

283-289

6772(3)

第10卷 第4期
1995年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 4
Dec. 1995受体导向药物 L-HSA-AraAMP 的导向性
及体外抗病毒效应的研究^{*}

张玲霞 王慧芬 李克 仲伯华**

刘洪 光盼勇

(解放军 302 医院, 北京 100039)

✓ R978.7
R966

A

提要 观察了用¹²⁵I 标记的受体导向药物——乳糖化人血清白蛋白单磷酸阿糖腺苷(L-HSA-AraAMP, 简称交联物)在小鼠体内的分布情况,结果显示在肝脏内含量明显高于其它各脏器,表明药物的肝脏导向性能良好。同时观察到药物具有缓慢释放作用,从而增强了药效。用乙肝病毒 DNA 转染的肝癌细胞(2.2.15 细胞)观察交联药物的抗病毒药效,结果显示交联物与 AraAMP 具有相似的抗病毒效应。两药对 HBsAg 的抑制率分别为 50%、63%,对 HBeAg 为 62.6%、67.2%。500 μg/ml 交联物(其中含 AraAMP 为 31.3 μg/ml)与 100 μg/ml AraAMP 对 HBV DNA 具有相似的抑制作用。两药对 HBeAg 抑制的选择指数分别大于 4.8、1.7。显示交联物比 AraAMP,在药效相似情况下可明显减少用量,降低毒性,延长作用时间。

关键词 受体,导向性,抗病毒,治疗

受体导向药物, 抗病毒药, 药理学

哺乳动物的肝细胞膜上存在特异性半乳糖受体,它能专一识别末端为半乳糖基的糖蛋白配体并主动转运入细胞内,这种受体介导抗癌药和抗病毒药物的肝脏导向治疗已取得了初步疗效。本研究选用乳糖化人血清白蛋白(L-HSA)为载体,与 AraAMP(抗病毒药)交联成乳糖化人血清白蛋白单磷酸阿糖腺苷(L-HSA-AraAMP,以下简称交联物)研究其导向性能及其抗病毒效应。

材料与方 法

1 交联物的制备及导向性实验

1.1 交联物的制备 以还原胺化法制备导向载体乳糖化人血清白蛋白(L-HSA),在碳二亚胺作用下,实现抗病毒药 AraAMP 与载体的偶联,得到水溶性良好的交联物——乳糖化人血清白蛋白单磷酸阿糖腺苷(L-HSA-AraAMP)。

1.2 交联物的放射性标记 采用氯氨-T 碘化法对 L-HSA-AraAMP 进行¹²⁵I 标记,标记率为 67.6%,以三氯醋酸沉淀法测定标记物的放射纯度为 90%以上。

本文于 1994 年 12 月 28 日收到,1995 年 4 月 18 日修回

* 本研究课题获全军“八·五”科研基金资助

** 军事医学科学院毒物药物研究所

1.3 交联物在小鼠体内分布实验 选择体重为20 g左右(19.6 g~20.5 g)的雌性昆明纯种小鼠(军事医学科学院动物中心提供)16只,经尾静脉注射标记交联物 7.4×10^5 Bq/只,注射后1、3、5、7日各杀4只,留取血液及组织称重,用FJ-2003型 γ 计数器测量其放射活性,结果以cpm/g表示。

2 交联物的体外抗病毒效应实验

2.1 将2.2.15细胞(HBV DNA转染的HepG₂细胞,由北京医科大学第一附属医院传染科赠送)接种于24孔板,每孔细胞数 1.0×10^6 ,二氧化碳孵箱培养,6天后更换含药液体,每3天收集上清液,-20℃保存,共9天。设阴阳性对照,实验重复2次。

