

芒果甙与异芒果甙的抗单纯疱疹病毒作用¹

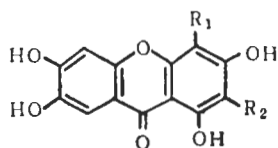
郑民实 (江西医学院微生物学教研室, 南昌 330006)

陆仲毅 (国家医药管理局上海医药工业研究院中药研究室, 上海 200040)

提要 用组织培养法检测芒果甙与异芒果甙的抗单纯疱疹病毒药效。25-250 μg/ml 药物直接或同时作用病毒以及先感染病毒后给药或先给药后感染病毒时, 异芒果甙较无环鸟苷、碘苷与环胞苷的抑制病毒增高 0.27-0.50 个对数, 芒果甙比异芒果甙低 0.53 个对数; 芒果甙和异芒果甙的平均空斑减数率分别为 69.5 及 56.8%。药物阻止病毒在细胞内复制。

关键词 芒果甙; 异芒果甙; 抗病毒剂; 疱疹病毒感染; 培养的细胞; 无环鸟苷(阿并洛韦); 碘苷; 环胞苷

单纯疱疹病毒性角膜炎的发病率日渐增多, 目前虽有几种化学合成药物问世, 但每因毒性或耐药性的产生尚难奏效, 故寻找新的药物实属必要⁽¹⁾。中草药来源广泛, 抗病毒效果已受到重视。我们使用组织培养技术对芒果甙(mangiferin)与异芒果甙(isomangiferin)进行了抗单纯疱疹病毒的作用。异芒果甙系按文献方法(2,3)从龙骨科(Polypodiaceae)植物庐山石韦 *Pyrrhosia sheareri* (Bak.) Ching 和漆树科(Anacardiaceae)植物芒果 (*Mangifera indica* L) 的树叶中分得以及芒果甙亦从芒果树叶提取。



R ₁	R ₂	
H	Glu	Mangiferin
Glu	H	Isomangiferin

Materials and methods

原代人胚肌皮单层细胞 人胚组织采自江西省妇产医院, 取孕妇施行人工流产后胎儿的全身肌肉和皮肤, 用 Hanks 液尽量洗除血液, 剪成 1 mm 左右的小块, 按 1:4-5 倍加

入 0.25% 胰蛋白酶(Difco, 1:250)4℃消化过夜, 再经 Hanks 液洗涤 3 次, 加入生长液(含 10% 小牛血清、Difco 199 培养液与常用抗生素, pH 7.2-7.4)轻轻吹打, 按 50 万细胞/ml 分装于细胞培养瓶内, 33℃ 孵育 4-5 d, 即可长成单层细胞。

病毒株 I 型单纯疱疹病毒(HSV-I)来自卫生部药品生物制品检定所, 毒株编号 0521。取上述细胞传代, 并用同型抗血清进行中和试验经鉴定无误后待用。

药物 芒果甙和异芒果甙系本文作者(陆仲毅)提取受试的单体药物, 有效对照药为碘苷(idoxuridine, 上海信谊药厂), 环胞苷(cyclo-cytidine, 上海第十二制药厂), 无环鸟苷(acyclovir, 阿并洛韦 aciclovir, 湖北省科益制药厂), 上述各药用 Hanks 液或必要时添加聚乙二醇(N_w 400)溶解, 调至 pH 7.0, 经煮沸消毒或过滤除菌后配成 10 倍浓缩剂量(100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10 000 μg/ml)冷存。抗病毒药效测试前先重复 4 次药物对细胞是否产生非特异性细胞病变(CPE), 正式试验浓度应以不出现 CPE 为准。

细胞病变抑制试验

1 药物直接作用于病毒 取上述 7 种浓度药物各 0.1 ml 与 10⁻¹-10⁻⁸ 稀释度的病毒 0.1 ml, 维持液(含 2% 小牛血清, 其余与生长液同) 0.8 ml 先在 33℃ 试管内静置 2 h, 再加入细胞培养瓶内, 经吸附 1 h, 用 Hanks 液洗涤 4 次(每次 1 ml)后, 更换维持液 1 ml 和橡皮塞(下同)。

