

鼠的肌肉和肝脏,胰岛素受体底物 IRS-2 和 IRS-2 的酪氨酸磷酸化及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)的活化比正常鼠明显增强,Akt 的磷酸化和 Akt 激酶的活化则明显减弱。当应用 T-1095 使血糖正常时,胰岛素受体、PI3K 和 Akt 的活化通路恢复正常。这些研究表明,持续高血糖可使 PI3K 到 Akt 激酶的活化步骤减慢,这是高血糖诱导胰岛素抵抗的分子机制。噻唑烷二酮(thiazolidinedione)作为胰岛素增敏剂,被报道可增强胰岛素上游相关信号分子的活性,如 IRS-1/2 和 PI3K,这些药物可能用于治疗高血糖诱导的胰岛素抵抗无效,因此认为 T-1095 是唯一可改善高血糖诱导胰岛素抵抗的药物。

6 SGLT 抑制剂对糖尿病并发症的可能疗效

糖尿病的微血管和大血管并发症是对患者健康的主要威胁,临床和流行病学资料显示,糖尿病患者血糖增高的数值和持续时间与并发症的危险呈密切相关,其他因素,如年龄、性别、高血压、遗传因素及吸烟等也与糖尿病并发症的病理改变有关。

大量临床试验表明,血糖的控制有助于防止糖尿病并发症的发生和加重。SGLT 抑制剂本身不仅对肾脏无损害,而且可能对防止糖尿病肾病有益。对于糖尿病其他并发症,如糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变及动脉粥样硬化的预防效果尚未阐明。尽管仍需进一步研究,SGLT 抑制剂在预防糖尿病并发症方面可能比其他抗糖尿病药物更有效。

7 结语

新近开发的口服 SGLT 抑制剂通过尿糖的增加改善了高血糖症。一系列糖尿病动物实验证实,该药不仅降低了血浆葡萄糖的浓度,而且使胰岛素抵抗恢复正常并防止胰腺 β 细胞的损伤。此外,SGLT 抑制剂还可能有效预防糖尿病并发症。除抗糖尿病作用外,持续抑制 SGLT 活性是否有其他的疗效或副作用仍在探索之中。初步的动物实验结果显示,持续应用 T-1095 治疗既不诱导 SGLT 的代偿性过表达,也无肾脏毒性,在未来的临床试验中仍需进一步证实。

抗流感病毒药物的研究进展

刘 颂综述 王京燕审校

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘要: 流感是流感病毒引起的急性呼吸道传染病。由于抗原变异频繁,疫苗的预防效果不理想,所以,抗流感病毒药物研究显得更加重要。目前,离子通道阻断剂和神经氨酸酶抑制剂正式应用于临床,但有耐药性和部分不良反应;流感病毒吸附抑制剂、细胞-病毒膜融合抑制剂和反义寡核苷酸正处于实验室研究阶段,在体内外实验中有良好的抗病毒活性;RNA 干扰在抗流感病毒方面具有诸多优势,已有实验证实小干扰 RNA 具有抑制流感病毒作用,可能成为新一代抗流感病毒药物。

关键词: 流感病毒;离子通道阻断剂;神经氨酸酶抑制剂;流感病毒吸附抑制剂;细胞-病毒膜融合抑制剂;反义寡核苷酸;RNA 干扰

中图分类号: R978.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2005)02-0111-05

流感是流感病毒引起的急性呼吸道传染病。在历史上,曾发生过多次世界范围的流感大流行,其中以 1918 年的流感流行最为严重,其死亡人数达到 2 000 多万,且死亡者多数为 15~45 岁的青壮年^[1]。目前,流感的威胁依然存在,据统计,全世界平均每年有 50~100 万人死于流感。WHO 早在 1948 年就

已启动了流感计划,并已经在全世界 83 个国家建立了 111 个国家研究中心和 4 个协作中心,对流感病毒进行样本收集、检测和研究。尽管如此,科学家们仍然希望用 5 年时间投入 4 500 万美元建立一个全球实验室来研究流感^[2]。由此可见,流感作为一种病毒性传染病不仅严重威胁着公众健康,而且给国家和社会带来了沉重的经济负担。

