

新属种丝状病毒勐腊病毒进入模型的建立及阻断剂研究

陈 勍, 陈盼盼, 莘一婧, 唐 克, 张晓雨, 郭 颖*

(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, 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: 勐腊病毒 (Mengla virus, MLAV) 是我国分离的一种源自蝙蝠的丝状病毒, 该病毒于 2019 年被鉴定为丝状病毒新属种, 即丝状病毒科滇丝病毒属勐腊病毒。丝状病毒科成员众多, 其中埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 和马尔堡病毒 (Marburg virus, MARV) 恶性程度最高, 死亡率 24%~90%。系统遗传学研究显示, 在丝状病毒家族中, MLAV 与 MARV 亲缘关系较近。MLAV 依靠囊膜表面糖蛋白 (glycoprotein, GP) 进入宿主, 重组病毒研究显示其具有蝙蝠-人跨种传播潜力。本课题构建了以 GP 介导的 MLAV 进入模型, 考察了 MLAV 对不同组织来源的人源细胞和非洲绿猴肾细胞的感染性, 并通过对 4 个体外可阻断 EBOV 和 MARV 进入, 且体内药效学证实可显著降低 EBOV 感染小鼠死亡率的化合物 (氯喹、粉防己碱、克罗米芬和托瑞米芬) 进行阻断 MLAV 进入宿主细胞的活性评价。结果显示, 氯喹可有效阻断 MLAV 进入 (半数有效浓度 EC_{50} : $1.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 与抗 EBOV 和 MARV 活性相当。目前尚无针对 MLAV 药物研究的相关报道, 本研究发现了氯喹具有抑制 MLAV 进入宿主细胞的能力, 将为抗新型丝状病毒药物研究提供参考。

关键词: 勐腊病毒; 丝状病毒; 进入; 氯喹

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2019)09-1612-08

Establishment of a new genus of filovirus (Mengla virus) entry evaluating system and entry inhibitors discovery

CHEN Qing, CHEN Pan-pan, XIN Yi-jing, TANG Ke, ZHANG Xiao-yu, GUO Ying*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, 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)

Abstract: Mengla virus (MLAV), isolated from the bats in China, was identified as a new genus of filovirus in 2019, i. e. *Dianlovirus* genus of *Filoviridae* family. Among filoviruses, Ebola virus (EBOV) and Marburg virus (MARV) are the most contagious viruses with mortality rates of 24%–90%. Phylogenetic analysis showed that MLAV was closely related to MARV among the members of filovirus family. MLAV enters into host cells *via* viral glycoprotein (GP). The recombinant virus study indicated that MLAV has a potential for bat-to-human cross-species transmission. In this study, a GP-mediated MLAV entry evaluating model was established, and by using this model, we investigated the susceptibility of MLAV to the human cell lines sourced from different tissues and the African green monkey kidney cell lines. Four compounds, chloroquine, tetrandrine, clomiphene, and toremifene, which were known as EBOV and MARV entry blockers, were tested for HIV/MLAV-GP infection. It was found that

收稿日期: 2019-05-28; 修回日期: 2019-07-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202568, 81473256, 81273561); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放课题资助项目 (GTZK201907); 国家“重大新药创制”专项 (2015ZX09102-023, 2018ZX09711001-003-002); 北京市科委全市成果转化统筹基金 (Z151100000115008); 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室资助项目 (BZ0150).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0420

chloroquine effectively blocked the entry of MLAV with the half maximal effective concentration (EC_{50}) of $1.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, resembling its anti-EBOV and -MARV activities. To the best of our knowledge, there is no anti-MLAV drug reported by far, and the identification of chloroquine as an MLAV entry inhibitor may provide an insight for developing anti-filovirus agents.

Key words: Mengla virus; filovirus; entry; chloroquine

丝状病毒是一类有囊膜的单链负链RNA病毒,可引起人严重病毒性出血热。丝状病毒科 (*Filoviridae*) 包括埃博拉病毒属 (*Ebolavirus*)、马尔堡病毒属 (*Marburgvirus*) 和奎瓦病毒属 (*Cuevavirus*)^[1]。其中,埃博拉病毒属扎伊尔型埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 是引起2014~2016年西非埃博拉疫情的病毒,造成2万余人感染,超过1万人死亡^[2],它和马尔堡病毒属马尔堡型马尔堡病毒 (Marburg virus, MARV) 是恶性程度最高的丝状病毒,死亡率高达24%~90%^[3]。2015年我国科学家报道了一株分离自中国云南省 *Rousettus* 种果蝠的丝状病毒^[4],2019年1月该病毒被鉴定为丝状病毒新属种,即滇丝病毒属 (*Dianlovirus* 属) 勐腊病毒 (Mengla virus, MLAV)^[5]。MLAV与其他丝状病毒均依靠病毒囊膜表面糖蛋白 (glycoprotein, GP) 进入宿主细胞^[6],系统遗传学分析显示,MLAV-GP与其他丝状病毒GP具有较低同源性(22%~39%),其中与之亲缘关系最近的是MARV^[5](图1)。有研究显示,重组MLAV可感染多种属动物细胞,具有蝙蝠-人跨种传播可能性^[5]。MLAV是在我国发现的丝状病毒,而我国具有人口密集和人员流动性强的特点,一旦突发疫情则极有可能对公共安全和人类健康造成巨大危害。目前尚无针对MLAV药物研究的相关报道。