2 药物在病毒感染同时加入细胞瓶内 按前法将药物与病毒-维持液同时加入细胞瓶内, 33℃ 吸附 3 h, 依上法洗涤、更换维持液和橡皮塞。

1987 年 10 月 8 日收稿 1988 年 8 月 19 日接受

¹国家自然科学基金资助项目 N_w 3860721

3 先感染病毒后给药物 细胞瓶内先感染病毒, 33℃吸附 1 h, 经洗涤后加入药物-维持液和更换橡皮塞。

4 先给药物后感染病毒 细胞瓶内先给药物, 33℃作用 48 h 后弃除药液, 洗涤后感染病毒, 33℃吸附 1 h, 再经洗涤后加入维持液与更换橡皮塞。

上述各实验使用的病毒是将原液按对数比例稀释 10^{-1} – 10^{-8} , 各稀释度接种 6 瓶, 静置于 5° 倾斜的培养架上, 33℃ 孵育 7 d, 隔日观察特异性 CPE, 如细胞肿胀变圆, d 7 为终点。在细胞-维持液、药物与病毒对照正确的情况下, 病毒对照组和药物组的最高稀释度出现 CPE 对数差, 即为药物抑制病毒的对数⁽⁴⁾。各项实验重复 4–6 次, 取 $\bar{x} \pm SD$ 。

空斑减数试验 细胞培养瓶内先感染 2×10^4 PFU (空斑形成单位)/ml 的病毒-维持液 (1 ml), 33℃ 吸附 1 h, 经 Hanks 液洗涤 3 次, 分别加入不同剂量 (25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 药物-抗 HSV-I 血清 (2 个中和单位/ml) 维持液 3 ml 各 6 瓶, 33℃ 孵育 5 d, 弃除液体, 用 Hanks 液清洗后, 取 1% 结晶紫-甲醛液染色, 用肉眼计数空斑数目⁽⁵⁾。重复 4 次。100-药物组空斑均数/病毒对照组空斑均数 $\times 100\%$ 即为空斑减数率。

药物阻止病毒复制的动力学测定 芒果甙、异芒果甙各 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入 $10^{3.5}$ TCID₅₀ (50% 组织培养感染剂量)/ml 病毒为药物组以及病毒对照组 ($10^{3.5}$ TCID₅₀/ml) 分别加入维持液 1 ml 于细胞瓶内, 33℃ 吸附, 1, 6, 12, 18, 24 h 后按时取出, 经 -40℃ 反复冻融 3 次, 再按对数比例稀释 10^{-1} – 10^{-8} , 各稀释度接种 6 瓶, 每瓶 1 ml, 33℃ 孵育, d 7 观察最高稀释度产生 CPE 的对数, 重复 4 次。按横坐标为不同吸附时间 (h) 与纵坐标为病毒滴度 ($10 \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) 制成曲线图。

Results

抗病毒药效试验前, 各药物本身对细胞不

产生非特异性 CPE 的最高浓度进行检测, 实验结果异芒果甙为 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 芒果甙、碘苷和无环鸟苷为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及环胞苷为 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

CPE 抑制试验 按 2.00 判定最低有效剂量。药物直接作用于病毒时, 芒果甙和异芒果甙均无效, 环胞苷与无环鸟苷 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 有效; 药物在感染病毒同时加入细胞瓶内时, 芒果甙、异芒果甙和无环鸟苷 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) > (优于, 下同) 碘苷与环胞苷 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 先感染病毒后给药物时, 无环鸟苷和碘苷 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) > 环胞苷、芒果甙与异芒果甙 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 先给药物后再感染病毒时, 环胞苷 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) > 异芒果甙和无环鸟苷 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 碘苷与芒果甙无效 (Tab 1)。若按 4 种给药剂量 (25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 与 4 种给药方式 (药物直接作用于病毒、药物在病毒感染同时加入细胞瓶内、先感染病毒后给药物和先给药后感染病毒) 的 8 项对数总和的 $\bar{x} \pm SD$ 来初步评价药效时, 异芒果甙 (2.28 ± 0.33) > 无环鸟苷 (2.01 ± 0.18) > 碘苷 (1.87 ± 0.13) > 环胞苷 (1.78 ± 0.15) > 芒果甙 (1.75 ± 0.11)。由此可见, 异芒果甙高于上述 3 种对照药物的 0.27–0.50 个对数值, 芒果甙却比异芒果甙降低 0.53 个对数值。

