

寨卡病毒 RdRp 抑制剂的筛选及活性研究

张红娟[#], 陈 莹[#], 韩燕星, 林 媛^{*}, 蒋建东^{*}

(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, 北京 100050)

摘要: 寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 的流行会引起严重的公共卫生安全问题, 而目前暂没有针对 ZIKV 的疫苗或药物上市。在 ZIKV 的复制和转录过程中, RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 发挥了重要作用, 而人体内不含有 RdRp, 因此 RdRp 是一个具有潜力的抗 ZIKV 药物筛选靶标。本研究基于碱性磷酸酶偶联聚合酶荧光检测法建立了 ZIKV RdRp 抑制剂筛选模型, 对已上市抗感染化合物库进行筛选, 发现化合物奥替尼啶双盐酸盐 (octenidine dihydrochloride, OCT) 对 ZIKV RdRp 具有较好的抑制活性, 其半数抑制浓度 (a half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 $5.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。利用生物膜层干涉技术研究, 结果显示 OCT 能够与 ZIKV RdRp 发生特异性结合, 并具有较强的亲和力。在抗 ZIKV 实验中发现, OCT 对 ZIKV 的复制具有一定的抑制作用, 其半数有效浓度 (a half maximal effective concentration, EC_{50}) 为 $29.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上结果表明, 化合物 OCT 能够通过抑制 RdRp 活性发挥其抗 ZIKV 活性, 是一个具有开发潜力的抗 ZIKV 先导化合物。

关键词: 寨卡病毒; RNA 依赖的 RNA 聚合酶; 筛选模型; 抑制剂; 奥替尼啶双盐酸盐

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-2995-07

Screening and activity analysis of ZIKV RdRp inhibitors

ZHANG Hong-juan[#], CHEN Ying[#], HAN Yan-xing, LIN Yuan^{*}, JIANG Jian-dong^{*}

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The epidemic of Zika virus (ZIKV) raises critical public health and safety problems. However, there are currently no vaccines or drugs that are clinically approved for ZIKV infections. Since RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) plays an important role in replication and transcription of ZIKV and is absent in human beings, it is a potential drug screening target of anti-ZIKV agents. According to the fluorescence-based alkaline phosphatase-coupled polymerase assay method, we established the NS5 RdRp inhibitor screening model. Through screening from an anti-infection compound library, we found a compound octenidine dihydrochloride (OCT) that could inhibit ZIKV RdRp activity with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of $5.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Biolayer interferometry (BLI) assay showed that OCT could bind to ZIKV RdRp and had a strong affinity. Moreover, OCT exhibited an inhibitory effect on ZIKV replication with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of $29.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. All these results indicated that OCT had the anti-ZIKV activity by targeting ZIKV RdRp, and it is likely to be a promising lead compound against ZIKV.

Key words: Zika virus; RNA-dependent RNA polymerase; screening model; inhibitor; octenidine dihydrochloride

收稿日期: 2022-06-06; 修回日期: 2022-06-22.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-026).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-63017906, E-mail: linyuan@imm.ac.cn; jiang.jdong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0701

寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 属于黄病毒家族, 其传播方式主要包括蚊虫传播、性传播和母婴传播^[1]。1947年, ZIKV 首次在非洲乌干达恒河猴体内发现, 2007年在西太平洋密克罗尼亚群岛首次暴发, 患者出现了以皮疹、发热、关节炎、关节痛和结膜炎为主的临床症状^[2]。2015~2016年间, 在美洲暴发了大规模寨卡疫情, 48个国家和地区先后约70万人感染, 造成了大量孕妇感染导致的胎儿小头畸形和神经系统并发症^[3]。鉴于此次疫情的严重性, 2016年2月, 世界卫生组织宣布将其列为“国际关注的突发公共卫生事件”^[4]。

近年来, 科学家们针对抗 ZIKV 的疫苗或者药物展开了大量研究, 目前尚无有效的疫苗或药物上市, 多数集中在临床研究阶段, 以疫苗为主。而处于临床研究阶段的药物仅有2种, 分别为 Tyzivumab 和 ZIKV-IG, 均为抗体药物^[5]。Tyzivumab 是首个进入临床试验阶段的抗体药物, 通过阻碍病毒与宿主细胞的融合, 抑制 ZIKV 感染^[6]。ZIKV-IG 中含有的多克隆抗体能够针对不同抗原表位发挥作用, 从而抑制 ZIKV 感染^[7]。目前暂无抗 ZIKV 的靶向性小分子药物处于临床研究阶段。