2.2 抗HBV药效测定 以固相放免法(RIA)测定上清液HBsAg、HBcAg,计算抑制百分率及ID₅₀(病毒抗原50%抑制量)。

2.3 HBV DNA Southern blot 测定 2.2.15细胞加药培养12天后弃上清,提取细胞HBV DNA,电泳转膜,按Promega药盒说明,同位素标记探针杂交。

2.4 药物的细胞毒性实验(MTT) 参照Francois法,2.2.15细胞于96孔板培养,方法如上述,第12天弃上清后加入MTT,再培养弃上清,加异丙醇,测定560 nm和690 nm波长下的OD值,计算:

$$\text{细胞抑制百分率} \% = \frac{\text{无药对照 OD 值} - \text{药 OD 值}}{\text{无药对照 OD 值}} \times 100\%;$$

$$\text{细胞半数致死量 } CD_{50} = \text{Antilog} \left[B + C \left(\frac{50 - <50\% \text{抑制百分率}}{>50\% \text{抑制百分率} - <50\% \text{抑制百分率}} \right) \right]$$

公式中的B=log<50%药物浓度, C=A-B

A=log>50%药物浓度;

选择指数 Si = $\frac{CD_{50}}{ID_{50}}$; Si值愈大,应用价值愈高。

结 果

1 交联物的纯度测定及结构鉴定 通过还原胺化法制备乳糖化白蛋白作为导向载体,在碳二亚胺作用下与AraAMP偶联。采用SDS-PAGE、凝胶柱层析测得交联物纯度在99%以上,以紫外光谱分析交联物,测得每分子白蛋白上连接35分子的半乳糖残基,15分子的AraAMP,交联键为共价键,平均分子量为82000。以薄层层析检测未发现游离药物存在。

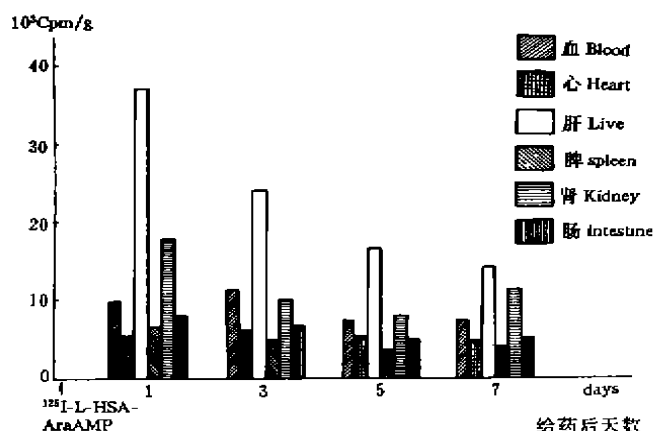
2 L-HSA-AraAMP在小鼠体内的分布

2.1 图1及表1显示¹²⁵I-L-HSA-AraAMP在肝脏的含量明显高于其它各脏器,高于心、脾、肠4—8倍,高于血、肾3—4倍。肝脏内含量最高为第1日,到第7日的cpm值仍大于10 000。

表1 ¹²⁵I-L-HSA-AraAMP在小鼠体内的分布 $\bar{X}(SD)$ n=4] cpm/g

Table 1 Distribution of ¹²⁵I-L-HSA-AraAMP in tissues of mice [$\bar{X}(SD)$ n=4] cpm/g

给药后天数 Days after administration	血 Blood	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidney	肠 Intestine
1	8 636.2 (4 401.6)	4 499.2 (2 188.6)	37 332.25 (8 245.07)	5 805.5 (3 656.2)	17 281.2 (2 627.0)	8 148.2 (5 087.9)
3	12 914.7 (8 182.0)	5 268.0 (2 119.6)	26 444.5 (11 353.04)	3 704.0 (1 960.1)	10 728.2 (2 947.0)	6 681.7 (3 241.0)
5	7 021.0 (3 075.2)	4 889.0 (2 990.4)	16 341.5 (4 964.1)	3 387.5 (480.8)	10 447.2 (4 634.5)	4 648.5 (1 028.9)
7	7 013.5 (2 497.4)	4 088.5 (1 685.0)	15 404.0 (6 960.4)	3 534.2 (1 033.3)	8 925.7 (3 021.3)	4 574.7 (1 528.1)

图1 ^{125}I -L-HSA-AraAMP 在小鼠体内的分布Fig 1 Distribution of ^{125}I -L-HSA-AraAMP in tissues of mice

