玛巴洛沙韦联合FDA上市药物的体外抗甲型流感病毒作用评价

任永成, 王 静*, 岑 山*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 流感病毒引起的季节性流感严重威胁人类健康。病毒耐药株的快速出现及新发突发传染病的暴发亟需研究人员发现新型的抗流感策略和药物。基于药物联用和药物再利用策略发现有效的联用候选药物组合成为抗病毒药物研发的方向之一。本文针对甲型流感病毒 (IAV), 利用高通量筛选系统, 从FDA上市及药典收录化合物库中筛选与玛巴洛沙韦具有协同作用的药物组合。研究表明, 玛巴洛沙韦分别与具有弱抗流感活性的曲普利啶、氢奎宁、美克西酮联用时, 能够在细胞水平协同抑制IAV复制。研究机制表明, 这3种药物与玛巴洛沙韦联用在抑制IAV RNA依赖性RNA聚合酶 (RdRp) 活性上无明显的协同作用, 提示可能存在其他作用机制来发挥协同作用。本研究初步证明了该抗流感药物组合筛选策略的可行性, 同时为玛巴洛沙韦通过药物联用来增强药效提供了理论依据。

关键词: 流感病毒; 玛巴洛沙韦; 抗病毒; 药物联用; 协同作用; RNA依赖性RNA聚合酶

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1700-10

In vitro evaluation of anti-influenza A virus activity of baloxavir marboxil combined with FDA marketed drugs

REN Yong-cheng, WANG Jing*, CEN Shan*

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: Seasonal influenza caused by the influenza virus poses a serious threat to human health. The rapid emergence of drug-resistant viral strains and the increasing incidence of novel infectious diseases underscore the urgent need for researchers to develop innovative anti-influenza strategies and drugs. The identification of effective drug combinations and the repurposing of existing drugs have gained traction as a potential avenue for antiviral therapy. This study employed a high-throughput screening system for influenza A virus (IAV) inhibitors to identify drug combinations that exhibit synergistic effects with baloxavir marboxil from FDA-approved and pharmacopeia-listed compound libraries. The results showed that triprolidine, hydroquinine, and mexenone, which individually display limited anti-influenza activity, exhibited synergistic effects when combined with baloxavir marboxil markedly enhancing its anti-IAV potency in cells. Mechanistic studies indicated the synergistic effects of these drug combinations with baloxavir marboxil were not attributed to the inhibition of IAV RNA dependent RNA polymerase (RdRp) activity, suggesting that alternative mechanisms may be responsible for their enhanced effects. This study provides preliminary evidence supporting the feasibility of this drug combination screening strategy and offers a theoretical basis for improving the therapeutic potential of baloxavir marboxil through combination therapy.

Key words: influenza virus; baloxavir marboxil; antiviral; drug combination; synergistic effect; RNA dependent RNA polymerase

收稿日期: 2025-02-10; 修回日期: 2025-04-03.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81971950); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-038).

*通讯作者 Tel: 86-10-63037279, E-mail: shancen@imb.pumc.edu.cn; jingwang@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0119

流感病毒属于正黏病毒科, 是一种单股负链RNA病毒, 可引起急性呼吸道传染病。流感病毒具有高传染性和致病性, 每年全球导致约300万～500万重症病例, 29万～65万死亡, 给人类健康带来严重威胁[1]。

抗流感病毒药物是应对季节性流感的重要手段。现有药物主要靶向M2离子通道蛋白、神经氨酸酶(NA)、RNA依赖的RNA聚合酶(RdRp)复合物。由于流感病毒基因组容易发生突变, 所以单靶点抗流感药物易引发耐药性问题。目前, 新上市抗流感药物玛巴洛沙韦(baloxavir marboxil)已经在多个国家和地区获得许可[2], 其通过抑制帽依赖性核酸内切酶活性, 来阻断病毒mRNA的转录[2,3]。尽管上市时间不长, 但研究人员在玛巴洛沙韦治疗的患者体内发现耐药性病毒突变株(PA-I38T等)。这些耐药性突变降低了流感聚合酶酸性蛋白(polymerase acidic protein, PA)对玛巴洛沙韦的敏感性, 导致疗效显著降低[4-6]。随着流感病毒变异和耐药性的加剧, 单一药物疗法的局限性逐渐凸显, 因此迫切需要开发新的抗病毒策略和新型药物以应对耐药病毒株的出现。

联合用药成为提升疗效、延缓耐药的重要策略[7-9]。目前, 抗流感药物联用的研究聚焦于不同作用机制的多靶点协同作用以及中西药协同抑制病毒复制和调节免疫等方面, 但主要还是针对抗流感上市药物之间或与临床/临床前药物的联用[10], 对于新型靶点药物的联用发现以及药物协同作用机制的探索还较少。因此, 本研究通过玛巴洛沙韦与FDA上市及药典收录化合物库中的近3 000个化合物进行药物联用的高通量筛选, 发现新的抗流感药物组合并对其药物协同作用机制进行初步探索, 以期为优化抗流感策略提供理论依据。

材料与方法

细胞、病毒与试剂 人胚肾上皮细胞293T(ATCC); 293T衍生细胞系293T-Gluc细胞[11], 为实验室自有并保存于液氮罐中, 使用DMEM高糖培养基(含有10% FBS, 1%青霉素、链霉素)培养; 流感毒株A/WSN/33由8质粒系统拯救产生, 并扩增于犬肾上皮细胞(MDCK细胞); 玛巴洛沙韦(货号: HY-109025)、奥司他韦酸(货号: HY-13318)、氢奎宁(货号: HY-42034)、盐酸曲普利啶(货号: HY-B1301)、美克西酮(货号: HY-B1023)、FDA上市及药典收录化合物库(货号: HY-L066)购自于美国MedChemExpress公司; CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号: 40203ES92)、腔肠素h(货号: 50909-86-9)购自上海翌圣生物科技有限公司; 流感病毒蛋白PA抗体(货号: GTX125932)、NP抗体(货号: GTX636282)购自美国GeneTex公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号: DL101)购自南京诺唯赞公司。β-actin一抗(货号: 4967)购自美国Cell Signaling Technology公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(货号: ZB-2305)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(货号: ZB-2301)购自北京中杉金桥公司。

质粒 甲型流感病毒(IAV) 8质粒反向遗传系统获赠于Dr. Robert G. Webster[12], 分别为: pHW181-PB2、pHW182-PB1、pHW183-PA、pHW184-HA、pHW185-NP、pHW186-NA、pHW187-M、pHW188-NS。pFlu-luc质粒为实验室之前构建[13]。

仪器 蛋白凝胶电泳仪、蛋白凝胶转膜仪、蛋白凝胶成像仪ChemiDoc™ MP全能型成像分析系统购自美国Bio-Rad公司; 微孔板式化学发光仪Centro LB 963购自于德国Berthold公司; Synergy™NEO2购自美国BioTek公司。

