

## • 研究论文 •

## 富马酸替诺福韦二吡呋酯体外抗寨卡病毒活性研究

陈秀秀<sup>1,2,4</sup>, 罗荣华<sup>2</sup>, 郑昌博<sup>3</sup>, 姚债文<sup>1,2,4</sup>, 唐秋菊<sup>3</sup>, 熊思东<sup>4</sup>, 郑永唐<sup>2,4\*</sup>

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215021; 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, 云南 昆明 650223; 3. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500; 4. 苏州大学-中国科学院昆明动物研究所疾病动物模型与新药研发联合实验室, 江苏 苏州 215021)

**摘要:** 富马酸替诺福韦二吡呋酯 (tenofovir disoproxil fumarate, TDF) 是一种核苷类似物 (nucleoside analogues), 已广泛用于临床治疗人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 和乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染。本研究旨在探讨 TDF 是否具有体外抗寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 活性。首先通过噬斑抑制实验在细胞水平检测 TDF 是否具有抑制 ZIKV 作用, 随后通过实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 实验和蛋白质印迹 (Western blot) 实验分别在 RNA 水平和蛋白水平进一步验证 TDF 的抗 ZIKV 活性, 最后通过 MTT 实验检测 TDF 的细胞毒性。结果发现, TDF 不仅可降低 ZIKV 感染细胞后噬斑形成, 还可抑制 ZIKV RNA 复制和 ZIKV NS2B 蛋白的表达, 其对 ZIKV 的半数有效浓度 (50% effective concentration,  $EC_{50}$ ) 为  $14.96\sim 27.47\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阳性药物利巴韦林抑制 ZIKV 的  $EC_{50}$  为  $56.01\pm 12.16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。MTT 检测结果表明, TDF 和利巴韦林的细胞毒性很小, 半数细胞毒浓度 (50% cytotoxic concentration,  $CC_{50}$ ) 均大于  $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过  $CC_{50}/EC_{50}$  计算出 TDF 的治疗指数 (therapeutic index, TI) 大于 18.20, 高于阳性对照药利巴韦林。本研究表明, TDF 在细胞、RNA 及蛋白水平均具有很好的体外抗 ZIKV 活性, 有望成为抗 ZIKV 治疗的候选药物。

**关键词:** 富马酸替诺福韦二吡呋酯; 核苷类似物; 寨卡病毒; 抗病毒活性; 治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1582-06

**The anti-ZIKA virus activity of tenofovir disoproxil fumarate *in vitro***CHEN Xiu-xiu<sup>1,2,4</sup>, LUO Rong-hua<sup>2</sup>, ZHENG Chang-bo<sup>3</sup>, YAO Zhai-wen<sup>1,2,4</sup>, TANG Qiu-ju<sup>3</sup>,  
XIONG Si-dong<sup>4</sup>, ZHENG Yong-tang<sup>2,4\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215021, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Peptides of Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 4. KIZ-SU Joint Laboratory of Animal Model and Drug Development, College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215021, China)

**Abstract:** Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is a nucleoside analogue that has been widely used for clinical treatment of human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV) infection. The aim of this study was to investigate whether TDF has anti-Zika virus (ZIKV) activity *in vitro*. The inhibitory effect of TDF on ZIKV was detected by plaque reduction assay. Then, the anti-ZIKV activity of TDF at RNA level and protein level was verified by real time quantitative PCR and Western blot. Finally, MTT assay was used to determine the cytotoxicity of TDF. Our results showed that TDF not only reduced the formation of plaque after ZIKV infection, but also

收稿日期: 2018-12-23; 修回日期: 2019-01-08.

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2016YFC1201000); 中国科学院重点部署项目课题 (ZDRW-ZS-2016-4-2); 云南省活性多肽研究与利用重点实验室开放课题 (AMHD-2017-3).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1135

inhibited the replication of ZIKV RNA or expression of ZIKV NS2B protein. The 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) of TDF in inhibition of ZIKV replication were 14.96–27.47 μmol·L<sup>-1</sup>, while that of ribavirin was 56.01 ± 12.16 μmol·L<sup>-1</sup>, which served as the positive control. The cytotoxicity of TDF and ribavirin in Vero cells were very low, with their 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) values being greater than 500 μmol·L<sup>-1</sup>. The therapeutic index of TDF calculated by CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> was greater than 18.20, which was significantly higher than that of ribavirin. The results suggest that TDF has good anti-ZIKV activity *in vitro* and is expected to become a candidate drug for anti-ZIKV therapy.

