

喜树碱通过抑制 HSV-1 复制相关基因的表达发挥抗 HSV-1 作用

周洁¹, 钟鹏禹¹, 许群芬², 陈恬^{1*}, 李祖锐¹, 崔家旗¹, 张倩¹

1. 成都医学院基础医学院, 四川 成都 610500

2. 四川大学华西第二医院 循证药学中心, 四川 成都 610041

摘要: 目的 探讨喜树碱体外抗单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 的作用及其机制。方法 不同浓度的喜树碱作用于 HSV-1 感染的 Vero 细胞后, 采用细胞病变 (cytopathologic effects, CPE) 法评价喜树碱体外抗 HSV-1 的作用, 计算喜树碱半数毒性浓度 (TC₅₀)、病毒半数抑制浓度 (IC₅₀) 及治疗指数 (TI), 并通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测喜树碱对 HSV-1 相关基因 mRNA 表达的影响。结果 喜树碱的 TC₅₀ 为 2 153.44 nmol/L, IC₅₀ 为 43.01 nmol/L, TI 为 50.07。RT-qPCR 结果显示, 喜树碱能明显抑制 HSV-1 UL12、UL42、UL54、TK 基因的表达, 其抑制作用与喜树碱浓度呈剂量依赖关系。结论 喜树碱具有明显抗 HSV-1 的作用, 能抑制 HSV-1 UL12、UL42、UL54、TK 基因的转录。

关键词: 喜树碱; 单纯疱疹病毒 I 型; 抗病毒活性; 实时荧光定量 PCR; UL12; UL42; UL54; TK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4078-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.017

Anti HSV-1 effect of camptothecin by inhibiting HSV-1 replication genes

ZHOU Jie¹, ZHONG Peng-yu¹, XU Qun-fen², CHEN Tian¹, LI Zu-rui¹, CUI Jia-qi¹, ZHANG Qian¹

1. School of Basic Medical Science, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Pharmacy/Evidence-based Pharmacy Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To study the antiviral effect and mechanism of camptothecin against HSV-1 *in vitro*. **Methods** Adding different concentration of camptothecin to the Vero cells infected by HSV-1, the measure of cytopathologic effects (CPE) was taken to evaluate the result of antiviral effect and mechanism of camptothecin. The median toxic concentration (TC₅₀), median inhibitory concentration (IC₅₀), and therapeutic index (TI) of camptothecin were calculated, and the affection of camptothecin on HSV-1 mRNA expression was examined through the method of RT-qPCR. **Results** TC₅₀ of camptothecin was 2 153.44 nmol/L, IC₅₀ was 43.01 nmol/L, and TI was 50.07. The results of RT-qPCR showed that camptothecin can significantly inhibit the gene transcription of HSV-1, UL12, UL42, UL54, and TK, and its inhibitory effect was in dose-dependence relationship with the concentration of camptothecin. **Conclusion** Camptothecin has an obvious antiviral effect on HSV-1 and can inhibit the transcription of HSV-1 genes such as UL12, UL42, UL54, and TK.

Key words: camptothecin; Herpes simplex virus 1; antiviral activity; RT-qPCR; UL12; UL42; UL54; TK

单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus 1, HSV-1) 属于疱疹病毒科 α 病毒亚科, 呈球形, 由双股 DNA 核心、衣壳、包膜组成, 是一种常潜伏在三叉神经节和颈上神经节的嗜神经病毒。HSV-1 感染腰以上部位的皮肤黏膜, 导致龈口炎、唇疱疹、角膜炎和病毒性睑皮炎等^[1]。临床上治疗 HSV-1 感染的首选药物是阿昔洛韦 (Acyclovir, ACV), 其属于无环核苷类药物^[2]。由于无环核苷类抗疱疹病毒药物的长期使用, 导致病毒胸苷激酶突变而产生耐药株^[3]。

HSV-1 耐 ACV 毒株在 20 世纪 80 年代已出现^[4], 近年来关于 HSV-1 耐药株的报道越来越多^[5-6], 因此探寻新的具有抗 HSV-1 活性的药物具有重要意义。

喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 主要分布于我国长江流域及西南各省, 属珙桐科旱莲属植物, 落叶乔木^[7]。喜树碱是从喜树皮和喜树果中提取的吲哚类生物碱^[8], 能抑制拓扑异构酶 I 的活性, 导致细胞凋亡, 故临床上常用于抗肿瘤治疗^[9-10]。但喜树碱是否具有抗 HSV-1 作用未见报道。通过预试

