

茜草对 II 型单纯疱疹病毒的体外生长抑制作用

金玉怀 王玉坤 顾葆良

(河北医学院微生物学教研室、石家庄)

提 要

茜草为常用中药。本研究发现,茜草的甲醇提取物在体外细胞培养上对 HSV-2 有明显的抑制作用。在 Vero 细胞上,病毒抑制数可达 3 个对数。病毒增殖抑制实验表明,该制剂确实抑制了 HSV-2 感染性病毒颗粒的产生。在不同的细胞系上进行比较,发现该制剂的抗病毒作用具有明显的细胞系依赖性。本文认为,茜草的甲醇提取物具有抑制 HSV-2 的作用,但其有效成分为何种,尚待进一步研究。

关键词: 茜草 抗病毒作用 HSV-2

茜草 (*Rubia cordifolia* H.) 属茜科植物,药用根茎,祖国医学用于治疗黄疸和预防疮疹。药理研究证明,它对多种细菌有体外抗菌作用,对囊尾蚴、羊的大肠寄生虫等有杀死作用,而对鼠、兔、人的毒性较低⁽¹⁾。Itokawa H. 等 (1983, 1984)^(2,3) 报道,从茜草甲醇提取物中分离的一种环六肽,对多种实验动物肿瘤有较好的抗肿瘤作用。

从中草药中寻找抗病毒药物,是抗病毒药物研究的一个重要方面。以往许多报道表明,抗肿瘤药物常具有一定的抗病毒作用,某些抗菌,抗寄生虫药也表现一定的抗病毒活性⁽⁴⁾。据此,我们对茜草进行了抗病毒作用研究,发现茜草的甲醇提取物在体外 Vero 和 HeLa 细胞上,对 HSV-2 有较强的抑制作用。

材料与方法

一、细胞: Vero 细胞系来自中国预防医学中心病毒学研究所。BHK-21 细胞系来自北京军区军事医科所微生物室。HeLa 细胞系为湖北医学院微生物教研室所赠,按常规进行传代和培养⁽⁵⁾。

二、病毒: HSV-2 来自中国预防医学中心病毒学研究所,经乳兔肾原代细胞培养传代,TCID₅₀ 为 10⁻⁵/0.1ml。

三、培养基: Eagle's MEM 培养基 (日本制药株式会社),用时加青、链霉素各 100u/ml,谷氨酰胺 1mM 及 10% 小牛血清。维持液加 2% 小牛血清。

四、药物

1. 茜草甲醇提取物制备:称取一定量茜草,按 1:4 比例加入甲醇,浸泡 24 小时后,纱布过滤除去药渣,药液经水浴蒸发挥去甲醇,所得浸膏加入双蒸水,制成相当于每毫升含 1 克生药的水溶液,以此为 100% 液,滤过除菌,4℃ 保存。

2. 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷 (BuDR, 市售)

本文于 1988 年 4 月 20 日收到

五、茜草对细胞毒性测定: 通过测定药物的细胞生长抑制率, 确定药物的细胞毒性⁽⁶⁾。方法为: 2×10^5 细胞/ml 左右的细胞悬液, 接种细胞培养管, 实验组管内含有不同浓度的药物, 37°C 培养 24 小时后, 胰酶-EDTA 混合消化液消化细胞单层, 台盼蓝染色, 血球计数盘内计数活细胞数, 按下列公式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组平均活细胞数}}{\text{对照组平均活细胞数}}\right) \times 100\%$$

以细胞生长抑制率小于 10% 的药物浓度作为实验浓度。

六、药物抑病毒指数测定: 长成单层的 Vero 细胞 Hanks' 液洗两次后, 接种 10 倍系列稀释的 HSV-2 病毒液, (0.1ml/孔) 37°C 吸附 1 小时后, 弃去未吸附病毒液, 分为对照组和实验组, 分别加入维持液和合药维持液, 放 37°C 温箱培养, 逐日观察细胞病变, 观察 7 天后, 分别计算 TCID₅₀ 值, 计算抑制指数:

$$\text{抑制指数} = \text{对照组 LogTCID}_{50} - \text{实验组 Log TCID}_{50}$$

七、药物对 HSV-2 感染性病毒增殖影响的测定: 长成均匀单层的 Vero 细胞瓶, Hanks' 液洗两次后, 接种约 20000 TCID₅₀ 的 HSV-2 液, 37°C 吸附 1 小时后, 分为对照组和实验组, 分别加入维持液和合药维持液。放 37°C 温箱培养, 从感染 24 小时起, 分次收获培养物(24、48、72、96 小时), -60°C 保存, 然后在 BHK-21 细胞上滴定感染性滴度。

