

酞丁安类似物抗单纯疱疹病毒活性的比较研究[△]

尹明标 高雅君 夏丽娟 柳元元 王 琳*

陈 明* 杨惠民* 赵知中*

(中国预防医学科学院病毒研究所, 北京; *中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 酞丁安对 HSV-1 与 HSV-2 具有明显的抑制作用。修饰酞丁安结构, 合成了 14 种酞丁安类似物, 并对这些类似物的抗病毒活性与细胞毒性进行了研究。在 14 种酞丁安类似物中, 有 6 种具有抗单纯疱疹病毒活性。但用非洲绿猴肾细胞进行空斑抑制测定, 仅有一种酞丁安类似物 V8540 对 HSV-2 具有强烈的抑制作用, 其抗 HSV-2 活性较酞丁安高 10 倍左右。酞丁安类似物抗 HSV 活性的次序为: V 8540 > V 8512 > V 8509 > V 8502 > V 8501 > V 8519。其它酞丁安类似物抗单纯疱疹病毒活性很低或完全没有活性。用 Vero 细胞检测各种酞丁安类似物的细胞毒性, 结果证明, V 8540 的细胞毒性较酞丁安高。大量快速增殖的 Vero 细胞在 V. 8540 作用下停止了生长。

关键词 酞丁安(3-邻苯二甲酰亚胺-2-氧-正丁醛-双缩氨硫脲); 单纯疱疹病毒 II 型; 非洲绿猴肾细胞; 药物抑制测定; 细胞生长抑制测定

酞丁安系药物研究所设计合成的一种新抗病毒化合物⁽¹⁾。实验室研究证明, 酞丁安对单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)与 II 型(HSV-2)在细胞培养内的复制具有明显的抑制作用⁽²⁾。该化合物治疗皮肤单纯疱疹病毒感染与生殖器疣(尖锐湿疣)也有良好的疗效^(3~5)。目前, 酞丁安栓剂正试用于宫颈间变患者的治疗, 以探索宫颈癌症前化学阻断的途径。但由于该化合物水溶性低, 限制了它的广泛应用。为了寻找水溶性较高的化合物, 对酞丁安的结构进行了修饰, 合成了多种酞丁安类似物, 检测其抗疱疹病毒作用, 希望能从中选出水溶性较高, 抗病毒作用更强的抗病毒化合物, 并通过其结构的比较, 探索酞丁安抗病毒作用的分子基础。现将初步研究结果报道如下。

材 料 与 方 法

细胞与病毒 Vero 细胞(非洲绿猴肾传代细胞)在 CO₂ 孵箱内培养, 用于抗病毒活性测定。单纯疱疹病毒 I 型(KOS 株)及单纯疱疹病毒 II 型(333 株)由美国 Rapp 实验室引进。病毒空斑滴定参照文献(6)方法进行。

药物与试剂 酞丁安先溶于二甲基亚砜(DMSO), 然后依据所需浓度加入培养液内。14 种酞丁安类似物均由中国医学科学院药物研究所合成, 按修饰酞丁安结构的不同部位, 分为 4 组。其它试剂均为分析纯。

药物抑制测定 IC₅₀ 测定参照文献(7), 并作适当修改, 简述如下: Vero 细胞在 CO₂ 孵箱培养成单层后, 每孔接种 40~60 空斑形成单位的 HSV-2。吸附 1 h 后, 更换含 0.5% 甲基纤维素及 2% 小牛血清的维持液, 加入适当浓度的酞丁安或酞丁安类似物。继续在 CO₂ 孵

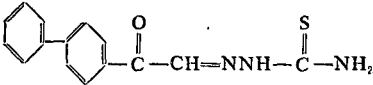
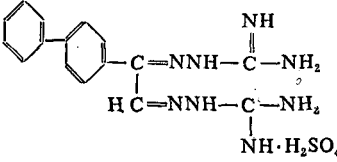
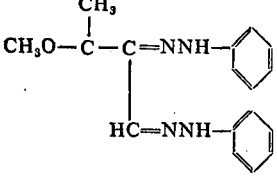
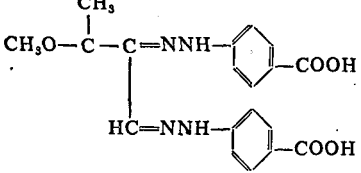
本文于 1985 年 12 月 18 日收到。

