

当归多糖硫酸酯抗小鼠 L6565 逆转录病毒的作用

贾敏, 姚秀娟, 杨铁虹, 孟静茹, 梅其炳*

(第四军医大学药理学教研室, 陕西 西安 710033)

摘要: 目的 观察当归多糖硫酸酯(APS)抗小鼠 L6565 逆转录病毒的作用,以探讨其治疗艾滋病的可能性。方法 用小鼠 L6565 病毒感染出生 24 h 内的乳鼠建立模型;以 RT-PCR 法测定血浆病毒载量;流式细胞术测定 CD4⁺, CD8⁺ 细胞的百分数,计算 CD4⁺/CD8⁺ 细胞的比值;镜检计数外周血白细胞、红细胞和骨髓有核细胞数;测定脾脏、胸腺的重量并计算脏体系数。结果 与正常对照组相比,模型组小鼠血浆病毒载量较高(4165 ± 198), CD4⁺ 细胞百分率(18.2 ± 4.9)、红细胞、骨髓有核细胞数及胸腺系数显著降低,而白细胞数和脾脏系数显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 10$);与模型组相比,APS 在 10 和 30 mg·kg⁻¹ 剂量下血浆病毒载量显著降低(3328 ± 103 和 3394 ± 171), CD4⁺ 细胞百分率(52.6 ± 5.8 和 57.0 ± 5.5), CD4⁺/CD8⁺ 比值(3.6 ± 0.6 和 3.4 ± 0.5)、红细胞、骨髓有核细胞数及胸腺系数显著升高,白细胞数和脾脏系数显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 10$)。结论 APS 不仅具有一定的抗病毒作用,而且对免疫功能有一定的调节作用,提示其对艾滋病可能有一定的治疗作用。

关键词: 当归多糖硫酸酯; 逆转录病毒; 免疫调节; 病毒载量

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)02-0093-05

多糖的硫酸酯化衍生物是一类具有多种生理活性的物质,如增强机体免疫功能、抗凝血、抗肿瘤、抗

病毒等,特别是其具有的抗艾滋病病毒(HIV)活性,使硫酸化多糖的研究成为多糖研究领域的新热点^[1]。关于硫酸化多糖的抗 HIV-1 作用已有很多报道^[2]。这一类药物不仅可以抑制病毒复制,而且具有良好的免疫调节作用,因此受到各国学者的重视。作者从新鲜当归中提取了水溶性当归多糖,对其进行硫酸化修饰并证实其对免疫功能有良好的促进作用^[3]。作者合成了不同取代度的当归多糖硫酸酯(Angelica polysaccharide sulfate, APS),在小鼠脾细胞增殖反应中发现取代度与增殖反应存在一定的关系,取代度增高,作用增强。许多研究亦证实,多糖硫酸酯抑制病毒作用与取代度有关,在较高取代度时抑制作用较强^[4]。因此选用取代度较高的一个产物进行试验。小鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MuLV)与 HIV 同属逆转录病毒,可诱发小鼠淋巴细胞和粒细胞白血病^[5,6],用它感染小鼠可以出现类似人艾滋病的症状,因此常被用作抗艾滋病药物的初筛实验。本研究应用 L6565 MuLV 复制小鼠逆转录病毒模型,研究当归多糖硫酸酯体内对小鼠逆转录病毒的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

APS 为本实验室合成^[3],取代度 1.57,用时以生理盐水溶解;齐多拉米双夫定(combivir, 英国葛兰素威康集团);RPMI-1640 培养液(Gibco);小牛血清(Hyclone);CD4, CD8-FITC 单克隆抗体(晶美公司);焦碳酸乙二酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)博士德生物公司;Trizol(Gibco);mRNA 选择性 PCR Ver1.1TaKaRa(Biotech);参照文献^[7]设计上游引物为 5'-GAGACTGTTGGACCAGGGAA-3'(P₁);下游引物为 5'-TTGTCCTGAGATCCCAT-3'(P₂),由上海生工生物公司合成。

1.2 病毒株

L6565 MuLV 株,由上海第二医科大学病理生理

收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-11-05

基金项目: 陕西省中医管理局基金资助项目(0347)

