

基于细胞的TMPRSS2抑制剂高通量筛选模型建立与应用

尤宝庆, 周雯雯, 李妍, 张晶*, 司书毅*

(中国医学科学院、北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 跨膜丝氨酸蛋白酶2 (transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) 是人体中广泛存在的细胞表面蛋白, 参与严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 等多种病毒的感染和前列腺癌细胞侵袭、肿瘤生长和转移过程等。本研究使用 Boc-Gln-Ala-Arg-AMC 作为表征 TMPRSS2 切割活性的底物, 在过表达 TMPRSS2 的 Vero E6 细胞 (Vero E6/TMPRSS2) 中建立了 TMPRSS2 抑制剂细胞筛选模型, 通过对国家新药 (微生物) 筛选实验室天然与合成化合物纯品库进行高通量筛选, 得到了7个具有 TMPRSS2 抑制活性的低毒化合物。表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 检测证明所得抑制剂均可与 TMPRSS2 发生中等强度的结合, 且呈现浓度依赖性; 细胞-细胞融合实验表明, 所得抑制剂可通过抑制 TMPRSS2 切割 SARS-CoV-2 S 蛋白, 抑制 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞融合的发生, 呈现浓度依赖性; 假病毒活性评价结果显示, 小分子抑制剂对野生型 SARS-CoV-2 假病毒感染 Opti-HEK-293T-ACE2 受体细胞表现出不同程度的抑制活性。本研究成功建立了细胞模型用于 TMPRSS2 抑制剂的高通量筛选, 并初步证实筛选所得的抑制剂具有体外抗 TMPRSS2 活性的作用, 为抗 SARS-CoV-2 的新药研发提供了新结构骨架。

关键词: 严重急性呼吸综合征冠状病毒2; 跨膜丝氨酸蛋白酶2; 高通量筛选模型; 表面等离子共振; 细胞-细胞融合

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)12-3273-09

Establishment and application of a cell-based high-throughput screening model for TMPRSS2 inhibitors

YOU Bao-qing, ZHOU Wen-wen, LI Yan, ZHANG Jing*, SI Shu-yi*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) is a cell surface protease widely present in the human body. It is involved in the infection of various viruses such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and in the cell invasion, tumor growth and metastasis processes of prostate cancer. This study used Boc-Gln-Ala-Arg-AMC as the fluorescent substrate to determine the cleavage activity of TMPRSS2 towards SARS-CoV-2 S protein. Then cell-based screening model for TMPRSS2 inhibitors was established in Vero E6 cells overexpressing TMPRSS2 (Vero E6/TMPRSS2). Seven compounds exhibiting TMPRSS2 inhibitory activities with low toxicity were obtained through high-throughput screening (HTS) from natural and synthetic compound pure product library of National Center for Screening Novel Microbial Drugs. Surface plasmon resonance (SPR) has shown that the obtained inhibitors could bind to TMPRSS2 with moderate affinity in a dose dependent manner. Cell-cell fusion experiments have shown that the obtained inhibitors can

收稿日期: 2024-05-30; 修回日期: 2024-09-29.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2021-I2M-1-054).

*通讯作者 Tel: 86-10-63180623, E-mail: jingjing-506@hotmail.com;

Tel: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0518

inhibit the occurrence of S protein mediated cell-cell fusion by inhibiting TMPRSS2 cleavage of SARS-CoV-2 S protein in a concentration dependent manner. Preliminary pseudovirus experiment showed that the inhibitors may reduce the pseudovirus infection into Opti-HEK-293T-ACE2 cells to varying degrees. In a word, this study successfully established a cell-based HTS model for TMPRSS2 inhibitor and preliminarily confirmed that the seven screened inhibitors possessed *in vitro* anti-TMPRSS2 activities, providing new structural scaffolds for the development of new drugs against SARS-CoV-2.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; transmembrane serine protease 2; high-throughput screening model; surface plasmon resonance; cell-cell fusion

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是 2019 年末发现的新型冠状病毒, 自发现至今, SARS-CoV-2 已在全球范围内造成超 7 亿人感染, 超 700 万人死亡 (<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>), 对全民健康造成了严重危害。

跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) 是人体中广泛存在的细胞表面蛋白, 主要在前列腺中表达, 同时在肺、结肠、肝脏、肾脏和胰腺中也有分布^[1], 参与多种疾病的发生发展过程。在 SARS-CoV-2 感染过程中, TMPRSS2 通过对 SARS-CoV-2 刺突蛋白 (spike protein, S) S2' 位点的切割, 参与病毒与宿主细胞的膜融合过程^[2-4]。除 SARS-CoV-2 外, TMPRSS2 还参与了多种病毒的感染过程, 包括引发了全球大流行性疾病的非典型肺炎病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒^[5]、其他冠状病毒如 HCoV-HKU1^[6] 和 HCoV-229E^[7]、流感病毒如 H1N1、H7N9^[1,8] 和人类偏肺病毒^[9]等。因此, 作为病毒侵入过程中的重要作用靶点, 筛选 TMPRSS2 抑制剂将有助于发现广谱抗病毒药物。此外, TMPRSS2 在前列腺癌细胞侵袭、肿瘤生长和转移过程中均起重要作用^[10]。

TMPRSS2 可水解荧光底物 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC acetate) 产生游离的 7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methylcoumarin, AMC), 被释放的 AMC 的荧光可在激发波长 (E_x) 340 nm、发射波长 (E_m) 440 nm 的条件下被酶标仪检测到, 通过 96 孔板中荧光强度的变化判断 TMPRSS2 的活性变化, 目前此方式已广泛应用于 TMPRSS2 抑制剂的活性评价^[11-13]。本研究选择此荧光底物作为活性指示标记建立 TMPRSS2 抑制剂细胞筛选模型, 对国家新药 (微生物) 筛选实验室天然与合成化合物纯品库进行高通量筛选, 获得了 7 个具有 TMPRSS2 抑制活性的化合物, 并对筛选所得抑制剂进行了初步的体外活性评价, 以期对病毒感染或抗前列腺癌药物的发现提供新思路。

