

椿乳凝胶抗低危型人乳头瘤病毒的作用研究

吴梦瑶¹, 彭冬冬^{2,3#}, 龚云¹, 彭印^{2,3}, 张鹏¹, 张小冬^{2,3}, 唐小燕^{2,3}, 张妙红^{2,3}, 姜德建^{2,3*}

1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000

2. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410331

3. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司, 湖南 长沙 410331

摘要: **目的** 研究椿乳凝胶抗低危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的作用。**方法** 建立低危型 HPV6、HPV11 假病毒感染人胚肾 293FT 细胞模型, 评价椿乳凝胶对 HPV 感染能力及对细胞周期的影响。将 HPV6、HPV11 假病毒注入苯甲酸雌二醇预处理的雌性小鼠阴道内建立 HPV 感染动物模型, 病毒感染 48 h 后检测病毒定植情况, 将定植成功的小鼠模型随机分为模型组、鬼臼毒素(1 mg/只)和椿乳凝胶低、中、高剂量(0.01、0.02、0.04 g/只)组, 另设对照组, 每组 16 只。每天阴道给予相应药物 1 次, 连续 20 d, 分别于给药第 10、20 天检测小鼠阴道外观、pH 值, 末次给药后观察小鼠阴道及宫颈组织病理形态学变化, 以及 HPV6、HPV11 假病毒的病毒滴度, E6、E7 基因和蛋白表达, 评价椿乳凝胶对低危型 HPV 病毒的体内抑制作用。**结果** 体外实验结果显示, 椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染能力和所致细胞周期改变具有一定抑制作用。体内实验结果显示, 椿乳凝胶能降低 HPV6、HPV11 假病毒感染能力($P<0.01$), 降低小鼠阴道 pH 值($P<0.01$), 减轻宫颈组织病变($P<0.05$ 、 0.01), 并且抑制 HPV6、HPV11 假病毒 E6、E7 基因和蛋白的表达($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** HPV6、HPV11 假病毒能较好地模拟低危型 HPV 病毒感染过程, 而椿乳凝胶对低危型 HPV 病毒具有明显的抑制作用, 对低危型 HPV 病毒引起的感染有一定治疗作用。

关键词: 低危型人乳头瘤病毒; HPV6; HPV11; 假病毒; 椿乳凝胶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4399-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.019

Effect of Chunru Gel on low risk human papillomavirus

WU Meng-yao¹, PENG Dong-dong^{2,3}, GONG Yun¹, PENG Yin^{2,3}, ZHANG Peng¹, ZHANG Xiao-dong^{2,3}, TANG Xiao-yan^{2,3}, ZHANG Miao-hong^{2,3}, JIANG De-jian^{2,3}

1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou 412000, China

2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China

3. Hunan Prima Drug Research Center Co., Ltd., Changsha 410331, China

Abstract: Objective To study the effect of Chunru Gel (椿乳凝胶) against low risk human papillomavirus (HPV). **Methods** Low-risk HPV6 and HPV11 pseudovirus-infected human embryonic kidney 293FT cells model was established, and effect of Chunru Gel on HPV infection and cell cycle was evaluated. HPV6 and HPV11 pseudoviruses were injected into vagina of female mice pretreated with estradiol benzoate to establish HPV infected animal models. After virus infection 48 h, virus colonization was detected. The mice models were randomly divided into model group, podophyllotoxin (1 mg/animals) and low-, medium-and high-dose (0.01, 0.02, 0.04 g/animal) Chunru Gel groups, and control group were set up, with 16 animals in each group. The corresponding drugs were administered vaginally once a day for 20 consecutive days. The appearance and pH value of the vagina and cervix of mice were detected on the 10th and 20th day of administration, respectively. After the last administration, the histopathological changes of the vagina and cervix of mice, as well as the viral titer of HPV6 and HPV11 pseudoviruses, and the expression of E6, E7 genes and proteins were observed to evaluate the *in vivo* inhibitory effect of Chunru Gel on low risk HPV virus. **Results** The results of *in vitro* test showed that Chunru Gel had a certain inhibitory effect on infectivity of HPV6 and HPV11 pseudoviruses and cell cycle changes. The results

收稿日期: 2022-04-15

基金项目: 湖南省重点研发计划项目(2020DK2003)

作者简介: 吴梦瑶, 女, 硕士研究生, 从事中药药理作用研究。Tel: 17369278531 E-mail: wmyao1995@qq.com

*通信作者: 姜德建, 男, 博士, 硕士生导师, 研究员, 从事新药药效与安全性评价。Tel: 13875802695 E-mail: jiangdejian@hnse.org

#共同第一作者: 彭冬冬, 男, 硕士研究生, 助理研究员, 从事新药药效与安全性评价。Tel: 18229760205 E-mail: pengdongdong@hnse.org

of *in vivo* experiments showed that Chunru Gel reduced the infection ability of HPV6 and HPV11 pseudovirus ($P < 0.01$), reduced the vaginal pH value of mice ($P < 0.01$), alleviated cervical tissue lesions ($P < 0.05, 0.01$), and inhibited HPV6, HPV11 pseudovirus E6, E7 gene and protein expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** HPV6 and HPV11 pseudoviruses can better simulate the infection process of low-risk HPV virus, while Chunru Gel has obvious inhibitory effect on low-risk HPV virus, and has a certain therapeutic effect on infection caused by low-risk HPV virus.

Key words: low-risk human papillomavirus; HPV6; HPV11; pseudoviruses; Chunru Gel

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种嗜上皮组织的无包膜双链环状 DNA 病毒, 目前已发现约 200 种不同 HPV 型别^[1]。根据其致病力的大小可以分为高危型 HPV 和低危型 HPV。高危型 HPV 包括 HPV16、18、26、31、33、35、39 等, 可以引起外生殖器癌、宫颈癌、高度外阴瘤变和其他部位的恶性病变等。低危型 HPV 主要包括 HPV6、11、40、42、43、44 等, 主要引起肛门-外生殖器疣和皮肤疣等良性病变^[2]。HPV 病毒的基因组按功能可分为早期编码区 (E 区)、晚期编码区 (L 区) 以及非编码区。早期编码区主要负责病毒 DNA 的复制、转录和翻译调控, 其中 E6、E7 在高危型 HPV 导致癌症中发挥重要作用。晚期编码区参与病毒衣壳蛋白的合成, 包括主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2^[3-4]。

