

17种植物中蛋白质提取物的抗 HIV-1 活性*

312-321
郑永唐¹ 贲昆龙^{1**} 金善炜²¹(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)²(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 以化合物对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制实验和化合物对 HIV-1 感染细胞的保护实验作为初筛方法, 筛选了来源于 7 科 17 种植物的 47 个样品, 其中 8 个样品经测定是核糖体失活蛋白(RIPs), 其余为粗提蛋白。进而测定了初筛有抗 HIV 活性的化合物对共培养、急性和慢性感染的 HIV-1 p24 抗原表达水平的影响, 用间接荧光染色检测这些化合物对 HIV 抗原阳性细胞率的影响, 以确证其抗 HIV 活性。天花粉蛋白(TCS)、南方栝楼蛋白峰 V、南方栝楼蛋白峰 VI 均显著地抑制合胞体的形成; 巴 II、丝瓜子蛋白、油瓜根蛋白、楝藤子蛋白有一定的抑制作用。老鼠拖瓜蛋白、大叶木鳖子根蛋白、西双版纳根 II 等粗提蛋白有显著的抑制作用。RIPs 不能保护 HIV-1 感染细胞的死亡。TCS 显著地抑制了 HIV-1 急性感染中 p24 抗原的表达, 减少了 HIV 抗原阳性细胞数, 但它们均不影响共培养细胞融合、HIV-1 慢性感染中 p24 抗原表达水平。结果表明, 除 TCS 等已知 RIPs 外, 还有一些新的 RIPs 具有不同程度的抗 HIV 活性。

关键词 人免疫缺陷病毒, 抗病毒活性, 植物蛋白质, 核糖体失活蛋白

艾滋病(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)引起的传染病。当前临床应用的抗 HIV 药物均为化学合成, 往往毒副作用大, 易产生耐药性。从传统中药和植物资源中寻找新的抗 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。McGrath 等首先在核糖体失活蛋白(Ribosome-inactivating proteins, RIPs)当中, 发现我国一直用于抗肿瘤和引产的天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)在体外可抑制 HIV^[1], I 期和 II 期临床试验证明 TCS 治疗 AIDS 和 ARC (AIDS-related complex) 患者均有明显的疗效, 血清中 p24 抗原水平降低, CD4⁺ T 细胞数量增加^[2]。随后其他学者相继发现有栝楼根抗 HIV 蛋白 29(TAP29)、美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)、苦瓜子抗 HIV 蛋白 30(MAP30)、多花白树抗 HIV 蛋白 31(GAP31)、香石竹抗 HIV 蛋白 31 和 32(DAP31 和 DAP32)以及异株泻根毒蛋白(Bryodin)等 7 种 RIPs 也具有抗 HIV 的作用^[3-7]。RIPs 对 HIV 的作用是多靶点的, 不易产生耐药性^[8]。我们曾研究 26 种 RIPs 抗 SRV(Simian retrovirus type D)的活性, 发现多种具有明显抗病毒活性的 RIPs^[9]。近来, 我们研究了来源于 17 种植物的 47 种 RIPs 类化合物和粗提蛋白的抗 HIV 活性, 以期获得具有显著抗 HIV 活性

收稿日期: 1997-11-24, 修回日期: 1998-01-19

* 中国科学院“九五”重大应用项目和“西部之光”人才基金、云南省应用基础研究基金(96C095M)、云南省中青年学术和技术带头人后备人才基金资助课题。

** 通讯联系人

的新的 RIPs,为进一步评价抗 HIV 的 RIPs 提供科学的依据。

材料与方 法

1 药物与化合物

AZT (3'-Azido-3'-deoxythymidine) 购自 Sigma 公司。DS (Dextran sulfate, M. W. 500 000) 为 Pharmacia 产品,日本群马大学医学部星野洪郎教授惠赠。巴 I、巴 II、天花粉蛋白(T11)由中国科学院福建物质结构研究所陈明晃教授制备;其余 RIPs 类样品按前述方法制备^[10],即把植物块根捣碎榨汁后或把植物捣碎后用生理盐水浸泡,原汁或生理盐水溶液再用丙酮沉淀,收集沉淀,冷冻干燥成粗品,粗品再用 Sephadex G50, G75 和 CM-Sephadex C-50 等进一步纯化。SDS-PAGE 用 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3)。RIPs 的 RNA N-糖苷酶活性测定按文献进行^[11]。被测样品的植物来源见表 1。样品均溶解于等渗 PBS 中。临用前以完全培养基稀释。

