

·专题报道·

新型甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶抑制剂细胞水平评价体系的建立

张 超¹, 曹颖莉¹, 钟 武², 肖军海², 郭 颖^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 本文旨在建立以 2009 新型甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 为靶点的神经氨酸酶抑制剂 (neuraminidase inhibitors, NAIs) 细胞水平评价体系。NA 有促进流感病毒释放的作用, 本研究应用重组病毒技术, 通过将表达 NA [A/California/04/2009 (H1N1)] 的质粒、表达流感病毒血凝素蛋白 HA (hemagglutinin) 的质粒以及表达敲除外壳基因并带有荧光素酶报告基因的 HIV-1 基因组共转染至病毒生成细胞, 产生以 HA、NA 为外壳蛋白包裹 HIV-1 核心的重组病毒。在病毒释放前加入不同浓度的化合物, 收集病毒上清液感染细胞, 通过测定感染率来反映化合物对重组病毒 NA 的抑制作用。经用阳性对照药物奥司他韦及其羧酸盐证实本模型能够反映化合物对病毒 NA 的抑制作用; 在此基础上, 本研究还建立了奥司他韦耐药株评价模型。本研究所建立的体系可用于针对新型甲型 H1N1 流感病毒及其临床耐药株神经氨酸酶抑制剂的寻找和评价。

关键词: H1N1; 神经氨酸酶抑制剂; 重组病毒; 奥司他韦耐药

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0383-05

Establishment of a cell-based 2009 H1N1 influenza neuraminidase inhibitors evaluation system

ZHANG Chao¹, CAO Ying-li¹, ZHONG Wu², XIAO Jun-hai², GUO Ying^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: This study is to establish a cell-based model targeting to neuraminidase (NA) of the 2009 H1N1 influenza A virus. NA is an influenza virus structural protein with enzymatic activity of the cleavage of HA-sialic acid interaction to release new viral particles from cells. A model of HIV-1 (pNL4-3.Luc.R^E) based pseudovirions packed with HA [hemagglutinin, A/VietNam/1203/2004 (H5N1)] and NA [A/California/04/2009 (H1N1)] was established to evaluate compounds activities on NA function. The viral release can be blocked by neuraminidase inhibitors, oseltamivir and oseltamivir carboxylate, with IC₅₀ of (61 ± 31) nmol·L⁻¹ and (5.5 ± 2.9) nmol·L⁻¹ respectively. A point mutation of H275Y on NA leads oseltamivir-resistance. This corresponding mutation was introduced into the system which was also confirmed by oseltamivir and oseltamivir carboxylate.

Key words: H1N1; neuraminidase inhibitor; pseudotyping virus; oseltamivir-resistance

流感病毒可引起急性呼吸道传染病, 每年造成死亡人数达 25 万~50 万^[1]。2009 年 3~4 月, 一种新型甲型 H1N1 流感病毒出现于北美^[2], 并在不到 3 个

月的时间席卷全球, 成为 40 年来首次世界大流行疾病, WHO 于 6 月 11 日将警戒级别升至 6 级。截至 2009 年 12 月 16 日, 我国内地累计报告 110 590 例甲型 H1N1 流感确诊病例, 死亡 442 例^[3]。针对该病毒, WHO 推荐药物为奥司他韦 (oseltamivir) 和扎那米韦 (zanamivir)^[4], 均为神经氨酸酶抑制剂 (neuraminidase inhibitors, NAIs)。但是伴随药物的广泛使用, 流感病

收稿日期: 2009-12-31.

基金项目: 科技部甲型 H1N1 流感联防联控应急科研项目——治疗药物效果评价与研发; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2010ZD03).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165176, E-mail: yingguo6@imm.ac.cn

