

虎杖靶向富集活性组分抗 HIV-1 活性研究

王小利^{1,2}, 胡 泰^{1,2}, 刘 伟^{1,2}, 艾 萍², 沈思嗣^{1,2}, 马洪涛^{1,2}, 杨怡姝^{1,2*}, 曾 毅^{1,2}

1. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124

2. 北京市抗病毒药物国际科技合作基地, 北京 100124

摘要: 目的 探讨虎杖 *Polygonum cuspidatum* 富集活性组分体外对人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 的抑制作用及作用靶点。方法 运用表面等离子共振 HIV-1 多靶点筛选系统对虎杖不同工艺提取物进行筛选, 整合酶氨基耦联柱靶向富集提取物中高活性成分, 在 TZM-bl 细胞和 PBMC 细胞中对富集产物进行抗 HIV-1 病毒活性评价; 采用荧光共振能量转移分析法测定药物对 HIV-1 整合酶 3'加工的抑制作用; 运用高通量 ELISA 法测定虎杖 60%乙醇提取物的整合酶靶向富集产物 (HZ60-IN) 对整合酶链转移的影响; 试剂盒检测 HZ60-IN 对逆转录酶和蛋白酶的影响。结果 HZ60-IN 对整合酶有高亲和性。细胞水平病毒感染实验表明, 在 TZM-bl 细胞中, HZ60-IN 对 HIV-1 NL4.3 和 1084i 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 (31.94±8.96)、(38.07±11.25) μg/mL; 在 2 株 PBMC 细胞中, HZ60-IN 对 HIV-1 NL4.3 病毒均显示显著的抑制活性。HZ60-IN 对整合酶的 3'加工和链转移均有抑制作用, 其中对 3'加工的 IC₅₀ 为 (6.54±1.69) μg/mL, 对链转移的 IC₅₀ 为 (2.56±0.97) μg/mL, 其不作用于 HIV 感染的进入阶段, 对逆转录酶抑制活性较弱, 对蛋白酶活性没有影响。结论 HZ60-IN 有抗 HIV-1 病毒活性, 主要通过影响 HIV-1 的整合酶活性发挥作用。

关键词: 虎杖; HIV-1; 整合酶; 逆转录酶; 蛋白酶; 靶向富集

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0717-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.023

Anti-HIV-1 activity of targeted enriched components from *Polygonum cuspidatum*

WANG Xiao-li^{1,2}, HU Qin^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, AI Ping², SHEN Si-si^{1,2}, MA Hong-tao^{1,2}, YANG Yi-shu^{1,2}, ZENG Yi^{1,2}

1. College of Life Science and Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

2. Beijing International Science and Technology Cooperation Base of Antivirus Drug, Beijing 100124, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and targets of enriched components from *Polygonum cuspidatum* on HIV-1 *in vitro*. **Methods** Four extracts of *P. cuspidatum* were screened by HIV-1 multi-target screening system based on the surface plasmon resonance. The highly active components were obtained by NHS-activated HiTrap conjugated with integrase. The anti-HIV activity of the sample was determined with TZM-bl infection assay and PBMCs infection assay. The inhibition of HZ60-IN on integrase 3' processing was detected by fluorescence resonance energy transfer analysis. High-throughput ELISA was used to determine the effect of enriched active ingredients of *P. cuspidatum* (HZ60-IN) on integrase chain transfer; Effects of HZ60-IN on reverse transcriptase and protease were detected by kit. **Results** HZ60-IN displayed higher affinity with integrase. HZ60-IN demonstrated potent antiviral activity against NL4.3 and 1084i strains in TZM-bl cells with the IC₅₀ of (31.94 ± 8.96) and (38.07 ± 11.25) μg/mL, respectively. HZ60-IN showed significant inhibition on HIV-1 NL4.3 strains in PBMCs from two donors. HZ60-IN acted on the integrase with the IC₅₀ of (6.54 ± 1.69) μg/mL for 3' processing and (2.56 ± 0.97) μg/mL for strand transfer activity. It showed weak effects on the entry stage of HIV infection, with weak inhibitory activity on reverse transcriptase and no effect on protease activity. **Conclusion** HZ60-IN showed significant inhibitive effect on HIV-1 replication and might specifically interfere with integrase activities.

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; HIV-1; integrase; reverse transcriptase; protease; targeted enrichment

艾滋病是全球传染性疾病, 艾滋病的抗逆转录 且需要终生服药。由于现存药物的不良反应及人类 病毒疗法取得了成功, 但患者仍不能被彻底治愈, 免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 耐药毒株的出现, 仍

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 国家科技重大专项 (2014ZX10005-002); 国家自然科学基金资助项目 (81760783); 北京市自然科学基金 (7182012)

作者简介: 王小利 (1977—), 女, 助理研究员, 研究方向为抗病毒药物研究。Tel: (010)67391667 E-mail: wangxiaoli@bjut.edu.cn

*通信作者 杨怡姝 (1974—), 女, 硕士生导师, 副研究员, 研究方向为抗病毒药物研究。E-mail: yishu-y@bjut.edu.cn

然需要研发新型抗艾滋病药物。中药种类繁多，应用历史悠久，富含活性物质，且副作用小，在防治艾滋病方面有着独特的优势和巨大的潜力^[1-2]。虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 为多年生草本植物，根及根茎为药用部位，具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效^[3]，在抗黄疸、抗炎、抗感染、抗高脂血症、抗癌等方面广泛应用^[4-5]。有研究表明虎杖提取物或其纯化的活性成分如白藜芦醇等有抑制 HIV-1 病毒复制的作用^[6-9]，亦有报道其具有再激活潜伏 HIV-1 的作用^[10-12]。本研究探讨虎杖靶向富集活性组分在细胞水平对 HIV-1 活性的影响及其作用的活性靶点。

