

## 6种抗病毒药物体外对豚鼠疱疹样病毒的抑制作用

郑志明 (湖北医学院病毒研究所, 武汉 430071)

**提要** 采用空斑减数分析, 病毒产量测定, CPE抑制试验在原代豚鼠胚细胞中测定 FMAU, FIAU, FIAC, BVDU, ACV 和 PFA 抗 GPHLV-394 作用的研究表明, FMAU, FIAU, BVDU 对 GPHLV-394 的  $ID_{50}$  浓度分别是 34, 48, 189 ng/ml, 而 FIAC, ACV, PFA 的  $ID_{50}$  浓度分别是 3.9, 280, 300  $\mu$ g/ml. 病毒产量测定法较空斑减数分析法敏感, 可反映 GPHLV 在药物存在下的繁殖动态。

**关键词** 阿糖呋喃嘧啶, 阿糖胞苷, 溴脱氧尿苷, 无环鸟苷, 疱疹病毒感染, 组织培养

豚鼠疱疹样病毒 (guinea pig herpes-like virus, GPHLV) 是感染豚鼠的一种嗜内脏性的内源性病毒。豚鼠感染 GPHLV 后, 血液中不可检测出抗 GPHLV 中和抗体为其内源性病毒之特征<sup>(1)</sup>。抗病毒药物对该病毒的敏感性未见报道。本研究报告了 GPHLV 对目前已知的 6 种抗疱疹病毒药物的敏感性测定。

### 材料与 方法

**细胞与病毒** 原代豚鼠胚成纤维细胞

1986年12月4日收稿 1987年8月28日接受

(GPE)按常规方法制备<sup>(2)</sup>。实验用 GPHLV-394 分离自 394 号豚鼠肺和脾<sup>(1)</sup>。

**抗病毒药物** 2'-氟-5-甲基阿糖尿嘧啶 (FMAU), 2'-氟-5-碘阿糖尿嘧啶 (FIAC), 2'-氟-5-碘阿糖尿嘧啶 (FIAU) 均由 Dr C McLaren (Bristol-Myers Co, P. O. Box 657, Syracuse NY 13201, USA) 赠送。E-5-(2-溴乙炔)-2'-脱氧尿苷 (BVDU) 由 Dr E De Clercq (Rega Institute For Medical Research, Leuven, Belgium) 提供。无环鸟苷 (ACV) 得自 Burroughs Wellcome Co (Research Triangle Park NC 27709, USA)。膦羧基甲酸钠 (PFA) 得自 Astra Lab. (Södertälje, Sweden)。

**病毒空斑减数分析** 待 GPE 细胞在 24 孔细胞培养板形成单层后, 将 GPHLV-394 用 Hanks 液作  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  稀释, 接种细胞单层, 每孔 0.1 ml。37°C 吸附 1 h 后, 分别加含 FMAU, FIAU, FIAC, BVDU, ACV, PFA 的甲基纤维素覆盖培养液<sup>(3)</sup>。置 35°C CO<sub>2</sub> 孵箱培养 5 d 后, 吸除覆盖液, 用固定染色液<sup>(2)</sup> 固定染色 15 min, 自来水清洗后, 检查计数空斑, 求出抑制 50% 空斑形成的药物浓度 ID<sub>50</sub> (50% inhibitory doses)<sup>(4)</sup>。

**CPE 抑制试验和病毒产量减数测定** 待培养瓶中 GPE 细胞成单层后, 每瓶接种 200 PFU 的 GPHLV-394, 37°C 吸附 1 h 后, 加含各种不同浓度的药物和 2% 小牛血清的 Eagle 培养维持液, 置 35°C 培养。在接种病毒后每天观察细胞病变 (CPE) 并于不同天取出培养液进行病毒空斑滴定: 从培养瓶中取 0.1 ml 培养维持液用 Hanks 液作  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  稀释后, 接种 24 孔 GPE 细胞单层板, 每孔 0.1 ml。37°C 吸附 1 h 后, 加甲基纤维素覆盖培养液。其余步骤同空斑减数分析。

## 结 果

FMAU, FIAU, FIAC, BVDU, ACV, PFA 对 GPHLV-394 的空斑形成抑制作用 在 6 种药物中, GPHLV-394 对 FMAU, FIAU,

