

# 二羟丙氧甲基鸟嘌呤抗单纯疱疹病毒 I 型的实验研究

陈祖基 刘卫国 宋洁贞

(河南省眼科研究所, 郑州 450003)

**提要** 二羟丙氧甲基鸟嘌呤(DHPG), 在组织培养中对单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1) KOS 株抑制 50%空斑形成的浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.1 μg/ml。DHPG 与环胞苷联合应用的抗 HSV 活性呈协同作用, DHPG 分别与无环鸟苷、酞丁安合用有相加作用。0.1 和 0.05% DHPG 溶液滴眼对家兔实验性浅层单纯疱疹病毒角膜炎有显著治疗作用, 浓度降低至 0.025 和 0.01% 无明显疗效。对实质层型单疱角膜炎, 0.1% DHPG 溶液滴眼治疗有效。

**关键词** 二羟丙氧甲基鸟嘌呤; 单纯疱疹病毒; 实验性单纯疱疹病毒角膜炎

二羟丙氧甲基鸟嘌呤 [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, 简称 DHPG] 系一种新的无环鸟嘌呤衍生物, 有水溶性较好、抗病毒作用强的优点。本文报告 DHPG 的抗单纯疱疹病毒作用及与其它抗病毒药物联合用药的抗病毒活性。

## 材料与方 法

本实验用 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1) KOS 株和传代非洲绿猴肾细胞 (Vero) 均由中国预防医学科学院病毒研究所提供, 用 Eagle's 培养基培养。白色家兔雌雄兼用, 体重 2~3 kg。DHPG 由湖北医药工业研究所合成供给, 配成 0.1% 溶液, 经 100°C 30 min 煮沸消毒后-20°C 保存备用。环胞苷(简称 CC)购于上海第十二制药厂; 无环鸟苷(简称 ACV)和酞丁安(简称 TDA)分别由湖北医药工业研究所和中国医科院药物研究所提供。

### 一. 抑制 50%空斑形成浓度(IC<sub>50</sub>)的测定

Vero 细胞培养长成单层后, 加入 100~300 PFU/ml 的 HSV-1 KOS 株 0.1 ml, 37°C 吸附 1 h 后, 每孔分别加入含不同浓度或配比的药物维持液 1 ml(含 1% 甲基纤维素), 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 培养 72 h, 固定染色(福尔马林-结晶紫溶液<sup>(1)</sup>), 计空斑数。在同等条件下作细胞和病毒对照。结果用 Reed-Muench 法计算单一药物或不同药物联合用药的 IC<sub>50</sub>。

### 二. 联合用药的抗病毒活性评价

将实验所得的各单一药物和联合用药的 IC<sub>50</sub> 用分部抑制浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 指数法评价联合用药的抗病毒活性<sup>(1)</sup>。

$$\text{FIC 指数} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{A 联合})}{\text{IC}_{50}(\text{A 单一})} + \frac{\text{IC}_{50}(\text{B 联合})}{\text{IC}_{50}(\text{B 单一})}$$

FIC 指数 ≤ 0.75 协同作用

> 0.75 至 < 1.25 相加作用

≥ 1.25 至 < 2.0 无关作用

≥ 2.0 拮抗作用

### 三. 家兔实验性单纯疱疹病毒角膜炎的治疗

浅层和实质层型单纯疱疹病毒角膜炎动物模型和疗效评价标准见前报<sup>(2)</sup>。

## 结 果

### 一. 组织培养

#### (一) DHPG 的 $IC_{50}$ 测定

将 DHPG 连续倍比稀释为 0.5, 0.25, 0.125 和 0.0625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  等不同浓度, 观察它们在组织培养中抑制 HSV 空斑形成的作用, 结果显示随 DHPG 浓度的降低, 空斑抑制百分率显著下降 (表 1)。计算结果  $IC_{50}$  为 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 而 DHPG 对 Vero 细胞的毒性浓度大于 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

#### (二) DHPG 与 CC, ACV, TDA 联合用药的抗 HSV 作用

首先按上法分别测出 CC, ACV 和 TDA 的  $IC_{50}$  为 0.19, 0.27 和 38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后将 DHPG 分别与 CC, ACV 和 TDA 的不同浓度互相配比, 进行联合用药的抗 HSV 活性实验, 求得 DHPG/CC, DHPG/ACV 和 DHPG/TDA 联合用药时的  $IC_{50}$  和 FIC 指数 (图 1)。

Tab 1. Plaque reduction assay of DHPG in Vero cells infected with HSV-1 kos strain

Concentration (ng/ml)	Plaques ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ , n=8)	Inhibition (%)
0	27.00 $\pm$ 9.29	
500	2.00 $\pm$ 1.07	92.59
250	5.25 $\pm$ 2.05	80.56
125	12.50 $\pm$ 4.28	53.70
62.5	16.13 $\pm$ 7.66	40.28