表 1 被测 RIPs 或粗提物及其来源

Table 1 Sources of RIPs or crude extracts used in present study

植物 Plants	RIPs 或粗提物 RIPs or crude extracts
葫芦科 栝楼科 <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim	天花粉蛋白 Trichosanthin, TCS ^{*,Δ} 天花粉蛋白 TCS-W ^{*,Δ} 天花粉蛋白 T11 ^{*,Δ} TCS 复合物 TCS complex ^{*,Δ}
葫芦科 三尖栝楼 <i>Trichosanthes tricuspidata</i> Lour	栝楼果子蛋白 Protein from seeds of <i>T. tricuspidata</i> ^{**,*}
葫芦科 老鼠拖瓜(全缘栝楼) <i>Trichosanthes ovigera</i> Bl	老鼠拖瓜蛋白(根) Protein from roots of <i>T. ovigera</i> ^{**,Δ} 老鼠拖瓜蛋白峰 I Protein fraction I from <i>T. ovigera</i> [*] 老鼠拖瓜蛋白峰 II Protein fraction II from <i>T. ovigera</i> [*] 老鼠拖瓜蛋白峰 IV Protein fraction IV from <i>T. ovigera</i> [*]
葫芦科大叶木鳖子 <i>Momordica macrophylla</i> Gagn	大叶木鳖子根蛋白 Protein from roots of <i>M. macrophylla</i> ^{**,*} 大叶木鳖子分子筛后峰 II [*]
葫芦科 苦瓜 <i>Momordica charantia</i> Linn	苦瓜子小分子蛋白 Low MW protein from <i>M. charantia</i> ^{**,Δ} γ-苦瓜子蛋白 γ-momocharin ^{**,Δ} 苦瓜子蛋白丙酮干粉 ^{**,Δ}
葫芦科 丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i> Linn	丝瓜子蛋白 Luffin ^{**,Δ} 丝瓜子蛋白峰 III Luffin fraction III [*]
葫芦科 南方栝楼 <i>Trichosanthes damiaoshanensis</i> C. Y. Cheng et Yueh	南方栝楼 V Protein fraction V from <i>T. damiaoshanensis</i> [*] 南方栝楼 VI Protein fraction VI from <i>T. damiaoshanensis</i> [*]
葫芦科 西双版纳根	西双版纳根 II ^{**,Δ} 根 2(93P39G-I) [*] 根 2(93P39G-II) [*] 根 II 心 W1(CM-I) [*] 根 II 皮 W6(皮 III) [*] 根 II 心 W2(CM-II) [*] 根 II 心 W3(CM-III) [*] 根 II 心 G-75 峰 I [*] 根 II 心 G-75 峰 II [*] 根 II 皮 W4(皮 I) [*] 根 II 皮 W5(皮 II) [*]

表1(续)

植物 Plants	RIPs 或粗提物 RIPs or crude extracts
葫芦科油瓜 <i>Hodgsonia macrocarpa</i> Bl	油瓜根蛋白 Protein from roots of <i>H. macrocarpa</i> * *
<i>Gogn</i> var. <i>capriocarpa</i> (Ridl) Tsai	油瓜根 II * *
葫芦科马干铃 <i>Trichosanthes lepiniana</i> (Naud.) cogn.	马干铃粗蛋白 Protein from <i>T. lepiniana</i> * * * Δ 马干铃 G75-CM-C50-G75 * * Δ
葫芦科老鼠拖冬瓜 <i>Zehneria indica</i> (Lour) Kersudren	老鼠拖冬瓜 II Protein fraction II from <i>Z. Indica</i> * *
云实科苏木 <i>Caesalpinia sappan</i> Linn.	苏木子蛋白 Protein from seeds of <i>C. sappan</i> * *
番木瓜科番木瓜 <i>Carica papaya</i> Linn.	番木瓜子蛋白 Protein from seeds of <i>C. papaya</i> * * * * Δ
豆科望江南 <i>Cassia occidentalis</i> Linn.	望江南 Crude extract from <i>C. occidentalis</i> * * * Δ
含羞草科植藤子 <i>Entada phaseoloides</i> (Linn) Merr.	植藤子蛋白 93-3-22 Protein from <i>E. phaseoloides</i> * * * Δ 植藤子 93-6-7 CM I * 植藤子 93-6-8 PCM- I * 植藤子 CM I 940510 峰 I * * 植藤子 CM II 940510 峰 II * * 植藤子 CM III 940510 峰 III * * 植藤子 G-75 940520b *
大戟科巴豆 <i>Croton tiglium</i> L.	巴 I Crotin I * * Δ 巴 II Crotin II * * Δ
大戟科绿背桂 <i>Ecoecaria cochinchinensis</i> Lour	绿背桂种子蛋白 Protein from seeds of <i>E. cochinchinensis</i> * *

