

思茅松松塔提取物体外抗 HIV-1 研究

崔雪青^{1,2}, 刘 熙², 陈 欢¹, 彭 芳², 罗荣华¹, 杨柳萌¹, 刘光明², 王睿睿^{1,3*}, 郑永唐^{1*}

1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223

2. 大理大学, 药学与化学学院, 云南 大理 671000

3. 云南中医学院, 中药学院, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究思茅松松塔提取物(SMS-E 和 SMS-F)体外对 HIV-1 的抑制活性和作用机制。方法 采用 MTT 比色法检测思茅松松塔提取物对 C8166 细胞的毒性; 合胞体抑制实验、p24 抑制实验和 MT-4 细胞保护作用检测提取物对 HIV-1 的抑制作用。采用 HIV-1 复制中间产物检测、融合阻断实验和分时给药实验判断提取物的作用机制。结果 思茅松松塔提取物 SMS-E 和 SMS-F 对 HIV-1 有很好的抑制作用, 对 HIV-1_{III}B 在 C8166 细胞中复制的治疗指数(TI)分别为 436.46 和 558.61。HIV 复制中间产物检测实验显示 SMS-F 处理组 ssDNA 和 Late-RT 的拷贝数明显低于对照组, 提示作用于病毒复制的早期; 融合阻断实验显示 SMS-F 对慢性 H9/HIV-1_{III}B 与 C8166 细胞融合有较好的抑制作用, EC₅₀ 值为 71.03 μg/mL, 说明 SMS-F 作用于病毒进入阶段; 分时给药实验显示提取物对已进入细胞的 HIV-1 没有抑制作用, 再次证明了 SMS-F 作用于 HIV 进入细胞阶段。结论 思茅松松塔提取物 SMS-F 对 HIV-1 有很强的抑制活性, 其作用机制为抑制 HIV-1 进入细胞阶段。

关键词: 松塔; 思茅松; 艾滋病; HIV; 融合阻断; 病毒进入

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)11-1914-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.017

Anti-HIV-1 activities of pine cone extract from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* in vitro

CUI Xue-qing^{1,2}, LIU Xi², CHEN Huan¹, PENG Fang², LUO Rong-hua¹, YANG Liu-meng², LIU Guang-ming², WANG Rui-rui^{1,3}, ZHENG Yong-tang¹

1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

2. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

3. School of Chinese Meteria Medica, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To investigate the anti-HIV-1 activity and mechanism of pine cone extracts from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* in vitro. **Methods** The cytotoxicity of pine cone extract from *P. kesiya* var. *langbianensis* was examined by MTT assay; Syncytium formation inhibition assay, p24 assay, and the HIV-1-induced MT-4 cell death assay were used to evaluate the anti-HIV-1 activity of pine cone extract from *P. kesiya* var. *langbianensis*. HIV DNA species detection assay, cell fusion assays, and time of addition assay were used to determine the mechanisms of the extracts. **Results** Pine cone extract from *P. kesiya* var. *langbianensis* named SMS-F showed the good inhibition on HIV-1 in C8166 cells with TI value above 436.46 and 558.61, respectively. HIV-1 DNA species detection showed that ssDNA and late-RT were lower in the SMS-F treated group than those in the control group. The result implied that the mechanism of SMS-F might target the early stage of HIV-1 replication. SMS-F blocked the cell to cell fusion with EC₅₀ value 71.03 μg/mL and could not inhibit the replication of HIV-1 after entering the cell, which confirmed SMS-F targeting the HIV entry stage. **Conclusion** Pine cone extract from *P. kesiya* var. *langbianensis* shows the good inhibition on HIV-1 targeting the viral entry stage.

