

黄芪多种成分对豚鼠皮肤 I 型人疱疹病毒感染的治疗作用

王志洁¹, 黄铁牛² (1. 武汉大学医学院, 湖北 武汉 430071; 2. 中南财经政法大学, 湖北 武汉 430064)

摘要:目的 以阿昔洛韦(acyclovir, ACV)为阳性对照, PBS 以及含 10 %二甲亚砜(DMSO)的 PBS 为阴性对照, 观察了黄芪三种成分在活体中的抗人疱疹病毒 I 型作用。方法 用 HSV-1 HS-1 株感染豚鼠皮肤的动物模型, 观察了黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮抗 HSV-1 药效。结果 临床观察结果表明: ACV, 黄芪总皂苷, 总多糖, 总黄酮处理皮区的累积计分依次为(14.20 ± 6.70); (12.94 ± 3.01); (12.75 ± 3.58); (15.13 ± 5.76); ACV, 黄芪总皂苷, 总多糖, 总黄酮处理皮区的痊愈天数分别为(7.70 ± 1.08); (7.60 ± 2.10); (8.50 ± 0.50); (8.00 ± 0.79), 与 PBS 及含 10 %DMSO 的 PBS 处理皮区有明显差异, 并具有统计学意义。HSV-1 HS-1 株感染过程中各处理皮区的大体照片及皮肤样本的病理滴度检测得到了一致的结果。结论 配对 T 检验的结果表明, 与黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮处理皮区的累积计分、痊愈天数与 ACV 阳性对照组无显著差异。病毒滴度检测结果也如此。说明黄芪三种成分与 ACV 药效相近, 值得开发利用。

关键词:黄芪总皂苷; 黄芪总多糖; 黄芪总黄酮; 豚鼠; 人疱疹病毒

中图分类号: R285.5; R512.92

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2003)06-0452-04

基金项目: 由湖北省自然科学基金资助项目。编号: 980J78

The therapeutic effects on human simplex virus cutaneous infection of guinea pigs of various components in the root of *Astragalus membranaceus*

WANG Zhi-jie¹, HUANG Tie-niu² (1. Virus Research Institute, College of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Zhongnan University of Economic and Law, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antiherpes effects of three components from *Astragalus membranaceus* on human simplex virus type-1. **METHOD** Guinea pigs infected with cutaneous herpes virus were applied to study the effects of total saponins, total polysaccharids, total flavonoids from *Astragalus membranaceus*. Acyclovir (ACV) was used as positive control, while PBS and PBS containing 10 % DMSO were used as negative controls. **RESULTS** The cumulative scores of the regions dealt with ACV, total saponins, total polysaccharids, total flavonoids were (14.20 ± 6.70) , (12.94 ± 3.01) , (12.75 ± 3.58) and (15.13 ± 5.76) respectively. The healing days of the regions treated with ACV, total saponins, total polysaccharids, total flavonoids were (7.70 ± 1.08) , (7.60 ± 2.10) , (8.50 ± 0.50) and (8.00 ± 0.79) , respectively, which had significantly difference with those of the negative controls. The same results were obtained from the pictures and measurements of virus titers of skin samples of each treatment region. The cumulative scores and healing days of total saponins, total polysaccharids, total flavonoids had no markedly difference with those of ACV. **CONCLUSION** The effects of three components studied in the present paper are close to that of ACV.

KEY WORDS: total saponins of *Astragalus membranaceus*; total polysaccharides of *Astragalus membranaceus*; total flavonoids of *Astragalus membranaceus*; guinea pigs; human simplex virus type-1

I 型人疱疹病毒可引起唇疱疹、疱疹性角膜结膜炎、新生儿脑炎等多种疾病。阿昔洛韦 (acyclovir, ACV) 对小鼠脉络膜视网膜炎^[1]及疱疹性角膜结膜炎^[2]有显著疗效,也可抑制无毛小鼠皮下 HSV-1 KOS 株感染^[3]。但是在治疗人类感染时易产生 ACV 耐药株^[4]。新药 Cidofovir 在治疗患 HSV 感染而对 ACV 无反应的 AIDS 患者效果较好^[4],但有很大的肾毒性^[5]。筛选研制新的抗病毒药是重要的。

