

疱克软膏抗 II 型生殖器疱疹病毒实验研究

张 艳¹, 陈健文², 马仁强^{2*}, 吴先哲²

(1. 广州贝氏药业有限公司, 广东 广州 510051; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 研究疱克软膏对 II 型生殖疱疹病毒(HSV- II)的防治作用。方法: 利用 MTT 法观察疱克软膏体外 HSV- II 感染 Hepr2 细胞的保护作用和小鼠阴道感染模型观察疱克软膏体内抗 HSV- II 作用。结果: 体外实验证实疱克软膏 0.4~ 6.4mg/mL 对 HSV- II 的抑制率 1.7%~ 91.7%, 对病毒的抑制作用与药物浓度呈正相关; 疱克软膏可明显减少小鼠阴道病毒的检出率, 可明显提高小鼠血清干扰素- γ (IFN- γ)与免疫球蛋白 G(IgG)的含量, 病理组织学检查显示小鼠阴道粘膜病理变化显著减轻。结论: 疱克软膏可能通过直接抗 HSV- II 和提高机体 IgG IFN- γ 水平起到良好的防治作用。

[关键词] 疱克软膏; 单纯疱疹病毒; 抗病毒作用; 干扰素- γ ; 免疫球蛋白 G

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)06-0053-04

II 型生殖疱疹病毒(HSV- II)易引起生殖器疱疹与阴道炎等, 且与宫颈癌密切相关, 现已成为传染性

性病的第五位, 主要通过性接触传播, 近来在国内外有增加的趋势^[1]。疱克软膏由大黄、连翘、参苦、蛇床子等组成, 具清热解毒、燥湿止痛的作用, 临床上外用对生殖疱疹有良好的防治作用。为进一步证实其药理作用及可能的作用机理, 本文拟观察疱克软

[收稿日期] 2005-03-09

[通讯作者] 马仁强, Tel: (020) 87391157; E-mail: pony213@163.com

膏对 HSV- II 体内外抗病毒作用, 并考察其对相关免疫生化指标、病理变化的影响。

1 实验材料

1.1 药物 疱克软膏由大黄 40g, 连翘 40g, 苦参 25g, 蛇床子 25g, 冰片 9g 组成。制备方法: 前四味药加 5 倍量 60% 乙醇, 加热回流提取二次, 每次 2h, 醇提液减压浓缩至相对密度为 1.15~1.20(60℃) 备用。取甘油 20mL 与浸膏混合保温 85℃, 滤过, 水溶液作为水相; 水不溶部分浸膏, 用少量乙醇溶解, 加入硬脂酸 18g, 液体石蜡 8mL, 加热融化, 混匀, 滤过, 保温 85℃ 左右作为油相。将油相缓缓加入水相中, 边加边搅拌, 冷至 45℃ 左右时加入冰片(适量乙醇溶解), 搅拌至冷却, 制备得软膏 100g。体外试验用重蒸水溶解, 过滤, 配成 100mg/mL 备用。体内试验分别将疱克软膏药膏与基质以 1:0、1:1 和 1:3 的比例混合, 制备成不同浓度药膏备用, 其疱克软膏浓度倍比关系为 4:2:1。阿昔洛韦软膏, 由武汉爱民制药厂生产, 批号: 20010304。

1.2 细胞及病毒 人肝癌 Hep2 细胞和 HSV- II 病毒由武汉大学医学院病毒研究所提供。

1.3 试剂 IFN- γ 试剂盒, 由北京帮定生物技术公司提供; IgG 试剂盒, 由武汉大学医学院病毒研究所提供。

1.4 动物 雌性清洁级昆明种小鼠, 体重 17 ± 1 g, 由中山医科大学实验动物学部提供, 动物质量合格证号: 第 2001A036 号, 检疫后备用。

2 实验方法

2.1 疱克软膏的细胞毒性与体外抗病毒实验

2.1.1 病毒感染性滴度的测定 将稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的病毒液接种已长成单层的 Hep2 细胞, 每孔 0.1mL, 每个稀释度 3 孔, 37℃ 吸附 1h 后, 加 2% 小牛血清的 MEM 培养基, 置 37℃ 培养, 每日检查病毒生长情况, 观察特征性细胞病变(CPE), 2~7d 后记录结果。CPE 记录方法: (-) 为无 CPE; (+) 为 25% 的细胞出现 CPE; (++) 为 50% 细胞出现 CPE; (+++) 为 75% 细胞出现 CPE; (++++) 为 100% 细胞出现 CPE。计算病毒的半数感染量(TCID₅₀)。

