

用鼠艾滋病模型评价虎杖水提液的抗病毒作用

蒋 岩* 王红霞 鲍作义 朱关福

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 P3 实验室, 北京 100071)

摘 要 以脾指数、病毒抗原阳性细胞、血清 IgG 和脾细胞对刀豆蛋白 A 的刺激应答为指标, 用 LP-BM5-C57BL/6 鼠艾滋病模型评价了虎杖水提液的抗病毒作用。结果显示: 虎杖水提液可以部分地抑制 LP-BM5 病毒导致的 C57BL/6 鼠的脾肿大, 免疫抑制和病毒血症; 病毒接种前和接种同时给药效果较好, 接种一星期以后开始的治疗对感染鼠的各项异常指标没有明显的改善作用, 提示早期用药效果较好; 持续给药可以部分地控制感染鼠脾肿大和脾细胞对刀豆蛋白 A 的刺激应答降低, 但对高球蛋白血症的改善作用是非持续性的。

关键词 虎杖, 小鼠, 艾滋病模型, 抗病毒作用

自八十年代初发现艾滋病以来, 人们对其进行了大量而深入的研究, 但迄今对这种烈性传染病仍然缺乏有效的防治措施。虽然脱氧叠氮胸苷(AZT)等几种核苷类抗病毒药和蛋白酶抑制剂可以部分地缓解症状, 延长患者的生存期, 但严重的毒副作用、快速出现的耐药性和昂贵的价格使得这一类药物的应用受到限制。为了探索和发现有效、低毒、价廉的药物, 一些研究者开始了对中医中药的探索, 近些年已有了可喜的苗头。如: 甘草甜素^[1]、天花粉蛋白^[2]、海藻水提液^[3]、黄芩提取物^[4]等可以显著地抑制病毒复制, 其中部分药物已经进入了临床实验。这些研究成果使人们对从传统药物中开发新的抗艾滋病制剂增强了信心。

虎杖(*Polygonum cuspidatum*) 在临床上用于治疗多种感染性疾病^[5-7]、烧伤^[8]、微循环功能障碍^[9]、肿瘤^[10]等, 而没有明显的毒副作用。在体外也证明它对多种细菌及病毒有抑制和灭活作用。另外, 我们以前的研究也证明了它在 MT-4 细胞和 HIV-1(Human immunodeficiency virus-1)培养系统可以有效地抑制病毒复制^[11]。它有望成为一种新型的抗逆转录病毒制剂。为此, 我们设计了本实验, 目的在于进一步用鼠模型评价它的抗病毒作用, 为探索新型、价廉、有效的抗逆转录病毒制剂提供依据。

材料和方法

1 材料

1.1 试剂 RPMI-1640 培养基, 刀豆蛋白 A(CnA), 2, 5-二苯基唑啉(PPO), 1, 4-双(5-苯基唑啉)(POPOP), 牛血清蛋白(BSA), 二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)购自 Sigma 公司; 羊抗鼠 IgG, HRP-羊抗鼠 IgG 和磷苯二胺(OPD)购自军事医学科学院微生物流行病学研究所, [甲基-³H]胸腺嘧啶核苷([methyl-³H]-TdR)购自中国原子能科学研究院; HRP-兔抗 LP-BM5 MuLV 抗体为本室自制。

1.2 仪器 酶标比色仪(Model 450): Bio-Rad 公司; 液闪记数仪: Beckman 公司; CO₂ 浮箱: Queue 公司; 电子天平: Mettler Toledo AB204。

收稿日期: 1997-10-13, 修回日期: 1997-12-29

* 作者现在地址: 卫生部艾滋病预防与控制中心参比实验室, 北京 100050

1.3 动物 雌性 C57BL/6 小鼠,体重 18~22 g,购自北京医科大学实验动物中心。小鼠在 20~28 ℃ 条件下用标准鼠料及水饲养。每周鼠笼清洁 1~2 次,每批实验前鼠笼经高压灭菌。新鼠购入一周后用于实验,小鼠随机分组,每组 5~8 只。