**Key words:** tenofovir disoproxil fumarate; nucleoside analogue; Zika virus; antiviral activity; therapy

寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 是一种虫媒传播病毒, 主要通过伊蚊叮咬进行传播。该病毒最早于 1947 年科学家在乌干达寨卡森林中的恒河猴血清中分离得到, 因此被命名为寨卡病毒<sup>[1]</sup>。ZIKV 的颗粒呈球形, 直径约 40 nm, 是不分节段的单股正链 RNA 病毒。ZIKV 基因组全长约 11 kb, 仅含有 1 个开放阅读框, 编码 3 个结构蛋白和 7 个非结构 (non-structural, NS) 蛋白。结构蛋白分别为衣壳蛋白 (capsid, C)、前体膜蛋白/膜蛋白 (premembrane and membrane, prM/M) 及包膜蛋白 (envelope, E), 非结构蛋白包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5。结构蛋白在病毒颗粒形成、病毒吸附、融合和进入宿主细胞等环节中发挥着重要作用, 非结构蛋白参与病毒复制、释放及逃逸宿主免疫反应。

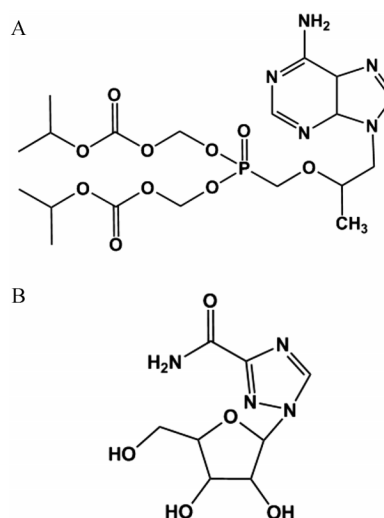
由 ZIKV 感染引起的疾病称为寨卡病毒病 (Zika virus disease), 也称为寨卡热。大多数寨卡病毒病都较轻微并且是自限性的, 但 ZIKV 感染也有可能造成患者严重的神经系统、生殖系统、胎儿及胎盘等器官损伤及并发症, 如格林-巴利综合征 (Guillain-Barré syndrome)<sup>[2-4]</sup>, 孕妇感染 ZIKV 则可导致胎儿脑部先天性发育畸形, 引起新生儿小头畸形<sup>[5,6]</sup>。自 2015 年来, ZIKV 感染在巴西爆发及其与新生儿小头症的关联, 引起了全球的高度关注。据统计, 目前全球已有 148 个国家及地区报道了经蚊媒传播的 ZIKV 感染<sup>[7]</sup>。我国也是 ZIKV 传播潜在风险最大的国家之一<sup>[8]</sup>。因此, 防治 ZIKV 感染与传播已成为当务之急。由于 ZIKV 的致病机制尚不完全清楚, 至今仍无特效的药物或疫苗批准上市用于治疗 ZIKV 感染, 急需寻找有效的抗 ZIKV 药物。

核苷类似物是一类广谱抗病毒药物, 可治疗多种病毒感染, 如疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 以及流感和呼吸系统病毒等 DNA 和 RNA 病毒。在目前使用的抗病毒药物中近 50% 是核苷类药物<sup>[9]</sup>。本课题组曾报道核苷类似物阿兹夫定不仅具有抗 HIV 活性还具有抗登革病毒 (dengue virus,

DENV) 活性<sup>[10,11]</sup>。此外, 还有很多核苷类似物具有抗黄病毒作用<sup>[12]</sup>。富马酸替诺福韦二吡呋酯 (tenofovir disoproxil fumarate, TDF) 也是一种核苷类似物, 已分别于 2001 年和 2008 年获得美国 FDA 批准上市用于治疗 HIV-1 和 HBV 感染。至今尚未见 TDF 抗 ZIKV 感染作用的研究报道。本研究就 TDF 是否具有抗 ZIKV 活性进行了研究, 期望为临床治疗 ZIKV 感染导致的严重疾病奠定基础。

