

· 实验研究 ·

艾滋病病毒 1 型逆转录酶抑制剂的 小鼠血清活性动态研究*

彭宗根 陈鸿珊 滕立

摘要 目的:观察艾滋病病毒 1 型逆转录酶(HIV-1 RT)抑制剂在小鼠血清中的活性动态,探讨其在药效评价中的可应用性。方法:不同途径给予小鼠已知和未知 HIV-1 RT 抑制剂后,在不同时间取血分离血清,体外测定血清抑制 HIV-1 RT 的活性。结果:正常小鼠血清有非特异性抑制 HIV-1 RT 的活性,经稀释后可排除;非核苷类 RT 抑制剂可在体外直接测定小鼠体内用药后的血清抑制 HIV-1 RT 活性和动态,核苷类 RT 抑制剂的血清抗 HIV-1 RT 的活性可测出,但血清活性不如非核苷类药物为高,主要因核苷类药物的活性物质是其三磷酸盐,在细胞内转化后形成。此种体外测定小鼠用药后血清活性的体内体外结合的实验方法,简便快速,可初步分析药物与血清蛋白的结合率以及估算其生物利用度和清除率。结论:体内与体外相结合的逆转录酶抑制剂的小鼠血清活性的测定方法,可应用于非核苷类 HIV-1 RT 抑制剂的药效评价,对于核苷类 HIV-1 RT 抑制剂,取血时间要长,并同时测定血清在细胞内的活性,以便综合分析。

关键词 艾滋病病毒 1 型逆转录酶 抑制剂 小鼠血清活性动态 药效评价

Dynamic Study of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor in Serum Activity of Mice PENG Zong-gen, CHEN Hong-shan TENG Li *Institute of Medical Biotechnology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences (100050)*

Objective: To observe the dynamics of HIV-1 reverse transcriptase(HIV-1 RT) inhibitor activity in serum of mice, and assess the applicability of the method in evaluating the activity of HIV-1 RT inhibitors. **Methods:** After mice were treated with HIV-1 RT inhibitors(with known or unknown constituents) through intragastric or intraperitoneal pathways, the activity of HIV-1 RT in serum of mice collected in different times was determined in vitro. **Results:** Serum of normal mice showed the non-specific inhibition on HIV-1 RT, but it could disappear when the serum was diluted. The inhibitory effects of HIV-1 RT in mice serum collected after given non-nucleotide reverse transcriptase inhibitors(NNRTIs) could be well and immediately determined. But that in serum collected after given nucleotide reverse transcriptase inhibitors(NRTIs) was weak, because this kind of RT inhibitor could display the inhibition on HIV-1 RT only when it has been activated through phosphorylation in the cells and acts as competitive inhibitors. The degree of binding between drug and albumin, the bioactivity and the clearance rate of drugs can also be analyzed by this method. **Conclusion:** The in vitro and in vivo combined method for detection of RT inhibitor activity in mice serum could be applied in quick drug effect evaluation of HIV-1 NNRTIs. But as it is applied to determine the RT inhibitory activity of NRTIs, the blood collecting time should be delayed and the activity should be determined both in vitro and in vivo parallely for a comprehensive analysis.

Key words HIV, reverse transcriptase-1, inhibitor, dynamic activity in mice serum, evaluation on drug efficacy

*“九五”国家重点科技攻关项目延续(No. 96-906-03-17)

中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所病毒室
(北京 100050)

通讯作者:陈鸿珊;Tel:010-63010984;E-mail:chenhs10@sohu.com
万方数据

艾滋病自 1981 年被发现以来在全世界迅速蔓延。虽然已经开发出了 17 种治疗药物,但在全世界范围内没有得到普遍应用,艾滋病仍在传播,其主要原因:一是药物对艾滋病病毒耐药株的产生使药物失效;二是长