化合物抗流感病毒活性检测 根据之前的文献[11]报道, 将化合物溶解于DMSO中并进行梯度稀释, 293T-Gluc细胞接种于96孔板中, 每孔4×10^4个, 100 μL体系, 于37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育24 h后, 将流感病毒以病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为0.05均匀感染细胞, 并将1 μL待测化合物加入到细胞中, 每种浓度设置5个复孔。感染体系内含TPCK-trypsin, 终浓度为1 μg·mL^{-1}。感染24 h后, 吸取10 μL细胞上清测量Gaussia荧光素酶活性。每组实验都设置阳性对照组(未感染病毒, 溶剂DMSO处理)和阴性对照组(感染病毒, 溶剂DMSO处理)。抑制率 = (阴性对照组−样品组) / (阴性对照组−阳性对照组) ×100%, 利用GraphPad Prism软件通过拟合曲线计算药物的半数有效浓度(half maximal effective concentration, EC_{50})值。

Gluc活性检测 采用之前的测定方法测定Gluc荧光素酶活性[14]。用无水乙醇将coelenterazine-h溶液溶解至1.022 mmol·L^{-1}, 临用前用PBS稀释至16.7 μmol·L^{-1}, 室温避光孵育30 min。将细胞上清加入白色不透明96孔板孔中, 加入稀释的coelenterazine-h工作液, 通过Berthold Centro XS3 LB 963微孔板光度仪测定荧光强度。

细胞毒性检测 CCK-8是目前常用于细胞增殖和毒性分析的方法, 使用CCK-8方法评价化合物在293T或293T-Gluc细胞上的细胞毒性。根据试剂盒说明书, 将293T或293T-Gluc细胞铺板于96孔板中过夜培养至单层, 加入浓度梯度稀释的化合物, 孵育24 h后, 每孔加入10 μL CCK-8试剂并于37 ℃、5% CO_2条件下孵

育 1 h, 在多功能酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度。

抗流感药物联用协同分析 两种化合物组合抗病毒活性根据单一化合物活性测定方案进行实验。根据化合物抗病毒活性 EC_{50} 浓度及半数细胞毒性浓度 (cytotoxic concentration 50%, CC_{50}) 制定浓度稀释范围, 通过两种化合物 6×6 浓度梯度矩阵来测定两种化合物联用的抗流感病毒活性。同时使用 CCK-8 方法评估药物联用毒性相互作用。通过 SynergyFinderPlus[15] (www.synergyfinderplus.org) 网站来分析两种药物组合的联合协同作用, 并以零交互作用函数 (zero interaction potency, ZIP) 模型作为分析药物协同的参考模型[16]。对于阳性对照玛巴洛沙韦与奥司他韦酸联用的抗病毒活性测定依据如下实验方案进行。首先用 IAV/WSN/33 病毒 (200 $TCID_{50}$) 感染 MDCK 细胞。1 h 后使用 PBS 清洗, 更换新鲜无血清培养基, 加入药物组合, 24 h 后吸取细胞上清感染 293T-Gluc 细胞, 通过检测 Gluc 的表达水平来测定组合效果, 同时收集细胞通过 Western blot 检测流感病毒蛋白的表达水平。

蛋白免疫印迹 在细胞培养孔板中进行转染或感染实验后, 通过预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞后, 离心收集细胞沉淀, 加入 1×SDS 上样缓冲液裂解细胞提取总蛋白并于 100 ℃金属浴中加热 10 min。取蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 用抗 IAV PA、NP 抗体 (1∶4 000)、抗 β-actin (1∶5 000) 抗体 4 ℃孵育过夜后, 进行辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联的二抗 (1∶5 000) 孵育, 通过化学发光法在凝胶成像仪上曝光成像, 检测流感病毒蛋白 NP、PA 以及细胞内参蛋白 β-actin 等的表达。

Mini-replicon 实验 将 293T 细胞 (每孔 2×10^5 个细胞) 接种在 24 孔板中并在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养过夜。用表达萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 的 pFlu-luc (100 ng) 和 pHW181-PB2 (100 ng)、pHW182-PB1 (100 ng)、pHW183-PA (100 ng)、pHW185-NP (100 ng) 以及表达海肾荧光素酶 (renilla luciferase) 的 pRL-SV40-C (10 ng) 共转染细胞。转染后 6 h, 加入测试化合物。48 h 后, 在 Berthold Centro XS3 LB 963 上用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测报告基因活性。以溶剂 DMSO 为阴性对照, 计算测试化合物的抑制率[17]。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.3 软件以可变斜率进行非线性回归分析后, 基于在模拟感染细胞上获得的活力/死亡曲线计算每种化合物的 CC_{50}。通过使用四参数 (4PL) 逻辑函数 $f(x)$ 拟合药物剂量−反应曲线, 基于对药物抑制率的分析, 计算出 EC_{50}。

结果

1 Baloxavir marboxil 联用候选化合物的发现

利用本课题组已建立成熟的基于 293T-Gluc 细胞系的甲型流感病毒抑制剂筛选系统[11], 对 FDA 上市及药典收录化合物库 (HY-L066) 中的 3 281 个化合物进行抗甲型流感病毒 A/WSN/33 活性检测。以利巴韦林为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 计算抑制率。图 1A 显示了抑制率在−50%～100% 的化合物筛选结果。鉴于玛巴洛沙韦在 293T-Gluc 报告基因系统中抗流感毒株 A/WSN/33 的 EC_{50} 值为 29.31 nmol·L^{-1}, 本研究以 20 nmol·L^{-1} 玛巴洛沙韦与该化合物库的药物进行联用筛选, 图 1B 显示了化合物与玛巴洛沙韦联用后流感病毒抑制率在−50%～100% 的筛选结果。

根据与文献[18]报道的相似思路, 本研究通过计算药物抑制流感病毒复制的倍数变化来评价化合物与玛巴洛沙韦的联用效果, 即将药物抑制率 (inhibition rate) 转换为抑制倍数 (inhibition ratio), 公式为 inhibition ratio = 1/(100%−x) (其中 x 为 inhibition rate)。将单药筛选中化合物的抑制倍数设为 inhibition ratio A, 联用筛选的抑制倍数设为 inhibition ratio B, 计算两轮筛选的抑制倍数比 inhibition ratio B/A, 并按照该值大小对化合物进行排序, 排名前 15 个化合物如表 1 所示。Inhibition ratio B/A 值越大, 提示药物与玛巴洛沙韦发挥协同作用的可能性越高。同时, 通过结合文献综合比较 15 个化合物适应症及细胞毒性, 以及观察到的化合物与玛巴洛沙韦联用后的致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 程度, 挑选了 3 个化合物即氢奎宁 (hydroquinine)、曲普利啶 (triprolidine)、美克西酮 (mexenone) 作为候选药物, 用于与玛巴洛沙韦联用的进一步研究。

