

用猴艾滋病 D 型逆转录病毒筛选抗艾滋病药物 实验模型的建立及应用

郑永唐 贲昆龙 王金焕 齐瑾 黄生民

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

R965.1
R978.7

A 提 要 以药物对合胞体形成的抑制和对细胞的毒性作为检测指标,应用猴艾滋病 D 型逆转录病毒(SRV)/Raji 细胞系统建立了体外筛选抗艾滋病药物的实验模型。AZT 和天花粉蛋白可显著地抑制 SRV 诱导的合胞体形成,它们的选择指数(SI)分别为数 13500 和 8812。用该模型筛选了 46 种来源于天然资源的化合物,结果表明有 11 种天然化合物有明显的抗病毒活性。

关键词 药物筛选,猴艾滋病 D 型逆转录病毒,合胞体,AZT,天花粉蛋白

抗艾滋病药

合适的药物筛选实验模型是新药研究和开发的关键。艾滋病(Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS)是由人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)引起的传染病。由于其流行广、病死率极高,寻找新的抗艾滋病药物成为当务之急。筛选抗艾滋病药物,主要采用 HIV/人 T 淋巴细胞系的模型进行体外筛选。由于必须在特殊实验室进行,所以不少学者探索用动物逆转录病毒,如山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV),猫白血病病毒(FIV),猴免疫缺陷病毒(SIV),Visna 病毒,马传染性贫血病毒(EIAV)及牛免疫缺陷病毒(BIV)等,作为模型,来进行药物筛选和研究药物的作用机制^[1,2]。

猴艾滋病(SAIDS)是研究人艾滋病的主要动物模型^[3]。SAIDS 的病原体有猴艾滋病 D 型逆转录病毒(Simian AIDS type D retrovirus, SRV)和猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)二种。Tsai 等人曾发现,抗 HIV 药物 AZT ddC 和 ddA 能影响 SRV1 感染的 Raji 细胞的合胞体的形成,病毒抗原的表达和逆转录酶的水平^[4]。但未见利用 SRV 作为筛选抗艾滋病药物模型报道。我们在 HIV 研究的专用 P3 实验室建立之前,为了建立一种安全可靠、可以快速筛选抗艾滋病药物的实验模型,用 SRV 作为体外筛选模型,将合胞体形成抑制试验和药物对细胞的毒性作为药物筛选模型中的观察指标,对该模型筛选抗艾滋病药物的可行性进行了研究,并筛选了几十种天然化合物,取得了很好的效果。

材料与方 法

1 药 物

3-叠氮胸腺嘧啶脱氧核苷(AZT, 3'-Azido-3'-deoxythymidine)购自 Sigma 公司。结晶天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)为中国科学院上海有机化学研究所金善炜教授提供,SDS-PAGE 为电泳纯,溶于生理

收稿日期:1996-04-08,修回日期:1996-08-23

• 中国科学院八五重大应用项目(KY85-05)和云南省应用基础研究基金资助项目(96Co95M)

盐水, 0.22 μm 滤膜除菌, 测定蛋白质浓度后分装, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。其它待筛选天然化合物分别由中国科学院昆明植物研究所、上海有机化学研究所、上海药物研究所等提供。

2 细胞

Raji 细胞为 P. Marx 博士 (California Primate Research Center, University of California, USA) 惠赠。培养基为 RPMI-1640 (Gibco), 含有 10% 小牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 10 mmol/L HEPES (Sigma), 50 mmol/L 2-ME (Bio-Rad), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青、链霉素。

3 病毒的制备

SRV1 由 P. Marx 博士惠赠。收集 SRV1 感染 Raji 细胞后第 7~8 天的培养上清。用 Minitan 超滤系统 (Millipore) 浓缩 10 倍。截留分子量为 30 万 kDa。滴定感染性病毒, 置液氮保存。

4 细胞毒性试验

取 $5 \times 10^4/\text{mL}$ Raji 细胞悬液 100 μL 加至 96 孔细胞培养板 (Costar) 中, 与不同浓度的药物溶液混合, 每个浓度设置 6 个孔, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 第三天补充新鲜完全培养基, 第 6 天按前述方法测定其细胞毒性^[5]。每孔加 5 mg/mL MTT (Sigma) 溶液 20 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中孵育 4 h, 每孔滴加 200 μL 20% SDS-50% DMF, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 用 Bio-Rad 3550 ELISA 仪测定 OD 值 (595/655 nm)。IC₅₀ 是对 50% 的 Raji 细胞产生毒性时的药物浓度。

