

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53 (12) :1334 - 1339; 4 December 2013  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## Colletodiol 降低聚合酶活性抑制流感病毒 (WSN/H1N1) 复制

赖文彬, 汪世雄, 叶昕\*

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 【目的】利用流感病毒启动子报告细胞株 (HeLa-IAV-Luc), 从微生物代谢产物化合物库中筛选具有抑制流感病毒 (WSN/H1N1) 效果的化合物, 并初步探索其抑制流感病毒的机理。【方法】首先用化合物处理感染流感病毒的 HeLa-IAV-Luc 细胞, 通过荧光素酶实验来筛选出能够抑制流感病毒的化合物。其次通过在流感病毒感染不同时间点加入化合物并检测病毒蛋白的表达水平, 以此来研究化合物在流感病毒复制的何时发挥作用, 并用假病毒实验进一步验证。同时通过流感病毒启动子报告实验来检测化合物对流感病毒 RNA 聚合酶 (viral RNA polymerase, vRNP) 活性的影响, 探究化合物抑制流感病毒的机理。最后通过实时荧光定量 PCR 来检测化合物对流感病毒 RNA 合成的影响。【结果】通过检测流感病毒感染的 HeLa-IAV-Luc 细胞中荧光素酶活性从化合物库中筛选出了具有抑制流感病毒活性的化合物 Colletodiol。通过在流感病毒感染不同时间点加药以及假病毒实验证明了 Colletodiol 在流感病毒进入细胞后发挥作用, 对血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白功能没有影响。通过启动子报告系统证明了 Colletodiol 能显著抑制流感病毒 vRNP 的活性, 流感病毒 RNA 的合成也因此受到抑制。【结论】通过 HeLa-IAV-Luc 细胞筛选出了具有抑制流感病毒活性的化合物 Colletodiol, 其抑制流感病毒的机理是能够显著降低流感病毒 vRNP 复合物的活性。

**关键词:** 流感病毒, 流感病毒启动子报告细胞株 (HeLa-IAV-Luc), Colletodiol, 流感病毒 RNA 聚合酶 (viral RNA polymerase, vRNP)

中图分类号: R395 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 12-1334-06

流感病毒是一种负链 RNA 病毒, 属于正粘病毒科, 包括 A, B 和 C 3 种型。A 型流感病毒是由 8 条负链 RNA 片段组成的包膜病毒, 每个片段编码 1 - 2 种蛋白质。根据 A 型流感病毒表面血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 蛋白抗原性的不同, 可分为多种亚型, HA 可分为 16 种亚型 (H1-H16), NA 可分为 9 种亚型 (N1-N9)<sup>[1]</sup>。流感病毒的复制周期可分为以下几个步

骤: 病毒侵染细胞, 病毒 RNA 聚合酶 (viral RNA polymerase, vRNP) 复合物入核, 病毒基因组转录和复制, vRNP 复合物出核, 病毒包装及出芽<sup>[2]</sup>。

流感病毒对人类的生命健康构成了重大威胁, 过去爆发的全球流感大流行都造成了严重的后果, 其中以 1918 年爆发的西班牙流感最为严重, 这次流感病毒的流行导致了全球将近 5000 万人死亡<sup>[3]</sup>。当前流感病毒的防控和治疗主要依靠疫苗和抗病毒

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2011CB504705)

\* 通信作者。Fax: +86-40-64807508; E-mail: yex@im.ac.cn

作者简介: 赖文彬 (1990 -), 男, 江西瑞金人, 硕士研究生, 研究方向为流感病毒与宿主细胞间的相互作用。E-mail: lwy460806347@163.com

