

· 药理实验与临床观察 ·

大蒜新素预防和治疗鼠巨细胞病毒性肝炎的实验研究

刘志峰, 方 峰, 董永绥, 李 革*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 儿科临床病毒研究室, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨大蒜新素在体内对鼠巨细胞病毒 (murine cytomegalovirus, MCMV) 感染小鼠的预防及治疗作用。方法 建立 BALB/c 小鼠 MCMV 重组病毒 (插入 LacZ 基因) 性肝炎模型, 采用 X-gal 染色测定 β -gal 在肝、肾及肺组织中的表达。70 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为大蒜新素预防+ 治疗组 ($n=20$), 大蒜新素治疗组 ($n=20$), 更昔洛韦治疗组 [$60\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, $n=10$], 安慰剂组 ($n=10$) 及空白对照组 ($n=10$)。其中前两组又各均分为低、高剂量组 [$25, 75\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 检测血浆丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平和评估肝组织组织学活动性指数 (HAI), 并用原位杂交法检测肝组织中 MCMV DNA 水平。结果 大蒜新素预防+ 治疗组及治疗组与安慰剂组相比较, ALT、肝脏 HAI 评分及 MCMV DNA 杂交的积分光密度均明显降低 ($P<0.05$), 与更昔洛韦治疗组相比无显著差异; 大蒜新素预防用药及加大用药剂量并不能显著降低 ALT、肝脏 HAI 评分及 MCMV DNA 积分光密度水平。结论 大蒜新素能减轻 MCMV 性肝炎模型鼠肝功能损害, 改善肝脏病理变化和降低肝组织内病毒 DNA 负荷量, 其治疗效果与更昔洛韦无显著差异, 大蒜新素预防用药及加大用药剂量不能增加其病毒抑制效应。

关键词: 大蒜新素; 鼠巨细胞病毒; 原位杂交

中图分类号: R286.87

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)06-0529-04

Experimental study on phylactic and therapeutic ability of allitridin to murine cytomegalovirus hepatitis

LIU Zhi-feng, FANG Feng, DONG Yong-sui, LI Ge

(Laboratory of Pediatric Clinical Virology of Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Object** To investigate the phylactic and therapeutic ability of allitridin to murine cytomegalovirus (MCMV) *in vivo*. **Methods** A MCMV hepatitis model using BABL/c mice was established with recombination of MCMV RM461 strain (LacZ gene carried). X-gal staining was used to detect the express of β -gal in liver, kidney and lung. Seventy female mice were allocated randomly into allitridin phylaxy+ therapy group ($n=20$), allitridin therapy group ($n=20$), Ganciclovir therapy group [$60\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] ($n=10$), placebo treated group ($n=10$) and control group ($n=10$). The first two groups were divided into two subgroups: low and high dosage [$25, 75\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] subgroups. Drug was initially used 48 h before virus infection in phylaxy+ therapy group, and 48 h after virus infection in therapy group. After treated for 14 d or 18 d, all mice were sacrificed, alanine aminotransferase (ALT) and histological activity index (HAI) of liver tissue slides were recorded, MCMV DNA load was also detected by in situ hibirdization on liver tissue slides. **Results** ALT, HAI and integral photo density of MCMV DNA of all allitridin-treated groups were significantly reduced when comparied with placebo group ($P<0.05$) and no significant deviation comparied with Ganciclovir therapy group; ALT, HAI and MCMV DNA accumulated optical density had not been significantly reduced by phylaxic using and higher dosage of allitricin. **Conclusion** Allitricin can alleviate liver lesion, lighten liver histological pathology change and reduce MCMV DNA load of liver tissue in MCMV hepatitis model, its effect is similar to that of Ganciclovir. The phylaxic usage and higher dosage seem contribute little to allitridin's anticytomegalovirus activity *in vivo*.