八、不同细胞系对药物作用 HSV-2 的影响观察: 长成单层的 Vero 细胞、BHK-21 细胞和 HeLa 细胞, Hanks' 液洗两遍后, 接种 10 倍系列稀释的 HSV-2 液, 分为对照组和实验组, 分别加入维持液和含药维持液, 放 37°C 温箱培养, 逐日观察细胞病变, 观察 7 天后, 分别计算 TCID₅₀ 值。

结果与讨论

一、茜草的细胞毒性测定: 茜草甲醇提取物对 Vero 细胞, BHK-21 细胞和 HeLa 细胞均有一定毒性作用, 但经 1:80 稀释后, 毒性作用均已不显著(表 1), 故以后的实验均采用此浓度。

表 1 茜草甲醇提取物的细胞毒性测定

Table 1. Cytotoxicity of Methanol Extract of *Rubia cordifolia*

药物浓度 Concentrations*	细胞生长抑制率 Inhibiting ratio on cell growth		
	Vero	BHK-21	HeLa
1:10	100.00	100.00	—
1:20	90.00	100.00	—
1:40	31.80	76.68	39.50
1:80	3.40	10.80	8.20
1:160	1.50	9.20	—

*concentration + drug solution (100%), dilution (v/v)

二、茜草甲醇提取物对 HSV-2 的抑制作用: 在 Vero 细胞上, 茜草甲醇提取物实验组 HSV-2 滴度明显降低, 病毒抑制指数达 3 个对数(表 2)。于感染后不同时间收获

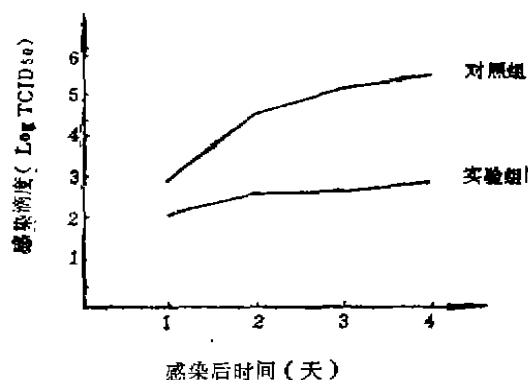


图1 茜草甲醇提取物对 HSV-2 对增殖的影响
Fig 1 Effect of methanol extract of *Rubia cordifolia* on reproduction of infectious HSV-2 Particles

培养物, BHK-21 细胞上滴定感染滴度, 测定药物对感染性病毒增殖的影响, 结果可见药物实验组的感染滴度明显降低(表 3)。绘成病毒生长曲线(图 1), 可见对照组生长曲线呈对数增长型, 而实验组生长曲线较平直。相关检验, 对照组感染滴度与培养时间呈明显正相关($r=0.9439$ $p<0.05$) 说明随培养时间延长, HSV-2 明显增殖, 而实验病毒滴度与培养时间无明显相关性($r=0.235$ $p>0.05$) 表明在茜草甲醇提取物作用下, 病毒无明显增殖。

表2 茜草甲醇提取物对 HSV-2 的抑制作用

Table 2 Inhibitory Effect of Methanol Extract of *Rubia cordifolia* on HSV-2 in Vero Cell Line

实验次数 No. of experiments	感染滴度 Infectivity titer(TCID ₅₀)		抑制指数 Inhibiting indexes
	对照组 control	实验组 experiment	
1	4.00	0.67	3.33
2	4.67	1.87	3.00
3	5.00	1.50	3.50
t test $P<0.01$			

表3 茜草甲醇提取物对 HSV-2 增殖的影响

Table 3 Effect of Methanol Extract of *Rubia cordifolia* on Production of Infectious HSV-2 Particles

感染后时间 (小时) Time of postinfection (hour)	病毒滴度 ($\bar{x} \pm RD$) Titer of virus particle		抑制指数 Inhibiting indexes	t 检验 t test
	对照组 control	实验组 experiment		
24	3.11 \pm 0.35	2.28 \pm 0.25	0.83	$p<0.05$
48	4.71 \pm 0.26	2.89 \pm 0.38	1.82	$p<0.01$
72	5.45 \pm 0.39	2.80 \pm 0.38	2.65	$p<0.01$
96	5.72 \pm 0.35	3.19 \pm 0.50	2.53	$p<0.01$

上述结果表明, 茜草甲醇提取物在 Vero 细胞上对 HSV-2 有较强的抑制作用, 并且确实能抑制 HSV-2 感染性病毒的增殖。此外, 由于在实验中, 药物是在病毒吸附完成以后加入的, 而 HSV-2 又往往通过细胞间传播, 所以可以推测药物起作用的步骤可能是在