期服药出现毒副作用,三是药物价格昂贵,患者难于负担。因此寻找高效、低毒和价格低廉的药物是刻不容缓的任务。目前药物筛选常用体外艾滋病毒 1 型(HIV-1)复制酶抑制试验和细胞培养内 HIV-1 细胞病变或 P24 抗原抑制试验,但体外有效并不一定在动物体内或临床有效,药物研究的较大风险。为此,我们对体外筛选有效的 HIV-1 逆转录酶(RT)抑制剂,给小鼠用药后取血,在体外测定血清抑制 HIV-1 RT 的活性,观察药物在小鼠血清内的动态变化,探讨其在小鼠体内药效,早期预测其发展前景。

材料与方 法

1 材 料

1.1 药物与试剂 Nevirir,每片含 nevirapine (NVP) 200mg(批号:NV11002),由 Hetero Drugs LTD (India)生产,为北京协和医院感染科王爱霞教授惠赠;Stavudin(STV),为北京双鹭药业有限公司提供的原料药(批号:20030310);Zidovudine(AZT),由 Burroughs Welcome CO 生产(批号:86/5082-184);中药丹参粗提物 T4、T6(下简称 T4、T6)为本室从植物中提取,磷酸钠(PFA)为常州第一制药厂生产(批号:921010);HIV-1 RT P66/P51 为本室制备并纯化。poly(A) dT)₁₅ 为 Boehringer Mannheim GmbH 公司产品,³H-TTP(1mCi/ml,76Ci/mmol)为美国 NEN 公司产品,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 多功能闪烁计数器为 BLS 6500 型(Beckman Instruments Inc)

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌性,体重 18~20g,由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。

2 方 法

2.1 药物抑制 HIV-1 RT 活性的测定 取酶样品 20 μ l、药液 20 μ l 与酶反应底物缓冲液 20 μ l 混合。同时设酶对照和阳性药 PFA 对照,37 $^{\circ}$ C 反应 0.5h,0 $^{\circ}$ C 水浴终止反应,点样于滤纸片上,5%冷三氯乙酸洗 3 次,95%乙醇脱水,80 $^{\circ}$ C 烘干,将滤纸片置于闪烁液中,测放射性强度 cpm 值,计算抑制率和半数有效浓度(IC₅₀)

2.2 HIV-1 RT 的酶量与药物活性的关系 在不同酶量(用测定的放射强度 cpm 表示)条件下分别测定药物的 IC₅₀。相关关系用相关系数统计(SPSS 10.0 for Windows)

2.3 小鼠给药和取血方法 小鼠经灌胃(ig)或腹腔注射(ip)给药后(灌胃双蒸水或注射生理盐水作对照),于 30、60、120、240min 时分别摘眼球取血,分离

血清,-20 $^{\circ}$ C 保存待测。测定前于 56 $^{\circ}$ C 30min 灭活。

2.4 药物与血清的结合率 不同浓度的药物与不同稀释度的正常小鼠血清等比例混合,于 56 $^{\circ}$ C 30min 灭活后,测定血清对酶活性的抑制率。

结 果

1 HIV-1 RT 的酶量与 PFA 和 NVP 体外抑制活性的关系 HIV-1 RT 抑制剂 PFA 和 NVP,用 2 倍稀释的 HIV-1 RT 的酶量(cpm 表示)测定 HIV-1 RT 抑制活性的 IC₅₀(μ g/ml),结果见表 1。HIV-1 RT 在 168947-15138cpm10 倍浓度范围内,PFA 和 NVP 的 IC₅₀与酶量无明显相关关系(PFA 的 IC₅₀与酶量的相关系数 $r = 0.509$, $F = 0.701$, $P > 0.05$;NVP 的 IC₅₀与酶量的相关系数 $r = 0.331$, $F = 0.368$, $P > 0.05$)

表 1 PFA 和 NVP 抑制 HIV-1 RT 的 IC₅₀与酶量的关系

酶量 (cpm)	药物的 IC ₅₀ (μ g/ml)	
	PFA	NVP
168947	—	0.509
100110	0.052	0.441
52627	0.050	0.358
27814	0.051	0.442
15138	0.061	0.318

