

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.01.0008

· 论 著 ·

利福平抗黄热病毒感染的效果及初步机制

吴兵安^{1△}, 钱汐晶^{1△}, 吴兴安², 徐铮昊¹, 罗正汉¹, 唐海琳¹, 赵平¹, 戚中田^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海 200433

2. 空军军医大学基础医学院微生物学教研室, 西安 710032

[摘要] **目的** 检测利福平抗黄热病毒(YFV)感染的效果并初步探索其机制。**方法** 用不同浓度(0.04、0.2、1、5、25、125、625 μmol/L)的利福平处理人肝癌细胞 Huh-7 24 h, 通过 CCK-8 检测利福平的细胞毒性并计算其细胞半数毒性浓度(CC₅₀)。YFV 感染 Huh-7 细胞的同时加入不同浓度(0.04、0.2、1、5、25 μmol/L)的利福平, 检测其抗 YFV 感染的剂量效应, 并计算 IC₅₀。YFV 感染 Huh-7 细胞的同时加入 5 μmol/L 利福平, 孵育不同时长(2、4、8、12、24 h), 检测其抗 YFV 感染的时间效应。YFV 感染 Huh-7 细胞后, 在感染的不同时间段(2、4、6、8、12 h)加入 25 μmol/L 利福平(药物作用时间 2 h, 病毒感染 2 h), 检测其抗 YFV 感染最显著的起效阶段。利用病毒结合实验、内吞荧光标记实验评价利福平对 YFV 入侵靶细胞的影响。**结果** 利福平细胞毒性较弱(CC₅₀ 为 176.9 μmol/L), 抑制 YFV 作用显著(IC₅₀ 为 1.868 μmol/L, $P < 0.01$); 动力学时间窗、结合和内吞实验表明, 利福平能抑制 YFV 结合、入侵靶细胞($P < 0.01$), 但不影响 YFV 的内吞过程。此外, 利福平在感染后期的复制阶段也有一定的抑制效果($P < 0.01$)。**结论** 利福平可抑制 YFV 感染靶细胞, 作用机制主要通过病毒感染早期的入侵阶段阻断病毒结合靶细胞。

[关键词] 利福平; 黄热病毒; 抗病毒药; 感染**[中图分类号]** R 373 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)01-0008-06

Antiviral effect of rifampin on yellow fever virus and its preliminary mechanism

WU Bing-an^{1△}, QIAN Xi-jing^{1△}, WU Xing-an², XU Zheng-hao¹, LUO Zheng-han¹, TANG Hai-lin¹, ZHAO Ping¹, QI Zhong-tian^{1*}

1. Department of Biomedical Defense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shannxi, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of rifampin on yellow fever virus (YFV) and its preliminary mechanism. **Methods** Indicated concentrations of rifampin (0.04, 0.2, 1, 5, 25, 125, 625 μmol/L) were incubated with human liver cancer cells Huh-7 for 24 h. The cytotoxicity of rifampin was measured by CCK-8 assay and the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was calculated. When Huh-7 cells were infected with YFV, different concentrations of rifampin (0.04, 0.2, 1, 5, 25 μmol/L) were added to detect the dose-response relationship of YFV resistance and to calculate the half inhibition concentration (IC₅₀); rifampin (5 μmol/L) was added and incubated for different exposure time (2, 4, 8, 12, 24 h) to detect the time-effect relationship of YFV resistance. Huh-7 cells were infected with YFV for 2 h, and rifampin (25 μmol/L) was added at different time points (2, 4, 6, 8, 12 h) for 2 h incubation. The most significant anti-YFV stage was detected. The effect of rifampin on YFV invasion was evaluated by virus binding assay and cholera toxin B (CTB)/transferrin (TF) mediated endocytosis experiment. **Results** Rifampin had a robust anti-YFV effect (IC₅₀ = 1.868 μmol/L, $P < 0.01$) with low cytotoxicity (CC₅₀ = 176.9 μmol/L). Kinetic test, binding and endocytosis experiments showed that rifampin could significantly inhibit YFV binding and invading target cells ($P < 0.01$), but did not affect the endocytosis process of YFV. Moreover, rifampin also had inhibitory effect at late YFV replication stage ($P < 0.01$). **Conclusion** Rifampin can inhibit YFV infection by blocking