假病毒模型是研究有囊膜高危病毒的经典方法,靶点明确,安全性好^[7,8]。本课题构建了以GP介导的MLAV进入模型,并考察了不同组织来源的6株人源细胞和2株非洲绿猴肾细胞对MLAV的易感性。然后,本研究评价了4个可体外阻断EBOV和MARV进入,且体内药效学证实可显著降低EBOV感染小鼠死亡率的化合物(氯喹、粉防己碱、克罗米芬和托瑞米芬)^[9-14],发现氯喹可有效阻断MLAV进入宿主细胞, EC_{50} 为 $1.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与其抗EBOV和MARV活性相当。本研究发现了氯喹是MLAV进入阻断剂,将为抗新型丝状病毒勐腊病毒的药物研究提供参考。

材料与方 法

质粒和细胞 编码密码子优化的MLAV表面糖蛋白GP基因 (MLAV-GP, MLAV/CHN/2015株, GenBank KX371887.2) 由北京擎科新业生物技术有限公司合

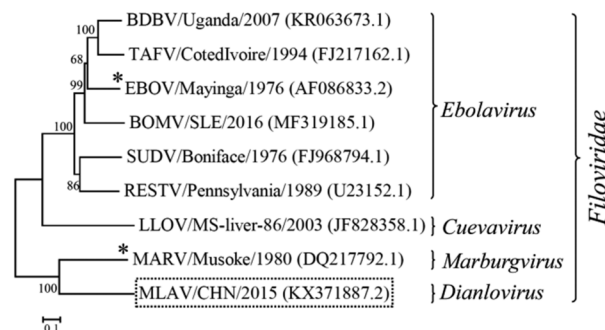


Figure 1 Phylogeny of filovirus based on amino acid sequences of glycoprotein (GP). The phylogenetic tree was generated by neighbor-joining method with 1 000 bootstrap replications using MEGA software; the numbers at the nodes indicated the bootstrap values; the scale bar indicated substitutions per site. Virus strains and their GP gene accession numbers are: *Ebolavirus* genus: Bundibugyo virus (BDBV, *Bundibugyo ebolavirus* species, Uganda/2007 strain, KR063673.1), Tai forest ebolavirus (TAFV, *Tai forest ebolavirus* species, Coted'Ivoire/1994 strain, FJ217162.1), Ebola virus (EBOV, *Zaire ebolavirus* species, Mayinga/1976 strain, AF086833.2), Bombali virus (BOMV, *Bombali ebolavirus* species, SLE/2016 strain, MF319185.1), Sudan virus (SUDV, *Sudan ebolavirus* species, Boniface/1976 strain, FJ968794.1), and Reston virus (RESTV, *Reston ebolavirus* species, Pennsylvania/1989 strain, U23152.1); *Cuevavirus* genus: Lloviu virus (LLOV, *Lloviu cuevavirus* species, MS-liver-86/2003 strain, JF828358.1); *Marburgvirus* genus: Marburg virus (MARV, *Marburg marburgvirus* species, Musoke/1980 strain, DQ217792.1); *Dianlovirus* genus: Mengla virus (MLAV, CHN/2015 strain, KX371887.2). Asteroids (*) denoted EBOV and MARV which are the most contagious filoviruses; the dashed square box denoted MLAV

成,并插入至pcDNA3.1/Myc-His A质粒载体;携带其他丝状病毒GP基因(EBOV-GP, EBOV/Mayinga/1976株, GenBank AF086833.2和MARV-GP, MARV/Musoke/1980株, GenBank DQ217792.1)的质粒为本室保存^[7]。携带荧光素酶报告基因的HIV-1核心质粒(pNL4-3. Luc.R'E-)和水泡性口炎病毒外壳糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)质粒由美国伊利诺伊大学Dr. Lijun Rong惠赠。人胚肾上皮细胞293T、人肺腺癌上皮细胞A549、人肝癌细胞HepG2、人脑胶质神经细胞U-87MG、人小肠癌细胞HIC、人结直肠腺

癌细胞 HCT-8、非洲绿猴肾细胞 Vero、非洲绿猴肾细胞 76 株 E6 克隆 VeroE6 购自国家实验细胞资源共享平台 (China Infrastructure of Cell Line Resource), 均按照细胞说明书进行培养和传代。

试剂和化合物 细胞裂解液、萤火虫荧光素酶检测试剂盒、CellTiter-glo 细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司; jetPRIME 转染试剂购自 Polyplus-transfection 公司; 蛋白预染分子量标准、限制性内切酶 *Kpn* I-HF 和 *Age* I-HF 购自 NEB 公司; λ DNA/*Hind* III Marker 购自 Fermentas 公司; 兔抗 6×His 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司; HIV-1 p24 抗原 ELISA 试剂盒和兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清和青链霉素双抗溶液购自 Invitrogen 公司; 粉防己碱 (tetrandrine, CAS# 518-34-3) 购自中国食品药品检定研究院; 磷酸氯喹 (chloroquine phosphate, CAS# 50-63-5)、柠檬酸托瑞米芬 (toremifene citrate, CAS# 89778-27-8) 和柠檬酸克罗米芬 (clomiphene citrate, CAS# 50-41-9) 购自上海陶素生化科技有限公司。

MLAV-GP 的蛋白表达检测 将 293T 细胞以 5×10^5 细胞数接种于 6 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。按照 jetPRIME 转染试剂说明书将羧基端连接有 6×His 标签的 MLAV-GP 质粒转染至 293T 细胞, 同时设置 293T 细胞空白对照组和转染 HIV-1 核心质粒对照组。转染 48 h 后, 弃去细胞上清, 裂解细胞并将细胞裂解物于 4 °C、13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将离心上清液收集于新管, 制备蛋白样品。通过蛋白免疫印迹方法检测 MLAV-GP 蛋白表达 (一抗: 兔抗 6×His 单克隆抗体; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG), 同时检测细胞内 β -actin 蛋白表达, 作为内参对照 (一抗: 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG)。