椿乳凝胶主要由椿皮、苦参、牡丹皮、乳香、冰片等中药组方而成, 为名老中医多年的经验方, 并且有 10 多年的医院制剂使用史。方中君药椿皮清热祛湿、止带; 苦参、丹皮清热燥湿、止痒为臣药, 以增强君药功效; 乳香活血化瘀、生肌, 冰片散热消肿、止痒为佐药, 以助主药祛瘀生肌。全方具有清热燥湿、祛瘀生肌的功效, 主要用于慢性宫颈炎之宫颈糜烂及中医辨证属于湿热瘀阻者。

HPV 病毒具有高度的宿主和组织特异性, 只能特异性感染人的黏膜、皮肤上皮细胞, 并且依赖上皮细胞的分化进行复制, 因此目前尚无法对 HPV 病毒进行有效的体外培养, 同时也缺乏合适的天然动物模型, 通过构建 HPV 假病毒成为目前研究 HPV 简单有效的方法^[5]。本研究通过多质粒共转染方法构建了 HPV6、HPV11 假病毒, 对该 HPV 假病毒的感染能力进行了分析, 并利用该假病毒成功建立了 HPV 感染小鼠阴道模型。通过研究椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染的 293FT 细胞的形态和增殖、细胞周期的影响, 以及椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染小鼠的影响, 综合评价椿乳凝胶对低危型 HPV6、HPV11 的药效作用, 为临床用药提供参考依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 100 只, 体重 15.6~18.8 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司病原微生物实验室, 实验室备案编号长卫计实备字 (2021) 第 B010 号, 实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2020-0015。动物研究遵循湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理委员会的指导方针, 伦理批准号 IACUC-2021 (3) 037。

1.2 细胞

人胚肾 293FT 细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3 仪器

BCR-MI02-72-C11-PPSU 型小鼠独立通气笼盒系统、BSC1300-II-B2 型生物安全柜 (山东新华医疗器械股份有限公司); ST8R 型台式高速大容量冷冻离心机、实时荧光定量 PCR 仪、CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 流式细胞仪 (BD 公司); Spectra Max i3x 型酶标仪 (Molecular Devices 公司); 5200 Multi 型化学发光成像系统、双垂直电泳仪、转印电泳仪 (Tanon 公司); 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); AniView100 型多模式动物活体成像系统 (广州博鹭腾生物科技有限公司)。

1.4 药品与试剂

椿乳凝胶 (批号 20191205) 由株洲千金药业股份有限公司提供; 报告质粒 pcDNA3.1-EGFP-HPV6-E6/E7、pcDNA3.1-EGFP-HPV11-E6/E7 送至通用生物 (安徽) 系统有限公司合成; 表达质粒 pCMV-HPV6-L1-flag-L2-6*His、pCMV-HPV11-L1-flag-L2-6*His 送至武汉中迈盈科生物科技有限公司合成; DMEM 培养基 (批号 AF29584966) 购自 HyClone 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 M009-6) 购自 Sciencell 公司; Lipo-fectamine 2000 (批号 2117484)、细胞周期检测试剂盒 (批号 2117484) 购自 Invitrogen 公司; Opti-MEM™ (批号 31985070)、

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (批号 4368814)、PowerUP SYBR Green Master Mix (批号 A25742)、Prestained Protein Ladder (批号 26617) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; CellTiter-Glo 发光法细胞活力检测试剂盒 (批号 C0065M)、RIPA 裂解液 (强) (批号 P0013B)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 (批号 P0012AC)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 P0018A) 购自碧云天生物试剂公司; DH5 α 感受态细胞 (批号 CB101)、无内毒素质粒大提试剂盒 (批号 DP117) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 RC101) 购自 Vazyme; β -actin 引物 (批号 H309KA9183) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PVDF 膜 (批号 IPVH00010) 购自 Merck Millipore; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 AS014)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 AS003)、 β -actin 抗体 (批号 AC026) 购自 Abclonal 公司; HPV6 E7 抗体 (批号 LS-C144095) 购自 LSBio 公司; HPV11 E7 抗体 (批号 ab100967) 购自英国 Abcam 公司; 鬼臼毒素 (批号 M0521B) 购自苏州美仑生物科技有限公司; 苯甲酸雌二醇注射液 (批号 20190312) 购自四川金科药业有限责任公司。

2 方法

2.1 HPV6、HPV11 假病毒构建

2.1.1 质粒常规转化与大量提取 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出 4 管 DH5 α 感受态细胞置冰上, 分别向 4 管感受态细胞悬液中加入 0.5~1.0 μL 预冷的目的质粒, 加入预热的 200 μL LB 液体培养基, 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床振荡 1 h。吸取细胞加到含相应抗生素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~15 h。挑取平板上单个菌落接种 (或直接取对应合成质粒的菌液 100~200 μL) 至 2 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中培养, 用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒, Nanodrop 测定质粒纯度与浓度, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 结构基因表达质粒与报告质粒共转染至 293FT 细胞 转染前 1 d, 按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度将 293FT 细胞铺于 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 待细胞长至密度约为 70% 时即可进行转染实验, 利用 Lipofectamine 2000 将结构基因表达质粒分别与报告质粒共转染至 293FT 细胞, 同时设置分别转染单个报告质粒为阴性对照组。①转染前 0.5 h 把培养孔板中的 DMEM 完全培养基换成无血清的 DMEM 培养

基, 对细胞进行饥饿处理, 且用量减半; ②首先将转染试剂 Lipofectamine 2000、对照组质粒和实验组质粒 (pcDNA3.1-EGFP-HPV6/11-E6/E7: pCMV-HPV6-L1-flag-L2-6*His=1:1, 2 种质粒均取 1.25 μg) 分别用 Opti-MEM 培养基进行稀释, 放置 5 min; ③将 Lipofectamine 2000 分别与对照组质粒和实验组质粒混合, 漩涡混匀, 放置 20 min; ④将转染混合液加入已换成无血清培养基的培养板中, 48~72 h 后收获假病毒, 进行病毒滴度测定。

2.1.3 病毒滴度测定 将 293FT 细胞按 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度铺于 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。将 HPV6/11 假病毒用 DMEM 培养基分别进行 0.1、0.01、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 倍稀释, 取各梯度病毒稀释液 100 μL 加入 293FT 细胞中, 每个稀释梯度 8 个复孔, 将 96 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 72 h 后, 置于倒置荧光显微镜下观察, 出现 1 个以上病变细胞定为阳性孔。用 Reed-Muench 方法计算细胞培养半数感染量 (half of tissue culture infective dose, TCID₅₀), 即病毒感染一半细胞时的病毒稀释度。