ZIKV 的遗传物质为单股正链 RNA, 基因全长 10.8 kb^[8]。ZIKV 以 RNA 为模板进行转录、翻译得到多聚蛋白, 经过宿主和病毒蛋白酶切割为3个结构蛋白 (E、C 和 pr M) 和7个非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5) (图 1A)^[9]。其中, NS5 是分子质量最大的蛋白, 主要含有 N 端的甲基转移酶 (MTase) 和 C 端的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。RdRp 参与 ZIKV RNA 的复制与转录过程, 而人体中不含有 RdRp 或类似结构, 故 RdRp 是一个具有前景的抗 ZIKV 药物研究靶标^[10,11]。由于 RdRp 在 RNA 病毒中普遍存在, 其被广泛应用于抗病毒药物筛选靶标。以 RdRp 为靶标的抗病毒药物

研发取得了较大的成功, 包括抗丙肝病毒的索非布韦 (sofosbuvir)、抗新冠病毒的瑞德西韦 (remdesivir)、莫奈拉韦 (molnupiravir) 和阿兹夫定 (azvudine) 等^[12-15]。

本文以 ZIKV RdRp 为靶标, 构建 ZIKV RdRp 抑制剂的高通量筛选模型, 对已上市抗感染化合物库进行筛选, 得到化合物奥替尼啉双盐酸盐 (octenidine dihydrochloride, OCT)。OCT 对 RdRp 的活性具有较好的抑制作用, 同时也有一定的抗 ZIKV 活性, 为抗 ZIKV 药物研发提供一定参考。

材料与方法

仪器 PCR 仪购自 Applied Biosystem 公司; DNA 电泳仪购自北京市六一仪器厂; 高压灭菌锅购自重庆雅马拓科技有限公司; 恒温摇床购自 Eppendorf 公司; 低温高速离心机购自 Thermo Fisher Scientific 公司; ÄKTA 蛋白纯化仪购自 GE Healthcare 公司; 生物膜干涉仪购自 Pall 公司。

菌株与病毒株 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* Transetta (DE3) 购自北京全式金生物技术股份有限公司; ZIKV (SMGC-1) 毒株来源于中国科学院微生物研究所。

试剂 限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 购自宝日生物技术 (北京) 有限公司; T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物技术股份有限公司; pET30a 载体购自 Novagen 公司; DNA 提取试剂盒 Qiaprep Spin Miniprep Kit、RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; RNA 3'-UTR-A₃₀ 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; γ -(BBT)-ATP 购自 Jena Bioscience 公司; alkaline phosphatase, calf intestinal (CIAP) 购自 Promega 公司; Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit 试剂盒、生物素化标记试剂 NHS-LC-LC-Biotin 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; HisTrap FF crud 预装柱购自 GE Health-

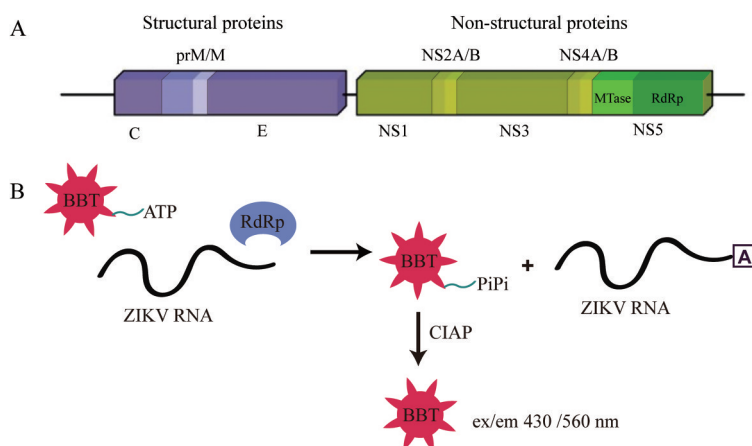


Figure 1 Zika virus (ZIKV) encoding gene and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity assay. A: Encoding gene of the ZIKV polyprotein; B: Schematic of principle for RdRp activity assay

care 公司; 已上市抗感染化合物库购自 MedChem Express。

质粒构建 ZIKV NS5 RdRp 的基因编码序列 (ZikaSPH2015; GenBank accession number KU321639.1) 由 Invitrogen 公司合成, 构建蛋白表达质粒 pET30a-RdRp, 含有酶切位点 *Kpn* I、*Hind* III。将质粒 pET30a-RdRp 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 得到菌株 pET30a-RdRp (DH5 α)。

