

· 研究论文 ·

沙粒病毒进入抑制剂体外药效学评价模型的建立

张晓雨, 唐克, 郭家梅, 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: 沙粒病毒是一类有囊膜的 RNA 病毒。以哺乳动物为宿主的沙粒病毒 (mammarenavirus) 中, 有 9 种可致人疾病, 其中 8 种可致人出血热。拉沙病毒 (Lassa virus, LASV) 感染人所致拉沙出血热 (Lassa hemorrhagic fever) 流行范围广, 有引发疾病大流行的可能, 因此拉沙病毒被列为第一类病原微生物。目前针对沙粒病毒的疫苗和药物极为有限。本研究应用重组病毒技术, 以 HIV-1 为核心, 共构建了以 9 种沙粒病毒外壳蛋白包裹的重组病毒 (arenavirus-GP/HIV-luc), 在考察了它们对 17 株人、猴、鼠及蝙蝠的不同组织来源细胞进入水平的基础上, 建立了沙粒病毒进入抑制剂药理活性评价模型, 并用工具药验证。本研究建立的重组沙粒病毒进入抑制剂体外药效学评价模型特异性好, 安全性高, 可在生物安全二级 (BSL-2) 实验室进行实验, 可为抗沙粒病毒药物和疫苗的活性评价提供技术平台, 促进针对沙粒病毒出血热的药物及疫苗的研发。

关键词: 沙粒病毒; 病毒性出血热; 假病毒; 进入抑制剂

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0735-08

Establishment of evaluation system for a cell-based arenavirus entry inhibitor

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

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

Abstract: Arenaviruses are enveloped RNA viruses. The genus mammarenavirus contains nine members that are known to be human pathogens, and eight of them cause human hemorrhagic fever. Lassa hemorrhagic fever, caused by Lassa virus (LASV) infection, is the most prevalent arenavirus hemorrhagic fever with potential to cause major epidemics. LASV belongs to category A agents, and biosafety level-4 (BSL-4) facility is required for live virus experiments. Currently there are few specific treatments available for arenavirus diseases. Here, we established efficient cell-based pseudovirus infection models using an HIV-1 core (pNL4-3.Luc.R⁻E) packed with arenavirus glycoproteins. Nine recombinant arenaviruses (arenavirus-GP/HIV-luc) were generated, and 17 cell lines were tested for susceptibilities to these viruses. These pseudovirus infection models were further validated by known arenavirus entry inhibitors. The models are safe and specific to pseudovirus infection, which are readily used for pharmacodynamic evaluation of arenavirus entry inhibitors in BSL-2 laboratory. The models will facilitate screening of the anti-arenavirus drugs and vaccines.

Key words: arenavirus; viral hemorrhagic fever; pseudovirus; entry inhibitor

收稿日期: 2018-01-08; 修回日期: 2018-01-29.

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”(2015ZX09102-023-004); 北京市科委全市成果转化统筹基金 (Z151100000115008); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-1-014).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0028

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性疾病，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。病毒学家根据沙粒病毒的地理分布和病毒血清学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) (图 1)。目前已知属于旧世界型的拉沙病毒 (*Lassa virus*, LASV) 和卢约病毒 (*Lujovirus*, LUJV), 及新世界型的胡宁病毒 (*Junin virus*, JUNV)、马丘波病毒 (*Machupo virus*, MACV)、沙比亚病毒 (*Sabiá virus*, SABV)、瓜纳瑞托病毒 (*Guanarito virus*, GTOV)、查帕雷病毒 (*Chaparé virus*, CHPV) 和白水阿罗约病毒 (*Whitewater Arroyo virus*, WWAV) 可致人出血热^[1-6], 他们被列为管制病原^[7]。这类活病毒实验需要在生物安全四级 (BSL-4) 实验室进行。沙粒病毒感染后潜伏期一般为 6~21 天, 患者在感染早期多出现流感样症状, 在感染晚期会出现休克及多器官系统功能衰竭, 部分患者 (10%~20%) 可伴随神经系统病变。拉沙病毒是流行程度最广、危害性最大的沙粒病毒, 主要流行于西非, 每年感染者达 10 万~30 万人, 死亡约 5 000 人^[2]。新世界型病毒中致出血热的几种沙粒病毒主要流行于美洲, 死亡率约 15%~30%^[1]。

沙粒病毒出血热属被忽视的热带病, 目前仅有针对胡宁病毒的减毒活疫苗 *Candid#1*, 注射该疫苗可显著降低胡宁出血热的发病率^[8, 9]。虽然也有关于抗沙粒病毒药物研发的报道, 如融合抑制剂 ST-294^[10]、ST-193^[11]、16G8、17C8^[12], 以宿主蛋白酶 SKI-1/S1P 为靶点的小分子 PF-429242^[13], 及作用于病毒复制环节或作用于 Z 蛋白的小分子^[14]等, 但这些小分子均在药物研发早期阶段。目前临床无抗沙粒病毒的特效治疗药物, 针对患者主要给予利巴韦林 (*ribavirin*)^[15] 及对症治疗控制病情的发展。