[△] 中国科学院科学基金资助的课题。

(四) 其它酞丁安类似物抗 HSV-2 活性的研究

同时在邻苯二甲酰亚胺与缩氨基硫脲结构上修饰多个基团, 分别合成 5 种酞丁安类似物 V 8502, V 8512, V 8505, V 8509 及 V 8510。其中有三种类似物 V 8502, V 8512 及 V 8509 表现一定的抗 HSV-2 活性, 而其余 2 种酞丁安类似物完全无 HSV-2 活性(表 4)。

Tab 4. Inhibitory effects of two mono-thiosemicarbazones and three other types of TDA analogs on plaque formation by HSV-2 in Vero cells. ($\bar{X} \pm SD$)

Chemical structure of compounds	IC ₅₀ (μg/ml)	ID ₅₀ (μg/ml)
V8502 $C_6H_5-CH=CH-CH=NNH-C(=S)-NH_2$	6.0±1.0	15.9±2.1
V8512 	3.5±0.8	8.3±1.5
V8505 	>10	
V8509 	3.6±1.0	4.6±6.7
V8510 	>100	

Legend is the same as Tab 1.

(五) 酞丁安类似物对生长迅速的 Vero 细胞抑制效应的研究

6 种表现有抗 HSV-2 活性的酞丁安类似物, 加入生长迅速的 Vero 细胞生长液内, 培养 72 h, 计算细胞增殖的抑制百分率及 50% 抑制浓度(表 2~4), 结果表明, 对 HSV-2 表现强烈抑制作用的 V 8540, 对生长旺盛的 Vero 细胞增殖也具有很强的抑制作用。

讨 论

近年来我们实验室的工作证明, 酞丁安对单纯疱疹病毒 I 型与 II 型具有明显的抑制作用, 酞丁安抑制 HSV-2 DNA 与蛋白质合成^[9, 10], 但对 HSV-2 DNA 聚合酶活性无影响^[11]。进一步研究还发现, 酞丁安抑制 HSV-2 早期蛋白质合成, 而对晚期蛋白质合成无明显影响^[12]。HSV 早期蛋白质包含与 DNA 合成有关的酶, 因此酞丁安抑制 HSV-2 DNA 合成, 可能与抑制 DNA 合成有关的酶有关。本实验介绍了 14 种合成的酞丁安类似物结构及其与抗 HSV 活性之间关系的研究, 实验结果表明, 酞丁安的邻苯二甲酰亚胺被氢及烷氧基等基团替代,

其它结构保持不变, 抗病毒活性完全丧失。酞丁安的双缩氨基硫脲被修饰为单缩氨基硫脲, 其它结构保持不变, 抗单纯疱疹病毒活性也完全丧失。保持酞丁安的双缩氨基硫脲结构, 仅修饰其上的 $-NH_2$ 基或 $=S$ 基, 例如用 $=O$ 替换 $=S$, 或用 $-CH_3$ 替代双缩氨基硫脲上的末端 $-NH_2$ 上的一个氢原子, 抗病毒活性完全丧失, 但用 $-C_6H_5$ 替换 $-NH_2$ 基上的一个氢原子, 不仅保持抗 HSV-2 活性, 而且较酞丁安原有结构抗 HSV-2 活性强 10 倍左右。同时在邻苯二甲酰亚胺与缩氨基硫脲上修饰多个基团, 也发现有些类似物具有一定的抗 HSV-2 活性。上述实验结果提示, 保持酞丁安的邻苯二甲酰亚胺及双缩氨基硫脲基本结构, 对于它的抗病毒活性可能是重要的, 很可能 HSV 早期蛋白质合成有关的酶受这种结构影响。局部修饰某些基团对抗病毒作用也有明显的影响, 例如用 $=O$ 替代缩氨基硫脲上的 $=S$, 抗病毒作用完全丧失, 说明 $=S$ 在化合物-酶的结合过程中起着重要的作用。有时修饰较多的基团, 结构与空间构型变化较大, 偶而也可能筛选出一些具有抗病毒作用的化合物, 但它们与酞丁安可能是不同的作用机制。例如抗痘病毒的化合物靛红- β -缩氨基硫脲(isatin- β -thiosemicarbazone) 不抑制病毒 DNA 合成, 主要抑制晚期生长^[13]。另一种具有抗病毒作用的缩氨基硫脲类化合物 SK & F 21681 则主要抑制 HSV DNA 合成, 而病毒蛋白质合成几乎不受影响^[14]。酞丁安不仅抑制病毒 DNA 合成, 也抑制病毒蛋白质合成, 主要抑制早期蛋白质合成, 可见三种不同的缩氨基硫脲类化合物, 它们的抗病毒作用机理可能是不同的, 这与化合物的结构与空间构型可能有一定的关系。本实验进行的结构与抗病毒活性之间关系的研究支持这一看法。