2.2 表2为方差分析表,显示本实验动物模型具有统计学意义($p < 0.001$)。

表2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance

来源 Source	部分SS Partial SS	df df	MS MS	F F	概率值 Probability value
模型 Model	423 030.85	9	47 003.43	53.74	0.0000
分组 Group	124 400.29	1	124 400.29	142.24	0.0000
时间 Time	41 262.44	3	13 754.15	15.73	0.0000
组织 Tissue	257 368.12	5	51 473.62	58.86	0.0000
残差 Error	159 173.87	182	874.58		
合计 Total	582 204.72	191	3 048.19		

3 L-HSA-AraAMP 的体外抗病毒效应

3.1 细胞毒性实验 三批实验显示 L-HSA 对细胞无毒性, $CD_{50} > 2000 \mu\text{g/ml}$; L-HSA-AraAMP 几乎无细胞毒性, $CD_{50} > 2000 \mu\text{g/ml}$; AraAMP 有细胞毒性, CD_{50} 为 $658.5 \pm 180 \mu\text{g/ml}$ (表略)。

3.2 药物对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用

L-HSA 对 HBsAg 及 HBeAg 无抑制作用(表略)。表3显示 AraAMP 对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用,在浓度为 $500 \mu\text{g/ml}$ 时,HBsAg 及 HBeAg 分别在第9、6天达抑制高峰;对 HBeAg 的抑制作用显示量、效关系,尤以第9天最为明显。

表3 AraAMP对HBsAg及HBeAg的抑制作用
Table 3 Inhibitory effect of AraAMP on HBsAg and HBeAg

药物浓度 Concentration of drug ($\mu\text{g/ml}$)	HBsAg(P/N)值(抑制率%) HBsAg P/N value(inhibitory ratio)			HBeAg(P/N)值(抑制率%) HBeAg P/N value(inhibitory ratio)		
	3天 3rd day	6天 6th day	9天 9th day	3天 3rd day	6天 6th day	9天 9th day
	500	2.6(23.5)	2.2(57.7)	1.8(63.5)	3.0(-)	1.9(67.2)
250	2.7(20.6)	2.4(53.8)	2.3(52.1)	3.2(-)	3.3(43)	3.3(27.7)
125	2.98(12.4)	2.3(55.8)	2.4(50)	2.2(-)	4.9(15.5)	4.4(6)
CC	3.4	5.2	4.8	2.7	5.8	4.7

Ara-AMP对HBeAg与HBsAg均有抑制,HBsAg第9天可见到抑制高峰,而HBeAg第6天抑制率可达67.2%。
Inhibitory peak of HBsAg on the 9th day Inhibitory peak of HBeAg on the 6th day

表4显示交联物对HBsAg、HBeAg均有抑制作用,对HBeAg的抑制率略低于AraAMP组,对HBeAg抑制率则大于AraAMP组,量效关系不如AraAMP组明显。

表4 L-HSA-AraAMP对HBsAg及HBeAg的抑制作用
Table 4 Inhibitory effect of L-HSA-AraAMP on HBsAg and HBeAg

药物浓度 Concentration of drug ($\mu\text{g/ml}$)	HBsAg(P/N)值(抑制率%) HBsAg P/N value(inhibitory ratio)			HBeAg(P/N)值(抑制率%) HBeAg P/N value(inhibitory ratio)		
	3天 3rd day	6天 6th day	9天 9th day	3天 3rd day	6天 6th day	9天 9th day
	1000	2.6(25.7)	2.6(43.5)	2.9(35.6)	2.7(-)	4.5(50.5)
500	2.9(17)	2.3(50)	3.8(15.6)	2.5(-)	3.4(62.6)	5.9(35)
250	2.6(25.7)	3.2(30.4)	3.8(15.6)	2.7(-)	5.6(38.5)	8.3(35.9)
CC	3.5	4.6	4.5	2.6	9.1	13.1

L-HSA-AraAMP对HBsAg的抑制较早但抑制率低,对HBeAg有明显抑制,第6天与第9天其抑制作用无明显区别。
Inhibitory peak of HBsAg at the 6th day Inhibitory peak of HBeAg at the 6th day

