

# 双黄连粉针剂及其药物血清体外抗 HIV-1 作用

曾祥凤, 曾耀英, 林长乐, 赵令斋, 李海仙, 李莉平

(暨南大学组织移植与免疫学教育部重点实验室, 广东 广州 510632)

**摘要**【目的】探讨双黄连药物及其药物血清在体外是否有抗 HIV-1 作用。【方法】采用荧光染料 Calcein AM 标记 HIV 感染的慢性 H9 细胞(H9/HIV-1 B)分别与不同稀释浓度的双黄连药物和药物血清作用后,与靶细胞 MT-2 细胞混合培养,观察 MT-2 和 H9/HIV-1 B 融合细胞的变化,MTT 法检测药物对 HIV 感染细胞的保护作用,HIV-1 p24 抗原试剂盒检测药物作用后的细胞培养上清 p24 抗原含量的变化。【结果】双黄连粉针剂及其药物血清能够抑制 MT-2 和 H9/HIV-1 B 细胞融合,能够保护 HIV 感染细胞的死亡,减少 HIV-1 p24 的表达。【结论】双黄连粉针剂及其药物血清在体外具有抗 HIV-1 的作用。

关键词:双黄连;HIV-1;细胞融合;药物血清

中图分类号:R373.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)02-0144-04

## Effect of Shuanghuanglian Injection and Its Drug Serum Against HIV-1 In Vitro

ZENG Xiang-feng, ZENG Yao-ying, LIN Chang-le, ZHAO Ling-zhai, LI Hai-xian, LI Li-ping

(Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology of National Education Department,  
Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract**【Objective】To investigate the inhibitory effect of Shuanghuanglian (SHL) injection on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in vitro.【Methods】Calcein-AM stained H9/HIV-1 B cells were treated with serially diluted SHL injection and its drug serum respectively, then mixed with target cells MT-2. HIV-1 mediated cell fusion was observed under a fluorescent microscope. The protective effect of SHL on HIV-1 infected cells was determined by MTT. Viral replication was evaluated by measuring the level of p24 antigen in culture supernatants by ELISA.【Results】SHL injection and its drug serum could inhibit the fusion of MT-2 and H9/HIV-1 B cells, could protect HIV-1 infected cells from death, and decrease p24 antigen release.【Conclusion】SHL injection and its drug serum can reduce HIV-1 infection in vitro.

Key words: Shuanghuanglian; HIV-1; cell fusion; drug serum

[J Sun Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):144-147, 156]

艾滋病即获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的一种致死性的传染病。HIV 是一种逆转录病毒,其主要型别分为 HIV-1 和 HIV-2,我国艾滋病大多由 HIV-1 引起。近年来艾滋病在全球蔓延的速度令人震惊,我国 HIV/AIDS 感染者也迅猛增加<sup>[1]</sup>。尽管高效抗逆转录病毒联合疗法 (highly active antiretroviral therapy, HAART)在治疗艾滋病上取得

了明显的进展,但因沉重的经济负荷无法广泛地应用到发展中国家,且毒副反应和多种耐药株报道已屡见不鲜<sup>[2-5]</sup>。为此开发和利用低毒、高效、可长期使用中草药或其他廉价药物治疗艾滋病已刻不容缓。双黄连是临床常用的中成药,有研究发现<sup>[6]</sup>双黄连粉针剂具有广谱抗病毒作用,并且对吸附于细胞表面和进入细胞的病毒均有抑制作用。但双黄连对 HIV 的作用报道很少,虽有临床试验<sup>[7]</sup>发现双黄连可提高艾滋病病人的 CD4<sup>+</sup>T 细胞的数量,改

收稿日期:2005-10-21

基金项目:十五“国家科技攻关计划中医药治疗艾滋病专项基金(2004BA719A09-03)

作者简介:曾祥凤(1968-),女,江西上犹人,硕士,讲师,从事艾滋病药物筛选及 HIV 致病与免疫研究;曾耀英,通信作者。E-mail:

zengxf868@sohu.com

善艾滋病人的症状,但未进行 HIV 病毒载量的测定。本实验用不同浓度的双黄连药液及其药物血清和 H9/ HIV-1 B 作用观察其是否具有抗 HIV-1 的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

