

板蓝根体外抗单纯疱疹病毒 I 型作用

方建国¹, 汤 杰¹, 杨占秋², 胡 娅¹, 刘云海¹, 王文清¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030;

2. 武汉大学医学院病毒学研究所, 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 探讨板蓝根 5 个化学部位体外抗单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)的活性及作用机制。方法 利用 Hep-2 细胞体外培养系统,通过观察细胞病变效应(CPE)、噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性,测定板蓝根不同化学部位抑制 HSV-I 对 Hep-2 细胞感染的作用;以治疗指数(TI)为评价指标,比较各部位抗病毒活性强弱。结果 板蓝根各部位均有抑制 HSV-I 生物合成作用,其中Ⅳ部位活性最强, TI 为 8.2;Ⅱ部位对 HSV-I 有直接灭活作用;各部位均不能阻止 HSV-I 侵入细胞。结论 板蓝根在体外主要通过抑制生物合成而发挥抗 HSV-I 作用。

关键词:板蓝根;单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I);抗病毒作用

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)02-0242-03

Effect of *Radix Isatidis* against herpes simplex virus type I *in vitro*

FANG Jian-guo¹, TANG Jie¹, YANG Zhan-qiu², HU Ya¹, LIU Yun-hai¹, WANG Wen-qing¹

(1. Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Institute of Virology, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Key words: *Radix Isatidis*; herpes simplex virus type I (HSV-I); antiviral effect

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是人类病毒感染性疾病中最常见的病毒,人群中 HSV 感染非常普遍,经统计感染率在 90% 以上^[1]。其中,单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)引起的单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)是一种主要的致盲性角膜病^[2]。板蓝根系十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,具有清热解毒、凉血利咽之功效,是公认的有较好抗病毒效果的中药之一。临床运用板蓝根治疗单纯疱疹病毒性角膜炎取得了良好的效果^[3]。为进一步证实板蓝根抗 HSV-I 的作用,明确其抗病毒作用机制,本研究利用 Hep-2 细胞体外培养系统,对其不同化学部位进行体外抗 HSV-I 的实验。

1 材料

1.1 药材及其化学部位的制备:板蓝根采自安徽亳州,经华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部方建国教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥根。药材粉碎成粗粉,以 95% 乙醇渗漉提取,渗漉液合并浓缩得到板蓝根乙醇总提取物(下简称总提取物)。拌以硅藻土采用系

统溶剂分离法,依次以石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇、水加热回流提取,回收溶剂得到 5 个不同极性的化学部位浸膏(按原生药量计,得率分别为 2.0%、2.2%、0.6%、1.5%、2.1%,编以代码简称板蓝根 I~V,各部位分别含腺苷 0.004%、0.010%、0.005%、0.042%、0.025%)。各部位按中药注射剂工艺配液、灌封、灭菌,制备供试品液。

1.2 病毒:以 HSV-I F 株,作为标准株,武汉大学医学院病毒学研究所提供。在 Hep-2 细胞上测定 HSV-I 病毒半数组织细胞感染剂量 TCID₅₀,实验用感染量为 100 TCID₅₀。

1.3 细胞:人喉癌上皮细胞(Hep-2 细胞),武汉大学临床病毒学研究所提供。培养用 MEM 培养基+10% 小牛血清,常规加入青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μg/mL)。

1.4 试剂:噻唑蓝(MTT, Fluka Biochemika 公司),二甲亚砜(DMSO,上海菲达有限公司)。

1.5 仪器:IF-1 型紫外透射反射分析仪(上海长明光学电子仪器厂),CO₂培养箱(美国 Forma 公司),SIK-202 型净化工作台(安徽蚌埠净化设备厂)。

收稿日期:2004-05-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800193)

作者简介:方建国(1965—),男,河南信阳人,副主任药师,博士,硕士生导师,主要从事中药药效的物质基础与标准化研究,现代中药制剂与分析研究,现主持、参与国家自然科学基金课题项目 2 项,在国内外医学权威期刊上发表论文 10 余篇,参编学术专著 2 部。Tel: (027) 83649095 E-mail: fjj3560@sina.com

2 方法

2.1 药物细胞毒性测定:将细胞悬液稀释成 8×10^4 /mL,接种 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μ L,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、100% 相对湿度的培养箱中培养 24 h 后,分别在各孔中加入总提取物和 I ~ V 部位供试品液,药物质量浓度为 2、4、8、16、32、64、128 mg/mL,相同条件下继续培养 33 h。观察细胞病变(CPE)情况,并以 MTT 法检测细胞存活率。每一药物浓度重复 4 孔,另设正常细胞对照。

2.2 药物对 HSV- I 的直接灭活作用:将不同质量浓度供试品液与 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 HSV- I 等体积混合,37 $^{\circ}$ C 作用 90 min 后,以此病毒药物混合液感染 Hep-2 细胞。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 吸附 90 min,洗涤,加细胞维持液置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养。每日观察 CPE,72 h 后以 MTT 法检测病毒抑制率。采用治疗指数 (treatment index, TI) 作为评价指标来衡量药物对病毒的抑制效力。每一药物浓度重复 4 孔,同时设置正常细胞对照、药物对照及病毒对照。

