

中药金叶败毒颗粒抑制人巨细胞病毒感染丝裂素活化蛋白激酶 p38 信号通路的研究*

汪 辉¹ 闻良珍² 凌霞珍²

内容提要 目的:研究金叶败毒颗粒(简称中药)对人巨细胞病毒(HCMV)感染丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)p38 信号通路的抑制作用,并探讨其治疗 HCMV 感染的分子机制。方法:应用原位杂交和免疫组化方法分别检测中药和更昔洛韦(GCV)干预 HCMV 感染的细胞 p38 mRNA 及 pRb 蛋白表达水平,观察两种药物对 HCMV 感染人胚胎成纤维细胞(HEL)的影响。**结果:**两种药物均可抑制 HCMV 在 HEL 中的增殖,但中药能明显抑制 p38 mRNA 的水平,并使其磷酸化底物 pRb 蛋白表达降低,而 GCV 无此作用。**结论:**中药可能通过调节 MAPK 通路而抑制 HCMV 基因的表达和复制。

关键词 金叶败毒颗粒 巨细胞病毒 丝裂素活化蛋白激酶

Study on Effect of Jingye Baidu Granule on Inhibition of Mitosin Activating Protein Kinase (p38) Signaling Pathway with Human Cytomegalovirus Infection WANG Hui, WEN Liang-zhen, LING Xia-zhen *Gynecology and Obstetric Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou (310006)*

Objective: To explore the mechanism of Jinye Baidu Granule (JYBDG) in treating human cytomegalovirus (HCMV) infection by studying its inhibitory effect on mitosin activating protein kinase (MAPK) pathway with HCMV infection. **Methods:** Expressions of p38 and pRb were investigated by means of in situ hybridization and immunohistochemistry before and after treated by JYBDG or Ganciclovir, and the development of cytopathic effect (CPE) was also observed. **Results:** Both JYBDG and Ganciclovir could inhibit HCMV proliferation in HEL, but JYBDG showed obvious inhibition on p38mRNA level and lower the pRb protein expression, while Ganciclovir didn't show. **Conclusion:** JYBDG could inhibit the gene expression and duplication of HCMV through regulating MAPK pathway.

Key words Jinye Baidu Granule, cytomegalovirus, mitosin activating protein kinase

妊娠期人巨细胞病毒(HCMV)活动性感染可以通过胎盘垂直传播,导致流产、畸形、死胎、新生儿神经系统及其他脏器的损害。有研究发现 HCMV 感染时能激活丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)细胞外信号调节激酶(ERK1/2)及 p38, MAPK 作为转录因子的上游信号在转录因子活化的磷酸化过程中起重要作用^[1]。另有研究表明^[2-4], HCMV 感染后病毒和细胞基因的表达需核因子 Kappa B (NK-κB)、环磷腺苷反应结合元件(CREB)及活化蛋白-1(AP-1)等转录因子的活化,因此通过抑制上游信号 MAPK 的表达而抑制 HCMV 的感染可能是治疗 HCMV 感染的新途径。本研究室在对金叶败毒颗粒(简称中药)长期研究中发现,它不仅能抑制 HCMV 晚期 mRNA 的表达,在体内外对 HCMV 均有明显的抑制作用,且是目前治疗育龄妇女

和孕妇 HCMV 活动性感染的一种安全有效的药物^[5],但其作用的分子机理尚不清楚,是否抑制了丝裂素活化蛋白激酶 p38 活化,本研究首次对此进行了探讨。

材料和方法

1 材料

1.1 药物 金叶败毒颗粒主要成分为金银花、鱼腥草、大青叶、蒲公英等,20ml/支,每毫升含生药量 1g,批号:950430,由本院中西医结合研究所提供;更昔洛韦(简称 GCV)粉针剂(为对照药物),25mg/支,批号 950101,购自湖北省医学工业研究所。

1.2 细胞和病毒 HCMV AD169 标准毒株由湖北省病毒研究所提供,按常规方法传代、滴定;人胚肺成纤维细胞(HEL)由本院儿科病毒室提供,按常规方法培养、传代,制成单层细胞,第 10~20 代用于本实验。