ZIKV RdRp 蛋白表达与纯化 将质粒 pET30a-RdRp 转化到 *E. coli* Transetta (DE3) 感受态细胞中用于蛋白表达。将 pET30a-RdRp (Transetta) 4 mL 转接至 200 mL ZYM-5052 自诱导培养基 (ZY: 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物; 5052: 0.5% 甘油, 0.05% 葡萄糖, 0.2% α -乳糖; M: 25 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 25 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 50 mmol·L⁻¹ NH₄Cl, 5 mmol·L⁻¹ Na₂SO₄, pH 6.7; 2 mmol·L⁻¹ MgSO₄) 中, 37 °C、200 r·min⁻¹ 条件下扩增 3 h 后, 20 °C、130 r·min⁻¹ 继续培养 18~20 h 进行自诱导蛋白表达。收集菌体进行破碎、离心、过滤, 取上清利用 ÄKTA 进行蛋白纯化, 上样缓冲液为 25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 30 mmol·L⁻¹ imidazole, pH 7.8; 洗脱缓冲液为 25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 350 mmol·L⁻¹ imidazole, pH 7.8。将纯化得到的样品进行 SDS-PAGE 凝胶检测 (考马斯亮蓝染色)。

ZIKV RdRp 蛋白活性测定及条件优化 蛋白活性测定主要采用碱性磷酸酶偶联聚合酶荧光检测法进行检测。RNA 底物 3'-UTR-A₃₀ (5'-A₃₀-AACAGGUUC UAGAACCUGUU-3') 溶于缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8 和 150 mmol·L⁻¹ NaCl 溶于 0.1% DEPC 水) 中至终浓度为 200 μ mol·L⁻¹, 在 55~60 °C 下孵育 5 min, 放置室温冷却形成分子发夹。RdRp、RNA 和 γ -(BBT)-ATP 在反应缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7; 2 mmol·L⁻¹ DTT; 10 mmol·L⁻¹ KCl; 1 mmol·L⁻¹ MnCl₂) 中 37 °C 孵育 1 h, 然后加入终止缓冲液 (200 mmol·L⁻¹ NaCl; 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂; 1.5 mol·L⁻¹ DEA) 和 CIAP, 在激发/发射 430/560 nm 下进行检测。利用控制变量法对反应条件进行优化, 分别设置不同浓度的 RdRp 蛋白 (0~1.6 μ mol·L⁻¹)、 γ -(BBT)-ATP (0~9.6 μ mol·L⁻¹) 及不同检测时间点 (0~54 min) 进行检测。

ZIKV RdRp 抑制剂筛选模型的建立与筛选 根据 ZIKV RdRp 蛋白测活方法建立 ZIKV RdRp 抑制剂高通量筛选模型。将待测化合物 10 μ mol·L⁻¹ 与 0.2 μ mol·L⁻¹ RdRp 在室温孵育 30 min 后, 按照上述方法测定待测化合物对 RdRp 活性的抑制。3'-dATP 作为阳性对照化合物, DMSO 为空白对照, 评估高通量筛选模型的稳定性, 计算筛选模型的 Z' 因子。Z' = 1 - 3(S_p + S_B)/ μ_p -

μ_B , 其中 S_p、S_B 分别代表阳性对照组和空白对照组信号标准偏差, μ_p 、 μ_B 分别代表阳性对照组和空白对照组信号的平均值。利用已经建立好的高通量筛选模型对已上市抗感染化合物库中约 500 个化合物进行筛选。抑制率的计算公式为 $[(\Delta S_N - \Delta S_S)/(\Delta S_N - \Delta S_B)] \times 100$, 其中 ΔS_N 是指阴性对照 DMSO 孔信号值, ΔS_S 指样品孔信号值, ΔS_B 指不加酶的空白孔信号值。经过初筛和复筛得到对 RdRp 抑制较好的活性化合物, 同时检测不同浓度下的活性化合物对 RdRp 的抑制作用, 利用 GraphPad Prism 8.0 软件对化合物的抑制曲线进行拟合并计算半数抑制浓度 (a half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

