

环索奈德体外抑制寨卡病毒复制

姚债文^{1,2}, 汪芳^{2,3}, 陈秀秀^{1,2}, 郑昌博⁴, 杨柳萌², 熊思东^{1*}, 郑永唐^{2*}

(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/中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 3. 昆明理工大学医学院, 云南 昆明 650500; 4. 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)

摘要: 寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 是一种新发蚊媒传播病毒, 与胎儿严重先天性小脑畸形和成人格林-巴利综合征相关, 至今尚无批准用于治疗 ZIKV 感染的药物或预防性疫苗。本文通过噬斑和细胞毒性实验发现环索奈德 (ciclesonide) 体外具有较好的抗 ZIKV 活性, 其对 ZIKV 亚洲株 SZ01 和非洲株 MR766 的半数有效浓度 (50% effective concentration, EC₅₀) 分别为 (0.40 ± 0.22) 和 (1.59 ± 1.08) μmol·L⁻¹, 对 Vero 细胞的半数致死浓度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀) 为 (64.70 ± 7.33) μmol·L⁻¹; 病毒产量降低实验和蛋白印迹实验显示环索奈德能够抑制 ZIKV 复制。此外, 环索奈德还能够抑制 A549 细胞中 ZIKV 的复制; 分时给药实验结果表明环索奈德主要作用于 ZIKV RNA 的合成阶段; 进一步研究显示环索奈德还可抑制 ZIKV 的内化。本研究结果表明环索奈德是一种潜在的抗 ZIKV 药物。

关键词: 环索奈德; 糖皮质激素; 寨卡病毒; 抑制; 活性

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2911-07

Ciclesonide inhibits Zika virus replication *in vitro*

YAO Zhai-wen^{1,2}, WANG Fang^{2,3}, CHEN Xiu-xiu^{1,2}, ZHENG Chang-bo⁴, YANG Liu-meng²,
XIONG Si-dong^{1*}, ZHENG Yong-tang^{2*}

(1. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215021, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Peptides of Yunnan Province/Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. College of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 4. School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne virus that is associated with severe congenital brain malformations in the fetus and Guillain-Barré syndrome in adults. However, there are currently no drugs or preventive vaccines approved for ZIKV infection. Here, ciclesonide has been found significantly against ZIKV activity by plaque and cytotoxicity assays *in vitro*, and its 50% effective concentration (EC₅₀) to ZIKV SZ01 and MR766 are (0.40 ± 0.22) and (1.59 ± 1.08) μmol·L⁻¹, respectively. Its 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) to Vero cells are (64.70 ± 7.33) μmol·L⁻¹; Virus yield reduction and Western blot assays showed that ciclesonide can inhibit replication of ZIKV. In addition, ciclesonide can also inhibit the replication of ZIKV in A549 cells; the results of time of drug addition analysis indicated that ciclesonide mainly acts on the ZIKV RNA synthesis stage. Ciclesonide can also inhibit the internalization of ZIKV. These results indicated that ciclesonide is a potential drug against ZIKV.

收稿日期: 2020-05-09; 修回日期: 2020-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1902210); 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: 86-512-65881255, E-mail: sdxiong@shmu.edu.cn;

Tel: 86-871-65195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0703

Key words: ciclesonide; glucocorticoid; Zika virus; inhibition; activity

寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 是一种新发的蚊媒传播的 RNA 病毒, 1947 年首次在乌干达恩德培附近的寨卡森林中的恒河猴血清中分离得到^[1]。与登革病毒 (dengue virus, DENV)、西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV)、黄热病毒 (yellow fever virus, YFV) 和日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 等重要医学病毒一样, ZIKV 是属于黄病毒科 (*Flaviviridae*) 黄病毒属 (*Flavivirus*) 的单股正链 RNA 病毒, 主要通过蚊子叮咬传播^[2]。ZIKV 感染人体后, 一般表现为无症状感染且具有自限性, 少数感染者表现发热、头痛、关节痛、皮疹和结膜炎等临床症状^[3,4]。然而, 近年的研究表明 ZIKV 感染与神经系统疾病直接相关, 例如成人感染可导致格林-巴利综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS), 孕妇感染还可导致胎儿先天性小头畸形^[5-8]。2016 年 2 月, 寨卡疫情被世界卫生组织宣布为“国际关注的突发公共卫生事件”。虽然我国尚无本地病例, 但已有多起输入病例报道^[9], 与我国相邻的东南亚是蚊媒病毒感染性疾病疫情的多发区域, 广泛分布着 ZIKV 的主要传播媒介埃及伊蚊与白纹伊蚊, 需高度警惕 ZIKV 对我国的潜在威胁。