[收稿日期] 2020-07-22 **[接受日期]** 2020-11-03**[基金项目]** 国家科技重大专项重大传染病防治课题(2017ZX10304403-003), 国家自然科学基金青年科学基金(31700147), 陕西省重点研发项目(2019ZDLSF02-03). Supported by National Major Science and Technology Project for Prevention and Control of Major Infectious Diseases of China (2017ZX10304403-003), National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (31700147), and Key Research and Development Project of Shannxi Province (2019ZDLSF02-03).**[作者简介]** 吴兵安, 硕士生. E-mail: 2928986405@qq.com; 钱汐晶, 博士, 讲师. E-mail: 437707827@qq.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

viral binding to the target cells at early stage of viral entry.

[Key words] rifampin; yellow fever virus; antiviral agents; infection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(1): 8-13]

黄热病毒 (yellow fever virus, YFV) 属于黄病毒科黄病毒属成员, 是一类有包膜的正义单链 RNA 病毒^[1], 其感染引起的黄热病目前主要在非洲和南美洲等热带地区流行^[2-3]。黄热病患者临床表现为高热、黄疸、出血、肝功能衰竭等^[4], 目前尚无有效的治疗药物, 临床上仅给予对症和支持治疗^[3,5-6]。尽管 YFV 疫苗在一定程度上降低了黄热病的发病率, 但由于疫苗覆盖率低, 非洲、美洲等地仍出现周期性的黄热病暴发^[7], 并且随着全球化进程 YFV 感染范围不断扩大, 已有多个国家和地区报道过黄热病输入病例, 我国也有输入性病例的报道^[8]。据统计, 全球每年 YFV 感染人数高达 20 万, 死亡人数超过 6 万^[9], 严重威胁人类的生命健康。鉴于 YFV 感染多发于热带地域, 其防控研究对于中非合作和“一带一路”建设非常重要。

利福平是临床常用的抗结核分枝杆菌药物, 抗菌机制主要是选择性抑制结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶, 阻碍 mRNA 转录^[10-11], 目前尚未见到其具有抗病毒活性的报道。我们前期从美国 FDA 小分子药物库中筛选出 10 $\mu\text{mol/L}$ 利福平能有效抑制 YFV 感染, 本研究对其抗 YFV 感染的效果及机制进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与病毒制备 人肝癌细胞 Huh-7、非洲猴肾细胞 Vero 由海军军医大学 (第二军医大学) 海军医学系生物医学防护教研室保存, 用含 10% FBS、非必需氨基酸、100 U/mL 青链霉素双抗和 2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液培养, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。YFV 疫苗株 (YFV-17D) 在 Vero 细胞内增殖, 待出现明显细胞病变后收集上清, 分装后存储在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。将病毒上清倍比稀释后, 加入提前接种有 Vero 细胞的 24 孔板, 通过空斑形成实验检测滴度。

1.2 药物与试剂 利福平 (批号: HY-B0272, 纯度为 98.07%) 购自美国 MCE 公司。CCK-8 细胞活性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。DMEM 培养基、Opti-MEM I 培养基、FBS、胰蛋白酶、EDTA 均购自美国 Gibco 公司。小鼠 Alexa Fluor[®] 488 二抗、DAPI、TRIzol 试剂、DMSO、荧光标记的霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B, CTB)、转

铁蛋白 (transferrin, TF) 购自美国 Invitrogen 公司, 小鼠抗 YFV 多克隆抗体为本实验室用甲醛灭活的全病毒免疫小鼠制备。

1.3 CCK-8 细胞活性检测 Huh-7 细胞接种于 96 孔板中培养过夜。第 2 天将不同浓度 (0.04、0.2、1、5、25、125、625 $\mu\text{mol/L}$) 的利福平加入 96 孔板中, 以 DMSO 作为对照。继续培养 24 h 后吸弃上清, 每孔加入 10% CCK-8 试剂孵育 1 h, 随后用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度 (D) 值, 计算不同浓度药物处理下的细胞活性, 评价利福平的细胞毒性并计算其细胞半数毒性浓度 (50% cytotoxic concentration, CC_{50})。