材料与方法

试剂与材料 过表达 TMPRSS2 的 Vero E6 细胞 (Vero E6/TMPRSS2) 购自 Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, 使用 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1% 青霉素混合液和 2% 遗传霉素 (geneticin, G418) 的 DMEM 培养; HEK-293T-ACE2 过表达细胞 (货号 41107ES03) 购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 使用 10% FBS、1% 青霉素混合液和 0.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素的 DMEM 培养; HEK-293T、Vero E6 细胞使用 10% FBS、1% 青霉素混合液的 DMEM 培养; 甲磺酸卡莫司他 (camostat mesylate, 货号 T2391) 购自上海陶术生物科技有限公司; Boc-Gln-Ala-Arg-AMC acetate (货号 HY-134432B) 购自美国 MedChemexpress 生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (货号 BS350B)、PBS 磷酸盐缓冲液干粉 (货号 BL601A) 购自合肥白鲨生物科技有限公司; 20 \times PBS Tween-20 (货号 28352)、DMEM (货号 C11995500BT)、FBS (货号 10270-106)、geneticin (货号 10131-035) 购自美国 Thermo Scientific 公司; 胰酶 (货号 T1300)、青霉素混合液 (货号 P1400) 和 Hoechst 33342 (货号 B8040) 购自北京索莱宝科技有限公司; 转染试剂 LipoMax (货号 32012) 购自南京南晶生物科技有限公司; pAAV-IRES-EGFP 质粒 (货号 LM8151) 购自上海联迈生物工程有限公司; pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S 质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司全合成; 化合物假病毒活性由南京金斯瑞蓬勃生物科技有限公司检测。

实验仪器 微孔板恒温振荡器 (北京佳源兴业科技有限公司); EnVision 多功能酶标仪、Operetta CLS 高内涵细胞成像与分析系统 (美国 PerkinElmer 公司); SR8600 表面等离子共振仪 (美国 Reichert Technologies 公司)。

TMPRSS2 抑制剂细胞筛选模型的建立 Vero E6/TMPRSS2 细胞以每孔 100 μL 均匀铺于白底、透明盖的 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 终浓度为 400、200、150、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的荧光底物

Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, 3组复孔。设置多功能酶标仪 E_x 为 340 nm, E_m 为 440 nm, 每 30 s 读取 1 次相对荧光强度 (relative fluorescence unit, RFU)。使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件拟合米氏方程, 计算 TMPRSS2 的米氏常数 (Michaelis constant, K_m) 与最大反应速度 (V_{max}) 以确定模型的可用性和最佳底物浓度。

选择 TMPRSS2 抑制剂 camostat mesylate 验证模型的可靠性, 细胞培养方式同上。用 PBS 梯度稀释的 camostat mesylate 以每孔 50 μL 加至 96 孔板中, 室温 (room temperature, RT) 孵育 30 min, 再加入终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, 微孔板恒温振荡器中 RT 避光孵育 1 h, 酶标仪检测 RFU 的变化, GraphPad Prism 9.5.1 计算半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

细胞筛选模型重复性分析。将 96 孔板分为两部分, 其一为 Vero E6/TMPRSS2 细胞 (阳性对照), 另一组仅含 DMEM (阴性对照), 其他处理方式同上。向 96 孔板中加入终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, 微孔板恒温振荡器中 RT 避光孵育 1 h 后检测 RFU。按照公式 (1) 计算 Z 因子, SD 为对照组的标准差, μ 为对照组的平均值。

$$Z = 1 - \frac{3 \times (\text{SD}_{\text{阳性对照}} - \text{SD}_{\text{阴性对照}})}{|\mu_{\text{阳性对照}} - \mu_{\text{阴性对照}}|} \quad (1)$$

TMPRSS2 抑制剂高通量筛选 细胞培养方式同“TMPRSS2 抑制剂细胞筛选模型的建立”。所筛选的化合物来自国家新药 (微生物) 筛选实验室天然与合成化合物纯品库, 化合物 (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中, 取 1 μL 化合物加至 49 μL PBS 中, 与细胞 RT 孵育 30 min, 随后加入终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的荧光底物 Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, RT 避光孵育 1 h, 酶标仪检测 RFU, 按照公式 (2) 计算抑制率。DMSO 处理的 Vero E6/TMPRSS2 细胞为阳性对照组, 仅含 DMEM 的组别为阴性对照。

化合物抑制率 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{RFU}_{\text{化合物组}} - \text{RFU}_{\text{阴性对照组}}}{\text{RFU}_{\text{阳性对照组}} - \text{RFU}_{\text{阴性对照组}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

选择初筛浓度 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 下抑制率高于 75% 的化合物进行不同浓度抑制率的检测, 计算 IC_{50} 。

TMPRSS2 抑制剂细胞毒评价 使用 CCK-8 试剂盒对复筛所得小分子抑制剂进行细胞毒性检测。HEK-293T、Vero E6 细胞经胰酶消化后, 8×10^3 个/孔接种到 96 孔细胞培养板中, 生长至对数期后, 吸出培养基, 使用无 FBS 的培养基倍比稀释化合物 (100~0.78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每孔 100 μL 加入到 96 孔细胞培养板中,

每个浓度 3 个复孔。化合物处理细胞 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 检测试剂避光培养 2 h, 酶标仪读取 450 nm 处的吸光度 (A)。实验重复 3 次, 按照公式 (3) 计算细胞存活率。DMSO 处理的细胞作为对照组, 选择不含细胞的 DMEM 作为空白组。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{化合物组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (3)$$

