基于转录组特征基因反向匹配方法发现抗流感病毒化合物BIX02189

吴 悠[1,2#], 陈姝冰[1,2#], 唐 克[1,2], 郭 颖[1,2*]

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制与药效评价北京市重点实验室, 北京 100050;
2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 流感病毒是RNA病毒, 分甲、乙、丙、丁4型, 其中甲型流感病毒和乙型流感病毒可引发人类急性呼吸道疾病, 全球每年约30万患者死于流感感染。流感病毒的生命周期高度依赖宿主, 靶向宿主因子已经成为抗病毒药物研究的重要策略。本研究通过转录组特征基因反向匹配 (transcriptome signature reversion, TSR) 方法, 计算获得干预多宿主因子的抗流感病毒化合物列表, 评价列表中化合物体外抗流感病毒活性, 最终获得活性化合物BIX02189。结果显示, BIX02189具有广谱抗流感病毒活性, 抗甲流病毒H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 和乙流病毒 (B/江西新建/BV/39/2008) 的半数有效浓度 (half maximal effective concentration, EC_{50}) 分别为17.1和9.4 μmol·L^{-1}, 其中抗甲流活性优于利巴韦林 (97.9 μmol·L^{-1})。转录组间无监督学习相似性成簇分析显示, BIX02189的抗流感病毒主要机制可能通过干预Raf/MEK/ERK通路, 实现对流感病毒颗粒的生成和释放的阻断。

关键词: 流感病毒; 宿主因子; 化合物扰动细胞转录特征基因; 转录组特征基因反向匹配; BIX02189

中图分类号: R965.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2022)10-3002-09

Discovering BIX02189 as a novel anti-influenza virus compound using transcriptome signature reversion strategy

WU You[1,2#], CHEN Shu-bing[1,2#], TANG Ke[1,2], GUO Ying[1,2*]

(*1. 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; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: Influenza virus is an RNA virus that classified into 4 types, A, B, C, and D, where influenza A and B virus infection may cause human acute respiratory tract infection and nearly 0.3 million deaths annually. The life cycle of influenza virus infection is highly dependent on the host response, demonstrating an important strategy of developing anti-influenza agents that target the host factors. This research utilized a transcriptome signature reversion (TSR) strategy to discover a list of multi-host-factor-target anti-influenza agents and determined their anti-influenza activities *in vitro*. BIX02189 was discovered and exhibited broad spectrum anti-influenza activity, with half maximal effective concentration (EC_{50}) of 17.1 μmol·L^{-1} against influenza A virus H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) and 9.4 μmol·L^{-1} for influenza B virus (B/Jiangxi Xinjian/BV/39/2008). The anti-influenza A virus activity of BIX01289 is stronger than the positive control ribavirin with EC_{50} of 97.9 μmol·L^{-1} for influenza A virus H1N1

收稿日期: 2022-01-18; 修回日期: 2022-05-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204472); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-I2M-2-002, 2021-I2M-1-028); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放课题 (GTZK202109); 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150); 北京协和医学院学科建设项目 (201920200802).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165176, E-mail: yingguo6@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0087

(A/Puerto Rico/8/1934). According to the unsupervised transcriptomic profile similarity clustering analysis, BIX02189 was considered to inhibit viral protein synthesis and release of influenza virus mainly through inhibiting the Raf/MEK/ERK cascade, revealing its potential mechanism of inhibiting influenza virus infection.

Key words: influenza virus; host factor; the transcriptomic signature of compound-perturbed cells; transcriptome signature reversion; BIX02189

流行性感冒是由流感病毒 (influenza virus) 感染引发的急性呼吸道传染病, 是全球范围内危害公共健康的重要疾病[1], 据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计, 全球每年有超过10亿流感病毒感染病例, 其中300万～500万例为重症患者, 死亡人数约29万～65万人[2-4]。流感病毒属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 分甲、乙、丙和丁4型, 其中甲、乙和丙型流感病毒可感染人并引起呼吸道疾病, 甲型流感病毒流行范围最广, 危害最大[5]。

现有的抗流感病毒药物包括4类共8个: M2离子通道抑制剂金刚烷胺 (amantadine) 和金刚乙胺 (rimantadine); 神经氨酸酶抑制剂奥司他韦 (oseltamivir)、扎那米韦 (zanamivir)、帕拉米韦 (peramivir) 和拉尼米韦 (laninamivir); RNA依赖RNA聚合酶抑制剂法匹拉韦 (favipiravir); CAP依赖核酸内切酶抑制剂巴洛沙韦玛波西酯 (baloxavir marboxil)[6,7], 上述药物均以流感病毒蛋白为药物靶点阻断病毒生命周期的不同环节。然而作为RNA病毒, 流感病毒基因组的高突变率导致靶点构象改变, 药物亲和力下降, 流感病毒成为耐药病毒并逃逸, 降低药物治疗效果[8-11]。

流感病毒复制及其所致的细胞病变是其造成呼吸道损伤的主要原因。流感病毒的生命周期高度依赖宿主, 多种宿主因子参与了流感病毒的复制过程[12]; 而在病毒入侵过程中, 宿主细胞的抵抗病毒感染反应也被激活。干预流感病毒复制、减缓病毒对宿主的损伤可有效控制感染, 已成为了抗流感病毒新药研发的目标。随着基因编辑和基因文库筛选技术的发展, 目前发现300余种与流感病毒感染相关的宿主因子[13-17], 靶向宿主因子已经成为抗病毒药物研究的重要策略[12,13,18], 其中NexBio公司研发的以唾液酸为靶点的DAS181[19,20]和Romark实验室研制的靶向流感病毒蛋白质合成环节的硝唑尼特[21,22]最具有代表性, 相关研究处于临床研究阶段。