药物和试剂:中药双黄连粉针剂(哈药集团中药二厂生产,剂型:600 mg/支),用生理盐水(NS)溶解为 200 mg/mL,无菌分装,-20℃ 贮存备用。AZT (3-Azido-3-deoxythymidine,美国 Biochemika Fluka)100 mg,用 DMSO 配成 100 mg/mL,分装,-20℃ 贮存备用。药物于实验前用 RPMI-1640 培养液按需要稀释至所需工作浓度。Calcein AM (美国 Molecular Probes),用 DMSO 配成 1 mmol/L,分装,-20℃ 贮存备用。噻唑蓝(MTT, Sigma) PBS 配制 5 mg/mL,-20℃ 贮存备用。p24 抗原检测试剂盒(美国 ZeptoMetrix)。RPMI-1640 培养液(美国 Gibco),使用时加入体积分数 10% 胎牛血清(FBS 杭州四季青)。细胞和病毒:HIV-1 B 感染的慢性 H9 细胞(H9/ HIV-1 B)和 MT-2 细胞来自美国,由南方医科大学免疫教研室惠赠。实验动物:6 周龄 SPF 级雄性 BABL/c 小鼠,体质量 15~20 g,购自广州医学实验动物中心。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞和病毒培养 H9/ HIV-1 B 细胞和 MT-2 细胞用含体积分数 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基在 37℃,体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2~3 d 传代 1 次。进行药物实验前 1 d 再传代换液 1 次使细胞处于对数生长期。

1.2.2 双黄连药物血清的制备 6 周龄 SPF 级雄性 BABL/c 小鼠 12 只,随机分成两组:生理盐水(NS)组和双黄连(SHL)组,每组 6 只。中药双黄连粉针剂用无菌 NS 配制,以人临床用量×动物(小白鼠)等效剂量比值×血清稀释度为参考浓度,给 BABL/c 小鼠腹腔注射,每天注射 2 次,每次 0.25 mL(药物质量浓度 60 g/L)。NS 对照组每次腹腔注射无菌 NS 0.25 mL,连续给药 2 d,末次给药后 1 h,眼球放血采集分离血清,组内 6 只小鼠血清混匀后 56℃ 30 min 灭活,小量分装密封后置于-80℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 药物和药物血清对细胞的毒性测定 采用

MTT 法<sup>[8]</sup>分别测定双黄连对 MT-2 细胞和 H9/ HIV-1 B 细胞毒性。在进行药物抗病毒实验前,应首先测定药物对实验细胞的毒性作用,观察细胞存活率和求出 CC<sub>50</sub>[50% cytotoxic concentration,即对 50% 宿主细胞产生细胞毒性作用时药物质量浓度  $\rho_{CC50}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )], 细胞存活率=(实验组 OD 均值/ 对照组 OD 均值) ×100%。根据细胞存活率按照 Reed-Muench 法求出 CC<sub>50</sub>。

1.2.4 药物和药物血清对 H9/ HIV-1 B 细胞与 MT-2 细胞早期融合的影响 分子荧光探针 Calcein-AM 标记 H9/ HIV-1 B 细胞:收集对数生长期的 H9/ HIV-1 B 细胞,计数并配制  $4\times 10^5$ /mL 细胞悬液。按 1 mL H9/ HIV-1 B 加入 2.5  $\mu\text{L}$  1 mmol/L Calcein AM。37℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次,再用含体积分数 10%FBS 的 RPMI-1640 培养液重悬细胞,计数并调整细胞密度为  $4\times 10^5$ /mL。H9/ HIV-1 B 细胞和药物及药物血清作用:将 Calcein-AM 标记好的 H9/ HIV-1 B 细胞加到 96 孔培养板,每孔 25  $\mu\text{L}$ ,分别加入不同稀释度双黄连和 AZT 药物 25  $\mu\text{L}$ ,或分别加入不同稀释度双黄连药物血清和 NS 对照血清 25  $\mu\text{L}$ ,为实验组。另外设不加药物或药物血清的病毒对照组(补加培养基)。每种样本设 3 个复孔。37℃ 孵育 30 min。细胞融合:每孔加入 50  $\mu\text{L}$  处于对数生长期的 MT-2 细胞(细胞数密度  $2\times 10^6$ /mL),同时设单独的 MT-2 细胞对照(不加药物和病毒)。37℃ 孵育 2 h。在倒置荧光显微镜下观察,计数每孔细胞融合数,每孔随机计数 4 个视野。计数完成后每孔再补加 100  $\mu\text{L}$  培养基 37℃ 继续培养。重复实验 3 次,记录结果。计算出融合细胞均数(N)值。

