

4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物的抗 HBV 活性研究

郭晓河¹, 陈亚娟^{1,2}, 李玉江¹, 陶乐¹, 董黎红¹, 王强¹, 常俊标^{3,2}

(1.河南省科学院 高新技术研究中心, 郑州 475001; 2.郑州大学 药学院, 郑州 450001;
3.河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘要:以野生型乙型肝炎病毒(HBV)细胞株 HepG2.2.15 和拉米夫定耐药型 HBV 细胞株 HepGRL1 为模型, 分别采用酶联免疫吸附检测(ELISA)法测定 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物(GY001—GY005)对乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)和乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的影响, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物(GY001—GY005)对 HepG2 细胞的毒性, 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物(GY001—GY005)对细胞上清液中和胞内 HBV DNA 拷贝数的影响。结果显示, 在 HepG2.2.15 细胞和 HepGRL1 细胞中, GY001, GY002, GY003, GY004, GY005 对细胞上清和细胞内 HBV DNA 均有非常好的抑制作用, 效果优于拉米夫定(3TC), 且没有表现出明显的耐药性; GY001, GY002, GY003, GY004, GY005 对 HepG2 细胞的毒性均较小, 其中 GY002 和 GY005 的半数细胞毒性浓度(CC₅₀)>1 000 μmol/L, GY001 和 GY003 的 CC₅₀ 分别为 963.69 μmol/L 和 994.49 μmol/L, GY004 的毒性相比稍大, CC₅₀ 为 545.12 μmol/L。

关键词:4-氨基酸取代; 嘧啶核苷化合物; 抗 HBV 活性

中图分类号: O626

文献标志码: A

乙型肝炎是目前严重影响人们健康的疾病之一^[1], 全世界有 2.4 亿以上的人患慢性乙型肝炎^[2], 中国约有 2 800 万慢性乙肝患者。乙型肝炎病毒(HBV)感染引起肝硬化、肝癌率高达 60%~80%, 世界范围内每年将近 88.7 万人死于 HBV^[3]。核苷及其类似物在抗艾滋病病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)等方面起着极其重要的作用^[4-8]。尽管这些药物可明显降低乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)病毒载量并防止肝脏疾病的进展, 但不能治愈 HBV 感染。因此, 发现和开发具有全新作用机制的抗 HBV 药物始终是该领域的研究热点。本课题组前期研究发现^[9-10], 4-氨基酸取代嘧啶核苷化合物具有较好的抗科萨奇 B 组病毒活性, 随后对这些化合物的抗 HBV 活性进行了研究, 发现这些化合物还具有较好的抗 HBV 活性^[11-12]。由于前期^[12]对化合物 GY005 进行的抗 HBV 活性初筛中发现其抗 HBV 活性较好、毒性较小, 因此本文对其进行了进一步的研究, 对化合物 GY005 的结构进行了修饰, 以更深入获得该类化合物的药理学价值, 发现更多更好的具有抗 HBV 活性的先导化合物, 进而拓宽该类核苷化合物的抗病毒谱。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

全自动酶标仪, 购自美国 Bio-Rad 公司; 低温离心机, 购自美国 Eppendorf 公司; CO₂ 培养箱, 购自力康发展有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 购自上海科哲生化科技公司。

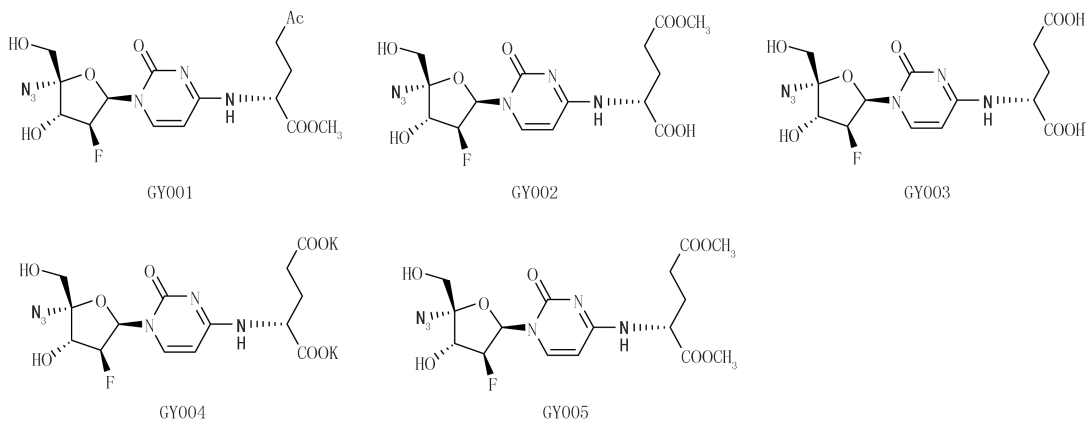
收稿日期: 2020-11-02; 修回日期: 2020-12-21.