由于与流感病毒感染相关宿主因子数目众多且互作关系复杂, 采用传统手段难以实现多宿主靶点抗流感病毒药物的研发。如前所述, 转录组学数据可以从整体上体现生理和病理过程中细胞和组织中各基因的表达特征, 近年来转录组学数据的高速积累为抽提疾病特征提供了数据基础, 为从病毒复制和细胞病变过程中多个环节研发干预流感病毒相关宿主因子的药物提供了可能。本研究依据转录组学大数据, 采用流感病毒感染转录组特征基因反向匹配 (transcriptome signature reversion, TSR) 策略计算筛选抗流感病毒化合物。计算过程分为三步: 确定疾病的特征基因; 提取化合物扰动细胞的特征基因; 将二者特征进行反向匹配计算获得化合物列表[23]。最终通过对列表中化合物进行活性评价, 发现了MEK5抑制剂BIX02189具有广谱抗流感病毒活性 (图1)。

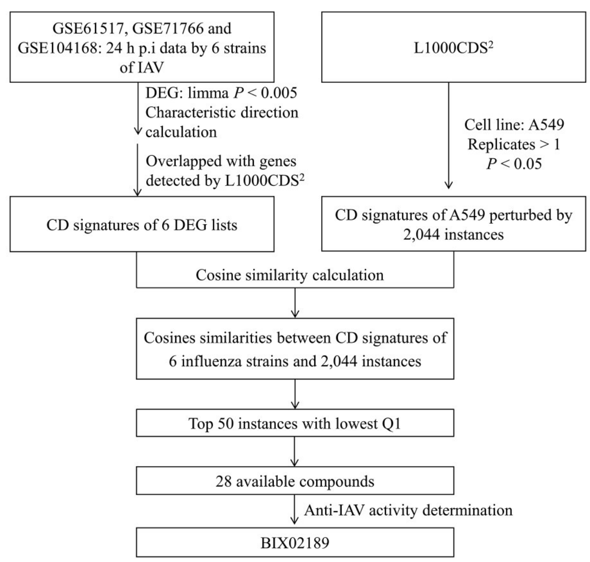

Figure 1　The workflow of discovering BIX02189 as an anti-influenza virus compound using transcriptome signature reversion (TSR) strategy. IAV: Influenza A virus; DEG: Differentially expressed genes; CD: Characteristic direction; p.i: Post-infection; Q1: First quartile

材料与方法

细胞　A549和MDCK细胞购自美国标准生物品收藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 用含10%胎牛血清、100 μg·mL^{-1}青霉素、100 μg·mL^{-1}链霉素的DMEM培养基进行培养和传代。

病毒　甲型流感病毒H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 和乙型流感病毒 (B/江西新建/BV/39/2008) 为本实验室自存[24]。

化合物及试剂　上市化合物库 (L1000, 纯度 > 95%)、临床在研化合物库 (L3400, 纯度 > 95%)、天然产物库 (L6000, 纯度 > 95%) 和经典已知活性化合物库 (L4000, 纯度 > 95%)、BIX02189 (纯度 > 99.86%, T2416) 和对照化合物利巴韦林 (纯度 > 98%, T0684) 均购自上海陶素生化科技有限公司。所有化合物溶于 DMSO (Sigma-Aldrich 公司, Cat No.34943) 并存储于 −20 ℃。

CellTiter-Glo® 发光法细胞活力检测试剂盒 (G7571) 购自 Promega 公司。甲型流感病毒血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 抗原检测试剂盒 (KIT11684) 购自北京义翘神州生物技术有限公司。

流感病毒感染特征基因提取流程　以"influenza"、"lung" 和"homo sapiens"为关键词, 从 GEO 数据库 (Gene Expression Omnibus, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 中检索获得流感感染细胞的高通量测序数据集 (GSE61517 和 GSE104168) 和 DNA 微阵列数据集 GSE71766。首先使用特征方向 (characteristic direction, CD) 方法, 以未感染组为对照组分别对 3 个数据集的不同甲型流感病毒株感染 6 组不同细胞 24 h 后的转录组学数据进行差异表达分析, 计算与获得各基因的特征方向 CD 值; 然后应用基于经验贝叶斯统计学方法的差异基因分析工具 R-limma 软件包[25]对差异表达水平进行显著性分析, 提取显著性 $P < 0.005$ 的基因作为各株流感病毒感染的特征基因; 最后, 从 L1000CDS^2 下载的数据库 (https://maayanlab.cloud/L1000CDS2/#/index) 中提取有特征值 CD 的基因列表, 将 6 组特征基因列表与 L1000CDS^2 中有测定值的基因取交集, 获得甲流病毒感染肺细胞的特征基因集。

L1000CDS^2 数据库化合物扰动细胞特征基因提取流程　LINCS L1000CDS^2 平台提供了 3 924 种化合物以不同浓度和不同时间下扰动 62 种细胞系的基因表达谱数据[26]。本研究首先从 L1000CDS^2 数据库中获得全部化合物扰动 A549 细胞的数据。为保证化合物 CD 数据的准确性和可靠性, 进一步以"化合物扰动细胞检测结果必须包含平行孔 (replicates > 1)", 和"显著性分析 $P < 0.05$"为筛选条件, 最终获得 2 044 组化合物以不同浓度、不同时间扰动细胞的 CD 特征值数据集。