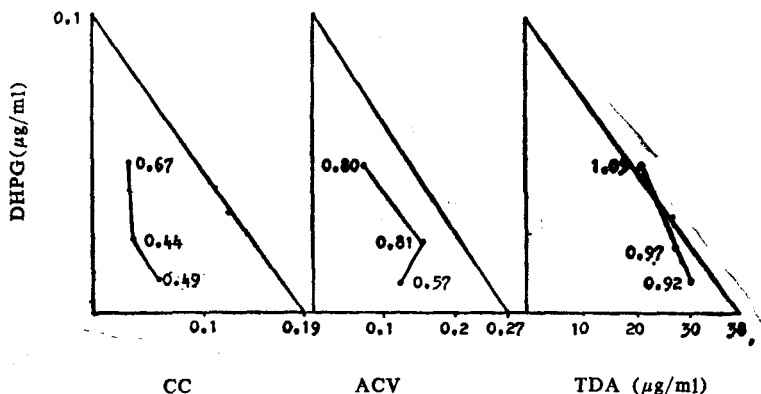


Fig 1. Antiviral activities of DHPG in combination with CC, ACV and TDA in various combinations.

实验结果表明, DHPG 和 CC 联合, FIC 指数分别为 0.67, 0.44 和 0.49, 均小于 0.75, 呈协同作用。DHPG 和 ACV 联合 FIC 指数分别为 0.80, 0.81 和 0.57。DHPG 和 TDA 联合 FIC 指数分别为 1.05, 0.97 和 0.92, 均呈相加作用。

### 二. 实验性 HSV 角膜炎的治疗

#### (一) 浅层 HSV 角膜炎

家兔眼角膜接种 HSV 48 h 后分为 0.1, 0.05, 0.025, 0.01% DHPG 和生理盐水五组,

每组 4 兔 8 眼, 每日点眼 6 次, 每次  $50 \mu\text{l}$ , 连续治疗 5 天。结果显示明显的剂量—反应关系, 0.1 和 0.05% DHPG 组有显著治疗效果; 0.025 和 0.01% DHPG 组治疗期间角膜病变程度虽较对照组为轻, 但经统计处理无明显差异(图 2)。

## (二) 实质层型 HSV 角膜炎

HSV 接种后 24 h 开始用 0.1% DHPG 溶液点眼, (4 兔 8 眼), 每日 6 次, 每次  $50 \mu\text{l}$ , 连续治疗 10 天。实验证明 0.1% DHPG 开始治疗后的第 4 天起就有明显治疗作用, 说明 DHPG 具有良好的治疗实质层型 HSV 角膜炎效果(图 3)。

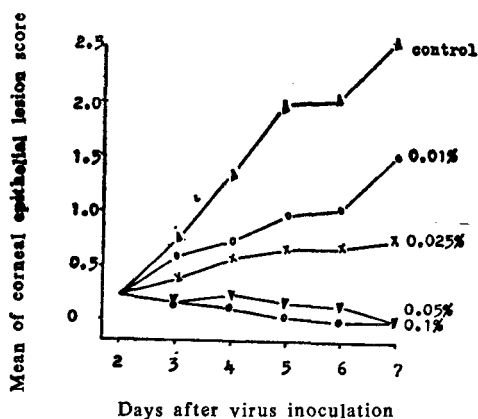


Fig 2. The effect of topically applied DHPG on herpetic epithelial keratitis in rabbits.

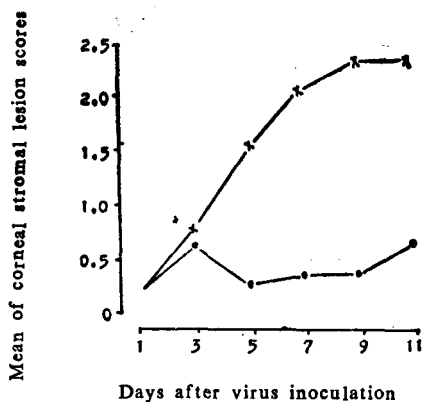


Fig 3. The effect of topically applied 0.1% DHPG on herpetic stromal keratitis in rabbits. x—x Control; ····· 0.1% DHPG.