5 合胞体形成抑制试验

在 96 孔平底细胞培养板上, 将药物用完全培养基进行 5 倍倍比稀释, 共 10 个稀释度, 每孔 100 μL , 设 6 个重复孔, 同时设置正常细胞对照, SRV1 感染细胞对照。每孔含 1×10^3 个 Raji 细胞, 加入浓缩 SRV1 上清, 感染复数 (MOI) 为 1:1.3。置培养箱内培养, 第 3 天补加新鲜完全培养基 100 μL 。第 6 天后观察药物对合胞体形成的影响。在 100 倍的倒置显微镜下, 选取 5 个不重叠的视野, 计数 SRV1 病毒诱导 Raji 细胞形成合胞体数。EC₅₀ 为抑制合胞体形成达 50% 时的药物浓度。选择指数 (Selectivity Index, SI) 为 IC₅₀/EC₅₀ 的比值。

结果和讨论

1 SRV 体外筛选药物实验模型的建立

为了鉴别 SRV1 感染 Raji 细胞形成的合胞体, 测定了正常细胞和合胞体细胞的平均直径, 合胞体细胞的平均直径是正常细胞的 6 倍。合胞体形成的数量与 SRV1 感染剂量有一定的量效关系, 我们摸索了筛选药物的最适 MOI 值。为了验证此模型的可行性, 用 AZT 进行了比较实验。AZT 是一种类核苷酸类抑制逆转录酶的药物, 是目前被美国 FDA 批准的少数几种可用于临床的抗 HIV 药物, 结果表明 AZT 抗 SRV 的选择指数与国外其它实验室利用体外抗 HIV 药物的筛选模型所得出的选择指数基本吻合^[6] (见表 1; 图 1)。

2 天花粉蛋白对 SRV1 的体外抑制作用

天花粉蛋白 (TCS) 是从中药葫芦科植物栝楼 [*Trichosanthes kirilowii* Maxim (Cucurbitaceae)] 的球根中提取的一种由 247 个氨基酸组成的单链核糖体失活蛋白 (Ribosome inactivating protein, RIP)^[7,8]。TCS 在体内有抑制 HIV 繁殖的作用, 有些方面优于 AZT。TCS 不仅能抑制 CD4+T 细胞内 HIV-1 的繁殖, 而且对抑制单核-巨噬细胞内 HIV-1 的复制特别有效^[9,10]。我们以此实验模型检测了 TCS 对 SRV1 体外增殖的影响。从图 2 可见, TCS 显著地抑制 SRV1 的繁殖, 抑制 50% 合胞体形成的药物剂量为 $1.6 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{mL}$, 而 TCS 对 Raji 细胞的 50% 毒性剂量为 1.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SI 值高达 8,812。

表 1 AZT 体外抗 HIV 和 SRV 的比较

Table 1 The comparison of anti-HIV or effects of AZT *in vitro*

实验室 Lab	病毒株 Virus	细胞 Cell	测定方法 Assay	IC50 ($\mu\text{mol/L}$)	EC50 (nmol/L)	选择指数 SI
G. S. H (德国)	HIV-1111B	PBL	MTT/p24	10	1.0	10,000
Pauwels' (比利时)	HIV-1111B	MT-4	CPE/MTT	9.3	1.5	6,200
		CEM	CPE/MTT	97	4.5	21,556
		Molt-4	CPE	-	6.0	-
			MTT	105	-	17,500
		PBL	p24	-	37.4	-
			MTT	52	-	1,390
	HIV-2ROD	MT-4	CPE/MTT	9.3	1.1	8,454
	HIV-2EHO	MT-4	CPE/MTT	9.3	0.8	11,625
本实验室 Our Lab	SRV-1	Raji	CPE	-	0.07	-
			MTT	0.76	-	10,857
			CPE	-	0.11	-
			MTT	0.22	-	2,000
			CPE	-	0.11	-
			MTT	0.14	-	13,364

