维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0243-03

甘草甜素对 HSV-1 抑制作用的实验研究

赵高年,谢 鹏,李 平

(重庆医科大学临床学院神经病学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察甘草甜素对单纯疱疹病毒Ⅰ型的抑制作用,为临床更为有效的治疗单纯疱疹病毒性脑炎探索新的药物。方法:体外培养 Vero 细胞,分成甘草甜素在病毒吸附 vero 细胞后加入病毒、吸附前甘草甜素预处理细胞以及吸附前甘草甜素预处理病毒,通过观察空斑形成单位来评价甘草甜素对单纯疱疹病毒Ⅰ型的抑制作用,以及作用发生于病毒感染的哪个阶段。结果:病毒吸附 vero 细胞后加入甘草甜素能明显抑制病毒所致的空斑形成,IC_{50}为 0.56mmol/L。吸附前甘草甜素预处理细胞以及吸附前甘草甜素预处理病毒,对病毒所致的空斑形成无明显影响。结论:甘草甜素能明显地抑制单纯疱疹病毒Ⅰ型的复制,它的作用是发生在病毒穿入细胞后的阶段,不能阻止病毒对细胞的吸附,也不能直接灭活病毒。

【关键词】甘草甜素;单纯疱疹病毒Ⅰ型;空斑形成单位

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-25

Experimental study on inhibitory effect of glycyrrhizin on HSV-1 in vitro

ZHAO Gaonian, et al

(*Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect of glycyrrhizin on HSV-1 in vitro, and to search a new drug against herpes simplex encephalitis. *Methods*: The Vero cells were cultured and divided into three groups: the group treated with glycyrrhizin after absorption of HSV-1 into the Vero cells, the group of pretreated cells and the group of pretreated HSV-1 with both glycyrrhizin before absorption of HSV-1 into the Vero cells. The plaque formation units were observed to evaluate the inhibitory effect of glycyrrhizin on HSV-1 and the stage when the virus replicating was inhibited. *Results*: Glycyrrhizin treatment after the absorption of virus into the cells obviously reduced the plaque formation units due to the virus infection and IC_{50} was 0.56mM. Pretreated cells and pretreated HSV-1 with glycyrrhizin before absorption of HSV-1 into the cells did not reduce the plaque formation units. *Conclusion*: Glycyrrhizin can markedly inhibit the replication of HSV-1 in Vero cells. Glycyrrhizin can not inhibit the virus absorption and inactivate the virus.

【Key words】Glycyrrhizin; HSV-1; Plaque formation units

单纯疱疹病毒性脑炎是临床上最常见的散发性、非流行性病毒性脑炎,引起单纯疱疹病毒性脑炎90%以上为单纯疱疹病毒Ⅰ型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)[1],资料显示,HSE 的年发病率为(2~3)/10 万,自然死亡率为 60%~80%,虽经有效的抗病毒治疗,死亡率仍有 20%左右[2],存活者仍有不同程度的后遗症,仅有 2.5%的患者能完全康复[3,4]。目前临床使用的抗 HSV-1 药物主要是核苷类抑制 DNA 聚合酶的药物,如阿昔洛韦、更昔洛韦等。由于这些药物都是病毒酶底物类似物,用药过程中会产生耐药性且有着一定的复发率,影响疗效,加之副反应较大[5],因此寻找新的、高效低毒的抗 HSV-1 的药物仍为当务之急。甘草甜素很早就被用来治疗病毒感染性皮肤病,近来国外一些学者发现甘草甜素具有抗病毒作用,如牛痘病毒、带状疱疹病毒、流感病毒、肝炎病毒、日本脑炎病毒及 HIV 等病毒[6]。本研究通过观察甘草甜素对由 HSV-1 引起的空斑形成单位的影响,探讨甘草甜素是否具有抗 HSV-1 的作用,以及药物作用于病毒感染的哪个阶段。