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173637); 国家级“大学生创新创业项目训练计划”项目 (201713705038)

作者简介: 周洁 (1996—), 女, 临床医学, 本科在读。Tel: 18328081388 E-mail: 327719474@qq.com

*通信作者 陈恬 (1967—), 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为抗感染药理。Tel: 18010518322 E-mail: chentianchina@126.com

验发现,喜树碱具有一定抗 HSV-1 作用,故采用细胞病变(CPE)法及实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法进一步探究其体外抗 HSV-1 的作用和机制。

1 材料

1.1 细胞和病毒

非洲绿猴肾细胞(Vero)由本研究室保存。细胞培养液成分为 89%高糖培养基(HyClone 公司)、10%新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)和 1%双抗(HyClone 公司)。HSV-1 F 株购自武汉大学医学院病毒学研究所。

1.2 药物

注射用阿昔洛韦由湖北华世通潜龙药业有限公司生产,批号 1607181,配制成 10 mg/mL 的药液,4 ℃ 保存备用;喜树碱购于成都曼思特生物科技有限公司,20 mg/支,批号 MUST-16061312,HPLC 测得质量分数为 98.82%,将干粉状药物溶于二甲基亚砜(DMSO),配制成 1 mmol/L 的药液,4 ℃ 保存备用。

1.3 主要试剂

DMEM 培养基和胰蛋白酶,购于 HyClone 公司;MTT 和 DMSO 购于美国 Sigma 公司;Trizol 和 6×Loading Buffer 购于 Takara 公司;氯仿购于成都市科龙化工试剂厂;反转录试剂盒购于 Takara 公司;2×SYBR Green PCR Kit 购于德国 Qiagen 公司。

通过 Genbank 收录的 HSV-1 F 全基因序列查找出 HSV-1 UL12、UL42、UL54、TK 的基因序列。18 S rRNA 内参基因引物由 Takara 公司合成,UL12、UL42、UL54、TK 基因引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。

2 方法

2.1 病毒的激活与保存

HSV-1 感染 Vero 细胞后,CPE 达到 90%以上

时反复冻融 3 次,使细胞裂解释放病毒,用 0.22 μm 的滤器除菌滤过,收集病毒液,在病毒液中加入 20%新生牛血清分装保存。本实验所用病毒为 HSV-1 F 株,属于第 3 类病原微生物,在 BSL-2 生物安全实验室完成相关实验。

2.2 病毒滴度的测定

取常规培养的 Vero 细胞(第 126 代),加 1 mL 胰酶于 75 mL 细胞培养瓶中,离心后计数,用培养液将细胞稀释至 1×10^5 个/mL,以 100 μL/孔接种于 96 孔板,周边加 PBS 100 μL/孔,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。将病毒原液稀释为 $10^{-4.0}$ 、 $10^{-4.5}$ 、 $10^{-5.0}$ 、 $10^{-5.5}$ 、 10^{-6} 、 $10^{-6.5}$ 、 10^{-7} 共 7 个稀释度,每个稀释度 8 个复孔,吸弃培养液后每孔加入 100 μL 病毒稀释液,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h 后,吸弃病毒稀释液,加入维持液 100 μL/孔继续培养,每日观察细胞 CPE 情况。被感染的 Vero 细胞圆缩聚集并脱落,当 CPE 达 50%以上时,记为病变孔,采用 Probit 回归分析计算病毒的半数组织感染量(TCID₅₀)。CPE 程度的记录方法^[11]:“0”代表无病变,“1”代表细胞病变介于 0~25%,”2”代表细胞病变介于 25%~50%,”3”代表细胞病变介于 50%~75%,”4”代表细胞病变介于 75%~100%。

2.3 喜树碱的细胞毒性测定

将生长状态良好的 Vero 细胞稀释至 1×10^5 个/mL,以 100 μL/孔接种于 96 孔板,培养至单层。将喜树碱用维持液稀释为 6 400、3 200、1 600、800、400、200、100 nmol/L 共 7 个浓度,每孔加入 100 μL 药液,每个浓度 5 个复孔,设细胞对照,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续培养 4 h 后吸弃上清,每孔加入 150 μL 的 DMSO 震荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测吸光度(A)值。计算细胞存活率(存活率=喜树碱处理组 A 值/细胞对照组 A 值),并用 Reed-Muench^[12]方法计算喜树碱半数毒性浓度(TC₅₀)。

