蒲葵籽提取物体外抗 HIV-1 活性及机制的初步研究

李春艳[1,3]，曾艳波[2]，彭 芳[3]，戴好富[2*]，郑永唐[1*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型和人类疾病机理重点实验室 分子免疫药理学实验室，云南 昆明 650223；
2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所，海南 海口 571101；3. 大理学院药学院，云南 大理 671000)

摘 要：目的 研究蒲葵籽提取物的体外抗 HIV-1 活性，对有活性粗提物进行初步机制研究。**方法** 采用细胞毒性、合胞体抑制、HIV-1 感染细胞保护实验和 HIV-1 p24 抗原测定等实验对蒲葵籽提取物体外抗 HIV-1 活性进行筛选和确认；采用重组 HIV-1 逆转录酶和蛋白酶活性抑制实验，融合阻断实验初步探讨活性粗提物的作用机制。**结 果** 蒲葵籽的醋酸乙酯 (P3) 提取物具有较强的体外抗 HIV-1 活性，P3 抑制 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的 EC_{50} 为 5.64 μg/mL，对 C8166 细胞的毒性较小，CC_{50} 大于 200 μg/mL，治疗指数 (TI) 大于 35.46；P3 抑制 HIV-1 急性感染中 p24 抗原表达的 EC_{50} 为 23.04 μg/mL，抑制正常 C8166 细胞与慢性感染细胞 H9/HIV-1_{IIIB} 融合的 EC_{50} 为 8.00 μg/mL；P3 在质量浓度为 200 μg/mL 时，对 HIV-1 逆转录酶的抑制率为 28.86%；P3 抑制重组 HIV-1 蛋白酶活性的 EC_{50} 为 1.77 μg/mL。**结论** 蒲葵籽的醋酸乙酯提取物 (P3) 具有较强的体外抗 HIV-1 活性，其作用机制可能主要为阻断病毒进入和抑制 HIV-1 蛋白酶活性。

关键词：蒲葵籽；提取物；抗 HIV-1 活性；HIV-1 蛋白酶

中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)12-1833-06

In vitro anti-HIV-1 activity of extracts from *Livistona chinensis* seeds and its mechanism

LI Chun-yan[1,3,4], ZENG Yan-bo[2], PENG Fang[3], DAI Hao-fu[2], ZHENG Yong-tang[1]

(1. Laboratory of Molecular Immunopharmacology, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Faculty of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: Objective To evaluate *in vitro* anti-HIV-1 activities of the extracts from *Livistona chinensis* seeds. **Methods** To screen and confirm the anti-HIV-1 activities of the exracts from *L. chinensis* seeds, the cytotoxicity assay, syncytium reduction assay, protection for HIV-1 induced lytic assay, and ELISA for HIV-1 p24 antigen assay were used. The inhibition assay of recombinant HIV-1 RT activity and protease activity, and co-cultivation assay were used to study the primary mechanisms. **Results** The ethyl acetate extract (P3) from *L. chinensis* seeds inhibited HIV-1 potently with a therapeutic index (TI) over 35.46. The P3 showed the anti-HIV-1 activity with EC_{50} of 5.64 μg/mL in syncytia formation assay and exerted cytotoxicity against C8166 cells with CC_{50}>200 μg/mL. In acute infection, the P3 inhibited HIV-1 p24 antigen expression with EC_{50} of 23.04 μg/mL. The P3 also inhibited cell-to-cell H9/HIV-1_{IIIB} fusion in co-culture with EC_{50} of 8.00 μg/mL. The P3 at a concentration of 200 μg/mL weakly inhibited the recombinant HIV-1 RT activity by 28.86%. It also inhibited significantly the recombinant HIV-1 protease activity with EC_{50} of 1.77 μg/mL. **Conclusion** The P3 is effective against HIV-1. The anti-HIV-1 mechanism of P3 might relate to the blockade of HIV-1 entry into cells in order to inhibit the activity of HIV-1 protease.