黄芪是豆科黄芪属植物膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge A) 和内蒙古黄芪的根,具有广谱的抗病毒作用。我们早期的研究表明,黄芪总皂苷^[6]、总多糖^[7]、总黄酮这三种成分^[8]对 HSV-1 HS-1 株和 HSV-2 333 株有明显的抑制作用。为了观察黄芪以上三种成分在活体中对 HSV-1 HS-1 株感染的抑制作用,我们利用豚鼠皮肤 HSV-1 感染的动物模型进行了观察,现将实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 中药 由武汉大学医学院中南医院中药房提供,由中南医院中医科鲁遂荣教授鉴定。经无水乙醇反复回流提取 4 次,放置,过滤,滤液减压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药渣干燥、浓缩,加乙醇使乙醇浓度为 80 %,静置,倾出上清液,沉淀加水溶解,离心除去不溶物,溶液再加乙醇使乙醇浓度为 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]。黄芪总黄酮的提取基本上按照侯云德等^[9]的方法。即将黄芪水煎液经乙醇抽提后,水相溶液过聚酰胺柱,留柱物用乙醇洗至基本无色,洗脱液减压浓缩,室温放置干燥得黄芪总黄酮提取物。这些提取物的基本化学性质证明它们的确是黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮提取物^[8]。

用含 10 %二甲亚砜 (DMSO) 的 PBS 配制黄芪总皂苷浓度为 $515 \mu\text{g}/\text{mL}$,总多糖为 $11.60 \text{ mg}/\text{mL}$,总黄酮为 $766.4 \mu\text{g}/\text{mL}$,母液待用。

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),用 PBS 配制成 $4.1 \text{ mg}/\text{mL}$ 用于动物实验。

1.1.3 细胞与病毒 Hep-2 细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心,Vero 细胞及 HSV-1 HS-1 株由本室保存。按常规方法培养细胞,繁殖病毒,HSV-1 HS-1 株半数组织培养感染剂量 (Median tissue culture infection dose, TCID₅₀) 为 $10^{-9}/0.1 \text{ mL}$ 。

1.1.4 动物:Dunkin Hartley 白毛豚鼠,重 300 ~ 350 g,购自卫生部武汉生物制品研究所。本实验均用雄性豚鼠,每天喂 3 次青菜及饲料,水随意饮用。

1.2 方法

1.2.1 病毒接种方法 在戊巴比妥钠麻醉下,将豚鼠背部按常规方法脱毛,清洁,消毒,用标记笔把豚鼠背部脱去皮毛部分分成六个皮区。在每个皮区的中心皮内注射 10^{-6} pfu/0.1 mL HSV-1 HS-1 株病毒 (plaque forming unit, Pfu 指空斑形成单位)。在麻醉后的睡眠中,动物保存在 30 °C 2h,方法基本上同 S Alenius 和 B Oberg^[10]。

1.2.2 动物分组 实验共用 18 只豚鼠,分为两组。对照组 9 只,黄芪组 9 只。对照组 2 个皮区涂 ACV,1 个皮区用金银花,3 个皮区涂 PBS。黄芪组 3 个皮区涂含 10 % DMSO 的 PBS,另外 3 个皮区涂黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮。

1.2.3 治疗方法 在豚鼠接种 HSV-1 HS-1 株后 24h 开始治疗。本实验以 ACV 为阳性对照,ACV 的溶剂对照为 PBS。本实验的阴性对照为含 10 % DMSO 的 PBS。对照组每只动物背部一侧的 2 个皮区用 ACV,一个皮区用金银花 (因篇幅所限,见于其他文章);另外 3 个皮区用 PBS。黄芪组每只动

物背部一侧 3 个皮区涂加入 10 %DMSO 的 PBS,另一侧 3 个皮区依次涂黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮。用微量加样器加 30 μ L ACV、PBS、金银花、含 10 %DMSO 的 PBS、黄芪的总皂苷、总多糖、总黄酮于各自对应的皮区上,涂抹感染部位,等药物干燥为止。每天抹药两次,共用药 5d。

1.2.4 病变的记分系统 为了定量药物的作用,按 S Ale-nius 和 B Oberg 的方法^[10]确立了一个记分系统,见于表 1。在给豚鼠接种 HSV-1 HS-1 株后,接种的区域每天按症状记分 1 次。疱疹发生时的记分以阿拉伯数字显示,当疱疹开始干并结痂时,记分改用罗马数字。所有记分均双盲地进行,将感染过程中所有的阿拉伯及罗马记分数字加在一起得到累积的记分。每天用脱毛剂脱毛以利于记分,未发现脱毛对病变有作用。

表 1 豚鼠 HSV 感染的记分系统^[10]

接种皮肤的外表	记分
发红,轻度水肿	0.5
发红,1~2 个小疱疹	1.0
发红,无数小疱疹	2.0
无数大疱疹,如果紧密相连,合成一片	3.0
疱疹干,有大痂	III
痂壳掉 50 %	II
剩 10 %的痂壳	I
未感染或痊愈区,无壳或疱疹接种的创伤,存在非常低剂量的 TCID ₅₀	0