空斑减数试验 各药物 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量的平均空斑减数率依次为异芒果甙 (69.5%) > 碘苷 (67.6%) > 无环鸟苷 (63.3%) > 芒果甙 (56.8%) > 环胞苷 (56.6%) (Tab 2)。

药物阻止病毒复制的动力学测定 病毒对照组在感染后 18 h 出现繁殖高峰 (滴度为 $10^{5.25}$ TCID₅₀/ml), 此时异芒果甙已下降 2.25 个对数, 芒果甙则减少 2.45 个对数; 24 h 后, 前者降低 2.90 个对数, 后者下降 2.60 个对数值 (Fig 1)。

Discussion

检测抗病毒药效时, 我们选用来源丰富的原代人胚肌皮单层细胞, HSV 经 33℃ 培养后

Tab 1. Logarithm reduction of herpes simplex virus type 1 by 5 antiviral compounds with 4 treatment methods, $\bar{x} \pm SD$

Drug	Methods of treatment	Dosage ($\mu\text{g/ml}$)						
		10	25	50	100	250	500	1000
Isomangiferin		—	0.50 \pm 0.08	0.50 \pm 0.04	0.71 \pm 0.05	0.83 \pm 0.06	1.00 \pm 0.07	—
Mangiferin	Virucidal	0	0	0.50 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.11	—	—
Iodoxuridine	effect	0	0	0.75 \pm 0.07	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.04	—	—
Cyclocytidine	n = 4	—	0	0	0.75 \pm 0.14	2.25 \pm 0.20	2.75 \pm 0.25	3.50 \pm 0.41
Acyclovir		0	0	0	1.00 \pm 0.07	2.13 \pm 0.11	—	—
Isomangiferin		—	2.93 \pm 0.18	3.81 \pm 0.29	4.00 \pm 0.41	4.75 \pm 0.58	4.92 \pm 0.30	—
Mangiferin		1.49 \pm 0.08	3.00 \pm 0.17	3.24 \pm 0.03	4.24 \pm 0.20	4.50 \pm 0.20	—	—
Iodoxuridine	Simultaneous	0.47 \pm 0.02	1.50 \pm 0.08	2.19 \pm 0.16	4.50 \pm 0.07	—	—	—
Cyclocytidine	n = 6	—	1.50 \pm 0.07	2.00 \pm 0.12	2.50 \pm 0.59	2.50 \pm 0.10	3.00 \pm 0.07	5.00 \pm 0.12
Acyclovir		1.75 \pm 0.12	2.50 \pm 0.12	3.50 \pm 0.41	3.75 \pm 0.20	4.15 \pm 0.58	—	—
Isomangiferin		—	1.98 \pm 0.16	2.19 \pm 0.24	3.37 \pm 0.53	4.32 \pm 0.35	4.58 \pm 0.39	—
Mangiferin		0	1.00 \pm 0.14	2.00 \pm 0.16	2.50 \pm 0.38	3.50 \pm 0.07	—	—
Iodoxuridine	Posttreatment	1.26 \pm 0.10	2.00 \pm 0.07	3.67 \pm 0.41	4.25 \pm 0.33	—	—	—
Cyclocytidine	n = 6	—	1.57 \pm 0.09	2.26 \pm 0.10	2.57 \pm 0.21	3.00 \pm 0.15	3.00 \pm 0.24	3.50 \pm 0.42
Acyclovir		1.75 \pm 0.09	2.00 \pm 0.39	2.50 \pm 0.18	3.15 \pm 0.33	3.55 \pm 0.19	—	—
Isomangiferin		—	0.53 \pm 0.04	1.29 \pm 0.12	1.75 \pm 0.13	2.98 \pm 0.49	3.64 \pm 0.20	—
Mangiferin		0	0	0.25 \pm 0.03	0.50 \pm 0.02	1.00 \pm 0.13	—	—
Iodoxuridine	Pretreatment	0	1.00 \pm 0.14	1.19 \pm 0.07	1.26 \pm 0.11	—	—	—
Cyclocytidine	n = 4	—	1.00 \pm 0.09	2.00 \pm 0.11	2.00 \pm 0.16	2.57 \pm 0.19	3.57 \pm 0.19	4.15 \pm 0.59
Acyclovir		0	0	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.07	2.00 \pm 0.11	—	—