病毒的制备 将 293T 细胞以 3×10^6 细胞数接种于 100 mm 培养皿, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。按照 jetPRIME 转染试剂说明书共转染 5 μ g HIV-1 核心质粒 (pNL4-3.Luc.R⁻E⁻) 和 5 μ g MLAV-GP 质粒, 或仅 5 μ g HIV-1 核心质粒至 293T 细胞, 并于转染后 16 h 更换为新鲜细胞培养基。转染 48 h 后, 收集包含病毒颗粒的细胞上清, 并经 0.45 μ m 滤膜过滤, 分别将获得的 HIV/MLAV-GP 和 HIV-alone 病毒液进行病毒滴度检测, 并按照 HIV-1 p24 抗原 ELISA 试剂盒说明书测定并计算病毒原液的 p24 抗原浓度。同法制备 HIV/EBOV-GP、HIV/MARV-GP 和 HIV/VSV-G 病毒液。

HIV/MLAV-GP 的病毒包装检测 将 HIV/MLAV-GP 或 HIV-alone 病毒液轻轻铺层于 20% 蔗糖垫层溶液上, 于 4 °C、50 000 r·min⁻¹ 离心 2 h (Beckman Optima L-100XP), 弃上清, 将浓缩病毒重悬于冰 NTE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.5)。通过蛋白免疫印迹方法检测 HIV/MLAV-GP 浓缩病毒的 MLAV-GP (一抗: 兔抗 6×His 单克隆抗体; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG), 以 HIV-alone 浓缩病毒为对照。同时检测病毒颗粒的核心蛋白 HIV-1 p24, 作为内参对照 (一抗: 兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG)。

病毒滴度检测 将 293T 细胞以 2×10^4 细胞数接种于 48 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。将病毒液以不同稀释比 (1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 和 1:64) 感染细胞, 并于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h。弃去细胞上清并向细胞孔中加入 40 μ L 细胞裂解液, 于室温裂解细胞 10 min, 将 30 μ L 萤火虫荧光素酶底物与 30 μ L 细胞裂解液混合并于化学发光检测器 (Berthold Titertek) 测定细胞中荧光素酶活性, 以荧光素酶相对活性 (relative luciferase units, RLUs) 表示, 计算病毒原液滴度。

化合物药效学评价 将 293T 细胞以 2×10^4 细胞数接种于 48 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。以 DMSO 为溶剂配制粉防己碱、柠檬酸托瑞米芬和柠檬酸克罗米芬; 以灭菌水为溶剂配制磷酸氯喹。将不同浓度化合物加入细胞孔中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 15 min 后, 加入 HIV/MLAV-GP 病毒液或 HIV/EBOV-GP 病毒液或 HIV/VSV-G 病毒液, 病毒量为 0.5 ng·mL⁻¹ HIV-1 p24。将细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 弃去细胞上清并向细胞孔中加入 40 μ L 细胞裂解液, 于室温裂解细胞 10 min, 将 30 μ L 萤火虫荧光素酶底物与 30 μ L 细胞裂解液混合并于化学发光检测器 (Berthold Titertek) 测定细胞中荧光素酶活性, 以荧光素酶相对活性 (RLUs) 表示。以 DMSO 组 RLUs 为 100% 感染, 计算粉防己碱、托瑞米芬和克罗米芬的半数有效浓度 EC₅₀; 以灭菌水组 RLUs 为 100% 感染, 计算氯喹的 EC₅₀。

化合物的细胞毒性检测 将 293T 细胞以 8×10^3 细胞数接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。以 DMSO 为溶剂配制粉防己碱、柠檬酸托瑞米芬和柠檬酸克罗米芬, DMSO 为溶剂对照; 以 PBS 为溶剂配制磷酸氯喹, PBS 为溶剂对照。将不同浓度化合物加入细胞孔中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 48 h 后, 将 100 μ L CellTiter-glo 底物与 100 μ L 细胞上清混

合,于室温孵育 0.5 h,并于化学发光检测器 (Berthold Titertek) 测定细胞活力。以等量 DMSO 组细胞活力为 100%, 计算粉防己碱、托瑞米芬和克罗米芬的细胞活力; 以等量 PBS 组细胞活力为 100%, 计算氯喹的细胞活力。

数据分析及统计 应用 GraphPad Prism 软件进行数据分析, 通过病毒稀释度/荧光素酶活性数据得到病毒滴度曲线; 通过化合物浓度/感染率、浓度/细胞存活率数据作散点图并用非线性拟合得到相关系数和量效曲线, 计算 EC_{50} 。

结果与讨论

1 勐腊病毒进入模型的构建

1.1 编码 MLAV-GP 基因的质粒构建 将 MLAV-GP 基因 (GenBank KX371887.2, 长度 1 989 bp) 按照人密码子偏好进行基因序列优化^[15]并合成基因, 将 MLAV-GP 基因片段插入 pcDNA3.1/Myc-His A 质粒载体, 酶

切位点为 *Kpn I/Age I*, GP 基因 3' 端连有编码 6×His 标签的基因序列, 加标签后的 MLAV-GP 基因长度为 2 016 bp。MLAV-GP 质粒经测序及酶切鉴定正确。

1.2 MLAV-GP 的蛋白表达鉴定 丝状病毒 GP 是负责病毒进入的唯一蛋白, GP 经转录翻译后生成 GP0 前体, 经蛋白酶解加工生成成熟 GP 单体, 由 GP1 和 GP2 两个亚基组成^[16,17]。本课题通过转染 MLAV-GP 质粒至 293T 细胞, 48 h 后收获细胞并进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测 GP 蛋白表达。结果显示, MLAV-GP 样品可检测到分子质量为 100~135 kDa 和 25~32 kDa 的两个条带, 两个蛋白分别为 MLAV-GP0 前体和 MLAV-GP2 亚基 (图 2A), 提示 MLAV-GP 蛋白可正常表达。

