

· 实验室研究 ·

吗啡对拉米夫定抗HIV-1药效影响的体外MT2细胞实验研究

梁冰玉 庄道民 蒋俊俊 刘思扬 苏齐鉴 李敬云 梁浩

【摘要】 目的 探讨吗啡是否影响拉米夫定(3TC)抗HIV-1的抗病毒效果。方法 MT2细胞随机分为吗啡+3TC、吗啡+纳洛酮+3TC、纳洛酮+3TC处理组及3TC对照组和病毒对照组;用纳洛酮处理相应组的MT2细胞0.5 h后,加入吗啡处理细胞24 h,然后每组细胞加入等量的HIV-1 III B病毒和3TC溶液;病毒感染细胞第3、4、5和6天,取培养上清,用ELISA法检测培养上清的HIV-1 p24抗原,根据p24抗原表达量,计算各个处理组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率。结果 HIV-1感染细胞第3和第4天,吗啡+3TC处理组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率最低,与3TC对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);吗啡+纳洛酮+3TC处理组和纳洛酮+3TC处理组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率相当,两组差异无统计学意义($P > 0.05$),这两组分别与3TC对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);病毒感染细胞第5和第6天,各处理组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率与3TC对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);各个处理组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率随感染时间延长而降低,呈现时间-效应关系。结论 吗啡在病毒感染初期能降低3TC的抗HIV-1药效;纳洛酮能够阻滞吗啡降低3TC的抗HIV-1药效作用。

【关键词】 艾滋病1型病毒;吗啡;拉米夫定;抑制率

Antiviral effect of lamivudine on HIV-1 targeting MT2 cells influenced by morphine LIANG Bing-yu¹, ZHUANG Dao-min², JIANG Jun-jun¹, LIU Si-yang², SU Qi-jian¹, LI Jing-yun², LIANG Hao¹. 1 Guangxi Key Laboratory Cultivation Base of AIDS Prevention and Treatment & Department of Epidemiology of School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences

Corresponding author: LIANG Hao, Email: haolphd@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30760218) and U.S. National Institutes of Health (No. 1-R21-DA025477-01).

【Abstract】 Objective To determine whether morphine having the ability to influence the antiviral effect of lamivudine(3TC) in vitro study. **Methods** MT2 cells were randomly assigned into morphine + 3TC treatment group, morphine + naloxone + 3TC treatment group, naloxone + 3TC treatment group. Both 3TC and virus control groups were set up. The corresponding MT2 cells were treated with opiates antagonist (naloxone) for 0.5 hours before the 24-hours morphine treatment program was implemented while all of the groups were then infected with equal amounts of cell-free HIV-1 III B strain and 3TC. HIV-1 p24 antigen in culture supernatants collected at days 3, 4, 5 and 6 after infection status was tested and the inhibition of 3TC anti-HIV-1 p24 antigen of various treatment groups calculated. **Results** Inhibition of 3TC anti-HIV-1 p24 antigen of Morphine + 3TC treatment group was the lowest when HIV-1 infected cells at 3rd and 4th day and showed significant difference ($P < 0.05$) when compared to the 3TC control. However, there was no statistically significant difference among them ($P > 0.05$), when virus was infected the cells at 5th and 6th day. The difference of 3TC anti-HIV-1 p24 antigen inhibition between the morphine + naloxone + 3TC treatment group and the naloxone + 3TC treatment group was not significant ($P > 0.05$). Similar results were obtained when these two groups were compared to the 3TC control group ($P > 0.05$), respectively. The 3TC anti-HIV-1 p24 antigen inhibition of each treatment group reduced as the time of infection prolonged, showing a significant and time-course effect. **Conclusion** The 3TC antiviral effect was reduced by morphine in the early stage of infection, and could be blocked by naloxone.