## 材料与方法

**药品** TDF 由南京安赛莱医药科技有限公司提供, 石家庄龙泽制药股份有限公司生产, 利巴韦林 (ribavirin) 购自大连美仑生物技术有限公司。TDF 和利巴韦林的结构式如图 1 所示。



**Figure 1** The structures of tenofovir disoproxil fumarate (TDF, A) and ribavirin (B)

**主要试剂** 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Thermo Fisher 公司); 低熔点琼脂糖、SDS (Amresco 公司); 结晶紫 (北京索莱宝公司); MTT (Sigma 公司), DMF (西陇化工股份有限公司); RNA 提取试剂盒 Roche High Pure Viral RNA Kit (Roche 公司); 一步法定量试剂盒 RNA-direct™ Realtime PCR

Master Mix (TOYOBO 公司); 引物及 TaqMan 探针 (Takara 公司); ZIKV NS2B 蛋白抗体 (Gene Tex 公司);  $\beta$ -actin 抗体 (北京康为世纪公司)。

**细胞与病毒** 非洲绿猴肾细胞 (Vero) 和白纹伊蚊细胞 (C6/36) 分别购自中国科学院上海细胞库和中国科学院昆明细胞库。Vero 细胞培养于含有 10% FBS 的 DMEM 中, C6/36 细胞采用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养。所有细胞置于 37 °C 恒温、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞维持液含 4% FBS。根据细胞生长状态及细胞密度进行传代和实验。ZIKV SZ-WIV01 株 (GenBank: KU963796) 由中国科学院武汉病毒研究所张波研究员惠赠。采用 C6/36 细胞进行病毒扩增并采用噬斑法对所扩增病毒进行滴度测定。

**噬斑抑制实验** 将 Vero 细胞种于 12 孔板中, 每孔  $3 \times 10^5$  个细胞, 于 37 °C 恒温、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。待细胞长成单层后, 弃培养上清, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 ZIKV 病毒 (MOI  $\approx$  0.1) 吸附 2 h 后弃病毒液, 用 PBS 洗 3 次后加入含有梯度稀释 TDF 的 2% 低熔点琼脂糖-DMEM (4% FBS) 培养基。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 4 天后采用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 清洗 3 次, 加入 0.8% 结晶紫染色 10 min, 清洗 3 次并烘干。采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统计。根据噬斑数绘制剂量反应曲线, 计算半数有效浓度 EC<sub>50</sub>, 即对 ZIKV 感染 Vero 细胞后噬斑形成抑制率为 50% 时的药物浓度。

**病毒产量降低实验** 将 Vero 细胞种于 24 孔板中, 每孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。待细胞长成单层后, 弃培养上清, 用 PBS 洗 1 次, 加入 ZIKV 病毒 (MOI  $\approx$  1) 吸附 2 h 后弃病毒液, 用 PBS 洗 3 次后加入含有梯度稀释的 TDF, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后收集病毒上清并立刻置于 -80 °C 冰箱保存。根据不同浓度 TDF 对 ZIKV RNA 复制的抑制率计算出 TDF 的 EC<sub>50</sub>。

**RNA 提取及实时荧光定量 PCR** 采用试剂盒 Roche High Pure Viral RNA Kit 提取病毒上清中的 RNA, 具体实验步骤遵循试剂盒说明书。使用定量 PCR 试剂盒 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix 和 TaqMan 探针在 ViiA 7 系统 (Life technologies) 下进行实时荧光定量 PCR。ZIKV NS5 片段通过引物 5'-CCGCTGCC CAACACAAG-3' 和 3'-TACAGACGTTTTCTTGCAAT CACC-5' 及 TaqMan 探针 5'-FAM-AGCCTACCTTGAC AAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA-3' 进行扩增。实时荧光定量 PCR 的扩增程序为: 90 °C 预变性 30 s; 61 °C 20 min; 95 °C 30 s; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min。

**蛋白印迹实验** 将 Vero 细胞种于 24 孔板中, 每

孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。待细胞长成单层后, 经 ZIKV 感染和 TDF 处理后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h, 倒掉培养上清, 用 PBS 清洗 3 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 每孔 200  $\mu$ L, 冰上裂解 30 min。将细胞吹下, 转移至 1.5 mL EP 管内, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min (4 °C), 收集蛋白上清。将蛋白上清变性制成样品后进行 SDS-PAGE 电泳, 经过转膜、牛奶封闭、一抗孵育、二抗孵育后显影。

