

奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺对 甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用

蒋虹, 金光丛, 喆, 鲍琳琳, 秦川, 魏强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 细胞水平测试奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺对甲型流感 H1N1 病毒的抑制或杀伤作用。方法 通过在 MDCK 细胞系和甲型 H1N1 病毒株间建立药物剂量-效应关系确定导致细胞死亡的效力与抑制病毒复制的效力的比值(治疗指数), 测试药物的抗病毒效果。结果 奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺对 MDCK 细胞的半数中毒浓度分别为 $(1134.7 \pm 186.8) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(742.0 \pm 76.9) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(94.6 \pm 1.9) \mu\text{g}/\text{mL}$, 对甲型 H1N1 病毒的治疗指数(TI)分别为 71.19、24.9 和 3.12。结论 奥司他韦对甲型 H1N1 病毒抑制作用最强, 利巴韦林其次, 盐酸金刚乙胺对甲型 H1N1 病毒抑制效果较弱。

【关键词】 病毒, 甲型 H1N1; 奥司他韦; 利巴韦林; 盐酸金刚乙胺

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0023-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.06

Antiviral Activity of Oseltamivir Phosphate, Ribavirin and Rimantadine Hydrochloride on Influenza A/ H1N1 Virus in Vitro

JIANG Hong, JIN Guang, CONG Zhe, BAO Lin-lin, QIN Chuan, WEI Qiang

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory
Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models,
State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the antiviral activity of oseltamivir phosphate, ribavirin and rimantadine hydrochloride on influenza A (H1N1) in vitro. **Methods** Drugs diluted in FCS-free DMEM media supplemented with $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-treated trypsin was applied to confluent MDCK cell monolayers for 1 h prior to addition of virus, at a challenge dose of one hundred times of the TCID₅₀. The IC₅₀ of drugs were calculated using neutral red assay after 3 days treatment at 34°C. **Results** The therapeutic index (TI) of oseltamivir phosphate against influenza A (H1N1) virus was 61.90, ribavirin was 42.86, and rimantadine hydrochloride was 6.22. Ubenimex was lower than 1.00. **Conclusions** Influenza virus is sensitive to oseltamivir phosphate and ribavirin. The antiviral effect of rimantadine hydrochloride is significantly lower than that of oseltamivir phosphate and ribavirin.

【Key words】 Influenza A (H1N1) virus; Oseltamivir phosphate; Ribavirin; Rimantadine Hydrochloride

[基金项目]北京市科技计划课题,编号:Z09000700090904。

[作者简介]蒋虹,女,研究方向:实验病毒学。

[通讯作者]魏强,男,教授,博士生导师,研究方向:病毒学。

奥司他韦(oseltamivir)别名:达菲是特异性抑制神经氨酸酶的活性,阻止病毒颗粒释放的一种最有效的抗流感病毒的药物,2002 年下半年在中国上市,已广泛应用于临床治疗^[1]。抗病毒化合物利巴韦林(ribavirin)又名病毒唑,是单磷酸次黄嘌呤核苷(IMP)脱氢酶抑制剂,抑制 IMP 而阻碍病毒核酸合成的广谱强效的抗病毒药物^[2]。盐酸金刚乙胺(rimantadine hydrochloride)为治疗和预防病毒性感冒的一线用药,对于流感的预防与早期治疗均有明显的效果^[3]。但 2009 年暴发“人感染猪流感”疫情,此次疫情的病原为变异后的新型甲型 H1N1 流感病毒,目前已在人类感染者体内发生变异,变异后的病毒对流感药物产生了明显的抗药性。世卫组织在 09 年 7 月首次收到关于大流行性流感病毒对奥司他韦具有耐药性的报告。随着世界许多地区流感活动增加^[4],以及抗病毒药物的使用亦相应增多,这些事件的数量也在稳步增加。甲型 H1N1A/California/7/09 病毒株^[5,6]是 2009 年多区域检测到的动物源性的能够人与人传播的病毒株,我们选择奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺 3 种药物对甲型 H1N1A/California/7/09 体外抑制作用进行测试,对药物的抗病毒作用有一基本了解。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

MDCK 细胞(Madin Darby canine kidney)由中国医学科学院病原生物学研究所提供,细胞生长为含有 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、100 U 青链霉素的 DMEM(Hyclone)培养液。

甲型 H1N1-CA7(A/California/7/09)病毒,鸡胚尿囊液^[7]。用 MDCK 细胞扩增培养,维持液为 DMEM 培养液(Hyclone)含 2% 胎牛血清(Gbico)和终浓度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK。病毒半数细胞感染剂量(TCID₅₀)为 6.5。所有病毒操作在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级(ABSL-3)实验室进行。