2.2 椿乳凝胶体外实验

2.2.1 椿乳凝胶对 293FT 细胞形态及增殖的影响 将 293FT 细胞按 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度铺于 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。待细胞长成单层细胞后, 用 PBS 溶液洗涤细胞 2~3 次, 将椿乳凝胶 (40 mg/mL) 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别稀释 6 个质量浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 鬼臼毒素设置 6 个浓度 (100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 取每组药物 100 μL 加入 96 孔板中, 同时设置溶媒对照组, 每组设 3 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养, 分别于 24、48、72 h 后于倒置荧光显微镜下观察细胞形态, 采用 CellTiter-Glo 发光法测定 72 h 后的细胞活性, 并计算椿乳凝胶和鬼臼毒素的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 及 TC₀ (IC₂₀), 共重复 3 次。

2.2.2 椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染力的影响 将 293FT 细胞按 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度铺于 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h。用培养基将椿乳凝胶 (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和鬼臼毒素 (3.12 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 进行多浓度稀释。待细胞长满约 80% 时弃培养液加入 100 倍 TCID₅₀ 病毒液, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 再加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的椿乳凝胶 (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和鬼臼毒

素 (3.12 $\mu\text{mol/L}$), 同时设置溶媒对照组 (单纯加入 DMEM 培养基), 每组 8 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24~72 h 后。共重复 3 次, 于倒置荧光显微镜下观察并记录实验组与对照组的细胞病变情况。

2.2.3 椿乳凝胶对 293FT 细胞周期的影响 将 293FT 细胞按 $1.5 \times 10^6/\text{孔}$ 的密度铺于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 待细胞长至 80% 左右时, 用 PBS 溶液洗涤细胞 2~3 次, 加入 100 倍 TCID_{50} 病毒液, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。在 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 培养基中分别加入低、中、高质量浓度 (32.3、64.6、129.2 $\mu\text{g/mL}$) 的椿乳凝胶和鬼臼毒素 (3.12 $\mu\text{mol/L}$), 同时设置病毒对照组和溶媒对照组。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 48 h 后, 1000 r/min 离心 3 min 收集细胞; 加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 至终质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ (用 190 μL 1 $\times$ Binding Buffer 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 离心; 加入 200 μL 1 $\times$ Binding Buffer 清洗, 离心; 加入 200 μL PBS 溶液重悬细胞, 用流式细胞仪进行细胞周期数据的收集和分析 (单次流式细胞仪检测, 1 份样品细胞数量约 10^6)。

2.2.4 椿乳凝胶对 293FT 细胞凋亡的影响 将 293FT 细胞按 $1.5 \times 10^6/\text{孔}$ 的密度铺于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 待细胞长至 80% 左右时, 用 PBS 溶液洗涤细胞 2~3 次, 加入制备得到的 100 倍 TCID_{50} 的 HPV6 和 HPV11 假病毒液, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。继续培养 2 h 后更换为低、中、高质量浓度 (32.3、64.6、129.2 $\mu\text{g/mL}$) 的椿乳凝胶和鬼臼毒素 (3.12 $\mu\text{mol/L}$), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 同时设置病毒对照组和溶媒对照组。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 48 h 后, 1000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 用 PBS 轻轻吹打洗涤细胞 2 次, 用 200 μL 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 再用 195 μL 细胞悬液中加入 Annexin V-FITC, 室温混合孵育 10 min; 加入 200 μL 1 $\times$ Binding Buffer 洗涤细胞, 再用 190 μL 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 加入 PI 室温孵育 10 min 后, 加入 200 μL 1 $\times$ Binding Buffer 清洗细胞; 加入 200 μL PBS 溶液重悬细胞, 进行流式细胞仪检测, 共重复 3 次。

2.3 椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染 BALB/c 小鼠模型的影响

2.3.1 造模、分组与给药 取雌性 BALB/c 小鼠 100 只, 每只动物 sc 0.1 μg 苯甲酸雌二醇, 1 次/d, 连

续 3 d, 第 3 天下午取 25 μL HPV 假病毒与 15 μL 4% 羧甲基纤维素 (CMC) 的混合物灌入小鼠阴道内进行感染, 另取 16 只对照组小鼠灌入 40 μL 的 4% CMC 进行处理; 假病毒感染 48 h 之后, 乙醚轻微麻醉小鼠, 利用多模式动物活体成像系统检测小鼠阴道内荧光的表达情况。选取造模成功的 BALB/c 小鼠 80 只, 按体质量随机分为模型组、鬼臼毒素组 (1 mg/只) 和椿乳凝胶低、中、高剂量 (0.01、0.02、0.04 g/只) 组, 每组 16 只。采用称量好的阴道装药器经阴道推注相应的药物, 1 次/d, 连续 20 d。

2.3.2 pH 值检测 分别于给药后 10、20 d 采用无菌棉签进行阴道分泌物的取样。取材部位为小鼠的宫颈口或宫颈后穹窿, 分泌物使用一次性无菌阴道拭子采集, 圆周滚动 3 次, 采用 0.1 级精密 pH 试纸检测阴道分泌物的 pH 值。

2.3.3 组织病理检查 末次给药后各组选取 8 只动物颈椎脱臼处死, 解剖取阴道、子宫组织进行苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠阴道、子宫及子宫颈组织形态学变化。评分标准^[6-7]: 上皮细胞正常, 且未见炎症细胞浸润, 计为 0 分; 上皮细胞坏死, 计为 1 分; 上皮细胞坏死及增生, 计为 2 分; 上皮细胞坏死及增生, 且炎症细胞浸润, 计为 3 分。

2.3.4 宫颈组织病毒滴度检测 取一定量的组织匀浆, 离心取上清液, 在 96 孔板中接种 293T 细胞, 第 2 天用完全培养基按 (1~1 $\times 10^{-9}$) 10 个梯度稀释病毒液, 每孔加入 100 μL 稀释后的病毒液, 每个梯度设置 3 个重复孔; 48 h 后观察细胞中绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达, 若 1 $\times 10^{-8}$ 梯度孔中分别有 2、3、4 个细胞 GFP, 则取平均值, 此病毒滴度为 3 $\times 10^8$ TU/mL。采用血凝抑制试验检测宫颈悬液的血凝抑制滴度 (以完全抑制红细胞凝集的最大稀释倍数为血凝抑制滴度), 以 $\log_2$ (最大稀释倍数), 反映宫颈中病毒效价。

