



# 三白草抗单纯疱疹病毒作用及机制

田蕾<sup>1,2</sup>, 李晓艳<sup>1,2</sup>, 徐云霞<sup>1,2</sup>, 李尔广<sup>1\*</sup>

(1. 南京大学医学院江苏省分子医学重点实验室, 江苏南京 210093;

2. 南京大学生命科学院, 江苏南京 210093)

**[摘要]** 目的:病毒复制需要宿主细胞参与,包括信号通路的激活,本研究以病毒复制所需信号通路为靶点,寻找抑制单纯疱疹病毒(HSV-2)感染的有效药物。方法:观察 HSV-2 感染引起的 Vero 细胞病变效应(CPE),用 MTT 法检测细胞活性,评价三白草水提物冻干粉抗病毒能力;以免疫印迹法检查 HeLa 细胞中三白草水提物对 HSV-2 病毒诱导的信号通路的作用。结果:三白草水提物可以明显抑制 HSV-2 感染引起的 CPE 和病毒复制所需的 NF- $\kappa$ B 通路的活化。水提物(冻干粉)在 0.10, 0.03, 0.01, 0.003 g · L<sup>-1</sup> 时对 HSV-2 平均抑制率分别为 (70.68 ± 3.39)%, (61.74 ± 2.13)%, (39.31 ± 1.10)%, (18.54 ± 3.44)% ; IC<sub>50</sub> 为 (0.023 ± 0.004) g · L<sup>-1</sup>, 而阳性对照阿昔洛韦 100% 抑制浓度为 0.001 g · L<sup>-1</sup> (5.0 × 10<sup>-6</sup> mol · L<sup>-1</sup>); 最佳药物添加时间为感染前 2 h 至感染后 6 h 之间。免疫印迹试验发现三白草水提物可以明显抑制 HSV-2 诱导的 NF- $\kappa$ B 核转移。结论:三白草水提物可以抑制 HSV-2 病毒复制,其机制与抑制病毒复制所需的 NF- $\kappa$ B 通路活化有关。

**[关键词]** 疱疹病毒;三白草;核转录因子- $\kappa$ B

中药三白草系三白草科植物三白草 *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. 的全草,具有清热利尿、解毒消肿的功能,民间用于治疗火淋,虚淋,黄疸以及湿疹等。三白草主要成分包括槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷、金丝桃苷及芸香苷等黄酮类化合物<sup>[1]</sup>。茎、叶均含有可水解鞣质以及小分子木质素(lignans)类化合物。现代药理研究证明其所含金丝桃苷具明显的抗炎作用,而木质素类可以抑制核转录因子 NF- $\kappa$ B<sup>[2]</sup>,表明三白草通过抑制炎症通路活化达到解毒消肿的功效。单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, 简称 HSV)包括 HSV-1 和 HSV-2, 主要引起唇部和生殖器疱疹。HSV 病毒一般寄宿于人体(潜伏感染),当溶胞感染时,病毒复制需要宿主细胞 NF- $\kappa$ B 通路活化及组蛋白乙酰化<sup>[3-6]</sup>。本研究对三白草水提物抑制 HSV-2 病毒复制的作用和机制进行了研究。

## 1 材料和方法

**1.1 药物和试剂** 三白草购自安徽山林药业公司,由南京大学医学院徐云霞助理研究员鉴定。三白草水提物制备:取三白草 0.50 g 置于无菌离心管,加

双蒸馏水 5.0 mL,置 45 °C 水箱浸提,每 15 min 振摇 1 次。2 h 后,样品离心,取上清液,共得三白草水提物 2.0 mL,经 0.22  $\mu$ m 孔径滤膜过滤,冻干。冻干粉(得率为 1.6%)保存于 -80 °C 冰箱,使用时用细胞培养液溶解稀释。样品用同样方法制备 2 批次。商品阿昔洛韦(acyclovir)购自美国 Sigma 公司,重组人 TNF- $\alpha$  购自北京神州义翹公司,核蛋白抽提试剂盒购自碧云天公司(南通)。兔抗人 p65,抗 I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$ -actin 抗体以及 Lamin B 抗体系购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗购自 Sigma 公司。免疫印迹显影试剂 ECL 购自美国热电 Pierce 公司。

**1.2 细胞** 非洲绿猴肾上皮 Vero 细胞、人宫颈上皮 HeLa 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。细胞培养基 DMEM、添加剂以及胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司。细胞于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 水蒸气饱和的细胞培养箱中培养。

