

黄芪多种成分抗人疱疹病毒的初步实验研究

王志洁 黄铁牛¹ 刘焱文² 鲁遂荣 杨占秋 方学韞(武汉 430071 武汉大学医学院病毒研究所;¹ 中南财经政法大学;² 湖北中医学院中药系)

摘要 目的:为了开发利用黄芪的抗病毒性质,我们进行了此项研究。方法:我们以阿昔洛韦(ACV)为阳性对照,采用对病毒所致细胞病变的抑制及空斑减数实验,观察了黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮抗 HSV 药效。结果:在 Hep-2 细胞系统中,ACV 对 HSV-1 HS-1 株直接杀灭、感染阻断、增殖抑制的 ED₅₀ 为 30.83ug/ml,16.04ug/ml,20.04ug/ml;对 HSV-2 333 株的相应 ED₅₀ 为 16.45ug/ml,18.62ug/ml,10.85ug/ml。黄芪总皂苷对 HSV-1 HS-1 株相应 ED₅₀ 为 1.68ug/ml,1.72ug/ml,1.95ug/ml;对 HSV-2 333 株相应 ED₅₀ 为 1.73ug/ml,2.70ug/ml,2.74ug/ml。黄芪总多糖对 HSV-1 HS-1 株的相应 ED₅₀ 为 4.03ug/ml,5.33ug/ml,4.90ug/ml;对 HSV-2 333 株相应 ED₅₀ 为 6.04ug/ml,5.43ug/ml,7.50ug/ml。黄芪总黄酮对 HSV-1 HS-1 株的相应 ED₅₀ 为 4.95ug/ml,2.75ug/ml,3.49ug/ml;对 HSV-2 333 株的相应 ED₅₀ 为 3.56ug/ml,3.93ug/ml,6.27ug/ml。结论:黄芪总皂苷对 HSV-1 的治疗指数(TI)为 ACV 的 4.4,2.4,2.5 倍;对 HSV-2 的治疗指数为 ACV 的 2.3,1.0,1.6 倍。总多糖对 HSV-1 的治疗指数为 ACV 的 10.3,4.1,5.5 倍;对 HSV-2 的治疗指数为 ACV 的 3.7,2.7,3.3 倍。总黄酮的治疗指数与 ACV 相近。值得开发利用。

关键词 黄芪总皂苷;黄芪总多糖;黄芪总黄酮;抗病毒;人疱疹病毒

The experimental research of antiherpes simplex virus effects of various components in the root of Astragalus membranaceus

Wang Zhijie, Huang Tieniu¹, Liu Yanwen², Lu Suiyong, Yang Zhanqiu, Fang Xueyun((1. Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Zhongnan University of Economics and Law, Hubei, China. 2. Department of Chinese Material Medica, College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei, China.))

ABSTRACT **OBJECTIVE:**In order to understand and exploit the antiviral properties of Astragalus membranaceus. **METHOD:**ACV was used as positive control of antiherpes,through inhibitions of cellular pathological effects of herpes simplex virus type-2 and plaque reduction assays,the effects of antiherpes of total saponins, total polysaccharides, total flavonoids of Astragalus membranaceus were observed. **RESULTS:**In Hep-2 cell systems,the median effect doses(ED₅₀) of ACV of direct virucidal activity,the inhibition effects on the infection and multiplication of HSV-1 HS-1 strain were 30.83ug/ml,16.04ug/ml and 20.04ug/ml, respectively the corresponding figures to HSV-2 333 strain were 16.45ug/ml,18.62ug/ml and 10.85ug/ml, respectively; the corresponding ED₅₀s of total saponins to HSV-1 HS-1 strain were 1.68ug/ml,1.72ug/ml and 1.95ug/ml, respectively; those to HSV-2 333 strain were 1.73ug/ml,2.70ug/ml and 2.74ug/ml, respectively; the corresponding ED₅₀s of total polysaccharides to HSV-1 HS-1 strain were 4.03ug/ml,5.33ug/ml and 4.90ug/ml, respectively; those to HSV-2 333 strain were 6.04ug/ml,5.43ug/ml and 7.50ug/ml, respectively. The corresponding ED₅₀s of total flavonoids to HSV-1 HS-1 strain were 4.95ug/ml,2.75ug/ml and 3.49ug/ml, respectively; to HSV-2 333 strain were 3.56ug/ml,3.93ug/ml and 6.27ug/ml, respectively. **CONCLUSION:**The Treatment Indices(TI) of total

本研究由湖北省自然科学基金资助。

saponins to HSV-1 HS-1 strain were 4.4, 2.4 and 2.5 times of ACVTIs, to HSV-2 333 strain were 2.3, 1.0 and 1.6 times of ACVTIs. The TIs of total polysaccharides to HSV-1 HS-1 strain were 10.3, 4.1 and 5.5 times of ACVTIs; to HSV-2 333 strain were 3.7, 2.7 and 3.3 times of ACVTIs. The TIs of total flavonoids were close to ACVTIs. These components of *Astragalus membranaceus* should be worth exploitation.