表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 利用 SPR 检测小分子抑制剂与 TMPRSS2 的相互作用^[14-16]。使用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 1:1 进行全芯片激活, 用 pH 4.5 的乙酸钠溶液稀释 TMPRSS2 至 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 固定在左通道, 右通道作为空白对照。当蛋白质被固定到所需信号值时, 注入 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醇胺 (pH 8.5) 阻断芯片表面上未与蛋白质结合的区域。用 0.22 μm 滤膜过滤的含有 5% DMSO 的 PBST 缓冲液稀释化合物, 使其终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。样品加载过程 0.5 min, 自然解离 2.5 min, 样品流速设置为 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。观察不同浓度的小分子抑制剂与芯片上固定蛋白的结合情况, 使用 Trace Drawer 软件计算平衡结合常数 (K_D)^[17]。

SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞融合实验 细胞融合实验可在细胞水平上间接检测筛选所得小分子抑制剂对 TMPRSS2 功能的影响^[18]。在 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的过程中, S 蛋白与宿主细胞表面血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 结合, TMPRSS2 通过对 S 蛋白切割参与病毒膜与宿主细胞膜的融合过程^[19]。使用转染 TMPRSS2 的 HEK-293T-ACE2 细胞作为靶细胞, 转染 pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S 的 HEK-293T 细胞作为供体细胞, 这两种细胞共培养作为融合对照, 靶细胞与转染 pAAV-IRES-EGFP 的 HEK-293T 细胞共培养作为非融合对照^[17,20]。HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 细胞经胰酶消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释至 10^5 个/孔, 转移至 96 孔板中, 并在加药处理 30 min 后加入供体细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h, RT 下加入终浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Hoechst 33342 对细胞核进行染色, 活细胞高内涵图像分析系统拍照, 选择 3 个视野统计分析, 带有 EGFP 的细胞在 E_m 为 488 nm 时呈现绿色, 细胞核经染色后在 E_m 为 461 nm 时呈现蓝色, 以此计算融合细胞的比例。

TMPRSS2 抑制剂假病毒活性评价 Opti-HEK-293T-ACE2 细胞 2×10^4 个/孔铺于 96 孔板中, 将野生型 SARS-CoV-2 假病毒 (SC2087A) 和不同浓度的小分子化合物 (IMB-4524 的浓度为 15、7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 其余化

合物浓度为 50、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或阳性对照 ACE2-Fc 加入至 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h。去除培养基, 立即加入 Fire-LumiTM 检测试剂 (GenScript, L00877C), RT 孵育 3~5 min, 酶标仪中检测结果。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.5.1 进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 TMPRSS2 抑制剂细胞筛选模型建立

利用通用底物 Boc-Gln-Ala-Arg-AMC 检测 Vero E6/TMPRSS2 细胞内源性 TMPRSS2 切割 SARS-CoV-2 S 蛋白的活性 (图 1A), 经计算 K_m 为 37.36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{\max} 为 15.60 $\text{RFU}\cdot\text{min}^{-1}$ (图 1B), 证明内源性 TMPRSS2 可用于建立细胞筛选模型。在此模型上, 加入不同浓度的 TMPRSS2 抑制剂 camostat mesylate 拟合 IC_{50} 为 $13.47 \pm 6.60 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1C), 与文献^[21]报道的活性相当。通过细胞筛选模型重复性分析计算此细胞模型的 Z 因

子为 0.73 (图 1D), 符合高通量筛选模型的要求^[22]。

2 TMPRSS2 小分子抑制剂的筛选

采用 Vero E6/TMPRSS2 细胞筛选模型对国家新药 (微生物) 筛选实验室的化合物库进行 4 000 样次高通量筛选, 初筛浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抑制率大于 75% 的化合物认定为初筛阳性, 进行复测确定 IC_{50} , 得到 7 个具有 TMPRSS2 抑制活性的化合物 (结构见图 2, 活性见图 3), 分别为 IMB-4524 ($\text{IC}_{50} = 5.17 \pm 1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、IMB-5155 ($\text{IC}_{50} = 8.18 \pm 0.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、IMB-0297 ($\text{IC}_{50} = 19.57 \pm 2.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、IMB-0028 ($\text{IC}_{50} = 94.68 \pm 19.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、IMB-0029 ($\text{IC}_{50} = 294.40 \pm 14.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、IMB-6290 ($\text{IC}_{50} = 58.32 \pm 3.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 IMB-8010 ($\text{IC}_{50} = 21.40 \pm 3.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其中, IMB-4524、IMB-5155、IMB-0297 和 IMB-8010 对 TMPRSS2 的抑制作用较强。

3 小分子抑制剂细胞毒评价

使用 CCK-8 试剂盒评价筛选得到的小分子抑制剂在 HEK-293T 和 Vero E6 细胞上的毒性 (图 4)。结果显示, IMB-4524 在 HEK-293T 和 Vero E6 细胞上具有一定的毒性, 半数细胞毒性浓度 (concentration of cytotoxicity 50%, CC_{50}) 分别为 31.92 ± 0.48 和 $27.7 \pm$

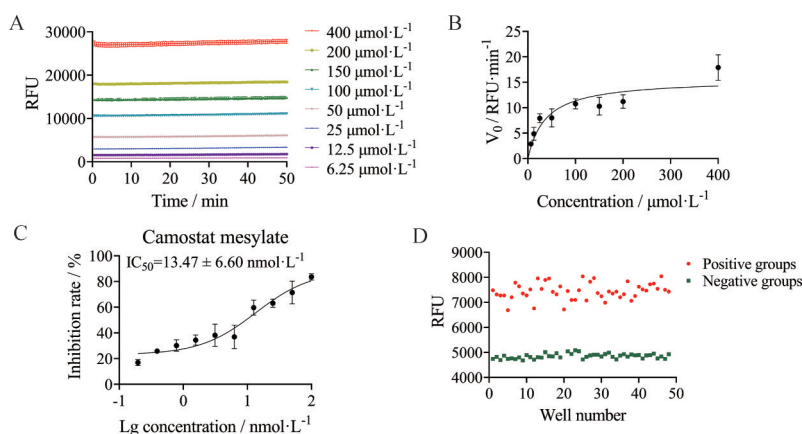


Figure 1 Establishment of a cell-based high-throughput screening (HTS) model for transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) inhibitors. A: Analysis of the initial velocity of TMPRSS2 proteolytic kinetics; B: Kinetic constant values of TMPRSS2. Kinetic data from figure A were plotted to estimate the Michaelis constant (K_m) by curve fitting of the Michaelis-Menten equation ($K_m = 37.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); C: Inhibitory activity of camostat mesylate against TMPRSS2 in newly built cell-based HTS; D: Assessment of Z factor for the cell-based HTS. GraphPad Prism 9.5.1 was used for curve fitting. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