Key words: *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Brown; extract; anti-HIV activity; HIV-1 protease

中国艾滋病 (AIDS) 流行态势严重，HIV/AIDS 感染者的人数已居亚洲第 2 位，全球第 14 位。艾滋病流行已经成为中国最为严重的社会问题之一。由于 HIV 疫苗的研制尚未成功，目前抗 HIV 药物治疗仍是防治艾滋病的重点。美国 FDA 批准了近 30 种抗 HIV 药物的临床应用，高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 使得 HIV 感染者的死亡率得到一定的控制。然而，由于 HIV 易变异，耐药性和药

收稿日期：2008-03-07
基金项目：国家科技攻关计划资助项目 (2004BA719A14)；中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KSCX1-YW-R-15；KSCX1-YW-R-24)；云南省科技攻关计划资助课题 (2004NG12)
作者简介：李春艳 (1983—)，女，云南省云县人，在读硕士生，研究方向为抗 HIV 药物筛选和研究。E-mail: lcyyanyan@126.com
*通讯作者 戴好富 郑永唐 Tel、Fax: (0871) 5195684 E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

万方数据

物不良反应等问题日趋严重，促使人们不断寻找新的抗 HIV 药物以及新靶点。从传统中药、植物和真菌资源等天然资源中寻找抗 HIV 新药或先导化合物是重要途径之一。我国至今没有一种具有自主知识产权的抗 HIV 药物获准上市，开发利用我国丰富的植物资源，研制具有我国原创知识产权、有效、价廉的抗 HIV 药物，将对我国科技、经济和社会发展具有特别重要的意义。

蒲葵 *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Brown 属于棕榈科常绿乔木，主要分布于我国南方地区。蒲葵根具有止痛和止喘的作用，其根的主要化学成分为饱和脂肪酸酯及不饱和脂肪酸酯。通过对蒲葵根脂肪油的研究，不饱和脂肪酸占有很大比例[1]。不饱和脂肪酸具有抗血栓形成和抗血小板凝集作用，防止动脉硬化、抗衰老、防癌抗癌等功效。国内外有蒲葵提取物或化合物抗肿瘤细胞、抑制蛋白激酶活性的文献报道[2,3]，但未见蒲葵提取物或化合物抗 HIV-1 活性的研究报道。蒲葵籽的乙醇提取物对蛋白激酶 C (PKC) 的活性有明显的抑制作用[4]。PKC 是一类磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，它参与调节淋巴细胞的活化、凋亡、细胞毒效应以及细胞迁移等多种生理功能，而且与某些免疫缺陷性疾病有关。研究发现，PKC 在 HIV 复制周期的多个环节中起作用，PKC 可以通过多种途径刺激 HIV 病毒的活化，并磷酸化病毒复制周期中的多种蛋白，如 P17gag、Nef、Rev 和 Vif 等，这些蛋白的磷酸化在病毒复制周期中起到了不可忽视的作用[5]。

本课题组筛选了蒲葵籽的乙醇提取物 (P1)、正丁醇提取物 (P2)、醋酸乙酯提取物 (P3) 和石油醚提取物 (P4) 的体外抗 HIV-1 活性，然后对其中具有抗 HIV-1 活性的醋酸乙酯提取物 (P3) 进行了初步的机制研究。

1 材料与方法

1.1 蒲葵籽和提取物：蒲葵籽于 2005 年 11 月采于海南省海口市中国热带农业科学院内，经代正福副研究员鉴定为棕榈科蒲葵属新会蒲葵 *L. chinensis* (Jacq.) R. Brown 的种子。蒲葵种子晒干粉碎 (416.0 g)，用 95% 乙醇提取两次，滤过后减压浓缩得到乙醇提取物 (P1)。将乙醇提取物分散于水中成悬浊液，然后依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取，减压浓缩后分别得到石油醚提取物 P4 (0.348 8 g，收率为 0.084%)、醋酸乙酯提取物 P3 (1.977 7 g，收率为 0.48%) 和正丁醇提取物 P2 (8.850 0 g，收率为 2.12%)。以上样品均溶于 DMSO，储存质量浓度为 25 mg/mL，分装后 4 ℃ 保存。实验用时，用含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 稀释。