Key words: pine cone; *Pinus kesiya* var. *langbianensis* (A. Chev.) Gaussen; HIV; fusion block; viral entry

艾滋病自 1983 年在美国发现以来, 如今已遍布世界各地, 给患者生活造成了沉重的影响, 经过科学工作者的不懈努力, 艾滋病已成为一种可控性的慢性疾病, 但需要终身药物治疗。HIV 具有高变异

收稿日期: 2015-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260632); 国家科技重大专项课题(2012ZX10001-006)

作者简介: 崔雪青(1987—), 男, 硕士生, 研究方向为抗 HIV 药物。Tel: (0871)65126855 E-mail: 272116611@qq.com

*通信作者 王睿睿(1980—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为抗 HIV 药物药效学研究。

Fax: (0871)65195684 E-mail: wangrr1980@163.com

郑永唐(1962—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为病毒免疫和抗 HIV 药物研究。Fax: (0871)65195684 E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

性特点, 传统治疗药物易产生耐药性且价格昂贵不易普及。寻找新靶点、廉价的抗 HIV 药物成为当务之急^[1]。松塔 *Pini Conus* 系松科(Pinaceae)松属 *Pinus* L. 植物的球果, 具有成本低、来源广泛的特点, 具有很高的研究价值。在我国松塔具有悠久的药用历史, 始记于汉末的《名医别录》,《本草纲目》中对松塔的祛痰、止咳平喘、祛风和润肠等功效有详细记载。现代药理学研究表明松塔具有抗肿瘤^[2]、抗菌^[3-4]、抗病毒^[5-6]、抗氧化^[7]和增强免疫功能^[8]的活性。目前在日本五针松^[9]、奥地利黑松^[10]、湿地松^[11]、云南松^[12]等少数几种松科松属植物松塔中发现有抗 HIV-1 活性作用的成分。思茅松 *Pinus kesiya* Royle ex Gordon var. *langbianensis* (A. Chev.) Gaussen 主要分布在云南地区, 其松塔是否具有抗 HIV-1 活性尚未见报道, 本实验进行思茅松松塔提取物体外抗 HIV 作用研究, 为拓展思茅松松塔的药用价值奠定基础。

1 材料

1.1 思茅松松塔样品

思茅松松塔采集于云南省普洱市椅象镇大寨村附近; 经大理学院药学与化学学院周浓副教授鉴定为思茅松 *Pinus kesiya* Royle ex Gordon var. *langbianensis* (A. Chev.) Gaussen 的干燥球果。

1.2 细胞与病毒

人 T 淋巴细胞系 C8166、MT-4 和 H9/HIV-1_{IIIB} 均由英国 MRC, AIDS Reagent Project 惠赠。HIV-1 实验株 HIV-1_{IIIB} 由英国 MRC, AIDS Reagent Project 惠赠。按常规方法培养制备 HIV 病毒。病毒感染性滴定按常规方法进行。病毒小量分装于冻存管, -80 °C 保存。

1.3 试剂与仪器

噻唑蓝 (MTT)、齐多夫定 (AZT)、恩夫韦肽 (T-20)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、Triton X-100、青霉素、硫酸链霉素、谷氨酰胺均购自 Sigma 公司; 2-巯基乙醇 (2-ME) 为 Bio-Rad 公司产品。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司。CO₂ 细胞培养箱 (Thermo); ELX800 酶标仪 (Bio-Tek); 高压灭菌锅 (HIRAYAMA); IEC CL40 离心机 (Thermo); 微量移液器 (Gilson); Eclipse TS100 倒置显微镜 (Nikon); 二级生物安全柜 Forma Class II。

2 方法

2.1 思茅松松塔提取物的制备

将 10 kg 思茅松松塔粗粉用 85% 乙醇提取 2 次, 每次用乙醇 4 000 mL, 每次浸泡 24 h, 滤过除去乙醇提取液, 并回收乙醇; 将残渣用热水提取, 滤过