融合抑制率=1-(N<sub>实验组</sub>/N<sub>对照组</sub>)×100%。根据融合抑制率按照 Reed-Muench 法算出 EC<sub>50</sub>(50% effective concentration,为抑制合胞体形成达 50% 时药物的质量浓度,  $\rho_{EC50}$  /  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。选择指数(selectivity index, SI)为 CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> 的比值。

1.2.5 MTT 试验检测药物和药物血清对 HIV-1 致感染细胞死亡保护作用 and P24 抗原检测 上述融合细胞计数后 37℃ 再培养 48~72 h,离心 96 孔细胞培养板,吸取细胞培养上清进行 p24 抗原检测(按试剂盒说明书进行),细胞沉淀做 MTT 检测。HIV-1 体外感染 MT-2 细胞后,在一定的时间内(5~7 d),HIV 感染细胞会死亡。用 MTT 方法测定存活细胞,酶标仪测定吸光度(OD)值。待测药物与其

共培养,如果抑制了细胞的死亡,活细胞数增加,或使 p24 抗原表达下降均说明该药物具有抗 HIV 活性。p24 抗原抑制率=[1-(实验组 OD 值/病毒对照组 OD 值)]。

$$\text{保护率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{病毒对照组 OD 值}}{\text{MT2 细胞对照组 OD 值} - \text{病毒对照组 OD 值}}$$

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS10 统计软件对数据进行成组 t 检验和 ANOVA 分析,结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,检验水准设  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 药物和药物血清对细胞的毒性测定

双黄连粉针剂对 MT-2 细胞和 H9/HIV-1 B 细胞  $CC_{50}$  均大于 1 000  $\mu\text{g/mL}$ 。药物血清含量在 20% 范围以下显示对细胞无明显的毒性作用。

### 2.2 细胞和病毒培养

H9/HIV-1 B 细胞整合有 HIV-1 B, 通常状态下,呈慢性整合感染状态,病毒较少释放出来,细胞表面可表达病毒蛋白。H9/HIV-1 B 细胞呈圆形或不规则形,体积较小,细胞之间无融合出现。MT-2 细胞呈半贴壁生长,绝大部分为圆形或椭圆形,少数呈不规则状,体积较大,有极少数的大细胞存在。MT-2 细胞具有 CD4 受体。H9/HIV-1 B 和 MT-2 细胞混合后会融合成巨细胞病变(cytopathic effect, CPE)(图 1A,C,D)。

### 2.3 双黄连药物和药物血清对 HIV-1 引起的细胞融合影响

在荧光显微镜下观察 H9/HIV-1 B 被 Calcein-AM 染色后,能发出较强的绿色均匀荧光,体积较小(图 1B)。单独的 MT-2 细胞没有染色不能发出荧光。H9/HIV-1 B 和 MT-2 细胞共同孵育 2 h 后,如发生融合,则 MT-2 与 H9/HIV-1 B 融合细胞能发出荧光,但荧光强度弱于未融合的 H9/HIV-1 B 细胞(荧光素扩散到两个细胞),细胞体积较大且不规则,因此很易区分融合和未融合细胞(图 1C,D)。表 1 显示双黄连药物能够较明显抑制 H9/HIV-1 B 细胞和 MT-2 细胞形成合胞体,其  $p_{EC_{50}} = 3.18 \mu\text{g/mL}$ ,选择指数 SI 大于 314.5。AZT 抑制细胞融合不明显,250  $\mu\text{g/mL}$  的 AZT 仍然可导致多数的细胞融合(表 1)。双黄连药物血清也有轻度的抑制作用,但效果不如药物的直接作用明