1.4 YFV 感染活性检测 Huh-7 细胞提前 1 晚接种于 96 孔板中。第 2 天加入 YFV (感染复数为 1) 感染 6 h, 同时分别加入 0.04、0.2、1、5、25 $\mu\text{mol/L}$ 的利福平, 以 DMSO 作为对照。药物作用 6 h 后, 弃上清, 补加含 10% FBS 的 DMEM 培养液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 吸弃上清。甲醇溶液固定后依次加入小鼠抗 YFV 多克隆抗体、抗小鼠 Alexa Fluor[®] 488 二抗、DAPI, 用细胞成像及分析系统 (BioTek Cytation 5 Imaging Reader) 进行免疫荧光检测并计数阳性克隆, 评价利福平抗 YFV 感染的剂量效应, 并计算 IC_{50} 。

1.5 利福平抗 YFV 感染时效检测 Huh-7 细胞提前 1 晚接种于 96 孔板中。第 2 天加入 YFV (感染复数为 1) 感染 6 h, 同时加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 利福平分别作用 2、4、8、12 和 24 h, 以 DMSO 作为对照。药物作用结束后, 弃上清, 补加含 10% FBS 的 DMEM 培养液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 吸弃上清, 部分孔中加入 10% CCK-8 试剂孵育 1 h, 随后用酶标仪测定 450 nm 波长处的 D 值, 评价利福平的细胞毒性; 部分孔中加入甲醇溶液固定后依次加入小鼠抗 YFV 多克隆抗体、抗小鼠 Alexa Fluor[®] 488 二抗、DAPI, 用细胞成像及分析系统进行免疫荧光检测并计数阳性克隆, 评价利福平抗 YFV 感染的时间效应。

1.6 YFV 感染的动力时间窗实验 Huh-7 细胞提前 1 晚接种于 96 孔板中。第 2 天, 分别于加入 YFV 感染前 2 h、加入病毒同时、病毒感染后 2、4、6、8、10、12 h 加入利福平 (25 $\mu\text{mol/L}$), 利福平作用时间为 2 h (病毒感染 12 h 后加入利福

平的作用时间段为12~24 h), 病毒感染2 h。以DMSO作为对照。药物处理结束后换含10% FBS的DMEM培养液100 μL继续培养24 h, 甲醇溶液固定后依次加入小鼠抗YFV多克隆抗体、抗小鼠Alexa Fluor® 488二抗、DAPI, 用细胞成像及分析系统进行免疫荧光检测, 计算靶细胞感染病毒的情况。

1.7 YFV结合靶细胞的影响 Huh-7细胞提前1晚接种于96孔板和24孔板中。第2天将YFV与靶细胞在冰上孵育, 使病毒结合在细胞表面, 同时加入利福平(25 μmol/L)处理2 h。以DMSO作为对照。药物处理后吸弃上清, 用预冷PBS清洗2次。96孔板中补加含10% FBS的DMEM培养液100 μL, 继续培养24 h后用细胞成像及分析系统进行免疫荧光检测; 24孔板直接加入TRIzol试剂裂解细胞, 抽提总RNA, 用qRT-PCR检测结合在靶细胞表面的YFV RNA水平。

1.8 利福平对YFV内吞入靶细胞的影响 Vero细胞提前1晚接种于96孔板中。第2天将标记了荧光的

内吞试剂CTB/TF与利福平(25 μmol/L)同时加入96孔板。以DMSO作为对照。37 °C孵育6 h后吸弃上清, 甲醇溶液固定后, 用细胞成像及分析系统进行免疫荧光检测。

