第8巻第2期 1993年6月

### 中 国 病 毒 学 VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.2 Jun.1993

# 大蒜中抗人巨细胞病毒成份的筛选

孟月生

(山东医科大学血液病研究室,济南250012)

陆道培 1 郭乃榄

(北京医科大学血液病研究所,北京100044)

R978.7

## 张礼壁 周桂珍

(中国预防医学科学院病毒学研究所,北京100052)

### 提要

临床试用大蒜制剂预防和治疗人巨细胞病毒感染取得了明显效果。 在此基础上我 们应用细胞病变(CPE)抑制试验和空斑抑制试验,对大蒜中的抗人巨细胞病毒成份进行了初步筛选和比较,证实新鲜大蒜中存在多种抗该病毒的有效成份,其中至少包括大蒜新素(二丙烯三硫)和 Ajoene 类似物。

关键词: 大蒜 成份 人巨细胞病毒

人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus, HCMV)属  $\beta$  疱疹病毒, 是起引人类 先天畸形的重要原因之一,在严重免疫功能受抑患者常可引起严重感染,至今临床上缺乏安全高效的抗该病毒药物。

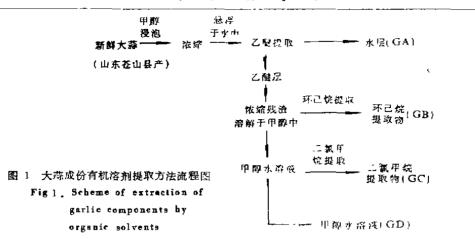
陆道培等<sup>[13]</sup>首先试用大蒜制剂(包括大蒜粗取液和大蒜素)预防和治疗骨髓移植后 HCMV 感染,取得了较好的临床效果。在此基础上,我们应用体外病毒培养方法,对系 列大蒜制剂或成份的抗HCMV活性进行了初步筛选和比较,现将结果报道如下。

# 材料与方法

一、大蒜成份: 大蒜粗提液(Garlie extract, GE), 由北京医科大学人民医院药房生产, 批号890107; 人工合成的大蒜新素(Allitridi)即二丙烯三硫(Diallyl trisulfide, DTS), 为连云港东风制药厂生产; 大蒜有机溶剂提取成份 GA、GB、GC、GD 按图 1 所示流程图分离提取。对 GB 部分进一步应用硅胶柱层析法(230—400目)分离成 B-a、b、c、d、e、f、g、m、n、o

本文于1992年8月24日收到,11月30日修回。

承蒙北京医科大学药学院王夔教授、闵吉梅教授、杨铭老师等协助分离大蒜成份、特致谢忱。



等10个组份; 大蒜含硒多糖(GSP): 取湖北省恩施地区产大蒜制成水堤液,碱性乙醇沉淀,用 Sephadex G25,G100和G200提取。 另有大蒜不含硒多糖(GP)、亚硒酸钠(Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>)和丙氧(乌苷)DHPG,即Gancicclovir,英国Syntex公司产品)作为对照药物。

二、**人胚胎肺成纤维细胞**(HEL): 常规方法培养至第 10~20代用于接种HCMV。HCMV AD 169从美国引进,其感染性滴度为50~100×103 PFU/ml。

首先应用试管法细胞毒性试验测定 HEL 细胞对大蒜成份的最大耐受浓度(MTC)。 大蒜成份 先用二甲基亚砜溶解, 再以倍比稀释梯度加于细胞维持液, 37℃培养 HEL 细胞 单层 8 —10 天,用 1 %亚甲蓝染色确定维持 HEL 细胞存活95%以上的最大药物浓度作为该成份的 MTC 值。 每药物均作重复试验进行验证

三、细胞病变(CPE)抑制试验: 用该法对各大蒜成份的抗 HCMV 作用进行初筛。 取HEL细胞单层,接种 100PFU/ml HCMV, 同时将各大蒜成份稀释至 MTC 浓度加于细胞维持液, 37℃培养8—10天,观察结果均重复试验验证。

四、空斑抑制试验: 有抑制 HCMV 作用的药物均进一步用空斑抑制试验测定其作用强度。 空 斑抑制试验 (Plaque reduction assay) 方法同文献[2]。

# 结果和讨论

细胞毒性试验和 CPE 抑制试验均经重复试验验证, 所得结果一致, 列于表 1 中。对于未显示抗 HCMV 作用的大蒜成份如 GA、GD 及 B-a、b、c、d、e、f、g、o 组份的 CPE 抑制试验结果未列于表中。由表 1 可知, 大蒜有机溶剂成份 B-m 和 B-n 以及大蒜 新素有较明显的抗HCMV活性。B-m和B-n 仍为混合物,现已从 中分离出 Z-Ajoen和E-Ajoene 等 4 种化合物, 我们相信从中分离出的单一化合物将会显示更强的抗 HCMV 活性。为了排除有机溶剂对试验结果的影响,我们分别测定了甲醇、乙醛、环已烷、二氯甲烷和二甲基亚砜 的 HEL 细胞毒作用及对 HCMV CPE 的影响, 发现 HEL 细胞对它们耐受性较好, MTC 均在 10000μg/ml 以上,且均未显示抑制 HCMV 的作用。