1.2 测试药物

奥司他韦(达菲),批号 090336,上海药物所提供。利巴韦林,四川百利药业有限责任公司提供。盐酸金刚乙胺,批号 Ky-Ru-MHA01,浙江普洛康制药有限公司提供。用维持液配制药至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作为药物毒性实验的起始浓度。0.2 μm 滤器过滤除菌。

1.3 病毒滴定

甲型 H1N1 病毒接种于 MDCK 细胞 96 孔培养

板中,34 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 3 d 后观察细胞病变。弃上清液加入 100 μL 0.5% 中性红(Sigma) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 1 h, PBS 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 乙酸乙醇(1% 乙酸 50% 乙醇)酶标仪 540 nm 读取吸光度值,计算病毒的半数感染剂量(TCID₅₀)^[8]。

1.4 药物对 MDCK 细胞毒性实验

药物毒性实验的起始浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 倍系列稀释药物,加入到单层 MDCK 细胞 96 孔培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养,每天观察细胞病变。第 5 天培养板中加入 CCK-8(同仁化学研究所公司),每孔 10 μL ,将培养板放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 孵箱中 3 h。酶标仪读板测定吸光度值波长为 540 nm。按 Reed Muench 计算药物对细胞的毒性浓度,最大无毒浓度(TD₀),半数中毒浓度(TD₅₀)。

1.5 药物抗病毒实验

长成单层的 MDCK 细胞 96 孔培养板中,加入 100 TCID₅₀ 病毒,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 吸附 2 h,吸去病毒,受试药物用无血清 DMEM 培养基配制,从最大安全浓度起始 2 倍系列稀释,加入到板中,34 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养 3 d,观察细胞病变。去上清液,加入 0.5% 中性红,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 作用 1 h。弃去中性红, PBS(PH 7.2) 洗涤 3 次,弃去 96 孔培养板中液体,加入乙酸乙醇(1% 乙酸 50% 乙醇),每孔 100 μL ,室温放置 15 min,540 nm 测定 A 值。计算药物抑制病毒半数有效浓度(IC₅₀)。

1.6 评价指标

药物对病毒的抑制率的曲线、药物对细胞 50% 毒性浓度与对病毒 50% 抑制浓度的比值(TC₅₀/IC₅₀)即治疗指数(therapeutic index, TI)^[9,10]。

2 结果

2.1 药物毒性

根据药物对 MDCK 细胞破坏率计算出药物半数中毒浓度和药物的安全浓度,奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺的半数中毒浓度分别为(1134.7 \pm 186.8) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(742.0 \pm 76.9) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(94.6 \pm 1.9) $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)对细胞的安全浓度分别为 156.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、39.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 药物对甲型 H1N1 病毒的抑制作用

奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺与 100 TCID₅₀ 甲型 H1N1 病毒作用,用细胞观察法和中性红测试细胞活性的方法获得药物对病毒的抑制率(图 1)和药物抑制病毒半数有效浓度(IC₅₀)(表 1)。奥司他韦药物在对 MDCK 细胞的安全浓度(156.3 ~ 19.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对病毒的抑制率达到 80% 以