1.9 统计学处理 应用GraphPad Prism 7软件进行数据处理和统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利福平处理组与对照组(DMSO组)之间差异的比较采用双因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 利福平细胞毒性较低, 且能抑制YFV感染靶细胞 CCK-8检测结果显示, 利福平对Huh-7细胞的毒性较低, 当浓度达到625 μmol/L时才表现出一定毒性(图1A), 其CC₅₀为176.9 μmol/L。利福平对YFV的感染具有抑制作用, 且呈浓度梯度依赖性(图1B、1C), 药物浓度达到25 μmol/L时利福平对YFV抑制率达99%。计算得利福平IC₅₀为1.868 μmol/L, 选择指数(SI值)为94.7。

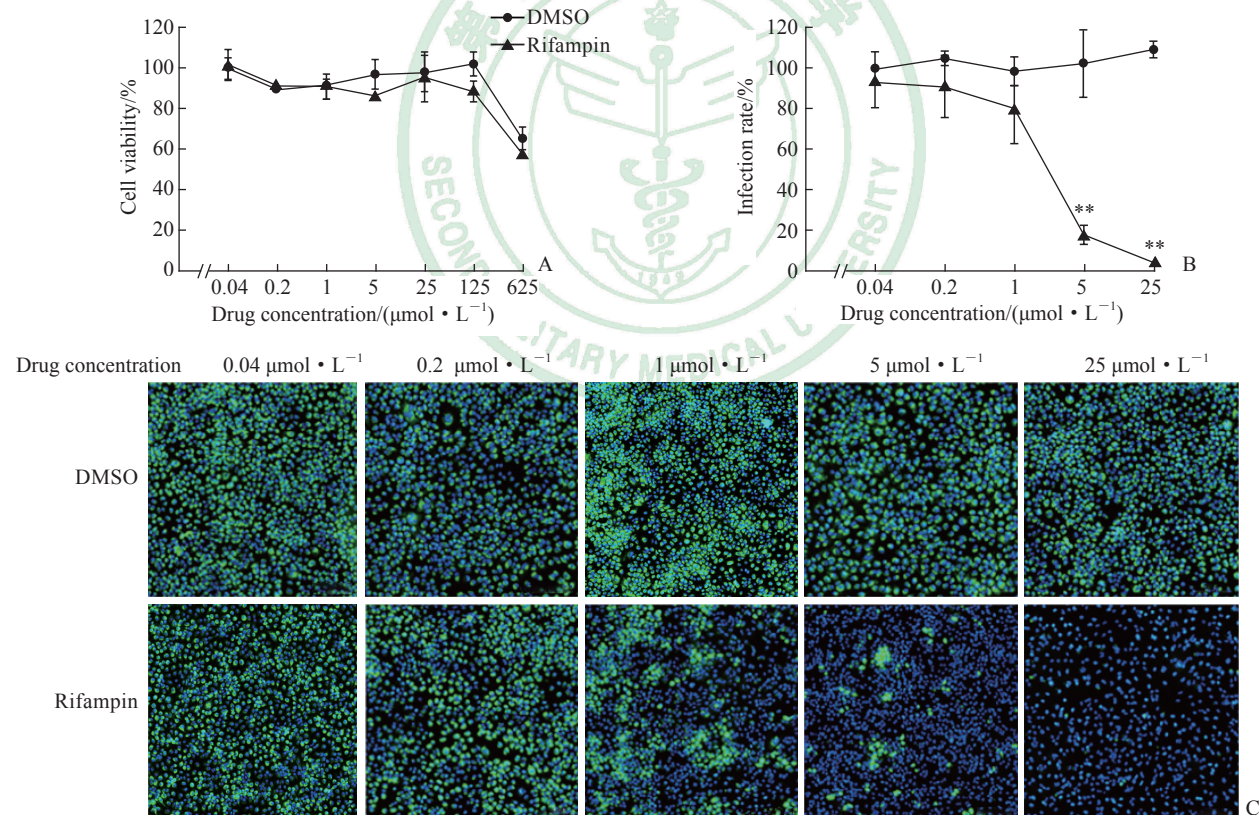


图1 不同浓度利福平对细胞活性及YFV感染的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of rifampin on cell viability and YFV infection

A: Cell viability of Huh-7 cells treated with rifampin for 24 h detected by CCK-8 assay; B: Infection rate of YFV (MOI=1) in Huh-7 cells treated with rifampin detected by immunofluorescence; C: Representative immunofluorescence pictures (10×). ** $P < 0.01$ vs DMSO group. $n=3, \bar{x} \pm s$. YFV: Yellow fever virus; DMSO: Dimethyl sulfoxide; CCK-8: Cell counting kit 8; MOI: Multiplicity of infection.

