

·实验研究·

运用猴免疫缺陷病毒筛选抗艾滋病 中药的实验研究

中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700)

关崇芬 王忆浙

中国医学科学院实验动物研究所 吴小闻 何伏秋 涂新明 魏 强

内容提要 本文研究了 40 余种中药或中药有效成分的抗猴免疫缺陷病毒(SIV)的活性, 实验结果发现: 其中 5 种中药有 >50% 的 SIV 抗原阳性细胞抑制率, 抑制率在 30~50% 之间的中药有 5 种。实验初步结果认为, 中药可以抑制猴免疫缺陷病毒, 有些中药的实验结果与国内外报道对人免疫缺陷病毒的抑制作用一致。尚发现几种未见报道的对 SIV 有抑制作用的中药。因此, 在没有 P₃ 级实验室的条件下, 采用 SIV 也可以较好地普通病毒实验室内进行艾滋病的研究工作。

关键词 艾滋病 中药 猴免疫缺陷病毒

猴免疫缺陷病毒(Simian Immunodeficiency Virus 简称 SIV)是在 1984 年由新英格兰灵长类研究中心从恒河猴中首次分离^[1]。人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus 简称 HIV)与从恒河猴与非洲绿猴中分离的 SIV 基因组成极为近似, 均属于逆转录病毒, 我们采用 HUT-78, SIV 系统, 在体外筛选了 40 余种中药的抗病毒作用。

材料与方法

一、中药处理

各种中药用水煎煮 1 h 后过滤除菌, 中药有效成分经双蒸水溶解后过滤除菌。用 RPMI1640(Gibco, U. S. A. 产品), 含 10% 新鲜小牛血清、1% L-谷氨酰胺及 100 mu 双抗的培养液稀释中药。用胎盼蓝染色方法确定中药对 HUT-78 细胞的毒性作用, 取无毒性作用时最大浓度的中药作为开始实验的稀释度(中药均经专家鉴定过)。

二、SIV 及 HUT-78 系统

在 24 孔板(Flow Laboratory 产品)加入 0.8 ml 上述确定稀释度的中药, 同时加入 0.4 ml 的 10 TCID₅₀ 的 SIV 与 0.4 ml 的 2.0×10^5 个/ml 的 HUT-78 细胞悬液。每种中药均设双复孔, 培养后第 5 天弃上清 0.8 ml, 再加入 0.4 ml 中药与 0.4

ml RPMI1640 培养液, 培养到第 10 天结束。

三、融合细胞的观察

在普通倒置显微镜下观察第 5 天与第 10 天的融合细胞数, 用下述计数方法计数: 30(++++)、20~29(+++)、10~19(++)、1~9(+) 和 0(-)。

四、间接荧光法观察(IF)SIV 抗原阳性细胞

第 10 天将 HUT-78 细胞洗 3 遍, 涂片后用 SIV 抗血清与荧光抗体标记物染色, 在荧光显微镜下观察计数两个视野中 SIV 抗原阳性细胞与全部细胞, 得出阳性细胞百分比后计算 SIV 抗原阳性细胞抑制率。

荧光细胞抑制率(%) =

$\frac{\text{加药孔荧光细胞百分比} - \text{病毒对照孔细胞百分比}}{\text{病毒对照孔细胞百分比}}$

病毒对照孔细胞百分比

五、产毒量游离病毒滴定

第 10 天后取各孔上清液在 96 孔板内稀释加入 CEM_x 细胞, 培养 5 天后在倒置显微镜下观察融合细胞数, 计算病毒滴度。

六、结果判定

以荧光细胞抑制率为主, 参照病毒产量及细胞病变。

1. 对 SIV 明显抑制 抑制率 > 50%, 病毒产量下降 2^2 倍以上者。

2. 对 SIV 轻度抑制 抑制率在 30~50% 之间, 病毒产量下降 $2 \sim 2^2$ 倍者。

3. 对 SIV 无抑制作用 抑制率 < 30% 者。

结 果

我们采用 HUT78-SIV 系统, 观察细胞病变、SIV 抗原阳性细胞抑制率及游离病毒测定, 筛选出有明显抑制 SIV 的中药 5 种, 轻度抑制者 5 种, 其实验结果见表 1。

