维普资讯 http://www.cqvip.com

红花五味子甲素的分离纯化及其抗 HIV-1 活性的研究

田仁荣[1,3]，肖伟烈[2]，杨柳萌[1]，王睿睿[1]，孙汉董[2]，刘乃发[3]，郑永唐[1*]

[1]中国科学院昆明动物研究所分子免疫药理学实验室，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，昆明 650204；
[3]兰州大学生命科学院，兰州 730000

【摘　要】 **目的**：从红花五味子果实中寻找活性代谢产物，研究其抗 HIV-1 活性和作用机制。**方法**：通过合胞体抑制、HIV-1 感染细胞保护、HIV-1 p24 抗原测定、融合阻断、逆转录酶和蛋白酶活性分析等实验，检测分离化合物的抗 HIV-1 活性并探讨其作用机制。**结果**：红花五味子甲素能够抑制病毒诱导的合胞体形成，保护病毒感染细胞，抑制病毒在细胞内的复制。对 HIV-1 感染细胞与正常 CD_4^+ 细胞间的融合，逆转录酶活性有一定的抑制作用。但是红花五味子甲素不抑制病毒在慢性感染细胞中的复制，也不抑制蛋白酶的活性。**结论**：首次从天然产物中分离得到红花五味子甲素，它对 HIV-1 病毒复制早期具有抑制作用。

【关键词】 天然化合物；红花五味子；红花五味子甲素；抗 HIV 药物；HIV-1

【中图分类号】 R284.1，R965　【文献标识码】 A　【文章编号】 1672-3651(2006)01-0040-05

获得性免疫缺陷综合征（Acquired Immunodeficiency Syndrome，AIDS），又称为艾滋病，是由人免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus，HIV）感染引起的，以全身免疫系统严重损害为特征的传染病。自发现 AIDS 以来，药物治疗一直是 HIV/AIDS 防治的重要手段。迄今为止，FDA 批准的抗 HIV 的药物主要有 26 种，均为化学合成药物，分别为病毒进入抑制剂，病毒逆转录酶（Reverse Transcriptase，RT）抑制剂和蛋白酶（Protease，PR）抑制剂。但是由于合成药物的副作用以及价格昂贵等局限性，使得人们寻找更多的抗 HIV 新药。

从天然药物中寻找新的抗 HIV 药物和先导化合物的研究是当前国内外新药研发中的重要方向和非常活跃的领域。目前已经从动物、植物以及微生物中分离得到许多具有抗 HIV-1 活性的化合物，其类型包括生物碱、香豆素、木脂素、醌类、多酚类、黄酮类、萜类、鞣质类、糖类、多肽和蛋白质类[1]。木脂素是一类重要的活性化合物，具有抑制 HIV-1 逆转录酶、整合酶和 HIV-1 转录等多种活性[2-4]。通过对红花五味子果实的化学成分研究，我们首次从天然产物中分离得到一个 3，3′-二羟基-4，4′，5，5′-四甲氧基联苯环辛烯类木脂素（图 1）[5]，并命名为红花五味子甲素。对红花五味子甲素的抗 HIV-1 活性及其作用机制研究发现，该化合物能够抑制 HIV-1 复制的早期阶段，但是不影响病毒复制晚期阶段。

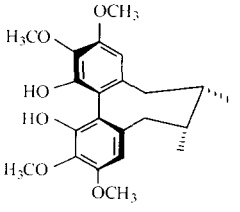


Fig 1　Structure of rubrifloralignan A

1　实验材料

1.1　材料与药物

实验用红花五味子果实采自云南省大村荞山，由李锡文教授鉴定。标本（KIB No. 03-0033）保存于中国科学院昆明植物研究所植物化学国家重点实验室；阳性对照药物 AZT（3′-Azido-3′-deoxythymidine）购自 Sigma 公司。

【收稿日期】 2005-10-11

【基金项目】 国家高技术研究发展计划（2003AA219142）、中国科学院知识创新工程（KSCX2-SW-216；KSCX1-SW-11）、"十五"国家科技攻关计划项目（2004BA719A14）、云南省自然科学基金（2003C0022R）、云南省科技攻关计划（2004NG12、2005XY004）和国家自然科学基金（No. 20402016）资助课题

