

## 以 p-TEFb 为靶点抗 HIV 药物高通量筛选模型建立及在中药初筛中的应用

李 芬<sup>1,3,4</sup>, 李玉会<sup>2</sup>, 吴秀丽<sup>1,3</sup>, 胡岩岩<sup>1,3</sup>, 马 瑜<sup>1,3</sup>, 贾盼盼<sup>1</sup>, 岳晓杰<sup>1</sup>, 李明军<sup>4</sup>

1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007

2. 河南省项城市中医院, 河南 项城 466200

3. 资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室培育基地, 河南 新乡 453007

4. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007

**摘要:** 目的 建立以正向转录延伸因子 (p-TEFb) 为靶点的抗 HIV 药物快速高通量筛选模型, 并运用此模型筛选抗艾滋病中药。方法 构建 BD-Tat 和 AD-CyclinT1 融合的酵母双杂交质粒, 分别转入 AH109 和 Y187, 经接合实验获得二倍体菌株并对其进行毒性检测、自激活实验和报告基因表达检测, 建立基于酵母双杂交的筛选模型。结果 运用此系统筛选具有提高机体免疫功效的 20 种中药, 获阳性中药 2 种, 其抗 HIV 活性已被体外抑制 HIV 实验证实。结论 该筛选模型可成功用于抗艾滋病化合物和中药的高效筛选, 得到的 2 种阳性中药狗脊和黄连, 值得进一步进行干扰 HIV Tat 和 CyclinT1 互作的有效成分分离研究。

**关键词:** 正向转录延伸因子; 靶点; HIV; 高通量筛选模型; 狗脊; 黄连

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)05-0679-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.016

## Establishment of high throughput screening model for anti-HIV drugs with p-TEFb as target and its application in screening Chinese materia medica

LI Fen<sup>1,3,4</sup>, LI Yu-hui<sup>2</sup>, WU Xiu-li<sup>1,3</sup>, HU Yan-yan<sup>1,3</sup>, MA Yu<sup>1,3</sup>, JIA Pan-pan<sup>1</sup>, YUE Xiao-jie<sup>1</sup>, LI Ming-jun<sup>4</sup>

1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

2. Xiangcheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangcheng 466200, China

3. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules, University of Henan Province, Xinxiang 453007, China

4. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang 453007, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid high-throughput screening model with positive transcription elongation factor (p-TEFb) as target for screening the inhibitors of HIV. **Methods** Double cross plasmid of BD-Tat and AD-CyclinT1 was established and transformed into yeast AH109 and Y187, respectively. AH109/pGBKT7-Tat was mated with Y187/pGADT7-CyclinT1 and the diploids were subjected to autoactivation, toxicity test, and reporter gene assay. The screening model based on double hybrid system was established. **Results** Two out of 20 kinds of Chinese materia medica possessing immunity-enhancing effects were identified as primary hits, the anti-HIV activity of these two positive drugs was already demonstrated by other researchers through detecting the suppression effects on HIV duplication *in vitro*. **Conclusion** The system established in this paper can be used for rapid high-throughput screening anti-HIV chemicals or herbs. Further research for the obtained two positive Chinese materia medica, *Cibotii Rhizoma* and *Coptidis Rhizom* should be carried out to isolate the effective component for disrupting the interaction between HIV Tat and CyclinT1.

**Key words:** positive transcription elongation factor; target; HIV; high-throughput drug screening model; *Cibotii Rhizoma*; *Coptidis Rhizoma*

艾滋病 (acquired immunodeficiency disease, AIDS) 的病原 HIV 攻击人体免疫系统的 T4 淋巴细胞, 导致患者全身免疫功能低下, 常因各种机会性感染而死亡。目前批准上市的抗艾滋病药物多为逆

转录酶或蛋白酶抑制剂, 治疗药来源也以化学合成为主, 无法同时兼顾对抗 HIV 及保护人体免疫系统<sup>[1]</sup>。治疗过程中, HIV-1 的 DNA 会因遭受药物攻击而突变, 产生对抗该药物的抗体, 使病人产生耐药性;

收稿日期: 2013-08-06

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (092102310026); 河南省高校科技创新团队支持计划资助项目 (13IRTSTHN009)

作者简介: 李 芬 (1972—), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为细胞增殖、基因表达调控。Tel: (0373)3326340 E-mail: lifen2001@yahoo.com

