

川楝子提取物体外抗单纯疱疹病毒 1 型活性的实验研究

赖志才^{1,2}, 瞿 畅^{1,2}, 曾恕芬³, 裴 赢², 向阳飞², 钱垂文², 任 哲², 王一飞², 张颖君³, 杨崇仁³
(1. 暨南大学药学院, 广州 510632; 2. 暨南大学生物医药研究开发基地, 广州 510632; 3. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204)

摘要: 目的 在体外研究川楝子提取物抗单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)的作用。方法 以 Vero 细胞为宿主细胞, 阿昔洛韦为阳性对照药物, 通过观察细胞病变效应(CPE)与空斑减数实验测定川楝子提取物抗 HSV-1 活性, 计算其 IC₅₀ 与治疗指数, 并从药物对病毒的直接灭活作用、对病毒吸附的影响及对病毒穿膜的影响三个方面初探川楝子提取物抗 HSV-1 活性的机理。结果 川楝子提取物能明显抑制 HSV-1 的致病变作用, 其 IC₅₀ 为 18.26 μg/mL, TI 值为 18。研究显示, 川楝子提取物在体外对 HSV-1 直接灭活的效果明显, 而对 HSV-1 吸附与穿入细胞的抑制作用较差。结论 川楝子提取物在体外有明显的抗 HSV-1 感染作用, 且主要是通过直接灭活 HSV-1 而发挥作用。

关键词: 川楝子提取物; MTT 法; 细胞病变效应法(CPE); 空斑减数实验

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9783(2010)01-0007-04

Anti-HSV-1 Activity of the Extract from Fructus Toosendan *In-vitro*

LAI Zhicai^{1,2}, QU Chang^{1,2}, ZENG Shufen³, PEI Ying², XIANG Yangfei², QIAN Chuiwen², REN Zhe², WANG Yifei², ZHANG Yingjun³, YANG Chongren³ (1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Biomedical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Objective To investigate the *in-vitro* effect of the extract from Fructus toosendan on counteracting the activity of herpes simplex virus type 1(HSV-1). **Methods** By using Vero cell as the host cells and with acyclovir as the positive control, anti-HSV-1 activity of the extract was observed and determined with cytopathic effect (CPE) assay and plaque reduction assay. Initial studies on antiviral mechanism included three aspects: virucidal assay, attachment assay and penetration assay. **Results** The extract had conspicuous anti-HSV-1 activity, with an IC₅₀ value of 84.28 μg/mL and a therapeutic index (TI) value of 18. The extract could inactivate virus directly, but had no influence on virus attachment and virus penetration. **Conclusion** The extract from Fructus toosendan has conspicuous anti-HSV-1 activity by inactivating virus directly.

Keywords: Extract from Fructus toosendan; MTT method; CPE assay; Plaque reduction assay

单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)属于疱疹病毒 α 亚科, 是最早发现的人类疱疹病毒, 也是所有人类病毒性疾病中最常见的病毒。它引起人类的主要疾病有龈口炎、唇疱疹、角膜结膜炎、脑炎等炎症性疾病^[1], 因在感染急性期出现水痘性皮疹或水疱而得名。目前, 临床使用的抗 HSV-1 药物主要为核苷类似物, 如阿昔洛韦、更昔洛韦等。由于这些药物都是病毒

DNA 聚合酶底物的类似物, 在用药过程中会产生耐药性, 副反应较大^[2], 因此, 寻找新的、高效低毒的抗 HSV-1 的药物仍为当务之急。

川楝子(*Fructus toosendan*)为楝科楝属川楝的果实, 具有祛湿热、清肝火、止痛、杀虫等功效。文献报道川楝子具有消炎、镇痛、抗菌、抗氧化、抗生育^[3]等多种作用, 对带状疱疹也具有抑制作用^[4]。有

