

# ApIV 3C 蛋白酶抑制剂的 虚拟筛选及活性测定

史艳丽<sup>1</sup>, 刘宇博<sup>1</sup>, 吴思晋<sup>2</sup>, 刘亚军<sup>1</sup>, 张嘉宁<sup>1</sup>, 李文利<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学生命与医药学院, 盘锦 124221;

2. 大连理工大学生命科学与技术学院, 分子药物中心, 大连 116023)

**摘要** 运用 Discovery Studio 4.5 软件, 通过同源建模及分子动力学优化获得柞蚕小吐白水软化病毒 (ApIV) 3C 蛋白酶的 3D 结构; 通过分子对接对天然产物库进行虚拟筛选, 得到 1 个 ApIV 3C 蛋白酶的有效抑制剂 3',4',5,7-四羟基异黄酮 (Orobol). 分子对接和分子动力学 (MD) 模拟结果进一步证明 Orobol 能稳定结合于 ApIV 3C 蛋白酶的结合口袋处. 体内外的 ApIV 病毒抑制实验结果表明, Orobol 具有良好的抗病毒活性.

**关键词** 柞蚕; 柞蚕吐白水软化病毒; 3C 蛋白酶; 抑制剂; 虚拟筛选

**中图分类号** O626.32

**文献标志码** A

吐白水软化病是柞蚕一种重要的病害, 通常发病于辽宁、吉林和黑龙江等天气寒冷的地区, 主要危害五龄柞蚕幼虫, 其平均发病率约 30%, 严重时甚至可以达到 70%~80%, 严重妨碍了柞蚕产业的发展<sup>[1-3]</sup>. 研究发现, 柞蚕吐白水病毒 (ApIV) 是柞蚕吐白水软化病的病原之一. ApIV 是一株小 RNA 病毒科的单正链 RNA 病毒, 由 10136 个碱基组成. ApIV 的 1 个开放阅读框编码含 3036 个氨基酸残基组成的前体蛋白, 在 3C 蛋白酶作用下, 该前体蛋白被切割成结构蛋白与功能蛋白. 前体蛋白的 N 端被切割为构成病毒衣壳的 4 种壳蛋白 (VP1, VP2, VP3 和 VP4), C 端被切割为病毒的功能蛋白 (解旋酶结构域的 2C 蛋白、半胱氨酸蛋白酶结构域的 3C 蛋白酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶结构域的 3D 蛋白)<sup>[4]</sup>. 小 RNA 病毒科的 3C 蛋白酶具有高度保守的活性位点<sup>[5-7]</sup>, 在前体蛋白的剪切过程中起重要作用<sup>[8-10]</sup>, 是小 RNA 病毒中唯一共有的蛋白酶, 宿主体内没有与之相似的蛋白酶. 因此, 该蛋白酶常被选作研制抗小 RNA 病毒抑制剂的靶标<sup>[11-20]</sup>.

本文通过同源建模<sup>[21-23]</sup>以及分子动力学 (MD) 优化构建了 ApIV 3C 蛋白酶的 3D 结构, 通过基于分子对接的虚拟筛选, 从天然产物库中虚拟筛选出 15 个苗头化合物. 经过 MD 优化后用分子对接和 MD 模拟进一步研究了这些化合物与 ApIV 3C 蛋白酶的结合模式. 结果表明, 异黄酮类化合物 3',4',5,7-四羟基异黄酮 (Orobol) 能稳定地结合于 ApIV 3C 蛋白酶的结合口袋处. 通过体内外的病毒抑制实验发现, Orobol 具有良好的抑制 ApIV 复制的作用, 具有抗病毒活性.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

体外筛选所用化合物购自云南西力生物股份有限公司; 昆虫细胞培养基 Sf-900 III SFM 购自美国 Hyclone 公司; RNA 提取试剂 (TRIzol)、反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent) 及实时定量荧光聚合酶链式反应试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq™) 购自宝生物大连有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯) 购自美国 Sigma 公司; 活细胞计数试剂盒 (CCK-8) 购自日本 DOJINDO 公司; 草地贪夜蛾细胞系 (Sf9) 和柞蚕病毒 (ApIV) 均由本实验室保存.

收稿日期: 2017-06-20. 网络出版日期: 2018-03-16.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 31570802, 21502015) 资助.