基金项目: 河南省科技创新杰出青年基金(094100510019); 河南省基础与前沿技术研究项目(162300410006); 河南省科技攻关计划项目(092102310021); 河南省科学院基本科研费项目(200602007).

作者简介: 郭晓河(1970—), 女, 河南滑县人, 河南省科学院研究员, 博士, 研究方向为有机药物化学, E-mail: drzhangguo@sina.com.

通信作者: 陶乐, E-mail: 1418489219@qq.com.

4-氨基酸取代嘧啶核苷化合物(实验室自己合成^[10],纯度大于 98%),依次是 4-N-(2'-氨基-戊二酸-1'-甲酯)-1-(2'-脱氧-2'-β-氟-4'-叠氮)-呋喃糖基-胞嘧啶(化合物 GY001)、4-N-(2'-氨基-戊二酸-5'-甲酯)-1-(2'-脱氧-2'-β-氟-4'-叠氮)-呋喃糖基-胞嘧啶(化合物 GY002)、4-N-(2'-氨基-戊二酸)-1-(2'-脱氧-2'-β-氟-4'-叠氮)-呋喃糖基-胞嘧啶(化合物 GY003)、4-N-(2'-氨基-戊二酸二钾盐)-1-(2'-脱氧-2'-β-氟-4'-叠氮)-呋喃糖基-胞嘧啶(化合物 GY004)、4-N-(2'-氨基-戊二酸二甲酯)-1-(2'-脱氧-2'-β-氟-4'-叠氮)-呋喃糖基-胞嘧啶(化合物 GY005).结构式如下.



人肝癌细胞 HepG2 和稳定转染 HBV 细胞 HepG2.2.15 由河南省医药科学研究院保存和提供.拉米夫定(3TC)耐药 HBV 细胞株 HepGRL1 由河南省医药科学研究院王庆端研究员团队构建和保存.

四甲基偶氮唑盐(MTT),购自上海威奥公司;Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM),购自北京 Solarbio 科技有限公司;胎牛血清(FBS),购自美国 Gemini 公司;3TC,购自大连美仑生物技术公司;乙型肝炎病毒抗原检测 ELISA 试剂盒,购自上海科华生物工程股份有限公司;DNA 病毒提取试剂盒,购自美国 OMEGA 公司;HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒,购自北京宝瑞源生物技术有限公司.

1.2 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物(GY001,GY002,GY003,GY004,GY005)的抗 HBV 活性测试

1.2.1 化合物体外细胞毒性评价

以 HepG2 细胞为模型,采用 MTT 法测定化合物 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 体外细胞毒性.实验步骤如下:HepG2 细胞复苏后以 5×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔培养板中,培养 12 h 后,弃去孔内培养基,然后将 100 μL 不同浓度(1 000 $\mu\text{mol/L}$,500 $\mu\text{mol/L}$,250 $\mu\text{mol/L}$,125 $\mu\text{mol/L}$,62.5 $\mu\text{mol/L}$)的含药培养基加入孔中,每个浓度需要设置 3 个复孔,同时设置阳性与空白对照孔.继续培养 72 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,反应 4 h 后弃去孔内液体,每孔加 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床避光摇动 10 min,预热酶标仪,测定每个孔的吸光度(OD)值,测量波长为 490 nm,对照波长为 630 nm.采用如下公式计算化合物对细胞的增殖抑制率:抑制率(%)=[(对照孔(OD 值)-给药孔(OD 值))/对照孔(OD 值)] \times 100%.根据各化合物对细胞的生长抑制率,算出化合物对细胞的半数毒性浓度 CC_{50} .