TSR　采用余弦相似度算法[26]对 6 组流感病毒感染细胞的特征基因 CD 值与 2 044 组化合物扰动细胞的 CD 特征值数据进行转录组特征基因反向匹配计算, 分别得到每个化合物逆转不同流感病毒株感染不同细胞的余弦相似度分数。随后根据 6 组分数的第一四分位数 (first quartile, Q1) 进行汇总及排名, 选取 Q1 最小的 50 组不同浓度、处理时间的化合物处理实例 (instance), 即反向调节程度最高的 50 组实例, 获得待活性验证的化合物列表。

CellTiter-Glo 法检测化合物对细胞活力的影响　将 A549 细胞按细胞数 4×10^4 个细胞/孔接种至 96 孔板中, 培养 4 h 后, 将受试化合物或 DMSO (0.1%, *v/v*) 溶剂对照分别加至细胞培养液。培养 20 h 后, 用 1×PBS 润洗细胞 1 次, 加入含 2 μg·mL^{-1} TPCK-trypsin 的 F-12K 培养基于 37 ℃、5% CO_2 孵育细胞 1 h。吸弃培养基, 加入含有待测化合物或等体积 DMSO (0.1%, *v/v*) 的生长维持液 F-12K (含 0.5 μg·mL^{-1} TPCK-trypsin 和 0.075% BSA) 150 μL, 置于培养箱中培养 24 h。使用 CellTiter-Glo®发光法细胞活力检测试剂盒检测相对光单位 (relative light unit, RLU) 值, 并计算细胞活力。以 DMSO 溶剂对照组数值为细胞活力 100%, 计算加药孔细胞存活率 (公式 1)[27]:

$$\text{细胞存活率\%} = \frac{\text{RLU}_{\text{加药组}}}{\text{RLU}_{\text{溶剂对照组}}} \times 100\% \tag{1}$$

化合物抗甲型流感病毒感染体外活性评价　采用 H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 感染 A549 细胞模型评价化合物对病毒感染致细胞病变的影响。将 A549 细胞以 4×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 4 h 后加入待测化合物, 以利巴韦林为阳性对照, 以等体积 DMSO (0.1%, *v/v*) 为溶剂对照, 继续培养 20 h。吸弃培养基, 并用 1×PBS 润洗 1 次, 随后加入含 2 μg·mL^{-1} TPCK-trypsin 和病毒 (MOI = 0.02) 的 F-12K 培养基, 轻晃摇匀, 37 ℃、5% CO_2 孵育细胞 1 h。吸弃培养基, 加入含有待测化合物、阳性对照利巴韦林或等体积 DMSO (0.1%, *v/v*) 的生长维持液 F-12K (含 0.5 μg·mL^{-1} TPCK-trypsin 和 0.075% BSA) 150 μL, 置于培养箱中培养 24 h。使用 CellTiter-Glo®检测 RLU 值并计算细胞活力, 以未感染病毒的 DMSO 溶剂对照组数值为细胞活力 100%, 计算加药孔的细胞存活率 (公式 1), 采用公式 2 计算病变百分率:

$$\text{病变百分率\%} = 100\% - \text{细胞存活率\%} \tag{2}$$

并根据病变百分率计算病毒抑制百分率 (公式 3):

$$\text{病毒抑制百分率\%} = \frac{\text{病毒对照组病变率} - \text{待测化合物组病变率}}{\text{病毒对照组病变率}} \times 100\% \tag{3}$$

使用 GraphPad Prism 软件分析实验数据, 计算化合物的半数有效浓度 (EC_{50})[28]。

抗乙型流感病毒化合物体外活性检验　将 MDCK 细胞以 3×10^4 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 24 h 后待细胞密度达到 95% 以上, 以 100×$TCID_{50}$ 感染乙型流感病毒 (B/江西新建/BV/39/2008), 病毒感染维持液为 MEM 培养基 (含 0.2% BSA 和 2 μg·mL^{-1} TPCK-trypsin)

于37 ℃、5% CO_2培养箱孵育细胞2 h。用1×PBS润洗细胞1次, 随后加入的BIX02189、阳性对照利巴韦林和溶剂对照DMSO (0.1%, *v*/*v*) 的病毒维持液150 μL, 于37 ℃、5% CO_2培养箱培养。感染后60 h使用CellTiter-Glo®检测RLU值并计算细胞活力, 以未感染病毒的DMSO溶剂对照组数值为细胞活力100%, 采用公式1计算加药孔的细胞存活率, 采用公式2计算病变百分率, 并根据病变百分率计算病毒抑制百分率 (公式3), 使用GraphPad Prism软件分析实验数据, 计算化合物的EC_{50}。

