

## 阿兹夫定体外抗登革病毒活性研究

张春涛<sup>1,2</sup>, 罗荣华<sup>2</sup>, 陈欢<sup>2</sup>, 刘光明<sup>1</sup>, 常俊标<sup>3</sup>, 杨柳萌<sup>2\*</sup>, 郑永唐<sup>2\*</sup>

(1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南省活性多肽研究与利用重点实验室/中国科学院动物模型与人类疾病重点实验室, 云南 昆明 650223; 3. 河南师范大学, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 本文通过检测化合物对登革 II 型重组病毒 (DENV-II Luc<sup>+</sup>) 表达海肾荧光素酶活性的影响, 进行化合物筛选, 发现阿兹夫定 (azvudine, FNC)、盐酸阿兹夫定 (hydrochloride salt of azvudine, FNC-HCl) 和三磷酸阿兹夫定 (triphosphate azvudine, FNC-TP) 能够抑制 DENV-II Luc<sup>+</sup> 的复制, 并研究其体外抗登革病毒 (dengue virus, DENV) 活性。首先通过噬斑法检测 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 对 DENV 的抑制活性; 并通过蛋白印迹实验检测 3 种化合物对 DENV-II 囊膜蛋白 E (envelope protein E) 表达的影响, 最后通过实时定量 PCR 检测化合物对 DENV-II 病毒 RNA 的抑制作用。结果显示, FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 抑制 DENV 复制的半数有效浓度 (EC<sub>50</sub>) 在 0.54~25.42 μmol·L<sup>-1</sup> 之间, 阳性药物利巴韦林抑制 DENV-II 的 EC<sub>50</sub> 为 40.78±1.02 μmol·L<sup>-1</sup>。蛋白印迹实验及定量结果显示, 3 种化合物均能抑制 DENV-II 囊膜蛋白 E 的表达, 并且显著地抑制 DENV-II 病毒 RNA 的复制。通过 MTT 法检测发现 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 的细胞毒性很小, 半数细胞毒性浓度 (CC<sub>50</sub>) 均大于 3000.00 μmol·L<sup>-1</sup>。本研究表明 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 在细胞水平、蛋白水平及 RNA 水平均能抑制 DENV 的复制, 且抑制作用优于利巴韦林, 有望成为抗登革病毒的候选药物。

**关键词:** 阿兹夫定; 登革病毒; 抗病毒活性; 体外

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0944-06

## The study of azvudine activity against dengue viruses *in vitro*

ZHANG Chun-tao<sup>1,2</sup>, LUO Rong-hua<sup>2</sup>, CHEN Huan<sup>2</sup>, LIU Guang-ming<sup>1</sup>,  
CHANG Jun-biao<sup>3</sup>, YANG Liu-meng<sup>2\*</sup>, ZHENG Yong-tang<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Peptides of Yunnan Province/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; 3. Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** In this study, azvudine (FNC), hydrochloride salt of azvudine (FNC-HCl) and triphosphate azvudine (FNC-TP) were tested against DENV-II recombinant virus (DENV-II Luc<sup>+</sup>). The inhibitory activity of FNC, FNC-HCl and FNC-TP on DENVs were detected by plaque assay. The effect on the expression of DENV-II envelope protein E was detected by Western blot; the inhibitory of DENV-II viral RNA by compounds was detected by real-time quantitative PCR. MTT assay was used to determine the cytotoxicity of the three compounds on Vero cells. The results showed that FNC, FNC-HCl and FNC-TP inhibited the viral replication by inhibition of renilla luciferase activity of DENV-II Luc<sup>+</sup>. The 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) of FNC, FNC-HCl and FNC-TP in the inhibition of DENVs replication were from 0.54–25.42 μmol·L<sup>-1</sup>, while that of ribavirin was 40.78±1.02 μmol·L<sup>-1</sup> as the positive control. Western blot and real time quantitative PCR results showed that FNC, FNC-HCl and FNC-TP significantly inhibited the expression of DENV-II E protein, and the

收稿日期: 2018-03-21; 修回日期: 2018-04-08.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2016YFC1201000); 云南省重大科技专项计划课题 (2017ZF007).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn; lmyang@mail.kiz.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0245

replication of DENV- II viral RNA. The 50% cytotoxic concentrations of FNC, FNC-HCl and FNC-TP were all greater than 3 000.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The results suggest that *in vitro* anti-DENVs activities of FNC, FNC-HCl and FNC-TP are superior to ribavirin, which are expected to become new candidates of anti-DENV drugs.