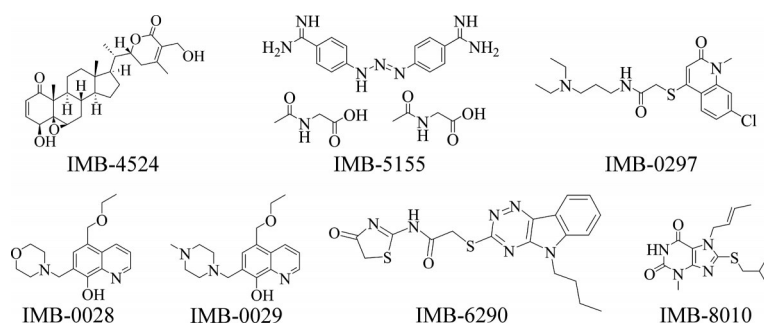


Figure 2 The chemical structures of TMPRSS2 inhibitors

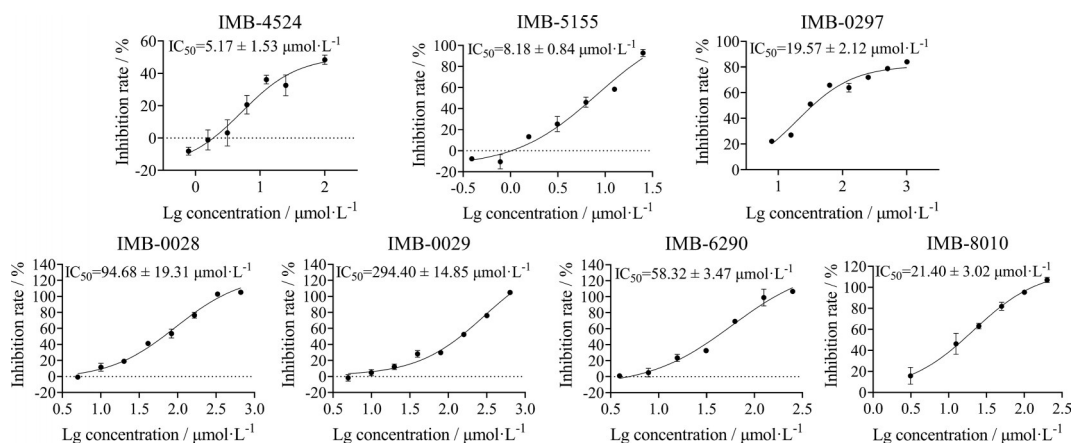


Figure 3 The inhibitory effects of seven compounds toward TMPRSS2. $n = 3, \bar{x} \pm s$

