

(Fig 3A, B, C, Plate 3, 4), 说明本实验条件下对纤毛结构无明显影响. 对照组纤毛摆动方向一致, 低剂量组的亦基本一致, 而高剂量组则纤毛摆动方向相当紊乱 (Fig 3D, E, F, Plate 3, 4). 提示 Nif  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可使纤毛的摆动运动发生改变.

对照组线粒体双层膜结构及嵴清晰, 基质密度中等, 低剂量组线粒体形态与对照组相比, 无明显改变, 而高剂量组线粒体肿胀, 嵴变短, 减少, 基质密度降低 (Fig 3G, H, I, Plate 3, 4). 提示 Nif  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可影响线粒体形态.

DISCUSSION

本实验表明 Nif, Ver 及 Cin 均可非竞争性的拮抗 NE 对输卵管平滑肌的兴奋作用, 影响受体操纵性钙通道, 抑制细胞兴奋时  $\text{Ca}^{2+}$  流入细胞内, 减弱了平滑肌的张力和卵子运行的推动力. Nif 和 Ver 都明显延缓兔卵在输卵管内的运行. Nif 的作用更强, Cin 无此作用. 纤毛的结构完整是纤毛活动的物质基础<sup>[6]</sup>, 本实验结果证实, Nif 不破坏纤毛的结构. Nif  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可影响线粒体的结构, 可能与 Nif 抑制  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜内流有关. 由于线粒体结构和嵴的完整, 是氧化磷酸化反应不可缺少的条件, 因此推测, Nif  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可进一步影响能量代

谢过程. 根据 Afzelius<sup>[7]</sup> 的观点, 平行于两中央微管划一直线, 纤毛摆动的方向与此线成直角. 实验发现大剂量 Nif 组纤毛摆动方向紊乱, 提示增大 Nif 用量还可能通过影响动力蛋白臂 ATP 酶活性和线粒体结构及能量代谢过程, 导致纤毛摆动不协调, 从而影响输卵管的功能.

REFERENCES

- 1 Shu HD, Wang YL, Shu NC. Effects of nifedipine on oviduct motility and ovum transport in rabbits. *Acta Pharm Sin* 1986; 21 : 740-3.
- 2 Forman A, Andersson K.-E, Ulmsten U. Effects of calcium and nifedipine on noradrenaline- and PGF-2 $\alpha$ -induced activity of the ampullary-isthmus junction of the human oviduct *in vitro*. *J Reprod Fert* 1983; 67 : 343-9.
- 3 Yang LZ, Hsieh CM. Studies on spontaneous contractility of oviductal isthmus of rabbits in different hormonal states *in vitro*. *Reprod Contracep* 1982; 2 (3) : 32-6.
- 4 Jin ZJ, Yu AY. Comparison between Scatchard and dose/response ratio equations. *Acta Pharmacol Sin* 1983; 4 : 73-6.
- 5 Greenwald GS. A study of the transport of ova through the rabbit oviduct. *Fertil Steril* 1961; 12 : 80-95.
- 6 Afzelius BA, Eliasson R. Flagellar mutants in man; on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J Ultrastruct Res* 1979; 69 : 43-52.
- 7 Afzelius BA. Ultrastructural basis for ciliary motility. *Eur J Respir Dis* 1983; 64 Supp 128 : 280-6.

452-454

(20)

芒果甙对 II 型单纯疱疹病毒体外复制的抑制作用

R 965.2

朱雪梅, 宋家兴, 黄宗之, 吴移谋, 余敏君 (湖南省衡阳医学院微生物教研室, 衡阳 421001, 中国)

Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 *in vitro*

WU Yi-Mou, YU Ming-Jun (Department of Microbiology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ZHU Xue-Mei, SONG Jia-Xing, HUANG Zong-Zhi.

ABSTRACT The effect of mangiferin, a tetrahydroxy pyrrolidone saponin extracted from the leaves of mango

Received 1992-01-18

Accepted 1992-11-09

(*Mangifera indica*), against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) *in vitro* was studied. The 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) of it against HSV-2 plaque formation in HeLa cells was  $111.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , and the concentrations of 33 and  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  reduced the virus replicative yields by 90% ( $EC_{90}$ ) and 99% ( $EC_{99}$ ), respectively. The therapeutic index ( $IC_{50}/EC_{50}$ ) was 8.1. Mangiferin did not directly inactivate HSV-2. The results of the drug addition and removal tests suggest that mangiferin inhibits the late event in HSV-2 replication.

