

氯喹联合用药体外抗 HIV-1 作用研究

向思颖^{1,2}, 陈敏^{2,3}, 陈欢^{2,3}, 罗荣华², 杨柳萌², 卿晨¹, 郑永唐^{2*}

- (1. 昆明医科大学药学院, 云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南省活性多肽研究与利用重点实验室/中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要: 本文评价氯喹与已上市抗 HIV 药物联合使用的体外抗 HIV-1 作用和抑制 TLR7 激动剂引起的浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) 活化及 I 型干扰素分泌上调的作用。采用 MTT 法检测氯喹对 C8166、TZM-bl、PBMC 细胞的毒性。采用荧光素酶活性检测方法、ELISA 检测 p24 抗原测定氯喹分别与雷特格韦 (raltegravir, RAL)、恩夫韦肽 (enfuvirtide, T-20)、茚地那韦 (indinavir, IDV) 和依法韦仑 (efavirenz, EFV) 联合用药抗 HIV-1_{III_B}、HIV-1_{KM018} 活性。流式细胞术检测氯喹分别与 RAL、IDV 联合使用对细胞 pDC 活化水平的影响。定量 PCR 检测氯喹分别与 RAL、IDV 联合使用对细胞内 IFN- α 、IFN- β mRNA 水平上调的影响。结果表明, 氯喹对 C8166、TZM-bl 和 PBMC 细胞表现出较低的细胞毒性, 半数细胞毒浓度 (median cytotoxic concentration, CC₅₀) 分别为 85.02±0.28、73.67±5.10 和 91.84±4.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。氯喹分别与 RAL、T-20、IDV、EFV 联合用药呈中度协同、强协同、相加、中度拮抗效果。氯喹分别与 RAL、IDV 的联合使用相比于氯喹单独使用对 pDC 活化水平和 IFN- α 、IFN- β mRNA 表达水平的下调作用无统计学差异。本研究发现氯喹与不同类型的已上市抗 HIV 药物联合使用呈现不同程度的协同、拮抗或相加抗 HIV-1 作用。氯喹分别与 RAL、IDV 联合使用不影响氯喹对 TLR7 激动剂引起的 pDC 活化和 I 型干扰素分泌上调的抑制作用。本研究希望能够给氯喹应用于抗 HIV 治疗提供参考, 促进氯喹更广泛地应用于临床研究和治疗中。

关键词: 氯喹; 人类免疫缺陷病毒-1; 联合用药; 浆细胞样树突状细胞活化

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0227-09

The combined anti-HIV-1 effect of chloroquine and antiretroviral drugs *in vitro*

XIANG Si-ying^{1,2}, CHEN Min^{2,3}, CHEN Huan^{2,3}, LUO Rong-hua²,
YANG Liu-meng², QING Chen¹, ZHENG Yong-tang^{2*}

- (1. School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Key Laboratory of Bioactive Peptides of Yunnan Province /Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The study is aimed to evaluate the anti-HIV-1 effect of chloroquine in combination with anti-human immunodeficiency virus (HIV) drugs, and inhibition of plasmacytoid dendritic cells (pDC) activation and type I interferon (IFN-I) production by Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist stimulation. We investigated the

收稿日期: 2017-08-30; 修回日期: 2017-10-10.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2009ZX09501-029, 2014ZX10005-002); 国家自然科学基金资助项目 (81102483); 国家重点研发项目课题 (2016YFC1201000); 云南省应用基础研究计划 (2015FB182).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0853

anti-HIV-1_{III}B, HIV-1_{KM018} activity of chloroquine and chloroquine combined with raltegravir (RAL), enfuvirtide (T-20), indinavir (IDV) and efavirenz (EFV) *in vitro* by luciferase activity assay system and ELISA method for p24 antigen. We measured the effect of chloroquine on the activation of pDC in combination with RAL and IDV, respectively. Quantitative PCR was used to evaluate the activity of chloroquine in combination with RAL and IDV in the upregulation of interferon (IFN) α and IFN- β . Chloroquine showed less cytotoxicity to C8166, TZM-bl and PBMC cells, and the 50% cytotoxic concentration values were 85.02 ± 0.28 , 73.67 ± 5.10 and $91.84 \pm 4.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The anti-HIV-1_{III}B activity of chloroquine combination with RAL, T-20, IDV and EFV were moderate in synergy, strong in synergy, additive and moderate antagonism, respectively. The anti-HIV-1_{KM018} activity of chloroquine in combination with RAL, IDV were moderate synergy, minor synergy. There was no significant difference between the chloroquine monotherapy and chloroquine combined with RAL, IDV in the down-regulation of pDC activation and IFN- α , IFN- β expression levels. We have found that chloroquine combined with different anti-HIV drugs represent different degrees of synergism, antagonism or additive anti-HIV-1 effect. Chloroquine in combination with RAL and IDV did not have influence on the inhibitory effect of chloroquine on pDC activation and type I interferon secretion induced by TLR7 agonist. The results suggest that chloroquine may be used to enhance the therapeutic activities of anti-HIV medicines.

Key words: chloroquine; human immunodeficiency virus-1; combination therapy; plasmacytoid dendritic cells activation

艾滋病, 即获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的感染引起患者自身免疫缺陷, 进而诱发机会性感染和多种癌症的严重疾病^[1]。30 多年来, 艾滋病持续在全球范围内蔓延, 全球大约累计有 3670 万 HIV 感染者。截至 2017 年 4 月底, 我国累计报告 HIV 感染者/AIDS 患者 916 198 例, 其中报告死亡 216 727 例^[2], 艾滋病已经成为严重危害公共健康的重大问题。

联合抗逆转录病毒疗法 (combined antiretroviral therapy, cART) 即多种抗病毒药物联合用药治疗 HIV/AIDS。cART 的使用有效地降低了 HIV/AIDS 的发病率和死亡率, 提高了患者的生存质量和延长了寿命。由于耐药毒株的产生和无法清除病毒, HIV/AIDS 依然无法完全治愈^[3], 寻找和现有药物作用机制不同的抗 HIV 药物应用于 cART 有重要临床意义。抗疟疾药物氯喹 (chloroquine, CQ) 被发现具有一定的抗 HIV 活性, 其抗病毒机制不同于目前上市的抗 HIV 药物^[4]。

HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 糖基化位点可藏匿病毒表位, 帮助病毒逃逸宿主免疫监视^[5, 6], 氯喹通过改变 gp120 糖基化位点构象, 使得病毒糖基化异常, 降低新生病毒的感染能力, 抑制病毒复制^[7]。氯喹还具有抑制 HIV-1 通过 Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 通路引起的浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) 活化及 I 型干扰素分泌上调的作用, 可抑制免疫活化, 减缓 AIDS 疾病进程^[8-10]。

本研究在体外对氯喹与各靶点抗 HIV 药物联合用药药效学进行了评价, 并进一步检测氯喹与 HIV 整合酶抑制剂雷特格韦 (raltegravir, RAL)、蛋白酶抑制剂茚地那韦 (indinavir, IDV) 联合用药是否影响其对 TLR7 通路的抑制作用, 旨在寻求氯喹联合用药抗 HIV 治疗方案。

材料与方法

试剂 噻唑蓝 [3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide, MTT]、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、Triton X-100、青霉素 (penicillin)、谷氨酰胺 (glutamine)、胰蛋白酶、碳酸氢钠、碳酸钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、二甲基亚砷 (DMSO)、PHA-P、抗 IgG Fc 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethyl formamine, DMF)、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇购自四川西陇化工有限公司; 雷西莫特 (resiquimod, R848) 为大连美仑生物技术有限公司产品; 胎牛血清 (FBS)、RPMI-1640、DMEM 购自 Gibco 公司; 白细胞介素-2 (IL-2) 为山东泉港生物科技有限公司产品; 抗 HIV p24 单克隆抗体和兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体由本实验室制备; 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC)、TRIzol[®] reagent (Ambion, Life Technologies)、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Ti RNaseH Plus) Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

药物 CQ、齐多夫定 (zidovudine, AZT) 购自 Sigma 公司; 恩夫韦肽 (enfuvirtide, T-20) 为 Roche 公司产品; RAL 购自北京汇康博源医药科技有限公司; IDV 购自 GlaxoSmithKline 公司; 依法韦仑 (efavirenz, EFV) 购自 United States Pharmacopoeia 公司。CQ、AZT 和 T-20 溶解于完全培养基中, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后置于 -20°C 保存; RAL 和 IDV 溶解于 DMSO 中, 4°C 保存。

细胞与病毒 TZM-bl 细胞、HIV-1 实验株 HIV-1_{11IB} 由英国 MRC AIDS Reagent Project 惠赠; C8166 细胞来自于美国国立卫生研究院; PBMC 由健康献血者浓缩白细胞分离获得。HIV-1 临床分离株 HIV-1_{KM018} 从云南省 AIDS 患者体内分离培养获得^[1]。所有细胞使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基, 37°C 、5% CO_2 培养。

氯喹对 C8166、TZM-bl、PBMC 细胞毒性实验 将细胞浓度为每毫升 4×10^5 个 C8166 细胞悬液、 2×10^5 个 TZM-bl 细胞悬液、 5×10^6 个 PHA-P 刺激转化的 PBMC 细胞悬液 100 μL 分别与倍比稀释的氯喹溶液 100 μL 在 96 孔细胞培养板内混合, 每个浓度设 3 个重复孔, 同时设置不含化合物的阴性对照孔和只添加细胞培养液的空白对照孔; 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。C8166 细胞培养 72 h, TZM-bl 细胞培养 48 h, PBMC 培养 4 天后每孔补添含有 IL-2 (终浓度 50 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 RPMI-1640 完全细胞培养基 100 μL 继续培养 3 天, 加入 MTT 溶液 20 μL (PBMC 加入 30 μL), 37°C 、5% CO_2 孵育 4 h, 每孔弃 100 μL 上清, 加入 SDS-DMF 溶液 100 μL , 37°C 过夜。ELx800 ELISA 酶标仪测定 OD 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长 630 nm。计算得到 CC_{50} 值 (50% cytotoxic concentration), 即对 50% 的细胞产生毒性时的化合物浓度。

氯喹联合用药对 HIV-1_{11IB} 急性感染 C8166 细胞中病毒复制的抑制实验 将氯喹、IDV 分别进行 2 倍浓度递度稀释, 氯喹共 7 个浓度, IDV 共 6 个浓度。起始浓度分别为 $48.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $58.24 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按药物浓度从高到低分别吸取不同浓度的氯喹 50 μL , 分别加入 96 孔细胞培养板的 9-3 列, 第 2 列加入 RPMI-1640 新鲜完全培养基 50 μL 。按浓度高到低分别吸取不同浓度的 IDV 分别加入 96 孔板第 A~F 行, 第 G 行加入 RPMI-1640 新鲜完全培养基 50 μL 。设置不加药物的病毒对照和只添加培养基的空白对照, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AZT 为阳性对照。

将细胞浓度为每毫升 4×10^5 个 C8166 细胞与 HIV-1_{11IB} (MOI=0.04) 在 37°C 下感染 2 h, 用 PBS 离

心洗涤 3 次后取 100 μL 细胞接种到含有 100 μL 药物的 96 孔板上, 37°C 、5% CO_2 培养 72 h。培养上清离心后收集, 用终浓度 0.5% Triton X-100 裂解灭活, 采用捕捉 p24 抗原 ELISA 方法检测药物对 HIV-1_{11IB} 复制的抑制作用, 计算 p24 表达抑制率^[12, 13]。

氯喹联合用药对 HIV-1_{11IB} 在 TZM-bl 细胞中病毒复制的抑制实验 将氯喹、RAL、T-20 和 EFV 分别进行 2 倍浓度递度稀释, 氯喹共 7 个浓度, RAL、T-20 和 EFV 共 6 个浓度。起始浓度分别为 $34.612 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.472 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $13.928 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.724 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按药物浓度从高到低分别吸取不同浓度的氯喹 50 μL , 分别加入 96 孔细胞培养板的 9-3 列, 第 2 列加入 DMEM 新鲜培养基 50 μL 。按浓度高到低吸取不同浓度的 RAL、T-20 或 EFV 分别加入 96 孔板第 A~F 行, 第 G 行加入 DMEM 新鲜培养基 50 μL 。设置病毒阳性对照和空白对照, AZT 为阳性对照。

TZM-bl 细胞携带有荧光素酶报告基因, 该报告基因受 HIV-1 Tat 元件调控, 只有在 HIV-1 Tat 蛋白存在的情况下才能有效表达。利用 HIV-1 病毒感染该细胞后, 表达 Tat 蛋白, 从而上调荧光素酶基因表达, 继而通过检测荧光素酶的表达情况以判断 HIV-1 的感染与复制效率。使用 HIV-1_{11IB} (MOI=0.04) 感染的 TZM-bl 细胞 (细胞浓度为每毫升 2×10^5 个), 并将其接种到含有药物的 96 孔培养板上, 37°C 、5% CO_2 培养 48 h 后 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入细胞裂解液 80 μL , 4°C 裂解 1 h。将配好的荧光素酶底物与细胞裂解液以 1:1 的比例在 96 孔白板上混合后, 在全功能连续波长扫描微孔板分析系统上检测相对荧光单位 (RLU), 计算荧光素酶表达抑制率。

氯喹联合用药对临床分离株 HIV-1_{KM018} 在 PBMC 中复制的抑制实验 将氯喹、RAL、IDV 分别进行 2 倍浓度递度稀释, 氯喹共 6 个浓度, RAL、IDV 共 5 个浓度。起始浓度分别为 $27.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.98 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $36.36 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按药物浓度从高到低分别吸取不同浓度的氯喹 50 μL , 分别加入 96 孔细胞培养板的 8-3 列, 第 2 列加入 RPMI-1640 新鲜完全培养基 50 μL 。按浓度高到低吸取不同浓度的 IDV 分别加入 96 孔板第 A~E 行, 第 F 行加入 RPMI-1640 新鲜完全培养基 50 μL 。设置病毒对照和空白对照, AZT 为阳性对照。

收集 PHA 刺激 72 h 的 PBMC, 用含有 IL-2 的 1640 完全培养基重悬细胞, 调细胞浓度为每毫升 5×10^6 个, 加入 HIV-1_{KM018} (MOI = 0.06), 37°C 感染 4 h 后, PBS 离心洗涤 3 次。每孔滴加细胞悬液 100 μL

至含有 100 μL 不同浓度氯喹的 96 孔板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 96 h 后, 每孔补加含有 IL-2 的细胞培养基 100 μL , 继续培养 72 h 后, 收集培养上清, 用 Triton X-100 裂解灭活。采用捕捉 p24 抗原 ELISA 方法, 计算药物对 HIV-1_{KM018} 在 PBMC 中复制表达 p24 抗原的抑制率^[11, 14]。

联合用药实验数据分析 Bliss independence 和 Loewe additivity 为目前主要使用的两种药物联合使用评价模型, 评价药物相互作用的方法都基于这两种模型。本研究采用 MacSynergy II 程序对联合用药的实验数据进行分析, 评价两种药联合使用呈现的相互作用。MacSynergy II 程序计算是基于 Bliss Independence 模型定义的理论药物累积作用^[15]。MacSynergy II 程序通过各药物单独的剂量效应曲线计算得出药物的累积平面, 即理论药物累积作用, 然后从联合实验所得的剂量-效应累积平面中减去理论累计平面, 获得非累积效应活性区域, 实验剂量效应累积平面的 95% 可信区间用于统计学上的数据评价, 如果累积平面为水平面, 则为相加作用, 累积平面上出现峰为协同作用, 平面下出现谷为拮抗作用。协同/拮抗图中的峰/谷单位为浓度 \times 浓度 \times 百分比 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$, 峰/谷的大小是对协同/拮抗作用的定量检测。MacSynergy II 程序计算出每组联合用药的正值(协同作用)或负值(拮抗作用), 正值总和为协同作用大小, 负值总和为拮抗作用大小, 轻度协同作用定义为药物联合作用时产生的协同量 25~50 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 。中度协同和高度协同活性分别定义为产生 50~100 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 和 >100 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 的协同量。药物相加作用定义为协同量在-25~25 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 之间, 轻度拮抗、中度拮抗和高度拮

抗作用则被认为是协同量分别在 -25 ~ -50 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 、-50 ~ -100 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ 以及 <-100 $[(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})^2\%]$ ^[16], 整合 3 次重复实验的抗病毒协同数据 (95% 置信区间), 计算联合用药的平均值。

氯喹联合用药对 TLR7 刺激剂活化 pDC 的影响 将浓度为每毫升 2×10^6 个的 PBMC 接种于 24 孔板上, 设置对照组、TLR7 刺激剂 R848 刺激组、R848+氯喹 ($110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组、R848+RAL ($1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组、R848+氯喹联合 RAL 刺激组、R848+IDV ($3.525 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组和 R848+氯喹联合 IDV 刺激组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 20 h, 离心, DPBS-BSA 重悬, 抗体混合液染色 (所用抗体如表 1), 冰上孵育 30 min, 染色缓冲液洗涤, 离心弃上清, 加入染色缓冲液重悬, 用流式细胞仪检测 pDC 活化情况。

氯喹联合用药对 TLR7 刺激剂引起的 IFN- α 、IFN- β 表达的影响 将浓度为每毫升 2×10^6 个 PBMC 接种于 24 孔板上, 设置对照组、TLR7 刺激剂 R848 刺激组、R848+氯喹 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组、R848+RAL ($0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组、R848+氯喹联合 RAL 刺激组、R848+IDV ($1.7625 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激组和 R848+氯喹联合 IDV 刺激组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 6 h。收集各组细胞, 提取细胞的总 RNA, 然后使用实时荧光定量 PCR 检测不同处理组 PBMC 中 IFN- α 、IFN- β mRNA 表达水平, 引物序列见表 2。由软件 Primer Premier 5.0 设计, 实验操作严格按照试剂盒说明书进行, 实验数据以 GAPDH 作为内参, 采用的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算方法^[17], 计算 IFN- α 、IFN- β 的相对表达量。

统计学处理 使用非配对 t 检验统计各组数据差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义, 所用统计方法通过 GraphPad Prism 5 进行计算分析。

Table 1 The monoclonal antibodies used in this study

Antigen	Fluorochrome	Clone	Isotype	Source
HLA-DR	APC-eFlour 780	LN3	Mouse IgG2b, κ	eBioscience
CD123	PerCP-Cy5.5	6H6	Mouse IgG1, κ	eBioscience
CD86	PE	IT2.2	Mouse IgG2b, κ	eBioscience
Lineage	FITC	-	Mouse	eBioscience

Table 2 Real-time PCR amplification primer

Name	GenBank	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	M33197	5'-GCTTCGCTCTCTGCTCCTCTGTT-3' (F)
		5'-ACGACCAAATCCGTTGACTCCGACC-3' (R)
IFN- α	NM_000605	5'-GATACTCCTGGCACAAATGGG-3' (F)
		5'-GCTTGAGCCTTCTGGAAGTGG-3' (R)
IFN- β	M25460	5'-CCAACAAGTGTCTCCTCCAAT-3' (F)
		5'-AATCTCCTCAGGGATGTCAAAG-3' (R)

结果

1 氯喹对细胞的毒性作用

本研究使用 MTT 比色法测定氯喹对 C8166、TZM-bl 和 PBMC 细胞的毒性作用。氯喹对 C8166 的 CC_{50} 值为 $85.02 \pm 0.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1A), 表明氯喹对 C8166 细胞具有一定的细胞毒性, 阳性药物 AZT 对 C8166 细胞毒性极小, 其 CC_{50} 值为 $5.3 \pm 0.09 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1B); 氯喹对 TZM-bl 细胞的 CC_{50} 值为 $73.67 \pm 5.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1C), 表明其对 TZM-bl 细胞也表现出了一定的细胞毒性。AZT 的 CC_{50} 值为 $2.62 \pm 0.31 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1D), 对 TZM-bl 细胞毒性很小; 图 1E 是氯喹对 PBMC 的细胞毒性实验图, 其 CC_{50} 值为 $91.84 \pm 4.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明氯喹对 PBMC 有一定的细胞毒性, AZT 的 CC_{50} 值为 $1.09 \pm 0.03 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1F), 对 PBMC 毒性很小。结果表明氯喹对不同的细胞表现出不同的细胞毒性, 且细胞存活率与药物浓度呈剂量依赖关系。

2 氯喹联合用药抗 HIV-1 作用

2.1 氯喹联合用药的抗 HIV-1_{IIIb} 作用 氯喹与整合酶抑制剂 RAL 联合用药的协同/拮抗容积量为 $99.24 \pm 19.33/0 \pm 0 [(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})^2\%]$, 表现出中度协同作用, $2.163 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯喹与 $0.046 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ RAL 联合使用时协同作用最强 (图 2A)。氯喹与进入抑制剂 T-20 联合用药的协同/拮抗容积量为 $104.72 \pm 17.83/-10.13 \pm 7.55 [(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})^2\%]$, 表现出强协同作用 (图 2B), $1.082 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯喹与 $6.96 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T-20 联合用药时呈现出最强的协同作用。氯喹与蛋白酶抑制剂联合用药的协同/拮抗容积量为 $24.74 \pm 1.29/-6.115 \pm 0.13 [(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})^2\%]$, 呈现出相加作用, 当氯喹浓度为 $1.508 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, IDV 浓度为 $1.82 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 联合用药效果最佳 (图 2C)。氯喹与非核苷类逆转录酶抑制剂 EFV 联合用药的协同/拮抗容积量为 $0.495 \pm 0.7/-63.4 \pm 19.94 [(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})^2\%]$, 显示出中度拮抗作用, $2.163 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯喹与 $0.0905 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EFV 联合用药

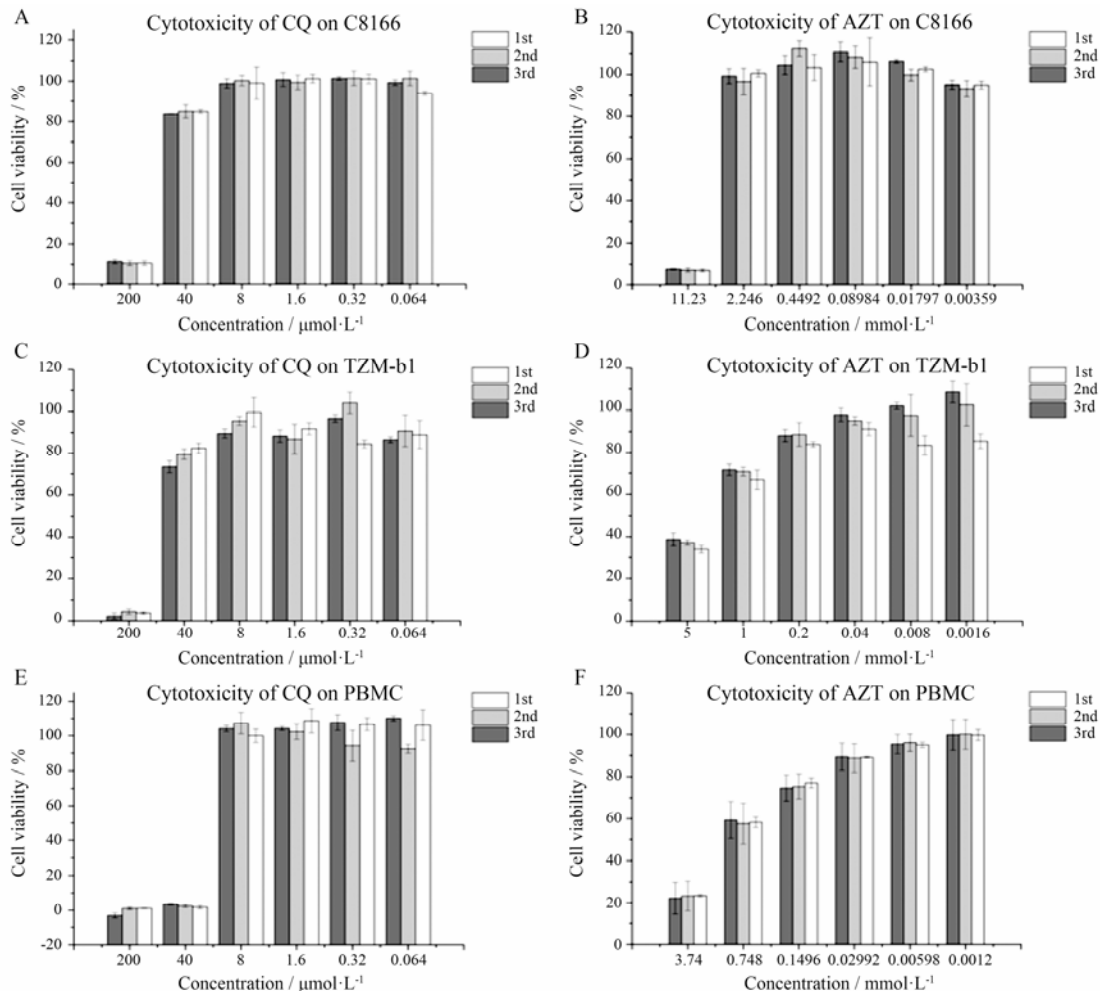


Figure 1 Cytotoxicities of CQ (A, C, E) and AZT (B, D, F) to C8166 cells, TZM-bl cells and PBMC respectively. CQ: Chloroquine; AZT: Zidovudine

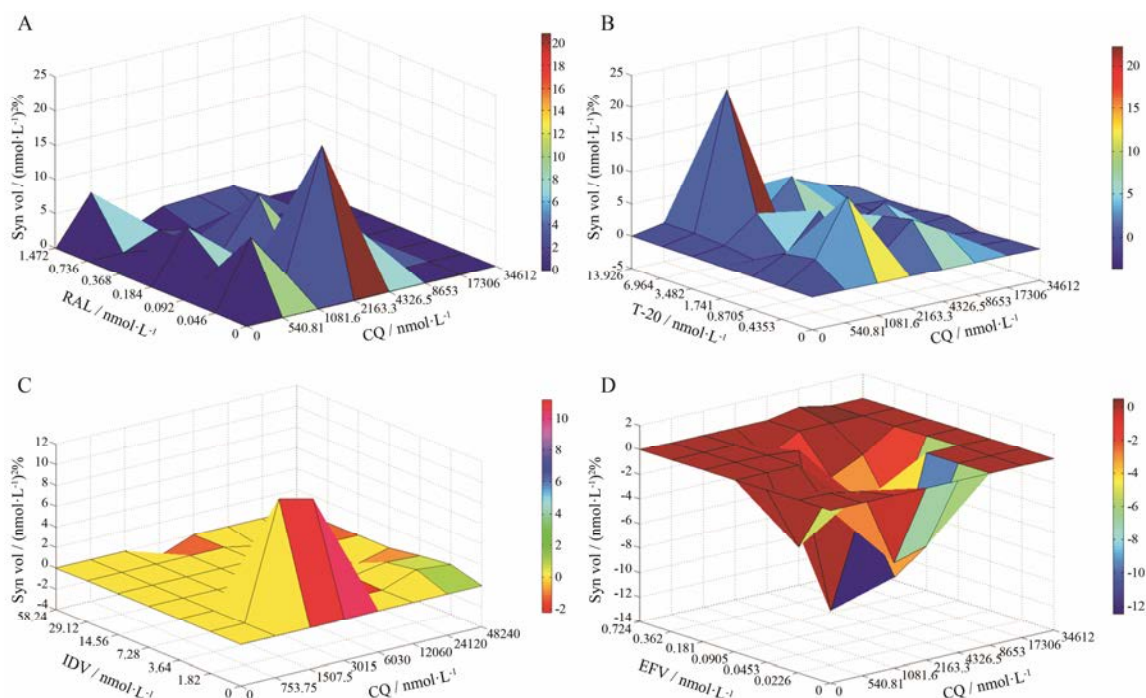


Figure 2 Inhibition of HIV-1_{IIB} replication by combinations of CQ+RAL (A), CQ+T-20 (B), CQ+IDV (C), and CQ+EFV (D). RAL: Raltegravir; T-20: Enfuvirtide; IDV: Indinavir; EFV: Efavirenz

时拮抗作用最强 (图 2D)。

结果表明, 氯喹分别与 RAL、T-20、IDV、EFV 联合使用在体外具有中度协同、强协同、相加及中度拮抗抗 HIV-1_{IIB} 作用, 并且发现浓度较低的氯喹 (0.541~8.653 μmol·L⁻¹) 分别与 RAL、T-20、IDV 联合呈现较强协同作用。

2.2 氯喹联合用药的抗 HIV-1_{KM018} 作用 氯喹与整合酶抑制剂 RAL 联合抗临床分离株 HIV-1_{KM018} 实验的协同/拮抗容积量为 63.46 ± 15.93/-44.83 ± 12.7 [(nmol·L⁻¹)²%], 表现出中度协同作用。1.7125 μmol·L⁻¹ 氯喹与 0.3725 nmol·L⁻¹ RAL 联合使用时协同作用最强; 氯喹与蛋白酶抑制剂 IDV 联合用药协同/拮抗容积量为 27.01 ± 8.07/-7.33 ± 0.32 [(nmol·L⁻¹)²%], 呈现轻度协同作用 (图 3A)。3.425 μmol·L⁻¹ 氯喹与 2.2725

nmol·L⁻¹ IDV 联合使用时协同作用最强 (图 3B)。

结果表明, 氯喹分别与 RAL、IDV 联合在体外具有中度协同、轻度协同抗 HIV-1_{KM018} 作用。低浓度氯喹 (0.856~3.425 μmol·L⁻¹) 联合用药呈现协同作用, 浓度较高时多为相加或拮抗作用。

3 氯喹联合用药对 TLR7 激动剂引起的 pDC 活化的影响

HIV 为单链 RNA 病毒, 通过 pDC 胞吞作用被吞噬进入细胞, 在 pDC 内体经过酸化之后, 暴露出病毒 RNA 链, 激活表达于内体上的 TLR7, 经 TLR7 信号通路, 活化 pDC 并引起 I 型干扰素分泌上调^[18]。氯喹为弱碱性药物, 可以通过渗透扩散进入内体, 阻断内体上 TLR7 下游的信号通路, 在体外实验中可有效地抑制 TLR7 激动剂引起的 pDC 活化及干扰素分泌

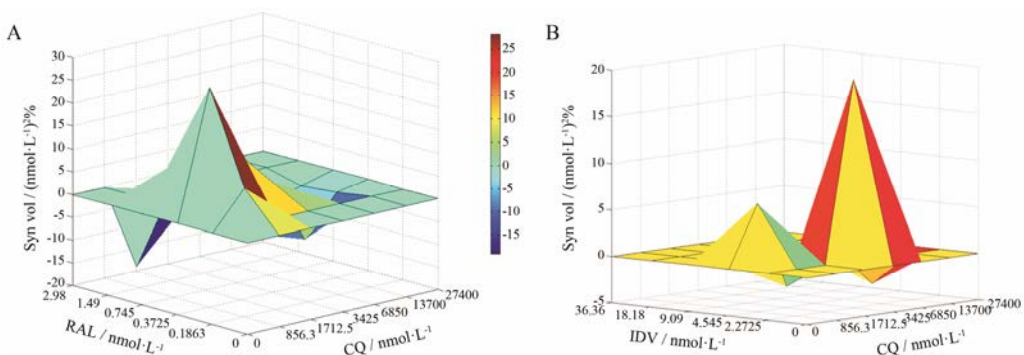


Figure 3 Inhibition of HIV-1_{KM018} replication by combinations of CQ+RAL (A), CQ+IDV (B)

水平^[8, 10]。为了检测氯喹联合用药对 TLR7 介导的 pDC 活化及 I 型干扰素分泌水平是否有影响, 本研究使用 TLR7 刺激剂 R848 对 pDC 进行刺激培养, 检测单独使用氯喹、RAL、IDV 及氯喹分别与 RAL、IDV 的联合使用对 pDC 活化及 I 型干扰素分泌的作用。

在使用药物处理 R848 刺激的 PBMC 24 h 后, 对 pDC 表面共刺激因子 CD86 的表达情况进行了分析。CD86 为 pDC 活化时的重要标志, CD86 的表达情况可有效说明 pDC 的活化水平。如图 4A~C 所示, 首

先划出 lineage⁻的 PBMC 群体, 在此基础上划出 HLA-DR⁺CD123⁺双阳性的细胞, 即 pDC, pDC 约占 PBMC 的 0.2%~0.4%, 再进一步圈出 CD86⁺的 pDC, 利用柱状图分析不同用药情况下 pDC 表面 CD86 表达水平的高低。

随后通过定量 PCR 检测 IFN- α 、IFN- β 的相对表达水平, 实验结果如图 4D~E 和图 5 所示, RAL、IDV 对 TLR7 激动剂引起的 pDC 活化及 IFN- α 、IFN- β 分泌上调没有影响。氯喹可有效地抑制 pDC 活化及

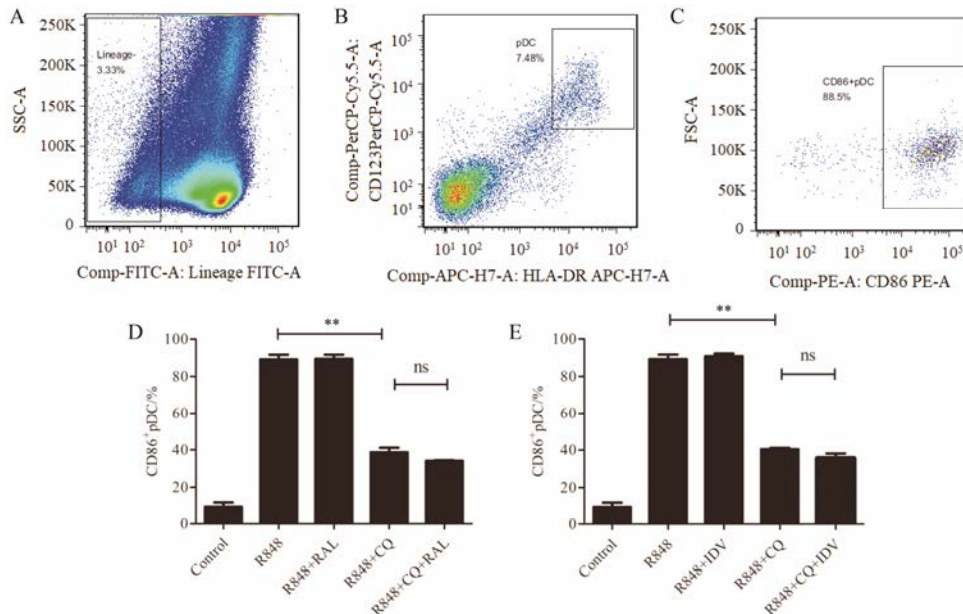


Figure 4 Lineage⁻PBMC (A), lineage⁻HLADR⁺CD123⁺ PBMC: pDC (B), CD86⁺ pDC: activated pDC (C), inhibition of pDC activation combinations of CQ+RAL (D), CQ+IDV (E). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$. ns: No statistical difference

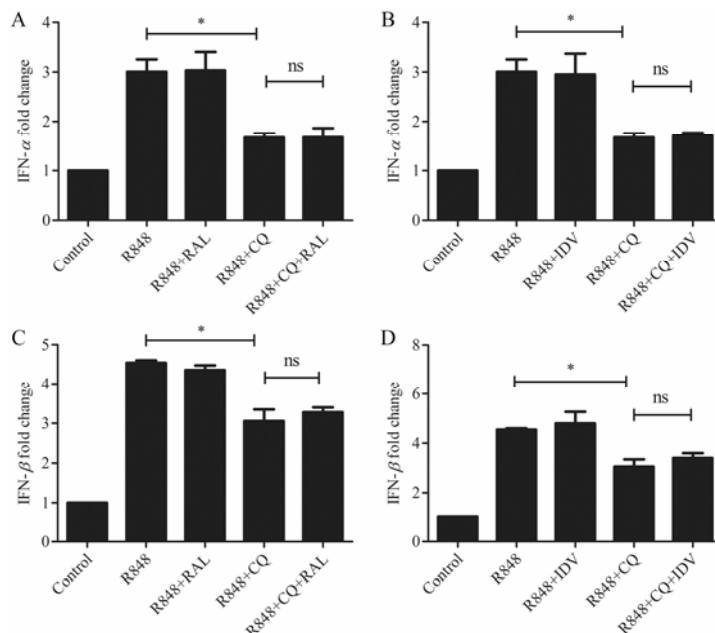


Figure 5 Inhibition of IFN- α upregulation by combinations of CQ+RAL (A), CQ+IDV (B); Inhibition of IFN- β upregulation by combinations CQ+RAL (C), CQ+IDV (D). * $P < 0.05$. ns: No statistical difference

IFN- α 、IFN- β 的分泌, 氯喹分别与 RAL、IDV 的联合使用相比于氯喹单药使用对 pDC 活化水平和 IFN- α 、IFN- β 表达水平的下调作用在统计学上并无明显差异 ($P>0.05$)。结果表明, RAL、IDV 与氯喹的联合使用均不会导致氯喹对 R848 引起的 pDC 活化和 IFN- α 、IFN- β 分泌上调的抑制作用发生变化。

讨论

本研究将 HIV 糖基化作为一个新靶点运用到 cART 中, 使用氯喹与其他靶点的抗病毒药物联合使用检测其体外抗 HIV-1 活性。根据 MacSynergy II 程序分析方法定义的协同/拮抗标准, 氯喹与 RAL 联合用药具有中度协同作用, 实验中药物使用不同浓度联合用药呈现的作用并不相同。氯喹主要在浓度为 $0.541\sim 2.163\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与 RAL 联合表现出不同程度的协同抗病毒作用, 此浓度与接受疟疾治疗的患者体内氯喹的血药浓度相近^[19]。氯喹具有逆转多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) 的作用^[20], 因此猜测其协同作用可能与该浓度范围内的氯喹可逆转病毒对 RAL 产生的耐药性有关。氯喹与进入抑制剂 T-20 的联合具有强协同抗 HIV-1_{III}B 作用, 氯喹浓度为 $1.082\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与 T-20 联合表现出较强的协同作用。T-20 为进入抑制剂, 可特异地与 HIV-1 gp41 的 HR1 结合阻断病毒的融合过程, 从而抑制病毒的感染^[21], 因此推测氯喹与 T-20 联合使用呈现的协同作用, 可能与氯喹增强了 T-20 的融合阻断作用有关。氯喹与蛋白酶抑制剂 IDV 联合抗 HIV-1_{III}B 和 HIV-1_{KM018} 作用呈轻度协同作用, 与 Savarino 等^[20]的研究结果一致。氯喹与非核苷类逆转录酶抑制剂 EFV 联合抗 HIV-1_{III}B 呈现中度拮抗作用。

本研究发现与单药相比, 氯喹分别与整合酶抑制剂 RAL、蛋白酶抑制剂 IDV 联合使用并不影响氯喹对 TLR7 激动剂引起的 pDC 活化和 I 型干扰素分泌上调的抑制作用, 表明在体外联合使用氯喹能够抑制 pDC 活化。氯喹分别与 RAL、IDV 联用呈不同程度的协同抗 HIV-1 作用, 并且氯喹与 RAL、IDV 的联合使用并不会影响氯喹对 pDC 活化的抑制作用。本研究结果为临床上 cART 联合使用氯喹降低患者免疫活化、减缓 AIDS 疾病进程提供了一定实验依据, 将有利于促进氯喹更好、更广泛地应用于临床研究和治疗。

References

- [1] Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011, 1: a006841.
- [2] China CDC. Update on the AIDS/STD epidemic in China and main response in control and prevention in April, 2017 [J]. Chin J AIDS STD (中国艾滋病性病), 2017, 23: 473.
- [3] Montagnier L. 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine [J]. Virology, 2010, 397: 248–254.
- [4] Xiang SY, Zhang GH, Zheng YT. Application of chloroquine/hydroxychloroquine in AIDS treatment: research advances [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2017, 44: 13–17.
- [5] O'Connell RJ, Kim JH, Excler JL. The HIV-1 gp120 V1V2 loop: structure, function and importance for vaccine development [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13: 1489–1500.
- [6] Naarding MA, Baan E, Pollakis G, et al. Effect of chloroquine on reducing HIV-1 replication *in vitro* and the DC-SIGN mediated transfer of virus to CD4⁺ T-lymphocytes [J]. Retrovirology, 2007, 4: 6.
- [7] Savarino A, Gennero L, Chen HC, et al. Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity [J]. AIDS, 2001, 15: 2221–2229.
- [8] Martinson JA, Montoya CJ, Usuga X, et al. Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54: 871–881.
- [9] Murray SM, Down CM, Boulware DR, et al. Reduction of immune activation with chloroquine therapy during chronic HIV infection [J]. J Virol, 2010, 84: 12082–12086.
- [10] Ma JP, Xia HJ, Zhang GH, et al. Inhibitory effects of chloroquine on the activation of plasmacytoid dendritic cells in SIVmac239-infected Chinese rhesus macaques [J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9: 410–416.
- [11] Zhang GH, Wang Q, Chen JJ, et al. The anti-HIV-1 effect of scutellarin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334: 812–816.
- [12] Wang RR, Gao YD, Ma CH, et al. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains [J]. Molecules, 2011, 16: 4264–4277.
- [13] Zheng YT, Ben KL, Jin SW. Anti-HIV-1 activity of trichobitacin, a novel ribosome-inactivating protein [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 179–182.
- [14] Wang P, Zhang GH, Xiang SY, et al. The anti-HIV-1 activities of benzophenones non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1704–1710.
- [15] Prichard MN, Prichard LE, Shipman C Jr. Strategic design and three-dimensional analysis of antiviral drug combinations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37: 540–545.
- [16] Feng JY, Ly JK, Myrick F, et al. The triple combination

- of tenofovir, emtricitabine and efavirenz shows synergistic anti-HIV-1 activity *in vitro*: a mechanism of action study [J]. *Retrovirology*, 2009, 6: 44.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [18] Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells *via* Toll-like receptor-viral RNA interactions [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 3265-3275.
- [19] Ducharme J, Farinotti R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 31: 257-274.
- [20] Savarino A, Lucia MB, Rastrelli E, et al. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004, 35: 223-232.
- [21] Wang RR, Yang LM, Wang YH, et al. Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382: 540-544.

石家庄以人才绿卡为抓手倾情打造引才聚才环境

为吸引和集聚一批优秀人才,有力支撑产业升级和创新发展,河北省石家庄市以建立人才绿卡制度为抓手,全面构建多层次、立体式、全方位的人才服务体系,着力打造引才聚才的良好环境。

2017年,研究出台了《石家庄市人才绿卡(A卡)管理办法(试行)》《石家庄市人才绿卡(B卡)管理办法(试行)》,其中,人才绿卡(A卡)定位高端,主要面向石家庄市域内用人单位(包括中央、省驻石单位)从市外、国(境)外引进或自主培育的国家“两院”院士、国家“千人计划”“万人计划”入选者、省高端人才等6类领军型人才。

符合申领人才绿卡条件的高层次人才可在石家庄行政区域内享受**出入境和居留服务、海关服务、户籍办理服务、工商税务服务、金融服务、场地支持、住房保障、科研服务、配偶随迁、子女入学、医疗保健、社会保险、职称评定、编制岗位管理、生活服务**等15项便利化服务。其中,持A卡人才带项目或技术到石家庄市创业,经评审后,市财政给予300万元至500万元的科研经费支持,获得银行贷款的,市财政2年内每年给予最高1000万元的贷款贴息补助,租赁厂房直接生产销售的,市财政2年内每年给予最高200万元的房屋租赁费用;在市区内购买首套自用商品住房,不受住房限购政策限制,市财政五年内给予最高100万元的购房补贴;享受子女入学转学优先办理、免费乘坐市区内公交车、地铁和参观市管文化旅游景区、优先办理机动车年检等各类生活服务。凡涉及服务项目的市直相关职能部门均开设了专门绿色通道,并指定服务专员为持卡人才提供全程精细化、专业化服务。

欢迎广大高层次领军人才到石家庄落户创业,扶持石家庄市产业社会发展,我们将为您提供最优质的服务!如有疑问请来电咨询石家庄市委组织部人才服务中心 0311-86137223,或登录石家庄市政府网站(www.sjz.gov.cn)“人才绿卡信息管理平台”窗口进行详细了解。

石家庄市委组织部人才服务中心