**Key words:** azvudine; dengue virus; antiviral activity; *in vitro*

登革病毒 (dengue virus, DENV) 属于黄病毒科黄病毒属 (*Flavivirus*), 黄病毒属包括西部尼罗河病毒、蜱传脑炎病毒、基孔肯尼亚热病毒、黄热病病毒和日本脑炎病毒等。DENV 是单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 10.7 kb<sup>[1]</sup>, 编码 7 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白。其结构蛋白包括衣壳蛋白 C、前膜蛋白 prM 和囊膜蛋白 E, 非结构蛋白包括 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5 蛋白<sup>[2]</sup>。结构蛋白在形成病毒颗粒、与受体结合、病毒融合和病毒组装中起关键作用, 非结构蛋白负责病毒基因组的复制及逃逸宿主免疫反应。

DENV 主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊传播。据估计, 全球有 128 个国家大约 39.7 亿人有感染 DENV 的风险, 约占世界人口的一半<sup>[3]</sup>。近年来, 全球登革热的发病率急剧上升, 估计每年有 3.9 亿人口感染, 其中有 9 600 万人被确诊为严重程度不同的登革热 (dengue fever, DF)<sup>[4]</sup>。DENV 包括 4 种血清型 (DENV I ~ IV), 感染一种 DENV 血清型仅产生针对该血清型的特异性抗体。原发性 DENV 感染通常导致轻度登革热, 并为感染该病毒血清型提供终身免疫。然而, 由于不同血清型的病毒感染存在抗体依赖增强作用, 不同 DENV 血清型的继发感染增加了登革出血热 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 的风险, 还可能引起危及生命的登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS)<sup>[5]</sup>, 使得登革疫苗研发成为一大难题。2015 年末, 由赛诺菲巴斯德公司开发的首个登革热疫苗 Dengvaxia (CYD-TDV) 在菲律宾、巴西、墨西哥等国家注册, 供流行区的 9~45 岁居民使用<sup>[6]</sup>, 但该疫苗的安全性和有效性仍有待于观察研究。

至今尚无登革热的特效药物上市, 登革热患者仅能通过对症治疗缓解临床症状。迫切需要安全有效的抗 DENV 药物来减少登革病毒的发病率和死亡率, 研发新的抗 DENV 药物迫在眉睫。DENV 抑制剂可分为 DENV 复制周期阻断剂和宿主因子抑制剂。DENV 复制周期阻断剂包括进入抑制剂、衣壳蛋白抑制剂、非结构蛋白 (NS3、NS4B 和 NS5 等) 靶点抑制剂; 宿主因子抑制剂包括细胞受体抑制剂、脂类合成及代谢途径抑制剂和葡萄糖苷酶抑制剂<sup>[7]</sup>。许多抑

制剂由于选择性差、理化和药代动力学性质欠佳等原因, 未能进入临床应用, 如 RNA 聚合酶核苷类似物 NITD-008 和 balapiravir 虽然已进入临床试验, 但分别由于毒性较高和疗效低而终止研究。西戈斯韦 (celgosivir) 是一种宿主  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂, 目前正在临床进行临床试验, 其临床疗效仍有待确定<sup>[8]</sup>。