1 材料与仪器

1.1 细胞、病毒、质粒与蛋白

TZM-bl 细胞（由 JC53bl-13 细胞派生，源于 HeLa 细胞，能稳定表达 CD4、CCR5、CXCR4 分子，携带 HIV 长末端重复序列启动的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶基因）、人胚肾细胞 293FT 为本实验室保存。外周血单核细胞（PBMC，编号为 261059、261560）由美国内布拉斯加大学林肯分校 Charles Wood 教授实验室保存。

HIV 假病毒由 HIV-1 包膜质粒 SVPB16 和 HIV-1 骨架质粒 pSG3 Δ env 制备；水泡性口炎病毒糖蛋白（VSVG）胞膜假病毒由 VSVG 质粒 pCMV-VSVG 和 HIV-1 的骨架质粒 pSG3 Δ env 制备，均由本实验室制备保存。HIV-1 的野生毒株 NL4.3 和 1084i 亚型由美国内布拉斯加大学林肯分校 Charles Wood 教授实验室制备保存。

逆转录酶 p66 亚基、整合酶、Vif 蛋白由本实验室合成；Gp41 蛋白、A3G 蛋白、Vpu 蛋白购自苏州杰恩生物技术有限公司。

1.2 药物

虎杖购自北京同仁堂大栅栏店，产地为河北，批号为 15030511，经中国食品药品检定研究院中药

民族药检定所康帅副研究员鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎；齐多夫定（AZT，批号 100672-200401）购自国药集团化学试剂有限公司；雷特格韦（RAL，批号 HY-10353），奈韦拉平（NVP-1，批号为 HY-10570）购自美国 MCE 公司。化合物均溶于 DMSO 中，-20 °C 保存。

1.3 试剂

链霉亲和素、碱性磷酸酶标记地高辛抗体购自 Sigma 公司；N-羟基丁二酰亚胺（NHS）、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐（EDC）、盐酸乙醇胺、10 mmol/L 乙酸钠不同 pH 值系列溶液、CM5 芯片、HiTrap 氨基偶联柱购自 GE 公司；CCK8 细胞活性检测试剂盒购自 Dojindo 公司；逆转录酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司；HIV-1 蛋白酶检测试剂盒购自 AnaSpec 公司；96 孔黑色微孔板、96 孔酶标板等购自 Corning 公司；整合酶 ELISA 活性检测反应底物序列见表 1，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成、修饰标记。白细胞介素-2（IL-2，美国 Sigma 公司）；胎牛血清（FBS，美国 Hyclone 公司）；RPMI 1640 培养基（美国 Gibco 公司）。

1.4 仪器

BIAcore3000 表面等离子共振仪（surface plasmon resonance, SPR，美国 GE 公司）；Enspire 多功能酶标仪（美国 PerkinElme 公司）；IX71 显微镜（日本 Olympus 公司）；AKTA 蛋白色谱（美国 GE 公司）；Agilent 1200 高效液相色谱（HPLC，美国安捷伦公司）。

2 方法

2.1 4 种虎杖提取液制备

将干燥虎杖根粉碎成粉末，过 60 目筛。按照 1 g 药物加入 5 mL 提取溶液分别用去离子水、60%乙醇和 90%乙醇浸泡过夜。将过夜浸泡的样品转入渗漉管中，管中提取液高于药材粉末，控制体积流量为

表 1 整合酶 3'加工和链转移活性检测底物序列

Table 1 Sequences of integrase substrate for 3' processing and strand transfer assay

实验名称	底物序列
3'加工	(FAM)-5'-ACTGCTAGAGATTTCCACGTG GAAAATCTCTAGCAGT-3'-(DABCYL)
链转移	供体 DNA 的 dE 链: 5'-biotin-ACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA-3'
	供体 DNA 的 dA 链: 5'-ACTGCTAGAGATTTCCACACTGACTAAAAG-3'
	靶 DNA 的 tE 链: 5'-TGACCAAGGGCTAATTCAGT-3'-digoxin
	靶 DNA 的 tA 链: 5'-AGTGAATTAGCCCTTGGTCA-3'-digoxin

5 mL/min, 收集渗滤液。随着渗滤随时补加相应溶剂, 加至总提取液体积为药物质量 10 倍时渗滤完毕, 得到对应提取物分别记为 HZ 水、HZ60%乙醇和 HZ90%乙醇。另取等量虎杖粉末, 加 10 倍体积去离子水, 沸水煮 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 提取物记为 HZ 水煎。所有提取液抽滤瓶 0.45 μm 滤膜滤过, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。HPLC 测定 4 种提取物 HZ 水、HZ60%乙醇、HZ90%乙醇和 HZ 水煎中的虎杖苷质量分数分别为 1.74%、2.76%、3.28%、1.20%。

2.2 表面等离子共振技术测定虎杖提取物与 HIV 相关蛋白亲和性

用表面等离子共振仪检测药物蛋白结合活性^[13]。NHS 和 EDC 等体积混匀, 体积流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 上样 100 μL , 活化 CM5 芯片上的通道。用一定 pH 值的乙酸钠溶液稀释逆转录酶、整合酶、Gp41 蛋白、Vif 蛋白, A3G 蛋白和 Vpu 蛋白, 上样 100 μL , 分别偶联至不同 CM5 芯片的通道, 制备靶蛋白芯片。用 70 μL 盐酸乙醇胺封闭芯片表面未与蛋白结合的位点。虎杖 4 种提取物稀释为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以生药量计), 上样检测, 体积流量 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 标记样品与蛋白的结合和解离时间点, 记录样本与蛋白的结合值。再生液高速短时洗脱芯片, 至曲线回到基线。BIAevaluation 软件进行数据分析。

