

虎杖多种蒽醌类化合物对豚鼠皮肤 I 型人疱疹病毒感染的治疗作用

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

摘要:目的 虎杖多种蒽醌类化合物在活体中的抗 HSV-1 作用。方法 以阿昔洛韦(ACV)为阳性对照, PBS 以及含 0.1 % 聚山梨酯 80(Tween-80) 的 PBS 为阴性对照, 用 HSV-1 HS-1 株感染豚鼠皮肤的动物模型, 观察虎杖蒽醌类化合物晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 抗 HSV-1 药效。结果 ACV、虎杖晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 处理皮区的累积计分依次为 14.20 ± 0.70 ; 7.00 ± 0.16 ; 7.31 ± 0.16 ; 11.63 ± 0.07 ; 8.50 ± 0.63 ; ACV、虎杖晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 处理皮区的痊愈天数分别为 (7.70 ± 1.08) , (6.30 ± 1.40) , (6.50 ± 1.10) , (8.20 ± 0.67) , (6.80 ± 1.35) d; 与 PBS 及含 0.1 % Tween-80 的 PBS 处理皮区在统计学上具有明显差异。HSV-1 HS-1 株感染过程中各处理皮区的病变的观察及皮肤样本的病毒滴度检测得到了一致的结果。结论 配对 *t* 检验的结果表明: ACV 与虎杖晶 I、晶 II 处理皮区的累积计分及痊愈天数的差异, 以及与虎杖晶 IV 处理皮区的痊愈天数的差异具有统计学意义。这些结果加上病毒滴度检测的结果说明虎杖晶 I、晶 II 比 ACV 药效好, 晶 IV 与 ACV 药效相近, 值得开发利用。

关键词: 虎杖蒽醌类化合物; 豚鼠; I 型人疱疹病毒; 抗病毒

中图分类号: R285.5; R512.92 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)02-0103-04

The therapeutic effects of various anthraquinones in Rhizoma Polygoni Cuspidati on HSV 1 cutaneous infection in guinea pigs

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

ABSTRACT: OBJECTIVE In order to investigate antiherpes effects of various anthraquinones in Rhizoma Polygoni Cuspidati on human simplex virus type-1 *in vivo*. **METHOD** Guinea pigs infected with cutaneous herpes virus were applied to study the effects of crystal I, II, III and IV from Rhizoma Polygoni Cuspidati. Acyclovir (ACV) was used as positive control, while PBS and PBS containing 0.1 % Tween-80 were used as negative controls. **RESULTS** The cumulative scores of the regions dealt with ACV, crystal I, II, III and IV were 14.20 ± 0.70 , 7.00 ± 0.16 , 7.31 ± 0.16 , 11.63 ± 0.07 and 8.50 ± 0.63 , respectively. The healing days of the regions were 7.70 ± 1.08 , 6.30 ± 1.40 , 6.50 ± 1.10 , 8.20 ± 0.67 and 6.80 ± 1.35 , respectively, which had significant 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. **CONCLUSION** The results of Student's *t* test suggested that the cumulative scores and healing days of skin regions dealt with ACV had significant differences in statistics with the cumulative scores and healing days of skin regions dealt with crystal I, II. These results together with the results of mea-

基金项目: 本课题由湖北省自然科学基金资助。

I 型人疱疹病毒可引起唇疱疹、疱疹性角膜结膜炎、新生儿肺炎等多种疾病。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]。然而在治疗人类感染时易产生耐药株^[4]。新药 Cidofovir 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:12 %表现为蛋白尿,5 %尿肌酐增加,而且 15 %的患者有中性粒细胞减少^[5]。筛选研制新的抗病毒药的确是重要而紧迫的任务。