很多患者因药物毒副作用大引起不适,不堪忍受服药痛苦和昂贵药费而拒绝治疗。由于目前抗艾滋病化学药存在上述缺陷,许多人尝试用中药治疗<sup>[2]</sup>,中医从整体观点进行辨证施治对症下药,且毒副作用小,在治疗艾滋病方面有独特优势,有望克服抗艾滋病化学药的某些缺陷。但相关临床实践表明即便有些单味中药或有效成分在体外有抗 HIV 作用,一旦进入临床,效果不很理想,故经过配伍寻找理想抗艾滋病中药配方是中药抗艾滋病亟待解决的问题<sup>[3-8]</sup>,而开发合适的快速药物筛选模型对解决这些问题至关重要。

正向转录延伸因子 (positive transcription elongation factor, p-TEFb) 生化酶是细胞周期依赖的激酶 9 (cyclin-dependent kinases 9, CDK9), 其与细胞周期蛋白 T1 (Cyclin T1) 的复合物可高效磷酸化 RNAPII 羧基末端重复序列, 为调控真核转录延伸所必需。已知 HIV-1 复制需要病毒的调控蛋白转录激活因子 (transcriptional activator, Tat) 的激活, 而 Tat 激活转录必需宿主细胞 p-TEFb 的参与。Tat 与 p-TEFb 调节亚基 Cyclin T1 的特异结合, 既可增强 Tat 与转录激活应答因子 (transactivating responsive factor, TAR) 相互作用<sup>[9]</sup>, 也可招募 p-TEFb 至 HIV-1 启动子区, 抑制 DISF 和 NELF 等负性转录因子活性促进病毒基因组转录延伸<sup>[10]</sup>, 使其大量复制<sup>[11-12]</sup>。因此, 一旦得到可有效阻抑 CyclinT1 与 Tat 结合的药物, 具有抑制 p-TEFb 作用, 即可阻断 HIV 的复制<sup>[10,13-18]</sup>。p-TEFb 是细胞本身产物, 抑制其作用的药物既可阻止病毒复制, 也可保证药物对 HIV 的攻击长期有效。

酿酒酵母属真核生物, 不仅繁殖快, 易于培养, 还与哺乳动物细胞有许多共同的生化机制, 其基因组内较简单的“跳跃基因”可模拟 HIV 与宿主细胞的互作, 自身基因则模拟宿主细胞基因, 因而是快速筛选抗艾滋病药物的理想模式生物。本实验以 p-TEFb 为靶点, 首次建立了基于酵母双杂交的抗艾滋病药物快速筛选模型, 从 20 种具有免疫促进效果的中药中筛选可阻抑 Tat 与 CyclinT1 互作的中药, 为进一步配伍及分离有效成分进行体外实验证实对 HIV-1 的抑制作用, 开发低廉抗艾滋病新药奠定坚实基础。

## 1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* AH109/Y187、SD 及缺陷培养基、pGBKT7、pGADT7-T 载体及 X- $\alpha$ -Gal (Clontech 公司, 美国); PCR 试剂盒、TaqDNA 聚合酶、T4DNA

连接酶、限制性内切酶 (Takara 公司, 日本); 质粒提取试剂盒、DNA 电泳回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 鲑鱼精 DNA (上海浩然生物技术有限公司)。PCR 仪、电泳仪 (Bio-Rad 公司, 美国); 恒温水箱、恒温摇床。pEGFP-Tat 由北京工业大学生命科学院杨怡姝教授惠赠。pCDNA3-CyclinT1 载体由河南师范大学基因表达调控研究实验室保存。白花蛇舌草、白藜、穿心莲、丹参、甘草、旱莲草、鸡血藤、老鹳草、连翘、蔓荆子、猫爪草、牡丹皮、牛蒡子、夏枯草、五味子、当归、虎杖、黄芪、狗脊、黄连共 20 种中药均购自新乡市佐今明大药房连锁有限责任公司十部, 由河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心李明军教授和河南省项城市中医院李玉会副主任中医师共同鉴定。

## 2 方法

### 2.1 目的基因 PCR 扩增

在 GenBank 找到 Tat 和 CyclinT1 的 mRNA 序列, 其开放阅读框架分别为 219 bp 和 2 178 bp; 根据其序列在编码区的上、下游分别设计合成各 1 对寡聚核苷酸引物, 人 CyclinT1 基因 (hCyclinT1-2178) 正向引物: 5'-NNNNGTTACGTAATGGCTCGTCATGGAAA-3', 反向引物: 5'-NNNNCGACGCGTAA-TTCTTTTCGACATGTA-3', 引入了 *EcoR* I 和 *Sal* I 限制性酶切位点; HIV Tat 基因片段 (Tat-219) 正向引物: 5'-NNNNCCATGGAGCCAGTAGATCCTAGACT-3', 反向引物: 5'-NNNNCTCGAGTTGCTTTGATAGAGAAGCTT-3', 引入了 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点。PCR 扩增反应体系 (50  $\mu$ L): 模板 2.0  $\mu$ L, 引物 10  $\mu$ mol/L 各 0.8  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 5.0  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer H 5.0  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 2.0  $\mu$ L, KOD-Plus 0.5  $\mu$ L, 以 ddH<sub>2</sub>O 补充体系至 50  $\mu$ L。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 分别延伸 2、1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