表 1 中药能抑制 SIV 活性

中药名	实验浓度	病 变	荧光细胞	抑制率	病毒产生
柴胡	1:100	+	12.6	3.07	1:64
紫花地丁	1:100	+	3.31	76.61	1:128
夏枯草	1:100	+++	24	10	1:160
天花粉	1:400	++	4.1	68.56	1:256
炙黄芪	1:100	+++	23	12	1:80
甘草制剂	1:20	++	2.1	78.81	1:20
猪苓多糖	1:20	+++	15.1	6	>1:512
806	1:40	+++		28	>1:320
黄连	1:10 ⁴	+++	25	25.37	1:160
大蒜素	1:40	+++	26	14.8	1:320
香菇多糖	1:40	+++	32	13.1	1:640
白花蛇舌草	1:160	++++	24	11	1:640
七叶一枝花	1:160	+++	23	12	1:640
牛蒡子	1:320	+++	29.5	8.38	>1:1280
紫草	1:30	+++	23.5	29.85	1:320
金银花	1:320	++	25.5	23.88	1:320
穿心莲	1:2000	+++	26.5	20.89	1:320
栀子	1:320	+++	30.5	8.950	1:640
僵蚕	1:80	+++	26.5	20.89	1:160
虎杖	1:160	+++	31	7.40	1:320
郁金	1:80	+++	28.5	14.93	1:640
AZT	0.04 mM	+	1.29	90.1	<1:41

表 2 中药能抑制 SIV 活性

中药名	实验浓度	病变	荧光细胞	抑制率	病毒产生
AS 001	1:50	+	7.23	44.56	1:128
AS 002	1:100	+	8.5	34.43	1:64
AS 003	1:50	+	3.43	73.70	1:328
AS 004	1:320	++	16	52.38	1:80
AS 005	1:320	++	20	40.29	1:160
AS 006	1:320	++	23	31.34	1:160
AS 007	1×10 ³	++	8.45	35.2	1:512
SIV 对照		++++	33.5		1:640
AZT	0.04 mM	+	1.29	90.1	<1:41

在实验中尚发现未见报道的几种能抑制 SIV 的中药, 目前正在进行研究。如表 2 所示。

讨 论

从 1987 年以来, 我国与坦桑尼亚合作, 用中医药治疗艾滋病患者, 在临床研究中取得了一定的效果。

我们选择临床研究中有疗效的中药进行了实验研究。用 HUT78-SIV 系统筛选了 40 余种中药, 实验结果发现能明显抑制 SIV 的中药 5 种, 轻度抑制者 5 种。其中紫花地丁、天花粉、甘草国外报道中已证实对 HIV 有较好的抑制作用^(2~4), 在我们的实验中, 这些中药也表现出明显的抑制 SIV 作用, 与国外用 HIV 实验的结果一致。实验中发现, 我们所用的紫花地丁经过鉴定属于紫堇科植物, 与 Chang 的报道中使用的紫花地丁科属不同, 却具有同样的抑制病毒作用, 提示我们在选用中药进行实验研究时, 必须注意严格鉴定产地、种属等, 以便正确评价其作用。

另外, 实验中也发现一些尚未见报道的具有不同程度的抑制 SIV 作用的中药, 有待进一步研究。通过实验, 我们认为: 密切结合艾滋病的临床研究, 选择有一定疗效的中药进行实验研究, 然后再反馈到临床应用, 是一条较为理想的研究途径。

此外, 我们用 SIV 筛选抗艾滋病的中药, 取得了较好的结果。由于中药品种繁多, 实验周期长, HIV 实验需要 P₃ 级实验室, 因此, 给在实验室内筛选抗艾滋病中药的研究带来了一定的困难。P₃ 级实验室在国内仅有为数不多的几家, 且造价昂贵, 因此我们认为, 用 SIV 进行抗艾滋病的中药筛选或进行研究工作是非常有意义的, 可以作为应用于 P₃ 实验室研究筛选 HIV 中药的一个初筛实验。

参 考 文 献

1. R. C. D. Desrosiers, et al. Origins of HTLV-4 Nature 1987; 327:107.
2. R. Shihman Chang, et al. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. Antiviral Research 1988; 9:163-176.
3. 伊藤正彦, 等. 甘草甜素的抗病毒作用. 第四回和汉医学学会学术总会论文摘要 1987; 8:21-22.
4. 后藤洋一, 等. 甘草甜素制剂治疗艾滋病的效果. 医学のあゆみ 1987; 140(8):619-620.