ZIKV 基因组全长约 11 kb, 包含 1 个开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码 1 个多聚蛋白^[10]。宿主和病毒蛋白酶将单个病毒多聚蛋白加工成 3 种结构蛋白, 即衣壳 (capsid, C)、前膜 (pre-membrane, prM) 和包膜 (envelope, E) 蛋白, 以及 7 种非结构蛋白 (non-structural protein, NS), 即 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5^[11]。结构蛋白在病毒颗粒形成、病毒结合、融合和进入宿主细胞等环节发挥重要作用, 非结构蛋白主要参与病毒复制、释放和逃逸宿主免疫反应^[12]。ZIKV 通过特异性受体介导的内吞作用进入细胞, 在此过程中, 酪氨酸蛋白激酶受体 AXL、Tyro3、DC-SIGN 和 TIM-1 等细胞表面受体介导并促进了 ZIKV 进入宿主细胞^[13], 形成包裹 ZIKV 颗粒的内体。然后, 内体中的酸性环境触发病毒 E 蛋白发生构象变化进而诱导 E 蛋白和内体发生膜融合, 从而使病毒基因组 RNA 释放到细胞质^[14,15]。

环索奈德 (ciclesonide) 是一种美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于临床的吸入型糖皮质激素, 常用于治疗成人和青少年的持续性哮喘^[16], 但至今未见环索奈德抗病毒活性的研究报道。本研究中, 作者发现环索奈德具有显著抗 ZIKV 活性并对其作用机制进行了初步研究, 期望为开发有

效的抗 ZIKV 药物提供科学依据。

材料与方法

化合物 环索奈德由江苏理工学院张大为博士提供; 表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 购自上海麦克林生化科技有限公司。化合物溶于 100% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 保存于 4 °C 备用。

细胞和病毒 Vero、A549、C6/36 和 Huh-7 等细胞为本实验室保存, 细胞培养于 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 或 RPMI1640 (Roswell park memorial institute medium 1640) 中。ZIKV 亚洲株 SZ-WIV01G (GenBank: KU963796, 简称 SZ01) 由武汉病毒研究所张波研究员惠赠。ZIKV 非洲株 MR766 (GenBank: LC002520) 由厦门大学程通副教授惠赠。DENV-2 (dengue virus 2, GenBank: KM204118.1) 由中国医学科学院医学生物研究所孙强明研究员惠赠。

主要试剂 培养基、磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS, Thermo Fisher 公司); 低熔点琼脂糖、SDS (sodium dodecyl sulfate) (Amresco 公司); 结晶紫 (北京索莱宝公司); MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide] (Sigma 公司); DMF (*N,N*-dimethyl formamine) (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™ Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 公司); 引物及 TaqMan 探针 (Takara 公司); ZIKV E 蛋白抗体 (Sinobiological 公司); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体 (北京康为世纪公司)。

病毒扩增和测定 ZIKV 感染 C6/36 白纹伊蚊细胞 2~4 h, 感染复数为 0.01。PBS 洗涤除去游离 ZIKV 病毒颗粒, 细胞在 80% 融合度下使用含 3% FBS 的 RPMI1640 培养基培养 5~7 天。观察细胞发生明显病变时, 收集细胞上清液, 4 °C、1 500×g 离心 10 min 去除细胞碎片。病毒保存于 -80 °C 备用。病毒滴度通过噬斑法测定, 计算噬斑形成单位/毫升 (plaque forming unit per mL, PFU·mL⁻¹)。

噬斑测定 实验方法参照^[17], Vero 细胞接种到 12 孔板上至 95%~100% 汇合, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。ZIKV 或 DENV-2 (50 PFU) 感染 2 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 1 mL 含有化合物的培养基 (4% FBS DMEM)