2.1.2 药物细胞毒性测定 在已长成单层的 Hep2 细胞中, 分别加入表 1 所示浓度的药物, 每一浓度的药物均重复四孔, 并设置加溶媒做正常对照。置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 72h。用 MTT 法检测细

胞存活率。存活率 = 加药孔平均 OD 值 \times 100% / 溶媒孔平均 OD 值。

2.1.3 药物抗病毒实验 取 0.8×10^5 /mL 浓度的 Hep2 细胞, 加至 24 孔板上, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24h, 待细胞长成单层后, 弃上清, 加 1000TCID₅₀/mL 的 HSV- II, 0.1mL/孔, 37℃, 5% CO₂, 吸附 90min, 弃上清, 加含药维持液待检, 疱克软膏与阿昔洛韦均采用 5 个浓度, 每一药物剂量均重复 4 孔。37℃, 5% CO₂ 培养 33h, 观察 CPE, 然后以 MTT 法检测病毒抑制率。抑制率 = (加药孔平均 OD 值 - 溶媒孔平均 OD 值) \times 100% / 溶媒孔平均 OD 值。

2.2 疱克软膏对感染 II 型疱疹病毒小鼠的治疗作用 取雌性清洁级昆明种小白鼠 140 只, 随机分为正常对照组、模型对照组、阿昔洛韦对照组、基质对照组、疱克软膏高剂量组、中、低三个剂量组。受试各组小鼠除正常对照组外, 分别取 50 μ L HSV- II 用 3mm \times 3mm \times 3mm 大小海绵吸附, 用眼科镊小心塞入小鼠阴道, 每日 1 次, 连续 7d。肉眼可见红肿、疱疹、破损等症状视为造模成功, 开始分别给药治疗, 药物用小棉签小心塞入小鼠阴道, 每日给药两次。治疗 7d 后, 眼眶取血, 无菌分离血清, -20℃ 冻存备检, 用于 IFN- γ 与 IgG 含量测定。实验结果用统计软件 SPSS 10.0 进行统计分析。完整分离小鼠阴道, 半数用 4% 多聚甲醛固定送病检, 半数 -20℃ 冻存, 用于病毒分离(正常组小鼠阴道粘膜不做病毒分离实验)。

2.3 结果统计分析 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 病毒检出率采用 χ^2 检验; IFN- γ 与 IgG 以均数 \pm 方差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析; 病理检查半定量数据采用秩和检验。

3 实验结果

3.1 实验测得病毒的半数感染量 TCID₅₀ 为 10^{-5} , 本实验用病毒浓度为 1000 TCID₅₀/mL。

3.2 不同浓度疱克软膏对细胞存活率的影响 由表 1 结果可见, 药物浓度在 2000 μ g/mL 以内未见明显的细胞毒性, 但经较高药物浓度作用后, 细胞死亡数增加, 药物有细胞毒性, 表现为细胞折光性改变, 壁厚, 变圆, 破碎, 脱落, 并且吸光值明显下降, 药物的细胞毒性与药物浓度呈相关性。疱克软膏对 Hep2 细胞 IC₅₀ 为 9.60mg/mL, 阿昔洛韦软膏对 Hep2 细胞 IC₅₀ 为 99.1 μ g/mL。

表 1 不同浓度的药物对细胞存活率的影响

疱克软膏		阿昔洛韦软膏	
药物浓度 ($\times 10^2 \mu\text{g/ml}$)	细胞存活 率(%)	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活 率(%)
10	94.7	20	90.5
20	83.1	40	85.7
40	70.2	60	81.0
80	50.0	80	61.9
160	36.2	100	61.9
320	11.7	140	14.3

3.3 不同浓度的疱克软膏对 II 型疱疹病毒增殖的抑制作用 通过对 CPE 的观察发现,当疱克软膏浓度达到 6400 $\mu\text{g/ml}$ 时,病毒的抑制率已经超过 90%,而且随着疱克软膏药物浓度的增加,其抗病毒活性也增强,且与药物浓度呈相关性。疱克软膏对 II 型疱疹病毒增殖 IC_{50} 为 9.60 mg/ml ,阿昔洛韦对 II 型疱疹病毒增殖 IC_{50} 为 99.1 $\mu\text{g/ml}$ 。结果详见表 2。

表 2 不同浓度药物对 II 型疱疹病毒增殖的抑制作用

疱克软膏		阿昔洛韦软膏	
药物浓度 ($\times 10^2 \mu\text{g/ml}$)	细胞存活 率(%)	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活 率(%)
4	1.7	5	26.3
8	7.5	10	53.3
16	48.3	20	63.3
32	65.0	40	85.2
64	91.7	80	93.3