1.2.2 化合物对野生型和 3TC 耐药 HBV 抗原的抑制作用检测

以 HepG2.2.15 和 HepGRL1 细胞为模型,采用 ELISA 法测定化合物 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 体外对 HBV e 抗原(HBeAg)和 s 抗原(HBsAg)的抑制作用.实验步骤如下:HepG2.2.15 细胞和 HepGRL1 细胞复苏后分别以 2×10^3 个细胞/孔和 1×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔培养板中,置于 CO_2 培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数 5.0% CO_2)中培养.12 h 后,加入不同浓度(1 $\mu\text{mol/L}$,0.2 $\mu\text{mol/L}$)的含药培养基,并设空白对照组和阳性对照组,每个浓度需要设置 3 个复孔.作用 3 d 后更换新鲜含药培养基.收集作用 6 d 后的细胞培养上清液,按照 ELISA 试剂盒检测说明书操作,检测细胞培养上清液中 HBeAg 和 HBsAg 的含量,酶标仪测定(检测波长 450 nm,参考波长 630 nm)每个孔的 OD 值,计算化合物对 Hep G2.2.15 细胞和 HepGRL1 细胞上清液中 HBsAg,HBeAg 的抗原表达抑制率.

1.2.3 化合物对细胞上清液中 HBV DNA 的抑制作用检测

1.2.3.1 体外细胞培养

将 HepG2.2.15 细胞和 HepGRL1 细胞分别以 1×10^4 个细胞/孔和 8×10^3 个/孔接种于 24 孔培养板中,置于 CO_2 培养箱中(37°C , 体积分数 $5.0\% \text{CO}_2$).培养过夜后取出培养板,加入不同浓度($0.2 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{mol/L}$)的 GY001, GY002, GY003, GY004, GY005 培养基,作用 3 d 后更换新鲜含药培养基,继续培养,收集第 6 天的培养上清液,置于 -20°C 保存.实验设置空白对照组和阳性对照组.

1.2.3.2 细胞上清液 DNA 的提取

按照 HBV 核酸检测试剂盒说明书操作,采用荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测细胞上清液中 HBV DNA 的含量.操作步骤如下:(1)吸取 $250 \mu\text{L}$ 待测样品、阴性对照血清以及参考标准品置于 1.5mL 灭菌离心(EP)管.(2)加入 $270 \mu\text{L}$ DNA 提取液 1, $100 \mu\text{L}$ DNA 提取液 2, $30 \mu\text{L}$ 异丙醇, $20 \mu\text{L}$ 蛋白酶 K, $10 \mu\text{L}$ 磁珠和 $1 \mu\text{L}$ 内标,涡旋 10 min,然后 1000r/min 离心 5 s.(3)将离心后 EP 管置于磁力架上,2 min 后小心吸取全部液体至新的 EP 管.(4)加入 $550 \mu\text{L}$ 提取液 3,涡旋 10 s, 1000r/min 瞬时离心后置于磁力架上,2 min 后弃去液体.(5)往沉淀中加入 $400 \mu\text{L}$ 提取液 4,涡旋 10 s 后置于磁力架上,2 min 后弃去液体.(6)往沉淀加入 $50 \mu\text{L}$ 提取液 5 后吹打 5 次,置于 55°C 水浴 10 min,期间每隔 3 min 吹打一次,然后置于磁力架上,2 min 后收集液体获得 DNA, -20°C 保存.

1.2.3.3 荧光定量 PCR 扩增

(1)配置 PCR 反应液,取 $30 \mu\text{L}$ 反应液加至 8 联排管中,再加入 $20 \mu\text{L}$ 给药样本 DNA 和标准品 DNA,混匀.(2)将 PCR 反应板放置荧光定量 PCR 仪,目的基因选择 5,6-羧基荧光素(FAM)检测通道,内标选择绿色荧光蛋白(VIC)通道检测,参比荧光设置为 None.(3)设置 PCR 反应参数,见表 1.(4)结果判定.检测样本 DNA 拷贝数在 $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^9$ copies/mL 范围内,检测结果可靠.若拷贝数大于上限,应对样本进行稀释再进行检测.(5)对 HBV DNA 抑制率计算.化合物对细胞上清液中 HBV DNA 的抑制率按下面公式计算:抑制率($\%$) = [(对照孔 HBV DNA 拷贝数 - 给药孔 HBV DNA 拷贝数) / 对照孔 HBV DNA 拷贝数] $\times 100\%$.