分别用 GE、GB、GC、B-m、B-n、GSP、DTS 和 DHPG 进行对 HCMV 的空斑抑制试验,结果显示 B-m、B-n 和 DTS 的抗 HCMV 活性最强, 其中 DTS 的 ED<sub>5</sub>, 为3.8  $\mu_{\rm g/ml}$ , 与DHPG 的 ED<sub>5</sub>, (3.2 $\mu_{\rm g/ml}$ ) 十分接近。将其结果列于表 2和3。GE 在较高浓

#### 表 1 大蒜成份对HEL 细胞 MTC及对 HCMV CPE 抑制

Table 1. Maximum Tolerated Concentration for HEL cells and Inhibition to HCMV CPE of Garlie Components

大蒜成份	对 HEL 细胞MTC MTC for HEL cells (µg/ml)	CPE(HCMV接种后天数) (Days after inoculation of HCMV)				
Garlie component		1	3	5	7	9
EG						
(Garlic extract DTS	20,000	_	_	_	±	±
(Giallyl trisulfide) GB	10	_	_	_	±	±
(Component B)	100	_	-	_	±	±
(Component C)	100		_	±	+	+
B- m	6(1	_			_	エ
B-n GSP	60	·		_	£	±
(Garlic selenium proteín)	1000	_		±	+	+
DHPC	25		_	-		
GP	1000	_	±	+	++	##
Ns; SeO;	10,000		±	+	++	₩
Controls			±	+	++	###

注: \*-" 指无 CPE 出现; \*±" 细胞轻度肿胀 \*+" CPE面积占25%左右; \*++" CPE面积占50%左右, \*++" CPE面积占75-100%

Note, "-" Indicating no CPE; "±" Entargement of cells

"+ " Area of CPE cover about 25%;

"H" Area of CPE cover about 5506;

" || " Area of CPE cover 75-100%.

#### 表 2 大蒜组份B-m 和 B-n 空斑抑制试验

Table 2 Plaque Reduction Assay of B-m and B-n Compositions of Garlie

#### 表 3 大藝術景与DHPG空斑抑制试验

Table 3, Plaque Reduction Assay of Allitridi and DHPG

	•				
大蒜组份 Gartic Compositions	浓度(μg/m <sup>1</sup> ) Concentration (μg/m <sup>1</sup> )	空斑抑制率(%) Plaque Reduct- ion Rate(%)	药 物 Drugs	浓度(µg/ml) Concentration (µg/ml)	空斑抑制率(%) Plaque Reduction Rale(%)
	60	B1,2		10	80.8
	40	74.1	大蒜新素	5	59.0
B—m 20 10 5	20	59.8	Allitridi	2.5	39.7
	10	18.8		1.25	19.2
	2.4		0.625	9.0	
	60	67.1		25	100
	40	41.2	丙氧乌苷	10	88.5
В с	20	20.0	DHPG	4	62.9
	10	12.9		1.6	24.4
	5	7.1		0.64	6.6

度水平显示明显的抗 HCMV 活性, 如在20000μg/ml(即 MTC) 时 空 斑 抑 制 率 可 达 72.1%。 GB 和GC 在其 MTC 时空斑抑制率分别为71.2%和49.2%。 GSP 的最大空斑抑 制率仅为38.6%,无统计学意义。

## 讨 论

大蒜为百合科葱属植物(Allium Stativum Liliaceae),现代医学研究证明,大蒜鳞茎中含有十分复杂的化学成份<sup>(1)</sup>,因此具有非常广泛的药理学作用,大蒜成份的抗动脉粥样硬化和血小板聚集、抗细菌和霉菌,以及抗癌等活性已被证实并应用于临床<sup>(1)</sup>但有关其抗病毒作用的研究尚少有报道。近有郭乃榄等<sup>(2)</sup>发现大蒜粗提液在体外有抑制人巨细胞病毒活性,这一结果在本研究亦得证实。本实验的结论是,新鲜大蒜中存在一种以上的抗 HCMV 有效成份,其中有些成份如二丙烯三硫的抗 HCMV 活性几乎与DHPG 相差无几。我们认为进一步开发研究大蒜成份的抗病毒作用有重要意义。

### 参考文献

- [1] 陆道培, 1992, 白血病治疗学, 科学出版社。p302--303。
- [2] 郭乃槻等, 1991, 中华实验和临床病毒学杂志, (5): 71-75.
- (3) Blok E., J Am Chem Soc, 108: 7045-49.
- (4) Abdullah T. H., 1988, J Noil Med Assoc, 80: 439-445.

## Studies On the Anti-HCMV Effect of Garlic Components

Meng Yuesheng

(Laboratory of Hematology, shandong Medical University, Jinan 250012)

Lu Daopei Guo Nailan

(Institute of Hematology, Beijing Medical University, Beijing 100044)

Zhang Libi Zhou Guizhen

(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)

Clinical uses of garlic preparations in the prevention and treatment of Human Cytomegalovirus (HCMV) infections are effective. On the basis of this, we screened a series of garlic components or compositions for their anti-HCMV activities in vitro by employing cytopathic effect inhibiting test and plaque reduction assay. It is confirmed that garlic contains more than one components, at least including Allitridi and Adjone derivatives, which have dominant anti-HCMV action. Further researches on the anti-viral effect of garlic components will be worthwhile.

Key words, Garlic Component Human cytomegalovirus