表4 在不同细胞系上茜草甲醇提取物和BuDR对HSV-2的抑制作用
Table 4 The Inhibitory Effect of Methanol Extract of Rubia cordifolia
and BuDR on HSV-2 in Different Cell Lines

组别 Groups	感染滴度 Infectivity titers (Log TCID ₅₀ /0.1ml)											
	BHK-21				Hela				Vero			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
control	5.23	4.67	5.67	5.19	5.00	4.67	5.00	4.89	5.45	4.67	5.00	5.04
rubia(1:80)	4.50	4.50	5.50	4.83	2.00	2.50	3.00	2.50	2.50	3.33	3.00	2.94
BuDR(40µg/ml)	3.36	3.33	3.50	3.49	3.00	3.00	3.33	3.11	3.33	3.50	3.33	3.39

病毒吸附阶段以后的过程中,尤其是在病毒增殖抑制实验中,于病毒感染后一个复制周期左右的时间(24小时),病毒的感染滴度已降低84%(0.83个对数)、更支持此推测。

三、不同细胞系对药物作用于HSV-2的影响,以前曾有报道^[7,8],药物在不同的细胞系上,抗病毒作用可有不同,我们在实验中也发现,茜草甲醇提取物在BHK-21细胞上对HSV-2几乎无抑制作用,为进一步了解该制剂的抗病毒作用是否具有细胞系依赖性,同时在Vero细胞、BHK-21细胞和Hela细胞上测定了其对HSV-2的影响,以BuDR作为阳性对照,结果发现(表4),在三个细胞系上各组感染性滴度存在有明显的差别(F检验, $P < 0.01$)进一步作Q检验发现:在BHK-21细胞上,茜草甲醇提取物与病毒对照组间差别无显著性($p > 0.05$) BuDR组与前两组相比,差别具有非常显著意义($p > 0.01$),说明在BHK-21细胞上, BuDR对HSV-2有明显抑制作用,而茜草甲醇提取物无明显抑制作用;在Hela细胞上,茜草组、BuDR组与病毒对照组相比,差别均非常显著意义($p > 0.01$),两药物处理组之间相比,差别也有显著性($P = 0.05$),说明在Hela细胞上,两药均能抑制HSV-2,其中茜草甲醇提取物的抑制作用较BuDR为强;在Vero细胞上,两药物处理组与病毒对照组相比,差别均具有非常显著意义, ($p < 0.01$),两药物处理组之间无显著差别($p > 0.05$)。说明在Vero细胞上,两药对HSV-2均有相同抑制作用。

从上述三种细胞系上的实验结果可以看出,茜草的抗HSV-2作用具有明显的细胞系依赖性,造成这种现象的原因尚不清楚,可能与细胞本身的遗传特性有关,不同的细胞系具有不同的生理生化特性,这种特性可能影响药物的抗病毒作用。

四、根据实验,茜草抗HSV-2作用明显,但其有效成份是什么。尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) 江苏新医学院编:1977, 中药大辞典, 第一版, 上海人民出版社。
- (2) Itokawa H et al: 1983; Chem Pharm Bull 31, 1424.
- (3) Itokawa H et al: 1984; Chem Pharm Bull 32, 284.
- (4) 陈鸿珊等译:1980, 抗病毒药物——作用方式和人类病毒病的化学治疗, 第一版, 人民卫生出版社。
- (5) 中国医学科学院流行病学防治研究所编:1978, 常见病毒病实验技术, 第一版, 科学出版社。

- [6] 赵小侠等, 1982. 中华微生物和免疫学杂志, 4, 261.
[7] De Clercq E, 1982. *Antiviral Agents Chemother* 21, 661.
[8] Kirsi J J et al, 1983. *Antiviral Agents Chemother*, 24, 353.

The Study on Antiviral Effect of Methanol Extract of *Rubia cordifolia* against Herpes Simplex Virus 2 in vitro

Jin Yu-Huai Wang Yu-kun Gu Bao-liang

(Microbiology Department of Hebei Medical College, Shigiazhuang)

Rubia cordifolia is a traditional Chinese drug. In this paper, it was reported that the methanol extract of this drug showed significant antiviral effect against herpes simplex virus 2 in vitro. In Vero cell line, virus inhibiting index reached 3 log. Virus reproduction inhibiting test showed that the reproduction of infectious virus particles was inhibited. By comparing the antiviral effect of this agent in different cell line, it was found that the antiviral effect of this extract was cell line dependent.

Key words: *Rubia cordifolia* Antiviral effect HSV-2