* , RIPs 纯品或较纯品; * * , 粗提蛋白;

Δ, 具有 RNA N-糖苷酶活性; #, 无 RNA N-糖苷酶活性; 其余未测定

* , Purified RIPs; * * , Crude extracts; Δ, RNA N-glycosidase; #, No RNA N-glycosidase; The rest had not been detected.

2 试剂

抗 HIV-p24 单克隆抗体 (McAb) 由日本北海道大学免疫科学研究所生田和良教授赠送; 艾滋病人血清 (APS) 由日本群馬大学医学部卫生学和病毒学教室星野洪郎教授惠赠。HRP 标记山羊抗人 IgG 抗体购自上海荣盛生物制药厂。FITC 绵羊抗人 IgG 结合物购自华美生物工程公司。

3 细胞和病毒

H9、C8166、MT-4(p) 和 HIV-1 III B/H9 均由英国 Medical Research Council (MRC), AIDS Reagent Project 惠赠。按常规方法制备 HIV-1 III B 贮存液, 滴定并计算出病毒的 TCID₅₀。病毒贮存液分装后, 置 -70 °C 保存。

4 ELISA 检测 HIV-1 p24 抗原

用碳酸盐缓冲液稀释抗 HIV-1 p24 McAb 至 10 μg/mL, 包被微量反应板 (Greiner 公司); 37 °C 封板 1.5 h; 每孔加待测样品 100 μL, 温育 2 h 后, 加 1:500 稀释的 APS 100 μL。37 °C 温育 1 h; 每孔加入合适浓度的 HRP 标记羊抗人 IgG 100 μL。37 °C 温育 1 h; 充分洗涤, 加入 ABTS 底物使用液 100 μL, 15 min 后, 中止反应后, Bio-Rad 3550 酶标仪测定 OD 值 (405/595 nm)。

5 间接荧光染色法检测 HIV 抗原阳性细胞

将 HIV-1 III B 急性感染的 C8166 细胞滴加在 8 孔 IFA 破片 (ICN Biomedicals, USA) 上, 干燥后用冷丙酮固定。每孔中滴加 1:50 用 PBS 稀释的 APS, 室温放置 15 min; 洗涤后每孔滴加 1:50 PBS 稀释的 FITC 标记

的绵羊抗人 IgG 抗体,室温作用 15 min;DABCO 封片液封片。在荧光显微镜(Olympus BH-2)下观察。计数视野中的细胞总数(>200 个细胞计数)和荧光染色阳性细胞数,计算出阳性细胞百分率和化合物对 HIV 抗原阳性细胞的抑制率。

6 细胞毒性实验

按文献用 MTT 方法测定其细胞毒性^[12]。CC₅₀(50% cytotoxic concentration)是对 50% 宿主细胞产生细胞毒作用时的药物浓度。

7 化合物对 HIV 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制实验

将待测化合物倍比稀释,每孔 100 μL,设 3 个重复孔,设正常细胞和 HIV 感染细胞对照。每孔滴加 3 × 10⁵/mL 的 C8166 细胞 100 μL,然后滴加 200 TCID₅₀ 的 HIV-1 ⅢB。终体积为 300 μL。第 3 天在倒置显微镜下(×100)观察待测化合物对合胞体形成的影响^[9,13]。EC₅₀(50% effective concentration)为抑制合胞体形成达 50% 时的药物浓度。选择指数>Selectivity Index, SI)为 CC₅₀/EC₅₀ 的比值。