1.3 HIV/MLAV-GP 假病毒的制备、病毒的包装及病毒滴度测定 通过共转染 MLAV-GP 质粒和 HIV-1 核心质粒至 293T 细胞, 获得 HIV/MLAV-GP 假病毒。在 HIV/MLAV-GP 病毒浓缩样品中可检测到 MLAV-GP 蛋

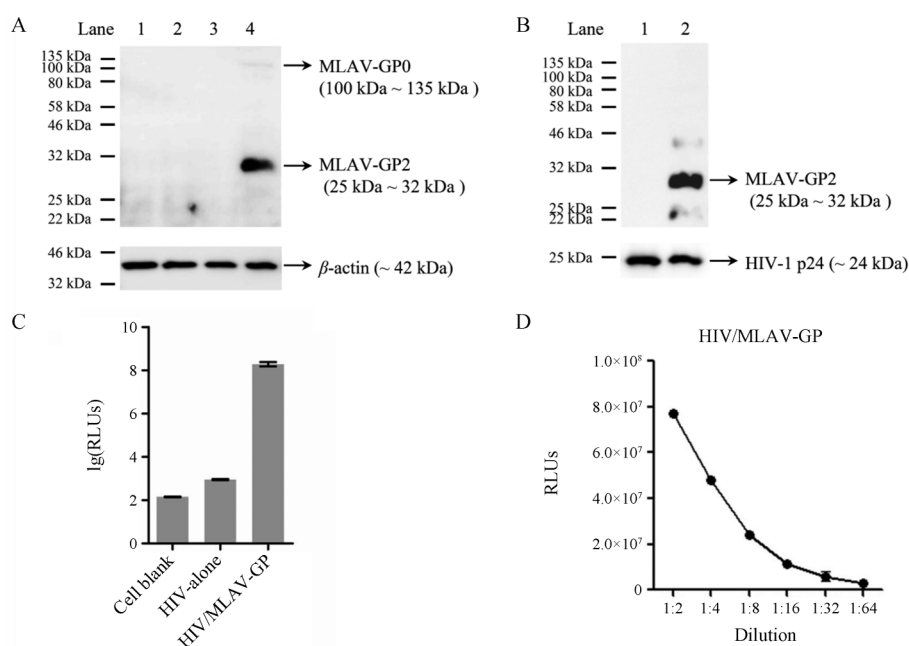


Figure 2 Establishment of HIV/MLAV-GP infection pseudovirus model. A: Identification of MLAV-GP expression. Lane 1: Blank, cell lysates of 293T cells alone; Lane 2: Mock, cell lysates of 293T cells transfected with HIV-1 plasmid; Lane 3: Mock, cell lysates of 293T cells transfected with vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) plasmid; Lane 4: Cell lysates of 293T cells transfected with MLAV-GP-His plasmid. The plasmid of HIV-1, VSV-G, or MLAV-GP-His was transfected to 293T cells respectively, after 48 h, cell lysates were harvested and detected by Western blot using anti-His monoclonal antibody as the primary antibody. The cellular β -actin expression was detected by anti- β -actin monoclonal antibody. Bands indicated MLAV-GP0, MLAV-GP2, and β -actin; B: Identification of HIV/MLAV-GP viral packaging. Lane 1: HIV-alone viral particles; Lane 2: HIV/MLAV-GP viral particles. The pelleted pseudoviruses were detected by Western blot using anti-His monoclonal antibody as the primary antibody. The HIV-1 p24 protein in the viral particles was detected by anti-HIV-1 p24 polyclonal antibody. Bands indicated MLAV-GP2 and HIV-1 p24; C: Infectivity of HIV/MLAV-GP pseudoviruses in 293T cells. The viruses were incubated with 293T cells, after 48 h, the infected cells were lysed and tested for luciferase activity. The HIV-alone pseudoviruses were tested simultaneously as control. RLU: Relative luciferase units; D: The dose-signal curve of HIV/MLAV-GP infection. The 293T cells were infected by indicated amount of HIV/MLAV-GP for 48 h, the infected cells were lysed and tested for luciferase activity

白(图2B),提示其囊膜包裹有MLAV-GP,可模拟MLAV进入过程。同时制备仅转染HIV-1核心的HIV-alone组,其囊膜无外壳蛋白包裹,可作为HIV/MLAV-GP感染的本底对照。由于病毒核心携带荧光素酶报告基因,因此可通过检测细胞中荧光素酶表达水平评价病毒感染。结果显示,HIV/MLAV-GP感染细胞的RLU达到 1×10^8 水平,比HIV-alone高10 000倍以上(图2C)。并且,HIV/MLAV-GP病毒的感染量与细胞中荧光素酶相对活性呈剂量依赖性关系(图2D),提示MLAV进入模型构建成功。

2 HIV/MLAV-GP对不同组织来源人源细胞和非人灵长类动物细胞的感染性研究

EBOV和MARV的感染可造成人体多组织器官损伤,包括肝脾坏死、急性肾小管坏死、全脑炎、肺出血、肠浸润等病变^[18]。为考察HIV/MLAV-GP对不同组织器官的感染性,本课题应用6株不同组织来源的人源细胞系和2株非洲绿猴肾细胞进行了病毒感染性检测,这8株细胞为:人肾组织细胞(293T)、人肺组织细胞(A549)、人肝组织细胞(HepG2)、人脑组织细胞(U-87MG)、人小肠组织细胞(HIC)、人结肠直肠组织细胞(HCT-8)和猴肾组织细胞(Vero和VeroE6)。结果显示,HIV/MLAV-GP对所检测的细胞均易感,报告基因信号强度较HIV-alone组(本底)高1 000~10 000倍,