流感病毒属于正粘病毒科。根据病毒核蛋白

(NP)和基质蛋白抗原性的差异,可分为甲(A)型、乙(B)型、丙(C)型3种;又根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的抗原性将其分成不同的亚型(HxNy)。从流感流行的历史资料分析,乙型和丙型流感病毒抗原性比较稳定;甲型流感病毒的表面抗原HA和NA则较易发生变异。目前,在人群中流行的流感病毒亚型为H1N1和H3N2。

由于流感病毒的抗原变异能力强,加之个体免疫力的不同,疫苗的保护率并不高,况且,疫苗只对已知的流感病毒亚型有预防作用,而对于由抗原性漂移或抗原性转换所产生的新型流感病毒无效。因此,抗流感病毒药物研究显得更加重要和紧迫。

1 抗流感病毒药物

目前,正式上市的抗流感药物大体分为两类:(1)以20世纪60年代中期发现的金刚烷胺(amantadine)为代表,只对甲型流感病毒有预防和治疗作用,属于离子通道阻断剂;(2)NA抑制剂,对甲型和乙型流感病毒均有效。另外,以流感病毒复制过程的不同环节为靶点,还有一些药物正处于实验室研究或临床试验阶段。

1.1 离子通道阻断剂

此类药物以流感病毒基质蛋白-2为作用靶点,通过阻断H⁺通道来抑制流感病毒复制,所以被称为离子通道阻断剂,包括金刚烷胺和金刚乙胺(ri-mantadine)。基质蛋白-2是流感病毒包膜上的一个跨膜蛋白,具有H⁺通道活性。它是一个由97个氨基酸残基组成的同源四聚体,其结构分为膜外区、跨膜区和膜内区3部分。其中跨膜区由4个几乎完全一致的 α 螺旋组成H⁺通道,病毒包膜低电解质环境迫使 α 螺旋间的氢键具有相同的几何构象,从而最大限度地降低了亲水肽链在膜外的暴露。特定的条件使得基质蛋白-2被充分地限制在病毒包膜中,同时保持了良好的结构和功能^[3]。实验证明,流感病毒基质蛋白-2在病毒脱衣壳和成熟过程中起重要作用^[4]。在流感病毒感染细胞早期,病毒吸附到细胞表面含唾液酸的糖蛋白受体上,通过受体介导的内吞作用进入细胞,形成核内体(endosome)。此时,基质蛋白-2被激活并打开,H⁺进入病毒内使pH降低,核内体的酸化引起HA构象变化,介导病毒包膜与核内体膜融合。同时,病毒颗粒内也发生酸化,导致病毒核衣壳与基质蛋白-1之间解离,为病毒基因组进入感染细胞核提供了必要条件。在病毒感染细

胞晚期,基质蛋白-2的H⁺通道活性可以升高高尔基复合体内的H⁺浓度,使流感病毒膜蛋白HA形成高pH构象,从而使新生的病毒具有感染性。

离子通道阻断剂金刚烷胺(1966年上市)及其衍生物金刚乙胺(1987年上市)有抗流感病毒作用。实验发现,金刚烷胺能够与质子竞争结合基质蛋白-2^[5],结合部位在距离脂质双层膜中心0.5 nm处的Val 27和Ser 31中间的特定区域内,从而影响基质蛋白-2的活性,阻断H⁺通道的作用,抑制流感病毒的复制,发挥预防和治疗作用。

从正式获准上市至今,金刚烷胺和金刚乙胺已在临床应用多年。最近,Jefferson等^[6]通过多种渠道对这些临床应用的数据和资料进行了系统的收集、整理和统计,并对这两种药物的有效性和安全性进行了评价。结果表明,金刚烷胺对流感样疾病(influenza-like illness, ILI)和甲型流感的保护率分别为25%和61%,并且能够使发热持续时间减少1 d。金刚乙胺有相似的疗效,但其预防作用与安慰剂或其他方法相比并无显著性差异。同时,研究结果显示,金刚烷胺和金刚乙胺均可引起明显的胃肠道不良反应;金刚烷胺与金刚乙胺相比,产生中枢神经毒副作用和学习能力减退更为常见。