1.4 细胞 G6 细胞(LP-BM5 病毒持续感染株)由日本京都大学病毒学研究所石本秋稔教授惠赠。

1.5 病毒 小鼠白血病病毒 LP-BM5 株由 G6 细胞培养上清制备。收集培养 3 d 的细胞上清,520 g,离心 10 min,上清经 0.22 μm 滤膜过滤后,分装, -70 ℃ 冻存。将冻存的病毒液按不同浓度(1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000)接种于 C57BL/6 鼠,30 d 后杀鼠,无菌取脾,测量脾脏重量,根据各组脾脏肿大(脾重大于正常对照组均数 + 3 倍标准差)的例数计算 TID₅₀。模型鼠每鼠腹腔接种 40TID₅₀ LP-BM5 MuLV/0.5 mL,接种后 4~8 周杀鼠,无菌取脾,进行各项指标的检测。

1.6 药物 虎杖从四川省成都市中药材市场购入,经中医研究院基础理论研究所胡士林教授鉴定。提取液过滤除菌后 4 ℃ 保存,用时以去离子水稀释至使用浓度(10%),每鼠每天 0.5 mL。给药途径为灌胃。以 AZT 作为阳性对照,将 AZT 用去离子水配制成 3 mg/mL,过滤除菌后 -20 ℃ 保存,每鼠每天 0.5 mL(75 mg/kg·d)。非感染对照组给予等量的水。

2 方法

2.1 虎杖水提液的制备

提取方法和以往相同^[11]。简言之,将虎杖根切碎,干燥,称取 100 g,侵入 1 L 去离子水中,室温下过夜。然后,将其置于沸水浴中 1.5 h,自然放置至室温后取其上清,220 g 离心 15 min,再取上清,650 g 离心 30 min,弃掉沉淀,上清(将此提取物浓度作为 100%)以 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 ℃ 冻存待用。

2.2 实验设计

将实验动物分为 4 组:正常对照组、感染对照组、药物治疗组和药物对照组(只给虎杖提取液或 AZT,不接种病毒)。感染鼠每鼠腹腔接种 0.5 mL 病毒;药物治疗组小鼠分别于接种病毒前(2 或 5 d),接种同时和接种后(7 或 10 d)给药。连续给药 4~8 周后,测量每鼠体重,与停药 48 h 后杀鼠,无菌取脾,进行各项指标的检测。

2.3 急性毒性

连续给小鼠灌药 7 d,观察一般反应和死亡率,同时设非给药对照组。试验结束时按各组死亡鼠数计算 LD₅₀,结果 LD₅₀ 为 65% (提取液原液为 100%)。

2.4 评价指标的检测方法

2.4.1 酶标染色法检测 LP-BM5 抗原 无菌取 LP-BM5 感染的鼠脾细胞,调至 5×10^6 /mL,将细胞均匀地涂在玻片镀膜圈上,20 μL/孔,自然干燥后,以丙酮固定 30 min。将 HRP-兔抗 LP-BM5 抗体用含有 0.4% Tween-20 的 PBS 稀释后,加到细胞上,20 μL/孔,37 ℃ 湿盒反应 2 h,最终以 DAB 显色。显微镜下记数 200 个细胞,计算抗原阳性细胞率。

2.4.2 小鼠血清 IgG 测定 以 pH9.6 碳酸盐缓冲液将羊抗鼠 IgG 稀释后,包被 96 孔微量培养板,100 μL/孔,4 ℃ 过夜。以含 1% BSA 的 PBST(Phosphate Buffer Saline Tween) 200 μL/孔,37 ℃ 封闭 30 min,然后,加入待测血清,室温反应 2 h,洗净后加入 HRP-羊抗鼠 IgG,室温反应 1 h,洗净,加入 OPD-H₂O₂ 显色 20 min。最后,以 1 mol/L 硫酸终止反应,在 Bio-Rad model 450 酶标仪(492 nm)上读取 OD 值。