与HIV/EBOV-GP和HIV/MARV-GP感染强度相当(图3),提示上述组织是MLAV的潜在感染靶器官,人类及非人灵长类动物有作为MLAV宿主的可能性。

3 应用HIV/MLAV-GP模型对已知抗EBOV和MARV化合物的药效学评价

自2014年西非埃博拉疫情暴发,针对EBOV的药物研究备受关注,全球多个团队针对EBOV进入环节研发药物。研究结果显示,磷酸氯喹^[10,11]、柠檬酸托瑞米芬^[12,13]、柠檬酸克罗米芬^[12,13]和粉防己碱^[14]可在体外有效阻断EBOV和MARV进入细胞,且体内药效学也证实上述4个化合物可显著降低EBOV感染小鼠死亡率。本课题针对这4个化合物,考察了它们是否可阻断MLAV-GP介导的病毒进入。如图4结果显示,氯喹可有效阻断HIV/MLAV-GP进入宿主细胞, EC_{50} 为 $1.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,与抗HIV/EBOV-GP和HIV/MARV-GP活性相当(EC_{50} : $1.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),与体外抗EBOV活病毒活性相似(EC_{50} : $4.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10,11])。粉防己碱是细胞双孔钙离子通道阻滞剂,有研究显示EBOV和MARV的膜融合过程依赖该通道,粉防己碱具有抑制EBOV和MARV膜融合活性^[14]。本研究也应用假病毒感染模型验证了该活性,其抗HIV/EBOV-GP和HIV/MARV-GP的 EC_{50} 分别为 $0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;研究显示粉防己碱对HIV/MLAV-GP感

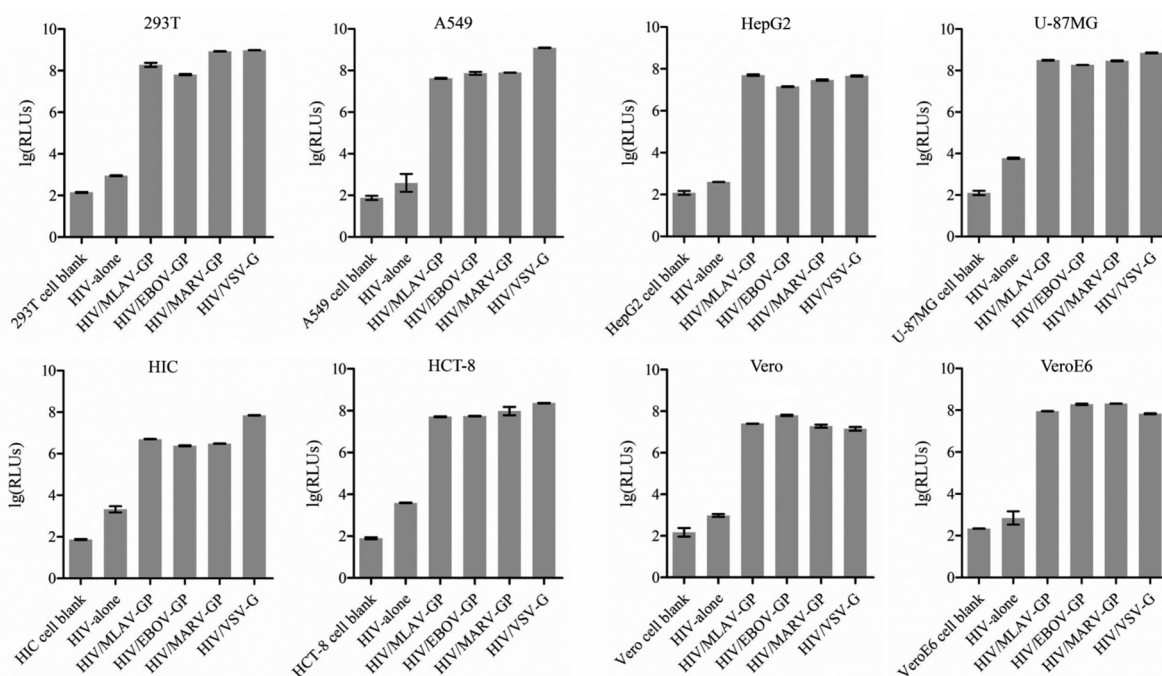


Figure 3 Infectivity of HIV/MLAV-GP in human and monkey cell lines. The human cell lines were human embryonic kidney cell line (293T), human lung adenocarcinoma cell line (A549), human liver hepatocellular carcinoma cell line (HepG2), human glioblastoma cell line (U-87MG), human small intestine cancer cell line (HIC), and human ileocecal colorectal adenocarcinoma cell line (HCT-8). The monkey cell lines were African green monkey kidney cell lines (Vero and VeroE6). Cells were infected with HIV-alone, HIV/MLAV-GP, HIV/EBOV-GP, HIV/MARV-GP, and HIV/VSV-G, respectively, and cells were lysed and tested for luciferase activity 48 h post-infection

染的抑制活性 (EC_{50} : $2.65 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与其抑制 HIV/VSV-G 感染活性相当 (EC_{50} : $2.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 弱于其抗 HIV/EBOV-GP 和 HIV/MARV-GP 活性, 提示 MLAV 感染宿主细胞的过程对细胞双孔钙离子通道的依赖性较低。克罗米芬在 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下无抗 MLAV 活性, 其抗 EBOV 和 MARV 的 EC_{50} 分别为 $0.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。托瑞米芬在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下无抗 MLAV 进入活性, 其抗 EBOV 和 MARV 的 EC_{50} 分别为 $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图4)。