另外,此类药物容易产生耐药和交叉耐药,这与基质蛋白-2基因序列中单个核苷酸发生突变有关。临床试验表明,应用金刚烷胺后基质蛋白-2跨膜区中的四个氨基酸位点26, 27, 30和31最易产生突变^[7]。并且,不同病毒亚型突变位点与频率不同:H3N2亚型常在31位发生突变(丝氨酸→天冬酰胺),而H1N1亚型则在27位发生突变(缬氨酸→丙氨酸);前者的突变频率高于后者。最近, Astrahan等^[8]发现,流感病毒可以通过增大离子通道口径的办法,使药物虽然能够与基质蛋白-2结合却不能完全封闭离子转运,从而产生耐药性。

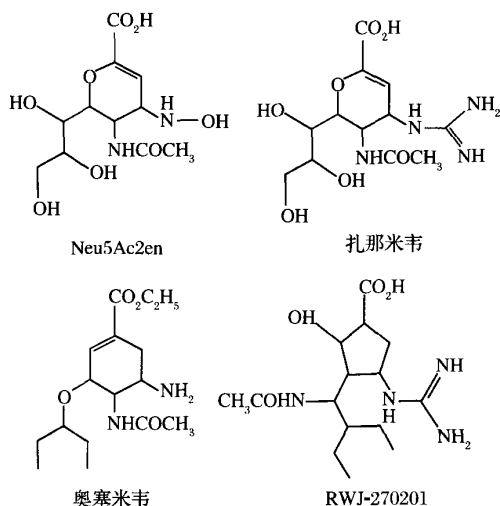
1.2 神经氨酸酶抑制剂

NA是流感病毒包膜上重要的糖蛋白,由4个亚基组成四聚体。主要结构包括胞浆尾部、跨膜区、杆部和球状头部4部分。其中头部具有水解酶活性,可水解感染细胞表面糖蛋白末端的神经氨酸与相邻糖基的 α -糖苷键,切除病毒表面和感染细胞表面的唾液酸,一方面破坏了细胞膜上的病毒特异性受体,使病毒从感染细胞膜上释放;另一方面,可以防止新生病毒的自身凝集,允许病毒扩散并增强其感染能力。此外,NA还可促进病毒从呼吸道粘液向周围组

织扩散。

NA 在流感病毒复制和传播中发挥重要作用, 并且其活性中心的氨基酸组成高度保守, 因此, 以 NA 为靶点开发选择性抑制剂具有非常重要的意义。

最初设计的 Neu5Ac2en 是神经氨酸的脱水衍生物, 它从分子构象上模拟了 NA 催化反应过程中的作用物过渡态, 因此, 可以与 NA 结合并抑制其酶活性。后来, 为了增强 Neu5Ac2en 和酶活性中心的相互作用, 研究人员对 Neu5Ac2en 的结构进行了改造: (1) 以胍基取代 4 位碳原子上的羟基, 得到扎那米韦 (zanamivir, GG167, Relenza); (2) 应用一个环己烷及用亲脂性侧链取代极性丙三醇, 得到奥塞米韦 (oseltamivir, GS4104, Tamiflu)^[9]。目前, 扎那米韦和奥塞米韦是在美国仅有的获准上市的 NA 抑制剂。另外, 带有一个胍基基团和亲脂性侧链的环戊烷衍生物 RWJ-270201 (BCX-1812) 正处于 II 期临床试验阶段。研究发现, 它对于对扎那米韦和奥塞米韦已产生耐药性的甲型和乙型流感病毒变异体有抑制作用, 有望成为第三个获准上市的 NA 抑制剂^[10]。