表 2 豚鼠感染皮区的累积积分和痊愈天数

Tab 2 Cumulative score and healing day of infection region in quinea pig

药物	投用不同药物皮区数	累积积分均数 $\bar{x} \pm s$	P 值	投用不同药物皮区数	痊愈天数均数 $\bar{x} \pm s$	P 值
ACV	13	14.20 $\pm$ 6.70	<0.001	15	7.70 $\pm$ 1.08	<0.001
PBS	20	45.79 $\pm$ 1.97		15	12.40 $\pm$ 0.51	
总皂苷	7	12.94 $\pm$ 3.01	<0.001	5	7.60 $\pm$ 2.10	<0.001
总多糖	7	12.75 $\pm$ 3.58	<0.001	5	8.50 $\pm$ 0.50	<0.001
总黄酮	7	15.13 $\pm$ 5.76	<0.001	5	8.00 $\pm$ 0.79	<0.001
含 10 %DMSO 的 PBS20		51.95 $\pm$ 22.97		15	12.16 $\pm$ 0.92	

2.2 黄芪多种成分治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的大体照片结果:①涂 PBS、ACV、含 10 %DMSO 的 PBS、总多糖、总皂苷、总黄酮的皮区,都感染了 HSV-1 HS-1 株,长了疱疹,从第 3 天到第 7 天,有一个病变发展的过程,以第 7 天的病变最厉害,与皮肤样本病毒滴度的检测相比较,对照皮区第 3~7 天的平均病毒滴度从 8.5log 10 - 10log10 是一致的。②涂 ACV 的皮区与涂 PBS 的皮区,尤其是涂 ACV 与涂 PBS 第 7 天的皮区相比较,虽然第 3 天,第 5 天皮肤病变的差异不明显,但第 6 天,第 7 天涂 PBS 的皮区病变加重时,涂 ACV 皮区病变逐渐减轻,第 8 天,第 9 天,这种差异就更明显了,可以看出涂抹 ACV 对 HSV-1 感染有明显的治疗作用。涂总皂苷、总多糖、总黄酮的皮区与涂含 10 %DMSO 的 PBS 的皮区相比

1.2.5 感染过程中豚鼠各皮区 HSV-1 HS-1 株滴度的检测

在接种 HSV-1 HS-1 后的第 3、5、6、7、12、14 天取豚鼠皮肤进行 HSV-1 HS-1 株滴度的检测,以观察 HSV-1 感染的豚鼠皮肤不同时间的病毒滴度。先以含 10 000u(μ g)/mL 的青(链)霉素的培养液 1 mL,浸泡 5 mm² 的豚鼠皮肤样本 4℃过夜,次晨加 1 mL 生理盐水,剪碎后用玻璃匀浆器研磨成匀浆,以 3500r/min 离心 5 min 除去组织碎片,把上清液接种到 10 mL 小方瓶的 Vero 细胞上,吸附 1 h,加维持液。待 48 h 后 Vero 细胞病变达 75 %~80 %时,冻融 3 次,将 0.1 mL 病毒悬液作 10⁻¹~10⁻¹⁰ 稀释后,检测病毒的半数组织培养感染剂量 TCID₅₀。

1.2.6 结果的统计学处理 根据标准方法作配对 t 检验,以比较病变的痊愈时间及累积记分的统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多种成分对豚鼠皮肤 HSV-1 HS-1 株感染的治疗作用:

从表 2 可见:①涂抹 ACV 与 PBS 的皮区相比,涂抹黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮与涂抹含 10 %DMSO 的 PBS 的皮区相比,不论是累积积分,还是痊愈天数,P 值均具有统计学意义,提示 ACV 及黄芪总皂苷对豚鼠皮肤的 HSV-1 感染具有治疗作用。②把黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮的累积积分与痊愈天数加以比较,可发现 3 种成分的治疗效果相近。

较,尽管第 3 天、第 5 天皮肤病变的差异不明显,但是到第 6 天、第 7 天涂含 10 %DMSO 的 PBS 的皮区病变加重时,涂总皂苷、总多糖、总黄酮的皮区病变已减轻,到第 8 天、第 9 天这种差异就更明显了,可以看出黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮对豚鼠皮肤 HSV-1 感染具有显著的治疗作用,与病毒滴度的检测结果是一致的。③涂 ACV 与涂总皂苷、总多糖、总黄酮的皮区相比较,ACV 与以上黄芪三种成分对 HSV-1 感染的治疗作用相似,与临床观察的结果是一致的。(第几天,是指接种病毒后的天数)。

2.3 黄芪多种成分治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染过程中病毒滴度的检测

表 3 豚鼠皮肤 HSV-1 感染的病毒滴度

Tab 3 Virus titers of quinea pigs' skin infected with HSV-1

样本	接种后 3~14 d 的 HSV-1 病毒滴度(d)					
	3	5	6	7	12	14
对照	8.5log10(11) *	10log10(10)	10log10(12)	10log10(5)	5log10(4)	2.8log10(6)
ACV 皮区	6.0log10(5)	3.4log10(4)	3.5log10(4)	3.6log10(3)	0(2)	0(6)
总皂苷皮区	5.3log10(3)	4.0log10(2)	4.0log10(3)	1.0log10(2)	0(2)	0(3)
总多糖皮区	5.0log10(2)	5.0log10(3)	4.6log10(3)	1.0log10(2)	0(2)	0(2)
总黄酮皮区	3.5log10(2)	4.0log10(2)	2.6log10(2)	1.0log10(2)	0(2)	0(2)