【*通讯作者】 郑永唐：研究员，博导，研究方向：病毒免疫学和分子免疫药理学。Tel/Fax：0871-5195684，E-mail：zhengyt@mail.kiz.ac.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 试 剂

抗 HIV-1 p24 单克隆抗体(P5F1)由本实验室制备;纯化艾滋病人血清(APS)由日本群马大学医学部卫生学和病毒学教室 Hoshino H 教授惠赠。HRP 标记羊抗人 IgG 抗体购自华美生物工程公司。Reverse transcriptase assay, Colorimetric 1 468 120 试剂盒,购自 Roche 公司;Enzolyte™ 490 HIV-1 Protease assay fluorimetric 试剂盒购自 Anaspec 公司;重组 HIV-1 蛋白酶由本实验室构建、表达和纯化。

1.3 细胞和病毒

H9、C8166、MT-4 和 HIV-1 慢性感染 H9(H9/HIV-$1_{ⅢB}$)等细胞均由英国 Medical Research Council (MRC), AIDS Reagent Project 惠赠。按常规方法制备 HIV-$1_{ⅢB}$贮存液,滴定并计算出病毒的 $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose)为 $10^{-8.073}$。病毒贮存液分装后,置 -70 ℃保存。完全培养基为 RPMI-1640 培养基,含 10%(V/V)新生小牛血清(Gibco)。

2 实验方法

2.1 红花五味子甲素的分离纯化

4.2 kg 红花五味子果实用 70% 丙酮-水室温下冷浸 3 次(10 L×3),每次 24 h。提取液合并,减压蒸馏除去丙酮,水溶液用乙酸乙酯萃取,得到乙酸乙酯部分(180 g)。

MCI 柱层析乙酸乙酯部分,用 90% 甲醇、100%甲醇及丙酮洗脱,90% 甲醇洗下部分(120 g),150 g 硅胶拌样,用 1.0 kg 硅胶装柱,石油醚-丙酮(100:0,9:1,8:2,7:3,6:4,1:1,0:100)梯度洗脱,合并相同流份,得到Ⅰ-Ⅳ 4 个流份段,流份段Ⅲ经反相 Rp-18 柱层析,通过 TLC 检测,合并相同流份得到流份段 A-D,流份段 B 经半制备 HPLC (Rp-18, MeOH:H_2O, 54:46)得到红花五味子甲素。

2.2 红花五味子甲素抗 HIV-1 活性的研究

2.2.1 红花五味子甲素对 C8166 和 H9/HIV-$1_{ⅢB}$的毒性 按文献用 MTT 法检测化合物对细胞的毒性[6]。在 96 孔细胞培养板上,将化合物 5 倍倍比稀释,每个稀释度设 3 个重复孔,同时设细胞对照和空白对照。除空白对照外,每孔滴加 4×10^4 个 C8166 或者 H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞,混匀,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱培养 3 d 后用 MTT 法测定细胞活性。H9/HIV-$1_{ⅢB}$培养 3 d 后,PBS 洗 3 次,再用 200 μL 对应浓度的药物重悬,继续培养 3 d 后测定细胞活性。计算得到 CC_{50} 值(50% Cytotoxic Concentration),即对 50% 的 C8166 细胞或慢性 H9 细胞产生毒性时的化合物浓度。

2.2.2 红花五味子甲素对 HIV-$1_{ⅢB}$诱导的合胞体形成的抑制 将 4×10^4 C8166 细胞接种到含有 5 倍倍比稀释化合物的 96 孔培养板上,然后加入 HIV-$1_{ⅢB}$稀释上清(MOI = 8),每个梯度设 3 个重复孔。同时设不含化合物的 HIV-$1_{ⅢB}$感染的阳性对照孔。37℃,5% CO_2培养箱培养 3 d。倒置显微镜下(×100)计数合胞体的数目。EC_{50}(50% Effective Concentration)为抑制 50% 合胞体形成时的化合物浓度。