除去热水提取液。在室温条件下向残渣中加碱液 (pH 11) 进行提取, 并滤过得到碱性提取液。用醋酸调所得碱性提取液的 pH 值至 5, 浓缩、滤过, 去除沉淀。将滤液用 1 倍量乙醇 (85%) 溶解, 滤过, 得沉淀 (SMS-D) 12.5 g, 收率为 0.25%。再将滤液用 2 倍量乙醇 (85%) 溶解, 滤过, 得沉淀 (SMS-E) 5.6 g, 收率为 0.11%。继续将滤液用 5 倍量乙醇 (85%) 溶解, 滤过, 得沉淀 (SMS-F) 10.1 g, 收率为 0.20%。经初步实验, SMS-E、SMS-F 的主要化学成分是木质素-多糖的复合体, 其结构复杂, 水溶性好。SMS-E、SMS-F 用无血清 RPMI 1640 培养基溶解, 得到思茅松松塔提取物溶液。

2.2 病毒的滴定

将 HIV-1 贮存液在 96 孔板上作 5 倍梯度稀释, 10 个梯度, 每梯度 6 个复孔, 每孔加入 C8166 细胞悬液 50 μ L (4×10^5 /mL), 每孔终体积 200 μ L。37 °C、5% CO₂ 条件下培养。第 3 天补加新鲜 RPMI 1640 培养基 100 μ L。第 7 天在倒置显微镜下观察每孔中 HIV-1 诱导细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 以每孔是否有合胞体 (syncytium) 的形成确定。按 Reed&Muench 方法计算 HIV-1 的半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀)。

2.3 C8166 细胞毒性实验

在 96 孔细胞培养板上, 将 4×10^5 /mL 的 C8166 细胞悬液 100 μ L 与 100 μ L 不同质量浓度的待测样品溶液混合, 每个浓度 3 个复孔, 同时设置不含化合物的对照孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 3 d, 加入 MTT 溶液 20 μ L, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 4 h, 每孔吸弃 100 μ L 上清, 加入 100 μ L SDS-DMF 溶液, 37 °C 过夜。BIO-TEK ELx800 ELISA 仪测定吸光度 (*A*) 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长 630 nm。计算细胞存活率 ($A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$), 进一步计算得到对 50% 的细胞产生毒性时的化合物质量浓度 (CC₅₀)^[13]。

2.4 HIV-1_{IIIB} 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制实验

通过实验考察待测样品对 HIV-1_{IIIB} 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制作用。将 8×10^5 /mL C8166 细胞 50 μ L 接种到含有 100 μ L 倍比稀释待测样品的 96 孔细胞培养板中, 加入 50 μ L 的病毒稀释上清 [感染时病毒与细胞的比值, 即感染复数 (MOI) = 0.20, 约为 200 TCID₅₀]。设 3 个复孔, 同时设不含化合物的正常细胞对照孔, AZT 为阳性药物对照。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 d, 倒置显微镜下 (100 $\times$) 计

数合胞体的形成。计算待测样品及阳性对照药物的抑制合胞体形成 50% 时的化合物质量浓度 (EC_{50})^[14]。

2.5 捕捉 p24 抗原 ELISA 方法测定 HIV-1 的复制

细胞分组、加药及染毒处理同“2.4”项下操作, 1 $\mu\text{g}/\text{孔}$ Fc 抗体(购自上海 Sigma-Aldrich 公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; Washing Buffer 洗涤 3 次, 2 min/次, 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封板 2 h; 洗涤同上, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 10 000 倍稀释鼠抗 p24 单抗 P5F1 (自备), 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 洗涤同上, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 裂解上清, 37 $^{\circ}\text{C}$, 2 h; 洗涤同上, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1:100 稀释的兔抗 p24 多抗, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 洗涤同上, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1:20 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP (购自上海 Sigma-Aldrich 公司), 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 洗涤同上, 2 min/次, 加入邻苯二胺 (OPD) 底物反应液。10 min 后, 2 mol/L 硫酸终止反应, 490/630 nm 读取 A 值; 计算 HIV-1 复制的抑制率和 EC_{50} 值^[14]。