Virus was diluted to 10^{-1} - 10^{-6} and incubated at 33°C to observe for 7 d, with the highest dilution, for the cytopathogenic effect logarithm difference between virus controls and drugs (= drug-inhibiting-virus logarithm)

Tab 2. Virus plaque reduction rate (%) on virus inoculation preceding drug addition, n = 4

Drug	Virus-plaque reduction rate with various drug doses ($\mu\text{g/ml}$)				Average plaque reduction rate
	25	50	100	250	
Isomangiferin	39.2	57.6	81.2	100.0	69.5
Mangiferin	32.8	49.4	65.5	79.4	56.8
Idoxuridine	27.3	62.0	81.1	100.0	67.6
Cyclocytidine	21.1	49.9	74.2	81.3	56.6
Acyclovir	26.1	55.2	83.6	88.1	63.3

Initial virus inoculation in the cell bottle was followed by adherence, rinsings, respective incorporation into drug-HSV-I antiserum at varying concentrations, 5 d incubation at 33°C, staining, and eventual plaque count. $100 - \text{no. of plaques in drug-test group} / \text{average no. of plaques in virus-control group} \times 100\% = \text{plaque reduction rate}$.

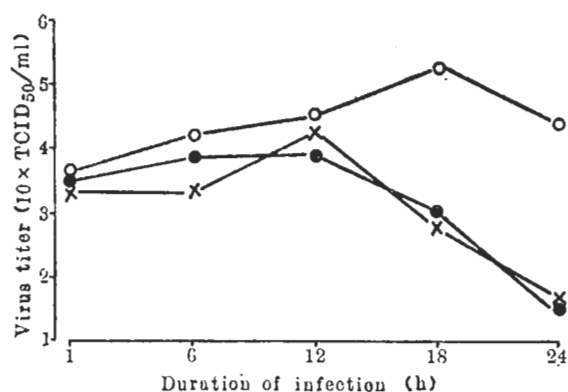


Fig 1. Kinetic determination of herpes simplex virus (○) replication inhibition of isomangiferin (●) and mangiferin (×). Both drug-test group and virus-control group were added into cell bottles, and 1, 6, 12, 18, and 24 h after adsorption logarithm difference was observed (Tab 1). isomangiferin $n = 4$, 2.29 ± 0.17 ($P < 0.01$); mangiferin $n = 4$, 2.60 ± 0.22 ($P < 0.01$).

滴度可高达 10^7 。在低倍(100倍)显微镜下直接观察有无特异性 CPE 以及用目计病毒空斑减数程度来判断药效^(1,4-6)。鉴于本实验采取病毒对照组与给药组平行操作,从而不受固定的病毒滴度波动影响以及病毒或/和药物吸附后多次反复洗涤与更换橡皮塞,以便尽量清除维持液内游离病毒与残存的药物,故结果比较可靠。两者最高稀释度产生 CPE 对数差 ≥ 2 (即药物能抑制 100 倍量的病毒)始为有效,对数

越大,抗病毒药效则越强⁽⁴⁾。从 Tab 1 的实验研究可见,异芒果甙的抗 HSV-I 药效高于芒果甙和各对照药物。

使用空斑减数试验检测药效时,本技术成败的关键是制备均匀、致密的单层细胞,细胞培养瓶接种病毒吸附后,应加入含药物的覆盖物,常用的覆盖物有琼脂⁽⁶⁾、琼脂糖⁽⁷⁾、甲基纤维素^(8,9)与抗血清(抗体)^(10,11),鉴于前 3 种为固体或半固体,此法操作技术不够简便,我们使用抗 HSV-I 血清试图阻止从细胞内释放出来的新病毒颗粒以及正常细胞不受病毒感染,本法虽难确保所有病毒能被同型抗体所中和,但实验步骤已被简化。我们⁽⁵⁾曾进行过 HSV 空斑形成影响因素的研究,发现覆盖物内含 1、2、4、个中和单位/ml 抗血清对空斑均数(分别为 11.3、11.7 与 10.0 个)是稳定的,故本工作采用 2 个中和单位/ml。从 Tab 2 可见,各药物 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 的平均空斑减数率与补充实验使用的甲基纤维素覆盖物所获结果(分别为 71.7, 66.1, 64.9, 55.4 和 55.8%)大致相似。本实验亦表明,异芒果甙的抗病毒药效高于芒果甙和其他各对照药物。