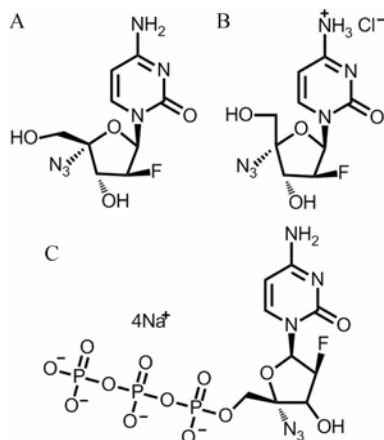
阿兹夫定 (4'- $\alpha$ -叠氮-2'-脱氧-2'- $\beta$ -氟胞嘧啶, FNC) 是一种新型的核苷类抑制剂 (nucleoside analog inhibitors, NIs), 有研究证明它对野生型 HBV 及拉米夫定耐药的 HBV 突变体具有抑制活性<sup>[9]</sup>。此外, FNC 选择性地抑制 HCV 1a 和 1b 基因型中 S96T 或 S282T 点突变病毒 RNA 的合成, 对 4'-叠氮胞苷 (R1479) 或 2'- $\beta$ -甲基胞苷 (NM107) 耐药的 HCV 病毒没有交叉耐药性<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究发现, FNC 能够明显抑制 HIV-1 和 HIV-2 的复制<sup>[11]</sup>, 并于 2013 年获得 CFDA 的抗 HIV 新药临床研究批件 (批件号: 2013L00941), 目前已进入临床 III 期试验。FNC-HCl 也对 HIV-1 野生株和核苷类逆转录酶抑制剂耐药株表现出极强的抗 HIV 活性<sup>[12]</sup>。迄今未见 FNC 抗 DENV 的研究报道。本研究旨在探索 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 对抗 DENV 的抑制活性, 以期研发新的抗 DENV 药物。

## 材料与方法

**化合物** FNC、盐酸阿兹夫定 (FNC-HCl) 和三磷酸酯阿兹夫定 (FNC-TP) 由河南师范大学常俊标教授惠赠, 结构如图 1 所示。利巴韦林 (ribavirin) 购自大连美仑生物技术有限公司。

**试剂** 低熔点琼脂糖购自美国 Amresco 公司; 结晶紫购自北京索莱宝公司; DMEM、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自 Thermo Fisher 公司; 海肾荧光素酶检测试剂盒购自北京 TransGen Biotech 公司; DENV- II 囊膜蛋白 E 抗体 (cat No. GTX629116) 购自 GeneTex 公司;  $\beta$ -actin 抗体购自北京康为世纪公司。提取 RNA 试剂盒 High Pure Viral RNA Kit (cat No. 11858882001) 购自 Roche 公司; 逆转录试剂盒 Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (cat No. 6210A)、荧光定量 PCR 试剂盒 Premix Ex Taq

TM (Probe qPCR) (cat No. RR390A) 购自 Takara 公司。引物由昆明硕擎公司合成, 用双蒸水将引物稀释为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 分装  $4^\circ\text{C}$  保存备用。



**Figure 1** The structure of azvudine (FNC, A), hydrochloride salt of azvudine (FNC-HCl, B) and triphosphate azovudine (FNC-TP, C)

**细胞与病毒** 非洲绿猴肾细胞 (Vero) 购自中国科学院上海细胞库, 乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和白纹伊蚊细胞 (C6/36) 购自中国科学院昆明细胞库。Vero 细胞和 BHK-21 细胞采用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基培养, C6/36 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养, 细胞维持液含 2% FBS。所有培养液均含有  $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  硫酸链霉素。登革 II 型重组病毒 (DENV-II Luc<sup>+</sup>) 由中国科学院武汉病毒研究所张波研究员惠赠, 在 Vero 细胞内传代扩增。DENV-I D06063 株 (GenBank: JQ317743.1), DENV-II D01090 株 (GenBank: KY882458), DENV-III YNSW1 株 (GenBank: KR296743.1) 及 DENV-IV (GenBank 号未发表) 均由中国医学科学院昆明医学生物学研究所孙强研究员惠赠, 在 C6/36 内扩增, 病毒滴度用噬斑法测定。实验用病毒滴度分别为  $1.45\times 10^3 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  (DENV-I)、 $5.04\times 10^6 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  (DENV-II)、 $1.44\times 10^5 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  (DENV-III) 和  $3.31\times 10^4 \text{ PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  (DENV-IV)。