KEY WORDS Total saponins, total polysaccharides, total flavonoids of *Astragalus membranaceus*, antiviral, herpes simplex virus

HSV-1 可引起唇疱疹、疱疹性角膜结膜炎等多种疾病, HSV-2 可引起生殖道疱疹, 还是宫颈癌的协同诱因。阿昔洛韦 (Acyclovir, ACV) 是临床治疗 HSV 病毒病的首选药物, 但易产生耐药毒株, 新药又有一定毒性^[1]。目前还没有有效的疫苗预防 HSV-2 病毒病的发生^[2,3]。开发研制新的抗 HSV 病毒病药物是极为重要的任务。

黄芪是豆科黄芪属植物膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge A) 和内蒙古黄芪 (*Astragalus mongholicus* Bge) 的根, 具有广谱的抗病毒作用。侯云德等^[4]报道黄芪水煎液对 VSV、Sindbis 病毒、流感病毒等有一定的抑制作用, 对 VSV 在鸡胚细胞培养上的繁殖平均可抑制 10 倍。北京市天坛医院^[5]用黄芪水煎液与人基因工程 IFN 联用治疗宫颈糜烂显效率为 60.7%, HSV-2 分离阳性率从 30.4% 下降到 3.8%, 单用 IFN 组显效率为 31.8%, HSV-2 分离阳性率由 33.3% 下降到 10%, 说明黄芪水煎液对 HSV-2 有抑制作用。黄芪的主要化学成分是黄芪皂苷、多糖、黄酮、多种微量元素、亚油酸、亚麻酸等。为了顺应中药现代化的发展趋势, 开发利用黄芪的抗病毒活性, 我们以 HSV 感染的 Hep-2 细胞作为实验系统, 对黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮抗 HSV 活性进行了观察, 现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黄芪由原湖北医科大学附属二院中药房提供, 经二院中医科方学韞、鲁遂荣教授鉴定为膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge A)。经 95% 医用酒精反复回流提取 4 次, 放置, 过滤, 滤液浓缩后, 用蒸馏水饱和的正丁醇萃取, 减压浓缩正丁醇萃取部分得黄芪总皂苷提取物^[6]。将用乙醇提取过的黄芪残渣干燥, 用蒸馏水提取, 浓缩, 加乙醇使浓度为 80%, 静置, 倾出上清液, 沉淀加水溶解, 离心除去不溶物, 溶液再加乙醇至浓度为 70%, 滤出沉淀物, 加水溶解后加活性炭脱色, 然后加乙醇沉淀, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤, 低温干燥, 备用^[7]。黄芪总黄酮类似物的提取基本上按照侯云德等的方法^[4]即将黄芪水煎液经水提醇沉法处理后, 水溶液过聚酰胺柱, 留柱物用乙醇洗至基本无色, 洗脱物减压浓缩, 室温放置干燥^[4]得黄芪总黄酮提取物。用含 10% DMSO (二甲基亚砷) 的 PBS 配制浓度依次为 79.7 μg/ml, 1515.67 μg/ml, 430.25 μg/ml 的黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮母液, G6 漏斗抽滤、分装、待用。

1.1.2 阿昔洛韦 (ACV) 批号为 980751-3 (丽珠集团湖北科益药业有限公司)。

1.1.3 细胞与病毒 Hep-2 细胞购自武汉大学细胞保藏中心, HSV-1 HS-1 株及 HSV-2 333 株由本所保存。按本所

常规培养细胞、繁殖病毒。HSV-1 HS-1 株及 HSV-2 333 株 TCID₅₀ 分别为 10^{-9} /ml, 10^{-9} /ml。

1.2 方法

1.2.1 空斑减数实验 本研究所有抗 HSV 实验均以 ACV 为阳性对照, 设置正常细胞对照以及单用病毒感染实验时加入等体积含 10% DMSO 的 PBS 的阴性对照组。实验以 3 种方式进行。①药物对 HSV 的直接杀灭: 病毒悬液与含药培养液 37℃ 孵 1h 后, 感染细胞。②药物对 HSV 感染细胞的阻断作用: 以含药培养液预先与细胞孵 2h, 再以 HSV 感染细胞。③药物对 HSV 增殖的抑制: 先感染 HSV, 再以含药培养液孵育。所用感染复数均为每个细胞 1 个空斑形成单位 (Plaque forming unit, Pfu)。经过上述处理的细胞加入细胞维持液 (含 0.5% 羧甲基纤维素), 观察 48h, 用 10% 甲醛固定, 0.5% 结晶紫染色, 计算空斑。空斑减数率 = (病毒对照组空斑数 - 药物处理组空斑数) / (病毒对照组空斑数) × 100%。