2.2.3 红花五味子甲素对 HIV-$1_{ⅢB}$急性感染 MT-4 细胞的保护 按 Mahmood 所述方法进行[7]。HIV-$1_{ⅢB}$感染细胞的感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)为 2.0。培养 6 d 后用 MTT 法测定 MT-4 细胞的存活率。用 BioTek Elx 800 酶标仪测定 $A_{595/630}$ 值。计算出化合物对正常细胞的毒性作用和对 HIV-$1_{ⅢB}$感染细胞的保护率。CC_{50} 为对 50% 的宿主细胞产生毒性的化合物浓度。EC_{50} 为保护 50% 的 HIV-$1_{ⅢB}$感染细胞存活时的化合物浓度。

2.3 红花五味子甲素抗 HIV-1 作用的确证和机制的初步研究

2.3.1 红花五味子甲素对 HIV-$1_{ⅢB}$在急性感染 C8166 细胞中复制的抑制作用 C8166 细胞与病毒(MOI = 8) 4 ℃孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次,用完全培养基重悬细胞,调细胞数为 4×10^5/mL。在 96 孔细胞培养板上 5 倍倍比稀释化合物,每个浓度设 3 个复孔,同时设置不含化合物的对照孔。然后每孔滴加 100 μL 上述感染的 C8166 细胞悬液。置于细胞培养箱培养 72 h 后取上清,灭活后用 ELISA 检测 HIV-1 p24 抗原水平[8]。计算得到 EC_{50},即抑制 HIV-1 p24 产生 50%时的化合物浓度。

2.3.2 红花五味子甲素对 H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞中病毒复制的抑制作用 在 96 孔细胞培养板上,将化合物 5 倍倍比稀释,每个浓度设 3 个重复孔,同时设不含化合物的对照孔。每孔滴加 4×10^4 个 H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞,混匀,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱培养。3 d 后 PBS 洗 3 次,再用 200 μL 对应浓度的药物重悬,继续培养 3 d。取上清,灭活后用 ELISA 检测 HIV-1 p24 抗原水平[8]。计算得到 EC_{50}。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3.3 红花五味子甲素对感染细胞与未感染细胞融合的阻断作用 在96孔细胞培养板上5倍倍比稀释化合物，每个梯度设3个复孔，同时设不含化合物的对照孔。每孔滴加 6×10^4 个 C8166 细胞和 2×10^4 个 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞。置于细胞培养箱内培养4 h后，于倒置镜下选取5个不重叠视野计数合胞体，判断化合物是否阻断感染细胞与正常细胞的融合过程。计算得到 EC_{50}，即抑制50%合胞体形成时的化合物浓度。

2.3.4 不同时间加入红花五味子甲素对 HIV-$1_{ⅢB}$ 诱导的合胞体形成的抑制 在96孔细胞培养板上，每孔加入 4×10^4 个 C8166 细胞和 20 μL HIV-$1_{ⅢB}$ 上清液(MOI = 8)，置于37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。在感染前2 h，感染后0，1，2，4，8，16，24，48 h分别加入待测样品(41.80 $\mu mol\cdot L^{-1}$)，每个时间设3个重复孔，同时设病毒感染正常细胞对照和阳性药物 AZT 对照(149.68 $nmol\cdot L^{-1}$)。在感染后72 h，在倒置显微镜下计数合胞体数。