**1.3 三白草水提物对 Vero 细胞毒性测定** 于 96 孔板上,每孔接种 1 × 10<sup>3</sup> Vero 细胞(总体积 0.1 mL)。接种次日于孔中加入质量浓度为 0.10, 0.03, 0.01, 0.003 g · L<sup>-1</sup> 的三白草水提物冻干粉,每浓度 3 孔重复,同时设置未处理细胞对照。药物处理 48 h 后,以 MTT 方法检查细胞活性<sup>[7]</sup>,读取吸收度 A<sub>570</sub>,细胞存活率 = A<sub>570药物</sub>/A<sub>570对照</sub> × 100%。加入 0.10 g · L<sup>-1</sup> 三白草水提物的实验组 A<sub>570</sub> 与对照组比

[稿件编号] 20110824011

[通信作者] \* 李尔广,教授,博士生导师, Tel: (025) 83593193, E-mail: nju1910@gmail.com

[作者简介] 田蕾,硕士研究生, E-mail: tianlei51666@163.com



没有明显变化,表明在此浓度内,三白草水提物不影响 Vero 细胞生长。

**1.4 三白草水提物抗 HSV-2 病毒实验** HSV-2 (G)购自美国 ATCC。病毒为本实验室分离保存,使用前病毒滴度(空斑形成单位,PFU)在 Vero 细胞滴定<sup>[8]</sup>。HSV-2 感染引起的细胞病变(CPE)可以通过倒置生物显微镜定性地观察或通过 MTT 方法定量测定。方法如下:将 HSV-2 病毒首先用无血清 DMEM 培养基稀释,然后按 1.0 PFU/细胞感染提前接种的 Vero 细胞,每孔重复 3 次,置细胞培养箱中培养,每天观察细胞病理变化。当未处理对照组呈现明显 CPE 约 12 h 后(感染后约 36 h),用 MTT 法测定细胞活性,读取  $A_{570}$ ,按公式计算抑制效率 =  $(A_{570\text{药物}} - A_{570\text{HSV}}) / (A_{570\text{未处理对照}} - A_{570\text{HSV}}) \times 100\%$ ,阿昔洛韦抑制率为 100%。同一试验中,Vero 细胞可以用三白草水提物按不同剂量或于不同时间(比如感染前 2 h,感染的同时,感染后 2,6,12 h 等)处理以鉴定三白草水提物抗病毒活性,同时设未感染、最高药物剂量和阿昔洛韦阳性对照。

**1.5 三白草水提物抑制 NF- $\kappa$ B 通路实验** 按  $1 \times 10^6$  每孔于试验前 1 d 接种 HeLa 细胞于 6 孔板中,于感染的不同时间向每孔添加  $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三白草水提物或不处理,然后用  $1 \times 10^6$  PFU HSV-2 感染 HeLa 细胞或不处理。细胞于 HSV-2 感染不同时间后用冰冷 PBS 清洗,用碧云天试剂盒抽提核蛋白。蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,孵育一抗、辣根过氧化物酶标记的二抗,特异性蛋白经 ECL 试剂处理,由 Alpha Innotech 成像仪记录。

**1.6 数据处理** 上述试验均重复 3 次以上,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。半数有效浓度( $\text{IC}_{50}$ )采用作图法按 NIH 规则得出(<http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section3.html#determination>)。

## 2 结果

**2.1 三白草水提物对 Vero 细胞毒性作用** 在倒置生物显微镜下,2 个批次的三白草水提物在  $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  未引起 Vero 细胞形态发生明显变化。MTT 方法显示三白草水提物处理和对照组样品  $A_{570}$  在  $(1.05 \pm 0.14)$  波动,进一步表明三白草水提物对 Vero 细胞生长没有明显毒性和抑制作用。

**2.2 三白草水提物对抗 HSV-2 感染作用** 为了检查三白草水提物是否具有抗 HSV-2 感染的能力,Vero 细胞首先于感染前 2 h 用不同浓度的三白草水

提物处理。结果表明,三白草水提物在  $0.10, 0.03, 0.01, 0.003 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对 HSV-2 感染的平均抑制率分别为  $(70.68 \pm 3.39)\%$ ,  $(61.74 \pm 2.13)\%$ ,  $(39.31 \pm 1.10)\%$ ,  $(18.54 \pm 3.44)\%$ ,半数有效浓度( $\text{IC}_{50}$ )为  $(0.023 \pm 0.004) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

HSV-2 感染涉及细胞表面黏附、病毒内吞或膜融合、病毒 DNA 进核和病毒复制和转录等过程。为了检验三白草水提物对抗 HSV-2 的具体过程,Vero 细胞分别在感染前、感染过程和感染后以  $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三白草水提物处理。在病毒感染前或感染后 6 h 内添加三白草水提物,其抑制作用最为明显,12 h 或 24 h 时添加则抑制作用不明显, -2,0,2,6,12,24 h 抑制率分别为  $(70.79 \pm 1.25)\%$ ,  $(69.12 \pm 1.02)\%$ ,  $(68.48 \pm 1.09)\%$ ,  $(69.23 \pm 3.83)\%$ ,  $(36.20 \pm 7.46)\%$ ,  $(17.86 \pm 4.29)\%$ 。另外,由于三白草预处理或感染后 6 h 内添加具有相似的抑制 HSV-2 感染的能力,推测三白草水提物作用于病毒进入细胞后的过程。