注：* 括号内是指检测病毒滴度的样本数。病毒滴度 8.5log10 指样本的平均 TCID₅₀ 为 10^{-8.5}/0.1 mL。

从表 3 可见：①在 ACV 及黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮处理的皮区，肉眼观察痊愈的天数，豚鼠皮肤尚分别有 10^{-3.6}/0.1 mL、10⁻¹/0.1 mL 的 HSV-1 HS-1 株存在，7d 后的确是痊愈了。②对照组在第 12 天及第 14 天其皮区 HSV-1 HS-1 株滴度分别为 10⁻⁵/0.1 mL 及 10^{-2.8}/0.1 mL，S Alenius 和 B Oberg^[10]的豚鼠模型对照组皮区到第 12 天痊愈，与我们的结果是一致的。

3 讨论

我们用 HSV-1 HS-1 株感染豚鼠皮肤的动物模型，观察了黄芪多种成分对豚鼠皮肤 HSV-1 感染的治疗作用。综合上述实验结果，可以得出以下结论：①用配对 T 检测处理 ACV 及黄芪三种成分对照组的累积计分及痊愈天数(表 2)，P 值分别为 < 0.20，> 0.50，说明溶剂对照组对实验结果没有影响。如果把 ACV 处理皮区的累积计分与黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮处理皮区的累积计分分别加以比较，P 值为 > 0.50，> 0.50，> 0.50。把 ACV 处理皮区的痊愈天数与黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮处理皮区的痊愈天数分别加以比较，P 值为 > 0.50，> 0.20，> 0.50。说明从临床观察的结果来看，黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的治疗作用与 ACV 相近。②ACV 及黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的大体照片与临床观察是一致的。③从表 3 结果提示黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的效果与 ACV 相近，与临床观察的结果是一致的。

我们早期的研究表明，黄芪总皂苷^[6]、总多糖^[7]以及总黄酮^[8]对 HSV-1、HSV-2 有明显的抑制作用，与我们在豚鼠皮肤 HSV-1 HS-1 株感染的动物模型中得到的结果是一致的。以上结果表明黄芪总皂苷、总多糖、总黄酮抗 HSV 感染的作用值得开发利用。我们将进一步观察黄芪以上的三种

成分对 HSV-2 感染小鼠阴道炎的抑制作用，这些工作正在进之中。

参考文献

[1] Merchant A, Fletcher J, Medina CA, *et al.* Pharmacomanipulation of HSV-1 induced chorioretinitis in mice[J]. Eye, 1997, 11(4):504.

[2] Hu S, Dutt J, Zhao T, *et al.* Tetradrine polently inhibits herpes simplex virus type-1 induced keratitis in BALB/c mice[J]. Ocul Immunol Inflamm, 1997, 5(3):173.

[3] Bolger GT, Allen T, Garnean M, *et al.* Cutaneously applied acyclovir acts systemically in the treatment of herpetic infection in the hairless mouse[J]. Antiviral Res, 1997, 35(3):157.

[4] Lalezar J, Schacker T, Feinberg J, *et al.* A randomized double-blind placebo controlled trial of Cidofovir gel for the treatment of acyclovir unresponsive mucocutaneous herpes simplex virus infection in patients with AIDS[J]. J Infect Dis, 1997, 176(4):892.

[5] Martinez CM, Luks-Galger DB. Cidofovir use in acyclovir resistant herpes infection[J]. Ann Pharmacother, 1997, 31(12):1519.

[6] 王志洁, 黄铁牛, 刘焱文, 等. 黄芪总皂苷抗 HSV2 的实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 20(5):43.

[7] 王志洁, 黄铁牛, 刘焱文, 等. 黄芪总多糖抗人疱疹病毒的初步实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2002, 25(1):31.

[8] 王志洁, 黄铁牛, 刘焱文, 等. 黄芪多种成分抗人疱疹病毒的初步实验研究[J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(5):356.

[9] 候云德, 宋代军, 傅丰永. 黄芪某些生物学活性的有效部分的研究[J]. 中西医结合杂志, 1984, 4(7):420.

[10] S Alenius and B Oberg. Comparison of the therapeutic effects of five antiviral agents on cutaneous herpes virus infection in guinea pigs[J]. Arch Virology, 1978, 158:277.

收稿日期:2002-05-13