和 1 mL 琼脂糖并混合均匀。待其凝固完全后, 将培养板倒置于 37 °C 孵育 4 天。加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 然后加入 0.8% 结晶紫染色 10 min, 再次洗涤并干燥。使用酶联荧光点分光计 (Immunospot S6 Universal) 进行图像采集, 并计数噬斑。基于斑块的数量绘制剂量效应曲线, 计算半数有效浓度 (50% effective concentration, EC_{50})。

化合物毒性测定 将细胞接种在 96 孔板中并培养过夜, 加入不同浓度的化合物。在 37 °C 培养箱中孵育 72 h 后, 加入 20 μ L 5 mg·mL⁻¹ MTT, 37 °C 孵育 4 h。随后, 加入 100 μ L 的 12% SDS-50% DMF 溶液并在 37 °C 孵育过夜。待结晶甲胍完全溶解后, 使用 Elx800 酶标仪测量吸光度 (A) 值, 波长为 570 nm, 参比波长为 630 nm, 计算半数致死浓度 (50% cytotoxic concentration, CC_{50})。

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, Trizol 法提取细胞内的 RNA, 具体实验步骤遵循试剂盒说明书。利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测感染后上清液中释放的子代 ZIKV RNA。ZIKV SZ01 (500 PFU) 在 37 °C 下感染细胞 2 h, PBS 洗涤 3 次去除游离病毒, 然后加入不同浓度的化合物, 并使用 DMSO 和未感染的细胞分别作为阳性和阴性对照。感染 72 h 后, 收获细胞上清液, 使用 Roche high pure viral RNA kit 提取病毒 RNA。使用一步法试剂盒 RNA-direct™ Real-time PCR Master Mix 和 TaqMan 探针定量检测所产生的病毒 RNA。

Western blot 实验 Vero 细胞接种在 12 孔板中并培养过夜。细胞与 ZIKV MR766 (500 PFU) 在 37 °C 孵育 2 h, 然后加入 DMSO 或不同浓度的环索奈德继续培养至 48 h, 提取细胞内总的蛋白质。SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 分离总蛋白质, 转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 并与 ZIKV E 抗体一起孵育。用化学发光底物呈现特异性信号, 并使用 Tanon-5200 Multi Imaging System 记录和定量抗体信号。

分时给药实验 Vero 细胞接种在 24 孔板中并培养过夜。细胞与 ZIKV SZ01 (multiplicity of infection, MOI = 1) 在 4 °C 孵育 1 h, 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 次以去除未结合的病毒。分别在感染后 (0、1、2、4、6 和 12 h) 加入环索奈德, 然后分别在 4、6 和 12 h 撤去化合物。阳性对照组加入等量的 DMSO, 其余孔用新鲜培养基代替并保持至实验结束。感染 24 h 后, 收集细胞上清并提取 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 进行检测。

病毒结合 Vero 细胞接种在 12 孔板中并培养过

夜。在有或没有环索奈德的情况下, 将预冷的细胞与 ZIKV SZ01 (MOI = 1) 在 4 °C 孵育 1 h, EGCG 为阳性药物对照。感染 1 h 后, PBS 洗涤去游离病毒和残留化合物, 收集细胞用于随后的实时荧光定量 PCR。

病毒内化 Vero 细胞接种到 12 孔板上培养至 95%~100% 汇合, PBS 洗涤 2 次。细胞与 ZIKV SZ01 (300 PFU) 在 4 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 DMSO 或环索奈德 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤细胞 2 次, 并用 300 μ L 柠檬酸缓冲液 (pH = 3.0) 处理 1 min。除去柠檬酸缓冲液, 立即用含琼脂的 DMEM 培养基覆盖细胞, 用于随后的噬斑测定。

数据分析 根据实验结果绘制剂量反应曲线, 按 Reed & Muench 法计算出化合物的 EC_{50} 和 CC_{50} 。实验数据和作图均使用 GraphPad Prism8 软件进行处理, 表示为 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用独立性 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为其差异具有统计学意义。

结果

1 环索奈德抑制 ZIKV 不同毒株的感染

噬斑测定法测定环索奈德 (图 1A) 对 ZIKV 抑制活性。结果表明, 环索奈德能显著抑制 ZIKV 2 种毒株 SZ01 和 MR766 的感染并呈现量效关系 (图 1B、C)。环索奈德对 ZIKV SZ01 的 EC_{50} 值为 $(0.40 \pm 0.22) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 ZIKV MR766 的 EC_{50} 值为 $(1.59 \pm 1.08) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。环索奈德对 Vero 细胞的 CC_{50} 为 $(64.70 \pm 7.33) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1D)。通过 CC_{50}/EC_{50} 计算出环索奈德的治疗指数 (therapeutic index, TI) 分别为 162 和 41。