作者简介: 贾敏(1972-),女,黑龙江省哈尔滨人,硕士研究生,主要从事中药药理学研究;梅其炳(1954-),男,教授,博士生导师,主要从事分子药理和心血管药理研究。

*联系作者 E-mail: jiamin 30@tom.com Tel: (029) 83374555

学教研室提供。

1.3 动物与仪器

昆明种小鼠, 出生 24 h 内, 体重 1~2 g, ♀、♂ 兼用, 由第四军医大学实验动物中心提供, 生产合格证为陕动字 08-013 号。

DYY-III 2 型电泳仪(北京六一仪器厂); GeneAmp PCR System 2400 仪(Perkin Elmer); 凝胶成像仪(Alpha Innotech Corporation); 流式细胞仪(Coulter ELTTE ESP, Beckman, USA); HITACHI-CR21F 型离心机(日本)。

1.4 小鼠逆转录病毒模型的建立

采用 L6565 MuLV 复制逆转录病毒模型。参照文献[8]并改进方法感染出生 24 h 内的乳鼠, 3 周后分笼饲养; 第 4 周取部分动物测定血浆病毒载量、淋巴细胞 CD4⁺, CD8⁺ 百分数、主要免疫器官湿重、细胞计数等指标, 证实逆转录病毒模型建立成功。

1.5 当归多糖硫酸酯的治疗作用

将造模动物随机分为 5 组(每组 10 只): 模型组; APS 3, 10 和 30 mg·kg⁻¹, ip 给药; 阳性药齐多拉米双夫定 90 mg·kg⁻¹, ig 给药; 同时设正常对照组。每日给药 1 次, 连续 30 d。末次给药后检测上述指标。

1.5.1 血浆病毒载量的测定

参照文献[9]用 Trizol 试剂提取血浆中病毒 RNA, 紫外可见分光光度计对 RNA 样品进行定量和纯度检验。参照试剂盒说明进行逆转录反应, 制备 cDNA, 反应总体积为 20 μL, 加入 9.5 μL 提取的 RNA, 反应在 42℃ 孵育 45 min, 然后 95℃ 5 min 终止反应。参照试剂盒说明进行 PCR 反应, 反应体系总体积为 100 μL, PCR 反应循环参数设置为: 变性温度 92℃, 45 s; 退火温度 57℃, 45 s; 延伸温度 72℃, 1 min。共 28 个循环, 72℃ 保温 5 min。PCR 产物的定量采用琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪记录图像并对凝胶上每一条带进行光密度扫描定量, 结果以综合吸光度值(integrated absorbance, IA)表示。

1.5.2 CD4⁺ 及 CD8⁺ 淋巴细胞的测定

肝素抗凝血 100 μL, 应用 FITC 标记的 CD4、CD8 单抗, 在流式细胞仪上测定外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的百分数, 并计算其比值。

1.5.3 免疫器官重量的测定

以上各组动物活杀后取胸腺、脾脏称湿重并计算脏体系数。

1.5.4 外周血白细胞、红细胞及骨髓有核细胞计数

分别取全血 20 μL 加入 WBC 和 RBC 稀释液, 显

显微镜下计数 WBC 和 RBC; 剥离股骨, 用 Hanks 液使骨髓细胞分散成单个细胞悬液, 镜下计数骨髓有核细胞。

1.6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 SPSS 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 当归多糖对血浆病毒载量的影响

