

中药研究

用艾滋病毒和马传染性贫血病毒逆转录酶 筛选抗艾滋病毒中药的研究

中国医学科学院医药生物技术研究所(北京100050) 唐小山 陈鸿珊 张兴权
北京军区后勤部军马防治检验所 权可久 孙明

摘要 作者研究了艾滋病毒逆转录酶(HIV-RT)抑制剂PFA、Suramine对HIV-RT和马传染性贫血病毒逆转录酶(EIAV-RT)的抑制作用。对HIV-RT、EIAV-RT的50%抑制浓度(IC₅₀), PFA分别为0.2 μmol、9.8 μmol, Suramin分别为17 μmol、19.9 μmol。以HIV-RT和EIAV-RT作为靶酶,筛选了30多种中药复方、单味药提取物及中药成分,发现虎杖、田七粉等5种中药粗提物, 槲寄生黄酮、白毛夏枯草黄酮、马兜铃酸等7种成分及1种复方小柴胡汤提取物对两种酶有不同程度的抑制作用。两种酶作用平行,但不如HIV-RT敏感,表明HIV-RT可用于筛选抗艾滋病药物。

主题词 马传染性贫血病毒/药物作用 HIV-1/药物作用 逆转录酶类 药, 中草/药理学

中医中药有几千年防病治病的基础, 很多药物在临床上可治疗病毒性疾病。RS Chang、Fung Ngan、Ito M等人相继报道了用组织培养法从中药中筛选出抗艾滋病毒药物^(1,2)。但是, 因艾滋病毒(HIV)对人有感染性, HIV的细胞培养需要在严格的P₃实验室进行。马传染性贫血病毒(EIAV)与艾滋病毒同属慢病毒亚属, 有同源性。本文用艾滋病毒和马传染性贫血病毒逆转录酶(HIV-RT和EIAV-RT)验证了抗艾滋病毒药物PFA、Suramine的作用, 并筛选一些中药复方、单味药提取物和中药成分, 观察对两种病毒复制酶的作用有无平行关系, 以探讨能否应用马传染性贫血病毒逆转录酶筛选抗艾滋病毒药物。

一、材料及方法

化学试剂及化合物: Poly(rA)(dT)₁₅为西德Boehringer Mannheim公司产品; ³H TTP为Amer-

sham公司产品; DTT为美国P-L Biochemical Inc产品; PFA为瑞典Astra产品, Suramine为德国FBA产品; 艾滋病毒逆转录酶(HIV-RT)为美国Microgenysic产品。马传染性贫血病毒感染驴胚肺二倍体细胞由北京军区军马防治检验所提供。

中药: 小柴胡汤、MBAA、MBAH₁、MBAH₂为本室制备, 另外28种中药提取物、成分药均为本室保存。中药制备: 将小柴胡汤、MBAA、MBAH₁、MBAH₂各按生药100g加75%乙醇500ml浸泡过夜, 回流提取4小时, 浓缩至无醇味, 然后加蒸馏水至100ml, 加NaOH调pH至7.4, 使其完全溶解于水, 并用0.45 μm的微孔滤膜过滤, 获得含生药1g/ml的药液。MBAA、MBAH₁、MBAH₂通过冷冻干燥得干粉。

HIV-RT活性测定按D'Aquila等和Frank等方法改进^(3,4), 具体方法见另文⁽⁵⁾。马传染性贫血病毒逆转录酶(EIAV-RT)活性测定, 参照Vrang和Oberg的检测方法⁽⁶⁾。按上述方法制备的反应溶液中, 分别加入10 μl HIV-RT使终浓度达25 μg/ml或4 μl EIAV-RT稀释制品, 再分别加入不同浓度的药液, 测定³H掺入率并计算药物抑制百分率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组}(\text{cpm}) - \text{实验组}(\text{cpm})}{\text{对照组}(\text{cpm})} \times 100\%$$

二、实验结果

1. EIAV感染驴胚肺二倍体细胞动态: EIAV感染驴胚肺二倍体细胞培养提取逆转录酶, 通过测定cpm值以检测其活性, 发现自第3天起活性开始上升, 为1204 cpm, 第4天提取逆转录酶活性为11300 cpm, 第5天达高峰, 为189600 cpm, 第6天活性开始下降为15600 cpm, 第7天为14800 cpm。此表示病毒的复制高峰在第5天。因此, 我们选定感染后第

5 日的 EIAV-RT 提取物进行稀释后检测其活性剂量反应。

2. EIAV-RT 和 HIV-RT 活性剂量反应: 我们选用感染后第 5 日的 EIAV-RT 的提取物, 分别按 0.1 μ l、0.5 μ l、1 μ l、2 μ l、4 μ l、6 μ l 和 10 μ l 七个酶剂量检测 ^{3} H 掺入率, 发现 4 μ l 的 EIAV-RT 提取物有较弱的活性。同时检测了不同 HIV-RT 浓度下的 ^{3} H 掺入率, 25 μ g/ml 的 HIV-RT 显示有较弱的活性。