2 AZT、STV、NVP、T4 和 T6 体外抑制 HIV-1 RT 的 IC₅₀ AZT、STV、NVP 和 T4、T6 的 IC₅₀分别为 >200 μ g/ml、>200 μ g/ml、0.33 μ g/ml、16.45 μ g/ml 和 27.16 μ g/ml。核苷类和非核苷类 HIV-1 逆转酶抑制剂 AZT 和 STV 未转化为三磷酸化合物,故测不出其活性,非核苷类 HIV-1 逆转酶抑制剂 NVP 活性很高,T4 和 T6 对 HIV-1 逆转酶也有抑制作用。

3 正常小鼠血清非特异性抑制 HIV-1 RT 的活性 正常小鼠血清有非特异性地抑制逆转录酶的活性。当血清 3 倍稀释(在反应体系中的终稀释倍数)后对酶活性的抑制率为 79.9%,但其抑制活性随血清的稀释倍数增加而降低,至 81 倍稀释后,其非特异性抑制率 <15%(见图 1)。

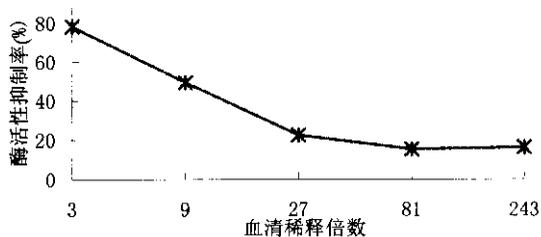


图 1 正常小鼠血清非特异性抑制 HIV-1 RT 活性

4 T4、T6 和 NVP 分别与正常小鼠血清混合后的灭活处理对其抑制 HIV-1 RT 活性的影响 3 倍稀

释的正常小鼠血清分别与 T4(3mg/ml)、T6(3mg/ml) 和 NVP(3mg/ml) 等比例混合后,分成两份,一份 56℃ 30min 灭活处理,另一份不灭活。结果显示,正常小鼠血清灭活与否对其抑制 HIV-1 RT 活性有较大的影响,而 T4、T6 和 NVP 在 3mg/ml 浓度下,与血清混合后的灭活与否对其抑制 HIV-1 RT 的活性无影响,而水对照组 T4、T6 和 NVP 的灭活与否也未影响其抑制活性(见表 2)。

表 2 血清与 T4、T6 和 NVP 混合灭活处理与否对其体外抑制酶活性的影响 (%)

药物	水对照		3 倍稀释的小鼠血清	
	灭活	未灭活	灭活	未灭活
水对照	—	—	41.0	57.8
T4(3mg/ml)	99.7	99.2	98.2	98.4
T6(3mg/ml)	99.5	99.7	98.8	96.6
NVP(3mg/ml)	98.2	96.4	97.4	96.3

5 T4、T6 与正常小鼠血清混合后对其抑制 HIV-1 RT 活性的影响 T4(3mg/ml)和 T6(3mg/ml) 分别与正常小鼠血清等比例混合,9 倍稀释,经灭活处理后抑制 HIV-1 RT 活性(见图 2)。血清的存在,降低了 T4 和 T6 的活性。血清与 T4 或 T6 混合后的活性比水对照血清活性强,但比 T4 或 T6 的活性弱,而混合后的活性不等于两者简单的结合之和。



图 2 T4 和 T6 与正常小鼠血清等比例混合 9 倍稀释后抑制 RT 的活性

6 小鼠经灌胃或腹腔注射给药后血清抑制酶的活性 NVP 灌胃后,小鼠血清在体外明显抑制 RT 活性,抑制活性随 NVP 浓度(5~500mg/kg)增大而增强,并在 4h 内可维持活性(见图 3A)。AZT 和 STV 经灌胃后,小鼠血清未表现明显的抑制 HIV-1 RT 的活性,但 STV 在灌胃后 4h 时和 AZT 在灌胃后 1h 时有较弱的抑制 HIV-1 RT 的活性,STV 活性虽有量效关系的趋势,但不明显(见图 3B、图 3C)。T4 和 T6 经灌胃或腹腔注射不同剂量后,小鼠血清抗 HIV-1 RT 活性较弱(见图 3D)。