2.6 HIV-1_{IIIIB} 感染 MT-4 细胞死亡的保护实验

在 96 孔细胞培养板上, 对药物进行 5 倍倍比稀释, 每个稀释度设 3 孔, 共 6 个稀释度, 每孔 100 μL 。同时设置不含药物的未感染或感染 HIV-1_{IIIIB} 的细胞对照组。AZT 作为阳性对照药。每孔分别滴加 $8 \times 10^5/\text{mL}$ 的 MT-4 细胞悬液和 HIV-1_{IIIIB} 上清各 50 μL ($\text{MOI}=0.3$)。每孔终体积为 200 μL 。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。感染后第 3 天补加 100 μL 新鲜培养基。第 5 天用 MTT 方法用酶标仪 595/630 nm 测定 A 值。计算药物对 HIV-1_{IIIIB} 感染细胞的保护率。计算 CC_{50} 值和 EC_{50} 值^[14]。

2.7 HIV-1 感染和未感染细胞融合阻断检测实验

100 μL 不同质量浓度的待测样品加入 50 μL HIV-1_{IIIIB} 慢性感染 H9 细胞 ($2 \times 10^5/\text{mL}$) 和 50 μL C8166 细胞 ($6 \times 10^5/\text{mL}$), 以 T-20 为阳性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 共培养 6~8 h, 在倒置显微镜下计数合胞体的形成, 计算 EC_{50} 值^[14]。

2.8 分时给药

将 $4 \times 10^5/\text{mL}$ C8166 细胞与 10 倍量的 HIV-1_{IIIIB} 同步感染 2 h, 800 r/min 离心洗去未感染的游离病毒, RPMI 1640 重悬, 100 μL 每孔接种到 96 孔板上, 设置 3 个复孔。不同时间段 (0、2、4、6、8、12、24、48 h) 加入 100 μL 的终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待测样品 (此质量浓度大于 EC_{50} 10 倍以上), 同时设置不含药物的对照孔。融合抑制剂 T-20 为阳性药物对照。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养 3 d。倒置显微镜下 (100 $\times$) 计数合胞体的形成, 计算药物

对合胞体的抑制率。同时, 取出 100 μL 细胞培养上清, 用终质量分数为 5% 的 TritonX-100 裂解病毒后, 用 ELISA 方法检测 p24 抗原的表达。计算药物对 p24 抗原的抑制率^[15]。

2.9 HIV 复制中间产物检测实验

在 24 孔板上接种 C8166 细胞, 每孔 1×10^6 个, 与 HIV-1_{IIIIB} ($\text{MOI}=0.3$) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 2 h, 每隔 15 min 轻轻摇晃, 以使病毒与细胞充分接触。2 h 后离心弃去上清, PBS 清洗 2 遍, 加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测样品以及阳性对照 200 nmol/L AZT、200 nmol/L EFV (购自 US Pharmacopeia)、200 nmol/L RAL (购自 Selleck Chemicals), 同时设置不加药的对照孔, 此时计时感染 0 h。分别于感染 0、1、2、4、6、8、12 和 24 h 收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 清洗细胞 1 次, 使用血液基因组小量提取试剂盒 (康为世纪) 提取全基因组 DNA, 将标准品进行梯度稀释, 采用 TaqMan[®] 探针法进行 qPCR。绘制标准曲线, 检测 late-RT 片段^[16]。

2.10 统计学方法

用 Origin Pro8.5 软件进行统计学分析, 组间拷贝数差异用 Paired t -检验。

3 结果

3.1 对 C8166 细胞的毒性与对 HIV-1_{IIIIB} 在 C8166 细胞中复制的抑制作用

采用 MTT 比色法测定思茅松松塔提取物对 C8166 细胞的毒性, 通过合胞体抑制实验和 p24 检测实验测得提取物对 HIV-1_{IIIIB} 的抑制活性。结果 SMS-E 与 SMS-F 对 C8166 细胞的 CC_{50} 均大于 1 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 合胞体抑制实验测得 EC_{50} 值分别为 2.31、1.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$, p24 检测实验测得 EC_{50} 值分别为 4.15、3.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 治疗指数 (TI) 均大于 400。阳性化合物 AZT 合胞体抑制实验和 p24 检测实验的 EC_{50} 值分别为 1.49、5.15 ng/mL, CC_{50} 值为 1 345.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果见表 1。