2.3 HZ60%乙醇的靶向富集及蛋白亲和性分析

用偶联缓冲液将整合酶蛋白稀释为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后缓慢加入氨基偶联柱, 封闭柱两端, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。10 mL 封闭液冲洗整合酶柱子 3 次, 封闭未结合位点, 10 mL 结合缓冲液冲洗柱子 3 次。结合缓冲液稀释 HZ60%乙醇为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 缓慢加入整合酶柱中, 使有效成分充分与蛋白结合。PBS 冲洗柱子, 去除未结合的药物。洗脱液缓慢洗脱柱子, 收集洗脱液。收集的有效组分冷冻干燥浓缩成粉末。用 60%乙醇重新溶解, 记做 HZ60-IN (虎杖苷质量分数为 2.97%)。

HZ60-IN 稀释为 100、20、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列质量浓度, 以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 体积流量上样 60 μL , 流经 BIAcore3000 仪器的 CM5 芯片的整合酶通道, 未偶联蛋白的通道为对照通道。测定结合值, BIAevaluation 软件分析药物和整合酶的结合情况。

2.4 HZ60-IN 对细胞的毒性测定

采用 CCK8 细胞活性检测试剂盒测定 HZ60-IN 对 TZM-bl 细胞和 PBMC 的细胞毒性。接种对数生长期的 TZM-bl 细胞到 96 孔板, 加入 HZ60-IN 系列

稀释药液, 终质量浓度分别为 1 000、500、125、31.25、7.8、1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 , 共孵育 2 d。

复苏来自 2 个健康受试者的 PBMC 细胞, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 植物血凝素激活 2 d, 随后用含有 IL-2 (40 IU/mL)、10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。细胞按照 1×10^5 个/孔接种到 96 孔细胞培养板, 每孔加入 HZ60-IN 系列稀释药液, 终质量浓度分别为 250、200、150、100、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 共孵育 5 d, 其中在第 3 天换取半量的新鲜药液。

培养板中加入 10 μL CCK8 试剂, 用多功能酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。计算细胞存活率, 确定药物对细胞的最大无毒剂量 (细胞存活率 $\geq 85\%$, 认为没有细胞毒性。)

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 HZ60%乙醇和 HZ60-IN 对 HIV-1 假病毒活性的影响

单轮细胞感染实验^[14]测定药物对 HIV-1 假病毒的抑制活性。接种 TZM-bl 细胞到 96 孔板, HIV-1 假病毒 (包膜质粒 SVPB16 和骨架质粒 pSG3 Δenv) 按照每孔 100 倍半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 感染 TZM-bl 细胞, 二倍比稀释 HZ60%乙醇和 HZ60-IN, 分别加入到各孔中, 终质量浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个剂量 3 个复孔。设置病毒对照组、无药液和无病毒的细胞对照组。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 共培养 48 h。培养板中细胞固定染色, 蓝斑用显微镜计数。计算药物对 HIV-1 的抑制作用。

$$\text{病毒抑制率} = (\text{病毒对照组蓝斑数} - \text{药物组蓝斑数}) / (\text{病毒对照组蓝斑数} - \text{细胞对照组蓝斑数})$$

2.6 HZ60-IN 对 HIV-1 野生株活性的影响

接种 TZM-bl 细胞到 96 孔板, HIV-1 B 亚型病毒 NL4.3 和 C 亚型 1084i 按照每孔 100 TCID₅₀ 剂量加入培养板中, 二倍比稀释 HZ60-IN, 加入到培养板中, 终质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个剂量 3 个复孔。设置病毒对照组、无药液和无病毒的细胞对照组。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 共培养 48 h。培养板中细胞固定染色, 蓝斑用显微镜计数。计算药物对 HIV-1 复制的抑制率。

复苏 PBMC 细胞, 稀释至 1×10^6 个/mL, 用含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 的培养基培养 2 d, 激活 PBMC 细胞。PBS 洗涤细胞 2 次, 随后用含有 IL-2 (40 IU/mL)、10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。按

照 1×10^5 个/孔接种到 96 孔板中。病毒对照组和药物组每孔加入 5×10^4 TCID₅₀ HIV-1 NL4.3 病毒与细胞进行孵育, 其中 HZ60-IN 组设 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 2 个质量浓度, 阳性药物组 AZT 终质量浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 病毒对照组加入等体积的培养基。细胞对照组不加病毒, 孵育 3 h。PBS 清洗培养板 2 次, 洗去培养孔中游离的病毒, 然后各组补加对应的药物或培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养。在共培养的第 4、7 天, 收集一半上清液, 放入 -20°C 备用, 同时孔中补加含有药液的新鲜培养基。收集第 10 天的上清液, 同时将第 4、7 天收集的上清液一起用液体闪烁法测定上清中的逆转录酶活性^[15]。

2.7 HZ60-IN 对整合酶 3'加工的影响

采用荧光共振能量转移分析法测定药物对 HIV-1 整合酶 3'加工的抑制作用^[16]。DNA 底物退火, 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min 变性, 随后每 90 秒温度降低 1 $^{\circ}\text{C}$, 持续 2 h, 退火后底物分装。药物和 2.5 μg 整合酶在反应缓冲液中 (0.25 $\mu\text{mol/L}$ 二硫苏糖醇, 200 mmol/L NaCl, 50%甘油, 40 mmol/L HEPES) 共孵育, HZ60-IN 的终质量浓度为 100、20、4、0.8 $\mu\text{g/mL}$; 阳性药物 RAL 的质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。随后, 加入 20 pmol/L 底物和 10 mmol/L 的 MnCl_2 , 孵育 4 h。多功能酶标仪在激发光波长 485 nm, 发射光波长 528 nm 处测定荧光强度, RAL 为阳性对照, 60%乙醇为对照。