3. PFA、Suramine 对 HIV-RT 及 EIAV-RT 的抑制作用: PFA、Suramine 对两酶均有明显的抑制作用。PFA 对 HIV-RT 的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.2 μ mol, 对 EIAV-RT 的 50% 抑制浓度为 9.8 μ mol。Suramine 对 HIV-RT 的 50% 抑制浓度为 17 μ mol, 对 EIAV-RT 的 50% 抑制浓度为 19.9 μ mol。

4. 中药提取物对 HIV-RT 及 EIAV-RT 的抑制作用: 我们筛选了 30 多种中药复方、单味药的提取物及中药成分, 其中 500 μ g/ml 浓度下抑制率在 30% 以上者有 7 种中药成分: 槲寄生黄酮、白毛夏枯草黄酮、马兜铃酸、异黄酮、小蘗胺、厚朴酚、三七皂甙 R_1 ; 5 种中药提取物: MBAA、MBAH₁、MBAH₂、虎杖提取物及田七粉粗提取物; 1 种复方小柴胡汤提取物 (见附表)。抑制率在 30% 以下的有人参粗提取物、半夏粗提取物、甘草粗制品、大青叶粗提取物、柴胡粗提取物、猕猴桃注射液、芍药甙、栀子甙、厚朴酚、大黄酮、淫羊藿甙、鱼腥草素、鱼腥草素钠、联苯双酯、丹皮酚、复方固精灵 (主要成分是白花蛇舌草)、一叶秋碱以及石家庄中药厂产肝炎一号 (GKK)、二号 (GFL) 等。

附表 中药粗提取物及中药成分对艾滋病和马传染性贫血病毒逆转录酶的抑制作用

筛选药物	HIV-RT				EIAV-RT			
	500*	50*	5*	ED ₅₀	500*	50*	5*	ED ₅₀
槲寄生黄酮	70±6	68±16	49±12	7	70±13	63±5	39±9	30
白毛夏枯草黄酮	51±52	35±13	0	213	67±47	24±37	0	169
马兜铃酸	52±12	13±6	0	353	47±6	31±9	0	>500
小蘗胺	40±13	39±7	0	>500	40±5	37	0	>500
异黄酮	40±7	41±16	0	>500	42±2	40±11	0	>500
厚朴酚	33.20	0	0	>500	31±12	28±7	0	>500
三七皂甙 R_1	21±3	0	0	>500	46±11	31±9	0	>500
MBAA	95±2	94±5	77±13	<5	96±3	42±17	29±5	33
MBAH ₁	93±11	92±21	73±17	<5	92±11	79±5	0	19
MBAH ₂	92±11	78±13	12±9	7.7	89±13	27±4	0	109
虎杖提取物	68±8	58±7	0	86.0	58±4	40±11	0	165
田七粉粗提取物	54±13	31±1	0	228	55±12	32±7	0	213
小柴胡汤提取物	64±13	44±11	26±7		45±2	34±4	22	

注: (1) 表中数据除 ED₅₀ 外, 为不同浓度药物对两酶的抑制作用 (均值±标准差)。 (2) * 为药物浓度 (μ g/ml)

三、讨论

逆转录酶是逆转录病毒复制的关键酶, 抑制逆转录酶亦抑制病毒复制。HIV-RT 抑制剂 PFA 和 Suramine 对 HIV-RT 和 EIAV-RT 有平行的抑制作用, 但是 EIAV-RT 比 HIV-RT 的敏感性略差。我们用 HIV-RT 和 EIAV-RT 筛选了 30 多种中药提取物或成分药, 其中 13 种药对两酶有不同程度的抑制作用。槲寄生黄酮、马兜铃酸、MBAA、MBAH₁、MBAH₂、虎杖提取物等 6 种中药成分提取物及复方小柴胡汤对 HIV-RT 的抑制作用强于 EIAV-RT, 白毛夏枯草黄酮、小蘗胺、异黄酮对两酶的抑制作用大致相同, 厚朴酚、三七皂甙 R_1 对 EIAV-RT 的抑制作用

略强于 HIV-RT, 综合以上结果说明 HIV-RT 比 EIAV-RT 对药物敏感。药效判断标准以 500 μ g/ml 的药物浓度下对酶的抑制率在 30% 以上为有效。逆转录酶对 pH 值、离子浓度、温度的变化十分敏感, 如果药物浓度大于 1 mg/ml, 可能影响到反应系统的 pH 值和离子强度而出现假阳性。

