

流感、禽流感病毒及其抑制剂研究新进展

吕志良,王甜甜,李科(第二军医大学药学院,上海 200433)

摘要 目的:介绍流感、禽流感及其抑制剂的研究新进展。**方法:**查阅国内外文献资料进行分析和述译。**结果与结论:**在流感、禽流感病毒的研究中,虽然病毒的关键酶已被探明,但存在着变异和重组的高几率。化学合成药物研究热点集中于神经氨酸酶,天然药物的抗病毒活性也是研究热点。

关键词 流感;禽流感;病毒;抑制剂

中图分类号:R978.7;R286

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2008)06-0405-04

流感是由流感病毒引起的一种高传染性的呼吸道疾病;禽流感是禽鸟中由 A 型流感病毒菌株引起的一种传染病。(禽)流感病毒的流行性爆发给世界各国人民的生命安全造成很大的威胁。(禽)流感疫苗和药物能有效的防止(禽)流感灾害的发生。抗(禽)流感疫苗能迅速诱导人体产生抗体,清除体内的病毒;药物能通过提高人体免疫或直接杀灭病毒等方式来控制病毒在体内的发展。然而,作为一种长期的流感病毒抑制剂,疫苗并不是唯一的选择,例如对一些老年人、免疫缺陷病人和一些特殊的易感人群,疫苗的应用会受到很大的限制;其次,现有的疫苗都是通过肌肉注射来引发抗体的产生,但是在感染早期,通过肌注所产生的抗体根本达不到有效的浓度,免疫效果将会大打折扣;最重要的是疫苗是针对性极强的抑制剂,由此诱导的抗体对(禽)流感病毒的变异株,其抑制作用将迅速降低甚至消失。抗(禽)流感药物能在短时间内达到有效浓度,提高人体免疫或者直接杀灭病毒,所以抗流感的药物治疗是介入疗法的最佳途径^[1]。

1 流感、禽流感病毒

流感病毒(Influenza virus, IV)属正黏病毒科(Orthomyx-ovirifidae),属 RNA 病毒。流感病毒内部的核心由单链核糖核酸及核蛋白组成,根据核蛋白(NP)与基质蛋白(MS)的抗原性不同,将流感病毒分为 A、B、C 三型。这三个型的病毒没有共同抗原,在内部蛋白和基质蛋白的抗原性上有很大差别,在致病性和基因组结构上也有所不同,其中以 A 型流感病毒感染的范围最广,危害最大,是人和禽畜呼吸道疾病的重要病原;而 B、C 型流感病毒只能感染人^[2]。禽流感病毒(Avian influenza virus)属于 A 型

流感病毒,感染禽类会引起一系列症状,极易在禽类间散播,可引致家禽大量死亡,同时有很大的感染人类的趋向。所以禽流感为一种人兽共患的烈性传染病。截止到 2008 年 4 月 30 日,WHO 的最新统计数据显示全世界禽流感感染者 382 人,死亡 241 人。其中印度尼西亚感染 133 人,死亡 108 人;越南感染 106 人,死亡 52 人;中国感染 30 人,死亡 20 人。全世界由禽流感造成的直接经济损失达到 100 亿美元,间接经济损失超过 2 880 亿美元。

1.1 形态学特征 流感病毒颗粒呈多形性,典型的禽流感病毒粒子在电镜下观察呈球形,直径为 80~120 nm,平均为 100 nm,病毒的中心有一直径为 40~60 nm 的高电子密度的锥状核心。但新分离的禽流感病毒多为丝状体。颗粒的最小直径 80~120 nm,有囊膜和纤突。核衣壳螺旋形对称。毒粒从外至内分为 3 层。最外层为双层类脂质包膜,包膜上散布着形态不一的三种蛋白突起:呈细长棒状能凝集红细胞的血凝素(hemagglutinin, HA)、呈蘑菇样能使病毒颗粒从凝集的红细胞表面释放下来的神经氨酸酶(neuraminidase, NA)和一种基质蛋白(M2)。中间层为基质蛋白(M1)形成的球形蛋白壳。最内层为核衣壳,包括病毒负链核糖核酸(RNA)、核蛋白(nucleocapsid protein, NP)和 3 种 RNA 聚合酶^[3]。

