

◇ 中药复方药物药理学 ◇

中药有效部位复方奇士乐体外抗 HIV-1 活性研究

杨柳萌¹, 王睿睿¹, 张高红¹, 张兴杰^{1,3}, 陈纪军², 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. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2011.04.029

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)04-0566-06

中国图书分类号: R284.1; R329.25; R373.51; R512.910.22; R512.910.531

摘要:目的 评价有效部位复方奇士乐(QSL)的体外抗 HIV-1 药理学。方法 通过合胞体抑制、HIV-1 感染细胞保护、HIV-1 p24 抗原测定等方法检测急性感染中 QSL 对 HIV-1 实验株、临床分离株、耐药株的抑制作用和对慢性感染细胞中病毒复制的影响;通过 ELISA 方法和荧光法分别检测了 QSL 体外抑制 HIV-1 逆转录酶和蛋白酶活性作用。结果 有效部位复方制剂 QSL 能有效地抑制 HIV-1_{III_B} 诱导淋巴细胞病变、保护 HIV-1_{III_B} 感染 MT-4 细胞死亡、阻断 HIV-1_{III_B} 慢性感染 H9 细胞与 C8166 细胞间融合的作用。QSL 对 HIV-1 实验株 HIV-1_{III_B}、临床分离株 HIV-1_{KM018}、耐药株 HIV-1_{74V} 的病毒复制也有较好的抑制作用。QSL 抑制 HIV 活性的作用机制可能为多靶点,主要是抑制 HIV 逆转录酶、蛋白酶和病毒进入细胞。结论 QSL 是具有较好体外抗 HIV-1 活性的中药有效部位复方。

关键词: 中药;有效部分;复方;奇士乐;艾滋病;HIV-1;抗 HIV-1

获得性免疫缺陷综合征(AIDS),又称为艾滋病,是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的一种致死传染性疾病。由 FDA 批准临床使用的多种抗 HIV 药物配伍组成的高效抗逆转录病毒疗法(HAART,即“鸡尾酒疗法”)治疗 AIDS,延长了 HIV 感染者寿命,提高了患者生活质量,但存在治疗价格贵、毒副作用大、服药繁琐、不能清除体内病毒和易产生耐药

病毒株等不足。因此需要不断地创制出新的高效、低毒、价廉的抗 HIV 药物和寻找抗 HIV 作用的新靶点。这些抗 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。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,目前我国仿制生产的少数几种国外专利过期抗 HIV 药物仅可组成极少几套 HAART 疗法,而且药物毒性较大。研发具有自主知识产权、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。

从传统中药和天然资源中寻找新的抗 HIV 药物或先导化合物的研究,是国内外新药研制中非常活跃的领域,也应是我国近期创制新药的一条捷径和制高点。研究人员开展了大量中医药治疗艾滋病的基础和临床研究。临床实验表明中药在稳定和提高免疫功能、消除和缓解症状、改善生活质量方面具有较好的效果,但对于降低病毒载量的作用有限。中药具有起效慢,作用平和而持久,毒副作用较小,价格便宜,适合国情,依从性好,能够长期服用等特点。目前已经筛选发现近百种中药具有抗 HIV 活性成分,它们作用于 HIV 不同的靶点^[1-6]。

传统中药和药用植物来源的天然化合物具有结构多样性、毒性较低等特点,因而在防治艾滋病方面有着独特的优势和巨大的潜力。我们曾对一些传统中药的有效部位或成分进行了抗 HIV 活性筛选和研究,在前期研究工作基础上试图开展抗 HIV 有效部位复方制剂的研发。奇士乐(QSL)是由娑罗子、姜黄、灯盏花、甘草、黄芪和人参等 6 味中药有效部位复合而成的中药有效部位复方制剂。姜辉等^[7-9]曾研究发现 QSL 对佐剂性关节炎大鼠紊乱的免疫功能具有调节作用,对免疫性肝损伤小鼠也具有保护作用。本文对 QSL 体外抗 HIV-1 实验株、临床分离株、耐药株的活性及作用机制进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 药物

QSL 由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室

收稿日期:2011-01-05,修回日期:2011-02-18

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No 2009CB522306); 国家科技重大专项“十一五”计划(No 2009ZX09501-029,2008ZX10005-005,2009ZX09103-414); 中国科学院知识创新工程重要方向资助课题(No KSCX2-YW-R-185)

作者简介:杨柳萌(1976-),女,硕士,助理研究员,研究方向:抗病毒药理学,E-mail:lmyang@mail.kiz.ac.cn;

郑永唐(1962-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:病毒免疫学和抗病毒药理学,通讯作者, Tel/Fax: 0871-5195684, E-mail:zhengyt@mail.kiz.ac.cn