HA定量检测　H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 感染A549细胞同"化合物抗甲型流感病毒感染体外活性评价"部分, 感染后24 h收集上清液, 按试剂盒说明书方法 (北京义翘神州生物技术有限公司, KIT11684) 检测上清中HA含量, 该含量反映上清中病毒滴度, 根据试剂盒说明书计算450 nm吸光度 (optical density at 450 nm, OD450) 的标准曲线、检测限和定量限, 并以公式4计算化合物对流感病毒复制的影响。使用GraphPad Prism软件分析实验数据, 计算化合物的EC_{50}。

$$抑制率\% = 100\% - \frac{OD450_{加药组}}{OD450_{病毒对照组}} \times 100\% \qquad (4)$$

数据分析及统计学方法[29,30]　用GraphPad Prism软件分析实验数据, 以浓度-病毒抑制率、浓度-细胞存活率作散点图, 用非线性拟合浓度-病毒抑制率量效曲线, 计算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

1　提取流感病毒感染细胞特征基因进行特征基因反向匹配计算

本研究首先以"influenza"、"lung"和"homo sapiens"为关键词, 经GEO检索获得了3组流感病毒感染细胞转录组学数据集 (GSE61517、GSE71766和GSE104168, 表1[31-33]), 对感染后24 h数据进行计算分析, 提取流感病毒感染细胞的转录水平特征基因集。

现有差异基因分析方法包括单变量及多变量等方法, 其中基于经验贝叶斯统计学方法的微阵列数据线性模型 (linear models for microarray data, limma) 是经典的单变量基因差异表达分析方法, 该方法通过线性拟合准确分析基因差异表达的显著性[25], 但在计算过程中该方法忽略了机体内不同基因间表达的关联性, 存在一定局限; CD方法是一种基于线性判别分析算法 (linear discriminant analysis, LDA) 的多变量基因差异表达分析方法, 计算时将所有基因表达视为一个整体, 每个基因视为一个维度, 利用线性判别分析方法, 确定可将实验组与对照组最大程度区分成两簇的超平面 (separating hyper-plane), 并通过计算超平面的法向量 (normal vector) 在各维度 (基因) 上的余弦分量 (cosine direction) 获得该基因的CD值, 作为该基因差异表达水平的特征值, 该方法在识别特征基因及特征值计算时具有更高灵敏度[34]。本研究结合了以上两种差异基因分析方法, 首先应用limma以未感染组为对照, 进行6个单一流感毒株感染24 h后的单变量差异表达分析, 计算数据集中全部基因差异表达显著性, 以"P < 0.005"作为阈值提取具有显著性表达的基因列表, 然后应用CD方法计算相应基因的差异表达特征值, 获得包含流感病毒感染特征基因及其CD值的6个列表 (略)。

L1000CDS² 数据库由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 资助构建, 是基于网络的细胞特征综合文库 (The Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures, LINCS)[35]数据进行特征方向分析得到的化合物扰动细胞基因表达差异程度特征方向值数据库, 包含了3 924种小分子化合物作用于62种细胞的33 197个基因表达谱数据[26], 同时提供了以CD方法计算的基因差异表达谱作为化合物扰动细胞的特征值[26]。该数据库提供了网页版和mongo数据库版本, 可用于进行化合物扰动不同细胞系的基因表达影响程度检索, 并计算可反向调节疾病特征的化合物。该方法目前已应用于抗埃博拉病毒的化合物筛选, 并验证了预测获得的化合物肯帕罗酮的体外抗埃博拉病毒活性[26]。本研究以肺细胞系"A549"为筛选条件, 以"P < 0.05"和"replicates > 1"为阈值提取化合物转录组矩阵, 获得LINCS L1000CDS² 数据库中2 044组包含不同浓度和不同扰动时间的化合物扰动细胞基因表达谱数据。

Table 1　The GEO datasets used for differentially expressed genes analysis of influenza virus infected cells in this study. MOI: Multiplicity of infection; RNA-seq: RNA sequencing

GEO accession No.	Experiment type	Cell line	Virus strain	MOI	Time point/h	Reference
GSE104168	RNA-seq	A549	H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934); H3N2 (A/New York/238/2015)	0.5	24, 48	[31]
GSE71766	Microarray	BEAS-2B	H1N1 (A/WSN/33)	2	2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72	[32]
GSE61517	RNA-seq	BEAS-2B	H3N2 (Brisbane/10/07); H3N2 (Perth/16/09); H3N2 (Udorn/307/72)	1	1, 6, 24	[33]

为保证TSR计算基因间对应关系, 对于6组流感病毒感染细胞特征基因集, 本研究仅保留了包含在L1000CDS^{2}测定基因集内的特征基因CD数据, 然后采用余弦相似度方法将化合物扰动细胞每个基因的特征值 (CD) 与甲流病毒感染细胞每个基因的特征值 (CD) 进行反向匹配, 计算得到2 044个化合物与6组流感病毒感染CD数据间的余弦相似度列表 (略); 最后, 根据各化合物6个余弦相似度数据的第一四分位数 (Q1) 进行排名, 选取Q1最低 (即化合物与疾病特征基因反向匹配程度最高, 扰动强度最强) 的50个不同浓度、处理时间的化合物处理组 (图2) 作为待测化合物列表, 共包含49种化合物。由于列表中的21个化合物难以获得, 本研究对28个可获得的化合物 (纯度 > 95%) 进行体外抗甲流病毒感染活性评价 (图1)。

2 化合物抗流感病毒体外活性评价

本研究以30 μmol·L^{-1}为终浓度, 采用甲型流感H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 感染A549细胞模型评价了28个化合物对病毒致细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 的影响。结果显示, 醋酸氢化可的松和BIX02189对甲流病毒致CPE的抑制率大于50% (图3)。经检索, 醋酸氢化可的松已有抗流感病毒活性报道, 该适应症的III期临床试验已结束[36]; 而BIX02189 (图4A) 未见抗流感病毒活性报道, 进一步进行化合物对流感病毒的广谱性评价。