模型组血浆病毒载量较高, 条带较亮; APS 及齐多拉米双夫定组与模型组相比, 病毒载量明显降低, 条带亮度明显减弱(图 1)。定量分析结果见表 1。

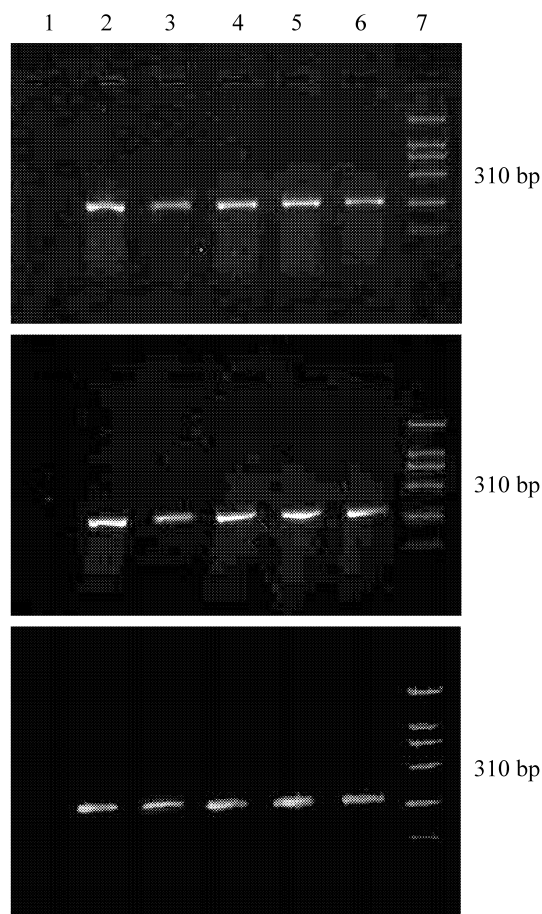


Fig 1. Effect of *Angelica polysaccharides sulfate* (APS) on viral load in mice. Lane 1: control; lane 2: model; lane 3: combivir; lanes 4-6: APS 3, 10 and 30 mg·kg⁻¹; lane 7: marker. Neonatal mice were infected with L6565 murine leukemia virus to set up model. Four weeks later, the mice were injected by APS or combivir for 30 d. Then the viral RNA in plasma was extracted by Trizol reagent and quantitative RT-PCR method was used to measure viral load in plasma.

Tab 1. Effect of APS on viral load in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	IA
Control		79 ± 26
Model		4165 ± 198 ^{**}
APS	3	3935 ± 243
	10	3328 ± 103 [#]
	30	3394 ± 171 [#]
Combivir	90	1982 ± 149 [#]

See Fig 1 for treatment. IA = integrated absorbance. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ^{**} $P < 0.01$, compared with control; [#] $P < 0.01$, compared with model.

2.2 当归多糖对淋巴细胞百分数的影响

表2结果显示,模型组 CD4⁺淋巴细胞的百分数与正常对照组相比明显降低;与模型组相比,APS在 3~30 mg·kg⁻¹范围内,CD4⁺细胞的百分数显著升高,CD4⁺/CD8⁺比值亦明显升高。

Tab 2. Effect of APS on percentage of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	CD4 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Control		33.6 ± 7.3	1.6 ± 0.4
Model		18.2 ± 4.9 ^{**}	1.4 ± 0.3
APS	3	55.8 ± 2.6 ^{**#}	3.6 ± 0.7 ^{**#}
	10	52.6 ± 5.8 ^{**#}	3.6 ± 0.6 ^{**#}
	30	57.0 ± 5.5 ^{**#}	3.4 ± 0.5 ^{**#}
Combivir	90	27.0 ± 2.1 ^{**#}	1.8 ± 0.9

The percentage of CD4⁺ cells means the number of CD4⁺ cells in total peripheral blood lymphocyte. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with control; [#] $P < 0.01$, compared with model.

Tab 4. Effect of APS on the number of WBC, RBC and marrow karyotes in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	WBC × 10 ⁻⁹ /L	RBC × 10 ⁻¹² /L	Marrow karyotes × 10 ⁻⁹ /L
Control		5.8 ± 1.2	6.6 ± 0.7	4.6 ± 0.9
Model		21.8 ± 9.7 ^{**}	5.0 ± 1.0 ^{**}	2.0 ± 0.7 ^{**}
APS	3	4.3 ± 0.9 [#]	8.5 ± 1.7 ^{**#}	2.2 ± 0.6 ^{**}
	10	5.1 ± 0.1 [#]	5.5 ± 1.6 [*]	3.2 ± 1.0 ^{**#}
	30	6.3 ± 1.4 [#]	4.8 ± 1.5 ^{**}	2.7 ± 0.6 ^{**}
Combivir	90	4.4 ± 0.9 [#]	3.1 ± 1.3 ^{**#}	2.0 ± 0.5 ^{**}

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with control; [#] $P < 0.01$, compared with model.