3 结 果

3.1 分离纯化结果

首次从天然产物中分离得到一个3,3′-二羟基-4,4′,5,5′-四甲氧基联苯环辛烯类木脂素，并命名为红花五味子甲素(图1)。

3.2 红花五味子甲素抗 HIV 活性

用MTT比色法测定了红花五味子甲素对C8166细胞、MT4细胞和H9/HIV-$1_{ⅢB}$细胞的体外毒性作用。结果表明：红花五味子甲素抑制不同细胞的 CC_{50} 范围在 40.46 $\mu mol\cdot L^{-1}$ ~ 204.72 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 之间(图2和表1)。如图3所示，红花五味子甲素在非细胞毒性浓度下(CC_{50} 为 123.35 $\mu mol\cdot L^{-1}$)以剂量依赖的方式抑制 HIV-$1_{ⅢB}$ 导致的细胞病变，EC_{50} 为 5.64 $\mu mol\cdot L^{-1}$。红花五味子甲素还具有抑制 HIV-1 感染 MT-4 细胞的死亡的活性，CC_{50} 为 204.72 $\mu mol\cdot L^{-1}$，EC_{50} 为 27.60 $\mu mol\cdot L^{-1}$。在 103.09 $\mu mol\cdot L^{-1}$ MT4 细胞的存活率为93.20%，此时药物对细胞的保护率最大，为74.89%，低于此浓度时，药物对细胞的保护率作用减弱(图3)。HIV-1 p24抗原测定结果显示其抑制 HIV-$1_{ⅢB}$ 在急性感染 C8166 细胞和 H9/HIV-$1_{ⅢB}$ 细胞中复制的 EC_{50} 分别为 47.50 $\mu mol\cdot L^{-1}$，223.53 $\mu mol\cdot L^{-1}$(表1)。红花五味子甲素对感染细胞和未感染细胞的融合也具有抑制作用，EC_{50} 为 96.06 $\mu mol\cdot L^{-1}$(表1)。在病毒与细胞孵育后1,2,4 h加药，药物对合胞体形成的抑制率分别为67.3%，72.8%，49.8%，此段时间抗病毒活性下降23.0%，4 h以后药物对病毒的抑制活性显著下降(图4)。

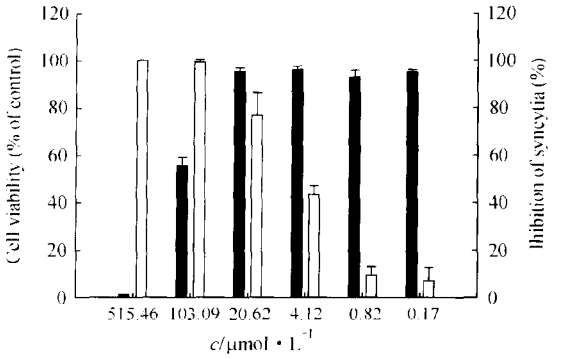
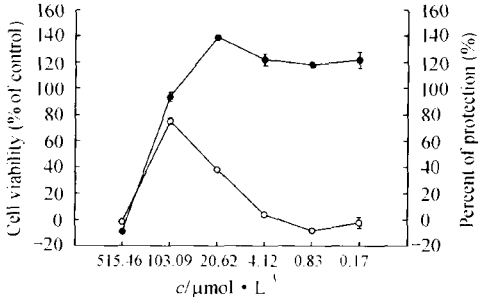


Fig 2 ***In vitro*** **cytotoxicity of rubrifloralignan A on C8166 and the effect of rubrifloralignan A on syncytia formation. Percentage of cell viability (■) was expressed as percent of control. Anti-HIV-activity (□) was expressed as inhibition of syncytia. Data are expressed as $\bar{x}\pm s$**



—●— : Mock-infected-cells; —○— : HIV-1-infected-cells

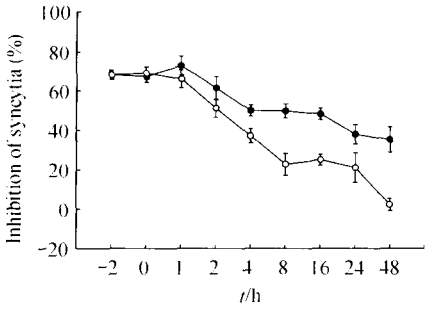
Fig 3 The protective effect of rubrifloralignan A on HIV-1 acutely infected MT-4 cell. Cytotoxicity was expressed as viability of mock-infected-cells (●) and anti-HIV-activity was expressed as protection of HIV-1-infected-cell (○). Data are expressed as $\bar{x}\pm s$

Table 1 The summary of anti-HIV-1 activities and cytotoxicity of rubrifloralignan A

Assays	Cell line and virus	CC_{50} ($\mu mol\cdot L^{-1}$)	EC_{50} ($\mu mol\cdot L^{-1}$)	Inhibition (%) (200 $\mu g\cdot mL^{-1}$)
MTT/syncytia	C8166 + HIV-$1_{ⅢB}$	123.35	5.64	
MTT/p24	C8166 + HIV-$1_{ⅢB}$	123.35	47.50	
MTT/p24	H9/HIV-$1_{ⅢB}$	40.46	223.53	
MTT	MT4 + HIV-$1_{ⅢB}$	204.72	27.60	
Co-culture	H9/HIV-$1_{ⅢB}$ + C8166		96.06	
RT[a]				33.40
PR[b]				4.87