2.3 药物对 HSV- I 侵入细胞的阻断作用:用药物预先处理细胞 90 min,洗涤后以 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 HSV- I 攻击,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 吸附 90 min 后洗涤,同 2.2 项方法培养与检查。

2.4 药物对 HSV- I 生物合成的抑制作用:以 100 TCID₅₀/0.1 mL HSV- I 感染细胞,吸附 90 min 后洗涤,加入不同浓度供试液,同 2.2 项培养与检查。

2.5 细胞存活率测定:采用改进的 MTT 法^[4],吸出培养液,每孔加入 MTT (5 mg/mL) 100 μ L 继续培养 2 h,每孔加 DMSO 100 μ L,振荡混匀后立即在 570 nm 波长下测定吸光度 A 值。

细胞存活率 = (药物组平均 A 值/细胞对照组平均 A 值) \times 100%

病毒抑制率 = (实验组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) / (药物组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) \times 100%

治疗指数(TI) = 半数毒性浓度(TC₅₀)/半数抑制浓度(IC₅₀)

3 结果

3.1 药物对细胞的毒性作用:供试品液对 Hep-2 细胞的毒性作用表现为细胞增殖缓慢、颗粒较多、折光性强、形态改变、部分细胞破碎脱落。由于细胞代谢活性降低或死亡,MTT 法检测到的活细胞数减少,故 A 值下降。结果表明,总提取物毒性较大,TC₅₀ 值为 3.6 mg/mL, I ~ V 部位 TC₅₀ 值分别为: 15.2、23.9、>128、17.2 和 38.2 mg/mL。

3.2 药物对 HSV- I 的直接杀伤作用:HSV- I 感染所致的 Hep-2 细胞 CPE 特征为细胞肿胀、变圆、细胞间融合、脱落、碎裂。总提取物及 I、III ~ V 各部位不同浓度组均出现典型的 HSV- I 感染所致 CPE,且病毒抑制率与病毒对照组差异无显著性,说明以上各部位不能直接灭活 HSV- I。II 部位在 2~8 mg/mL,随着药物浓度增加,HSV- I 所致的 CPE 程度降低,病毒抑制率与药物浓度呈正相关,说明该部位具有直接灭活 HSV- I 的作用。其对 HSV- I 的 IC₅₀ 为 4.9 mg/mL, TI 为 2.2。

3.3 药物阻止 HSV- I 侵入细胞的作用;各部位不同浓度组均出现典型的 CPE,且病毒抑制率与病毒对照组差异无显著性,说明板蓝根各部位对病毒侵入细胞均无阻断作用。

3.4 药物对 HSV- I 生物合成的抑制作用:实验结果表明,板蓝根各部位均能明显抑制 HSV- I 生物合成,这表现在:随着各部位药物浓度的增加,细胞肿胀、变圆、脱落、碎裂等典型 CPE 特征逐渐减弱,病毒抑制率(细胞存活率)明显升高。根据各部位抑制 HSV- I 生物合成的 TI 值不同,将它们归为 3 类:(1)高效:TI > 6,即 IV 部位;(2)有效:3 < TI < 6,即总提取物、I、III、V 部位;(3)低效:TI < 3,即 II 部位。结果见表 1。

表 1 板蓝根不同化学部位对 HSV- I 生物合成的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of different chemical fractions of Radix Isatidis on biosynthesis of HSV- I

药 物	药物不同质量浓度 (mg · mL ⁻¹) 时的病毒抑制率/%								TC ₅₀ /(mg · mL ⁻¹)	IC ₅₀ /(mg · mL ⁻¹)	TI
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32			
总提取物	33.3	45.5	78.8	90.5	—	—	—	—	3.6	0.7	5.1
I 部位	—	—	1.5	16.7	48.5	65.2	88.8	—	15.2	5.0	3.1
II 部位	—	9.6	18.2	22.7	33.3	52.0	—	—	23.9	9.2	2.6
III 部位	—	—	—	7.5	14.2	15.5	45.5	69.4	>128	21.6	>5.9
IV 部位	—	28.8	28.8	59.4	60.0	69.4	—	—	17.2	2.1	>8.5
V 部位	—	—	6.0	18.2	32.8	44.5	84.8	—	38.2	7.5	5.1