2.2 利福平抗YFV感染具有时间依赖性 随着利福平(5 μmol/L)作用时间的延长, 其对YFV的抑

制效果逐渐增加, 24 h时其抑制率达90%以上且对细胞无毒性(图2)。

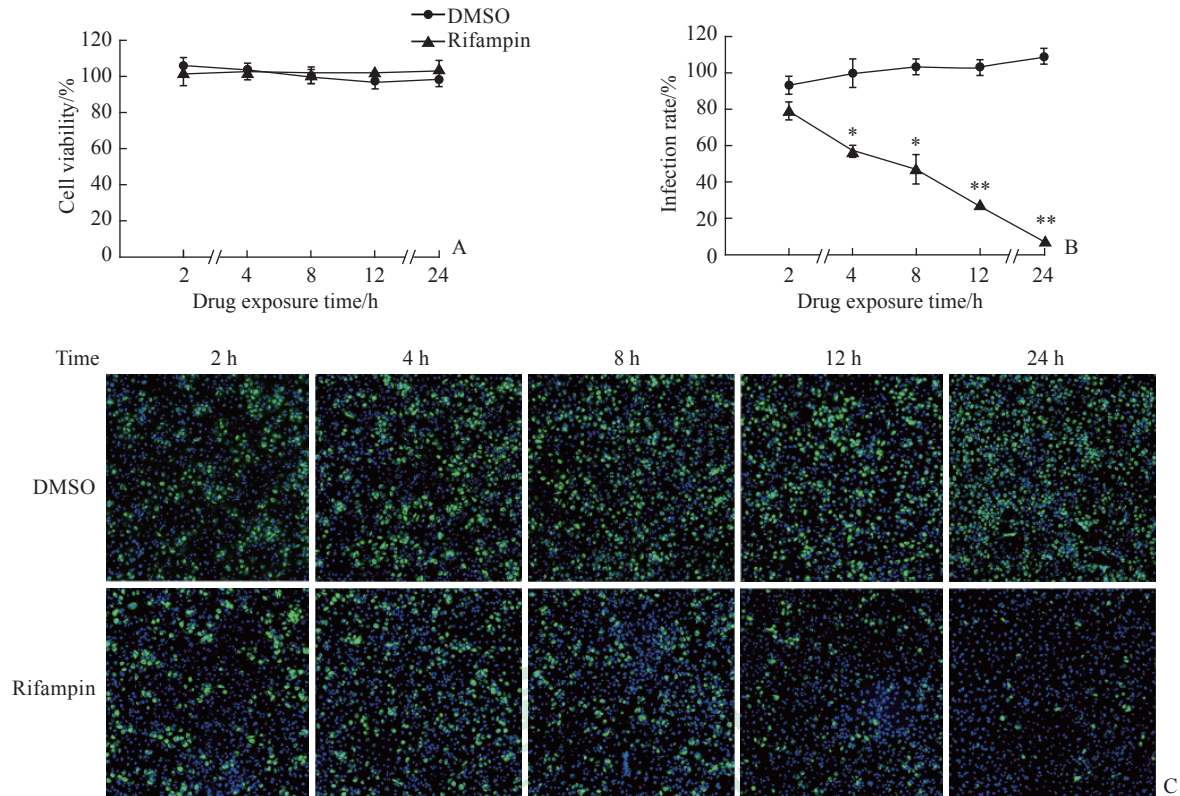


图2 利福平 (5 μmol/L) 作用不同时长对细胞活性及 YFV 感染的影响

Fig 2 Effect of rifampin (5 μmol/L) with different exposure durations on cell viability and YFV infection

A: Cell viability of Huh-7 cells treated with rifampin detected by CCK-8 assay; B: Infection rate of YFV (MOI=1) in Huh-7 cells treated with rifampin detected by immunofluorescence; C: Representative immunofluorescence pictures (10×). **P*<0.05, ***P*<0.01 vs DMSO. *n*=3, $\bar{x}\pm s$. YFV: Yellow fever virus; DMSO: Dimethyl sulfoxide; CCK-8: Cell counting kit 8; MOI: Multiplicity of infection.