Key words: allitridin; murine cytomegalovirus (MCMV); in situ hibirdization

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属于疱疹病毒科, 为线状双链 DNA 病毒,

* 收稿日期: 2002-10-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070928)

作者简介: 刘志峰 (1970—), 男, 湖北人, 华中科技大学同济医学院博士, 主要从事小儿感染研究工作。

Tel: (027) 83663579 E-mail: liu8917@163.com

具有潜伏-活化的生物学特性。CMV 感染在我国相当普遍,多在婴幼儿期发生,是婴幼儿肝脏损害的主要病因之一,患儿出现肝大或质地异常,ALT 升高,可伴有黄疸^[1]。大蒜为传统的食品,其药用价值早为人知,近年来发现大蒜及其制品有抗 CMV 活性^[2~4]。大蒜新素为大蒜鳞茎提取物,是大蒜主要有效成分之一,其分子式为 $C_6H_{10}S_3$ 。本实验旨在进一步探讨大蒜新素在体内预防和治疗巨细胞病毒感染的效应。

1 材料与方法

1.1 病毒: MCMV RM 461 毒株由美国德克萨斯大学健康卫生科学中心的 Sally 博士惠赠,在本室自制的 MEF 传代细胞中传代适应。

1.2 试剂及药物: 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷 (X-gal) (Sigma 公司), 大蒜新素 (大蒜素注射液, 上海禾丰制药公司, 批号 010501), 更昔洛韦 (丽珠集团湖北科益制药有限公司, 批号 000602), 地高辛标记及检测试剂盒购自美国 Roche 公司, 甲基强的松龙 (比利时法玛西亚普强公司, 批号 HH0196)。

1.3 质粒: 含 MCMV IE 片段的重组质粒 pSG5mIE1 由美国水牛城 Roswell Park 癌症中心李红博士惠赠。

1.4 动物: 4~6 周龄, 雌性 BALB/c 小鼠 20 只, 体重 9~11 g, 购于湖北省医学科学院纯种动物室。饲养在同济医院动物室洁净层柜内。

1.5 主要设备: CO₂ 培养箱 (美国产 Model 2300 型), 血生化自动化分析仪 (美国产 AU100 型), 显微镜图像分析仪 (HPIAS-1000 医学彩色图像分析系统)。

2 方法

2.1 MCMV 性肝炎鼠模型的建立: 给 20 只 BALB/c 小鼠 im 甲基强的松龙 (100 mg/kg) 每 4 天 im 1 次, 以接种病毒之日为 0 d, 在接种病毒前 2 d 开始给药, 即于 -2, 2, 6, 10 d 给药^[5,6], 于免疫抑制后 2 d (即 0 d 时) 腹腔接种 1×10^6 PFU 病毒悬液。

2.2 大蒜新素应用剂量的确定及毒性观察: 按人和小鼠间的剂量换算公式^[7] 计算得小鼠用药的低、高剂量分别为 25, 75 mg/(kg·d), 更昔洛韦的剂量为 60 mg/(kg·d)。随机选取 5 只小鼠, 如前方法免疫抑制, 不给病毒, ip 大蒜新素 75 mg/(kg·d), 共用 18 d 后处死小鼠, 取血进行肝功能测定及肝组织切片 HE 染色以观察大蒜新素的毒性反应。

2.3 动物分组: 70 只 BALB/c 小鼠在免疫抑制 (方法同 2.1) 的基础上随机分为大蒜新素预防+

治疗高、低剂量组、大蒜新素治疗高、低剂量组、更昔洛韦治疗组、安慰剂组、空白对照组, 每组 10 只小鼠。预防+ 治疗组于病毒感染前 48 h 开始用药, 治疗组于病毒感染 48 h 后开始用药, 安慰剂组于病毒感染 48 h 后开始给予等量生理盐水, 空白对照组不感染病毒, 仅与安慰剂组同期给予生理盐水。

2.4 标本收集: 在治疗组完成 14 d 疗程后同时处死全部小鼠, 眼眶静脉取血, 肝素抗凝, 离心取血浆, 于 -20℃ 保存备用。同时取肝脏右叶冰冻切片及石蜡包埋切片。

2.5 观察指标

2.5.1 一般情况: 每天测量小鼠体重, 观察其体毛、食欲、活动变化情况, 进行详细记录。

2.5.2 小鼠组织中 MCMV 感染情况: 小鼠肝、肾、肺组织冰冻切片进行 X-gal 染色, 显微镜下观察到淡蓝色细胞斑点即为 RM 461 病毒感染细胞。计每低倍视野染色斑点个数。