2 玛巴洛沙韦、美克西酮、曲普利啶、氢奎宁对甲型流感病毒 WSN/33 的抗病毒活性

利用上述 293T-Gluc 报告基因系统进一步测定这 4 种化合物单药 (玛巴洛沙韦、氢奎宁、曲普利啶、美克西酮) 抗流感病毒的 EC_{50}。通过拟合剂量效应曲线, 计算获得化合物玛巴洛沙韦、氢奎宁、曲普利啶、美克西酮的抗甲型流感病毒的 EC_{50} 值分别为 0.029、33.47、33.44 和 38.37 μmol·L^{-1} (图 2A)。同时利用 CCK-8 法检测这 4 种化合物在 293T-Gluc 上的细胞毒性, 通过拟合浓度反应曲线, 化合物玛巴洛沙韦、氢奎宁、曲普利啶、美克西酮的 CC_{50} 值分别为 202.34、254.84、233.26 和大于 200 μmol·L^{-1} (图 2B)。玛巴洛沙韦、氢奎宁、曲普利啶、美克西酮 4 个化合物的治疗指数 (therapeutic index, TI = CC_{50}/EC_{50}) 分别为 6 977.24、7.61、6.98、大于 5.21 (表 2)。上述实验结果表明, 阳性药物玛巴洛沙韦

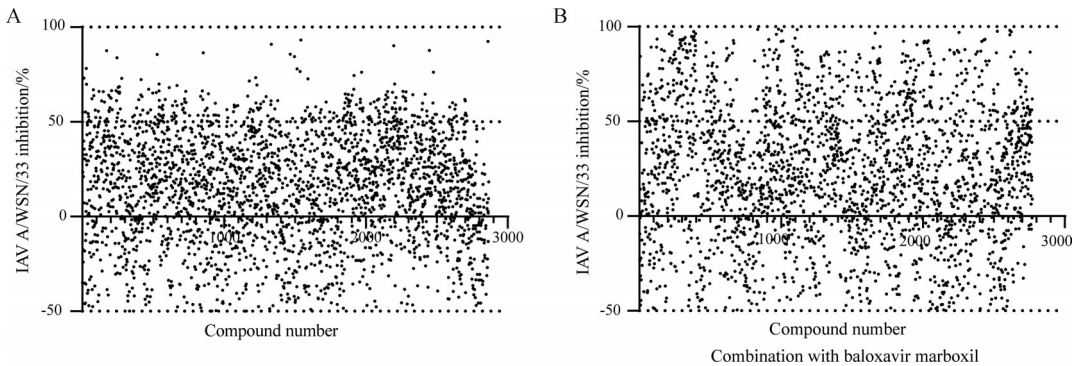


Figure 1 Screening of candidate compounds for combination with baloxavir marboxil. A: The inhibitory activities of the compounds (10 μmol·L^{-1}) against IAV A/WSN/33; B: The inhibitory activities of the compounds in combination with baloxavir marboxil against IAV A/WSN/33. IAV: Influenza A virus

Table 1 The candidate compounds with the highest rankings after screening and sorting

Product name	Inhibition rate/%	Inhibition ratio A	Com inhibition rate/%	Inhibition ratio B	Inhibition ratio B/A
DMSO	0	1.00	26.42	1.36	1.36
Saquinavir (mesylate)	43.71	1.78	81.21	5.32	3.00
Triprolidine (hydrochloride monohydrate)	2.57	1.03	66.80	3.01	2.93
Hydroquinine	10.26	1.11	68.81	3.21	2.88
Phentolamine (mesylate)	3.96	1.04	65.65	2.91	2.80
Ajmalicine	−21.36	0.82	55.36	2.24	2.72
Mexenone	3.94	1.04	63.15	2.71	2.61
Prednisolone acetate	22.80	1.30	69.96	3.33	2.57
Orbifloxacin	−21.25	0.82	52.79	2.12	2.57
Exemestane	68.41	3.17	87.49	7.99	2.53
Orotic acid	−4.47	0.96	58.52	2.41	2.52
Lercanidipine (hydrochloride)	33.45	1.50	72.96	3.70	2.46
Pirmenol (hydrochloride)	−0.57	0.99	58.87	2.43	2.45
Grazoprevir	17.85	1.22	65.99	2.94	2.42
Vilanterol	50.26	2.01	78.59	4.67	2.32

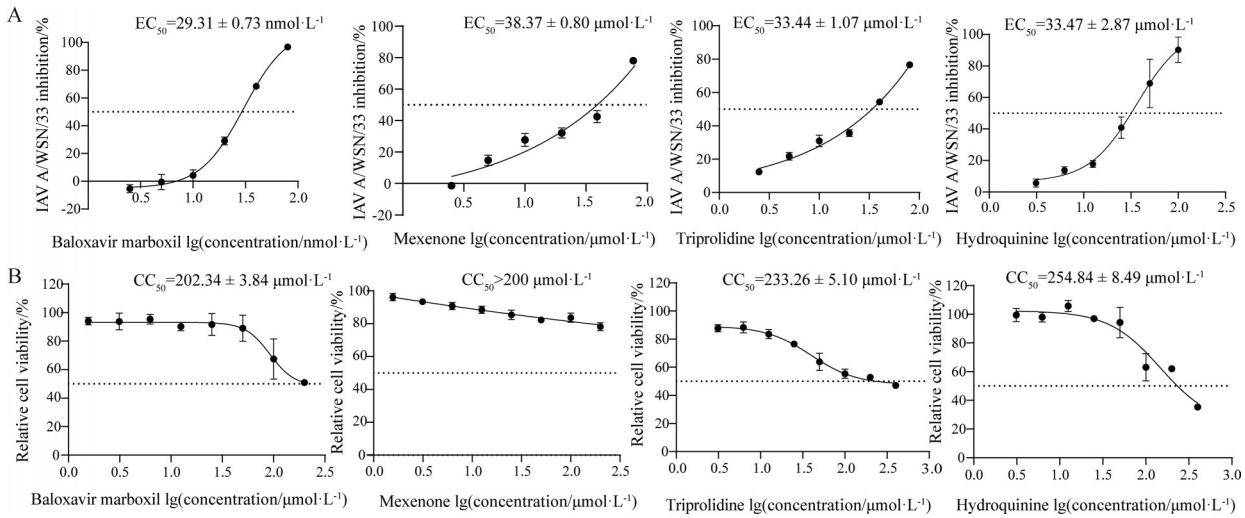


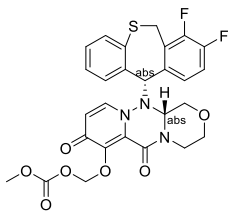
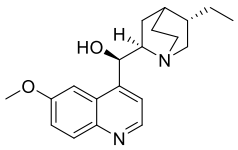
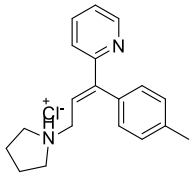
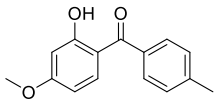
Figure 2 Dose-response curves (EC_{50} and CC_{50}) for the 4 compounds, namely baloxavir marboxil, mexenone, triprolidine, and hydroquinine. A: EC_{50} values; B: The CC_{50} values were measured with CCK-8 kit. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. EC_{50}: Half maximal effective concentration; CC_{50}: Cytotoxic concentration 50%