2.3 利福平主要在 YFV 感染早期的入侵阶段发挥抗病毒作用 动力学时间窗实验结果表明, 在 YFV 感染后 0~2 h 加入利福平的抑制效果最为明显, 抑制率可达 90% 以上; 提前 2 h 加入药物处理并不能有效阻止病毒感染靶细胞; 此外, 随着药物作用

时间段的延后利福平对 YFV 感染的抑制效果逐渐下降; 然而, 感染 12 h 后加入利福平也有一定的抗 YFV 效果。这些结果提示, 利福平主要在 YFV 入侵阶段发挥抗病毒作用, 对入侵后的复制或释放阶段也有一定的抑制效果。见图 3。

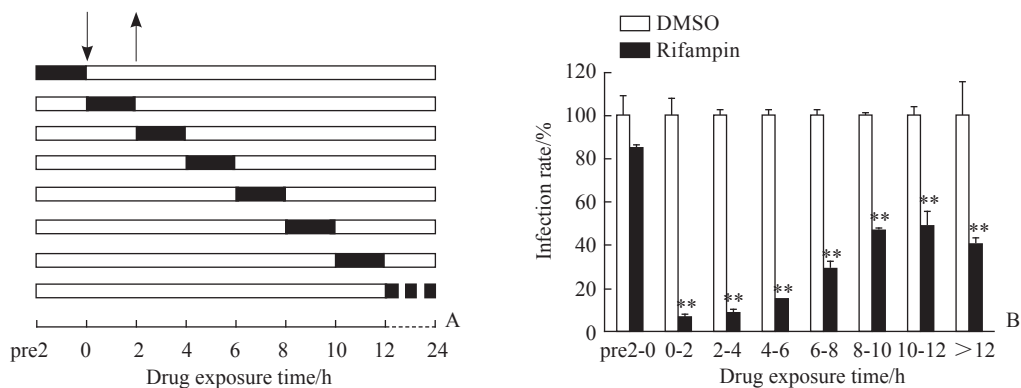


图3 YFV 感染不同阶段加入利福平 (25 μmol/L) 对病毒感染的影响

Fig 3 Effect of rifampin (25 μmol/L) on YFV infection after different exposure durations

A: Kinetic test of rifampin on YFV infection (■: Intervention time of rifampin; ↓: Time point of adding YFV; ↑: End of YFV infection). B: The infection rate was detected by immunofluorescence. ***P*<0.01 vs DMSO group. *n*=3, $\bar{x}\pm s$. YFV: Yellow fever virus; DMSO: Dimethyl sulfoxide.

2.4 利福平通过干扰 YFV 与靶细胞的结合抑制病毒入侵 结果显示, 25 $\mu\text{mol/L}$ 的利福平能抑制 YFV 结合至靶细胞表面, 免疫荧光检测抑制效

果可达 90% 以上 ($P < 0.01$, 图 4), YFV RNA 检测的抑制效果也在 70% 以上 (28.51 ± 1.93 vs 100.29 ± 7.57 , $P < 0.01$)。