毒已在药物选择压力下出现耐药现象^[5,6], 并有扩散趋势, 因此寻找新型的针对甲型 H1N1 流感病毒的神经氨酸酶抑制剂迫在眉睫。

目前评价 NAIs 的方法为酶活性检测法, 即以唾液酸类似物为底物与神经氨酸酶作用, 检测酶催化产物, 以反映药物对神经氨酸酶活性的影响^[7-9]。值得注意的是, 流感病毒 NA 的功能是在病毒释放环节切割病毒血凝素蛋白 HA (hemagglutinin) 与细胞表面唾液酸 SA (sialic acid) 的结合, 从而使病毒得以释放^[10], 因此流感病毒 NA 的天然底物是宿主细胞表面与病毒血凝素蛋白相连接的多形式糖基化的唾液酸。所以建立细胞水平神经氨酸酶抑制剂评价系统, 可以更确切地反映细胞病理条件下 NAIs 的作用。神经氨酸酶 H274Y 或 H275Y 突变是引起流感病毒对奥司他韦耐药的的决定性因素^[11], 此次新型流感的奥司他韦临床耐药病例经检测也是由于病毒神经氨酸酶 H275Y 位点变异引起的^[5,6]。因此, 建立奥司他韦耐药型神经氨酸酶评价体系, 对于寻找针对该新型流感的抑制剂意义重大。重组病毒技术是一项可用于多种人类高致病性病毒研究的成熟技术, 重组流感病毒的应用也多有报道^[12,13], 本研究即采用此技术, 构建了表达新型甲型流感神经氨酸酶 (野生型/达菲耐药型) 的重组流感病毒, 此体系可用于药物筛选和评价。

材料与方法

细胞、质粒和阳性对照药物 293T 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所; A549 细胞购自美国标准生物制品收藏中心 (ATCC)。编码优化的 NA 基因 [A/California/04/2009 (H1N1), Genbank FJ969517] 由上海生工生物工程技术有限公司合成; 编码季节性流感病毒 NA [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] 的表达质粒由北卡罗莱纳大学 Dr. JC Olsen 惠赠; 水泡性口膜炎病毒外壳糖蛋白 (vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G) 表达质粒由美国伊利诺伊大学 Dr. Lijun Rong 惠赠。奥司他韦 (oseltamivir) 及奥司他韦羧酸盐 (oseltamivir carboxylate) 由军事医学科学院提供。

重组病毒的制备 转染前 24 h, 按细胞数 2.2×10^6 接种 293T 细胞到 100 mm 培养皿中, 应用改良的磷酸钙转染法^[14], 将 5 μ g pNL4-3.Luc.R⁻E⁻ 和 5 μ g HA [A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1), 简称 HA (viet)] 分别与 3 μ g VSV-G、1~10 μ g NA [A/California/04/2009 (H1N1), 简称 NA (CA/04)]、1~10 μ g NA

[A/Puerto Rico/8/34, 简称 NA (PR/8)] 共转染至 293T 细胞, 转染后 16 h, 用 PBS 冲洗细胞并换新鲜 DMEM 继续培养 32 h, 收集上清液并经 0.45 μ m 滤膜过滤, 即获得重组病毒 VSVG/HIV-luc、HA (viet)-NA (CA/04)/HIV-luc 和 HA (viet)-NA (PR/8)/HIV-luc。

病毒滴度的测定 将 293T 和 A549 细胞消化为单细胞悬液, 感染前 24 h 以细胞数 5×10^4 /孔接种到 24 孔板中, 加入病毒。感染后 48 h, 去除上清液, 裂解细胞并加入荧光素酶底物 (Promega), 用 FB15 荧光检测器 (Sirius) 测定裂解液中荧光素酶的活性, 以荧光素酶的相对活性 (relative luciferase units, RLUs) 表示。

应用奥司他韦和奥司他韦羧酸盐验证模型 应用改良的磷酸钙转染法, 将 5 μ g pNL4-3.Luc.R⁻E⁻ 和 5 μ g HA (viet) 分别与 3 μ g VSV-G、1~3 μ g NA (CA/04)、6~10 μ g NA (PR/8) 共转染至 293T 细胞。16~18 h 后用 PBS 冲洗细胞并用胰酶消化为单细胞悬液后, 以细胞数 1.2×10^5 /孔接种至 24 孔板中。将奥司他韦和奥司他韦羧酸盐溶解于 DMSO, 并以终浓度 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 及 1×10^{-5} mol·L⁻¹ 与细胞于 37 °C 培养箱温孵 48 h 后收获上清液, 上清液经 0.45 μ m (Millipore) 滤膜过滤后用于感染 A549 细胞。感染 48 h 后, 依照“病毒滴度的测定”方法检测 luciferase 活性, 计算化合物的半数抑制浓度。

奥司他韦耐药病毒株 NA 模型的建立 采用重叠 PCR 方法^[15]在 NA (CA/04) 引入 H275Y 突变。在 NA (CA/04) 基因两侧分别包含 *Bam*H I 和 *Xho* I 单酶切位点的序列位置, 设计两条引物: 正向 5'-GAAT CCGATCCGCCACCATGAACC-3'; 反向 5'-CTAGA CTCGAGTCACTTGTCGATGGTGA-3'; 在 H275 位置设计突变位点引物: 正向 5'-GCTCCCACTACTA CTACGAGGAGTGCAG-3'; 反向 5'-CTGCACTCGTC GTAGT^AGTAGTTGGGAGC-3'。测序正确后, 采用“重组病毒的制备”方法建立耐药型重组病毒, 并用奥司他韦及奥司他韦羧酸盐进行验证。