由于活沙粒病毒毒株不易获得, 且实验需要在 BSL-4 实验室进行, 这些因素限制了抗沙粒病毒药物的研发。因此, 建立安全并可在普通实验室操作的体外病毒感染模型将有助于抗沙粒病毒药物的研发。

沙粒病毒基因组为双义编码 RNA, 包括 S 和 L 两条链, L 编码基质蛋白 Z 和病毒 RNA 聚合酶 L; S 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^[5]。沙粒病毒进入宿主是病毒感染的第一步, 阻断病毒的进入可有效抑制病毒感染。

本研究即用 9 种沙粒病毒的包膜蛋白 GP 包裹

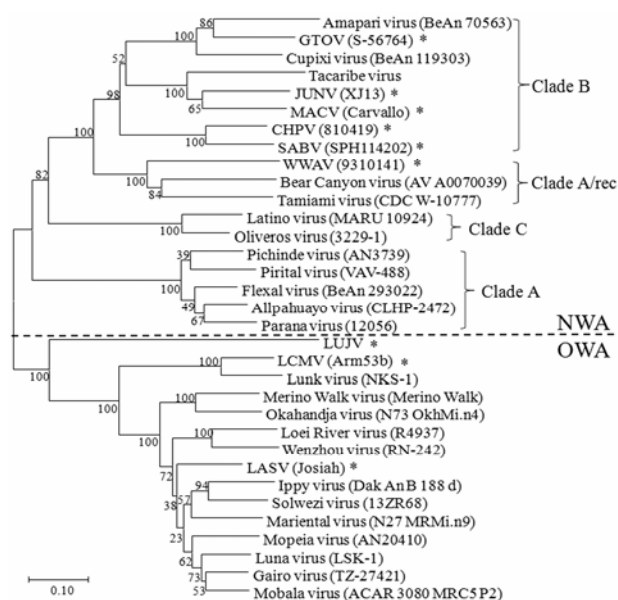


Figure 1 Phylogeny of mammarenavirus based on amino acid sequences of glycoprotein complex. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method with 1 000 bootstrap replications using MEGA 7.0 software; the bootstrap values are indicated at the nodes, and the scale bar indicates substitutions per site. Asterisks (*) denote lethal hemorrhagic fever viruses and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). Virus strains and their Genbank accession numbers are: Allpahuayo virus (CLHP-2472, YP_001649221.1); Amapari virus (BeAn 70563, YP_001649208.1); Bear Canyon virus (AV A0070039, AAX99345.1); CHPV (810419, YP_001816782.1); Cupixi virus (BeAn 119303, YP_001649222.1); Flexal virus (BeAn 293022, YP_001936019.1); Gairo virus (TZ-27421, YP_009116790.1); GTOV (S-56764, AAT72103.1); Ippy virus (Dak An B 188 d, YP_516230.1); JUNV (XJ13, ACO52428.1); LASV (Josiah, NP_694870.1); Latino virus (MARU 10924, YP_001936021.1); LCMV (Arm53b, AAX49341.1); LUJV (ACR56359.1); Luna virus (LSK-1, YP_004933730.1); Lunk virus (NKS-1, YP_006858706.1); MACV-GP (Carvalho, NP_899212.1); Mariental virus (N27 MRMi.n9, YP_009141003.1); Merino Walk virus (Merino Walk, YP_009019200.1); Mobala virus (ACAR 3080 MRC5 P2, YP_516226.1); Mopeia virus (AN20410, YP_170709.1); Okahandja virus (N73 OkhMi.n4, YP_009141005.1); Oliveros virus (3229-1, YP_001649210.1); Parana virus (12056, YP_001936017.1); Pichinde virus (AN3739, YP_138543.1); Pirital virus (VAV-488, YP_025080.1); SABV (SPH114202, YP_089665.1); Solwezi virus (13ZR68, BAU22152.1); Tacaribe virus (NP_694849.1); Tamiami virus (CDC W-10777, YP_001911115.1); Wenzhou virus (RN-242, YP_009113206.1); WWAV (9310141, AAN09950.1)

HIV 核心构建重组病毒 (arenavirus-GP/HIV-luc), 然后用所构建的 9 种重组病毒感染细胞, 建立高安全性的沙粒病毒体外感染模型, 并用工具药确认了所建立的模型可用于沙粒病毒进入抑制剂的活性评价。

材料与方法

质粒 9 个沙粒病毒 GP 基因 (LASV-Josiah GP, Genbank NC_004296.1, 1 476 bp; LCMV-Arm53b GP,

Genbank AY847350.1, 1 497 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) 经密码子优化后委托北京义翘神州生物技术有限公司合成, 所合成的基因克隆至 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。