3.2 对 HIV-1_{IIIIB} 感染 MT-4 细胞的保护作用

采用 TI 值较高的思茅松松塔样品 SMS-F 进行对 HIV-1_{IIIIB} 感染 MT-4 细胞的保护实验, 进一步探讨提取物对 HIV-1 的抑制活性, MT-4 细胞对 HIV-1 感染敏感, 感染后 5~7 d 即会大量死亡, 若待测样品有抑制 HIV-1 复制的作用, 则可以保护感染的 MT-4 细胞, 减少死亡。研究结果显示, SMS-F 可以有效保护感染 MT-4 细胞的死亡, EC_{50} 值为 18.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阳性对照 AZT 的 EC_{50} 值为 1.43 ng/mL。 CC_{50} 均大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 思茅松塔提取物对 HIV-1_{IIIB} 在 C8166 细胞中复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibition of pine cone extract from *P. kesiya* var. *langbianensis* on HIV-1_{IIIB} in C8166 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	测定方法	EC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TI
SMS-E	CPE/MTT	2.31 ± 0.24	1 811.31 ± 158.66	784.12
	p24	4.15 ± 0.18		436.46
SMS-F	CPE/MTT	1.69 ± 0.07	2 145.08 ± 55.44	1 269.28
	p24	3.84 ± 0.25		558.61
AZT	CPE/MTT	(1.49 ± 0.35) × 10 ⁻³	1 345.69 ± 39.68	903 144.30
	p24	(5.15 ± 0.03) × 10 ⁻³		261 298.06

3.3 对 HIV-1_{IIIB} 慢性感染 H9 细胞和 C8166 细胞融合的阻断作用

在融合阻断实验中, 采用活性较好的样品 SMS-F 进行研究, 结果测得 SMS-F 的 EC₅₀ 值为 71.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阳性对照药 T-20 的 EC₅₀ 值为 22.10 ng/mL。

3.4 分时给药实验结果

采用 ELISA 方法检测了 SMS-F 样品分时给药对 HIV-1 p24 抗原产生的抑制作用, 发现 SMS-F 对已感染的 HIV-1_{IIIB} 基本无抑制作用, 与阳性对照药 T-20 对 HIV-1_{IIIB} 抑制作用的趋势基本一致, 表明 SMS-F 对 HIV-1 进入融合阶段有很好的抑制作用。结果见图 1。

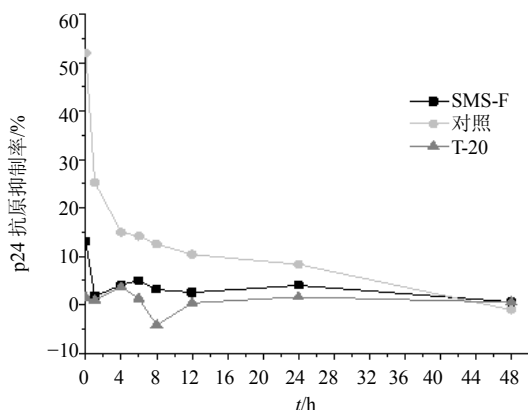


图 1 分时给药检测 SMS-F 对 HIV-1_{IIIB} 的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of SMS-F on HIV-1_{IIIB} by time of addition assay

3.5 HIV 复制中间产物检测实验结果

HIV-1 在复制周期中产生一些特征性的中间产物, 通过检测中间产物可以推测药物作用在 HIV-1 复制周期中的大致阶段, 即明确药物的作用机制。ssDNA 为 HIV-1 逆转录的起始产物, 标志着 HIV-1 进入细胞, 逆转录开始, 这一阶段发生在病毒感染细胞 2 h 以内, 因此检测感染后 0、1、2 h 的 ssDNA 拷贝数, 可判断药物是否作用在逆转录阶段。