1 材料与方法

1.1 试剂来源

作者介绍:赵高年(1973-),男,硕士,
主要研究方向:中枢神经系统感染。

维普资讯 http://www.cqvip.com

甘草甜素注射液，日本美能发源制药公司生产，浓度为2.4mmol/L。非洲绿猴肾传代细胞(Vero cell line)，由第三军医大学微生物教研究室提供。HSV－1F 株，购自中国科学院武汉病毒研究所。甲基纤维素，Sigma 公司产品。

1.2 病毒培养传代及效价测定

以(2～3)×10^5 个细胞/ml 接种 24 孔细胞培养板，每孔1ml，置 37℃、5%CO_2 孵箱中培养，待细胞长成单层后进行实验。病毒传代：取出保存于－70℃冰箱中的 HSV－1F 株，自来水下冲至病毒悬液融化，接种长满单层的 Vero 细胞，置 37℃、5%CO_2 孵箱中感作 1h，使病毒吸附，弃去残余未吸附病毒，加入含 2%小牛血清的 DMEM 培养 48～96h，待细胞出现变圆、融合及死亡脱落形成空斑时收集瓶中培养液，冻融两次，于 1000r/min 离心 10min，取上清(病毒存于上清中)，再作以上步骤传代，共 4 次。末次收集的病毒存于－70℃冰箱中备用。病毒的毒力鉴定用空斑单位形成(Plaque forming unit，PFU)法，病毒用 DMEM 作 10 倍连续稀释至10^{-6}，接种长满单层 Vero 细胞的 24 孔培养板，每个稀释度 4 孔，感作 1h 后，弃去未吸附的病毒，加入含 2%甲基纤维素及 2%小牛血清的 DMEM 培养 96h，吸去培养液，用 3.3%的结晶紫染色后可见清晰的空斑，计算最大稀释度的空斑数，病毒效价根据以下公式计算：

$$PFU/ml = 稀释度 \times \frac{P_1 + P_2 + \cdots + P_n}{n} \times \frac{1}{V}$$

P＝同一病毒稀释度培养板每孔中的空斑数

n＝同一病毒稀释度接种的孔数

V＝每孔接种的病毒量(ml)

1.3 甘草甜素对 Vero 细胞的毒性试验

用含 10%小牛血清的 DMEM 将甘草甜素连续 2 倍稀释至 0.075mmol/L(药物终浓度为 2.4、1.2、0.6、0.3、0.15、0.075mmol/L)，每稀释度 2 孔，每孔 1ml 接种长满单层 Vero 细胞的 24 孔培养板，不给药细胞作为对照。置 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 48h，观察 Vero 细胞的形态，死亡脱落情况；用胰酶消化后加入台盼蓝染色除外死细胞，活细胞计数。

1.4 甘草甜素对 HSV－1 的抑制作用

分成甘草甜素在病毒吸附细胞后加入、病毒吸附前甘草甜素预处理细胞以及吸附前甘草甜素预处理病毒，分别考察甘草甜素在细胞内的抗病毒作用、阻止病毒吸附的作用及甘草甜素对病毒的直接灭活作用。用空斑形成法，以病毒及细胞作为对照。计算空斑形成单位，按照 Reed&muench 公式计算药物对病毒的抑制率及半数抑制浓度(IC_{50})，统计学方法用成组设计的 t 检验。

$$抑制率(\%) = \frac{病毒对照组平均空斑数 - 给药实验组平均空斑数}{病毒对照组平均空斑数} \times 100\%$$

$$IC_{50} = Antilog\left(B + \frac{50 - (<50\%的抑制百分率)}{(>50\%的抑制百分率) - (<50\%的抑制百分率)} \times C\right)$$

B＝log＜50%药物浓度

C＝A－B

A＝log＞50%药物浓度

2 结 果

2.1 甘草甜素对 Vero 细胞的毒性

三批实验结果各药物浓度实验组的 Vero 细胞形态与细胞对照组无明显差别，两组均未见细胞明显变圆缩小、死亡脱落等细胞毒性改变。经台盼蓝染色除外死细胞，活细胞计数各药物浓度两组间差别无显著意义($P>0.05$)(见图 1)。