使用药物阻止病毒复制的动力学来检测芒果甙和异芒果甙药效时,要比病毒对照组分别降低 2.60 和 2.90 个对数值(Fig 1),从而认为

上述两种单体可阻止 HSV-I 在细胞内的复制, 至于抑制哪个环节, 诸如是否阻碍病毒在细胞内的晚期复制, 尚需病毒的生物化学检测才能确定。

此外, 我们用芒果甙与异芒果甙分别配成 1% 眼膏收治了单纯疱疹病毒性角膜炎患者 16 例, 现已初步观察到疗效。

References

- 1 郑民实、施仲贤. 抗病毒药物的实验室与临床研究进展. 药学通报 1981; 16 : 358
- 2 上海第一医学院、上海医药工业研究院. 石韦治疗慢性气管炎的有效成分研究. 医药工业 1973; (3) : 1
- 3 陆仲毅、毛懿德. 芒果叶化学成分研究. 中草药 1982; 13 (8) : 3
- 4 郑民实、施仲贤、陈瑞琪、刘佩芹、何士勤. 中草药在组织培养内的抗病毒实验研究. 药学通报 1981; 16 : 388
- 5 郑民实、施仲贤、何善武. 单纯疱疹病毒空斑形成影响因素的研究. 病毒学杂志 1987; (3) : 22
- 6 Cooper PD. The plaque assay of animal viruses. In: Maramorsch K, Koprowski H, eds. *Methods in virology*. NY : Academic Press, 1967 : 244-311
- 7 Schinazi RF, Fox JJ, Watanabe KA, *et al.* Activities of 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine and its metabolites against herpes simplex virus type 1 and 2 in cell culture and in mice infected intracerebrally with herpes simplex virus type 2. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29 : 77
- 8 Colacino J, Brownridge E, Greenberg N, *et al.* Enzymology and pathogenicity in mice of a herpes simplex virus type 1 mutant resistant to 2'-fluoro-2-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-5-iodocytosine. *Ibid* 1986; 29 : 877
- 9 郑志明、向近敏. 单纯疱疹病毒生物学和生物化学的分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志 1984; 4 : 352
- 10 Babiuk LA, Meldrum B, Gupta VS, *et al.* Comparison of the antiviral effects of 5-methoxymethyl-deoxyuridine with 5-iododeoxyuridine, cytosine arabinoside, and adenine arabinoside. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8 : 643
- 11 Ayisi NK, Gupta VS, Meldrum JB, *et al.* Combination chemotherapy: Interaction of 5-methoxymethyldeoxyuridine with adenine arabinoside, 5-ethyldeoxyuridine, 5-iododeoxyuridine, and phosphonoacetic acid against herpes simplex virus type 1 and 2. *Ibid* 1980; 17 : 558
- 12 杜平、范中善、郭葆玉. 病毒在细胞上的感染性滴定. 见: 杜平, 主编, *医用实验病毒学*. 北京: 人民军医出版社, 1985 : 102-19

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Jan; 10 (1) : 85-90

Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus

ZHENG Min-Shi (Department of Microbiology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006)

LU Zong-Yi (Department of Traditional Medicine, Shanghai Research Institute of Medicinal Industry, Shanghai 200040)

ABSTRACT Using tissue culture techniques the present study assured us of the merits of mangiferin and isomangiferin in the antiviral action against HSV-1. Utilizing 4 main patterns for evaluating drug effectiveness (ie intratube drug-on-virus direct action, simultaneous addition of drug-virus-

inoculum to cell bottle, virus inoculation preceding drug addition, and drug addition followed by virus inoculation), it was readily found by logarithm determination of HSV-I inhibition that isomangiferin was superior to such control drugs as acyclovir, idoxuridine, and cycloctidine

in logarithm by 0.27-0.50, and that mangiferin was lower than isomangiferin in logarithm by 0.53. The average plaque reduction rates of mangiferin and isomangiferin were 69.5% and 56.8%, respectively. All in all, the antiviral effect of mangiferin and isomangiferin was

attributed presumably to their capability to inhibit virus replication within cells.

KEY WORDS mangiferin; isomangiferin; antiviral agents; herpesvirus infection; cultured cells; acyclovir (aciclovir); idoxuridine; cyclo-cytidine

* * * * *