1.2 病毒的蛋白质 流感病毒的核酸类型为复股单链 RNA,由 8 个片段组成,共编码 8 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白:血凝素(HA),神经氨酸(NA),核蛋白(NP),基质蛋白(M1, M2),聚合酶(PB1, PB2, PA),非结构蛋白(NS1, NS2)。目前 75% 的流感病毒蛋白的功能以及作用机制已被深入研究,其中,在流感病毒生命周期中三个最重要的蛋白质:血凝素、神经氨酸酶、基质蛋白亦在对成熟细胞的入侵过程中具有及其重要的作用,对其结构的详细了解也对抗流感(禽流感)病毒药物研究有很大的推动性作用。

1.2.1 血凝素(Hemagglutinin, HA)的结构和功能

作者简介:吕志良(1983-),男,硕士研究生。

通讯作者:李科. Tel: (021)25074585, E-mail: proflike@sina.com.cn.

HA 是有 vRNA 片段 4 编码的表面糖蛋白,为 75KD 的典型 I 型糖蛋白,即羧基端在囊膜内,氨基端在囊膜外。HA 分子通常有 6-10 个糖基化位点,4 个结构域:信号肽、胞浆域、跨膜域、胞外域,是流感病毒所有蛋白质中最重要的一个,具有凝集多种动物红细胞的性质。作为宿主免疫系统的主要靶抗原,HA 可以诱导产生中和抗体,进而起到免疫保护的作用,抵抗感染和疾病。HA 的主要功能是结合宿主唾液酸之类的细胞受体,使病毒附着于细胞上,帮助病毒穿透宿主的细胞膜并改变抗原性,以逃脱宿主免疫系统的监视^[4]。

尽管禽流感病毒的毒力由多个基因决定,然而 HA 是最具决定作用的。HA 介导病毒结合到细胞受体上,并且促进病毒核糖核蛋白受体(RNP)通过膜融合释放出来,从而激发病毒的感染。HA 的裂解性是流感病毒组织嗜性的主要决定因素之一,蛋白酶在组织中的不同分布和 HA 对这些酶的敏感性决定了流感病毒的感染。HA 的两个结构特征——裂解位点处的氨基酸序列和附件氨基酸的糖基化——决定其裂解性。Bosch 等(1981 年)比较了 LPAIV 和 HPAIV 的 HA 氨基酸序列,发现二者在 HA 裂解位点处的氨基酸序列不同,通常, LPAIV 的 HA 裂解位点处只有一个碱性氨基酸,只能在呼吸道、消化道等少数细胞中裂解,因此只能引起消化道和呼吸道感染,造成温和感染或者不表现临床症状;而一般来讲,HPAIV 的 HA 裂解位点处由多个连续的碱性氨基酸插入,可以在无类胰蛋白酶的情况下发生裂解,因此可以在很多不同的宿主细胞中裂解为 HA1 和 HA2,造成感染禽全身系统衰竭,导致死亡。在体外组织培养中,HPAIV 可在没有外源蛋白酶存在的情况下繁殖, LPAIV 却不能,进一步证明 HA 的裂解性是 AIV 感染的决定因素之一^[5]。

