第 20 卷第4期
2005 年 8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

20(4):366-369
August 2005

人中性粒细胞多肽 $HNP_{1,3}$体外抗单纯疱疹病毒 I型的作用

刘 娟[1],孙永涛[1**],王少扬[1],史孟元[2],庄 严[1],翟 嵩[1]

(1.第四军医大学唐都医院 解放军感染病诊疗中心,陕西西安 710038;2.第四军医大学微生物教研室,陕西西安 710038)

Studies on the Inhibitory Effects of $HNP_{1,3}$ on HSV-1 Infection in vitro

LIU Juan[1], SUN Yong-tao[1**], WANG Shao-yang[1], SHI Meng-yuan[2], ZHUANG Yan[1], ZHAI Song[1]

(1. Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: In order to evaluate the effect of human neutrophil peptide$_{1,3}$ ($HNP_{1,3}$) and acyclovir (ACV) on Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection, Vero cells were inoculated with HSV-1. Antiviral activity was evaluated by reduction in cytopathic effect and HSV-1 envelop glycoprotein antigen, which determined by sandwich ELISA 48h after infection when drug[3] were interacted with free virus particles and infected vero cells (group A: inactivation of viruses, group B: inhibition of viral replication). Their cytoxicity were also measured by MTT assay. The results showed $HNP_{1,3}$ reversed HSV-1 induced cytopathic effect and inhibited the antigen expression in group A, their 50% efficiency concentrations (EC_{50}) were 8.1μg/mL、10.03μg/mL; In group B, ACV can lessen HSV-1 induced cytopathicity effects and reduced the antigen secretion whose EC_{50} was 0.68μg/mL. No cytotoxic effects of $HNP_{1,3}$ were found by MTT assay. These findings confirmed that $HNP_{1,3}$, previously showed active to bacterium and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), possess direct virus neutralizing and binding-blocking activity. In addition they inhibit the cytopathic effect as well as viral antigen production.

Key words: Human neutrophil peptide (HNP); Acyclovir (ACV); Herpes simplex virus 1 (HSV-1); *Human immunodeficiency virus* 1 (HIV-1)

摘要:体外观察人中性粒细胞多肽$_{1,3}$(Human neutrophil peptide, $HNP_{1,3}$)及阿昔洛韦(Acyclovir, ACV)对单纯疱疹病毒- I型(Herpes simplex virus 1, HSV-1)的抑制作用。以 Vero 细胞为靶细胞,用各种浓度 $HNP_{1,3}$与游离病毒颗粒(直接失活组)及感染病毒后的靶细胞(复制抑制组)进行相互作用,镜下观察各药物对 HSV-1 致细胞病变效应的抑制作用,并采用 ELISA 法测定感染 48h 后药物对 HSV-1 囊膜糖蛋白分泌的抑制作用。MTT 法检测各药物对细胞的毒性作用。结果显示直接失活组中,$HNP_{1,3}$可使 HSV-1 的致细胞病变效应减轻,对 HSV-1 直接失活的 50%有效浓度(EC_{50})为 8.1μg/mL、10.03μg/mL;复制抑制组中,ACV 使 HSV-1 的致细胞病变效应减轻,EC_{50}为 0.68μg/mL。MTT 检测结果表明 $HNP_{1,3}$在治疗浓度范围内无明显细胞毒性。以上结果表明 $HNP_{1,3}$除具有较强的抗菌作用和抗人类免疫缺陷病毒 I型(*Human immunodeficiency virus* 1, HIV-1)活性外,还能失活 HSV-1 病毒颗粒,从而逆转病毒及其蛋白的病毒效应(致细胞病变)和抑制病毒蛋白质的合成。

关键词:中性粒细胞多肽$_{1,3}$($HNP_{1,3}$);阿昔洛韦(ACV);单纯疱疹病毒 I型(HSV-1);人类免疫缺陷病毒 I型(HIV-1)

中图分类号:R373 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2005)04-0366-04

在人免疫缺陷病毒 1 型(*Human immunodeficiency virus* 1, HIV-1)感染者,除了各种机会性的细菌感染外,10%艾滋病患者伴发有单纯疱疹[1]。由于免疫功能受损,这些患者的单纯疱疹不仅发

收稿日期:2005-02-21,修回日期:2005--
作者简介:刘 娟(1972-),女,从事皮肤性病学与病毒学研究。E-mail:juanliufmmu@hotmail.com
** 通迅作者. Corresponding author. Tel:029-83377652, Email:yongtaos@hotmail.com