**抗登革病毒活性化合物筛选** 将 Vero 细胞铺于 96 孔板中,  $4\times 10^4$  个/孔。培养 24 h 后, 弃上清, 加入含有待测化合物和 DENV-II Luc<sup>+</sup>。待测化合物进行 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) 和仅含细胞的空白对照孔 (blank control, BC)。 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 72 h 后, 弃上清, PBS 清洗细胞 2 次, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 将海肾荧光素酶

底物与细胞裂解液 1:1 混合, 检测相对荧光素酶活性单位 (relative luciferase unit, RLU)。通过检测化合物对海肾荧光素酶报告基因的抑制活性来测定化合物对病毒复制的抑制作用。

**噬斑法检测化合物对 DENV-II 型病毒的抑制活性** Vero 细胞铺种于 12 孔板,  $3\times 10^5$  个/孔。培养 24 h 后, 加入 DENV-II 型病毒, 每孔 250  $\mu\text{L}$ , 吸附 2~4 h 后加入含有梯度稀释待测化合物的 1% 低熔点琼脂糖-DMEM (2% FBS) 培养基。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 5 天, 每天观察细胞状态及噬斑形成。第 5 天采用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 清洗 3 次, 加入 0.8% 结晶紫进行染色。用酶联荧光斑点分析仪 (CTL, Immunospot S6 Universal) 进行图片采集并对噬斑进行计数, 计算半数有效浓度 (50% effective concentration,  $\text{EC}_{50}$ )。

**蛋白印迹方法 (Western blot) 检测化合物对 DENV 囊膜蛋白的影响** 为了进一步验证化合物的有效性, 采用蛋白印迹方法检测该化合物对 DENV-II E 蛋白的抑制作用。BHK-21 细胞  $1\times 10^5$  个/孔铺种于 24 孔板培养 24 h 后, 弃培养上清, 再加入 DENV-II 型病毒, 每孔 200  $\mu\text{L}$  吸附 2 h 后, 加入含有梯度稀释化合物的细胞维持液。设置 PC 和 BC 孔,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 48 h 后, 提取细胞总蛋白, Western blot 检测化合物对 DENV-II E 蛋白表达的抑制作用。用 ImageJ 软件对 Western blot 条带进行灰度分析, 以 PC 为对照, 计算 E 蛋白的相对表达量。

**qRT-PCR 检测化合物对 DENV RNA 复制的影响** 将 Vero 细胞  $1\times 10^5$  个/孔铺种于 24 孔板培养 24 h 后, 弃培养上清, 加入 DENV-II 型病毒, 每孔 200  $\mu\text{L}$  吸附 2 h 后, 弃病毒上清液,  $1\times \text{PBS}$  洗 3 次, 加入含有梯度稀释化合物的培养液。设置 PC 和 BC 孔,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 48 h 后, 提取上清液中 RNA。采用探针法进行 qRT-PCR 检测, 体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括:  $2\times \text{Premix Ex Taq}$  (Probe qPCR) 10.0  $\mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  上下游引物及探针各 0.4  $\mu\text{L}$ 、 $50\times \text{ROX Reference Dye II}$  0.2  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 加双蒸水补至 20  $\mu\text{L}$ 。RT-PCR 反应条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 30 s;  $95^\circ\text{C}$  3 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环。引物序列如下: qPCR-F: 5'-AGGCTCTCACC AAGTTTTCCG-3', qPCR-R: 5'-TTCCTATCCATGTG ATAATGACTCCTA-3', 探针序列: 5'-CCATGAGACC CCACTGAAGGCAGC-3'。探针的 5'端以荧光发射基因 FAM 标记, 3'端以荧光淬灭基团 TAMAR 标记。

**MTT 法检测化合物的细胞毒性** 化合物对细胞的毒性采用 MTT 法测定<sup>[13]</sup>。将 Vero 细胞按  $4\times 10^4$  个/孔接种于 96 培养板,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h。待

