

# 金叶败毒及其拆方体外抗人巨细胞病毒的比较研究

张 斐, 闻良珍\*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 妇产科, 湖北 武汉 430030)

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 是引起先天性及围产期感染的重要病原, 妊娠期 HCMV 活动性感染可以通过胎盘垂直传播, 导致流产、畸形、死胎及新生儿神经系统和脏器损害。HCMV 围产期感染的预防和治疗是国内围产医学研究的热点之一。金叶败毒是由金银花、大青叶、鱼腥草及蒲公英提取后按一定比例混合组成的纯中药制剂, 近年来研究表明金叶败毒具抗 HCMV 作用<sup>[1]</sup>。为进一步了解拆方中以哪味中药起主导作用, 并进一步探讨中药复方配伍的意义, 本研究以 HCMV 体外感染人胚肺 (HEL) 细胞为模型, 比较金叶败毒及其组分以 HCMV 体外感染 HEL 细胞的影响, 探讨其妊娠期用药的合理性, 寻找恰当的治疗妊娠期 HCMV 感染的方法。

## 1 材料与与方法

1.1 药物: 金叶败毒针剂 (JBI) 由本院中西医结合研究所制, 批号 20011231, 含生药 1 g/mL, 配制成 100 mg/mL; 金银花、大青叶、鱼腥草和蒲公英各 100 g, 用常规水提法提取实验样品, 分别制成含 0.5 g 生药/mL, 配制成 100 mg/mL, 调 pH 值至 7.4 左右, 再 2 500 r/min 离心 20 min 后除沉淀, 分装后常规高压灭菌消毒, 置 4 °C 冰箱保存。更昔洛韦 (GCV) 为阳性对照药物, 购自湖北省科益药业公司, 每支 50 mg 配制成 100 μg/mL, 批号 20021020。

1.2 细胞与病毒: HEL 细胞由本院儿科病毒室提供, 按常规方法培养传代, 以第 10 代 HEL 细胞为实验材料; HCMV (AD169 株) 由湖北省病毒研究所提供, 按常规方法传代, 滴度为  $10^{-3.36}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。

1.3 仪器与试剂: CO<sub>2</sub> 培养箱 Heperin (上海合资), Olympus 倒置显微镜, 美国产 EI312e 酶联免疫检测仪, 上海产 γ-计数器, 北京产高速离心机; MTT 为 Sigma 公司产品, 白细胞介素-6 (IL-6) 和

肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 放射免疫试剂盒为解放军总医院东亚免疫技术研究所产品。

1.4 药物毒性测定: 接种 96 孔培养板 HEL 细胞单层, 加入各药物等倍系列稀释液 7 个浓度, 每孔 0.2 mL (各 4 个复孔), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 3 d, 每天观察细胞病变, 3 d 后倾去培养液, PBS 洗涤, 加 MTT 染液 20 μL 进行染色, 继续培养 4 h 后, 倾去孔内液体, 每孔加 150 μL 二甲亚砜 (DMSO), 振荡 10 min, 使结晶溶解, 用酶联免疫检测仪测 A<sub>570</sub> 值, Reed-Muench 法<sup>[2]</sup> 计算细胞死亡率及各药物的半数致死量 (TC<sub>50</sub>)。细胞病变 (CPE) 程序判断标准: 无明显病变: 0; 0~25% 细胞病变: +; 25%~50% 细胞病变: ++; 50%~75% 细胞病变: +++; 75% 以上细胞发生病变: ++++。实验中以不引起细胞病变的药物最低稀释度为其对 HEL 细胞的最大无毒浓度 (TC<sub>0</sub>)。

1.5 药物抗 HCMV 的药效学实验: 将 HEL 细胞接种于 96 孔培养板, 长成单层细胞后, 倾去培养液, 用 PBS 洗涤 2 次, 将 100 TCID<sub>50</sub> 滴度的 AD169 株接种于 HEL 细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育吸附 90 min, 倾去含有病毒的培养液, 加入各药物的最大无毒浓度倍比稀释的含药培养液 7 个浓度, 每孔 200 μL (各 4 个复孔), 以正常细胞加入各药物的最大无毒浓度倍比稀释的含药培养液为正常对照, 以不含药物的培养基加入病毒感染的细胞为病毒对照, 以阳性药物 GCV 为药物对照, 培养 4 d, 每天观察细胞病变, 4 d 后 MTT 法染色, 方法同上。按 Reed-Muench 方法计算细胞存活率、药物半数抑制病毒浓度 (IC<sub>50</sub>) 及其治疗指数 (TI, TI=TC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>)。