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

作频繁且皮损较重,有时甚至伴播散性、致命性的内脏感染。对于单纯疱疹病毒 I型(Herpes simplex virus 1,HSV-1)感染,临床首选治疗药物是阿昔洛韦(Acyclovir,ACV)。而在艾滋病患者,应用抗 HIV-1 药物的同时再加用 ACV,势必会加重药物毒副作用及患者经济负担,因此我们力图找到能同时抑制 HIV-1 和 HSV-1 的药物。本实验选用临床上首选的抗 HSV-1 药物 ACV 与正处于抗菌肽研究热点中的、具有抗 HIV-1 的药物中性粒细胞多肽$_{1,3}$(Human neutrophil peptide$_{1,3}$, $HNP_{1,3}$),从细胞形态学和免疫学角度评判了它们的抗 HSV-1 的作用。

1　材料和方法

1.1　细胞、毒株及主要试剂

Vero 细胞为本室保存,完全培养液为含 10 % FBS 的高糖 DMEM,维持液(VGM)为含 0.5 % FBS 的 DMEM。HSV-1 购于中国生物制品药品检定所。$HNP_{1,3}$为本室制备[2],贮存液用不含血清的 DMEM 培养液配制为 200μg/mL;ACV 为湖北科益药业股份有限公司;MTT(噻唑蓝)购于 Sigma。鼠 HSV-1 单克隆抗体(囊膜糖蛋白抗体)、兔抗 HSV-1 多克隆抗体抗体购自 Biodesign,HRP 标记羊抗兔 IgG 购自华美公司。FBS、DMEM 购于 Gibco 公司。

1.2　病毒悬液的制备和滴度的测定

HSV-1 接种于 Vero 细胞,吸附 1h,换液,待细胞病变(CPE)为 ++～+++后,0.25 %胰酶消化细胞,用不完全 DMEM 培养液洗涤细胞(1000r/min,离心 5min),经反复冻融,收集上清。将上述病毒悬液作 10 倍系列稀释(10^{-1}～10^{-8}),将各稀释度的毒株接种于 24 孔板中已长成单层的 Vero 细胞,各 3 复孔,48h 后,吸弃培养液,10 %甲醛固定,1 %结晶紫染色,计算每孔的空斑数。滴度为空斑数的平均值乘以稀释倍数。测得病毒悬液的滴度为5.27 ×10^6 PFU/mL。

1.3　药物对 HSV-1 的抑制试验

待 Vero 细胞长成单层后,分成 2 个实验组作不同方式的抗病毒试验。每组均设置正常细胞对照以及加入等体积 VGM 的单用病毒感染的对照。整个实验用 10^5 PFU/mL 的 HSV-1 来感染细胞。观察 CPE 变化,2d 后收集上清,集中用 ELISA 法测定 HSV-1 抗原。

1.3.1 药物对 HSV-1 的直接失活作用(直接失活组):用 1 ×含药的 DMEM 维持液稀释无血清病毒悬液至 10^5 PFU/mL,37 ℃孵育 1h。Vero 单层细胞中每孔加入 0.02mL 病毒悬液感染细胞。吸附 1h 后,用 Hank's 清洗细胞,加入 0.2mL VGM。

1.3.2 药物对 HSV-1 在靶细胞中复制的抑制作用(复制抑制组):先以 0.02mL 10^5 PFU/mL 的 HSV-1 感染细胞,吸附 1h 后以 Hank's 清洗细胞,除去游离病毒,加入 0.2mL 含药的 VGM。

1.3.3 HSV-1 抗原(囊膜糖蛋白)检测:采用夹心 ELISA 法[3],TMB 显色,波长 450nm 处测定 *OD* 值。空白孔调零,样本孔 *OD* 值大于或等于阴性对照孔 OD 值的 2.1 倍,即为阳性。

抗原抑制率 = [(对照孔 P/N-样本孔 S/N)/对照孔 P/N-2.1] ×100 %,P 为阳性对照孔 *OD* 值,N 为阳性对照孔 *OD* 值,S 为样本孔 *OD* 值。用对数机率单位法[4],计算抗原抑制率为 50 %时的药物浓度,即为 EC_{50}。

1.4　药物对细胞的毒性试验[5]

2 ×10^4个 Vero 细胞接种 96 孔板,37 ℃5 %CO_2培养 24h。次日换用 DMEM 完全培养液 10 倍稀释的药物($HNP_{1,3}$为 0.01μg/mL～100μg/mL,ACV 为 0.002μg/mL～2.0μg/mL),每孔 0.2mL,各 3 复孔,设阴性对照和空白对照,37 ℃培养 48h。MTT 法测各孔吸光度[3]。细胞存活率 = (实验孔 A 值/对照孔 A 值) ×100 %。

1.5　统计学分析

数据以 $x \pm s$ 表示,用 SPSS11.5 统计软件进行分析,实验组和对照组比较采用 Wilcoxon rank sum test,组间比较采用 ANOVA。