收稿日期: 2013-04-11; 修回日期: 2013-04-28

药物。每年流行的流感病毒毒株难以预测,疫苗的生产周期相对较长以及疫苗本身的安全性问题等给疫苗的使用带来了一定的局限性<sup>[4]</sup>。当前用于抗流感病毒的药物主要分为两大类:神经氨酸酶(NA)抑制剂 Zanamivir(扎纳米韦)和 Oseltamivir(奥司他韦)<sup>[5]</sup>以及离子通道蛋白(matrix protein 2, M2)抑制剂 Amantadine(盐酸金刚烷胺)和 Rimantadine(金刚烷胺)<sup>[6]</sup>。现在世界范围内流行的流感病毒毒株大部分都已对 M2 抑制剂产生了抗性<sup>[7]</sup>,而对 NA 抑制剂有耐药性的流感病毒毒株也已经在全球范围内迅速传播<sup>[8]</sup>。因此,开发新型的抗流感病毒药物以及治疗方法具有非常重要的意义。

流感病毒的 vRNP 复合物由 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白组成。在流感病毒的生命周期中发挥着至关重要的作用,其发挥功能的关键区域结构也比较保守<sup>[9]</sup>。因此筛选针对 vRNP 的化合物不仅能有效的抑制流感病毒的复制,而且可以有效的避免病毒产生耐药性。流感病毒启动子报告细胞株(HeLa-IAV-Luc)是将 pREP4-FluA Luc 质粒转染到 HeLa 细胞中构建而成的。pREP4-FluA Luc 质粒 5'端包含有流感病毒 NP 片段的非编码区域,其后连接着萤火虫荧光素酶的编码基因。在流感病毒 vRNP 存在的条件下,萤火虫荧光素酶才能正常表达。因此流感病毒 vRNP 的活性可以通过荧光素酶的活性来衡量。HeLa-IAV-Luc 细胞株可作为筛选抗流感化合物的有效工具<sup>[10]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

293T 和 A549 细胞来自于本实验室冻存细胞,培养于含有 10% 胎牛血清(PAA)的 DMEM 培养基中(Gibco)。HeLa-IAV-Luc 稳定细胞株由本实验室人员构建。将 pREP4-FluA-Luc 质粒转染到 HeLa 细胞中,30h 后向细胞培养基中持续加入潮霉素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )筛选两周,之后细胞传代时维持潮霉素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用于筛选的化合物(98 种)由中国科学院微生物研究所车永胜研究员馈赠,化合物为真菌次生代谢产物,溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中并冻存于  $-20^{\circ}\text{C}$  中。流感病毒 WSN 的 PB1、PB2、PA 和 NP 的 cDNA 来自于中国疾病预防控制中心周剑芳研究员并克隆于 pcDNA 3.1

载体中。携带流感病毒 A/WSN/1933 (H1N1) NS 基因启动子的报告载体 vNS-Luc 来自于弗莱堡大学的 Martin Schwemmler。pNLLucE-R-HIV-Luc 质粒来自于中国科学院微生物研究所田波研究员。pEWSN-HA 和 pCAGGS-NA 质粒来自于中国科学院微生物研究所高福研究员。检测流感病毒核蛋白(nuclear protein, NP)和基质蛋白(matrix protein 1, M1)的抗体由中国科学院微生物研究所刘文军研究员馈赠, $\beta$ -actin 抗体购自 Santa Cruze 公司。荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。MLV 逆转录酶购自 Promega 公司。

### 1.2 流感病毒感染细胞

将流感病毒 A/WSN/33 预先稀释于去离子水配制的无血清的  $1 \times \text{DMEM}$  高糖培养基中,再将 HeLa-IAV-Luc 或 A549 细胞中的培养液吸出,用磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 3 遍,然后将稀释好的病毒加入培养皿中并置于  $37^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养 1.5 h,将含有病毒的 DMEM 吸弃后再用磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 3 遍并加入含有 10% 血清的新鲜 DMEM 培养基继续培养。

### 1.3 抗流感病毒化合物的筛选

将 HeLa-IAV-Luc 细胞均匀的铺在 96 孔细胞培养板上( $1.5 \times 10^4$  cells/well)生长 12 h。按病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 5 计算所需病毒量并稀释到无血清的  $1 \times \text{DMEM}$  高糖培养基中,吸取 50  $\mu\text{L}$  稀释好的病毒并分别加入预先溶于 DMSO 的化合物,使化合物浓度达到 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。DMSO 用作阴性对照,利巴韦林(Ribavirin)用作阳性对照。将化合物和病毒混匀后加入 96 孔细胞培养板上,细胞继续在恒温箱中培养。14 h 后将有明显细胞毒性的化合物排除,剩余的用磷酸盐缓冲液 PBS 清洗细胞后用裂解液收集细胞样品并用 Steady-Glo 荧光素酶底物检测荧光素酶的活性。