2.8 HZ60-IN 对整合酶链转移的影响

运用整合酶链转移活性检测的高通量 ELISA 方法^[17]测定 HZ60-IN 对链转移的影响。用退火缓冲液溶解 DNA 底物 dE、dA、tE、tA, 然后分别等体积混合 dE/dA、tE/tA, PCR 仪上 94 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 每 90 s 下降 1 $^{\circ}\text{C}$, 2 h, 底物自发形成互补双链, 即 donor DNA (dDNA) 和 target DNA (tDNA)。用链霉亲和素包被 96 孔酶标板, 3%的脱脂奶粉封闭 96 孔反应板。4 $^{\circ}\text{C}$, 过夜孵育。TBST 清洗酶标板和反应板。反应板中每孔加入 $2 \times$ 反应缓冲液 50 μL , 500 mmol/L Mn^{2+} 2 μL , 500 mmol/L β -巯基乙醇 1 μL , 1.5 pmol donor DNA 和 15 pmol target DNA, 药液 2 μL , 整合酶蛋白 2.5 μL , 余下体积使用去离子水补足 100 μL , 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。HZ60-IN 的终质量浓度为 100、20、4、0.8 $\mu\text{g/mL}$; 阳性药物 RAL 的质量浓度为 50、10、2、0.4 $\mu\text{g/mL}$; 60%乙醇为阴性对照。每孔加入 100 μL 结合缓冲液, 彻底振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 每隔 10 min 振

荡混匀 1 次。将 96 孔反应板中的反应体系转移至包被链霉亲和素的酶标板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 弃净上清液。用 TBST 洗板, 每孔加入 200 μL 稀释的碱性磷酸酶标记的地高辛抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育 30 min。TBST 洗板, 每孔加入 200 μL 底物显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min, 加入 2 mol/L NaOH 溶液 20 μL , 终止显色, 用多功能酶标仪测定 405 nm 波长处的 A 值。

2.9 HZ60-IN 对 VSVG 包膜病毒和 HIV-1 包膜病毒活性的影响

将等量 HIV-1 包膜的假病毒 (SVPB16 和 pSG3 Δenv) 与 VSVG 包膜的假病毒 (VSVG 和 pSG3 Δenv) 分别感染 TZM-bl 细胞, 加入系列稀释的 HZ60-IN, 终质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$, RAL 为阳性药物, 终质量浓度为 2.5、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g/mL}$, 共培养 48 h, 培养板中细胞固定、染色、蓝斑计数。计算 HZ60-IN 对病毒的抑制率和半数抑制浓度。

2.10 HZ60-IN 对逆转录酶的影响

按照逆转录酶活性检测试剂盒说明书操作。96 孔板每孔加入 10 μL 逆转录酶 (2 $\mu\text{g/mL}$), 20 μL 含有 DIG-dUTP、Bio-dUTP 及 DNA 模板的混合液, 30 μL HZ60-IN (100、20、4 $\mu\text{g/mL}$)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。将 60 μL 反应液转移到链霉亲和素包被的 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。清洗 5 次, 每孔加入 200 μL 过氧化物酶抗地高辛抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h。用洗液清洗 5 次, 加入 ABTS 底物, 室温 10~30 min, 在过氧化物酶催化下, 显色, 用酶标仪 405 nm 处测 A 值。NVP-1 为阳性对照药物, 溶剂 60%乙醇为对照组。

2.11 HZ60-IN 对蛋白酶的影响

用蛋白酶检测试剂盒测定药物对蛋白酶的影响。HZ60-IN 质量浓度设为 100、20、4 $\mu\text{g/mL}$, 每个质量浓度 3 个复孔, 同时设阳性药对照组 (蛋白酶抑制剂 Pepstatin A) 和阴性对照组 (60%乙醇)。向 384 孔板中加入药物和蛋白酶, 室温孵育 15 min。随后加入蛋白酶底物溶液, 混匀, 室温 1 h, 加终止液, 多功能酶标仪在激发光波长 340 nm, 发射光波长 490 nm 处测定光强度。

2.12 数据统计分析

所有实验均重复 3 次或以上, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析 (One way ANOVA)。用 GraphPad Prism 6.0 软件绘图及进行统计学分析。

3 结果

3.1 虎杖提取物与 HIV 相关蛋白的亲性和

结果如图 1 所示, 虎杖 4 种提取物与靶蛋白有一定的结合, 其中虎杖 60%乙醇提取物与整合酶的结合值最高, 达到 600 以上, 选取 60%乙醇提取物做进一步研究。

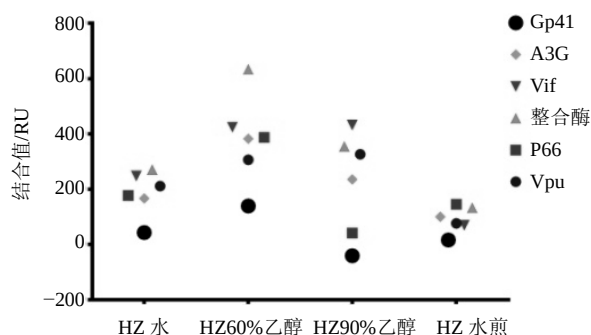


图 1 虎杖不同提取物与 HIV-1 相关蛋白 SPR 亲和性
Fig. 1 Affinity to HIV-1 related protein of serial *P. cuspidatum* extracts by SPR assay

3.2 HZ60%乙醇的靶向富集及蛋白亲和性

将 HZ60%乙醇用整合酶氨基耦联柱进行靶向富集, 得到富集产物 HZ60-IN。将 HZ60-IN 上样流过整合酶芯片, 其与整合酶结合情况见图 2。随着 HZ60-IN 质量浓度增高, HZ60-IN 与整合酶结合值增大, 100 $\mu\text{g/mL}$ 时结合值达到 900 RU。