ZIKV RdRp 与化合物的亲和力测定 利用生物膜层干涉技术 (biolayer interferometry, BLI) 检测化合物与蛋白的相互作用。将 RdRp 蛋白进行生物素化处理, 并用 PBST (含有 0.02% Tween-20 的 PBS) 稀释至 25 μ g·mL⁻¹。首先将 SSA 传感器浸入 PBS 缓冲液中预湿 10 min。然后, 将 SSA 传感器浸入到稀释后的 RdRp 中 10 min, 使 RdRp 结合到传感器上, 同时设置 SSA 传感器与 PBS 缓冲液结合组为空白对照。校准基线后与 PBS 稀释的不同浓度的 OCT 化合物 (0~400 μ mol·L⁻¹) 结合 60 s, 解离 60 s。使用 Forte Bio Data analysis 9.0 软件对数据进行分析, 以稳态方式进行拟合, 得到结合解离平衡常数 K_D 值, 若 R² \geq 0.95, 则检测显示有效。

抗 ZIKV 活性测定 用培养基稀释后的 ZIKV (SMGC-1) 毒株感染 Huh 7 细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 30 min。将不同浓度的化合物 OCT 加入感染后的细胞内, 同时设置 sofosbuvir 作为阳性对照药。置于 37 °C、5% CO₂ 条件下静置培养 36~48 h。根据 RNA 提取试剂盒说明, 提取细胞 RNA, 利用实时荧光定量 PCR 检测 ZIKV 包膜蛋白保守区域基因表达量, 进而反映病毒复制情况 (正向引物: 5'-TGCCCAACACAA GGTGAAGC-3', 反向引物 5'-CTCTGTCCACTAAYG TTCTTTTGC-3')^[16], GAPDH 作为内参 (正向引物: 5'-GGTGAAGTTCGGAGTCAACG-3', 反向引物: 5'-TGGGTGGAATCATATTGGAACA-3')。RNA 上样量为 50 ng, 在 48 °C 条件下逆转录 30 min, 95 °C 预变性 10 min, 之后 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火/延伸 1 min, 此过程进行 40 个循环, 最后 4 °C 终止反应。根据 $\Delta\Delta C_T$ 计算存活率, 利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行曲线拟合半数有效浓度 (a half maximal effective concentration, EC₅₀)。同时, 利用 CCK8 法检测细胞活力。将 Huh 7 细胞以 1 \times 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后加入不同浓度的化合物 OCT (0~50 μ mol·L⁻¹), 继续培养 24 h 后加入 CCK8 检

测试剂,用酶标仪在450 nm处测定其吸光度。

结果

1 ZIKV RdRp 蛋白表达与纯化

pET30a-RdRp (Transetta) 在 ZYM-5052 自诱导培养基中诱导表达,利用 SDS-PAGE 凝胶进行分析,经考马斯亮蓝染色后,结果显示上清和沉淀中均有目的蛋白表达。取上清利用 HisTrap 层析柱进行分离纯化,收集波峰处样品。SDS-PAGE 凝胶分析结果显示,纯化后的蛋白样品在分子质量约 72 kDa 位置具有单一条带且无明显杂质,与带有 His 标签的 ZIKV RdRp 蛋白分子质量相符,说明得到了目标蛋白 RdRp,且具有较高的纯度(图 2A)。

2 ZIKV RdRp 酶活测定体系的建立与条件优化

酶活测定主要采用碱性磷酸酶偶联聚合酶荧光检测方法(图 1B),利用 RdRp 催化 5'-单磷酸腺苷从 γ -(BBT)-ATP 上转移到 RNA 上,使 RNA 链延长同时生成副产物 BBT_{PPi} 。 BBT_{PPi} 在碱性磷酸酶 CIAP 的作用下裂解生成 BBT 和两个磷酸基团。通过检测激发/发射(430/560 nm)条件下的信号值来分析 BBT 的生成量,从而反映 RdRp 蛋白的活性。为了进一步明确 RdRp 酶活测定体系的实验条件,本研究分析了不同浓度 RdRp ($0 \sim 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、不同浓度 γ -(BBT)-ATP ($0 \sim 9.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和不同检测时间 ($0 \sim 54 \text{ min}$) 对酶活测定的影响。结果显示,随着 RdRp 浓度的增加,荧光值逐渐增强(图 2B); γ -(BBT)-ATP 呈现出与 RdRp 相当的浓度依赖性结果,随着 γ -(BBT)-ATP 浓度的增加,荧光值逐渐增强,当 γ -(BBT)-ATP 浓度为 $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反应逐渐趋于饱和(图 2C);随着反应时间的延长,反应进行得越充分,当反应时间为 30 min 时,反应趋于平衡(图 2D)。为了确保酶活测定过程中反应底物充足,并具有高灵敏度,因此确定反应体系中 RdRp 浓度为

