

桉叶水提物体外抗单纯疱疹病毒 型活性的实验研究^{*}

赖志才¹ 瞿 畅¹ 田立文² 张美英¹ 裴 赢¹ 向阳飞¹ 钱垂文¹ 王一飞^{1*} 张颖君² 杨崇仁²

(1 暨南大学生物医药研究开发基地,广东,广州,510632;

2 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,云南,昆明,650204)

【摘要】 目的:研究直干桉叶水提物体外抗单纯疱疹病毒 1 型(HSV - 1)活性。方法:采用 CPE 观察实验与空斑减数实验测定直干桉叶水提物抗 HSV - 1 活性,计算其空斑抑制率和 IC_{50} ,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 3 个方面初探直干桉叶水提物抗 HSV - 1 活性机理。结果:直干桉叶水提物能明显抑制 HSV - 1 的致病变作用,其 IC_{50} 为 $84.28 \mu\text{g/ml}$ 。药物主要是对病毒有直接灭活作用,也能影响对病毒对细胞的吸附。结论:直干桉叶水提物有显著的抗 HSV - 1 活性,初步推测直干桉叶水提物抗 HSV - 1 活性的机理是影响病毒的囊膜结构从而使之失活。

【关键词】 直干桉叶;MTT法;细胞病变效应法(CPE);空斑减数实验

【中图分类号】 R931.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007 - 8517(2009)20 - 0007 - 02

人类单纯疱疹病毒 1 型(Hepes simplex 1 virus, HSV - 1)可引起多种疾病,如唇疱疹、疱疹性角膜炎、生殖器疱疹、新生儿脑炎等,且艾滋病、癌症和器官移植等免疫低下者感染 HSV - 1 的危险性大大增加。而目前临床常用的治疗药物主要是无环鸟苷(ACV)等核苷类,其作用靶点是病毒 DNA 聚合酶,进而影响病毒的复制,但其毒性大,且容易产生耐药性、抗病毒谱窄且价格高昂,故筛选研制毒性小,作用机理不同的抗病毒药物尤为重要。桉树是桃金娘科(Myrtaceae)桉属(Eucalyptus)树种的统称,品种主要有蓝桉、大叶桉、小叶桉、赤桉和直干桉(Eucalyptus maidenii)等,桉叶中含有挥发油、苦味质、鞣质和树脂等多种成分。其主要成分为挥发油,是医药、香料和化学工业的重要原料,具有一定的药用价值。近年来研究表明桉叶具有解热、消炎、抗菌、祛痰、平喘、镇痛等作用,但其在抗病毒方面的研究国内外未见报道,本文以 Vero 细胞作为体外筛选细胞模型检测直干桉叶水提物对 HSV - 1 的抑制作用,并对其抗病毒活性机理进行了初步探讨,为从传统中药中筛选新型抗病毒药物及进一步研究其抗 HSV - 1 活性机理提供参考依据。

1 材料

实验样品:无环鸟苷(ACV)购于湖北科益药业股份有限公司,单纯疱疹病毒 1 型(HSV - 1)F 株来源于武汉大学病毒研究所;Vero 细胞购于美国 ATCC 公司,由本室保存。Vero 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基连续传代 3 次保持对数生长期供实验用。实验样品由昆明植物所通过以下提取流程获得:收集直干桉叶样品→粉碎→醋酸乙酯提取→甲醇提取→热水提取→得到水提物(P19 - E3)。

2 方法

2.1 病毒滴度测定 将病毒株作 10 倍系列稀释, $10^{-1} \sim 10^{-9}$, 常规方法感染单层 Vero 细胞,各 8 个复孔, 37℃、5% CO_2 培养 3d, 观察细胞病变效应(CPE)情况,按 ReedMuench 方法计算 TCD_{50} 。

2.2 P19 - E3 的细胞毒性测定 Vero 细胞经胰酶消化后,以 1.5×10^5 个/孔的密度加入 96 孔培养板中,待细胞长成单

层后弃生长液,用维持液分别将 P19 - E3 稀释成 6 个系列浓度(500、250、125、62.5、31.25、15.63 $\mu\text{g/ml}$),每个稀释度设 4 个复孔,同时设正常细胞对照组, 37℃、5% CO_2 培养,每天观察细胞的变化,48h 后取出培养板,每孔加入 0.5mg/ml MTT 20 μl ,继续培养 4h 后,弃 MTT 液,并加入 DMSO,用酶标仪测吸光值 A_{570} ,计算细胞存活率及药物对细胞的半数中毒浓度(TC_{50})。

2.3 药物抗病毒的药效学实验

2.3.1 CPE 观察实验 将不同浓度的 P19 - E3 药液和病毒稀释液(100 TCD_{50})等体积混合后直接加到单层 Vero 细胞上,置于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱培养 48h,光镜下观察细胞病变效应(CPE)。CPE 的记录方法为:无细胞病变为“-”;1%~25%细胞出现病变为“+”;26%~50%细胞病变为“++”;51%~75%细胞病变为“+++”;76%~100%的细胞病变为“++++”。

