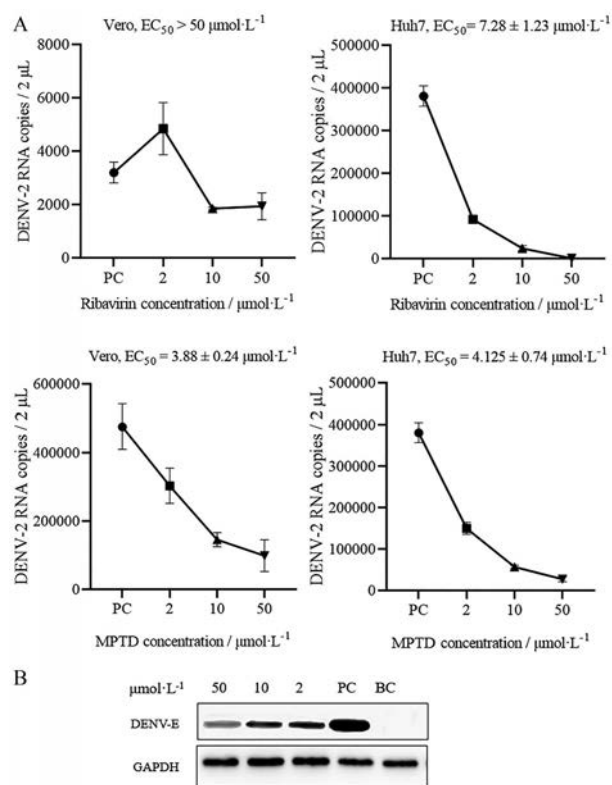


Figure 4 MPTD inhibits DENV-2 RNA production and protein E expression. A: Inhibition of MPTD and ribavirin on DENV-2 RNA production in Vero or Huh7 cells; B: Inhibition of MPTD on DENV-2 protein E (DENV-E) expression. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

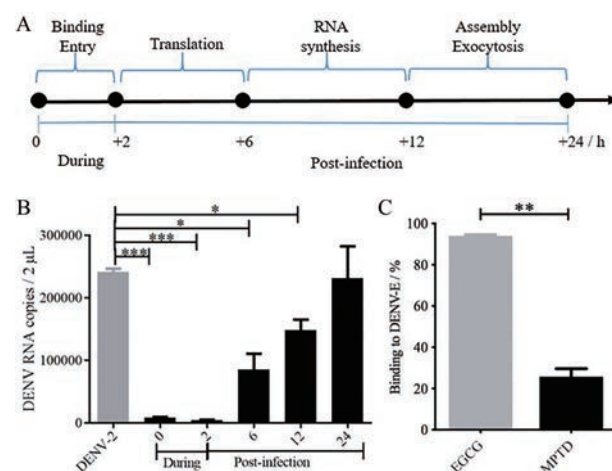


Figure 5 MPTD inhibits the early phase of the DENV replication cycle. A: Schematic diagram of time of drug addition assay; B: The inhibition of RNA production at $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPTD on DENV-2 replication cycle by time of drug addition assay; C: Inhibition of DENV-2 entry by $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPTD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. EGCG: Epigallocatechin gallate

讨论

随着对DENV的蛋白结构和功能、病毒与宿主的

相互作用、天然免疫通路以及病毒免疫逃逸功能等方面的深入研究,同时结合天然产物分离鉴定技术和化合物合成等技术的不断进步,越来越多的抗病毒药物将被发现^[21,22]。

本文发现MPTD在体外具有抗DENV活性,其在细胞水平对DENV的抑制作用优于利巴韦林。病毒的侵入过程是感染宿主的重要阶段,研发可抑制DENV进入细胞早期阶段的药物具有重要意义。通过分时给药实验发现,MPTD在0、2、6 h对DENV具有抑制作用,推断其可能作用于病毒复制的早期阶段。E蛋白介导DENV与细胞受体的结合和融合过程,表没食子儿茶素没食子酸酯EGCG是E蛋白抑制剂,比较EGCG与MPTD对DENV的抑制活性发现,MPTD不通过抑制DENV-E蛋白而使病毒失去感染能力。由于MPTD在2~6 h同样对DENV的复制具有较强抑制作用,因此作者推测MPTD的抗DENV作用机制可能是抑制病毒的蛋白质合成过程。本研究结果发现,MPTD为植物来源的化合物且具有较好的抗DENV活性,将为研发抗DENV感染的新型先导化合物并为临床治疗DENV感染引起的严重疾病奠定基础。

作者贡献:汪芳、姚倩文和罗荣华负责抗病毒活性实验实施并收集整理实验数据;严欢负责化合物纯化和鉴定;刘海洋和郑永唐负责指导实验设计、研究经费支持及论文修改。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Gopala Reddy SB, Chin WX, Shivananju NS, et al. Dengue virus NS2 and NS4: minor proteins, mammoth roles [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 154: 54-63.
- [2] Kuczera D, Assolini JP, Tomiotto PF, et al. Highlights for dengue immunopathogenesis: antibody-dependent enhancement, cytokine storm, and beyond [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2018, 38: 69-80.
- [3] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496: 504-507.
- [4] Whitehorn J, Farrar J. Dengue [J]. *Brit Med Bull*, 2010, 95: 161-173.
- [5] Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88: 365-375.
- [6] Huang KJ, Yang YC, Lin YS, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 2825-2832.
- [7] Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century [J]. *Trop Med Health*, 2011, 39: 3-11.
- [8] Beesetti H, Khanna N, Swaminathan S. Investigational drugs in early development for treating dengue infection [J]. *Expert Opin Inv Drug*, 2016, 25: 1059-1069.
- [9] Guy B, Noriega F, Ochiai RL, et al. A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16: 671-683.
- [10] Okealtuntas F, Ipekcioglu S, Sahin YA, et al. Phytochemical analysis, antiproliferative and antioxidant activities of *Chrozophora tinctoria*: a natural dye plant [J]. *Pharmac Biol*, 2017, 55: 966.
- [11] Nara LMQ, Lilian WR, Gislaire FS, et al. Contribution of α,β -amyrenone to the anti-inflammatory and antihypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. [J]. *Biomed Res Intern*, 2014, 2014: 636839.
- [12] Cesca TG, Faqueti LG, Rocha LW, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract: semisolid herbal [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143: 355-362.
- [13] Locher CP, Witvrouw M, De Béthune MP, et al. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) [J]. *Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol*, 1996, 2: 259-264.
- [14] Pedrosa RC, Meyre SC, Cechinel FV, et al. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana* [J]. *Phytother Res*, 2002, 16: 765-768.
- [15] Michael CA, Dominic AS, Anne M, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 589-601.
- [16] Liu HY, Di YT, Yang JY, et al. Three novel 3,4-*seco*-podocarpane trinorditerpenoids from *Aleurites moluccana* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2008, 49: 5150-5151.
- [17] Liu HY, Li SJ, Zhao Y, et al. Four new podocarpane-type trinorditerpenes from *Aleurites moluccana* [J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90: 2017-2023.
- [18] Zhang CT, Luo RH, Chen H, et al. Activity of azvudine against dengue viruses *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 944-949.
- [19] Dighe SN, Ekwudu O, Dua K, et al. Recent update on anti-dengue drug discovery [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 176: 431-455.
- [20] Calland N, Albecka A, Belouzard S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry [J]. *Hepatology*, 2012, 55: 720-729.
- [21] Michael CA, Dominic AS, Anne M, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 589-601.
- [22] Zou G, Xu HY, Qing M, et al. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening [J]. *Antiviral Res*, 2011, 91: 11-19.