1.2 试剂：RPMI-1640 和新生小牛血清购自 Gibco 公司；十二烷基磺酸钠 (SDS)、MTT、*N*，*N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 和 Triton X—100 均购自 Sigma 公司；恩夫韦肽 (T20，Enfuvirtide) 和 HIV-1 RT 测定试剂盒购自 Roche 公司；HIV 蛋白酶底物 DABCYL-γ-Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS 购自 AnaSpec 公司；艾滋病人血清由日本群马大学医学部卫生学和病毒学教研室星野洪郎 (Hiroo Hoshino) 教授惠赠；辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人 IgG 抗体购自华美生物工程公司；茚地那韦 (IND，Indinavir) 购自 Merk 公司；齐多夫定 (AZT) 和膦甲酸钠 (PFA，Foscarnet) 购自 Sigma 公司。抗 HIV p24 单克隆抗体、兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体以及重组 HIV-1 蛋白酶由本实验室制备[6,7]。

1.3 仪器：ELX800 酶标仪 (Bio-Tek)，微量移液器 (Gilson)，Eclipse TS100 倒置显微镜 (Nikon)；二级生物安全柜 Forma Class Ⅱ，CO_2 细胞培养箱和荧光酶标仪 Fluoroskan Ascent FL 均为 Thermo 公司产品。

1.4 细胞和病毒：人 T 淋巴细胞系 MT-4、C8166，HIV-1_{IIIB}/H9 和 HIV-1 实验株 HIV-1_{IIIB} 由英国 MRC，AIDS Reagent Project 惠赠。按实验室常规方法培养细胞和病毒。病毒滴度 $TCID_{50}$ (50% tissue culture infectious dose) 采用 Reed & Muench 方法确定，病毒小量分装于冻存管，−70 ℃ 保存。本研究所有涉及 HIV 操作的实验按照国际和国家有关生物安全操作规程在生物安全三级 (BSL-3) 实验室进行。

1.5 蒲葵籽提取物对 C8166 细胞毒性实验：用 MTT 比色法测定蒲葵籽提取物对 C8166 细胞毒性。在 96 孔细胞培养板上将 4×10^5/mL C8166 细胞悬液 100 μL 与不同质量浓度的蒲葵籽提取物溶液混合。每个质量浓度设 3 个复孔，同时设置阴性对照，空白对照孔及 AZT 药物对照。37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 3 d 后，每孔加 4 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL。37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 4 h 后每孔吸去 100 μL，补加 100 μL SDS-DMF 溶液，37 ℃ 过夜。Bio-Tek ELx 800 酶标仪测定吸光度 (A) 值，测定波长为 595 nm，参考波长为 630 nm。计算出细胞毒浓度 CC_{50} (50% cytotoxic concentration) 值，即对 50% 的正常 T 淋巴细胞系 C8166 产生毒性时的药

万方数据

物浓度[8]。

1.6 蒲葵籽提取物对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制实验：蒲葵籽提取物在 96 孔细胞培养板上进行 5 倍倍比系列稀释（100 μL/孔），然后每孔分别加入 50 μL C8166 细胞（8×10^5/mL）和 50 μL 的 HIV-1_{IIIB}稀释上清（MOI 值 0.03）。每个质量浓度设 3 个复孔，同时设置阴性对照孔和 AZT 为阳性药物对照。37 ℃、5% CO_2培养箱培养 3 d，在倒置显微镜下（100×）计数合胞体。计算出抑制合胞体形成达 50% 时药物的浓度（50% effective concentration，EC_{50}）及治疗指数（therapeutic index，$TI=CC_{50}/EC_{50}$）[8]。

1.7 蒲葵籽提取物对 HIV-1 感染 MT-4 细胞的保护作用：在 96 孔板上，将蒲葵籽提取物 5 倍倍比系列稀释（100 μL/孔），然后每孔加 4×10^4 个 MT-4 细胞与 HIV-1_{IIIB}病毒上清（MOI 值 0.03），每孔总体积 200 μL。同时设置细胞对照孔和病毒感染细胞对照孔。置 37 ℃、5% CO_2培养箱内培养，培养 6 d 后用 MTT 方法测定细胞存活率。用 Bio-Tek EL×800 酶标仪测定 *A* 值，测定蒲葵籽提取物对正常细胞的毒性作用和对 HIV-1_{IIIB}感染细胞的保护率，计算得到 CC_{50}、EC_{50}和 TI[8]。