Late-RT 为 HIV-1 逆转录后期产物, 发生在病毒感染细胞的 4~8 h 内, 检测感染后 4、6、8 h 的 late-RT 拷贝数, 可判断是否作用在此阶段。结果显示 SMS-F 组的 ssDNA 和 Late-RT 拷贝数均明显低于对照组, 表明 SMS-F 作用在 HIV-1 进入细胞或逆转录的早期。阳性对照 T-20(HIV 融合抑制剂)组 ssDNA 拷贝数和 Late-RT 拷贝数均明显低于对照组; AZT 与 EFV 都是逆转录抑制剂, Late-RT 拷贝数明显低于对照组, 但 AZT 并不能抑制逆转录的起始, 因此 ssDNA 拷贝数未受影响; RAL 为整合酶抑制剂, 对逆转录过程无作用, 而且由于后面的整合过程受阻, Late-RT 产生富集, ssDNA 和 late-RT 拷贝数略高于对照组。结果见图 2。

4 讨论

本研究初步评价了思茅松塔提取物抗 HIV-1 活性及作用机制。通过合胞体实验和 p24 检测方法研究了乙醇分级沉淀获得的思茅松塔提取物 (SMS-E 和 SMS-F) 体外抗 HIV-1 活性, MTT 方法检验了 2 个提取物对 C8166 细胞的毒性作用, 发现 SMS-F 抗 HIV-1 活性略高于 SMS-E, 最大 TI 值达到 1 269。随后以 SMS-F 为对象进行进一步研究, 评价其对 HIV-1_{IIIB} 感染 MT-4 细胞的保护作用, EC₅₀ 值为 18.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 不同体系实验 SMS-F 均显示出了较好的抗 HIV-1 活性。

本实验对 SMS-F 抗 HIV-1 作用机制进行了初步研究, 首先, 通过 HIV-1 复制中间产物检测实验, 检测 HIV-1 进入细胞逆转录起始产物 ssDNA 和逆转录完成后产物 Late-RT, 结果显示 SMS-F 组的拷贝数明显低于对照组, 提示 SMS-F 可能作用于 HIV-1 复制早期; 随后, 以融合阻断实验进一步研究发现, SMS-F 可以很好地阻断慢性 H9/HIV-1_{IIIB} 细胞与正常 C8166 细胞的融合, 说明 SMS-F 可能作用于 HIV-1 进入细胞阶段; 最后, 分时给药实验发现, SMS-F 对已感染的 HIV-1_{IIIB} 从 0~24 h 均没