讨 论

HIV-1 逆转录酶抑制剂按其作用性质和作用靶点可分为核苷类 RT 抑制剂和非核苷类 RT 抑制剂。核苷类 RT 抑制剂是底物类似物,在体内发生磷酸化后,结合在酶的催化位点与底物竞争性结合在新合成的寡聚链上,从而使链合成终止,所以核苷类 RT 抑制剂需要磷酸化后才有活性,在体外不能测定其活性,AZT 和 STV 的 IC₅₀均大于 200μg/ml。非核苷类 RT 抑制剂是结合在逆转录酶活性调节位点上,降低酶的催化活性或使酶无催化活性,能直接抑制酶的活性,在体外可以测定 NVP 的 IC₅₀为 0.33μg/ml。NVP 为 dNTP 的非竞争性抑制剂,PFA 为非核苷类非竞争性逆转录酶抑制剂,当 HIV-1 RT 酶量在一定范围内对其 IC₅₀无影响,这可能是底物浓度在一定量时,总反应速度是一定的,结合在酶活性调节位点上,降低酶的催化活性^[1,2]。这对于测定其 IC₅₀有利,但对于其他药物是否也有类似结果,有待进一步实验。

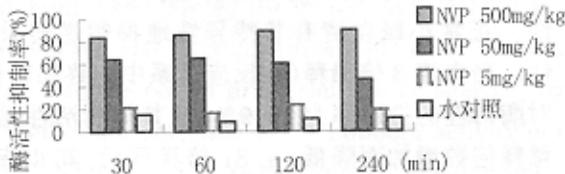


图 3A 小鼠灌胃不同浓度的 NVP 后血清抑制 RT 活性

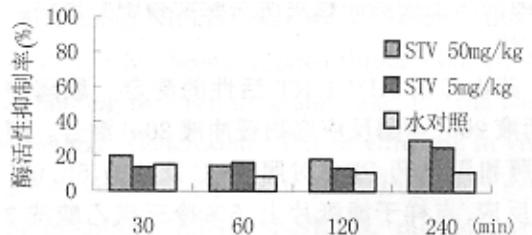


图 3B 小鼠灌胃不同浓度的 STV 后血清抑制 RT 活性

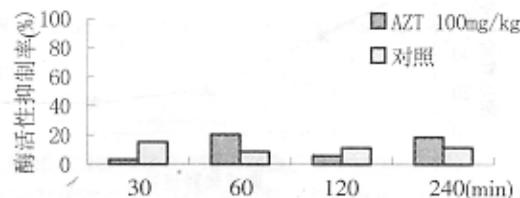


图 3C 小鼠灌胃 AZT 后血清抑制 RT 活性
万方数据

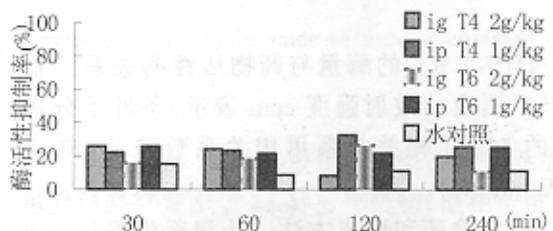


图 3D 小鼠灌胃或腹腔注射 T4、T6 后血清抑制 RT 活性

由于在体外筛选获得的有效抗 HIV-1 RT 药物, 与其体内的效果未必一致, 因此寻找一种在体外也能较好地评估体内药效的方法, 在抗 HIV-1 RT 药物筛选中具有重要意义。为此, 我们进行了体内与体外相结合的给药, 测定小鼠血清抑制 HIV-1 RT 活性, 以探索简便、快速的半体内抗 HIV 药效评价方法。实验发现正常小鼠血清有非特异性抑制 HIV-1 RT 活性, 未灭活血清尤为明显。但经 56℃ 30min 灭活处理, 并经稀释后, 这种非特异性抑制可消除, 而药物在经同样稀释倍数的稀释后仍可测定血药抑制 HIV-1 RT 的活性。但在实际应用中, 要根据药物的耐热特性选择血清的灭活与否, 使结果更可靠。

