

总结报告

实验名称：乾坤宁的抗 HIV-1 活性报告

实验起止日期：2009 年 10 月 21 日~2009 年 12 月 31 日

承接单位：中国医学科学院药物研究所

实验负责人：郭颖

地址：北京市宣武区先农坛街 1 号

电话：010-63165176

委托单位：四川恩威中医药研究开发有限公司

地址：四川省成都市高新区创业路 28 号

电话：028-81663333

目录

1.实验材料	
1.1 供试品	
1.2 对照品	
1.3 细胞株	
1.4 病毒株	
1.5 培养基	
1.6 实验用介质	
1.7 主要仪器设备及试剂	
2.实验方法	
2.1 供试品、对照品配制	
2.2 实验步骤	
2.3 考察指标及检测方法	
3.数据处理与分析	
4.实验结果	
5.实验结论	
6.参考文献	

一
医
学
分
一

实验名称 乾坤宁的抗 HIV-1 活性试验

摘要

本试验的目的是测定乾坤宁片抗 HIV-1 病毒的活性。通过将 MT-2 细胞和 HIV-1 (NL4-3) 病毒混合液加入待测的乾坤宁药液中, 37°C 培养 72 小时, 以 β -Gal 作为报告基因测定 HIV-1 的感染程度。结果显示: 乾坤宁的半数有效浓度分别为 19.9 $\mu\text{g/ml}$ 和 22.6 $\mu\text{g/ml}$ 。且其在最高浓度 (500 $\mu\text{g/ml}$) 下未检测到对 MT-2 的细胞毒性。

1. 实验材料

1.1 供试品

名称: 乾坤宁 批号: 071104
性状: 薄膜衣片剂 规格: 0.55g \times 120 片
理化性质: 味苦 贮存条件: 密封 常温
提供单位: 四川恩威中医药研究开发有限公司

1.2 对照品

名称: 齐多夫定 (Zidovudine, AZT) 有效期: 无
批号: 无 性状: 白色粉末
规格: 原料药
理化性质: 针状结晶, 无臭。 贮存条件: -80°C
生产单位: 厦门迈克制药有限公司

1.3 细胞株

名称: MT-2 细胞系 来源: 实验室自存
保存条件: 液氮

1.4 病毒株

名称: HIV-1(NL4-3) 来源: 实验室自存

保存条件: 液氮

1.5 培养基

名称: DMEM 培养基 来源: 美国 Gibco 公司

RPMI-1640

FBS

配制方法: RPMI-1640/DMEM+10%FBS

1.6 实验用介质

二甲基亚砷(DMSO) 美国 Sigma。

1.7 主要仪器及试剂

BS124S 电子天平: 德国 Sartorius 公司

离心机: 美国 Beckman 公司;

酶标仪: 美国 Molecular Devices 公司;

CO₂ 细胞培养箱: 美国 ShellAB 公司;

倒置荧光显微镜: 日本奥林巴斯公司;

2720 型 PCR 仪: 美国 ABI 公司;

Sirius 化学发光检测仪: 德国 Berthold 公司;

胰蛋白酶: 美国 Invitrogen 公司;

青链霉素: 美国 Invitrogen 公司;

胎牛血清: 美国 Gibco 公司;

细胞裂解液: 美国 Promega 公司

FluorAce β-Gal 试剂盒: 美国 Bio-Rad 公司

2. 实验方法

2.1 供试品、对照品配制

受试样品：乾坤宁片剂经研末后溶解于 PBS 溶液并高温灭菌，贮液浓度为 500 mg/mL；

对照品：称重齐多夫定并溶解于 DMSO，贮液浓度为 10 mmol/L。

2.2 实验步骤

在 384 孔培养板中先加入待测化合物，然后加入 MT-2 细胞和 HIV-1 (NL4-3) 病毒 (MOI: 0.01) 混合液，37°C 培养 72 小时，以 β -Gal 作为报告基因测定 HIV-1 的感染程度 (FluorAce β -Gal. Bio-Rad)。试验平行两孔，重复一次 (共计两次)

