

• 思路与方法学 •

抗艾滋病药物的研究方法

中国医学科学院医药生物技术研究所(北京 100050) 唐小山 陈鸿珊

中国中医研究院西苑医院(北京 100091) 陈可冀

自从1981年美国首次报告艾滋病以来, 艾滋病在全球迅速传播, 已有 8 000 000 人感染艾滋病毒, 并有 700 000 人患上艾滋病, 我国已发现 446 例艾滋病毒抗体阳性者, 5 例确诊为艾滋病患者, 因此艾滋病已成为威胁我国人民健康的重要问题, 寻找有效的抗艾滋病药物已成为当务之急。

抗艾滋病药物的研究重点在于筛选新的药物, 而药物的筛选分别在体外和体内进行, 体外药物筛选是以病毒复制的每一个环节作为靶点, 寻找抑制这些靶点的有效药物, 体内筛选是建立合适的动物模型, 通过动物模型来筛选抗艾滋病药物, 同时, 新的有效药物将进行临床实验, 下面分别介绍。

一、抗艾滋病药物的体外筛选方法

如上所述体外筛选是以病毒复制的每一环节作为靶点筛选药物, 病毒复制时, 首先, 病毒和宿主细胞表面受体相结合, 通过内存作用进入细胞, 再脱壳, 在逆转录酶的作用下, 以单链 RNA 合成双链 DNA, 再在 DNA 环化酶的作用下变成环状双链 DNA, 部分整合到宿主细胞基因里, DNA 前病毒(环状双链 DNA)可以潜伏的形式存在, 也可以转录产生新的病毒信使 RNA, 再依次转译病毒蛋白酶, 复制的最后一步是通过芽生使完整的病毒释放出来⁽¹⁾。因此我们可以通过抑制病毒吸附、病毒逆转录酶、病毒 DNA 环化酶、病毒蛋白合成等作为指标来筛选药物, 也可以通过细胞培养抑制病毒复制的全过程来筛选药物。

1. 以 CD 4 受体作为靶点来筛选药物: 美国 NIH 的 Chaudhary VK 等人利用基因融合, 分子杂交技术, 构建了一株表达可溶性 CD 4 质粒 (E.coli. pVC 403), 含有编码 CD 4 前 178 个氨基酸的基因, 同时插入氨基酸 1-3 和 253-613 的假单枝菌外毒素 (PE), 这样分泌出来的蛋白能和针对 PE 和 CD 4 的多克隆抗体起反应, 因而此种蛋白在体内能和感染了人免疫缺陷病毒 (HIV) 的细胞结合, 利用其毒素的细胞毒作用, 从而消灭这些细胞, 此种细胞毒性具有选择性, 我们可用此方法, 寻找高选择性的导向药物⁽²⁾。同时, 我们也可以寻找某些能封闭 CD 4 的药物或者抗 CD 4 抗体, 从而阻断其感染⁽³⁾。

2. 以艾滋病毒逆转录酶 (HIV RT) 作为靶点筛选药物: 如前述, HIV RT 是 HIV 复制的关键酶, 该酶如被抑制则病毒复制肯定受到阻抑, 目前在实验室和临床上应用的抗艾滋药物大多是 HIV RT 的抑制剂, 如 AZT 及其衍生物, DDI 及其衍生物, PFA 及其衍生物以及苏拉明等均为 HIV RT 竞争性抑制剂和非竞争性抑制剂⁽⁴⁾, 我们在实验中亦用该酶作为体外筛选系统从中药中来筛选药物, 发现黄芩甙等为 HIV RT 的非竞争性抑制剂, 该方法具有简便、快速、适于大量筛选等优点, 且安全, 对人无感染性, 可在普通实验室进行操作。但不足之处是筛选出来的药物要在组织培养上验证, 同时酶易受 pH 值、离子浓度、温度等影响, 因此实验条件要严格控制⁽⁵⁾。

3. 以 gag 基因产物 P24 作为靶点来筛选药物: gag 基因是 HIV 的核心基因, 其产物 P24 是 HIV 的核心抗原, 将 gag 基因克隆后提出质粒, 再将其转染到某一标记细胞, 获得转染细胞株, 通过观察药物对传染细胞株 P24 产物产生的影响来筛选药物。西德科赫研究所已成功地建立此方法, 并筛选出药物。此方法也较为简便, P24 抗原的检测可用 P24 抗原 ELISA 检测盒进行, 且可用于普通实验室⁽⁶⁾。