2　结果

2.1　药物对 HSV-1 CPE 的观察效果

HSV-1 在生长繁殖的 Vero 细胞引起如下变化:细胞肿胀,变圆,团缩,并可见到多核巨细胞和融合细胞,偶有核内包涵体。细胞多聚集成葡萄串状,并且细胞病灶逐渐变大,最终使整个单层细胞被破坏。在直接失活组中,$HNP_{1,3}$可使 HSV-1 的 CPE 明显减轻;复制抑制组中,ACV 使 CPE 明显减轻。表明 $HNP_{1,3}$通过与病毒颗粒的直接作用,逆转了病毒及其蛋白所引发的致细胞病变效应,保护了靶细胞。

2.2　药物对 HSV-1 抗原的抑制效果

各药物对 HSV-1 抗原的作用见表 1。直接失活组中的 $HNP_{1,3}$及复制抑制组中的 ACV 对 HSV-1 囊膜糖蛋白抗原的抑制作用呈剂量依赖性。在直接失活组中,$HNP_{1,3}$及ACV的EC_{50}分别为8.1μg/mL、10.03μg/mL、0μg/mL,HNP_1与 HNP_3的抑制作用

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

表1 $HNP_{1,3}$及ACV对HSV-1抗原的抑制作用

Table 1 Inhibition of HSV-1 by $HNP_{1,3}$ and ACV

Group	Drug	HSV-1 S/N				Inhibitory rate(%)				EC_{50}
		1	2	3	4	1	2	3	4	
Group A	HNP1	12.45 ±0.58	11.98 ±1.23[a]	7.00 ±0.30[a]	3.23 ±0.69[a]	5.08	9.33	55.11	89.63	8.1
	HNP3	13.64 ±2.12	12.50 ±1.87	8.53 ±1.90[a]	4.20 ±1.87[a]	0	4.56	41.00	80.72	10.03
	ACV	13.10 ±1.22	14.70 ±1.98	14.00 ±1.36	13.05 ±1.29	0	0	0	0	
	Control	13.00 ±0.74								
Group B	HNP1	13.92 ±1.08	13.81 ±0.60	14.28 ±0.97	13.04 ±1.38	0	0	0	4.86	
	HNP3	13.74 ±1.09	14.03 ±1.76	14.08 ±0.47	13.19 ±1.32	0	0	0	3.70	
	ACV	13.94 ±1.55	13.02 ±2.03	10.18 ±0.78[b]	5.96 ±1.11[b]	0	5.32	29.77	61.76	0.68
	Control	13.60 ±0.59								

a: $p < 0.05$, compared with control group in group A; b: $p < 0.05$, compared with control group in group B; 1～4 stand for drug concentrations in 10-fold dilution as following: HNP1, 0.1μg/mL～100μg/mL; HNP3, 0.1μg/mL～100μg/mL; ACV, 0.002μg/mL～2.0μg/mL.

无显著性差别($p > 0.5$);$HNP_{1,3}$复制抑制组中,$HNP_{1,3}$及ACV的EC_{50}分别为0μg/mL、0μg/mL、0.68μg/mL。$HNP_{1,3}$通过失活HSV-1病毒颗粒,明显抑制了病毒囊膜糖蛋白抗原的合成。

2.3 细胞毒性试验结果

当有活细胞存在时,线粒体内琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的MTT还原成紫兰色的甲臜,后者溶于有机溶剂将结晶的甲臜溶解释放,所测*OD*值反映了活细胞的数量。三种药物不同浓度细胞存活率见图1,结果表明,$HNP_{1,3}$在治疗范围内无明显细胞毒性。

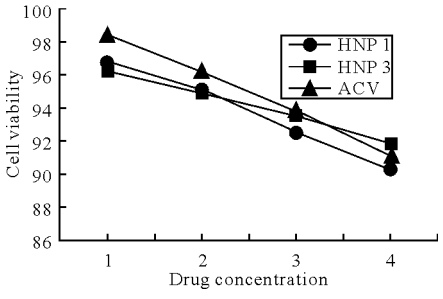

图1 MTT法检测$HNP_{1,3}$及ACV对Vero细胞的毒性

Fig.1 Cell toxicity of Vero cells with $HNP_{1,3}$ and ACV by MTT assay

1～4 stand for drug concentrations in 10-fold dilution as following: HNP1, 0.1μg/mL～100μg/mL; HNP3, 0.1μg/mL～100μg/mL; ACV, 0.002μg/mL～2.0μg/mL.