收稿日期: 2009-07-09

作者简介: 赖志才(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事抗病毒新药的研究工作。Email: laichichoi@hotmail.com。通讯作者: 王一飞, 博士研究生导师, 主要从事新药的研究工作。Email: twangyf@jnu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金·广东省人民政府自然科学基金(U0632010); 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室自主课题(O807E21211)以及开放课题(O807B11211)。

关川楝子提取物的抗单纯疱疹病毒实验尚未见报道, 本文对川楝子提取物抗单纯疱疹病毒的药效进行了实验研究, 并对其抗病毒活性机理进行了初步的探讨, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞及其培养 单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) F 株, 由武汉大学病毒研究所提供; Vero 细胞, 购于美国 ATCC 公司, 由本室保存。细胞生长液: DMEM 培养基 (Hyclone 产品), 加 10 % 胎牛血清 (杭州四季青生产), 常规加 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素。细胞维持液: 除血清浓度降为 2 % 之外, 其余同细胞生长液。

1.2 药品与试剂 阿昔洛韦 (ACV) 注射用灭菌粉末, 购于湖北科益药业股份有限公司, 批号: 081102; 川楝子乙酸乙酯提取物, 编号为 P17-E1, 由中科院昆明植物研究所提供, 用 DMSO 溶解, 药液浓度为 500 mg/mL, -20 °C 保存, 临用时以细胞维持液稀释成所需的药液浓度; MTT, 广州市博理生物科技有限公司, 批号: 0793; DMSO, 美国 TEDIA 公司产品, 批号: 607034。

1.3 仪器 超净工作台 (苏州净化设备公司, Heal [HForce HFsafe-1200E]); CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司); 相差显微镜 (德国 Laica 公司); 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 病毒滴度的测定 将 HSV-1 病毒液, 以 10 倍递次稀释成 10⁻¹ ~ 10⁻⁹, 常规方法感染单层 Vero 细胞, 每个稀释度设 8 孔, 同时设不加病毒液的正常细胞做对照, 37 °C、5 % CO₂ 的培养箱中继续培养。每日观察细胞的病变程度 (CPE) 并做记录, 待 CPE 稳定 (3 ~ 4 d) 后判定结果, 计算^[5]病毒的半数感染量 (TCID₅₀)。CPE 记录方法: “-” 为无细胞病变; “+” 为 1 % ~ 25 % 的细胞出现病变; “++” 为 26 % ~ 50 % 的细胞出现病变; “+++” 为 51 % ~ 75 % 的细胞出现病变; “++++” 为 76 % ~ 100 % 的细胞出现病变。

1.5 P17-E1 的细胞毒性测定 在 96 孔板上培养 Vero 细胞, 长满成单层后弃去生长液, 换用含 P17-E1 的维持液继续培养。药液浓度分别为 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 μg/mL, 每个稀释度均重复 3 孔, 同时设正常细胞对照组, 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养, 每天观察细胞的变化, 48 h 后用改良 MTT 法检测各孔细胞的存活率。改良 MTT 法操作步骤如下^[5]: 每孔加 MTT (5 mg/mL) 10 μL, 37 °C 继续

培养 4 h; 轻吸弃各孔内上清液, 每孔加入 DMSO 100 μL, 振荡混匀 10 min, 使结晶充分溶解; 测定 570 nm 波长处吸光度 (OD 值)。细胞存活率 (%) = 药物组 OD 值 / 正常细胞组 OD 值 × 100 %。用直线回归法算出药物对细胞的半数中毒浓度 (TC₅₀)。

1.6 药物抗病毒的药效学实验

1.6.1 CPE 观察实验 将不同浓度的 P17-E1 药液和病毒稀释液 (100 TCID₅₀) 等体积混合后直接加到单层 Vero 细胞上, 置于 37 °C、5 % CO₂ 细胞培养箱培养 48 h, 光镜下观察细胞病变效应 (CPE)。