有良好的抗病毒活性, 另外3种化合物具有较弱的抗流感病毒活性, 且在活性浓度范围内, 对细胞没有明显的毒性作用。

3 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用的抗流感病毒的协同模型评价

本研究进一步检测玛巴洛沙韦与这3种化合物是

Table 2 Structure, properties, and antiviral activities of 4 compounds against IAV A/WSN/33. TI: Therapeutic index

Structure	Compound name	Cas No.	Formula	IAV EC_{50}/μmol·L^{-1}	CC_{50}/μmol·L^{-1}	TI (CC_{50}/EC_{50})
	Baloxavir marboxil	1985606-14-1	$C_{27}H_{23}F_2N_3O_7S$	0.029	202.34	6 977.24
	Hydroquinine	522-66-7	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	33.47	254.84	7.61
	Triprolidine hydrochloride monohydrate	6138-79-0	$C_{19}H_{23}ClN_2$	33.44	233.26	6.98
	Mexenone	1641-17-4	$C_{15}H_{14}O_3$	38.37	>200	>5.21

否存在协同抗甲型流感病毒作用。对于药物组合研究, 通常的实验设计为测量各种药物浓度组合的剂量效应, 产生用于计算和拟合的数据结果, 研究不同浓度组合的药物相互作用[19]。二维矩阵测定法, 也称为棋盘格测定法, 通过稀释化合物为不同浓度进行棋盘格测定活性, 是评估两种药物之间相互作用的常用方法。由于巴洛沙韦与神经氨酸酶抑制剂 (NAIs) 的联用已经有文献[20,21]报道, 本研究使用玛巴洛沙韦与奥司他韦酸的联用作为协同作用评价的阳性对照。依据文献[20,21]报道设定化合物浓度梯度以及病毒感染量, 获得两药联用的抗病毒活性数据 (图3A)。

SynergyFinderPlus是一个用于分析药物组合剂量反应数据的工具, 它提供了网站和R包, 并集成了4种参考模型用于药物组合相互作用的评价[15]。两种药物相互作用的结果可以通过几种参考模型之一计算并给出得分。本研究利用SynergyFinderPlus (www.synergyfinderplus.org) 网站, 将ZIP模型作为分析药物协同的参考模型[16], 通过比较单个药物和它们的组合之间的剂量−反应曲线的效价变化来捕捉药物相互作用关系, 并使用Delta分数来量化与零相互作用期望的偏差, 并保持了较低的假阳性率。通过对图3获得的玛巴洛沙韦与奥司他韦酸两药联用数据进行模型分析, 结果如图3B所示, 阳性化合物组合联用得分为11.75, 表明这两种药物具有协同抗IAV活性, 与文献[20,21]报道一致。

本研究利用该协同模型对玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用的协同效果进行评价。根据3种化合物的EC_{50}, 实验设立玛巴洛沙韦浓度梯度为50、25、12.5、6.25、3.125 nmol·L^{-1}, 其他3种化合物浓度梯度为40、30、20、10、5 μmol·L^{-1}, 并以溶剂DMSO作为浓度0的6×6浓度矩阵, 利用与单药检测相同的条件来测定化合物组合对IAV WSN/33的协同活性。同时, 使用CCK-8法评价在不感染病毒时化合物组合在细胞水平的毒性作用 (图4)。通过对图4获得的两药联用数据进行模型分析, 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁的联用得分分别为10.96、17.14、12.61 (图5)。协同得分可以解释为药物相互作用导致的平均过量反应。通常, 协同得分大于10表明两种药物之间的相互作用可能是协同的[22]。实验结果表明, 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用得分均大于10, 表明这3种药物组合很可能具有协同作用。同时, 化合物联用在测试浓度范围内也没有观察到细胞毒性作用, 可以排除药物联用毒性的影响 (图4)。

4 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用对甲型流感病毒复制的影响

本研究进一步确认玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用对甲型流感病毒复制的影响。通过浓度矩阵中显示的具有较强联用活性区域的浓度组合, 进行单药及联合给药, 在293T-Gluc细胞水平上检测化合物和化合物组合对病毒蛋白表达的影响。浓度

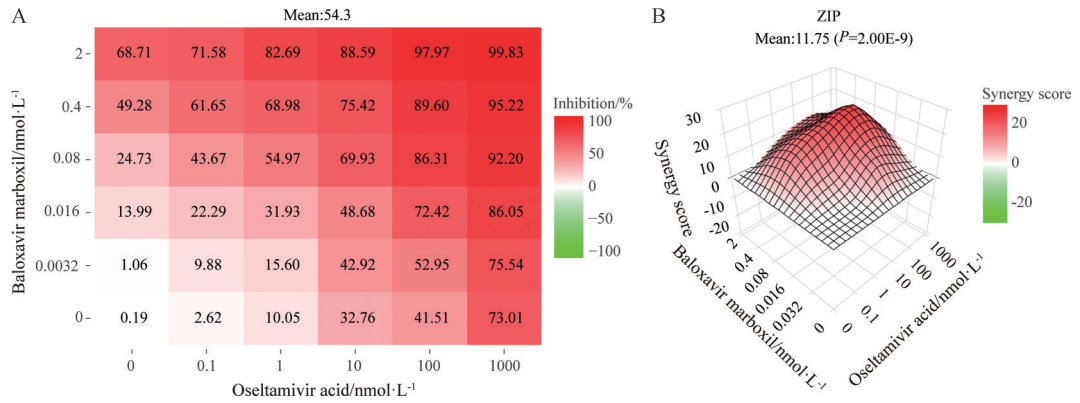


Figure 3 Evaluation of the pharmacological interactions of oseltamivir acid and baloxavir marboxil. A: Matrix blocks from oseltamivir acid and baloxavir marboxil were shown; B: Zero interaction potency (ZIP) reference model was used to assess the interaction landscapes and to identify areas of synergy. Interaction surfaces are colour-coded according to the synergy scores of the responses. $n = 3, \bar{x} \pm s$