细胞长成单层后, 弃培养上清, 加入含梯度稀释待测化合物的DMEM培养基, 每个浓度设置3个复孔, 并设正常细胞对照组。培养5天后, 每孔加5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 20 μL, 37 °C孵育4 h后, 弃100 μL上清, 加入12% SDS-50% DMF溶液100 μL, 37 °C孵育过夜。待结晶完全溶解, 震荡混匀, 选用Bio-TEK酶标仪检测OD值(检测波长570 nm, 参考波长630 nm)。根据实验结果绘制剂量反应曲线, 计算出对半数细胞毒性浓度(50% cytotoxic concentration, CC<sub>50</sub>)。

**计算公式** EC<sub>50</sub>和CC<sub>50</sub>采用Reed-Muench法计算, 治疗指数(therapeutic index, TI)根据公式TI=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>计算, TI越大, 说明化合物的抗病毒活性越好。

**数据处理** 实验数据通过GraphPad Prism 5软件进行计算分析, 两组数据比较使用*t*检验。*P*<0.05被认为差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV-II Luc<sup>+</sup>重组病毒复制的抑制作用

DENV-II Luc<sup>+</sup>是DENV-II衣壳蛋白中插入海肾荧光素酶报告基因的重组病毒。DENV-II Luc<sup>+</sup>感染Vero细胞后, 通过检测海肾荧光素酶活性测定化合物对病毒的抑制作用, 可用于高通量筛选。本研究对739个化合物进行初步筛选后, 发现FNC、FNC-HCl和FNC-TP能够抑制DENV-II Luc<sup>+</sup>的复制。EC<sub>50</sub>分别为1.16±1.44、3.68±4.33和0.83±0.26 μmol·L<sup>-1</sup>, 阳性药物利巴韦林的EC<sub>50</sub>为7.43±4.77 μmol·L<sup>-1</sup>。说明FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV-II Luc<sup>+</sup>的抑制