2.4 喜树碱对 HSV-1 的抑制作用

将生长状态良好的 Vero 细胞培养至单层,用 100 TCID₅₀ HSV-1 病毒液进行 2 h 吸附接毒后弃上清,每孔加入 20、40、80、160 nmol/L 的喜树碱,每个浓度 5 个复孔,设细胞对照、病毒对照和阳性药物(ACV)对照,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养,每日观察细胞 CPE 情况。当病毒对照组细胞 CPE 达 90%以上时,记录各孔细胞 CPE 情况,采用 Reed-Muench 方法计算喜树碱对 HSV-1 的半数

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

基因名称	引物序列 (5'→3')
18 S rRNA	正向引物: AGTCCCTGCCCTTTGTACACA 反向引物: GATCCGAGGGCCTCACTAAAC
UL12	正向引物: ATGGGGTCGAAAGCGTACT 反向引物: CGTCCCTGGATATTCTCGTC
UL42	正向引物: GAACACTCGCAATTCAGTCG 反向引物: GTAGGTCCGGGTACTGGTTG
UL54	正向引物: GGCCCTTTCTCCAGTGCTA 反向引物: GCCAGATGACAAACACGAA
TK	正向引物: GCAGCAAGAAGCCACGGAAGT 反向引物: AACCCAGGGCCACCAGCAGT

抑制浓度 (IC₅₀)。

2.5 RT-qPCR 检测喜树碱对 HSV-1 基因表达的影响

100 TCID₅₀ HSV-1 感染单层 Vero 细胞 2 h, 弃上清, 培养孔中加入 80、160 nmol/L 的喜树碱, 同时设病毒对照, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 16 h 后提取细胞总 RNA (采用有机溶剂法提取细胞总 RNA, 用微量分光光度计测得 A 值均在 1.8~2.0, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 结果可见 28 S、18 S、5 S 3 个条带, 28 S 最亮, 5 S 最暗, RNA 完整性较好, 符合实验要求)。以提取的总 RNA 为模板, 逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 实验。RT-qPCR 反应体系为 2×SYBR Green PCR Master Mix 5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 稀释 10 倍的 cDNA 模版 4 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 10 s, 共 45 个循环。采用 CFX Manager 96 软件分析结果。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件分析数据, 对于定性资料采用例数和感染率描述, 组间感染率的比较采用确切概率法; TCID₅₀ 的分析采用 Probit 回归分析, 药物细胞毒作用和喜树碱抗 HSV-1 的作用采用非参数 *t* 检验; 定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。

3 结果

3.1 HSV-1 病毒滴度

Vero 细胞是贴壁依赖性细胞, 呈铺路石样排列。HSV-1 感染 Vero 细胞后, 细胞圆缩、聚集或脱

落, 常形成多核巨细胞。在不同的 HSV-1 稀释倍数下, 细胞 CPE 情况不同, 结果见表 2, 各组差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。采用 Probit 回归分析得病毒滴度 TCID₅₀ 为 10^{-5.18}, 可信区间为 [10^{-4.73}, 10^{-5.56}], 即接种 100 μL 病毒滴度为 10^{-5.18} HSV-1 时, 可使 50% 的 Vero 细胞发生明显的 CPE。

3.2 喜树碱的细胞毒性作用

将 2 倍梯度稀释的喜树碱加入生长状态良好的 Vero 细胞中, 细胞发生明显的药物毒性反应。镜下细胞数量减少、间隙增宽, 且随着喜树碱浓度的增高, 细胞大量坏死, 呈明亮的碎片状, 结果见图 1。200 nmol/L 喜树碱对细胞毒性较小, 与正常 Vero 细胞无明显差异, 形态正常, 存活率达 95% 以上, 因此, 实验用的喜树碱浓度在 200 nmol/L 以下。根据细胞的病变情况, 用 Reed-Muench 方法计算药物对细胞的毒性作用, 各药物浓度组与细胞对照组细胞病变率结果见图 2, 组间病变程度的差异具有统计