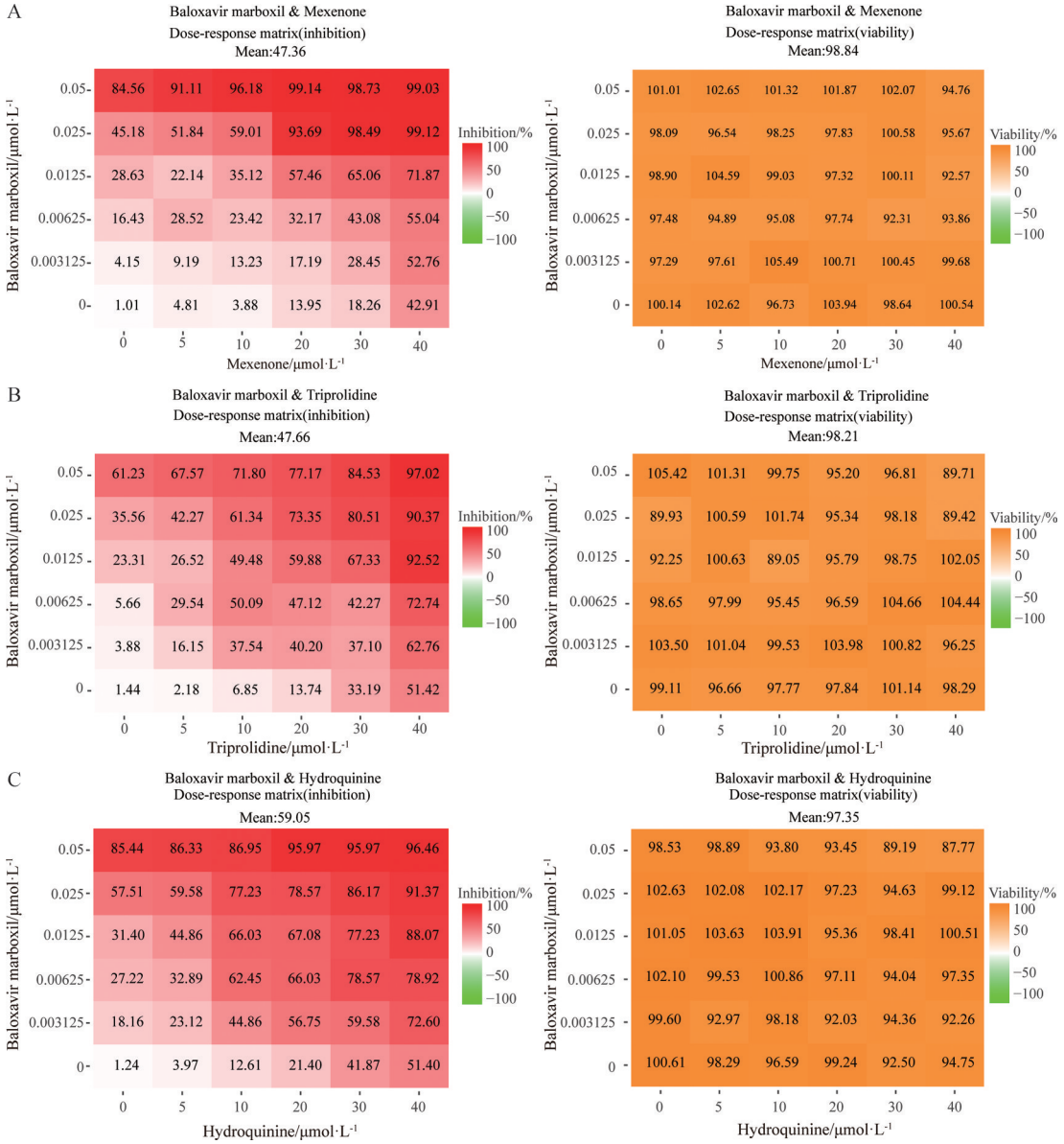


Figure 4 Matrix blocks from baloxavir marboxil + drugs in inhibition assay and viability assay. A: Mexenone; B: Triprolidine; C: Hydroquinine. $n = 3, \bar{x} \pm s$

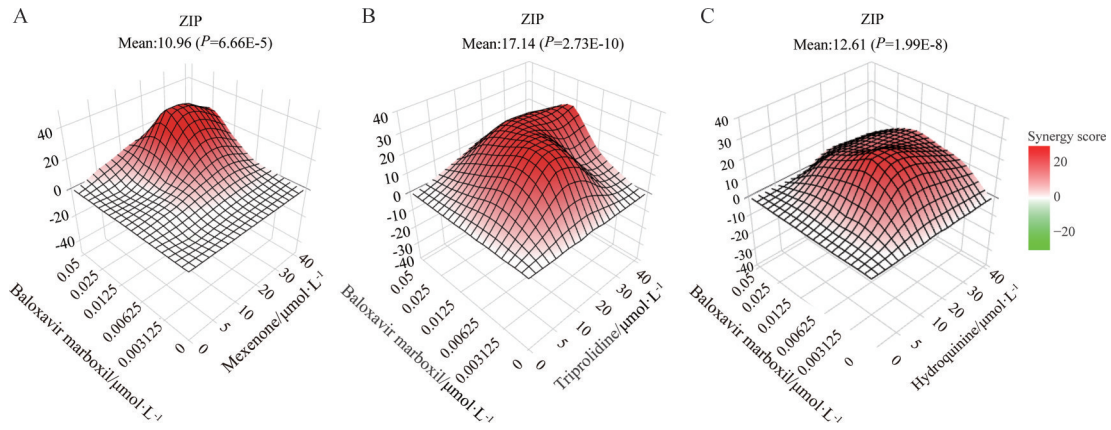


Figure 5 Evaluation of the pharmacological interactions of compounds and baloxavir marboxil. A: Mexenone; B: Triprolidine; C: Hydroquinine. ZIP reference model was used to assess the interaction landscapes and to identify areas of synergy. Interaction surfaces are colour-coded according to the synergy scores of the responses