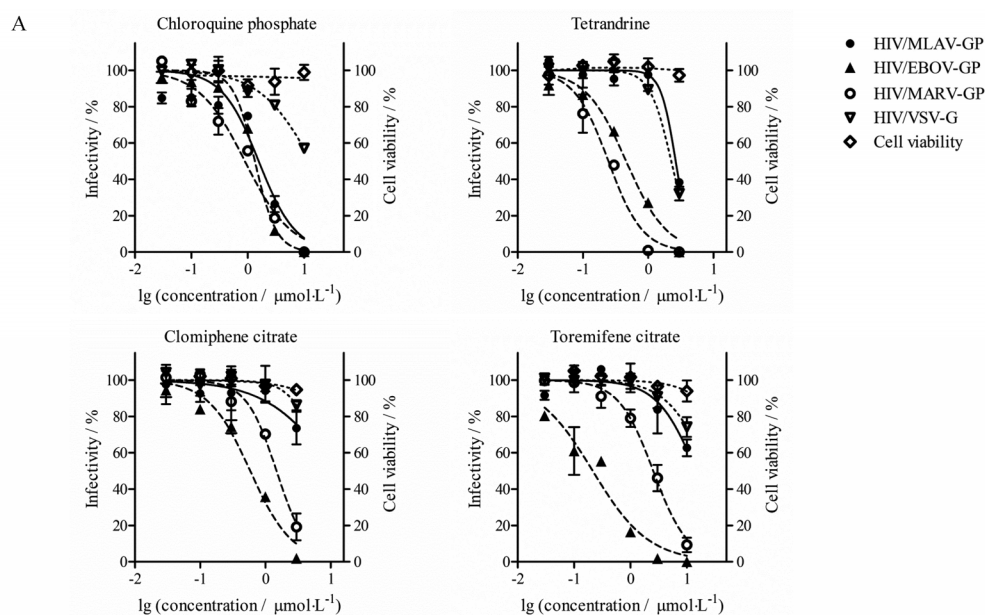
结合上述化合物的抗 MLAV 活性和它们阻断 EBOV 和 MARV 的机制, 本研究进行了如下分析:

① 氯喹可有效阻断 EBOV、MARV 和 MLAV 进入, 且活性近似。有报道氯喹作用于病毒进入细胞内体后的早期病毒颗粒转运过程, 通过将病毒滞留于早期内体并阻断其进入晚期内体/溶酶体, 从而抑制病毒膜融合过程^[10,11]。本结果提示, MLAV 的早期进入过程应与 EBOV 和 MARV 近似, 同时也提示了丝状病毒的胞内早期转运环节有可能是广谱抗丝状病毒药的

药靶。

② 粉防己碱对 HIV/MLAV-GP 感染的抑制活性 (EC_{50} : $2.65 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 弱于其抗 EBOV 和 MARV 的活性, 而其在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时可引起细胞变圆等细胞毒性现象, 故安全窗较小, 不建议将粉防己碱作为抗 MLAV 化合物进行后续研究。此外, 有报道显示, 粉防己碱阻断 EBOV 和 MARV 融合过程是通过作用于细胞双孔钙离子通道, 从而将 EBOV 或 MARV 滞留于晚期内体/溶酶体^[14]; 而本研究结果显示, 在相同剂量下, 粉防己碱不能阻断 HIV/MLAV-GP 的进入过程, 提示 MLAV 的进入对细胞双孔钙离子通道的依赖性较低。

③ 克罗米芬无显著抗 MLAV 活性。有研究显示克罗米芬作用于 EBOV 进入后期, 使病毒滞留于晚期内体/溶酶体, 可能通过干扰 NPC1 作用而抑制 EBOV 膜融合过程^[12,13]。MLAV 也通过与 NPC1 结合而进入宿主^[5], 但由于 MLAV-GP 与 EBOV-GP 的序列同源性低, 因此, 推测 MLAV-GP 的 NPC1 结合位点可能与 EBOV-GP 的 NPC1 结合位点有差异。由于克罗米芬



B

Compound	HIV/MLAV-GP		HIV/EBOV-GP		HIV/MARV-GP		HIV/VSV-G	
	EC_{50} / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EC_{50} / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EC_{50} / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EC_{50} / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	95% Confidence intervals/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Chloroquine phosphate	1.56	0.71-3.44	1.34	1.06-1.70	0.89	0.49-1.61	>10	-
Tetrandrine	2.65	2.13-3.28	0.46	0.31-0.69	0.25	0.16-0.38	2.27	1.99-2.58
Clomiphene citrate	>3	-	0.58	0.39-0.87	1.48	1.16-1.87	>3	-
Toremifene citrate	>10	-	0.21	0.11-0.42	2.53	2.12-3.02	>10	-

Figure 4 Effects of four compounds on HIV/MLAV-GP infection. A: Effect of chloroquine phosphate, toremifene citrate, clomiphene citrate, or tetrandrine on HIV/MLAV-GP infection. The HIV/EBOV-GP, HIV/MARV-GP, and HIV/VSV-G pseudoviruses were used as controls. Compounds were added to 293T cells at indicated concentrations 15 min prior to infection. Cells were lysed 48 h post-infection, and then the luciferase activity was measured. DMSO was used as the solvent control for toremifene citrate, clomiphene citrate, and tetrandrine; sterile water was used as the solvent control for chloroquine phosphate. The infectivity of solvent was defined as 100%; B: Summary of the antiviral activities of four compounds