2 环索奈德抑制 ZIKV 复制

为进一步确定环索奈德抗 ZIKV 活性, 首先通过实时荧光定量 PCR 检测了环索奈德处理后对 ZIKV 复制的影响。结果显示, 环索奈德以剂量依赖性方式抑制 ZIKV 复制 (图 2A)。随后, 通过 Western blot 法检测了环索奈德对 ZIKV E 蛋白表达的影响。结果显示, 随着环索奈德浓度的增加, ZIKV E 蛋白的表达逐渐被抑制 (图 2B)。RNA 水平和蛋白水平检测结果进一步表明环索奈德具有显著的抗 ZIKV 感染和复制作用。

3 环索奈德抑制不同细胞中的 ZIKV 复制

Vicenti 等^[18]研究表明, ZIKV 可感染 A549 和 Huh7 细胞并有效复制。环索奈德在 Vero 细胞中具有较好的抗 ZIKV 活性, 为观察环索奈德在人源细胞中的抗病毒活性, 通过实时荧光定量 PCR 实验, 检测了环索奈德在 Huh-7 和 A549 细胞中的抗 ZIKV 活性。结果显示环索奈德在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著抑制 A549 细胞中的 ZIKV 复制 (图 3A)。环索奈德 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 A549 细胞几乎没有毒性, 而对 Huh-7 细胞则有较高的毒性。

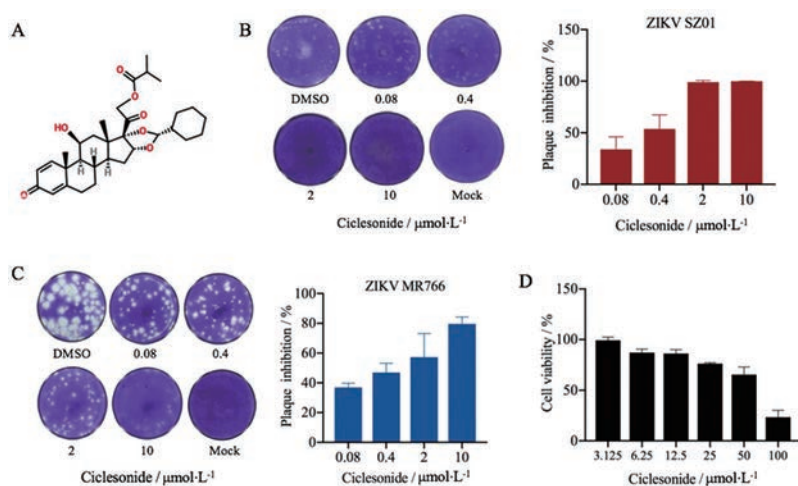


Figure 1 The inhibition of Zika virus (ZIKV) infection and cytotoxicity of ciclesonide. A: Structure of ciclesonide; B, C: The effect of ciclesonide on plaque formation induced by ZIKV SZ01 (B) and MR766 (C) in Vero cells by plaque assay; D: Cytotoxicity of ciclesonide in Vero cells by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide (MTT) assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. DMSO group: Virus infected cells; Mock group: Non-infected cells

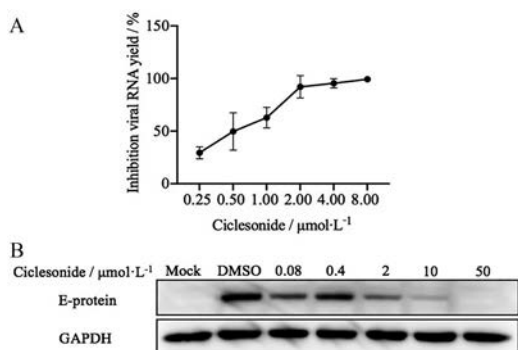


Figure 2 Ciclesonide inhibits ZIKV replication. A: The effect of ciclesonide on virus RNA yield of ZIKV SZ01 in Vero cells was quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR); B: The effect of ciclesonide on protein E expression of ZIKV MR766 in Vero cells was evaluated by Western blot. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