**MTT 检测** 采用 MTT 法检测药物的细胞毒性<sup>[13]</sup>。将 Vero 细胞种于 96 孔板中, 每孔  $4 \times 10^4$  个细胞, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。待细胞长成单层, 弃培养上清, 加入含梯度稀释 TDF 的培养基, 每个浓度设置 3 个重复孔, 并设置不含药物的对照组。于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 天后, 每孔加入 20  $\mu$ L 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT。37 °C 孵育 4 h, 弃 100  $\mu$ L 上清, 加入 100  $\mu$ L 12% SDS-50% DMF 溶液, 37 °C 孵育过夜。待结晶甲臞完全溶解, 选用 Elx800 酶标仪检测 OD 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm。计算出半数细胞毒浓度 CC<sub>50</sub>, 即对 50% Vero 细胞产生毒性时的药物浓度。

**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 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

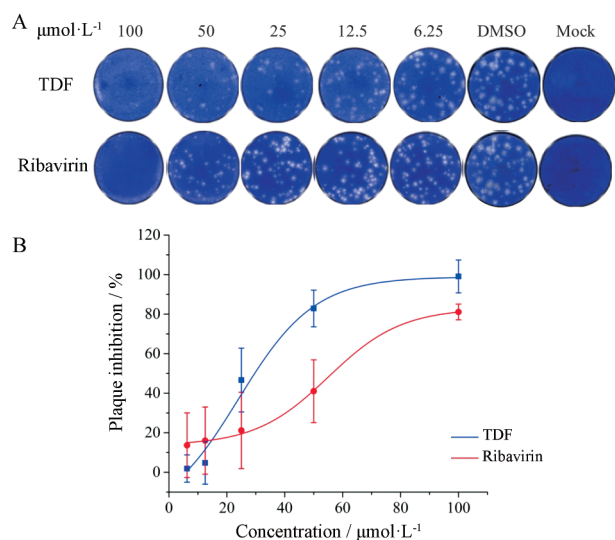
## 结果

### 1 噬斑抑制实验证明 TDF 具有抗 ZIKV 活性

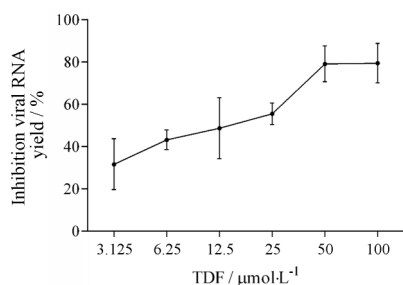
本研究以利巴韦林为阳性对照药, 采用噬斑抑制实验证明了 TDF 具有抗 ZIKV 活性 (图 2A), 对不同药物浓度下的噬斑个数进行统计并与 DMSO 组进行比较, 算出 TDF 对 ZIKV 的抑制率 (图 2B), 从图中可以看出 TDF 呈剂量依赖关系抑制 ZIKV 的复制。计算得出 TDF 对 ZIKV 的半数有效浓度 (50% effective concentration, EC<sub>50</sub>) 为  $27.47 \pm 8.07 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。利巴韦林对 ZIKV 的 EC<sub>50</sub> 为  $56.01 \pm 12.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。TDF 抗 ZIKV 活性明显优于利巴韦林。

### 2 TDF 可有效降低 ZIKV 病毒产量

为了进一步确认 TDF 的抗 ZIKV 活性, 接着通过实时荧光定量 PCR 实验在 RNA 水平检测了 TDF 对 ZIKV RNA 复制的抑制作用。将含有梯度稀释 TDF 的培养基与感染了 ZIKV 的细胞共培养 72 h 后收集上清检测 TDF 对 ZIKV RNA 复制的抑制作用, 结果表明, 随着 TDF 药物浓度的升高, TDF 对 ZIKV 病毒 RNA 复制的抑制作用逐渐增强, 当 TDF 浓度为  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对 ZIKV RNA 拷贝数的抑制率已大于 50% (图 3)。因此, TDF 可有效降低 ZIKV 的病毒产量, 计算得出其对 ZIKV 的 EC<sub>50</sub> 为  $14.96 \pm 8.29 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



**Figure 2** Plaque reduction assay to determine anti-ZIKV activity. A: Plaque reduction assay for TDF and ribavirin in Vero cells; B: Plaque inhibition curves. Mock: Non-infected cells; DMSO: ZIKV infected cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



**Figure 3** Dose-dependent reduction of ZIKV yield by TDF. Viral RNA levels were quantified by means of real time quantitative PCR.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