提供,批号为:20050406。样品溶解于DMSO中,分装后4℃避光保存。齐多夫定(AZT,3'-Azido-3'-deoxythymidine)购自Sigma公司,恩夫韦肽(Enfuvirtide, T-20)为Roche公司产品。化合物溶解于完全培养基中,0.22 μm过滤除菌,分装后-20℃保存。

1.2 试剂 SDS (sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠)、MTT (3, (4, 5-dimethylthiazol-2-yl, 噻唑蓝)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)、DMF (N, N'-dimethyl formamine, N, N'-二甲基甲酰胺)、Triton X-100、PHA-P、牛血清白蛋白、抗 IgG Fc 抗体均购自Sigma公司;RPMI 1640 和新生小牛血清为Gibco公司产品;抗 HIV-1 p24 单克隆抗体和兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体由本实验室制备^[10]。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体购自华美生物工程公司。IL-2 (白细胞介素-2)购自上海华新生物高技术有限公司。

1.3 细胞与病毒 人 T 淋巴细胞系 H9 细胞、C8166 细胞、MT-4 细胞和 HIV-1_{III_B}/H9 细胞均由英国 MRC, AIDS Reagent Project 惠赠,以上细胞均为悬浮细胞。人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)自健康献血员浓缩白细胞中分离。细胞按常规方法进行复苏和传代,使所用细胞处于对数生长期。HIV-1 实验株 HIV-1_{III_B} 和 HIV-1 耐药株 HIV-1_{74V} (抗 ddI 和 ddC 株)由英国 MRC, AIDS Reagent Project 惠赠。HIV-1 临床分离株 HIV-1_{KM018} 由本实验室自云南省昆明市 HIV/AIDS 患者体内分离培养^[11]。HIV-1 病毒培养和滴定按常规方法进行。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进行。

2 方法

2.1 细胞毒性

2.1.1 药物对人 T 淋巴细胞系和 H9/HIV-1_{III_B} 慢性感染细胞的细胞毒性 按文献用 MTT 法检测药物对细胞的毒性^[12]。将 4×10^5 个细胞悬液接种到含有 5 倍稀释化合物的 96 孔细胞培养板上,每个稀释度 3 个重复孔,同时设置不含药物的对照和阳性药物对照。培养 3 d 后,用 MTT 法以 ELx800 酶标仪测定 OD_{595/630 nm} 值,计算 CC₅₀ 值(50% cytotoxic concentration),即对 50% 的细胞产生毒性时的化合物浓度。

2.1.2 药物对 PBMC 的细胞毒性 将 5.5×10^6 个 PHA-P 刺激转化的 PBMC 接种到含有 5 倍稀释药物的 96 孔细胞培养板上培养, d 4 每孔补加 100 μl 含有 IL-2 的新鲜完全细胞培养基,继续培养 3 d 后用 MTT 法测定细胞活性^[12],计算 CC₅₀ 值。

2.2 体外抗 HIV-1 活性

2.2.1 药物对实验株 HIV-1_{III_B} 致细胞病变(CPE)的抑制实验 将 $8 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ C8166 细胞 50 μl/孔接种到含有 100 μl/孔倍比稀释药物的 96 孔细胞培养板上,然后加入 50 μl 的 HIV-1_{III_B} 稀释上清,1 300 TCID₅₀/孔。设 3 个重复孔。同时设置不含药物的正常细胞对照和 AZT 阳性药物对照。37℃, 5% CO₂ 培养 3 d,倒置显微镜下(100×)计数合胞体的形成,计算抑制率和 EC₅₀。CPE 抑制率/% = (1 - 实验孔合胞体数/对照孔合胞体数) × 100%。EC₅₀ (50% effective concentration) 为抑制合胞体形成 50% 时的药物浓度^[13]。

2.2.2 药物对实验株 HIV-1_{III_B} 急性感染 C8166 细胞中病毒复制的抑制实验 将 $8 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ C8166 细胞 50 μl/孔接种到含有 100 μl/孔倍比稀释药物的 96 孔板上,然后加入 50 μl 的 HIV-1 稀释上清,1 300 TCID₅₀/孔,设置 3 个重复孔。同时设置不含药物的对照孔和 AZT 阳性药物对照。培养 3 d 后离心收集培养上清, TritonX-100 灭活。p24 抗原 ELISA 方法检测药物对 HIV-1 复制的抑制作用^[14], 计算抗原表达抑制率和 EC₅₀。HIV-1 p24 抗原表达的抑制率/% = (1 - 实验孔 OD 值/对照孔 OD 值) × 100%