### 1.4 蛋白免疫印迹试验

为了检测化合物对流感病毒蛋白表达的影响, A549 细胞感染 WSN 病毒后在特定的时间点加入化合物。感染 8h 后统一用裂解液收取细胞样品。细胞裂解液在经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜并进行 Western blot 实验。用流感病毒 NP 和 M1 蛋白的抗体来检测病毒蛋白表达水平的变化, $\beta$ -actin 作为内参。

### 1.5 假病毒抑制试验

将 pNLLucE-R-HIV-Luc、 pEWSN-HA 和

pCAGGS-NA 3 种质粒共转到 293T 细胞中。36 h 后收取上清液和细胞冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  中。使用时将其取出,待其融化后以  $7000 \times g$  离心 5 min,HA-HIV 假病毒存在于上清液中。293T 细胞用 HA-HIV 假病毒感染并同时用化合物处理 48h 后收取细胞裂解液用来检测荧光素酶活性。

### 1.6 流感病毒聚合酶复合体 (vRNP) 活性检测

将克隆于 pcDNA 3.1 载体中的流感病毒聚合酶复合体表达载体 PA、PB1、PB2 和 NP 连同报告载体 vNS-Luc 和内参 pRL-TK 共转入 293T 细胞中,随后在培养基中加入化合物处理 48h 后收取细胞裂解液用来检测荧光素酶活性。

### 1.7 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR

将 A549 细胞培养在 24 孔板中,感染流感病毒后加入浓度为  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  Colletodiol 或 DMSO,8 h 后用 TRIzol 法提取样品 RNA,并用 MLV 逆转录酶反转录流感病毒的 vRNA、cRNA、mRNA 和细胞的 18S rRNA。其中 vRNA 和 cRNA 使用流感病毒末端保守序列作为引物,mRNA 使用 Oligo dT,18S rRNA 使用随机引物反转录。随后取等量的 cDNA 样品对流感病毒的 M1 片段进行荧光定量 PCR,引物序列如表 1 所示。

## 2 结果

### 2.1 抗流感化合物的筛选

为了筛选具有抗流感病毒活性的化合物,HeLa-

表 1. 反转录和 PCR 所用引物

Table 1. Primers for reverse transcription and PCR reaction

| Primers       | Primer sequence (5'→3')  |
|---------------|--------------------------|
| vRNA-1 for RT | AGCGAAAGCAGG             |
| vRNA-2 for RT | AGCAAAAGCAGG             |
| cRNA for RT   | AGTAGAAACAAGG            |
| PCR-M1-F      | TGCCAGAGTCTATGAGGGAAGAAT |
| PCR-M1-R      | GACGATGCTATTTTGTCAACATAG |
| PCR-18s-F     | GTAACCCGTTGAACCCCAT      |
| PCR-18s-R     | CCATCCAATCGGTAGTAGCG     |

Primers for reverse transcription of mRNA and 18S rRNA were oligo dT and random hexmer.

IAV-Luc 细胞在 MOI 值为 5 的 WSN 病毒感染状态下同时加入化合物 ( $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 14 h, DMSO 作为阴性对照,利巴韦林 (Ribavirin) 作为阳性对照,之后收取细胞裂解液检测荧光素酶活性。如图 1-A 所示,2 种化合物显示出具有抑制流感病毒的活性,分别为 Colletodiol 和 Hydroxymonocerin。Colletodiol 化合物抑制效果优于 Hydroxymonocerin,因此选取其作进一步研究。Colletodiol 为已知的真菌次生代谢产物,图 1-B 所示为化合物 Colletodiol 的分子结构式。为了鉴定 Colletodiol 发挥抑制病毒效果的最小浓度,分别选取了一系列浓度重复以上实验。如图 1-C 所示,将 Colletodiol 浓度降为  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,仍比较有效地抑制流感病毒,因此 Colletodiol 化合物的使用浓度最终确定为  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