2.4.3 淋巴细胞增殖反应 无菌取小鼠脾脏,制备脾细胞悬液。以 pH7.2 Tris-NH₄Cl 缓冲液溶解红细胞,洗净后将细胞调至 6×10^5 /mL,吸取 100 μL 加入 96 孔板,加入 100 μL 丝裂原 ConA(10 μg/mL),37 ℃ 培养 56 h 后,加入 ³H-TdR(0.5 μL/孔),继续培养 16 h。最后将细胞收于玻璃纤维膜上,在液闪计数仪上读取 cpm。

2.4.4 脾指数(Spleen index, SI) 无菌取脾,以电子天平精确称取其重量,以脾重(mg)除以体重(g)即为脾指数(mg/g)。脾指数大于正常对照组均数 + 3 倍标准差者视为脾肿大。

2.5 统计学处理

实验数据以均数(标准差), $\bar{X}(SD)$ 表示。各组间显著性差异采用成组资料 t 检验。

结 果

10%虎杖水提液(*Polygonum cuspidatum* Water Extract, PCWE)可以部分地抑制 LP-BM5 病毒感染的 C57BL/6 鼠的脾肿大及免疫抑制(表 1),并减少脾细胞中的病毒抗原量(图 1)。病毒接种前或接种同时给药作用较好,而接种一星期以后开始的治疗虽然对脾肿大有一定的抑制作用,对免疫抑制和脾细胞中的病毒抗原量没有改善作用(表 2,图 2)。治疗 4 周时,

表 1 虎杖水提液和 AZT 对 LP-BM5 病毒感染 C57BL/6 鼠的脾肿大和免疫缺陷的抑制作用

Table 1 Inhibition of PCWE and AZT on splenomegaly and immunodeficiency of C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV

组别 Groups	脾重 Spleen Wt. (mg)	体重 Body Wt. (g)	脾指数 Spleen Index (mg/g)	IgG (OD)	ConA (cpm)
正常对照 Normal control	53.9(20.4)	21.2(1.1)	2.5(0.9)	0.733(0.061)	10472(2078)
感染对照 Infection control	264.7(18.9)###	20.7(1.0)	12.8(0.9)###	1.148(0.209)###	2840(895)###
虎杖治疗 Cure with PCWE	168.3(42.4)**	21.1(0.8)	8.0(2.0)**	0.895(0.088)*	4491(3264)**
虎杖对照 PCWE control	48.1(11.5)	21.5(1.5)	2.2(0.5)	0.797(0.097)	11238(4231)
AZT 治疗 Cure with AZT	131.3(26.4)***	18.5(0.8)	7.1(4.2)***	0.718(0.027)**	3388(1444)*
AZT 对照 AZT control	81.7(16.0)	19.2(1.2)	4.3(0.9)	0.746(0.060)	10156(3116)

均数(标准差),例数=5-8,###与正常对照组比较 $p<0.001$; *与感染对照组比较 $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。病毒接种同时给药。X(SD), $n=5-8$, ### $p<0.001$ compared with normal control; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared with infected control. Treatment beginning at the same time of virus inoculation

表 2 病毒接种后不同时间虎杖水提液对 LP-BM5 感染 C57BL/6 鼠的作用

Table 2 Effect of PCWE on splenomegaly and immunodeficiency of C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV at different time

病毒 Virus	虎杖水提液 PCWE	脾重 Spleen Wt. (mg)	体重 Body Wt. (g)	脾指数 Spleen index (mg/g)	IgG (OD)	ConA (cpm)
No	No	53.9(20.4)	21.2(1.1)	2.5(0.9)	0.733(0.061)	10472(2078)
Yes	No	264.7(18.9)###	20.7(1.0)	12.8(0.9)###	1.148(0.209)###	2840(895)###
Yes	Yes(1)	196.4(53.9)**	21.9(1.9)	9.0(2.3)**	0.786(0.098)**	6032(2531)**
Yes	Yes(2)	168.3(42.4)**	21.1(0.8)	8.0(2.0)**	0.895(0.088)*	4491(3264)**
Yes	Yes(3)	241.0(52.2)	22.0(1.0)	10.9(2.1)*	0.947(0.107)	1760(741)

均数(标准差),例数=5-8;(1)病毒接种前 2 d 开始治疗;(2)病毒接种同时开始治疗;(3)病毒接种后 7 d 开始治疗。与正常对照组比较,### $p<0.001$;与感染对照组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

X(SD), $n=5-8$; (1) Treatment beginning before 2 days inoculation; (2) Treatment beginning at the same time inoculation;

(3) Treatment beginning after 7 days inoculation., ### $p<0.001$ compared with normal control; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared with infected control.

