

多羟基芳香族化合物对 HIV-1 整合酶的抑制作用

郭志敏¹, 陈鸿珊^{1*}, 王琳²

(中国医学科学院·中国协和医科大学 1. 医药生物技术研究所, 2. 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究 HIV-1 整合酶抑制剂, 为艾滋病的治疗提供新作用靶位的抗 HIV 药物。方法 用 HIV-1 整合酶 ELISA 法检测 3 种萘醌类化合物, 10 种白藜芦醇及其衍生物和 7 种吡喃香豆素类化合物对整合酶的抑制作用。结果 双羟基-1,4-萘醌(NQ-2)对 HIV-1 整合酶有抑制活性, IC_{50} 为 $78.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 发现萘醌类新化合物 NQ-3 对 HIV-1 整合酶的抑制作用优于 NQ-2, IC_{50} 为 $37.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。用分步测定法发现 NQ-2 主要抑制 HIV-1 整合酶的链转移活性, 而 NQ-3 则对装配和链转移都有较强的抑制。结论 萘醌类化合物(NQ-2, 3)对 HIV-1 整合酶有抑制作用, NQ-3 为新化合物值得进一步研究。

关键词: HIV-1 整合酶; 抑制剂; 多羟基芳香族化合物

中图分类号: R978.7; R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)04 - 0253 - 04

人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)编码的逆转录酶(RT)、蛋白酶(PR)和整合酶(IN)是 HIV-1 病毒复制的关键酶。抑制酶的活性可抑制病毒的繁殖^[1]。以 HIV 逆转录酶和蛋白酶为靶点, 已有 9 种逆转录酶抑制剂和 5 种蛋白酶抑制剂用于临床治疗艾滋病, 能显著抑制病毒复制, 控制病情发展, 延长生命; 但病毒易产生耐药性, 使病情反复, 不能治愈。联合应用逆转录酶和蛋白酶抑制剂, 可使病人血浆病毒降至检测水平以下, 但整合于细胞染色体的 HIV 不能被清除^[2], 停药后反跳。HIV 的整合酶使 HIV-cDNA 整合于宿主细胞 DNA, 随着宿主细胞的复制而复制。整合酶在体内的功能可分为 3 个步骤^[3]: 第 1 步是装配和 3' 加工过程: 整合酶与病毒 cDNA 长末端重复序列(LTR)的特异性序列相互识别, 装配成稳定的核蛋白复合物, 进一步在病毒基因组 3' 末端各切下两个核苷酸, 露出高度保守的胞嘧啶腺嘌呤(CA)双核苷酸羟基末端; 第 2 步为链转移反应: 上步产生的病毒 DNA 蛋白复合物转运到细胞核中, 整合酶交错切割宿主细胞染色体 DNA, 产生间隔 5 个碱基的交错切口, 然后病毒 DNA 的 3' 端带自由羟基的碱基与宿主 DNA 的 5' 端共价连接; 第 3 步整合: 宿主细胞酶修补病毒 DNA 与宿主 DNA 之间的裂隙, 完成整个整合过程, HIV 基因与宿主细胞染

色体形成一个线性的整合 DNA, 与宿主 DNA 同步复制, 使 HIV 难于清除。HIV 整合酶的特异性抑制剂阻断 HIV 的整合, 将对清除病毒有重要意义^[4]。近年来国外以 HIV 整合酶为作用靶点, 用同位素检测方法, 筛选 HIV 的整合酶抑制剂, 已有一些活性物质进入临床试验^[5]。由于同位素方法操作复杂, 伴有同位素污染, 需要防护措施, 不易推广, 作者经过反复试验在国内建立了 HIV-1 整合酶 ELISA 方法。此方法简便, 易于操作。用 ELISA 方法共筛选了 20 种多羟基芳香族化合物, 发现 NQ-3 为一种新的萘醌类化合物, 对 HIV 整合酶有较强的抑制作用, 值得进一步研究。

材料和 方法

试剂 HIV-1 整合酶质粒 F185K/C280SINI-288 由美国 NIH NIDDK 的 Robert Craigie 教授惠赠。大肠杆菌 *E. Coli* BL21(DE3) 由本所微生物代谢室王以光教授和尚广东博士惠赠。

