

Nephrol Dial Transplant, 1996, 11 (3): 444 - 448

[17] TEPEL M, VAN DER GIET M, SCHWARZFELD C, *et al* Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine[J]. *N Engl*

J Med, 2000, 343 (3): 180 - 184

[18] XDNG X L, JIA R H, YANG D P, *et al* Irbesartan attenuates contrast media-induced NRK-52E cells apoptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2006, 54 (4): 253 - 260

羧甲基茯苓多糖体外抗艾滋病病毒作用研究

强华贵, 杨占秋

(武汉大学医学病毒学研究所, 病毒学国家重点实验室, 430071)

[摘要] 目的 观察羧甲基茯苓多糖(CMP)体外抗艾滋病病毒(HIV)作用。方法 通过观察CMP对HIV-1 B诱导感染C8166细胞致细胞病变的抑制实验及对HIV-1 B感染MT4细胞的保护实验进行CMP抗HIV-1活性研究。结果 同对照组相比, 10 000, 1 000和0 100 g · L⁻¹ CMP对C8166细胞培养上清液HIV-1 B P24抗原的分泌有抑制作用(P < 0.05), IC₅₀为1.8 g · L⁻¹, 10 000和1 000 g · L⁻¹ CMP对感染HIV-1 B的MT4细胞有保护作用(P < 0.05), EC₅₀为0.5 g · L⁻¹。结论 CMP体外有一定的抗HIV病毒的作用。

[关键词] 羧甲基茯苓多糖; 艾滋病病毒; 体外

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)10-1156-03

Study on the Anti-HIV Effect of Carboxymethyl Pachymaran in Vitro

QIANG Hua-gui, YANG Zhan-qiu (State Key Laboratory of Virology Institute of Medical Virology, School of Medicine, Wuhan University 430071, China)

ABSTRACT Objective To investigate the anti-HIV effect of carboxymethyl Pachymaran (CMP) *in vitro* **Methods** The inhibitory activities against HIV-1 by CMP were evaluated on cytopathic C8166 cells induced by HIV-1 B and infected MT4 cells by HIV-1 B. **Results** Compared with the control, CMP inhibited the secretion of HIV-1 B P24 antigen (P < 0.05) at the concentration of 10 000 g · L⁻¹, 1 000 g · L⁻¹ and 0 100 g · L⁻¹, with IC₅₀ 1.8 g · L⁻¹, protected MT4 cells against HIV-1 B infection (P < 0.05) at 10 g · L⁻¹ and 1 g · L⁻¹ as well **Conclusion** CMP has antiviral effect against HIV *in vitro*

KEY WORDS Carboxymethyl pachymaran (CMP); Human immunodeficiency virus; *In vitro*

艾滋病的防治是一个世界性难题。艾滋病病毒(HIV)疫苗尚有待在理论上和技术上实现重大突破^[1]。中医药是我们的国宝, 一直以来, 它在治疗慢性疾病中显示出的独特作用不能忽视。茯苓是一味传统的中药, 其主要化学成分是茯苓聚糖, 切除(1-6)支链后, 即可得到茯苓多糖, 茯苓多糖经羧甲基化可得到溶于水的羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachymaran, CMP)^[2]。羧甲基茯苓多糖具有抗肿瘤、增强免疫、抗辐射、抗病毒、保肝、催眠、诱生与催诱生人血抗癌细胞因子的作用^[3]。目前国内关于茯苓用来抗HIV的研究笔者尚未见报道。

但有报道茯苓可以用于改善艾滋病症状^[4,5], 也有抗HSV-1病毒^[6]和抗HIV病毒^[7]的报道, 本研究观察了CMP的抗HIV作用, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 CMP购自浙江省庆元县真菌多糖制品有限责任公司; 胎牛血清(FBS)、RPMI-1640培养液购自Hyclone公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)及阳性对照化合物齐多夫定(AZT)购自Sigma公司; P24检测试剂盒购自美国Perkin Elmer公司; MT4细胞、C8166细胞(为人T淋巴细胞系)及HIV-1株HIV-1 B株均由英国Medical Research Council (MRC)惠赠。