1.8 ELISA 测定 HIV-1 p24 抗原的表达：Triton X-100 裂解的病毒培养上清加入到预先包被有抗 HIV-1 p24 McAb 的 96 孔中，37 ℃ 温育 1 h。充分洗涤后，加入稀释的人单克隆抗体 HIV-1 血清，37 ℃ 温育 1 h。充分洗涤后，加入稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG，37 ℃ 温育 1 h。充分洗涤后，加入 OPD 底物反应液，10～15 min 后，2 mol/L 硫酸终止反应。用 Bio-Tek EL×800 酶标仪测定读取 *A* 值，计算 HIV-1 复制的抑制率和 EC_{50}[8]。

1.9 HIV-1 感染和未感染细胞融合阻断检测：在 96 孔板上，将提取物 P3 进行 5 倍倍比系列稀释（100 μL/孔），然后每孔加入 HIV-1_{IIIB}慢性感染 H9 细胞 2×10^5/mL 和 C8166 细胞 6×10^5/mL 各 50 μL。同时设阴性对照孔和含恩夫韦肽（T20）的阳性药物对照孔。37 ℃、5% CO_2培养箱中培养 6～8 h。倒置显微镜下（100 倍）计数合胞体数，计算得到提取物 P3 抑制合胞体形成达 50% 时的浓度（EC_{50}）。

1.10 蒲葵籽提取物对重组 HIV-1 RT 活性的抑制实验：采用 Roche 公司的 HIV-1 RT 测定试剂盒检测提取物对重组 HIV-1 逆转录酶（HIV-1 rRT）活性的抑制作用[9]。取出试剂盒反应条，每孔滴加含 2 ng 重组 HIV-1 RT 的溶液 20 μL，20 μL 提取物溶液和 20 μL 含模板和核苷酸的反应缓冲液。使提取物的终质量浓度为 200 μg/mL。设置 PFA（20 μg/mL）阳性药物对照孔和不含化合物的阴性对照孔。置 37 ℃、1 h。洗涤 5 次后，每孔加入 200 μL 抗 DIG-POD 抗体工作液。37 ℃ 温育 1 h，洗涤 5 次。每孔滴加 200 μL ABTS 底物反应液。室温反应 15～30 min，Bio-Tek El×800 酶标仪测定 *A* 值。

1.11 蒲葵籽提取物对重组 HIV-1 蛋白酶活性的抑制实验：使用 Enzolyte™ HIV-1 蛋白酶试剂盒（AnaSpec）测定提取物对 HIV-1 蛋白酶活性的抑制作用[7,10]。在 96 孔板上每孔加入 40 μL 蛋白酶溶液（终质量浓度为 4.75 ng/mL）和待测样品 10 μL，混匀后，30 ℃ 温育 15 min。加入荧光标记的合成蛋白酶底物工作液 50 μL，混匀。分别在不同时间段（0、30、45、60、90 min）用荧光酶标仪上读取荧光值。计算出抑制率和 EC_{50}。

1.12 统计学处理：实验资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计分析软件，对组间实验数据进行单因素方差分析及 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 蒲葵籽提取物对 C8166 细胞的毒性作用：从图 1 可见，蒲葵籽的乙醇提取物（P1）、正丁醇提取物（P2）、醋酸乙酯提取物（P3）对 C8166 细胞的毒性较小，CC_{50}均大于 200 μg/mL。蒲葵籽石油醚提取物（P4）有一定的毒性，其 CC_{50}为 68.72 μg/mL。

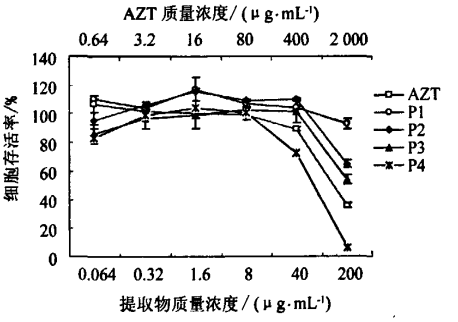

图 1 蒲葵籽提取物对 C8166 细胞的毒性作用（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 1 Cytotoxicity of extracts from *L. chinensis* seeds on C8166 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2.2 蒲葵籽提取物对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制作用：HIV-1 感染 C8166 细胞后，感染细胞与未感染细胞将会相互作用并融合形成合胞体，通过计数合胞体的数量可以判断提取物对 HIV-1 感染细胞的抑制作用。如图 2 所示，提取物 P3 具有显著抑制 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的活性，EC_{50}为 5.64 μg/mL，TI 大于 35.46；提取