2.3.2 空斑减数实验 Vero 细胞在 24 孔板上培养至单层,弃液,分别将不同浓度的 P19 - E3 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℃、5% CO_2 培养 2h,弃上清液,加入含 0.5% 羧甲基纤维素细胞维持液(覆盖液)1ml,观察 72h 后,10% 甲醛固定 30min,1% 结晶紫染色 30min,清水漂洗、晾干,参照 Nitta 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) $\times 100\%$ 。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, IC_{50})。

2.4 药物抗病毒作用机理实验

2.4.1 药物直接灭活病毒实验 将不同浓度的 P19 - E3 药液与病毒稀释液等体积混合, 37℃ 孵育 1.5h。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℃、5% CO_2 培养 2h。其余步骤同 2.3.2 项的空斑减数

* 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联合基金(Na 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)。

实验。

2.4.2 病毒吸附抑制实验 将已长成单层 Vero 细胞的 24 孔培养板置于 4℃ 预冷 1h, 加入不同浓度的 P19 - E3 药液与病毒稀释液 4 孵育 3h。每个浓度设 3 个复孔, 设病毒对照组和正常细胞对照组。其余同 2.3.2 项的空斑减数实验。

2.4.3 病毒穿入抑制实验 将已长成单层 Vero 细胞的 24 孔培养板置于 4℃ 预冷 1h, 加入病毒稀释液后 4℃ 孵育 3h。然后加入不同浓度的 P19 - E3 药液, 37℃、5% CO₂ 培养 10min。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 10min 后, 加入 pH3.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 处理 1min, 灭活未穿入的病毒, 加入 pH11 的 PBS 中和后吸弃。其余步骤同 2.3.2 项的空斑减数实验。

2.5 结果数据的统计学处理 细胞毒性实验与空斑减数实验的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作 t 检验。

2.6 抗病毒效果的评价 通过比较 P19 - E3 与 ACV 的 TC₅₀, IC₅₀, TI (治疗指数, $TI = TC_{50} / IC_{50}$), 药物的安全范围 (IC₅₀ ~ TC₅₀) 来评价它们的抗病毒效果。

3 结果

3.1 病毒滴度 按 Reed - Muench 法计算病毒的 TC_{D₅₀} 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 TC_{D₅₀}。

3.2 细胞毒性测定 MTT 法测得细胞存活率最低为: 84.6 ± 0.02% (药物浓度为: 500μg/ml), 最高为: 98.5 ± 0.08% (药物浓度为: 15.6μg/ml), 可见 P19 - E3 对 Vero 细胞毒性很小, 无明显的毒性作用, 对 Vero 细胞的 TC₅₀ 为 4099.95μg/ml。参照本实验室的前期发表文章^[8], ACV 的 TC₅₀ 为 656μg/ml。

3.3 药物抗病毒的药效学实验 CPE 观察实验结果为: 当药物浓度为: 125μg/ml 时, CPE 为: +, 当药物浓度为: 62.5μg/ml 和 31.3μg/ml 时, CPE 为: + + +, 当药物浓度为: 15.6μg/ml 时, CPE 为: + + + +。P19 - E3 能减少 HSV - 1 所致 CPE 的产生, 随着药物浓度的增大, P19 - E3 抑制细胞当 P19 - E3 能减少 HSV - 1 所致 CPE 的产生, 随着药物浓度的增大, P19 - E3 抑制细胞 CPE 的程度增强。当用药浓度为 125μg/ml 时, 直干桉叶水提取物有明显的抗 HSV - 1 活性。

空斑减数实验中, 病毒对照组的平均空斑数为 31.7 个, 不同浓度的 P19 - E3 作用下的平均空斑数和空斑抑制率分别为: 250μg/ml (1.0 ± 1.00, 96.8 ± 3.15%), 125μg/ml (11.7 ± 1.15, 63.1 ± 3.63%), 62.5μg/ml (21.0 ± 1.00*, 33.7 ± 3.15%), 31.3μg/ml (30.7 ± 3.21, 3.2 ± 10.13%), 15.6μg/ml (31.0 ± 2.65, 2.1 ± 8.36%), 通过回归方程计算得 P19 - E3 的 IC₅₀ 为 84.28μg/ml。参照本实验室的前期发表文章, ACV 的 IC₅₀ 为 0.97μg/ml。

3.4 抗病毒效果的评价 在中毒浓度为 TC₅₀μg/ml 时, P19 - E3 和 ACV 抗病毒效果分别为 4099.95 和 656, 在中毒浓度为 IC₅₀μg/ml 时, P19 - E3 和 ACV 抗病毒效果分别为 84.28 和 0.97。其 TI (治疗指数) 为 49 和 676 可见 P19 - E3 的细胞毒性较阿昔洛韦小, 但治疗指数不如阿昔洛韦高。