环索奈德属于糖皮质激素, 针对其抗病毒作用是否是糖皮质激素所共有的性质, 作者通过噬斑法检测了同属于糖皮质激素且应用较广泛的地塞米松 (dexamethasone) 对 ZIKV 的抑制作用。结果显示, 地塞米松无论是对 ZIKV SZ01 还是 MR766 均未表现出明显的抗病毒活性 (图 3B), 表明环索奈德可能不是通过激素途径发挥抗病毒作用的。另外, 还研究了环索奈德的结构类似物布地奈德 (budesonide) 对 ZIKV MR766 的抑制作用, 结果显示布地奈德以剂量依赖性抑制 ZIKV MR766 的复制 (图 3C), 提示环索奈德和布地奈德可能存在着一定的构效关系。

4 环索奈德抑制 ZIKV 生命周期的 RNA 合成阶段

在黄病毒感染复制的生命周期过程中, 0~2 h 为

结合进入阶段, 2~6 h 为病毒翻译阶段, 6~12 h 为 RNA 合成阶段, 12 h 以后可以检测到子代病毒组装和释放^[19,20]。为确定可能受环索奈德影响的 ZIKV 生命周期阶段, 进行了分时给药实验 (图 4A)。结果显示, 在 ZIKV 感染后 6 h, 加入 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环索奈德可显著抑制 ZIKV 的产生 (图 4B), 表明环索奈德主要作用于病毒 RNA 合成阶段。

5 环索奈德抑制 ZIKV 内化

为进一步阐明环索奈德是否影响病毒的结合和内化, 首先检测了环索奈德对病毒结合宿主细胞的影响。结果显示, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG (已知的 ZIKV 结合抑制剂, 图 5A) 和 ZIKV 共处理组与仅用 ZIKV 处理组之间观察到 ZIKV RNA 的显著差异, 这与文献报道一致^[21]; 而 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环索奈德和 ZIKV 共处理组与仅用 ZIKV 处理组之间未观察到 ZIKV RNA 的显著差异 (图 5B)。这些结果表明环索奈德不影响 ZIKV 与宿主细胞的结合。

已有研究表明氯喹可抑制 ZIKV 的内化^[22], 参照此方法, 检测了环索奈德对病毒内化的影响。与仅感染 ZIKV 的细胞相比, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环索奈德能够抑制约 90% 噬斑的形成 (图 5C), 表明环索奈德能够抑制 ZIKV 的内化。

6 环索奈德抑制 DENV-2 的复制

DENV 和 ZIKV 同属于黄病毒属, 且其感染后症状有相似之处, 因此检测了环索奈德的抗 DENV2 活性。随着环索奈德浓度的升高, 噬斑的形成逐渐被抑制, 环索奈德对 DENV2 的 EC_{50} 值为 $(1.52 \pm 0.62) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明环索奈德也能够抑制 DENV2 的复制 (图 6)。