细胞 人胚胎肾上皮细胞 HEK293T、人肝癌细胞 HepG2、人肺腺癌上皮细胞 A549、人肺支气管癌细胞 NCI-H1650、人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y、人脐静脉融合细胞 Ea.hy926、人急性 T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat、人组织细胞淋巴瘤细胞 U937、非洲绿猴肾细胞 VeroE6、叙利亚仓鼠肾细胞 BHK-21、中国仓鼠卵巢细胞 CHO、小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7、小鼠胚胎成纤维细胞 MEF、小鼠结缔组织 L 细胞株 929 克隆 L929、小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3、人小肠癌细胞 HIC 和蝙蝠肺细胞 Tb 1 Lu 取自国家实验细胞资源共享平台 (China Infrastructure of Cell Line Resource), 所有细胞按照说明书进行培养和传代。

试剂 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; jetPRIME[®]转染试剂购自 Polyplus transfection 公司; 兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体及 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒购自北京义翘神州生物技术有限公司; 小鼠抗 His-tag 单克隆抗体、小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司; 蛋白预染分子量标准购自 NEB 公司; 依法韦仑 (efavirenz) 购自 Sigma-Aldrich 公司; ST-193 购自 MCE 公司; 化合物 F3406-2010 及地昔帕明 (desipramine) 购自上海陶素生化科技有限公司。

重组病毒制备和病毒定量 转染前 24 h, 将 HEK293T 细胞以 4×10^6 细胞数接种于 10 cm 培养皿中, 按照 jetPRIME[®]转染试剂说明书将 HIV-luc 核心质粒 (pNL4-3.Luc.R E⁻) 分别与各沙粒病毒 GP 质粒或模型对照 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 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 获得 9 种重组沙粒病毒 (LASV-GP/HIV-luc、LCMV-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, 所获得的重组病毒用 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒定量。

LASV-GP 的检测 转染前 24 h, 将 HEK293T 细胞以 4×10^6 细胞数接种于 10 cm 培养皿中, 按照 jetPRIME[®]转染试剂说明书将 HIV-luc 核心质粒、VSV-G 质粒和羧基端含 $6 \times \text{His}$ 标签的 LASV-GP 质粒分别转染至 293T 细胞, 转染后 48 h, 弃去上清, 消化收集细胞, 裂解细胞, 制备蛋白样品用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用蛋白免疫印迹法检测 HEK293T 细胞中 LASV-GP 的表达 (一抗: 鼠抗 His-tag 单克隆抗体; 二抗: 辣根酶标记山羊抗鼠 IgG)。

重组病毒感染细胞 将被感染细胞按每孔 2×10^4 细胞数接种在 48 孔板中, 继续培养 24 h 后, 加入重组病毒液, 感染 48 h 后, 弃去上清, 裂解细胞, 用荧光素酶检测试剂盒测定细胞裂解液中的相对荧光素酶活性 (relative luciferase units, RLUs), 即病毒感染程度。

阳性药物验证 将 HEK293T 细胞按每孔 2×10^4 个接种在 48 孔板中, 并继续培养 24 h。感染前 10 min 将阳性药 (ST-193、F3406-2010、地昔帕明、依法韦仑) 加至细胞, 以等量 DMSO 作为溶剂对照, 再加入病毒 (每孔 0.2 ng HIV-1 p24)。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%, 计算加药孔的感染率。

计算 Z' 因子 按照 $Z' = 1 - [(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})]$ 公式^[16]进行计算, 其中 μ_{c-} 和 σ_{c-} 分别表示阴性对照组 (即 DMSO 溶剂组) RLUs 的平均值和标准差; μ_{c+} 和 σ_{c+} 分别表示阳性药对照组 (即 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ST-193 组) RLUs 的平均值和标准差。

数据分析及统计方法 用 GraphPad Prism 软件分析实验数据, 以浓度-感染率作散点图并用非线性拟合得到相关线、相关系数及半数有效浓度 (EC_{50})。