1.2 病毒滴度的测定 取上述毒株按常规复苏培养后, 以组织培养半数感染量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)表示病毒滴度。将HIV-1 B贮存液在96孔板上作4倍稀释, 10个梯度, 每梯度6个重复孔, 同时设置对照孔6孔。每孔加入C8166细胞(2 × 10⁶个 · mL⁻¹) 50 μL, 每孔终体积为200 μL。37 ℃、5%

[收稿日期] 2008-02-10

[作者简介] 强华贵(1981-), 男, 湖北荆门人, 在读硕士, 研究方向: 临床与分子病毒学和抗病毒药物。电话: (0) 15927274399, E-mail: joan9713027181@sohu.com.

[通讯作者] 杨占秋(1952-), 男, 教授, 博士生导师, 电话: 027-68759136, E-mail: zqyang@whu.edu.cn.

二氧化碳 (CO₂) 条件培养。第 3 天补加新鲜 RPMI-1640 完全培养基 100 μL, 第 7 天倒置在显微镜下观察每孔中 HM-1 诱导的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 以每孔是否有合胞体 (Syncytium) 的形成确定; 至不再出现新的合胞体为止, 收集上清液, 测定每孔 HM-1 的 P24^[8], 按 Reed-Muench 法^[9] 计算 TCD₅₀。

1.3 药物对细胞的毒性实验 采用 MTT 比色法^[10] 将 C8166 按每孔 4 × 10⁵ 个接种于 96 孔板中 (每孔 100 μL), 并配制实验需要系列稀释的 2 含药培养液: CMP 为 10.00, 5.00, 2.50, 1.00, 0.50, 0.20, 0.10, 0.05, 0.02, 0.01 g · L⁻¹; AZT 为 100.0, 50.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 μmol · L⁻¹, 每孔加入 100 μL 上述 2 含药培养液, 各药共 10 种浓度, 每个浓度各 4 复孔, 同时设阴性对照。37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。第 4 天每孔补加上述 1 含药培养液及对照培养液 50 μL, 第 7 天末每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT 溶液 20 μL, 37 ℃ 培养 4 h, 离心弃上清液后, 每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 150 μL, 震荡 10 min, 测定波长 490 nm 处吸光度值 (A 值)。细胞存活率 (%) = 实验孔 A 值 / 对照孔 A 值 × 100 %。

1.4 药物抑制实验 取上述系列稀释的 2 含药培养液中 10 倍稀释浓度, 即 CMP 为 10.000, 1.000, 0.100, 0.001 g · L⁻¹, AZT 为 100.0, 10.0, 1.0, 0.1 μmol · L⁻¹ 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 每浓度各 6 复孔。取 8 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ C8166 细胞 1 mL, 离心弃上清液, 加入培养液 500 μL 重悬细胞, 并以 1 000 TCD₅₀ / 10⁶ 细胞的比例攻击 C8166 细胞, 即加入 1 000 VTCD₅₀ · mL⁻¹ 的 HM-1 毒株 500 μL, 37 ℃ 孵育 1 h, 将孵育后的感染细胞稀释至 8 mL, 即细胞 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 同时设立阳性及阴性 (每孔正常 C8166 细胞 1 × 10⁵ 个) 对照, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, 每天观察 CPE, 第 4 天每孔补加上述 1 含药培养液及对照培养液 50 μL, 第 7 天末收集上清液测定 HM-1 P24 抗原, 并在光镜下观察各孔细胞形态变化。