1.2.2 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的结构及功能 流感(禽流感)病毒的另一个表面糖蛋白——NA,也能与具有末端酸残基的受体作用。HA 与细胞膜受体结合并引起病毒的入侵和细胞膜的融合,而 NA 是一个由胞质尾区、跨膜区、棒状区和球状头部组成的四聚体。活性位点在球状头部的表面凹陷里,并且组成位点的酸残基在 A 型和 B 型中都是高度保守的^[6]。有的病毒直接与底物神经氨酸键合反应,用的首先为功能酸残基形成一个功能框架。NA 可以通过破坏神经氨酸残基与临近的寡聚糖的单键来破坏 HA 识别的受体。这种破坏可以促进病毒在被感染的呼吸道里自由移动,呼吸道的粘液里含有神经氨酸残基,所以 NA 对 HA 受体的破坏对病毒穿过器官分泌物的过程是很有意义

的。子代病毒从感染细胞表面出芽,对细胞膜上的 HA 受体的破坏是病毒释放的关键。子代病毒释放的另一个障碍是新合成的 HA 和 NA 低聚糖链上的神经氨酸残基。这些残基识别并结合到这些神经氨酸残基上,引起子代病毒的自聚集现象。因此,子代病毒的释放需要 NA 的这种破坏活性的存在,使得细胞膜表面和病毒表面的糖蛋白即时的清除,便于病毒的扩散^[7]。HA 和 NA 是流感病毒入侵健康细胞和成熟释放的关键酶,所以针对这两者的合成药物在世界范围内都胜极一时,寻找靶点,结构模仿等研究热度至今未减。但是科学家们很快发现一些不足,比如 RNA 的变异导致的 HA 和 NA 变化,使得新药的研发速度远远跟不上 RNA 变异所带来的蛋白质变化的速度,所以研发的新药达不到预期的治疗效果。

1.2.3 基质蛋白的结构和功能 流感病毒的基质蛋白有两种,即 M1 和 M2。M1 由 252 个氨基酸残基组成,分子量约 26KD,是病毒的主要结构蛋白,占流感病毒蛋白总量的 40%。M1 位于病毒囊膜的类脂双层、和衣壳的外侧,在感染细胞的细胞核、细胞质和细胞膜上也可发现 M1。流感病毒的 M1 具有多种功能,除维持病毒粒子的形态外,还调节病毒转录酶的活性,另外在子代病毒粒子装配方面也起到重要作用^[8]。

M2 由 97 个氨基酸组成,分子量约为 15KD,由片段 7 转录的第二个小 mRNA 翻译。M2 是一种跨膜粒子通道蛋白,主要以四聚体形式存在于感染细胞的细胞膜上,另外也是病毒囊膜上的蛋白组分之一。其主要功能是在病毒脱壳时酸化病毒粒子的内部环境;在 HA 合成过程中作为质子通道控制高尔基体内的 pH 值;据郭元吉等报道,M2 基因和流感病毒的抗药性有很大关系。与 HA 蛋白相比,M2 只是流感病毒中很小的组分,但在感染的细胞中 M2 表达丰富。Pinto 等(1992)发现,M2 蛋白的跨膜区域发生突变时,病毒对药物的抗性也随之发生变化。

1.2.4 非结构蛋白的结构和功能 A 型流感病毒的非结构蛋白由片段 8 编码,有两个 ORF,可编码两种蛋白质: NS1 和 NS2,这两种蛋白质大量存在于感染的细胞中。序列分析发现,NS1 和 NS2 有 70 个氨基酸的重叠,在氨基端有 9 个氨基酸是相同的。从人、猪、马分离的 A 型流感病毒,其 NS1 抗原性非常相似,一般方法难以区分,而禽流感毒株的 NS1 抗原性有变异。NS1 蛋白在 1971 年从流感病毒感染的细胞中分离出来,定位于核内,其功能直到 90 年代才逐步阐明。NS1 蛋白是一个具有多种活性的独特的转录控制剂,至少具有以下三种活性:①抑制包