2.3.5 HPV6 E6/E7、HPV11 E6/E7 mRNA 检测 取各组宫颈组织, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行 PCR 反应, 根据 Genbank 里的基因数据, 使用 Primer Premier 6 和 Oligo 7 软件设计引物序列。内参为 β -actin。设定对照基因表达量为 100, 以目的基因占对照基因相对百分含量代表目的基因表达量。引物序列: HPV6 E6 上游引物 5'-TGTTTCAGGACCCACAGGAG-3', 下游引物 5'-TCACGTCGCAGTAAGTGTG-3'; HPV6 E7 上游引物 5'-CAGCTCAGAGGAGGAGGATG-3', 下游引物 5'-AACCGA-

AGCGTAGAGTCACA; HPV11 E6 上游引物 5'-CACTATAGAGGCCAGTGCCA-3', 下游引物 5'-CTTGTGTTTCTCTGC GTC GT; HPV11 E7 上游引物 5'-CGAACCACAACGTCACACAA-3', 下游引物 5'-AGAAACAGCTGCTGGAATGC-3'。

2.3.6 HPV6、HPV11 E7 蛋白表达 留取样本用 BCA 法测定蛋白浓度, 制备分离胶、浓缩胶, 上样, 电泳。将电泳后凝胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜, ECL 显色曝光。目的蛋白相对表达量为目的蛋白条带灰度值与 β -actin 条带灰度值比值。

2.3.7 统计学方法 用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 椿乳凝胶体外实验

3.1.1 HPV6、11 假病毒滴度测定 HPV6/11 假病毒滴度测定结果见表 1。根据公式 $\lg TCID_{50} = \lg$ (高于 50% 的死亡百分数的稀释度) + (距离比例 $\times$ lg 稀释倍数) 可知, $TCID_{50}$ 终点稀释比例为 1:630.95, 即测定 HPV6/11 假病毒中, 每 0.1 mL 接种量含有 630 个 $TCID_{50}$ 单位。因此, 把 HPV6/11 假病毒原液用 DMEM 培养基按照 1:6.3 倍稀释即可得 100 $TCID_{50}$ 。

3.1.2 椿乳凝胶对 293FT 细胞形态及增殖的影响 如表 2 所示, 椿乳凝胶对 293FT 细胞的 IC_{50} 为 333.80 $\mu\text{g/mL}$, TC_0 为 129.20 $\mu\text{g/mL}$, 鬼臼毒素在 100~3.12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度对 293FT 细胞的毒性差异不大, 实验浓度范围内未检测到鬼臼毒素对 293FT 细胞的 IC_{50} 和

TC_0 。加入椿乳凝胶溶液 (1000~31.25 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24~72 h 后对 293FT 细胞形态的影响见图 1, 对照

表 1 HPV6/11 假病毒的滴度测定出现 CPE 孔的统计 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Statistics of CPE wells in titer determination of HPV6/11 pseudovirus ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

病毒稀释度	出现 CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计出现 CPE 孔占比/%
1×10^{-1}	8	0	100.0
1×10^{-2}	8	0	100.0
1×10^{-3}	3	5	37.5
1×10^{-4}	2	6	25.0
1×10^{-5}	0	8	0

表 2 椿乳凝胶和鬼臼毒素对 293FT 细胞的毒性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Toxicity results of Chunru Gel and podophyllotoxin on 293FT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	$IC_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$TC_0/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
椿乳凝胶	1000.00	66.53 ± 0.83	309.09	129.14
	500.00	53.34 ± 0.74		
	250.00	48.95 ± 0.25		
	125.00	19.01 ± 0.66		
	62.50	8.88 ± 0.95		
	31.25	1.96 ± 0.30		
鬼臼毒素	100.00	66.04 ± 0.85	/	/
	50.00	63.18 ± 0.67		
	25.00	63.21 ± 1.34		
	12.50	61.45 ± 0.91		
	6.25	59.64 ± 0.87		
	3.12	61.92 ± 1.85		

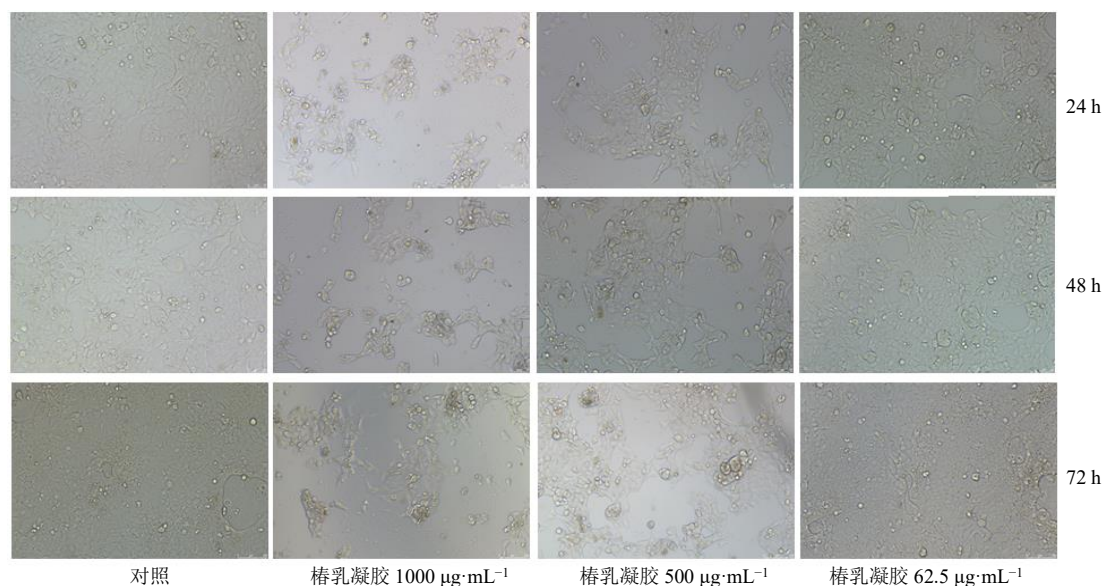


图 1 椿乳凝胶对 293FT 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of Chunru Gel on morphology of 293FT cells

组细胞形态呈圆形，棱角分明。与对照组比较，椿乳凝胶干预组中细胞形态出现明显变化，以细胞脱落，皱缩为主，提示药物干预后细胞增殖受到一定的抑制作用。

3.1.3 椿乳凝胶对 HPV6、HPV11 假病毒感染力的影响 如图 2 所示，与溶媒对照组比较，病毒感染 48 h 后，病毒对照组细胞出现明显的增殖速度减慢，细胞碎片增多、细胞间的间隙增大等病变现象。与病毒对照组比较，椿乳凝胶干预后细胞病变程度明显减少，表明其有一定抑菌病毒增殖的能力；至培养 72 h 后，椿乳凝胶抑制病毒的效果呈现降低的趋势，病毒对照组与椿乳凝胶干预组出现细胞病变的差异性不大，鬼臼毒素在 72 h 表现出一定抑制病毒增殖的能力。提示随着时间的延长椿乳凝胶抗病毒的能力慢慢减弱，需连续给药增强药效。综上所述，椿乳凝胶对 HPV6/HPV11 病毒的感染有一定的抑制作用。