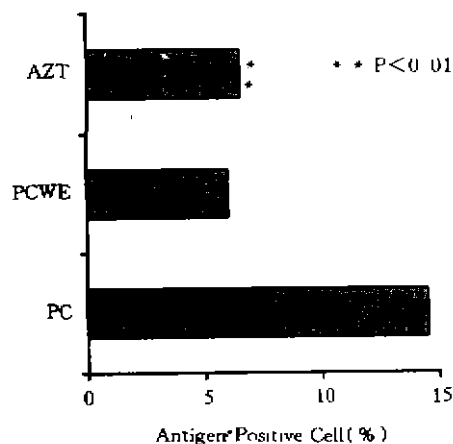


图1 虎杖水提液和 AZT 对 LP-BM5 感染的 C57BL/6 鼠脾抗原阳性细胞的影响

Fig.1 Effect of PCWE and AZT on spleen cells of C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV

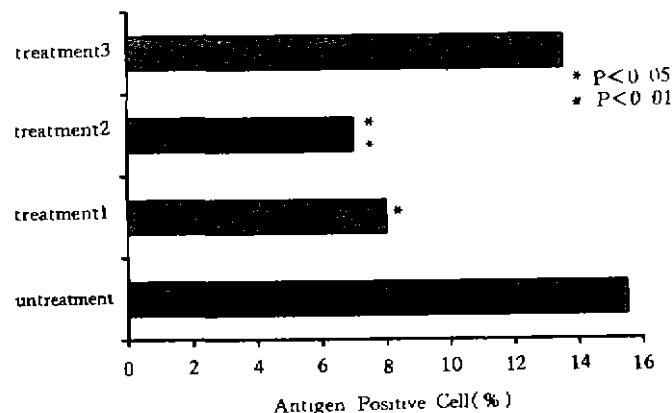


图2 虎杖水提液对不同时间接种 LP-BM5 C57BL/6 鼠的脾抗原阳性细胞的影响

Fig.2 Effect of PCWE on spleen cell of C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV at different time

treatment 1: beginning before 2 days

treatment 2: beginning at the same time of inoculation

treatment 3: beginning after 7 days of inoculation

表3 虎杖水提液对 LP-BM5 病毒感染的 C57BL/6 鼠作用的动态观察

Table 3 Inhibition of PCWE on splenomegaly and immunodeficiency of C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV for different treatment time

病毒 Virus	虎杖水提液 PCWE	脾重 Spleen Wt (mg)	体重 Body Wt. (g)	脾指数 Spleen index (mg/g)	IgG (OD)	ConA (cpm)
Treatment for 4 weeks						
No	No	53.9(20.4)	21.2(1.1)	2.5(0.9)	0.733(0.061)	10472(2078)
Yes	No	264.7(18.9)###	20.7(1.0)	12.8(0.9)###	1.148(0.209)###	2840(895)###
Yes	Yes	168.3(42.4)**	21.1(0.8)	8.0(2.0)**	0.895(0.088)*	4491(3264)**
Yes	No	48.1(11.5)	21.5(1.5)	2.2(0.5)	0.797(0.097)	11238(4231)
Treatment for 8 weeks						
No	Yes	84.2(31.6)	21.6(0.6)	3.9(1.3)	0.922(0.066)	14297(4836)
Yes	No	442.7(59.6)###	23.8(3.1)	18.6(0.1)###	1.208(0.020)###	4039(1982)###
Yes	Yes	156.4(81.2)*	21.5(4.5)	7.3(5.4)*	1.416(0.124)	9147(1027)*
No	Yes	87.8(16.8)	19.7(2.6)	4.5(0.4)	1.443(0.101)###	15501(4917)

均数(标准差),例数=8;与正常对照组比较,### $p < 0.001$;与感染对照组比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。病毒接种同时给药。

X(SD), $n=8$;### $p < 0.001$ compared with normal control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with infected control. Treatment beginning at the same time of virus inoculation.