[a]The activity was tested by Reverse Transcriptase Assay Kit (Roche).; [b]The activity was tested by HIV-1 Protease Assay Kit (Anaspec)

维普资讯 http://www.cqvip.com



-●-: Rubrifloralignan A (41.80 μmol·L⁻¹); -○- AZT (149.68 nmol·L⁻¹)

Fig 4 Time-of-addition experiment. C8166 cells were infected with HIV-1 and rubrifloralignan A (41.80 μmol·L⁻¹) (●) was added at various times post-infection. AZT (149.68 nmol·L⁻¹) (○) was added as positive control. Syncytia were counted 72 h after infection. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$

4 讨 论

鉴于目前临床使用的药物无法彻底清除病毒,长期使用易产生抗药性和毒副作用以及价格昂贵,尚需开发新药。从天然化合物中寻找活性化合物,对其靶点进行研究和结构改造,以获高效、高特异性的化合物是新药研发的重要方向。五味子是一种传统的中草药,也是一种制饮料的好材料。它具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效。五味子中富含多糖、木脂素、挥发油(包括萜类、醇酸等含氧成分),它对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、免疫及代谢系统都具有调节作用和抗衰老、抑制肿瘤生长和抗病毒的活性。从五味子中已分离出五味子素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素,伪-γ-五味子素、五味子醇甲、醇乙、五味子酚、五味子酯甲、酯乙等多种活性木质素。这些化合物分别具有抑制胃分泌、利胆、抗HIV-1、抗氧化、保护中枢神经系统、安定、促成骨髓细胞的增生与分化等多种活性作用[9-13]。

本研究首次从天然产物中分离得到红花五味子甲素。对其活性研究发现:红花五味子甲素不仅能够抑制 HIV-1$_{\mathrm{IIIB}}$诱导的合胞体的形成及 HIV-1 引起的细胞死亡,而且还能抑制病毒的复制,选择指数 SI (CC_{50}/EC_{50})分别为 21.85、7.42、2.60。对红花五味子甲素的抗 HIV-1 作用机制研究发现,其对感染细胞与未感染细胞的融合、病毒的逆转录酶有轻度的抑制作用,但不抑制 H9/HIV-1$_{\mathrm{IIIB}}$中病毒的复制,对 HIV-1 蛋白酶也无抑制活性。不同时间点加入药物(1~4 h 内),随感染后红花五味子甲素加入的延迟,对 HIV-1 的抑制作用也随之下降,感染 4 h 后加药,药物抗病毒活性显著减弱。综合上述,红花五味子甲素是一种作用于 HIV-1 感染早期的有效抗 HIV-1 复制的化合物。

参 考 文 献

[1] Asres K, Seyoum A, Veeresham C, *et al*. Naturally derived anti-HIV agents[J]. *Phytother Res*, 2005, **19**:557-581.

[2] Li YS, Wang ZT, Zhang M, *et al*. A new pinoresinol-type lignan from *Ligularia kanaitizensis*[J]. *Nat Prod Res*, 2005, **19**:125-9.

[3] Ovenden SP, Yu J, Wan SS, *et al*. Globoidnan A: a lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase[J]. *Phytochemistry*, 2004, **65**:3255-3259.

[4] Gnabre JN, Brady JN, Clanton DJ, *et al*. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 11239-11243.

[5] Landais Y, Lebrun A, Robin JP. Ruthenium (Ⅳ) tetrakis (trifluoroacetate), a new oxidizing agent. Ⅱ. A new access to schizandrins skeleton using biaryl oxidative coupling of *cis*-substituted butanolides[J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, **27**: 5377-5380.

[6] 郑永唐(Zheng YT), 贲昆龙(Pen KL). 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J]. 免疫学杂志(*J Immunol*), 1992, **8**: 266-269.

[7] Mahmood N. *Cellular assays for antiviral drugs*[M]. *In*: *Karn J ed*, *HIV* (*Vol* 2). *New York*: *Oxford University Press*, 1995, 271-287.