2 方法

* 国家“九五”重点攻关项目资助(No. 96-904-06-08)

1. 浙江大学医学院附属妇产科医院博士后流动站(杭州 310006);
2. 武汉同济医科大学附属同济医院妇产科

2.1 取 20 代 HEL 细胞,按 1×10^5 /ml 分种于内含飞片的小瓶或 25ml 的培养瓶中,待细胞长成单层后,将 100TCID₅₀ 的 AD169 毒株接种于培养瓶中,37℃ 吸附 1.5h 后分组换液,病毒组(简称 HCMV 组)更换维持液,HCMV 加中药组更换用维持液稀释的金叶败毒颗粒(终浓度为 4mg/ml);HCMV 加 GCV 组更换用维持液稀释的 GCV(终浓度为 25μg/ml),每组均设 5 个实验管,于感染后 8、12、24、72h 后终止培养,取出小飞片,磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗 1 次,风干,一部分用冷丙酮固定 10min 风干后,-20℃ 保存;一部分置 4% 多聚甲醛内,室温下固定 30min 后,梯度酒精脱水风干,-20℃ 保存。

2.2 p38 mRNA 的原位杂交检测 p38 探针及所用原位杂交试剂盒由武汉博士德公司提供。细胞飞片在湿盒中 42℃ 预杂交 2h 后,覆于硅化盖玻片,42℃ 杂交 16h,再滴加兔抗地高辛 37℃ 60min,按试剂盒说明进行显色,结果满意后,经 PBS 焦磷酸二乙酯(DE-PC)水洗终止,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片。设不加探针的阴性对照和 RNase 处理后的阴性对照。杂交结果进行计算机图像分析处理。

2.3 pRb 蛋白检测 采用免疫组织化学 SABC 方法,鼠抗 pRb 单抗为美国 Santa Cruz 公司产品,稀释度 1:200。ABC 试剂盒为美国 Zymed 公司产品。检测 HCMV 感染的人胚肺细胞飞片时,阴性对照用 PBS 代替特异性第一抗体,细胞核用苏木素复染,结果进行计算机图像分析处理。

2.4 中药对 HCMV 在 HEL 中增殖的影响(分别记录感染后 1~7 天细胞病变情况) 细胞病变分为:- 为细胞无病变,+ 为 1%~25% 细胞病变,++ 为 26%~50% 细胞病变,+++ 为 51%~75% 细胞病变,++++ 为 76%~100% 细胞病变。

3 统计学方法 采用 *t* 检验。

结 果

1 中药对丝裂素活化蛋白激酶 p38 信号通路的调节作用 见图 1。HCMV 感染后 p38 信号通路活化,中药对丝裂素活化蛋白激酶 p38 mRNA 的抑制作用在感染后 8h 就已出现,12~24h 达到高峰,此后随感染时间的延长,p38 mRNA 的水平又趋上升,与 HCMV 组比较差异有显著性($P < 0.01$)。而 GCV 对 p38 无明显的抑制作用。

2 中药对 pRb 蛋白表达的影响 为探讨 MAPK 通路活化后的生理功能,我们检测了 p38 的底物 pRb 的表达水平,发现其随 HCMV 感染时间的延长而逐

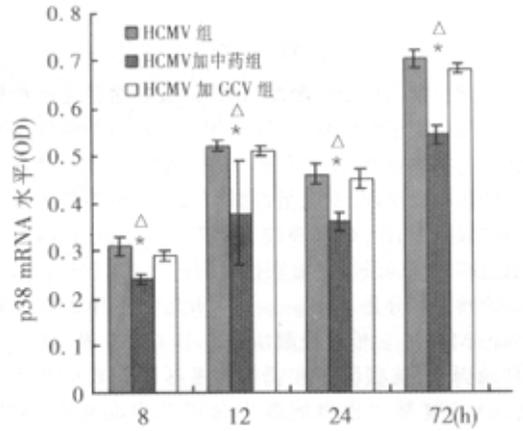


图 1 中药和 GCV 干预 HCMV 感染细胞 p38 mRNA 的表达

注:与 HCMV 组比较,* $P < 0.01$;与 HCMV 加 GCV 组比较, $\Delta P < 0.01$

渐升高,中药作用后 pRb 水平在 24h 和 72h 显著降低,与 HCMV 组和 HCMV 加 GCV 组比较差异均有显著性($P < 0.01$),其变化与 p38 活性改变一致。而 HCMV 加 GCV 组无明显改变(见图 2)。