结果

1 重组拉沙病毒 LASV-GP/HIV-luc 感染模型的构建

LASV-GP/HIV-luc 是用 LASV 表面糖蛋白 GP 包裹 HIV 核心的重组病毒。LASV-GP 是病毒负责进入宿主细胞的唯一元件, 以三聚体的形式镶嵌于病毒表面。LASV-GP 首先以糖蛋白前体复合物 (glycoprotein precursor complex, GPC) 形式被合成, 然后由蛋白酶 SKI-1/S1P (subtilisin kexin isozyme-1/site-1

protease) 剪切为 GP1 和 GP2 亚基, 2 个亚基以非共价键连接, 其中 GP1 负责识别并结合宿主细胞表面受体, GP2 的主要功能是介导病毒与宿主溶酶体膜的融合过程。本研究检测了羧基端带 6×His 标签的 LASV-GP 质粒在真核细胞的表达, 结果显示 GPC (分子质量 75 kD) 和 GP2 (分子质量 37 kD) 正确表达 (图 2A)。将 LASV-GP 与 HIV 核心质粒共转染, 收集含有 LASV-GP/HIV-luc 病毒颗粒的上清并感染细胞, 被感染细胞表达荧光素酶。结果显示, 被 LASV-Josiah GP/HIV-luc 感染 48 h 后的 HEK293T 细胞中相对荧光素酶活性 (RLUs) 达到 1×10^7 , 信号值超过 HIV-luc 空白对照组 10 000 倍 (图 2B), 且具有病毒量-信号值剂量依赖关系 (图 2C)。

2 九种重组沙粒病毒 arenavirus-GP/HIV-luc 模型的构建

本研究针对所有 8 种致人出血热的沙粒病毒和致人病毒性脑膜炎的淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV), 构建了 9 种重组病毒, 其中旧世界沙粒病毒 3 种: LCMV、LASV 和 LUJV; 新世界沙粒病毒 6 种: MACV、GTOV、JUNV、SABV、WWAV 和 CHPV。用所构建的重组沙粒病毒感染 HEK293T 细胞, 结果显示, 旧世界沙粒病毒 LASV 和 LCMV 的感染信号值高于对照组 (HIV-luc) 10 000 倍, 旧世界病毒 LUJV 和新世界病毒 MACV、GTOV、JUNV、SABV、WWAV 的感染信号值高于对照组 1 000 倍, 新世界病毒 CHPV 信号值高于对照组 100 倍 (图 3)。本结果提示所构建的重组沙粒病毒可感染 HEK293T 细胞, 其中旧世界沙粒病

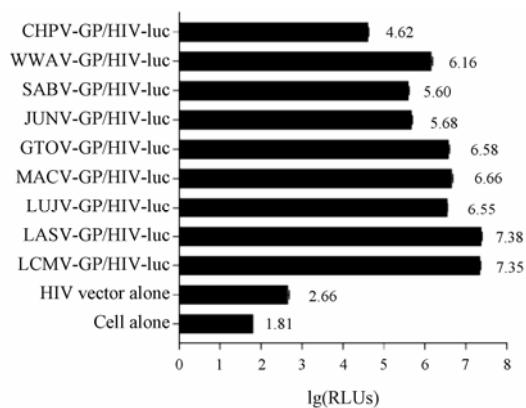


Figure 3 Infectivities of arenavirus pseudovirions on HEK293T cells. HEK293T cells were infected with arenavirus-GP/HIV-luc (12.5 ng HIV-1 p24/well). Cells were lysed and tested for luciferase activity 48 h post-infection

毒 LASV 和 LCMV 的感染力强于 LUJV 及新世界病毒 10~100 倍。

3 不同动物种属及组织来源细胞对重组沙粒病毒的易感性比较

囊膜病毒的外壳糖蛋白是介导病毒进入宿主细胞的唯一因子, 也是影响细胞对病毒易感性的重要因素。为了比较重组沙粒病毒的种属选择性和感染趋向性, 本课题研究了人、猴、鼠及蝙蝠的不同组织来源共 17 株细胞对 9 种重组沙粒病毒的易感性。结果显示, 17 种细胞均可被模型对照 VSV-G/HIV-luc 感染, $\lg(\text{RLUs}) > 4.00$, 说明 17 种细胞均支持病毒 HIV 核心的复制与表达; 本底对照 (HIV-luc) 在 17 种细胞中的信号值 $\lg(\text{RLUs}) < 3.00$, 说明缺失外壳糖蛋白的重组病毒无法进入宿主细胞启动 HIV 核心的复制与表