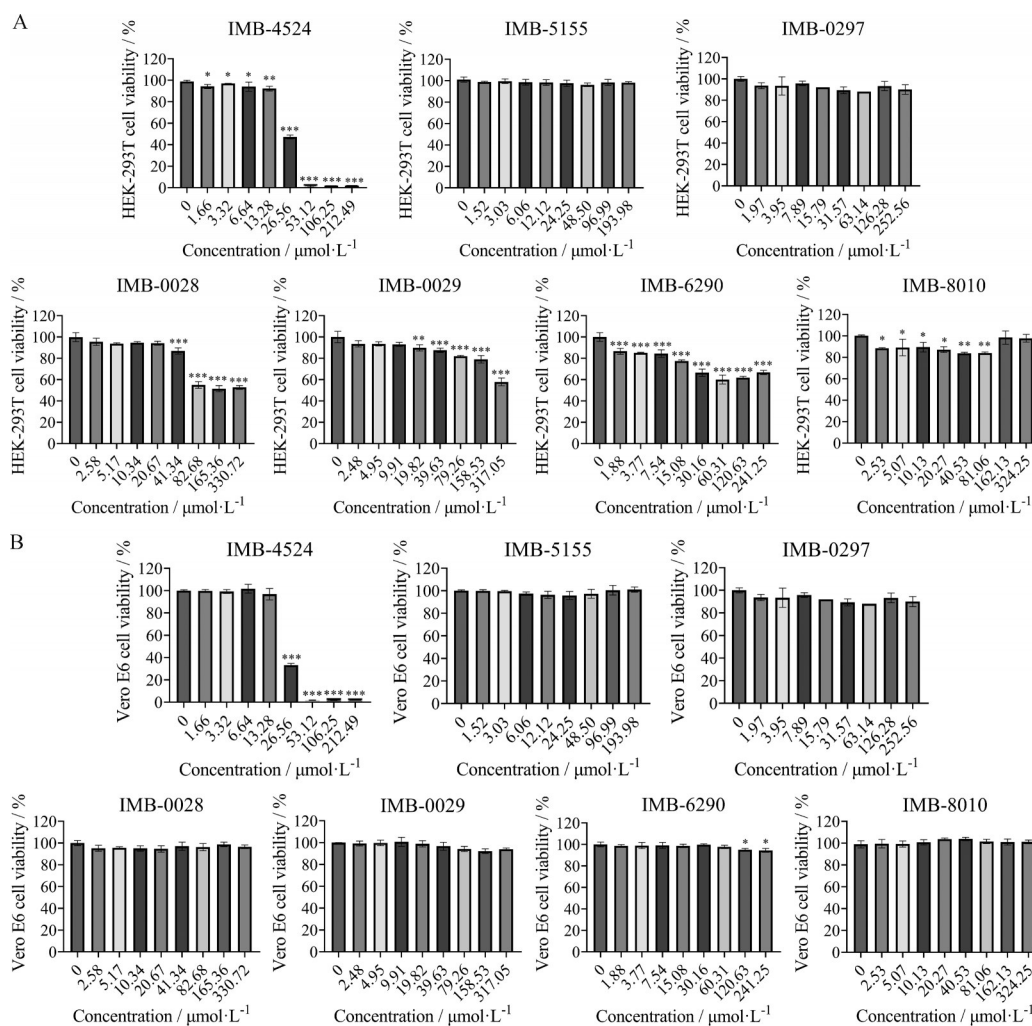


Figure 4 Toxicity analysis of TMPRSS2 inhibitors on HEK-293T (A) and Vero E6 (B) cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group

3.07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余6个化合物在工作浓度下均无细胞毒性。

4 小分子抑制剂与TMPRSS2亲和力检测

使用SPR技术检测小分子抑制剂与TMPRSS2的结合活性。结果发现, 筛选所得小分子抑制剂均可与

TMPRSS2呈浓度依赖性结合, 结合强度中等(图5)。其中, 化合物IMB-0028和IMB-0029与TMPRSS2呈现快结合快解离, 能够迅速达到稳态; IMB-4524、IMB-0297、IMB-6290和IMB-8010与TMPRSS2的结合特征为快结合慢解离; IMB-5155与TMPRSS2呈现快结合

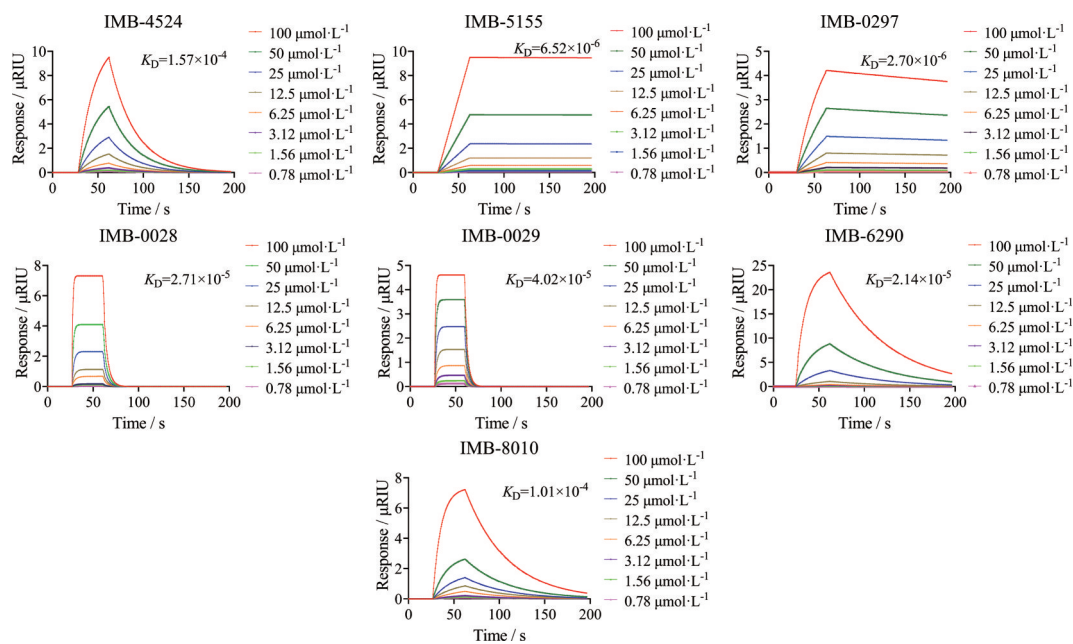


Figure 5 Surface plasmon resonance (SPR) analysis of TMPRSS2 inhibitors

不解离的动力学特征。

5 小分子抑制剂对 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞融合的影响

转入 pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S 的 HEK-293T 细胞与过表达 TMPRSS2 的 HEK-293T-ACE2 细胞共培养 (融合对照), 因 HEK-293T 细胞表面表达 SARS-CoV-2 S 蛋白后, 会识别 HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 细胞表面 ACE2 受体并与其结合, 通过 TMPRSS2 对 SARS-CoV-2 S 蛋白的切割引发两种细胞融合。因此, 如图 6 所示, 两种细胞共培养后体积明显增大、绿色荧光强度减弱, 通过 Hoechst 33342 将细胞核染色后, 能在视野中观察到一个绿色荧光区域内有多个染成蓝色的细胞核; 而转入 pAAV-IRES-EGFP 的 HEK-293T 细胞, 由于未表达 S 蛋白不能识别并结合 HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 细胞表面的 ACE2, 与 HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 细胞共培养 (非融合对照) 后两种细胞呈现出分散均匀、体积一致、荧光强度均一等特征。在 HEK-293T/pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S 与 HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 共培养细胞中加入不同浓度的小分子抑制剂处理后, 所呈现的细胞形态与非融合对照组趋于一致, 表明小分子抑制剂通过抑制 TMPRSS2 对 SARS-CoV-2 S 蛋白的切割降低了细胞融合的发生, 并呈现浓度依赖性。

6 TMPRSS2 抑制剂假病毒活性评价结果

检测小分子抑制剂对野生型 SARS-CoV-2 假病毒感染 Opti-HEK-293T-ACE2 受体细胞的抑制活性。如图 7 所示, IMB-4524 在 $7.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 对假病毒的