由于 HIV 细胞培养对人有一定的传染性, 需要在 P₂ 实验室进行操作, 艾滋病毒逆转录酶作为试剂需要进口, 价格昂贵不易在国内推广应用。马传染性贫血病毒对人无感染性, 其逆转录酶易于提取, 药物对两酶的作用基本平行, 故认为以马传染性贫血病毒逆转录酶用于初步筛选抗艾滋病药物是可行的。

我们在实验中发现,一些对温病有效验方或古方对艾滋病毒有效。因此,我们在筛选过程中,注意从以下三个方面进行研究:(1)从温病或虚症方药中选方,或按照传统中医药学理论组方进行实验研究;(2)对已在临床试用或证明有比较可靠的抗病毒作用的方剂进行抗HIV的筛选研究;(3)对实验和临床证明有初步抗HIV的作用的方剂进行拆方,筛选有效单味中药,并进行提取分离,确定有效部分和结构,研究其构效关系,为今后化学合成和半合成新型抗艾滋病毒药物打下基础。

参 考 文 献

- (1) Chang RS, et al. Antiviral Res 1988; 9:163.
- (2) Ito M, et al. Antiviral Res 1987; 7:127.
- (3) D'Aquila RT, et al. J AIDS 1989; 2:579.
- (4) Frank KB, et al. Antimicrob Agents & Chemother 1987; 31:1369.
- (5) Tang XS, et al. Proc CAMS & PUMC 1990; 5(3): 140.
- (6) Vrang L, et al. Antimicrob Agents & Chemother 1986; 29:867.

推拿掌按振颤法治疗胸椎小关节错位

内蒙古医学院附属医院中医科(内蒙古 010059) 雷 征

胸椎小关节错位在临床中经常见到,笔者运用推拿掌按振颤手法治疗25例胸椎小关节错位,取得满意疗效,现介绍如下。

一、一般资料

25例中,男16例,女9例;年龄最大60岁,最小18岁,其中18~20岁3例,21~40岁17例,41~60岁5例。病程短则1天,长则3周;病变部位:第三胸椎6例,第四胸椎12例,第五胸椎7例。

二、诊断依据

发病前都有不同程度的闪、扭、牵拉致伤史。当天或次日胸背突然牵扯样疼痛,呼吸不畅,多数吸气疼痛加重,疼痛亦可牵扯患侧上臂,颈部。患病胸椎棘突压痛,而相邻上下棘突正常,病变棘突有不同程度侧突,亦可无侧突。前屈、后仰活动受限。

三、手法操作

患者俯卧位,错位一节胸椎前垫枕,两上肢伸向前方。医者立于患侧床沿,右手掌与脊柱成45度角平放在有病变的胸椎棘突上,左手掌交叉重叠在右手背上。施术前先嘱患者肩背部肌肉放松,深吸气,然后缓缓吐出,当即将吐净时施按压振颤,当闻及胸椎“咯答”声响后手法即告成功。

四、疗效

手法成功,侧突纠正,棘突压痛消失,活动受限解除,胸背牵扯痛立即消失为治愈。本组25例均达到治愈标准。

五、病案举例

王××,男,37岁,本院职工,1986年5月17

日就诊。昨日晨起翻身时突听“咯”的一声,自感胸憋闷,牵扯痛,呼吸困难,尤不能大口吸气,上肢、颈部活动受限。查体:头部固定于前倾位,不能随意转动,触其第四胸椎棘突压痛明显,棘突稍向右侧突,局部肌肉紧张,余(-)。诊断第四胸椎小关节错位。经掌按振颤法“咯答”一声,症状立即消失,查胸四棘突右偏矫正,错位而告治愈。

六、讨论

胸椎小关节即关节突关节,往往由于突然的外力作用,使小关节不能承受所分担的应力而引起单个或多个关节发生轻微的移位。笔者在临床中观察,发生错位关节以第三、四、五胸椎多见,单个椎体发病多,两个椎体同时发病则少。胸椎小关节错位后的关键性诊断是在有闪、扭、牵拉伤史情况下,该棘突压痛,而相邻上下棘突无压痛。周围软组织亦可无肌紧张或疼痛。运用推拿掌按振颤法手法简便,效果显著。正如《医宗金鉴·正骨心法要旨》曰“因跌仆闪失,以致骨缝错开,气血郁滞,为肿为痛,宜用按摩法。按其经络,以通郁闭之气,摩其壅聚,以散瘀结之肿,其患可愈”。

掌按振颤法的要求:一是要心明手巧,达到“机触于外,巧生于内,手随心转,法从手出”。二是要明确诊断,操作时注意手法作用部位、方向力的准确性,以及患者深吸气的配合。若手法第一次未成功,可令患者稍休息片刻,让患者放松,消除紧张感。再施行第二次手法。推拿掌按振颤法治疗胸椎小关节错位,只要诊断正确,手法得当,可在几秒钟内治愈。