[8] 王 茜(Wang X), 郑永唐(Zheng YT), 戎隆富(Rong LF), 等. 半乳糖神经酰胺脂质体对 HIV-1 感染性的影响[J]. 免疫学杂志(*J Immunol*), **18**:128-131.

[9] 倪立东(Ni LD), 陈延西(Chen YX). 五味子药理作用研究概况案[J]. 暨南大学学报(医学版), 1996, **17**:125-128.

[10] 张明华(Zhang MH), 陈 虹(Chen H), 李灵芝(Li LZ). 五味子甲素和五味子醇甲对四氯化碳所致肝脏损伤的保护作用[J]. 武警医学(*Med J Chin PAPF*), 2002, **13**:395-396.

[11] 杨 毅(Yang Y), 张成路(Zhang CL). 木脂素抗艾滋病病毒研究[J]. 化学进展(*Prog Chem*), 2003, **15**:327-331.

[12] 王建华(Wang JH), 齐锦生(Qi JS), 李 恩(Li N). 北五味子甲素对大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J]. 天然产物研究与开发(*Nat Prod Res Dev*), 2002, **14**:44-46.

[13] Li RT, Han QB, Zheng YT, *et al*. Anti-HIV Lignans from *Schisandra micrantha*[J]. *Chin J Nat Med*, 2005, **3**(4): 208-212.

维普资讯 http://www.cqvip.com

The Isolation of Rubrifloralignan A and Its Anti-HIV-1 Activities

TIAN Ren-Rong[1,3], XIAO Wei-Lie[2], YANG Liu-Meng[1], WANG Rui-Rui[1], SUN Han-Dong[2], LIU Nai-Fa[3], ZHENG Yong-Tang[1]*

[1] *Laboratory of Molecular Immunopharmacology, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223;*

[2] *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204;*

[3] *School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*

【ABSTRACT】 **AIM**: To isolate bioactive secondary metabolites from the fruits of *Schisandra rebriflora* (Franch.) Rehd. et. Wils and study their effects on HIV-1 infectivity. **METHODS**: Inhibition of syncytia formation, HIV-1 reverse transcriptase (RT) and protease (PR), protection of HIV-1 infected cells, level of HIV-1 p24 antigen, blockage of fusion were detected. **RESULTS**: A lignan compound, named rubrifloralignan A, was first isolated as a natural product with modest inhibition effects on syncytium formation and HIV-1 replication and could protect HIV-1 infected cells with weak inhibition effects on fusion and RT, but it showed no effects on the replication of HIV-1 chronic H9 and PR. **CONCLUSION**: Rubrifloralignan A is an efficient anti-HIV-1 product with effect on early stage of HIV-1 replication.

【KEY WORDS】 Natural product; *Schisandra rebriflora*; Rubrifloralignan A; Anti-HIV agents; HIV-1

【Foundation Item】 This project was supported by Key Scientific and Technological Projects of China (2004BA719A14) and Yunnan province (2004NG12), CAS Knowledge Innovation Projects (KSCX2-SW-216; KSCX1-SW-11), National 863 Program (2003AA219142), Natural Science Foundation of Yunnan (2003C0001R), and Natural Science Foundation of China (No. 20402016).

·科研成果·

"著名古方生脉散的基础研究"获中国中西医结合学会首届科学技术奖一等奖

"著名古方生脉散的基础研究"获中国中西医结合学会首届科学技术奖一等奖，于2006年1月17日在北京颁奖。该项目是国家科技攻关项目获资助的第一个中药复方课题，从1983年起，该项目先后获"六五"、"七五"、"九五"攻关项目和国家自然科学基金、国家新药基金、国家863重大专项基金等资助。研究人员历经20多年，对生脉散从文献、方源、组方药材的品种及炮制品、组方原理及配伍最佳比例、方中化学成分变化与药效关系、药理、毒理、质量控制方法学等进行了系统的基础研究，并以基础研究成果先后开发了3个新制剂。

该项目基础研究主要由中国药科大学、中国中医研究院西苑医院等单位完成，主要完成人有严永清、陈可冀、余伯阳、李连达、朱丹妮、王秋娟、刘建勋、刘文英、徐秀华、王强等数十人；已故徐国钧、楼之芩院士等也曾参与早期的研究工作。

（本刊编辑部）