**KEY WORDS** mango; saponins; antiviral agents; herpesvirus hominis; HeLa cells

**摘要** 采用空斑减数试验与产量减数试验对芒果甙 (mangiferin, Man) 体外抗 HSV-2 作用的研究表明, Man 抑制 50% 空斑形成的有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 为  $111.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 使病毒产量减少 90% 和 99% 的有效浓度 ( $EC_{90}$  和  $EC_{99}$ ) 分别为 33 和  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 治疗指数 ( $IC_{50}/EC_{50}$ ) 为 8.1. 药物加入和去除试验结果提示 Man 抗 HSV-2 作用的机制可能是抑制病毒在细胞内复制的晚期.

**关键词** 芒果; 皂甙类; 抗病毒剂; 人疱疹病毒; HeLa 细胞

芒果甙 (mangiferin, Man) 是从芒果树叶中提取到的一种四羟基吡酮的碳糖甙<sup>(1)</sup>. 郑民实等<sup>(2)</sup>已证明 Man 有抗 HSV-1 作用, 由于 HSV-1 和 HSV-2 对某些药物的敏感性常有所不同, 本研究探讨 Man 对 HSV-2 在细胞培养中复制的影响, 旨在为 Man 的临床研究提供依据.

#### MATERIALS AND METHODS

**细胞与病毒** HeLa 细胞由湖南医科大学微生物教研室提供, 传代用含 10% 灭活小牛血清的 Eagle 培养液, 维持液含 2% 小牛血清. HSV-2 (MS 株) 由湖北医学院病毒研究所提供.

**药物** 芒果甙 Man 由国家医药管理局上海医药工业研究院陆仲毅高级工程师提供. 将 Man 用维持液配成  $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (加 10%  $\text{Me}_2\text{SO}$  助溶), 过滤除菌, 用维持液将过滤后 Man 浓度校正为  $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (采用

HPLC 分析),  $-20^\circ\text{C}$  保存, 使用时用维持液稀释至所需浓度.

**空斑减数试验** 24 孔板中 HeLa 细胞单层, 每孔接种约 100 PFU 的病毒, 吸附 1 h 后, 加入含不同浓度药物的 0.5% 甲基纤维素维持液覆盖,  $36^\circ\text{C}$  培养 48 h 后, 固定染色<sup>(3)</sup>, 数各孔内空斑数, 求抑制 50% 空斑形成的有效浓度 ( $EC_{50}$ ).

**产量减数试验** HeLa 细胞单层按 0.01 MOI 感染病毒, 吸附 1 h 后, 加入含不同浓度药物的维持液培养, 于感染后 48 h 收获病毒, 在 HeLa 细胞中测定其感染性滴度, 作剂量-反应曲线求使病毒产量减少 90% ( $EC_{90}$ ) 和 99% ( $EC_{99}$ ) 的有效浓度<sup>(4)</sup>.

**细胞毒性实验** 将实验用各浓度 (10, 25, 50, 100, 250,  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 药物加入 HeLa 细胞单层,  $36^\circ\text{C}$  培养 72 h 后观察细胞形态. 在生长旺盛的 HeLa 细胞中加入不同浓度的 Man, 培养 72 h 后, 以 trypan blue 排除法作活细胞计数.

#### RESULTS

**Man 对 HSV-2 的抑制作用** 空斑减数试验和产量减数试验结果表明, Man 对 HSV-2 在 HeLa 细胞中的复制呈剂量依赖性抑制作用, 它抑制 50% 空斑形成的有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 为  $111.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 使病毒产量减少 90% 和 99% 的有效浓度 ( $EC_{90}$  和  $EC_{99}$ ) 分别为 33 和  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Man 的细胞毒性作用和治疗指数** 静止期 HeLa 细胞对药物的毒性作用相对抵抗, Man  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  及其以下浓度对 HeLa 细胞单层的正常形态均无影响. 生长旺盛的细胞对药物的毒性作用相对较敏感,  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  及其以上浓度的药物对 HeLa 细胞的生长有抑制作用 (抑制率  $>11\%$ ), Man 抑制 50% HeLa 细胞生长的浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $900 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 对 HSV-2 的治疗指数 ( $IC_{50}/EC_{50}$ ) 为 8.1.

#### Man 抗病毒作用的机制

**1 Man 对 HSV-2 的直接灭活作用** 病毒悬液 (滴度为  $4.5 \times 10^5 \text{ PFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 与等量含药或不含药物的维持液试管内混合,  $36^\circ\text{C}$  温育 2 h

后分别测定其感染性滴度. 结果 $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 药物组病毒滴度为 $5.20 \pm 0.10$ ,  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 药物组滴度为 $5.10 \pm 0.10$ , 二者与对照组(滴度为 $5.20 \pm 0.20$ )比较差异无显著性, 提示 Man 对 HSV-2 无直接灭活作用.