3.4 小鼠阴道粘膜病毒分离 结果表明,经治疗后,疱克软膏大剂量组与阿昔洛韦组小鼠阴道粘膜病毒检出率显著低于模型组和基质对照组。结果详见表 3。

表 3 对小鼠阴道粘膜病毒检出率的影响

组别	n	检出病毒 样本数	病毒检 出率(%)
模型对照组	10	8	80.0
基质对照组	9	7	77.8
阿昔洛韦组	10	3	30.0 ¹⁾
疱克小剂量组	10	5	50.0
疱克中剂量组	8	4	50.0
疱克大剂量组	9	2	22.2 ¹⁾

注:与基质组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 4 对小鼠血清中 IFN- γ 与 IgG 含量的影响

组别	INF- γ 含量 (pg/ml)	IgG 含量 (P/N)
正常对照	9.50 \pm 4.35	1.73 \pm 0.28
模型对照	16.2 \pm 6.27 ¹⁾	3.45 \pm 0.45 ²⁾
基质对照	15.5 \pm 4.01 ¹⁾	3.30 \pm 0.51 ²⁾
阿昔洛韦	24.2 \pm 6.68 ⁴⁾	4.15 \pm 0.56 ⁴⁾
疱克小剂量	21.8 \pm 7.45	3.65 \pm 0.56
疱克中剂量	22.8 \pm 8.55 ³⁾	3.85 \pm 0.67 ³⁾
疱克大剂量	22 \pm 10.23 ³⁾	4.05 \pm 0.56 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与基质组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 疱克软膏对 II 型疱疹病毒引起小鼠血清 IFN- γ 与 IgG 含量的影响 结果表明,经病毒感染后各组小鼠血清 IFN- γ 、IgG 含量较正常组有显著升高,经疱克软膏大、中剂量组治疗小鼠血清 IFN- γ 、IgG 含量较正常组、基质组均显著升高,阳性药物阿昔洛韦组较基质组血清 IFN- γ 、IgG 含量亦明显升高。

3.6 疱克软膏对小鼠阴道组织学改变的影响 对照组小鼠阴道粘膜上皮光滑完整,结构清晰,表面未见脓性分泌物,粘膜下未见明显炎症细胞浸润或充血。模型组与基质组粘膜表面见较多脓性分泌物,粘膜结构紊乱,粘膜上皮可见明显增生、缺损、水样变性,粘膜损伤深达基层,粘膜下可见充血及大量炎症细胞浸润。阿昔洛韦组与疱克大剂组组粘膜表面未见或少许脓性分泌物,粘膜结构尚清楚,粘膜上皮可见增生、缺损、气球样变形,粘膜下层可见充血及炎症细胞浸润。疱克中、小剂组组小鼠阴道粘膜表面有少量脓性分泌物,粘膜结构清晰,粘膜欠光滑,有缺损,粘膜内可见脓腔,粘膜下炎症细胞浸润较模型组明显减轻,可见充血。

表 5 疱克软膏对小鼠阴道组织学改变的影响

组别	粘膜上皮破损、增生、变性、出现脓性分泌物				粘膜下充血、炎症细胞浸润			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照	9	1	0	0 ²⁾	7	2	0	0 ²⁾
模型对照	0	2	5	3	0	3	6	2
基质对照	0	2	5	2	0	2	6	1
阿昔洛韦	3	4	2	1 ²⁾	2	6	2	0 ²⁾
疱克小剂量	0	4	4	2	1	5	3	1
疱克中剂量	1	3	3	1 ¹⁾	1	4	2	1 ²⁾
疱克大剂量	3	4	2	0 ²⁾	3	3	3	0 ²⁾