虎杖是蓼科蓼属植物(*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc.)的根茎。国内报道对多种病毒如 HSV-1, HSV-2, 流感病毒, 11 型及 9 型埃可病毒, A9 及 B5 型柯萨奇病毒有抑制作用。我们的早期研究表明虎杖大黄素(即晶 I)对 HSV-1^[6], HSV-2 和 CVB3^[7]有抑制作用,其醋酸乙酯萃取部分对 HSV-1、HSV-2 的抑制作用也很显著^[8]。在这些体外实验的基础之上,我们用 HSV-1 HS-1 株感染豚鼠皮肤的动物模型观察了虎杖的 3 种蒽醌类化合物在活体中抗 HSV-1 感染的作用。现在将实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 中药 虎杖由武汉大学医学院中南医院中药房提供,经中南医院中医科鲁遂荣教授鉴定为虎杖(*Rhizoma polygoni Cuspidati*)。将虎杖用水提醇沉法处理,水液经苯萃取后,萃取液减压浓缩,反复精制,最后用冰醋酸重结晶,得橙红色针晶,称晶 I,进一步的理化性质检测表明晶 I 是大黄素^[7]。经苯萃取后的水相用醋酸乙酯萃取,这时有深棕色沉淀析出,用无水乙醇重结晶得晶 III。回收醋酸乙酯到浸膏,用稀乙醇溶解,放置、过滤,有红棕色沉淀析出,重结晶得晶 IV。将滤液浓缩,室温挥发至干,反复精制,得深棕色结晶,称晶 II。晶 III 难溶于水、醋酸乙酯,能溶于乙醇,不溶于苯,可使 KMnO₄ 液褪色,但遇氨水不显红色。晶 IV 难溶于冷水,能溶于乙醇、醋酸乙酯、丙酮。晶 II 易溶于水,晶 II 和晶 IV 遇氨水显红色,这是蒽醌类化合物特有的 Borntrager 反应,与醋酸镁的甲醇溶液反应显粉红色,故晶 II、晶 IV、晶 I 是蒽醌类化合物。用含 0.1 %聚山梨酯 80(Tween-80)的 PBS 配制浓度分别为 4.0、4.0、4.0、4.2 mg/mL 的晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 母液,在动物实验中外用。

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 mg/mL 的母液待用。

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,Vera 细胞及 HSV-1 HS-1 株由本室保存。按本室常规培养细胞,繁殖病毒,HSV-1 HS-1 株 TCID₅₀为 10⁹/0.1 mL。

1.1.4 动物 Dunkin Hartley 雄性白毛豚鼠,重 300 ~ 350g,购自卫生部武汉生物制品研究所。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,用标记笔把无毛区分成 6 部分。在每个皮区的中心皮内注射 10⁶ pfu/mL 的 20 μL HSV-1 HS-1 株病毒。在麻醉后的睡眠中,动物保存在 30 °C 达 2h,方法基本上同 S Alenius 和 B Oberg^[9]。

1.2.2 动物分组 实验共用豚鼠 18 只,分为两组。对照组 9 只,虎杖组 9 只。对照组每只动物背部 2 个皮区涂 ACV,1 个皮区涂其它药物,3 个皮区涂 PBS。用药组每只动物背部 4 个皮区分别涂虎杖晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV,2 个皮区涂含 0.1 %Tween-80 的 PBS。于接种病毒后的第 3、5、6、7d 留皮肤样本作病毒滴度检测,对痊愈天数的观察每组用 5 只豚鼠。

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,以 PBS 和含 0.1 %Tween-80 的 PBS 为阴性对照。用微量加样器加 30 μL ACV、PBS,含 0.1 % Tween-80 的 PBS、晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 于各自对应的皮区上,涂抹于感染部位,等药物干燥为止。每天抹药 2 次,共用药 5d。

1.2.4 病变的计分系统 为了定量药物的作用,按 S Alenius 和 B Oberg 的方法^[9]确立了一个计分系统,见表 1。

在给豚鼠接种 HSV-1 HS-1 株后,接种的区域每天按症状计分 1 次。疱疹发生时的计分以阿拉伯数字显示,当疱疹开始干并结痂时,计分改为罗马数字。所有计分均双盲地进行,将感染过程中所有的阿拉伯及罗马计分数字加在一起得到累积的计分。每天用脱毛剂脱毛以利于计分,未发现脱毛对病变有作用。

表 1 豚鼠 HSV 感染的计分系统^[9]

接种皮肤外表	计分
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,连成一片	3.0
疱疹干,有大痂	III
痂壳掉了 50 %	II
剩下 10 %的痂壳	I
未感染或痊愈区、无壳或疱疹,接种的创伤、存在痕量的感染	0

1.2.5 感染过程中豚鼠各皮区 HSV-1 HS-1 株病毒滴度的检测 在接种 HSV-1 HS-1 株后的第 3、5、6、7、12、14 天取豚鼠皮肤进行病毒滴度的检测,以观察豚鼠皮肤 HSV 感染的动态变化。用本所成熟的方法进行。即先以含 10 000u(μg)/mL 青(链)霉素的培养液 1 mL,浸泡 5 mm² 大小的豚鼠皮肤样本,4 °C 过夜,次日晨加 1 mL 生理盐水,剪碎后用玻璃匀浆器研磨均匀浆,以 3 500 r/min 离心 5 min 除去组织碎片,把上清液接种到 10 mL 小方瓶的 Vera 细胞上吸附 1h,加维持液。等到 Vera 细胞病变达 75 % ~ 80 %时,冻融 3 次后,用本室常规方法检测皮肤样本的病毒滴度。

