清开灵注射液体外抑制 HIV-1 作用

赵令斋[1,2]， 曾耀英[1]， 黄秀艳[1]， 曾祥凤[1]， 林长乐[1]， 唐先高[1]

(1. 暨南大学生命科学技术学院 组织移植与免疫研究中心，广东 广州 510632；
2. 广州市第八人民医院 传染病研究所，广东 广州 510060)

[摘 要] 目的：研究清开灵注射液(QKL)体外抑制 HIV-1 的作用。方法：用 MTT 比色法检测 QKL 对 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞(慢性感染 HIV-$1_{ⅢB}$ 的 H9 细胞)和 MT-2 细胞的毒性；采用荧光染料 Calcein-AM 标记的 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞和系列稀释的 QKL 作用后，与 MT-2 细胞混合培养，2 h 后在荧光下计数融合细胞数目，评价 QKL 对两种细胞早期融合的影响；用 MTT 法检测 QKL 对 HIV-$1_{ⅢB}$ 急性感染的 MT-2 细胞的保护作用；用 HIVp24 抗原试剂盒检测 HIV-$1_{ⅢB}$ 感染的 MT-2 细胞的培养上清 p24 抗原的含量，分析 QKL 对 HIV-1 复制的影响。结果：QKL 对 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞和 MT-2 细胞的 CC_{50} 分别为 1/50.76 和 1/36.97；抑制 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞和 MT-2 细胞早期融合作用的 EC_{50} = 1/235.29，SI = 6.36；对 HIV-$1_{ⅢB}$ 感染的 MT-2 细胞保护作用的 EC_{50} = 1/144.93，SI = 3.92；抑制 p24 抗原产生作用的 EC_{50} = 1/175.44，SI = 4.75。结论：QKL 体外有抗 HIV-1 活性，作用机制可能是多靶点的，可抑制病毒进入细胞和胞内复制。

[关键词] 清开灵注射液； 人类免疫缺陷病毒Ⅰ型(HIV-1)； 细胞融合； 抑制作用
[中图分类号] R373.3 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)02-0176-04

Inhibitory effect of Qingkailing injection on HIV-1 in vitro

ZHAO Ling-zhai[1,2], ZENG Yao-ying[1], HUANG Xiu-yan[1], ZENG Xiang-feng[1], LIN Chang-le[1], TANG Xian-gao[1]

(1. Institution of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Institution of Infectious Deseases, Guangzhou 8th People's Hospital, Guangzhou 510060, China)

[Abstract] **Aim**: To investigate the inhibitory effect of Qingkailling(QKL) on HIV-1 *in vitro*. **Methods**: The cytotoxicity of QKL was detected by MTT assay. H9/HIV-$1_{ⅢB}$ cells labeled calcein-AM were treated with serially diluted QKL, and then co-cultured with MT-2 cells. After 2 hours, the cell fusion was observed with a fluorescencmicroscope. The protective effect of QKL on MT-2 cells infected by HIV-$1_{ⅢB}$ was detected by MTT. Viral replication was analyzed by measuring the level of p24 antigen in culture supernatants by p24 kit. **Results**: QKL was toxical to H9/HIV-$1_{ⅢB}$ cells and MT-2 cells. The CC_{50} was 1/50.76 and 1/36.97 respectively. The EC_{50} of QKL against early H9/HIV-$1_{ⅢB}$ cells and MT-2 cells fusion was 1/235.29 with a selective index of 6.36. QKL could protect MT-2 cells direct infected by HIV-$1_{ⅢB}$ from death. The EC_{50} was 1/144.93 with SI 3.92. The EC_{50} of QKL against P24 antigen production was 1/175.44 with SI of 4.75. **Conclusion**: QKL has inhibitory effect on HIV-1 *in vitro* and it reacted through at least two clarified antiviral mechamisms. QKL inhibited not only entry of HIV-1 into cell but also the replication.

[收稿日期] 2008-10-13
[基金项目] "973"国家重点基础研究项目(2004CB720100,2006CB504201)；广州市科技计划项目(2006Z1-E0091)
[作者简介] 赵令斋(1981-)，女，技师，硕士，研究方向：中药免疫药理
通讯作者：曾耀英，男，研究员，博士生导师，Tel：020-85226219；E-mail：tzengyy@jnu.edu.cn

[Key words] Qingkailing injection; human immunodeficiency virus-1 (HIV-1); cell fusion; inhibitory effect

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人免疫缺陷病毒(human mmunodeficiency virus, HIV)引起的一种致死性传染病,其流行范围广,致死率高,正严重威胁着人类的健康。自1981年发现第1例AIDS患者以来,抗HIV药物的研究一直没有停止过。目前,美国FDA批准的抗HIV的药物主要为化学合成药物,长期应用这些药物存在毒副作用大,耐药性不断产生、对潜伏病毒不起作用、停药后容易复发且价格昂贵等问题,均限制其临床应用。