3.5 药物抗病毒作用机理实验 在 P19 - E3 对 HSV - 1 的直接灭活实验中, 250μg/ml 和 125μg/ml 的平均空斑个数为 0.0 ± 0.00 个, 空斑抑制率为 100.0 ± 0.00%, 62.5μg/ml 的平均空斑个数为 0.5 ± 1.00 个, 空斑抑制率为 98.0 ± 3.95%, 31.3μg/ml 的平均个数为 07.7 ± 1.15 个, 空斑抑制率为 69.8 ± 4.55%, 15.6μg/ml 的平均空斑个数为 19.3 ± 0.58 个, 空斑抑制率为 23.7 ± 2.29%。在 P19 - E3 对 HSV - 1 的吸附抑

制中, 250μg/ml 平均空斑个数为 0.8 ± 0.96 个, 空斑抑制率为 97.9 ± 2.72%, 125μg/ml 平均空斑个数为 6.0 ± 1.63 个, 空斑抑制率为 83.0 ± 4.62%, 62.5μg/ml 的平均空斑个数为 18.0 ± 3.56 个, 空斑抑制率为 49.1 ± 10.08%, 31.3μg/ml 的平均空斑个数为 29.0 ± 1.41 个, 空斑抑制率为 18.0 ± 3.99%, 15.6μg/ml 的平均空斑个数为 32.7 ± 1.15*, 空斑抑制率为 7.5 ± 3.26%。在 P19 - E3 对 HSV - 1 的穿入抑制实验中, 250μg/ml 平均空斑个数为 9.0 ± 2.65 个, 空斑抑制率为 64.7 ± 10.39%, 125μg/ml 平均空斑个数为 14.0 ± 2.65*, 空斑抑制率为 45.1 ± 10.39%, 62.5μg/ml 的平均空斑个数为 17.7 ± 4.04 个, 空斑抑制率为 30.8 ± 15.84%, 31.3μg/ml 的平均空斑个数为 18.3 ± 2.89 个, 空斑抑制率为 28.1 ± 11.33%, 15.6μg/ml 的平均空斑个数为 19.7 ± 2.52 个, 空斑抑制率为 22.9 ± 9.88%。由实验结果可以看出: 直干桉叶水提取物具有明显的抑制 HSV - 1 的活性, 其 IC₅₀ 分别为 22.57μg/ml 与 60.57μg/ml。而在 P19 - E3 对 HSV - 1 的穿入细胞的抑制实验中, 直干桉叶水提取物抑制 HSV - 1 的活性较差, IC₅₀ 为 140.23μg/ml。

4 讨论

桉树在我国南方种植广泛, 引种五百余年, 桉树及其副产品的综合利用研究取得了一定的进展, 但其药理作用研究方兴未艾, 通过本研究, 进一步丰富了桉叶的药理作用, 也为桉叶作为抗病毒感染药物进行进一步开发研究提供了科学的理论依据。HSV 是疱疹病毒的典型代表, 由于在感染急性期发生水疱性皮疹即所谓单纯疱疹而得名。主要特点是宿主范围广泛, 复制周期短, 致细胞病变作用强, 在细胞培养中容易扩散, 在神经节中常形成潜伏感染。HSV - 1 是人类重要致病病毒, 能引起口唇疱疹、生殖器疱疹、脑炎、内脏器官感染, 并与宫颈癌和唇癌有关。由于 HSV - 1 的基因为双链 DNA, 易与宿主 DNA 发生整合作用, 或形成潜伏状态, 限制了病毒疫苗的发展和作用。而抗疱疹病毒化学药物因为毒性太大或耐药性的产生临床应用也不令人满意。筛选有效的抗病毒中药是当前抗病毒研究热点之一。本研究通过 MTT 法测定直干桉叶水提取物对 Vero 细胞的毒性作用, 可以发现, 与阳性对照药阿昔洛韦相比, P19 - E3 对细胞毒性作用相当低。利用 CPE 观察实验与空斑减数实验, 可以看出直干桉叶水提取物有明显的抗 HSV - 1 的活性, 其 IC₅₀ 值为 84.28μg/ml。机制研究结果初步显示, P19 - E3 对病毒有直接灭活作用, 同时也能影响病毒对 Vero 细胞的吸附。推测直干桉叶水提取物可能是通过破坏病毒囊膜蛋白的结构, 使之失去感染性而失活。

综上所述, 由于直干桉叶水提取物为天然草药制剂, 而且细胞毒性低, 抗 HSV - 1 的活性良好, 对于 HSV - 1 感染的临床治疗具有应用前景, 而进一步提取分离直干桉叶水提取物中的抗病毒活性物质, 具有很强的临床开发意义。

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
- [2] 田玉红. 广西桉叶挥发性成分分析及抗菌抗氧化性能研究 [D]. 广西大学, 2006
- [3] 何耀松, 张继东. 桉树化学成分及药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展, 2007, 28, 7.
- [4] 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

(收稿日期: 2009. 01. 10)