矩阵中, 联用活性最强的浓度组合显示在图4和5中红色区域, 本研究选择较低的联用浓度, 其中玛巴洛沙韦浓度选择25、12.5和6.25 nmol·L^{-1}, 其他3种化合物选择浓度为30、20和10 μmol·L^{-1}。Western blot实验结果如图6所示, 在氢奎宁与玛巴洛沙韦上述浓度组合中, 流感病毒PA和NP蛋白的表达水平均比单药更低, 氢奎宁在与低浓度玛巴洛沙韦 (6.25或12.5 nmol·L^{-1}) 联用时对流感病毒的抑制效果最为明显 (图6A、B)。在美克西酮与玛巴洛沙韦的联用组合中, 玛巴洛沙韦浓度为25 nmol·L^{-1}, 美克西酮的浓度为30、20 μmol·L^{-1}两个组合中表现出最为明显的协同抑制作用, 在其他较低浓度时, 化合物联用组合抑制流感蛋白表达效果均不显著 (图6C、D)。在曲普利啶与玛巴洛沙韦的联用组合中, 玛巴洛沙韦浓度为6.25 nmol·L^{-1}, 曲普利啶的浓度为20 μmol·L^{-1}时表现出较明显的协同抑制作用 (图6E、F)。阳性化合物组合在玛巴洛沙韦浓度为0.4、0.08 nmol·L^{-1}与奥司他韦酸浓度为100、10 nmol·L^{-1}时, PA蛋白水平显著降低, 两者具有明显的协同作用 (图6G)。上述结果表明, 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用能够进一步抑制甲型流感病毒复制。

5 玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁联用对流感病毒核糖核蛋白 (viral ribonucleoprotein, vRNP) 的抑制活性

玛巴洛沙韦是帽依赖性核酸内切酶抑制剂, 其靶向流感病毒的RdRp复合物中的PA亚基, 本研究将继续探究药物组合产生协同作用的机制。流感病毒复制子Mini-replicon系统通过在细胞中转染负责流感病毒RNA转录复制的各蛋白质粒 (PA、PB1、PB2和NP) 以及病毒基因组调控下的报告基因表达质粒, 来模拟IAV的转录复制过程, 细胞中报告基因活性可以反映IAV的复制子活性。本研究首先利用Mini-replicon系统检测玛巴洛沙韦与美克西酮、曲普利啶、氢奎宁的联用是否能够增强玛巴洛沙韦对IAV vRNP的抑制活性。实验结果表明, 玛巴洛沙韦单药抗IAV vRNP活性的EC_{50}为0.003 6 μmol·L^{-1}, 曲普利啶、氢奎宁的EC_{50}均大于100 μmol·L^{-1}, 对流感病毒复制子活性的抑制作用较弱。美克西酮在Mini-replicon系统中未显示出明显的剂量依赖性的抑制作用 (图7)。在确定单药的抗IAV vRNP活性之后, 本研究将3种化合物以10 μmol·L^{-1}的终浓度与玛巴洛沙韦进行联用测试, 阴性对照为玛巴洛沙韦与溶剂DMSO联用。根据文献[19], 与阴性对照相比, 化合物的剂量效应曲线在联用后会存在曲线的偏移, 曲线向右移动表明化合物之间可能存在拮抗作用, 曲线左移表明可能存在协同或相加作用, 取决于移动的程度。结果如图8所示, 曲普利啶、氢奎宁与玛巴洛沙韦联用后, 玛巴洛沙韦剂量效应曲线只有轻微的左移, 其中曲普利啶有微弱的抗IAV vRNP活性, 向左移动幅度更大一点, 表明玛巴洛沙韦与曲普利啶、氢奎宁联用在抗IAV vRNP活性上无明显协同作用, 只有一定的加和作用。而美克西酮结果与其单药IAV vRNP结果一致, 需要进一步的研究确证。

讨论

流感病毒是季节性流感的主要病原体, 历史上曾引发5次全球大流行, 对人类健康构成严重威胁。禽流感病毒在全球范围内的持续传播, 不仅对动物健康造成危害, 还对人畜共患疾病和大流行风险提出了严峻挑战[23]。尽管抗流感药物的研发不断推进, 但最新上市的药物玛巴洛沙韦因流感病毒的快速突变而面临耐药性问题[6,24]。在此背景下, 药物再利用 (drug repurposing) 和药物联用 (drug combination) 成为应对耐药