## 讨 论

DHPG 系一种新的无环鸟嘌呤衍生物, 水溶性比 ACV 高,  $25^\circ\text{C}$  pH 7 时, 溶解度为  $4.3 \text{ mg/ml}$  (ACV 为  $1.2 \text{ mg/ml}$ ),  $37^\circ\text{C}$  为  $7 \text{ mg/ml}$ 。水溶液稳定, 0.1% 溶液  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存 75 天药效不降低<sup>(3)</sup>。

空斑减数试验表明 DHPG 在组织培养中具有显著的抗病毒作用, 抗 HSV-1 的  $\text{IC}_{50}$  为  $0.1 \mu\text{g/ml}$ , 抗病毒活性比 ACV 和 CC 强, 与 Smith<sup>(4)</sup> 和 Smee<sup>(5)</sup> 报道一致。Ashton 等则报道在组织培养中 DHPG 对 HSV-1, HSV-2 和 VSV 的抑制作用与 ACV 相当。DHPG 体内的抗 HSV-1 活性较 ACV 高 60 倍<sup>(6,7)</sup>。本文进一步证明, 在组织培养中 DHPG 和 CC 联合应用在抗 HSV 活性方面具有协同作用, DHPG 和 ACV, DHPG 和 TDA 合用有相加作用。不同作用机理的药物合用, 产生协同或相加作用已为人们所熟知, DHPG 通过病毒特异性 TK 酶磷酸化, 然后选择性地抑制病毒 DNA 的合成。但 DHPG 对 ACV 耐药的 TK<sup>+</sup>, DP<sup>-</sup> 突变株敏感, 说明 DHPG 对病毒 DNA 聚合酶的作用位点与 ACV 不同。另外, 已知 CMV 和 EBV 不诱导 TK, DHPG 对这两种病毒有效, 显示存在另一种抗病毒作用机理<sup>(4,8)</sup>。

在实验性 HSV 角膜炎治疗中, DHPG 有显著疗效, 并存在明显的剂量—反应关系。0.1 和 0.05% DHPG 溶液滴眼对浅层 HSV 角膜炎具有良好治疗作用, 但降低浓度则无效。本文结果与 Troasdale 等的报告相符<sup>(9,10)</sup>。我们证明 0.1% DHPG 溶液于接种病毒 24 h 后开始滴眼, 对实验性实质层型 HSV 角膜炎有一定治疗作用。治疗过程中未见明显不良反应, 是临床上有希望的一个抗疱疹病毒新药。

## 参 考 文 献

1. Allen LB, et al. Evaluation of the antiherpesvirus drug combinations: Virazole plus arabinofuranosylhydroxanthine and virazole plus arabinofuranosyladenine. *Antiviral Res* 1982; 2:203.
2. 陈祖基, 等. 酞丁安对实验性单疱角膜炎的作用. *药理学报* 1986; 21:928.
3. Martin JC, et al. 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)-guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J Med Chem* 1983; 26:759.
4. Smith KO, et al. A new nucleoside analog, 9- {[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] guanine, highly active *in vitro* against herpes simplex virus type 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:55.
5. Smee DF, et al. Antiherpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *Ibid* 1983; 23:676.
6. Ashton WT, et al. Activation by thymidine kinase and potent antiherpetic activity of 2'-nor-2'-deoxyguanosine (2'NDG). *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108:1716.
7. Field AK, et al. 9- {[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]-methyl} guanine: A selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:4139.
8. Cheng YC, et al. Unique spectrum of activity of DHPG against HSV-1. *Ibid* 1983; 80:2767.
9. Trousdale MD, et al. Efficacy of BW759 (9- {[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy]methyl} guanine) against herpes simplex virus type 1 keratitis in rabbits. *Curr Eye Res* 1984; 3:1007.
10. Davies MEM, et al. 2'-Nor-2'-deoxyguanosine is an effective therapeutic agent for treatment of experimental herpetic keratitis. *Antiviral Res* 1986; 7:119.
11. 郑志明, 等. 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.

## EXPERIMENTAL STUDIES OF 9-(1, 3-DIHYDROXY-2-PROPOXYMETHYL)-GUANINE(DHPG) AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS

ZJ Chen, WG Liu and JZ Song

(Henan Institute of Ophthalmology, Zhengzhou 450003)

**ABSTRACT** The antiherpes virus effects of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG) were studied in cell culture and in experimental herpetic keratitis in rabbits. In plaque reduction assays in Vero cell, the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of DHPG was shown to be 0.1 μg/ml against HSV-1. Combination of DHPG and Cyclocytidine (CC), produced a synergistic activity against kos strains of HSV-1. Whereas the combination of DHPG and Acyclovir (ACV) or Tai-Ding-An (TDA) resulted in an additive interaction against HSV-1. Topical application of 0.1% or 0.05% DHPG eyedrop was initiated 48h after virus inoculation, significant efficacy was obtained in rabbits with herpetic epithelial keratitis. But 0.025 and 0.01% DHPG eyedrop showed no effect. 0.1% DHPG has been shown to be effective in the topical treatment of herpetic stromal keratitis in the rabbits.

**Key words** 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (DHPG); Herpes simplex virus; Herpetic keratitis