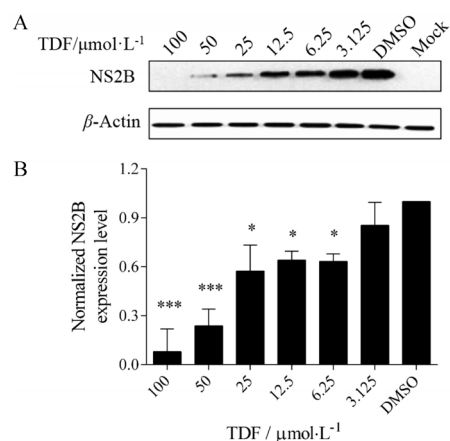
### 3 TDF对ZIKV NS2B蛋白表达的抑制作用

通过病毒产量降低实验确定TDF的抗ZIKV活性后,本研究又进一步通过Western blot在蛋白水平检测了TDF是否具有抗ZIKV活性。将感染了ZIKV的细胞与含有梯度稀释TDF的培养基共培养72 h后收集细胞,提取细胞内总蛋白并进行蛋白印迹检测,结果发现,随着药物浓度升高,TDF对ZIKV NS2B蛋白表达的抑

制作用逐渐增强(图4A),当TDF浓度为 $6.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,已可显著抑制ZIKV NS2B蛋白表达(图4B)。

### 4 TDF对Vero的细胞毒性

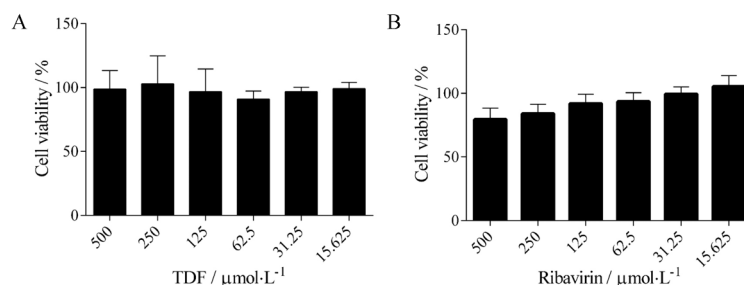
通过MTT实验检测了TDF对Vero细胞的毒性从而确定TDF抗ZIKV的治疗指数。结果表明,当TDF浓度为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率依然大于50%(图5A),TDF对Vero细胞毒性很小,半数细胞毒浓度(50% cytotoxic concentration,  $\text{CC}_{50}$ )大于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阳性药物利巴韦林对Vero细胞的 $\text{CC}_{50}$ 也大于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图5B)。通过 $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 计算出TDF的治疗指数大于18.20,明显高于利巴韦林的治疗指数(表1)。



**Figure 4** Effects of TDF on ZIKV NS2B protein expression by Western blot. A: Representative Western blot images of Vero cells after treatment with TDF; B: Quantification of NS2B protein band intensities, relative to those for  $\beta$ -actin. Mock: Non-infected cells; DMSO: ZIKV infected cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs DMSO

**Table 1** Antiviral activity of TDF and ribavirin against ZIKV strain SZ-WIV01 ( $n = 3$ ).  $\text{EC}_{50}$ : 50% Effective concentration;  $\text{CC}_{50}$ : 50% Cytotoxic concentration; PA: Plaque reduction assay; VY: Virus yield reduction assay; TI: Therapeutic index

Compound	$\text{EC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		$\text{CC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TI
	PA	VY	MTT	
Ribavirin	$56.01 \pm 12.16$	-	$>500$	$>8.93$
TDF	$24.47 \pm 8.07$	$14.96 \pm 8.29$	$>500$	$>18.20$



**Figure 5** Cytotoxicity of TDF (A) and ribavirin (B) in Vero cells which were determined by MTT assay.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 讨论

大量研究表明, ZIKV 感染可造成胎儿小头畸形和成年人的格林-巴利综合征<sup>[2-6]</sup>。ZIKV 的爆发流行严重危害了人类健康, 研发有效的抗 ZIKV 治疗药物迫在眉睫。TDF 是由美国 Gilead Sciences 公司生产的一种新型核苷类抑制剂, 已广泛用于临床治疗 HIV 和 HBV 感染。本研究首次在体外细胞、RNA 及蛋白水平发现 TDF 具有抗 ZIKV 活性。本研究通过噬斑抑制实验首先在细胞水平证明了 TDF 具有抗 ZIKV 活性, 随后通过病毒产量降低实验和蛋白质印迹实验分别在 RNA 和蛋白水平进一步验证了其对抗 ZIKV 的抑制作用。噬斑抑制和病毒产量降低实验均表明 TDF 以剂量依赖方式抑制 ZIKV 复制。MTT 检测结果表明, TDF 对 Vero 细胞的毒性很小, 通过  $CC_{50}/EC_{50}$  计算出 TDF 的治疗指数发现其治疗指数高于阳性对照药利巴韦林。因此, TDF 有望成为抗 ZIKV 感染的潜在治疗药物。