3.3 HZ60-IN 对 TZM-bl 细胞和 PBMC 存活率的影响

在 TZM-bl 细胞中, HZ60-IN 对细胞存活率影响很小, 最大无毒质量浓度约 500 $\mu\text{g/mL}$, 半数毒性浓度 (TC_{50}) 大于 1 mg/mL 。HZ60-IN 在 PBMC 细胞中亦显示低细胞毒性, 250 $\mu\text{g/mL}$ HZ60-IN 对 PBMC 仍未显示细胞毒性 (图 3)。

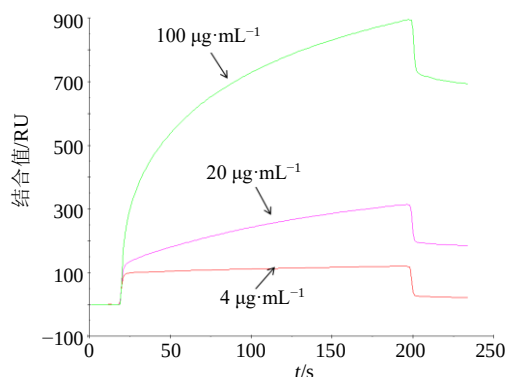


图 2 HZ60-IN 与整合酶的亲和性
Fig. 2 Affinity to integrase of HZ60-IN

3.4 HZ60%乙醇和 HZ60-IN 对 HIV-1 假病毒活性的影响

单轮细胞感染实验检测 HZ60%乙醇和 HZ60-IN 的抗 HIV-1 假病毒活性 (图 4), 二者对 HIV-1 病毒有抑制作用, HZ60%乙醇的 IC_{50} 为 (61.41 ± 7.21) $\mu\text{g/mL}$, HZ60-IN 的 IC_{50} 为 (19.86 ± 1.52) $\mu\text{g/mL}$, 较 HZ60%乙醇的抗病毒活性略有提高。

3.5 HZ60-IN 对 HIV-1 野生病毒的影响

在 TZM-bl 细胞中, HZ60-IN 对 HIV-1 野生毒株 B 亚型 NL4.3 和 C 亚型 1084i 的抑制作用呈现剂量效应关系, 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对 2 种病毒的抑制率均在 70%以上, IC_{50} 分别为 (31.94 ± 8.96) 、 (38.07 ± 11.25) $\mu\text{g/mL}$ (图 5-A)。

在 PBMC 中, HZ60-IN 对 HIV-1 野生毒株 B 亚型 NL4.3 的抑制作用见图 5-B。上清中的逆转录酶在作用第 4 天时可检测到, 第 7 天达到高峰, 第 10 天有所下降。第 10 天下降原因可能是随着培养时间延长, 细胞数目减少, 导致病毒减少所致。在 2 株 PBMC 细胞中, 在不同感染时间点, HZ60-IN 100、50 $\mu\text{g/mL}$ 组上清中的逆转录酶多数低于病毒

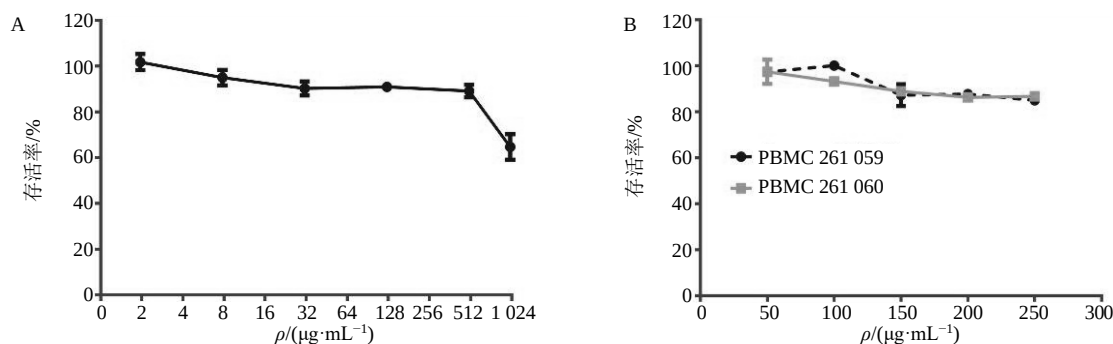


图 3 HZ60-IN 对 TZM-bl 细胞 (A) 和 PBMC (B) 存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Cytotoxicity of HZ60-IN in TZM-bl cells (A) and PBMC (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

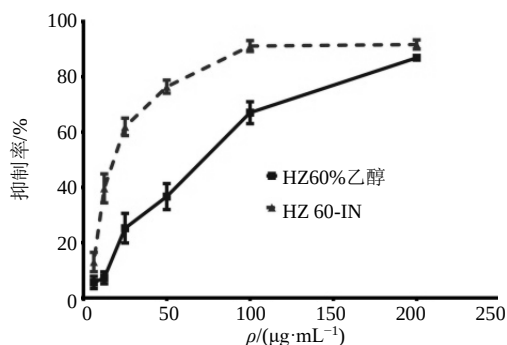
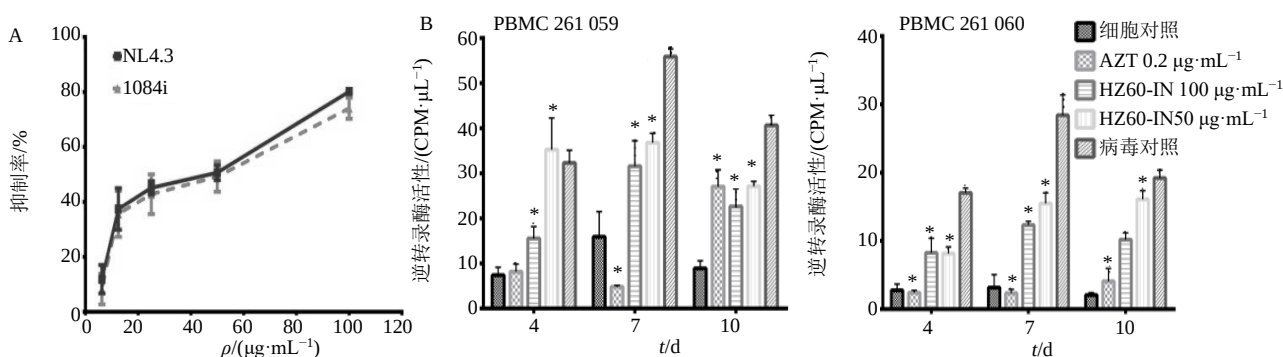