联系人简介: 李文利, 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学方面的研究. E-mail: biolwl@dlut.edu.cn

Hera cell 150 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司); Neofuge 13R 型高速离心机(上海力中科学仪器有限公司); Spcetra max Plus 型酶标仪(美国分子仪器公司); LightCycler 96 型聚合酶链式反应仪(美国 Roche 公司); Nanodrop 2000 型分光光度仪(美国 Thermo 公司). 药物设计软件 Discovery Studio 4.5(美国 Accelrys Software 公司); 分子对接软件 AutoDock 4.2(美国斯克利普斯研究所).

## 1.2 实验过程

1.2.1 同源建模及模型验证 从 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中下载 ApIV 3C 蛋白酶的氨基酸序列(登录号 KF751885), 使用 Discovery Studio (DS) 4.5 软件中 Homology Modeling 进行 ApIV 3C 蛋白酶的同源建模. 经分子动力学(MD)优化后, 使用 Ramachandran Plot 与 Profile-3D 对模型进行评估<sup>[24]</sup>.

载入氨基酸序列后, 使用 Blast search 从蛋白质结构数据库(PDB)中搜寻同源建模的模板, 再使用 Align Sequence to Templates 将目标序列比对至模板序列, 然后使用 Modeler 依据目标序列与模板的结晶结构建立 ApIV 3C 蛋白酶的 3D 结构.

用 Prepare Protein 工具对蛋白酶结构进行预处理, 其中 Build loops 设为 true, Keep water 设为 none, 将半胱氨酸(Cys)的巯基设置为去质子化状态, 将组氨酸(His)设置为双质子化状态, 完成去水、加氢及补全 Loop 结构等过程. 添加 Charmm36 立场, 通过 Solvation protocol 将蛋白酶模型溶剂化, 将模型放到含生理盐水(质量体积分数 0.85%)的周期性边界条件立方体中. 再通过 Standard Dynamics Cascade protocol 经过优化 1 (Minimization I)、优化 2 (Minimization II)、升温(Heating)、平衡(Equilibration)和 20 ns 模拟采样(Production)等处理完成该蛋白酶的 MD 优化.

使用 Homology Modeling 中 Ramachandran plot 和 Profile 3D 对构建的 3C 蛋白酶模型进行评估.

1.2.2 基于分子对接的虚拟筛选 使用 AutoDock 4.2 和 DS 4.5 软件中 Lib-dock 进行分子对接, 从含 3500 多个天然化合物的数据库中虚拟筛选 ApIV 3C 蛋白酶的先导化合物.

依据目标序列与模板序列的多序列比对, 选取保守氨基酸所在的区域作为 ApIV 3C 蛋白酶的活性位点<sup>[25]</sup>.

在 AutoDock 4.2 软件中使用 UNIX 命令和 Python 脚本准备受体与配体的对接模型文件(PDBQT), 进行虚拟筛选, 输出 Binding energy<sup>[26-29]</sup>.

使用 DS 4.5 软件中 Lib-dock 分子对接进行进一步的虚拟筛选<sup>[24]</sup>. 用 Full Minimization 工具对数据库中的配体小分子进行能量最优化, 用 Prepare Protein 工具对蛋白酶受体进行去水、加氢及补全 Loop 结构等操作. 使用 Dock Ligands(LibDock) protocol 执行分子对接运算, 输出 Libdock-score.

1.2.3 结合模式分析 将分子对接结果经过 MD 优化后, 用 Pymol 作图显示 ApIV 3C 蛋白酶与化合物的结合模式, 分析在 MD 优化过程中每一个氨基酸的均方根波动(RMSF)情况.

1.2.4 体外抑制病毒实验 取密度为  $3.7 \times 10^5$  cell/mL 的草地贪夜蛾细胞系(Sf9 细胞)接种到 12 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL. 置于 27 °C 培养箱中孵育 24 h 后, 接种 ApIV 病毒(CID<sub>50</sub> = 0.01 T). 实验组用终浓度为 1 μg/mL(取 1 mg 化合物用 100 μL DMSO 溶解, 用培养基 10 倍稀释)的苗头化合物处理, 对照组用相同体积的 DMSO 处理. 孵育 16 h 后, 提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 通过实时定量聚合酶链反应(q-PCR)检测病毒的拷贝数, 确定该化合物的抗病毒活性. 针对有抗病毒活性的化合物, 再分别使用终浓度为 0.1, 1.0 和 10 μg/mL 的化合物处理同上的感染 ApIV 病毒的 Sf9 细胞, 使用 q-PCR 检测不同浓度化合物处理的病毒拷贝数, 每组重复 3 次. 以 β-Actin 基因作为内参, 做均一化处理.