3.3 药物的选择指数Si

从表5可见,对于HBeAg的Si,交联物明显大于AraAMP;对于HBsAg,AraAMP的Si大于交联物。

表5 药物对病毒抗原50%抑制量ID₅₀及选择指数Si
Table 5 Inhibitory dose of drug to 50% viral antigen(ID₅₀) and selective index of drug(Si)

药物 Drug	培养天数 Days of culture	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		Si	
		HBsAg	HBeAg	HBsAg	HBeAg
L-HSA-AraAMP	3	>1000	-	-	-
	6	5000	375.0	>4	>5.3
	9	>1000	417.03	-	>4.8
AraAMP	3	-	-	-	-
	6	<125	305.3	>5.3	2.2
	9	125	393.3	5.3	1.7

3.4 对HBV DNA的抑制作用

图2显示:第1-1行为浓度不同的AraAMP,表明对HBV DNA有不同程度的抑制作用,量效关系显著;第9行为无药对照,HBV DNA无抑制现象;第7、8行为浓度不同的交联物,与无药对照比较显示出交联物对HBV DNA具有抑制作用;与AraAMP组比较,显示交联物在

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (其中含 AraAMP 为 31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 浓度时,其抑制程度相当于 AraAMP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抑制程度。

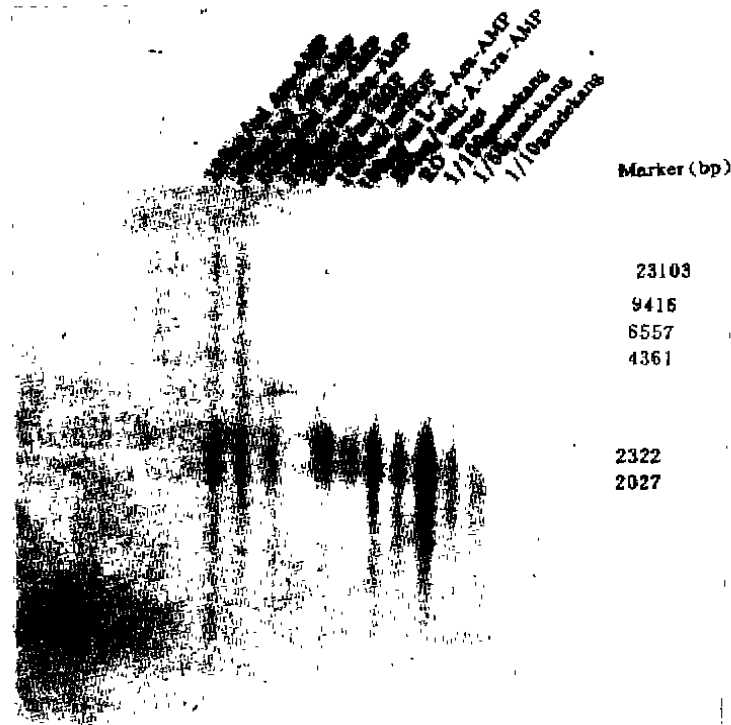


图2 药物对 HBV DNA 的抑制作用

Fig 2 Inhibitory effect of drug on HBA DNA

讨 论

导向治疗是应用医学生物技术将药物与载体交联,通过这一方法将交联药物运送到靶器官细胞内,达到治疗目的。此法具有选择性较强、特异性较好,药物用量小,毒副作用少,能提高疗效等优点^[1]。人肝细胞表面具有半乳糖受体,它是由分子量为 41 000 的一种亚基组成,每个肝细胞约有 1.5×10^5 个受体,受体具识别结合体内去唾液酸糖蛋白配基专一性,受体配体复合物经胞吞作用进入细胞内^[2],利用这一机制将治疗药物携带到靶细胞内充分发挥作用。本文结果证实了胺化乳糖白蛋白(L-HSA)具有较好的肝脏导向性能,经同位素标记的 L-HSA 在肝脏内含量显著高于在其它脏器的含量($P < 0.001$)。经交联后的 L-HSA-AraAMP 在肝脏内含量仍高于其它的脏器含量($P < 0.001$)。说明 L-HSA 经交联抗病毒药物后导向性未受影响。游离的 AraAMP 经静脉注射数分钟后,组织浓度迅速下降,转化为阿糖腺苷次黄嘌呤(Ara-H)而失去药效^[3]。本实验显示 AraAMP 经交联后,到第 7 天仍有活性,提示交联药物具有缓慢释放药物的作用,从而使药物在体内作用时间延长,因此可以减少药物用量,减少给药次数,降低毒副作用,增强抗病毒效应。