3.1.4 椿乳凝胶对 293FT 细胞周期的影响 PI 单染流式细胞仪分析 293FT 细胞周期中各期细胞的变化，结果见图 3。HPV6/HPV11 感染 48 h 后，细胞中 G₀/G₁ 期细胞比例显著低于溶媒对照组，S 期细

胞比例高于溶媒对照组，G₂/M 细胞比例与溶媒对照组相比无显著差异。椿乳凝胶低、中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于 HPV6/HPV11 组，S 期细胞比例低于 HPV6/HPV11 组，G₂/M 细胞比例低于 HPV6/HPV11 组。椿乳凝胶组 G₀/G₁ 期细胞比例低于溶媒对照组，与鬼臼毒素组相比 G₀/G₁ 期细胞比例无显著差异。

3.1.5 椿乳凝胶对 293FT 细胞凋亡的影响 如图 4 所示，经 Annexin V-FITC 染色后利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况，经假病毒处理的病毒对照组 293FT 细胞凋亡率明显低于溶媒对照组，提示 HPV 假病毒能抑制细胞凋亡。经鬼臼毒素和低、中、高剂量椿乳凝胶处理后的 293FT 细胞凋亡率明显高于病毒对照，并且椿乳凝胶具有剂量相关性。

3.2 椿乳凝胶体内实验

3.2.1 一般观察结果（定植检查） 造模后 48 h 通过动物活体成像系统对 HPV 定植进行检查，如图 5 所示，模型组荧光强度高，且造模后 22 d 模型组荧光强度仍然较高，提示 HPV 在阴道体内定植良好，维持时间较长。一般临床观察显示给药后各组动物一般情况（自主活动、摄食饮水等）均未见异常，

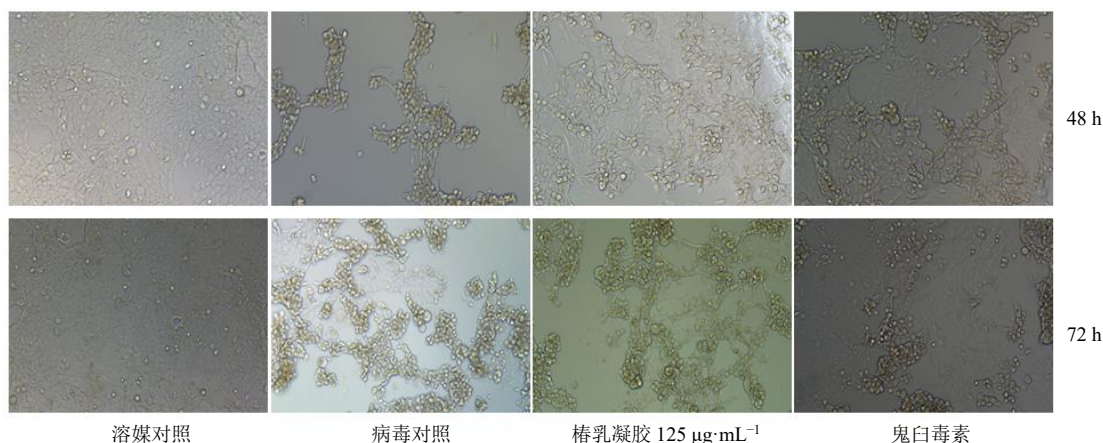


图 2 椿乳凝胶对假病毒感染 293FT 细胞的影响

Fig. 2 Effect of Chunru Gel on pseudovirus infection of 293FT cells

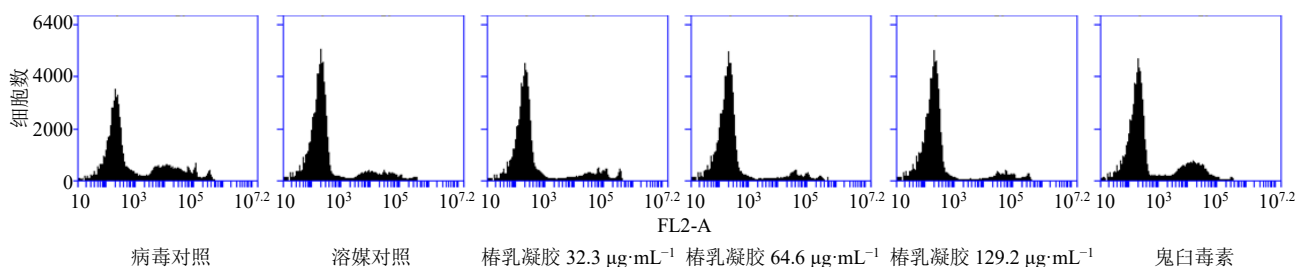


图 3 PI 单染流式细胞仪分析 293FT 细胞周期

Fig. 3 PI single staining flow cytometry analysis of 293FT cell cycle

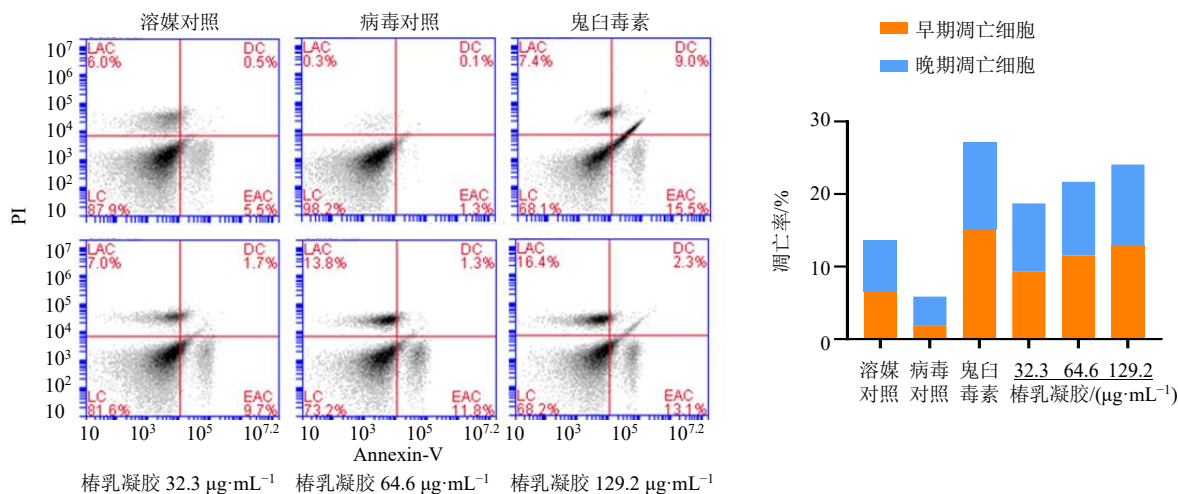


图 4 椿乳凝胶对 293FT 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Chunru Gel on apoptosis of 293FT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

