



(21) 申请号 201410108246.0

(22) 申请日 2014.03.21

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 梁伟 董文娟 张春玲 魏秀莉
黄峰

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 郎坚

(51) Int. Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

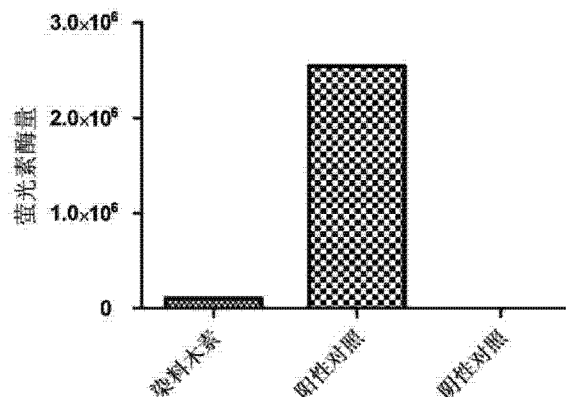
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

人类免疫缺陷病毒抑制剂或药物增敏剂的筛选方法

(57) 摘要

本发明涉及以 ERK 和 HDAC1 为联合靶标, 筛选抑制人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的抑制剂的方法, 以及该方法筛选获得的小分子化合物、蛋白或功能性多肽片段、聚合物、功能性核酸片段、抗体或抗体的功能片段抑制剂, 还涉及由通过所述联合靶标筛选获得的抑制剂在制备抑制 HIV 病毒的药物中的应用, 以及所述联合靶标筛选获得的抑制剂在制备 HIV 治疗药物的增敏剂中的应用。



1. 以 ERK 和 HDAC1 为联合靶标, 筛选抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)的抑制剂的方法, 其特征在于, 筛选得到的抑制剂同时降低:

- (1) 胞外信号调节激酶(ERK)的转录 / 翻译水平或磷酸化激活水平;
- (2) 组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 的转录 / 翻译水平。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的抑制剂为小分子化合物、蛋白或功能性多肽片段、聚合物、功能性核酸片段、抗体或抗体的功能片段。

3. 根据权利要求 1 所述方法筛选获得的针对 HIV 病毒的抑制剂, 所述的抑制剂优选为染料木素。

4. 权利要求 3 所述的抑制剂在制备抗 HIV 病毒的药物中的应用。

5. 以 ERK 和 HDAC1 为联合靶标, 筛选抗人类免疫缺陷病毒(HIV) 的药物的增敏剂的方法, 其特征在于, 筛选得到的增敏剂同时降低:

- (1) 胞外信号调节激酶(ERK)的转录 / 翻译水平或磷酸化激活水平;
- (2) 组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 的转录 / 翻译水平。

6. 根据权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述的增敏剂为小分子化合物、蛋白或功能性多肽片段、聚合物、功能性核酸片段、抗体或抗体的功能片段。

7. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其特征在于, 所述的抗 HIV 的药物为针对 HIV 的蛋白酶抑制剂、针对 HIV 的核苷类 / 非核苷类逆转录酶抑制剂, 优选为齐夫多定(Zidovudine)、奈韦拉平(Nevirapine)。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法筛选获得的增敏剂, 优选为染料木素。

9. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法筛选获得的增敏剂在制备抗 HIV 药物增敏剂中的应用, 所述的增敏剂优选为染料木素。

10. 胞外信号调节激酶(ERK)、组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1) 作为联合靶标在筛选,

- (1) 抑制人类免疫缺陷病毒(HIV) 的抑制剂;
- (2) 抗 HIV 药物的增敏剂;

中的应用。

人类免疫缺陷病毒抑制剂或药物增敏剂的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及染料木素抑制人类免疫缺陷病毒的复制及潜伏,以及作为联合使用药物增加临床使用的逆转录酶抑制剂药效的应用。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus,HIV)是单链 RNA 病毒,其基因组全长 9.7kb,属于逆转录病毒科慢病毒属。人类免疫缺陷病毒感染可引起获得性免疫综合症(acquired immunodeficiency syndrome,AIDS),目前,被人类免疫缺陷病毒感染的人群已达 3 千 4 百万人,并以每年 2 百 50 万人新发感染的速度增加,在这些被感染的人群中,每年有 2 百万人患获得性免疫综合症。在人类免疫缺陷病毒感染严重的国家和地区,被感染人数已占总人数的 67%,并且超过 70% 的死亡是由人类免疫缺陷病毒感染引起的,严重威胁人类健康。

[0003] 目前,已有超过 25 种抗逆转录病毒药物被批准用于临床治疗人类免疫缺陷病毒感染,虽然这些药物对人类免疫缺陷病毒感染引发的获得性免疫综合症具有一定的缓解作用,但是其效果相当有限,原因之一是因为大多数药物仅针对特定的病毒蛋白靶点,而 RNA 病毒基因组的高突变率导致耐药毒株的产生和宿主免疫系统的逃逸效果,更进一步的,抗人类免疫缺陷病毒的靶标蛋白主要集中在逆转录酶、蛋白酶、gp41 跨膜蛋白和整合酶中,限制了抗病毒药物的靶标数量。

[0004] 另一方面,虽然同时使用多种抗病毒药物的疗法(highly active antiretroviral therapy,HAART)会比单一使用一种抗病毒药物的疗法疗效明显,但是,也会促进病毒感染进入潜伏期,这时病毒复制速度较慢,新生病毒粒子少,抗病毒药物无明显疗效,而一旦停药或产生耐药突变株,病毒就会大量复制使病情加重,这也是获得性免疫综合症病人终身服药和导致死亡的主要原因。

[0005] 目前,不同于传统的抗人类免疫缺陷病毒药物的开发策略,一些较为新颖的抗人类免疫缺陷病毒药物开始着眼于不同的角度来优化现有药物和疗法中存在的弊端,例如通过抑制特定的病毒生命周期所需要的细胞因子或信号转导途径,或是降低现有药物的用量以减缓药物压力产生突变株的数量和时间。

[0006] 病毒的复制和传播是一个与宿主细胞相互作用的过程,大量的宿主细胞蛋白参与到病毒的生活周期中。在人类免疫缺陷病毒的复制过程中,胞外信号调节激酶(ERK)是病毒逆转录及基因组整合过程中所需的宿主细胞因子,目前文献报道减少的胞外信号调节激酶导致病毒逆转录及基因组整合效率显著降低,并且胞外信号调节激酶也整合进入成熟病毒粒子中,宿主细胞中降低表达的胞外信号调节激酶导致其整合进入病毒粒子中的效率降低,使得新生病毒粒子毒力减弱。另外,组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)是已整合病毒进入潜伏期所必需的,组蛋白去乙酰化酶 1 调节染色质构象,对病毒 LTR 表达十分重要。已有文献表明,组蛋白去乙酰化酶 1 的抑制剂可以有效地增加病毒基因的表达从而防止病毒进入潜伏期。

[0007] 虽然胞外信号调节激酶通过调控病毒逆转录和整合过程而影响人类免疫缺陷病毒的复制和扩散及组蛋白去乙酰化酶 1 通过调控人类免疫缺陷病毒 LTR 表达而防止病毒进入潜伏期的基础功能都已被阐明。但是,并未有任何报道表明,存在某一化合物,能够同时调控 ERK 和 HDAC1 的分子效应。而同时,并未出现某一化合物通过调控 ERK 能显著提高已有药物抗病毒疗效的报道。

[0008] 基于宿主细胞因子在人类免疫缺陷病毒复制和扩散中的重要作用,本发明人通过筛选,发现黄酮类小分子化合物的典型化合物染料木素在抑制人免疫缺陷病毒中的独特效果,通过对其分子靶标的鉴定,结合相关的功能验证,证实了这一小分子通过降低 ERK 和 HDAC1 蛋白表达,抑制人类免疫缺陷病毒复制和扩散,并可在联合使用时,显著提高已有抗病毒药物的药效。为针对 HIV 病毒的药物开发工作,提供了一种全新的思路。

[0009] 下列参考文献作为背景技术的参考,以其公开的内容引入本申请:

[0010] 1. Este, J. A. & Cihlar, T. Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res* 85, 25-33, doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.007 (2010).

[0011] 2. Menendez-Arias, L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* 23, 381-388 (2002).

[0012] 3. Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* 85, 1-18, doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.002 (2010).

[0013] 4. Adamson, C. S. & Freed, E. O. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res* 85, 119-141, doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.009 (2010).

[0014] 5. Arhel, N. & Kirchhoff, F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 1802, 313-321, doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.003 (2010).

[0015] 6. Greene, W. C. et al. Novel targets for HIV therapy. *Antiviral Res* 80, 251-265, doi:10.1016/j.antiviral.2008.08.003 (2008).

[0016] 7. Kuritzkes, D. R. Drug resistance in HIV-1. *Current opinion in virology* 1, 582-589, doi:10.1016/j.coviro.2011.10.020 (2011).

[0017] 8. Hemonnot, B. et al. The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J Biol Chem* 279, 32426-32434, doi:10.1074/jbc.M313137200 (2004).

[0018] 9. Mettling, C. et al. Galphai protein-dependant extracellular signal-regulated kinase-1/2 activation is required for HIV-1 reverse transcription. *Aids* 22, 1569-1576, doi:10.1097/QAD.0b013e32830abdaf (2008).

[0019] 10. Bukong, T. N., Hall, W. W. & Jacque, J. M. Lentivirus-associated MAPK/ERK2 phosphorylates EMD and regulates infectivity. *J Gen Virol* 91, 2381-2392, doi:10.1099/vir.0.019604-0 (2010).

[0020] 11. Yang, X. & Gabuzda, D. Regulation of human immunodeficiency virus

typel infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Virol 73, 3460-3466 (1999).

[0021] 12. Archin, N. M. et al. Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. AIDS research and human retroviruses 25, 207-212, doi:10.1089/aid.2008.0191 (2009).

[0022] 13. Wightman, F., Ellenberg, P., Churchill, M. & Lewin, S. R. HDAC inhibitors in HIV. Immunology and cell biology 90, 47-54, doi:10.1038/icb.2011.95 (2012).

发明内容

[0023] 本发明涉及胞外信号调节激酶(ERK)、组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1)作为联合靶标在筛选抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)的抑制剂中的应用。

[0024] 本发明还涉及以 ERK 和 HDAC1 为联合靶标,筛选抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)的抑制剂的方法,其特征在于,筛选得到的抑制剂同时降低:(1)胞外信号调节激酶(ERK)的转录/翻译水平或磷酸化激活水平;(2)组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1)的转录/翻译水平。

[0025] 所述的抑制剂包括但不限于,小分子化合物、蛋白或功能性多肽片段、聚合物、功能性核酸片段、抗体或抗体的功能片段。

[0026] 本发明还涉及通过所述筛选方法获得的抑制剂,所述抑制剂优选为染料木素。

[0027] 本发明还涉及通过所述联合靶标筛选获得的抑制剂在制备抑制 HIV 病毒的药物中的应用。所述的抑制剂优选为染料木素。

[0028] 本发明还涉及胞外信号调节激酶(ERK)、组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1)作为联合靶标在筛选 HIV 治疗药物的增敏剂中的应用。

[0029] 本发明还涉及以 ERK 和 HDAC1 为联合靶标,筛选抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)治疗药物增敏剂的方法,其特征在于,筛选得到的增敏剂同时降低:(1)胞外信号调节激酶(ERK)的转录/翻译水平或磷酸化激活水平;(2)组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC1)的转录/翻译水平。

[0030] 所述的药物增敏剂包括但不限于,小分子化合物、蛋白或功能性多肽片段、聚合物、功能性核酸片段、抗体或抗体的功能片段。

[0031] 所述的 HIV 治疗药物为针对 HIV 的蛋白酶抑制剂、针对 HIV 的核苷类/非核苷类逆转录酶抑制剂,优选为齐夫多定(Zidovudine)、奈韦拉平(Nevirapine)。

[0032] 本发明还涉及通过所述的联合靶标筛选获得的 HIV 治疗药物增敏剂,所述增敏剂优选为染料木素。

[0033] 本发明还涉及通过所述联合靶标筛选获得的化合物在制备 HIV 治疗药物的增敏剂中的应用。所述的增敏剂优选为染料木素。

附图说明

[0034] 图 1. 染料木素对人类免疫缺陷病毒的抑制效果(图 1A. 染料木素对人类免疫缺陷病毒侵染影响的柱状图、图 1B. 染料木素对人类免疫缺陷病毒蛋白 p24 表达影响的柱状图、图 1C. 染料木素对人类免疫缺陷病毒蛋白 p24 表达影响的定量效果图)。

[0035] 图 2. 染料木素对人类免疫缺陷病毒复制影响的柱状图(图 2A. 染料木素对人类免

疫缺陷病毒逆转录和整合影响的柱状图、图 2B. 染料木素对人类免疫缺陷病毒感染毒力影响的柱状图)。

[0036] 图 3. 染料木素对调节人类免疫缺陷病毒基因表达影响的柱状图。

[0037] 图 4. 染料木素对 ERK 和 HDAC1 蛋白表达影响的效果图。

[0038] 图 5. 染料木素对增加已有抗人类免疫缺陷病毒药物药效的效果图。

具体实施方式

[0039] 细胞及培养方法、病毒株、化合物

[0040] 1、人胚肾上皮细胞(293T, ATCC NO. CRL-3216™; 永生化人胚肾上皮细胞, 由上海细胞库提供) 培养于含 10% 胎牛血清(美国 PAA 公司)、青霉素和链霉素各 100U/ml 的 DMEM 培养基中(Gibico 公司), 5%CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。

[0041] 2、人宫颈上皮细胞(HeLa, ATCC NO. CCL-2™; 人宫颈腺癌上皮细胞, 由上海细胞库提供) 培养于含 10% 胎牛血清(美国 PAA 公司)、青霉素和链霉素各 100U/ml 的 DMEM 培养基中(Gibico 公司), 5%CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。

[0042] 3、人外周血 T 细胞(Jurkat, ATCC NO. TIB-152™; 人外周血白血病 T 细胞, 由上海细胞库提供) 培养于含 10% 胎牛血清(美国 PAA 公司)、青霉素和链霉素各 100U/ml 的 RPMI1640 培养基中(Gibico 公司), 5%CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。

[0043] 4、人原代外周血单核细胞(PBMC, 由血液中心捐赠者血液中提取) 培养于含 10% 胎牛血清(Gibico 公司)不含抗生素的 RPMI-1640 培养基中, 5%CO₂、37°C (FIL-TER 型培养箱, 德国 Thermo 公司)。

[0044] 5、人类免疫缺陷病毒假病毒 NL4-3 及 VSV-G 包装质粒, 用于包装 HIV-VSVG 假病毒, 由中国科学院生物物理研究所提供。

[0045] 6、人类免疫缺陷病毒 HIV-VSVG 假病毒包装方法: 由转染 293T 细胞人类免疫缺陷病毒 NL4-3 及 VSV-G 假病毒包装质粒获得。制备方法为: 将 293T 细胞以 70% 丰度接种于 10cm 细胞培养皿中, 培养 24 小时。使用 lipofectmin2000 转染试剂, 将总量为 24 μg 的 NL4-3 质粒与 VSV-G 质粒以 4:1 比例共同转染培养于 OPTI-MEM 培养基中的 293T 细胞, 6 小时后将培养基换为 DMEM 培养基补充 10%FBS, 继续培养至 48 小时, 收集细胞上清, 除去细胞碎片后存于 -80°C 备用。人类免疫缺陷病毒 NL4-3 假病毒普遍用于人类免疫缺陷病毒的科学研究。

[0046] 7、染料木素由山西惠科公司购买。

[0047] 8、ERK 及 HDAC1 抑制剂均购于 sigma 公司。

[0048] 9、其他试剂或原材料如无特别说明, 为本领域常规试剂或原材料, 纯度为分析纯。

[0049] 其他说明

[0050] 以下实施例中使用 NL4-3 及 VSV-G 假病毒包装质粒制备的 HIV-VSVG 假病毒评价染料木素对逆转录病毒基因表达, 病毒感染毒力及病毒逆转录和基因组整合过程的抑制作用。NL4-3 假病毒包装质粒中插入荧光素酶基因作为报告基因, 该基因经过假病毒制备过程被包装入 HIV-VSVG 假病毒粒子中, 只有在假病毒成功感染宿主细胞并将其基因组整合于宿主基因组中时, 该基因才会表达, 所以被广泛用于检测逆转录病毒的基因表达水平和病毒感染毒力。另外, 逆转录病毒如 HIV, 在将其基因组整合进入宿主细胞基因组过程前需要

进行逆转录过程,将其 RNA 基因逆转录为 DNA。如果此过程不能完成,则在宿主细胞基因组中无法检测到报告基因的表达,因此,荧光素酶基因也用于表征病毒逆转录和基因整合水平。GAPDH 作为宿主细胞的组成型表达基因,不存在于病毒粒子中,荧光素酶 /GAPDH 的比值将宿主细胞数目和基因表达水平差异均一化,更准确地反应出病毒基因表达水平的差异。

[0051] 实施例一、染料木素对人类免疫缺陷病毒的抑制效果

[0052] 1.1 luciferase 检测法,使用 luciferase 检测法检测染料木素抗人类免疫缺陷病毒效果,将 293T 细胞接种于 96 孔板中(10000 细胞 / 孔),将 100 μ M 染料木素加入培养基中,并加入 100 μ l 的 HIV-VSVG 假病毒(1×10^7 IFU/ml),孵育 24 小时后,检测 luciferase 表达量。结果见图 1A。可见,染料木素具有显著地抗人类免疫缺陷病毒感染作用。

[0053] 1.2 Elisa 法检测人类免疫缺陷病毒蛋白 p24 表达,将丰度 90% 的 A549 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后将细胞于 70% 丰度接种于 96 孔培养板,细胞贴壁 24 小时后,除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入 100 μ l 的 HIV-VSVG 假病毒(1×10^7 IFU/ml) 及 100 μ M 染料木素培养 24 小时。使用 p24 检测试剂盒检测 p24 表达量,结果如图 1B。该结果进一步证明了染料木素具有抑制人类免疫缺陷病毒感染作用。

[0054] 1.3 使用免疫蛋白印迹法检测人类免疫缺陷病毒 I 型核心蛋白 p24 (通常用来表征病毒感染) 表达量与染料木素浓度的量效关系,将丰度 90% 的 A549 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后将细胞于 70% 丰度接种于 24 孔培养板,细胞贴壁 24 小时后,除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次,每孔加入 500 μ l 的 HIV-VSVG 假病毒(1×10^7 IFU/ml),并加入不同浓度梯度的染料木素(0 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M 和 100 μ M) 培养 24 小时。收集蛋白,使用免疫蛋白印迹法检测 p24 蛋白表达量,结果如图 1C 所示。该结果进一步证明了 p24 蛋白表达水平与染料木素浓度具有剂量依赖性。

[0055] 实施例二、染料木素对人类免疫缺陷病毒逆转录和整合过程的影响

[0056] 2.1 293T, HeLa, Jurkat 和 PBMC 细胞于 70% 丰度接种于 24 孔培养板,细胞贴壁 24 小时后,除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次,加入 HIV-VSVG 假病毒粒子 500 μ l (1×10^7 IFU/ml) 及 50 μ M 或 100 μ M 染料木素(10 μ M ERK 抑制剂 -U0126 作为对照), 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 24 小时。提取细胞基因组,对其基因组做 RT-PCR 分析。结果显示,对 ERK 的抑制明显降低人类免疫缺陷病毒的逆转录和基因组整合过程,100 μ M 和 50 μ M 的染料木素对人类免疫缺陷病毒的逆转录和基因组整合过程有不同程度的抑制作用,具体结果见图 2A,上述实验表明,染料木素对人类免疫缺陷病毒的逆转录和基因组整合过程具有抑制作用。

[0057] 2.2 染料木素对人类免疫缺陷病毒感染毒力影响

[0058] 将丰度为 70% 的 293T 细胞接种于 24 孔板中,培养 24 小时。使用 lipofectmin2000 转染试剂将总量为 2 μ g 的 NL4-3 与 VSV-G 质粒以 4 : 1 比例转染培养于 OPTI-MEM 培养基中的 293T 细,用于包装 HIV-VSVG 假病毒,6 小时后将培养基换为 DMEM 补充 10%FBS,并分别加入 0 μ M, 50 μ M 或 100 μ M 染料木素,使用 10 μ M U0126 作为对照。细胞培养 48 小时后,收集细胞上清并分别接种于 293T, HeLa, Jurkat 及 PBMC 细胞中,细胞继续培养 24 小时,提取细胞基因组,使用 RT-PCR 法检测其拷贝数。结果显示对比 U0126 抑制剂,50 μ M 和 100 μ M 染料木素都不同程度降低 HIV-VSVG 假病毒拷贝数,结果如图 2B 所示,上述实验表明,染料木素对人类免疫缺陷病毒感染毒力具有抑制作用。

[0059] 实施例三、染料木素对调节人类免疫缺陷病毒基因表达的影响

[0060] 将 293T, HeLa, Jurkat 和 PBMC 细胞于 70% 丰度接种于 24 孔培养板, 细胞贴壁 24 小时后, 除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次, 加入 HIV-VSVG 假病毒粒子 $500 \mu\text{l}$ (1×10^7 IFU/ml) 培养 24 小时后, 去除培养上清, 加入 DMEM 培养基补充 2%FBS 并加入 $0 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ 或 $100 \mu\text{M}$ 染料木素 ($1 \mu\text{M}$ 和 500nM HDAC1 抑制剂 -SAHA 作为对照), 37°C 孵育细胞 24 小时。提取细胞 RNA, 使用 RT-PCR 法检测 HIV-VSVG 假病毒基因的表达。结果显示 $50 \mu\text{M}$ 或 $100 \mu\text{M}$ 染料木素, $1 \mu\text{M}$ 或 500nM SAHA 都对 HIV-VSVG 假病毒基因表达起到促进作用, 结果如图 3 所示, 说明染料木素具有提高 HIV-VSVG 假病毒基因表达作用。

[0061] 实施例四、染料木素对 ERK 和 HDAC1 蛋白表达的影响

[0062] 将 293T, HeLa, Jurkat 和 PBMC 细胞于 70% 丰度接种于 6 孔培养板, 细胞贴壁 24 小时后, 除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次, 加入 0 或 $100 \mu\text{M}$ 染料木素孵育 24 小时, 收集各细胞蛋白检测染料木素对 ERK 蛋白表达和激活及 HDAC1 蛋白表达的影响。结果如图 4 所示, 在 293T, HeLa, Jurkat 和 PBMC 细胞中, 染料木素对 ERK 蛋白表达和激活 (激活的 ERK 蛋白即磷酸化的 ERK 蛋白, 图 4 中用 p-ERK 表示) 均有不同程度的抑制作用, 对 HDAC1 蛋白表达也具有抑制作用。

[0063] 实施例五、染料木素对增加已有抗人类免疫缺陷病毒药物 (Zidovudine, ZDV 及 Nevirapine, NVP) 药效的效果

[0064] 将 293T, HeLa, Jurkat 和 PBMC 细胞于 70% 丰度接种于 24 孔培养板, 细胞贴壁 24 小时后, 除去培养基, PBS (pH=7.0) 冲洗细胞一次, 加入 HIV-VSVG 假病毒粒子 $500 \mu\text{l}$ (1×10^7 IFU/ml) 及如下组别的抑制剂:

[0065] (1) $100 \mu\text{M}$ 染料木素;

[0066] (2) $1 \mu\text{M}$ ZDV;

[0067] (3) $100 \mu\text{M}$ 染料木素和 $1 \mu\text{M}$ ZDV;

[0068] (4) $10 \mu\text{M}$ ZDV;

[0069] (5) $1 \mu\text{M}$ NVP;

[0070] (6) $100 \mu\text{M}$ 染料木素和 $1 \mu\text{M}$ NVP;

[0071] (7) $10 \mu\text{M}$ NVP。

[0072] 37°C 孵育细胞 24 小时。提取细胞基因组, 对其基因组做 RT-PCR 分析。结果如图 5 所示, 染料木素与 ZDV 或 NVP 联合使用时可显著提高其药效。

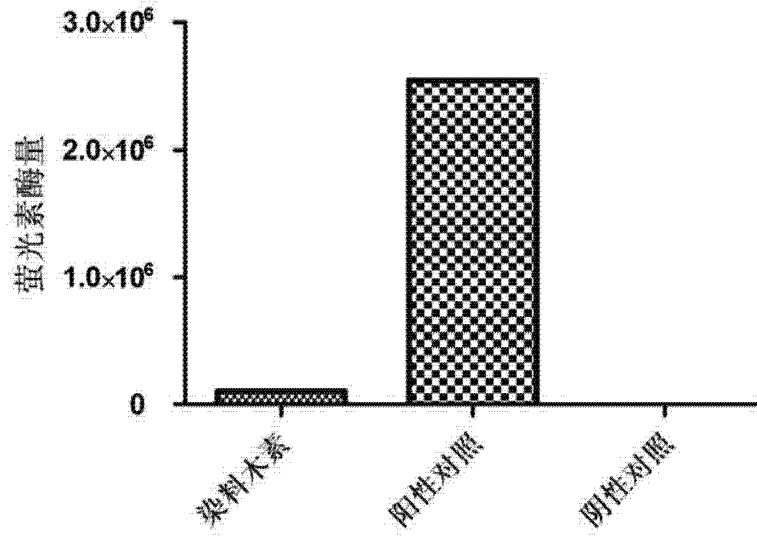


图 1A

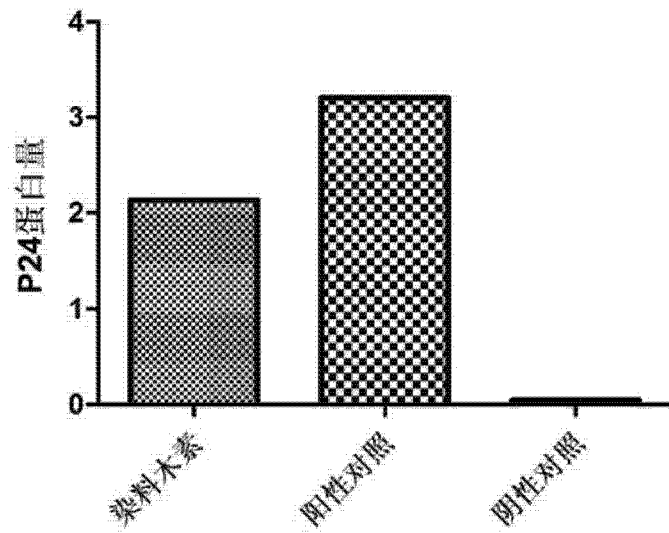


图 1B

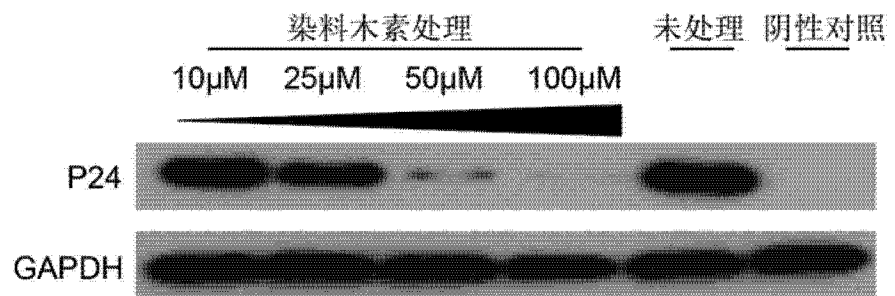


图 1C

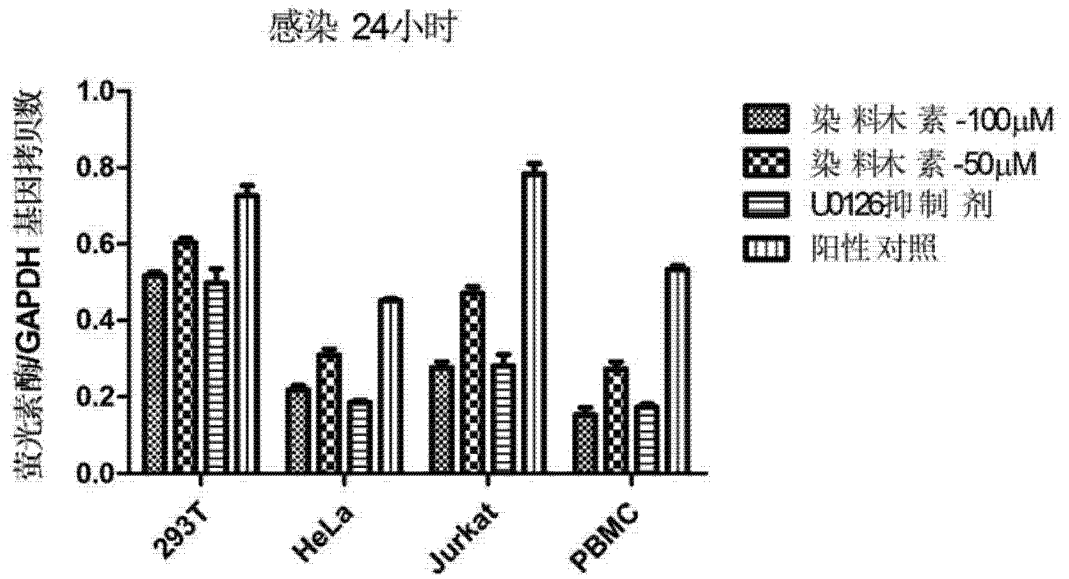


图 2A

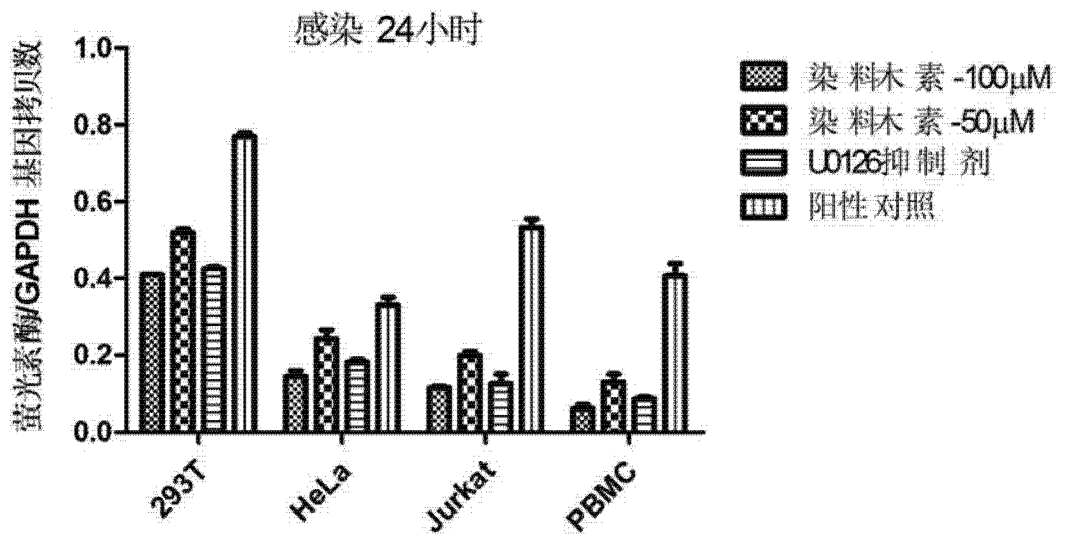


图 2B

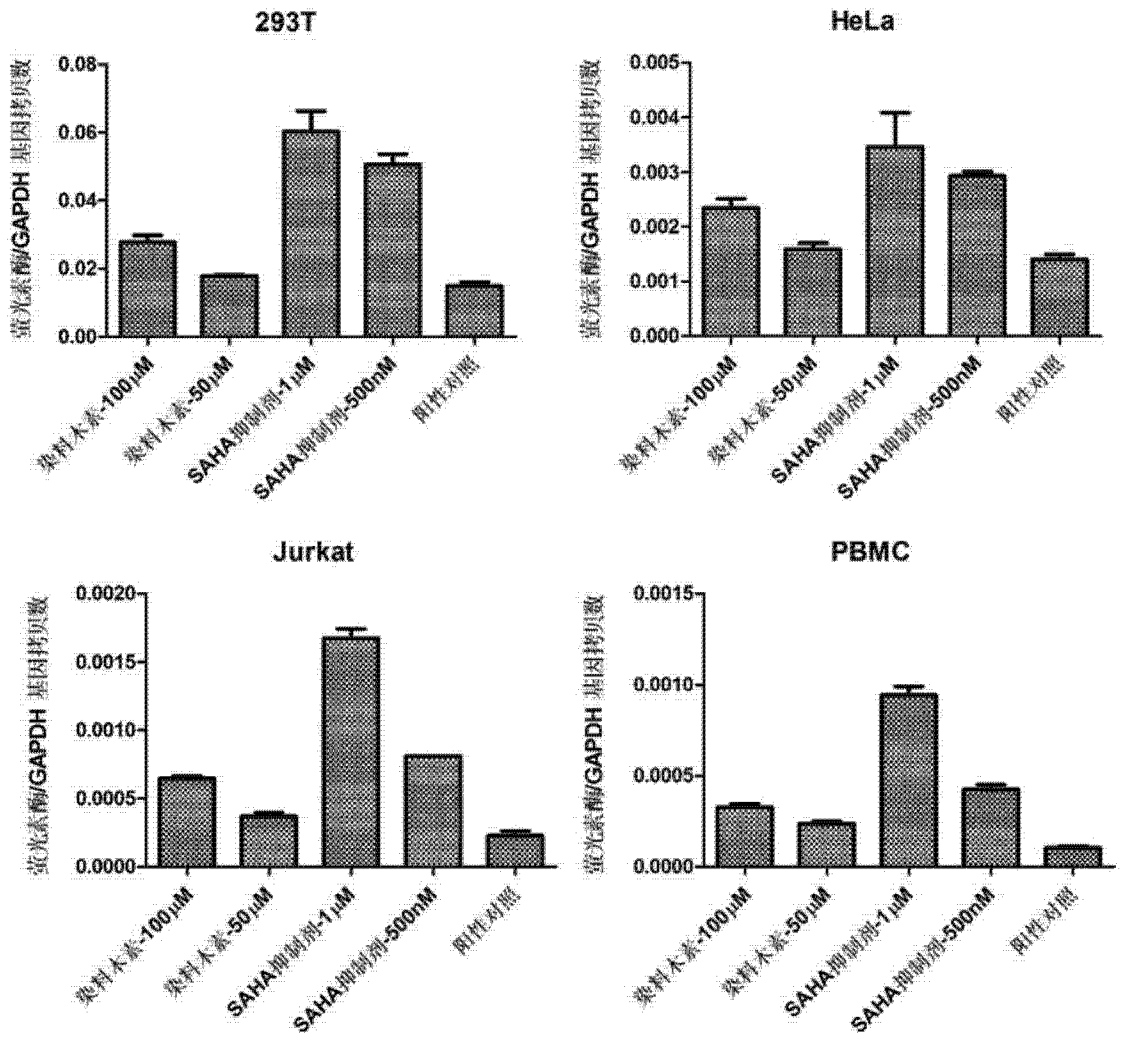


图 3

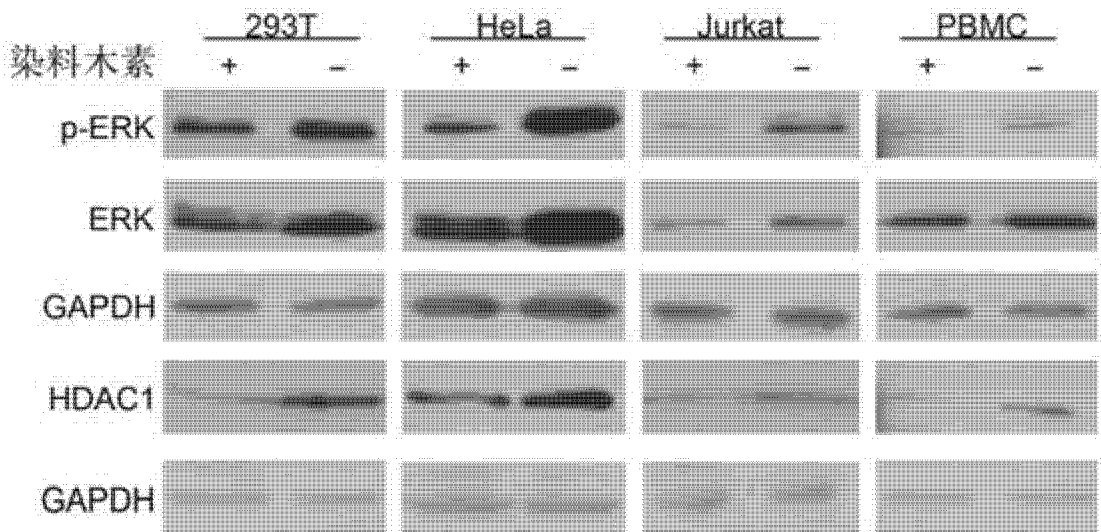


图 4

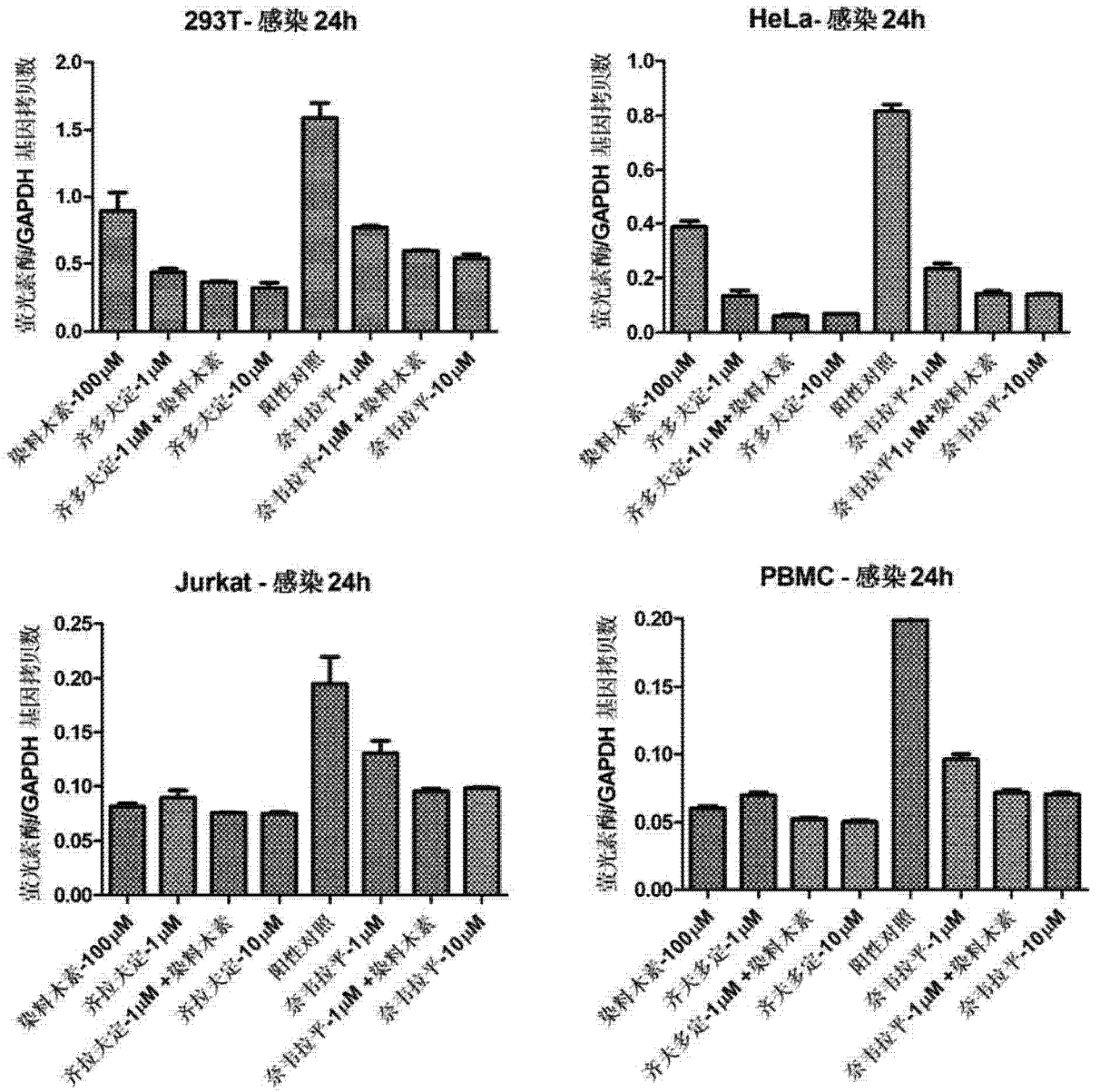


图 5