1.6.2 空斑减数实验 在 24 孔板上培养 Vero 细胞, 长满成单层后弃去生长液, 分别将不同浓度的 P17-E1 药液和病毒稀释液各 50 μL 混合后加入细胞中, 每个浓度设 3 个复孔, 设病毒对照组和正常细胞对照组, 37 °C、5 % CO₂ 培养 2 h, 弃上清液, 加入含 0.5 % 羧甲基纤维素细胞维持液 (覆盖液) 1 mL, 观察 72 h 后, 10 % 甲醛固定 30 min, 1 % 结晶紫染色 30 min, 清水漂洗、晾干, 参照 Nitta^[6] 的方法空斑计数, 计算空斑抑制率。空斑抑制率 (%) = (病毒对照组空斑数 - 药物处理组空斑数) / 病毒对照组空斑数 × 100 %。通过线性回归法, 以不同药物浓度的对数值为横坐标, 相应的空斑抑制率为纵坐标, 得出直线回归方程, 根据该方程计算出药物对病毒的半数抑制浓度 (50 % inhibiting concentration, IC₅₀)。

1.6.3 抗病毒效果的评价 通过比较 P17-E1 与 ACV 的 TC₅₀, IC₅₀, TI (治疗指数, TI = TC₅₀ / IC₅₀) 来评价它们的抗病毒效果。

1.7 药物抗病毒作用机理实验

1.7.1 药物直接灭活病毒实验 将不同浓度的 P17-E1 药液与病毒稀释液等体积混合, 37 °C 放置 1.5 h。病毒对照组以等同条件处理。然后将各药物与病毒混合液加入单层 Vero 细胞中, 每个浓度设 3 个复孔, 设病毒对照组和正常细胞对照组, 37 °C、5 % CO₂ 培养 2 h。其余步骤同 1.6.2 项的空斑减数实验。

1.7.2 病毒吸附抑制实验^[7] 将已长成单层 Vero 细胞的 24 孔培养板置于 4 °C 预冷 1 h, 同时加入不同浓度的 P17-E1 药液与病毒稀释液 4 °C 孵育 3 h。每个浓度设 3 个复孔, 设病毒对照组和正常细胞对照组。其余步骤同 1.6.2 项的空斑减数实验。

1.7.3 病毒穿入抑制实验^[8] 将已长成单层 Vero 细胞的 24 孔培养板置于 4 °C 预冷 1 h, 加入病毒稀释液后 4 °C 孵育 3 h。然后加入不同浓度的 P17-E1 药液, 37 °C、5 % CO₂ 培养 10 min。每个浓度设 3 个复孔, 设病毒对照组和正常细胞对照组。药物作用 10 min

后,加入 pH=3.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)处理 1 min,灭活未穿入的病毒,最后加入 pH=11 的 PBS 中和后吸弃。其余步骤同 1.6.2 项的空斑减数实验。

1.8 统计学处理 细胞毒性实验与空斑减数实验的数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 病毒滴度 按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀ 为 $10^{-6.8}$,即接种滴度为 $10^{-6.8}$ 的病毒每孔 0.1mL,可使 50% 细胞发生明显病变。实验用病毒浓度为 100 TCID₅₀。

2.2 P17-E1 的细胞毒性测定 在细胞毒性的实验中,125 $\mu\text{g/mL}$ 及以下浓度实验组的 Vero 细胞形态与正常细胞对照组无明显差别,当浓度达到 250 $\mu\text{g/mL}$ 时,实验组的细胞有明显的变圆缩小、死亡脱落等细胞形态改变。经噻唑蓝染色后,测得各药物浓度的细胞存活率,见表 1,用直线回归法算出 P17-E1 对 Vero 细胞的 TC₅₀ 为 324.65 $\mu\text{g/mL}$ 。参考本实验室的前期实验结果^[9],ACV 的 TC₅₀ 为 656 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 P17-E1 对 Vero 细胞毒性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	存活率/%
正常细胞对照组	—	—
P17-E1 组	500.00	$27.5 \pm 0.04^{**}$
	250.00	$24.3 \pm 0.06^{**}$
	125.00	95.5 ± 0.08
	62.50	109.8 ± 0.14
	31.25	103.6 ± 0.15
	15.63	105.5 ± 0.09