4. 在细胞培养里观察药物对 HIV 的抑制作用来筛选药物: 该方法观察指标全面, 如对 HIV RT 的抑制作用, P24 抗原产生的抑制作用, HIV 抗原表达的影响, 以及巨细胞融合的影响等。同时, 可观察药物的细胞毒性, 求出治疗指数。但是, 实验条件要求高, 需要 P3 实验室, 且对人有感染性, 实验感染者已有报道^(7~9)。

5. 以与艾滋病毒同属慢病毒亚属的其它动物病毒来作为体外模型来筛选抗艾滋药物: 与 HIV 同属慢病毒亚属的其它动物病毒有 EIAV、CAEV、Visna virus、FeLV、SIV 等, 这些病毒与 HIV 均有基因结构上的同源性与核酸序列的相似性。目前, 抗艾滋药物对这些病毒均有不同程度的抑制作用, 故可用组织培养的方法寻找对这些病毒有抑制作用的药物来间接筛选抗艾滋药物, 优点是可在普通实验室里进行, 缺点是筛选出来的药物还需验证直接抗艾滋病作用^(10~16)。

二、抗艾滋病药物的体内筛选方法

抗艾滋病药物的体内筛选方法是利用动物模型筛选抗艾滋病药物,研究艾滋病的动物模型主要有三个目的:(1)研究艾滋病毒所致的病理效应,包括免疫缺陷和病理性脑炎;(2)试验实验性疫苗;(3)试验新的治疗方法,特别是抗艾滋病药物和免疫刺激剂。

艾滋病的动物模型分二类,一类是 HIV 感染模型,一类是动物慢病毒感染模型。

1. 猩猩感染 HIV 模型:在亲缘关系里,猩猩和人类最为接近,对 HIV 易感,感染后大多数不出现临床症状,只有血清学的异常,因而在病毒学、血清学和其它免疫学方面的指标可以同人感染 HIV 早期无症状者相比较,在此阶段有药物治疗可以阻止疾病的发展和流行⁽¹⁷⁾。在美国,大约有 100 只感染了 HIV 的猩猩用于这方面的研究,Patricia NF 等在这方面做了大量的工作,他们发现不同株的 HIV 对猩猩的感染力不同,同时,他们也发现感染 HIV 的猩猩有着较恒定的抗体反应,维持较高水平的抗体滴度,维持时间长达 3~5 年。整个感染过程类似于人健康带毒者^(18~19)。当我们在体外筛选出有效的抗艾滋病药物后,在用于临床之前,我们需要了解其对病人是否有毒及其是否会使病情恶化,也需要知道治疗早期药物对病人的影响及其代谢规律。猩猩模型可用来评定药物的有效性、可行性及其药代参数。然而由于其来源困难、价格昂贵、难于饲养及对人有感染性的问题,大规模的筛选和毒理实验显然受到了限制。

2. 猴 SIV、HIV-2 感染模型:SIV 是猴免疫缺陷病毒⁽²⁰⁾,恒河猴不仅可感染此病毒,而且症状与艾滋病病人相似,因此国内外均有报道用 SIV 感染猴作为模型来评价抗艾滋药物,同时,因为 HIV 与 SIV 有交叉反应,从分子序列来看 HIV-2 更接近于 SIV,因此,有人用 HIV-2 感染猴作为动物模型来筛选抗艾滋药物,SIV 和 HIV-2 感染猴模型的优点是可以复现艾滋病的临床表现,故可用来评价新药对艾滋各阶段的疗效及其获得临床前药理的相关参数,缺点同猩猩模型^(21~22)。

3. 动物慢病毒感染模型:猴和猩猩提供了较好的抗艾滋药物筛选模型,但有上述缺点,因此,人们使用某些不能感染人的动物慢病毒来初筛药物并研究其发病机理。羊维斯纳病毒(Visna virus)是第一个分离出的慢病毒^(10,15,23),关于它的研究已进行了 40 年,此后,又相继分离出马传染性贫血病病毒(EIAV),山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)⁽²⁴⁾,猫 T 淋巴细胞慢病毒(FeLV)^(25,26),牛免疫缺陷病毒(BIV)等。此类病毒感染动物后出现的临床症状类似于艾滋病,故可用来