2.3 考察指标及检测方法

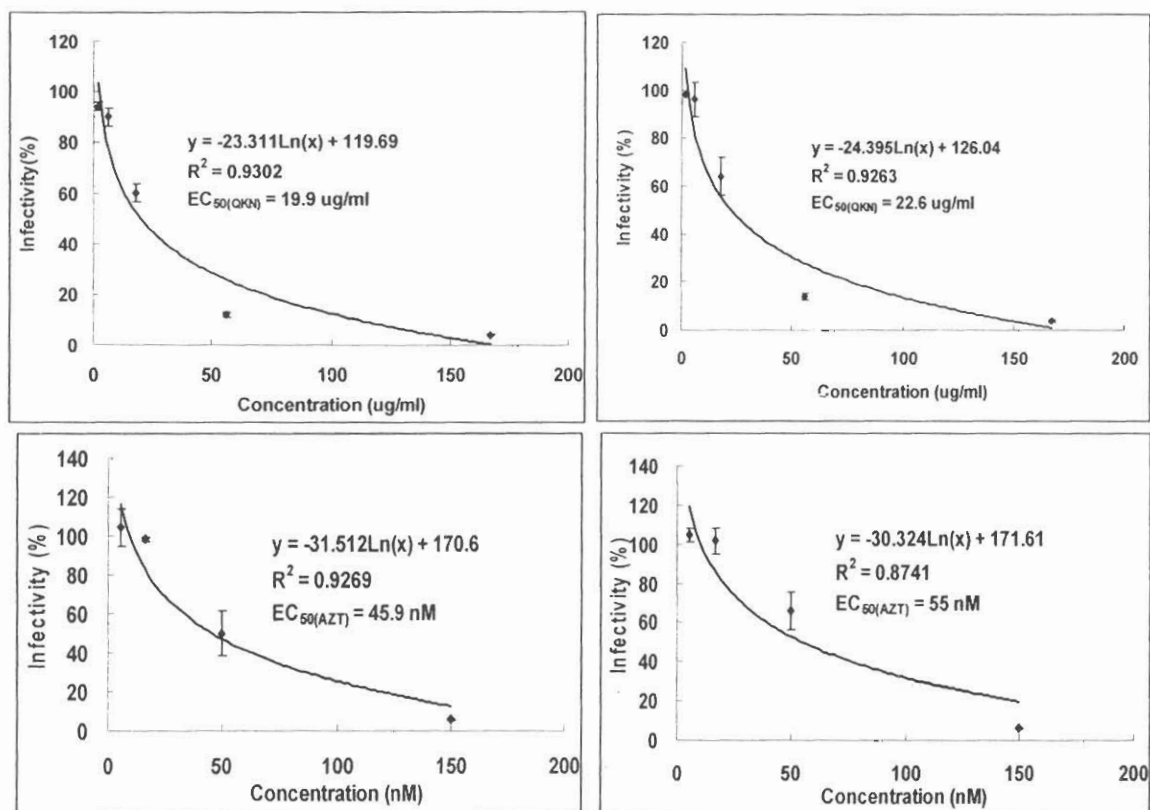
用于测定的 HIV-1 病毒携带有 β -半乳糖苷酶作为报告基因，病毒感染细胞的水平可以通过监测被感染的细胞 (MT2) 中 β -半乳糖苷酶的活性进行监测。

3. 数据处理与分析

在试验过程中测定了乾坤宁 11 个浓度下 (终浓度分别为：0、0.025、0.08、0.23、0.7、2、6.2、18.5、5.6、167、500 μ g/mL) 对 HIV-1 活病毒的作用，每个浓度平行两孔 (原始数据见附件)。通过对所测定的结果进行分析，以 2、6.2、18.5、5.6、167 μ g/mL 终浓度下的数据 (抑制率 6-96%) 进行回归 (Excel 软件) 得到方程并计算乾坤宁对 HIV-1 活病毒的半数抑制浓度。