NA 抑制剂对甲型和乙型流感病毒均有抑制作用。它们能够与病毒的 NA 特异性结合, 阻断该酶的活性, 使病毒不能轻易地从感染细胞表面释放, 促进病毒凝集, 阻止病毒进一步扩散, 从而发挥抗流感作用。扎那米韦和奥塞米韦已经在临床应用中显示了良好的治疗作用。最近的一些临床试验结果表明, 与安慰剂相比, 扎那米韦和奥塞米韦可以显著地减少流感急性症状的持续时间 1 ~ 2.5 d (依不同亚型而异), 使并发症发生率降低 50% ~ 70%, 使患者提前 1 ~ 3 d 恢复正常活动能力^[11]。并且, 多数试验

显示, 发病后越早给药, 治疗效果越明显。

与离子通道阻断剂相类似, 由于 NA 抑制剂在人群中的广泛应用, 使得流感病毒产生了一定程度的耐药性。体外实验结果表明, NA 和 HA 均能影响病毒对此类药物的易感性^[12]。病毒 NA 主要通过其活性位点中单个氨基酸残基的改变产生耐药性, 而 HA 则通过其受体结合位点处氨基酸的组成、寡糖链的位置和数量等因素的改变来影响病毒的易感性。由于病毒耐药机制的复杂性和实验条件的限制, 对于这方面的研究还有待深入。

1.3 以血凝素为靶点的抗流感药物

HA 是位于流感病毒表面的一个重要糖蛋白, 在转录后首先表达为无活性的前体 HA0, 然后经过蛋白酶催化水解为两个有活性的多肽亚单位 HA1 和 HA2。实验证实, HA1 介导病毒与感染细胞受体上唾液酸之间的吸附作用; HA2 引导病毒包膜和核内体膜的融合。目前, 以 HA1 和 HA2 为靶点, 已经发现了一些有抗流感病毒活性的化合物。

1.3.1 流感病毒吸附抑制剂 已知流感病毒 HA1 链远端球状头部上的抗原表位可以识别和多价结合细胞表面受体上的唾液酸, 介导病毒的吸附。唾液酸类似物可以诱使 HA1 链上的受体结合位点与之结合, 从而干扰或阻断病毒的吸附作用^[13]。研究表明, 单价的唾液酸类似物不能有效地与靶细胞上的多价受体竞争结合流感病毒, 因此, 为了提高抗病毒作用, 研究人员通过多种方法设计合成了二价和多价唾液酸类似物 (包括唾液酸糖苷脂质体、唾液酸糖苷多聚物和树突状唾液酸类似物)。Reuter 等^[14]对多价唾液酸类似物的研究表明, 结构和形状对此类药物的作用效果有明显影响。他们对线形、球形和树突状等几种不同形状的多聚物分别进行了抗流感病毒的体外实验, 结果显示, 树突状唾液酸类似物的作用效果最佳, 并且, 在治疗水平无细胞毒作用。

1.3.2 细胞-病毒膜融合抑制剂 流感病毒与核内体膜发生融合是病毒基因组进入细胞并进行复制的关键步骤。研究表明, 流感病毒 HA2 链在核内体 pH 降至 5 左右时发生构象变化, N 端的融合肽暴露并插入核内体膜中, 引导两者的膜融合。目前文献报道的流感病毒膜融合抑制剂多数是通过抑制低 pH 诱导的 HA 构象变化发挥抗病毒作用, 其中代表性药物是 Stachyflin^[15]。体外实验证实, 此化合物能够稳定 HA 在中性 pH 条件下的构象。另外, Stachyflin 只对流感病毒 H1 和 H2 两个亚型有效, 而对 H3