抑制率为 94.20%。IMB-0028 和 IMB-0029 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 假病毒抑制率高于 95%, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制率较低。IMB-0297、IMB-6290 和 IMB-8010 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时, 存在一定的假病毒抑制活性。

讨论

SARS-CoV-2 引发的全球大流行疾病使 TMPRSS2 抑制剂得到了更多的关注。TMPRSS2 广泛分布于人体组织器官中, 是与依赖 S 蛋白感染人体的病毒感染和前列腺癌等疾病密切相关的丝氨酸蛋白酶。在 SARS-CoV-2 感染人体的过程中, SARS-CoV-2 S 蛋白的 S2' 位点可被位于靶细胞表面的 TMPRSS2 所切割, 介导病毒与宿主细胞的膜融合过程^[23]。有研究证明敲除 *tmprss2* 后小鼠仍能正常生长, 表明抑制 TMPRSS2 的活性不会影响机体的正常生理活动^[24], 加之 SARS-CoV-2 作为 RNA 病毒, 突变速度快^[25,26], 因此开发靶向宿主蛋白酶 TMPRSS2 的药物可有效减轻突变株带来的耐药性^[12,27,28]。

目前已有的 TMPRSS2 抑制剂包括 camostat mesylate^[29]、nafamostat mesylate^[30]、bromhexine hydrochloride^[31]、 α_1 -antitrypsin^[32]、HAI-2^[33]、N-0385^[12]、omicsynin B4^[13] 等, 其中 camostat mesylate、nafamostat mesylate 和 bromhexine hydrochloride 正在进行临床研究, 但目前具有抑制 SARS-CoV-2 感染活性的 TMPRSS2 抑制剂仍然缺乏^[34-36]。总之, 筛选并获得更多新骨架的 TMPRSS2 抑制剂以对抗未来可能出现的冠状病毒疫情仍具有深远的意义。

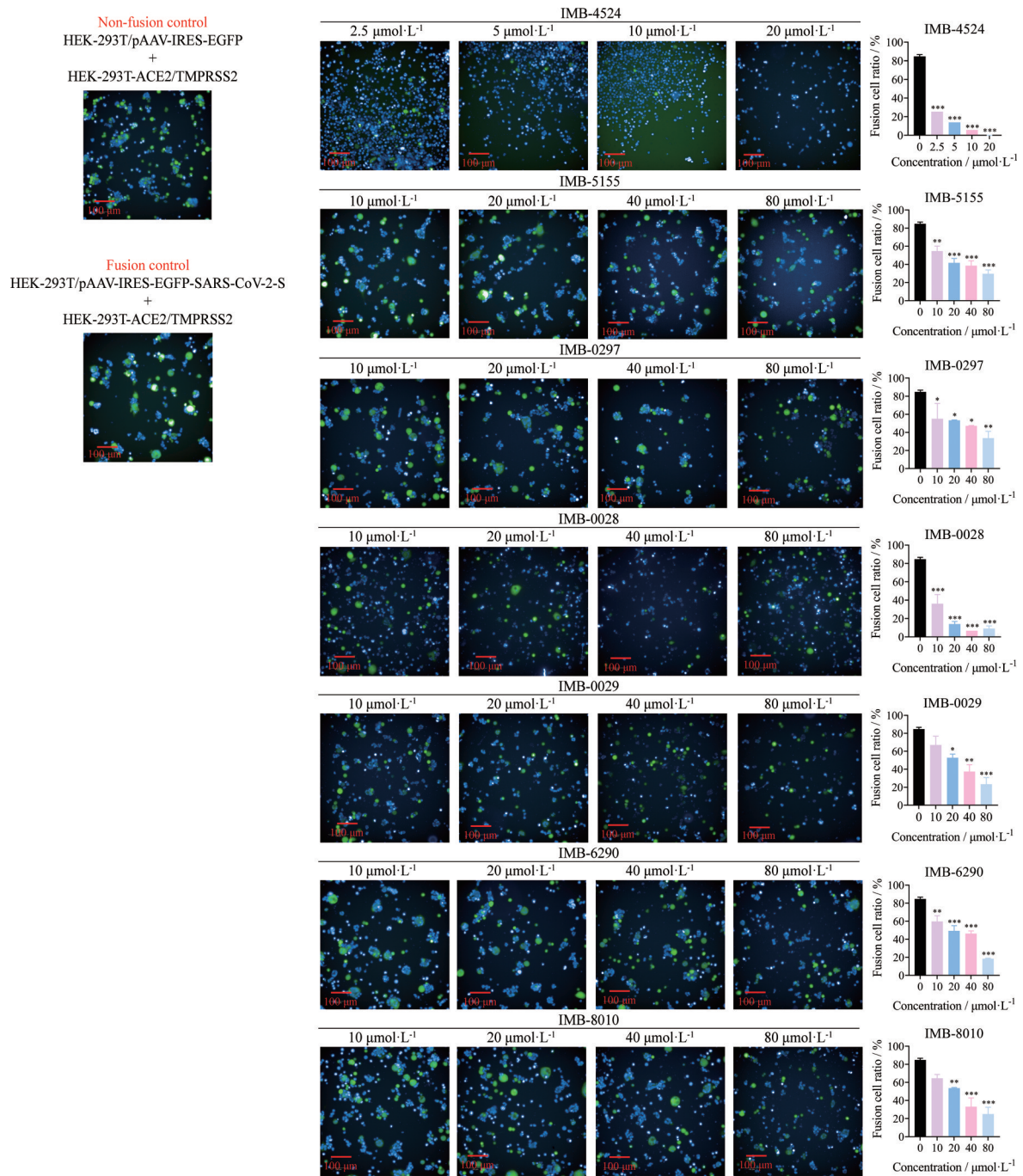


Figure 6 Cell-cell fusion assay. The HEK-293T cells transfected with pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S were co-cultured with HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 in the presence of IMB-4524, IMB-5155, IMB-0297, IMB-0028, IMB-0029, IMB-6290, and IMB-8010, respectively. HEK-293T/pAAV-IRES-EGFP and HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 co-cultured were set as non-fusion control, with pAAV-IRES-EGFP-SARS-CoV-2-S and HEK-293T-ACE2/TMPRSS2 co-cultured as fusion control. Fluorescence was observed under a fluorescent microscope at 20× magnification, and the scale bars indicated 100 μm. The green area represented cells carrying EGFP, and the blue area were nucleus. For each specified concentration, 3 distinct images were captured and quantification of cell-cell fusion were calculated by GraphPad Prism 9.5.1. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle group. SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; ACE2: Angiotensin-converting enzyme 2