万方数据

物 P1、P2 和 P4 对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制作用弱于提取物 P3，EC_{50} 分别为 24.91、20.82、11.72 μg/mL，其 TI 分别大于 8.03、9.61、5.86。阳性对照药物 AZT 的 EC_{50} 为 4 ng/mL。

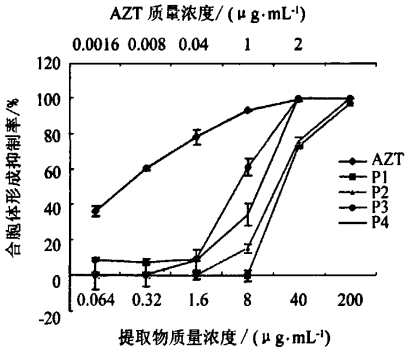

图 2 蒲葵籽提取物对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Inhibition of extracts from *L. chinensis* seeds on HIV-1 inducing syncytium formation ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.3 蒲葵籽提取物对 HIV-1 致 MT-4 细胞死亡的保护作用：HIV-1 体外感染 MT-4 细胞后 4～6 d，被感染的 MT-4 细胞会发生死亡，化合物或提取物如能抑制病毒的复制，细胞存活率就会增加。从图 3 中可知，提取物 P1 和 P2 在高质量浓度下对体外 HIV-1 感染 MT-4 细胞有一定的保护作用。在 200 μg/mL 时，提取物 P1 和 P2 对 HIV-1 感染 MT-4 细胞的保护率分别是 57.25%、67.99%。提取物 P3 和 P4 未显示出对体外 HIV-1 感染 MT-4 细胞的保护作用。提取物 P1、P2、P3 和 P4 对体外 HIV-1 感染 MT-4 细胞保护作用的 EC_{50} 分别是 158.9、114.02、大于 200、大于 200 μg/mL。

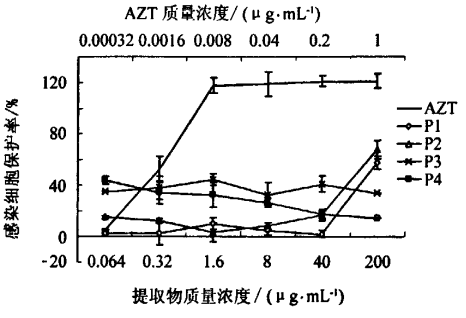

图 3 蒲葵籽提取物对 HIV-1 感染 MT-4 细胞的保护作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Protection of extracts from *L. chinensis* seeds on HIV-1 infected MT-4 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.4 蒲葵籽提取物 P3 对 HIV-1 急性感染病毒复制的影响：HIV-1 p24 为病毒核衣壳蛋白，HIV-1 感染细胞培养上清中 p24 量的变化，是判断待测样品抑制病毒复制的重要指标和通用指标。根据细胞毒性实验和抑制 HIV-1 诱导细胞合胞体形成实验，蒲葵籽的 4 个提取物中 P3 具有显著体外抗 HIV-1 活性。采用 ELISA 法测定 HIV-1 p24 抗原表达，观察提取物 P3 对 HIV-1 急性感染的病毒抑制作用。AZT 在 2 μg/mL 时，抑制 HIV-1 p24 抗原活性高，且在此质量浓度下对 C8166 细胞毒性小，以此为对照进行 LSD-t 检验。从表 1 可知，提取物 P3 在质量浓度为 200～0.064 μg/mL 的抑制率与阴性对照及 AZT 对照差异非常显著 ($P<0.01$)。提取物 P3 抑制 HIV-1 p24 抗原表达呈剂量依赖性，其 EC_{50} 为 23.04 μg/mL。AZT 的 EC_{50} 为 0.046 μg/mL。