2.2.3 药物对实验株 HIV-1_{III_B} 感染 MT-4 细胞死亡的保护实验 HIV-1_{III_B} 的感染复数(MOI)为 0.3。37℃, 5% CO₂ 培养, 6 d 后用 MTT 法测定 MT-4 细胞的存活率。用 ELx800 酶标仪测定 A_{595/630nm} 值。计算药物对细胞生长的抑制率、对 HIV-1_{III_B} 感染细胞的保护率和治疗指数(therapeutic index, TI)^[15]。药物对 HIV-1 感染细胞的保护率/% = (实验孔 OD 值 - HIV 感染细胞对照孔 OD 值)/(正常细胞对照孔 OD 值 - HIV 感染细胞对照孔 OD 值) × 100%。TI = CC₅₀/EC₅₀。

2.2.4 药物对慢性感染 H9/HIV-1_{III_B} 细胞中 HIV-1 复制的抑制实验 按文献所述方法进行^[15]。将待测药物在 96 孔微量培养板上用完全培养基进行倍比稀释,每个稀释度设 3 孔,每孔 100 μl。同时设置不含药物的对照孔和 AZT 阳性对照药物。每孔滴加 $4 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ 慢性感染细胞 HIV-1_{III_B}/H9 细胞 100 μl。培养 4 d 后离心收集上清并 Triton X-100 灭活。ELISA 方法测定 HIV-1 p24 抗原水平。

2.2.5 药物对临床分离株 HIV-1_{KM018} 急性感染 PBMC 中病毒复制的抑制实验 按文献所述方法进行^[11]。HIV-1_{KM018} 感染复数为 0.07。培养 d 4 每孔补加 100 μl 含 IL-2 新鲜完全细胞培养基, d 7 离心

收集上清, TritonX-100 裂解灭活。ELISA 方法测定 HIV-1 p24 抗原水平。计算出药物对 HIV-1_{KM018} 在 PBMC 中复制表达 p24 抗原的抑制率和 EC₅₀, 即抑制 50% HIV-1 p24 抗原表达的药物浓度。

2.2.6 药物对 HIV-1 耐药株 HIV-1_{74V} 在 C8166 细胞中复制的抑制实验 用 HIV-1 耐药株 HIV-1_{74V} 贮存液感染 C8166 细胞(MOI = 0.16)。离心洗涤去除游离 HIV 病毒后, 以完全培养基调细胞浓度至 $3 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ 。在 96 孔细胞培养板上, 将 100 μl HIV-1_{74V} 感染细胞悬液(3×10^4 个)与 100 μl 不同稀释浓度的药物混合。培养 4 d 后收集上清, Triton X-100 裂解病毒, ELISA 方法测定 HIV-1 p24 抗原水平。计算出药物对 HIV-1_{74V} 在 C8166 细胞中复制表达 p24 抗原的抑制率和 EC₅₀, 即抑制 50% HIV-1 p24 抗原表达的药物浓度^[11]。

2.2.7 药物对 HIV-1 慢性感染细胞与正常细胞间融合的阻断实验 在 96 孔细胞培养板上, 将待测药物倍比稀释, 每孔 100 μl 。同时设置不含药物的阳性对照孔和 T20 阳性药物对照。每孔滴加 50 μl $6 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ C8166 细胞和 50 μl $2 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ 的 HIV-1 慢性感染 H9/HIV-1_{IIIb} 细胞。37℃, 5% CO₂ 培养 24 h, 在显微镜下计数合胞体数并计算 EC₅₀^[14]。

2.3 药物对 HIV-1 酶的体外抑制活性

2.3.1 药物对 HIV-1 重组逆转录酶活性的抑制实验 Reverse Transcriptase Assay, non-radioactive 试剂盒购自 Roche 公司。每孔加入 HIV-1 RT、稀释药物和反应混合液各 20 μl , 混匀后 37℃ 反应 2 h。设置不含化合物的阳性对照孔及空白对照孔, 阳性对照化合物为 PFA。洗液洗涤后每孔加入偶联抗-地高辛-过氧化物酶(anti-DIG-POD) 200 μl , 37℃ 反应 1 h。洗涤后每孔加 200 μl ABTS 底物反应液, 37℃ 室温反应, ELx800 酶标仪测定 A_{405/490 nm} 值^[15]。

2.3.2 药物对 HIV-1 蛋白酶活性的抑制实验 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荧光的强度来检测蛋白酶切割反应的情况^[16]。实验使用 Enzolyte™ HIV-1 蛋白酶试剂盒(ANASPEC): 在 96 孔板上, 每孔分别加入蛋白酶溶液、待测药物及对照药物, 充分混匀, 30℃ 温育 15 min。然后加入底物工作液, 混匀 30s。在荧光酶标仪上读取荧光值, 0、30、60、45、90 min 各读取 1 次, 计算抑制率(%)^[17]。