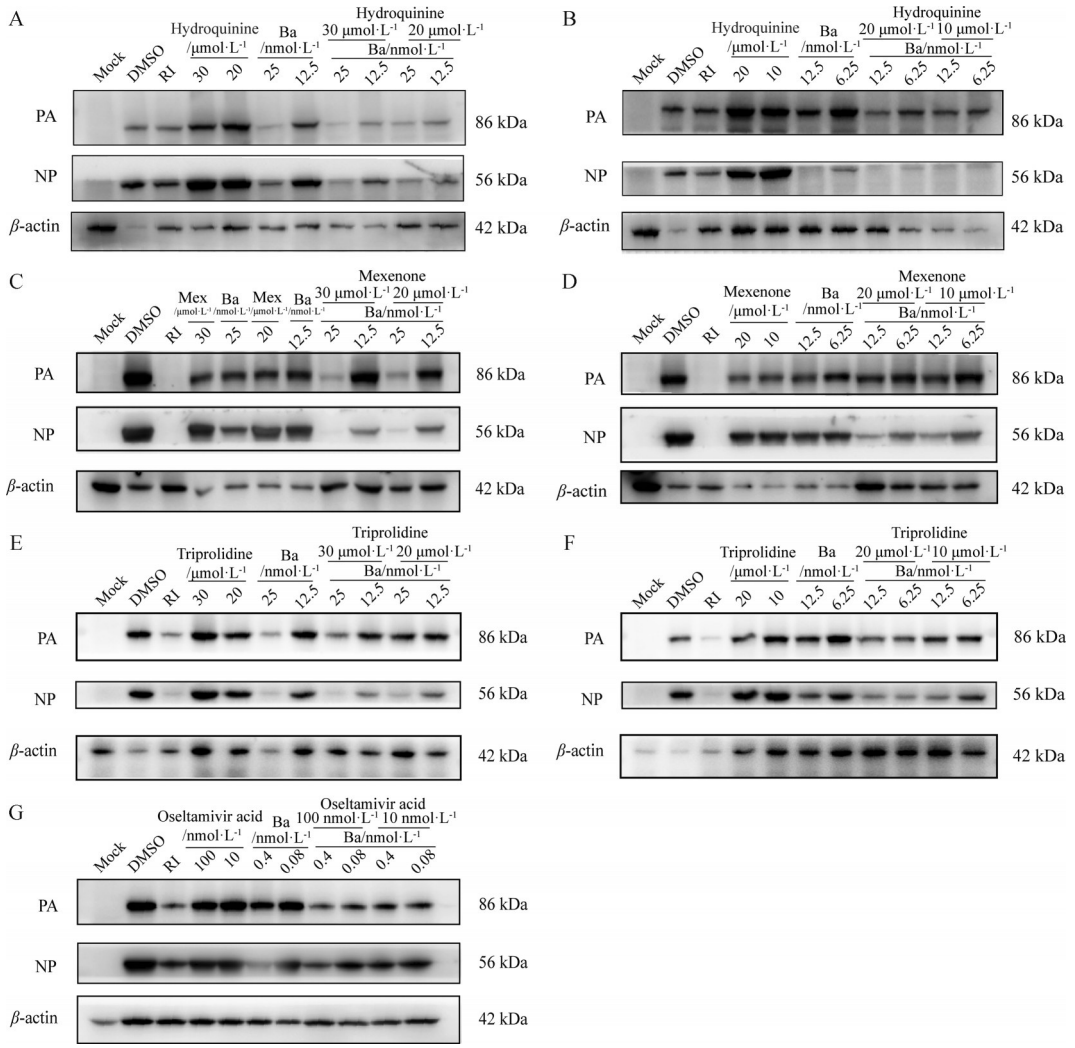


Figure 6 The effects of the inhibitor alone or combination on PA and NP protein levels. 293T-Gluc cells in 24-well plates were infected with A/WSN/33 (MOI 0.05) and treated with the indicated inhibitors. A, C and E: 30 and 20 μmol·L^{-1} hydroquinine (A), mexenone (C) or triprolidine (E) combined with baloxavir marboxil (25 and 12.5 nmol·L^{-1}); B, D and F: 20 and 10 μmol·L^{-1} hydroquinine (B), mexenone (D) or triprolidine (F) combined with baloxavir marboxil (12.5 and 6.25 nmol·L^{-1}); G: Combination of oseltamivir acid with baloxavir marboxil. Ribavirin and DMSO were used as the positive and negative controls, respectively. At 24 h post infection, cells were analyzed by Western blot using antibodies against IAV NP and PA protein. Cellular β-actin was used as a loading control. Molecular masses in kDa are indicated on the right. PA: Polymerase acidic protein; NP: Nucleoprotein

性和优化治疗效果的重要策略。药物再利用具有研发周期短、成本低、毒性低、作用机制明确等优势[25], 而药物联用则通过不同作用机制的协同作用, 能够更有效地抑制病毒复制并降低耐药风险[8,26]。

不同于以往大多数抗流感药物间或与免疫调节药物的联用研究, 本研究基于上述策略, 以发现新型靶点药物联用为目的, 选择FDA上市及药典收录化合物库(HY-L066)进行高通量筛选和验证, 发现曲普利啶、氢奎宁、美克西酮3种化合物与玛巴洛沙韦在细胞水平具有协同抗IAV的作用, 在药物联用浓度范围内未表现出细胞毒性。这些化合物组合能够显著抑制流感病毒复制, 为抗流感治疗提供了新的潜在方案。

初步机制研究表明, 3种化合物组合并未在IAV RdRp抑制活性上表现出协同作用, 提示其协同效应可能通过其他机制实现。进一步研究发现, 玛巴洛沙韦在抑制流感病毒蛋白表达方面效果显著, 且呈现浓度依赖性, 表明其在组合中起主导作用。由于目前尚无曲普利啶、氢奎宁和美克西酮抗流感病毒的直接研究报道, 本研究基于文献推测化合物组合产生协同作用可能的机制: 如美克西酮作为一种紫外线吸收剂, 最新研究发现其能够结合唾液酸酶-1[27], 并具有稳定内皮细胞屏障的功能[28], 这可能与其协同抗病毒作用相关。氢奎宁作为一种多功能离子通道阻滞剂, 可能通过抑制电压门控钾和钠通道活性与玛巴洛沙韦协同作

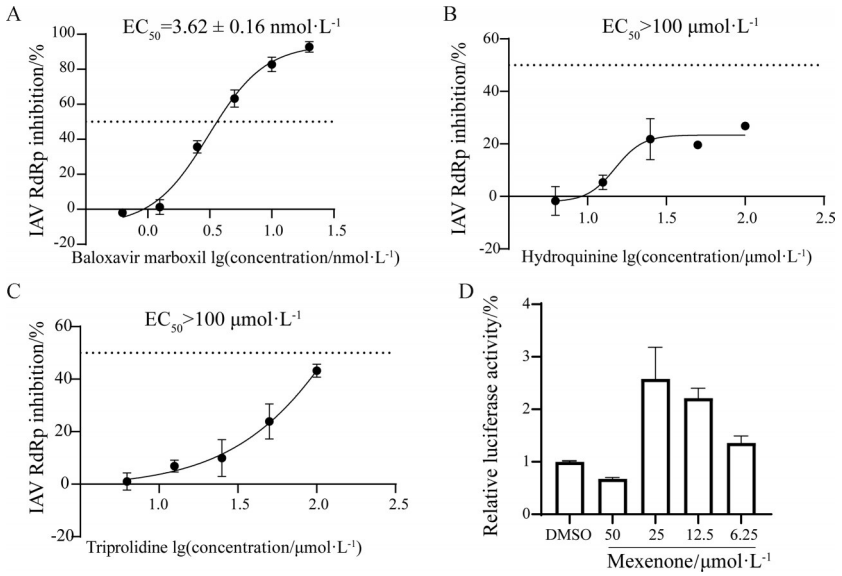


Figure 7 Dose-dependent inhibition of baloxavir marboxil (A), hydroquinine (B), triprolidine (C), mexenone (D) on IAV vRNP activity. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. vRNP: Viral ribonucleoprotein

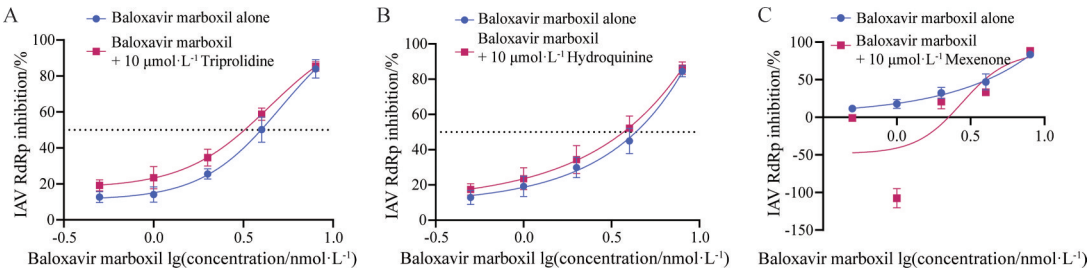


Figure 8 Dose-dependent inhibition of baloxavir marboxil combinations on IAV vRNP activity. A: Triprolidine; B: Hydroquinine; C: Mexenone. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

用[29]。曲普利啶作为组胺H1受体拮抗剂, 可能通过调节免疫反应或炎症过程间接影响病毒感染[30]。尽管如此, 这3种化合物与玛巴洛沙韦产生协同作用的具体机制仍不清楚, 后续本课题组将通过IAV时间添加等实验初步确定化合物联用的作用环节, 深入研究其可能的作用机制, 同时通过组学和网络药理学等多种研究手段进一步探索这3种化合物与玛巴洛沙韦的确切协同作用机制及关键信号通路。

