

病毒灵喷雾剂抗单纯疱疹病毒的实验研究

康旭亮¹, 李洪梅², 阮克锋³, 李小芹², 卢长安², 周爱香^{2*}

(1. 北京化工大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 上海中药制药技术有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究病毒灵喷雾剂对单纯疱疹病毒(HSV)的作用。方法: 采用细胞培养体外测定病毒灵喷雾剂对 HSV-1 或 HSV-2 感染 Hepr2 细胞的半数抑制浓度 EC₅₀ 和治疗指数(TI)。在豚鼠上观察病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染皮肤的治疗作用, 在小鼠上观察对 HSV-2 感染阴道炎的治疗作用。结果: 体外实验表明, 病毒灵喷雾剂对 HSV-1、HSV-2 致细胞病变均有不同程度的抑制作用; 体内实验表明, 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染豚鼠皮肤及 HSV-2 感染小鼠阴道所致病变均有不同程度的抑制作用。结论: 病毒灵喷雾剂具有抗 HSV 的作用。

[关键词] 病毒灵喷雾剂; 单纯疱疹病毒; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)12-0053-03

单纯疱疹病毒(HSV)有 HSV-1 和 HSV-2 两个

型, HSV 感染可导致多种疾病, 包括口咽部疱疹、生殖器疱疹、疱疹性角膜结膜炎、皮肤感染、脑炎、新生儿感染、免疫功能缺损个体的感染, 其中 HSV-2 感染与子宫颈癌关系十分密切, 且 HSV 具有嗜感觉神经节而形成潜伏感染的特性。病毒灵喷雾剂是由金银

[收稿日期] 2007-03-26

[通讯作者] * 周爱香, Tel: (010) 64285181; E-mail: sinomd@sina.com

花、板蓝根等 6 味中药制成的中药制剂,具有清热解毒,消肿止痛的作用,临床用于单纯疱疹疮口肿痛、瘙痒等症已取得良好疗效。我们通过细胞培养和整体动物实验,进一步探讨了病毒灵喷雾剂对单纯疱疹病毒的作用,以便为临床用药提供实验依据。

1 实验材料

病毒灵喷雾剂,由上海中药制药技术有限公司提供,批号:030211,含 1.5 g 生药·mL⁻¹。酞丁安喷雾剂,北京四环医药科技股份有限公司生产,批号:011019,含 5 mg·mL⁻¹。

人喉癌传代细胞 Hep-2 株,购自卫生部药品生物制品检定所;单纯疱疹病毒 1,2 型(HSV-1, HSV-2),购自中国预防医学科学院病毒学研究所,本实验室传代后使用。

昆明种小鼠,体重(20±1) g,雌性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2002-0003;豚鼠,雌雄各半,(200±10) g,北京市海淀区学院路通利实验动物养殖场提供,动物合格证号第 069 总 024 号。

CO₂ 培养箱,日本 Yamato 科学株式会社产品;倒置显微镜,日本 OLYMPUS 产品。

2 实验方法

2.1 病毒灵喷雾剂体外抗病毒实验^[1]

2.1.1 对 Hep-2 细胞的毒性测定 选用已长成单层的 Hep-2 细胞板,加入 7 个连续二倍稀释的不同浓度的药液,每稀释度加 4 孔,设正常细胞对照,37℃,5% CO₂ 中培养 3 d,观察细胞病变(CPE),以 Reed-Muench 法计算该药的半数中毒浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。

细胞病变(CPE)程度的判断标准:“—”:表示细胞生长基本正常,未出现病变;“1”表示细胞病变约占整个单层细胞的 25% 以下;“2”表示细胞病变约占整个单层细胞的 25%~50% 之间;“3”表示细胞病变约占整个单层细胞的 50%~75% 之间;“4”表示细胞病变约占整个单层细胞的 75%~100%。若 CPE 为“1”及其以下则视为阴性,“2”及以上各级均视为阳性。

2.1.2 药物抗单纯疱疹病毒实验 将长成单层的 Hep-2 细胞板中培养液倾去,加入 100 TCID₅₀ 的各病毒液,吸附 1 h,倾去病毒液,加入从最大无毒浓度(TC₀)起连续 2 倍稀释的 6 个浓度的药液,每个浓度加 3 孔,设正常细胞对照和病毒对照,37℃,5% CO₂

中培养 3 d,观察 CPE,以 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度(EC₅₀)及治疗指数 TI=TC₅₀/EC₅₀。

2.2 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染豚鼠皮肤的影响^[2] 将豚鼠随机分为正常对照组,模型对照组,病毒灵喷雾剂高、中、低剂量组(0.2, 0.4, 0.8 g 生药·kg⁻¹),酞丁安喷雾剂组(0.01 g·kg⁻¹)。背部脱毛,划分出前后 2 个感染区,用 9 号针头深刺入皮肤深层,(1~1.2) cm 直径内,呈梅花样均匀刺 7 针,除正常对照组外其余各组以原倍 HSV-1 0.07 mL 滴加于针刺区内,用无菌玻棒涂开感染。于感染后第 5 d,各组分别给药,每日 2 次将药物涂于创面进行治疗,连续 5 d,正常对照和感染对照给予无菌蒸馏水。每日观察记录感染区皮肤病损程度,以秩和检验将各组皮肤病损程度进行比较。