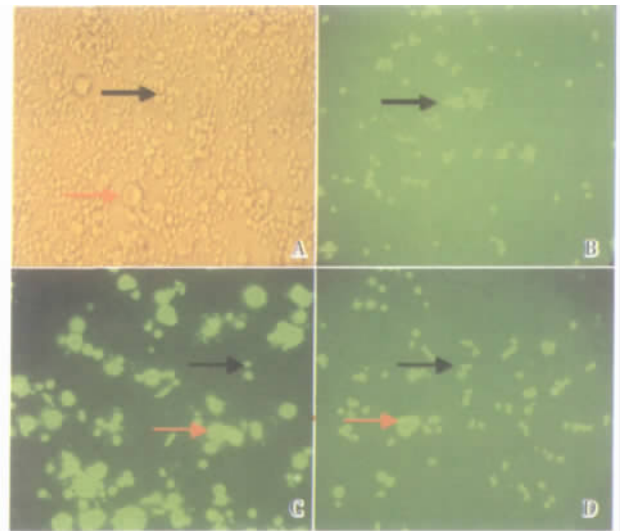


图 1 H9/HIV-1 B 与 MT-2 细胞融合

Fig. 1 The fusion between the H9/HIV-1 B and MT-2 cells (fused cells measured about two or more times by size of cell ( $\times 250$ ))

Black arrow: unfused cell; Red arrow: fused cell. A: H9/HIV-1 B and MT-2 fused and unfused cells (unlabelled); B: H9/HIV-1 B cells (labeled with Calcein-AM); C: H9/HIV-1 B and MT-2 cells (control group, labeled with Calcein-AM, showing a lot of fused cells); D: SHL injection inhibit fused cell

显(图 2A)。

### 2.4 药物及药物血清对 HIV-1 致感染细胞死亡的保护作用和 P24 抗原影响

由表 1 可见 AZT 和双黄连均能保护 HIV-1 致感染细胞死亡和抑制 p24 抗原表达。双黄连抑制感染细胞死亡和抑制 p24 抗原表达的  $EC_{50}$  分别为 10.59  $\mu\text{g/mL}$  和 23.29  $\mu\text{g/mL}$ ,SI 分别大于 94.43 和 42.9。双黄连药物血清也能对抗 HIV 感染细胞的死亡和减少 p24 抗原的表达,其作用与正常生理盐水血清组比较差异具有统计学意义。

## 3 讨论

双黄连是临床常用的中成药,其成分主要由金银花、黄芩、连翘三味中药组成。金银花、连翘为清热解毒药,黄芩为清热燥湿药,三者合用具有表里双解、气血两清之功效,显示较强的广谱抗病毒作用<sup>[6]</sup>。本实验表明,双黄连在一定浓度范围内(8~200  $\mu\text{g/mL}$ )对 HIV-1 病毒具有较显著的抵抗作用,表现双黄连粉针剂不但能抑制 MT-2 和 H9/HIV-1 B 融合,减少 MT-2 细胞病变,而且能够保护 HIV-1 感染细胞的死亡,减少 HIV-1 p24 抗原

表 1 双黄连粉针剂和 AZT 药物体外抗 HIV-1 作用

Table 1 Inhibitory effect of SHL injection and AZT on HIV-1 infection in vitro

( $\bar{x} \pm s$ )

Drug concentration ( $\rho_{\beta}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	CPE		MTT		p24 antigen	
	fused cell count	( fused inhibition%)	OD value	( protective rate%)	OD value	( p24 antigen inhibition%)
<b>Shuanghuanglian</b>						
200	0.57	$\pm 0.73$ ( 98 )	1.09	$\pm 0.05$ ( 83 )	0.70	$\pm 0.03$ ( 59 )
40	3.71	$\pm 0.88$ ( 84 )	0.99	$\pm 0.04$ ( 60 )	0.80	$\pm 0.04$ ( 53 )
8	6.57	$\pm 2.32$ ( 72 )	0.96	$\pm 0.05$ ( 52 )	0.94	$\pm 0.04$ ( 45 )
1.6	15.86	$\pm 4.70$ ( 33 )	0.88	$\pm 0.04$ ( 33 )	1.31	$\pm 0.04$ ( 23 )
0.32	18.71	$\pm 2.31$ ( 21 )	0.74	$\pm 0.03$ ( 3 )	1.52	$\pm 0.05$ ( 10 )
<b>AZT control</b>						
250	21.17	$\pm 1.60$ ( 8 )	1.08	$\pm 0.06$ ( 82 )	0.71	$\pm 0.04$ ( 58 )
25	19.0	$\pm 2.37$ ( 18 )	0.99	$\pm 0.05$ ( 60 )	0.65	$\pm 0.04$ ( 61 )
2.5	19.67	$\pm 2.42$ ( 19 )	0.92	$\pm 0.04$ ( 45 )	0.79	$\pm 0.05$ ( 54 )
0.25	19.17	$\pm 2.98$ ( 17 )	0.89	$\pm 0.04$ ( 37 )	0.82	$\pm 0.04$ ( 52 )
0.025	20.67	$\pm 1.86$ ( 13 )	0.75	$\pm 0.04$ ( 9 )	1.03	$\pm 0.03$ ( 39 )
<b>Virus control</b>						
	23.71	$\pm 2.29$ ( 0 )	0.72	$\pm 0.04$ ( 0 )	1.70	$\pm 0.04$ ( 0.00 )
<b>Cell control</b>						
	0		1.16	$\pm 0.04$ ( 100 )		