1.2.4 化合物对细胞内 HBV DNA 的抑制作用检测

将 HepG2.2.15 细胞和 HepGRL1 细胞接种于 24 孔培养板中,化合物作用 6 d 后,收集细胞,用 DNA 提取(Tissue DNA Kit)试剂盒提取细胞内基因组 DNA,步骤如下:(1)细胞沉淀用 $200 \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,分别加入 $220 \mu\text{L}$

表 1 PCR 反应参数

Tab. 1 Parameters of PCR reaction

反应过程	UNG 酶反应	Taq 酶活化	变性	退火、延伸、荧光收集	降温
温度/ $^\circ\text{C}$	50	95	95	60	25
时间/s	120	300	15	45	10
循环数	1	1	45	45	1

平衡液和 $25 \mu\text{L}$ OB 蛋白酶,涡旋混匀,置于 65°C 水浴 10 min.(2)加入 $220 \mu\text{L}$ 无水乙醇,涡旋混匀,转移至结合 DNA 吸附柱中, 8459r/min 离心 1 min,丢弃下层收集管废液.(3)加入 $500 \mu\text{L}$ 缓冲溶液,3 min 后,离心,丢弃下层收集管废液.(4)加入 $700 \mu\text{L}$ 用无水乙醇稀释的 DNA 洗涤液,2 min 后,离心,丢弃下层收集管废液.(5)将 DNA 吸附柱转移至新的收集管 12689r/min 离心 2 min 除去残留液体.(6)向 DNA 吸附柱中加入 $60 \mu\text{L}$ 65°C 水浴过的洗脱液,静置 5 min 后, 10573r/min 离心 2 min,下层液体即为提取的细胞内基因组 DNA, -20°C 保存备用.

1.2.5 统计分析

实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,统计分析采用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 化合物体外细胞毒性

以 HepG2 细胞为模型,采用 MTT 法测定化合物体外细胞毒性.实验结果表明 GY001, GY002, GY003,

GY004,GY005 对 HepG2 细胞的毒性均较小,其中 GY002 和 GY005 的毒性最小,CC₅₀大于 1 000 $\mu\text{mol/L}$,GY001 和 GY003 的毒性也较小,CC₅₀分别为 963.69 $\mu\text{mol/L}$ 和 994.49 $\mu\text{mol/L}$,而 GY004 的毒性稍大,CC₅₀为 545.12 $\mu\text{mol/L}$ (表 2).

表 2 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对 HepG2 细胞的毒性
Tab. 2 Toxicity of GY001,GY002,GY003,GY004 and GY005 on HepG2 cells

分组	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	OD 值	抑制率/%	CC ₅₀ / $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
空白组	—	2.02±0.03	—	—
GY001	1 000.0	0.64±0.23**	62.92	963.69
	500.0	1.13±0.22**	44.06	
	250.0	1.37±0.08**	32.29	
	125.0	1.57±0.16**	26.98	
	62.5	1.64±0.16*	22.97	
GY002	1 000.0	0.93±0.06**	53.99	>1 000
	500.0	1.24±0.02**	38.84	
	250.0	1.51±0.01**	25.40	
	125.0	1.55±0.04**	23.15	
	62.5	1.76±0.03**	12.97	
GY003	1 000.0	0.89±0.06**	55.56	994.49
	500.0	1.23±0.03**	39.09	
	250.0	1.47±0.07**	27.01	
	125.0	1.63±0.13**	19.21	
	62.5	1.75±0.06**	13.30	
GY004	1 000.0	0.76±0.12**	62.18	545.12
	500.0	0.83±0.03**	58.88	
	250.0	1.04±0.04**	48.75	
	125.0	1.10±0.06**	45.53	
	62.5	1.22±0.02**	39.41	
GY005	1 000.0	1.07±0.11**	46.95	>1 000
	500.0	1.45±0.05**	28.00	
	250.0	1.80±0.04**	10.68	
	125.0	1.87±0.02**	7.28	
	62.5	1.89±0.03*	6.45	

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

2.2 化合物对野生型和 3TC 耐药 HBV 抗原的抑制作用

以 HepG2.2.15 细胞为模型研究化合物对野生型 HBV 抗原抑制作用,以 3TC 为阳性对照药^[13],采用 ELISA 法检测 HBV 抗原的表达量^[14].结果如表 3 所示,阳性药 3TC 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 14.45%和 12.18%.化合物 GY004 和 GY005 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HBV 抗原的抑制作用与其效果相当,对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的抑制率均在 10%左右,其中 GY005 对 HBsAg 和 HBeAg 抗原的抑制率分别为 12.50%和 10.12%.