3 BIX02189具有体外抗流感病毒活性

本研究采用甲型流感病毒H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 感染A549细胞模型和乙型流感病毒 (B/江西新建/BV/39/2008) 感染MDCK细胞模型评价BIX02189的抗流感病毒活性。结果显示, BIX02189对H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 和乙型流感病毒 (B/江西新建/BV/39/2008) 感染具有显著抑制活性, EC$_{50}$分别为17.1和9.4 μmol·L^{-1} (图4C、D, 表2)。研究还采用酶联免疫吸附模型 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测了感染H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) 的A549细胞上清中HA评价化合物对流感病毒感染A549细胞后上清中病毒量的影响。结果显示, BIX02189可降低感染

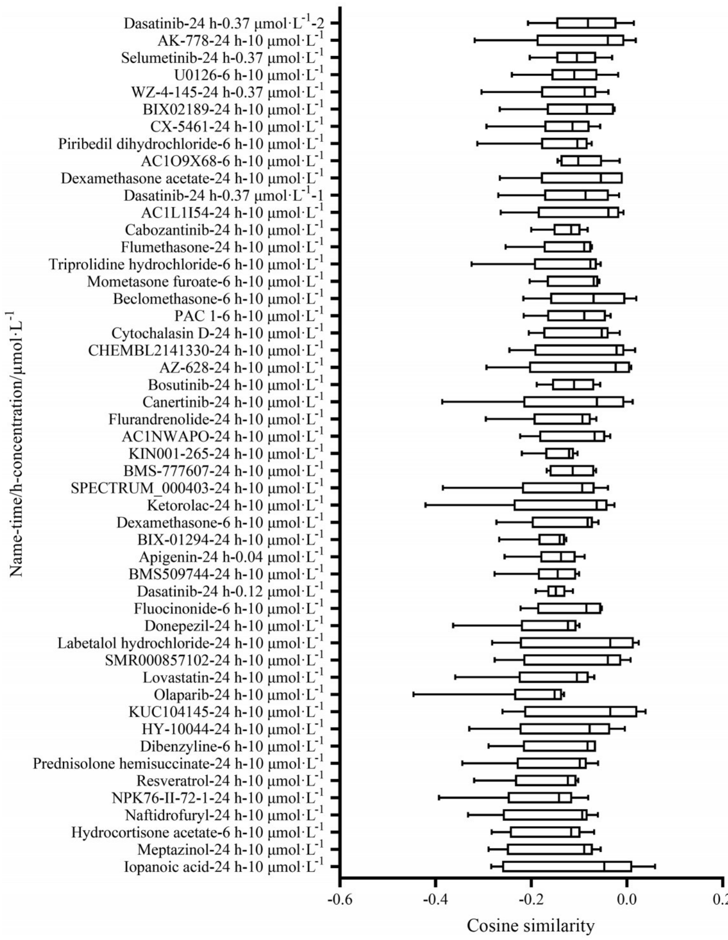

Figure 2 The cosine similarity scores of the top 50 compounds with the lowest Q1 score in TSR process. The first quartile, median, third quartile were calculated from the 6 cosine similarity values with influenza CD signatures of each compound perturbation instances. The Y axis lists the compound perturbation instances as "compound name-perturbation time/h-compound concentration/μmol·L^{-1}"

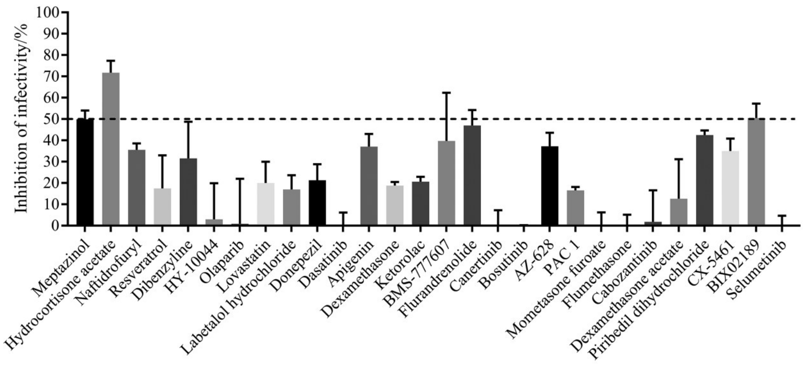

Figure 3　The effect of 28 compounds at 30 μmol·L^{-1} on A549 cells cytopathic effect (CPE) caused by H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) with an MOI of 0.02. The CPE was measured by a CellTiter-Glo Kit. The assay was performed in quadruplicate. The bar graph denotes the mean and the standard deviation of inhibition rate on CPE. Error bars represent the standard deviation from 4 individual wells