8 HIV 感染细胞融合阻断实验

将待测化合物倍比稀释,设三重复孔,每孔 100 μL。对照孔不含待测化合物。每孔滴加 3 × 10⁴ 个未感染的 C8166 细胞和 1 × 10⁴ 个 HIV-1 ⅢB/H9 细胞。置细胞培养箱内培养 24 h 后,在倒置镜下观察细胞融合形成合胞体来判断化合物是否阻断病毒与细胞的结合过程^[14]。

9 化合物对 HIV 感染细胞的保护作用实验

按 Pauwell 等以及 Mahmood 所述方法进行^[15,16]。感染复数为 0.005。计算出化合物对 HIV-1 ⅢB 感染细胞的保护率。CC₅₀为对 50% 的宿主细胞产生毒性的化合物浓度;EC₅₀为保护 50% 的 HIV-1 ⅢB 感染细胞存活时的化合物浓度。SI 为 CC₅₀/EC₅₀ 的比值。

10 化合物对急性感染 HIV 复制的作用

将待测化合物稀释,设三个重复孔,每孔 100 μL。对照孔不含化合物。每孔加入 1 × 10⁶/mL 的 C8166 细胞悬液 50 μL。化合物与细胞在 37℃ 预作用 60 min 后,每孔加入 200 TCID₅₀ 的 HIV-1 ⅢB。置细胞培养箱中培养 72 h^[4,14]。以 0.8% 的台盼蓝染料排斥法计数,计算存活细胞数。收集细胞悬液离心,上清用于 ELISA 测定 p24 抗原水平;细胞沉淀物重悬后,用于间接荧光染色检测 HIV 阳性细胞。

11 化合物对慢性感染 HIV 复制的作用

将待测化合物倍比稀释,设三重复孔,每孔 100 μL。对照孔不含化合物。调 H9/HIV-1 ⅢB 细胞浓度至 4 × 10⁵/mL,每孔加感染细胞悬液 100 μL。置细胞培养箱中培养 96 h^[17]。吸取上清用于 ELISA 测定 HIV p24 抗原水平。MTT 方法测定化合物对 H9/HIV-1 ⅢB 细胞的毒性作用。

结 果

1 对 HIV-1 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制作用

AZT 和 DS 抑制 HIV-1 ⅢB 诱导 C8166 细胞形成合胞体的反复实验结果表明,该方法敏感、简便、重复性好。因此,我们以 HIV-1 ⅢB 诱导 C8166 细胞形成合胞体的抑制实验作为研究抗 HIV 药物的初筛方法,对来源于 17 种植物的 47 个 RIPs 类化合物或粗提物样品进行了筛选。

从表 2 可见,天花粉蛋白复合物、巴 II、丝瓜蛋白峰 III、γ-苦瓜子蛋白、三尖栝楼果子蛋白、绿背桂子种子蛋白、苏木子蛋白、老鼠拖冬瓜(2)、马干铃粗蛋白、马干铃 G75-CM-C50-G75、番木瓜子蛋白、望江南(粗)等样品无抑制作用(SI < 10);巴 I、丝瓜子蛋白、油瓜根蛋白、油瓜根(2)、榼藤子蛋白及分离纯化成分有一定的抑制作用(SI 在 10~50 之间);从某些植物提取的粗提物(如老鼠拖瓜蛋白、大叶木鳖子根蛋白、西双版纳根 II 等)有显著抑制 HIV-1 增

表2 RIPs或粗提蛋白抑制HIV-1诱导C8166形成合胞体作用
Table 2 Inhibition of HIV-1 inducing C8166 syncytia formation by RIPs or crude extracts