图 4 HZ60%乙醇和 HZ60-IN 对 HIV-1 假病毒活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of 60% ethanol extract of *P. cuspidatum* and HZ60-IN on HIV-1 pseudovirus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

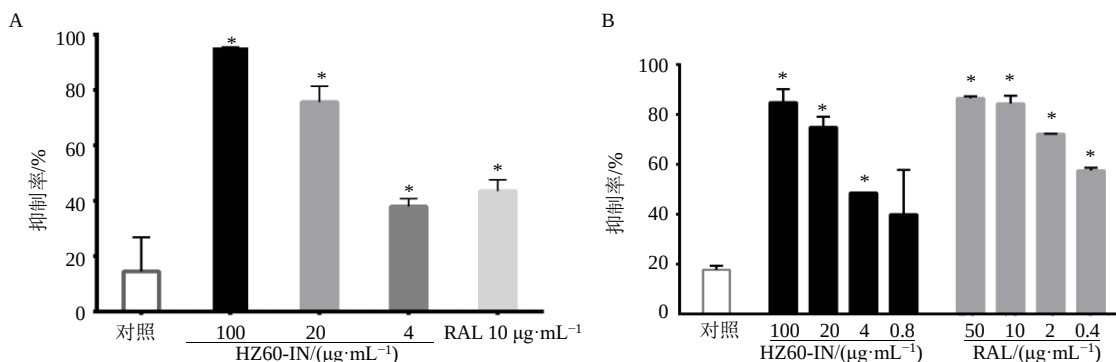


A-在 TZM-bl 细胞中抑制作用 B-在 2 株 PBMC 细胞中对 NL4.3 的抑制作用; 与病毒对照组比较: $*P < 0.05$

A-inhibition in TZM-bl cells B-inhibition on NL4.3 in PBMCs from two donors; $*P < 0.05$ vs virus control

图 5 HZ60-IN 对 HIV-1 野生毒株 NL4.3 和 1084i 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Inhibition of HZ60-IN on HIV-1 wild-type strains NL4.3 and 1084i ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: $*P < 0.05$, 下图同

$*P < 0.05$ vs control group, same as below figures

图 6 HZ60-IN 对整合酶 3' 加工 (A) 和链转移 (B) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Inhibition of HZ60-IN on integrase 3' processing (A) and strand transfer (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 HZ60-IN 对 VSVG 包膜病毒和 HIV-1 包膜病毒的影响

HIV-1 包膜的假病毒需要包膜蛋白 Gp120 和

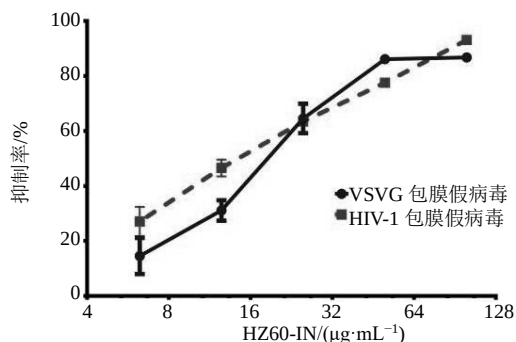
对照组, 且与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。阳性对照药 AZT 组上清中逆转录酶显著低于病毒对照组, 显示良好的抗病毒活性。

3.6 HZ60-IN 对整合酶活性的影响

运用 ELISA 方法研究 HZ60-IN 对整合酶活性的影响 (图 6)。与对照组比较, HZ60-IN 对 3' 加工和链转移具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 且呈剂量效应关系。HZ60-IN 在质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对整合酶 3' 加工活性的抑制率为 90% 以上 (图 6-A), 对链转移活性抑制率在 80% 以上 (图 6-B), IC_{50} 分别为 (6.54 ± 1.69) 、 (2.56 ± 0.97) $\mu\text{g/mL}$ 。阳性对照 RAL 对整合酶 3' 加工活性呈弱抑制作用, 但可显著抑制整合酶的链转移活性。

Gp41 蛋白识别宿主细胞的受体和辅助受体感染宿主细胞, 而 VSVG 包膜假病毒可直接感染细胞。将 VSVG 和 HIV-1 包膜的假病毒分别感染 TZM-bl 细

胞,加入 HZ60-IN 共孵育 48 h。如图 7 所示,HZ60-IN 对 2 种病毒均显示有抑制作用, IC_{50} 分别为 (19.61 ± 7.95) 、 (14.73 ± 5.43) $\mu\text{g/mL}$, 提示 HZ60-IN 的抗 HIV-1 病毒作用与病毒进入细胞过程无关。RAL 为以整合酶为靶点的对照药物,其对 2 种病毒亦均有抑制作用,表明病毒包膜对其抗病毒活性无影响。



3.8 HZ60-IN 对逆转录酶及蛋白酶的影响

与对照组比较, HZ60-IN 100 $\mu\text{g/mL}$ 对逆转录酶有显著的抑制作用 ($P < 0.05$, 图 8), 提示 HZ60-IN 对逆转录酶有抑制活性, 但最高剂量组的抑制作用只有 30% 左右, 提示 HZ60-IN 对逆转录酶抑制作用较弱。HZ60-IN 对蛋白酶没有显示抑制活性。