$0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, γ -(BBT)-ATP 浓度为 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测时间为 30 min。最终的酶活测定方法为:在 96 孔黑色半孔板中加入 30 μL 反应缓冲液、 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RdRp 蛋白、 $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ RNA 和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ γ -(BBT)-ATP,混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h。然后,加入 20 μL 终止反应缓冲液和 $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIAP,室温孵育 30 min 后,在激发/发射(430/560 nm)处通过检测 BBT 释放量来反映 RdRp 活性。

3 化合物 OCT 对 ZIKV RdRp 的抑制作用

以 ZIKV RdRp 酶活测定方法为基础,建立 ZIKV RdRp 抑制剂高通量筛选模型。选取 3'-dATP 作为阳性对照。首先测定筛选模型的 Z' 因子,以 3'-dATP、DMSO 分别作为阳性对照和空白对照,计算得到筛选模型 Z' 因子约为 0.9,表明了该模型具有较高的稳定性和可信度(图 3A)。同时设定不同浓度梯度的 3'-dATP ($0 \sim 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),结果显示,随着 3'-dATP 浓度增加,对 RdRp 的抑制率逐渐增强,其 IC_{50} 为 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3B)。对已上市抗感染化合物库约 500 个化合物进行筛选,初筛选取抑制率大于 50% 的化合物,阳性率为 3%,约 15 个化合物,经过进一步复筛选取活性最好的化合物 OCT(图 3C)。检测不同浓度梯度的 OCT ($0 \sim 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 RdRp 活性的抑制作用,结果显示,随着化合物 OCT 浓度增加,对 RdRp 的抑制作用逐渐增强,测定其 IC_{50} 为 $5.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3D)。

4 利用生物膜层干涉技术测定化合物 OCT 与 ZIKV RdRp 的相互作用

生物膜干涉仪主要利用生物膜层干涉技术,实时监测分子间可逆的结合和解离造成干涉光谱图的位移变化^[17]。当 RdRp 与传感器结合后,依次与不同浓度的化合物 OCT 相互作用,结果显示,化合物 OCT 在 $0 \sim 400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间与 RdRp 的结合呈现明显的浓度依赖性,随着化合物浓度升高,结合响应信号值逐渐增加

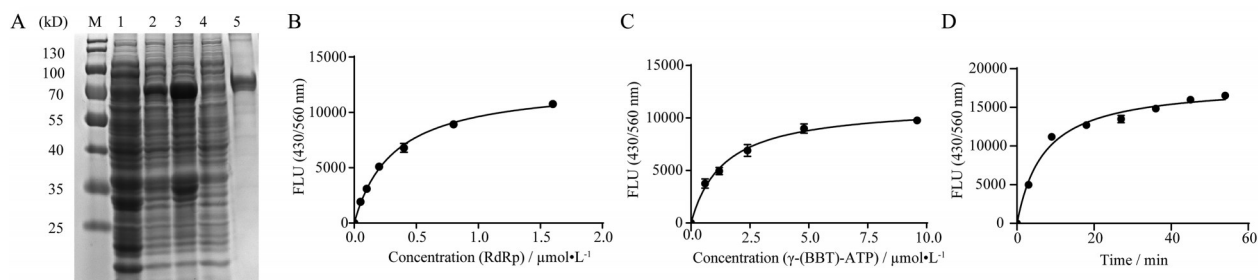


Figure 2 Optimization for RdRp activity assay. A: Purification and identification of RdRp by SDS-PAGE. Lane M: Protein ladder; Lane 1: Total cellular proteins without induced recombinant RdRp; Lane 2: Total cellular proteins containing induced recombinant RdRp; Lane 3: Sediment of cellular lysate containing induced recombinant RdRp; Lane 4: Supernatant of cellular lysate containing induced recombinant RdRp; Lane 5: Purified recombinant RdRp; B: Dose effect curve of RdRp; C: Dose effect curve of γ -(BBT)-ATP; D: Dose effect curve of reaction time