使用活细胞计数试剂盒(CCK-8)检测该化合物的细胞毒性. 将 Sf9 细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 接种密度为  $5 \times 10^4$  cell/孔. 置于 27 °C 培养箱中孵育 24 h 后, 加入化合物对细胞进行处理, 终浓度为 10 μg/mL. 孵育 16 h 后, 加入 10 μL CCK-8 试剂, 再孵育 4 h. 用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度值(记为  $A_s$ ). 对照组用相同含量的 DMSO 处理, 其值记为  $A_c$ . 空白组只加入相同体积的培养基和 DMSO, 其值记为  $A_b$ . 使用相对细胞活性来表征化合物的细胞毒性, 计算公式如下:

$$\text{Relative cell activity} = [(A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100\% \quad (1)$$

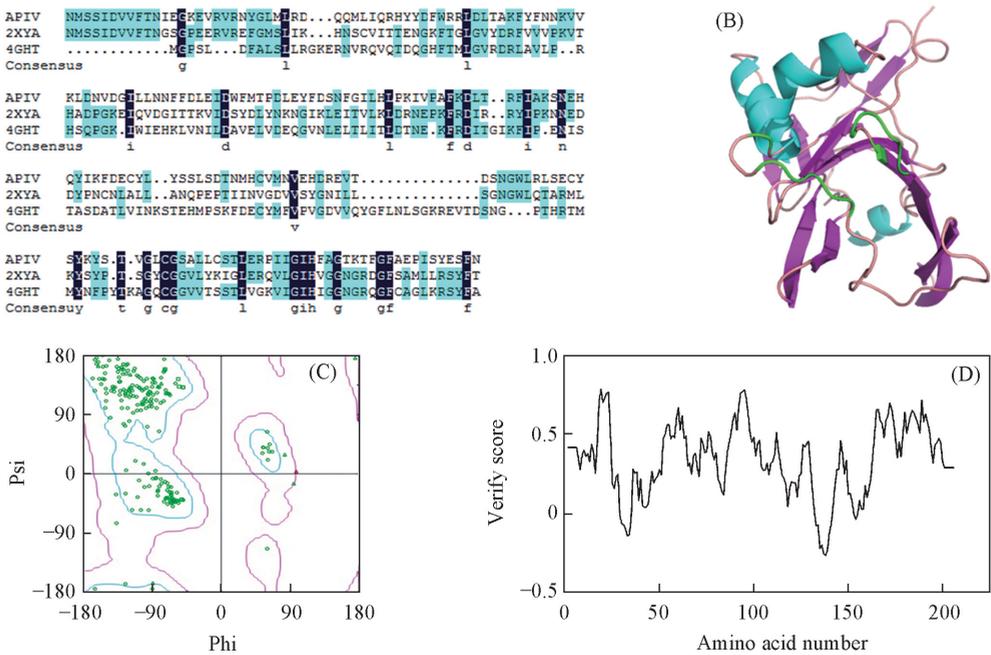
1.2.5 体内抑制病毒实验 取健康、体重及发育一致的柞蚕蛹, 用 75%(体积分数)的酒精浸泡 15 min

杀菌. 每只蚕蛹注射  $1 \times 10^7$  的 ApIV 病毒, 然后分别用 0.1, 1.0, 10 和 100  $\mu\text{g}$  剂量的化合物处理蚕蛹, 于 27  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中放置 24 h, 用相同体积 DMSO 处理的蚕蛹作为阳性对照, 不做任何处理的蚕蛹作为阴性对照. 提取脂肪体总 RNA, 反转录成 cDNA, 经 q-PCR 检测病毒拷贝数, 确定该化合物的抗病毒活性, 并通过观察蚕蛹颅顶板的颜色确定感染病毒的情况. 蚕蛹感染病毒后, 颅顶板会随着病毒复制拷贝数的增加由白色逐渐变为黑色, 颜色越深表明病毒的拷贝数越多.

## 2 结果与讨论

### 2.1 同源建模与模型验证

使用 DS 4.5 软件的 Blast search 从 PDB 数据库中获得了 2 个用于同源建模的模板 (PDB\_ID: 2XYA 和 4GHT)<sup>[30,31]</sup>. 使用 Clustal X2 进行目标序列与 2 个模板序列之间的多序列比对, 结果显示序列的一致性达到 38.57% [图 1(A)]. 再使用 DS 4.5 软件的 Modeler 构建 ApIV 3C 蛋白酶模型, 对同源建模建立的模型进行 20 ns 的 MD 优化, 作为 ApIV 3C 蛋白酶的最终模型 [图 1(B)].