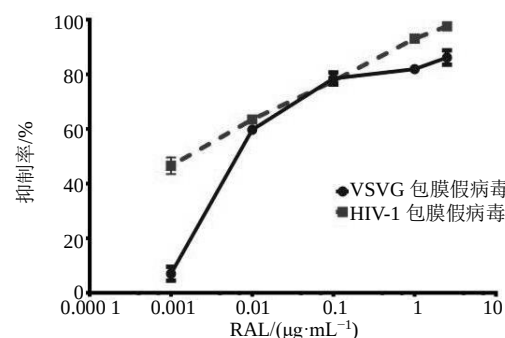


图 7 HZ60-IN 和 RAL 对 HIV-1 包膜的假病毒和 VSVG 包膜的假病毒的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of HZ60-IN and RAL on replication of HIV-1 and VSVG pseudovirions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

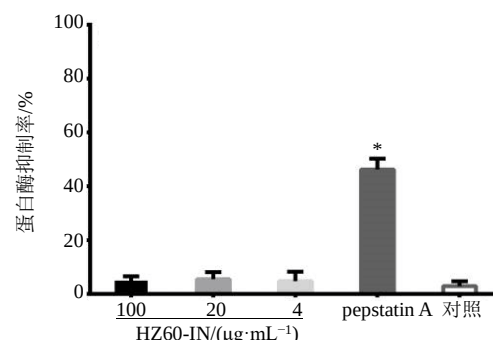
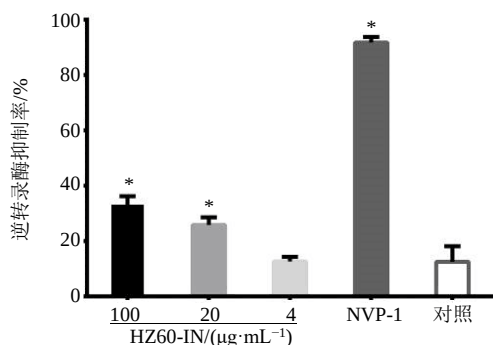


图 8 HZ60-IN 对逆转录酶和蛋白酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of HZ60-IN on HIV-1 reverse transcriptase and protease activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

虎杖被用于多种中药制剂中,具有调节脂质、抗休克、抗炎、抗癌和抗氧化等作用^[4]。虎杖对 HIV-1 的直接抑制作用也有报道。蒋岩等^[18]报道虎杖水提取物能够显著抑制 HIV-1 黏膜感染小鼠体内的病毒复制。杨子峰等^[9]报道虎杖提取物中的白藜芦醇在小鼠艾滋病模型中有抗病毒的作用。Lin 等^[6]从虎杖中分离出儿茶酸、大黄酸及白藜芦醇,对 HIV-1 抑制作用的 IC_{50} 分别为 (14.47 ± 1.34) 、 (11.29 ± 6.26) 、 (4.37 ± 1.96) $\mu\text{g/mL}$, 有显著的抗 HIV-1 作用。本研究采用多种工艺提取虎杖成分,用表面等离子共振技术靶向筛选与 HIV-1 相关蛋白亲和性高的样本,结果发现虎杖 60%乙醇提取物与整合酶亲和力最强。用整合酶氨基耦联柱对虎杖 60%乙醇提取物

靶向性富集,收集提取物中与整合酶高亲和性的有效成分,富集产物在细胞水平对 HIV-1 病毒显示抑制活性,并对其作用靶点进行了初步探讨。

表面等离子共振多靶点药物筛选是基于表面等离子共振检测原理,将靶蛋白固定到芯片表面,待测样本流经芯片,通过监测芯片表面液体折射率的变化实时监测分子间的相互作用^[19]。将 Gp41 蛋白、逆转录酶 P66 亚基、整合酶蛋白、Vpu 蛋白、Vif 蛋白和 A3G 蛋白 6 种有代表性的 HIV-1 相关蛋白制备成芯片,这些蛋白来自 HIV-1 病毒生活周期不同阶段,从病毒吸附到出芽,既有逆转录酶、整合酶和包膜蛋白等 HIV-1 药物重要的靶点蛋白,又有 Vif 蛋白和 Vpu 蛋白等新靶点蛋白及抗 HIV-1 蛋白 A3G 蛋白,多靶点筛选抗病毒药物。该方法样本、蛋白

均不需要特殊标记,每个样本进样检测仅需 3 s 左右,且可以一次进行 48 孔全自动操作,方便、快捷、直观,既可以筛选药物的作用靶点,又可以研究药物和靶点结合解离特性。

本研究靶向制备的有效组分 HZ60-IN 与虎杖 60%乙醇提取物相比,其与整合酶的响应值增大,亲和力增加,抗 HIV-1 假病毒活性也有提高。进一步对 HZ60-IN 抗 HIV-1 野生毒株活性进行了研究。在 TZM-bl 细胞中, HZ60-IN 对 HIV-1 B 亚型病毒 NL4.3 和 C 亚型病毒 1084i 有显著抑制作用, IC₅₀ 分别为 31.94、38.07 μg/mL,在 2 株 PBMC 细胞中, HZ60-IN 对 NL4.3 有一定的抑制作用。高效液相色谱初步测定, HZ60-IN 成分比 HZ60%乙醇大大减少,主要成分可能为一种黄酮类物质和 2 种蒽醌类物质,需要质谱进一步确定。

HZ60-IN 是以整合酶为靶点的富集产物。整合是 HIV-1 复制中关键步骤^[20],整合酶的主要作用是将反转录的 HIV-1 cDNA 整合到宿主 DNA 上,涉及 2 个过程,3'加工和链转移。首先整合酶催化病毒 DNA 3'末端加工为 3'-CA-OH 结构,随后整合酶、HIV-1 cDNA、辅助因子形成整合前复合物,进入细胞核,整合酶使病毒 DNA 插入宿主细胞 DNA 中。用整合酶活性 ELISA 检测方法发现 HZ60-IN 对整合酶的 3'加工和链转移活性均有影响, IC₅₀ 分别为 6.54、2.56 μg/mL,提示 HZ60-IN 可能通过影响整合酶功能对 HIV-1 活性有抑制作用。HZ60-IN 来源于中药提取物,不同于目前临床上应用的整合酶抑制药物,对开发新型的整合酶抑制剂有重要意义。