4. 实验结果

乾坤宁的半数有效浓度分别为 19.9 $\mu\text{g/ml}$ 和 22.6 $\mu\text{g/ml}$, 阳性对照 AZT 的半数有效浓度为 45.9 nM 和 55 nM。



5. 实验结论

乾坤宁的对 HIV-1 (NL4-3) 活病毒感染 MT2 细胞的半数有效浓度分别为 19.9 $\mu\text{g/ml}$ 和 22.6 $\mu\text{g/ml}$; 在相同条件下平行测定的阳性对照 AZT 半数有效浓度为 45.9 nM 和 55 nM; 在 384 孔板中进行了细胞毒性试验 (MT-2 细胞), 结果显示乾坤宁在所测试的最高浓度 (500 $\mu\text{g/ml}$) 下未检测到细胞毒性。

6. 参考文献

无

N=1

AZT	Concentration (nM)	150	50	16.7	5.5	1.8	0.6	0.2	0.067	0.02	0.0067	0.02
		91485	731954	1742306	1712647	1662011	1575458	1551834	1644072	1657214	1582932	1768551
		104009	1017649	1714170	1956826	1799802	1723115	1545906	1571526	1839218	1725654	1744368
QKN	Concentration. (ug/ml)	500	167	56	18.5	6.17	2	0.7	0.23	0.08	0.025	0.008
	well-1	33017	54046	194592	1058899	1493534	1627746	1658418	1485316	1677264	1567648	1780540
	well-2	36226	69142	216109	978063	1580836	1589211	1590891	1537657	1684764	1731178	1631157

N=2

AZT	Concentration (nM)	150	50	16.7	5.5	1.8	0.6	0.2	0.067	0.02	0.0067	0.02
		111925	1052236	1737906	1832747	1746115	1700509	1639226	1746481	1669112	1657294	1700856
		104716	1304396	1900253	1923128	1748780	1719363	1757388	1618669	1814329	1675040	1884022
QKN	Concentration(ug/ml)	500	167	56	18.5	6.17	2	0.7	0.23	0.08	0.025	0.008
	well-1	32503	48197	236566	1100537	1589275	1631752	1677078	1691023	1853441	1700574	1764036
	well-2	31674	104475	250161	1134929	1782691	1815945	1808486	1801918	1782253	1803428	1752709

11 point, 3-fold dilution
Top con. in assay plate :

QKN :500ug/ml

AZT :150 nM

N=1												
AZT	Concentration (nM)	150	50	16.7	5.5	1.8	0.6	0.2	0.067	0.02	0.0067	0.02
		74409	76395	73102	72864	71447	71635	73974	72452	71797	71850	76061
		77636	78025	74739	73341	71191	72633	73854	73033	73264	74708	74485
QKN	Concentration (ug/ml)	500	167	56	18.5	6.17	2	0.7	0.23	0.08	0.025	0.008
	well-1	67736	78689	74328	71967	70531	71444	70672	72245	69243	72716	74514
	well-2	67376	75366	75551	72204	70375	70455	74427	71548	70769	72537	74618
N=2												
AZT	Concentration (nM)	150	50	16.7	5.5	1.8	0.6	0.2	0.067	0.02	0.0067	0.02
		76239	73220	69355	70209	67411	69982	71064	73716	69746	70780	75840
		72387	71765	71986	70173	71728	71024	76416	73458	68612	68144	74032
QKN	Concentration (ug/ml)	500	167	56	18.5	6.17	2	0.7	0.23	0.08	0.025	0.008
	well-1	67204	74645	73162	69856	69673	71989	73724	71723	71366	70529	75273
	well-2	78579	85542	81717	74947	72007	76563	81269	83168	83040	74362	81520

11 point, 3-fold dilution
 Top con. in assay plate :
 QKN : 500ug/ml
 AZT : 150 nM