【Key words】 HIV-1; Morphine; Lamivudine; Inhibition

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.07.016

基金项目:国家自然科学基金(30760218);美国国立卫生研究院资助课题(1-R21-DA025477-01)

作者单位:530021 南宁,广西艾滋病防治研究重点实验室培育基地 广西医科大学公共卫生学院(梁冰玉、蒋俊俊、苏齐鉴、梁浩);军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物安全国家重点实验室(庄道民、刘思扬、李敬云)

通信作者:梁浩,Email: haolphd@163.com

近年来以强迫用药为特征的药物滥用,尤其是阿片类毒品如海洛因、吗啡滥用呈逐年上升趋势。截至 2009 年底,全国累计登记吸毒人员 133.5 万名,其中滥用海洛因等阿片类毒品 97.8 万名,占 73.2%^[1]。我国在 2006 年以前 HIV-1 感染主要经静脉吸毒传播^[2],近年尽管 HIV-1 的传播逐渐以性传播取代吸毒传播,但目前在累计的艾滋病患者和感染者中仍以吸毒者为主,因而毒品依赖并接受抗病毒治疗的 HIV-1 感染者占抗病毒治疗患者的大部分。已有研究表明,因服药依从性差和病毒耐药性等原因,静脉吸毒者比非吸毒者的抗病毒治疗效果差^[3],具体影响机制尚不清楚。毒品是否与抗病毒药物相互作用而影响其抗病毒效果?为此,本研究通过体外研究方式观察阿片类毒品对抗病毒药抗病毒效果的影响。

材料与方 法

1. 材料:

(1) 药物和试剂: 盐酸吗啡注射液(吗啡,规格 1 ml, 10 mg)由东北制药集团公司沈阳第一制药厂生产;盐酸纳洛酮注射液(纳洛酮,规格 1 ml, 10 mg)由国药集团国瑞药业有限公司生产;拉米夫定(3TC)粉剂为上海迪赛诺生物医药有限公司生产。3TC 溶于 RPMI 1640 培养液[含青霉素 10 U/ml, 庆大霉素 50 μg/ml, 10% 胎牛血清(FBS)],使用前以 RPMI 1640 培养液稀释成所需浓度。p24 试剂盒采用法国生物梅里埃公司(Biomerieux)生产的 Vironostika HIV-1 Antigen 试剂盒。FBS 和 RPMI 1640 培养液均购于美国 Gibco 公司。

(2) 细胞和病毒: 传代人类 T 淋巴细胞系 MT2 细胞引自日本由中国军事医学科学院微生物流行病学研究所全军艾滋病检测中心(全军艾滋病检测中心)保存; HIV-1 III B 病毒(2008 年 11 月 26 日分离自河南省一名 35 岁男性艾滋病患者的外周血淋巴细胞)在全军艾滋病检测中心实验室稳定传代保存。

2. 方法:

(1) 3TC 的 IC₅₀ 和细胞毒性测定: 3TC 的 IC₅₀ 测定方法同文献[4]。药物对细胞毒性测定,取对数生长期的 MT2 细胞以每孔 5 × 10⁴ 个/ml 细胞接种到 96 孔板。加入不同稀释浓度的吗啡(10⁻¹⁴ ~ 10⁻⁶ mol/L)、纳洛酮(10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ mol/L)和 3TC 溶液(10⁻⁴ ~ 10³ μmol/L),同时设不加药物的对照组,各浓度重复 4 个孔,培养 3 d。MTT 法^[5]检测各药物浓度对 MT2 细胞的毒性,并用 Reed-Muench 法计算 CC₅₀,即对 50% 宿主细胞产生细胞毒作用时的药物浓度。