2.5.3 肝功能测定及肝组织病理检查: 取上述血浆标本用 AU100 自动生化分析仪测定 ALT 水平, 肝组织切片经 HE 染色, 显微镜下观察肝脏病理改变, 记录 Knodell 肝组织病变活动性积分 (HAI)^[8,9]。

2.5.4 肝组织切片中 MCMV IE 基因的原位杂交检测: 按冯作化等^[10] 所述原位杂交的方法, 以 MCMV IE 片段作为探针, 运用地高辛标记及检测试剂盒对肝组织切片进行 MCMV DNA 原位杂交检测, 核固红复染, 设不加探针为阴性对照。用显微镜图像分析仪对切片进行图像分析, 所有切片均在同一放大倍数 ($\times 200$) 及同一光强度下分析, 每张切片随机分析 10 个视野, 分别测肝组织阳性细胞积分光密度, 取平均值。

2.6 统计学处理: 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间用方差分析和 q 检验, 两组比较用 t 检验, 用相关系数检测指标间的相关性, 皆以 SAS 统计软件处理。

3 结果

3.1 一般情况: 安慰剂组小鼠出现体重不增, 毛稀松、生长迟缓、食欲差、活动少等表现, 大蒜新素各组 and 更昔洛韦治疗组小鼠一般情况良好, 未发现以上异常情况。

3.2 毒性观察: 取 5 只小鼠仅给大蒜新素 75 mg/(kg·d), 共用 18 d, 肝切片 HE 染色未见明显病理变化, 血浆 ALT 平均值 42.00 ± 13.00 , 与空白对照组 40.70 ± 12.02 相比无显著差异。

3.3 小鼠组织中 MCMV 感染情况: 肝、肺、肾组织冰冻切片 X-gal 染色可见淡蓝色斑点, 其中以肝脏

切片 X-gal 染色淡蓝色斑点为多。

3.4 各组 HAI 评分、ALT 及肝组织内 MCMV DNA 水平比较: 大蒜新素各预防+ 治疗组、治疗组及更昔洛韦治疗组 HAI 评分、ALT 及肝组织内 MCMV DNA 水平与安慰剂组相比均明显降低

表 1 各组 HAI 值、ALT 含量及肝组织内 MCMV DNA 积分光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of HAI, ALT and MCMV DNA integral photodensity in liver tissues among all groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 $I/(mg \cdot kg^{-1})$	ALT		HAI	积分光密度
		$I/(U \cdot L^{-1})$	范围		
大蒜新素预防+ 治疗	75	53.3 ± 17.94	(36 ~ 85)	2.8 ± 1.93*	118.84 ± 44.82*
	25	61.8 ± 12.73	(45 ~ 86)	3.2 ± 1.99*	134.84 ± 44.51*
大蒜新素治疗	75	61.0 ± 13.87	(45 ~ 91)	3.2 ± 1.62*	131.54 ± 94.60*
	25	62.4 ± 13.38	(50 ~ 81)	3.5 ± 1.65*	137.92 ± 66.45*
更昔洛韦治疗	60	62.0 ± 12.68	(39 ~ 81)	2.6 ± 1.51*	134.62 ± 60.83*
安慰剂	-	97.0 ± 44.98	(58 ~ 201)**	6.7 ± 2.83**	220.86 ± 108.00**
空白对照	-	40.7 ± 12.02	(24 ~ 58)	0	0

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与安慰剂组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.05$ vs placebo group

4 讨论

CMV 是胎儿、新生儿及免疫功能不全者 (如器官移植者、恶性肿瘤放、化疗后及 HIV 患者等) 的重要致病因子。但由于 CMV 病毒具有严格的种特异性, 不可能在动物模型上研究抗 HCMV 药物的疗效。而 MCMV 和 HCMV 在基因及核酸水平有很多相似性, 在 HCMV 中存在的人类基因类似物在 MCMV 中亦同时存在^[11]。MCMV 感染和 HCMV 感染亦非常相似, 在免疫功能不全小鼠可致急性感染或死亡, 在免疫功能正常小鼠易造成慢性感染, 且在急性感染小鼠组织中 MCMV 维持较高水平, 这对于观察药物抑制 MCMV 作用提供了良好的模型。MCMV 鼠感染模型已多次运用于抗病毒药物的研究^[12~14]。在本实验中, 我们利用免疫抑制小鼠成功地制造出 MCMV 性肝炎小鼠模型。