3 结果

3.1 QSL 的细胞毒性作用 MTT 方法测定 QSL 对

C8166、MT-4、PBMC 和 HIV-1_{IIIb}/H9 等 4 种细胞的体外毒性作用。结果表明, QSL 对 C8166、MT-4、PBMC 和 HIV-1_{IIIb}/H9 的体外细胞毒性作用 CC₅₀ 分别为 165.96、105.87、122.10 和 92.66 mg · L⁻¹ (Fig 1)。

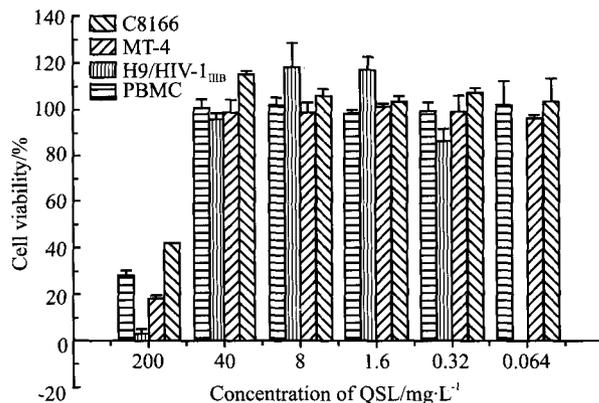


Fig 1 Cytotoxicities of QSL

3.2 QSL 的体外抗 HIV-1 活性研究

3.2.1 QSL 抗 HIV-1 实验株 HIV-1_{IIIb} 的活性作用

QSL 对 HIV-1_{IIIb} 诱导 C8166 细胞形成合胞体有较好的抑制作用, 其 EC₅₀ 为 3.55 mg · L⁻¹, TI 值为 44.65 (Fig 2A); QSL 对 HIV-1_{IIIb} 急性感染 C8166 细胞抑制 HIV-1 p24 抗原表达水平的 EC₅₀ 为 80.32 mg · L⁻¹, TI 值为 2.07 (Fig 2B); QSL 对正常 MT-4 细胞的毒性作用的 CC₅₀ 为 103.07 mg · L⁻¹, 对感染细胞的保护率的 EC₅₀ 为 18.77 mg · L⁻¹, TI 值为 5.49, 可见 QSL 对体外感染 MT-4 有一定的保护作用 (Fig 2C)。QSL 对 HIV-1_{IIIb} 慢性感染 H9 细胞 p24 抗原表达的抑制作用 EC₅₀ 大于 200 mg · L⁻¹ (Fig 2D), 表明 QSL 作用于病毒复制周期的早期。

阳性对照药物 AZT 抑制 HIV-1_{IIIb} 诱导 C8166 细胞形成合胞体和对 HIV-1_{IIIb} 急性感染 C8166 细胞抑制 HIV-1 p24 抗原表达水平的 EC₅₀ 则分别为 0.0034 mg · L⁻¹ 和 0.041 mg · L⁻¹, TI 值分别为 363 617 和 29 324; AZT 对 HIV-1_{IIIb} 感染 MT-4 细胞保护率的 EC₅₀ 为 0.0005 mg · L⁻¹, TI 值大于 2 000; AZT 对 HIV-1_{IIIb} 慢性感染 H9 细胞 p24 抗原表达的抑制作用的 EC₅₀ > 200 mg · L⁻¹。

3.2.2 QSL 抗 HIV-1 临床分离株 HIV-1_{KM018} 的活性作用

QSL 对临床分离株 HIV-1_{KM018} 急性感染 C8166 细胞 p24 抗原表达抑制作用的 EC₅₀ 为 7.21 mg · L⁻¹, TI 值为 10.24。阳性对照药物 AZT 的 EC₅₀ 则为 0.072 mg · L⁻¹, TI 值为 7 203。QSL 对 HIV-1 临床分离株感染细胞的复制有较好的抑制作用 (Fig 3)。