表 1 蒲葵籽提取物 P3 对 HIV-1 急性感染中 p24 抗原表达的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Inhibition of P3 on p24 antigen expression in HIV-1 acute infection ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组 别	ρ/(μg·mL⁻¹)	A 值	抑制率/%
阴性对照	—	0.431±0.041	0
提取物 P3	200	0.009±0.01**△△	97.87
	40	0.204±0.01**△△	52.84
	8	0.215±0.04**△△	44.55
	1.6	0.243±0.03**△△	38.74
	0.32	0.252±0.04**△△	34.36
	0.064	0.237±0.02**△△	46.09
AZT	2	−0.01±0.01**	102.31
	0.4	0.01±0.01	97.69
	0.08	0.09±0.05	79.17
	0.016	0.47±0.05	−8.80
	0.003 2	0.57±0.04	−31.94
	0.000 64	0.62±0.04	−43.52

与阴性对照比较：**$P<0.01$；与 AZT 比较：△△$P<0.01$

**$P<0.01$ *vs* negative control; △△$P<0.01$ *vs* AZT

2.5 蒲葵籽提取物 P3 对 HIV-1 慢性感染细胞与未感染细胞间融合的抑制作用：未感染细胞 C8166 与慢性感染 H9 细胞共培养后，会相互融合形成合胞体。化合物或提取物如能干扰感染细胞表面 gp120 与未感染细胞 CD4 受体的结合，就能抑制 HIV-1 慢性感染细胞与未感染细胞间的融合。作用于该靶点的抗 HIV 药物如恩夫韦肽 (T20) 就表现出很强的抑制细胞融合作用。在 0.04 μg/mL 时，T20 完全地抑制了细胞融合的发生 (表 2)。以 0.2 μg/mL 的 T20 进行实验组与对照组比较，提取物 P3 在 200 μg/mL 时，对 HIV-1 慢性感染细胞与未感染细胞间融合的抑制率为 100%，与阴性对照差异具有统计学意义 ($P<0.01$，表 2)；提取物 P3 在

万方数据

表 2 提取物 P3 对 HIV-1 慢性感染细胞与未感染细胞间融合的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibition of P3 on cell-to-cell fusion in co-culture between HIV-1 chronic infection and uninfected cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组 别	ρ/(μg·mL^{-1})	合胞体数	抑制率/%
阴性对照	—	65±8.14	0
提取物 P3	200	0±0.00**	100.00
	40	16±3.00**△△	75.38
	8	32±1.00**△△	50.00
	1.6	49±3.06**△△	25.13
	0.32	71±3.06**△△	−8.72
	0.064	84±4.04**△△	−33.08
T20	0.2	0±0.00**	100.00
	0.04	0±0.00	100.00
	0.008	3±2.65	95.38
	0.001 6	17±3.61	73.85
	0.000 32	32±6.03	45.38
	0.000 064	43±3.06	33.33

与阴性对照比较：**$P<0.01$； 与 T20 比较：△△$P<0.01$

**$P<0.01$ *vs* negative control; △△$P<0.01$ *vs* T20

40～0.064 μg/mL 的抑制率与阴性对照和 T20 对照差异都具有统计学意义 ($P<0.01$，表 2)。提取物 P3 也有一定的干扰细胞融合作用，在 40 μg/mL 时，该提物能够抑制 75.38% 的细胞融合，其 EC_{50} 为 8.00 μg/mL。T20 的 EC_{50}为 0.000 42 μg/mL。

2.6 蒲葵籽提取物 P3 对 HIV-1 逆转录酶的体外活性抑制作用：逆转录酶是 HIV 复制过程中必需参与的关键酶，是抗 HIV 药物最重要的靶点。提取物 P3 对重组 HIV-1RT 表现出微弱的体外抑制活性作用。在质量浓度为 200 μg/mL 时，提取物 P3 (200 μg/mL) 能够抑制 28.86% 的体外重组的 HIV-1RT 活性。阳性对照药膦甲酸钠 (PFA，20 μg/mL) 则表现出很好的抑制 HIV-1RT 活性 (图 4)。

2.7 蒲葵籽提取物 P3 对 HIV-1 蛋白酶的体外活性抑制作用：实验利用荧光共振能量传递 (fluorescence resonance energy transfer，FRET) 原理，在合成的蛋白酶底物两端分别偶联荧光发光基团和淬灭基团，通过检测底物被切割后产生的荧光强度来测定蛋白酶反应活性。提取物 P3 在 200～8 μg/mL 时，抑制 HIV-1 蛋白酶活性差异具有统计学意义 (表 3)，提取物 P3 对重组 HIV-1 蛋白酶的体外活性抑制作用呈质量浓度依赖性，其 EC_{50}为 1.77 μg/mL，茚地那韦 (INV) 的 EC_{50}为 0.076 ng/mL (表 3)。