大蒜新素在体内的抗 CMV 作用已被多次实验证实, 对于大蒜新素在体内的抗 CMV 作用, 国内有一些探索^[2~4], 但由于上述研究观察指标有限或没有设置其他药物对照, 其结果缺乏说服力。本实验通过观察大蒜新素对 MCMV 肝炎小鼠肝功能、肝组织病变及肝组织内病毒 DNA 负荷量的影响, 并以具有良好抗 CMV 效应的更昔洛韦作为对照, 进一步探讨大蒜新素在整体水平预防和治疗巨细胞病毒感染的效应。结果显示, 大蒜新素在 MCMV 性肝炎小鼠模型中, 可显著改善小鼠肝功能及肝脏组织病变, 降低肝组织中 MCMV DNA 负荷量, 其治疗效应和更昔洛韦相比无显著差异, 证实大蒜新素在体内具有和更昔洛韦相似的抗 CMV 作用。但高剂量

($P < 0.05$); 大蒜新素各预防+ 治疗组、治疗组 HAI 评分、ALT 及肝组织内 MCMV DNA 水平与更昔洛韦治疗组之间比较无显著差异; 在大蒜新素各预防+ 治疗组及治疗组之间 HAI 评分、ALT 及肝组织内 MCMV DNA 水平亦无显著差异, 见表 1。

药物效应并不优于低剂量, 增加预防用药亦不优于感染后开始用药。由于小鼠静脉用药困难, 本实验采用了 ip 这一非正常途径用药, 加之大蒜新素局部刺激性大, 在一定程度上可能影响了大蒜新素的生物利用; 本实验使用大蒜新素 2 周末能清除小鼠体内病毒, 长期用药能否清除有待进一步观察。

大蒜新素的副作用包括致实验动物血红蛋白合成减少、溶血及贫血^[15]。Alnaqeeb^[16] 等发现小剂量大蒜提取液 [50 mg/(kg · d)] 不会导致大鼠肝脏及肺明显的病理变化, 而超大剂量大蒜提取液 [500 mg/(kg · d)] 可导致大鼠肝脏及肺组织发生明显的病理变化。大蒜提取液为大蒜鳞茎的粗提液, 其成分复杂, 对机体影响大, 而大蒜新素为大蒜的有效成分, 药效提高, 对机体影响减小。本实验所用高剂量大蒜新素 [75 mg/(kg · d)] 为 Alnaqeeb 等所用大蒜提取液小剂量的 1.5 倍, 用药 18 d 未发现肝脏有明显病理变化。提示大蒜新素低剂量和高剂量应用于小鼠都是安全的。

和目前临床应用的抗 CMV 药物相比, 大蒜新素有副作用小、价格便宜的优点, 特别对小儿更易耐受, 显示出良好的临床应用前景。

References:

[1] Fang F, Dong Y S, Wei Q, *et al.* A prospective study of liver impairment caused by cytomegalovirus in infancy [J]. *Chin J Pediatr* (中华儿科杂志), 1995, 33(6): 350.
[2] Guo N L, Lu D P, Woods G L, *et al.* Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus *in vitro* [J]. *Chin Med J (Engl)* (中华医学杂志英文版), 1993, 106(2): 93-96.
[3] Meng Y S, Lu D P, Guo N L, *et al.* Anti-human cytomegalovirus effect of allitridin and its use in bone marrow transplantation [J]. *Chin J Hemato* (中华血液学杂志), 1992, 13