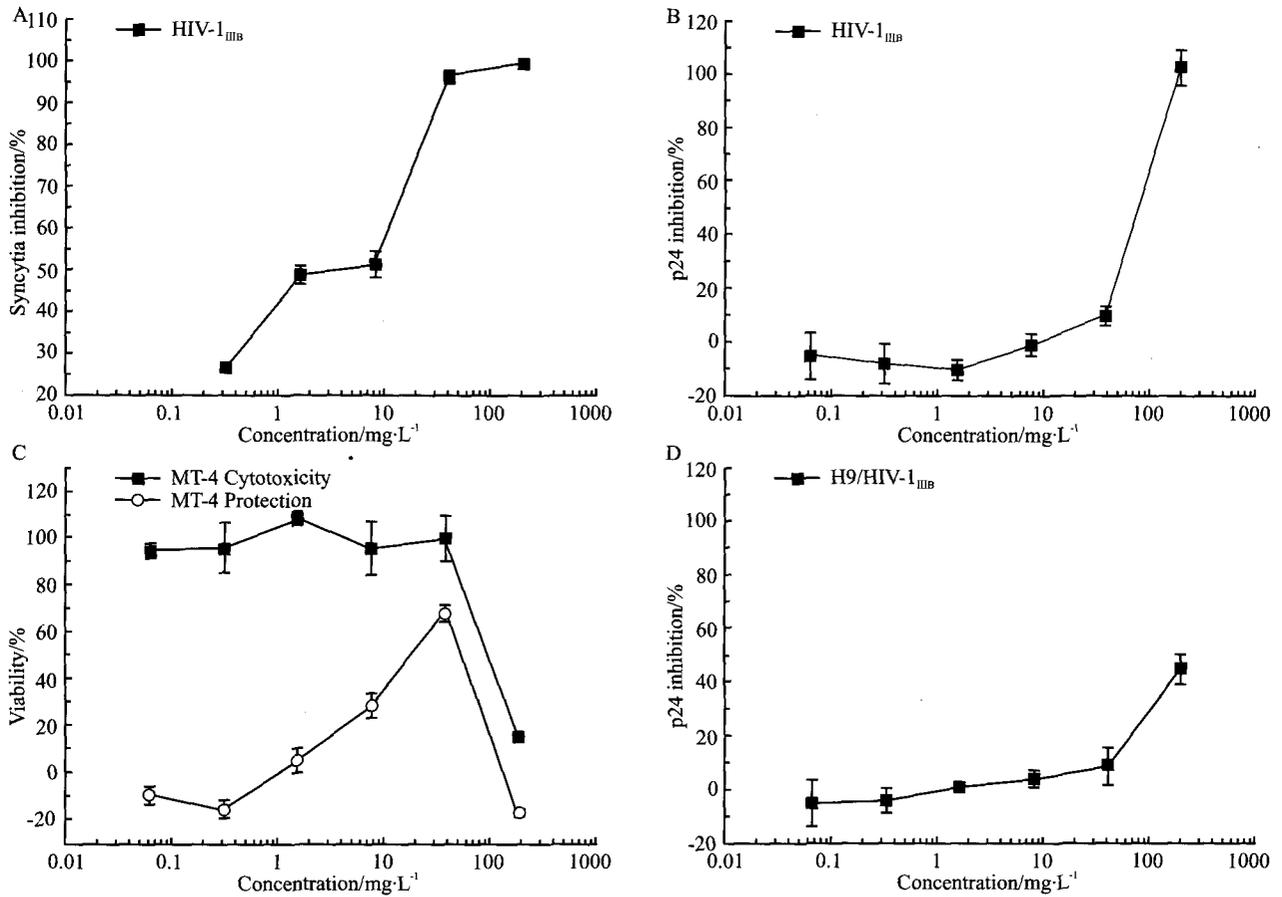


Fig 2 Anti-HIV-1_{MB} activities of QSL in vitro

A. Inhibition of HIV-1 induced syncytium formation; B. Inhibition of HIV-1 p24 antigen in acute infection; C. Protection of HIV-1 induced MT-4 cells lytic effects; D. Inhibition of HIV-1 p24 antigen in chronically infected H9 cells.

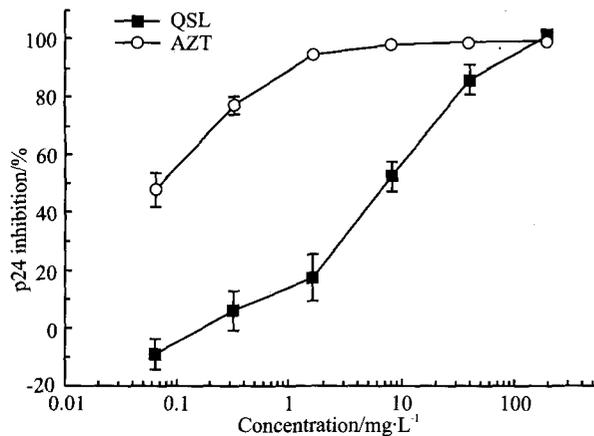


Fig 3 Inhibition of QSL on the clinical strain HIV-1_{KM018} replication in PBMCs