1.2.2 药物对 HSV 所致细胞病变 cpe 的抑制作用 本实验也以上述 3 种方式进行。经过直接杀灭处理的病毒悬液按对数比例稀释 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 倍, 每一稀释度接种 4 小瓶细胞, 培养 48h 后判定病毒滴度。而第 2 及第 3 种方式则是在细胞接受抗病毒处理后, 孵育 24h, 弃维持液, 加入 1.0 ml PBS, 冻融 3 次后, 再检测病毒滴度。

1.2.3 细胞毒性实验 长成单层的 Hep-2 细胞加入含药培养液孵育达 72h 后, 以台盼蓝拒染法计数死活细胞数。

1.3 结果的统计学处理

1.3.1 药效的 ED₅₀ 及细胞毒 IC₅₀ 的计算采用加权直线回归法。

1.3.2 中药提取物抗 HSV 的量 - 效关系用 Chou 和 Talalay 导出的中效方程式^[8]: $f_a/f_u = (D/D_m)^m$, 上式中 f_a 和 f_u 各代表系统中反应及未反应部分, D 是剂量, D_m 是产生中效作用的剂量 (即 ED₅₀)。如果上式的两边采用对数, 则可用统计学上直线回归的方法作出中效作用图, 分析药物剂量及空斑减数率之间的量 - 效关系。

2 结果

2.1 黄芪多种成分对 HSV-2 333 株所致细胞病变 cpe 的抑制作用 表 1 的结果表明: (1) 黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮提取物对 HSV-2 333 株有明显的直接杀灭、阻断感染、抑制增殖作用, 传染性病毒滴度的降低取决于总皂苷、总多糖、总黄酮类似物的浓度增加并与之成反比, 而且药效比 ACV 强。(2) 对于黄芪的三种基本成分而言, 在直接杀灭、感染阻断、增殖抑制三种抗病毒实验中, 5.6 μg/ml, 6.0 μg/ml, 7.2 μg/ml 总皂苷使 HSV-2 滴度降低了 9 log₁₀, 而 15.0 μg/ml, 18.0 μg/ml, 23.0 μg/ml 黄芪总多糖及 10.4 μg/ml, 10.4 μg/ml, 10.

4ug/ ml 黄芪总黄酮才具有相同的作用 ,说明黄芪总皂苷是黄芪抗 HSV 的主要成分 ,对 HSV - 1 HS - 1 株感染豚鼠皮肤动物实验的结果也证实了这一点(载于其它文章中) 。

表 1 黄芪多种成分对 HSV - 2 333 株 cpe 的抑制作用

成 分		用量 * 及病毒滴度降低(以 log10 为单位表示)											
直接杀灭													
ACV	2	4	6	8	10	15	20	30	40	50	60	* *	
	1	1	1	2	4	4	4	5	7	9	9	#	
总皂苷	0.8	1.6	2.4	3.2	4.8	5.6							
	1	2	5	7	8	9							
总多糖	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0								
	1	2	4	8	9								
总黄酮	2.4	4.0	5.6	7.2	8.8	10.4							
	1	2	3	4	7	9							
感染阻断													
ACV	2	4	6	8	10	12	15	20	25	30			
	0	0	1	4	4	6	6	7	9	9			
总皂苷	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0	5.6	6.0						
	2	3	5	6	7	8	9						
总多糖	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0	18.0	20.0						
	1	2	3	5	7	9	9						
总黄酮	2.4	4.0	5.6	7.2	8.8	10.4							
	1	2	3	4	7	9							
增殖抑制													
ACV	4	6	8	10	12	20	30	40	50	60			
	0	1	1	2	2	2	6	6	8	9			
总皂苷	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0	4.8	5.6	6.4	7.2				
	1	1	3	6	6	6	7	9	9				
总多糖	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0	18.0	23.0						
	1	2	3	4	7	8	9						
总黄酮	2.4	4.0	5.6	7.2	8.8	10.4							
	1	2	4	5	7	9							

* 每种成分用量单位为 ug/ ml。
* * 表中每项上排数值代表相对应成分的用量。
表中每项下排数值代表 HSV - 2 333 株滴度降低 ,单位为 log10。