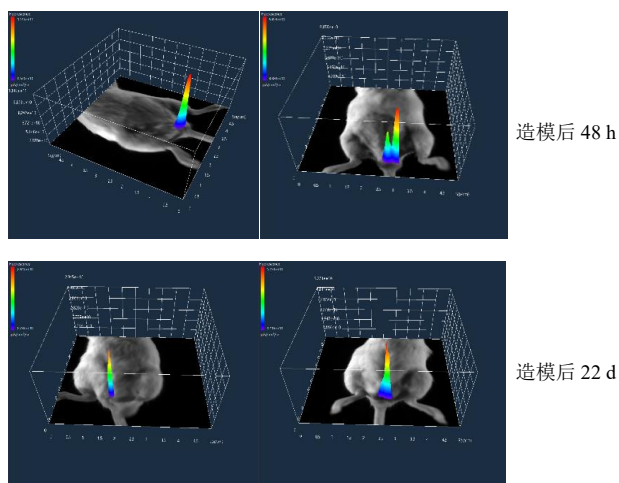


图 5 模型组 HPV 定植检查

Fig. 5 HPV colonization examination in model group

且阴道外观无明显分泌物和红肿。

3.2.2 对阴道 pH 的影响 如表 3 所示，与对照组比较，给药第 10、20 天模型组阴道 pH 值明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，给药第 10 天鬼白毒素组和椿乳凝胶低、高剂量组阴道 pH 值均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)，给药第 20 天各给药组阴道 pH 值均明显降低 ($P < 0.01$)。

3.2.3 对宫颈组织病毒滴度的影响 如表 4 所示，与对照组比较，模型组宫颈组织病毒滴度明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组宫颈组织病毒滴度均明显降低 ($P < 0.01$)。

3.2.4 组织病理学镜下观察 如图 6 所示，对照组仅个别动物阴道及宫颈组织镜下可见黏膜上皮细胞坏死，并伴有少量炎症细胞浸润；模型组宫颈及阴

表 3 椿乳凝胶对阴道 pH 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Chunru Gel on vaginal pH ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	pH 值	
		第 10 天	第 20 天
对照	—	6.3±0.2	6.4±0.2
模型	—	6.9±0.5 ^{##}	7.0±0.5 ^{##}
鬼白毒素	0.001	6.5±0.2*	6.5±0.1**
椿乳凝胶	0.01	6.4±0.3**	6.2±0.3**
	0.02	6.5±0.2	6.4±0.2**
	0.04	6.4±0.2*	6.3±0.2**

与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下表同

^{##} $P < 0.01$ vs control group；* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group，same as below tables

表 4 椿乳凝胶对宫颈组织病毒滴度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Chunru Gel on cervical tissue virus titer ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	log ₂ 末次给药病毒滴度
对照	—	0.0±0.0
模型	—	4.4±0.7 ^{##}
鬼白毒素	0.001	2.6±0.7**
椿乳凝胶	0.01	3.1±0.4**
	0.02	2.1±0.4**
	0.04	1.6±0.5**

道上皮细胞坏死，部分动物出现上皮细胞增生，上皮层及黏膜固有层炎症细胞浸润；各给药组阴道及宫颈组织镜下均可见黏膜上皮细胞变性坏死，伴有少量炎症细胞浸润。小鼠造模后经阴道给予不同剂量的椿乳凝胶，阴道组织病变程度变化不明显，宫颈组织病变有不同程度的减轻。连续给药 20 d 后，各组动物子宫组织镜下观察未见上皮细胞增生、坏死及炎症细胞浸润。

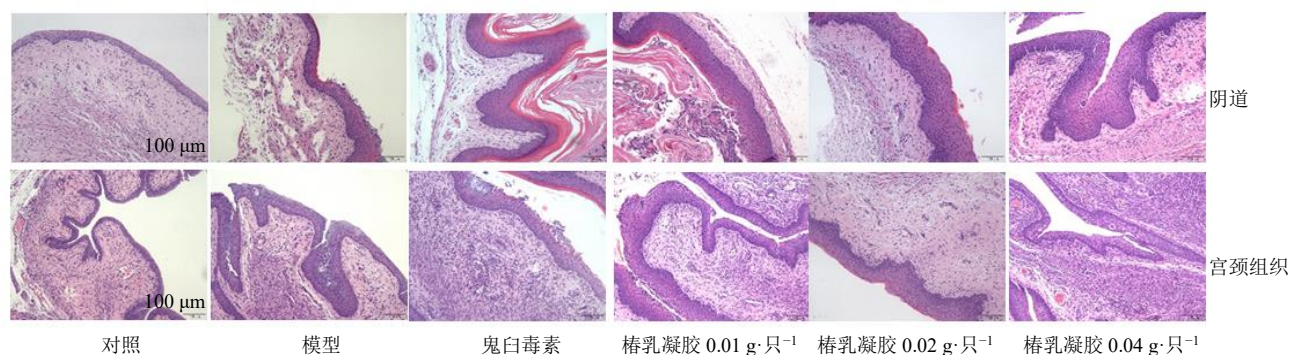


图 6 各组小鼠阴道、宫颈组织病理切片 (HE, ×100)

Fig. 6 Histopathological sections of vagina and cervix in mice (HE, ×100)