- (12): 627-629.
- [4] Fang F, Dong Y S, Li H, *et al.* Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with Allitridin Injection: an experimental study [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1999, 19: 271-275.
- [5] Duan Y, Hernandez R, Pang L, *et al.* Spread of murine cytomegalovirus to inner ocular structures following disruption of the blood-retina barrier in immunosuppressed BALB/c mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(5): 935-940.
- [6] Atherton S S, Newell C K, Kanter M Y, *et al.* T cell depletion increases susceptibility to murine cytomegalovirus retinitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33 (12): 3353-3360.
- [7] Xu S, Bian R L, Chen X, *et al.* *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [8] Knodell R G, Ishak K G, Black W C, *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [J]. *Hepatology*, 1981, 1: 431-435.
- [9] Desmet V J, Gerber M, Hoofnagle J H, *et al.* Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. *Hepatology*, 1994, 19: 1513-1520.
- [10] Feng Z H, Huang Fu Y M, *Basic Experimental Techniques in Molecular Biology* (分子生物学基本实验技术) [M]. Wuhan: Tongji Medical University Publishing House, 2000.
- [11] Rawlinson W D, Farrell H E, Barrell B G. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus [J]. *J Virol*, 1996, 70 (12): 8833-8849.
- [12] Overall J C J, Kern E R, Glasgow L A. Effective antiviral chemotherapy in cytomegalovirus infection of mice [J]. *J Infect Dis*, 1976, 133: A237-A244.
- [13] Bolger G, Lapeyre N, Rheume M, *et al.* Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis [J]. *Antiviral Res*, 1999, 44(3): 155-165.
- [14] Smee D F, Reist E J. Potent anti-murine cytomegalovirus activity and reduced nephrotoxicity of ganciclovir cyclic phosphonate [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(8): 1964-1966.
- [15] Fan D H, Wang Y L. *Chinese Drugs Encyclopedia (Western Medicine)* (中国药物大全西药卷) [M]. 2nd ed, Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [16] Alnaqeeb M A, Thomson M, Bordia T, *et al.* Histopathological effects of garlic on liver and lung of rats [J]. *Toxicol Lett*, 1996, 85(3): 157-164.

土槿乙酸对人黑素瘤细胞增殖抑制作用研究

姜孟臣, 陈虹, 张敏, 陈莉*
(武警医学院 药学教研室, 天津 300162)

摘要: 目的 研究土槿乙酸 (PAB) 对人黑素瘤细胞 (LiBr) 生长的抑制效应, 并探讨其作用机制。方法 用不同浓度的 PAB 加入体外培养 LiBr 细胞中, 观察加药后细胞生长数量及其形态的变化; 用 MTT 法检测 PAB 的细胞毒作用; 用 Hoechst 33342 和 PI 双荧光染色法检测细胞凋亡。用免疫细胞化学方法, 观察 LiBr 细胞基因表达的变化。结果 PAB 明显抑制 LiBr 细胞生长; IC_{50} 值为 2.5×10^{-5} mol/L; 其抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系; 凋亡细胞的比例与药物浓度及作用时间呈正相关。免疫细胞化学检测显示 p21^{WAF1} 表达增强。结论 PAB 能有效抑制 LiBr 细胞的增殖。

关键词: 土槿乙酸; LiBr 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)06-0532-03

Effect of pseudolaric acid B on proliferation of human LiBr cell line *in vitro*

JIANG Meng-chen, CHEN Hong, ZHANG Min, CHEN Li

(Department of Pharmacy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Object** To study the inhibitory effects and mechanism of pseudolaric acid B (PAB) on the growth of LiBr cell line. **Methods** PAB in different concentrations was added into the medium in which LiBr cells were cultured. The changes of cell morphology were observed by phase contrast microscope. Cytotoxicity of PAB was detected by MTT. The number of apoptotic cell was calculated by double fluorescent staining. The level of p21^{WAF1} protein was measured with immunocytochemistry. **Results** The growth of LiBr cell line was remarkably inhibited by PAB. The IC_{50} values of PAB for LiBr cells was 2.5×10^{-5} mol/L. The inhibitory rate and the apoptotic cell rate were related with the medicine concentration. The level of p21^{WAF1} protein in LiBr cells treated with PAB was obviously increased. **Conclusion** PAB can effectively inhibit the proliferation of LiBr cell line.

Key words: pseudolaric acid B (PAB); LiBr cell line; cell proliferation

收稿日期: 2002-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171108); 天津市自然科学基金重点课题 (003805211)

作者简介: 姜孟臣 (1962—), 男, 内蒙古赤峰市人, 学士, 毕业于内蒙古医学院, 硕士学位在读, 现在武警医学院药学教研室工作, 研究方向: 抗肿瘤药物作用机制研究。