RIPs 或粗提蛋白 RIPs or crude extracts proteins	EC ₅₀ (μg/ml)	CC ₅₀ (μg/ml)	选择指数 SI
AZT	0.131	794.2	6063
DS(Dextran sulfate, 500 000)	3.39	2004.2	591
天花粉蛋白 Trichosanthin, TCS	0.0135	2.61	193.3
天花粉蛋白 T11	0.0155	1.83	118.1
天花粉蛋白 TCS-W	0.0033	0.83	251.5
天花粉蛋白复合物 TCS complex	0.035	1.18	3.4
巴 I Crotin I	0.41	19.7	48.1
巴 II Crotin II	4.97	47.3	9.5
丝瓜蛋白 Luffin	0.62	13.1	21.1
丝瓜蛋白峰 III Luffin fraction III	>4.2	>12.6	inactive
苦瓜蛋白丙酮干粉	0.0046	1.56	339.1
苦瓜小分子蛋白 Low WM protein from <i>M. charantia</i>	>44.2	55.2	inactive
γ-苦瓜蛋白 γ-Momorcharin	>29.6	42.7	inactive
南方栝楼峰 V Protein fraction V from <i>T. damiaoshanensis</i>	0.026	6.32	243.1
南方栝楼峰 VI Protein fraction VI from <i>T. damiaoshanensis</i>	0.00224	>2.69	>1200.9
栝楼果子蛋白 Protein from seeds of <i>T. tricuspidata</i>	3.19	7.2	2.25
绿背桂种子蛋白 Protein from seeds of <i>E. cochinchinensis</i>	>90.0	84.0	inactive
苏木子蛋白 Protein from seeds of <i>C. sappan</i>	>119	122.9	inactive
油瓜根蛋白 Protein from roots of <i>H. macrocarpa</i>	0.083	1.44	17.4
油瓜根 II	0.01	0.187	18.7
老鼠拖瓜蛋白 Protein from roots of <i>T. ovigera</i>	0.0543	5.81	107.0
老鼠拖瓜峰 I Protein fraction I from <i>T. ovigera</i>	>2.92	>21.9	inactive
老鼠拖瓜峰 II Protein fraction II from <i>T. ovigera</i>	>4.15	—	—
老鼠拖瓜峰 IV Protein fraction IV from <i>T. ovigera</i>	>2.99	17.8	<6.0
大叶木鳖子根蛋白 Protein from roots of <i>M. macrophylla</i>	0.028	21.6	771.4
大叶木鳖子分子筛后峰 II	2.54	37.6	14.8
植藤子蛋白 Protein from <i>E. Phaseolodes</i>	1.82	63.0	34.6
植藤子 93-6-7 CM-I	2.35	19.5	8.3
植藤子 93-6-8 PCM-I	>3.83	21.8	<5.7
植藤子 CM-I 940510 峰 I	—	>3.53	—
植藤子 CM-II 940510 峰 II	>2.35	4.88	inactive
植藤子 CM-III 940510 峰 III	>6.78	15.8	inactive
植藤子 G-75 940520b	>9.0	31.4	inactive
老鼠拖冬瓜 II Protein fraction II from <i>Z. indica</i>	0.43	0.76	1.8
马干铃粗蛋白 Protein from <i>T. lepiniana</i>	0.163	0.42	2.6
马干铃 G75-CM-C50-G75	4.0	8.9	2.2
番木瓜子蛋白 Protein from seeds of <i>C. papaya</i>	>7.8	11.7	inactive
望江南(粗) Crude extract from <i>C. Occidentalis</i>	>2.25	6.56	inactive
西双版纳根 II	0.008	22.4	2800
根 2 93P39G-I	>2.85	14.9	<5.2
根 2 93P39G-II	>1.71	9.2	<5.4
根 II 心 W1 CM-I	>2.23	5.94	inactive
根 II 心 W2 CM-II	>2.2	6.3	inactive
根 II 心 W3 CM-III	>2.3	>3.45	inactive
根 II 心 G-75 峰 I	1.18	7.2	6.1
根 II 心 G-75 峰 II	>2.25	>3.38	inactive
根 II 皮 W4 皮 I	>3.5	10.0	inactive
根 II 皮 W5 皮 II	>2.35	3.41	inactive
根 II 皮 W6 皮 III	>2.77	7.0	inactive

CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; EC₅₀, 50% effective concentration; SI, Selective index.

殖的作用,但进一步纯化分离的组分却丧失了活性。不同产地提纯的 TCS、南方栝楼峰 V、南方栝楼峰 VI 均有显著的体外抑制 HIV-1 ⅢB 诱导 C8166 细胞形成合胞体的作用。图 1 显示了 TCS 抑制 HIV-1 ⅢB 诱导 C8166 细胞形成合胞体的量效关系。