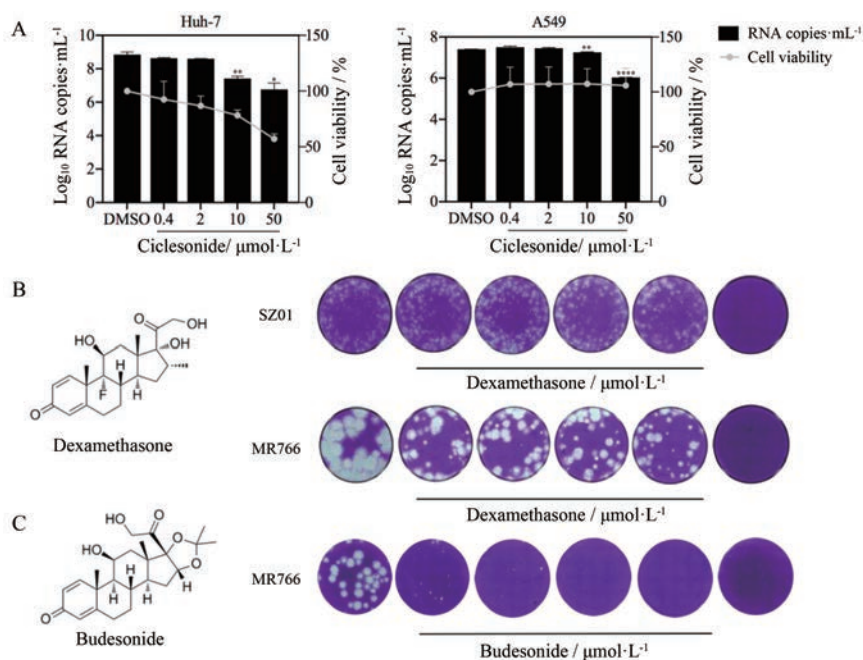


Figure 3 Ciclesonide inhibits ZIKV infection in different cell types. A: The effect of ciclesonide on the virus production of A549 and Huh-7 cells infected with ZIKV SZ01 was quantified by qRT-PCR; B, C: The effect of dexamethasone (B) or budesonide (C) on plaques induced by ZIKV SZ01 or MR766 in Vero cells was detected by plaque assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs DMSO group

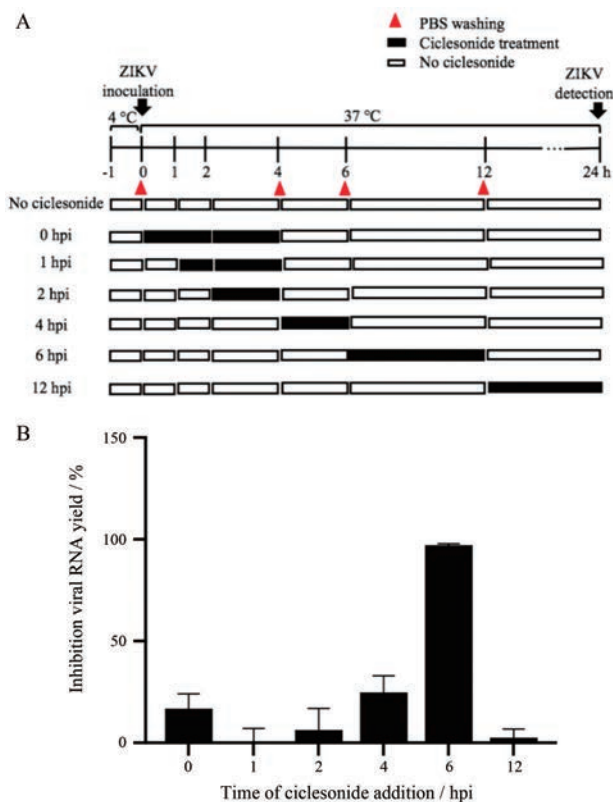


Figure 4 Ciclesonide mainly acts on the inhibition of the ZIKV SZ01 RNA synthesis stage. A: Schematic diagram of time of drug addition assay; B: The detection of the action stage of ciclesonide in Vero cells using time of drug addition assay was quantified by qRT-PCR. Each group was compared with DMSO. hpi: Hours post-infection

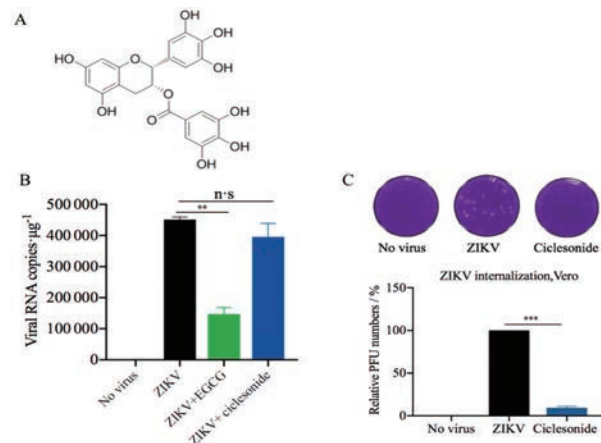


Figure 5 The effect of ciclesonide on viral binding and internalization. A: Structure of the epigallocatechin gallate (EGCG); B: The effect of ciclesonide on binding to the host cells (Vero cells) which infected with ZIKV SZ01 was quantified by qRT-PCR; C: The effect of ciclesonide on internalization of ZIKV SZ01 in Vero cells was detected by plaque assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. n-s: The difference is not statistically significant; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