BVDU 较敏感。FMAU 80 ng/ml, FIAU 100 ng/ml, BVDU 700 ng/ml 即可完全抑制 GPHLV 在 GPE 细胞中形成空斑, ID<sub>50</sub> 浓度分别是 34, 48, 189 ng/ml。GPHLV-394 对 ACV 和 PFA 相对抵抗, ID<sub>50</sub> 浓度分别是 280 和 300 μg/ml; 对 FIAC 中度敏感, ID<sub>50</sub> 浓度为 3.9 μg/ml (表 1)。比较 GPHLV-394 对 6 种药物的敏感性顺序是 FMAU > FIAU > BVDU > FIAC > ACV > PFA。

Tab 1. Inhibitory effects of 6 antiviral compounds on guinea pig herpes-like virus-394 plaque formation, n=2,  $\bar{x} \pm SD$

Drugs		Virus infectivity titers (log PFU/0.1 ml)	log plaque reduction	ID <sub>50</sub>
Control		5.5 ± 0.5	0	0
FMAU	10.0	4.9 ± 0.2	0.6	34.0
	30.0	3.3 ± 0.4	2.2	
	50.0	2.1 ± 0.1	3.4	
	80.0	0	≥ 5.5	
	100.0	0	> 5.5	
FIAU	10.0	5.3 ± 0.5	0.2	48.0
	30.0	4.3 ± 0.1	1.2	
	80.0	2.0 ± 0.0	3.5	
	100.0	0	≥ 5.5	
FIAC	0.1	5.2 ± 0.2	0.3	3.9
	1.0	3.6 ± 0.4	1.9	
	10.0	2.1 ± 0.1	3.4	
	50.0	0	≥ 5.5	
BVDU	7.0	5.8 ± 0.1	-0.3	189.0
	70.0	4.8 ± 0.1	0.7	
	200.0	1.8 ± 0.2	3.7	
	400.0	0.9 ± 1.2	4.4	
	700.0	0	≥ 5.5	
ACV	0.1	5.5 ± 0.2	0	280.0
	1.0	5.1 ± 0.1	0.3	
	10.0	5.7 ± 0.0	-0.2	
	50.0	5.3 ± 0.1	0.2	
	100.0	4.4 ± 0.0	1.1	
	500.0	2.4 ± 0.0	3.1	
PFA	0.2	5.2 ± 0.1	0.3	300.0
	2.0	4.9 ± 0.0	0.6	
	20.0	4.8 ± 0.1	0.7	
	50.0	5.3 ± 0.4	0.2	
	100.0	4.9 ± 0.0	0.6	
	500.0	2.5 ± 0.1	3.0	
	600.0	0.7 ± 0.9	4.8	

FMAU, FIAU, FIAC, BVDU, ACV, PFA 对 394 GPHLV 产量的影响 正常情况下, GPHLV-394 在感染 GPE 细胞后 d 5 产量

可达 5.0 log/0.1 ml 左右, d 7 上升为 5.5 log/0.1 ml, 其后, 基本上稳定在此水平。每 ml 培养液含 FMAU 或 FIAU 50 ng, FIAC 1  $\mu$ g, ACV 500  $\mu$ g, PFA 500  $\mu$ g 后, GPHLV-394 的繁殖完全受到抑制; 含 BVDU 70 ng 时, 病毒的繁殖十分缓慢; 含 FMAU 或 FIAU 5 ng 时, GPHLV-394 的繁殖受到严重抑制, 抑制滴度达 2.0 log 以上。该病毒对每 ml 培养液中含 FIAC 0.1  $\mu$ g, BVDU 7 ng, ACV 或 PFA 50  $\mu$ g 中度敏感, 抑制滴度达 1.0-2.0 log; 含 FMAU 或 FIAU 0.5 ng, BVDU 0.7 ng, ACV 或 PFA 5  $\mu$ g 时仅对 GPHLV-394 显示轻度抑制, 抑制滴度约 1.0 log(图 1)。然而, 在病毒感染 GPE 细胞后 d 7(PFA)和 d 9(FMAU, FIAU, BVDU, ACV, PFA), 中等药物剂量存在下的病毒产量略有回升。