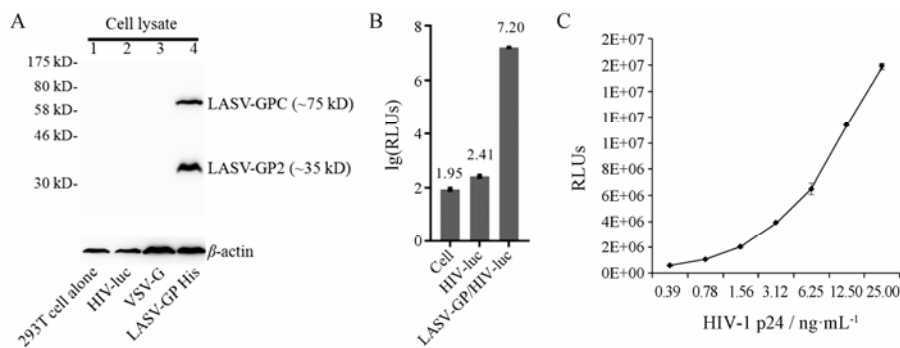


Figure 2 Establishment of LASV-GP/HIV-luc pseudovirions. A: Identification of LASV-GP expression. Lane 1: Blank, cell lysates of HEK293T cells alone; Lane 2, 3: Mock, cell lysates of HEK293T transfected with HIV-luc or VSV-G plasmid; Lane 4: Cell lysates of HEK293T transfected with LASV-GP-His plasmid. The plasmid, HIV-luc, VSV-G or LASV-GP-His, was transfected to HEK293T cells individually, 48 h post-transfection, cell lysates were collected and detected by Western blot. LASV-GP was detected by mouse anti-His monoclonal antibody, and the cellular β -actin expression was detected by mouse anti- β -actin monoclonal antibody. Bands indicate LASV-GPC (~75 kDa), LASV-GP2 (~37 kDa) and β -actin (43 kDa). B: Infectivity of LASV-GP/HIV-luc pseudovirions against HEK293T cells. The virions (15 ng p24/well) were incubated with HEK293T cells for 48 h, then the infected cells were lysed and tested for luciferase activity. C: The dose-signal curve of LASV-GP/HIV-luc infection. HEK293T cells were infected by indicated amount of LASV-GP/HIV-luc for 48 h, then the infected cells were lysed and tested for luciferase activity

达; 因此, 被感染细胞的相对荧光素酶活性 (RLUs) 可反映细胞对重组病毒的易感程度。本研究将细胞对沙粒病毒的易感程度以相对荧光素酶活性值进行分类: $\lg(\text{RLUs}) \geq 6.00$ 为易感; $4.00 \leq \lg(\text{RLUs}) < 6.00$ 为可感; $3.00 \leq \lg(\text{RLUs}) < 4.00$ 为不易感, 据此绘制热度图 (图 4)。

通过分析结果发现: ① 大多数人源细胞对旧世界沙粒病毒 LASV 和 LCMV 易感; 肺细胞 (A549) 对大多数新世界沙粒病毒易感; 人淋巴细胞 (U937 和 Jurkat) 对大多数沙粒病毒不易感。② 仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 对旧世界沙粒病毒 LASV 和 LCMV 易感, 其他啮齿动物细胞对 LASV 和 LCMV 不易感; 6 种啮齿动物来源细胞对大多数新世界沙粒病毒均不易感。③ 蝙蝠是多种病毒的天然宿主, 本研究首次全面评价了蝙蝠肺细胞 (Tb 1 Lu) 对沙粒病毒的易感性, 结果显示, 蝙蝠细胞可被除 JUNV 和 CHPV 外的 7 种重组沙粒病毒感染, 提示蝙蝠有作为沙粒病毒宿主的可能性。

4 沙粒病毒进入抑制剂药效学评价模型的确认

以囊膜病毒外壳糖蛋白包裹慢病毒核心的重组病毒可用于病毒进入抑制剂的发现, 该技术已应用于多种病毒^[17-20]。本研究将所构建的重组病毒应用于沙粒病毒进入抑制剂活性评价, 评价模型用已知工具药进行验证。

4.1 LASV-GP/HIV-luc 体外感染模型可用于化合物

抗拉沙病毒活性筛选 本研究以 LASV-GP/HIV-luc 为模型进行化合物筛选时, 以 VSV-G/HIV-luc 作为特

异性对照, 当化合物仅抑制 LASV-GP/HIV-luc, 而对 VSV-G/HIV-luc 无抑制作用时, 可认为化合物为特异性 LASV 进入抑制剂。

以 LASV 进入抑制剂 ST-193 为阳性对照药验证模型, 结果显示 ST-193 可抑制 LASV-GP/HIV-luc 感染, EC_{50} 为 $2.16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献^[11]报道一致, 而对 VSV-G/HIV-luc 的感染无抑制作用 (图 5A)。而 HIV 逆转录酶抑制剂依法韦仑^[21]对 LASV-GP/HIV-luc 和 VSV-G/HIV-luc 均可抑制, EC_{50} 为 0.61 和 $0.79 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 5B)。

Z' 因子是评估药物筛选模型质量的重要参数, 其理想值为 1。当 Z' 值大于 0.5 时, 通常认为该模型可用于高通量筛选。以 ST-193 (终浓度 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 为阳性对照组, 以等量 DMSO 为阴性对照组, 重复 25 次实验, 计算得到 Z' 因子为 0.75 ± 0.11 (图 5C)。上述结果表明本研究所建立的 LASV-GP/HIV-luc 感染细胞模型精确度及稳定性好, 可用于 LASV 进入抑制剂的高通量筛选。