**Fig.1 Homology modeling and model validation of ApIV 3C protease**

(A) Multiple alignment of query sequence and templates (PDB: 2XYA and 4GHT) protein sequence. Navy blue represents conserved residues; (B) Homology model (3D structure) of ApIV 3C protease after molecular dynamics (MD) simulation. The active pocket is constituted by green amino acid residues; (C) the Ramachandran plot of ApIV 3C protease model; (D) the profile 3D model of ApIV 3C protease.

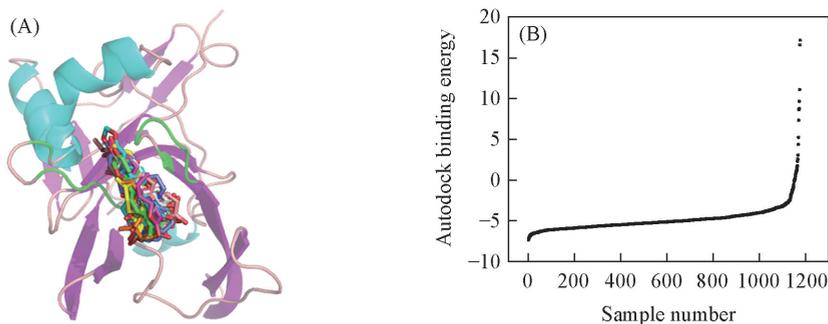
使用 Ramachandran Plot 与 Profile 3D 进行模型的评估. Ramachandran Plot 评估显示了氨基酸在最适区、允许区及不允许区的分布. 由图 1(C)可知, 有 329 个氨基酸残基 (占 97.05%) 落在最适区, 9 个氨基酸残基 (占 2.65%) 落在允许区, 1 个氨基酸残基 (占 0.29%) 落在不允许区 [图 1(C)]. Profile 3D 显示出模型的每一个氨基酸残基的 Verify Score 值, Verify Score > 0 的氨基酸残基代表构象合理的氨基酸残基. 由图 1(D)可知, 大部分氨基酸残基的 Verify Score > 0. Ramachandran Plot 评估与 Profile-3D 评估结果表明, 所示构建的 ApIV 3C 蛋白酶模型是合理的.

### 2.2 基于分子对接的虚拟筛选

对目标序列 (ApIV) 与模板序列 (PDB\_ID: 2XYA 和 4GHT) 进行了多序列比对分析. 结果表明, Phe102, Asp104, Cys169, Gly170, Gly184, Ile185 和 His186 氨基酸残基较为保守, 将这些保守氨基酸作为 ApIV 3C 蛋白酶的活性位点.

使用 AutoDock 4.2 软件从天然产物库中虚拟筛选 ApIV 3C 蛋白酶抑制剂, 并统计这些化合物的结

合能[图 2(A)]. 选取结合能前 55 的化合物使用 DS 4.5 软件中的 Lib-Dock 进行虚拟筛选. 综合考虑分子对接打分、分子对接结合模式和化合物的生物活性和类药性, 选取了 15 个苗头化合物进行下一步的实验验证. 这 15 个化合物与 ApIV 3C 蛋白酶的结合模式如图 2(B)所示.



**Fig.2 Virtual screening and molecular docking**

(A) Binding energy distribution of the docking results about ligands; (B) binding mode of fifteen hit compounds in the ApIV 3C protease model by docking studies using AutoDock.

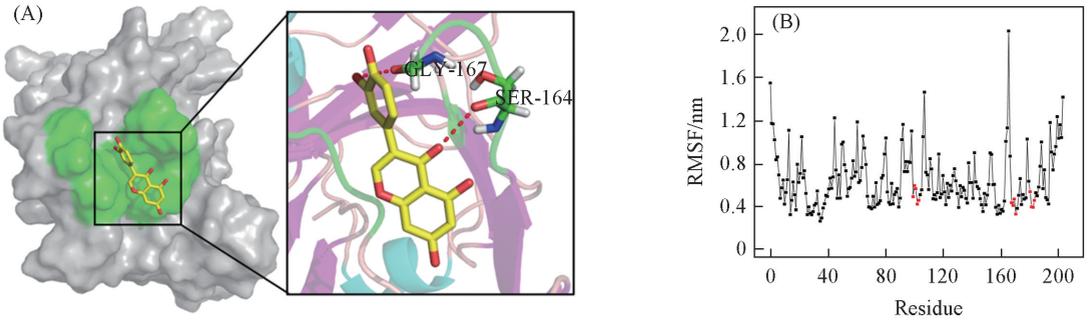
所筛选的 15 个化合物的生物活性、分子对接打分和与化合物形成 H 键与  $\pi$ - $\pi$  键相互作用的氨基酸残基结果统计如表 1 所示.