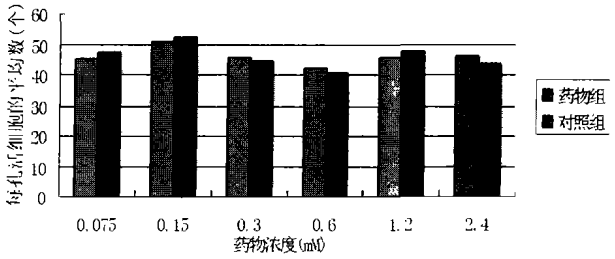


图 1 甘草甜素对 Vero 细胞的毒性试验

2.2 甘草甜素在细胞内对 HSV－1 的抑制作用

在病毒吸附细胞后加入甘草甜素能明显抑制病毒所致空斑的产生，二次空斑减少试验结果显示 IC_{50} 分别为 0.38mmol/L 和 0.34mmol/L，均值 0.36mmol/L(见表 1)。

表 1 甘草甜素在 Vero 细胞内对 HSV－1 的抑制作用(PFU 法)

实验批次	药物浓度(mmol/L)	病毒效价(pfu/0.2ml)	空斑数	平均数	抑制率(%)	IC_{50}(mmol/L)
Ⅰ	2.4	15.2	0,0,0	0	100.00	0.58
	1.2		1,0,2	1	95.00	
	0.6		11,8,10	9.67	51.65	
	0.3		14,17,18	16.33	18.35	
	0.15		14,24,16	18	10.00	
	0.075		25,18,20	21		
	病毒对照		17,21,22	20		
	细胞对照		0,0,0	0		
Ⅱ	2.4	20	0,0,0	0	100.00	0.54
	1.2		4,1,2	2.33	92.48	
	0.6		16,11,15	13	54.84	
	0.3		23,26,20	23	23.33	
	0.15		27,24,30	27	9.68	
	0.075		29,25,40	31.33		
	病毒对照		26,33,34	31		
	细胞对照		0,0,0	0		

2.3 甘草甜素对 HSV－1 吸附的抑制作用

在病毒吸附细胞前予 0.6mmol/L 的甘草甜素

维普资讯 http://www.cqvip.com

预处理细胞 24h,然后接种 HSV－1,培养 3 天后空斑计数,实验组的平均空斑数为 10.05,对照组的平均空斑数为 12.08,两组空斑数差别无显著意义($P>0.05$)(见表 2)。

表 2 甘草甜素(0.6mmol/L)对 HSV－1(9.5pfu/0.1ml)吸附的抑制作用

组 别	平均空斑数(pfu)	样本量 n	t 值	P 值
药物实验组	10.50	12	1.5459	>0.05
病毒对照组	12.08	12		

2.4 甘草甜素对病毒的直接灭活作用

在病毒吸附细胞前予 0.6mmol/L 的甘草甜素预处理,37℃、5% CO_2 混合 2h,再以此病毒吸附细胞,3 天后空斑计数,实验组的平均空斑数为 10.17,对照组的平均空斑数为 11.58,两组空斑数差别无显著意义($P>0.05$)(见表 3)。

表 3 甘草甜素(0.6mmol/L)对 HSV－1(9.5pfu/ml)直接灭活作用

组 别	平均空斑数(pfu)	样本量 n	t 值	P 值
药物实验组	10.17	12	1.226	>0.05
病毒对照组	11.58	12		

3 讨 论

甘草甜素(Glycyrrhizin)是从甘草根里提取出来的三萜类化合物,属于皂甙家族一员。早期的研究发现甘草甜素具有抗炎、抗溃疡、抗肿瘤和免疫调节作用,被广泛用于治疗病毒感染性皮肤病和慢性肝脏疾病。近年来国外的一些研究发现甘草甜素具有抗病毒作用,它不但已被用来有效的治疗慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎[7],而且发现对其它多种病毒的复制均有抑制作用,如牛痘病毒、带状疱疹病毒、流感病毒及 HIV 等病毒,对脊髓灰质炎病毒无抑制作用[6]。现已被用于治疗艾滋病,并被认为是治疗艾滋病的最好的天然药物。2000 年日本学者研究发现,甘草甜素能明显增加单纯疱疹病毒性脑炎小鼠的存活率[8]。