2.3 当归多糖对小鼠免疫器官脏体系数的影响

解剖动物肉眼可见模型组动物的脾脏、淋巴结明显肿大,个别动物脾、淋巴结异常巨大。由表3结果也可以看出,模型组小鼠的脾脏系数显著升高,而胸腺系数显著降低;与模型组相比,APS和齐多拉米双夫定均能显著降低模型动物的脾脏系数、升高胸腺系数。

Tab 3. Effect of APS on spleen and thymus index in mice

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Spleen index /mg·kg ⁻¹	Thymus index /mg·kg ⁻¹
Control		2.2 ± 0.6	2.3 ± 0.5
Model		9.1 ± 2.7 ^{**}	0.9 ± 0.5 ^{**}
APS	3	5.6 ± 0.9 ^{**#}	2.3 ± 0.7 [#]
	10	5.9 ± 1.2 ^{**#}	1.6 ± 0.5 [#]
	30	6.9 ± 1.5 ^{**#}	1.8 ± 0.6 [#]
Combivir	90	3.8 ± 0.6 ^{**#}	1.7 ± 0.5 ^{**}

$\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with control; [#] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with model.

2.4 当归多糖对白细胞、红细胞、骨髓有核细胞数的影响

表4结果显示,与对照组相比,模型组 WBC 显著升高,RBC 和骨髓有核细胞数显著降低;与模型组相比,齐多拉米双夫定及 APS 能显著降低 WBC 数;APS 分别在 3 和 10 mg·kg⁻¹剂量下显著升高 RBC 和骨髓有核细胞数;齐多拉米双夫定组骨髓有核细胞数与模型组相比没有显著差异,而 RBC 进一步显著降低。

3 讨论

艾滋病发病机制研究结果显示,即使大部分病毒从被感染的个体排除,病人的免疫系统也不能恢复到正常功能^[10]。HIV 感染引起的免疫功能异常是多方面的,其中最主要的是 CD4⁺ 淋巴细胞数减少和免疫功能下降,因此,病毒载量和 CD4⁺ 淋巴细胞计数常被临床作为 AIDS 发病和衡量治疗效果的重要指标。齐多拉米双夫定是鸡尾酒疗法的骨干药物,能有效清除病人体内的病毒。

从本研究结果看,在疗效上,齐多拉米双夫定在降低血浆病毒载量方面的作用明显优于当归多糖硫酸酯,但后者在提高 CD4⁺ 淋巴细胞数方面的作用要明显好于前者,能显著提高病毒感染小鼠 CD4⁺ 淋巴细胞数和 CD4⁺/CD8⁺ 比值,这是当归多糖硫酸酯的优势所在。在副作用方面,齐多拉米双夫定的组成成分齐多夫定和拉米夫定存在较严重的副作用,能引起贫血、中性粒细胞和白细胞减少。

本研究中观察到齐多拉米双夫定显著降低 WBC 和 RBC,恰是药物副作用的表现。遗憾的是,本研究观察到的当归多糖硫酸酯也存在一定的副作用,甚至在个别指标如脾指数的恢复上还不如齐多拉米双夫定。

总之,作者在当归多糖硫酸酯治疗艾滋病方面做了初步的探索,观察到了一定的疗效,有其自身的优势,也存在不足,其最终的治疗效果还有待临床评价。

另外,在实验中作者还观察到当归多糖硫酸酯 3 个剂量的量效关系不明显,可能主要原因为多糖类药物作用在一些观察指标上存在最适剂量,作用的强弱不一定随剂量的升高而增强,在最适剂量时作用最强,作者的其他实验也观察到类似现象。

4 参考文献:

- [1] Xiang DB, Li XY. Polysaccharide sulfate: new drugs for AIDS treatment[J]. *Foreign Med Sci (Section on Pharmacology)*(国外医学药学分册), 1992, 19(1):1-5.
- [2] Nakano M, Itoh Y, Mizuno T, Nakashima H. Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(2):267-271.
- [3] Yang TH, Jia M, Shang P, Mei QB, Zhao DH. Synthesis of *Angelica sinensis* polysaccharide sulfate and their effects on splenocyte proliferation *in vitro* [J]. *J Fourth Mil Med Univ*(第四军医大学学报), 2001, 22(5):432-434.
- [4] Zheng MS, Jiang WS, Li W, Li ST, Tiang GY, Tao YY. Experimental study on the anti-HSV- I action of *Achyranthes bidentata* polysaccharide sulfate[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 1996, 16(11):483-486.
- [5] Yin LH, Qing X, Zhao XY, Kong XS. Establishment and biological characteristics of murine L6565 leukemia cell clone[J]. *Acta Acad Med Shanghai*(上海医科大学学报), 1999, 26(Suppl):1-3.
- [6] Hu AQ, Jiang YF, Wu CG. Virological characteristics and pathogenicity of culture supernatant of L6565 leukemia clone cell[J]. *J Fudan Univ*(复旦学报), 2001, 28(4):296-299.
- [7] Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus [J]. *Nature*, 1981, 293(5833):543-548.
- [8] Li YN, Yang ZHQ, Liu JJ. L6565 Mouse leukemia induced by L6565 murine leukemia virus[J]. *Virolo Sin*(中国病毒学), 2001, 16(3):261-264.
- [9] Robert-Guroff M, Poponiv M, Cartner S, Markham P, Gallo RC, Reitz MS. Structure and expression of *tat*, *rev*- and *net*-specific type of HIV-1 in infected lymphocytes and macrophages[J]. *J Virol*, 1990, 64(7):3391-3398.
- [10] Johnston MI, Hoth DF. Present status and future prospects for HIV therapies [J]. *Science*, 1993, 260(28):1286-1292.

Antivirus effects of *Angelica* polysaccharides sulfate on L6565 murine leukemia virus

JIA Min, YAO Xiu-Juan, YANG Tie-Hong, MENG Jing-Ru, MEI Qi-Bing*

(Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: AIM To investigate the antivirus effects of *Angelica* polysaccharide sulfate (APS) on

L6565 murine leukemia virus and discuss the possibility of APS on AIDS therapy. **METHODS**

The model was set up by infecting infant mice with L6565 murine leukemia virus. Quantitative RT-PCR method was used to measure viral load in plasma. The percentage of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes was estimated by flowcytometric method and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ was calculated. The number of WBC, RBC and marrow karyote was counted, index of immune organs was weighed and calculated. **RESULTS** Compared with control, the viral load in plasma in the mice infected with the virus was at high level (4165 ± 198). The percentage of CD4⁺ lymphocyte (18.2 ± 4.9), the ratio of CD4⁺/CD8⁺, the number of RBC and marrow karyote, and thymus index were significantly decreased in the model mice, while the number of WBC and spleen index were remarkably increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, $n = 10$). But at 10 and 30 mg·kg⁻¹, compared with model, the viral load in plasma (3328 ± 103 and

3394 ± 171), WBC and spleen index were significantly decreased by APS, while the percentage of CD4⁺ lymphocyte (52.6 ± 5.8 and 57.0 ± 5.5), the ratio of CD4⁺/CD8⁺ (3.6 ± 0.6 and 3.4 ± 0.5), the number of RBC and marrow karyote was remarkably increased by APS ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, $n = 10$), some of the items even recovered to normal level. **CONCLUSION** These results suggest that APS have not only antiviral effects, but also immunomodulative effect. APS has a potential therapy effect on AIDS.

Key words: *Angelica* polysaccharide sulfate; retrovirus; immunomodulation; viral load

Foundation item: The project supported by Administration of Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province(0347)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

更 正

由于本人失误,发表在《中国药理学与毒理学杂志》2004年第18卷第6期的论文“利用细菌/杆状病毒系统在昆虫细胞中表达人类UGT1A6”(第444-448页)中,所有 V_{\max} 值的单位应更正为 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{pro.}$,特此更正。

作者 郑水莲
2005-02-23