### 2.2 重组质粒 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pGBKT7 和人 CyclinT1 的 PCR 产物, 电泳回收靶序列和载体片段, 连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取质粒进行 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定。对 Tat 的 PCR 产物和 pGADT7-help4 进行 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 电泳回收靶序列和载体片段, 连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取质粒进行 *Nco* I 和 *Xho* I

双酶切鉴定。阳性 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 送上海生工生物工程有限公司测序。

### 2.3 酵母感受态细胞的转化

采用乙酸锂转化法<sup>[19-20]</sup>将 8 μL pGBKT7-CyclinT1、pGBKT7 和 pGADT7-Tat、pGADT7 分别加入 50 μL 制备的吸光度 (*A*) 值为 0.4~0.5 的感受态酵母菌 AH109 及 Y187 中;SD/-Trp 或 SD/-Leu 平板筛选转化子。

### 2.4 菌落 PCR 鉴定转化后感受态酵母菌 AH109 和 Y187 中的重组质粒

在转化平板上挑取单菌落 (直径>2 mm), 于 2.5 μL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及 0.5 μL 细胞溶解酶中充分混匀。37 °C 孵育 1 h, 100 °C 温浴 3 min, 冰浴 1 min, 4 °C 保存备用。PCR 扩增, 反应体系 (50 μL): 目的 DNA 处理液 2.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, 10×PCR Buffer 5.0 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.0 μL, 引物 10 μmol/L 各 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 37.0 μL。94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。产物 4 °C 保存备用, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 实验重复 3 次。

### 2.5 重组质粒 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 对酵母宿主的毒性作用与自激活验证

按照 Clontech 操作说明, 将重组质粒 pGBKT7-CyclinT1 和空载体 pGBKT7、pGADT7-Tat 和空载体 pGADT7 分别转化感受态 AH109 或 Y187, 在 SD/-Trp 和 SD/-Leu 选择平板上分别挑取 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 转化子单克隆 (直径大于 2 mm) 接种至 SD/-Trp、SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-Ade、SD/-Trp/-Ade/-His 或 SD/-Leu、SD/-Leu/-His、SD/-Leu/-Ade、SD/-Leu/-Ade/-His, 观察其生长情况, 检测自激活作用; 同法选取上述两种转化子接种于 50 mL 的 SD/-Trp/+Kan 或 SD/-Leu/+Kan (20 μg/mL) 液体培养基中, 30 °C, 250 r/min 培养 16 h, 测定 *A*<sub>600</sub>, 检测毒性作用。

### 2.6 酵母交配及酵母双杂交鉴定

分别挑取直径约 2 mm 的含 pGBKT7-CyclinT1 的 AH109 和含 pGADT7-Tat 的 Y187 克隆, 共同接种于含 0.5 mL YPDA 培养液的 1.5 mL 离心管中, 涡旋振荡 1 min, 使菌团彻底打散混匀; 30 °C、30~50 r/min 振荡培养 20~24 h; 取 100 μL 培养物接种于 SD/-Trp/-Leu 平板, 30 °C 倒置培养 3~5 d 后挑取直径约 2 mm 的二倍体单克隆于 100 μL 灭菌双蒸水中混匀, 取 5 μL 点样于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/

+X-α-Gal 平板上, 30 °C 倒置培养 5 d, 观察结果。

### 2.7 抗艾滋病中药筛选

取待测中药 (20 种) 各 100 g, 分别适量水浸泡 1 h, 武火煮沸后文火煎煮 30 min, 滤出药液; 药渣中加适量水武火煮沸后文火 30 min, 滤出药液, 合并两次滤液并加热浓缩至 100 mL, 然后抽滤灭菌, 其质量浓度相当于生药量 1 g/mL。配制 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 固体培养基, 铺板前, 加入无菌中药提取物, 使其终体积分数为 0、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%。挑取直径为 2~3 mm 的二倍体单克隆, 接种于 10 mL 的 SD/-Trp/-Leu/-His 培养液中, 250 r/min、30 °C 培养 16~20 h, 依照文献方法<sup>[19]</sup>将培养物稀释成梯度点样于筛选平板上。