以 HepGRL1 细胞为模型研究化合物对 3TC 耐药 HBV 抗原抑制作用,以 3TC 为阳性对照.结果如表 3 所示,阳性药 3TC 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HBeAg 的抑制率为 9.90%.GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对耐药

株 HBeAg 的分泌均有抑制作用,其中 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 GY005 对 HBeAg 抗原的抑制率为 8.01% ,与 3TC 接近。

综上,化合物 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对野生型和拉米夫定耐药 HBV 抗原均有抑制作用,其中 GY005 活性最强, $1 \mu\text{mol/L}$ 的 GY005 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 3TC 活性相当。

表 3 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对野生型和 3TC 耐药 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

Tab. 3 Inhibitory effects of GY001,GY002,GY003,GY004 and GY005 on wild type and 3TC resistant HBsAg and HBeAg

分组	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	HepG2.2.15				HepGRL1	
		HBsAg/(OD)	抑制率/ %	HBeAg/(OD)	抑制率/ %	HBeAg/(OD)	抑制率/ %
对照组	—	1.14 ± 0.05	—	0.74 ± 0.02	—	0.81 ± 0.04	—
3TC	20	0.98 ± 0.09	14.45	0.65 ± 0.07	12.18	0.73 ± 0.04	9.90
GY001	1	$1.05 \pm 0.09^{* \square}$	8.08	$0.68 \pm 0.18^{* \square}$	8.68	0.77 ± 0.06	4.58
GY002	1	$1.08 \pm 0.13^{* \square}$	5.46	$0.72 \pm 0.11^{* \square}$	3.37	$0.75 \pm 0.05^{*}$	7.01
GY003	1	$1.10 \pm 0.32^{* \square}$	3.70	$0.70 \pm 0.14^{\square}$	5.99	0.76 ± 0.08	5.65
GY004	1	1.03 ± 0.13	10.20	0.68 ± 0.05	9.31	0.77 ± 0.10	5.36
GY005	1	$0.99 \pm 0.11^{*}$	12.50	$0.67 \pm 0.09^{*}$	10.12	0.74 ± 0.05	8.01

注:与空白对照组相比, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$;与阳性对照组相比, $^{\square} P < 0.01$ 。

2.3 化合物对 HBV DNA 的抑制作用

采用荧光定量 PCR 方法检测化合物对 HBV DNA 的抑制作用.结果表明,GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 能显著降低细胞上清液和细胞内 HBV DNA 水平,且呈浓度依赖性. $20 \mu\text{mol/L}$ 3TC 用药 6 d 对野生型 HBV 细胞上清 DNA 抑制率为 76.00% ,而 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对细胞上清 HBV DNA 的抑制率平均在 75.00% 左右,其中 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 GY005 抑制率达到 81.00% ,说明 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物比 3TC 表现出更好的活性. GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对在细胞上清液和细胞内的 HBV DNA 抑制率接近(表 4,图 1,图 2)。

表 4 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对野生型 HBV DNA 的抑制作用

Tab. 4 Inhibitory effect of GY001,GY002,GY003,GY004 and GY005 on wild type HBV DNA

分组	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	上清液		胞内	
		$\times 10^5$ copies/mL	抑制率/ %	$\times 10^7$ copies/mL	抑制率/ %
对照组	—	7.03 ± 0.15	—	4.76 ± 0.22	—
3TC	20.0	$1.69 \pm 0.29^{**}$	76.00	$1.24 \pm 0.09^{**}$	73.86
GY001	1.0	$2.31 \pm 0.23^{**}$	67.16	$1.15 \pm 0.15^{**}$	75.74
	0.2	$4.99 \pm 0.35^{* \square}$	29.03	$2.93 \pm 0.13^{* \square}$	38.02
GY002	1.0	$1.67 \pm 0.28^{**}$	76.33	$1.02 \pm 0.09^{**}$	78.22
	0.2	$5.10 \pm 1.01^{* \square}$	27.40	$2.10 \pm 0.02^{* \square}$	55.56
GY003	1.0	$2.10 \pm 0.44^{**}$	70.06	$2.24 \pm 0.32^{* \square}$	52.52
	0.2	$4.49 \pm 0.55^{* \square}$	39.18	$3.12 \pm 0.47^{* \square}$	34.04
GY004	1.0	$1.97 \pm 0.07^{**}$	71.96	$1.94 \pm 0.08^{* \&}$	59.01
	0.2	$4.07 \pm 0.48^{* \square}$	42.02	$3.51 \pm 0.10^{* \square}$	25.78
GY005	1.0	$1.33 \pm 0.38^{**}$	81.07	$1.33 \pm 0.33^{**}$	71.85
	0.2	$4.48 \pm 0.57^{* \square}$	36.18	$2.18 \pm 0.27^{* \square}$	53.79