1.6 药物对 HEL 细胞分泌细胞因子的影响: 将 HEL 细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞长成单层后, 将 100 TCID<sub>50</sub> 的 AD169 株接种孔内, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 吸附 90 min 后换液, 病毒对照组换维持液, 药物实验组换用含各药物最大无毒浓度的维持液 (各

收稿日期: 2004-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271673)

作者简介: 张 斐 (1964—), 女, 河南尉氏人, 博士, 主要从事围生医学方面的研究。

E-mail: zhangyann01@sohu.com Tel: (027) 83691314

\* 通讯作者 闻良珍 Tel: (027) 83662164

4 个复孔), 分别于感染 12、24、48、72 和 96 h 收集维持液, -20 °C 保存, 以正常细胞培养上清液为正常对照组, 依试剂盒说明书操作, 分别测定 TNF-α 和 IL-6 水平。

1.7 统计学处理: 应用 SSPS10.0 软件行统计学处理, 采用有交互作用的两因素方差分析进行组间均数的比较。

2 结果

2.1 药物毒性测定: 正常细胞对照组均无明显病变, 其 A 值 ( $\bar{x} \pm s$ ) 为 0.391 ± 0.034, 各药物的 TC<sub>0</sub> 及 TC<sub>50</sub> 见表 1。

2.2 药物抗 HCMV 的药效学实验: 按 Reed-Muench 方法计算细胞存活率, 由实验数据计算得各药物抗 HCMV 的 IC<sub>50</sub> 和 TI, 见表 1。金叶败毒的 TI 值明显高于各单方药物, 但较 GCV 的 TI 值低, 各单方药物的 TI 值无明显差异。

2.3 药物对 HEL 细胞分泌细胞因子的影响: 见表 2 和 3。金叶败毒组与模型组比较, 细胞因子水平明显升高, TNF-α 在感染后 12 h 即开始显著升高 (P < 0.05), 24、48 h 达峰值 (P < 0.01); IL-6 的分泌水平相对较低。拆方中 4 味中草药组的细胞因子

表 1 金叶败毒及其拆方抑制 HCMV 致细胞病变作用  
Table 1 Inhibition of JBI and its four component herbs on cytopathogenic action induced by HCMV

Table with 5 columns: 组别, TC0, TC50, IC50, TI. Rows include 金叶败毒, 金银花, 大青叶, 鱼腥草, 蒲公英, GCV.

表 2 金叶败毒及其拆方对 HCMV 感染细胞 TNF-α 分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2 Effect of JBI and its four component herbs on TNF-α secretion from HCMV infected cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table with 6 columns: 组别, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Rows include 正常对照, 病毒, GCV, 金叶败毒, 金银花, 鱼腥草, 大青叶, 蒲公英.

与正常对照组比较: ▲P < 0.05 ▲▲P < 0.01; 与病毒组比较: \*P < 0.05 \*\*P < 0.01; 与 GCV 组比较: △P < 0.05 △△P < 0.01 ▲P < 0.05 ▲▲P < 0.01 vs normal group; \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 vs HCMV group; △P < 0.05 △△P < 0.01 vs GCV group

表 3 金叶败毒及其拆方对 HCMV 感染细胞 IL-6 分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 3 Effect of JBI and its four component herbs on IL-6 secretion from HCMV infected cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table with 6 columns: 组别, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Rows include 正常对照, 病毒, GCV, 金叶败毒, 金银花, 鱼腥草, 大青叶, 蒲公英.

表注同表 2

Notes are same to Table 2

水平在感染后 24、48 h 也显著升高 (P < 0.05), GCV 无此作用。

3 讨论

前期临床研究证明金叶败毒具有抗 HCMV 作用, 为了更深入研究组方中哪味药起主导地位, 进行

了单味药与组方的对比研究, 本实验结果显示同阳性药 GCV 相比, 金叶败毒在体外细胞水平能有效抑制 HCMV, 而金叶败毒拆方后各单味中草药也有不同程度的抗病毒效应, 但强度较弱, 4 种单味药无明显差异。