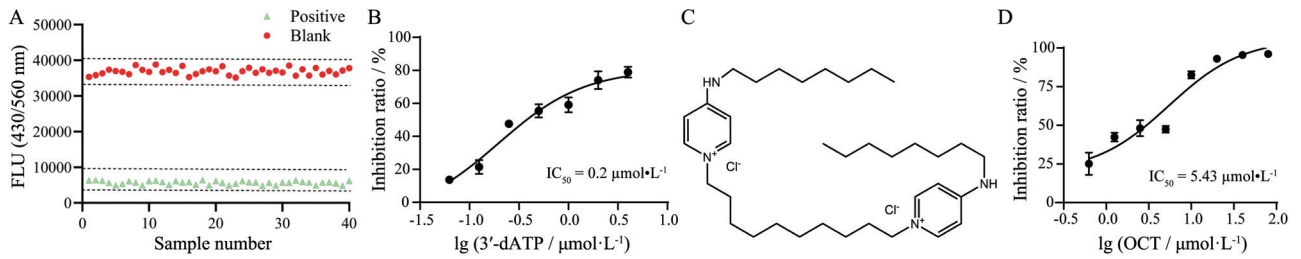


Figure 3 Evaluation and application of the screening assay. A: Z' factor of the screening assay for RdRp inhibitors; B: Inhibition of RdRp by the reference compound 3'-dATP, $IC_{50} = 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C: The structure of compound octenidine dihydrochloride (OCT); D: Inhibition of RdRp by compound OCT, $IC_{50} = 5.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

(图4), 说明了化合物 OCT 能够与 RdRp 蛋白特异性结合, 并具有较强的亲和力。 K_D 值为 $2.5 \times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, R^2 值为 0.994 7。

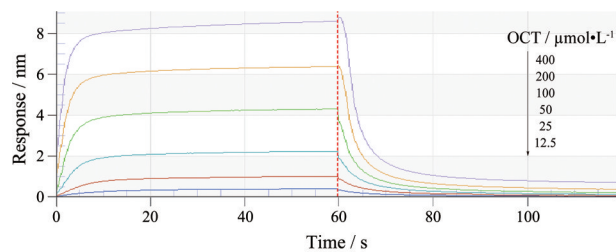


Figure 4 Bio-layer interferometry analysis of the interaction between OCT and RdRp

5 化合物 OCT 对 ZIKV 的抑制活性

利用 ZIKV (SMGC-1) 毒株感染 Huh7 细胞, 检测不同浓度 OCT ($0 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与阳性对照 sofosbuvir 对 ZIKV 复制的影响。RT-PCR 检测结果显示, 随着化合物 OCT 与 sofosbuvir 的浓度增加, 细胞中病毒 RNA 含量逐渐降低。化合物 OCT 与 sofosbuvir 的 EC_{50} 分别为 29.94 和 $4.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明化合物 OCT 具有一定的抗 ZIKV 活性 (图 5A)。CCK8 检测结果显示, 化合物 OCT 在相同浓度下, 几乎没有细胞毒性 (图 5B)。

讨论

目前, 以 ZIKV 功能性蛋白为靶标, 寻找其特异性抑制剂是抗 ZIKV 药物研发的重要方法。RdRp、MTase、NS2B、NS3 等蛋白是 ZIKV 中具有重要功能的蛋白, 以这些蛋白为靶点的研究, 取得了重要进展^[1]。RdRp 参与 ZIKV RNA 的复制和转录, 以此为靶点的药物包括索非布韦、加利司韦、利巴韦林、吐根碱等^[18-21]。MTase 参与病毒 RNA 的甲基化过程, 西奈芬净是一种 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的类似物, 能够与 MTase 的底物 SAM 竞争性结合 MTase, 从而抑制病毒的复制^[22,23]。NS2B-NS3 蛋白复合物影响 ZIKV 多聚蛋白的切割, 以其为靶点的药物包括新生霉素、溴隐亭、替莫泊芬

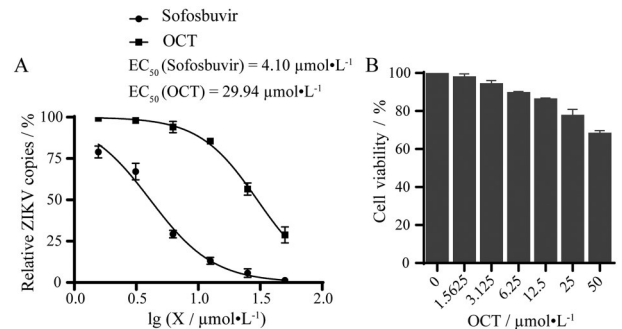


Figure 5 Anti-ZIKV activity and cytotoxicity of OCT. A: Inhibition of OCT on ZIKV replication; B: Cytotoxicity of OCT