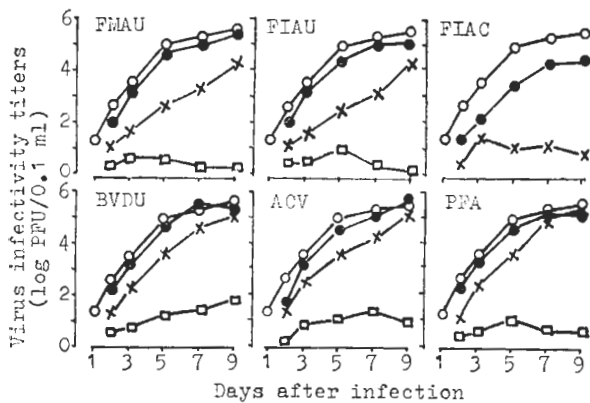


Fig 1. Effect of 6 antiviral compounds on guinea pig herpes-like virus-394 yield in guinea pig embryo cells. (○), virus control; (●), FMAU and FIAU 0.5 ng/ml, FIAC 0.1  $\mu$ g/ml, BVDU 0.7 ng/ml, ACV and PFA 5  $\mu$ g/ml; (×), FMAU and FIAU 5 ng/ml, FIAC 1.0  $\mu$ g/ml, BVDU 7 ng/ml, ACV and PFA 50  $\mu$ g/ml; (□), FMAU and FIAU 50 ng/ml, BVDU 70 ng/ml, ACV and PFA 500  $\mu$ g/ml. PFA: plaque formation unit.

FMAU, FIAU, FIAC, BVDU, ACV, PFA 对 GPHLV-394 的 CPE 抑制作用 在进行病毒产量分析的同时观察药物对 GPHLV-394 CPE 的影响显示, 在接种病毒后连续 9 d 的观察中, 大剂量 FMAU 50 ng/ml, FIAU 50

ng/ml, FIAC 1  $\mu$ g/ml, PFA 500  $\mu$ g/ml 均完全抑制病毒在 GPE 细胞中出现 CPE; BVDU 70 ng/ml 完全抑制病毒在 GPE 细胞中出现 CPE 达 8 d; ACV 500  $\mu$ g/ml 可完全抑制 CPE 出现达 5 d, 以后 CPE 范围稳定在 25%(+)以下。在病毒 CPE 被抑制过程中, GPE 细胞形态正常, 无细胞单层脱落现象。小剂量药物(每 ml 维持液含 FMAU 或 FIAU 0.5 ng, BVDU 0.7 ng, ACV 5  $\mu$ g)可使病毒 CPE 的出现稍推迟, 接种病毒后 5 d 内的 CPE 范围均比病毒对照略低 25%(即低 1 个+)。但 PFA 5  $\mu$ g/ml 对 d 4-5 的 CPE 不显示任何抑制作用。中剂量药物对 GPHLV-394 的 CPE 抑制作用见表 2。

Tab 2. Inhibition of 6 antiviral compounds on guinea pig herpes-like virus-394 cytopathic effect.

Drugs	$\mu$ g/ml	Days after infection								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	-	0	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
FMAU	0.005	0	0	±	+	+	+	+	++	++
FIAU	0.005	0	0	±	+	+	+	+	++	++
FIAC	0.1	0	0	±	+	+	++	++	+++	+++
BVDU	0.007	0	±	+	+	++	+++	+++	+++	+++
ACV	50.0	0	0	+	+	+	++	+++	+++	+++
PFA	50.0	0	0	+	+	+	++	+++	+++	+++

## 讨 论

本文报告了 5 种核苷类衍生物和 1 种非核苷类衍生物的抗 GPHLV 作用。其中, 以 3 种尿核苷类衍生物的抑制能力最强。同 HSV-2 对 FMAU 和 FIAU 的敏感性相比较, GPHLV-394 对 FMAU 和 FIAU 的敏感性比 HSV-2 高 2-3 倍<sup>(6)</sup>。这说明尿核苷类衍生物在 GPHLV-394 DNA 合成中的参入能力可能远较 FIAC 和 ACV 强, 或者是病毒胸苷激酶(TK 酶)对尿核苷类衍生物较 FIAC 和 ACV 更容易磷酸化成二磷酸和三磷酸衍生物的结果, 因为这 5 种核苷类衍生物在抗疱疹病毒作用中均有病毒 TK 酶的磷酸化过程<sup>(5-8)</sup>。然而, 鉴于 GPHLV-394 对 ACV 的高度耐受性, 提示该病毒可能不含或很少含有 TK 酶。因此, 其病毒 TK 酶磷酸化