4.2 应用阳性药物验证 8 种重组沙粒病毒模型

文献报道 ST-193 除可抑制 LASV 的进入外, 还对新世界沙粒病毒中的 MACV、GTOV、JUNV、SABV 有抑制活性^[11]。本研究使用 ST-193 对所构建的新世界重组沙粒病毒模型进行验证 (图 6A), 结果显示, ST-193 对新世界沙粒病毒的进入有抑制作用, EC_{50} (MACV: $1.12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, GTOV: $0.36 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, JUNV: $0.87 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SABV: $9.81 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与文献^[11]报道一致, 此外本研究发现 ST-193 对新世界沙粒病毒 WWAV 和

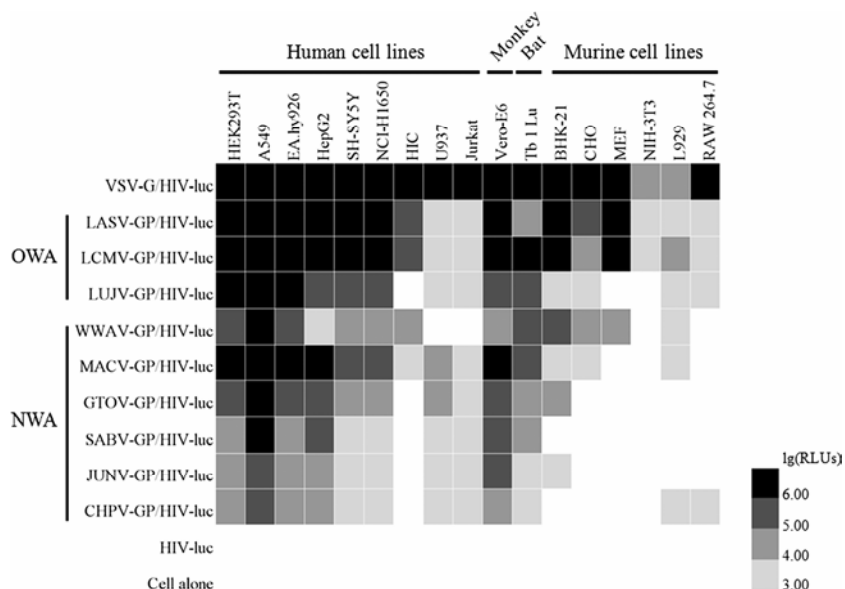


Figure 4 A heat map of arenavirus-GP/HIV-luc infectivity on 17 cell lines. Cells were infected with arenavirus-GP/HIV-luc, and cells were lysed and tested for luciferase activity 48 h post-infection

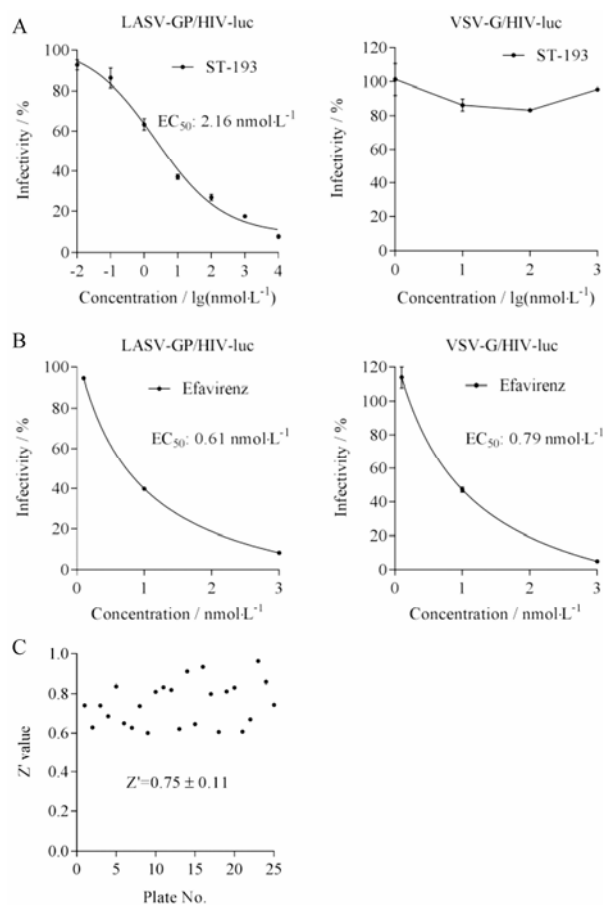


Figure 5 LASV-GP/HIV-luc pseudovirus infection model can be used for LASV entry inhibitors screening. Effect of ST-193 (A) or efavirenz (B) on LASV-GP/HIV-luc and VSV-G/HIV-luc infection. Compounds were added to 293T cells at indicated concentrations 10 min prior to infection. Cells were lysed 48 h post-infection, and the luciferase activity was measured. DMSO was used as a solution control and its infectivity was defined as 100%. C: Z' values calculated from the RLUs of ST-193 (100 nmol·L⁻¹) and DMSO on LASV-GP/HIV-luc infection. Data represents the Z' values from 25 independent experiments