含由 poly(A) 尾的成熟 mRNA 的出核;②抑制前体 mRNA 的拼接;③通过整合双链 RNA 而抑制双链 RNA 蛋白激活酶(PRR)的活性。

2 流感(禽流感)病毒抑制剂

2.1 中药方面 在中国药典的三千多种中草药中有抗病毒作用的有几十种,其中作为主药用于抗病毒治疗的中草药也不下十几种。然而,中药成分复杂多变,从单一中草药中提取的化合物可达到几百种,其中抗(禽)流感病毒的有效成分也有几种至几十种,甚至更多。所以中草药对(禽)流感的治疗往往同时从多个方面来影响(禽)流感病毒在人体中的发展过程。研究表明,中药抗病毒途径主要有两条:①直接抑制病毒。主要有阻断病毒繁殖过程的吸附、穿入、复制、成熟中的某一环节,从而达到抗(禽)流感病毒的目的;一类是多酚类物质,证明其可以抑制流感病毒蛋白质和 RNA 合成,同时也可抑制流感病毒的吸附作用,代表药物有:天然茶叶中提取的茶多酚以及百合科植物知母中提取的知母宁^[9];另一类是黄酮类物质,通过抑制流感病毒唾液酸酶的活性和抑制膜融合作用,代表药物有从北柴胡茎叶中提取的斛皮素、异鼠李素、芦丁和水仙苷等黄酮成分^[10]以及 Takayuki 等从黄芪的根和叶中提取 5,7,4-三羟-8-甲基黄酮和 5,7,8,4'-四氢黄酮等黄酮^[11]。②间接抑制病毒的中药,代表药物黄芪,主要化学成分有多糖、三萜皂苷、黄酮和生物碱等,其对病毒并无明显的灭活作用,但对细胞病变有一定抑制作用;黄芪,其所含的多糖成分能对病毒感染引起的小白鼠肺炎实变有明显的抑制作用^[12];人参,所含的人参皂苷等有效成分能通过提高人体免疫来增强对(禽)流感病毒的抑制。虽然,中药对(禽)流感病毒的抑制机理已经有很深入的研究,但中药对(禽)流感病毒的预防作用远远超过了对病毒的治疗作用^[13]。

2.2 化学合成药物

2.2.1 以 M2 受体为靶点的药物 金刚烷胺和金刚乙胺是作用于 M2 蛋白离子通道的流感病毒抑制剂。金刚烷胺是人类开发的第一个抗流感病毒药物,1964 年 Davies 等首次报告了金刚烷胺的抗病毒作用后,1987 年就研制出其衍生物金刚乙胺,亦用于抑制 A 型流感病毒。后者的口服利用度可达到 90%,血药浓度达到 44%~46%,半衰期是前者的 3 倍^[14]。到目前为止,针对 M2 受体的药物仍以金刚烷胺(amantadine)和金刚乙胺(rimantadine)为主力。在感染流感病毒的前期服用效果迅速有效,两者都是通过阻断 M2 蛋白通道来抑制 A 型流感病毒

进入细胞的,是 A 型流感病毒特异性抑制剂,对预防 A 型病毒具有一定的作用^[15]。但是该类药物的严重副作用以及 M2 蛋白的强变异性,限制了该类药物的临床应用^[16]。

2.2.2 以 HA 为靶点的药物 HA 是位于流感病毒表面的一个重要糖蛋白,在转录后首先表达为无活性的前体 HA0,然后经过蛋白酶催化水解为两个有活性的多肽亚单位 HA1 和 HA2。HA1 介导病毒与感染细胞受体上唾液酸之间的吸附作用;HA2 引导病毒包膜和核内体膜的融合。以 HA1 和 HA2 为靶点,已经发现了一些有抗流感病毒活性的化合物。