寡核苷酸为上海生工生物工程公司合成, 用 PAGE 纯化。供体底物 1: 5'-P-ACC/CTT/TTA/GTC/AGT/GTG/GAA/AAT/CTC/TAG/CAG-3'; 3'-GAA/AAT/CAG/TCA/CAC/CTT/TTA/GAG/ATC/GTCA-5'。供体底物 2: 5'-P-ACC/CTT/TTA/GTC/AGT/GTG/GAA/AAT/CTC/TAG/CA-3'; 3'-GAA/AAT/CAG/TCA/CAC/CTT/TTA/GAG/ATC/GTCA-5'。靶底物: 5'-TGA/CCA/AGG/GCT/AAT/TCA/CT-3'-biotin; biotin-3'-ACT/GGT/TCC/CGA/TTA/AGT/GA-5'。

收稿日期: 2001-08-22。

作者简介: 郭志敏(1973-), 女, 博士研究生;

陈鸿珊(1920-), 女, 研究员。

* 通讯作者 Tel: (010) 63010984, Fax: (010) 63017302,

E-mail: chenhs@ihw.com.cn

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 为 Sigma 公司产品。甲基咪唑和咪唑为 Acros 公司产品。Sephacrose fast flow 为 Pharmacia 公司产品。BSA 为 Promega 公司产品。Avidin AP 为 SABC 产品。Covalink NH 酶标板和 pNPP 为 Roche 公司产品。

品。

化合物 20 种化合物分为 3 类(图 1): 萘醌类化合物 3 种(NQ-1 ~ 3), 白藜芦醇(resveratrol) 及其衍生物 10 种(RES-1 ~ 10), 吡喃香豆素类化合物 7 种(CAL-1 ~ 7)。

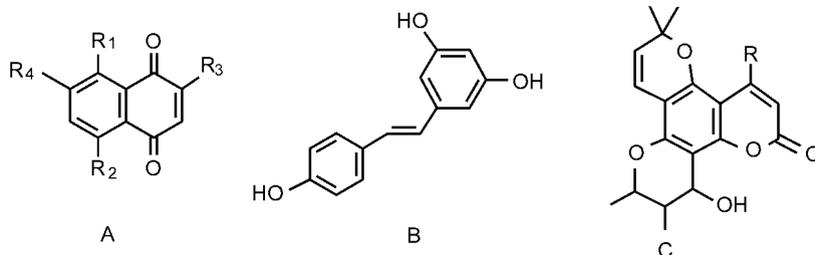


Figure 1 Basic chemical structures of the compounds

A: Naphthoquinones (NQ-1, R1 = R2 = R3 = R4 = H; NQ-2, R1 = R2 = OH, R3 = R4 = H; NQ-3, R1 = R2 = OH, R3 = R4 = SO₃K); B: Resveratrols; C: Pyranocoumarins

HIV-1 整合酶融合蛋白的制备、纯化及 ELISA 法测定酶活性

整合酶融合蛋白的表达和纯化 将重组质粒 F185 K/C280S IN1-288 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达和柱亲和色谱纯化, 获得 HIV-1 整合酶融合蛋白。

ELISA 法测定酶的活性^[6,7] 在包被了供体底物的微孔板中, 加入反应缓冲液(终浓度为 20 mmol·L⁻¹ Tris HCl, 7.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 20 mmol·L⁻¹ DTT, 0.1% NP40, 25 mmol·L⁻¹ MOPS) 和已纯化的整合酶, 37℃ 反应 60 min(使酶与底物装配并行使 3' 加工活性), 加入靶底物 DNA, 再继续反应 60 min(使整合酶行使链转移活性, 使靶 DNA 3' 端的 biotin 连接在板上), 用含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗板, 用 1% BSA 阻断, 最后用亲和素标记的碱性磷酸酶系统检测链转移的产物, 以测定 HIV-1 整合酶的活性。