## 3 结果

### 3.1 CyclinT1 和 Tat 的 PCR 扩增

以 pCDNA3-CyclinT1 和 pEGFP-Tat 质粒为模板, PCR 扩增并电泳后产物大小约为 2 178 bp 和 219 bp, 与预期结果吻合, 无非特异扩增现象, 见图 1。

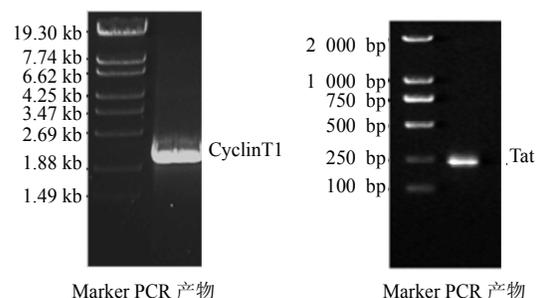


图 1 人 CyclinT1 和 HIV Tat 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of human CyclinT1 and HIV Tat gene amplified by PCR

### 3.2 重组质粒的酶切鉴定及测序

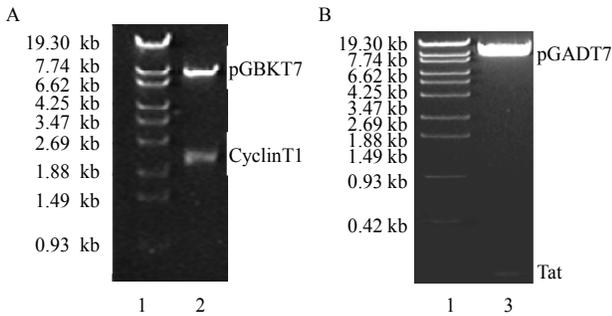
pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 酶切图谱琼脂糖电泳结果见图 2, 显示酶切结果与预期大小吻合。阳性 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 质粒测序显示序列完全正确, 无碱基突变。

### 3.3 重组质粒 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 转化感受态酵母菌 AH109 和 Y187

菌落 PCR 法鉴定 2 种转化子, 在 2 178 bp 和 219 bp 处分别得到目的条带, 提示转化成功。

### 3.4 AH109 中重组质粒的毒性检测及自激活实验

分别转化 pGBKT7-CyclinT1 和 pGBKT7 的 AH109 在 SD/-Trp 平板长出的单克隆 (直径>1 mm) 数量相似, 分别为 39 和 42 个; 分别转化 pGADT7-Tat



A-*Eco* I 和 *Sal* I 双酶切的 pGBKT7-CyclinT1 重组质粒 B-*Nco* I 和 *Xho* I 双酶切的 pGADT7-Tat 重组质粒 1-DNA Marker  $\lambda$ -*Eco*T-14 2-约 7.3 kb 的 pGBKT7 载体和约 2.1 kb 的 CyclinT1 基因片段 3-约 10.0 kb 的 pGADT7 载体和约 0.2 kb 的 Tat 基因片段  
A-recombinant plasmid pGBKT7-CyclinT1 restricted by *Eco*RI and *Sal*I B-recombinant plasmid pGADT7-Tat restricted by *Nco*I and *Xho*I 1-DNA Marker  $\lambda$ -*Eco*T-14 2-about 7.3 kb pGBKT7 vector and 2.1 kb CyclinT1 gene fragments 3-about 10.0 kb pGADT7 vector and 0.2 kb Tat gene fragments

图2 重组质粒 pGBKT7-CyclinT1 (A) 和 pGADT7-Tat (B) 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion analysis of pGBKT7-CyclinT1 (A) and pGADT7-Tat (B) recombinant plasmids

和 pGADT7 的 Y187 在 SD/-Leu 平板长出的单克隆 (直径 > 1 mm) 数量相似, 分别为 46 和 52 个; 且含 pGBKT7-CyclinT1 的 AH109 (图 3-A) 和含 pGADT7-Tat 的 Y187 (图 3-B) 分别只可在单缺培养基 SD/-Trp 和 SD/-Leu 上生长, 不能在二缺、三缺培养基上生长, 表明二者均无自激活宿主菌的作用。二者在含 20  $\mu$ g/mL Kan 的液体培养基中, 30  $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养 16 h 的  $A_{600}$  均 > 0.8, 提示其对酵母生长无毒性。因此构建的 pGBKT7-CyclinT1 和 pGADT7-Tat 可用于酵母双杂交实验。