注:与正常细胞对照组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

2.3 药物抗病毒的药效学实验 通过 CPE 观察实验结果可以看出,随着药物浓度的增大,药物抑制细胞 CPE 的程度增强。当用药浓度为 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 时,P17-E1 显示有较好的抗 HSV-1 活性,见表 2。

空斑减数实验中,病毒对照组的平均空斑数为 20.3 个,不同浓度的 P17-E1 作用下的平均空斑数和空斑抑制率见表 3,通过回归方程计算得 P17-E1 的 IC₅₀ 分别为 18.26 $\mu\text{g/mL}$ 。比较 CPE 法与空斑减数实验两种药效检测方法,可见 P17-E1 在两种方法中,抗病毒效果趋近一致,且抗病毒活性呈剂量依赖性增加。参考本实验室的前期实验结果^[9],ACV 的 IC₅₀ 为 0.97 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 抗病毒效果的评价 P17-E1 与 ACV 的 TC₅₀、IC₅₀、TI 值如表 4 所示。实验结果显示 P17-E1 的安全范围不及 ACV 的宽,但仍有良好的安全性。

表 2 P17-E1 抑制 HSV-1 的致细胞病变作用

组 别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	CPE
P17-E1 组	125	—
	62.5	—
	31.3	—
	15.6	++
	7.8	+++
	3.9	++++

注:CPE 等级:1%~25% 为“+”;26%~50% 为“++”;51%~75% 为“+++”;76%~100% 为“++++”。

表 3 P17-E1 抑制 HSV-1 的平均空斑个数和空斑抑制率($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均空斑个数/个	空斑抑制率/%
P17-E1 组	125.0	$1.7 \pm 0.58^{**}$	91.8 ± 2.84
	62.5	$2.7 \pm 1.15^{**}$	86.9 ± 5.68
	31.3	$9.3 \pm 1.53^{**}$	54.1 ± 7.51
	15.6	$11.3 \pm 2.52^{*}$	44.3 ± 12.38
	7.8	$14.3 \pm 0.58^{*}$	29.5 ± 2.84
病毒对照组	—	20.3 ± 2.52	—

注:与病毒对照组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

表 4 P17-E1 抗 HSV-1 活性结果

样品	TC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	IC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	TI
P17-E1	324.65	18.26	18
ACV	656	0.97	676

2.5 药物抗病毒作用机理实验 空斑减数结果见表 5,在直接灭活实验中,低浓度的药物即对 HSV-1 有抑制作用,其 IC₅₀ 为 7.28 $\mu\text{g/mL}$ 。而在病毒吸附与病毒穿入实验中,药物浓度需在 85.52 $\mu\text{g/mL}$ 与 39.49 $\mu\text{g/mL}$ 才能有效抑制 HSV-1 感染 Vero 细胞,显示川楝子提取物在体外具有很强的直接灭活 HSV-1 的作用。

3 讨论

HSV-1 的基因组为双链 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的热点之一。

川楝子为楝科植物川楝的果实,广泛分布于四川、湖北、贵州、河南等地。川楝子中主要有效成分为川楝素,此外,还含有挥发油、黄酮及多糖等多种化学成分^[10]。近年来研究表明川楝子具有消炎、镇