等^[24-26]。NS3 蛋白具有蛋白酶、解旋酶和磷酸酶活性, 苏拉明能够与 NS3 解旋酶相结合, 阻碍病毒复制^[27]。除此之外, 氯喹通过升高内体 pH, 阻碍病毒膜与内体膜的融合, 干扰病毒的内吞过程, 从而在早期抑制 ZIKV 感染^[28]。虽然研究人员对抗 ZIKV 药物的研发不断深入, 但目前仍无针对 ZIKV 治疗的药物批准上市。

RdRp 在 RNA 病毒的复制和转录过程中发挥着重要的功能, 靶向 RdRp 的抑制剂可以有效地阻止病毒的增殖, 而高效的 RdRp 测活方法对于发现其抑制剂具有重要的作用。Min 等^[29]将 RdRp 表达质粒与 FLuc、NLuc 表达质粒共转染细胞, RdRp 参与 NLuc 报告基因的表达, 通过检测 NLuc 的表达测定 RdRp 活性, 同时 FLuc 的表达作为细胞活性指标, 此方法的优势在于检测 RdRp 活性的同时能够指示化合物对细胞的毒性作用, 但是瞬时转染过程影响因素多, 易造成转染效率不稳定, 进而导致样品间差异较大, 重复性较差。Bertolin 等^[30]开发了一种基于链置换技术的 RdRp 活性测定方法, 链置换主要是指在 RdRp 作用下, RNA 链延伸, 下游的荧光淬灭基团被取代, 通过检测 Cy3 荧光基团的发光强弱反映 RdRp 活性, 此方法具有较高的灵敏度, 可在溶液中直接进行检测, 但荧光染料易发生聚集, 影响检测结果。Wang 等^[31]利用同位素标记技术, 标记 RdRp 反应底物 [α - ^{32}P] UTP, 通过检测反应产物的放射性强度测定 RdRp 活性, 该方法灵敏度高、定位准确,

但是放射性同位素对人体具有一定的伤害。而本实验基于碱性磷酸酶偶联聚合酶荧光检测建立了 RdRp 活性测定方法, 该方法特异性强, 稳定易操作, 灵敏度高, 且无生物安全问题。由于在 SARS-CoV-2 的复制和转录过程中, RdRp 同样发挥了重要作用^[32], 因此, 本研究的 RdRp 活性测定方法不仅为抗 ZIKV 药物研究提供了技术支持, 同时也为抗 SARS-CoV-2 药物的发现与机制探索提供了一定的参考。

OCT 是一种阳离子表面活性剂, 可用于皮肤黏膜和伤口的消毒与治疗^[33]。由于 OCT 对病原体具有非特异性作用, 能够与细胞壁和细胞膜形成强烈的物理相互作用, 使细胞完整性被破坏, 因此具有广谱的抗菌作用, 包括抗革兰阳性菌、革兰阴性菌、衣原体、支原体和真菌^[33,34]。除此之外, OCT 还能够通过影响 HSP90 抑制癌细胞的生长和繁殖^[35]。在抗病毒作用方面, OCT 与苯氧乙醇联用可以快速降低口腔内 SARS-CoV-2 的 RNA 水平^[36]。然而, 目前还没有 OCT 抗 ZIKV 活性的报道。

综上所述, 本实验建立了 ZIKV RdRp 抑制剂的高通量筛选模型, 通过对已上市抗感染化合物库进行筛选, 得到化合物 OCT。进一步研究发现, 化合物 OCT 与 RdRp 具有较好的亲和力, 并对 ZIKV 具有一定的抑制活性。在今后的研究中, 本课题组希望对 OCT 的作用机制进行进一步的深入研究, 同时, 通过化学修饰、结构改造等方法, 增强 OCT 的活性, 使其成为更有效的抗 ZIKV 先导化合物。此外, 本研究所建立的 ZIKV RdRp 抑制剂筛选方法, 也为抗 SARS-CoV-2 的药物研发提供了一定参考。