2.2 黄芪多种成分抗 HSV 空斑减数实验的量 - 效关系：

从表 2 和表 3 的资料可以得出以下结果 : (1) 黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮对 HSV - 1 HS - 1 株、HSV - 2 333 株具有直接杀灭、感染阻断及增殖抑制作用 ,随着这三种成分剂量的增加 ,HSV - 1、HSV - 2 空斑减数率也随之增加 ,并与这三种成分剂量的增加成正比。而且这三种成分抗 HSV 的 ED50 及 ED90 均比 ACV 小 ,说明其药效比 ACV 好。 (2) 在三种成分抗 HSV - 1 的作用中 ,总皂苷的 ED50 最小 ,ED90 与总黄酮相近 ;在抗 HSV - 2 的作用中 ,总皂苷的 ED50 及 ED90 均最小 ,说明在黄芪抗 HSV 的作用中 ,主要抗病毒成分 是总皂苷。

表 4 及表 5 分别列举了 ACV、黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮抗 HSV - 1 HS - 1 株及 HSV - 2 333 株的中效方程参数 ,指出药物的剂量对数与空斑减数率对数具有正相关关系 ,相关系数 P 值均小于 0.0005 ,具有统计学上的显著性 ,肯定了 ACV 及黄芪以上三种成分抗 HSV 的量效关系。

表 2 黄芪多种成分抗 HSV - 1 HS - 1 株空斑减数实验的结果：

成分用量 (ug/ ml)	空斑减数率(%)					
	20	40	50	60	80	90
ACV	25.74*	29.20	30.83	32.56	36.90	40.58
	5.14*	11.39	16.04	22.60	50.13	90.95
	5.88*	13.86	20.04	28.97	68.25	129.5
黄芪总皂苷	0.40	1.09	1.68	2.59	7.06	14.96
	0.38	1.09	1.72	2.71	7.79	17.16
	0.68	1.42	1.95	2.67	5.58	9.66
黄芪总多糖	1.90	2.77	4.03	9.64	18.51	23.61
	3.80	4.50	5.33	7.92	10.40	11.55
	2.21	3.29	4.90	12.34	24.61	29.88
黄芪总黄酮	2.70	4.13	4.95	5.94	9.06	12.43
	0.94	1.99	2.75	3.79	8.02	14.05
	1.60	2.76	3.49	4.42	7.61	11.44

* 注 :表中第一排数值是直接杀灭实验的 ED20 ~ ED90 ;中排数值是感染阻断实验的 ED20 ~ ED90 ;下排数值是增殖抑制实验的 ED20 ~ ED90 数值。

表 3 黄芪多种成分抗 HSV - 2 333 株空斑减数实验的结果：

成分用量 (ug/ ml)	空斑减数率(%)					
	20	40	50	60	80	90
ACV	6.32*	12.33	16.45	21.95	42.85	70.68
	8.31*	14.57	18.62	23.74	41.76	63.68
	4.28*	8.20	10.85	14.40	27.56	44.86
黄芪总皂苷	0.58	1.25	1.73	2.41	5.17	9.15
	1.40	2.22	2.70	3.40	5.23	7.38
	1.39	2.21	2.74	3.36	5.41	7.73
黄芪总多糖	2.65	4.72	6.04	7.73	13.70	21.03
	2.62	3.77	5.43	12.67	23.82	28.38
	4.59	5.87	7.50	13.22	20.30	22.88
黄芪总黄酮	1.84	2.92	3.56	4.35	6.91	9.77
	2.02	3.21	3.93	4.80	7.68	10.86
	4.29	5.59	6.27	7.03	9.16	11.18

* 注 :数值排列的解释见表 1。
表 4 黄芪多种成分抗 HSV - 1 HS - 1 株的中效方程参数：

成分	中效方程参数			
	M(斜率)	Dm(ED50 ,ug/ ml)	Y 轴截距	相关系数(自由度)
ACV	0.63*	30.83	- 0.14	0.98(4) * *
	0.57*	16.04	- 0.18	0.99(10)
	0.56*	20.04	- 0.23	0.98(5)
黄芪总皂苷	0.97	1.68	- 0.001	0.99(8)
	0.92	1.72	- 0.002	0.99(8)
	1.48	1.95	0.040	0.99(8)
黄芪总多糖	1.21	4.03	- 0.130	0.96(8)
	2.66	5.33	- 0.020	1.00(4)
	0.98	4.90	- 0.006	0.97(8)
黄芪总黄酮	2.32	4.95	- 0.0006	0.99(8)
	1.98	2.75	- 0.3000	0.98(8)
	1.90	3.49	- 0.0450	0.99(8)