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以及累积计分的统计学意义。

2 结果

2.1 虎杖蒽醌类化合物对豚鼠皮肤 HSV-1 感染的治疗作用

从表 2 的结果可见: ①涂抹 ACV 与涂抹 PBS 的皮区相比; 涂抹晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 的皮区与涂抹含 0.1 % Tween-80 的皮区相比, 累积积分及痊愈时间($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Total scores and healing time of infection regions of guinea pigs($\bar{x} \pm s$)

药物	投用不同 药物皮区数	累积积分	P 值	投用不同 药物皮区数	痊愈天数/ d	P 值
ACV	13	14.20 ± 6.70	< 0.001	15	7.70 ± 1.08	< 0.001
PBS	20	45.79 ± 21.97		15	12.40 ± 0.51	
晶 I	7	7.00 ± 6.16	< 0.001	5	6.30 ± 1.40	< 0.001
晶 II	7	7.31 ± 6.16	< 0.001	5	6.50 ± 0.10	< 0.001
晶 III	7	11.63 ± 6.07	< 0.001	5	8.20 ± 0.67	< 0.001
晶 IV	7	8.50 ± 4.63	< 0.001	5	6.80 ± 1.35	< 0.001
0.1 % Tween-80 PBS	13	31.63 ± 3.30		10	11.95 ± 0.83	

2.2 虎杖蒽醌类化合物治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的大体观察结果

从豚鼠 HSV-1 感染过程中可以见到, ①涂 PBS、ACV、涂含 0.1 % Tween-80 的 PBS、晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 的皮区的确都感染了 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, 对照皮区的第 3 天到第 7 天的平均病毒滴度从 8.5log10 ~ 10log10 是一致的。然后病变逐步减轻, 与皮肤样本病毒滴度检测的结果是一致的。②涂 ACV 与涂 PBS 的皮区, 涂 ACV 及 PBS 的第 7 天的皮区相比较, 虽然第 3 天、第 5 天病变差异不明显, 但第 6 天、第 7 天涂 PBS 的皮区病变加重时, 涂 ACV 的皮区病变已减轻, 到第 8 天、第 9 天, 差异就更加明显了, 可以看出涂抹 ACV 对 HSV-1 感染有明显

表 3 豚鼠皮肤 HSV-1 感染病毒滴度的检测

Tab 3 The virus titers of the skin HSV-1 infection of guinea pigs

样本	接种后 3 ~ 14 d 的 HSV-1 HS-1 株滴度(d)					
	3	5	6	7	12	14
对照	8.5log10(11) ¹⁾	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)
晶 I 皮区	4.3log10(4)	4.0log10(2)	3.0log10(2)	1.6log10(5)	0(3)	0(3)
晶 II 皮区	3.6log10(3)	3.5log10(2)	3.0log10(2)	1.0log10(3)	0(3)	0(3)
晶 III 皮区	8.0log10(3)	5.0log10(2)	5.0log10(2)	2.0log10(2)	0(3)	0(3)
晶 IV 皮区	7.0log10(3)	6.0log10(2)	4.0log10(2)	1.5log10(2)	0(3)	0(3)

注: 括号内是指进行病毒检测的皮肤样本数。1) 8.5log10 是指所检测的皮肤样本的平均病毒滴度 TCID₅₀ 为 10^{-8.5}/0.1 mL。

Note: in the bracket is the number of skin samples detected virus titers; 1) 8.5 log10 is the average virus titer of skin samples detected.

从表 3 的结果可以得出以下结论: ①在 ACV 及晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 处理的皮区, 肉眼观察痊愈天数, 豚鼠皮肤尚分别有 10^{-3.6}/0.1 mL、10^{-1.6}/0.1 mL、10⁻¹/0.1 mL、10⁻²/0.1 mL、10^{-1.5}/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 ~ 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^[9] 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

80PBS 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 及晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 对豚鼠皮肤的 HSV-1 感染具有治疗作用。②把晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 的累积积分及痊愈天数加以比较, 结果表明属蒽醌类化合物的晶 I、晶 II、晶 IV 的治疗效果比不属蒽醌类化合物的晶 III 好。

的治疗作用。涂晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 的皮区与涂含 0.1 % Tween-80 的 PBS 的皮区相比较, 同样可以发现, 尽管第 3 天、第 5 天病变的差异不明显, 但到第 6 天、第 7 天, 在涂含 0.1 % Tween-80 的 PBS 的皮区病变加重时, 涂晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 的皮区病变已减轻, 到第 8 天、第 9 天, 差异就更加显著了, 同样可以看出晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 对豚鼠皮肤 HSV-1 感染有治疗作用, 与豚鼠皮肤样本病毒滴度检测的结果是一致的。③涂 ACV 与涂晶 I、晶 II 的皮区比较, 晶 I、晶 II 的治疗作用比 ACV 好, 与涂晶 IV 的皮区比较, 与晶 IV 的治疗作用相近。与临床观察的结果是一致的。