作者贡献: 张红娟和陈莹负责实验操作和数据整理; 林媛和陈莹负责论文的撰写; 林媛、蒋建东和韩燕星负责课题设计和论文修改工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- Bernatchez JA, Tran LT, Li J, et al. Drugs for the treatment of Zika virus infection [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 470-489.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360: 2536-2543.
- Ikejezie J, Shapiro CN, Kim J, et al. Zika virus transmission - region of the Americas, May 15, 2015-December 15, 2016 [J]. *Am J Transplant*, 2017, 66: 1681-1686.
- Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO [J]. *BMJ*, 2016, 352: i657.
- 28 Studies found for: ZikV | Phase 1,2,3,4 [DB/OL]. Clinical-Trails gov. [2022-05-10]. https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=ZikV&age_v=&ndr=&type=&rslt=&phase=0&phase=1&phase=2&phase=3&Search=Apply.
- Dibo M, Battocchio EC, Dos Santos Souza LM, et al. Antibody therapy for the control of viral diseases: an update [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20: 1108-1121.
- White J, Tunga P, Anderson DM, et al. Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of anti-Zika virus immunoglobulin [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2021, 105: 1552-1562.
- Baz M, Boivin G. Antiviral agents in development for Zika virus infections [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12: 101.
- Zhao B, Yi G, Du F, et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14762.
- Ramharack P, Soliman MES. Zika virus NS5 protein potential inhibitors: an enhanced *in silico* approach in drug discovery [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2018, 36: 1118-1133.
- Anusuya S, Velmurugan D, Gromiha MM. Identification of dengue viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor using computational fragment-based approaches and molecular dynamics study [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2016, 34: 1512-1532.
- Rubino C, Trapani S, Indolfi G. Sofosbuvir/velpatasvir for the treatment of hepatitis C in pediatric patients [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15: 1097-1105.
- 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.
- Yin W, Mao C, Luan X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir [J]. *Science*, 2020, 368: 1499-1504.
- Imran M, Kumar Arora M, Asdaq SMB, et al. Discovery, development, and patent trends on molnupiravir: a prospective oral treatment for COVID-19 [J]. *Molecules*, 2021, 26: 5795.
- 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.
- Sultana A, Lee JE. Measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions by biolayer interferometry [J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2015, 79: 19.25.11-19.25.26.
- Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2017, 137: 134-140.
- 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.
- Kamiyama N, Soma R, Hidano S, et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication *in vitro* and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice [J]. *Antiviral Res*, 2017,

- 146: 1-11.
- [21] Yang S, Xu M, Lee EM, et al. Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry [J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 31.
- [22] Zhang J, Zheng YG. SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 583-597.
- [23] 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.
- [24] Yuan S, Chan JF, Den-Haan H, et al. Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antiviral Res*, 2017, 145: 33-43.
- [25] 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.
- [26] Li Z, Brecher M, Deng YQ, et al. Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction [J]. *Cell Res*, 2017, 27: 1046-1064.
- [27] Tan CW, Sam IC, Chong WL, et al. Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2017, 143: 186-194.
- [28] Shiryayev SA, Mesci P, Pinto A, et al. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika virus treatment and prophylaxis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 15771.
- [29] Min JS, Kim GW, Kwon S, et al. A cell-based reporter assay for screening inhibitors of MERS coronavirus RNA-dependent RNA polymerase activity [J]. *J Clin Med*, 2020, 9: 2399.
- [30] Bertolin AP, Weissmann F, Zeng J, et al. Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of NSP12/7/8 RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Biochem J*, 2021, 478: 2425-2443.
- [31] Wang QM, Johnson RB, Chen D, et al. Expression and purification of untagged full-length HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Protein Expr Purif*, 2004, 35: 304-312.
- [32] Arya R, Kumari S, Pandey B, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433: 166725.
- [33] Assadian O. Octenidine dihydrochloride: chemical characteristics and antimicrobial properties [J]. *J Wound Care*, 2016, 25: S3-S6.
- [34] Malanovic N, Ön A, Pabst G, et al. Octenidine: novel insights into the detailed killing mechanism of gram-negative bacteria at a cellular and molecular level [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56: 106146.
- [35] Li L, Yang M, Li C, et al. Virtual screening based identification of miltefosine and octenidine as inhibitors of heat shock protein 90 [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394: 2223-2232.
- [36] Smeets R, Pfefferle S, Büttner H, et al. Impact of oral rinsing with octenidine based solution on SARS-CoV-2 loads in saliva of infected patients an exploratory study [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19: 5582.