表 2 HSV-1 病毒滴度

Table 2 HSV-1 virus titer

病毒滴度	孔数	观察结果/孔		感染率/%
		发生 CPE	未发生 CPE	
10 ^{-4.0}	8	8	0	100.0
10 ^{-4.5}	8	5	3	83.3
10 ^{-5.0}	8	5	3	62.5
10 ^{-5.5}	8	2	6	29.4
10 ^{-6.0}	8	2	6	14.3
10 ^{-6.5}	8	1	7	3.8
10 ^{-7.0}	8	0	8	0.0

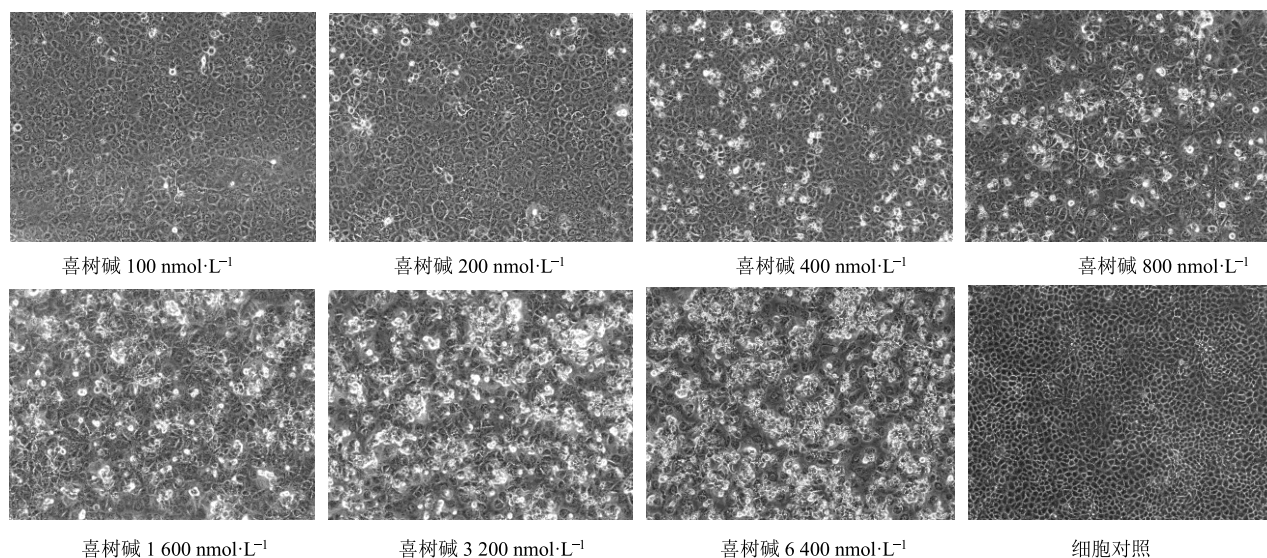


图 1 喜树碱对 Vero 细胞的毒性作用 (×100)

Fig. 1 Cytotoxicity of camptothecin on Vero cells (×100)

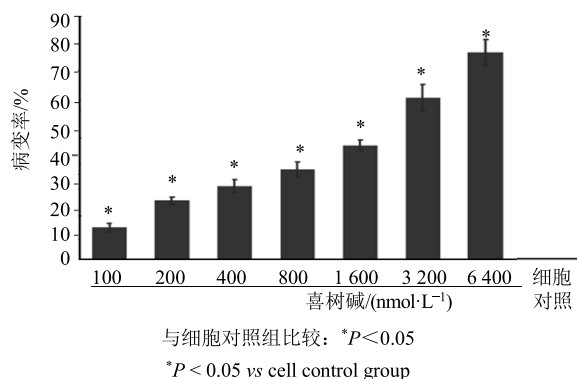


图 2 喜树碱对 Vero 细胞的毒性作用 (CPE 法)
Fig. 2 Cytotoxicity of camptothecin on Vero cells (CPE)