1.5 HM-1 P24 抗原测定 ELISA 法测定细胞培养上清液 HM-1 的 P24 抗原, 按说明书进行操作。酶标仪 450 nm 处测定每孔 A 值。6 个平行孔取均值后计算抗原抑制率。抗原抑制率 (%) = (对照孔 P/N 值 - 实验孔 P/N 值) / (对照孔 P/N 值 - 2.1) × 100 %, P 为阳性孔 A 值, N 为阴性对照孔 A 值, P/N 值 > 2.1 为阳性。药物半数抑制浓度 (IC₅₀) = lg⁻¹ { lgB + [(50 - B) 的抑制百分数 / (A - B) 的抑制百分数] × C }, A 为抑制 > 50% 药物浓度, B 为抑制 < 50% 药物浓度, C 为

lg 稀释倍数^[11]。

1.6 药物保护实验 同“1.4 项”的方法处理 MT4 细胞, 第 7 天末每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT 溶液 20 μL, 37 ℃ 培养 4 h, 离心弃上清液后, 每孔加入 DMSO 150 μL, 震荡 10 min, 测定波长 490 nm 处 A 值。细胞存活率 (%) = 实验孔 A 值 / 对照孔 A 值 × 100 %。保护率 (%) = (实验组 A 值 - 病毒对照组 A 值) / (MT4 细胞对照组 A 值 - 病毒对照组 A 值) × 100 %。半数有效浓度 (EC₅₀) 计算参考“1.5 项”中 IC₅₀ 计算公式。

1.7 统计学方法 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 统计软件进行分析, 组间比较采用方差分析, 实验组和对照组比较采用 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞毒性 药物对 C8166 及 MT4 细胞的毒性表现为细胞形态改变, 固缩或破碎, 对 MTT 摄入及转化减少, A 值下降。结果表明 CMP 及 AZT 在所选浓度下对细胞基本上没有毒性, 两种药物不同浓度下细胞存活率见表 1。

表 1 药物对 C8166 及 MT4 细胞毒性实验

组别	细胞存活率 / %	
	C8166 细胞	MT4 细胞
CMP / (g · L ⁻¹)		
10.00	82.04	90.87
1.00	91.43	95.60
0.10	93.58	91.74
0.01	92.75	94.31
AZT / (μmol · L ⁻¹)		
100.0	84.37	86.75
10.0	89.78	90.68
1.0	95.43	97.38
0.1	92.37	92.40

2.2 药物对 C8166 细胞培养上清 HM-1 的 P24 抗原的抑制作用 CMP 及 AZT 对 C8166 细胞培养上清 HM-1 P24 抗原的分泌均有抑制作用, 其抑制作用见表 2。CMP 及 AZT 的 IC₅₀ 分别为 1.8 g · L⁻¹ 和 0.5 μmol · L⁻¹。

2.3 药物对 HM 致感染细胞死亡的保护作用 HM-1 体外感染 MT4 细胞后, 在一定的时间内 (5 ~ 7 d), 感染细胞会死亡, 而用药之后, 可见细胞死亡明显减少。用 MTT 法测定存活细胞, 酶标仪测定 A 值。结果表明 CMP 及 AZT 均对感染了 HM-1 的 MT4 细胞有保护作用, CMP 及 AZT 的 EC₅₀ 分别为 0.50 g · L⁻¹ 和 0.3 μmol · L⁻¹。结果见表 3。

3 讨论

本研究结果初步显示, CMP 有一定的抗病毒作

用,并对感染 HM 的细胞有一定的保护作用。进一步的研究可能还要找出 CMP 抗病毒的作用是由于其对细胞的保护作用,还是其本身的免疫调节作用。如果说 CMP 本身有抗病毒的作用,还要进一步找出其抗病毒的机制,是针对病毒生物学作用的哪一步,相对于已有的抗病毒的药物而言,和它们的作用机制有什么不同。

表 2 药物对 C8166 细胞培养上清 HIV-1 的 P24 抗原的抑制作用

组别	HIV-1 P24 P/N 值	HIV-1 P24 抑制率 / %
CMP/(g · L ⁻¹)		
10.000	14.98 ± 1.03 ^{*1}	67
1.000	24.42 ± 0.98 ^{*1}	44
0.100	31.89 ± 1.24 ^{*1}	25
0.001	39.79 ± 1.32	5
AZT/(μmol · L ⁻¹)		
100.0	10.21 ± 0.87 ^{*1}	79
10.0	11.49 ± 1.13 ^{*1}	76
1.0	17.83 ± 0.89 ^{*1}	60
0.1	32.56 ± 0.76 ^{*1}	23
病毒对照组	41.97 ± 0.63	
细胞对照组	-	