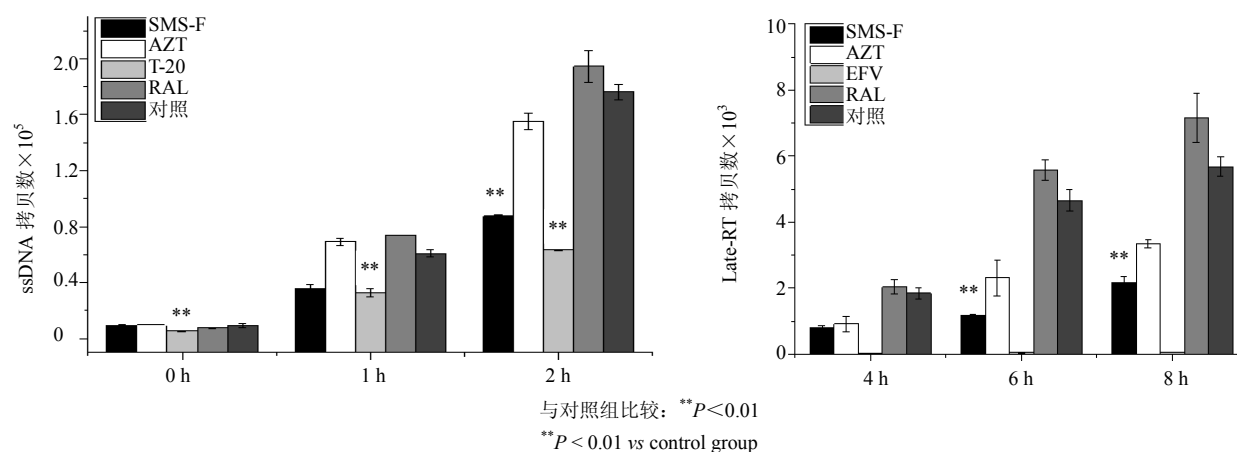


图 2 SMS-F 对 HIV 复制中间产物 ssDNA 和 Late-RT 的影响

Fig. 2 Effect of SMS-F on HIV-1 DNA intermediate products ssDNA and Late-RT

有抑制作用,这与阳性对照药 T-20 的作用趋势基本相同,证实了 SMS-F 作用在病毒进入细胞阶段。通过以上实验表明,思茅松松塔提取物 SMS-E 和 SMS-F 具有很好的抗 HIV-1 活性, SMS-F 作用于 HIV-1 进入融合阶段,通过本实验研究为进一步开发思茅松松塔的生物利用提供了理论支持,也为寻找新型抗 HIV 药物提供思路。

参考文献

- [1] 李 凯, 李爱秀, 靳玉瑞, 等. 天然产物来源的抗 HIV-1 多靶点抑制剂研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1840-1848.
- [2] 李艳省, 谢芳钦, 金新文, 等. 红松球果鳞片多糖抗肿瘤作用 [J]. 中国公共卫生, 2010, 24(6): 390-391.
- [3] 张大伟, 郝琳琳, 李明谦, 等. 红松松籽壳和松塔天然产物研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2588-2590.
- [4] Diğrak M, İlçim A, Hakki A M. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani*, and *Pinus nigra* [J]. *Phytother Res*, 1999, 13: 584-587.
- [5] Zhang X, Yang L M, Liu G M, et al. Potent anti-HIV activities and mechanisms of action of a pine cone extract from *Pinus yunnanensis* [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 6916-6929.
- [6] Tamura Y, Lai P K, Bradley W G, et al. A soluble factor induced by an extract from *Pinus parviflora* Sieb et Zucc can inhibit the replication of human immunodeficiency virus *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2249-2253.
- [7] Xu R B, Yang X, Wang J, et al. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 14262-14277.
- [8] Burrows M, Assundani D, Celis E, et al. Oral administration of PPC enhances antigen-specific CD⁸⁺ T cell responses while reducing IgE levels in sensitized mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2009, 9: 49.
- [9] 王 莉, 张 宇, 赵 艳. 樟子松松塔化学成分初步研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(6): 10-11.
- [10] 杨 鑫, 张 华, 赵昌辉, 等. GC-MS 法分析樟子松松塔挥发油的化学成分 [J]. 中成药, 2008, 30(11): 1074-1077.
- [11] Ucar M B, Ucar G. Lipophilic extractives and main components of black pine cones [J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44(3): 380-383.
- [12] 罗建蓉, 张 楨, 李冬梅. 乔松松塔脂溶性成分的气相色谱-质谱分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 259-260.
- [13] 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. 免疫学杂志, 1992(8): 266-269.
- [14] Wang R R, Yang L M, Wang Y H, et al. Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(3): 540-544.
- [15] Wang R R, Gao Y D, Ma C H, et al. Mangiferin, an anti-HIV agent targeting protease effective against resistant strains [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 4264-4277.
- [16] Wang R R, Liu B J, Luo R H, et al. Azvudine, a novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor showed good drug combination features and better inhibition on drug-resistant strains than lamivudine *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e105617.