虽然目前针对抗 ZIKV 药物的研究也发现和报道了不少具有抗 ZIKV 活性的已上市药物, 但很多药物属于抗肿瘤药物和免疫调节剂, 这些药物可能具有免疫抑制作用并不适合孕妇使用<sup>[14,15]</sup>。此外, 还有很多未批准上市的化合物被发现具有抗 ZIKV 活性<sup>[12,16,17]</sup>, 但这些化合物的药效学、药代动力学、使用剂量及安全性均有待进一步研究, 距离批准上市并应用于临床仍需时日。据美国 FDA 的药物妊娠期危险性分类, 将药品的安全性分为 A、B、C、D、X 五类, 妊娠期妇女用药应尽可能选择 A 类及 B 类药, 但分类 A 等级的药物极少。TDF 为已批准上市药物且为妊娠 B 级药物, 已被各大指南推荐为妊娠期首选抗病毒药物<sup>[18,19]</sup>。目前 TDF 已广泛用于妊娠期妇女 HBV 感染母婴阻断治疗<sup>[20,21]</sup>, 也有研究表明 TDF 可用于妊娠期妇女 HIV 感染母婴阻断治疗<sup>[22]</sup>。因此, TDF 有望用于妊娠期妇女抗 ZIKV 治疗。

TDF 为 FDA 已批准上市药物, 临床试验研究结果显示, 在健康志愿者和 HIV 感染患者中 TDF 的药代动力学相似。在空腹状态下, HIV 感染患者单次口服 TDF 75~600 mg 后可在 0.8~1.0 h 内达到最大血药浓度 ( $C_{max}$ ),  $C_{max}$  为 68.6~618  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (0.11~0.97  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 而 TDF 以 3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量静脉注射给药后  $C_{max}$  可达 8.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (13.38  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。TDF 的药代动力学和剂量呈比例关系, 不受重复给药影响<sup>[23,24]</sup>。虽然 TDF 体外抗 ZIKV 的  $EC_{50}$  高于单次口服 TDF 600 mg 后的  $C_{max}$ , 但是与 TDF 静脉注射给药后的  $C_{max}$  接近。尽管很难从药物的体外活性推测出药物体内活性, 但本研究结果表明, TDF 有用于临床治疗 ZIKV 感染的可能性。

TDF 系替诺福韦的前药, 经口服后迅速水解为替诺福韦。替诺福韦可被细胞内的腺苷酸激酶磷酸化成为单磷酸, 然后被快速转化为活性二磷酸形式。替诺福韦二磷酸盐通过竞争性地与天然底物 5'-脱氧腺苷三磷酸结合而抑制 HIV-1 逆转录酶和 HBV 聚合酶的活性, 并在与 DNA 整合后阻止 DNA 链延长从而发挥抗病毒作用<sup>[25,26]</sup>。RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 是黄病毒 RNA 合成的关键酶, 具有高度保守性, 因此是抗黄病毒药物研发最有前景的靶点之一。研究表明, 核苷类似物可通过作用于 ZIKV RdRp 产生抗 ZIKV 作用<sup>[27,28]</sup>。核苷类似物可经细胞内激酶磷酸化成为三磷酸盐形式后与天然底物竞争性结合 RdRp 的活性位点并整合进入子代病毒 RNA 链中, 最终终止病毒 RNA 的复制从而发挥抗 ZIKV、DENV、HCV 等黄病毒科病毒活性<sup>[27-30]</sup>。TDF 也属于核苷类似物, 因此推测其作用靶点可能是 ZIKV RdRp, 但尚需通过实验验证。此外, TDF 体内抗 ZIKV 活性也需要通过动物实验或临床试验进行验证。