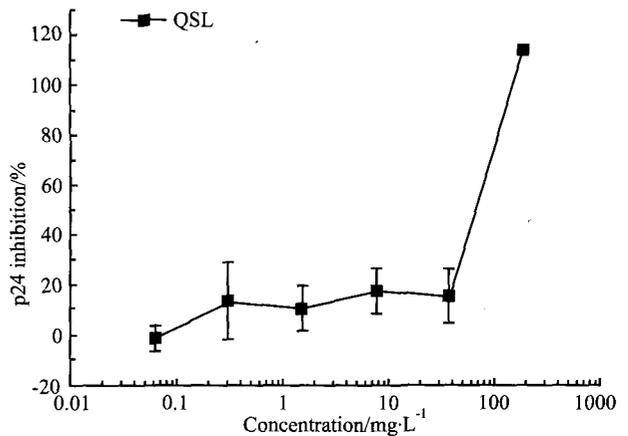


Fig 4 Inhibition of QSL on the drug resistant strain HIV-1_{74V} replication in C8166 cells

3.2.3 QSL 对耐药株 HIV-1_{74V} 急性感染 C8166 细胞中病毒复制的抑制作用 QSL 对耐药株 HIV-1_{74V} 感染 C8166 细胞的 p24 抗原表达抑制作用的 EC₅₀ 为 70.50 mg·L⁻¹, TI 值为 2.35 (Fig 4), 表明 QSL 对 HIV-1 耐药株感染细胞的病毒复制仍有一定抑制作用。阳性对照药物的 EC₅₀ 为 1.16 mg·L⁻¹, 敏感性降低了 24.4 倍。

3.3 QSL 抗 HIV-1 作用机制研究

3.3.1 QSL 对 HIV-1 慢性感染细胞与正常细胞间融合的阻断作用 QSL 阻断 HIV-1 慢性感染细胞与正常 T 淋巴细胞 C8166 融合的 EC₅₀ 为 14.86 mg·L⁻¹, 表明 QSL 对病毒进入细胞有较好的阻断作用; 阳性对照药物 T-20 的 EC₅₀ 为 0.045 mg·L⁻¹ (Fig 5)。

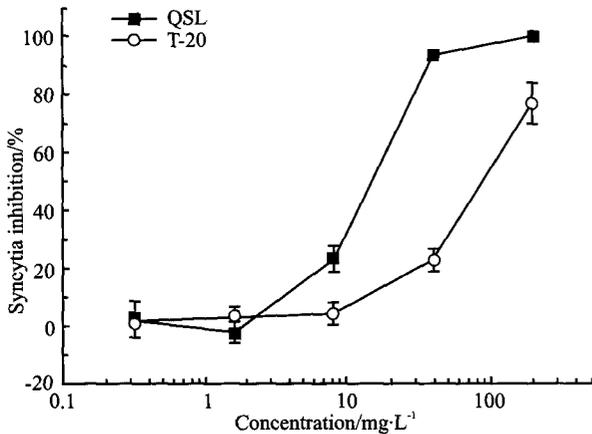


Fig 5 Inhibition of QSL on fusion between normal C8166 cells and HIV-1_{MB} chronically infected H9 cells

3.3.2 QSL 对重组 HIV-1 逆转录酶和蛋白酶的抑制作用 QSL 对重组 HIV-1 逆转录酶抑制作用的 EC₅₀ 为 171.13 mg · L⁻¹ (Fig 6)。QSL 在 200 mg · L⁻¹ 时对重组 HIV-1 蛋白酶活性的抑制率为 (68.25 ± 8.42) %，表明 QSL 在高浓度下对 HIV-1 逆转录酶和蛋白酶有一定的抑制作用。