注:与空白对照组相比, $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$;与阳性对照组相比, $^{\&} P < 0.05$, $^{\square} P < 0.01$ 。

化合物 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对 3TC 耐药 HBV DNA 同样具有较好活性,对上清和胞内 HBV DNA 的抑制作用均呈现明显的浓度依赖性.3TC 对耐药株的抑制率与野生株相比明显降低,对

上清和胞内 HBV DNA 的抑制率分别为 16.65%和 22.16%。GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对耐药株 HBV DNA 的抑制作用均高于 3TC,且没有明显的耐药性。其中作用最强的是 GY005,1 μmol/L 的 GY005 对细胞上清和胞内 HBV DNA 的抑制率分别为 72.97%和 80.05%(表 5,图 3,图 4)。

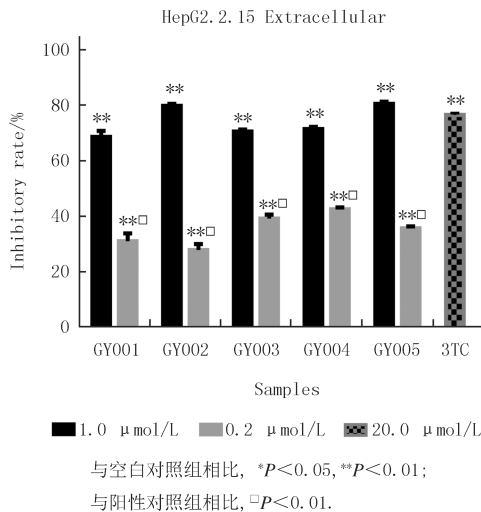


图1 GY001, GY002, GY003, GY004, GY005对野生型HBV DNA 的细胞外抑制作用

Fig. 1 Extracellular inhibitory effect of GY001, GY002, GY003, GY004 and GY005 on wild type HBV DNA

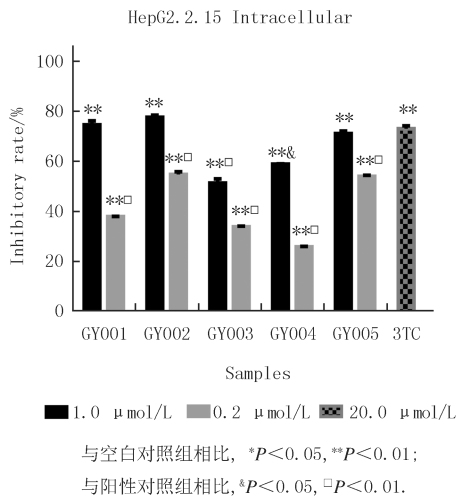


图2 GY001, GY002, GY003, GY004, GY005对野生型HBV DNA 的细胞内抑制作用

Fig. 2 Intracellular inhibitory effect of GY001, GY002, GY003, GY004 and GY005 on wild type HBV DNA

表 5 GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对 3TC 耐药型 HBV DNA 的抑制作用

Tab. 5 Inhibitory effect of GY001, GY002, GY003, GY004 and GY005 on 3TC resistant HBV DNA

分组	浓度/(μmol · L ⁻¹)	上清液		胞内	
		×10 ⁵ copies/mL	抑制率/%	×10 ⁶ copies/mL	抑制率/%
对照组	—	11.80 ± 1.96	—	1.84 ± 0.36	—
3TC	20.0	9.80 ± 1.80	16.65	1.43 ± 0.12	22.16
GY001	1.0	4.28 ± 2.37 * * &	63.61	0.75 ± 0.12 * &	59.05
	0.2	7.12 ± 1.48 *	39.49	1.05 ± 0.07	42.96
GY002	1.0	5.27 ± 0.98 * * &	55.20	0.99 ± 0.62 *	45.84
	0.2	10.22 ± 2.75	13.29	1.66 ± 0.31	9.81
GY003	1.0	5.88 ± 3.68 * *	50.04	1.01 ± 0.26 *	45.08
	0.2	8.58 ± 2.76	27.24	1.41 ± 0.98	23.21
GY004	1.0	6.02 ± 1.31 * *	48.84	0.87 ± 0.12 * *	52.35
	0.2	9.19 ± 2.54	21.93	1.68 ± 0.55	8.45
GY005	1.0	3.18 ± 2.45 * * □	72.97	0.37 ± 0.06 * * □	80.05
	0.2	6.75 ± 0.31 *	42.63	1.15 ± 0.28 *	37.60