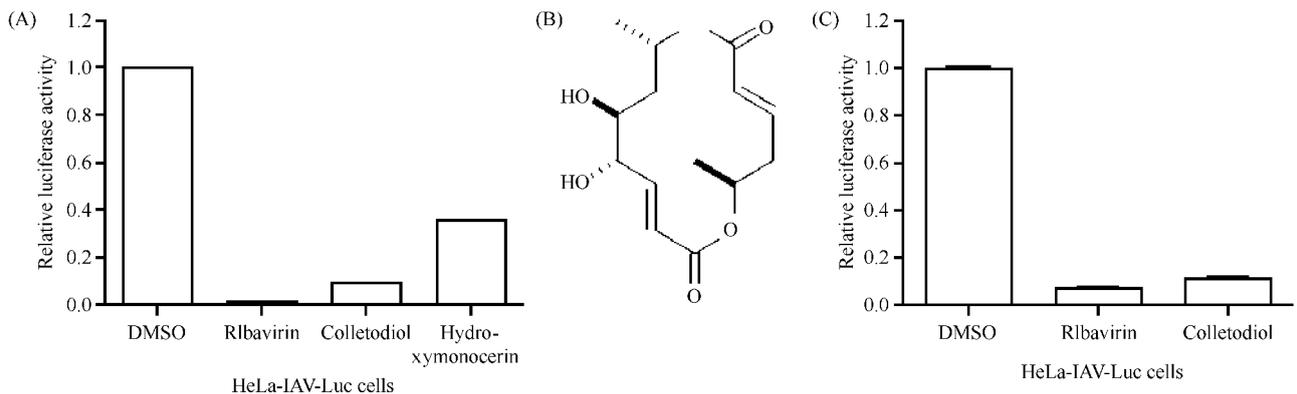


图 1. 具有抑制流感病毒活性的化合物

Figure 1. Chemical compounds that can inhibits influenza A virus. (A) HeLa-IAV-Luc cells were infected with Influenza A/WSN/33 at an MOI of 5, and treated with  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  chemical compounds or ribavirin as positive control for 14h. DMSO was used as a negative control. Then the cell lysates were harvested for luciferase assay. The relative luciferase activity was calculated against DMSO control. (B) Chemical structure of compound Colletodiol (C) HeLa-IAV-Luc cells were infected with Influenza A/WSN/33 at an MOI of 5 and treated with  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  Colletodiol or  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  ribavirin for 14h. Then the cell lysates were harvested for luciferase assay. The results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

## 2.2 Colletodiol 化合物不影响流感病毒进入细胞

为研究 Colletodiol 化合物抑制流感病毒的机理, 分别在流感病毒感染的 0 - 1.5 h、1.5 - 4 h 和 4 - 8 h 3 个时间点加入 Colletodiol 化合物处理 A549 细胞, 8 h 后统一收集细胞样品进行 Western-blot 实验检测流感病毒复制情况。结果如图 2-A 所示, 在流感病毒感染细胞的 0 - 1.5 h, Colletodiol 并不发挥作用, 在流感病毒进入细胞后, Colletodiol 抑制病毒的效果逐渐显现。这一结果也通过 HA 假病毒抑制试验得到验证, 如图 2-B 所示, Colletodiol 并不影响 HA 假病毒的复制。从图 2 的结果可以得出结论, 化合物 Colletodiol 并不影响流感病毒 HA 蛋白介导的流感病毒进入细胞的过程。