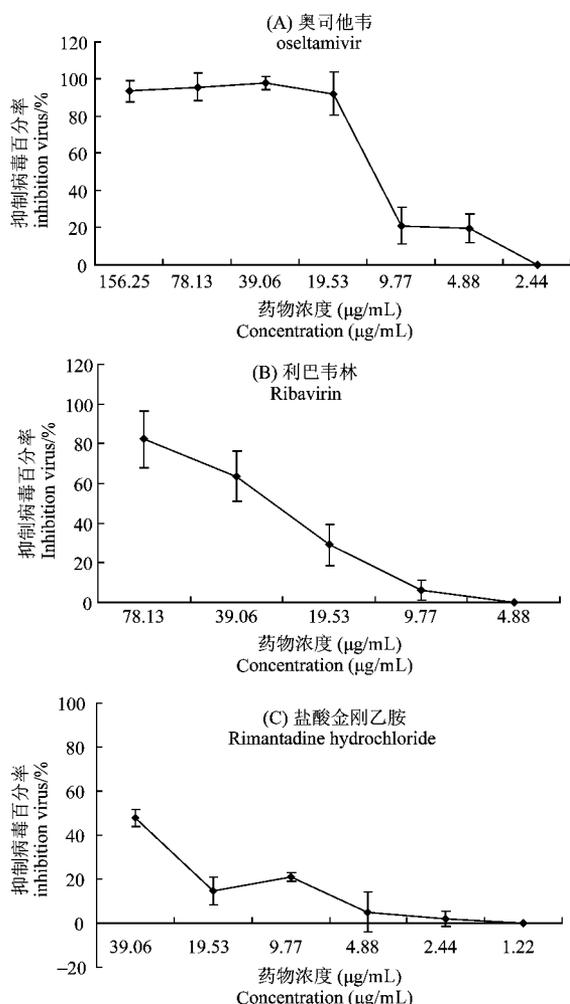


图 1 药物对甲型 H1N1-CA7 病毒的抑制率
(A) 奥司他韦、(B) 利巴韦林、(C) 盐酸金刚乙胺

Fig. 1 The inhibition rate of influenza A(H1N1) virus.
(A) Oseltamivir phosphate, (B) Ribavirin,
(C) Rimantadine hydrochloride

表 1 药物对甲型 H1N1 病毒的抑制作用

Tab. 1 The inhibitory effects of compounds on H1N1-CA7 virus infection

药物名称 Compounds	药物对细胞的半数中毒浓度 CC ₅₀ (µg/mL)	药物抑制病毒半数有效浓度 IC ₅₀ (µg/mL)	治疗指数 SI (CC ₅₀ / IC ₅₀)
奥司他韦 Oseltamivir phosphate	1134.7 ± 186.8	15.9 ± 0.8	71.19
利巴韦林 Ribavirin	742.0 ± 76.9	29.8 ± 6.7	24.90
盐酸金刚乙胺 Rimantadine hydrochloride	94.6 ± 1.9	30.32 ± 2.6	3.12

注:表中显示的药物对细胞的半数中毒浓度和药物抑制病毒半数有效浓度为 3 次重复实验的结果。

Note: The Experiments were repeated three times, and the averages of IC₅₀ and CC₅₀ are shown. SI corresponds to CC₅₀ / IC₅₀.

上,随后浓度到 4.88 µg/mL 仍有 20% 的抑制作用,治疗指数为 71.19。利巴韦林浓度在 (78.13 ~

4.88) µg/mL 之间对病毒的抑制作用 80% 逐渐递减,治疗指数为 24.90。盐酸金刚乙胺对病毒的抑制率只有在浓度为 78.3 µg/mL 时达到 50%,治疗指数为 3.12。

3 讨论

三种药物对甲型 H1N1A/California/7/09 病毒株在细胞水平抑制病毒的作用测试结果表明,奥司他韦抑制病毒作用强,治疗指数、安全性高。据报道,奥司他韦抑制神经氨酸酶的活性,具有特异性针对流感病毒释放的功效,体外实验证实与抗病毒类药物如利巴韦林、盐酸金刚乙胺相比,显示出明显的优势。虽然利巴韦林对甲型 H1N1A 病毒也有一定的抑制作用,但效果不如奥司他韦。盐酸金刚乙胺对甲型 H1N1A 病毒抑制效果较弱。三种药物通过细胞水平测试得到以上结果,但实际在人体内、动物体内的抗病毒作用因药物代谢作用不得而知,还应进行深入研究。

参考文献:

- [1] Dharan NJ; Gubareva LV; Meyer JJ, et al. Infection with oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in the United States [J]. JAMA, 2009, 301(10):1034-1041.
- [2] Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, et al. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, p. 946-951.
- [3] 高长有. 盐酸金刚乙胺防止流行性感冒的疗效分析 [J]. 临床心身疾病杂志, 2007, 13(5):442.
- [4] Rohloff J C, Kent K M, Postich M J, et al. Practical total synthesis of the anti-influenza drug GS-4104 [J]. Org Chem, 1998, 63(13):4545-4550.
- [5] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. Nature, 2009, 459:931-939.
- [6] Soundararajan V, Tharakaraman K, Raman R, et al. Extrapolating from sequence—the 2009 H1N1 “swine” influenza virus [J]. Nat Biotechnol. 2009, 27:510-513.
- [7] Chen Z, Wang W, Zhou H, et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs [J]. J Virol. 2010, 84(1):44-51.
- [8] 黄祚祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京科学出版社. 1990:661-693.
- [9] 新药(西药)临床及临床前研究指导原则 [S]. 中华人民共和国卫生部药政局. 1993:170-171.
- [10] 国家食品药品监督管理局国家药品标准 [S]. WS1-(X-251)-2004Z.

(修回日期) 2010-09-27