数据处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并应用 Excel 统计软件进行分析。应用 Excel 图表分析软件得到浓度值—感染率的趋势线及拟合公式, 根据公式计算药物的半数抑制浓度 IC₅₀。

结果

1 HA-NA/HIV-luc 重组病毒的建立

实验设立 HIV-luc 对照组、空白对照组 HA (viet)/HIV-luc、模型对照组 VSVG/HIV-luc、普通流感对照

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

16~18 h, 细胞经阳性对照药物奥司他韦和奥司他韦羧酸盐作用 48 h, 收集上清液感染 A549 细胞, 病毒感染率可以反映其释放量。图 3 显示, 模型对照组 VSVG/HIV-luc 感染率不受化合物影响, 可以排除化合物对该模型非神经氨酸酶因素的影响; 而重组流感病毒 HA (viet)-NA (CA/04)/HIV-luc 和 HA (viet)-NA (PR/8)/HIV-luc 的感染率对阳性药物存在剂量依赖性, 在有效浓度范围内, 随着药物浓度的增大感染率降低, 即病毒释放量随药物浓度的增大而减少。奥司他

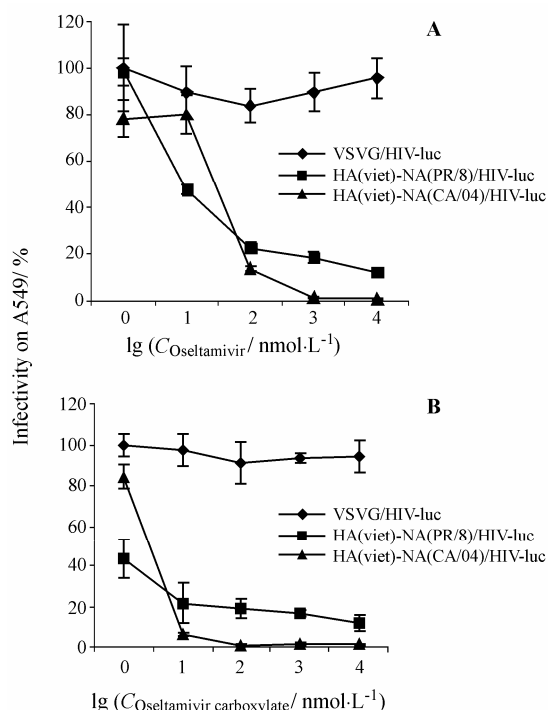


Figure 3 Inhibitory effect of oseltamivir (A) or oseltamivir carboxylate (B) on NA (CA/04) and NA (PR/8) activities. Pseudovirions were produced by co-transfecting HA (viet)/NA/HIV plasmids into 293T cells by using calcium phosphate method. Sixteen hours post transfection, cell culture was replaced by new medium and compounds were added simultaneously. Supernatants were collected and used to infect A549 cells at 48 hours post transfection. Infected cells were lysed and cell lysates luciferase activity was measured at 48 hours post infection by using Promega kits. VSVG/HIV-luc was used as a model control, and DMSO as a solution control whose inhibition was defined as 0%. The data was $\bar{x} \pm s$ of four wells

Table 1 Summary of IC_{50} values of oseltamivir and oseltamivir carboxylate on NA (PR/8), NA (CA/04), and NA (CA/04)-H275Y activities ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Oseltamivir /nmol·L ⁻¹	Oseltamivir carboxylate/nmol·L ⁻¹
HA (viet)-NA(PR/8)/HIV-luc	5.2 ± 3.0	0.5 ± 0.2
HA (viet)-NA(CA/04)/HIV-luc	61 ± 31	5.5 ± 2.9
NA(CA/04)-H275Y/HIV-luc	2 737 ± 2 250	248 ± 165

韦和奥司他韦羧酸盐对 NA (CA/04) 的 IC_{50} 分别为 (61 ± 31) nmol·L⁻¹ 和 (5.5 ± 2.9) nmol·L⁻¹; 对 NA (PR/8) 的 IC_{50} 分别为 (5.2 ± 3.0) nmol·L⁻¹ 和 (0.5 ± 0.2) nmol·L⁻¹ (表 1)。本结果证明, 该模型能够有效筛选及评价针对本次甲型 H1N1 流感病毒 [A/California/04/2009 (H1N1)] 神经氨酸酶 NA (CA/04) 及季节性流感病毒神经氨酸酶 NA (PR/8) 的抑制剂。