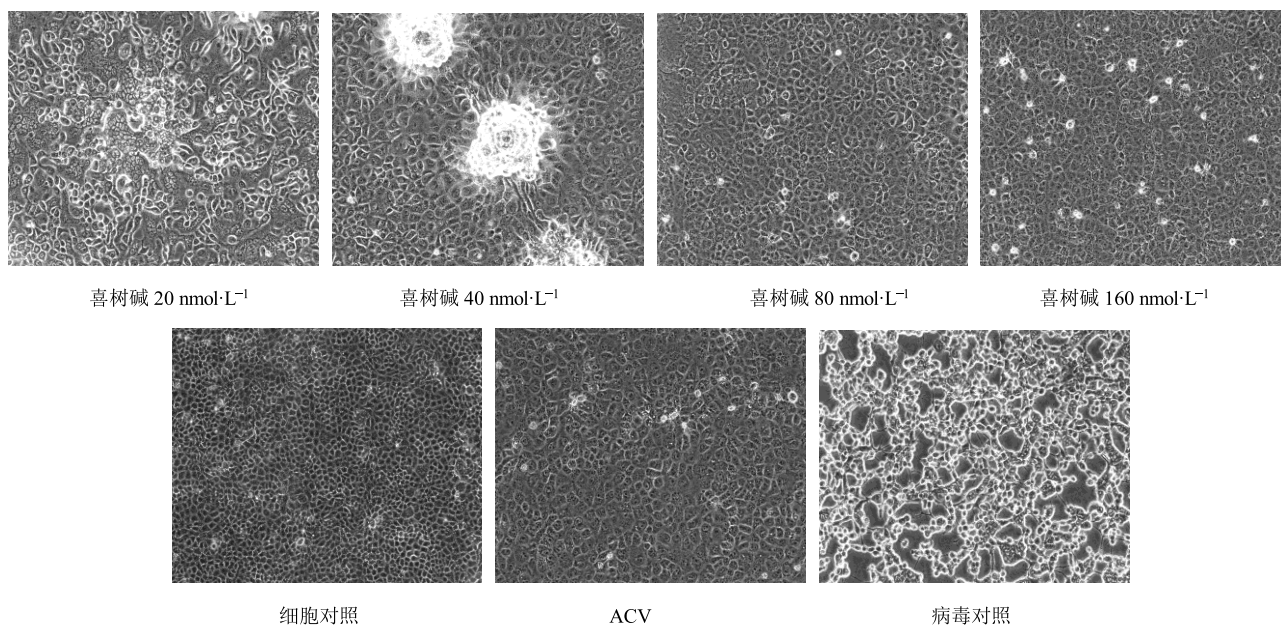


图 3 喜树碱对 HSV-1 致 Vero 细胞病变的抑制作用 (×100)
Fig. 3 Inhibition of camptothecin on CPE of Vero cells induced by HSV-1 (×100)

致使细胞间距明显增大。当喜树碱浓度升高到 80~160 nmol/L 时, 细胞病变明显减少。采用 CPE 法记录的结果表明组间病变程度的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。用 Reed-Muench 方法计算喜树碱对病毒的 IC_{50} 为 43.01 nmol/L。

3.4 喜树碱对 HSV-1 相关基因表达的影响

3.4.1 HSV-1 复制相关基因扩增结果 以总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 加入上、下游引物经 RT-qPCR 扩增后, 用 1.5% 琼脂糖电泳检测目的片段的大小, 结果见图 4, 符合引物设计推断的片段大小。内参 18 S rRNA 扩增后的电泳图, 在 69 bp 处均出现清晰完整的目的条带, 表明逆转录的 cDNA 质量较好。UL12、UL42、UL54、TK 扩增后的琼脂糖电泳图显示, 病毒对照组的条带较亮, 而

学意义 ($P < 0.05$), 计算得到喜树碱对 Vero 细胞的 TC_{50} 为 2 153.44 nmol/L。

3.3 喜树碱对 HSV-1 致 Vero 细胞病变的抑制效果

HSV-1 感染 Vero 细胞后, 病变细胞圆缩聚集, 呈串珠样排列, 细胞间隙增大, 镜下可见多核巨细胞。而细胞对照组的 Vero 细胞生长状态良好, 排列紧密, 边界清晰。ACV 阳性对照组中, 细胞形态规则, 未见明显的病毒病变。喜树碱组 CPE 较病毒对照组弱, 且随着喜树碱浓度的提高, 细胞病变减少, 结果见图 3。喜树碱浓度为 20 nmol/L 时, 病变细胞融合成为多核巨细胞, 细胞核数量可多达几十个,