(2) 实验分组与处理: MT2 细胞随机分为 3 个处理组和 2 个对照组,即吗啡+3TC (Mo+3TC)、吗啡+纳洛酮+3TC (Mo+Nal+3TC)、纳洛酮+3TC (Nal+3TC)及 3TC 和病毒对照组。前三组用浓度分别为 10⁻¹²、10⁻¹⁰、10⁻⁸ mol/L 的吗啡对 MT2 细胞预处理 24 h,各浓度重复 3 个孔。此外,在用吗啡预处理细胞 24 h 前,于细胞培养液中加入 10⁻⁸ mol/L 的纳洛酮处理 30 min。吗啡、纳洛酮处理的浓度和时间是通过 MTT 实验后对细胞不产生毒性的浓度,且与报道的体外实验有可比性^[6]。吗啡处理 24 h 后,用浓度为 100 TCID₅₀ 的 HIV-1 III B 病毒,感染细胞 4 h,同时,除病毒对照组外其余各组加入浓度为 1/2 IC₅₀ 的 3TC 溶液。病毒感染细胞 4 h 后,用 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 3 次,以洗去游离的病毒,再加入相应浓度的吗啡、纳洛酮和 3TC 溶液。细胞感染病毒第 3 天,更换一次含有吗啡、3TC 和纳洛酮的细胞培养液。

(3) HIV-1 p24 抗原的检测: MT2 细胞病毒培养第 3、4、5 和 6 天每孔收集培养上清 200 μl,检测 HIV-1 p24 抗原,检测方法按照试剂盒说明书。3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率(%)=[(病毒对照组 pg 值-给药组 pg 值)/病毒对照组 pg 值] × 100%。

3. 统计学分析: 以上试验均重复 3 次,计算出每个处理组 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率(%, $\bar{x} \pm s$),然后用 Student-t 检验和方差分析(ANOVA)比较处理组间,以及处理组和对照组间差异是否有统计学意义。采用 SPSS 13.0 统计软件。

结 果

1. 3TC 的 IC₅₀ 和细胞毒性测定: 经计算,3TC 的 IC₅₀ = 0.32 μmol/L,所以 1/2 IC₅₀ 的 3TC 浓度为 0.16 μmol/L。本实验所使用的吗啡、纳洛酮和 3TC 对 MT2 细胞均无毒性作用。

2. 吗啡对 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率的影响: 如表 1 所示, HIV-1 感染 MT2 细胞第 3 天, Mo+3TC 组 3 个浓度的 p24 抗原表达量均大于 3TC 对照组,且 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率均低于 3TC 对照组,差异有统计学意义(P < 0.05); HIV-1 感染 MT2 细胞第 4 天, Mo+3TC 组 10⁻¹² 和 10⁻¹⁰ mol/L 两个浓度的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率与 3TC 对照组相比,差异有统计学意义(P < 0.05),但该处理组内浓度为 10⁻⁸ mol/L 的吗啡对 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率无影响,与 3TC 对照组相比差异无统计学意义(P > 0.05); HIV-1 感染 MT2 细胞第 5、6 天, 3 个处理组的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率与 3TC 对照

表 1 处理组和对照组 p24 抗原表达 ($\times 10^{-1}$ ng/ml, $\bar{x} \pm s$) 及 3TC 对 HIV-1 p24 抗原的抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