**Table 1 Summary of virtual screening results**

No.	Compd.	Biological activity	Dock-Score		Interaction residues	
			AutoDock	LibDock	HBond	$\pi$ - $\pi$ Bond
1	Orobol	Hypotensivel, enzyme inhibitor	-6.4	114.345	Gly167, Ser164	Tyr163
2	Tanshinlactone	Anti-tumor	-6.1	99.7829	—	Tyr163
3	Maackiain	Antifungal	-5.6	81.7844	Cys123	Cys123
4	(-)-Epiafzelechin	Antioxidant, enzyme inhibitor, anti-inflammatory	-5.4	83.1081	—	Val166
5	2- $\alpha$ ,3- $\alpha$ ,23-Trihyd-roxy-olean-12-en-28-oic acid	Anti-inflammatory	-5.1	78.322	Cys123	Tyr163
6	(+)-Conocarpan	Analgesic, antifungal	-5.3	80.6224	—	Glu112, Tyr163
7	Sakuranetin	Phytoalexin	-5.3	80.6224	—	Tyr163
8	Dehydro- $\alpha$ -lapachone	Antivascular, antifungal	-5.3	84.7844	—	—
9	Illicic acid	Anti-inflammatory	-5.2	82.089	—	—
10	Naringenin	Anti-tumor, anti-cancer, antiulcer, antiatherogenic	-5.2	75.367	—	Tyr163
11	Luteolin	Anti-inflammatory, antispasmodic, antitussive, antioxidant, antiallergic	-5.2	78.959	Cys123	Tyr163
12	Carabrone	Antifungal	-5.1	72.633	—	—
13	Dehydrocostus lactone	Antibacterial, antimicrobial	-5.1	73.830	—	—
14	Apigenin	Anti-tumor, anti-cancer, anti-inflammatory	-5.1	70.493	—	Tyr163
15	1-Hydroxyrutaeacarpine	Antiplatelet, aggregation	-5.1	75.472	—	Tyr163

### 2.3 结合模式分析

经过 20 ns 的 MD 优化后, 分析苗头化合物与 ApIV 3C 蛋白酶的结合模式. 结果表明, 异黄酮类化合物 Orobol 的 4' 位上的羟基与 Gly167 残基形成了氢键相互作用, 羰基与 Ser164 残基形成了氢键相互作用. 苯并吡喃-4 酮环与 Tyr163 残基形成了 2 个  $\pi$ - $\pi$  键相互作用. 苯并吡喃-4 酮环与 Ile183, Ile185 和 Pro198 残基形成了  $\sigma$ - $\pi$  键相互作用, 苯环与 Pro198, Lys103 和 Ile185 残基形成了  $\sigma$ - $\pi$  键相互作用. 化合物与活性口袋处的 Pro100, Gly170, Ser171, Gly184, Ala196, Glu197 和 Ile199 残基形成了 1 个范德华力网, 这些相互作用使 Orobol 能稳定地结合于 ApIV 3C 蛋白酶的结合口袋处[图 3(A)]. ApIV 3C 蛋白酶各个氨基酸残基在 MD 模拟过程中的稳定性用 RMSF 进行表征, 结果表明, Ala101, Phe102, Lys103, Asp104, Leu105, Gly170, Ser171, Ala172, Leu173, Ile183, Gly184, Ile185 和 His186 这些位于活性口袋处的氨基酸残基在 MD 模拟过程中的波动处于其附近区域的最低点, 波动不大, 比较稳定, 说明 Orobol 能稳定地结合于 ApIV 3C 蛋白酶的结合口袋处[图 3(B)].