①流感病毒吸附抑制剂 已知流感病毒 HA1 链远端球状头部上的抗原表位可以识别和多价结合细胞表面受体上的唾液酸,介导病毒的吸附。唾液酸类似物可以诱使 HA1 链上的受体结合位点与之结合,从而干扰或阻断病毒的吸附作用^[17]。单价的唾液酸类似物不能有效地与靶细胞上的多价受体竞争结合流感病毒,因此,为了提高抗病毒作用,研究人员通过多种方法设计合成了二价和多价唾液酸类似物(包括唾液酸糖苷脂质体、唾液酸糖苷多聚物和树突状唾液酸类似物)。Reuter 等对多价唾液酸类似物的研究表明,结构和形状对此类药物的作用效果有明显影响。他们对线形、球形和树突状等几种不同形状的多聚物分别进行了抗流感病毒的体外实验,结果显示,树突状唾液酸类似物的作用效果最佳,并且,在治疗水平无细胞毒作用^[18]。

②细胞-病毒膜融合抑制剂 流感病毒与核内体膜发生融合是病毒基因组进入细胞并进行复制的关键步骤。流感病毒 HA2 链在核内体 pH 降至 5 左右时发生构象变化,N 端的融合肽暴露并插入核内体膜中,引导两者的膜融合。目前文献报道的流感病毒膜融合抑制剂多数是通过抑制低 pH 诱导的 HA 构象变化发挥抗病毒作用,其中代表性药物是司他弗林(Stachyflin)^[19,20]。体外实验证实,此化合物能够稳定 HA 在中性 pH 条件下的构象。另外,司他弗林只对流感病毒 H1 和 H2 两个亚型有效,而对 H3 和 B 型流感病毒无抑制作用,具有亚型特异性。而且由于 HA 的变异率很高,很难针对 HA 上的位点合成有效的抑制剂,所以很少有报道化学合成小分子能通过结合位点的方式来抑制 HA 的作用。

2.2.3 以 NA 靶点的药物 虽然 NA 和 HA 都是病毒侵入细胞和成熟释放的关键表面糖蛋白,与 HA 不同的是,NA 有相对保守的 RNA 转译序列,变异频率比 HA 低很多。鉴于其在病毒生命周期中的重要作用,NA 便成为一个重要的的抗病毒靶点^[21]! 自

1983年流感病毒NA与天然底物唾液酸共结晶的晶体结构得以确定以来,高亲和力的以NA为靶点的药物相继被开发出来。

Neu5Ae2en是最初设计的神经氨酸的脱水衍生物,它从分子构象上模拟了NA催化反应过程中的作用物过渡态,可以与NA结合并抑制其酶活性^[22]。为了增强Neu5Ae2en和酶活性中心的相互作用,研究人员对Neu5Ae2en的结构进行了改造:①以胍基取代4位碳原子上的羟基,得到扎那米韦(zanamivir, GG167);②应用一个环己烷及用亲脂性侧链取代极性丙三醇,得到奥塞米韦(oseltamivir, GS 4104)。每一个修饰都使其生物利用度和对靶点的亲和力大大提高,扎那米韦和奥塞米韦也是仅在美国获准上市的抗病毒新药。另外,带有一个胍基基团和亲脂性侧链的环戊烷衍生物RWJ-270 201(BCX-1812, peramivir)对流感病毒NA的抑制活性比其他来源的NA的抑制活性强100万倍,正处于III期临床试验阶段^[23,24]。研究发现,它对于对扎那米韦和奥塞米韦已产生耐药性的甲型和乙型流感病毒变异体仍有较强的抑制作用。另外,其他类的抗病毒制剂,如:核酸抑制剂,转录抑制剂等。

2.2.4 流感疫苗 各种病毒疫苗有其天生的优点:针对性强,起效快,适用人群广等,但是也有其致命的弱点,就是专一性太强而导致其抗病毒谱窄。往往是一种疫苗只能对一种病毒或者一类病毒有效,对其近亲弱效甚至无效,曾经有效的疫苗,对基因点变异的病毒无能为力了,并且面临加快基因重组的可能性,所以严禁对野生禽类接种疫苗。