药物在体内的活性受多方面的影响, 如药物与血清蛋白的结合率, 药物在体内的代谢稳定性与清除率等。药物与血清结合, 降低了药物在体内的药效。通过本实验药物与血清结合后的活性可初步看出药物与血清蛋白的结合程度及其对药物产生的影响, 分析药物在不同时间的血药活性动态, 可预测药物的代谢稳定性和清除率。从本实验可看出, 尽管丹参提取物 T4 和 T6 体外活性高, 但与血清蛋白有较高的结合率, 给药后小鼠血清的抑制 HIV-1 RT 活性低。NVP 与血清蛋白的结合程度低, 给药后小鼠血清的抑制 HIV-1 RT 活性高, 且持续时间长。另外, 通过灌胃和腹腔注射不同方式的给药后小鼠血清在体外的活性动态, 以及体外药物与血清混合后的抑制活性实验结果, 可以初步估算药物的有效生物利用度、药物在小鼠体内的代谢率及药物与血清的结合率, 为临床用药提供参考依据, 从而预见这一问题, 早期预测药物的发展前景。

核苷类 RT 抑制剂, 需在体内经磷酸化后才有活性^[3]。给药后药物在小鼠体内经磷酸化, 其抑制 RT 活性得以激活, 从而可在体外测定其活性。AZT 和 STV 均为核苷类 RT 抑制剂, 在体外无活性 ($IC_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{ml}$), 但灌胃给药后小鼠血清均有低的抑制 HIV-1 RT 活性, 虽血清抑制 RT 的活性不强, 但 STV 在给药后 4h 时有相对强的活性, AZT 在给药后 1h 时有相对较强的活性, 与所报道 STV 和 AZT 给药后血中出现高峰一致^[4, 5]。活性不强, 这可能是磷酸化的药物形式在血清中的浓度不高所致。而非核苷类逆转录酶抑制剂在体内无需转化, 可直接发挥抑制作用。NVP 为非核苷类逆转录酶抑制剂, 其体外活性高 (IC_{50} 为 $0.33 \mu\text{g}/$

ml), 且与血清结合率低, 因而其给药后小鼠血清抑制逆转录酶的活性强, 并且持续时间长, 这与文献报道一致^[6]。此结果说明本实验方法可很好地应用于非核苷类 RT 抑制剂的药效评价, 而对于核苷类 RT 抑制剂的药效评价, 还需其他辅助实验来进一步分析。中药丹参提取物 T4 和 T6 有抑制 HIV-1 活性, 但活性较 NVP 低, 故在小鼠血清中活性也低, 可能是反映其实际情况。

本实验方法可应用于早期预测 HIV-1 RT 抑制剂的体内药效, 通过药物与正常小鼠血清的结合及给药后体内血清抑制 HIV-1 RT 的活性动态, 可以推测药物与血清的结合率及药物的有效生物利用度和药物在体内的代谢和清除率。但对 NRTIs, 由于血清中药活性低, 不能很好地反映效果, 故有局限性, HIV-1 细胞培养方法可确定药效, 也可应用小鼠血清测定方法, 但因 HIV-1 有感染性, 需要特殊条件, 实验周期较长, 但仍较动物感染模型快速简便, 可在药物研究早期应用, 预测其前途。

参 考 文 献

- Oberg B. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* 1989; 40(2): 213—215.
- Tang Xiao-shan, Chen Hong-shan, Zhang Xing-quan. Inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by Chinese medicines in vitro. *Proc. CAMS and PUMC* 1990; 3(5): 140—144.
- Campiani G, Ramunno A, Maga G, et al. Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitors: past, present and future perspectives. *Curr Pharm Dis* 2002; 8(8): 615—617.
- Wientjes MG, Au JL. Lack of pharmacokinetic interaction between intravenous 2', 3'-dideoxyinosine and 3'-azido-3'-deoxythymidine in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(3): 665—668.
- Schinazi RF, Boudinot FD, Doshi KJ, et al. Pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-deoxy-2', 3'-dideoxythymidine in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(6): 1214—1219.
- Riska PS, Joseph DP, Dinallo RM, et al. Biotransformation of nevirapine, a non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, and chimpanzees. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(12): 1434—1447.

(收稿 2003-03-25 修回 2003-04-28)