CHPV 也有抑制活性, EC₅₀ 分别为 4.27 和 6.58 nmol·L⁻¹。

使用 LCMV 特异性抑制剂 F3406-2010 对 LCMV 重组病毒模型进行验证, 其 EC₅₀ (0.27 μmol·L⁻¹, 图 6B) 与文献^[22]报道一致; 使用已报道的 LUJV 抑制剂地昔帕明 (desipramine) 对 LUJV 病毒模型进行验证, 其 EC₅₀ (20.98 μmol·L⁻¹, 图 6C) 与文献^[23]报道一致。

上述结果表明, 本研究所构建的所有 9 种重组沙粒病毒模型均可应用于沙粒病毒进入抑制剂的活性评价。

讨论

啮齿类动物是沙粒病毒的自然宿主, 可携带并散播病毒, 但自身通常无病理表现。人接触携带病毒

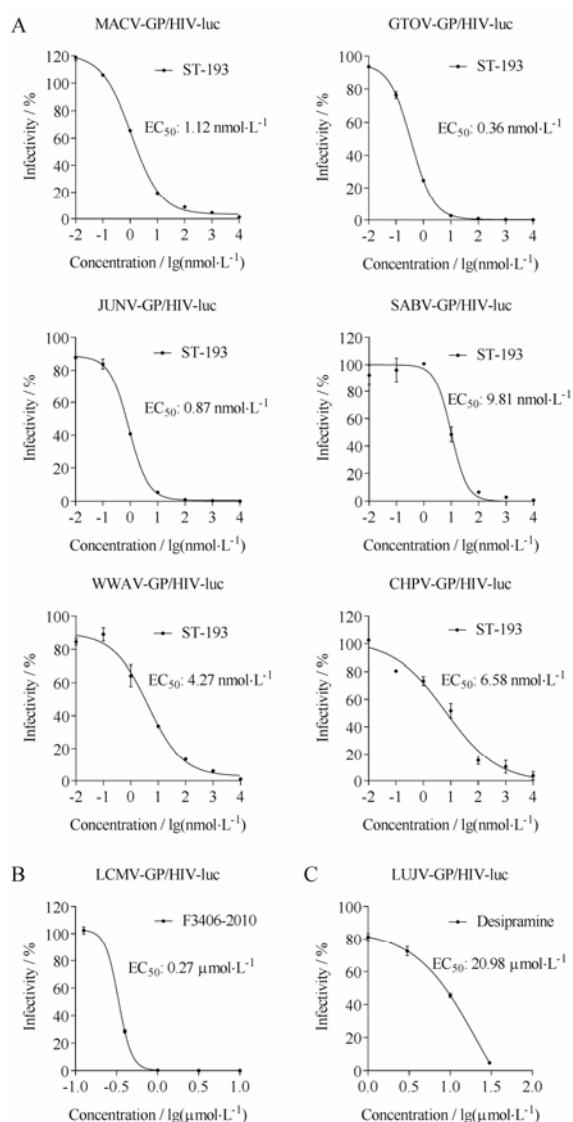


Figure 6 The arenavirus-GP/HIV-luc infection models were confirmed by tool compounds. A: Effect of ST-193 on six NW arenavirus-GP/HIV-luc infections. B: Effect of compound F3406-2010 on LCMV-GP/HIV-luc infection. C: Effect of desipramine on LUJV-GP/HIV-luc infection. Compounds were added to 293T cells at indicated concentrations 10 min prior to infection. Cells were lysed 48 h post-infection, and the luciferase activity was measured. DMSO was used as a solution control and its infectivity was defined as 100%

的鼠或其排泄物可被感染。沙粒病毒出血热患者早期临床症状包括发烧、不适、头痛、结膜炎、恶心、呕吐和腹泻等流感样症状; 感染晚期患者除发烧外, 还会有出血, 多器官功能衰竭和神经系统症状^[1]。用致死量 LASV 感染恒河猴, 在猴血清、肝、肺、肾、胰腺、淋巴和脑脊液中均可检测到病毒^[5]。沙粒病毒进入宿主细胞是病毒感染的的第一步, 阻断此过程可有效抑制沙粒病毒感染, 寻找沙粒病毒进入抑制剂是抗沙粒病毒药物研发的重要途径。本研究应用重

组病毒技术, 以沙粒病毒 GP 包裹 HIV-luc 核心组装获得重组病毒, 该病毒仅可单次感染宿主细胞, 特异性好、安全性高。应用重组病毒, 本研究针对人、猴、鼠及蝙蝠的不同组织来源细胞对沙粒病毒的易感性结果表明, 相较于天然宿主啮齿类动物细胞, 沙粒病毒对灵长类动物及人源细胞的感染性更强, 且组织趋向性更广, 这可能是沙粒病毒可致人疾病的原因之一。