本研究结果显示甘草甜素在细胞内能明显抑制 HSV－1 所致空斑的产生,半数抑制浓度为 0.56mmol/L,在浓度为 1.2mmol/L 及 2.4mmol/L 时能完全抑制 HSV－1 所致空斑的产生,证实了甘草甜素在体外具有很强的抑制 HSV－1 复制的作用。在最大浓度 2.4mmol/L 时尚未见对细胞有明显的毒性作用,提示它是一个安全的药物。此结果证实了 Pompei 等的研究结果,他们研究发现甘草甜素能抑制多种 DNA 和 RNA 病毒在非整倍体 Hep2 细胞的复制,包括牛痘病毒、HSV－1、纽卡斯尔病病毒等病毒。

在病毒吸附细胞前甘草甜素预处理细胞及病毒均不能降低 HSV－1 所致空斑产生,提示甘草甜素的抗病毒作用是发生在细胞内,而无阻止病毒吸附及直接灭活病毒的作用。Pompei 的研究结果认为甘草甜素对 HSV－1 有直接的灭活作用,产生不一致的结果可能与使用的细胞株不一样有关。

甘草甜素确切的抗病毒机理尚不清楚。Dargan[9]等研究认为甘草甜素的抗病毒作用是多步骤的,与阻断病毒蛋白质的修饰、阻断与病毒复制有关的信号传导、诱生干扰素以及使从细胞中释放的病毒迅速失活等多种途径有关。

本实验虽已证实甘草甜素在体外对 HSV－1 具有很强的抑制作用,但要评价它对单纯疱疹病毒性脑炎的治疗作用,尚需建立动物模型进行在体试验,以及临床试验。

参 考 文 献

[1] 谢 鹏. 神经病学[M]. 第 4 版,北京:人民卫生出版社,2001;164－166.

[2] Meyding－Lamade U, Haas J, Lamade W, et al. Herpes simplex virus encephalitis: Long－term comparative study of viral load and the expression of immunology nitric oxide synthase in mouse brain tissue[J]. Neuro Letters, 1998;244:9－12.

[3] Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens[J]. Lancet, 2002; 359(9305): 507－513.

[4] Skolederberg B. Herpes simplex encephalitis[J]. Scand Infect, 1996;100(s):8－13.

[5] Ito Y, Kimura H, Yabuta Y, et al. Exacerbation of herpes simplex encephalitis after successful treatment with acyclovir [J]. Clin Infect Dis, 2000;30(1):185－187.

[6] Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified against human immunodeficiency virus type 1 (HIV－1) and herpes simplex virus type 1 (HSV－1) in vitro[J]. Chem Pharm Bull, 1991;39(1):112－115.

[7] Fujisawa Y, Sakamoto M, Matsushita M, et al. Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement－possible mechanism of its anti－inflammatory effect on liver cells in

(下转第 268 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

越提示精神障碍的程度严重[4]。本研究发现精神分裂症组的高分依次为 Hs、Pa、D、F、Pd。Hs、D 量表高分反映暴力违法的精神分裂症个体情绪低落、悲观、过度控制、有许多模糊的躯体不适、焦虑、以自我为中心、发牢骚、诉苦。这也许是精神分裂症暴力违法者的特征性症状;也有可能与被羁押和司法鉴定的处境有关。Pd 高分提示个体冲动、不成熟、判断力差、敌意、好攻击,与反社会行为有关:Pa 高分表现为敏感多疑、怪罪和怨恨别人:当 Pd、Pa 分增加且 Pa 高于 Pd 分时,多有精神病或精神失常发生;精神分裂症患者的 Pa 高分常提示病人的症状以系统妄想为主,被害妄想尤为突出。结合临床分析,提示精神分裂症病人的暴力行为与精神病理有关,这可从 Cheung、kemph JP 等的研究结果得到支持[5,6]。本研究的罪犯组主要表现为 Pd、Hs、F 高分,这与许多暴力罪犯人格特征的研究报道有部分一致之处[7,8]。由此可见,正常人群的暴力罪犯在人格方面有偏离正常的趋向,以反社会人格和疑病人格最为显著,这类人群具有冲动、社会适应差、敌意和攻击性、以自我为中心、无视法规和权威等个性特点。