2.3 虎杖蒽醌类化合物治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染过程中病毒滴度的检测

我们用 HSV-1 HS-1 株感染的豚鼠皮肤的动物模型, 观察了虎杖多种蒽醌类化合物对豚鼠皮肤 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* 检验, 处理 ACV 及晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 对照组的累积积分及痊愈天数(表 2), P 值分别 > 0.20, > 0.10, 说明溶剂对照组对实验结果没有影响。如果把 ACV 处理皮区的累积积分与晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 处理皮区的累积积分分别加以比较, P 值依次分别为 < 0.001, < 0.001, > 0.25, > 0.10; 把 ACV 处理

皮区的痊愈天数与晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 处理皮区的痊愈天数分别加以比较, P 值分别为 <0.005 , <0.005 , >0.10 , <0.01 。说明从实验观察的结果来看, 晶 I、晶 II 对豚鼠皮肤 HSV-1 感染的治疗作用比 ACV 强, 晶 III 的治疗效果比不上 ACV, 晶 IV 的治疗效果与 ACV 相近。②ACV 及晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV 治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的大体照片与临床观察的结果是一致的。③从表 3 可见, ACV 处理皮区在豚鼠感染 HSV-1 HS-1 株后 3, 5, 6, 7, 12, 14d 的病毒滴度分别是 $6\log_{10}$, $3.4\log_{10}$, $3.5\log_{10}$, $3.6\log_{10}$, $0, 0$ 。晶 I 则为 $4.3\log_{10}$, $4\log_{10}$, $3\log_{10}$, $1.6\log_{10}$, $0, 0$; 晶 II 则为 $3.6\log_{10}$, $3.5\log_{10}$, $3\log_{10}$, $1\log_{10}$, $0, 0$; 晶 III 则为 $8\log_{10}$, $5\log_{10}$, $5\log_{10}$, $2\log_{10}$, $0, 0$; 晶 IV 则为 $7\log_{10}$, $6\log_{10}$, $4\log_{10}$, $1.5\log_{10}$, $0, 0$ 。提示晶 I、晶 II 治疗豚鼠皮肤 HSV-1 感染的效果比 ACV 好, 晶 III 不如 ACV, 晶 IV 与 ACV 相近。与临床观察的结果是一致的。

我们早期研究的结果表明, 虎杖晶 I 对 HSV-1^[6], HSV-2^[7], 晶 IV 对 HSV-1, HSV-2^[8]有明显的抑制作用, 与我们在豚鼠皮肤 HSV-1 感染动物模型中得到的结果是一致的。意外的收获是晶 II 对豚鼠皮肤 HSV-1 感染治疗效果比 ACV 好, 就连在体外实验中对 HSV-1 F 株及 HSV-1 333 株没有明显抑制作用的晶 III 也有一定的治疗效果。这些结果表明晶 I、晶 II 对抗 HSV-1 皮肤感染的作用值得开发利用, 我们将进一步观察虎杖多种蒽醌类化合物对小鼠 HSV-2 阴道炎的抑制作用, 这些工作正在进行之中。

参考文献

[1] Merchant A, Fletcher J, Medina CA, *et al.* Pharmacomai nipulation of

HSV-1 induced chorioretinitis in mice[J]. Eye, 1997, 11(pt4) : 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, Gernean 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, Schaelser T, Feinberg J, *et al.* A randomized doubleblin- placebo controlled trial of Cidofovir for the treatment of acyclovir unre- sponsive mucocutaneous herpes simplex virus infection in potients with AIDS[J]. J Infect Dis, 1997, 176(4) : 892 .
- [5] Martinez CM, Luks- Galger DB. Cidofovir use in acyclovir resistant her- pes infection[J]. Ann Pharmacother, 1997, 31(12) : 1519 .
- [6] 王志洁, 邓培, 方学韞, 等. 虎杖蒽醌类化合物抗疱疹病毒的实验研究[J]. 湖北医科大学学报, 2000, 21(3) : 180 .
- [7] 王志洁. 虎杖大黄素抗 HSV-2、CVB3 病毒的作用初探[J]. 安徽中医学院学报, 1999, 18(3) : 41 .
- [8] 王志洁, 方学韞, 程仲敏. 虎杖乙酸乙酯萃取部分抗人疱疹病毒研究[J]. 中国现代应用药学, 1999, 16(5) : 27 .
- [9] Alemius S, Oberg B. Comparison of the therapeutic effects of five ar- tiviral agents on cutaneous herpes virus infection in guniea pigs[J]. Arch Virology, 1978, 158 : 277 .

收稿日期: 2002-05-13