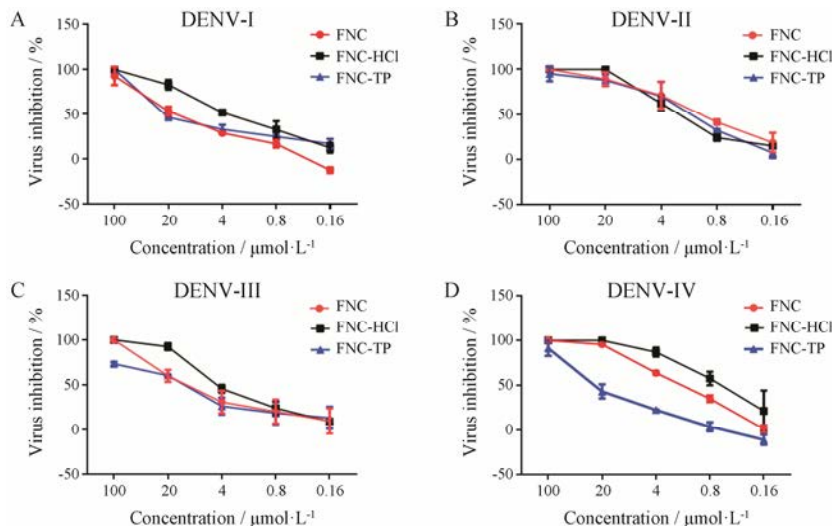
作用优于利巴韦林。

### 2 噬斑法检测FNC、FNC-HCl和FNC-TP对4种血清型DENV病毒的抑制作用

以利巴韦林为阳性对照药物, 采用噬斑法检测FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV复制的抑制活性。通过3次独立重复实验结果显示, FNC、FNC-HCl和FNC-TP在100 μmol·L<sup>-1</sup>浓度下能够完全抑制DENV的复制。对噬斑进行计数分析发现, 化合物对4种血清型DENV的抑制效果均呈剂量依赖关系(图2)。FNC、FNC-HCl和FNC-TP抑制DENV-I复制的EC<sub>50</sub>分别为10.21±1.93、2.77±1.13和22.12±0.63 μmol·L<sup>-1</sup>(图2A), 抑制DENV-II的EC<sub>50</sub>分别为1.41±0.33、2.54±0.70和1.68±0.32 μmol·L<sup>-1</sup>(图2B), 抑制DENV-III的EC<sub>50</sub>分别为5.60±2.84、4.57±0.56、11.94±2.03 μmol·L<sup>-1</sup>(图2C), 抑制DENV-IV的EC<sub>50</sub>分别为1.82±0.27、0.54±0.29和25.42±6.70 μmol·L<sup>-1</sup>(图2D)。利巴韦林对DENV-II的EC<sub>50</sub>为40.78±1.02 μmol·L<sup>-1</sup>, 说明FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV的抑制活性优于利巴韦林。对4个血清型DENV的抑制作用进行比较, FNC抑制DENV-II和DENV-IV的作用强于DENV-I和DENV-III, FNC-HCl对4种血清型的抑制作用均较强, EC<sub>50</sub>均在5 μmol·L<sup>-1</sup>以下, FNC-TP对DENV-II型的抑制作用优于其他3型。

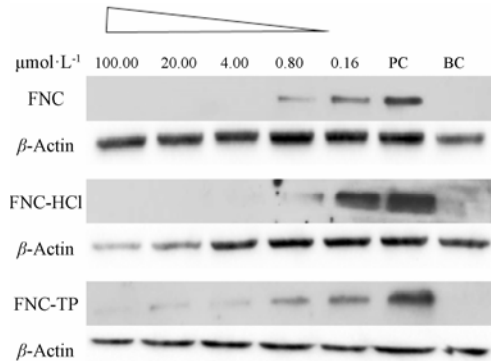
### 3 FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV-II囊膜蛋白E的抑制作用

为进一步确证FNC、FNC-HCl和FNC-TP对DENV的抑制作用, 采用含不同药物浓度的培养基培养DENV-II感染的BHK-21细胞。培养48 h后提取细胞内总蛋白进行Western blot检测。结果显示, FNC、



**Figure 2** Inhibitory effects of FNC, FNC-HCl and FNC-TP on DENVs by plaque assay. A: DENV-I; B: DENV-II; C: DENV-III; D: DENV-IV. *n*=3,  $\bar{x} \pm s$

FNC-HCl 和 FNC-TP 能够显著抑制 DENV- II E 蛋白的表达, 且蛋白表达量与药物浓度呈剂量依赖关系 (图 3)。



**Figure 3** Effects of compounds on DENV-II envelope protein E expression by Western blot. PC: Positive control; BC: Blank control

#### 4 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 对 DENV- II 病毒 RNA 复制的抑制作用

将化合物设高、中、低 3 个剂量组, 与感染 DENV- II 的细胞进行共培养 48 h, 检测化合物对 DENV- II 病毒 RNA 的抑制作用。结果显示, FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 在 10 和 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下均能显著抑制病毒 RNA 的复制 (图 4)。FNC 和 FNC-TP 在 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对病毒 RNA 复制的抑制作用没有显著性差异 (图 4A、C), 而 FNC-HCl 在该浓度下也能显著抑制病毒 RNA 的复制 (图 4B), 该结果与噬斑法检测化合物的有效性结果一致, 3 个化合物对 DENV- II 的抑制作用