结 果

1 萘醌类化合物对 HIV-1 整合酶的作用

3 种萘醌类化合物中, 母体 NQ-1 对 HIV-1 整合酶无抑制作用, 1899 μmol·L⁻¹ 时不能抑制整合酶活性; 其衍生物(已知化合物) NQ-2 具有一定抑制作用, IC₅₀ 为 (78.5 ± 0.4) μmol·L⁻¹; 其新衍生物 NQ-3 对 HIV-1 整合酶有较强抑制作用, IC₅₀ 为 (37 ± 9) μmol·L⁻¹, 其抑制活性比 NQ-2 强 1 倍以上(表 1)。

Table 1 Inhibitory effects of naphthoquinones on HIV-1 integrase *in vitro*

Compound	Concentration/ μmol·L ⁻¹	Inhibition/ %	IC ₅₀ / μmol·L ⁻¹
NQ-1	1899	4.36 ± 0	>1899
	380	- 3.11 ± 0	
	76	- 7.31 ± 0	
	15	- 5.89 ± 0	
NQ-2	1579	94.47 ± 0.07	78.5 ± 0.4
	316	95.7 ± 1.1	
	63	13.1 ± 0.9	
	13	- 4 ± 5	
NQ-3	704	97.35 ± 0	37 ± 9
	141	96 ± 4	
	28	22 ± 4	
	6	- 3 ± 7	

Each dilution was duplicated in two repeated experiments. n = 4, x̄ ± s

2 化合物 NQ-2 和 NQ-3 对 HIV-1 整合酶作用比较

为进一步了解 NQ-2 和 NQ-3 对 HIV 整合过程的作用性质, 采用分步测定活性的方法, 在检测系统中不同时间加药, 测定抑制 HIV-1 整合酶活性。(1) 测定药物总的抑制活性: 在第 1 步时加入药物, 药物一直存在于整个反应过程;(2) 测定抑制装配活性: 将药物与整合酶及预切割底物(供体底物 2) 共同作用 60 min 后, 洗去药物及未结合的酶, 再加入靶底物检测产物;(3) 测定抑制链转移活性: 将整合酶与预切割底物作用 60 min, 使两者装配后, 洗去未结合酶, 在加入靶底物的同时加入药物, 检测其抑制整合酶的链转移活性;(4) 测定抑制 3' 加工 + 装配活性: 将药物与未切割的底物(供体底物 1) 作用 60 min

后,洗去药物和未结合酶,加入靶底物检测产物。结果发现 NQ-2 和 NQ-3 抑制整合酶总的活性 IC_{50} 分别为 (78.5 ± 0.4) 和 $(37 \pm 9) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3' 加工 + 装配活性的 IC_{50} 分别为 (97 ± 15) 和 $(8.5 \pm 0.7) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对装配活性的 IC_{50} 分别为 (168 ± 98) 和 $(6.90 \pm 0.05) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 链转移活性的 IC_{50} 分别为 (50 ± 4) 和 $(1.10 \pm 0.07) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物 NQ-2 和 NQ-3 主要抑制 HIV-1 整合酶的链转移活性, NQ-3 的分步活性比 NQ-2 强 10 ~ 45 倍,并且对装配和链转移均有较强的抑制作用(表 2)。

Table 2 *In vitro* effects of naphthoquinone inhibitors on HIV-1 integrase uncoupled assay

Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	Total	3' pro + assembly	Assembly	Strand transfer
NQ-2	78.5 ± 0.4	97 ± 15	168 ± 98	50 ± 4
NQ-3	37 ± 9	8.5 ± 0.7	6.90 ± 0.05	1.10 ± 0.07

Each dilution was duplicated in two repeated experiments. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 白藜芦醇类和吡喃香豆素类化合物对 HIV-1 整合酶的作用

结果见表 3。10 种白藜芦醇及其类似物 RES-1 ~ 10 对 HIV-1 整合酶没有抑制作用, IC_{50} 均大于 $245 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 7 种香豆素类化合物 CAL-1 ~ 7 对 HIV-1 整合酶也没有抑制作用, IC_{50} 均大于 $148 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Table 3 The activities of resveratrols and coumarins against HIV-1 integrase *in vitro*