* —表示此项未做

* —undetected

4 讨论

HSV-1 的基因为双链 DNA, 易与宿主 DNA 发生整合。病毒严格寄生在细胞内, 使得药物杀伤病毒的同时对机体细胞也有损害。现有的抗疱疹病毒化学药物因为毒性太大或耐药性的产生, 其临床难以取得令人满意的效果。传统中药的多靶点作用机制、较少不良反应、无耐药性等优点表现出诱人的应用前景, 筛选高效低毒的抗病毒中药是当前抗病毒研究热点之一。对清热解暑类中药的现代研究发现其中不少中药具有抗病毒作用, 除杀灭病原微生物外, 还具有多种免疫学活性, 能非特异性增强免疫系统功能, 改善机体状况, 增强对各种感染的抵抗力。如果能够明确这类药物的抗病毒作用, 其意义是不言而喻的。

板蓝根是清热解暑类中药的典型代表, 应用于临床多年, 其传统清热解暑功效已得到认同, 尤其是对于病毒感染性疾病的治疗。国内外学者对板蓝根进行了大量的研究, 但是板蓝根中究竟何种成分起主导作用, 是作用于单一靶点还是作用于不同部位协同表现其抗病毒作用尚无定论。本实验初步研究了板蓝根的抗病毒的活性成分及作用机制, 结果显示, 板蓝根不同化学部位的抗病毒作用强度有较大

差异, 但其相关活性物质并未集于某一个单一的化学部位, 表明板蓝根是通过多种有效成分, 多环节、多途径地发挥协同作用而表现出抗病毒功效。抑制 HSV-1 的生物合成是板蓝根抗病毒的主要作用途径, 其中 II 部位尚能直接杀灭病毒。HSV-1 是有包膜的病毒, 最外层的包膜由脂质和糖蛋白组成, 其中任何一种成分改变, 即可使包膜变性, 从而灭活病毒, 故推测 II 部位中的某些化学成分能使病毒包膜变性以灭活病毒。本研究结论将指导笔者进一步提取分离板蓝根中与抗病毒功效相符的活性物质, 并为深入探讨其作用机制提供科学依据。

References:

- [1] Wang J, Li Y X, Zhang Y. Cloning, expression of HSV-IgG gene fragment and identification of the expressed protein [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2003, 23(6): 55-63.
- [2] Yan M, Wang Y C, Xia D Z. Effect of *Flos Lonicerae* Co solution against herpes simplex virus 1 *in vitro* [J]. *J Chin Pract Ophthalmol* (中国实用眼科杂志), 1998, 16(2): 82-84.
- [3] Liao Z M. Clinical approach of Banlangen Injection treating herpes simplex keratitis [J]. *J Chin Pract Ophthalmol* (中国实用眼科杂志), 2003, 21(3): 232-233.
- [4] Li D H, Tian Z G, Zhang J, et al. The use of MTT assay for the rapid testing of cytotoxicity of drugs against non-solid tumor cells [J]. *Cancer* (癌症), 1991, 10(3): 226.

蟾蜍灵对白血病 U937 细胞生长抑制和凋亡诱导作用

贾彩云¹, 呼文亮², 俞小瑞³, 于杰³, 徐瑞成²

(1. 河南大学医学院 细胞和分子免疫学研究室, 河南 开封 475001; 2. 武警医学院 生物化学教研室, 天津 300162; 3. 西安交通大学医学院 生物化学教研室, 陕西 西安 710061)

蟾蜍灵是蟾蜍毒素的主要成分之一, 蟾蜍毒素具有强心、麻醉、解毒、止痛、开窍、醒神等药理作用, 已被广泛应用于临床。近年来发现, 含有蟾蜍毒素的中药制剂在体外能抑制多种肿瘤细胞生长, 诱导白血病细胞的分化。临床观察提示, 含有蟾蜍毒素的中药制剂对肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、白血病等具有明显的抑制作用。Numazawa^[1]研究表明, 蟾蜍毒素的各种成分以剂量依赖的方式抑制 K562 细胞生长。在所有的蟾蜍毒素中, 蟾蜍灵是诱导白血病细胞分化最有效的成分, 蟾蜍灵在较低浓度 ($1 \times 10^{-8} \sim$

1×10^{-9} mol/L) 能够在较宽的范围内(有较宽的白血病细胞谱)引起人白血病细胞分化^[2,3]。在较高的浓度 ($\geq 1 \times 10^{-7}$ mol/L) 诱导人白血病细胞凋亡^[4]。本实验以蟾蜍灵单体作用 U937 细胞株, 研究其抑制白血病细胞生长和诱导凋亡作用。

1 材料与方 法

1.1 药品、试剂和仪器: 蟾蜍灵由天津药物研究院制备, 纯度大于 99.5%, 用无水乙醇配制成母液, 用 D-Hanks 液稀释, 乙醇控制在体积分数小于 0.1% (预试验表明该体积分数的乙醇对细胞没有影响)。

收稿日期: 2004-05-18

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (013804311)

作者简介: 贾彩云(1973—), 女, 河南洛阳人, 理学硕士, 讲师, 主要从事药物诱导肿瘤细胞凋亡及分子机制研究。Tel: (0378) 5654398
E-mail: jiacy602@sina.com, caiyunjia@henu.edu.cn