

选择性抗疱疹病毒药物的酶学机制

汤 华 任中原

(天津医学院微生物学教研室)

提 要

近年来,核苷类选择性抗疱疹病毒化合物的发展,使抗病毒药物治疗取得了可喜的进展。其作用机制主要是它们首先被病毒增殖时诱导产生的特异性病毒 dTK 选择性磷酸化,而后在细胞的或病毒 dTMP 激酶、细胞 NDPK 作用下转变成三磷酸衍生物,最终干扰病毒 DNA 多聚酶活性,从而阻止病毒 DNA 的合成。

近年来,越来越多的资料已证实病毒感染的细胞与正常细胞,或多或少地存在某些性质上或数量上不同的特征。其中较为清楚的是疱疹病毒感染细胞后诱导的某些病毒特异性酶,如脱氧胸苷激酶(deoxythymidine kinase, dTK). $3' \rightarrow 5'$ 外切脱氧核酸酶, dUTP 焦磷酸化酶及核酸还原酶等。这些酶不存在于正常细胞中或者明显不同于相应的细胞酶系,并能利用独特的底物^[1]。据此,人们致力于寻找这些特异性底物作为选择性抗病毒药物(图1),从而打破了“不可能只阻止病毒的复制而不影响细胞正常代谢”的概念。

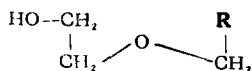
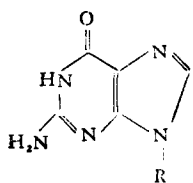
选择性抗疱疹病毒药物可分为两大类:一类为非竞争性抑制疱疹病毒 DNA 多聚酶的化合物如膦羧基甲酸(PFA)和膦羧基乙酸(PAA);另一类则利用病毒编码的 dTK 选择性磷酸化,而后在细胞酶系的作用下转化为三磷酸形式,才能发挥干扰病毒 DNA 合成的作用。这类化合物包括 ACV, DHPG, BVdU, FMAC 及其衍生物。不过,其作用的发挥受到细胞中的核苷及三磷酸核苷浓度的影响。这些抗病毒物质的发展,为控制病毒病的发生展示了新的前景。

脱氧胸苷激酶(dTK)

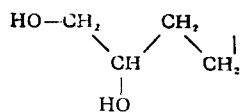
上述第二类抗疱疹病毒药物的特异性主要

依赖于病毒编码的 dTK 将其磷酸化的过程。单纯疱疹病毒 1,2 型(HSV-1,2)及水痘-带状疱疹病毒(VZV)在感染的细胞中能诱导产生特异性病毒 dTK,并证明它同时具有脱氧胞苷激酶(dcydK)活性,而另一些病毒如牛疱疹病毒,猫疱疹病毒编码的 dTK 不具 dcydK 活性^[2]。dTK 的化学本质是由各自 360 个氨基酸的二条多肽链构成的蛋白酶,其天然底物是胸苷与胞苷^[3],而病毒 dTK 还能利用不同于细胞 dTK 的底物。这些底物即核苷类似物包括 ACV, DHPG, BVdU, BVaraU, FIAC, FMAU, DHBG, PedU 和 BVamU 等。它们多数是近年来合成的作为选择性抗疱疹病毒的化合物,其中有些已正式应用于临床如 ACV,有些正试用于临床如 BVdU, DHPG。这些化合物对病毒 dTK 的亲合力不尽相同,因而其抗病毒作用及其选择性亦有明显不同。HSV 编码的 dTK 对 DHPG 的敏感性比 ACV 高 30 倍,这很可能是 DHPG 抗 HSV 作用优于 ACV 的原因^[4]。病毒编码的 dTK 不仅对不同的化合物敏感性不同,而且对同一化合物的不同异构体的敏感性亦存在明显的差异,如 R-DHBG 与 RS-DHBG 对 HSV 编码的 dTK 亲合力很高,而 S-DHBG 几乎不能作为病毒 dTK 的底物,其体内外抗 HSV 作用前者明显强于后者^[5]。

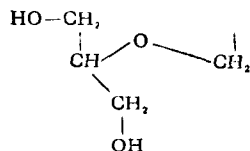
(a) 开环鸟嘌呤核苷类



ACV 羟乙氧甲基鸟苷
(无环鸟苷)