Resveratrol		Coumarin	
Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
RES-1	> 262.93	CAL-1	> 161.97
RES-2	> 245.70	CAL-2	> 148.37
RES-3	> 232.29	CAL-3	> 168.35
RES-4	> 245.70	CAL-4	> 198.40
RES-5	> 262.93	CAL-5	> 149.96
RES-6	> 262.93	CAL-6	> 208.12
RES-7	> 282.75	CAL-7	> 208.26
RES-8	> 245.70		
RES-9	> 282.75		
RES-10	> 245.70		

讨 论

本文用 HIV-1 整合酶 ELISA 法测定了 3 种萘醌对 HIV 整合酶的抑制作用。NQ-1 为 1,4-萘醌母核,能抑制 HCV(丙型肝炎病毒)蛋白酶, IC_{50} 为 $8.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [8]; 但 NQ-1 $1899 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 HIV 整合酶不能抑制。5,8-羟基-1,4-萘醌(NQ-2)有抑制 HIV-1

整合酶的作用,用同位素法测定抑制 3' 切割活性的 IC_{50} 为 $5.73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [5]。我们用 HIV-1 整合酶 ELISA 测定法证实了其抑制 HIV-1 整合酶,总活性的 IC_{50} 为 $78.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,说明 ELISA 法的测定结果与同位素法一致,但敏感性较差。萘醌类新衍生物 NQ-3 可以抑制 HIV-1 整合酶, IC_{50} 为 $37.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,活性优于 NQ-2。

用分步测定抑制 HIV-1 整合酶活性的方法研究了 NQ-2 和 NQ-3 对酶抑制的性质。NQ-2 抑制 3' 加工 + 装配活性的 IC_{50} 是 $96.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,抑制单纯装配活性的 IC_{50} 是 $168 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,抑制链转移活性的 IC_{50} 是 $49.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见 NQ-2 对 HIV-1 整合酶的作用主要是抑制酶的链转移活性。NQ-3 抑制 3' 加工 + 装配活性的 IC_{50} 是 $8.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,比 NQ-2 的活性提高 11 倍;抑制装配活性的 IC_{50} 是 $6.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,比 NQ-2 提高 24 倍;抑制链转移活性的 IC_{50} 是 $1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,比 NQ-2 提高 45 倍。说明新衍生物 NQ-3 活性较高,可能同时抑制整合酶的装配和链转移,值得进一步研究。

目前国外采用 ^{32}P 同位素标记法进行 HIV 整合酶抑制剂的筛选,实验操作复杂,伴有同位素的污染,实验周期长,限制其应用于大量筛选。本文采用的 HIV-1 整合酶 ELISA 法,操作简单、快速、重复性好,有剂量效应关系,并可以定量、用于高通量的筛选,对寻找高效的 HIV-1 整合酶抑制剂有现实意义。此方法还可将整合酶的整合过程解离为 4 步,分别测定活性,有利于研究抑制剂的作用特性。

整合酶最主要的两种功能是 3' 加工和链转移功能,3' 加工与一些有内切酶活性的酶切割活性一致,只抑制 3' 切割的化合物可能也抑制其他酶,特异性较差。NQ-2 和 NQ-3 主要是抑制链转移活性,可能是整合酶的特异性抑制剂。ELISA 法研究抑制剂的分步活性时发现, NQ-3 对整合酶总的活性不高,但它的分步活性尤其对链转移活性很强,说明 ELISA 方法在总活性测定上虽不如同位素方法敏感,但可以在一定程度上排除假阳性,而且这种不敏感性可以由分步测活来弥补。

目前文献[5]报道的 HIV 整合酶抑制剂主要有肽类、核苷类和多羟基芳香族化合物类 3 大类,其中多羟基芳香族化合物是种类最多的一类。白藜芦醇类和吡喃香豆素类属于此类化合物[9],但我们测定了 10 种白藜芦醇类似物,未发现其抑制 HIV-1 整合酶活性, IC_{50} 均大于 $245 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吡喃香豆素类中

calanolide A (CAL-1) 对 HIV-1 逆转录酶有很强的抑制作用^[10,11], 但对 HIV-1 整合酶无抑制作用, 说明 HIV-1 整合酶抑制剂有其化学结构的专属性。

REFERENCES:

- [1] Jing N, Clercq ED, Rando RF, *et al.* Stability-activity relationship of a family of G tetrad forming oligonucleotides as potent HIV inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(5) :3421 - 3430.
- [2] Pani A, Marongiu ME. Anti-HIV-1 integrase drugs: how far from the shelf? [J] *Curr Pharm Des*, 2000, **6**(5) :569 - 584.
- [3] Hazuda D, Felock PJ, Hastings JC, *et al.* Discovery and analysis of inhibitor of the human immunodeficiency integrase [J]. *Drug Des Discov*, 1997, **15**(1) :17 - 24.
- [4] Beale KK, Robinson WE Jr, Combination of reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitors can be synergistic *in vitro* against drug-sensitive and RT inhibitor-resistant molecular clones of HIV-1 [J]. *Antiviral Res*, 2000, **46**(3) :223 - 232.
- [5] Fesen MR, Kohn KW, Leteurtre F, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus integrase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(6) :2399 - 2403.
- [6] Rasmussen SR, Ravnlaesen M, Rasmussen SE, *et al.* Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end [J]. *Anal Biochem*, 1991, **198**(1) :138 - 142.
- [7] Hazuda DJ, Hastings JC, Wolfe AL, *et al.* A novel assay for the DNA strand-transfer reaction of HIV-1 integrase [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(6) :1121 - 1122.
- [8] Chen XH, Guo JT, Chen HS, *et al.* Detection of proteolytic activity of hepatitis C virus NS3-4A protease using enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报)*, 2000, **22**(3) :300 - 302.
- [9] Zhou CM, Wang L, Zhang ML, *et al.* Synthesis and anti-HIV activity of (±)-calanolide A and its analogues [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1999, **34**(9) :673 - 678.
- [10] Wang L, Feng YB, Zhao ZZ, *et al.* Synthesis and anti-HIV activity of natural products — resveratrol (I) and isorhapotigenin (II) [J]. *Antiviral Res*, 1999, **41**(2) :A44, 34.
- [11] Robert W, Buckheit JR, White EL, *et al.* Unique anti-human immunodeficiency virus activities of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors calanolide A, costatolide, and dihydrocostatolide [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(8) :1827 - 1834.

STUDIES ON THE INHIBITION OF POLYHYDROXYLATED AROMATIC COMPOUNDS AGAINST HIV-1 INTEGRASE

GUO Zhi-min¹, CHEN Hong-shan¹, WANG Lin²

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: AIM Three major enzymes of HIV-1, reverse transcriptase (RT), protease (PR), and integrase (IN), are important targets for anti-HIV drugs. Nine RT and five PR inhibitors have been effectively used in treatment of AIDS patients. In order to find active integrase inhibitors, twenty polyhydroxylated aromatic compounds were tested.

METHODS ELISA method was used to test the integrase activity. The synthesized donor substrate oligonucleotide representing the HIV-1 U5LTR was immobilized onto Covalink polystyrene microtiter plates, and a synthesized biotinylated 20 bp oligonucleotide was used as the target substrate. The products were detected and quantified by a colorimetric avidin-linked alkaline phosphatase reporter system.

RESULTS Compound NQ-2 was found to inhibit HIV-1 integrase with the IC₅₀ of 78.5 μmol·L⁻¹ by ELISA method. Its novel analogue NQ-3 was found to be 2 fold more potent on HIV integrase than NQ-2, IC₅₀ was 37.2 μmol·L⁻¹. The IC₅₀s of NQ-2 and NQ-3 to inhibit the 3'-pro + assembly activity of integrase were 96.94 μmol·L⁻¹ and 8.48 μmol·L⁻¹; to inhibit assembly activity were 168 and 6.9 μmol·L⁻¹ and to inhibit strand-transfer activity were 49.8 and 1.1 μmol·L⁻¹, respectively. Compound NQ-2 mostly inhibited the strand transfer activity of HIV-1 integrase. Compound NQ-3 inhibited both the assembly and strand-transfer with high activities.

CONCLUSION Naphthoquinone compound NQ-3 was found to be a novel HIV integrase inhibitor which warrants further study. Uncoupled ELISA HIV integrase assay is shown to be useful to screen HIV-1 integrase inhibitors.

KEY WORDS: HIV-1 integrase; inhibitor; polyhydroxylated aromatic compound