感染时间 (第 n 天)		处理组(吗啡浓度: mol/L)				对照组(吗啡浓度: mol/L)		
		Mo+3TC			Mo+Nal+3TC	Nal+3TC	3TC	病毒
		10^{-12}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-10}	0	0	0
3	p24 抗原	2.94±0.41	3.28±0.40	2.54±0.58	1.59±0.34	1.44±0.46	1.38±0.34	8.95±1.75
	抑制率	65.56±10.50	61.98±9.15	69.97±12.00	81.55±6.58	82.94±8.84	83.79±6.58	-
	t 值	4.61	5.72	3.33	0.85	0.26	-	-
	P 值	<0.01	<0.01	<0.01	0.41	0.80	-	-
4	p24 抗原	16.11±3.75	17.95±4.15	16.21±6.24	11.16±2.14	11.13±3.64	11.61±1.99	35.14±2.62
	抑制率	53.82±11.02	48.39±11.02	52.90±12.12	68.15±6.00	65.91±9.71	66.69±6.35	-
	t 值	2.77	3.55	2.09	0.53	0.31	-	-
	P 值	0.01	0.03	0.053	0.60	0.75	-	-
5	p24 抗原	69.35±10.74	71.18±10.70	65.29±11.09	69.19±11.65	67.59±8.73	67.50±13.82	139.13±22.75
	抑制率	48.88±11.57	47.67±11.87	52.63±12.89	48.87±11.76	50.34±10.9	50.37±14.06	-
	t 值	0.25	0.48	0.22	0.25	0.02	-	-
	P 值	0.80	0.60	0.83	0.80	0.98	-	-
6	p24 抗原	264.0±34.3	280.4±29.1	262.3±43.2	268.9±42.6	253.03±33.7	257.2±39.2	413.7±18.2
	抑制率	36.25±7.82	32.26±6.02	36.71±9.90	35.09±9.54	38.91±6.90	37.94±9.16	-
	t 值	0.46	1.62	0.27	0.69	0.31	-	-
	P 值	0.65	0.12	0.79	0.50	0.76	-	-

注:以三次实验的 p24 抗原抑制率的均数±标准差表示,经 Student-t 检验,比较不同处理组与 3TC 对照组的差异,以 t、P 值表示

组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3. 纳洛酮对吗啡降低 3TC 药效的阻滞作用:由图 1A、B 可见, HIV-1 感染 MT2 细胞第 3 和 4 天, Mo+3TC 组的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率明显低于 Mo+Nal+3TC、Nal+3TC 组和 3TC 对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 Mo+Nal+3TC 组和 Nal+3TC 组分别与 3TC 对照组的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

HIV-1 感染 MT2 细胞第 5 和 6 天, Mo+3TC 组的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率与 Mo+Nal+3TC、Nal+3TC 组和 3TC 对照组分别相比,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1C、D)。

4. 吗啡对 3TC 抗病毒药效影响的时间-效应关系:由表 1 和图 2 可见,从 HIV-1 感染 MT2 细胞第 3 天到第 6 天,各处理组的 p24 抗原表达量逐日增加,而各处理组的 3TC 抗 HIV-1 p24 抗原抑制率逐日下