表 5 P17-E1 抑制 HSV-1 的平均空斑个数和空斑抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	直接灭活		吸附抑制		穿入抑制	
		平均空斑个数/个	空斑抑制率/%	平均空斑个数/个	空斑抑制率/%	平均空斑个数/个	空斑抑制率/%
P17-E1 组	125.0	0.0 $\pm$ 0.00**	100.0 $\pm$ 0.00	7.3 $\pm$ 2.52**	68.6 $\pm$ 10.79	4.3 $\pm$ 2.08**	81.9 $\pm$ 8.67
	62.5	0.0 $\pm$ 0.00**	100.0 $\pm$ 0.00	16.7 $\pm$ 3.21	28.6 $\pm$ 13.78	10.7 $\pm$ 0.58**	55.6 $\pm$ 2.41
	31.3	0.3 $\pm$ 0.50**	99.2 $\pm$ 1.69	19.0 $\pm$ 1.73	18.6 $\pm$ 7.42	13.3 $\pm$ 2.08*	44.4 $\pm$ 8.67
	15.6	5.3 $\pm$ 0.58**	82.0 $\pm$ 1.95	22.0 $\pm$ 7.94	5.7 $\pm$ 34.02	17.7 $\pm$ 3.06	26.4 $\pm$ 12.73
	7.8	14.7 $\pm$ 1.53**	50.6 $\pm$ 5.15	23.7 $\pm$ 1.53	-1.4 $\pm$ 6.55	20.7 $\pm$ 1.53	13.9 $\pm$ 6.36
病毒对照组	-	29.7 $\pm$ 4.04	-	23.3 $\pm$ 3.06	-	24.0 $\pm$ 3.46	-

注：与病毒对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

痛、抗菌、抗氧化、抗生育等多种作用，但作为一种抗病毒药研究较少，研究表明，以川楝子为主药治疗带状疱疹及其发生前后引起的诸般疼痛，收到了良好的疗效^[4]。

本研究结果显示，川楝子提取物能明显抑制 HSV-1 所致 CPE 的产生，半数抑制浓度为 18.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能完全抑制 HSV-1 所致 CPE 的产生，证实了川楝子在体外具有很强的抑制 HSV-1 的作用。而其抗 HSV-1 的治疗指数达 18，表示其具有一定的安全性。通过初步的作用机理研究，发现川楝子提取物对抑制 HSV-1 吸附与穿入细胞的效果较差，但其对 HSV-1 直接灭活作用强。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 P17-E1 中的某些化学成分能使病毒包膜变性以灭活病毒，但是其直接灭活病毒的具体作用机制及其有效成分尚待进一步的实验研究。

参考文献：

[1]陶佩珍. 抗疱疹病毒药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12

(4): 253.

[2]林靖雯, 陈谦明, 周红梅. 抗疱疹病毒药物的研究进展[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(1): 60-62.
[3]孙建, 周洪雷. 中药川楝子临床应用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(1): 27-28.
[4]郭兴旺. 配伍川楝子治疗带状疱疹[J]. 山东中医杂志, 2005, 24(3): 183.
[5]傅继华. 病毒学实用实验技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 61-63.
[6]Nitta K, Shiota H, Nito T, et al. Sensitivities of other antiviral drugs and thymidine kinase activity of aciclovir-resistant herpes simplex virustype1[J]. J Jpn Ophthalmol Soc, 1994, 98: 513.
[7]Sua ST, Hsu JTA, Hsieh HP, et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms[J]. Antiviral Res, 2008, 79(1): 62-70.
[8]Cheng HY, Lin TC, Yang CM, et al. In vitro anti-HSV-2 activity and mechanism of action of proanthocyanidin A-1 from Vaccinium vitis-idaea[J]. J Sci Food and Agr, 2005, 85(1): 10-15.
[9]郝静, 王一飞, 张美英, 等. 裙带菜茎硫酸多糖体外抗单纯疱疹病毒 I 型活性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 806-808.
[10]谢帆, 张勉, 张朝凤, 等. 川楝子的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(14): 1066.

(编辑：宋威)

本刊入选中医药类“双核心”(中文核心、科技核心)期刊

《中药新药与临床药理》杂志入选《中文核心期刊要目总览》2008 年版(第五版)之中国医学类的核心期刊。本次核心期刊的评价涉及期刊 12 400 种，参加评审的学科专家达 5 500 多位。经过 9 个评价指标的定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出 1980 余种核心期刊。

本刊继续入选 2008 年《中国科技期刊引证报告》(核心版)。经过中国精品科技期刊遴选指标系综合评价，本刊也被评选为 2008 年度中国精品科技期刊。

(本刊编辑部)