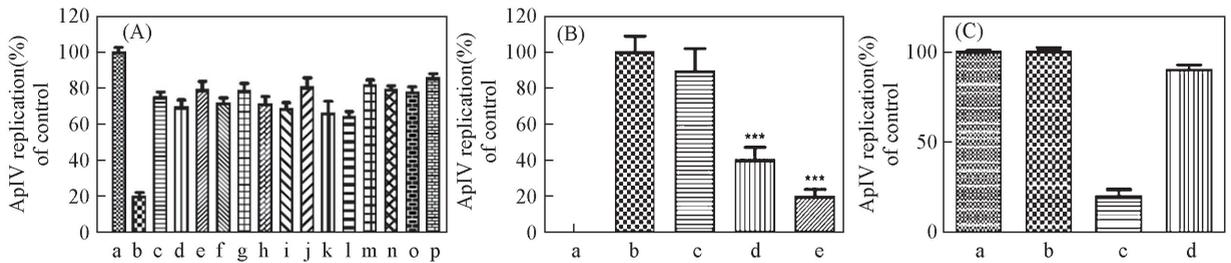


**Fig.3 Analysis of binding mode between orobol and ApIV 3C protease**

(A) Binding mode of orobol with ApIV 3C protease by molecular docking studies using AutoDock. In the solid surface, the pocket (green) is labeled. Local amplify docking interaction structure of orobol along with hydrogen bonds; (B) the root mean square fluctuation (RMSF) of ApIV 3C protease model over 20 ns molecular dynamics (MD) simulation. The red dot represents the amino acid residue in the active site pocket.

## 2.4 体外抑制病毒实验

用终浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的苗头化合物处理接种了 ApIV 病毒的细胞, 经 q-PCR 检测抗病毒活性. 结果表明, Orobol 有明显的抑制 ApIV 复制的作用, 显示出良好的抗病毒活性 [图 4(A)]. 分别用终浓度为  $0.1$ ,  $1.0$  和  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 Orobol 处理接种 ApIV 病毒的细胞, q-PCR 检测实验结果表明, 随着 Orobol 浓度的升高, 其抑制 ApIV 病毒复制的作用越强, 证明 Orobol 抗病毒的效果越好, 当 Orobol 的浓度达到  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 ApIV 复制的抑制率达到了  $80.5\%$  [图 4(B)]. 采用 CCK-8 法检测了 Orobol 的细胞毒性, 结果表明, 当 Orobol 的浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞活性仅降低  $3.42\%$ , 说明在此浓度下, Orobol 对细胞的生长基本上无影响, 即 Orobol 的细胞毒性低 [图 4(C)]. 以上结果表明, Orobol 在体外具有良好的抗病毒活性.

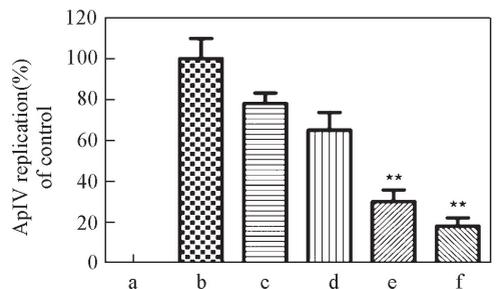


**Fig.4 Assays of antiviral activity and cell cytotoxicity in vitro**

(A) q-PCR analysis of the effect of 15 compounds at  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  concentration for ApIV replication. a. Control, b. 1, c. 2, d. 3, e. 4, f. 5, g. 6, h. 7, i. 8, j. 9, k. 10, l. 11, m. 12, n. 13, o. 14, p. 15; (B) q-PCR analysis of the effect of Orobol for ApIV replication. a. negative control, b. positive control, c. (orobol)/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): e.  $0.1$ , d.  $1$ , e.  $10$ ; (C) the analysis of cell cytotoxicity for Orobol. a. blank; b.  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  orobol; c. ApIV; d. ApIV+ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  orobol.

## 2.5 体内抑制病毒实验

分别用不同剂量的 Orobol 处理接种了 ApIV 病毒的蚕蛹, 培育  $24 \text{ h}$ , q-PCR 检测实验结果表明, 随着 Orobol 浓度的升高, 其抑制 ApIV 病毒复制的作用越强, 证明 Orobol 抗病毒效果越好, 当 Orobol 的剂量为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 ApIV 复制的抑制率达到  $82\%$  (见图 5). 阴性对照组蚕蛹的颅顶板呈白色, 阳性对照组蚕蛹的颅顶板呈黑色. 注射不同剂量 Orobol 的 ApIV 病毒蚕蛹, 随着注射 Orobol 的剂量增加, 蚕蛹颅顶板的颜色逐渐变浅, 说明 Orobol 在体内具有抗病毒活性 (见图 6).



**Fig.5 q-PCR analysis of the effect of orobol for ApIV replication**

a. negative control; b. positive control; c. (orobol)/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): c.  $0.1$ ; d.  $1$ ; e.  $10$ ; F.  $100$ .