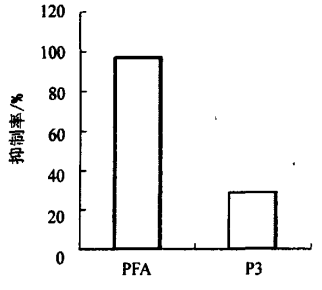

图 4 提取物 P3 对重组的 HIV-1 逆转录酶活性的体外抑制作用

Fig. 4 Inhibition of P3 on recombinant HIV-1 RT activity *in vitro*

表 3 提取物 P3 对 HIV-1 蛋白酶活性的体外抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Inhibition of P3 on HIV-1 protease activity *in vitro* ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组 别	ρ/(ng·mL^{-1})	A 值	抑制率/%
提取物 P3	200 000	0.078±0.07**	94.26
	40 000	−0.097±0.02**	107.23
	8 000	0.188±0.00*	86.03
	1 600	0.703±0.01	47.62
	320	1.022±0.14	23.88
	64	1.220±0.43	−9.13
茚地那韦	4.75	−0.083±0.07**	106.18
	0.95	0.795±1.46	40.75
	0.19	0.509±0.06	62.07
	0.038	3.274±0.07	−143.96
	0.007 6	3.999±0.06	−197.99
	0.001 52	4.004±0.02	−198.36
阴性对照	—	1.342±0.007	

与阴性对照比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

*$P<0.05$ **$P<0.01$ *vs* negative control

3 讨论

中药作为我国的传统医药和中华民族瑰宝，不仅为我国人民的健康水平做出了巨大贡献，也是我国医药产业的三大支柱之一，在经济发展中发挥了重要作用。从我国国情出发，利用中医药的独特性及经济性，开发传统的具有我国特色的抗 HIV 药物或抗艾滋病辅助药物是完全可能和可行的。中药有效部位是经过筛选确定的某一中药或复方中的各类有效成分的组合，是研发有效部位新药和活性跟踪有效成分或先导化合物的基础。

国内外曾对蒲葵提取物或化合物的抗肿瘤细胞、抑制蛋白激酶活性做过初步研究。发现蒲葵根醋酸乙酯部分和从蒲葵籽中分离出的化合物薯蓣皂苷元在体外具有抗肿瘤作用[2,11]。陈屏等[12]也从蒲葵籽的醋酸乙酯部位和石油醚部位分得 8 个化合物，并对化合物表儿茶素进行 5 个肿瘤细胞株的活性筛选；蒲葵籽的水提物体外有抑制血管和肿瘤生长作用，体内实验也证明该提取物有抗肿瘤活性[13]，从蒲葵籽乙醇提取物中纯化得到的 LC-X 具有体外抗

万方数据

肿瘤和抑制蛋白激酶活性，且在人的肿瘤细胞中能选择性地抑制表皮生长因子受体 (EGFR)[3]。蒲葵果实水提取物和乙醇提取物体外有抑制细胞增殖，抗氧化作用，在非特异性酯酶实验中，乙醇提取物还能诱导 HL-60 细胞的单核细胞或巨噬细胞分化且有剂量依赖性[14]。

本实验通过对蒲葵籽的 4 个提取物进行初筛，表明蒲葵籽的醋酸乙酯提取部分 (P3) 具有体外抗 HIV-1 活性。P3 能阻断 HIV-1 慢性感染细胞与正常细胞的融合，提示其作用靶点或靶点之一可能为阻断病毒进入细胞。通过基因工程重组 HIV-1 蛋白酶和逆转酶的体外活性抑制实验，发现提取物 P3 能有效的抑制蛋白酶活性，也有微弱的抑制逆转录酶活性。由此可见，蒲葵籽的醋酸乙酯提取物具有较强的体外抗 HIV-1 活性，其作用机制可能主要为阻断病毒进入和抑制 HIV-1 蛋白酶活性。目前本课题组正在对蒲葵籽的醋酸乙酯提取物 P3 进行进一步的分离纯化，希望从中筛选出具有抗 HIV 活性的化合物，明确其作用机制。

参考文献：

[1] 何小玉，崔建国，黄初升，等. 蒲葵根中脂肪油的 GS-MS 联用分析 [J]. 化工技术与开发，2003，32(2)：32.