本研究建立了基于 Vero E6/TMPRSS2 细胞的 TMPRSS2 抑制剂筛选模型。通过高通量筛选得到的小分子抑制剂中, 包含 2 个已知化合物 withaferin A (IMB-4524) 和 diminazene aceturate (IMB-5155), 文献

报道 withaferin A 具有抗肿瘤^[37]、抗炎^[38]活性, 可与 SARS-CoV-2 S 蛋白结合发挥抗病毒活性^[39]。Diminazene aceturate 是具有抗锥虫活性的化合物, 有研究通过分子对接发现 diminazene aceturate 可通过与 TMPRSS2

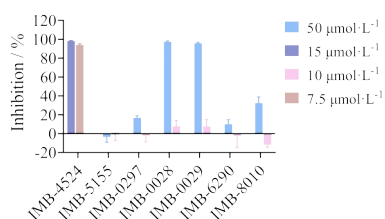


Figure 7 Pseudovirus of wildtype SARS-CoV-2-based inhibition assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

相互作用发挥抗 SARS-CoV-2 的作用^[40]。IMB-6290 是本课题组此前筛选得到的组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTSL) 抑制剂, IC_{50} 为 $11.53 \pm 0.68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[16]。CTSL 位于内体中, 可同时识别并切割 S 蛋白的 S1-S2 和 S2' 位点^[41], 介导“内吞途径”, 与 TMPRSS2 介导的“膜融合途径”共同参与病毒感染宿主的过程^[42-44]。本研究发现这个化合物也对 TMPRSS2 存在抑制活性, 同时抑制 CTSL 与 TMPRSS2 的活性可彻底阻断病毒进入宿主细胞, 是可深入研究的双靶点抑制剂。其余 4 个化合物均为本次筛选得到的具有 TMPRSS2 抑制活性的新结构。

本研究对这 7 个小分子抑制剂进行了初步的活性评价。SPR 结果表明, 这 7 个小分子抑制剂均可通过不同的结合模式与 TMPRSS2 呈中等强度的结合, 并能够在细胞水平上抑制由 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的细胞-细胞融合。同时, IMB-4524、IMB-0028、IMB-0029 和 IMB-8010 对野生型 SARS-CoV-2 假病毒均有一定的抑制活性, 其中 IMB-0028 和 IMB-0029 在低于对 TMPRSS2 的 IC_{50} 值下即能表现出对假病毒感染 Opti-HEK-293T-ACE2 受体细胞大于 95% 的抑制率, 不排除还具有其他靶点抑制活性的可能性。作为 TMPRSS2 和 CTSL 的双靶点抑制剂, IMB-6290 对野生型假病毒感染 Opti-HEK-293T-ACE2 受体细胞抑制作用不明显, 可能与其对 CTSL 的抑制活性更高有关, 而野生型 SARS-CoV-2 更依赖于膜融合途径完成对靶细胞的感染^[42,45], 这就造成了其在野生型假病毒实验中对靶细胞感染的抑制作用不够明显。下一步可在此工作的基础上, 通过结构改造获得毒性更低、活性更优的小分子抑制剂。

总之, 本研究通过建立 TMPRSS2 细胞筛选模型为靶向 TMPRSS2 小分子抑制剂发现提供了思路, 尤其是具有双靶点抑制活性的 IMB-6290, 但这些小分子抑制剂对依赖 TMPRSS2 感染人体的病毒和前列腺癌等疾病的治疗活性仍需进一步的深入评价。

作者贡献: 尤宝庆完成整体实验、数据分析和论文撰写; 周雯雯协助实验完成和论文修改; 李妍和张晶负责实验设计

与指导和基金支持; 司书毅负责基金支持和论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Shen LW, Mao HJ, Wu YL, et al. TMPRSS2: a potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections [J]. *Biochimie*, 2017, 142: 1-10.
- [2] Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 3-20.
- [3] Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells [J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3: e202000786.
- [4] Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein *via* sequential proteolytic cleavage at two distinct sites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 5871-5876.
- [5] Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, et al. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection [J]. *J Virol*, 2019, 93: e01815-18.
- [6] Saunders N, Fernandez I, Planchais C, et al. TMPRSS2 is a functional receptor for human coronavirus HKU1 [J]. *Nature*, 2023, 624: 207-214.
- [7] Bertram S, Dijkman R, Habjan M, et al. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium [J]. *J Virol*, 2013, 87: 6150-6160.
- [8] Sato K, Hayashi H, Shimotai Y, et al. TMPRSS2 activates hemagglutinin-esterase glycoprotein of influenza C virus [J]. *J Virol*, 2021, 95: e0129621.
- [9] Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2 [J]. *J Virol*, 2008, 82: 8942-8946.
- [10] Pettersson A, Lis RT, Meisner A, et al. Modification of the association between obesity and lethal prostate cancer by TMPRSS2: ERG [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105: 1881-1890.
- [11] Ko CJ, Hsu TW, Wu SR, et al. Inhibition of TMPRSS2 by HAI-2 reduces prostate cancer cell invasion and metastasis [J]. *Oncogene*, 2020, 39: 5950-5963.
- [12] Shapira T, Monreal IA, Dion SP, et al. A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic [J]. *Nature*, 2022, 605: 340-348.
- [13] Li Y, Wang K, Sun H, et al. Omicsynin B4 potently blocks coronavirus infection by inhibiting host proteases cathepsin L and TMPRSS2 [J]. *Antiviral Res*, 2023, 214: 105606.
- [14] Yang R, Liu L, Jiang D, et al. Identification of potential TMPRSS2 inhibitors for COVID-19 treatment in Chinese