* From Nature 1990, 343:470-474, SI = IC50/EC50

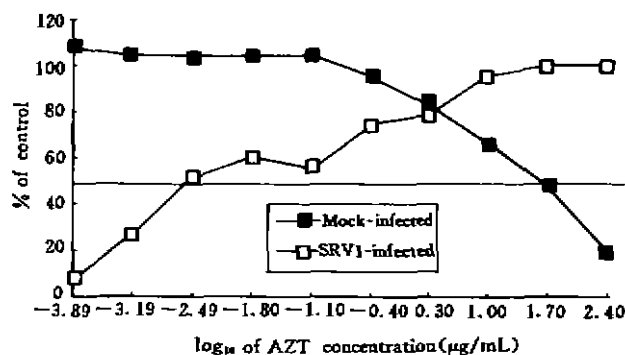


图 1 AZT 体外抗 SRV1 的作用

Fig 1 *In vitro* anti-SRV1 activity of AZT

3 抗艾滋病天然药物的筛选

从我国传统药物和天然资源中寻找新药物或先导化合物受到各国科研工作者的重视。除天花粉外,发现有抗 HIV 作用的还有 TAP29,甘草甜素,喜树碱,丝瓜蛋白,姜黄素,苦瓜子蛋白,金丝桃素等。与有关单位合作,用建立的模型对数十种来源于天然资源的化合物进行了筛选,结果见表 2。其中的 26 种 RIPs 类化合物有 17 种(65.4%)具有抑制 SRV1 的作用。现正对初筛有效的化合物作进一步的抗 HIV 的研究。

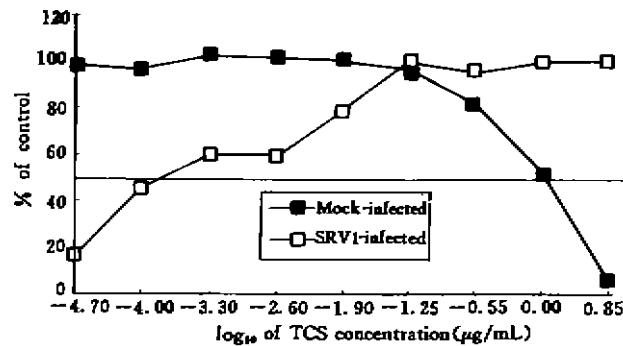


图2 天花粉蛋白体外抗SRV1的作用

Fig 2 *In vitro* anti-SRV1 activity of TCS

表2 46种天然化合物的抗SRV的活性

Table 2 Anti-SRV activity of 46 natural compounds

选择指数 SI	化合物数 Number of compounds	百分离 %
< 100	24	52.2
100 - 499	9	19.6
500 - 999	2	4.3
> 1,000	11	23.9
合计(Total)	46	100.0

参 考 文 献

- 1 张兴传, 权可久, 唐小山等. 几种药物抑制马传染性贫血病毒和人免疫缺陷病毒的实验研究. 病毒学报, 1992, 8:38-43
- 2 王岱, 耿运琪, 徐为人等. 用牛免疫缺陷病毒筛选抗艾滋病药物实验模型. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10:49-52
- 3 陈志斌, 贾昆龙. 猴艾滋病与D型逆转录病毒. 动物学研究, 1992, 13:193-199.
- 4 Tsai CC, Follis KE, Benveniste RE. Antiviral effects of 3'-azido-3'-deoxythymide, 2',3'-dideoxycytidine, and 2',3'-dideoxyadenosine against simian acquired immunodeficiency syndrome-associated type D retrovirus *in vitro*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1988, 4:359-366
- 5 郑永唐, 贾昆龙. 检测细胞存活和增殖的MTT方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8:266-269
- 6 Pauwels R, Andries K, Desmyter J *et al.* Potent and selective inhibition of HIV1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives. Nature, 1990, 343:470-474
- 7 Collins EJ, Robertus, JD, Lopresti M *et al.* Primary amino acid sequence of α -trichosanthin, and molecular models for abrin A-chain and α -trichosanthin J Biol Chem, 1990, 265:8665-8669
- 8 汪猷主编, 天花粉蛋白. 北京: 科学出版社, 1990:1-130
- 9 McGrath BS, Hwang KM, Caldwell SE *et al.* GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte lineage. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:2844-2848
- 10 Kahn JO, Gorelick KJ, Gatti G *et al.* Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38:260-267

Establishment and Application of an Experimental Model for Screening Anti - AIDS Drugs with Simian Type D Retrovirus

Zheng Yongtang Ben Kunlong Wang Jinghuan
Qi Jin Huang Shengming

(*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223*)

Because of the close phylogenetic relationship, the simian acquired immunodeficiency syndrome (SAIDS) is considered as an important model in search of new drugs in prevention and treatment of the pandemic human AIDS. The simian AIDS type D retroviruses (SRV) and simian immunodeficiency viruses (SIV) are the causative agents of SAIDS. A SRV model to screen anti - AIDS drugs *in vitro* was established. AZT and trichosanthin (TCS) were shown to inhibit SRV1 syncytium formation obviously. The selectivity indexes (SI) of AZT and TCS were 13500 and 8812, respectively. Forty - six natural compounds isolated from the Chinese medical herbs were screened by using this model. There were eleven natural compounds with obvious antiviral activity *in vitro*. These data indicated that SRV model for screening anti - AIDS drugs was feasible.

Key words Drug screening, Simian AIDS type D retrovirus, Syncytium, AZT, Trichosanthin