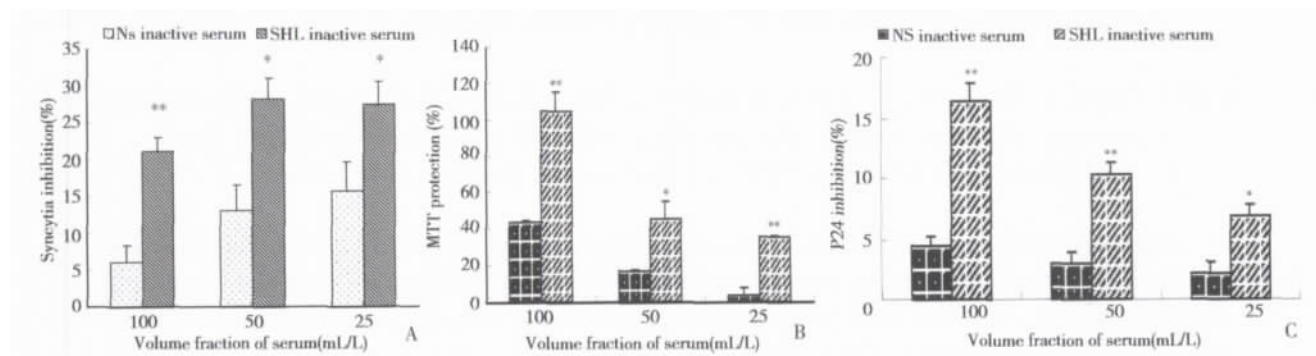


图 2 双黄连(SHL)药物血清和生理盐水(NS)对照血清抗 HIV-1 感染作用

Fig. 2 Effects of the inactive serum of SHL and NS on HIV-1 infection

A: Inhibition (%) of HIV-1 inducing MT-2 syncytia formation; B: Protection (%) of HIV-1 infected cells from death; C: Inhibition (%) of p24 antigen expression. \*\*P 0.01, \* P 0.05 compared with NS serum control

的表达。

中药含药血清的药理研究方法是近十余年来出现的一种较为符合中药特点的体外实验方法。应用中药含药血清进行中药及其复方的药理研究,其实验结果和整体药效具有一致性,能够克服中药粗提物进行体外实验对实验结果的干扰,比较接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程,因此用含药物血清进行的体外实验在一定程度上能够反映整体给药的效果。但正常血清中固有的酶、抗体、补体及其它生物活性物质,它们对体外培养的细胞、病毒会产生影响而干扰实验结果。血清经 56℃, 30 min 水浴灭活后可减少其干扰作用,并且不影响在灭活前所表现的有效作用

点,但血清灭活后对病毒致细胞病变的抑制作用明显降低<sup>[9]</sup>。本研究是在发现双黄连粉针剂具有显著抑制 HIV-1 病毒基础上,按照文献[10]方法制备双黄连粉针剂的药物血清和生理盐水阴性对照血清,血清经 56℃, 30 min 灭活后再进行 HIV-1 的抗病毒作用研究。结果发现双黄连药物血清也同样具有抗 HIV-1 的作用。但双黄连药物血清的作用相对较弱,分析其原因很可能是血清被灭活后药效降低所致。本研究结果为双黄连用于艾滋病的治疗和预防提供了较为直接的依据,而且双黄连的价格便宜,毒副作用低,所以值得在临床上特别是那些艾滋病的高发区推广试验性应用。

(下转第 156 页 to page 156)