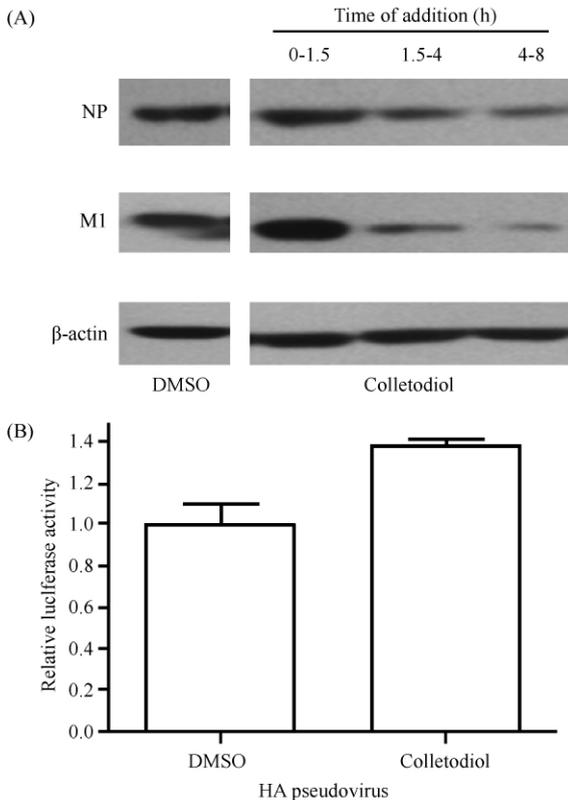


图 2. Colletodiol 化合物不影响流感病毒侵染细胞

Figure 2. Colletodiol doesn't affect the influenza virus entry into cells. (A) A549 cells were infected with WSN. Colletodiol was added at 0 - 1.5 h, 1.5 - 4.5 h and 4.5 - 8 h to a final concentration of 20  $\mu$ g/mL. The cell lysates were all collected at 8 h and applied to immunoblot analysis. (B) 293T cells were infected with HA pseudovirus and treated with 20  $\mu$ g/mL Colletodiol for 48h. The cell lysates were harvested for luciferase assay. The relative luciferase activity was calculated against DMSO control. The results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

## 2.3 Colletodiol 化合物会显著抑制流感病毒聚合酶 (vRNP) 活性

Colletodiol 化合物并不影响流感病毒进入细胞, 其发挥抑制效果是在流感病毒进入细胞后, 因此我们推测 Colletodiol 化合物可能会影响流感病毒聚合酶的活性。为了验证这一推测, 将流感病毒聚合酶复合体的 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白的表达载体与报告载体 vNS-Luc 和内参 pRL-TK 共同转入 293T 细胞中, 用 Colletodiol 化合物处理 48 h 后检测荧光素酶活性。报告载体 vNS-Luc 在萤火虫荧光素酶基因的 5'端插入了流感病毒 NS 片段的启动子, 该启动子需要流感病毒聚合酶复合体识别并启动翻译。如果流感病毒聚合酶活性受到影响, 荧光素酶的表达也会随之下降。结果如图 3 所示, Colletodiol 的处理使得荧光素酶活性降低, 说明 Colletodiol 能显著的降低流感病毒聚合酶的活性。

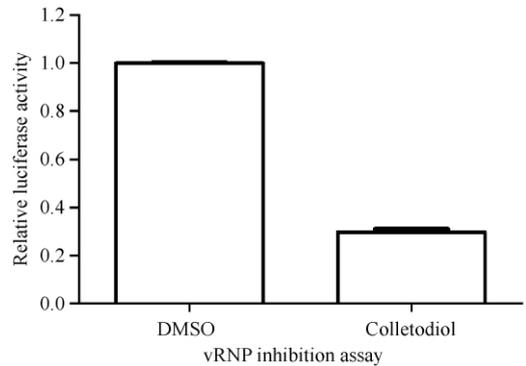


图 3. Colletodiol 化合物能显著抑制流感病毒聚合酶活性

Figure 3. Colletodiol inhibits the influenza viral polymerase activity dramatically. 293T cells were transfected with plasmids expressing influenza A virus (A/WSN/33 or A/California/07/2009) PB1, PB2, PA, NP protein and vNS-Luc with pRL-TK as an internal control. After treated with 20  $\mu$ g/mL Colletodiol for 48h, the cell lysates were harvested for luciferase assay. The results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