作为模型以研究艾滋病的发生发展,寻找其防治方法^(25~28)。

4. 小动物模型:小动物模型主要包括前述的猫 T 淋巴细胞病毒模型,兔感染 HIV 模型,小鼠感染鼠白血病病毒模型和转基因小鼠模型,小动物模型最主要的优点是适于大规模筛选,可以快速评价治疗效果^(27~29)。

三、抗艾滋病药物的临床研究方法

当证实某一药物确有抗艾滋活性后,接着就需要做一系列临床前药理研究包括毒性和特殊毒理,一般药理和药代动力学,了解其吸收,生物利用度,代谢物,关卡效应等,和其它药物的临床前药理研究相同。根据获得的临床前药理数据,设计一期临床试验,一般说来,新药一期临床试验先在正常的健康志愿者身上评价其安全性和耐受力,然后,再扩大到病人身上评价其效果和安全范围,通常病人选择较轻的,其理由是:(1)观察药物毒性应该在病人一般情况比较好的状况下进行,(2)治疗成功的可能性在轻病人身上人远比重病人身上大。

一期临床试验只能提示该药可能有效,二期临床试验则证明是否确实有效,因此,二期临床试验需在严格双盲对照下进行,二期临床中,安慰剂组和用药组的病人在病情轻重方面应该是基本相同的而且是可比的,例如,在 AZT 的研究中 Barry 等人选用病人的条件是:(1)艾滋病人有一期卡氏肺炎(PCP)。(2)ARC 病人有较多的症状,如体重下降、发热、腹泻、口腔念珠菌感染。(3)所有的病人的 CD4 小于 500,(4)OT 阳性。有卡波氏肉瘤、静脉药瘾和儿童、孕妇等排除在外,用药时间为 10~28 周,平均为 17 周⁽³⁰⁾,检测指标主要是一般情况,OT,体重,活动能力,神经系统功能,常规检查, T_4/T_8 比值及计数, β 微球蛋白和 P24 抗原检测。

二期临床试验中,病例选择是很重要的,以早、中期为宜,按 CDC 分类标准,艾滋病临床分期分为急性感染期、早期、中期和晚期,详见附表。

我们根据 CDC 标准和中医中药治疗艾滋病患者的实际情况,提出如下药物评价方案,供临床医生和药理学家参考。

一期试验:病例选择 40 例早、中期患者,双盲配对,根据临床前药理实验选择合适剂量,观察指标为:(1)一般情况,临床症状如发热、皮疹、淋巴结肿大、腹泻、体重下降等是否好转;中医证候的演变特点。(2)总 T 细胞, T_4/T_8 比值及计数。(3)P24 抗原。(4) β 微球蛋白。(5)OT 试验。(6)血象及心、

附表 艾滋病不同时期临床及实验室表现

分期	临 床	T ₄ /T ₈	T	P24 抗原	β ₂ 微 球蛋白	OT
急性期	单核细胞增多	正常	正常	+	正常	正常
早期	无症状或持续性 淋巴肿大, 无 菌性炎症, 皮疹	<1	>400	-	正常	正常
中期	无症状或持 续性 淋巴肿大, 口 腔真菌感染, 白 细胞减少, 自发性 血小板减少 紫癜	<1	200~ 400	±	中度 升高	正常 或 低下
晚期	机会性感染 恶性肿瘤 消瘦, 痴呆	<1	<200	±	明显 升高	低下

肝、肾功能。(7)毒副反应: 胃肠道、心血管功能紊乱、骨髓抑制、皮疹、过敏等。治疗3个月为一疗程, 2个疗程总结。

二期试验: 病例选择, 观察指标同一期, 根据一期试验选择用药剂量, 病例双盲配对50~100对, 3个月为一疗程, 观察3个以上疗程。

三期试验: 扩大到早、中、晚各期患者, 观察疗效及长期毒副反应。

疗效及毒副反应标准: (1)显效: 死亡率, 症状, 实验室指标, 用药组与对照组相比均有明显好转 $P < 0.05$ 。(2)好转: 部分症状或实验室指标好转 $P < 0.05$ 。(3)无效: 差别无统计学意义或病情发展。(4)毒副反应: 确证为药物引起的器官功能损害。