2 药物处理时间对病毒产量的影响 为了解 Man 在病毒复制的哪一个阶段抗病毒活性最强, 参照 Hu 等<sup>[4]</sup>的方法作了药物加入和去除试验: 病毒吸附(0.01 MOI)后, 分别加入维持液(药物加入试验)或含 Man  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的维持液(药物去除试验)培养, 并于吸附后不同时间将维持液换为含药维持液(药物加入试验)或将含药维持液换为维持液(药物去除试验), 继续培养至吸附后 48 h, 收获并滴定各孔中的病毒产量. 结果显示, 病毒吸附后 12 h 内加药物均能明显抑制病毒复制, 但要达到最大程度的抑制, 药物必须维持存在(Fig 1).

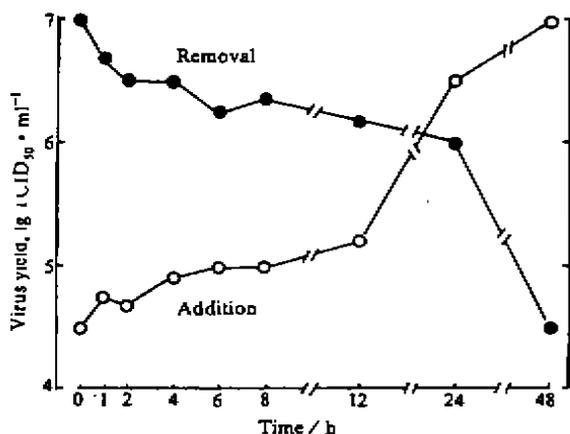


Fig 1. Drug addition and removal test. Mangiferin ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was either added to or removed from the media of HSV-2 infected HeLa cells at different times post-absorption. Virus input MOI was 0.01, and the virus yield was harvested at 48 h. The virus yields were assayed in HeLa cells and were expressed in lg 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) per ml.

DISCUSSION

本研究首次报道 Man 对 HSV-2 在细胞培

养中的复制有抑制作用, 其抗病毒作用的有效浓度 EC<sub>50</sub>, EC<sub>90</sub>和 EC<sub>99</sub>均远远低于其细胞毒性浓度, 治疗指数为 8.1, 说明 Man 的抗病毒作用不是由于其非特异性细胞毒性作用所致, 与郑民实等<sup>[2]</sup>对 HSV-1 研究的结果相符.

对 Man 抗病毒作用机制的研究表明, Man 对 HSV-2 无直接灭活作用, 病毒吸附后 12 h 内加药均能明显抑制病毒复制, 但药物必须持续存在才能达到最大的抗病毒活性. 由此推测 Man 可能主要作用于 HSV-2 在细胞内复制的较晚期阶段. 郑民实等<sup>[2]</sup>认为 Man 对 HSV-1 的抑制作用也是阻止其在细胞内的复制, 我们推测 Man 对 HSV-1 与 HSV-2 抑制作用的机制可能是一致的.

目前疱疹性损害发生的部位已不再是判断所感染的 HSV 型别的可靠指征, 而 HSV 的分型既费时又昂贵, 大多数的临床病毒学实验室都很少对其进行分型<sup>[5]</sup>, 因此, 对 HSV-1 与 HSV-2 均有效的药物比只对其中一种有效的药物更适合于临床应用. Man 对单纯疱疹性角膜炎有效<sup>[2]</sup>. 如经证实 Man 在体内亦有较强的选择性抗单纯疱疹病毒作用, 那么该药将有可能成为一种有效的抗疱疹病毒新药.

REFERENCES

- 1 Lu ZY, Mao HD, He MR, Lu SY. Studies on the chemical constituents of Mango (*Mangifera indica*) leaf. *Chin Trad Herb Drugs* 1982; 13 (3) : 3-6.
- 2 Zheng MS, Lu ZY. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 85-90.
- 3 Zheng ZM, Hsiang CM. Classification study of herpes simplex viruses by biological and biochemical methods. *Chin J Microbiol Immunol* 1984; 4 : 352-4.
- 4 Hu JM, Hsiung GD. Activities of two new antiviral agents against guinea pig lymphotropic herpesvirus infection *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 : 1600-5.
- 5 Zheng ZM, Mayo DR, Hsiung GD. Comparison of biological, biochemical, immunological, and immunochemical techniques for typing herpes simplex virus isolates. *J Clin Microbiol* 1983; 17 : 396-9.