4 奥司他韦耐药病毒株 NA 检测模型的建立

通过重叠 PCR 技术及分子克隆技术在表达野生型 NA (CA/04) 的质粒上引入突变位点 H275Y 并测序。将该质粒返回上述建立的体系中, 经用奥司他韦和奥司他韦羧酸盐验证, 两种药物对新型甲型流感耐药病毒株神经氨酸酶的 IC_{50} 分别为 (2 737 ± 2 250) nmol·L⁻¹ 和 (248 ± 165) nmol·L⁻¹, 相对野生株病毒分别提高了约 45 倍 (表 1)。结果显示, 新型甲型流感奥司他韦耐药株神经氨酸酶体系成功建立, 并可用于针对本次甲型 H1N1 流感病毒奥司他韦耐药株 NAIs 的筛选。

讨论

神经氨酸酶是抗流感病毒药物研究的经典靶点, 其药物筛选模型通常为酶学模型, 通过检测化合物对酶-底物相互作用的影响, 寻找其抑制剂。酶学方法简易高效, 而不足之处为神经氨酸酶与唾液酸类似物的反应不能真实反映病毒和细胞间复杂的作用过程。流感病毒释放过程的复杂之处在于涉及了血凝素蛋白与各种天然多形式糖基化的末端唾液酸的相互作用, 以及神经氨酸酶对 HA-SA 的切割。本研究采用重组流感病毒模拟流感病毒释放过程, 实现了在 P-2 实验室进行新型甲型流感病毒神经氨酸酶抑制剂细胞水平评价工作。此外, 本研究在建立了野生型流感病毒模型的基础上, 还建立了奥司他韦耐药病毒株评价模型。综上所述, 本研究所建立的细胞水平野生株与耐药株神经氨酸酶抑制剂评价体系, 为寻找和评价针对本次爆发的甲型流感病毒神经氨酸酶抑制剂提供了一个药物评价平台。

References

- [1] Influenza. WHO fact sheet No. 211 revised March 2003 [R]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- [2] Swine influenza A(H1N1) infection in two children—southern California, March–April, 2009 [R]. MMWR, 2009: 400–402.
- [3] <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/wsb/pyq>

- xx/list.htm.
- [4] Options for use of antivirals for influenza A (H1N1) cases. <http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/7D1FC5E7-828C-412A-BBB2-D40FB97CAE49/0/antivirals.pdf>.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis--North Carolina, 2009 [R]. MMWR, 2009, 58: 969–972.
- [6] Chen H, Cheung CL, Yuen KY, et al. Oseltamivir-resistant influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong, China [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15: 1970–1972.
- [7] Potier M, Mameli L, Melançon SB, et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate [J]. Anal Biochem, 1979, 94: 287–296.
- [8] Buxton RC, Edwards B, Bethell RC, et al. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir [J]. Anal Biochem, 2000, 280: 291–300.
- [9] Cabezas JA, Reglero A, Hannoun C. A fluorometric procedure for measuring the neuraminidase activity: its application to the determination of this activity in influenza and parainfluenza viruses [J]. Anal Biochem, 1983, 131: 121–126.
- [10] Palese P, Tobita K, Compans RW, et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase [J]. Virology, 1974, 61: 397–410.
- [11] Collins PJ, Haire LF, Hay AJ, et al. Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses [J]. Vaccine, 2009, 27: 6317–6323.
- [12] Guo Y, Rumschlag-Booms E, Rong LJ, et al. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza [J]. Virol J, 2009, 6: 1–13.
- [13] Rumschlag-Booms E, Guo Y, Rong LJ, et al. Comparative analysis between a low pathogenic and a high pathogenic influenza H5 hemagglutinin in cell entry [J]. Virol J, 2009, 6: 76.
- [14] Guo Y, Yu X, Rong LJ, et al. The role of a conserved acidic residue in calcium-dependent protein folding for a low density lipoprotein (LDL)-A module [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 16629–16637.
- [15] Cao YL, Li SX, Guo Y, et al. Establishment of pharmacological evaluation system for non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors resistant HIV-1 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 355–361.
- [16] Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections [J]. Rev Med Virol, 2002, 12: 159–166.
- [17] Song G, Yang S, Guo Y, et al. Discovery of the first series of small molecule H5N1 entry inhibitors [J]. J Med Chem, 2009, 52: 7368–7371.