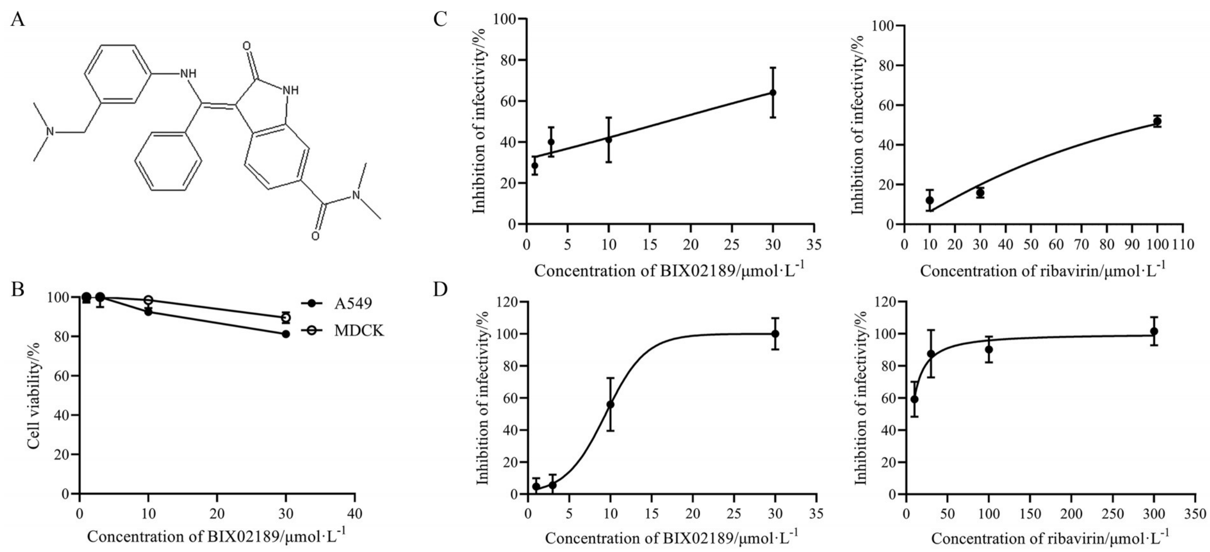

Figure 4　The effects of BIX02189 on influenza virus infection caused CPE of A549 and MDCK cells. A: The chemical structure of BIX02189; B: The cell viability of BIX02189 in A549 and MDCK cells. Cells treated with 0.1% DMSO (*v*/*v*) were utilized as the indicator of 100% cell viability. The assay was performed in duplicate; C: The inhibitory effect of BIX02189 and positive control ribavirin on H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) infection in A549 cells; D: The inhibitory effect of BIX02189 and positive control ribavirin on B/Jiangxi Xinjian/BV/39/2008 infection in MDCK cells. The CPE was measured by a CellTiter-Glo Kit (Promega, G7571) in quadruplicate. A DMSO (0.1%, *v*/*v*) vehicle control was used as the indicator of 100% infectivity. Error bars represent the standard deviation from 4 individual wells for inhibition of infectivity and 3 individual wells for cell viability. The dose response curves were generated by GraphPad Prism software

Table 2　The effects of BIX02189 on influenza virus infection. EC_{50}: Half maximal effective concentration; EC_{50} 95% CI: 95% confidence interval of EC_{50}; CC_{50}: Half maximal cytotoxic concentration; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Compound	Virus	Cell line	Activity against influenza infection			CC_{50}/μmol·L^{-1}
			Method	EC_{50}/μmol·L^{-1}	EC_{50} 95% CI/μmol·L^{-1}	
BIX02189	A/Puerto Rico/8/1934	A549	CPE	17.1	11.7−22.5	> 30
			ELISA	6.9	5.9−8.2	
	B/Jiangxi Xinjian/BV/39/2008	MDCK	CPE	9.4	8.4−10.4	> 30
Ribavirin	A/Puerto Rico/8/1934	A549	CPE	97.9	81.9−127.2	> 300
			ELISA	14.9	11.3−19.0	
	B/Jiangxi Xinjian/BV/39/2008	MDCK	CPE	7.1	2.6−10.4	> 300

H1N1的A549上清中的病毒水平, EC_{50}为6.9 μmol·L^{-1} (图5、表2)。上述结果提示, BIX02189具有体外抗甲流和乙流病毒感染活性, 对流感病毒中可引起人类急性呼吸道疾病的两类流感病毒感染具有广谱抗病毒活性。本研究还评价BIX02189对A549和MDCK细胞活力的影响。结果提示, BIX01289 (30 μmol·L^{-1}) 对

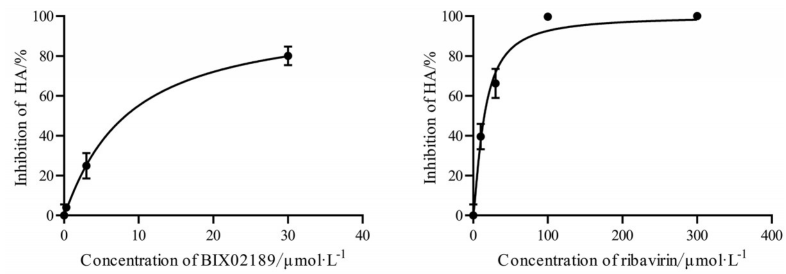

Figure 5 Effect of BIX02189 on influenza A virus replication. The hemagglutinin (HA) detection of ELISA was performed on the supernatant of H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) infected A549 cells following the same procedure of CPE assay. The supernatant was collected 24 h post-infection. The HA quantity was measured by the ELISA kit (KIT11684, SinoBiological, Beijing, China) in duplicate. Error bars represent the standard deviation from 2 individual wells for inhibition of HA and both experiments were conducted 3 times with similar results. The dose response curves were generated by GraphPad Prism software