近年来,国内外有关中药治疗HIV/AIDS的研究已成为当前抗病毒药物研究中的一个热点,清开灵注射液(qingkailing injection, QKL)是在古方"安宫牛黄丸"的基础上改良而成的一种纯中药复方制剂,由黄芩苷、栀子、板蓝根、金银花等8种成分组成,具有清热解毒、化痰通络、镇惊安神、醒神开窍等功效。QKL临床主要用于治疗感染性、传染性、脑血管性疾病等,因疗效肯定,副作用小,其临床应用范围愈来愈广[1-2]。本研究初步探讨了QKL体外抑制HIV-1的作用,为进一步扩大其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)主要材料和试剂　清开灵注射液(QKL)由北京中医药大学药厂生产,批号为311112A。叠氮胸苷(3'- Azido - 3'deoxythymidine, AZT)购自美国Biochemika Fluka公司,用DMSO溶解成浓度为100 mg/ml, -20℃储存,临用前用PBS稀释至工作浓度。钙黄绿素(Calcein-AM)购自美国Molecular Probe公司,用DMSO配成1 mmol/L,分装,-20℃避光储存。RETRO-TEK HIV-1p24 Antigen ELISA Kit购自美国ZeptoMetrix公司。RPMI-1640、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、L-谷氨酰胺等细胞培养试剂为GibcoBRL公司产品。四氮唑蓝3-(4,5-dimethylthiazd-2-yl)-2,5-diphenltetrazolium bromide, MTT)购自美国Sigma公司。

(2)细胞和病毒　H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞和MT-2细胞由南方医科大学免疫教研室惠赠;C8166细胞由中国科学院昆明动物所郑永唐教授惠赠;HIV-$1_{ⅢB}$病毒由H9/HIV-$1_{ⅢB}$和C8166细胞混合培养的上清中获得。

1.2 实验方法

(1)实验毒株的制备　处于对数生长期的H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞和C8166细胞以1:1的细胞数目比混合培养。待80%以上细胞形成合胞体时,再加入3倍数量的C8166细胞,继续培养3 d,离心收集上清(7 000 g × 15 min,4 ℃),分装,-80 ℃冻存。

(2)病毒滴度的测定　以TCID50为病毒定量指标。取上述制备的病毒,以RPMI-1640完全培养基4倍倍比稀释(4^{-1} ~ 4^{-10}),接种于96孔板,然后每孔加入5×10^4 MT-2细胞悬液,每孔终体积为200 μL,同时设MT-2细胞空白对照,设6个复孔。37 ℃、体积分数为5% CO_2孵箱中培养,第3天开始观察细胞病变(CPE),直到CPE不再形成。计算各稀释度病毒液出现CPE的孔数,按Reed-Muench法计算$TCID_{50}$为$10^{-5.1}$。

(3)QKL的细胞毒性测定　采用MTT法[3]测定QKL对H9/HIV-$1_{ⅢB}$和MT-2细胞的毒性。在96孔细胞培养板中,加入2倍倍比稀释的QKL,然后每孔分别加入5×10^4 H9/HIV-$1_{ⅢB}$和MT-2细胞悬液,设3个复孔,同时设不加药物的MT-2细胞、H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞对照。37 ℃、体积分数为5% CO_2培养4 d,加MTT温育4 h,离心,弃上清,每孔加入100 μL二甲基亚砜(DMSO)振荡10 min,酶标仪读取吸光度$A_{490\ nm}$值,计算细胞生长抑制率% = 1 - 实验孔A值/对照孔A值,由SPSS 10.0回归分析得CC_{50}(50% Cytotoxic concentration,即致半数细胞毒性的药物浓度)。

(4)QKL抑制H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞与MT-2细胞早期融合的作用　1 mmol/L的Calcein-AM按每1×10^5细胞2.5 μL量标记H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞,37 ℃孵育30 min,PBS离心洗涤2次。用含体积分数为10% FBS的RPMI-1640完全培养基重悬,调整细胞密度为1×10^8/L,每孔100 μL接种于96孔板。然后加入10 μL倍比稀释的QKL,同时设不加药物的细胞对照,每个样本设3个复孔,37 ℃、体积分数为5% CO_2温育30 min。然后每孔加入5×10^4 MT-2细胞,每孔终体积为200 μL。培养2 h后,倒置荧光显微镜下对融合细胞进行计数(N),每孔随机计数4个视野,取均值[4]。计算早期融合抑制率% = 1 - 实验孔N值/对照孔N值,由SPSS 10.0回归分析得出QKL抑制两种细胞早期融合作用的EC_{50}(50% Effective concentration,即半数有效浓度),并算出选