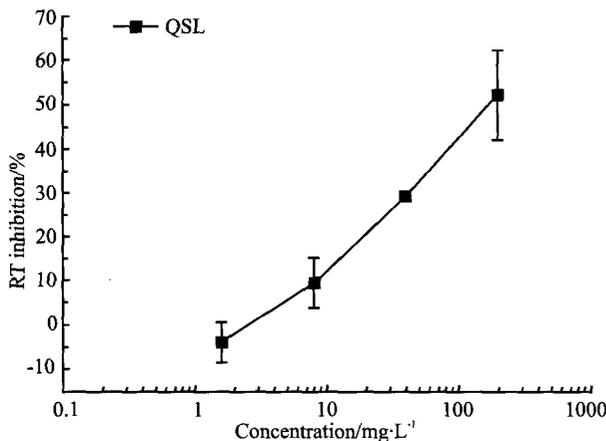


Fig 6 Inhibition of QSL on recombinant HIV-1 reverse transcriptase activity

4 讨论

中药在稳定和提高免疫功能、消除和缓解症状、改善生活质量方面具有较好的效果，而且具有作用平和持久，毒副作用较小，价格便宜，依从性好，能够长期服用等特点。传统中药和药用植物在防治艾滋病方面有着独特的优势和潜力。传统中药和药用植物来源的天然化合物具有结构多样性，筛选发现许多中药和天然生物资源的植物、动物、真菌和微生物等含有抗 HIV 活性组分或化合物，它们作用于 HIV 不同的靶点，在细胞水平也显示出抗 HIV 活性^[1,6]。我国在上世纪 80 年代中期即开展了中药治疗艾滋病的研究和临床实践应用。至今有复方 SH、艾宁颗

粒、复方三黄散、克艾特、爱可扶正片、乾坤宁、喘可治、艾可清等 10 多种中药复方获得国家食品药品监督管理局 (SFDA) 临床研究批件，其中有多数中药完成了临床研究，取得了一定的效果。但仅有唐草片获得新药证书用于艾滋病的临床治疗。

我们曾对一些传统中药的有效部位或成分进行了抗 HIV 活性筛选和研究^[6]，其中前人和我们均有研究报道娑罗子、姜黄、灯盏花、甘草、黄芪中有抗 HIV 化合物^[11,13]。我们试图开展抗 HIV 有效部位复方制剂的研发，首先我们对娑罗子、姜黄、灯盏花、甘草、黄芪和人参的有效部位进行了体外抗 HIV-1 活性筛选，发现这 6 味中药的有效部位均有不同程度的体外抗 HIV-1 活性，娑罗子、姜黄、灯盏花、甘草、黄芪和人参也有一定的抗 HIV-1_{MB} 活性 (EC₅₀ 分别为 51.54、5.36、15.38、62.05、31.77 和 189.35 mg · L⁻¹)，作用靶点分别为 HIV-1 蛋白酶、整合酶、逆转录酶、病毒进入等。甘草、黄芪和人参还有免疫调节作用。我们将娑罗子、姜黄、灯盏花、甘草、黄芪和人参等 6 味中药有效部位配伍成有效部位复方制剂 QSL。

本文研究了 QSL 体外对 HIV-1 实验株、临床分离株、耐药株的抑制活性，同时也对其作用机制进行了初步研究。结果显示，QSL 能有效抑制 HIV-1_{MB} 诱导淋巴细胞病变，其抑制合胞体形成的 EC₅₀ 为 3.55，治疗指数为 46.8。与这 6 味中药中的任一味的单独有效部位相比较，QSL 的细胞毒性有所降低、抗 HIV-1_{MB} 活性提高，TI 值提高了 9~40 倍左右，表明这些有效部位联合配伍有协同或叠加作用。有效部位复方制剂应该可达到增效减毒的目的，是研发抗 HIV 中药的一条可行途径。QSL 还能保护 HIV-1_{MB} 感染 MT-4 细胞的死亡作用，对 HIV-1 实验株 HIV-1_{MB}、临床分离株 HIV-1_{KM018}、耐药株 HIV-1_{74V} 的病毒复制也有较好的抑制作用。初步机制研究显示，QSL 能阻断 HIV-1_{MB} 慢性感染 H9 细胞与 C8166 细胞间融合的作用，在高浓度下能体外抑制 HIV-1 重组逆转录酶和蛋白酶活性。结果表明：QSL 对 HIV-1 实验株、临床分离株，耐药株均有一定作用，作用机制为多靶点，可能主要是抑制 HIV 逆转录酶、蛋白酶和病毒进入细胞，是具有较好体外抗 HIV-1 活性的中药有效部位复方制剂。

参考文献：

[1] Lam T L, Lam M L, Au T K, et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs[J]. *Life Sci*, 2000, 67(23):2889-96.