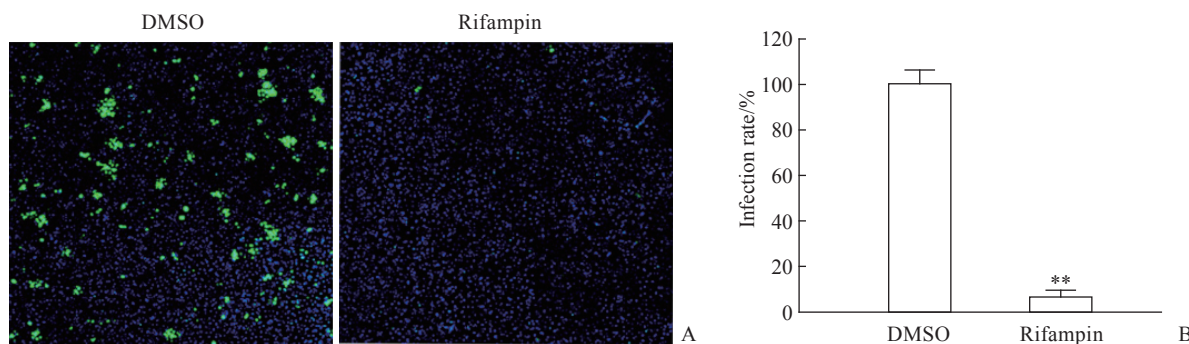


图 4 利福平 (25 $\mu\text{mol/L}$) 对 YFV 与靶细胞结合的影响

Fig 4 Effect of rifampin (25 $\mu\text{mol/L}$) on YFV binding to target cells

A: Representative immunofluorescence pictures (10 \times); B: Viral binding to target cells was detected by immunofluorescence 24 h post infection. ** $P < 0.01$ vs DMSO group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. YFV: Yellow fever virus; DMSO: Dimethyl sulfoxide.

2.5 利福平不影响 YFV 感染靶细胞的内吞过程 结果 (图 5) 显示, 25 $\mu\text{mol/L}$ 利福平不影响 YFV 靶细

胞对 TF 和 CTB 的内吞, 因此利福平不抑制 YFV 入侵阶段内吞过程。

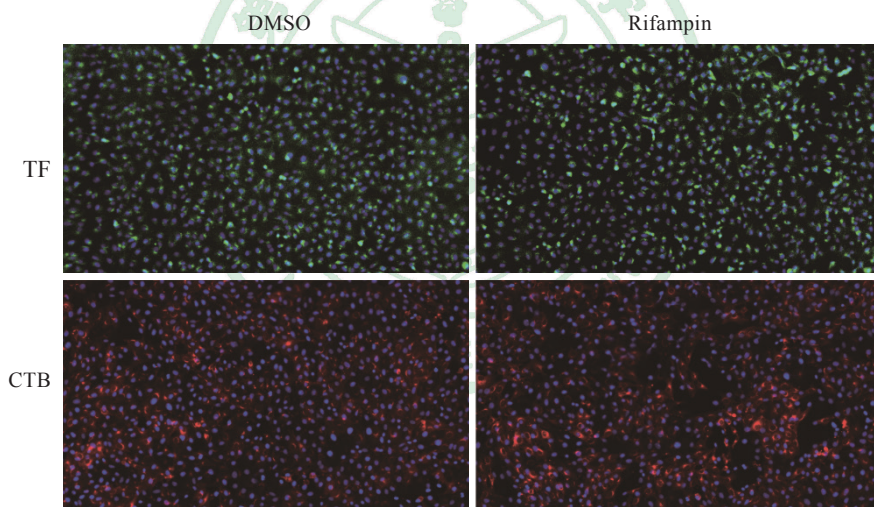


图 5 利福平 (25 $\mu\text{mol/L}$) 对 YFV 内吞入靶细胞的影响

Fig 5 Effect of rifampin (25 $\mu\text{mol/L}$) on the endocytosis of YFV into target cells

Representative immunofluorescence pictures (10 \times). YFV: Yellow fever virus; DMSO: Dimethyl sulfoxide; TF: Transferrin; CTB: Cholera toxin B.