3 讨论

$HNP_{1,3}$是庞大的小分子量抗菌短肽中的一员[6],与其它抗菌肽相比,具有特殊的抗菌机理,它们主要作用于病原微生物的细胞膜,从而病原微生物不易对它们产生抗性。而其它抗菌肽主要作用于微生物的酶,酶基因的突变就会使靶细胞对其产生抗性,因此HNP具有其它抗菌肽无可比拟的优势。体外研究表明$HNP_{1,3}$通过在病原微生物细胞膜上形成通透性孔道而发挥其广谱的抗菌活性(包括G^+细菌、G细菌、真菌、包膜病毒)[6～8]。HNP不能失活两种无包膜病毒——埃可病毒和呼肠孤病毒(reovirus),可能因为脂质囊膜是防御素与病毒颗粒相互作用的靶点。本实验根据$HNP_{1,3}$与HSV-1的作用环节将实验分为两组进行,表明了$HNP_{1,3}$使HSV-1病毒颗粒丧失其感染力,而ACV对HSV-1不具有直接失活作用;ACV主要表现出对HSV-1复制的抑制作用。它们均对细胞无明显毒性。另外,由于防御素类介导的抗病毒活性很容易被血清失活[9],因此我们在实验中制备高活力的病毒悬液及用HNP与细胞相互作用时,均避免了血清的使用。这一点可能会使HNP在体内的应用受到限制。但是为什么机体内的抗菌肽却未受到血清的干扰呢?可能是因为抗菌肽的分泌仅仅局限于细胞外的局部微环境中,相当高浓度的抗菌肽对抗了血清成分的抑制作用。

ACV对疱疹病毒选择性很强,它经HSV的胸腺核苷激酶(TK)激活后磷酸化为一磷化ACV,再经细胞激酶磷酸化为二三磷酸化ACV,二三磷酸化ACV对dGTP有极强的竞争性,通过干扰病毒DNA多聚酶,抑制病毒的复制;或在DNA多聚酶的作用下,与增长的DNA链结合,引起DNA链的延伸中断。研究发现,约5%的免疫受损患者中出现了耐受ACV的HSV变异株。耐受ACV的HSV变异株不会引起正常人的发病,却常常使免疫力受损的艾滋病患者产生严重皮损。96%耐受ACV的HSV变异株TK产生过少或缺乏活性,

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

4 %的 HSV 变异株出现 TK 变异体而丧失对原有底物的特异性。可能是变异的病毒改变了编码 TK 的基因。其最终结果是耐受 ACV 的 HSV 变异株不能将 ACV 磷酸化而成为有抗病毒作用的化合物[10],这是核苷类药物(如 ACV)治疗引发耐药的主要机制。另外,研究还表明耐受 ACV 的 HSV 变异株的 DNA 多聚酶也发生了变异[10,11]。因此,临床上迫切需要应用一种既能抗 HIV-1 又能抗 HSV-1 及其变异株的安全无毒的新型药物。HNP 不仅具有抗 HIV 的作用[8,12],也能降低 HSV-1 病毒颗粒的感染力,从其抗病毒机理推测,应该对 HSV-1 的变异株也有效,但仍需进一步的实验证明。$HNP_{1,3}$的应用,对于解决艾滋病患者同时出现的多种病原体感染,将会起到一箭双雕的作用,同时可以避免多重药物联合治疗带来的毒副作用和巨大经济负担,因此在伴多种病原体感染的艾滋病患者的治疗上将会有广阔应用前景。

参考文献

[1] Richard B O, William D J, Timothy G B. Andrews' diseases of the skin[M]. 9th ed. Philadephia: Sounders Company, 2000, 480-481.

[2] 刘　娟,翟　嵩,杜德伟,等. 人γ防御素的稳定表达和活性鉴定[J]. 第四军医大学学报,2005,26(2):178-181.

[3] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社, 2002,44-46.

[4] Tallaride R J. Manual of Pharmacologic calculations with computer programs[M]. New York: pringer verlag press, 1998, 59-64.

[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2002,199-200.

[6] Lehrer R I, Ganz T. Defensins of vertebrate animals[J]. Curr Opin Immunol, 2002,14:96-102.

[7] Lehrer R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells[J]. Annu Rev Immunol, 1993,11:105-128.

[8] Zhang L, Yu W, He T, *et al*. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor[J]. Science, 2002, 298(5595):995-1000.

[9] Daher K A, Selsted M E, Lehrer R I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins[J]. J Virol, 1986, 60(3):1068-1074.

[10] Illan H, Jacob N, Maiolo E, *et al*. Antiviral sensitivity of herpes simplex virus in immunocompromised patients[J]. Rev Argent Microbiol, 2004, 36(2):88-91.

[11] Nugier F, Colin J N, Aymard M, *et al*. Rucurrence and characterization of acyclovir-resistant simplex virus isolates: report on a two-year sensitivity screening survey[J]. J Med Virol, 1992,36:1-12.

[12] Mackewicz C E, Yuan J, Tran P, *et al*. α-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors[J]. AIDS, 2003, 17(14):23-32.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.