讨论

ZIKV 感染是全球重大公共卫生问题。自 2015 年 ZIKV 在巴西大面积爆发后, 虽然已经筛选出了多种能够抑制 ZIKV 感染的活性小分子^[23,24], 但截至目前尚无有效的抗 ZIKV 药物和疫苗批准上市。为了有效地控制病毒的感染和传播, 研发强效且安全的抗 ZIKV 药物具有十分重要的现实意义。环索奈德是由德国

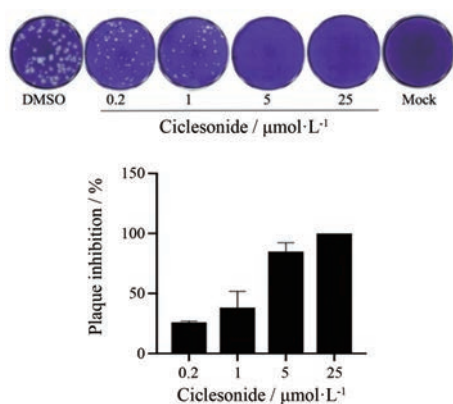


Figure 6 The effect of ciclesonide on the infection of dengue virus 2 (DENV2) in Vero cells was detected by plaque assay

Altana 公司开发的一种泼尼松龙的衍生物, FDA 已批准临床用于治疗哮喘、季节性变应性鼻炎和嗜酸性食管炎^[25,26]。至今未见环索奈德抗病毒活性的研究报道。

本文发现环索奈德具有抗 ZIKV 活性, 其对 ZIKV 亚洲株和非洲株的治疗指数分别为 162 和 41。环索奈德不仅能够抑制 ZIKV 所诱导的噬斑的形成, 还能够通过减少病毒产生和 ZIKV 包膜蛋白的表达显著抑制 ZIKV 感染。另外, 环索奈德处理还可抑制不同细胞系中的 ZIKV 感染。目前, 已发现多种靶向病毒结合、内吞、灭活或针对 ZIKV 复制的小分子抑制剂, 如多酚提取物、抗菌肽、阿莫地喹等。本文初步研究了环索奈德抗 ZIKV 活性机制, 分时给药实验结果显示环索奈德主要抑制 ZIKV RNA 合成阶段。通过进一步研究发现, 环索奈德不影响 ZIKV 结合而影响内化, 但其详细机制仍有待进一步研究。此外, 耐药性是抗 ZIKV 药物研发需要特别关注的问题^[27], 环索奈德抗 ZIKV 耐药突变株活性有待于验证。

孕妇感染 ZIKV 可导致胎儿严重的小头畸形, 因此阻止 ZIKV 垂直传播是感染孕妇治疗的主要目标。未怀孕的个体, 例如具有高并发症风险的个体, 也可能受益于抗 ZIKV 药物。与其他已知的蚊媒病毒不同, ZIKV 还可通过垂直传播和性途径传播^[28]。值得关注的是, 尽管 ZIKV 可能通过血液途径垂直传播, 但与被感染的男性进行性行为后上升的感染也可能将病毒转移至发育中的胎儿。因此, 研发可用于非妊娠人群的药物是防止 ZIKV 对公众健康造成危害的重要组成部分。环索奈德是一种广泛使用的抗哮喘药物, 其临床安全性已知, 因此它有可能用于治疗非孕妇个体中的其他感染。构建动物模型开展体内实验来评估环索奈德对 ZIKV 引起的先天性感染和胎儿死亡的保护效果很有必要。作者之前曾对环索奈德的体内实验进行过初步研究, 也成功建立了小鼠模型, 但由于环索奈德

临床试验给药方式大都以气雾喷入给药, 给药方式执行难度较大。另外, 环索奈德水溶性较差, 口服生物利用度极低 (仅有 1%), 静脉给药未能找到低毒且能溶解完全的溶剂, 腹腔给药的抗病毒体内药效结果不理想。

综上所述, 环索奈德在细胞水平上具有显著抗 ZIKV 活性, 机制初步研究表明环索奈德靶向病毒 RNA 合成阶段和病毒内化。本研究为深入研究环索奈德的精确靶点、构效关系以及研发有效的 ZIKV 防治药物奠定了基础。