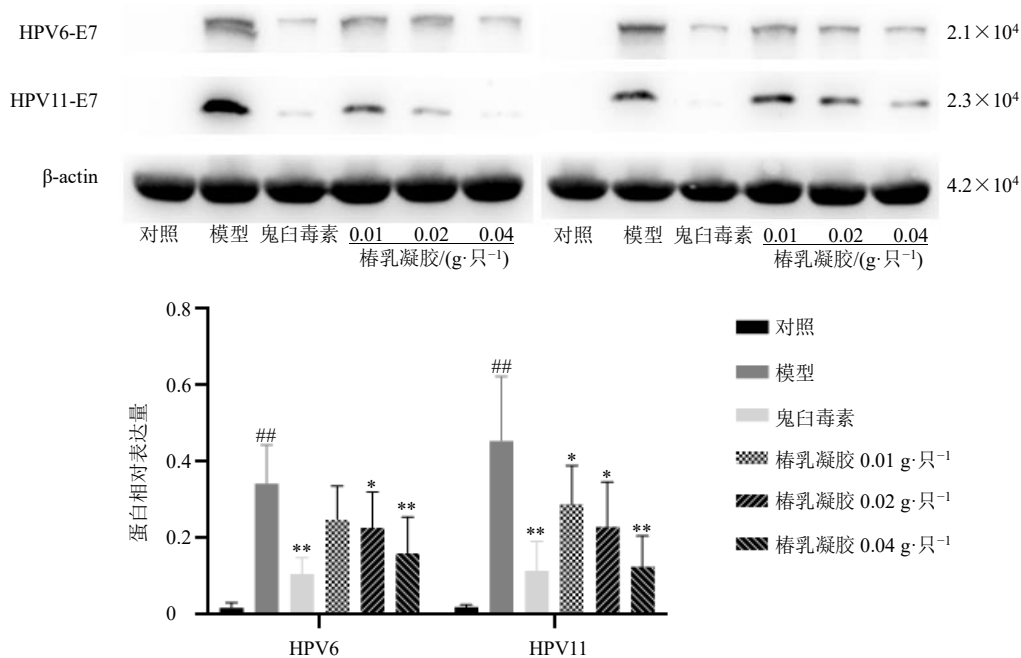
3.2.5 组织病理学评分 如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组宫颈组织病变评分明显升高 ($P < 0.01$), 阴道组织病变评分有增加趋势, 但无统计学差异; 与模型组比较, 鬼臼毒素组和椿乳凝胶中、高剂量组宫颈组织病变评分均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。各给药组阴道组织病变评分与模型组比较, 均无统计学差异。

3.2.6 对 HPV6、HPV11 的 E7 蛋白表达的影响 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 HPV6、HPV11 的 E7 蛋白表达水平均明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 鬼臼毒素组 HPV6、HPV11 的 E7 蛋白表

达水平明显降低 ($P < 0.01$), 椿乳凝胶各剂量组 HPV11 的 E7 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、

表 5 椿乳凝胶对组织病变评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 5 Effect of Chunru Gel on histopathological score ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·只 ⁻¹)	阴道组织病变评分	宫颈组织病变评分
对照	—	0.4 ± 0.7	0.1 ± 0.4
模型	—	0.9 ± 1.0	1.9 ± 0.4 ^{##}
鬼臼毒素	0.001	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.9 [*]
椿乳凝胶	0.01	1.1 ± 0.8	1.4 ± 0.7
	0.02	0.8 ± 0.7	0.9 ± 0.6 ^{**}
	0.04	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.7 [*]



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 7 椿乳凝胶对小鼠宫颈组织 HPV6、HPV11 E7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 7 Effect of Chunru Gel on HPV6 and HPV11 E7 protein expressions in cervical tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.01), 椿乳凝胶中、高剂量组 HPV6 的 E7 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

3.2.7 对 HPV6、HPV11 E6/E7 mRNA 表达的影响 如图 8 所示, 对照组小鼠宫颈组织中未检测到 HPV6/HPV11 E6/E7 mRNA 表达; 模型组小鼠宫颈组织 HPV6/HPV11 E6/E7 mRNA 表达水平均明显升

高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鬼臼毒素组 HPV6 E6/E7、HPV11 E7 mRNA 均明显降低 ($P<0.05$ 、0.01), 椿乳凝胶低剂量组 HPV6 E7、HPV11 E7 mRNA 均明显降低 ($P<0.05$), 椿乳凝胶中、高剂量组 HPV6 E6/E7、HPV11 E7 mRNA 均明显降低 ($P<0.05$ 、0.01)。

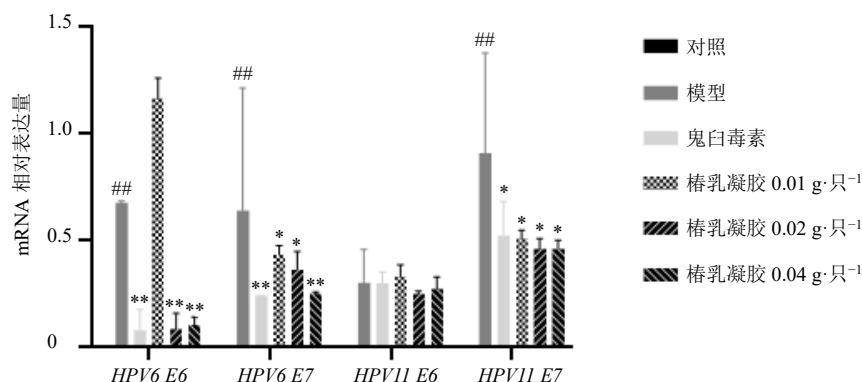


图 8 椿乳凝胶对小鼠宫颈组织 HPV6、HPV11 E6/E7 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Effect of Chunru Ningjiao on HPV6 and HPV11 E6/E7 mRNA expressions in cervical tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

尖锐湿疣 (condyloma acuminatum, CA) 也叫生殖器疣、性病疣, 是一种由 HPV 病毒感染引起的性传播疾病, 主要引起生殖器、肛门部位增生性损害^[8]。据报道, 全球每 10 万人中就有近 200 人感染 CA。美国每年用于 CA 的直接医疗费用约 1.77 亿美元, 而在发展中国家, CA 造成的影响更加严重^[9-11]。CA 传染性强, 并且有一定潜伏期, 导致发病率逐年升高^[12]。目前 CA 治疗手段多局限于去除疣体及 HPV 感染组织, 非针对 HPV 的病原学治疗, 因此该病容易复发^[13]。研究表明, 90% 以上的 CA 都与 HPV6 和 HPV11 2 种基因型有关^[14-15]。

HPV 是乳多空病毒科乳头瘤空泡病毒 A 属的病毒, 只特异性感染人的上皮细胞, 依靠上皮细胞的分化途径来完成其生命周期。HPV 可能通过上皮表面的微磨损感染上皮基底层细胞, 利用伴随伤口愈合的基底细胞的横向延伸进入细胞^[16]。HPV 感染上皮细胞后, 癌蛋白 E6、E7 可以通过各种机制逃避宿主的免疫系统监测, 并且将自身基因整合进入基因组, 使得病毒免于被免疫系统清除。E6 和 E7 还能共同促进细胞增殖、延长细胞周期进程并防止细胞凋亡, 使得病毒大量复制。衣壳蛋白 L1 和 L2 在上皮的最表层表达, 并且进行病毒组装, 最后, 新的感染性病毒颗粒从上皮表面脱落^[17-18]。