A549和MDCK细胞增殖无显著影响 (图4B、表2)。

4 BIX02189抗甲型流感病毒机制分析

BIX02189是美国勃林格殷格制药公司 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals) 研发的丝裂原活化细胞外信号调节激酶5 (mitogen-activated protein kinase 5, MEK5) 抑制剂, 可通过特异性抑制MEK5 (IC_{50}: 1.5 nmol·L^{-1}) 阻断细胞外信号调节激酶5 (extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5) 的磷酸化[37]。当流感病毒感染细胞时, 细胞ERK5有丝分裂原活化蛋白 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路被激活, 但有研究显示通过显性负性突变体或寡核苷酸结构对ERK5或其上游激酶MEK5进行干预均对流感病毒的复制效率或宿主对病毒感染的应答无影响[38], 故推测BIX02189的抗流感活性与其抑制MEK5无关。

LINCS L1000FWD是一个基于无监督机器学习的成簇分析方法, 根据化合物在LINCS L1000和LINCS L1000CDS^{2}基因表达数据特征的相似性, 进行潜在作用靶点预测和通路富集分析的在线交互性可视化平台[39]。本研究根据BIX02189扰动的基因表达特征与其他LINCS L1000化合物的相似性, 采用LINCS L1000FWD检索, 预测其对除MEK5以外其他通路转录水平的影响[40]。如表3所示, Raf/MEK/ERK通路抑制剂在L1000FWD预测中的可能性 (probability) 最高, 达53.58%。有研究显示, 甲流病毒感染会引发Raf/MEK/ERK级联反应的双相激活, 抑制Raf信号通路会导致流感病毒核糖核蛋白复合物 (ribonucleoprotein complexes, RNP) 滞留在细胞核, 提示有丝分裂级联反应对病毒颗粒的生成和RNP的输出起到关键作用[41]。通过ELISA检测病毒感染上清液中BIX02189对病毒颗粒生成的抑制作用, 结果提示可能与BIX02189对Raf/MEK/ERK通路的抑制作用有关。由此推测, BIX02189可能通过Raf/MEK/ERK影响了流感病毒颗粒的生成和释放, 发挥抗流感病毒作用。

Table 3 Mode of actions (MOA) of BIX02189 analysis by L1000FWD (https://maayanlab.cloud/L1000FWD/)

Predicted mode of action	Probability
Raf inhibitor	0.535 8
PARP inhibitor	0.072 9
EGFR inhibitor	0.041 8
Calcium channel blocker	0.032 4
Cyclooxygenase inhibitor	0.028 9
CDK inhibitor	0.025 3
Adrenergic receptor antagonist	0.021 0
Tubulin polymerization inhibitor	0.019 1
Dopamine receptor antagonist	0.018 8
MEK inhibitor	0.018 1

讨论

TSR是一种基于反向调节转录组整体特征, 挖掘对疾病具有反向调节能力化合物的药物虚拟筛选方法[23]。本研究即采用此策略, 首先抓取不同流感毒株感染不同肺部或呼吸道细胞系的疾病特征[31-33], 然后计算获得可对不同毒株感染不同细胞系均具有显著反向调节作用的化合物。传统的高通量抗病毒药物实验筛选阳性率仅为0.01%～0.1%[28,42], 而本研究应用TSR方法所获得的阳性化合物率为7.1% (2/28), 筛选效率显著提高。两个活性化合物之一的BIX02189抗流感病毒活性为首次发现。

BIX02189原靶点为MEK5, 而现有研究表明抑制MEK5不影响流感病毒的复制或宿主应答[37], 即BIX02189不是通过其原生物活性发挥抗流感病毒作用的。采用LINCS L1000FWD的无监督成簇分析化合物基因转录的整体变化相似性, 结果显示BIX02189可能抑制了与流感病毒颗粒生成和释放相关的Raf/MEK/ERK级联反应, 起到抗流感病毒作用。

本研究通过对6组不同细胞系被不同流感毒株感

染24 h的转录组学数据分析, 应用TSR方法进行计算并活性验证28个化合物, 成功从2 044组化合物数据中发现具有抗甲流和乙流病毒活性化合物BIX02189, 其抗甲型流感病毒活性优于利巴韦林, 该化合物抗流感活性为首次报道。此外, 与传统高通量筛选相比, 本研究显著提高了筛选效率, 降低了人工、时间和经济成本, 提示采用合理的大数据分析方法, 充分利用转录组学数据资源可能成为未来活性化合物发现的重要途径。

作者贡献: 吴悠参与了本研究的设计、数据分析和实验工作; 陈姝冰参与了数据分析和文章撰写; 唐克参与实验设计和结果分析; 郭颖是本研究的负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 所有作者特此声明本研究不存在任何的利益冲突。

References

[1] Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, et al. Anti-influenza viral effects of honey *in vitro*: potent high activity of manuka honey [J]. Arch Med Res, 2014, 45: 359-365.

[2] Ziegler T, Mamahit A, Cox NJ. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network [J]. Influenza Other Respir Viruses, 2018, 12: 558-565.

[3] Arbeitskreis Blut, Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankhertserreger». Influenza virus [J]. Transfus Med Hemother, 2009, 36: 32-39.

[4] Influenza (seasonal) [EB/OL]. Geneva: World Health Organization, 2018 [2018-11-06]. https://www. who. int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal).

[5] First global estimates of 2009 H1N1 pandemic mortality released by CDC-Led Collaboration [EB/OL]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2012 [2012-06-25]. https://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm.