喜树碱组的条带不明显, 提示该基因含量较少, 与 RT-qPCR 结果一致。

3.4.2 RT-qPCR 检测结果 选用 18 S rRNA 作为荧光定量 PCR 的内参, 检测病毒基因 UL12、UL42、UL54 和 TK 的表达情况。以病毒对照组各 mRNA 的表达量为“1”, 各药物浓度处理后病毒 mRNA 的表达量与之相比, 结果见表 3, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过检测 HSV-1 基因 UL12、UL42、UL54 和 TK 表达的情况, 发现喜树碱可抑制 HSV-1 基因的表达, 随着喜树碱药物浓度的增加, 4 个目标基因的表达水平呈下降趋势, 均低于病毒对照组。

4 讨论

HSV-1 是人类最常见的感染病毒之一, HSV-1

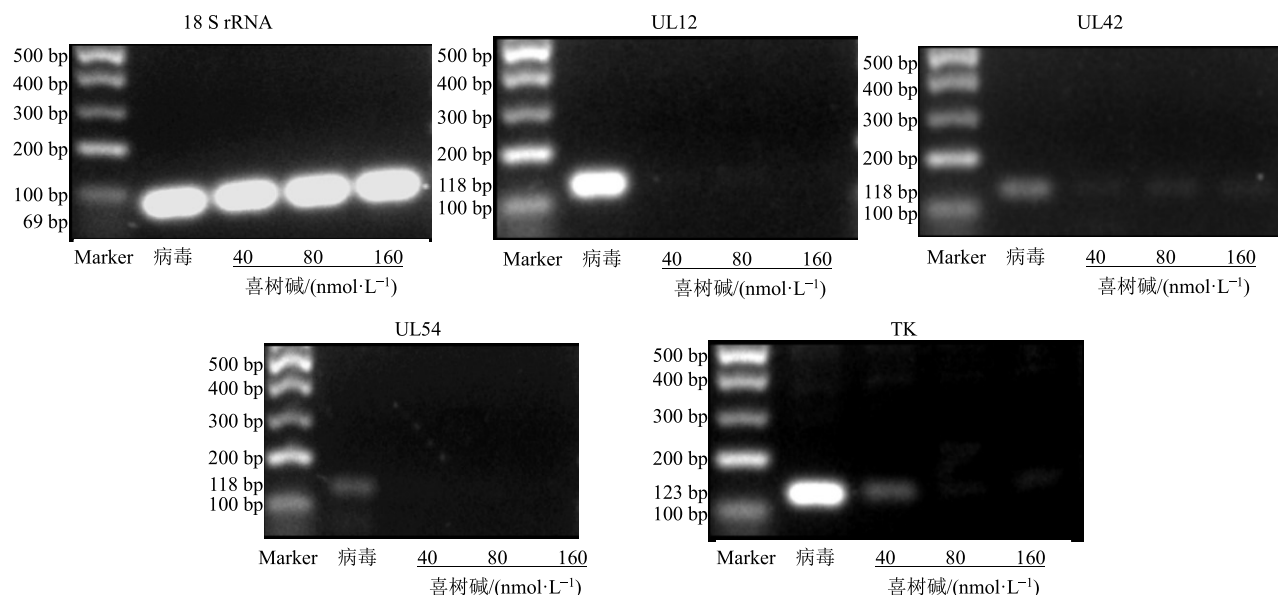


图 4 18 S rRNA、UL12、UL42、UL54、TK 扩增后电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of 18 S rRNA, UL12, UL42, UL54, and TK

表 3 喜树碱对 HSV-1 相关基因 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 32$)Table 3 Effects of camptothecin on gene mRNA expression levels of HSV-1 ($\bar{x} \pm s, n = 32$)

组别	$\rho/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	UL12	UL42	UL54	TK
喜树碱	40	$0.096 0 \pm 0.032 0^*$	$0.089 0 \pm 0.013 2^*$	$0.094 0 \pm 0.008 8^*$	$0.142 0 \pm 0.036 4^*$
	80	$0.049 0 \pm 0.001 8^*$	$0.035 0 \pm 0.003 5^*$	$0.084 0 \pm 0.012 4^*$	$0.085 0 \pm 0.017 2^*$
	160	$0.038 0 \pm 0.003 2^*$	$0.023 0 \pm 0.002 5^*$	$0.020 0 \pm 0.003 3^*$	$0.046 0 \pm 0.002 7^*$
病毒对照	—	$1.000 0 \pm 0.100 6$	$1.000 0 \pm 0.089 9$	$1.000 0 \pm 0.202 0$	$1.000 0 \pm 0.152 8$