作者贡献: 姚倩文和汪芳负责实验方案实施及实验数据采集整理; 陈秀秀和郑昌博负责指导实验操作; 杨柳萌负责材料支持; 熊思东和郑永唐负责实验设计和指导, 以及研究经费支持。

利益冲突: 本研究不存在研究者、伦理委员会成员、受试者监护人以及与公开研究成果有关的利益冲突。

References

- Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes [J]. *Nature*, 2018, 560: 573-581.
- Lazear HM, Diamond MS. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere [J]. *J Virol*, 2016, 90: 4864-4875.
- Joob B, Wiwanitkit V. Comment on article: "Zika, febrile disease?" [J]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2019, 56: 516.
- Chang DF, Wang X, He C, et al. Advances in study of Zika virus [J]. *Prog Microbiol Immunol* (微生物学免疫学进展), 2019, 47: 59-64.
- Oehler E, Watrin L, Larre P, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013 [J]. *Euro Surveill*, 2014, 19: 20720.
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study [J]. *Lancet*, 2016, 387: 1531-1539.
- Rivera-Correa J, de Siqueira IC, Mota S, et al. Anti-ganglioside antibodies in patients with Zika virus infection-associated Guillain-Barré syndrome in Brazil [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13: e0007695.
- Garcez PP, Lioila EC, Madeiro da Costa R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids [J]. *Science*, 2016, 352: 816-818.
- Zhou R, Shi X, Tian DF, et al. Establishment and application of a high-throughput screening model for Zika virus inhibitors [J]. *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2019, 14: 14-20.
- Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, et al. Mutational landscape of Zika virus strains worldwide and its structural impact on proteins [J]. *Gene*, 2019, 708: 57-62.
- Abrams RPM, Solis J, Nath A. Therapeutic approaches for Zika

- virus infection of the nervous system [J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14: 1027-1048.
- [12] Chen XX, Luo RH, Zheng CB, et al. The anti-ZIKV activity of tenofovir disoproxil fumarate *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1582-1587.
- [13] Li Z, Jia RF, Zhan P, et al. Progress on the discovery and development of anti-Zika virus agents [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 627-639.
- [14] Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5: 318-328.
- [15] Cortese M, Goellner S, Acosta EG, et al. Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories [J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 2113-2123.
- [16] Liddell BS, Oberlin JM, Hsu DP. Inhaled corticosteroid related adrenal suppression detected by poor growth and reversed with ciclesonide [J]. *J Asthma*, 2017, 54: 99-104.
- [17] Liu HM. Screening and Mechanisms Investigation of Inhibitors against Zika Virus (抗寨卡病毒药物筛选及作用机制的研究) [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
- [18] Vicenti I, Boccuto A, Giannini A, et al. Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds *in vitro* [J]. *Virus Res*, 2018, 244: 64-70.
- [19] Sreekanth GP, Panaampon J, Suttitheptumrong A, et al. Drug repurposing of *N*-acetyl cysteine as antiviral against dengue virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2019, 166: 42-55.
- [20] Chan JF, Chik KK, Yuan S, et al. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor [J]. *Antiviral Res*, 2017, 141: 29-37.
- [21] Clain E, Haddad JG, Koishi AC, et al. The polyphenol-rich extract from *psiloxylon mauritanium*, an endemic medicinal plant from reunion island, inhibits the early stages of dengue and Zika virus infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1860.
- [22] Li C, Zhu X, Ji X, et al. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents Zika virus infection and its associated congenital microcephaly in mice [J]. *EBioMedicine*, 2017, 24: 189-194.
- [23] Li YZ, Qi SJ, Xu YH, et al. Virtual screening, design, synthesis and biological activity of Zika virus inhibitors [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2019, 39: 786-792.
- [24] 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.
- [25] Chopra D, Bhandari B, Wardhan N. Ciclesonide-a novel corticosteroid for the management of asthma [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2012, 7: 73-77.
- [26] Jacobs RL. Ciclesonide for the treatment of seasonal allergic rhinitis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2011, 7: 735-741.
- [27] Lin G. Construction of Zika Virus Mutant Strain and Preliminary Screening of Attenuated Strain (寨卡病毒突变株的构建和减毒株的初步筛选) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2019.
- [28] Nicastrì E, Castillettì C, Liuzzi G, et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016 [J]. *Euro Surveill*, 2016, 21: 30314.