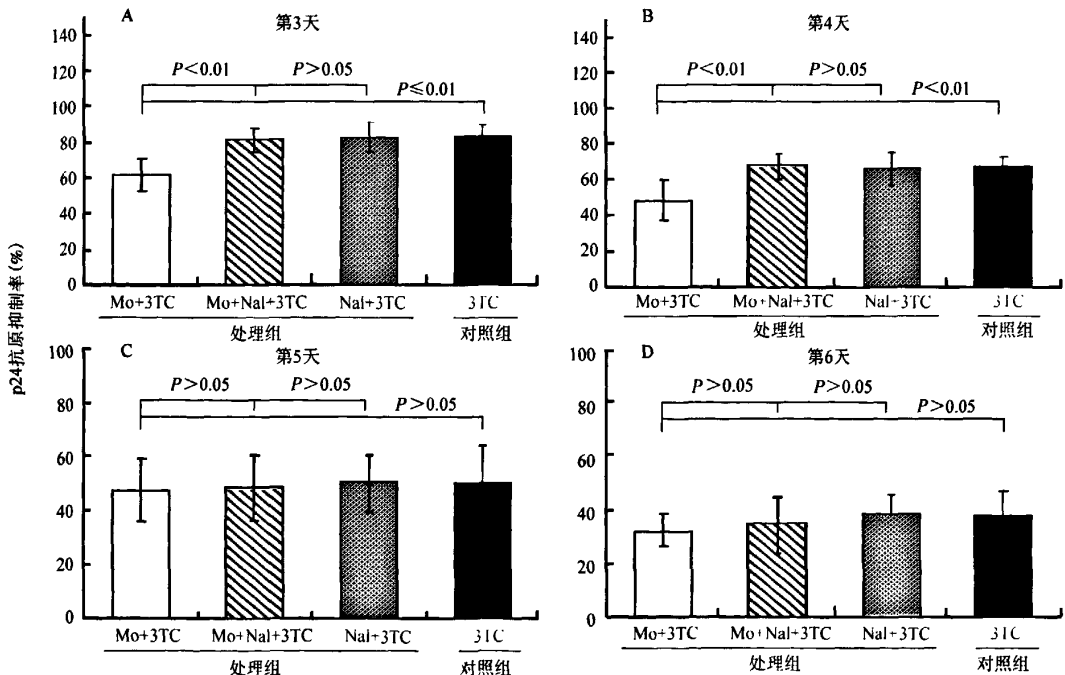


图 1 纳洛酮对吗啡降低 3TC 药效的阻滞作用

降,呈现时间-效应关系;Mo+3TC组的3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率与3TC对照组相比,差异逐渐减少(从第3天的差异有统计学意义到第6天的差异无统计学意义)。

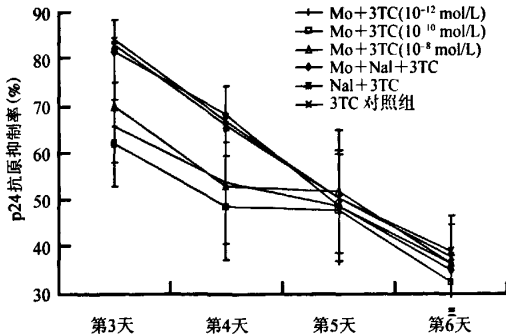


图2 吗啡对3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率的时间-效应关系

讨论

3TC可阻断反转录酶活性有效抑制HIV-1的复制,是目前治疗艾滋病的首选药物;MT2细胞是人T淋巴细胞,易感染HIV,是目前用于筛选和评价体外抗HIV药物较好的细胞模型之一^[7]。为此,本研究运用体外研究模型,选取MT2细胞,以及我国流行毒株HIV-1 III B构建细胞-病毒培养系统,加入阿片类毒品吗啡和抗HIV病毒药3TC,观察吗啡对3TC抗HIV药效的影响。

流行病学调查发现,鸦片依赖能增加HIV感染者体内的病毒载量,并促进病程和显著性增加死亡率^[8]。有临床研究报道,频繁使用阿片类毒品(如吗啡、海洛因),更易感染HIV^[9]。动物实验结果表明,吗啡依赖的恒河猴体内病毒载量高于非鸦片依赖猴^[10]。体外研究显示,阿片类毒品美沙酮和吗啡能够促进HIV在免疫细胞内的复制^[11]。本研究结果显示,一定浓度的吗啡能够降低3TC的抗HIV-1 p24抗原。由此可推测吗啡能够促进HIV感染免疫细胞,并促进HIV在细胞内复制,提示吗啡可能通过降低免疫MT2细胞的抗病毒免疫功能,促进HIV-1感染MT2细胞,并促进HIV-1在细胞内的复制,最终使病毒-细胞培养系统的病毒量增加,HIV-1 p24抗原表达增加,而表现出3TC抗HIV-1 p24抗原抑制率降低。本文结果可解释流行病学研究结果:在接受抗病毒治疗患者中,阿片类毒品(可卡因)依赖的HIV感染者其病毒载量具有高于非依赖者的特征^[12]。

本研究发现,含有阿片受体阻滞剂的纳洛酮能够阻滞吗啡降低3TC药效的作用,提示吗啡可能是通过阿片受体作用于MT2细胞,促进HIV-1在免疫细胞

内的复制,从而降低3TC的抗病毒药效。此结果与Wang等^[13]的研究一致,表明吗啡可能是通过促进HIV感染和复制而降低抗病毒药3TC的抗病毒效果。

本研究还发现,各处理组培养上清的HIV-1 p24抗原随着培养时间的延长而增加,而3TC的抗HIV-1 p24抗原抑制率随着培养时间的延长而降低,呈现时间-效应关系。提示吗啡降低3TC的抗病毒效果随着病毒感染时间的延长而有减弱的趋势。