值得注意的是, 2025年版《流行性感冒诊疗方案》明确建议避免联用相同作用机制的药物 (如两种RNA聚合酶抑制剂), 以防止毒性叠加和疗效不增。依据本研究采用的药物联用筛选策略, 所获得的筛选结果更多可能是通过不同机制发挥协同作用, 基本符合这一目标。然而, 本研究仍存在一些局限性: 首先, 未评估化合物组合对其他的甲型流感病毒毒株、乙型流感病毒及临床分离株的广谱抗病毒效果; 其次, 对玛巴洛沙韦耐药毒株的作用尚未明确; 此外, 研究主要集中于细胞水平, 缺乏动物模型或人源化类器官等更高层次的研究验证。尽管所研究化合物的药代动力学和安全性已有较多文献支持, 但将体外结果转化为临床应用仍面临重大挑战, 需进一步深入研究[31]。

综上所述, 本研究发现曲普利啶、氢奎宁和美克西酮与玛巴洛沙韦在细胞水平上具有协同抗甲型流感病毒的作用, 为抗流感药物联用研究提供了新的思路和理论依据。这一发现不仅拓展了玛巴洛沙韦的临床应用潜力, 也为应对流感病毒耐药性问题提供了可能的解决方案, 推动抗流感治疗策略的优化与创新。

作者贡献: 任永成负责实验操作、数据处理和文章撰写; 王静负责实验设计与数据分析; 岑山负责实验设计、研究课题监管、论文审阅与修改。所有作者阅读并认可终稿。

利益冲突: 本文中所有作者声明无任何利益冲突。

References

[1] Liang Y. Pathogenicity and virulence of influenza [J]. Virulence, 2023, 14: 2223057.

[2] Tejus A, Mathur AG, Pradhan S, et al. Drug update - baloxavir

marboxil: latest entrant into the arena of pharmacotherapy of influenza [J]. Med J Armed Forces India, 2022, 78: 125-130.

[3] Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, et al. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit [J]. Antiviral Res, 2018, 160: 109-117.

[4] Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil [J]. Sci Rep, 2018, 8: 9633.

[5] Govorkova EA, Takashita E, Daniels RS, et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018-2020 [J]. Antiviral Res, 2022, 200: 105281.

[6] Pascua PNQ, Jones JC, Webby RJ, et al. Effect of E23G/K, F36V, N37T, E119D, and E199G polymerase acidic protein substitutions on the replication and baloxavir susceptibility of influenza B viruses [J]. Antiviral Res, 2022, 208: 105455.

[7] Jones JC, Yen HL, Adams P, et al. Influenza antivirals and their role in pandemic preparedness [J]. Antiviral Res, 2023, 210: 105499.

[8] Batool S, Chokkakula S, Song MS. Influenza treatment: limitations of antiviral therapy and advantages of drug combination therapy [J]. Microorganisms, 2023, 11: 183.

[9] Zheng W, Sun W, Simeonov A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175: 181-191.

[10] Koszalka P, Subbarao K, Baz M. Preclinical and clinical developments for combination treatment of influenza [J]. PLoS Pathog, 2022, 18: e1010481.

[11] Gao Q, Wang Z, Liu Z, et al. A cell-based high-throughput approach to identify inhibitors of influenza A virus [J]. Acta Pharm Sin B, 2014, 4: 301-306.

[12] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 6108-6113.

[13] Wang Z, Wang X, He Z, et al. Establishment of drug screening assay and pharmacodynamic evaluation method targeting influenza RNA polymerase [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2012, 47: 1159-1163.

[14] Wang Z, Zhao F, Gao Q, et al. Establishment of a high-throughput assay to monitor influenza A virus RNA transcription and replication [J]. PLoS One, 2015, 10: e0133558.

[15] Zheng S, Wang W, Aldahdooh J, et al. SynergyFinder plus: toward better interpretation and annotation of drug combination screening datasets [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2022, 20: 587-596.

[16] Yadav B, Wennerberg K, Aittokallio T, et al. Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2015, 13: 504-513.

[17] Tang L, Yan H, Wu W, et al. Synthesis and anti-influenza virus effects of novel substituted polycyclic pyridone derivatives modified from baloxavir [J]. J Med Chem, 2021, 64: 14465-14476.

[18] Sun W, He S, Martínez-Romero C, et al. Synergistic drug combination effectively blocks Ebola virus infection [J]. Antiviral Res, 2017, 137: 165-172.

[19] Shyr ZA, Cheng YS, Zheng W. Drug combinations [M]//Comprehensive Pharmacology. New York: Elsevier, 2022: 789-812.

[20] Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, et al. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection [J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74: 654-662.

[21] Koszalka P, George A, Dhanasekaran V, et al. Effect of baloxavir and oseltamivir in combination on infection with influenza viruses with PA/I38T or PA/E23K substitutions in the ferret model [J]. mBio, 2022, 13: e0105622.

[22] Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50: W739-W743.

[23] Kang M, Wang LF, Sun BW, et al. Zoonotic infections by avian influenza virus: changing global epidemiology, investigation, and control [J]. Lancet Infect Dis, 2024, 24: e522-e531.

[24] Kiso M, Yamayoshi S, Kawaoka Y. Efficacy of favipiravir against influenza virus resistant to both baloxavir and neuraminidase inhibitors [J]. J Antimicrob Chemother, 2023, 78: 1649-1657.

[25] Schcolnik-Cabrera A, Juárez-López D, Duenas-Gonzalez A. Perspectives on drug repurposing [J]. Curr Med Chem, 2021, 28: 2085-2099.

[26] Calzetta L, Page C, Matera MG, et al. Drug-drug interactions and synergy: from pharmacological models to clinical application [J]. Pharmacol Rev, 2024, 76: 1159-1220.

[27] Klein JJ, Baker NC, Foil DH, et al. Using bibliometric analysis and machine learning to identify compounds binding to sialidase-1 [J]. ACS Omega, 2021, 6: 3186-3193.

[28] Choi YJ, An J, Kim JH, et al. Mexenone protects mice from LPS-induced sepsis by EC barrier stabilization [J]. PLoS One, 2024, 19: e0302628.

[29] Mazzanti A, Maragna R, Vacanti G, et al. Hydroquinidine prevents life-threatening arrhythmic events in patients with short QT syndrome [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70: 3010-3015.

[30] Simons KJ, Singh M, Gillespie CA, et al. An investigation of the H1-receptor antagonist triprolidine: pharmacokinetics and antihistaminic effects [J]. J Allergy Clin Immunol, 1986, 77: 326-330.

[31] Schloer S, Brunotte L, Mecate-Zambrano A, et al. Drug synergy of combinatory treatment with remdesivir and the repurposed drugs fluoxetine and itraconazole effectively impairs SARS-CoV-2 infection *in vitro* [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178: 2339-2350.