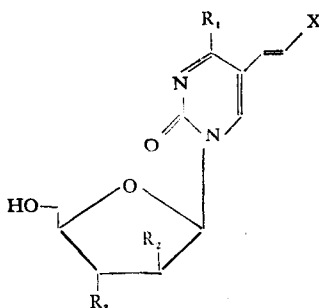


DHBG 二羟丙甲基鸟苷



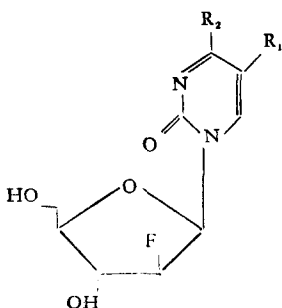
DHPG 二羟丙氧甲基鸟苷

(b) 溴乙烯尿苷及类似物



X	R ₁	R ₂	R ₃		
Br	OH	H	OH	BVdU	溴乙烯尿苷
I	OH	H	OH	Ivdu	碘乙烯尿苷
CH ₃	OH	H	OH	PedU	甲基乙烯尿苷
CF ₃	OH	H	OH	F ₃ PedU	氟甲基乙烯尿苷
Br	NH ₂	H	OH	BVdC	溴乙烯胞苷
Br	OH	OH	OH	BVaraU	溴乙烯阿糖尿苷
Br	OH	H	NH ₂	BVamU	溴乙烯氨基尿苷

(c) 氟嘌呤阿糖核苷类



R ₁	R ₂		
I	NH ₂	FIAC	氟碘阿糖胞苷
I	OH	FIAU	氟碘阿糖尿苷
CH ₃	OH	FMAU	氟甲基阿糖尿苷
H	OH	FAU	氟尿苷
H	NH ₂	FAC	氟胞苷

图1 选择性抗疱疹病毒的核苷类化合物

除 BVdU 外,尚未发现其它的核苷类化合物能作为线粒体 dTK 的底物^[6]。因此,这些化合物的磷酸化作用可能仅限于 dTK⁺病毒感染的细胞中,ACV,DHPG,DHBG,BVdC,FIAC 及 FMAU 的磷酸化形式在未经病毒感染的细胞中极少或不能检出^[7]。显然,这是这些化合物选择性抗 dTK⁺病毒或病毒感染的细胞,而对正常细胞毒性极小的主要机制。令人感兴趣的是 ACV, DHPG, FIAC, BVdU 及 FMAU 也能有效地抑制不能编码 dTK 的巨细胞病毒 (CMV), EB 病毒 (EBV) 的增殖^[2,8,9],此外,

亦发现 ACV, DHPG 对不能编码 dTK 的猫巨细胞病毒有效^[10]。但其作用机制尚不清楚,推测可能是 CMV 或 EBV 在感染的细胞中,轻度激活细胞的某种核苷激酶,从而使其磷酸化所致。

这些化合物发挥抗 dTK⁺病毒作用主要依赖于病毒编码的 dTK 对它们的磷酸化作用,一旦 dTK 活性位点突变可导致其病毒对一种或数种核苷类化合物耐药。诱导病毒 dTK 产生的能力完全丧失的病毒可能对所有依赖 dTK 发挥作用的化合物均耐药,诱导能力降低可能

导致其对部分核苷类化合物耐受^[11]。因此,推测 DHPG 对耐 ACV 的 HSV 仍然有效的机制,可能是由于耐 ACV 的 dTK 仍然对 DHPG 敏感所致。

dTMP 激酶与 dTMP 合成酶

核苷类化合物在被病毒 dTK 选择性磷酸化而成单磷酸化合物后,作为一磷酸脱氧胸苷激酶(dTMPK)的底物,形成二磷酸化合物。其 dTMPK 一般认为来源于细胞,并且不同的核苷单磷酸化合物对 dTMPK 的亲合力亦有所不同,如 Field 等发现 DHPG-MP 对 dTMPK 的亲合力比 ACV-MP 强 492 倍^[12]。此外,Chen 等发现 HSV-1, VZV 诱导编码的 dTK,同时具 dTMPK 活性,但 HSV-2 编码的 dTK 不具此酶的活性^[13]。Fyle 等证明多功能的 dTK 可将一些核苷类化合物如 BVdU,连续磷酸化成一磷酸,二磷酸衍生物^[14]。BVdU-MP 磷酸化成 BVdU-DP 是 BVdU 发挥抗病毒作用的关键步骤,HSV-2 编码的 dTK 不具 dTMPK 活性,从而不能使 BVdU-MP 转变成 BVdU-DP。因此,HSV-2 对 BVdU 及其衍生物如 IVdU, PedU, F₃PedU, BVdC, BVaraU 及 BVamU 的敏感性比 HSV-1 低 100—1000 倍^[2]。根据这种特性,临床上利用 BVdU 来鉴别 HSV-1 与 HSV-2 毒株。