和 B 型流感病毒无抑制作用,具有亚型特异性。

1.4 反义寡核苷酸

反义寡核苷酸(ODN)作为一种研究工具,已经被广泛应用于特异性抑制基因表达,并作为潜在的治疗药物在艾滋病、癌症、流感、单纯疱疹及其他疾病的研究中占有重要地位。在应用 ODN 对流感病毒基因组中的四个不同基因 PB1, PB2, PA 和 NP 进行抑制的研究中发现:(1)脂质体包裹的硫代磷酸酯类反义寡核苷酸(S-ODN)对 PB2 的起始密码子 AUG 有较高的抑制作用,而对 PB1 的抑制作用相对较弱;(2)脂质体包裹的 S-ODN 比自由寡核苷酸显示了更高的抑制活性和序列特异性^[16]。另外,研究人员还将针对流感病毒 PB2-AUG 和 PA-AUG 的两种 S-ODN 静脉注射给甲型流感病毒感染的小鼠,结果显示,针对流感病毒 PB2-AUG 的一段寡核苷酸显著地延长了小鼠的平均存活时间,提高了存活率,并具有剂量依赖性。这是第一次在体内实验中应用 ODN 治疗流感获得成功,为 ODN 在流感治疗中的应用带来了新的希望。

1.5 RNA 干扰在预防和治疗流感中的前景

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA(dsRNA)介导的序列特异性转录后基因沉默现象,并且是一种在进化上高度保守的免疫防御机制。RNAi 作为抑制流感病毒感染的理想方法主要有以下几个原因:(1)流感病毒为 RNA 病毒,在病毒整个生命周期中除 mRNA 外,病毒颗粒 RNA(virion RNA)和互补 RNA(complementary RNA)均可以作为小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)作用的靶点;(2)由于流感病毒基因组分片段编码不同的病毒蛋白,每一种蛋白在病毒的生命周期中都发挥重要作用,因此,可以同时抑制一个或多个病毒基因片段,从而更好地防止耐药病毒的产生;(3)siRNA 可以通过吸入的方式给药,不仅使用方便,而且可以增加其在感染部位的药物浓度。并且,由于感染早期病毒数量小,充足的 siRNA 可以更为有效地抑制病毒的复制,从而起到预防和治疗的效果;④RNAi 与流感疫苗不同,不需要使用者具有健全的免疫系统,因此,对于年老或免疫缺陷病人也可使用。基于上述认识,Ge 等^[17]针对流感病毒的不同基因设计了 20 个 siRNA,结果提示以 NP 和 PA 基因为靶点的 siRNA 对流感病毒感染有抑制作用。另外,Bertrand 等^[18]的研究表明,与 ODN 相比,siRNA 的抗流感病毒作用更为有效和持久。

2 结语

流感作为严重危害公众健康的病毒性传染病,始终伴随着人们的生活。虽然已知的流感病毒已经得到控制,但是,由于流感病毒的抗原变异能力极强且相当频繁,疫苗的研制和生产相对滞后,对于易感人群的保护率不高,因此,新的流感大流行随时都有可能爆发。在这种情况下,寻找具有预防和治疗作用的抗流感药物就显得尤为重要和紧迫。

目前,抗流感病毒的药物研究已取得初步成果,已有离子通道阻断剂和 NA 抑制剂两大类四种药物在国外正式上市,某些药物正处于临床试验阶段,有望在未来几年内获准在临床上使用。但是,由于现有药物在临床上的广泛应用,使得流感病毒发生变异,对这些药物产生了不同程度的耐药性,离子通道阻断剂更是存在对 B 型流感病毒无效和神经毒性等缺陷,因此,对现有药物进行结构改造并寻找新的药物作用靶点是今后的主要发展方向。流感病毒吸附抑制剂、细胞-病毒膜融合抑制剂和 ODN 在这方面做出了有益的尝试,并且在体内和体外实验中均表现出了一定的抗病毒活性,能否进入临床应用,还有待于进一步的研究。RNAi 是近几年新兴起的研究热点,由于其特异性高,安全性好,在抗病毒研究领域具有良好的应用前景,并已有实验证实 siRNA 具有抑制流感病毒作用,如果在理论和技术上加以完善,可能成为新一代的抗流感病毒药物。