进行比较, FNC-HCl 的抑制作用最强, FNC-TP 最弱。

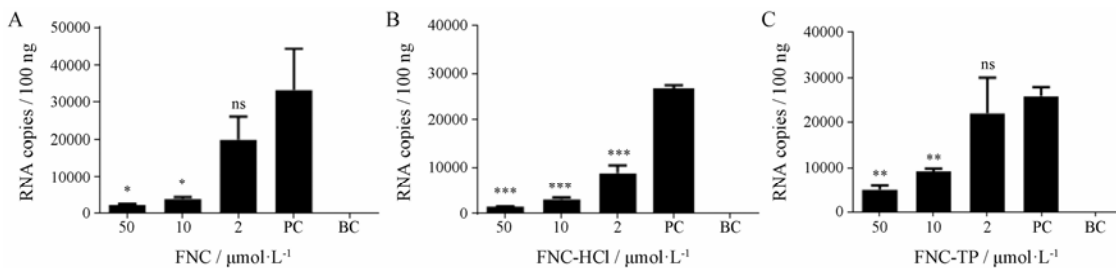
#### 5 化合物对 Vero 细胞的毒性作用

不同浓度的 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 与 Vero 细胞共培养 5 天后, 通过 MTT 法测细胞存活率。结果显示, 3 种化合物对 Vero 细胞的毒性都很小, 其  $\text{CC}_{50}$  均大于 3 000.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 阳性药物利巴韦林对 Vero 细胞的  $\text{CC}_{50}$  大于 1 000.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过  $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$  计算出 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 对登革病毒 4 个血清型的治疗指数 (表 1)。

#### 讨论

NIIs 是临床应用最多的抗病毒药物, 这类抑制剂在病毒性疾病如 HIV-1、HBV 感染中有明显的治疗效果, 对 DENV 治疗也发挥着重要的作用。该类抑制剂是天然核苷的类似物, 进入体内后经过多步磷酸化反应, 转化为相应的三磷酸盐后结构与天然 NTP 底物极为相似, 它们与内源性的 dNTP 竞争性地作用于酶的底物活性部位并且被结合到伸长的 RNA 链中以终止 RNA 延伸, 从而抑制病毒的复制<sup>[14]</sup>。然而由于耐药毒株及毒副作用的出现, NIIs 的疗效受到很大限制。因此, 研发高效、低毒、不易产生突变的新型 NIIs 仍然是目前的研究热点之一。

FNC 是一种新型的核苷类抑制剂, 本研究发现其具有体外抗 DENV 的活性。DENV- II Luc<sup>+</sup>是在 DENV- II (strain TSV01; GenBank accession No. AY037116) 衣壳蛋白中插入海肾荧光素酶报告基因的重组病毒, 荧光素酶随着病毒复制而表达, 通过检测荧光素酶



**Figure 4** Quantification of DENV-II viral RNA strands. FNC (A), FNC-HCl (B) and FNC-TP (C) inhibited the replication of DENV virus RNA.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs PC

**Table 1** The cytotoxicity of compounds on Vero cells and the therapeutic index of compound against DENV ( $n=3$ ).  $\text{CC}_{50}$ : 50% Cytotoxic concentration

| Compound  | $\text{CC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Therapeutic index |           |            |           |
|-----------|--|-------------------|-----------|------------|-----------|
|           |  | DENV-I            | DENV-II   | DENV-III   | DENV-IV   |
| Ribavirin | >1 000.00  | –                 | >24.52    | –          | –         |
| FNC       | >3 000.00  | >293.83           | >2 127.66 | >99.21     | >1 648.35 |
| FNC-HCl   | >3 000.00  | >1 083.03         | >1 181.10 | >656.46    | >5 555.56 |
| FNC-TP    | >3 000.00  | >135.62           | >1 785.71 | >27 272.73 | >118.02   |

可以测定病毒复制。该重组病毒能够筛选抗 DENV 整个生命周期的抑制剂<sup>[15]</sup>。本研究筛选结果显示 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 有较好的抗 DENV- II Luc<sup>+</sup>活性, 抑制作用均强于利巴韦林。细胞水平、蛋白水平和 RNA 检测确证了 FNC 抗 DENV 的作用。噬斑法检测结果发现, 3 种化合物呈剂量依赖关系抑制 DENV 的复制。阳性药物利巴韦林对 DENV- II 的治疗指数大于 24.52, FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 对 DENV 的治疗指数均显著高于利巴韦林 (表 1), 说明这 3 种化合物对 DENV 的抑制活性优于利巴韦林。同时通过对宿主细胞毒性检测发现三者对 Vero 细胞毒性均很小, 有望成为抗 DENV 的潜在药物。