[2] 钟振国，张凤芳，张雯艳，等. 蒲葵根提取物的体外抗肿瘤实验研究 [J]. 中药材，2007，30(1)：60-63.

[3] Huang W C, Hsu R M, Chi L M, *et al.* Selective downregulation of EGF receptor and downstrem MAPK pathway in human cancer cell lines by active componets partially purified form the seeds of *Livistona chinensis* R. Brown [J]. *Cancer Lett*, 2007, 248(1): 137-146.

[4] 黄 才，覃燕梅，梁念慈. 石上柏和蒲葵籽对蛋白激酶 C 活性的影响 [J]. 中草药，1995，26(8)：414-416.

[5] 张高红，唐 宏，郑永唐. 蛋白激酶 C 在 HIV 复制中的作用与药物发现 [J]. 中国药理学通报，2005，21(9)：1025-1029.

[6] Liu G J, Wang J P, Xiao J C, *et al.* Preparation and characterization of three monoclonal antibodies against HIV-1 p24 capsid protein [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(3): 203-208.

[7] 王云华，王睿睿，杨柳萌，等. HIV-1 蛋白酶的表达、纯化及其抑制剂体外筛选方法的建立 [J]. 中国病毒学，2006，21(2)：126-130.

[8] Wang R R, Gu Q, Yang L M, *et al.* Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105: 269-273.

[9] Wang J H, Tam S C, Huang H, *et al.* Site-directed PEGylation of trichosanthin retained its anti-HIV activity with reduces potency *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commum*, 2004, 317: 965-971.

[10] Wang Y H, Tang J G, Wang R R, *et al.* A novel Beta-carboline compound with anti-HIV-1 actions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4): 1091-1095.

[11] 刘志平，崔建国，黄初升，等. 蒲葵籽中有效化学成分的研究 [J]. 中草药，2007，38(2)：178-180.

[12] 陈 屏，杨峻山. 蒲葵籽化学成分研究 [J]. 中草药，2007，38(5)：665-667.

[13] Sartippour M R, Liu C, Shao Z M, *et al.* Livistona extract inhibits angiogenesis and cancer growth [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(6): 1355-1357.

[14] Cheung S, Tai J. *In vitro* studies of the dry fruit of Chinese fan plam *Livistona chinensis* [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14: 1331-1336.

20(*S*)-原人参二醇对肺癌 A549 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用

张 锐，徐华丽，曲绍春，于小凤，陈明侠，睢大贇*

（吉林大学药学院 药理教研室，吉林 长春 130021）

摘 要：目的 研究 20(*S*)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长抑制作用。**方法** 采用噻唑蓝 (MTT) 法观察 20(*S*)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用，流式细胞术测定 20(*S*)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及周期的影响，并在裸小鼠人肺癌模型上观察 20(*S*)-原人参二醇对荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用。**结果** 20(*S*)-原人参二醇对 A549 细胞具有明显的抑制作用并有剂量时间依赖关系，并且流式细胞仪检测时均出现典型凋亡峰，24 小时凋亡率分别为 32.47%、32.75%、33.51%。荷瘤裸小鼠动物实验表明，20(*S*)-原人参二醇对裸小鼠的肿瘤生长也具有明显的抑制作用，抑瘤率分别为 18.78%、34.37%、50.02%。**结论** 20(*S*)-原人参二醇对 A549 细胞的增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤的生长具有明显的抑制作用。

关键词：20(*S*)-原人参二醇；A549 细胞；肺癌；裸小鼠

中图分类号：R286.91 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)12-1838-04

收稿日期：2008-03-29

基金项目：国家“九五”重点科技攻关课题 (96-901-01-83)

作者简介：张 锐 (1978-)，女，博士研究生，研究方向为抗肿瘤药物研究。Tel：(0431) 85619705 E-mail：zgr1219@163.com

*通讯作者 睢大贇 Tel：(0431) 85619705 E-mail：suidy@jlu.edu.cn

万方数据