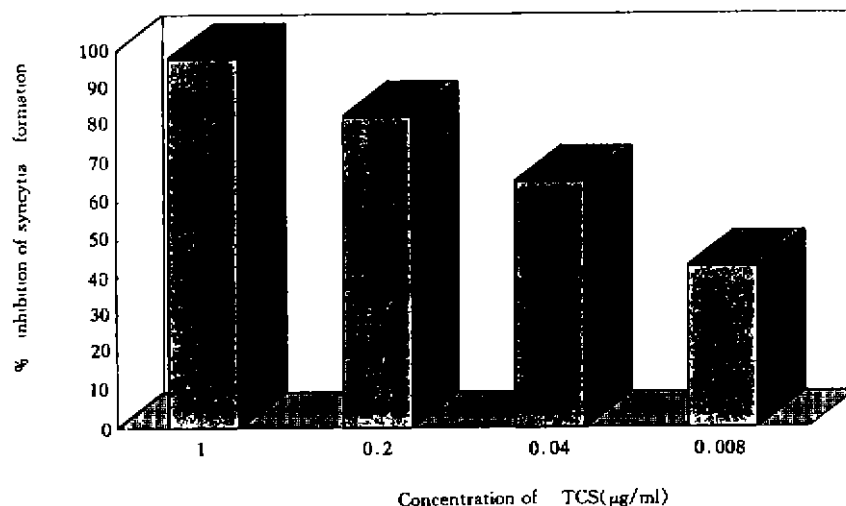


图 1 TCS 对 HIV-1 诱导 C8166 形成合胞体的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of HIV-1 inducing C8166 syncytia formation by TCS

2 RIPs 对 HIV-1 感染细胞的保护作用

HIV-1 感染某些敏感宿主细胞后,可导致绝大多数细胞死亡。因此,测定化合物对 HIV-1 感染细胞的保护作用是初筛抗 HIV 药物的另一种方法。从表 3 可见,无论以 C8166 还是 MT-4 作为 HIV-1 ⅢB 感染的宿主细胞,AZT 均能显著地保护感染细胞的死亡。DS 对感染细胞只有较弱的保护作用。对 HIV-1 ⅢB 诱导 C8166 细胞形成合胞体有显著抑制作用的核糖体失活蛋白均不能保护 HIV-1 感染细胞。

表 3 化合物对 HIV-1 感染 MT-4 和 C8166 细胞的体外保护作用

Table 3 Protection of compounds on HIV1 infected cells *in vitro*

化合物 Compounds	细胞 Cell	测定方法 Assay	CC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ (nM)	选择指数 SI
AZT	MT-4	CPE/MTT	0.125	0.1	1250
			0.045	0.06	750
	C8166	CPE/MTT	>1.87	0.138	>3740
			1.68	0.115	3907
			0.85	0.29	780
DS	C8166	CPE/MTT	0.0001	0.0058	17
TCS	MT-4	CPE/MTT	0.0012	NP*	inactive
	C8166		0.00009	NP	inactive

* NP, Protection was not detectable

3 RIPs 对 HIV 感染细胞融合的阻断作用

感染细胞表面的 HIV-1 与未感染细胞表面的 CD4 受体和辅助受体结合后,可导致细胞融合形成合胞体。作用于该靶点的药物将阻断融合的发生。TCS (7.5 µg/mL) 和其它 RIPs 均不能阻断感染细胞的融合。AZT 的作用靶点是 HIV 的逆转录酶,因此 AZT (125 µg/mL) 对

感染细胞的融合也无影响。已知作用于该靶点的 DS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 则能完全阻断融合的出现(资料未列出)。

4 RIPs 对 HIV-1 急性感染病毒复制的影响

从表 4 可见, AZT、TCS 均能显著地抑制 HIV-1 III B 在急性感染 C8166 细胞中的复制。TCS 浓度在 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, p24 抗原表达和 HIV 抗原阳性细胞分别降低了 56.2% 和 39.1%。HIV 抗原阳性细胞和 p24 抗原的表达有一定的相关性。

表 4 AZT 及 TCS 对急性感染中 HIV 复制的作用
Table 4 Effects of AZT and TCS on acute infection with HIV-1

化合物 Compounds	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞存活率 Viable cell number (% of control)	HIV 抗原阳性 细胞下降率 Decrease of HIV antigen positive cell (%)	p24 抗原表达 抑制率 Inhibition of p24 antigen expression (%)
Control	0	100.0	0	0
AZT	10.0	114	94.1	89.0
	2.0	116.3	90.1	89.5
	0.4	111.6	74.8	88.2
	0.08	137.2	68.8	85.5
TCS	5.0	39.5	71.8	86.0
	1.0	83.7	61.9	78.2
	0.2	88.4	49.0	66.6
	0.04	86.0	39.1	56.2