FNC 临床前药效学研究结果显示, FNC 在 SD 大鼠体内的无毒剂量为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $0.52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下 SD 大鼠体内达到的最大血药浓度为  $334.32 \pm 78.20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $1.17 \pm 0.27 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[16]</sup>。FNC 对 DENV- II 的 EC<sub>50</sub> 值低于安全剂量下体内达到的血药浓度, 对其他血清型的 EC<sub>50</sub> 值均高于安全剂量下体内达到的血药浓度, FNC 有望成为抗登革病毒的候选药物。

文献<sup>[17]</sup>报道, FNC 能够抑制 HCV 病毒的复制, 作用靶点为 NS5B 蛋白 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。NS5 是最保守的黄病毒非结构蛋白, 也是病毒 RNA 合成的关键, 因此成为抗病毒药物的重要靶点<sup>[18]</sup>。DENV 与 HCV 是黄病毒科的不同属病毒, 两种病毒之间具有相似性。因此推测 FNC 及类似物对 DENV 的作用靶点可能是 NS5 蛋白, 但尚需进行实验验证。

本研究首次发现 FNC、FNC-HCl 和 FNC-TP 能够抑制登革病毒的复制, 且 FNC-HCl 对 4 种血清型 DENV 的抑制作用均优于 FNC 和 FNC-TP, 有望成为治疗登革热的新型先导药物。

## References

- [1] Paranjape SM, Harris E. Control of dengue virus translation and replication [M] // *Dengue Virus*. Berlin: Springer, 2010, 338: 15–34.
- [2] Sreanont G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 745–759.
- [3] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6: e1760.
- [4] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496: 504–507.
- [5] Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity [J]. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 2010, 338: 67–81.
- [6] Scott LJ. Tetravalent dengue vaccine: a review in the prevention of dengue disease [J]. *Drugs*, 2016, 76: 1–12.
- [7] Zhang GH, Zheng YT. Research progress of chemical drugs against dengue virus [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2017, 52: 809–813.
- [8] Lim SP, Wang QY, Noble CG, et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects [J]. *Antiviral Res*, 2013, 100: 500–519.
- [9] Zhou Y, Zhang Y, Yang X, et al. Novel nucleoside analogue FNC is effective against both wild-type and lamivudine-resistant HBV clinical isolates [J]. *Antiviral Ther*, 2012, 17: 1593–1599.
- [10] Smith DB, Kalayanov G, Sund C, et al. The design, synthesis, and antiviral activity of monofluoro and difluoro analogues of 4'-azidocytidine against hepatitis C virus replication: the discovery of 4'-azido-2'-deoxy-2'-fluorocytidine and 4'-azido-2'-dideoxy-2',2'-difluorocytidine [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2971–2978.
- [11] Wang RR, Yang QH, Luo RH, et al. Azvudine, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor showed good drug combination features and better inhibition on drug-resistant strains than lamivudine *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e105617.
- [12] Wang Q, Hu WD, Wang SY, et al. Synthesis of new 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-azido nucleoside analogues as potent anti-HIV agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4178–4183.
- [13] Xiang SY, Chen M, Chen H, et al. The combined anti-HIV-1 effects of chloroquine and antiretroviral drugs *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 227–235.
- [14] Chen YL, Yokokawa F, Shi PY. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus [J]. *Antiviral Res*, 2015, 122: 12–19.
- [15] 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.
- [16] Peng Y, Cheng T, Dong L, et al. Quantification of 2'-deoxy-2'-β-fluoro-4'-azidocytidine in rat and dog plasma using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry: application to bioavailability and pharmacokinetic studies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98: 379–386.
- [17] Kalayanov G, Tai E, Sund C, et al. 2'-Deoxy-4'-azido nucleoside analogs are highly potent inhibitors of hepatitis C virus replication despite the lack of 2'-α-hydroxyl groups [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 2167–2175.
- [18] Lim SP, Noble CG, Shi PY. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery [J]. *Antiviral Res*, 2015, 119: 57–67.