3 讨论

在非洲和南美洲, YFV 仍然是导致致命性出血热的重要病原体^[12]。YFV 的分子结构、流行病学特点、传播途径等已基本明确, 但目前仍未有特异性、高效的抗病毒药物, 加之病毒流行区疫苗接种普及率低, 在疫情高发区黄热病的病死率仍非常高。本研究发现, 常用抗菌药物利福平能抑制 YFV 感染靶细胞。利福平作为一种经典的抗结核分枝杆菌药物, 动力学及代谢学等方面的数据已成熟完

善, 长期临床应用安全性较好, 最大安全剂量可达 35 mg/kg, 甚少出现严重的不良反应^[13]。本研究体外实验结果显示, 利福平主要在病毒感染早期的入侵阶段拮抗 YFV 感染靶细胞, 在感染晚期阶段也能发挥一定的抑制效果。我们初步分析利福平抑制 YFV 入侵的机制和方式是其干扰了病毒与靶细胞表面的结合。本研究结果表明, 提前加入利福平不能阻止 YFV 感染靶细胞, 而利福平与细胞、病毒同时孵育却能有效抑制病毒感染, 因此, 我们认为利福平可能通过某种机制破坏了病毒表面与靶细

胞结合的相关蛋白,从而抑制 YFV 入侵靶细胞。

入侵是病毒与宿主作用的最先过程,在此阶段干预可避免后续所有感染步骤的发生,起到预防和治疗感染的作用。疫苗不推荐用于幼儿、年迈及有免疫力缺陷等特定的高危人群,同时具有预防性和治疗性作用的药物可降低这些人群的患病率和病死率。

本研究在细胞层面证实利福平具有抗 YFV 感染的作用,并对其机制做了初步探索,其抗病毒靶点及具体的分子作用机制还需进一步研究,动物体内利福平的抗病毒活性也需进一步评价。

[参考文献]

- [1] GUARNER J, HALE G L. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2019, 36: 170-176.
- [2] BECK A, GUZMAN H, LI L, ELLIS B, TESH R B, BARRETT A D T. Phylogeographic reconstruction of African yellow fever virus isolates indicates recent simultaneous dispersal into east and west Africa[J/OL]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7: e1910. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001910.
- [3] MONATH T P, VASCONCELOS P F C. Yellow fever[J]. *J Clin Virol*, 2015, 64: 160-173.
- [4] HOLANDA G M, CASSEB S M M, MELLO K F L, VASCONCELOS P F C, CRUZ A C R. Yellow fever virus modulates the expression of key proteins related to the microRNA pathway in the human hepatocarcinoma cell line HepG2[J]. *Viral Immunol*, 2017, 30: 336-341.
- [5] MENDES E A, DE PILGER D R B, DE SEIXAS SANTOS NASTRI A C, DE MELLO MALTA F, PASCOALINO B D S, D'ALBUQUERQUE L A C, et al. Sofosbuvir inhibits yellow fever virus *in vitro* and in patients with acute liver failure[J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18: 816-824.
- [6] GARDNER C L, RYMAN K D. Yellow fever: a reemerging threat[J]. *Clin Lab Med*, 2010, 30: 237-260.
- [7] KLEINERT R D V, MONTOYA-DIAZ E, KHERA T, WELSCH K, TEGTMEYER B, HOEHL S, et al. Yellow fever: integrating current knowledge with technological innovations to identify strategies for controlling a re-emerging virus[J/OL]. *Viruses*, 2019, 11: 960. DOI: 10.3390/v11100960.
- [8] WANG Y, WANG X, LIU X, REN R, ZHOU L, LI C, et al. Epidemiology of imported infectious diseases, China, 2005-2016[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 25: 33-41.
- [9] FARIAN R, KRAEMER M U G, HILL S C, GOES DE JESUS J, AGUIAR R S, IANI F C M, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential[J]. *Science*, 2018, 361: 894-899.
- [10] WANG X, GRACE P M, PHAM M N, CHENG K, STRAND K A, SMITH C, et al. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain[J]. *FASEB J*, 2013, 27: 2713-2722.
- [11] TEMPLE M E, NAHATA M C. Rifapentine: its role in the treatment of tuberculosis[J]. *Ann Pharmacother*, 1999, 33: 1203-1210.
- [12] BEASLEY D W C, MCAULEY J, BENTE D A. Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy[J]. *Antiviral Res*, 2015, 115: 48-70.
- [13] HAAS M K, BELKNAP R W. Updates in the treatment of active and latent tuberculosis[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2018, 39: 297-309.

[本文编辑] 尹 茶