四、抗艾滋病药物的筛选程序

我们根据国内外有关抗艾滋病药物筛选方法, 由简至繁, 提出了这样一个筛选程序, 首先是生化筛选, 即用CD4, RT, P24等生化指标筛选抗艾滋病药物; 第二步, 有效者在细胞里验证抗艾滋病效果; 第三步, 研究其免疫药理作用和其它药理作用; 第四步, 研究其细胞毒性和动物体内毒性; 第五步, 有条件者可利用动物模型来评价药物在体内的药理作用, 药代参数和毒副反应, 如果没有此条件, 只要在组织培养上确证有可靠的抗艾滋病效果, 而且对细胞和动物的毒性都很小, 亦可被接受而进入一期临床试验。如果实验室不具备试验药物直接抗艾滋的条件, 亦可用其它动物慢病毒代替艾滋病病毒间接筛选抗艾滋病药物, 但是, 最后一定要在组织培养里验证其直接抗艾滋病作用。

上面, 我们介绍了抗艾滋病药物的研究方法, 众所周知, 艾滋病严重危害人类健康和生命, 因此研究新的有效的抗艾滋病药物已成为我们面临的重要问题。同时, 中医中药建立在几千年防病治病的基础之上,

某些药物或复方有抗艾滋病作用是完全可能的。

参 考 文 献

1. James RM, AIDS UPDATE: Current treatment approaches, American Pharmacy 1987; 8: 552.
2. Chaudhary VK, et al. Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-pseudomonas exotoxin hybrid protein. Nature 1988; 335: 369.
3. Clapham PR, et al. Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. Nature 1989; 337: 368.
4. Schinazi RF, et al. Comparison of inhibition activities of various antiretroviral agents against particlederi-ved and recombinant human immunodeficiencyvirus reverse transcriptase. Antimicrob Agents and Chemother 1989; 33: 115.
5. Tang Xiaoshan, et al. Inhibition of immunodeficiency virus reverse transcriptase by Chinese medicines in vitro. Proc CAMS and PUMC 1990; 5(3): 140.
6. Mashi KN, et al. Broad-spectrum antiviral/antimicrobial activity of natural and synthetic immunomodulators. Proc of Second International Symposium on Viral Diseases(Beijing)1990; 74.
7. Chang RS, et al. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. Antiviral Res 1987; 7: 127.
8. Ito M, et al. Inhibitory effect of Glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus. Antiviral Res 1987; 7: 127.
9. Savin RS, et al. Inhibition of HTLV-3/LAV replication by Foscarnet. Biochemical Pharmacol 1985; 34: 4075.
10. Siyardson B, et al. Cultivation of visna virus in tissue culture. Arch Ges Virus Forsch 1960; 80: 368.
11. Weinhold E, et al. Visna virus-ähnliche partikel in der kultur Von Pelexus Choroides Zellen einer Ziege mit Visna Symptomen. Zentralbl Vet Med B 1974; 21: 32.
12. Crawford TB, et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. Science 1988; 207: 997.
13. Rushlow K, et al. Lentivirus genomic organization: The complete nucleotide sequence of the env gene region of equine infectious anemia virus. Virology 1986; 155: 309.
14. Pederson NC, et al. Isolation a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. Science 1987; 235: 406.
15. Gonda MA, et al. Sequence, homology and morphologic similarity of HTLV-3 and Visna, a pathogenic