综上所述,吗啡可能是通过促进HIV-1 III B感染MT2细胞,并促进病毒在MT2细胞内复制,增加HIV-1的病毒载量,从而降低3TC的药效。研究结果为阿片类毒品依赖合并HIV感染者的抗病毒治疗方案的调整和防治HIV-1感染的宣传教育提供参考。

参考文献

- [1] National Narcotics Control Commission. Annual report on drug control china 2010[N/OL]. [2010-6-20]. Available from: http://china.rednet.cn/c/2010/06/25/1991969_7.htm. (in Chinese) 国家禁毒委员会办公室. 2010 中国禁毒报告 [N/OL]. [2010-6-20]. http://china.rednet.cn/c/2010/06/25/1991969_7.htm.
- [2] Wang N. Some new trends of HIV/AIDS epidemic in China. Chin J Epidemiol, 2010, 31(11): 1205-1209. (in Chinese) 汪宁. 中国艾滋病流行的一些新动向. 中华流行病学杂志, 2010, 31(11): 1205-1209.
- [3] Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Differences in HIV disease progression by injecting drug use in HIV-infected persons in care. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004, 35(1): 46-51.
- [4] Li J. Research on regularity of molecular evolution of drug resistance for HIV-1 from countryside in central China. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2007. (in Chinese) 李珏. 我国中部农村 HIV-1 耐药性及分子进化规律研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007.
- [5] Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, et al. Wilm's tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium derived factor in a xenograft model. J Pediatr Surg, 2003, 38(3): 336-342.
- [6] Wang X, Douglas SD, Peng JS, et al. An in vitro model of morphine withdrawal manifests the enhancing effect on human immunodeficiency virus infection of human T lymphocytes through the induction of substance P. Am J Pathol, 2006, 169(5): 1663-1670.
- [7] Miao WQ, Li JY. Screening and evaluating system of anti-HIV drugs. Foreign Med Sci Sec Phar, 2007, 34(3): 170-173. (in Chinese) 苗文泉, 李敬云. 抗 HIV 药物筛选评价方法. 国外医学药学分册, 2007, 34(3): 170-173.
- [8] Stefano GB, Salzet M, Bilfinger TV. Long-term exposure of human blood vessels to HIV gp120, morphine, and anandamide increases endothelial adhesion of monocytes: uncoupling of nitric oxide release. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 31(6): 862-868.
- [9] Kumar R, Orsoni S, Norman L, et al. Chronic morphine exposure causes pronounced virus replication in cerebral compartment and accelerated onset of AIDS in SIV/SHIV-infected Indian rhesus macaques. Virology, 2006, 354: 192-206.
- [10] Riazi M, Marcario JK, Samson FK. Rhesus macaque model of chronic opiate dependence and neuro-AIDS: longitudinal assessment of auditory brainstem responses and visual evoked potentials. J Neuroimmune Pharmacol, 2009, 4(2): 260-275.
- [11] Li Y, Wang X, Tian S, et al. Methadone enhances human immunodeficiency virus infection of human immune cells. J Infect Dis, 2002, 185: 118-122.
- [12] Baum MK, Rafie C, Lai S, et al. Crack-cocaine use accelerates HIV disease progression in a cohort of HIV-positive drug users. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009, 50(1): 93-99.
- [13] Wang X, Tan N, Douglas SD, et al. Morphine inhibits CD8⁺ T cell-mediated, noncytolytic, anti-HIV activity in latently infected immune cells. J Leukoc Biol, 2005, 78(3): 772-776.

(收稿日期: 2010-12-27)

(本文编辑: 张林东)