**2.3 三白草水提物抑制 HSV-2 感染诱导的 NF- $\kappa$ B 活化作用** HSV-2 感染能够诱导 MAPK 以及 NF- $\kappa$ B,引起基因复制和转录。NF- $\kappa$ B 通路活化还可以为宿主细胞提供抗凋亡能力。抑制 NF- $\kappa$ B 活化可以阻断 HSV-1 和 HSV-2 病毒的复制。为此,以 p65 核转移为标志,检查了 HSV-2 感染过程中 NF- $\kappa$ B 的活化以及三白草水提物对病毒诱导的 NF- $\kappa$ B 活化的影响。因为 p65 蛋白一般与特异抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  结合,位于胞浆。当细胞受到激活时,I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白降解,导致 p65 释放和核转移。HSV-2 感染后 6,12,24 h 引起 p65 明显核转移(图 1)。三白草水提物处理能够明显降低 HSV-2 感染诱导的 p65 核转移情况,表明三白草水提物具有抑制 HSV-2 诱导的 NF- $\kappa$ B 活化的能力。为了进一步验证这一现象,检查了三白草水提物是否具有阻断常用 NF- $\kappa$ B 通路激活剂 TNF- $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  降解的作用。三白草水提物预处理细胞可以明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 I $\kappa$ B $\alpha$  降解,表明三白草水提物具有通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路活化阻断单纯疱疹病毒复制的能力(图 2)。

## 3 讨论

常用中草药三白草以及鱼腥草均属于三白草科植物。中国有 3 属 4 种该科植物,包括中国特产裸蒴属植物 2 种以及三白草属三白草及蕺菜属鱼腥草各 1 种。三白草具有清热、解毒、消肿的功能,民间

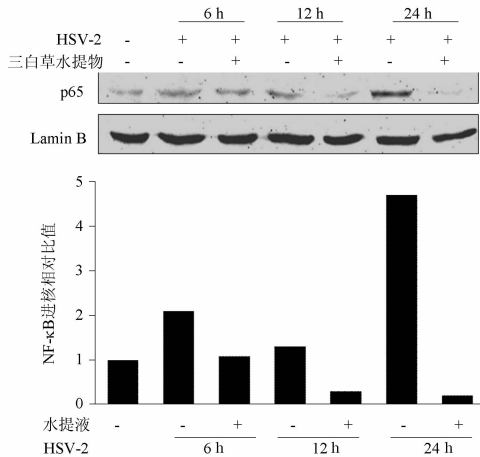


图 1 三白草水提物对 p65/NF-κB 蛋白进核的影响  
Fig. 1 AESC inhibits p65/NF-κB nuclear translocation

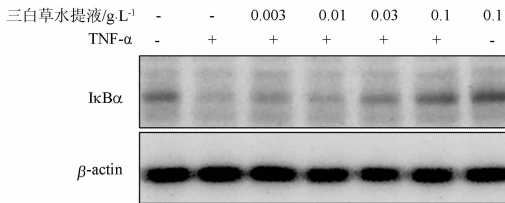


图 2 三白草水提物抑制 TNF-α 诱导的 IκBα 降解  
Fig. 2 AESC inhibits TNF-α-induced degradation of IκBα

用于治疗火淋,虚淋,黄疸,湿疹等,其颗粒制剂虽然用于病毒性肝炎,但是少有报道抗病毒作用及机制研究。同科植物鱼腥草煎煮液以及鲜汁具有抗流感病毒、脑心肌炎病毒和疱疹病毒的作用。因此研究了三白草水提物对抗 HSV-2 感染的作用,发现三白草水提物可以明显抑制 HSV-2 复制,其半数抗病毒浓度为(0.023 ± 0.004) g · L<sup>-1</sup>。另外,作者还发现三白草水提物具有抑制病毒复制诱导的 NF-κB 活化的能力。HSV-1 和 HSV-2 病毒基因复制需要 NF-κB 活化<sup>[3,5]</sup>。Amici 以及 Faith 等报道抑制 NF-κB 通路活化可以有效抑制疱疹病毒复制<sup>[9-10]</sup>。所以这些结果显示三白草可能通过抑制 NF-κB 活化而抑制病毒复制。