5 RIPs 对 HIV-1 慢性感染 p24 抗原表达的影响

理想的药物应该既能抑制急性感染又能抑制慢性感染的 HIV 复制。现在绝大多数的临床用抗 HIV 药物均不能达到这个目的。核糖体失活蛋白是否具有抗慢性感染 HIV 复制的优点? 我们检测了该类化合物对慢性感染细胞表达 HIV-1 p24 抗原水平的影响。从表 5 可见, 核糖体失活蛋白与 AZT 一样, 不影响 HIV-1 III B 在慢性感染 H9 细胞内的复制。

表 5 AZT 及 TCS 对慢性感染 p24 表达抗原水平的影响
Table 5 Effects of AZT and TCS on p24 antigen expression in chronic HIV-1 infection

化合物 Compounds	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞存活率 Viable cells (% of control)	p24 抗原水平 p24 antigen level (% of control)
Control	0	100.0	100.0
AZT	10.0	39.3	73.1
	2.0	81.1	83.0
	0.4	101.8	91.7
	0.08	97.3	102.4
TCS	5.0	3.0	67.2
	1.0	18.8	95.7
	0.2	57.1	133.2
	0.04	84.7	129.6

讨 论

从我国丰富的天然资源中寻找新药或先导化合物是一条捷径, TCS 和青蒿素就是成功范

例。我国在 RIPs 结构和功能方面的研究具有较好的基础,取得了不少重大理论和应用成果^[18]。植物来源的 RIPs 在抗 HIV 方面有独特的作用机制,从中发现新的 RIPs 作为抗 HIV 药物是完全有可能的。

我们首先以合胞体形成抑制实验作为基本初筛方法对来源于 7 科 17 种高等植物的 47 种 RIPs 类化合物或粗提物进行了筛选,每批实验均设置 AZT 为阳性对照药物。不同产地的 TCS、南方栝楼蛋白峰 V、南方栝楼蛋白 VI 均显著地抑制 HIV-1 诱导 C8166 形成合胞体;巴 II、丝瓜子蛋白、油瓜根蛋白、油瓜根 2、榼藤子蛋白及纯化成分有一定的抑制作用(SI 在 10 - 50 之间);从某些植物提取的粗提物(如老鼠拖瓜蛋白、大叶木鳖子根蛋白、西双版纳根 II 等)有显著抑制 HIV-1 增殖的作用,但进一步纯化分离的组分却丧失了活性(表 2)。这可能与样品纯化后蛋白溶解度差、反复提纯和冷冻干燥后活性损失有关。我们的实验也表明纯化的样品溶解度显著降低(资料未列出)。我们的结果还表明,除 TCS 等已知 RIPs 外,还有一些新的 RIPs 具有不同程度的抗 HIV 活性。

我们选取部分对合胞体形成有显著抑制作用的样品,观察它们对 HIV-1 感染细胞的保护作用和对共培养中融合的阻断作用。结果表明,RIPs 不能保护 HIV-1 感染 C8166 细胞的死亡。这也印证了 Ferrari 等人的实验结果,他们的实验表明 TCS 不能保护 HIV-1 感染 MT-4 细胞的死亡^[19]。此外,RIPs 也不能阻断感染细胞与非感染细胞的融合,提示 RIPs 抗 HIV 活性不是作用于病毒与宿主细胞结合这一靶点。

致谢 感谢英国 MRC 惠赠 HIV 毒株和细胞,日本北海道大学免疫科学研究所生田和良教授和群馬大学医学部卫生学和病毒学教室星野洪朗教授赠送抗 p24 McAb 和艾滋病人血清;感谢中科院昆明植物研究所周俊研究员对本研究的宝贵建议和支持,中科院福建物质结构研究所陈明晃先生提供部分样品,上海中科院生化所刘望夷研究员和蒲正先生测定 RIPs 活性。