择指数 SI (Selectivity index) = CC_{50}/EC_{50}。

(5)QKL 对 HIV-1_{IIIB}急性感染的 MT-2 细胞的保护作用 将 5×10^4 MT-2 细胞悬液接种到含有倍比稀释的 QKL 的 96 孔细胞培养板上,然后加入 500 $TCID_{50}$的 HIV-1_{IIIB}病毒液,设 3 个复孔,同时设不加药物的 HIV-1_{IIIB}感染的阳性对照和不加病毒的单独 MT-2 细胞对照。37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养 6 d 后,MTT 法检测 MT-2 细胞的存活百分率,用 SPSS 直线回归计算 QKL 保护 HIV-1_{IIIB}感染的 MT-2 细胞存活的 EC_{50},计算 SI,计算方法同 1.2(4)。

(6)QKL 抑制 HIV-1_{IIIB}在 MT-2 细胞中复制的作用 1 000 $TCID_{50}$的 HIV-1_{IIIB}攻击 MT-2 细胞(细胞密度为 5×10^8/L)2 h。离心,弃上清,用 PBS 洗涤 1 次,去掉未黏附的病毒,然后用含体积分数为 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬 MT-2 细胞沉淀,在含有倍比稀释的 QKL 的 96 孔细胞培养板中每孔加入 5×10^4 个上述 MT-2 细胞悬液,设 3 个复孔,37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养。4 d 后更换培养基,继续培养 3 d。收集上清,用 p24 抗原检测试剂盒测定 HIV-1p24 抗原,实验操作步骤按试剂盒说明书进行。根据 *A* 值计算复制抑制率,抑制率% = (1 - 实验孔 *A* 值/对照孔 *A* 值) × 100%,SPSS 10.0 回归分析得出抑制病毒复制的 EC_{50}和 SI,计算方法同 1.2(4)。

2 结果

2.1 QKL 的细胞毒性

QKL 浓度高于 1/160 原液时对体外培养的细胞有一定的细胞毒性,QKL 对 MT-2 细胞和 H9/HIV-1_{IIIB}细胞的生长抑制率(图 1A),对两种细胞的 CC_{50}分别为 1/36.97 和 1/50.76 原液。

2.2 QKL 对急性感染病毒的 MT-2 细胞的保护作用

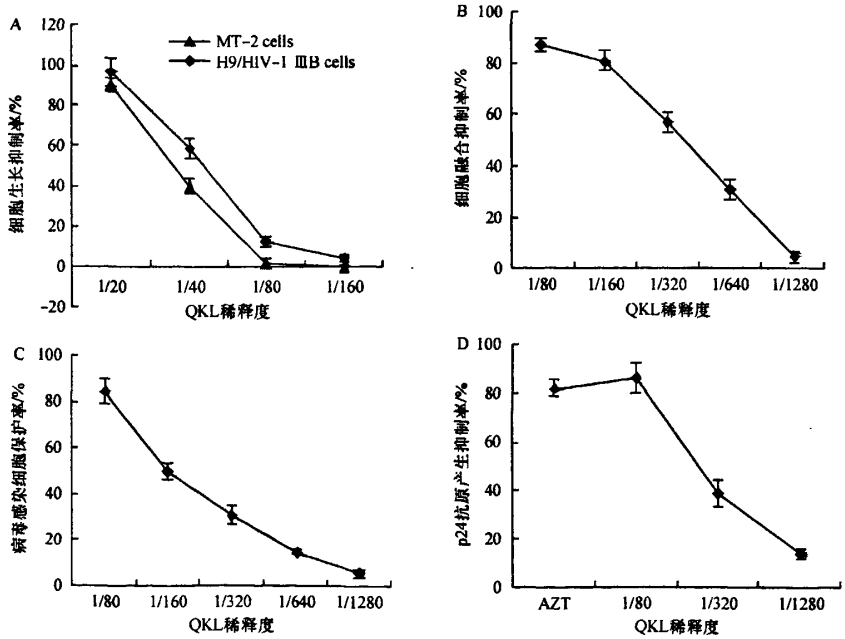
QKL 对 HIV-1_{IIIB}急性感染的 MT-2 细胞的保护率结果(图 1C),EC_{50} = 1/144.93,SI = 3.92。

2.3 QKL 抑制 HIV-1p24 抗原产生的作用

QKL 和 250 μg/mL 的 AZT 对急性感染病毒的 MT-2 细胞培养上清中的 p24 抗原产生的抑制率(图 1D),QKL 抑制 HIV-1 胞内复制的 EC_{50} = 1/175.44,SI = 4.75。