脾重为 168.3 mg,未治疗组为 264.7 mg。延长治疗时间到 8 周时,未治疗组脾重增至 442.7 mg,而治疗组脾重没有继续增加(156.4 mg)。表明持续给药可以较好地控制病情发展。免疫指标的变化:治疗 4 周,感染鼠 IgG 及脾细胞 ConA 应答反应均有所改善;而治疗到 8 周时,虽

然 ConA 应答有所改善, 高球蛋白血症却没有改善, 提示 PCWE 对高球蛋白血症的作用是非持续性的(图 3)。

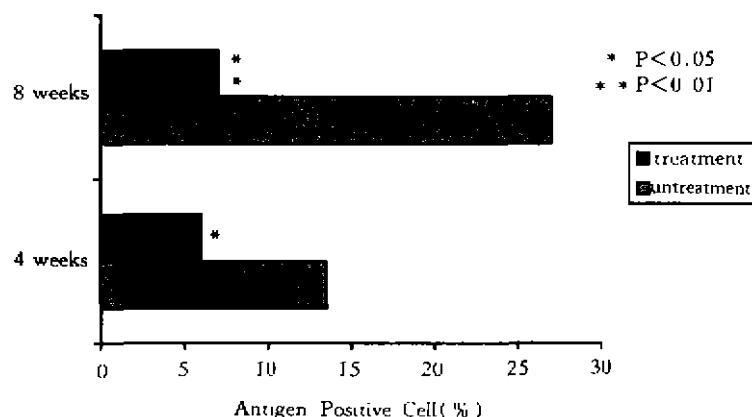


图 3 虎杖水提液抗病毒作用的动态观察

Fig 3 Kinetic of antiviral effect of PCWE in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 MuLV

讨 论

LP-BM5 病毒接种敏感鼠以后, 可以使鼠出现脾脏肿大, 免疫缺陷等类似人艾滋病的某些表现, 也称其为鼠艾滋病^[12~14], 这种模型已经用于筛选和评价抗艾滋病制剂^[15, 16]。我们用 LP-BM5 病毒感染 C57BL/6 鼠, 建立了 LP-BM5 病毒/C57BL/6 鼠艾滋病模型。接种病毒的小鼠于 4 周后出现显著的脾肿大和免疫缺陷, 感染鼠症状的严重程度与病毒的接种量呈正相关。与大动物模型相比, 此模型有一定的优势, 如实验周期短, 实验期内感染鼠死亡率低, 易于饲养, 不需要特殊实验室, 价格便宜等, 尤其适宜于抗病毒药物的初筛。我们用此模型初步评价了 PCWE 的抗病毒作用, 证明它可以部分地抑制感染鼠的脾脏肿大、免疫抑制和病毒血症。在本模型系统它基本可获得与 AZT 等同的抗病毒效果(表 1, 图 1)。其作用特点是在病毒接种前或接种同时投用 PCWE 对感染鼠的异常指标有一定的改善作用, 但对病毒接种一周后的感染鼠没有明显的治疗作用, 提示它可能是通过阻止病毒与细胞的结合而发挥抗病毒作用的。这个结果与我们以前在体外试验中获得的结果相似, 在体外 PCWE 可以有效地抑制病毒表面的 gp120 与细胞表面的 CD4 结合, 抑制 HIV-1 感染 MT-4 细胞。此外, 我们还证明在体外 PCWE 对 HIV-1 的逆转录酶有显著的灭活作用, 因此其抗病毒作用可能也与酶的灭活有关。总之, PCWE 的抗病毒机制可能不是单一的, 它可能包括了多方面的因素。有关它的抗病毒机制和有效成分尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Jto M, Nakashima H, Baba M *et al*. Inhibition effect of glycyrrhizin on the infectivity and cytopathic activity of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antiviral Res*, 1987, 7: 127-137
- 2 McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al*. GLQ223: an inhibitor of HIV replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2844-2848