参考文献

- [1] Holmes EC. Virology. 1918 and all that [J]. *Science*, 2004, 303(5665):1787 - 1788.
- [2] Layne SP, Beugelsdijk TJ, Patel CK, et al. A global lab against influenza [J]. *Science*, 2001, 293(5536):1729.
- [3] Wang J, Kim S, Kovacs F, et al. Structure of the transmembrane region of the M2 protein H⁺ channel [J]. *Protein Sci*, 2001, 10(11):2241 - 2250.
- [4] Kelly ML, Cook JA, Brown-Augsburger P, et al. Demonstrating the intrinsic ion channel activity of virally encoded proteins [J]. *FEBS Lett*, 2003, 552(1):61 - 67.
- [5] Salom D, Hill BR, Lear JD, et al. pH-Dependent tetramerization and amantadine binding of the transmembrane helix of M2 from the influenza A virus [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(46):14160 - 14170.
- [6] Jefferson T, Deeks J, Demicheli V, et al. Amantadine and rimantadine for preventing and treating influenza A in adults [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, (3):CD001169.

- [7] Saito R, Sakai T, Sato I, *et al.* Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring co-circulation of H1N1 and H3N2[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):2164 - 2165.
- [8] Astrahan P, Kass I, Cooper MA, *et al.* A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug[J]. *Proteins*, 2004, 55(2):251 - 257.
- [9] Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors[J]. *Lancet*, 2000, 355(9206):827 - 835.
- [10] Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants[J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2001, 45(12):3403 - 3408.
- [11] Stiver G. The treatment of influenza with antiviral drugs[J]. *CMAJ*, 2003, 168(1):49 - 57.
- [12] Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors[J]. *Virus Res*, 2004, 103(1/2):199 - 203.
- [13] Matrosovich M, Klenk HD. Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(2):85 - 97.
- [14] Reuter JD, Myc A, Hayes MM, *et al.* Inhibition of viral adhesion and infection by sialic-acid-conjugated dendritic polymers[J]. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(2):271 - 278.
- [15] Yoshimoto J, Kakui M, Iwasaki H, *et al.* Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(5):865 - 878.
- [16] Abe T, Mizuta T, Hatta T, *et al.* Antisense therapy of influenza[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13(1):61 - 69.
- [17] Ge Q, Eisen HN, Chen J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection[J]. *Virus Res*, 2004, 102(1):37 - 42.
- [18] Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, *et al.* Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(4):1000 - 1004.

呼吸道合胞病毒化学治疗药物的研究进展

方学平综述 梅兴国审校

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:到目前为止,对呼吸道合胞病毒(RSV)感染的研究已经有了一定进展,但是尚无特异有效的治疗和预防方案。目前唯一允许用于化学疗法的药物仍是利巴韦林,因此人们加大力量开发研制新的有效防治RSV感染的药物。主要包括两方面:(1)人工合成的具有抗病毒活性的化合物;(2)源于天然药物的抗病毒活性物质。本文综述了近年来国内外人工合成的各种类型的抗病毒因子的结构特点、抗病毒效果和作用机制,以及已经从天然药物中分离出的各种有效的抗RSV成分。

关键词:呼吸道合胞病毒;抗病毒;化学治疗

中图分类号: R978.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2005)02-0115-05

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)属于副粘病毒科肺炎病毒属,是一种单链、负股、有胞膜的RNA病毒。根据RSV主要抗原的差异可将其分为A和B两个亚型。在RSV表面有两个主要的糖基蛋白:G蛋白和F蛋白,G蛋白能帮助病毒粘附在气道上皮细胞上;F蛋白具有使细胞融合形成多核巨细胞的能力。RSV的生命周期包括以下过程:粘附、穿入、去胞膜、脱核衣壳、复制、转录、翻译、装配、继而子代病毒以芽生方式通过被感染的细

胞的胞膜释放进入呼吸道。

RSV是导致婴幼儿和2岁以下儿童严重的下呼吸道感染的最重要的病原体,同时也是致使某些免疫抑制人群和年老人群发病和死亡的重要原因。目前唯一允许用于化学疗法的药物是利巴韦林(ribavirin),它严格用于高危和病情严重的患儿。人类单克隆抗体palivizumab(Synagis)和静脉用免疫球蛋白(RSV-IGIV)已经注册使用,疗效较好,但是其治疗一个周期所需的费用很高,不能普遍应用于临床。迄今临床还没有疫苗用于预防RSV感染。因此,迫切需要高效廉价的防治RSV感染的药物。