Fig.6 Color change of epicranium of the antheraea pernyi pupae treated with ApIV and different dose orobol

### 3 结 论

通过基于分子对接的虚拟筛选方法,从天然产物库中筛选出1个ApIV 3C蛋白酶的抑制剂——异黄酮类物质 Orobol. 分子对接与分子动力学(MD)模拟结果表明, Orobol 能稳定地结合于 ApIV 3C 蛋白酶的结合口袋处. 体外抑制病毒复制实验结果表明,当 Orobol 的浓度达到 10 μg/mL 时,对病毒在细胞内复制的抑制率达到 80.5%,且细胞毒性低. 分别用不同剂量的 Orobol 处理接种了 ApIV 病毒的蚕蛹,进一步证实 Orobol 可以抑制 ApIV 病毒在蚕蛹体内的复制,可见 Orobol 在体内也具有抗病毒活性.

### 参 考 文 献

- [1] Wu P. Y., Wei C. G., *Liaoning Agricultural Sciences*, **1995**, (5), 12—17(吴佩玉, 魏成贵. 辽宁农业科学, **1995**, (5), 12—17)
- [2] Zhang X. Z., Sun F. Y., *Science of Sericulture*, **1980**, (6), 187—191(张秀珍, 孙芳义. 蚕业科学, **1980**, (6), 187—191)
- [3] Ma L. F., Hu F. Z., *Liaoning Agricultural Sciences*, **2012**, (5), 39—40(马连福, 胡杏枝. 辽宁农业科学, **2012**, (5), 39—40)
- [4] Geng P., Li W., Lin L., de Miranda J. R., Emrich S., An L., Terenius O., *PLoS One*, **2014**, 9, 92—107
- [5] Wang X., Zhang J., Liu C., Yu H., Hu Y., *Virologica Sinica*, **2003**, 19(1), 39—42
- [6] Ongus J. R., Peters D., Bonmatin J. M., Bengsch E., Vlak J. M., van Oers M. M., *The Journal of General Virology*, **2004**, 85(12), 3747—3755
- [7] Chu L., Choy W. Y., Tsai S. N., Rao Z. H., Ngai S. M., *Protein Science*, **2006**, 15, 699—709
- [8] Liljas L., Tate J., Lin T., Christian P., Johnson J. E., *Archives of Virology*, **2002**, 147(1), 59—84
- [9] Kim B. K., Ko H., Jeon E. S., Ju E. S., Jeong L. S., Kim Y. C., *Euro. J. Med. Chem.*, **2016**, 120, 202—216
- [10] Ye S., Xia H., Dong C., Cheng Z., Xia X., Zhang J., Zhou X., Hu Y., *Virology*, **2012**, 428(2), 136—145
- [11] Kim B. K., Cho J. H., Jeong P., Lee Y., Lim J. J., Park K. R., Eom S. H., Kim Y. C., Kim B. K., *FEBS Letters*, **2015**, 589(15), 1795—1801
- [12] Weerawarna P. M., Kim Y., Kankanamalage A. C. G., Damalanka V. C., Lushington G. H., Alliston K. R., Mehzabeen N., Battaile K. P., Lovell S., Chang K., Groutas W. C., *Euro. J. Med. Chem.*, **2016**, 119, 300—318
- [13] Ma G., Ye Y., Zhang D., Xu X., Si P., Peng J., Xiao Y., Cao R., Yin Y., Chen J., Zhao L., Zhou Y., Zhong W., Liu H., Luo X., Chen L., Shen X., *Euro. J. Med. Chem.*, **2016**, 124, 981—991
- [14] Kim B. K., Ko H., Jeon E. S., Ju E. S., Jeong L. S., Kim Y. C., *Euro. J. Med. Chem.*, **2016**, 120, 202—216
- [15] Zhai Y., Ma Y., Ma F., Nie Q., Ren X., Wang Y., Shang L., Yin Z., *Euro. J. Med. Chem.*, **2016**, 124, 559—573
- [16] Zeng D., Ma Y., Zhang R., Nie Q., Cui Z., Wang Y., Shang L., Yin Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26(7), 1762—1766
- [17] Kawatkar S. P., Gagnon M., Hoesch V., Tiong-Yip C., Johnson K., Ek M., Nilsson E., Lister T., Olsson L., Patel J., Yu Q., *Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26(14), 3248—3252
- [18] Kuo C., Shie J., Fang J., Yen G., Hsu J. T., Liu H., Liang P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16(15), 7388—7398
- [19] Konno H., Wakabayashi M., Takanuma D., Saito Y., Akaji K., *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24(13), 3035—3042
- [20] Kumar V., Tan K. P., Wang Y. M., Lin S. W., Liang P. H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24(6), 1241—1254
- [21] Mohd H. B., Shazi S., Asad U. K., *Medicinal Chemistry Research*, **2012**, 21, 2229—2237
- [22] Xie Y. F., Jiang Y. R., Pan Y. F., Li C. J., *Journal of Central South University of Technology*, **2012**, 19, 3033—3039
- [23] Vivek K., Manjunath G., Kinjal P., Gulamnizami Q., Srumil S., *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2005**, 74, 42—48
- [24] Temml V., Kaserer T., Kutil Z., Landa P., Vanek T., Schuster D., *Future Medicinal Chemistry*, **2005**, 6(17), 1869—1881
- [25] Surekha K., Nachiappan M., Prabhu D., Choubey S. K., Biswal J., Jeyakanthan J., *Journal of Molecular Structure*, **2017**, 1127, 675—688
- [26] Sandeep G., Nagasree K. P., Hanisha M., Kumar M. M., *BMC Research Notes*, **2011**, 4(1), 445—445
- [27] Zhang R. B., Lu J. R., Liu J. B., Mu J. B., Yang X. Y., Wang H. Y., Wang M. J., Zhang H., Zhang M., *Chem. J. Chinese Universities*, **2015**, 36(8), 1521—1529(张瑞波, 卢俊瑞, 刘金彪, 穆江蓓, 杨旭云, 王宏韞, 王美君, 张贺, 张玫. 高等学校化学学报, **2015**, 36(8), 1521—1529)