## 2.4 Colletodiol 化合物能够抑制流感病毒 RNA 的合成

流感病毒的 vRNP 活性对于病毒的 mRNA, vRNA 和 cRNA 合成至关重要。如图 3 所示, Colletodiol 化合物能够显著降低流感病毒 vRNP 的活性, 因此推测该化合物会影响病毒 RNA 的合成。A549 细胞在感染 WSN 病毒后用 Colletodiol 或 DMSO 处理, 8 h 后收取样品提取 RNA 用于实时荧光定量 PCR。结果如图 4 所示, Colletodiol 化合物处理后流感病毒的 mRNA,

vRNA 和 cRNA 的合成都显著下降。

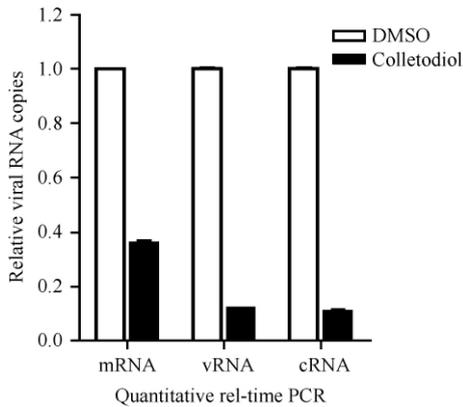


图 4. Colletodiol 可以抑制流感病毒 RNA 的合成

Figure 4. Colletodiol inhibits influenza viral RNA synthesis. A549 cells in 24-well plate were infected with WSN and treated with Colletodiol or DMSO. The cells were harvested 8 h post infection and the total RNAs were isolated with TRIzol reagent, then mRNA, vRNA and cRNA of M1 were quantified by real-time fluorescence quantitative PCR. The RNA level was normalized to 18S rRNA in cells. The results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

### 3 讨论

流感病毒对人类的健康构成了重大威胁,开发新型的流感病毒抑制药物具有重要的意义。本研究通过 HeLa-IAV-Luc 报告细胞株从化合物库中筛选出了具有抑制流感病毒活性的化合物 Colletodiol。该化合物不能抑制流感病毒 HA 蛋白的功能,对流感病毒侵入细胞没有影响,能够显著的抑制流感病毒的 vRNP 活性。由于 vRNP 活性降低,流感病毒的 mRNA、vRNA 和 cRNA 的合成都受到了抑制。

Amantadine (盐酸金刚烷胺) 和 Rimantadine (金刚烷胺) 作为 M2 离子通道的抑制剂可以阻止  $H^+$  离子进入病毒颗粒从而导致病毒 RNA 无法释放到细胞质中。Zanamivir (扎纳米韦) 和 Oseltamivir (奥司他韦) 能够抑制流感病毒神经氨酸酶的活性,组装好的流感病毒无法从细胞表面释放,从而抑制了病毒的扩散。耐药性流感病毒的出现和不断扩散限制了这两种抑制剂的使用。当前世界各地的许多研究都致力于开发新型的抗流感药物以应对流感病毒对传统抗流感药物的耐药性。通过对传统药物 Zanamivir 进行修饰改造,使其对具有抗药性的流感病毒也能重新发挥抑制效果<sup>[11]</sup>。将参与流感病毒

繁殖的宿主细胞因子作为靶点,也能有效的抑制流感病毒。DAS181 是一种唾液酸酶融合蛋白,通过结合细胞表面的唾液酸受体阻止流感病毒进入细胞内,目前已经进入临床试验阶段<sup>[12]</sup>。