注:与空白对照组相比,* P<0.05,* * P<0.01;与阳性对照组相比,& P<0.05,□ P<0.01。

综上所述,GY001,GY002,GY003,GY004,GY005 对野生型和 3TC 耐药型 HBV DNA 均有非常好的抑制作用且没有明显的耐药性。其中,活性最好的是 GY005。

2.4 化合物对 HBV DNA 的抑制作用和毒性较小的原因初步探讨

新合成的 4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物结构里 4'-位含有空间位阻较大的叠氨基,利于阻止前病毒 DNA 链的增长,而且具有 2',3'-二脱氧核苷类化合物结构的化合物是前病毒 DNA 链生物合成的链终止剂;

分子中的五元糖环可形成氧碳翁离子,可以提高核苷化合物糖环对酶和酸糖解的稳定性;糖环上的吸电子基F原子在不改变整个分子的大小和形态的情况下可以改善化合物的生物活性;同时,结构中都含有谷氨酸,特别是化合物GY005中谷氨酸的酸的两端是甲氧酯基,其他几个化合物的氨基酸的一端是酯基或者是羧基或者是盐,在体内吸收时,酯化后能增加吸收,羧酸盐不容易吸收,这可能是GY005活性最好的原因之一.由于化合物在体内对HBV DNA的抑制作用机制比较复杂,更高层次地探讨有待继续进行大量和深入的研究工作.

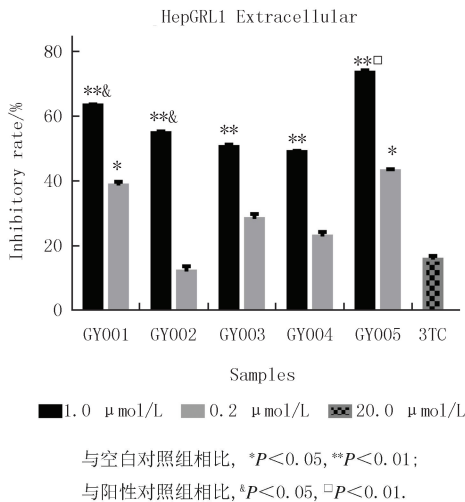


图3 GY001, GY002, GY003, GY004和GY005对3TC耐药型HBV DNA的细胞外抑制作用

Fig.3 Extracellular inhibitory effect of GY001, GY002, GY003, GY004 and GY005 on 3TC resistant HBV DNA

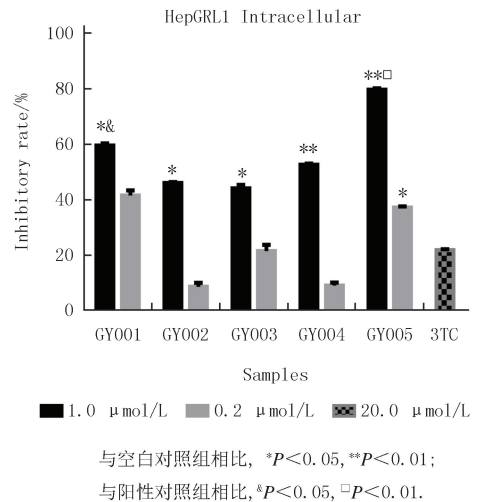


图4 GY001, GY002, GY003, GY004和GY005对3TC耐药型HBV DNA的细胞内抑制作用

Fig.4 Intracellular inhibitory effect of GY001, GY002, GY003, GY004 and GY005 on 3TC resistant HBV DNA

3 结论

总之,4-氨基酸取代嘧啶核苷类化合物(GY001, GY002, GY003, GY004, GY005)对野生型和3TC耐药型HBV细胞上清和细胞内DNA均有非常好的抑制作用,效果优于3TC,且没有表现出明显的耐药性.化合物GY001, GY002, GY003, GY004, GY005对HepG2细胞毒性较低,可初步判定这5个化合物为高效低毒化合物,对HBV都有一定的抑制作用,而且毒性都不是太大,其中GY005抗HBV活性最好,值得进一步研究.