在 HSV-2 感染的细胞中,如用 BVdU 处理,可发生 BVdU-MP 的堆积,它们可能被细胞的 dTMP 合成酶转化成某些代谢产物,其中亦有些具有抗病毒活性,这可能是 BVdU 对 HSV-2 弱的作用机制所在,但 ACV, DHPG, BVaraU, FIAC, FMAU 不能作为 dTMP 合成酶的有效底物^[2]。

NDPK 与 DNA 多聚酶

二磷酸核苷化合物在细胞的核苷二磷酸激酶(NDPK)的作用下,转变成三磷酸化合物,这才是真正的活性形式,至今尚未发现病毒能编码 NDPK^[15]。

活性的三磷酸化合物的最终作用靶位是干

扰病毒 DNA 的合成。其作用的发挥是竞争性 与病毒 DNA 多聚酶结合所致,如 ACV-TP, DHPG-TP 与 dGTP, BVdU-TP 与 dTTP, FIAC-TP 与 dCTP 竞争。结合在 DNA 多聚酶上的三磷酸化合物,阻止其在 DNA 链上的移动,从而阻止了正在合成的 DNA 链的延伸,起到末端阻止剂的作用^[16]。Frank 等发现 ACV-TP 作用于 DNA 多聚酶的位置与 DHPG-TP 不完全相同,因耐 ACV-TP 的 HSV-1 DNA 多聚酶对 DHPG-TP 仍然敏感,并认为 DHPG 既可起到 DNA 合成的末端阻止剂的作用,又可掺入到 DNA 链中,当再次复制时干扰 DNA 多聚酶活性^[15]。此外,已证明这些三磷酸化合物的作用存在较高的特异性即阻止病毒 DNA 多聚酶的作用明显强于对细胞的 α , β 或 γ DNA 多聚酶的作用,如 DNA 多聚酶对 ACV-TP 的 K_i 值为 $0.03 \mu\text{mol/L}$ (dGTP, $0.15 \mu\text{mol/L}$),而细胞的 β DNA 多聚酶对 ACV-TP 的 K_i 值为 $11.9 \mu\text{mol/L}$ ^[17]。同样还证明了 DHPG-TP

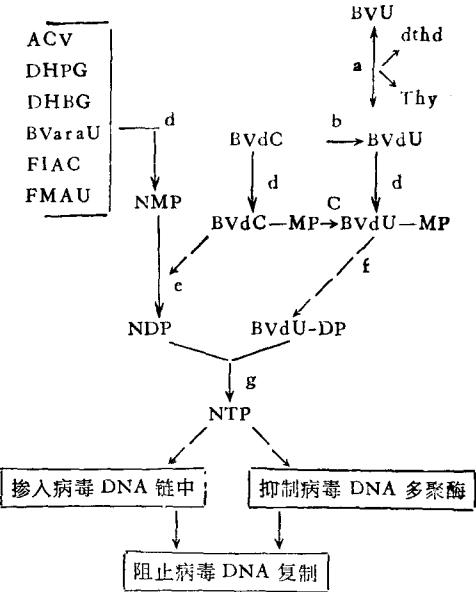


图 2 核苷类化合物抗病毒作用机制示意图

NMP, NDP, NTP: 分别代表核苷一磷酸,二磷酸,三磷酸衍生物 a: dThd 磷酸化酶, b: dCyd 脱氨酶, c: dCMP 脱氨酶, d: 病毒 dTK, e: 细胞 dTMP 激酶, f: 病毒编码的具有 dTMPK 活性的 dTK, g: 细胞核苷二磷酸激酶

的选择性比 ACV-TP 更强^[18]。最近,Chun 等发现在 HSV-1 感染的细胞中, DHPG 能阻止

病毒 β 蛋白的合成,而 γ 蛋白的合成相对增高,认为 β 蛋白的合成减少可能与抑制病毒DNA多聚酶活性有关^[19]。亦有资料表明EBV,CMV的DNA多聚酶对这些三磷酸核苷化合物存在较高的敏感性^[20]。