与病毒对照组比较: $^*P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs virus control group

可引起潜伏感染,潜伏期的隐蔽性使 HSV-1 避开免疫系统,因而用于预防 HSV-1 感染的疫苗仅对 58% 妇女有效^[13]。我国中药资源丰富,很多中药均有抗病毒作用^[14-16];为发掘我国中药资源并筛选高效低毒的抗 HSV-1 新药,在对大量中药提取物初筛的基础上,发现喜树碱具有良好的抗 HSV-1 作用,该发现目前尚未见国内外报道。

研究表明,喜树碱不仅具有抗肿瘤的作用,还具有抗病毒的活性。Wu 等^[17]的研究显示,喜树碱能阻碍肠道病毒 71 型(EV71)RNA 的转录和翻译,从而发挥抗 EV71 的作用。李闻文等^[18]的研究显示,喜树果粗提物具有抗 HSV-2 的作用。但喜树碱抗 HSV-1 的作用及作用机制尚未见相关报道。本实验以 HSV-1 感染 Vero 细胞作为体外抗病毒的细胞模型,经多次 MTT 测定结果显示,病毒对照组与细

胞对照组的 A 值基本一致,与显微镜下观察结果存在显著差异,且该现象亦出现于在王永洪等^[19]的实验研究中。可能因为 MTT 将活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶染色,而 HSV-1 感染 Vero 细胞后,细胞脱落、圆缩,虽然形态改变,但并未坏死,导致病毒对照组与细胞对照组的 A 值相差较小,甚至有时高于细胞对照组,因此本实验未采取 MTT 法,而采取 CPE 法。采用 CPE 法测得喜树碱的 IC_{50} 为 43.01 nmol/L, TC_{50} 为 2 153.44 nmol/L, TI 为 50.07,表明喜树碱具有显著的体外抗 HSV-1 的作用。

HSV-1 感染细胞后,可依次表达立即早期基因(α)、早期基因(β)、晚期基因(γ)^[20]。 α 基因表达的立即早期蛋白是感染过程中产生的第一个病毒多肽,不仅可激活 β 和 γ 基因的表达,还可拮抗宿主免疫成分^[21]。ICP27 是 α 基因 UL54 表达的调节

蛋白,先抑制 mRNA 剪接,再招募 RNA 聚合酶 II 到复制位点,促使 RNA 从细胞核转入细胞质^[22]。喜树碱通过抑制 UL54 基因的表达,降低 ICP27 的产量,使病毒 RNA 合成减少,阻碍 RNA 的核输出。UL12 基因编码的碱性核酸酶 (alkaline deoxyribonuclease, AN) 是 HSV-1 复制的关键酶,其核酸外切酶活性强于核酸内切酶活性,具有 3 个磷酸化位点 (Tyr-371、Thr-474、Ser-604),可促进病毒的复制及其在细胞间的传播^[23]。喜树碱通过抑制 UL12 编码的碱性核酸酶的表达,从而抑制病毒 DNA 复制与病毒对照组相比,40、80、160 nmol/L 喜树碱组病毒表达量分别下降了 90.4%、95.1%、96.2%。UL42 是 HSV-1 复制的早期 (Early, E) 基因,可编码磷酸化的 UL42 蛋白,存在于病毒颗粒皮层,是 HSV-1 DNA 聚合酶的辅助因子^[24],可与 DNA 直接结合,促进病毒基因的表达。与病毒对照组相比,40、80、160 nmol/L 喜树碱组的病毒表达量分别下降了 91.1%、96.5%、97.7%,喜树碱通过抑制 UL42 蛋白的表达,使病毒复制和转录过程受阻,从而发挥抗 HSV-1 的作用。TK 属于自杀基因,可催化无毒性的前提物质转化为细胞毒性物质,从而导致细胞死亡,在肿瘤基因治疗中具有一定作用。在病毒内编码胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸激酶,参与病毒 DNA 复制过程中胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的磷酸化过程^[25]。喜树碱通过下调该基因的表达量,使 HSV-1 DNA 合成下降,相应蛋白质无法合成,进而发挥抑制细胞病变的作用。