### 3.5 CyclinT1 和 Tat 互作的酵母双杂交的鉴定

含 pGBKT7-CyclinT1 的 AH109 和 pGADT7-Tat 的 Y187 接合后的二倍体及各对照菌株在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+X- $\alpha$ -Gal 平板上生长情况见图 4。由图 4 可知二倍体菌株 (图 4-B-3、4) 同阳性对照类似 (图 4-A-3、4), 均显蓝色, pGBKT7-CyclinT1 与 pGADT7、pGADT7-Tat 与 pGBKT7 的 AH109 共转化株 (图 4-B-1、2) 和阴性对照一样 (图 4-A-1、2),

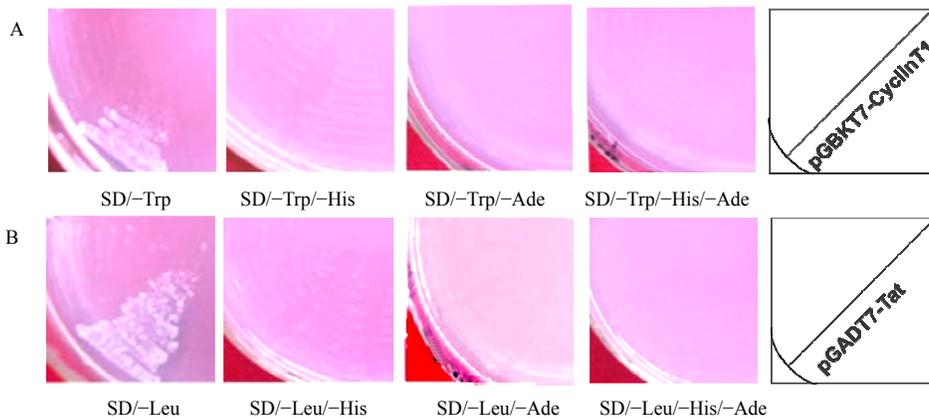
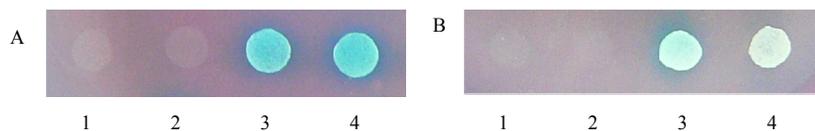


图3 双杂交质粒 pGBKT7-CyclinT1 转化 AH109 菌株 (A) 和 pGADT7-Tat 转化 Y187 菌株 (B) 的自激活实验

Fig. 3 Autoactivation experiments of pGBKT7-CyclinT1 transformed AH109 (A) and pGADT7-Tat transformed Y187 (B)



A-1-阴性对照, 为 pGBKT7-p53 和 pGADT7 的 AH109 共转化株; A-2-阴性对照, 为 pGADT7-T 和 pGBKT7 空载的 AH109 共转化株; A-3、4-阳性对照, 为 pGBKT7-p53 和 pGADT7-T 的 AH109 共转化株; B-1-pGADT7-Tat 和 pGBKT7 的 AH109 共转化株; B-2-pGBKT7-CyclinT1 与 pGADT7 的 AH109 共转化株; B-3、4-pGBKT7-CyclinT1 的 AH109 转化子与 pGADT7-Tat 的 Y187 转化子接合后的二倍体菌株  
A-1, 2-AH109 co-transformed of pGBKT7-p53 and pGADT7 (1), pGADT7-T and pGBKT7 (2) used as negative controls; A-3, 4-AH109 co-transformants of pGBKT7-p53 and pGADT7-T used as positive controls; B-1-AH109 co-transformants of pGADT7-Tat and pGBKT7; B-2-AH109 co-transformants of pGBKT7-CyclinT1 and pGADT7; B-3, 4-Diploids of AH109 transformants of pGBKT7-CyclinT1 and Y187 transformants of pGADT7-Tat

图4 CyclinT1 与 Tat 互作蛋白的酵母双杂交检测

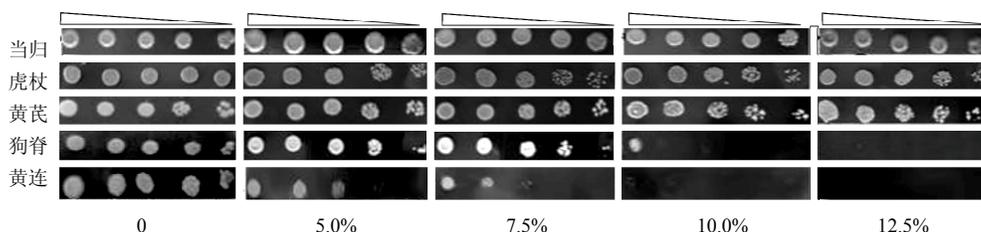
Fig. 4 Detection of specific interaction between CyclinT1 and Tat through yeast double-hybrid system