- medicine by computational approaches and surface plasmon resonance technology [J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63: 3005-3017.
- [15] Olaru A, Bala C, Jaffrezic-Renault N, et al. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors in pharmaceutical analysis [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2015, 45: 97-105.
- [16] Ye B, Gao SH, Song LT, et al. Screening methods of SARS-CoV-2 main protease inhibitors and current applications [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1528-1539.
- [17] Zhou WW, You BQ, Zheng YF, et al. Anti-SARS-CoV-2 activity of small molecule inhibitors of cathepsin L [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 600-607.
- [18] Hu LD, Liu CF, Li P, et al. Recent advances in drug screening methods of SARS-CoV-2 spike protein [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 298-312.
- [19] Yu S, Zheng X, Zhou B, et al. SARS-CoV-2 spike engagement of ACE2 primes S2' site cleavage and fusion initiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2111199119.
- [20] Chan SW. Fusion assays for screening of fusion inhibitors targeting SARS-CoV-2 entry and syncytia formation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1007527.
- [21] Shrimp JH, Kales SC, Sanderson PE, et al. An enzymatic TMPRSS2 assay for assessment of clinical candidates and discovery of inhibitors as potential treatment of COVID-19 [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3: 997-1007.
- [22] Yan G, Li D, Lin Y, et al. Development of a simple and miniaturized sandwich-like fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11: 199.
- [23] Abbasi AZ, Kiyani DA, Hamid SM, et al. Spiking dependence of SARS-CoV-2 pathogenicity on TMPRSS2 [J]. *J Med Virol*, 2021, 93: 4205-4218.
- [24] Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, et al. Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 965-975.
- [25] Sanjuan R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 4433-4448.
- [26] Torii S, Kim KS, Koseki J, et al. Increased flexibility of the SARS-CoV-2 RNA-binding site causes resistance to remdesivir [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19: e1011231.
- [27] Wu A, Shi K, Wang J, et al. Targeting SARS-CoV-2 entry processes: the promising potential and future of host-targeted small-molecule inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 263: 115923.
- [28] De Clercq E, Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29: 695-747.
- [29] Sakr Y, Bensasi H, Taha A, et al. Camostat mesylate therapy in critically ill patients with COVID-19 pneumonia [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47: 707-709.
- [30] Li K, Meyerholz DK, Bartlett JA, et al. The TMPRSS2 inhibitor nafamostat reduces SARS-CoV-2 pulmonary infection in mouse models of COVID-19 [J]. *mBio*, 2021, 12: e0097021.
- [31] Maggio R, Corsini GU. Repurposing the mucolytic cough suppressant and TMPRSS2 protease inhibitor bromhexine for the prevention and management of SARS-CoV-2 infection [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104837.
- [32] Wettstein L, Weil T, Conzelmann C, et al. Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 1726.
- [33] Tomita Y, Matsuyama S, Fukuhara H, et al. The physiological TMPRSS2 inhibitor HAI-2 alleviates SARS-CoV-2 infection [J]. *J Virol*, 2021, 95: e00434-21.
- [34] Kinoshita T, Shinoda M, Nishizaki Y, et al. A multicenter, double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of camostat mesilate in patients with COVID-19 (CANDLE study) [J]. *BMC Med*, 2022, 20: 342.
- [35] Quinn TM, Gaughan EE, Bruce A, et al. Randomised controlled trial of intravenous nafamostat mesylate in COVID pneumonia: phase 1b/2a experimental study to investigate safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103856.
- [36] Tolouian R, Mulla ZD, Jamaati H, et al. Effect of bromhexine in hospitalized patients with COVID-19 [J]. *J Investig Med*, 2023, 71: 691-699.
- [37] Kakar SS, Parte S, Carter K, et al. Withaferin A (WFA) inhibits tumor growth and metastasis by targeting ovarian cancer stem cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 74494-74505.
- [38] Liang Y, Jiang Q, Zou H, et al. Withaferin A: a potential selective glucocorticoid receptor modulator with anti-inflammatory effect [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 179: 113949.
- [39] Straughn AR, Kakar SS. Withaferin A: a potential therapeutic agent against COVID-19 infection [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13: 79.
- [40] Santos ES, Silva PC, Sousa PSA, et al. Antiviral potential of diminazene aceturate against SARS-CoV-2 proteases using computational and *in vitro* approaches [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 367: 110161.
- [41] Zabięgala A, Kim Y, Chang KO. Roles of host proteases in the entry of SARS-CoV-2 [J]. *Anim Dis*, 2023, 3: 12.
- [42] Padmanabhan P, Desikan R, Dixit NM. Targeting TMPRSS2 and cathepsin B/L together may be synergistic against SARS-CoV-2 infection [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16: e1008461.
- [43] Liu T, Luo S, Libby P, et al. Cathepsin L-selective inhibitors: a potentially promising treatment for COVID-19 patients [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 213: 107587.
- [44] Yang H, Zhou JN, Zhang XM, et al. Nanoengineered red blood cells loaded with TMPRSS2 and cathepsin L inhibitors block SARS-CoV-2 pseudovirus entry into lung ACE2⁺ cells [J]. *Adv Mater*, 2024, 36: e2310306.
- [45] Wang H, Yang Q, Liu X, et al. Structure-based discovery of dual pathway inhibitors for SARS-CoV-2 entry [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 7574.