目前,临床常用于抗 HSV-1 的核苷类药物已导致耐药毒株的产生,且具有一定的毒副作用,而喜树碱是从天然植物中提取出的单体,具有低毒高效、不易产生耐药性、材料易获得等优点,有较好的应用前景。本研究为今后研究喜树碱是否具有抗耐药毒株的作用提供参考。

参考文献

- [1] Brady R C, Bemstein D L. Treatment of herpes simplex virus infections [J]. *Antirviral Res*, 2004, 61(2): 73-81.
- [2] Momper J D, Zhao Y, Shapiro R, *et al*. Pharmacokinetics of low-dose cidofovir in kidney transplant recipients with BK virus infection [J]. *Transpl Infect Dis*, 2013, 15(1): 34-41.
- [3] Wutzler P. Antiviral therapy of herpes simplex and varicella zoster virus infections [J]. *Intervirology*, 1997, 40(8): 3452-3561.
- [4] Milne R S, Nicola A V, Whitbeck J C, *et al*. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type1 [J]. *Virology*, 2005, 79(11): 6655-6663.
- [5] Bauer D, Keller J, Alt M, *et al*. Antibody-based immunotherapy of acyclovir resistant ocular herpes simplex virus infections [J]. *Virology*, 2017, 512(1): 194-200.
- [6] Houston D M J, Bugert J J, Denyer S P, *et al*. Potentiated virucidal activity of pomegranate rind extract (PRE) and punicalagin against herpes simplex virus (HSV) when co-administered with zinc (II) ions, and antiviral activity of PRE against HSV and aciclovir-resistant HSV [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179291.
- [7] 冯建灿, 张玉洁, 谭运德, 等. 喜树与喜树碱开发利用进展 [J]. *林业科学*, 2000, 36(5): 100-108.
- [8] Wall M E, Wani M C, Cook C E, *et al*. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 88(16): 3888-3890.
- [9] 崔晓如, 缪震元, 张万年, 等. 高喜树碱类抗肿瘤药物研究进展 [J]. *药学服务与研究*, 2012, 12(1): 41-44.
- [10] Paola M, Sonia P. Metabolite fingerprinting of camptotheca acuminata and the HPLC-ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(2): 405-415.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [12] 中国医学科学院流行病学防治研究所. 常见病毒实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [13] Robert B, Belshe M D, Peter A, *et al*. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(1): 34-43.
- [14] 李玲, 魏科, 卢芳国, 等. 基于 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的麻杏石甘汤抗 A 型流感病毒感染小鼠所致的病毒性肺损伤研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(8): 1591-1596.
- [15] 张亚平, 陶振刚, 宋振举, 等. 疏风解毒胶囊对小鼠病毒性心肌炎模型的影响 [J]. *中草药*, 2016, 47(1): 110-113.
- [16] 曹泽或, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗 A16 型柯萨奇病毒的研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [17] Wu K X, Chu J J. Antiviral screen identifies EV71 inhibitors and reveals camptothecin-target, DNA topoisomerase 1 as a novel EV71 host factor [J]. *Antiviral Res*, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.04.008.

- [18] 李闻文, 阎祖炜, 施 凯. 喜树果粗提液抗单纯疱疹病毒实验研究 [J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(2): 121-122.
- [19] 王永洪, 兰婉莹, 陈 恬. 甘草酸体外抗人巨细胞病毒 AD169 的作用 [J]. 中成药, 2016, 38(10): 2121-2127.
- [20] Coleman J L, Shukla D. Recent advances in vaccine development for herpes simplex virus types 1 and 2 [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9(4): 729-753.
- [21] Sandri-Goldin R M. The many roles of the highly interactive HSV protein ICP27, a key regulator of infection [J]. *Future Microbiol*, 2011, 6(11): 1261-1277.
- [22] Sandri-Goldin R M. The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection [J]. *Front Biosci*, 2007, 13(13): 5241-5256.
- [23] Fujii H, Kato A, Mugitani M, *et al*. The UL12 protein of herpes simplex virus 1 is regulated by tyrosine phosphorylation [J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10624-10634.
- [24] Gottlieb J, Marcy A I, Coen D M, *et al*. The herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: A subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity [J]. *J Virol*, 1990, 64(12): 5976-5987.
- [25] Prados J, Melguizo C, Boulaiz H, *et al*. Cancer gene therapy: Strategies and clinical trials [J]. *Cell Mol Biol*, 2005, 51(1): 23-36.