注:与基质组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

疱克软膏对小鼠阴道组织学改变照片

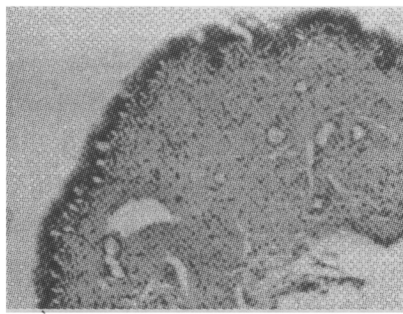


图 1 正常对照组

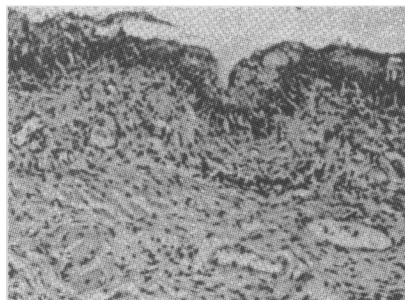


图 2 模型对照组

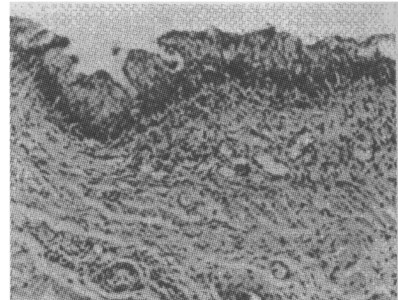


图 3 阳性对照组

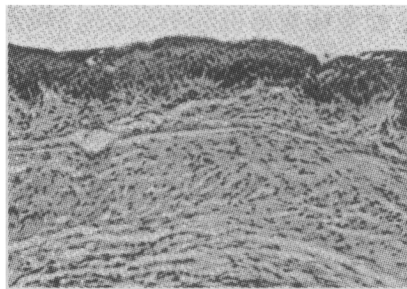


图 4 疱克软膏高剂量组

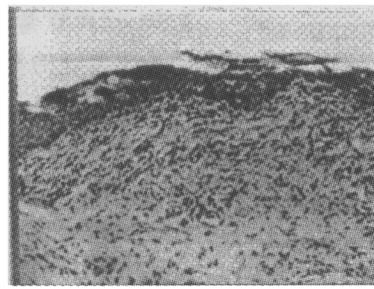


图 5 疱克软膏中剂量组

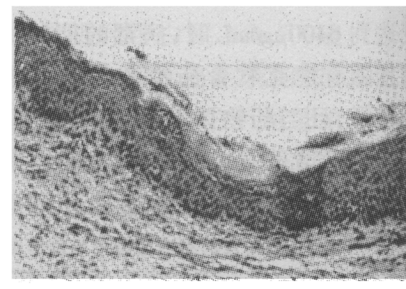


图 6 疱克软膏低剂量组

4 讨论

生殖器疱疹病毒是最流行的性传播疾病之一,业已证实,其感染与先天性畸型、流产、宫颈癌、脑炎等多种疾病相关。当前临床用于治疗 HSV- II 感染的药物主要限于抗病毒药物无环鸟苷、阿昔洛韦等合成药,此类药物疗效确切,但毒副作用与耐药性一定程度上限制了其在临床上的应用^[1]。中医认为生殖器疱疹的病机为外感受湿热淫毒,困阻皮肤粘膜和下焦经络,治宜清热解毒。燥湿止痛。已有大量的文献报道许多中草药对 HSV- II 有良好的防治作用^[2],本方大黄具清热解毒之功,外用对热盛湿重之疮痍有显效;连翘以清热解毒,清痈散结见长,前人有“疮家圣药”之美称,对疱疹病毒有较强的灭活作用^[3];苦参,性寒,味苦,既能清热燥湿,又能杀虫,止痒;蛇床子味辛苦,辛能散风邪,又能行血脉,苦能燥湿,故治疗风湿之邪所致湿疹,瘙痒、疱疹等症,可达祛风燥湿,杀虫止痒之效外加其它诸药合用对 HSV- II 有良好的对抗作用。

实验表明疱克软膏体外对 HSV- II 的感染 Hep-2

细胞有明显保护作用,体内大剂量组小鼠阴道粘膜病毒检出率显著低于模型组和基质对照组,病理结果可见疱克软膏可明显改善小鼠阴道粘膜的病理改变,另外还发现疱克软膏大中剂量可明显提高 IgG 与 IFN- γ 。本研究结果提示疱克软膏有直接对抗 HSV- II 作用,同时可提高机体免疫功能发挥抗 HSV- II 作用,具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 林雨霖,刘学锋,李晖,等. 菲索(生命泉膏滋)一种治疗艾滋病的中药制剂[M]. 香港国际抗病毒学术研讨会论文集. 1998. 123-126.
- [2] 张杰,詹炳炎. 中草药抗单纯疱疹病毒作用的研究进展[J]. 中医药信息, 1995, 12(1): 31-34.
- [3] 罗军,杨占秋,肖红,等. 大黄对小白鼠单纯疱疹病毒感染的治疗作用[J]. 中药药理与临床, 1996, 7(1): 19-25.
- [4] 伍参荣,贺双腾,胡建中. 茜草提取液小鼠体内抗 HSV- II 及诱生干扰素作用的实验观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 1997, 7(1): 18.