EBOV-GP	1	MGVTGI LQLPRDRFKRTS FFLWVI LFRQRTFSI PLGVI HNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGGNV	75
MARV-GP	1 MKTTCFLI SLI LI QGT KN. LP I LEI AS NNQPQNVDVCS GTLQKTEDVHLMGFTLSGQKV	59
MLAV-GP	1 MALAKKYLRI FI I SHYFLSYNYGF FLPI VKLDI QPENEI I KSPCNGVVKKEDEHMLSLTLTGQKT	67
EBOV-GP	76	ATDVPS ATKRWGFRS GVP PKV VNYEAGEWAENCYNLEI KKPDPGSECLP AAP DGI RGF PRCRYVHKVSGT GP CAGD	150
MARV-GP	60	ADS PLE AS KRVAERT GVP PKNVEYTEEGEEAKTCYNI SVT DPS GKS LLLDPP TN RDY PKCKTI HHI OGQNPAAQG	134
MLAV-GP	68	ASDPNAASKRWAFKE GVL PKT VAFTEEGEEAKDCFNI SI VDLQGRS LLLLEAP SGI KDY PRC KSI HHI OGQNPAAHG	142
EBOV-GP	151	FAFHKE GAF FLYDRLASTVI YRGTTF AEGVVAFLI LPQAKKDFFS SHPLREPVNATEDPS SGVYSTTI RYQATCF	225
MARV-GP	135	I ALHLWGAF FLYDRI ASTTMYRGKVFTEGNI AAMV NKT VHKM F SRQGGYRHMNL TSTNKYWTS..... SNGT	204
MLAV-GP	143	NVLHLWGAF FLYDRI ASTTMTF KDKVFAEAGNVAAALV NKT VHHQI F KI NKI P QNETI GSCNHTY WRS..... DAGD	212
EBOV-GP	226	GTNETE YLF EVDNLT YVQLES RFT PQF LLOLINE TI YTS GKRS NTI GKL I WKVNP EI DTTI GEWAFWE. TKNLNR	299
MARV-GP	205	QTNDIGCFGALQEYNSTKNQT CAPSKI PPP LPTARPEI KLTS TPT DATKLNTTDPSS DDEDLATS GSGS GEREPH	279
MLAV-GP	213	GFNTLAVTNLAYVLSANESTKI F KMQQDRLRKR E NNT SSSLT LSP EAI SNS SDANSS ATI AYGT. S GAS I SA	286
EBOV-GP	300	KI RSEELSF TVVSNAGAKNI SGQSPARTSSDPGNTT TEDHKI MAS ENS SAMVQVHSQGREAAVSHL TLTATI STS	374
MARV-GP	280	TTS DAVTKQGLS STMPPTPSP QPS TPQQGNNT NHS ODAVTE LDKNNTAQPSMPHNTTIS TNN TSKHNF STL	354
MLAV-GP	287	TTRSATSTLTI TTDGQMS PPP TPAPPS PSLKPS TDDI KPTVLSTSS STRSKRSVT VAKQSS ANP TGQRGRGR	361
EBOV-GP	375	PQS LTT KP GPDNSTHNTVYKLDI SEATQVEQHRR TDNDS T ASDT..... PSATTAAGP PKAENTNTS KST	441
MARV-GP	355	SAPLQNTTNDNTQSTI TENEQTSAPSI TTLPPTGNP TTAKSTSSKKGPTT APNTTNEHF TSP PPTSS TAQHLV	429
MLAV-GP	362	KGPSTGTLTEEQI ERVR. . . MLI QKNVGRVNNYNLPI AGLT ALKK. . . . KRQVLETF SGEI EL EELI GDEKL	427
EBOV-GP	442	DFLDP. . . . ATTTSP QNHSETAGNN. NT HHQDTEGES ASS GKLGLI TNTI AGVAGLI T GRRTRREA	503
MARV-GP	430	YFRRRKRSI L WRE GDMFPF LDGLI NAPI DFDVPV NTKTI F DES SSS GAS AEE DQHASP NI S LTL SYF PNI NENTAY	504
MLAV-GP	428	DSR. FREN. LKM LETLRNE. SYSHF ELDI PKTAALKS PEE TDP. . . RI HMEYLGSGEEP I QS	484
EBOV-GP	504	I VNAQPKCNPNLHWITQDEGAAI GLAWI P YFGPAAEGI YI EGLMHNQDGLI CGLRQLANETTQAL QLF LRATTE	578
MARV-GP	505	SGENENDCAELHISWVOEDDLAAGLS WIPFFGPGI EGLYTAVLI KNQNNL VCR LRR LANQTAKS LELL LRVTTE	579
MLAV-GP	485	NQGTDTDCPSLHWITPNEEKLAAGVSWIPYFGPGAEGLYTMGLMGNQNDVVCR LRR LANQTAKS LELL LRVTTE	559
EBOV-GP	579	LRTFSI LNRKAI DFLLRWGGTCHI LGGDCCI EPHDWTKNI TDKI DQI I HDFVDKTL PDQGDNDNWWTG. WRQWI	652
MARV-GP	580	ERTFSLI NRHAI DFLLRWGGTCKVLGPDCCI GI EDLSKNI SEQI DQI KKDEQKE. GTGWGLGGKWWTS DWGVLT	653
MLAV-GP	560	ERTYSI I NRHAI DFLLARWGGTCRVLGPECCI GVEDLTKNI TDQI QQMRREQDE. YEGWKGGNWFNS QFGNWL	633
EBOV-GP	653	PAGI GVTGVI I AVI ALFCI CKFVF.	676
MARV-GP	654	NLGI LLLLSI AVLI ALSGI CRI FTKYI G.	681
MLAV-GP	634	NLGI LI FLFLGI I ALSQVCR LFMNLT VY	662