- entivirus, Science 1985; 227: 173.
16. Schneider J, et al. Structural, biochemical and serological comparison of LAV/HTLV-3 and STLV-3 mac to primate retroviruses and human cancer. From Gallo, et al. Viruses and Human Cancer, New York, Liss, 1987: 319—332.
17. Fultz PN, et al. Persistent infection of chimpanzees with HTLV-3/LAV, A potential model for AIDS. J Virol 1986; 58: 116.
18. Fultz PN, et al. Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzees. J Infected Dis 1986; 154: 896.
19. Fultz PN, et al. HIV infection of chimpanzees as a model for testing chemotherapeutics. Intervirology 1989; 30 (suppl): 51.
20. Schneider J, et al. Simian lentiviruses: The SIV group. AIDS 1988; 2: 1.
21. Ottmar H, et al. Experimental infection of rhesus monkeys with SIV isolated from African green monkeys. Intervirology 1989; 30 (suppl): 66.
22. HIV-2 in rhesus monkeys: Serological, virological and clinical results. Intervirology 1989; 30 (suppl): 59.
23. Pelursson G, et al. Maedi-visna virus in sheep: Host-virus interactions and utilization as a model. Intervirology 1989; 30 (suppl): 36.
24. Straud C, et al. Caprine arthritis encephalitis-B model for AIDS. Intervirology 1989; 30 (suppl): 45.
25. Edward AH, et al. Feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome in cats as a model for evaluation of antiretroviral therapy. Intervirology 1989; 30 (suppl): 12.
26. Luis T, et al. Testing of nucleoside analogues in cats infected with feline leukemia virus, a model. Intervirology 1989; 30 (suppl): 26.
27. Filize G, et al. Infection of rabbits with human immunodeficiency virus. Nature 1988; 335: 22.
28. Ruth MR, et al. Murine models for antiretroviral therapy. Intervirology 1989; 30 (suppl): 2.
29. Barry DW, et al. The development and use of AZT in the treatment of human immunodeficiency virus infection. London: Proc ICN annual conference on virology. 1987: 19.

单味生地黄治疗功能性子宫出血 48 例

浙江省乐清县人民医院(浙江 325600) 黄乐芬

笔者从 1969 年至 1990 年 20 年间对 48 例功血患者用单味生地治疗取得了显著的疗效, 现报道如下。

临床资料 48 例患者均经妇科检查确诊为功血, 年龄 22~51 岁, 其中 22~30 岁 33 例, 30~40 岁 7 例, 40 岁以上 8 例, 平均年龄 32.3 岁, 病程最短 1 周, 最长 2 年。出血持续时间: 1~2 周 14 例, 2 周~1 月 25 例, 1~2 月 5 例, 2 月以上、1 年以内 3 例, 1 年 1 例。出血量少于月经量 17 例, 同月经量 13 例, 大于月经量 18 例, 其中 7 例病人曾住院用过西药、中药治疗, 3 例为刮宫治疗无效者。

治疗方法 生地黄 60g, 黄酒 500ml, 为一天剂量。生地黄 60g 放入砂锅或铝锅中, 先加黄酒 375ml, 再加冷水 125ml, 用文火煮开, 水开后掀开锅盖任其挥发, 煎至药液剩 100ml 左右, 倒在杯里, 然后将剩下的 125ml 黄酒加冷水 250ml, 倒入锅内, 用上述同样方法, 进行第二次煎煮, 亦煎至药液剩 100ml 左右, 两次药液混合, 放红糖少许调味, 分早晚 2 次口服。

此法不需要在其它药物的基础上应用, 阴道出血的患者一旦妇科检查确诊功血, 即可用药, 如果病程长, 出血持续时间长, 诊断功血早已明确, 目前无出血情况, 此疗法在下次月经期第 4~7 天开始用药。

结果 疗效标准: 治愈: 完全血止, 远期随访月经正常。显效: 完全血止, 远期随访, 往后出血量较前减少, 用上述方法复治仍然有效。结果: 经上方治疗, 48 例全部有效, 用药时间最短 1 天, 最长 3 天, 平均 2 天, 远期随访时间最短 2 个月, 最长 7 年, 治愈 44 例, 占 91.6%, 显效 4 例, 占 8.4%, 总有效率 100%。

病案举例 黄某, 女, 24 岁, 护士, 病历号 14310, 于 1981 年 3 月人工流产后, 阴道不规则出血, 无腹痛发热, 经妇科检查诊断“功血”, 经用雌激素、孕激素、住院治疗反复刮宫 4 次, 出血不止, 持续时间 1 年, 出血量时多时少, 多时大于月经量, 经服上述方药, 2 天血止, 随访 7 年月经正常。

讨论 功能性子宫出血分无排卵型与排卵型, 前者占 80% 左右, 后者少见。一般功血为无排卵型功血, 多见青春期与绝经前期。对于妇科不规则阴道出血病人, 需排除器质性阴道出血, 上述 48 例患者都已经过妇科检查确诊功血。生地加黄酒治疗功血的机理尚待研究, 生地功效凉血、止血, 现代医学研究认为其能促进血液凝固, 有止血作用, 加入黄酒可能有助于生地有效成份溶出而增加疗效。