注 :表中第一排数值是直接杀灭实验的中效方程参数 ;中排数值是感染阻断实验的中效方程参数 ;下排数值是增殖抑制实验的中效方程参数。* * 表中所有的 P 值均小于 0.0005。

表 5 黄芪多种成分抗 HSV - 2 333 株的中效方程参数：

成分	中效方程参数			
	M(斜率)	Dm(ED50, ug/ ml)	Y 轴截距	相关系数(自由度)
ACV	0.58 [*]	16.45	- 0.21	0.98(7) [*]
	0.76 [*]	18.62	- 0.48	0.99(7)
	0.69 [*]	10.85	- 0.20	0.99(8)
黄芪总皂苷	1.28	1.73	- 0.003	0.99(5)
	1.91	2.71	0.066	0.98(5)
	1.95	2.74	0.074	0.98(5)
黄芪总多糖	1.69	6.04	- 0.004	0.99(7)
	1.24	5.43	- 0.055	0.98(7)
	1.72	7.50	- 0.102	0.92(7)
黄芪总黄酮	2.32	3.56	- 0.113	0.97(7)
	2.35	3.93	- 0.137	0.97(7)
	2.38	6.27	- 1.470	0.98(7)

^{*}注:表中的数值排列同表 3。另外所有的 P 值均小于 0.0005。

2.3 黄芪多种成分对 Hep - 2 细胞的细胞毒作用: ACV 对 Hep - 2 细胞的细胞毒 IC50 为 1085ug/ ml。黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮对 Hep - 2 细胞的细胞毒 IC50 依次分别为 259.9ug/ ml,1452ug/ ml,161.4ug/ ml。

3 讨论

通过对黄芪三种成分抗 HSV 药效的比较,我们发现总皂苷抗 HSV - 1 HS - 1 株药效稍比总黄酮好,抗 HSV - 2 333 株药效最好,说明总皂苷是黄芪抗 HSV 的主要成分。但是,三种成分抗 HSV 药效均比 ACV 好。用 HSV - 1 HS - 1 株感染豚鼠皮肤的动物实验得到了一致的结果(载于其他文章)。侯云德等^[4]早期对黄芪抗 VZV、Sindbis、流感病毒等的作用进行了研究,发现黄芪抗这些病毒的活性主要存在于黄酮及皂苷部分,与我们的结果是一致的。

治疗指数(Treatment Index, TI) = IC50/ ED50。如果按照直接杀灭、感染阻断、增殖抑制的顺序排列,ACV 对 HSV

- 1 HS - 1 株的 TIs 为 35,67,54;对 HSV - 2 333 株的 TIs 为 65,100,58。黄芪总皂苷对 HSV - 1 HS - 1 株的 TIs 为 155,151,133;对 HSV - 2 333 株的 TIs 为 150,96,95。黄芪总多糖对 HSV - 1 HS - 1 株的 TIs 为 360,272,296;对 HSV - 2 333 株的 TIs 为 240,267,194。黄芪总黄酮对 HSV - 1 HS - 1 株的 TIs 为 33,59,46;对 HSV - 2 333 株的 TIs 为 45,41,26。优于 ACV 或与 ACV 相近,是值得开发利用的。

参考文献

- 1 MartinczCM, Luks- GalgerDB. Cidofovir use in acyclovir-resistant herpes infection. *Ann Pharmacother*,1997,31(12):1519.
- 2 StransSE, Kost RG, Mckenzie, *et al*. Immunotherapy of recurrent genital herpes recombinant herpes simplex virus type-2 glycoproteins D and B: results of placebo controlled vaccine trial. *J Infect Dis*,1997,176(5):1129.
- 3 SkinnerGR, Turck ME, BensonCA, *et al*. The efficacy and safety of skinner herpes simplex vaccine towards modulation of herpes genitalis: report of a prospective double-blind placebo controlled trial. *Med Microbiol Immunol*,1997,186(1):31.
- 4 侯云德,宋代军,傅丰永. 黄芪某些生物活性的有效部分的研究. *中西医结合杂志*,1984,4(7):420.
- 5 钱止维,毛淑娟,李玉英等. 黄芪与干扰素治疗宫颈糜烂及抗病毒的协同作用. *中西医结合杂志*,1987,7(5):268.
- 6 余灏,杨胜华. 黄芪皂苷分析方法研究近况. *华西药科学杂志*,1993,8(3):163.
- 7 倪艳,李先荣,李惠娟. 黄芪多糖冲剂的试制. *中成药*,1992,14(2):6.
- 8 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗. 第 2 版,北京:北京医科大学中国医科大学联合出版社,1994:315.