本实验筛选的某些酞丁安类似物, 例如 V8540 有较高的抗病毒活性, 可溶于乙醇溶液中, 这些性质较酞丁安有优越性, 但其缺点是细胞毒性较大。然而本实验所获得的结果, 为进一步设计新的酞丁安类似物提供了许多启示。

参 考 文 献

1. 赵知中等. 酞丁安的合成研究. 化学学报 1980;38:67.
2. 尹明标等. 酞丁安对单纯疱疹病毒在细胞培养内复制的影响. 药学学报 1984;19:387.
3. 朱钵等. 酞丁安治疗尖锐湿疣 12 例报告. 临床皮肤科杂志 1982;4:173.
4. 袁兆庄等. 关于酞丁安治疗病毒性皮肤病的报告. 全国皮科学术会议论文汇编 1982;140.
5. 陈鸿珊等. 酞丁安制剂对豚鼠皮肤单纯疱疹病毒感染的作用. 药学学报 1986;21:241.
6. Schinazi RF, et al. Effect of combinations of acyclovir with vidarabine or its 5'-monophosphate on HSV in cell culture and in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:499.
7. Ninomiya Y, et al. Comparative studies on the mode of action of the antirhinovirus agents Ro 09-0410, Ro 09-0179, 731, 4'6-dichloroflavan and enviroxime. *Ibid* 1985;27:595.
8. Ayisi NK, et al. Comparison of the antiviral effects of 5-methoxymethyldeoxyuridine-5'-monophosphate with adenine arabinoside-5'-monophosphate. *Antiviral Res* 1983;3:161.
9. 尹明标等. 酞丁安对 HSV-2 DNA 与蛋白质合成的抑制作用. 中华医学杂志 1985;65:587.
10. 尹明标等. 核酸杂交法检测 3 种化合物对 HSV-2 DNA 合成的影响. 病毒学报 1986;2:21.
11. 尹明标等. 单纯疱疹病毒 II 型 DNA 聚合酶的纯化及其性质的研究. 中国医学科学院学报 1984;6:330.
12. 尹明标等. 酞丁安对 HSV-2 早期与晚期蛋白质合成的影响. 待发表.
13. Woodson B and WR Joklik. The inhibition of viral multiplication by isatin-thiosemicarbazone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;54:946.
14. Katz E and E Margalith. Antiviral activity of SK & F 21681 against herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:195.

COMPARATIVE STUDIES ON ANTIVIRAL ACTIVITY OF SEVERAL TDA ANALOGS AGAINST HSV-2[△]

YIN Ming-Biao, GAO Ya-Jun, XIA Li-Juan, LIU, Yuan-Yuan, WANG Lin,*
CHEN Ming,* YANG Hui-Min* and ZHAO Zhi-Zhong*

*(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medical Sciences; *Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)*

ABSTRACT Fourteen TDA analogs were synthesized and their antiviral and cytotoxic activities examined. Among the 14 TDA analogs 6 were found to be effective against HSV-2. Of the 6 compounds V8540 was shown to be most potent inhibitor of HSV-2 in a plaque inhibition assay in Vero cells. It is approximately 10 times more active against HSV-2 than TDA. The following order of decreasing activity against HSV-2 in Vero cells was found: V8540 > V8512 > V8509 > V8502 > V8501 > V8519. The other compounds were less effective or inactive. The cytotoxic activity of the analogs was also determined using Vero cells. The results indicate that the toxic effects of V8540 were higher than those of TDA. A large number of rapidly proliferating Vero cells exposed to V8540 stopped growing.

Key words TDA (3-phthalimido-2-oxo-butylaldehyde-bis-thiosemicarbazone); Herpes Simplex Virus type 2; African green monkey kidney (Vero) cells; Drug inhibition assay; Inhibition assay of cell growth

[△] Projects Supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences