

6 种藏族药提取物体外抗 HIV-1 活性的初步探讨

高丽娜¹, 贾润清¹, 艾萍¹, 胡秦^{1*}, 林鹏程^{2*}

(1. 北京工业大学 生命科学与生物工程学院, 北京 100124; 2. 青海民族大学 药学院, 西宁 810016)

[摘要] **目的:**对斑花黄堇、木藤蓼、野棉花、黄花铁线莲、黑心虎耳草和短尾铁线莲 6 种藏药提取物的体外抗艾滋病病毒 I 型(HIV-1)病毒活性的评价及其作用机制的初步研究。**方法:**采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法细胞毒性实验和 HIV-1 假病毒单周期感染实验检测提取物的体外抗病毒活性和细胞毒性;利用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术、蛋白酶、整合酶和逆转录酶体外活性抑制实验初步探讨药物的作用靶点。**结果:**在这 6 种藏药提取物中,木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草提取物具有较好的体外抗 HIV-1 病毒活性,半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为(6.47 ± 0.78), (11.97 ± 1.09), (11.7 ± 0.79) mg·L⁻¹,且细胞毒性较小,三者均具有较好的体外抑制整合酶活性。**结论:**木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草提取物具有较好的抗 HIV-1 病毒的作用,其作用机制与整合酶的抑制作用有关。

[关键词] 藏族药; HIV-1 病毒; 蛋白酶; 整合酶; 逆转录酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)04-0171-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040171

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1530.040.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 15:30

In Vitro Anti-HIV-1 Activity of Extracts from 6 Traditional Tibetan Medicines

GAO Li-na¹, JIA Run-qing¹, AI Ping¹, HU Qin^{1*}, LIN Peng-cheng^{2*}

(1. College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;
2. College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810016, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the *in vitro* anti-HIV-1 activities and mechanism of extracts from 6 traditional Tibetan medicines: *Corydalis conspersa*, *Fallopia aubertii*, *Anemone vitifolia*, *Clematis urophylla*, *Saxifraga melanocentra* and *C. hexapetala*. **Method:** Cell counting kit (CCK-8) cell cytotoxicity test and HIV-1 single cycle infection experiments were used to detect the *in vitro* anti-HIV-1 effect and cytotoxicity of extracts. The surface plasma resonance (SPR) technology, protease, integrase and reverse transcriptase inhibition assay were used to identify the potential targets of these extracts. **Result:** The extracts from *F. aubertii*, *A. vitifolia* and *S. melanocentra* showed dose-dependent anti-HIV-1 effect with little cytotoxicity. Their half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were (6.47 ± 0.78), (11.97 ± 1.09), (11.7 ± 0.79) mg·L⁻¹, respectively. All the above three extracts inhibited integrase activity. **Conclusion:** *F. aubertii*, *A. vitifolia* and *S. melanocentra* extracts potently inhibited HIV-1 virus *in vitro*, possibly through down-regulating integrase activity.

[Key words] Tibetan medicine; HIV-1 virus; protease; integrase; reverse transcriptase

艾滋病到迄今为止仍然是严重危害人类社会健康
的重大传染性疾病,由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起,其中 HIV-1 亚型是主要的病原体。自从 1987 年第一个核苷类逆转录酶抑制剂齐多夫定被批准以

[收稿日期] 20160529(004)
[基金项目] 北京市教委科技计划一般项目(KM201510005029);北京市自然科学基金项目(7142013)
[第一作者] 高丽娜,硕士,从事抗艾滋病药物开发及机制研究,Tel:18800167833,E-mail:542830931@qq.com
[通讯作者] * 胡秦,讲师,硕士生导师,从事抗病毒药物的研究,Tel:15201201610,E-mail:hq0716@bjut.edu.cn;
* 林鹏程,博士,教授,从事藏药的开发研究,Tel:13897241263,E-mail:qhlpc@126.com

来,先后有三十余种药物进入临床使用^[1]。作用靶点分别为 HIV 病毒逆转录酶、蛋白酶、整合酶和病毒融合进入。以联合用药为基础的高效抗逆转录病毒(HARTT)疗法仍然是目前抗击艾滋病和 HIV 感染的主要手段^[2],但同时也存在依从性较差、对耐药性毒株效果差、对潜伏病毒无效等问题。

从传统中药、民族药中寻找新的抗病毒药物的研究,一直是新药研制中的活跃领域。天然药物在艾滋病防治过程中取得了积极进展,目前已发现上百种传统天然药物具有抗 HIV 活性成分^[3]。据报道从中药紫草提取的水溶性二氢苯骞呋喃类物质具有较强抗 HIV 活性^[4],姜黄素对 HIV 蛋白酶、逆转录酶、整合酶活性均存在抑制作用^[5],儿茶素可有效的抑制病毒进入、逆转录酶和蛋白酶^[6],此外,黄芩苷、甘草酸、天花粉提取物以及藏族药榜嘎等中药材也有抗病毒作用^[7-8]。本研究选取的藏族药来源及分布于西北地区,据报道斑花黄堇为罂粟科紫堇属植物^[9],化学成分主要为生物碱类,藏族医用于感冒发烧、传染病、肝炎、水中、胃炎、胆囊炎、高血压、狂犬病、烧伤等多种疾病^[10-11]。木藤蓼为蓼科蓼属植物,主要成分为黄酮、蒽醌类、三萜类甾醇类次生代谢产物。藏族医中具有清热解表、祛风、去湿、利尿和补血的作用^[12]。黄花铁线莲为毛茛科铁线莲属植物^[13],主要化学成分为三萜皂苷类、黄酮类、木脂素类、香豆素类、生物碱类、挥发油类、甾体类、大环苷类、以及其他有机酸和脂类等^[14],全草及叶具有祛风除湿,活血化瘀,消肿止痛的作用^[15]。野棉花为毛茛科银莲属植物,主要化学成分为香豆素、内酯及其苷类、氨基酸、糖类、酮类、醇类等成分^[16],具有祛风、散瘀、利湿、驱虫等功效,具有抑制肿瘤细胞增殖和抗氧化活性^[17-18]。短尾铁线莲为毛茛科铁线莲属植物,主要化学成分为齐墩果酸,具有祛风湿、止痹痛的功能,现有药典标准和文献中多以齐墩果酸和熊果酸的定性和定量指标来对药材进行质量评价^[19]。黑心虎耳草系虎耳草科虎耳草属植物,相关研究较少,目前已分离鉴定了岩白菜素等 10 个化学成分,并发现岩白菜素没食子酸酯对丙型肝炎丝氨酸蛋白酶具有抑制活性^[20]。

选取的 6 种藏族药材其相关化学和药理研究较少,作用机制尚不明确,目前还未见相关抗 HIV 病毒活性报道,在已建立多靶点的药物研究平台上对 6 种藏族药进行抗 HIV-1 病毒活性的检测,并对传统靶点逆转录酶、蛋白酶、整合酶进行了初步作用机制探讨,筛选得到具有抗 HIV-1 病毒活性的藏族药,

并进一步确定药物作用靶点,为寻找和发现全新结构和机制的抗 HIV 药物、藏族药资源的开发和利用提供了技术支持。

1 材料

1.1 细胞株与病毒 HEK-293T 细胞来源于 ATCC,TZM-bl 细胞(Hela 细胞表达 CD4,CXC 族趋化因子受体 4(CXCR4)和趋化因子受体 5(CCR5),含 Tat 启动的荧光素酶和 LacZ 基因)来源于 NIH AIDS Reagent Program,细胞采用含 10% FBS,100 U·mL⁻¹青链霉素,0.03% 谷氨酰胺的 DMEM 培养基,于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养;pSG3 ΔEnv 和 Env 包膜质粒 SVPB16 均来源于 NIH AIDS Reagent Program。

1.2 药物及试剂 中草药斑花黄堇(*Corydalis conspersa*),木藤蓼(*Fallopia aubertii*),黄花铁线莲(*Clematis intricata*),野棉花(*Anemone vitifolia*),短尾铁线莲(*Clematis brevicaudata*)和黑心虎耳草(*Saxifraga melanocentra*)均由青海民族大学药学院林鹏程教授采集和鉴定。阳性药齐多夫定(zidovudine, AZT,北京欣盛泽有限公司,批号 78110-38-0,奈韦拉平(nevirapin, NVP)和黄芩素(baicalein)(北京万佳首化生物科技有限公司,批号分别为 88255-01-0,491-67-8)。CCK-8 细胞增殖检测试剂(同仁化学,批号 CK04),Fugene HD 转染试剂(美国 Promega 公司,批号 E231A),HIV-1 逆转录酶检测试剂盒(德国 Roche 公司,批号 114681120910),SensoLyte 490 HIV-1 蛋白酶检测试剂盒(德国 ANASPEC 公司,批号 AS-71127),寡核苷酸底物(ACTGCTAGAGATTTTCCAGCTGGAAATC TCTAGCAGT, 5' FAM 修饰,3' DABCYL 修饰,北京赛百盛基因技术有限公司),重组逆转录酶蛋白(reverse transcriptase, RT),整合酶蛋白(integrase, IN)和 sso7d-IN 重组整合酶为本实验室刘伟老师提供馈赠。

1.3 仪器 ELITE II 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Enspire 型多模式微孔板检测仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

2 方法

2.1 药品制备及细胞毒性实验 以全草为原料粉碎过筛,以 95% 乙醇浸泡并超声提取 1 h,用纱布过滤除去滤液,用 65% 乙醇继续浸泡样品并超声提取 1 h,用纱布过滤得到滤液并回流浓缩,当 65% 乙醇提取的滤液回流浓缩浸膏不再增加时,合并浸膏获

得 65% 乙醇提取的测试样品。获得 65% 醇提取物后,采用抽真空干燥的方法对药物进行干燥,精密称定 100 mg 于离心管中,加入 DMSO 1 mL 溶解,配制 100 g·L⁻¹ 的贮存液。用细胞计数试剂盒 (CCK-8) 法测定样品对 TZM-bl 细胞的毒性,96 孔细胞培养板中按 6 000 个/孔的细胞量接种 TZM-bl 细胞,37 ℃ 培养箱培养 24 h 后,采用无血清培养基稀释样品至系列质量浓度为 250,125,62.5,31.25,15.63 mg·L⁻¹,向细胞培养板加入不同浓度梯度的药物,每组设 3 个复孔,细胞对照组加入等体积无血清培养基。继续培养 48 h 后,采用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒检测,酶标仪检测 450 nm 处吸光度 A,计算样品抑制率,采用 GraphPad Prism 5.0 软件对实验数据进行拟合得到半数毒性浓度 (TC₅₀)。实验重复 3 次,取均值计算标准差。并计算 TC₁₀,即对 10% 的 TZM-bl 细胞产生抑制作用时的药物浓度,来选取无毒剂量用于药效学实验。

2.2 HIV-1 假病毒单周期感染实验 pSG3^{ΔEnv} 和 Env 包膜质粒 SVPB16 共转染 293T 细胞,48 h 后离心过滤收集含有假病毒上清,测定病毒的半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 后于液氮保存。实验将 TZM-bl 细胞接种于 96 孔板并培养 24 h 后,分别加入质量浓度为 25,8.33,2.78,0.93,0.31 mg·L⁻¹ 的待测样品,每孔加入 100 μL 含 100 TCID₅₀ 病毒稀释液,每组设 3 个复孔。仅加入假病毒不加药组为病毒组。培养 48 h 后,弃去上清,室温固定 5 min,PBS 清洗后加入显色液培养 50 min,PBS 清洗并在显微镜下计数蓝斑数,根据抑制率 = [(病毒对照组 - 实验组)/病毒对照组] × 100% 计算得到量效曲线和半数抑制浓度 (IC₅₀),实验重复 3 次,取均值计算标准差。通过计算细胞毒性实验中得到的 TC₅₀ 与 IC₅₀ 的比值得到选择指数 (selection index, SI = TC₅₀/IC₅₀)^[21],以此判断药物效果的安全范围,选择指数 > 1.00 为有效,指数越大安全范围越大。

2.3 表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 法测定药物与蛋白体外结合 实验采用 BIAcore 3000 生物分子相互作用仪,采用逆转录酶蛋白和整合酶蛋白分别与 CM5 芯片偶联,采用牛血清蛋白 (BSA) 作为阴性对照。将样品稀释到 200 mg·L⁻¹,流速 20 μL·min⁻¹,注入量为 60 μL 进样,记录样品流经靶蛋白结合期时的结合响应值 (RU) 与流经 BSA 蛋白结合期的 RU 值,二者之差为该样品与靶蛋白的 RU。

2.4 药物对 HIV-1 逆转录酶活性抑制实验 采用

逆转录酶检测试剂盒体外检测药物对 HIV-1 逆转录酶 (RT) 活性的影响,逆转录酶抑制剂 NVP 作为阳性药,终质量浓度 2.5 mg·L⁻¹,实验组样品终质量浓度为 200 mg·L⁻¹。在 96 孔板内加入样品液 20 μL, HIV-1 RT 酶溶液 20 μL 和含有模板和核苷酸的反应缓冲液 20 μL,37 ℃ 孵育 1 h 后转移到包被板,继续孵育 1 h,经洗脱液洗 5 次后加入 Anti-DIG-POD 工作液 200 μL,37 ℃ 孵育 1 h,洗 5 次,每孔加入 ABTs 底物溶液 200 μL,室温下孵育 30 min,使用酶标仪检测 405 nm 处的 A,进行统计学分析并计算抑制率。

2.5 药物对 HIV-1 蛋白酶活性抑制实验 采用蛋白酶检测试剂盒体外检测药物对 HIV-1 蛋白酶 (Pro) 活性的影响。实验组药物终质量浓度为 200 mg·L⁻¹。向 384 孔板中加入药物稀释液 (10 μL/孔) 和蛋白酶溶液 (10 μL/孔),溶剂组加入药物和缓冲液,重组蛋白酶对照孔加入蛋白酶溶液和缓冲液,室温孵育 15 min 后,每孔加入蛋白酶底物溶液 10 μL,室温下避光孵育 30 min,检测 340 nm/490 nm 处 A,计算抑制率。

2.6 药物对重组 sso7d-IN 整合酶活性的抑制实验 采用 3'加工反应活性高通量检测方法体外检测药物对 HIV-1 整合酶 (IN) 活性的影响,黄芩素为阳性药,终浓度为 50 μmol·L⁻¹,实验组药物终质量浓度 50 mg·L⁻¹,各组设 3 个复孔,向 96 孔微孔板中依次加入 2 × 缓冲液 (200 mmol·L⁻¹ NaCl, 50% 甘油, 40 mmol·L⁻¹ HEPES) 50 μL, DTT (0.005 mol·L⁻¹) 2 μL,重组整合酶蛋白 2.5 μg 和药物溶液 2 μL,37 ℃ 孵育 30 min,每孔加入 Mn²⁺ (0.2 mmol·L⁻¹) 20 pmol DNA 底物 2 μL 混匀后,37 ℃ 培养箱孵育 2 h,检测 485/528 nm 处的荧光值,计算抑制率并进行统计学分析。对木藤蓼、野棉花,黑心虎耳草提取物进行重组整合酶活性的抑制实验,黄芩素作为阳性药,质量浓度为 27,6.76,1.69,0.42 mg·L⁻¹。实验组药物质量浓度为 100,25,6.25,1.56 mg·L⁻¹。实验方法同前,计算得到量效曲线和 IC₅₀。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,重组蛋白酶、重组逆转录酶、重组整合酶活性抑制实验,提取物和阳性药物组与模型组比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药物对 TZM-bl 细胞的细胞毒性作用 为测定样品对细胞的毒性,采用 CCK-8 法测定不同浓度药

物对正常 TZM-bl 细胞的抑制作用,如图 1 所示,样品均对 TZM-bl 细胞呈现剂量依赖性的抑制增殖作用,对数据进行拟合分析计算得到斑花黄堇、木藤蓼、黄花铁线莲、野棉花、短尾铁线莲、黑心虎耳草的半数中毒浓度 TC_{50} ,见表 1,结果显示野棉花对 TZM-bl 细胞的细胞毒性较小 ($>250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),其他药物存在一定的细胞毒性。且黄花铁线莲 TC_{10} 为 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其他各药物 TC_{10} 均 $>25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,可用于观察细胞单周期感染实验中对假病毒的抑制作用。

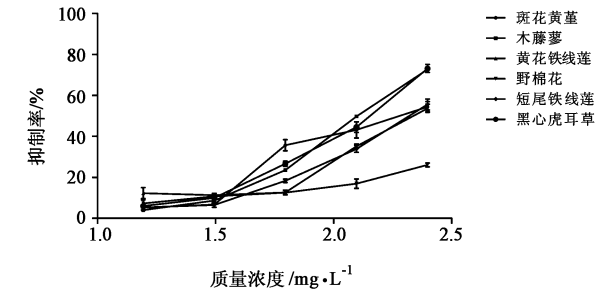


图 1 提取物对 TZM-bl 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Inhibitory effect of extracts on TZM-bl cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 提取物对 TZM-bl 细胞作用的 TC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	$TC_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
斑花黄堇	183.1 ± 7.0
木藤蓼	123.4 ± 4.7
黄花铁线莲	219.6 ± 5.2
野棉花	>250
短尾铁线莲	215.3 ± 7.7
黑心虎耳草	146.5 ± 10.8

3.2 药物的体外抗病毒活性检测 HIV-1 假病毒单周期感染实验测定药物对 pSG3 HIV-1 假病毒的抑制作用,样品均呈现剂量依赖性的抑制病毒作用(图 2),其中木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草 IC_{50} 分别为 $6.47 \pm 0.78, 11.97 \pm 1.09, 11.7 \pm 0.79\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,且 SI 分别为 19.07, $>20.88, 11.47$ (表 2),斑花黄堇、黄花铁线莲、短尾铁线莲 IC_{50} 均高于最大无毒剂量,其抑制作用较弱,结果表明木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草具有较好的体外抗 HIV-1 病毒作用。

3.3 药物与 RT 蛋白和 IN 蛋白体外结合实验 实验采用 BIAcore 3000 生物传感器作为检测系统,测定样品与靶蛋白的 RU 从而反映分子间相互作用。表 3 可见药物对逆转录酶和整合酶均有一定的体外结合亲和力,其中野棉花(B)和黑心虎耳草(A)与重组整合酶具有较高的体外结合, RU 值分别为 872, 825.5,有可能具有潜在的结合调节整合酶活性作用。

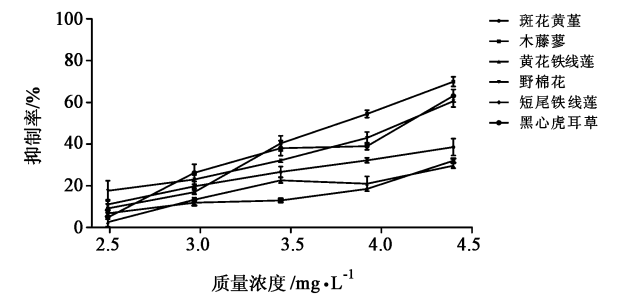


图 2 提取物对 HIV-1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of extracts on the activity of HIV-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 提取物对 HIV-1 活性作用的 IC_{50} 和 SI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

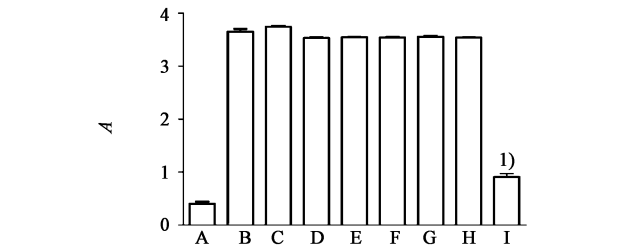
样品	$IC_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SI
斑花黄堇	>25	—
木藤蓼	6.47 ± 0.78	19.07
黄花铁线莲	>25	—
野棉花	11.97 ± 1.09	>20.88
短尾铁线莲	>25	—
黑心虎耳草	11.7 ± 0.79	11.47

注:“—”表明该样品没有抗 HIV-1 活性

表 3 提取物与 RT 蛋白和 IN 蛋白的结合响应值

样品	RU(逆转录酶)	RU(整合酶)
斑花黄堇	138	101.2
木藤蓼	142	155.7
黄花铁线莲	142	279
野棉花	146.8	872
短尾铁线莲	168	181.5
黑心虎耳草	142.6	825.5

3.4 药物对 HIV-1 RT 活性的体外抑制作用 与 HIV-1 RT 酶组比较,加入奈韦拉平后,能够显著的抑制 HIV-1 RT 酶活性 ($P < 0.01$),抑制率为 84.32%。实验组样品对 HIV-1 RT 酶活性抑制作用均不显著。见图 3。



A. 空白组;B. 重组逆转录酶;C. 黄堇组;D. 木藤蓼组;E. 黄花铁线莲组;F. 野棉花组;G. 短尾铁线莲组;H. 黑心虎耳草组;I. 奈韦拉平组。
与重组逆转录酶比较¹⁾ $P < 0.01$

图 3 提取物对 HIV-1RT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of extracts on activity of RT ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 药物对 HIV-1 蛋白酶的体外活性抑制作用 与蛋白酶组比较,加入 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的斑花黄堇、木

藤蓼、黄花铁线莲、野棉花,短尾铁线莲、黑心虎耳草后,HIV-1 蛋白酶的体外活性具有一定程度的下降,但作用较弱,统计学分析无显著性。见图 4。

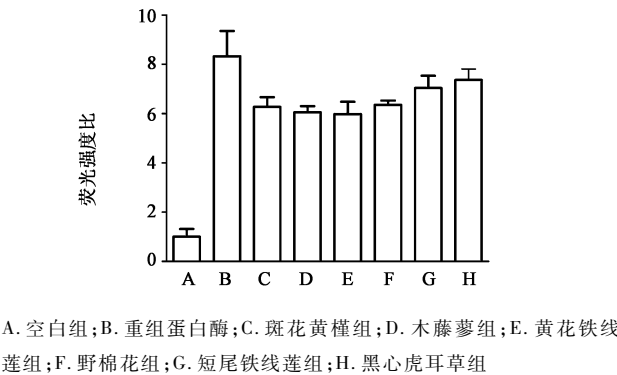


图 4 提取物对 HIV-1 蛋白酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of extracts on activity of protease ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 药物对重组 sso7d-IN 整合酶活性的抑制作用
利用整合酶对底物序列的 3'切割活性检测样品对整合酶的抑制作用,与整合酶对照组比较较,加入阳性药黄芩素能够显著的抑制整合酶活性 ($P < 0.01$),抑制率为 92.97%,加入木藤蓼 ($P < 0.01$),野棉花 ($P < 0.01$) 和黑心虎耳草 ($P < 0.01$) 也显示出 so7d-IN 整合酶活性的显著下降,抑制率分别为 93.63%,85.74%,66.83%;斑花黄堇、黄花铁线莲、短尾铁线莲对 so7d-IN 整合酶活性的抑制作用较弱,提示木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草的作用靶点可能为整合酶。对木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草进行了浓度梯度实验,质量浓度为 100,25,6.25,1.56 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,3 种提取物对整合酶活性均呈现剂量依赖性的抑制作用, IC_{50} 分别为 27.08,36.77,42.93 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 5,6。

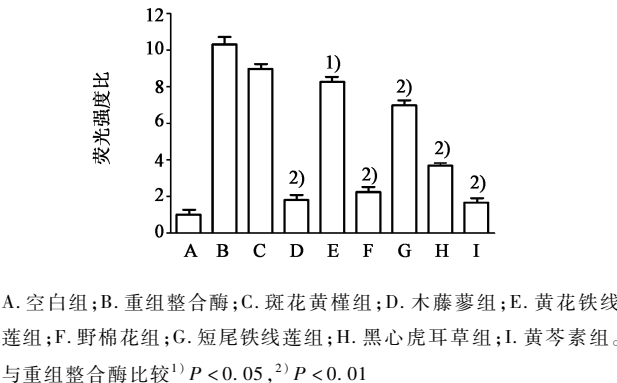


图 5 提取物对 HIV-1 整合酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of extracts on activity of IN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

藏族药主要分布在青藏高原地区,在独特的地理条件和自然环境下,形成了丰富的植物资源种类。

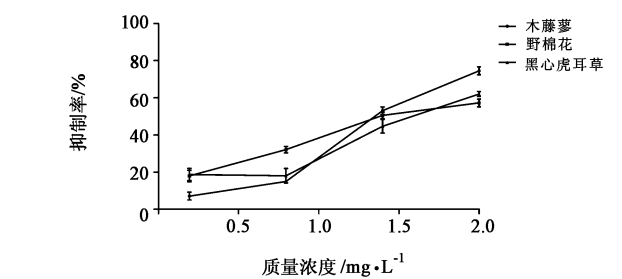


图 6 3 种提取物对 HIV-1 整合酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Effect of 3 extracts on activity of IN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

藏药医药学迄今为止已有千年历史,在长期不断的实践过程中形成了自己独有的医药体系,是我国民族医药学重要组成部分^[22-23]。截止到 2015 年 5 月,经批准列入 2010 年版《中国药典》的藏族药品种只有 17 种,列入国家卫生部颁发的藏族药标准的藏成药 200 种,列入青海省藏药标准的藏成药 191 种,经国家各级管理机关正式注册的藏成品种约为 290 种^[24-25]。对藏药新品种开发及更高的药用价值的研发投入已无法满足市场和藏族药发展的迫切需要。

近年来假病毒技术在病毒药物的研发和治疗方面取得了积极进展^[26],本研究通过 pSG3 Δ Env 和 Env 包膜质粒 SVPB16 共转染 HEK-293T 细胞得到 pSG3 HIV-1 假病毒,筛选和评价 6 种藏族药提取物的体外抗病毒活性,发现木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草具有较好的体外抗病毒作用效果。并在药理学实验基础上对传统靶点逆转录酶、蛋白酶、整合酶进行作用机制的初步研究,找寻可能的作用靶点。在传统的作用靶点分析中,由于检测技术不够灵敏,对于中药中含量低的活性成分检测效率低,由于 SPR 技术专属性强、灵敏度高、对待测样品纯度要求不高,适于体外高通量筛选发现先导化合物和确认活性成分与靶蛋白的相互作用^[27-30]。本研究通过 SPR 生物传感器检测药物与逆转录酶蛋白和整合酶蛋白体外结合亲和力,发现野棉花和黑心虎耳草对整合酶蛋白具有较高的结合。

通过 HIV-1 逆转酶蛋白酶、蛋白酶和整合酶的体外活性抑制实验证实了木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草对 so7d-IN 整合酶活性具有显著的抑制作用。何红秋等根据分子信标的原理,设计了荧光基团和淬灭基团标记的 3'加工反应 DNA 底物,建立了实时检测 IN 3'加工反应的高通量方法^[31],本实验室在此基础上建立了一种高通量的检测方法,通过在整合酶蛋白序列中加入一个非特异性 DNA 结合蛋白嗜热硫磺硫化叶菌染色体蛋白 Sso7d 的序列,Sso7d 有

助于稳定 DNA 的双螺旋结构并促使 DNA 构型转变,并将这段融合序列进行表达纯化,从而构建出一个高度可溶性且高活性的整合酶 Sso7d-I,与野生型整合酶不同的是它可以更有效的催化整合体的形成以及与寡核苷酸 DNA 底物的相关整合过程,提高了检测的灵敏度和特异性。目前已上市的整合酶抑制剂只有数种,因此开发毒性小的新型整合酶抑制剂具有重要意义^[32]。

综上所述,在细胞水平上对 6 种藏药提取物的体外活性筛选发现木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草具有良好的体外抗 HIV-1 病毒作用,对逆转录酶、蛋白酶、整合酶进行作用机制的初步研究发现其作用靶点可能与整合酶有关。在前期工作基础上,对提取物的进一步分离纯化,将有望从中筛选出新的抗 HIV 药物。

[参考文献]

[1] 宋丹,安玉会,鲍玉洲. 抗艾滋病药物研究进展[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(12):13-16.

[2] 刘瑞,彭勃. 中药治疗艾滋病的国内外研究进展[J]. 世界中医药, 2009, 4(3): 175-178.

[3] 张旋,黄宁,郑永唐,等. 我国中药来源的抗 HIV 天然化合物研究进展[J]. 药学学报, 2010, 45(2): 141-153.

[4] 买尔旦·马合木提,贺金华,古丽仙·胡加. 新疆软紫草提取物抗 HIV-1 体外活性研究(I) [J]. 新疆医科大学学报, 2009,32(4): 374-377.

[5] 方晓红,张绪利. 抗艾滋病毒中草药研究[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(10): 162-163.

[6] 刘瑞,彭勃. 中药治疗艾滋病的国内外研究进展[J]. 世界中医药, 2009, 4(3): 175-178.

[7] 杨柳萌,王睿睿,张高红,等. 中药有效部位复方奇士乐体外抗 HIV-1 活性研究[J]. 中国药理学通报, 2011,27(4):566-571.

[8] 杨丽华,林丽美,王智民,等. 藏族药榜嘎研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(10):43-49.

[9] 陈心启,崔鸿宾,戴伦凯,等. 中国植物志. 32 卷[M]. 北京:科学出版社,1999: 266-267.

[10] FANG Q C, LIN M, WENG Q M. Chemical study of alkaloids from corydalis conspersa [J]. Planta Med, 1984,50(1):25-27.

[11] 尚伟庆,陈月梅,高小力,等. 紫堇属藏药的化学与药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1190-1198.

[12] 赵娅敏. 藏药木藤蓼和中药千年健的化学成分研究[D]. 兰州:兰州大学, 2010, 22(6): 57-58.

[13] 王文采,李良千. 铁线莲属一新分类系统[J]. 植物分类学报, 2005,43(5):431-488.

[14] 李云飞,李骁. 铁线莲属蒙药材的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(3): 61-64.

[15] 涂院海,杨晓军. 黄花铁线莲化学成分阿魏酸对类风湿关节炎的治疗作用[J]. 延安大学学报:医学科学版, 2011, 9(4): 22-24.

[16] 谭文红,韦群辉,武文,等. 民族药野棉花的生药学研究[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(9):36-38.

[17] Pieme C A, Penlap V N, Ngogang J, et al. *In vitro* cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of malvaceae family from cameroon [J]. Environ Toxicol Pharmacol,2010(29): 223-228.

[18] Lissy K P, Simon T K, Lathab M S. Antioxiant potential of sidaretusa, *Urena lobata* and *Triumfetta rhomboidea* [J]. Anc Sci Life,2006,25(3/4): 10-15.

[19] 张小梅,柯秀梅,励娜,等. 藏族药翼首草的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23): 75-78.

[20] 左国营,张志军,陈丽蓉,等. 藏药黑蕊虎耳草的化学成分[J]. 云南植物研究, 2005, 27(6): 691-694.

[21] 彭宗根,秦德华,滕立,等. 丹参复合有效部位抗 HIV-1 活性的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 711-715.

[22] 秦阿娜,钟伯雄,刘伟志,等. 中国少数民族传统医药的现状分析研究[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 12(2): 1-4.

[23] 旺多. 浅论藏药的发展与前景[J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7(2): 3-5.

[24] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所. 中国藏药. 1 卷[M]. 上海: 科学技术出版社, 1996: 19-22.

[25] 李蓉榕. 青海省藏药产业现状分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(2): 38-39.

[26] 董占柱,高雪军,余黎. 假病毒的应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(2): 59-64.

[27] 陈朗东,曹岩,朱臻宇,等. 表面等离子共振生物传感器在中药活性分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2):196-201.

[28] Campbell C T, Kim G. SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics [J]. Biomaterials, 2007,28(15):2380.

[29] Piazz F D, Cotugno R, Lepore L, et al. Chemical proteomics reveals HSP70 1A as a target for the anticancer diterpene oridonin in Jurkat cells [J]. J Proteomics, 2013, 82(8): 14-19.

[30] GAO X G, ZHI Y, SUN L, et al. The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship [J]. J Biol Chem, 2013, 288(47): 33953-33965.

[31] 何红秋. HIV-1 整合酶活性检测方法建立和应用研究[D]. 北京:北京工业大学, 2010.

[32] 马帅,高文磊,赵俊,等. 人类免疫缺陷病毒-1 整合酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2014, 21(3):1877-1881.

[责任编辑 周冰冰]