目前,科学家们已经研制出针对禽流感病毒的疫苗,动物实验证明其确实对被感染动物有很好的保护作用,有效性得到很好的验证;但是尚未进入临床研究,无法保障被感染的患者使用后的安全,所以禽流感病毒疫苗的安全性问题还没有得到很好的证实^[25]。

参考文献:

- [1] Weiss EI, Hourri-Haddad Y, Greenbaum E, et al. Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity *Antiviral Research*, 2005, 66(1):9.
- [2] 康二勇, 赵锁花. “禽流感”病毒解析[J]. 当代禽畜养殖业, 2004, 7:36.
- [3] Gubareva LV, Kaiser L. Influenza virus neuraminidase inhibitors [J]. *Lancet*, 2000, 355: 827.
- [4] Varghese JN, Colman PM. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 1991, 221: 473.
- [5] Bennis JR, Palmore TN. The promise of siRNAs for the treatment of influenza [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(12):571.
- [6] 王乐, 郭蓓. 禽流感病毒的最新研究进展 [J]. 生命科学, 2006, 18(1):35.
- [7] Watanabe K, Handa H, Mizumoto K. Mechanism of inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein [J]. *J Virol*, 1996, 70:241.
- [8] Serkedjieva J. Antiinfective activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L [J]. *J Pharmazie*, 1997, 52(10):799.
- [9] 冯煦, 王鸣, 赵友谊, 等. 北柴胡茎叶总黄酮抗流感病毒的作用 [J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(4):15.
- [10] Turan K, Nagata K, Kuru A. Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. leaves extract on influenza virus-infected cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(1):22.
- [11] 李丽娅, 凌秋, 崔洪波, 等. 黄芪多糖抗流感病毒的试验研究 [J]. 中国中医药科技, 2002, 9(6):354.
- [12] 路振香, 时维静. 20份中草药提取液抗禽流感病毒作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(2):97.
- [13] 陈忠斌. 抗病毒药物的研究进展 [J]. 国外医学药学分册, 1998, 25(4):71.
- [14] Keyaor LA, Karl M, Nafziger AN, et al. Coraparison of central nervous system adverse effects of amantadine and rimantadine used as sequential prophylaxis of influenza A in elderly nursing patients [J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160:1485.
- [15] 徐坤, 侯雷, 杨松涛, 等. 金刚烷胺修饰物对禽流感(H5N1)病毒的抑制作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2007, 33(5):863.
- [16] Reuter JD, Myc A, Hayes MM, et al. Inhibition of viral adhesion and infection by sialic-acid-conjugated dendritic polymers [J]. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(2):271.
- [17] Yoshimoto J, Kakui M, Iwasaki H, et al. Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus [J]. *Arch Virol*, 1999, 144(5):865.
- [18] 顾觉奋, 韩方. 抗流感病毒抗生素研究开发进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(7):443.
- [19] Stoll V, Stewart KD, Maring CJ, et al. Influenza neuraminidase inhibitors: structure-based design of a novel inhibitor series [J]. *Biochemistry*, 2003, 42:718.
- [20] Kim CU, Lew W. Influenza neuraminidase inhibitors possessing novel hydrophobic interactions in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza active [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119:681.
- [21] Porotto M, Greengard O, Poltoratskaia N, et al. Human parainfluenza virus type 3 HN-receptor interaction effect of 4-guanidino-Neu5Ae2en on a neuraminidase-deficient variant [J]. *J Virol*, 2001, 75:7481.
- [22] Bantia S, Parker CD. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of Oseltamivir and zanamivir [J]. *Antimicrob agent and chemoth*, 2001, 45(4):1162.
- [23] 邱灵才, 陈建新, 方炳虎, 等. 抗流感及禽流感病毒新药“帕拉米韦”研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(6):36.
- [24] 刘英豪, 冉多良, 成进, 等. 禽流感疫苗研制进展 [J]. 中国动物检疫, 2007, 24(11):42.

收稿日期:2008-03-17