三白草主要化学成分包括黄酮类化合物以及木脂素类化合物。文献报道黄酮类化合物比如槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷等都具有抗炎和抗疱疹病毒感染的能力<sup>[11-13]</sup>。Hwang 等最近报道三白草木脂素化合物 manassantin A, manassantin B, (-)-甲基 sa-

cerneol 都具有抑制 NF-κB 活化的能力<sup>[2]</sup>。至于这些化合物是否为三白草抗疱疹病毒的活性成分还有待进一步研究。HSV-2 是最常见的性病病原体,引起生殖器疱疹,并能增加 HIV 的传播。这些化合物的鉴定有可能成为以抑制病毒复制所需信号通路为靶点的抗病毒前体化合物。

[参考文献]

[1] 徐礼燊,徐叶周. 三白草中总黄酮及金丝桃甙的库伦滴定[J]. 药学学报,1986,21(4):306.

[2] Hwang B Y, Lee J H, Nam J B, et al. Lignans from *Saururus chinensis* inhibiting the transcription factor NF-κB[J]. Phytochemistry,2003,64(3):765.

[3] Patel A, Hanson J, McLean T I, et al. Herpes simplex virus type 1 induction of persistent NF-κB nuclear translocation increases the efficiency of virus replication[J]. Virology,1998,247(2):212.

[4] Gregory D, Hargett D, Holmes D, et al. Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the IκB kinase-IκB-p65 pathway[J]. J Virol,2004,78(24):13582.

[5] Yedowitz J C, Blaho J A. Herpes simplex virus 2 modulates apoptosis and stimulates NF-κB nuclear translocation during infection in human epithelial HEp-2 cells[J]. Virology,2005,342(2):297.

[6] Hargett D, McLean T, Bachenheimer S L. Herpes simplex virus ICP27 activation of stress kinases JNK and p38[J]. J Virol,2005,79(13):8348.

[7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods,1983,65(1/2):55.

[8] Ejercito P M, Kieff E, Roizman B. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells[J]. J Gen Virol,1968,2(3):357.

[9] Amici C, Belardo G, Rossi A, et al. Activation of IκB kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy[J]. J Biol Chem,2001,276(31):28759.

[10] Faith S A, Sweet T J, Bailey E, et al. Resveratrol suppresses nuclear factor-κB in herpes simplex virus infected cells[J]. Antiviral Res,2006,72(3):242.

[11] Khan M T H, Ather A, Thompson K D, et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses[J]. Antiviral Res,2005,67(2):107.

[12] Lyu S Y, Rhim J Y, Park W B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*[J]. Arch Pharm Res,2005,28(11):1293.

[13] 钟建青,李波,贾琦,等. 天然黄酮类化合物及其衍生物的构效关系研究进展[J]. 药学学报,2011,46(6):622.



## Effect and mechanism of *Saururus chinensis* against herpes dimplex virus

TIAN Lei<sup>1,2</sup>, LI Xiaoyan<sup>1,2</sup>, XU Yunxia<sup>1,2</sup>, LI Erguang<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[**Abstract**] **Objective:** To seek effective drugs inhibiting herpes simplex virus (HSV-2) with the signal pathway required by virus replication as the target spot. **Method:** HSV-2-induced Vero cytopathic effect was observed, and MTT method was adopted to detect cell activity, in order to assess the antiviral capacity of freeze dried powder of aqueous extracts of *Saururus chinensis* (AESC). Western blot was used to check the effect of AESC on signal pathway induced by HSV-2 virus in HeLa cells. **Result:** AESC obviously inhibits the pathway activation of CPE induced by HSV-2 infection and NF- $\kappa$ B required for virus replication. The inhibition ratio of AESC freeze dried powder at 0.10, 0.03, 0.01 and 0.003 g · L<sup>-1</sup> were (70.68 ± 3.39)%, (61.74 ± 2.13)%, (39.31 ± 1.10)% and (18.54 ± 3.44)%, respectively. The IC<sub>50</sub> was determined at (0.023 ± 0.004) g · L<sup>-1</sup>. The inhibition concentration of the positive control acyclovir was 0.001 g · L<sup>-1</sup> (5.0 × 10<sup>-6</sup> mol · L<sup>-1</sup>). The best administration time was from 2 h before infection to 6 h after infection. Western blot also showed that AESC can notably inhibit HSV-2-induced NF- $\kappa$ B nuclear transfer. **Conclusion:** AESC can inhibit HSV-2 virus replication, which is related to the pathway activation of NF- $\kappa$ B required for virus replication.

[**Key words**] herpes simplex virus-2; *Saururus chinensis*; NF- $\kappa$ B

doi:10.4268/cjmm20121129

[责任编辑 张宁宁]