本研究首次发现 TDF 在体外具有抗 ZIKV 活性, 其对抗 ZIKV 的抑制作用明显优于利巴韦林, 有望成为研发抗 ZIKV 感染治疗药的新型先导化合物, 尤其为临床治疗 ZIKV 感染引起的严重疾病奠定了基础。

## References

- [1] Faye O, Freire CC, Iamarino A, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20<sup>th</sup> century [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8: e2636.
- [2] Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barre syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study [J]. Lancet, 2016, 387: 1531-1539.
- [3] Brasil P, Sequeira PC, Freitas AD, et al. Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection [J]. Lancet, 2016, 387: 1482.
- [4] Tang QJ, Pang W, Zheng CB. Zika virus infection and organ injury [J]. Int J Immunol (国际免疫学杂志), 2018, 41: 559-564.
- [5] Garcez PP, Loiola EC, Madeiro Da Costa R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids [J]. Science, 2016, 352: 816-818.
- [6] Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice [J]. Cell Stem Cell, 2016, 19: 120-126.
- [7] World Health Organization. Zika situation report [EB/OL]. (2017-03-10) [2018-12-18]. <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/>.
- [8] Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, et al. Potential for Zika virus introduction and transmission in resource-limited countries

- in Africa and the Asia-Pacific region: a modelling study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16: 1237-1245.
- [9] Zhang ST, Ni MX, Ruan QP. Enzymatic synthesis of nucleoside drugs [J]. *Prog Pharma Sci (药理学进展)*, 2005, 29: 56-62.
- [10] 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.
- [11] Zhang CT, Luo RH, Chen H, et al. The study of azvudine activity against dengue viruses *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 944-949.
- [12] Eyer L, Nencka R, Huvarova I, et al. Nucleoside inhibitors of Zika virus [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214: 707-711.
- [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] Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, et al. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 20: 259-270.
- [15] Xu M, Lee EM, Wen Z, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death *via* a drug repurposing screen [J]. *Nat Med*, 2016, 22: 1101-1107.
- [16] Deng YQ, Zhang NN, Li CF, et al. Adenosine analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2016, 3: ofw175 .
- [17] Julander JG, Siddharthan V, Evans J, et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model [J]. *Antiviral Res*, 2017, 137: 14-22.
- [18] Zou H, Chen Y, Duan Z, et al. Protective effect of hepatitis B vaccine combined with two-dose hepatitis B immunoglobulin on infants born to HBsAg-positive mothers [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e26748.
- [19] Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, et al. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2016, 63: 261-283.
- [20] Pan CQ, Duan Z, Dai E, et al. Tenofovir to prevent hepatitis B transmission in mothers with high viral load [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374: 2324-2334.
- [21] Hyun MH, Lee YS, Kim JH, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy and safety of tenofovir to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 45: 1493-1505.
- [22] Gibb DM, Kizito H, Russell EC, et al. Pregnancy and infant outcomes among HIV-infected women taking long-term ART with and without tenofovir in the DART trial [J]. *PLoS Med*, 2012, 9: e1001217.
- [23] Barditch-Crovo P, Deeks SG, Collier A, et al. Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 2733-2739.
- [24] Deeks SG, Barditch-Crovo P, Lietman PS, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of intravenous 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy)propyl]adenine, a novel anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy, in HIV-infected adults [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 2380-2384.
- [25] Delaney WE 4th, Ray AS, Yang H, et al. Intracellular metabolism and *in vitro* activity of tenofovir against hepatitis B virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 2471-2477.
- [26] Kearney BP, Flaherty JF, Shah J. Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43: 595-612.
- [27] Xu HT, Hassounah SA, Colby-Germinario SP, et al. Purification of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase and its use to identify small-molecule Zika inhibitors [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72: 727-734.
- [28] Hercik K, Kozak J, Sala M, et al. Adenosine triphosphate analogs can efficiently inhibit the Zika virus RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Antiviral Res*, 2017, 137: 131-133.
- [29] Latour DR, Jekle A, Javanbakht H, et al. Biochemical characterization of the inhibition of the dengue virus RNA polymerase by beta-d-2'-ethynyl-7-deaza-adenosine triphosphate [J]. *Antiviral Res*, 2010, 87: 213-222.
- [30] Deval J, Symons JA, Beigelman L. Inhibition of viral RNA polymerases by nucleoside and nucleotide analogs: therapeutic applications against positive-strand RNA viruses beyond hepatitis C virus [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 9: 1-7.