均不能生长；表明 CyclinT1 和 Tat 在酵母中发生相互作用激活了报告基因 *ADE*、*HIS3* 及 *MEL1* 的表达，因此该酵母双杂交体系成立，可用于筛选干扰二者互作的药物。

### 3.6 基于酵母双杂交的抗艾滋病中药筛选

运用上面建立的双杂交系统对 20 种中药进行筛选，部分结果见图 5。由图 5 可知，双倍体菌株仅在含狗脊和黄芪水溶性提取物的四缺筛选平板上生长

缓慢，在药物体积分数提高时甚至表现出致死表型（狗脊和黄芪提取物体积分数为 10.0%或 12.5%）；黄芪提取物体积分数在 10.0%或 12.5%时对菌有微弱的抑制作用；白花蛇舌草、白薇、穿心莲、丹参、甘草、旱莲草、鸡血藤、老鹳草、连翘、蔓荆子、猫爪草、牡丹皮、牛蒡子、夏枯草、五味子则同图所示的当归和虎杖类似，在不同药物体积分数平板的生长情况无差异，且均与未加药物的对照接近。



0-生长于未加药物的对照平板上的二倍体菌株；5.0%、7.5%、10.0%、12.5%-生长于含不同体积分数的各中药水溶性提取物（1 g/mL）的筛选平板上的二倍体菌株

0-diploids grown on four-drop out plates without herbs as control; 5.0%, 7.5%, 10.0%, and 12.5%-diploids grown on four-drop out plates with water extracts of herbs at different concentration

图 5 当归等 5 种中药的筛选结果

Fig. 5 Screening results of *Angelicae Sinensis Radix* and other drugs

## 4 讨论

### 4.1 本筛选方法的优势

抗 HIV 药物筛选常采用分子水平或细胞水平筛选。分子水平筛选针对纯化的靶分子进行，适于高通量筛选，虽靶点明确，但靶分子构象及所处的环境异于天然生理状态。细胞水平筛选通过 HIV 体外感染人 CD4<sup>+</sup>的 T 淋巴细胞及巨噬细胞等，但哺乳动物细胞培养成本高，操作繁琐，不利于高通量筛选。同上述两方法相比本课题组基于酵母双杂交的抗艾滋病筛选模型具明显优势：第一，同分子水平筛选相比，本法无需对靶蛋白纯化，因而靶蛋白构象及所处的生理环境接近于天然状态，可提高筛选质量，减少筛选结果的假阳性和假阴性；第二，与细胞水平筛选相比，单细胞真核生物酵母繁殖速度快，培养成本低，操作简便，适于高通量筛选，且其基因组已全部测序，与哺乳动物细胞有许多共同的生化机制，其基因组中存在较简单的跳跃基因，可模拟 HIV 与宿主细胞的相互作用，因此是快速筛选药物的理想模型；第三，酵母虽有细胞壁，细胞膜也与哺乳动物相异，但其细胞壁不阻止小分子物质进入细胞，且大部分能够进入酵母的药物也能进入人体细胞。

### 4.2 供试中药的选择及筛选结果分析

随着对 HIV 的研究进展，已有许多抗 HIV 药

物出现，但仅针对其生活周期中不同靶点来抑制其复制，多数不能兼顾机体的免疫功能，而艾滋病患者往往正因免疫功能严重受损而死于机会性感染，因而抗病毒和提高机体免疫力是治疗艾滋病两个不可或缺的方面，而中药可以抗病毒，更擅长调整机体的免疫状况。

本实验选择的 20 种补益中药均有不同程度的免疫促进作用。如黄芪等能促进辅助性 T 细胞增生并增强其功能，提高 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的比例，抑制 CD4<sup>+</sup>细胞的耗竭，还能促进 NK 细胞的活性，提高机体的免疫功能；鸡血藤等可增加白细胞的数量；当归能增强中性粒细胞的吞噬作用<sup>[21]</sup>。对其进行的初筛结果表明，狗脊和黄芪的水溶性提取物可显著阻抑 Tat 与 CyclinT 的相互作用，影响报告基因的表达，从而抑制双倍体菌株在四缺筛选平板上的生长，在药物体积分数提高到 10.0%或 12.5%时菌株出现致死表型；黄芪也有微弱的抑制作用。研究表明黄连、狗脊具有抑制 HIV 复制的活性，据报道黄连还有抗 HIV 蛋白酶的作用<sup>[22]</sup>；在体外抗 HIV 病毒实验中对中药进行筛选，发现黄芪具有抗 HIV 活性<sup>[23]</sup>，国内在运用中药治疗 AIDS 时，也经常运用黄芪、黄连和狗脊，本实验则揭示三者抗 HIV 的另一个分子机制，即通过干扰或阻抑 CyclinT1 和 HIV Tat 蛋白的