国外学者证明人格诊断问卷(PDQ4 +)应用于犯罪人群时,具有良好的特异度和灵敏度,适合犯罪人群人格障碍的筛查[9]。本研究发现精神分裂症组偏执型、分裂样、分裂型、表演型、依赖型、强迫型、被动攻击型和抑郁型人格障碍的得分高于罪犯组,与本研究的 MMPI 测定结果部分吻合。而罪犯组反社会型人格障碍得分高于精神分裂症组,与国内外同类研究结论基本一致[10,11],该人格障碍的主要特征为无视社会规范、对挫折的耐受性低、缺乏责任感、容易冒犯他人而不思悔过。目前许多研究认为暴力行为与反社会人格密切相关,许多重罪犯符合反社会人格障碍的诊断标准,本研究结果在一定程度上支持上述观点。

上述研究结果提示,有暴力行为的精神分裂症患者和暴力罪犯存在一些相似的病理性人格特点,即冲动、以自我为中心、情绪不稳定、社会适应差,这为暴力人群的心理矫治提供了一些理论依据。这种人格形成的原因及如何对这类人群开展有效的心理和行为治疗将是今后继续研究的方向。

参 考 文 献

[1] Mungas D. Discrimination validation of an MMPI measure of aggression[J]. J Consul Clini Psychol, 1984;52(2):313 - 314.

[2] 王小平,杨德森,李凌江,等. 男性分裂症患者和罪犯攻击行为相关因素对照研究[J]. 中国心理卫生杂志,1997;11(2):103 - 106.

[3] 朱连成,王丽娟,陈 利,等. 具有凶杀行为的精神分裂症患者 MMPI 的对照研究[J]. 中国心理卫生杂志,2001;15(2):110.

[4] 纪术茂,戴郑生,主编. 明尼苏达多相人格调查表[M]. 北京:科学出版社,2004;77.

[5] Cheung P, Schweitzer I, Crowley k, et al. Violence in schizophrenia[J]. Schizophr Res, 1997;26(2):181 - 189.

[6] Kemph JP, Braley RO, Ciotola PV. A comparison of youthful inmates who have committed violent versus nonviolent crimes[J]. J Am Acad Psychiatry Law, 1998;26(1):67 - 74.

[7] Valliant PM, Gristey C, Pottier D, et al. Risk factors in violent and nonviolent offenders[J]. Psycho Rep, 1999;85(2):675 - 680.

[8] 徐莉萍,王小平,谢永标,等. 男性少年暴力罪犯人格特征对照研究[J]. 中国行为医学科学,2003;12(2):188 - 189.

[9] Davision S, Leese M, Taylor PJ. Examination of the screening properties of the personality diagnostic questionnaire 4 + (PDQ4 +) in a prison population[J]. J Personal Disord, 2001;15(2):180 - 194.

[10] Blackburn R, Coid JW. Empirical clusters of DSM - Ⅲ personality disorders in violent offenders[J]. J Personal Disord, 1999;13(1):18 - 34.

[11] 沈东郁,杨蕴萍. 人格诊断问卷在成年违法犯罪人群中的应用[J]. 中国行为医学科,2002;11(5):531 - 532.

(上接第 245 页)

viral hepatitis[J]. Microbiol Immunol, 2000;44(9):799 - 804.

[8] Sekizawa T, Yanagi K, Itoyama Y. Glycyrrhizin increases survival of mice with herpes simplex encephalitis[J]. Acta virologica, 2001;45:51 - 54.

[9] Dargan DJ, Subak - Sharpe JH. The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus - infected cells in culture. DNA and protein synthesis, polypeptide processing and transport[J]. J Gert Virol, 1986;67:1831 - 1850.