Screening of Anti-SIV Drugs from Chinese Medicinal Herbs

Guan Chong-fen (关崇芬), Wang Yi-zhe (王忆浙), Wu Xiao-xian (吴小闲) *

Institute of Basic Theory, China Academy of TCM, Beijing (100700)

* *Institute of Lab. Animal Science, Chinese Academy of Med. Sciences (100021)*

The inhibitory activities of more than 40 species of Chinese medicinal herbs or their single chemical components against simian immunodeficiency virus (SIV) have been studied. The study revealed that four species of the medicinal herbs and a single chemical component had more than 50% inhibition of SIV antigen expression and five other herbs' inhibitory rate of SIV antigen expression was between 30–50%. The results showed that Chinese medicinal herbs could inhibit the SIV activity.

Key words Acquired immunodeficiency syndrome, Chinese medicinal herbs, simian immunodeficiency virus

(Original article on page 162)

Morphological Changes of Pituitary Gland and Ovary in Testosterone-induced Anovulatory Rat Treated with Chinese Medicinal Herbs of Replenishing Kidney

Wei Mei-juan (魏美娟), Yu Jin (俞瑾)

Obstetrics and Gynecology Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200011)

Injection of testosterone propionate 1.25mg were given to SD rats on 9 days of age, and fed with replenishing Kidney herbal decoction as well as with distilled water as control from 80 to 94 days of age. On 100 days of age, all the rats were sacrificed and the pituitary glands and ovaries were excised for examination. In the ovaries, increase in interstitial glands' count and lowering of lipid drop's quantity in cytoplasm of interstitial glandular cells were observed after the treatment, and intracellular "crinophagy" and "autophagy" disappeared in the pituitary gland. After treatment with replenishing Kidney drugs, ovarian estrogen receptors increased whereas the ovarian progesterone receptors raised even higher. It suggests that both ovaries and pituitary gland in testosterone induced anovulatory rats were affected by herbs of replenishing Kidney.

Key words: testosterone-induced anovulation, medicinal herb of replenishing Kidney, interstitial gland

(Original article on page 164)

Experimental Study on Effects of 18 Kinds of Chinese Herbal Medicine for Synthesis of TXA₂ and PGI₂

Wang Shuo-ren (王硕仁), Guo Zi-qiang (郭自强), Liao Jia-zhen (廖家桢)

Affiliated Dongzhimen Hospital, Beijing College of TCM, Beijing (100700)

The effect of 18 kinds of Chinese herbal medicine for the synthesis of TXA₂ and PGI₂ was studied. The porcine lung microsoma was used as donor of enzymes such as cyclo-oxygenase, thromboxane A₂ synthetase and prostacyclin synthetase, etc. It was found that *Glehnia littoralis* could inhibit the synthesis of TXA₂ and increase the formation of PGI₂. *Rheum palmatum* (300mg group) and *Erigeron breviscapus* significantly inhibited the synthesis of TXA₂, but no apparent effect on the synthesis of PGI₂. When *Codonopsis pilosulae*, *Astragalus membranaceus*, *Angelica sinensis*, Ginsenosides and Baicalin, etc. markedly inhibited the formation of TXA₂ and mildly affected the formation of PGI₂. Some Chinese herbs for promoting blood circulation play an important role on the inhibition of TXA₂ synthesis. Some tonic herbs could either inhibit the synthesis of TXA₂ and increase the synthesis of PGI₂ or inhibit the formation of PGI₂. Therefore these tonic herbs had the characteristics of both strengthening the body resistance and eliminating pathogenic factors. In this aspect they are better than the control drug (Aspirin) and other herbs of promoting blood circulation.

Key words thromboxane A₂ (TXA₂), prostacyclin (PGI₂), Arachidonic acid

(Original article on page 167)