相互作用,影响 Tat.p-TEFb 复合物的形成,进而抑制 HIV 的复制。

### 4.3 该筛选系统的可靠性

因该筛选方法为本课题组首次建立,其他抗 HIV 药物作用靶点均为 HIV 逆转录酶、蛋白水解酶、整合酶、病毒进入等,尚无以干扰 CyclinT1/Tat 互作为靶点的,理论上讲,应对筛选到中药进行抗 HIV 检测,并通过其与阴性和阳性药物对比以验证该系统的可靠性。本实验之所以未提供此验证,是因本实验在运用此系统进行初筛所选择的 20 种中药中,包括黄连<sup>[22,24]</sup>、狗脊<sup>[22]</sup>、五味子<sup>[25-26]</sup>、丹参<sup>[27-28]</sup>、黄芪<sup>[22]</sup>等在内的一多半药物的抗 HIV 活性已被证实,且有的有效成分已被分离。如杨柳萌等<sup>[24]</sup>研究发现,黄连中的小檗碱和巴马汀可抑制 HIV-1 重组逆转录酶活性,其 EC<sub>50</sub> 分别是 63.1 和 44.52 μg/mL;对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体也有抑制作用,EC<sub>50</sub> 分别是 6.45 和 21.38 μg/mL。鉴于得到的两种阳性中药的抗 HIV 活性已被其他研究者证实,故未进行重复;至于筛选模型中的阴性药物,只能确定它们不能通过干扰 Tat/CyclinT1 互作而发挥作用,并不能排除其通过其他靶点起作用的可能。因 HIV 的复制周期包括吸附、融合、逆转录、整合、转录、翻译、出芽和成熟等,理论上抑制每一环节均可表现抗 HIV 活性,故本筛选模型的阴性药物完全有可能通过其他靶点发挥抗 HIV 活性。如丹参的水溶性提取物体外能抑制 HIV 整合酶和逆转录酶活性<sup>[27-28]</sup>;黄芩提取物(黄芩苷元)有抑制 HIV 逆转录酶的作用(静滴黄芩苷元可使 p24 抗原降低, T4 细胞数上升);五味子中的木脂素具有抑制 HIV-1 逆转录酶、整合酶活性<sup>[29-30]</sup>;其他的如白花蛇舌草、当归、甘草、牛蒡子、夏枯草、连翘、鸡血藤等也被证实有抗 HIV 活性<sup>[21-23]</sup>。但本筛选模型针对病毒复制的必需的宿主 p-TEFb 作用来进行,同已有的针对 HIV 自身的反转录酶、整合酶、蛋白水解酶等不同部位的筛选系统比,本法的优越性是可克服 HIV 变异带来的耐药性问题。若与其他筛选系统配合使用,得到可针对多个靶点的中药,形成复方,还可克服现有抗艾滋病药物不能兼顾免疫机能、价格昂贵的弊病。本课题组将会进一步对筛选得到的阳性中药进行有效成分分离研究,以期得到抑制二者互作的化合物,并对其进行抗 HIV 活性检测,进一步评价该模型的可靠性。

目前 FDA 批准的抗 HIV 药物只有逆转录酶抑

制剂、蛋白酶抑制剂和融合抑制剂,其联合疗法不能完全消灭病毒,仅可使病毒载量大幅下降,且药物价格昂贵,毒副作用大易诱发耐药性,患者需长期服药,停药易反弹;HIV 的高度变异又使病毒疫苗的研制异常困难;目前尚无根治艾滋病的方法。故亟需寻找抗 HIV 新药物和新靶点,本实验建立的以 p-TEFb 为靶点的抗 HIV 筛选模型可用于抗艾滋病中药或化合物的快速、高通量筛选,筛选到的药物可通过干扰或阻断 Tat/CyclinT1 互作抑制 p-TEFb 作用进而阻断 HIV 复制;p-TEFb 是细胞本身产物,抑制其作用的药物既可阻止病毒复制,也可保证对 HIV 的攻击长期有效;与针对其他靶点筛选系统配合使用,对开发低廉抗艾滋病新药或复方有非常重要的意义。