本研究中筛选的化合物 Colletodiol 能够显著抑制流感病毒聚合酶的活性,针对流感病毒聚合酶的抑制剂在抗药性方面更有优势,因为聚合酶负责流感病毒的转录和复制等诸多功能,发生突变通常会影其活性,因此流感病毒聚合酶复合体相对保守。本研究是第一次发现该化合物能够抑制流感病毒复制,Colletodiol 的结构类似物 Grahamimycin A 是已知的具有广谱抑菌活性的化合物。根据 Grahamimycin A 的分子结构推测其可能作为迈克尔加成反应 (Michael Addition) 的受体,通过与多种酶的相互作用而抑制微生物的生长繁殖<sup>[13]</sup>。Colletodiol 抑制流感病毒聚合酶活性的机制还需要加以验证,本研究仅在细胞水平对 Colletodiol 化合物抑制流感病毒的机理进行了初步探索,该化合物是否能通过其他途径发挥抑制流感病毒的作用,以及在动物模型上的抑制效果和临床应用价值等还需要进一步的验证。

### 参考文献

- [1] Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> eds. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1691-1740.
- [2] Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2009, 82 (4) : 153-159.
- [3] Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine*, 2002, 76 (1) : 105-115.
- [4] Rebmann T, Zelicoff A. Vaccination against influenza: role and limitations in pandemic intervention plans. *Expert Review of Vaccines*, 2012, 11 (8) : 1009-1019.
- [5] De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2006, 5 (12) : 1015-1025.
- [6] Pinto LH, Lamb RA. Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Molecular BioSystems*, 2007, 3 (1) : 18-23.
- [7] Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI. Incidence of

adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, 2005, 366(9492): 1175-1181.

- [8] Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(10): 953-956.
- [9] Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(5): 530-538.
- [10] Zhang J, Liu T, Tong X, Li G, Yan J, Ye X. Identification of novel virus inhibitors by influenza A virus specific reporter cell based screening. *Antiviral Research*, 2012, 93(1): 48-54.
- [11] Lee CM, Weight AK, Haldar J, Wang L, Klibanov AM,

Chen J. Polymer-attached zanamivir inhibits synergistically both early and late stages of influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(50): 20385-20390.

- [12] Triana-Baltzer GB, Babizki M, Chan MC, Wong AC, Aschenbrenner LM, Campbell ER, Li QX, Chan RW, Peiris JS, Nicholls JM, Fang F. DAS181, a sialidase fusion protein, protects human airway epithelium against influenza virus infection: an in vitro pharmacodynamic analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(2): 275-284.
- [13] Gurusiddaiah S, Ronald RC. Grahamimycins: antibiotics from *Cytospora* sp. Ehrenb. W. F. P. L. 13A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1981, 19(1): 153-165.

# Colletodiol inhibits the replication of influenza A virus WSN/H1N1 by reducing the activity of viral RNA polymerase

Wenbin Lai, Shixiong Wang, Xin Ye\*

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] To screen for compounds against influenza A virus by using the viral promoter reporter cell line HeLa-IAV-Luc and investigate their anti-viral mechanism. [Methods] We screened the inhibitors of influenza A virus by infecting HeLa-IAV-Luc cells with influenza A virus WSN/H1N1 and treating it with the compounds isolated from microbial metabolites. The cell lysates were then subjected to the luciferase assay. We conducted the pseudovirus assay to analyze whether the compound affected the function of hemagglutinin (HA). We carried out the influenza viral promoter reporter assay to examine whether the compound could inhibit influenza viral RNA polymerase (vRNP) activity. The effect of anti-viral compound on influenza viral RNA synthesis was measured by real-time fluorescence quantitative PCR. [Results] Colletodiol inhibited the replication of influenza A virus in HeLa-IAV-Luc cells by luciferase assay. It did not inhibit the function of HA protein based on the results of the time-of-addition experiment and pseudovirus assay. The influenza viral polymerase promoter reporter assay indicated that Colletodiol could inhibit the activity of vRNP dramatically. Due to the inhibition of vRNP, the influenza viral RNA synthesis decreased significantly. [Conclusion] Compound Colletodiol was an inhibitor of influenza A virus. It blocks the replication of influenza A virus by reducing the activity of vRNP.

**Keywords:** influenzavirus, viral promoter reporter cell line (HeLa-IAV-Luc), Colletodiol, viral RNA polymerase (vRNP)

(本文责编:王晋芳)