参 考 文 献

- 1 McGrath BS, Hwang KM, Caldwell SE *et al* . GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:2844 - 2848
- 2 Kahn JO, Gorelick KJ, Gatti G *et al* . Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38:260 - 267
- 3 Lee-Huang S, Huang PL, Kung HF *et al* . TAP 29: An anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:6570 - 6574
- 4 Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL *et al* . MAP30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS letters*, 1990, 272:12 - 18
- 5 Olson MC, Ramakrishnan S, Anand R. Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibit HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1991, 7:1025 - 1030
- 6 Lee-Huang S, Kung HF, Huang PL *et al* . A new class of anti-HIV agents: GAP31, DAPs 30 and 32. *FEBS letters*, 1991, 291:139 - 144
- 7 Wachinger M, Samtleben R, Gerhauser C *et al* . Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production. *Res Exp Med*, 1993, 193:1 - 12

- 8 郑永唐, 贾昆龙. 抗人艾滋病毒的核糖体失活蛋白. 大自然探索, 1997, 12(2): 62-66
- 9 郑永唐, 贾昆龙, 王金焕等. 猴艾滋病D型逆转录病毒筛选抗艾滋病药物实验模型的建立及应用. 中国病毒学, 1997; 12: 61-65
- 10 Jin SW, Xiong BP, Cao BX *et al*. Trichohitacin - a new ribosome-inactivating protein: I. The isolation, physiochemical and biological trichohitacin. Chinese J Chem, 1997; 15: 160-168
- 11 Zhang JS, Liu WY. The mechanism of action of trichosanthin on eukaryotic ribosomes-RNA N-glucosidase activity of the cytotoxin. Nucleic Acids Res, 1992; 20: 1271-1275
- 12 Zheng YT, Zhang WF, Ben KL *et al*. *In vitro* immunotoxicity and cytotoxicity of trichosanthin against human normal immunocytes and leukemia-lymphoma cells. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1995, 17: 69-79
- 13 Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadla M *et al*. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. Science, 1990, 250: 1411-1413
- 14 Walker BD, Kowalski M, Goh WC *et al*. Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 8120-8124
- 15 Pauwels R, Balzarini J, Baba M *et al*. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. J Virol Methods, 1988, 20: 309-321
- 16 Mahmood N. Cellular assays for antiviral drugs. In: J Karn ed, HIV, Vol 2, Oxford: Oxford University 1995. 271-287
- 17 Kinchington D, Galpin S, Jaroszewski JW *et al*. A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. Antiviral Res, 1992, 17: 53-62
- 18 汪猷主编. 天花粉蛋白. 北京: 科学出版社. 1990. 1-130
- 19 Ferrari P, Traub M-A, Rommain M *et al*. Toxicity and activity of purified trichosanthin. AIDS, 1991, 5: 865-870

Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Proteins from 17 Species of Plants

Zheng Yongtang¹ Ben Kunlong¹ Jin Shanwei²

¹ (Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

² (Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract In order to find new anti-human immunodeficiency virus (HIV) ribosome-inactivating proteins (RIPs), the anti-HIV activities of 47 RIPs and crude proteins from 17 species of plants were examined by the following measurements; 1) the inhibition of syncytia formation; 2) the protection of HIV-1 infected cell; 3) inhibition of HIV-1 infected cell fusion in coculture; 4) reduction of p24 antigen expression and numbers of HIV antigen positive cells in acutely and chronically infected culture. Among 47 proteins, trichosanthin (TCS) (SI=193.3) from *Trichosanthes kirilowii*, protein fractions V (SI=243) and VI (SI>1200) from *Trichosanthes damiaoshanensis* were found to obviously inhibit syncytia formation induced by HIV-1. Croton I from *Croton tiglium*, luffin from *Luffu cylinarica*, RIPs from *Hodgsonia macrocarpa* and *Entada phaseoloides* showed slightly inhibition of the syncytia formation (SI<50). Crude protein

extracts from *Trichosanthes Ovigera*, *Momordica macrophylla* and an unnamed plant growing in Xishuangbanna district, Yunnan province, obviously inhibited syncytia formation, but proteins purified from them lost their activities. All RIPs were unable to block HIV infected cell fusion in coculture, and did not protect HIV-1 infected MT-4 or C8166 cells from dying. TCS markedly reduced both expression of p24 core protein and the numbers of HIV antigen positive cells in acutely but not chronically HIV-1 infected culture. These data suggested that in addition to TCS and the known RIPs, some of the other RIPs may have anti-HIV activity to certain extent.

Key words Human immunodeficiency virus (HIV), Anti-HIV activity, Proteins of plants, Ribosome inactivating proteins