- [2] Ma C M, Nakamura N, Miyashiro H, et al. Screening of Chinese and Mongolianherbal drugs for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity[J]. *Phytother Res*, 2002, **6**(2):186-9.
- [3] Ngai P H, Ng T B. A mushroom (Ganoderma capense) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**(4):988-93.
- [4] 王艳艳, 张晓静, 王桂英. 中药单体及复方制剂抗艾滋病的 研究进展[J]. 中医研究, 2004; **17**(6):59-60.
- [4] Wang Y Y, Zhang X J, Wang G Y. Research advances of anti-AIDS compounds and Chinese medicinal formula[J]. *TCM Res*, 2004, **17**(6):59-60.
- [5] Wu J A, Attele A S, Zhang L, Yuan C S. Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development[J]. *Am J Chin Med*, 2001, **29**(1):69-81.
- [6] 张旋, 黄宁, 郑永唐. 我国中药来源的抗 HIV 天然化合物 研究进展[J]. 药学学报, 2010, **45**(2):141-53.
- [6] Zhang X, Huang N, Zheng Y T. Advances in the study of anti-HIV natural compounds derived from traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, **45**(2):141-53.
- [7] 姜辉, 李俊, 胡成穆, 陈纪军. 奇士乐对佐剂性关节炎大鼠 的免疫调节作用[J]. 安徽医科大学学报, 2007, **42**(3):295-8.
- [7] Jiang H, Li J, Hu C M, Chen J J. Immunomodulatory effects of Qishile on adjuvant arthritis rats[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2007, **42**(3):295-8.
- [8] 姜辉, 吴芙蓉, 夏伦祝, 陈纪军. 奇士乐对免疫性肝损伤小鼠 的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, **25**(4):60-2.
- [8] Jiang H, Wu F R, Xia L Z, Chen J J. Effects of Qishile on immunological liver injury in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mat Med*, 2009, **25**(4):60-2.
- [9] 姜辉, 吴芙蓉, 夏伦祝, 陈纪军. 奇士乐对免疫性肝损伤小鼠 的保护作用[J]. 中国中医急症, 2010, **19**(6):990-2.
- [9] Jiang H, Wu F R, Xia L Z, Chen J J. Protective effects of Qishile on immunological liver injury mice[J]. *J Emerg Trad Chin Med*, 2010, **19**(6):990-2.
- [10] 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):203-8.
- [11] Zhang G H, Wang Q, Chen J J, et al. Anti-HIV-1 effect of scutellarin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334**(3):812-6.
- [12] 郑永唐, 贲昆龙. 检测细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. 免疫学杂志, 1992, **8**(4):266-9.
- [12] Zheng Y T, Ben K L. Use of MTT assay for the determination of cell viability and proliferation[J]. *Immunol J*, 1992, **8**(4):266-9.
- [13] Wang Q, Wang Y T, Pu S P, Zheng Y T. Zinc coupling potentiates anti-HIV-1 activity of baicalin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **324**:605-10.
- [14] 龙晶, Sriram D, 张高红, 郑永唐. 两种 AZT-氟喹诺酮偶 联物体外抗 HIV-1 及抗菌活性的研究[J]. 中国药理学通报, 2009, **25**(1):30-4.
- [14] Long J, Sriram D, Zhang G H, Zheng Y T. The anti-HIV-1 and antibacterial activities of two novel AZT-fluoroquinolones conjugates [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2009, **25**(1):30-4.
- [15] 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**:269-73.
- [16] Matayoshi E D, Wang G T, Krafft G A, et al. Novel fluorogenic substrate for assaying retroviral protease by resonance energy transfer [J]. *Science*, 1990, **247**(4945):954-8.
- [17] 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):126-30.
- [17] Wang Y H, Wang R R, Yang L M, et al. Expression and purification of HIV-1 protease and the establishment of a method for protease inhibitor screening[J]. *Virol Sin*, 2006, **21**(2):126-30.

In vitro anti-HIV-1 activities of Qishile, a Chinese medicine effective fraction formula

YANG Liu-meng¹, WANG Rui-rui¹, ZHANG Gao-hong¹, ZHANG Xing-jie^{1,3}, Chen Ji-jun², ZHENG Yong-tang¹

(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences and

Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. State

Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese

Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Aim To evaluate the anti-HIV-1 activities of Qishile (QSL) *in vitro*, a Chinese medicine effective fraction formula. **Methods** The inhibition of syncytia formation induced by HIV-1 was determined under microscopy. The protection of HIV-1 induced MT-4 cell lytic effects was measured by MTT assay. The level of HIV-1 p24 antigen in acute and chronic HIV-1 infection was assayed by ELISA. HIV-1 reverse transcriptase and protease activities *in vitro* were tested by ELISA and FRET, respectively. **Results** QSL markedly inhibited syncytium formation induced by

HIV-1_{III B}, protected HIV-1_{III B} induced MT-4 cell lytic effects and blocked cell-to-cell fusion. It also showed obviously inhibitory effect on the clinical strain HIV-1_{KM018} and drug resistant strain HIV-1_{74V} replication. QSL maybe inhibited HIV-1 replication through multiple targets, including reverse transcriptase, protease and virus entry. **Conclusion** QSL is a Chinese medicine effective fraction formula with potent anti-HIV-1 activities.

Key words: Chinese traditional medicine; effective fraction; formula; qishile; AIDS; HIV-1; anti-HIV-1