与dTK一样,病毒DNA多聚酶的活性位点突变亦可导致其对一种或多种核苷类抗病毒化合物的耐药,这可能是耐ACV-TP的HSV-1 DNA多聚酶对DHPG-TP仍然敏感的部分原因。

总之,选择性抗疱疹病毒的核苷类化合物主要是通过病毒编码的dTK,细胞或病毒的dTMPK,细胞NDPK,最终干扰病毒DNA多聚酶活性,从而阻止病毒DNA合成而发挥作用的(如图2↑所示)。

参 考 文 献

- [1] De Clercq, E.: *Biochem. J.*, 1982, **205**, 1.
- [2] De Clercq, E.: *Biochem. Pharmac.*, 1984, **33**, 2159.
- [3] Wagner, M. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 1441.

- [4] Cheng, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 12460.
- [5] Ericson, A. C. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 753.
- [6] Cheng, Y. C. et al.: *Molec. Pharmac.*, 1981, **20**, 203.
- [7] Ashton, W. T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, **108**, 1716.
- [8] Plotkin, S. A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 833.
- [9] Chiou, G. f. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 416.
- [10] Freitas, V. F. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **28**, 148.
- [11] Cold, D. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1987, **31**, 361.
- [12] Field, A. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 4139.
- [13] Chen, M. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 1325.
- [14] Fyle, J. A.: *Molec. Pharmac.*, 1982, **21**, 432.
- [15] Frank, K. B. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1985, **27**, 445.
- [16] Hutchinson, D. W.: *IRCS. Med. Sci.*, 1986, **14**, 965.
- [17] Allaudeen, H. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 11879.
- [18] Clair, M. S. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1984, **25**, 191.
- [19] Chun, Y. S. et al.: *Antimicrob. Agents. Chemoth.*, 1987, **31**, 349.
- [20] Brion, K. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 2473.

[本文于1987年8月27日收到]

(上接第435页)

分开,分别测定结合和游离的¹²⁵碘标HSP-I的放射性,算出放射比,通过标准管的放射比制作标准曲线,从而定出样本管的抑制素样蛋白量。

近几年来,抑制素的分析测定都倾向于用离体垂体细胞培养分析法,在体分析法和垂体组织培养分析法已很少采用。放免分析法测定的是抑制素样蛋白的量,而不能完全肯定是具有生物活性的抑制素,因此亦有待进一步弄清抑制素的结构与功能活性的关系,以利扩大它的使用范围。

参 考 文 献

- [1] de Kretser, DM et al.: *The Pituitary and Testis* 1983, **25**, 12.
- [2] Setchell, BP et al.: *J. Endocrinol.*, 1974, **62**, 675.
- [3] Ultee-van Gessel, AM et al.: *J. Endocrinol.*, 1987,

113, 103.

- [4] Seidah, NG et al.: *FEBS*, 1984, **167**, 98.
- [5] Hudson, B. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 1979, **26**, 17.
- [6] Eddie, LW et al.: *J. Endocrinol.*, 1978, **78**, 217.
- [7] Frachini, G. et al.: *Nature*, 1963, **199**, 195.
- [8] Cornelia, P. et al.: *J. Endocrinol.*, 1985, **351**, 85.
- [9] Marrs, RP et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1984, **58**, 104.
- [10] Tsonis, CG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **112**, R11.
- [11] Baker, HWG et al.: *Clin. Reprod. Fert.*, 1983, **2**, 61.
- [12] Forage, RG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **114**, R1—R4.
- [13] Hillier, SG et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **113**, R3.
- [14] Lee, VWK et al.: *Endocrinology*, 1982, **111**, 849.
- [15] de Jong, WJ et al.: *J. Endocrinol.*, 1987, **113**, 449.
- [16] Hudson, B. et al.: *J. Reprod. Fert. (Supple)*, 1979, **26**, 17.
- [17] Lumpkin, MD et al.: *Endocrinology*, 1984, **114**, 201.
- [18] de Jong, FH et al.: *J. Reprod. Fert. (Supple)*, 1979, **26**, 47.
- [19] Scott, RS et al.: *Endocrinology*, 1980, **7**, 389.
- [20] Slambay, SA et al.: *J. Endocrinol.*, 1984, **103**, 389.

[本文于1987年9月23日收到]