蝙蝠是翼手目哺乳动物, 是多种病毒的天然宿主, 如 SARS^[24]、Ebola^[25]等。而哺乳动物沙粒病毒属中大部分病毒是从啮齿类动物中分离得到的, 目前所报道的沙粒病毒中只有塔卡里伯病毒 (Tacaribe virus, TCRV) 是从蝙蝠中分离得到^[1]。研究蝙蝠对沙粒病毒的易感性可有助于对沙粒病毒宿主趋向性和感染性的理解和预测。本研究首次报道了蝙蝠细胞对 9 种可致人疾病的沙粒病毒的易感性, 此结果不仅有助于对沙粒病毒致病性的理解, 而且对沙粒病毒的宿主选择性也提供了线索。

基于慢病毒的假病毒技术是研究囊膜病毒进入过程的经典方法^[17-20], 除研究病毒趋向性和宿主选择性外, 国际大型制药公司已将此项技术用于囊膜病毒进入抑制剂的筛选^[26]。虽然此技术也应用于拉沙病毒进入抑制剂的评价^[11], 但是, 针对除拉沙病毒外的其他致病沙粒病毒假病毒感染模型研究较少, 而本研究构建了所有 9 种人致病沙粒病毒假病毒感染模型, 并明确了此假病毒体系可用于沙粒病毒进入抑制剂的评价, 本研究结果在国内属首次报道。基于慢病毒的沙粒病毒感染细胞模型具有高安全性和特异性, 在 BSL-2 实验室即可进行实验, 将此模型应用于沙粒病毒进入抑制剂的筛选, 将有助于沙粒病毒进入的广谱抑制剂的研发, 为抗沙粒病毒药物的研发提供技术平台。

References

- [1] Sarute N, Ross SR. New world arenavirus biology [J]. *Annu Rev Virol*, 2017, 4: 141-158.
- [2] Coyle AL. Lassa fever [J]. *Nursing*, 2016, 46: 69-70.
- [3] Paweska JT, Sewlall NH, Ksiazek TG, et al. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1598-1602.
- [4] Delgado S, Erickson BR, Agudo R, et al. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000047.
- [5] Gunther S, Lenz O. Lassa virus [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41: 339-390.
- [6] Centers for Disease C, Prevention. Fatal illnesses associated with a new world arenavirus - California, 1999-2000 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2000, 49: 709-711.
- [7] Dept. U.S. Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories [M]. 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, USA, 2010: 246-265.
- [8] Enria DA, Briggiler AM, Sanchez Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever [J]. *Antiviral Res*, 2008, 78: 132-139.
- [9] Aguilar PV, Camargo W, Vargas J, et al. Reemergence of Bolivian hemorrhagic fever, 2007-2008 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1526-1528.
- [10] 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.
- [11] Larson RA, Dai D, Hosack VT, et al. Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor [J]. *J Virol*, 2008, 82: 10768-10775.
- [12] Lee AM, Rojek JM, Spiropoulou CF, et al. Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 18734-18742.
- [13] Hay BA, Abrams B, Zumbunn AY, et al. Aminopyrrolidoneamide inhibitors of site-1 protease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 4411-4414.
- [14] Radoshitzky SR, Kuhn JH, de Kok-Mercado F, et al. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7: 613-632.
- [15] Charrel RN, Coutard B, Baronti C, et al. Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals [J]. *Antiviral Res*, 2011, 90: 102-114.
- [16] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays [J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4: 67-73.
- [17] Guo Y, Rumschlag-Booms E, Wang J, et al. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza [J]. *Virol J*, 2009, 6: 39.
- [18] Cao YL, Guo Y. Screening of HIV-1 replication inhibitors by using pseudotyped virus system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 253-258.
- [19] Zhang C, Cao YL, Zhong W, et al. Establishment of a cell-based 2009 H1N1 influenza neuraminidase inhibitors evaluation system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 383-387.
- [20] 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.
- [21] Ford N, Mofenson L, Kranzer K, et al. Safety of efavirenz in first-trimester of pregnancy: a systematic review and meta-analysis of outcomes from observational cohorts [J]. AIDS, 2010, 24: 1461–1470.
- [22] Ngo N, Henthorn KS, Cisneros MI, et al. Identification and mechanism of action of a novel small-molecule inhibitor of arenavirus multiplication [J]. J Virol, 2015, 89: 10924–10933.
- [23] 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.
- [24] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses [J]. Science, 2005, 310: 676–679.
- [25] Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus [J]. Nature, 2005, 438: 575–576.
- [26] Basu A, Li B, Mills DM, et al. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses [J]. J Virol, 2011, 85: 3106–3119.