与病毒对照组比较, ^{*1}P < 0.05

表 3 药物对病毒致 MT4 细胞死亡的保护作用

组别	A 值	保护率 / %
CMP/(g · L ⁻¹)		
10.000	1.044 0 ± 0.042 6 ^{*1}	65
1.000	1.017 0 ± 0.052 3 ^{*1}	60
0.100	0.828 4 ± 0.049 8	25
0.001	0.774 5 ± 0.041 2	15
AZT/(μmol · L ⁻¹)		
100.0	1.130 2 ± 0.036 7 ^{*1}	81
10.0	1.097 9 ± 0.048 2 ^{*1}	75
1.0	1.060 2 ± 0.054 2 ^{*1}	68
0.1	0.855 3 ± 0.043 6	30
病毒对照组	0.693 6 ± 0.039 3	0
细胞对照组	1.232 7 ± 0.035 1	-

与病毒对照组比较, ^{*1}P < 0.05

不可忽视的是本研究中 CMP 对细胞的有益作用,可能是由于其免疫调节作用。CMP 体内与体外实验均能促进小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子(TNF- α)^[12],皮下注射 CMP 可以提高小鼠巨噬细胞吞噬指数,可增强小鼠抗体分泌细胞数以及抗原结合细胞数,并增强小鼠迟发性超敏反应,促进健康人外周血淋巴细胞分泌白细胞介素(L)-2、干扰素(IFN)- γ 、TNF-

α 、L-6,并诱导人外周血淋巴细胞产生粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),体内外给药后显著增强 ConA 或 LPS 活化的小鼠脾淋巴细胞的增殖反应及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的作用。CMP 体外给药后可直接促进小鼠脾淋巴细胞的增殖反应和小鼠混合淋巴细胞反应。这些细胞因子的释放可能是其抗 HM 作用的原因。

通过本项研究,为今后的研究提出了方向,那就是进一步研究药物作用后,感染了 HIV 的小鼠 PBMC 免疫学分泌有什么改变,如 IL-2、TNF- α 、IFN- γ ,然后是给予 CMP 作用动物后,收集含药血清,看含药血清对感染 HIV 细胞的 P24 分泌的抑制作用和细胞保护作用,同时测定免疫分子分泌的改变。临床上还可以观察 HIV 患者接受 CMP 治疗后免疫学指标改变以及病毒载量的改变。

[参考文献]

- [1] 洪坤学,邵一鸣. 艾滋病疫苗研究进展 [J]. 公共卫生与预防医学, 2007, 18(2): 1 - 4.
- [2] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖研究进展 [J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 19 - 20.
- [3] 张明利,徐立然,张世玺,等. 小半夏加茯苓汤治疗艾滋病 HAART 疗法致消化道反应 24 例 [J]. 中医研究, 2006, 19(3): 48 - 49.
- [4] 刘国,黄尧洲,张莅峡,等. HIV 感染腹泻的诊治体会 [J]. 中医药研究, 1999, 15(2): 6 - 7.
- [5] 张信岳,杨根元,梁丽坚,等. 羧甲基茯苓多糖体外抗单纯疱疹病毒型的作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 161 - 163.
- [6] 段会平,侯安继,陆付耳,等. 羧甲基茯苓多糖对 HBV 转染细胞表达功能影响的实验研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19(3): 290 - 292.
- [7] 李在留,李凤兰,郑永唐,等. 文冠果种皮中的香豆素类化合物及抗 HIV-1 活性研究 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 73 - 83.
- [8] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 143 - 146.
- [9] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 186 - 187.
- [10] 李晶晶,杨璞,叶方立. 一种简单、精确计算 EC50 的方法 [J]. 数理医药学杂志, 2001, 14(6): 481 - 482.
- [11] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 食用菌, 2002, 22(4): 39 - 41.
- [12] 张秀军,徐俭,林志彬. 羧甲基茯苓多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(12): 913 - 916.