2.2.15 细胞是转染了 HBV DNA 序列的肝癌细胞,它能长期稳定地产生 HBV 颗粒,在细

胞内和培养上清液中可以检测到有病毒复制中间体存在。文献指出,2.2.15 细胞表面具有半乳糖受体^[4]。抗病毒效应实验显示,交联物与 AraAMP 对 HBsAg、HBeAg 具有相似的抑制作用,尤其对于 HBeAg 的抑制作用,交联物优于 AraAMP。对结合药物毒性作用全面观察,可见加药后第 6 天交联物对 HBsAg、HBeAg 的选择指数分别为 >4 , >5.3 ; AraAMP 为 5.3、2.2,第 9 天交联物对 HBeAg 的选择指数 >4.8 ,而 AraAMP 为 1.7。结果表明,AraAMP 随时间延长,选择指数降低,说明其具有蓄积毒性作用,而此时交联物尚能充分发挥抑制作用。Southern blot 分析显示,病毒复制中间体 rcDNA 及 ssDNA 均有减少,表明交联物与 AraAMP 的作用机制一致,作用部位在 DNA 多聚酶。同样剂量的交联物中的 AraAMP 含量仅 $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{6}$, AraAMP 用量的减少可明显降低毒副作用,实验结果充分显示交联物通过导向作用,促进药物吸收、利用。

致谢 中国医学科学院医学生物技术所陈鸿珊教授、郭巨涛副研究员指导药效学实验;301 医院李振甲教授、王录焕医师帮助完成同位素标记,统计室姚晨讲师帮助计算机统计学处理,特此致谢。感谢军事医学科学院龚雄麒教授、本院陈菊梅教授指导。

参 考 文 献

- 1 Fiume L, Bassi B, Busi C, *et al*. Galactosylated poly (L-Lysine) as a hepatotropic carrier of 9-B-D-arabinofuranosyladenine 5'-monophosphate. *FERS Letters*, 1986; 203(2):203~206
- 2 Schwartz AL. The hepatic asialoglycoprotein receptor. *CRC Crit Rev Biochem*, 1984; 16:207
- 3 Penzetto A, Fiume L, Forzani B, *et al*. AraAMP and ACV AMP coupled to lactosaminated albumin reduce wood-chuck hepatitis virus viremia at doses lower than do the unconjugated drugs. *Hepatology*, 1991; 14(1):16-24
- 4 Wu CY, Wu JH. Specific inhibition hepatitis B viral gene expression *in vitro* by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*, 1992; 267(18):12436-12439

Experimental Studies on Viral Hepatitis Receptor-targeted Drug L-HSA-AraAMP

Zhang Lingxia Wang Huifen Li Ke
Zhong Bohua Liu Hong *et al*

(PLA Hospital 302, Beijing 100039)

Lactosaminated Human Serum Albumin (L-HSA) was used as a carrier and coupled to Arabinoside adenine monophosphate (AraAMP). The distribution of ¹²⁵I-labelled L-HSA-AraAMP were higher in liver than in other organs. Radioactivities of the drug could still be measured at the 7th day after injection.

The efficacy of targeted drug was determined by analyzing dynamic changes of HBsAg and HBeAg in 2.2.15 cell culture medium by RIA and changes in the replicative intracellular HBV

DNA content by Southern blot. The results showed that the targeted drug had significantly inhibitory ratio of HBsAg and HBeAg which was similar to AraAMP (inhibitory ratio of HBsAg 50%, 63%; HBeAg 62.6%, 67.2%, respectively). Southern blot test showed the replicative intermediates rcDNA and ssDNA were inhibited by AraAMP. The targeted drug had parallel anti-HBV DNA replicative effectiveness compared with AraAMP. The values of Si of drugs to HBsAg and HBeAg were detected.

Key words Receptor-targeted drug, Anti-viral efficacy