Figure 5 The protein-sequence alignments of EBOV-GP, MARV-GP, and MLAV-GP. The conserved amino acids were highlighted in grey; the square boxes and triangle-labels denoted the site mutations of amino acid residues which belong to the binding sites of toremifene with EBOV-GP

在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时出现细胞稀疏等细胞毒表现, 安全窗较小, 故不建议后续进行高剂量克罗米芬的抗 MLAV 活性研究。

④ 托瑞米芬无显著抗 MLAV 活性。已报道托瑞米芬可结合 EBOV-GP, 通过插入 GP1/GP2 之间的凹槽, 干扰 GP2 结构转换, 从而抑制病毒膜融合过程^[19]。氨基酸序列比对结果显示, MLAV-GP 中对应于托瑞米芬与 EBOV-GP 的作用域有 8 个关键氨基酸残基突变, 分别为 R64H、V66M、E100T、A101E、L186I、Y517I、T520P 和 D522E (图 5), 其中的 V66、L186 和 Y517 位是与托瑞米芬形成多处结合的重要位点。值得注意的是, 上述位点在 MARV-GP 中也出现了突变。根据活性检测数据, 托瑞米芬的抗 MARV 活性弱于其抗 EBOV 活性, 差异超过 5 倍, 提示托瑞米芬可特异性结合 EBOV-GP 并阻断 GP2 结构转换, 而关键氨基酸残基的突变导致托瑞米芬与 MARV-GP 结合力下降, 即阻断 MARV 膜融合活性下降; MLAV-GP 与 EBOV-GP 和 MARV-GP 的蛋白序列同源性低 (27% 和 39%), 推测其构象与 EBOV-GP 和 MARV-GP 的构象差异较大, 而这可能是引起托瑞米芬在高剂量时仍无法阻断 MLAV-GP 进入的原因。

综上所述, 本课题通过构建 MLAV 进入模型, 考

察了 MLAV 对不同组织来源的人源细胞和非洲绿猴肾细胞的感染性。通过对 4 个机制不同的 EBOV 和 MARV 进入阻断剂对 MLAV 进入过程进行活性评价, 发现氯喹可有效阻断 MLAV 进入宿主细胞, 而粉防己碱、克罗米芬和托瑞米芬均不推荐作为抗 MLAV 备选药物。本研究首次明确了氯喹的抗 MLAV 活性, 同时也提出了胞内早期转运环节有可能是广谱抗丝状病毒药物研究的药靶。另外, 进入抑制剂活性会受到 GP 位点突变的影响, 因此, 在研究进入抑制剂的同时, 针对丝状病毒复制等其他环节的抑制剂研究也将有助于抗新型丝状病毒药物的发现。

References

- [1] Knipe DM, Howley PM. Fields Virology [M]. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 923.
- [2] World Health Organization. Ebola Situation Report [EB/OL]. 2016-6-10. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep_10Jun2016_eng.pdf;jsessionid=0AB00EB43AF9C6B144F67307BCE6BC37?sequence=1.
- [3] Nyakarahuka L, Kankya C, Krontveit R, et al. How severe and prevalent are Ebola and Marburg viruses? A systematic review and meta-analysis of the case fatality rates and seroprevalence [J]. BMC Infect Dis, 2016, 16: 708.

- [4] He B, Feng Y, Zhang H, et al. Filovirus RNA in fruit bats, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 1675-1677.
- [5] Yang XL, Tan CW, Anderson DE, et al. Characterization of a filovirus (Měnglà virus) from Rousettus bats in China [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4: 390-395.
- [6] Martin B, Hoenen T, Canard B, et al. Filovirus proteins for antiviral drug discovery: a structure/function analysis of surface glycoproteins and virus entry [J]. *Antiviral Res*, 2016, 135: 1-14.
- [7] 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.
- [8] Tang K, Zhang XY, Chen Q, et al. Effects and mechanism of 3,5,6,7,4'-pentamethoxyflavone for blocking arenavirus entry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 838-845.
- [9] Kouznetsova J, Sun W, Martínez-Romero C, et al. Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry *via* a repurposing screen of approved drugs [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3: e84.
- [10] Madrid PB, Chopra S, Manger ID, et al. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e60579.
- [11] Madrid PB, Panchal RG, Warren TK, et al. Evaluation of Ebola virus inhibitors for drug repurposing [J]. *ACS Infect Dis*, 2015, 1: 317-326.
- [12] Johansen LM, Brannan JM, Delos SE, et al. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 190ra179 .
- [13] Shoemaker CJ, Schornberg KL, Delos SE, et al. Multiple cationic amphiphiles induce a niemann-pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e56265.
- [14] Sakurai Y, Kolokoltsov AA, Chen CC, et al. Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment [J]. *Science*, 2015, 347: 995-998.
- [15] Grote A, Hiller K, Scheer M, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: W526-W531 .
- [16] Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA, et al. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 5762-5767.
- [17] Volchkov VE, Volchkova VA, Ströher U, et al. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein [J]. *Virology*, 2000, 268: 1-6.
- [18] Martines RB, Ng DL, Greer PW, et al. Tissue and cellular tropism, pathology and pathogenesis of Ebola and Marburg viruses [J]. *J Pathol*, 2015, 235: 153-174.
- [19] Zhao Y, Ren J, Harlos K, et al. Toremfene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein [J]. *Nature*, 2016, 535: 169-172.