白介素 (IL) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 与病毒感染密切相关, 在抗病毒免疫中发挥重要作用, TNF- $\alpha$  具有广泛的生物活性, 可以上调受感染细胞表面黏附分子的表达, 进一步刺激自身及 IL-6 的分泌, IL-6 可以促进 B 细胞增殖、分化, 诱导 IgG、IgM 的产生。本实验将复方与拆方中 4 味中草药分别做了对体外 HCMV 感染 HEL 细胞模型不同时间点的细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 影响的研究, 结果表明, 金叶败毒组与模型组比较细胞因子水平明显升高, 拆方中 4 味中草药组的细胞因子水平在感染后 24 和 48 h 也有显著升高 ( $P < 0.05$ ), GCV 无此作用, 表明金叶败毒能够抗炎, 调节受感染细胞的免疫状态。由此推测, 金叶败毒可能通过抑制 HCMV 并调节机体的免疫反应来达到其良好的抗 HCMV 作用。而拆方后单味中药效果明显逊色于金叶败毒, 方内无任何一味中药能代替复方的抗炎、调节免疫效果。

HCMV 广泛存在于人体, 不仅是人类先天感染的主要病原之一, 严重影响人口出生质量, 同时也是机体免疫功能低下人群如器官移植及 AIDS 病人并发感染死亡的常见原因之一。由于该病毒结构的复

杂性至今尚无特异的治疗药物, 目前国外常用 GCV 做为一线抗 HCMV 药物<sup>[3]</sup>, 但 GCV 具有致畸作用, 且易产生耐药, 不宜孕期使用, 中医药治疗是一条行之有效的治疗孕期 HCMV 感染的方法。金叶败毒是本院中西医研究所研制的纯中药制剂, 经过多年临床应用。前期动物实验表明金叶败毒在致畸敏感期用药对子代的生长发育无不良影响<sup>[4]</sup>。本实验从复方和拆方的角度进一步证明复方配伍的合理性, 任何一种单味药都不能取代复方的独特抗 HCMV 作用, 因此金叶败毒有望成为临床抗 HCMV, 防治其宫内感染的理想药物。

#### References:

- [1] Jiang H, Wen L Z, Ling X Z, *et al.* Chinese Herb Reducing inhibit human cytomegalovirus infection [J]. *Chin J Infect Dis* (中华传染病杂志), 1997, 4: 267-268.
- [2] Zhang J T. *Modern Methodology in Pharmacological Experiments* (现代药理实验方法) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 2001.
- [3] Drew W L. Clinical use of ganciclovir for cytomegalovirus infection and the development of drug resistance [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1991, 4(suppl 1): S42.
- [4] Chen S H, Xiong J W, Xing W, *et al.* The animal study on treating the intrauterine infection in cytomegalovirus by Chinese herb Jinyebaidu [J]. *Chin J Lab Med* (中华检验医学杂志), 2003, 4: 248.

## 人参根和茎叶皂苷对大鼠学习记忆功能的影响

邵碧霞, 白洁, 孙文虹, 邹雪飞, 倪小虎

(哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076)

世界范围的老齡化趋势, 使痴呆的患病率大大增加。10%~15% 65 岁以上的老年人患有痴呆, 且年龄越大, 患痴呆的危险性越高<sup>[1]</sup>。病人意识清楚, 但记忆损害和一种或一种以上的认知障碍 (失语、失用、失认和行为功能障碍)。人参皂苷促进学习记忆的作用已明确, 研究人参根或茎叶皂苷对作业记忆损害的影响对研究早老性痴呆症具有重要意义。三门走行迷路实验和 T-迷路延迟非样板走行实验在国外都是很好的用来研究作业记忆的方法<sup>[2,3]</sup>, 而在国内的应用却未见报道。本实验采用这两种方法来测试人参根及人参茎叶皂苷对老齡大鼠学习记忆的影响, 为开发有效的抗痴呆药物提供依据。

### 1 材料

1.1 动物: 雄性 Wistar 大鼠, 24 月龄, 体重 (250±

20) g, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供, 合格证号: SCXK (黑) 20020001 号。实验中为促使动物对诱饵的迫切性, 限制食饵, 体重控制在正常体重 85% 左右, 自由饮水, 室温 (23±2) °C。

1.2 药品: 人参根和茎叶皂苷 (哈尔滨商业大学药学院植化教研室提供), 人参根总皂苷质量分数为 75.3%, 人参茎叶总皂苷质量分数为 83.1%。氢溴酸东莨菪碱 (美国 E. merck 公司产)。安定 (山东平原制药厂)。荷包牡丹碱 (美国 E. merck 公司产)。毒扁豆碱 (美国 E. merck 公司产)。

1.3 实验装置: 木制三门迷路如图 1 所示, 由 1 个出发箱 (20 cm×12 cm×25 cm)、1 个目标箱和 4 个选择点组成 (155 cm×36 cm×25 cm), 每个选择点由 3 个挡板门 (a~c) 组成。在每个选择点上用一