2015, 36(8), 1521—1529)

- [28] Zhang L., Li H. F., Chen P., Sun W. B., Yan P. F., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, 32(4), 534—538
- [29] Chen C., Wang P., Zou L. W., Yang L., Fan Y. M., Hu W. Z., Ge G. B., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2017**, 33(2), 194—199
- [30] Wu C., Cai Q., Chen C., Li N., Peng X., Cai Y., Yin K., Chen X., Wang X., Zhang R., Liu L., Chen S., Li J., Lin T., *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **2013**, 69(Pt 5), 866—871
- [31] Hirai M., Terenius O., Li W., Faye I., *Insect Molecular Biology*, **2004**, 13(4), 399—405

## Virtual Screening and Activity Verification of Novel Inhibitors of ApIV 3C Protease<sup>†</sup>

SHI Yanli<sup>1</sup>, LIU Yubo<sup>1</sup>, WU Sijin<sup>2</sup>, LIU Yajun<sup>1</sup>, ZHANG Jianing<sup>1</sup>, LI Wenli<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Medicine, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China;

2. Center for Molecular Medicine, School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

**Abstract** *Antheraea pernyi* iflavivirus (ApIV) is an important cause of *Antheraea pernyi* vomiting disease (AVD) which is seriously harming the production of *Antheraea pernyi* (*A. pernyi*) industry in China. ApIV is a single-stranded, positive-sense RNA virus, belong to the picornavirida family. Due to the significant role of 3C protease in virus replication, it is considered to be an attractive drug target for developing antiviral therapeutic agents. Although great efforts have been made to develop 3C protease inhibitors, no effective anti-viral therapy for the prevention or treatment of diseases caused by ApIV infection is available. In this study, an effective inhibitor of ApIV 3C protease, 3', 4', 5, 7-tetrahydroxyisoflavone (Orobol), was identified through virtual screening using molecular docking against natural product library. And the binding mode of Orobol with ApIV 3C protease was stable through molecular docking and molecular dynamics simulation (MD). The biological data displayed that the inhibition ratio of virus replication was stronger with the increase of the concentration of Orobol. And when the concentration of Orobol was 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the inhibition ratio reached 80.5%. *In vivo* assay also demonstrated that Orobol could inhibit viral replication in *Spodoptera frugiperda* cell (Sf9) cells. Those results proved that Orobol was a novel inhibitor for the disease of *Antheraea pernyi* caused by ApIV infections.

**Keywords** *Antheraea pernyi*; *Antheraea pernyi* iflavivirus; 3C Protease; Inhibitor; Virtual screening

(Ed.: P, H, F, K)

<sup>†</sup> Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31570802, 21502015).