过程事实上可能不存在。PFA 是一种病毒 DNA 多聚酶抑制剂，其抗 GPHLV 的  $ID_{50}$  浓度比文献上报道的抗 HSV  $ID_{50}$  浓度<sup>(6)</sup>高 20 倍。有关这些药物的确切抗 GPHLV 的作用机理有待探讨。

上述 6 种药物，先前曾多次用于体外抗 HSV 的研究<sup>(5,7)</sup>，在有效的抗病毒药物浓度下未见明显的细胞毒性作用。本次实验中，每种药物的最大剂量可完全抑制 GPHLV 的 CPE 作用，但未见有任何 GPE 细胞形态学的改变或细胞单层脱落现象，故可排除药物对病毒的抑制作用是由于细胞的药物毒性的结果。上述药物对原代兔肾细胞的毒性，FIAC 对 PRK 细胞形态学影响的  $ID_{50}$  浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，其余药物对 PRK 细胞的  $ID_{50}$  毒性作用均在 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上<sup>(6)</sup>。

采用 3 种检测方法还显示，3 种方法各有优缺点。空斑减数法是一种敏感的抗病毒药物筛选方法，结果准确，可靠，可观察药物对病毒空斑形成能力的影响，但对不具有空斑形成能力的某些病毒而言，此方法不适用。产量减数法是一种较为复杂的而又最敏感的抗病毒药物筛选法，结果精确，通过测定在药物存在下的病毒量，可以从中了解药物对病毒复制能力的作用。CPE 抑制法是一种较为简单敏感的方法，可以了解药物对病毒致细胞病变作用的影响，但在判断 CPE 强度时其准确性可受观

察者经验之多少的干扰。虽然 3 种检测方法均表明不同药物对 GPHLV-394 的抑制作用大小有别，但均以尿核苷类衍生物的抑制作用最强。

### 参 考 文 献

- 1 郑志明. 从实验性单纯疱疹病毒 2 型感染的 Hartley 豚鼠中分离出潜伏的内源性豚鼠疱疹样病毒. 微生物学报 1985; 25 : 366
- 2 郑志明、向近敏. 单纯疱疹病毒生物学和生物化学的分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志 1984; 4 : 352
- 3 Zheng ZM, Mayo DR, Hsiung GD. Comparison of biological, biochemical, immunological, and immunochemical techniques for typing herpes simplex virus isolates. *J Clin Microbiol* 1983; 17 : 396
- 4 Crumpacker CS, Schnipper LE, Kowalsky PN, Sherman DM. Resistance of herpes simplex virus to adenine arabinoside and E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine: A physical analysis. *J Infect Dis* 1982; 146 : 167
- 5 Mayo DR, Hsiung GD. Treatment of primary acute genital herpes in guinea pigs by intraperitoneal administration of fluoropyrimidines. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26 : 354
- 6 De Clercq E, Descamps J, Verhelst G, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J Infect Dis* 1980; 141 : 563
- 7 Zheng ZM, Mayo DR, Fong CKY, Winship T, Hsiung GD. Antiviral activity of CP-20, 961 against herpes simplex viruses *in vitro*. *Intervirology* 1985; 23 : 44

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Mar, 9 (2) : 166-170

## Efficacies of six antiviral compounds against guinea pig herpes-like virus *in vitro*

ZHENG Zhi-Ming (Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan 430071)

**ABSTRACT** Efficacies of FMAU (2'-fluoro-5-methylarauracil), FIAU (2'-fluoro-5-iodoarauracil), FIAC (2'-fluoro-5-iodoacytosine), BVDU [E-5-(2-bromovinyl)-2'-

deoxyuridine], ACV (acyclovir), and PFA (trisodium phosphonoformate) against guinea pig herpes-like virus-394 (GPHLV-394) were studied by using plaque reduction, yield

reduction, and cytopathic effect (CPE) inhibition assay. The results of the studies performed in primary guinea pig embryo cell cultures showed that FMAU, FIAU, and BVDU inhibited GPHLV-394 with the corresponding  $ID_{50}$  of 34, 48, and 189 ng/ml, respectively, whereas the  $ID_{50}$  of FIAC, ACV, PFA were 3.9, 280, and 300  $\mu$ g/ml, respectively. Yield reduction assays were

more sensitive than plaque reduction in the antiviral assays and the multiplication curve of GPHLV-394 was defected in the presence of drugs.

**KEY WORDS** arabinofuranosyluracil; cytarabine; bromodeoxyuridine; acyclovir; herpesvirus infections; tissue culture

\* \* \* \* \*