### 参考文献

- [1] 曹庭智, 聂广. 中医药治疗艾滋病的研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(7): 61-63.
- [2] 吕维柏. 艾滋病治疗的战略重点转移 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(10): 724-725.
- [3] 罗士德. 中草药抗艾滋病病毒活性研究 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1998.
- [4] 周文华, 杨辉岳, 岳庆磊. 天然产物在抗爱滋病毒中研究新进展 [J]. 中成药, 2003, 5(9): 750-752.
- [5] 郭晓辉, 谢世平, 彭勃, 等. 艾滋病中药治疗的研究进展 [J]. 光明中医, 2010, 25(3): 534-535.
- [6] 徐巍龙, 杨继兵. 从中医角度浅谈对艾滋病的认识 [J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2102-2104.
- [7] 李汉鑫. 艾滋病中医辨证方法研究进展 [J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(5): 65-66.
- [8] 刘延泽, 许利嘉, 肖伟, 等. 中医药抗艾滋病优势的科学与前景展望 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1672-1684.
- [9] Gold M O, Yang X Z, Herrmann C H, et al. PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation *in vivo* [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 4448-4453.
- [10] Price D H. P-TEFb, a Cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(8): 2629-2634.
- [11] Fujinaga K, Taube R, Wimmer J. Interactions between human cyclin T1, Tat and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 96(4): 1285-1290.
- [12] Peng J M, Marshall N F, Price D H. Identification of a cyclin subunit required for the function of drosophila p-TEFb [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22): 13855-13860.

- [13] Salerno D, Hasham M G, Marshall R. Direct inhibition of CDK9 blocks HIV-1 replication without preventing T-cell activation in primary human peripheral blood lymphocytes [J]. *Gene*, 2007, 405(1/2): 65-78.
- [14] Chiu Y L, Cao H, Jacque J M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor p-tefb (CDK9/cyclin1) [J]. *J Viro*, 2004, 78(5): 2517-2529.
- [15] Bai J, Sui J, Zhu R Y. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies [J]. *J Bio Chem*, 2003, 278(3): 1433-1442.
- [16] Zhu Y, Pe'ery T, Peng J. Transcription elongation factor p-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation *in vitro* [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(20): 2622-2632.
- [17] Zhou Q, Chen D, Pierstorff E. Transcription elongation factor p-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages [J]. *EMBO J*, 1998, 17(13): 3681-3691.
- [18] Bieniasz P D, Grdina T A, Bogerd H P. Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(14): 7791-7796.
- [19] Li F, Ma J X, Ma Y, *et al.* hElp3 Directly modulates the expression of HSP70 gene in HeLa cells via HAT activity [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29303.
- [20] Li F, Han Q J, Lu J, *et al.* The Elp3 subunit of human elongator complex is functionally similar to its counterpart in yeast [J]. *Mol Genet Genomics*, 2005, 273(3): 264-272.
- [21] 徐淑玲, 吴崇芬, 翁新愚, 等. 扶正祛瘀中药复方对候艾滋病模型实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 42-44.
- [22] 陈 峥, 徐志凯. 天然药物治疗艾滋病的研究进展 [J]. 国外医学: 流行病学分册, 2003, 30(3): 166-168.
- [23] 彭 勃, 苗明三, 杨晓娜. 中医药治疗艾滋病的研究进展 [J]. 河南中医, 2006, 26(1): 82-85.
- [24] 杨柳萌, 王睿睿, 李晶晶, 等. 四个小檗碱类化合物的体外抗 HIV-1 活性 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 225-228.
- [25] Pu J X, Yang L M, Xiao W L, *et al.* Compounds from *Kadsura heteroclita* and related anti-HIV activity [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(5): 1266-1272.
- [26] Chen D F, Zhang S X, Xie L, *et al.* Anti-AIDS agents-XXVI. Structure-activity correlations of Gomisins G related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogs [J]. *Bioorg Med Chem*, 1997, 5(8): 1715-1723.
- [27] 彭宗根, 高 雷, 董 飏, 等. 紫草酸 B 的抗 HIV-1 活性研究 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(5): 389-393.
- [28] 秦德华, 陈鸿珊, 彭宗根, 等. 丹参中的一个新化合物及其抗 HIV 活性 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 725-728.
- [29] Li Y S, Wang Z T, Zhang M, *et al.* A new pinoresinol-type lignan from *Ligularia kanaitzensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19(2): 125-129.
- [30] Ovenden S P, Yu J, Wan S S, *et al.* Globoidnan A: a lignin from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(24): 3255-3259.