2.4 QKL 抑制 H9/HIV-1_{IIIB}细胞与 MT-2 细胞早期融合作用

倒置荧光显微镜下 Calcein-AM 标记的 H9/HIV-1_{IIIB}细胞为较强的均匀绿色荧光,体积较小,与 MT-2 细胞共同培养 2 h 后,两种细胞发生细胞融合,融合细胞荧光强度稍弱于未融合的 H9/HIV-1_{IIIB}细胞,细胞体积较大且形状不规则(图 2)。QKL 对两种细胞早期融合抑制率见图 1B,EC_{50} = 1/235.29,SI = 6.36。



A:QKL 对 MT-2 细胞及 H9/HIV-1_{IIIB}细胞的毒性作用;B:抑制 H9 / HIV-1_{IIIB}细胞和 MT-2 细胞融合的作用;C:对急性感染 HIV-1_{IIIB}的 MT-2 细胞的保护作用;D:QKL 和 250 μg/mL AZT 抑制 p24 抗原产生的作用

图 1 QKL 与 4 种不同物质的作用图

图 2　倒置荧光显微镜下 Calcein-AM 标记的 H9/HIV-1$_{IIIB}$细胞(A)及其与 MT-2 形成的融合细胞(B)(×400)

3 讨论

临床治疗 HIV/AIDS 应以经典的高效抗逆转录病毒治疗(highly active anti-retrovirus treatment, HAART)为主,间歇期通过中药的抗病毒和免疫调节作用抑制病毒载量反弹和 CD4$^+$T 细胞回落,使免疫功能维持正常,延长西药间歇期,减少用量及次数,避免毒副作用及耐药性的过早出现,减轻患者的负担[5]。QKL 中黄芩苷、栀子、金银花和板蓝根体外都有抑制 HIV-1 作用;以黄芩苷作用最明显、抑制 X4 和 R5 型 HIV Env 与靶细胞融合,在 HIV-1 感染的早期阶段抑制 DNA 的复制[6];通过干预病毒 RNA 结合于逆转录酶活性位点而抑制 HIV-1 逆转录酶活性[7],抑制 HIV-1 LTR 的基因表达,其机制可能是抑制了 NF-κB 或一种转录调节因子诱导的信号转导。

在 HIV 感染过程中,必须是 HIV 感染细胞或 HIV 病毒颗粒与靶细胞发生融合,HIV 遗传物质才能进入靶细胞内,病毒融合位点是筛选抗 HIV 药物的一个重要药物靶点。本研究对 HIV-1 介导的细胞融合实验通过观察 H9/HIV-1$_{IIIB}$细胞和未感染病毒的 MT-2 细胞共培养来实现。H9/HIV-1$_{IIIB}$细胞被 Calcein-AM 标记后,荧光结果表明,QKL 可减少融合细胞的形成,明显干扰病毒的吸附过程,是一种入胞抑制剂。

HIV 感染敏感细胞后,可导致细胞死亡,因此测定药物对感染细胞的保护作用是筛选抗 HIV 药物的常用方法之一。1988 年 Pauwels 等[3]建立了 MTT 法以检测药物抗 HIV 作用,即通过测定细胞的存活率来检测药物对病毒感染细胞的保护作用。本研究用此方法进行检测,结果表明,QKL 可提高病毒感染细胞存活率,保护病毒感染的细胞免于死亡,但其特异作用位点在本实验中不能确定。

HIV-1p24 抗原是 HIV 的核衣壳特异性蛋白,体外实验可通过检测培养上清中的 p24 抗原水平来判断病毒的复制水平。本实验结果表明,QKL 可减少 p24 抗原产生量,说明 QKL 对病毒复制有一定的抑制作用。

总之,QKL 体外对 HIV-1 有一定的抑制 HIV 作用,可抑制 HIV-1 向靶细胞的感染,亦可抑制 HIV-1 在细胞内的复制,保护病毒感染细胞,其抗病毒作用可能是多靶点、多途径的。因 QKL 组成成分复杂多样,其具体的抗病毒成分及效应机制还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 徐建好,张　维. 清开灵注射液近 5 年临床应用概况[J]. 中华实用中西医杂志,2005, 16(18): 756-759.

[2] 欧阳华,刘弋戈. 清开灵注射液临床应用概述[J]. 海峡药学,2005, 17(3): 121-125.

[3] PAUWELS R, BALZARINI J, BABA M, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds[J]. J Virol Methods, 1988, 20 (4): 309-321.

[4] LU L, LIU S W, JIANG S B, et al. Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25 (2): 213-218.

[5] 田春洪,张　震. 治疗 HIV/AIDS 中药的用药规律探讨[J]. 云南中医中药杂志,2005, 26(6): 13-14.

[6] LI B Q, FU T, DONGYAN Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 27 (2): 34-38.

[7] 赵　晶,张致平,陈鸿珊,等. 黄芩苷衍生物的合成及抗人免疫缺陷病毒活性研究[J]. 药学学报, 1998, 33 (1): 22-27.

[责任编辑:朱颖娜]