本研究进一步评价了 HZ60-IN 对 HIV 其他靶点的作用情况。将 HZ60-IN 分别作用于 VSVG 包膜和 HIV-1 包膜的假病毒, HZ60-IN 对 2 种病毒均显示有抑制活性,表明病毒包膜不影响 HZ60-IN 抗病毒活性,不作用于病毒进入阶段。HZ60-IN 对逆转录酶的抑制活性弱,对蛋白酶活性影响不显著。

本研究表明 HZ60-IN 主要影响整合酶活性而发挥抗 HIV 作用,与病毒进入和包膜蛋白无关,而金航^[21]研究发现虎杖水提物作用于 HIV-1 感染 T 细胞白血病 MT4 细胞的早期阶段,且可能作用于 gp120 蛋白和 CD4 受体的结合阶段,与本实验结果不一致。分析原因可能是 HZ60-IN 是整合酶柱靶向反复富集的成分,是针对整合酶成分富集,对整合酶的影响特异性高,提取溶剂及提取方法不同,导致提取物成分差别比较大,发挥抗病毒作用的有效

成分不一致,需要进一步实验验证。

中药提取物生物活性高,但成分复杂,发挥药效的物质基础不明确,作用机制不清楚,限制了其推广应用。快速找到有生物活性的物质基础是中药研究的关键和瓶颈^[22]。本研究从生物活性和作用靶点出发,建立了一种靶蛋白导向的快速分离中药提取物中活性组分的方法,获得活性相近的有效组分,但是发挥药效的物质基础依旧不明确,需要进一步深入研究。

致谢:美国内布拉斯加大学林肯分校 Charles Wood 教授及其团队提供的抗 HIV 药物实验平台及对本研究提供指导帮助。

参考文献

- [1] Van Den Bout-Van Den Beukel C J, Koopmans P P, Van Der Ven A J, et al. Possible drug-metabolism interactions of medicinal herbs with antiretroviral agents [J]. *Drug Metab Rev*, 2006, 38(3): 477-514.
- [2] Yu D, Morris-Natschke S L, Lee K H. New developments in natural products-based anti-AIDS research [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(1): 108-132.
- [3] 洪小桐,许华玉,尚悦,等. 2015 年版《中国药典》四部增修订概况 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(20): 1782-1786.
- [4] Peng W, Qin R, Li X, et al. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 729-745.
- [5] Han J H, Koh W, Lee H J, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction of *Polygonum cuspidatum* in experimental animals [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(2): 191-195.
- [6] Lin H W, Sun M X, Wang Y H, et al. Anti-HIV activities of the compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum* [J]. *Planta Med*, 2010, 76(9): 889-892.
- [7] Zhang H S, Zhou Y, Wu M R, et al. Resveratrol inhibited Tat-induced HIV-1 LTR transactivation via NAD (+)-dependent SIRT1 activity [J]. *Life Sci*, 2009, 85(13/14): 484-489.
- [8] Clouser C L, Chauhan J, Bess M A, et al. Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(21): 6642-6646.
- [9] 杨子峰,洪志哲,唐明增,等. 白藜芦醇对小鼠艾滋病

- 治疗作用的实验研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 148-150.
- [10] Wang C, Yang S, Lu H, *et al.* A natural product from *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. promotes Tat-dependent HIV latency reversal through triggering P-TEFb's release from 7SK snRNP [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142739.
- [11] Chan C N, Trinite B, Levy D N. Potent inhibition of HIV-1 replication in resting CD4 T cells by resveratrol and pterostilbene [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, doi: 10.1128/AAC.00408-17.
- [12] Zeng X, Pan X, Xu X, *et al.* Resveratrol reactivates latent hiv through increasing histone acetylation and activating heat shock factor 1 [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(22): 4384-4394.
- [13] Baleux F, Loureiro-Morais L, Hersant Y, *et al.* A synthetic CD4-heparan sulfate glycoconjugate inhibits CCR5 and CXCR4 HIV-1 attachment and entry [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(10): 743-748.
- [14] Kimpton J, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene [J]. *J Virol*, 1992, 66(4): 2232-2239.
- [15] Dorr P, Westby M, Dobbs S, *et al.* Maraviroc (UK-427, 857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4721-4732.
- [16] He H Q, Ma X H, Liu B, *et al.* High-throughput real-time assay based on molecular beacons for HIV-1 integrase 3'-processing reaction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 811-817.
- [17] 毛志杰. HIV-1 整合酶抑制剂生物活性测定方法的研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2016.
- [18] 蒋 岩, 王红霞, 鲍作义, 等. 用鼠艾滋病模型评价虎杖水提液的抗病毒作用 [J]. 中国病毒学, 1998(4): 27-32.
- [19] Thillaivinayagalingam P, Gommeaux J, Mcloughlin M, *et al.* Biopharmaceutical production: Applications of surface Plasmon resonance biosensors [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(2): 149-153.
- [20] Hare S, Maertens G N, Cherepanov P. 3'-processing and strand transfer catalysed by retroviral integrase in crystallo [J]. *EMBO J*, 2012, 31(13): 3020-3028.
- [21] 金 航. 虎杖抗 HIV-1 活性的体外实验研究 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1995(3): 32.
- [22] 严诗楷, 赵静寰, 圣 姗, 等. 基于系统生物学与网络生物学的现代中药复方研究体系 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(4): 249-259.