参 考 文 献

- [1] 邵晓霜,张彦功,曾晓萍,等.4-氯苯甲酸取代马蹄金素衍生物的合成及其抗HBV活性研究[J].中南药学,2020,18(2):177-182. SHAO X S, ZHANG Y G, ZENG X P, et al. Synthesis and anti-HBV activity of 4-chlorobenzoic acid substituted derivative of Matijun-Su [J]. Central South Pharmacy, 2020, 18(2): 177-182.
- [2] OTT J J, STEVENS G A, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [3] GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2015, 385(9963): 117-171.
- [4] LIU Y, PENG Y M, LU J J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new 1,2,3-triazolo-2'-deoxy-2'-fluoro-4'-azido nucleoside derivatives as potent anti-HBV agents [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 143: 137-149.
- [5] KENNEDY M, ALEXOPOULOS S P. Hepatitis B virus infection and liver transplantation [J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2010, 15(3): 310-315.
- [6] LAVANCHY D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2004, 11(2): 97-107.

- [7] YUEN M F, LAI C L. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 26: 138-143.
- [8] KIM S R, YANG J, KUDO M, et al. Recent advances in the management of chronic hepatitis B[J]. *Hepatitis Monthly*, 2011, 11(8): 601-611.
- [9] 郭晓河, 陶乐, 李玉江, 等. 4-氨基酸取代嘧啶核苷化合物及其药物用途: CN109265504A[P]. 2019-01-25.
- [10] TAO L, LI Y J, GUO X H, et al. Synthesis and anti-CVB₃ activity of 4-amino acid derivative substituted pyrimidine nucleoside analogues [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30(1): 126770.
- [11] 陶乐, 郭晓河, 常俊标, 等. 4-氨基酸取代嘧啶核苷化合物在抗乙型肝炎病毒药物中的应用: CN110169975A[P]. 2019-08-27.
- [12] 常俊标, 安浩云, 余学军, 等. 嘧啶核苷类衍生物、合成方法及其在制备肿瘤、抗病毒药物中的应用: CN201110245782.1[P]. 2014-01-22.
- [13] 国家食品药品监督管理局. 抗病毒药物病毒学研究申报资料要求的指导原则[S]. 2012.
- [14] YANG Q H, KANG J F, ZHENG L Y, et al. Synthesis and biological evaluation of 4-substituted fluoronucleoside analogs for the treatment of hepatitis B virus infection[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(9): 3693-3703.

Anti-HBV activity of 4-amino acid substituted pyrimidine nucleosides

Guo Xiaohé¹, Chen Yajuan^{1,2}, Li Yujiang¹, Tao Le¹, Dong Lihong¹, Wang Qiang¹, Chang Junbiao^{3,2}

(1. High & New Technology Research Center, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 475001, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: HepG2.2.15 cells transfected with wild-type hepatitis B virus HBV cellular and HepGRL1 cells transfected with lamivudine-resistant HBV were used as experimental cells. The effects of 4-amino acid substituted pyrimidine nucleosides (GY001-GY005) on hepatitis B e antigen (HBeAg) and Hepatitis B surface antigen (HBsAg) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The toxicity of 4-amino acid substituted pyrimidine nucleosides (GY001-GY005) on HepG2 cells was determined by tetramethylazo blue (MTT) method, and the effects of 4-amino acid substituted pyrimidine nucleosides (GY001-GY005) on HBV DNA copy number in cell supernatant and in cell were detected by FQ-PCR. The results showed that in HepG2.2.15 cells and HepGRL1 cells, GY001, GY002, GY003, GY004, GY005 had very good inhibitory effect on HBV DNA in cell supernatant and cell, and the effect was better than that of 3TC, showing no obvious drug resistance; GY001, GY002, GY003, GY004, GY005 had less toxicity to HepG2 cells, and the median cytotoxic concentration (CC_{50}) of GY002 and GY005 was more than 1 000. The CC_{50} of GY001 and GY003 were 963.69 $\mu\text{mol/L}$ and 994.49 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The toxicity of GY004 was slightly higher, and the CC_{50} was 545.12 $\mu\text{mol/L}$.

Keywords: 4-amino acid substituted; pyrimidine nucleoside compounds; anti HBV activity

[责任编辑 赵晓华 陈留院]