感染区皮肤病损程度分级标准:皮肤正常或恢复结痂脱落为“-”,感染面轻微发红或恢复结痂为“+”,感染面红肿为“++”,感染面红肿较重或伴有疱疹为“+++”。

2.3 病毒灵喷雾剂对 HSV-2 感染小鼠阴道的影响^[3,4] 将小鼠随机分为正常对照组,模型对照组,病毒灵喷雾剂高、中、低剂量组(1, 2, 4 g 生药·kg⁻¹),酞丁安喷雾剂组(0.05 g·kg⁻¹)。除正常对照组外其余各组吸取 HSV-2 原液 0.03 mL 注入阴道内,正常对照组注入等量的生理盐水。于感染后第 4 d 起,各组分别阴道内给药,正常对照组和模型对照组给予等量的无菌蒸馏水,连续 5 d。逐日记录各组小鼠病变情况,以秩和检验将各组病变程度进行比较。

小鼠病变程度分 4 级:正常为“-”,外阴轻度肿胀为“+”,外阴明显肿胀为“++”,外阴严重发红肿胀或伴有疱疹为“+++”。

2.4 统计方法 病变等级以秩和检验进行统计比较。

3 结果

3.1 病毒灵喷雾剂对 Hep-2 细胞的毒性测定结果 病毒灵喷雾剂对 Hep-2 细胞的半数中毒浓度 TC₅₀ = 0.44 mg·mL⁻¹,最大无毒浓度 TC₀ = 0.30 mg·mL⁻¹;酞丁安喷雾剂对 Hep-2 细胞的 TC₅₀ = 0.004 mg·mL⁻¹,TC₀ = 0.002 mg·mL⁻¹。

3.2 病毒灵喷雾剂体外抗病毒实验结果 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 的半数抑制浓度 EC₅₀ 为 0.11 mg·mL⁻¹,治疗指数 TI 为 4.0;对 HSV-2 的 EC₅₀ 为(0.065

~ 0.076) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, TI 为 (5.8~ 6.8)。阳性对照药酞丁安喷雾剂对 HSV-1 的 EC_{50} 为 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, TI 为 4.0; 对 HSV-2 的 EC_{50} 为 0.001 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, TI 为 4.0。结果表明病毒灵喷雾剂对单纯疱疹病毒 1 型和 2 型致细胞病变均有明显抑制作用, 其中对 HSV-2 型的抑制作用强于 HSV-1 型。

3.3 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染豚鼠皮肤的影响

由表 1 可见, 病毒灵喷雾剂所试剂量可明显减轻 HSV-1 感染豚鼠皮肤所致的病变, 表明其对 HSV-1 有明显的抑制作用。

表 1 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染豚鼠皮肤的影响 (秩和检验 H)

组别	剂量 (g 生药·kg ⁻¹)	用药后天数 (d)				
		2	3	4	5	6
酞丁安喷雾剂	0.01 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	85.5	76 ¹⁾	79	81	85.5
病毒灵喷雾剂	0.8	76.5 ¹⁾	69 ²⁾	71.5 ¹⁾	71 ²⁾	74.5 ¹⁾
	0.4	75 ¹⁾	69 ²⁾	73 ¹⁾	71 ²⁾	74.5 ¹⁾
	0.2	81.5	77 ¹⁾	79	80	78 ¹⁾

注: N1= N2= 10, H0.05= 78, H0.01= 71, 与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.4 病毒灵喷雾剂对 HSV-2 感染小鼠阴道的影响

由表 2 可见, 病毒灵喷雾剂可明显减轻因感染 HSV-2 引起的外阴肿胀, 表明其对 HSV-2 有较强的抑制作用。

表 2 对 HSV-2 感染小鼠阴道病变程度的影响 (秩和检验 H)

组别	剂量 (g 生药·kg ⁻¹)	用药天数 (d)					
		0	1	2	3	4	5
酞丁安喷雾剂	0.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	105	99	90	71.5 ¹⁾	75 ¹⁾	78 ¹⁾
病毒灵喷雾剂	4	98	90	70 ²⁾	68 ²⁾	63 ²⁾	71 ²⁾
	2	105	90	75 ¹⁾	68.5 ²⁾	71 ²⁾	71 ²⁾
	1	101.5	94.5	80	71.5 ¹⁾	75 ¹⁾	75 ¹⁾

4 小结与讨论

体外实验表明, 病毒灵喷雾剂对单纯疱疹病毒 HSV-1 HSV-2 致细胞病变均有不同程度的抑制作用; 体内实验表明, 病毒灵喷雾剂对 HSV-1 感染豚鼠皮肤及 HSV-2 感染小鼠阴道而致病变亦有不同程度的抑制作用。

HSV 感染在临床上具有十分重要的地位。由于 HSV 基因组是双链 DNA, 易与宿主细胞 DNA 发生整合或形成潜伏感染, 限制了疫苗的发展及应用, 临床应用的几种化学药物, 有的毒性大, 有的已产生耐药性。中草药自然资源丰富、毒副作用低, 为抗 HSV 药物的筛选提供了广阔的空间。病毒灵喷雾剂由金银花、板蓝根等 6 味组成, 临床用于单纯疱疹疮口肿痛、瘙痒等症已取得良好疗效, 通过细胞培养和动物实验, 表明病毒灵喷雾剂具有抗 HSV 的作用, 但该制剂抗 HSV 确切的作用机制和作用位点还有待我们进一步研究。

[参考文献]

- [1] 孟庆云. 中西医结合基础理论研究方法与实验技术 [M]. 北京: 中国古籍出版社, 1999. 390-420.
- [2] 陈鸿珊, 李金河, 滕立, 等. 酞丁安制剂对豚鼠皮肤疱疹病毒感染的作用 [J]. 药理学报, 1986, 21 (4): 252-255.
- [3] 魏芸, 林雨霖, 周峰, 等. 生命泉膏滋抗实验小鼠阴道单纯疱疹病毒 2 型的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13 (5): 281-283.
- [4] 张杰, 詹炳炎, 姚学军, 等. 石榴皮抗 II 型生殖器疱疹病毒体内实验研究 [J]. 中药药理与临床, 1997, 13 (6): 34.