血管内皮生长因子(VEGF)是目前已知的最强的血管增生刺激因子。研究发现肿瘤细胞比相应的正常组织高表达 VEGF,且高表达 VEGF 的肿瘤组织生长速度快,易发生转移<sup>[9]</sup>。本结果显示高表达 VEGF 的胃癌组织中微血管密度高,易于发生淋巴结和血道转移。提示 VEGF 可能通过刺激胃癌组织内血管增生而促进胃癌细胞转移。

肿瘤组织和正常组织中的血管增生相似,受二个相互制约的平衡系统调控:一是血管增生抑制因子,如 PEDF 等,二是血管增生刺激因子,如 VEGF 等。肿瘤组织内微血管密度是这二个系统作用的结果。本研究见胃癌组织内微血管密度高于其相应的正常胃黏膜,癌组织内 VEGF 的表达高于正常黏膜,PEDF 的表达低于正常黏膜。这可以推测胃黏膜上皮在癌变过程中,促进了血管增生刺激因子 VEGF 基因表达,抑制了血管增生抑制因子 PEDF 基因表达,从而打破了原先存在于正常胃黏膜组织中调控血管增生的平衡系统。胃癌组织中微血管密度的增加正是这种平衡被破坏的结果。新生血管的形成不仅给癌细胞带来了丰富的营养,且增加了癌细胞进入血管和淋巴管的机会,促进转移发生。

#### 参考文献:

- [1] DAWSON D W, VOLPERT O V, GILLIS P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5425):245- 248.
- [2] 方建晨, 邵春奎, 苏祖兰. 色素上皮源性因子与肿瘤[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(3):

283- 285.

- [3] DOLL J A, STELLMACH V M, BOUCK N P, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6):774- 780.
- [4] CRAWFORD S E, STELLMACH V, RANALLI M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(24): 4421- 4428.
- [5] GUAN M, YAM H F, SU B, et al. Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(4):277- 282.
- [6] QUAN G M, OJAIMI J, NADESAPILLAI A P, et al. Resistance of epiphyseal cartilage to invasion by osteosarcoma is likely to be due to expression of antiangiogenic factors[J]. *Pathobiology*, 2003, 70(6): 361- 367.
- [7] VOLPERT O V, ZAICHUK T, ZHOU W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4):349- 357.
- [8] ABRAMSON L P, STELLMACH V, DOLL J A, et al. Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model [J]. *J Pediatr Surg*, 2003, 38(3):336- 342.
- [9] STOELTZING O, ELLIS L M. Regulators of vascular endothelial growth factor expression in cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2004, 119:33- 58.

(编辑 黄小延)

(上接第 147 页 from page 147)

#### 参考文献:

- [1] WATTS J. China faces up to HIV/AIDS epidemic [J]. *Lancet*, 2003, 362(9400): 1983.
- [2] WALKER N, GRASSLY N C, GARNETT G P, et al. Estimating the global burden of HIV/AIDS: what do we really know about the HIV pandemic? [J]. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2180- 2185.
- [3] AINSWORTH M, TEOKUL W. Breaking the silence: setting realistic priorities for AIDS control in less-developed countries [J]. *Lancet*, 2000, 356(9223): 55- 60.
- [4] TANG J W, PILLAY D. Transmission of HIV-1 drug resistance [J]. *J Clin Virol*, 2004, 30(1): 1- 10.
- [5] JOHNSON M O, CHARLEBOIS E, MORIN S F, et al. Perceived adverse effects of antiretroviral therapy [J]. *J*

Pain Symptom Manage, 2005, 29(2): 193- 205.

- [6] 易世红, 王放, 王丽萍, 等. 双黄连粉针剂体外抗病毒药效学研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 2001, 27(5): 490- 492.
- [7] 张妍玲, 张涛源, 陈集双. 双黄连粉针剂治疗艾滋病的临床观察[J]. *山西医科大学学报*, 1999, 30(2): 177- 179.
- [8] RUDI P, JAN B, MASANORI B, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds [J]. *J Virol Meth*, 1988, 20(4):309- 321.
- [9] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理学方法学探讨- [J]. *中国实验方剂学杂志*, 1999, 5(3): 36- 37.
- [10] 张军平, 张伯礼, 山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. *天津中医药*, 2004, 21(4): 274- 276.

(编辑 张敏瑞)