- 3 Nakamura H, Ohtsuki N, Sadamasu K *et al* . Anti-human immunodeficiency virus activities of aqueous extracts from marine algae. *Natural Medicine*, 1994, 48(30): 173 - 179
- 4 Ono K, Nakane H, Fukushima M *et al* . Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5, 6, 7-trihydroxyflavone. *Biochem Biophys Res Com*, 1989, 160(3): 982 - 987
- 5 顾梯成. '虎柏针'静脉滴注治疗小儿急性肺炎 40 例临床观察. *上海中医药杂志*, 1987, 11: 11
- 6 王宝山. 单味虎杖对治疗黄疸型肝炎的疗效观察. *沈阳医学*, 1989, 4: 29, 62
- 7 李武钟. 虎杖根治疗霉菌性阴道炎. *四川中医*, 1986, 11: 27
- 8 王长江, 赵希贵. 单味虎杖治疗 I 度, 浅 II 度烧伤. *实用中西医结合杂志*, 1994, 7(2): 117 - 118
- 9 赵克森. 虎杖 4 号结晶可改善重症不可逆性失血性休克的微循环紊乱. *第一军医大学学报*, 1987, 2: 113 - 117
- 10 周立东. 虎杖煎剂对艾氏腹水瘤的抑瘤作用. *中西医结合杂志*, 1989, 2: 111
- 11 Jiang Y, Sano K, Mohmatu S *et al* . Anti-HIV-1 activity of *Polygonum cuspidatum* extract *in vitro*. *Japanese Archives of Sexually Transmitted Diseases*, 1994, 5(1): 138 - 146
- 12 Mosier D E, Yetter R A, Morse H C. Retroviral induction of acute lymphoproliferative disease and profound immunosuppression in adult C57BL/6 mice. *J Exp Med*, 1985, 161: 766 - 784
- 13 Watson R R, Prebhala R H, Darban H R *et al* . Changes in lymphocyte and macrophage subsets due to morphine and ethanol treatment during a retrovirus infection causing murine AIDS. *Life Science*, 1988, 43(6): v-xi
- 14 Khnken P, Fredrickson T N, Hartley J W *et al* . Evolution of B cell lineages lymphomas in mice with a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *MAIDS*, 1988, 140(4): 1123 - 1131
- 15 Hersh E M, Funk C Y, Ryschon K L *et al* . Effective therapy of the LP-BM5 murine retrovirus-induced lymphoproliferative immunodeficiency disease with Diethylthiocarbamate. *AIDS Res and Human Retroviruses*, 1991, 7(6): 553 - 561
- 16 Cerny A, Merino R, Fossati L *et al* . Effect of Cyclosporin A and Zidovudine on immune abnormalities observed in the murine acquired immunodeficiency syndrome. *J Infectious Disease*, 1992, 166: 285 - 290

Evaluation of Antiviral Effect of *Polygonum cuspidatum* Water Extract with a Model of Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome

Jiang Yan* Wang Hongxia Bao Zuoyi Zhu Guanfu

(P3 Laboratory, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract The effect of *Polygonum cuspidatum* water extract (PCWE) on C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia virus (MuLV) was investigated taking spleen index, viral antigen positive cell, serum IgG level and ConA response as parameters. It is demonstrated that PCWE can partly inhibit LP-BM5 MuLV-induced splenomegaly, immunodeficiency and viremia of C57BL/6 mice. Antiviral effect of PCWE is more effective before or at the same time of virus inoculation than after virus inoculation. It indicates that the earlier treatment, the better. Continual treatment can partly improve splenomegaly and ConA response of infected mice, but the inhibition of PCWE on hypergammaglobulinemia of infected mice is non-persistent.

Key words *Polygonum cuspidatum*, Mice, Antiviral effect, Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)

* Present address: National AIDS reference laboratory, Beijing 100050