[6] Amarelle L, Lecuona E, Sznajder JI. Anti-influenza treatment: drugs currently used and under development [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53: 19-26.

[7] Ng KE. Xofluza (baloxavir marboxil) for the treatment of acute uncomplicated influenza [J]. P T, 2019, 44: 9-11.

[8] Amarelle L, Lecuona E, Sznajder JI. Anti-influenza treatment: drugs currently used and under development [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53: 19-26.

[9] WHO. Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses [EB/OL]. World Health Organization. https://www. who. int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza.

[10] Zhang Q, Zhao QJ, Xiong RS, et al. Research progress of anti-influenza virus agents [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2010, 45: 289-299.

[11] Xiu SY, Zhang J, Ju H, et al. Progress on IFV drug targets and small molecule inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 611-626.

[12] Lee SMY, Yen HL. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection [J]. Antiviral Res, 2012, 96: 391-404.

[13] Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, et al. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development [J]. Cell Host Microbe, 2014, 16: 795-805.

[14] König R, Stertz S, Zhou Y, et al. Human host factors required for influenza virus replication [J]. Nature, 2010, 463: 813-817.

[15] Karlas A, Machuy N, Shin Y, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication [J]. Nature, 2010, 463: 818-822.

[16] Li B, Clohisey SM, Chia BS, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection [J]. Nat Commun, 2020, 11: 164.

[17] Han J, Perez JT, Chen C, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication [J]. Cell Rep, 2018, 23: 596-607.

[18] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference [J]. Science, 2009, 324: 1394-1395.

[19] Moss RB, Hansen C, Sanders RL, et al. A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection [J]. J Infect Dis, 2012, 206: 1844-1851.

[20] Koszalka P, Tilmanis D, Hurt AC. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial [J]. Influenza Other Respirat Viruses, 2017, 11: 240-246.

[21] Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, et al. Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 29798-29808.

[22] Belardo G, Cenciarelli O, La Frazia S, et al. Synergistic effect of nitazoxanide with neuraminidase inhibitors against influenza A viruses *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59: 1061-1069.

[23] Koudijs KKM, Terwisscha van Scheltinga AGT, Böhringer S, et al. Transcriptome signature reversion as a method to reposition drugs against cancer for precision oncology [J]. Cancer J, 2019, 25: 116-120.

[24] Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. Influenza: propagation, quantification, and storage [J]. Curr Protoc Microbiol, 2006, Chapter 15: Unit 15G.1.

[25] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: e47.

[26] Duan Q, Reid SP, Clark NR, et al. L1000CDS(2): LINCS L1000 characteristic direction signatures search engine [J]. NPJ Syst Biol Appl, 2016, 2: 16015.

[27] Xin Y, Chen S, Tang K, et al. Identification of nifurtimox and chrysin as anti-influenza virus agents by clinical transcriptome signature reversion [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 2372.

[28] Tang K, Wu Y, Chen S, et al. Discovery of the anti-influenza A virus activity of SB216763 and cyclosporine A by mining infected cells and compound cellular signatures [J]. Chin Chem Lett, 2022, 33: 2541-2544.

[29] Tang K, Zhang X, Chen Q, et al. Effects and mechanism of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone for blocking arenavirus entry [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2019, 54: 838-845.

[30] Tang K, Zhang X, Guo Y. Identification of the dietary supplement capsaicin as an inhibitor of Lassa virus entry [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 789-798.

[31] Forst CV, Zhou B, Wang M, et al. Integrative gene network analysis identifies key signatures, intrinsic networks and host factors for influenza virus A infections [J]. NPJ Syst Biol Appl, 2017, 3: 35.

[32] Kim TK, Bheda-Malge A, Lin Y, et al. A systems approach to understanding human rhinovirus and influenza virus infection [J]. Virology, 2015, 486: 146-157.

[33] Fabozzi G, Oler AJ, Liu P, et al. Strand-specific dual RNA sequencing of bronchial epithelial cells infected with influenza A/H3N2 viruses reveals splicing of gene segment 6 and novel host-virus interactions [J]. J Virol, 2018, 92: e00518-18.

[34] Clark NR, Hu KS, Feldmann AS, et al. The characteristic direction: a geometrical approach to identify differentially expressed genes [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15: 79.

[35] Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles [J]. Cell, 2017, 171: 1437-1452.e17.

[36] Low doses corticosteroids as adjuvant therapy for the treatment of severe H1N1 flu (CORTIFLU) [EB/OL]. ClinicalTrial. gov, 2011. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01014364.

[37] Tatake RJ, O'Neill MM, Kennedy CA, et al. Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377: 120-125.

[38] Ludwig S. Influenza viruses and MAP kinase cascades – novel targets for an antiviral intervention? [J]. Signal Transduct, 2007, 7: 81-88.

[39] Wang Z, Lachmann A, Keenan AB, et al. L1000FWD: fireworks visualization of drug-induced transcriptomic signatures [J]. Bioinformatics, 2018, 34: 2150-2152.

[40] BIX02189 (BRD-K73368362) [EB/OL]. New York: Mount Sinai Center for Bioinformatics at the Icahn School of Medicine, 2018 [2018-06-15]. https://maayanlab. cloud/dmoa/report/BRD-K73368362.

[41] Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, et al. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3: 301-305.

[42] Zhu T, Cao S, Su PC, et al. Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis [J]. J Med Chem, 2013, 56: 6560-6572.