尽管目前对于 HPV 已经有广泛研究, 然而对于

低危型 HPV 的可用数据仍然有限。有研究显示在中国西南地区, HPV6 是第 2 流行的 HPV 类型, 同时也是最流行的低危型 HPV^[19]。因此本研究以最常见的 5 种低危型 HPV 类型 HPV6、HPV11 为研究对象, 评价椿乳凝胶在体内外对于低危型 HPV 的抑制作用。

由于 HPV 真病毒的复制具有严格的宿主特异性和细胞分化依赖性, 因此目前并没有成功建立 HPV 体外培养体系, 也缺乏合适的动物感染模型, 构建假病毒成为目前 HPV 研究快速有效的方法。研究发现, 将 HPV 结构蛋白 L1、L2 基因进行密码子优化后, 可以极大提高其在细胞中蛋白的表达, 而这 2 种蛋白能够自我组装成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP), 其可以将外源性报告质粒包裹进病毒颗粒内, 形成与天然病毒结构相似的假病毒, 具有单次感染细胞的能力, 通过检测报告质粒的表达可以间接反映病毒的感染情况^[20-21]。

椿乳凝胶为株洲千金药业股份有限公司自主开发并独家生产的中药制剂, 由椿皮、苦参、牡丹皮、乳香、冰片 5 味中药组方而成, 具有清热燥湿、祛瘀生肌的功效, 主要用于慢性宫颈炎之宫颈糜烂及中医辨证属于湿热瘀阻者。根据其功能主治的特点, 本实验对椿乳凝胶体内及体外抗低危型 HPV 病毒的药效学作用展开了研究。本研究成功建立了 HPV6、HPV11 假病毒感染 293FT 细胞的体外模型,

发现假病毒能使细胞产生病变,影响细胞周期变化,并且抑制细胞凋亡。椿乳凝胶干预可以显著降低假病毒细胞感染能力,恢复细胞正常周期,促进细胞凋亡。同时本研究利用 HPV6、HPV11 假病毒建立了雌性小鼠生殖器感染体内模型,病毒感染上皮细胞后其包裹的报告基因可以立即表达,通过小动物体内可见光成像系统检测 GFP 荧光表达可以反映假病毒在上皮细胞中的感染情况。研究结果显示,HPV6、HPV11 假病毒成功感染小鼠,宫颈组织中病毒滴度显著升高,并且 HPV6、HPV11 的 E7 蛋白和 E6、E7 基因表达水平明显升高。同时宫颈组织上皮细胞出现增生和坏死,伴有明显炎性浸润,阴道 pH 值明显升高,研究显示正常阴道的酸性环境可以维持阴道微环境稳态,抵御 HPV 感染^[22]。椿乳凝胶给药后,可以有效降低假病毒感染小鼠宫颈组织中的病毒滴度,抑制 HPV6、HPV11 的 E7 蛋白和其 E6、E7 基因的表达,保护宫颈上皮细胞。

综上所述,通过体内体外实验证明椿乳凝胶可以明显抑制低危型 HPV 复制,减轻低危型 HPV 感染引起的组织病变。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王华庆,王岩,王朝华,等. 子宫颈癌等人乳头瘤病毒相关疾病免疫预防专家共识(简版)[J]. 中国疫苗和免疫, 2019, 25(6): 718-735.
- [2] 耿建祥,黄华艺,刘建华,等. HPV 感染疾病相关问题专家共识(2017)[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(12): 1238-1241.
- [3] 王鹤,乔友林. 人乳头瘤病毒型别及其相关疾病[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(5): 678-684.
- [4] 单玮,张涛,张铁军,等. 我国女性人乳头瘤病毒(HPV)感染的流行病学现状[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(1): 89-93.
- [5] 王大宁,张丽,刘亚静,等. 基于假病毒的人乳头瘤病毒小鼠感染模型的建立及 HPV16VLP 疫苗保护性评价[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(11): 5-10.
- [6] 龙子江,吕晓英,王桐生,等. 阴道及宫颈炎大鼠动物模型的研究[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(4): 35-36.
- [7] 郭姗姗,高英杰,包蕾,等. 紫金化毒栓治疗宫颈炎的体内外药效学评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 115-122.
- [8] 中华医学会皮肤性病学分会性病组,中国医师协会皮肤科分会性病亚专业委员会. 尖锐湿疣临床诊疗与防治指南(一)[J]. 中国艾滋病性病, 2015, 21(2): 172-174.
- [9] 张钰颖,宋晓彬,郝世超,等. 尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒感染状况及影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(4): 443-447.
- [10] 赵方晴,郑淑云. 尖锐湿疣与人乳头瘤病毒感染相关性研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(7): 1374-1377.
- [11] Patel H, Wagner M, Singhal P, et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 39.
- [12] 朱伟,曹萍. 尖锐湿疣的研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2014, 36(6): 327-329.
- [13] 陆小年,徐金华. 尖锐湿疣治疗专家共识(2017)[J]. 临床皮肤科杂志, 2018, 47(2): 125-127.
- [14] Moscicki A B. Impact of HPV infection in adolescent populations[J]. J Adolesc Health, 2005, 37(6): S3-S9.
- [15] 董琳琳,时元泰,马静洁. 尖锐湿疣的治疗进展[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(5): 373-376.
- [16] Crosbie E J, Einstein M H, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Lancet, 2013, 382(9895): 889-899.
- [17] 李甜甜,武丽,吕霄,等. 人乳头瘤病毒的感染现状及免疫治疗研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(18): 2862-2867.
- [18] 魏丽惠. HPV 感染现状及在宫颈癌和癌前病变筛查中的意义[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(2): 81-83.
- [19] Chen Z Y, Li Q Y, Huang J, et al. E6 and E7 gene polymorphisms in human papillomavirus type-6 identified in Southwest China[J]. Virol J, 2019, 16(1): 114.
- [20] 程艳香,杨潇,陈干涛. HPV16 假病毒制作方法优化[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(6): 19-21.
- [21] 陆巧妮. 人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)药物筛选模型的建立及药效学评价[D]. 北京:北京协和医学院, 2012.
- [22] 王婧,郭洁,宋殿荣. 阴道微环境与人乳头瘤病毒感染相关性的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2020, 47(1): 5-9.

[责任编辑 李亚楠]