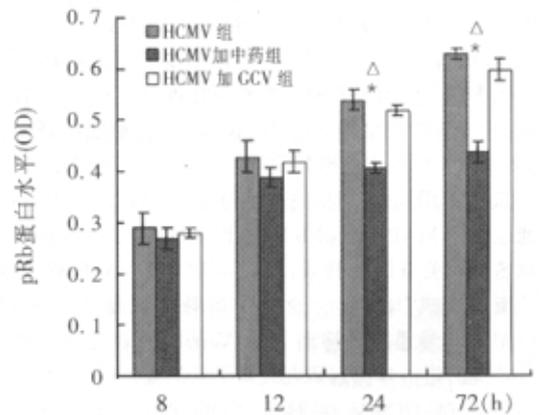


图 2 中药及 GCV 作用 HCMV 感染细胞 pRb 蛋白的表达
注:与 HCMV 组比较,* $P < 0.01$;与 HCMV 加 GCV 组比较, $\Delta P < 0.01$

3 中药对 HCMV 在 HEL 中增殖的影响 见表 1。HCMV 组在感染后 48h 就已出现细胞病变,并随感染时间的延长而不断加重;感染后 168h 细胞全部发生病变,而 HCMV 加中药组和 HCMV 加 GCV 组在感染后 72h 才出现细胞病变,并且进展缓慢,感染 168h 后细胞病变轻于 HCMV 组。

表 1 中药对 HCMV 在 HEL 中增殖的影响

组别	n	24	48	72	96	120	144	168(h)
HCMV	5	-	+	+	+	+	+	+
HCMV 加中药	5	-	-	+	+	+	+	+
HCMV 加 GCV	5	-	-	+	+	+	+	+

讨 论

丝裂素活化蛋白激酶 MAPK 级联途径是将细胞外信号传导至细胞核,介导细胞产生反应的细胞信息传递的共同通路,以之为核心的信号传递,是一个底物磷酸化级联反应,受到蛋白激酶 MKK 的磷酸化及蛋白磷酸酶 MKPs 的去磷酸化调节^[6,7]。MAPK 激活后通过磷酸化转录因子而调控基因的表达与细胞周期,细胞增殖和分化。Johnson 等^[8]研究发现 HCMV 感染通过 MAPK 信号途径激活 NF- κ B、CREB 及 AP-1 等转录因子,这些因子在调控病毒基因的表达及病毒 DNA 的复制过程和病毒生命周期中起重要作用。Rodems 等^[1]证实应用 MAPK 磷酸酶抑制剂 PD98059 可显著降低 HCMV UL112-113 启动子及病毒基因的表达。因此有望通过调节上游信号 MAPK 通路来控制下游靶分子转录因子的磷酸化进行 HCMV 感染的治疗。

中药金叶败毒颗粒主要成分为金银花、鱼腥草、大青叶、蒲公英等,经 30 余年的基础研究和临床应用,证实该药具有抗 HCMV 及提高机体免疫功能作用,临床使用前的毒性实验及安全性实验均为阴性^[9],其疗效满意,但其作用的分子机理尚未阐明。本研究发现金叶败毒颗粒能明显抑制丝裂素活化蛋白激酶 p38 的活性,并使其磷酸化活化底物 pRb 表达也相应的降低。pRb 在 G₁ 期处于低磷酸化状态,结合并抑制转录因子 E2Fs,进而阻止 S 期相关基因的转录。HCMV 感染后通过激活 MAPK 使 pRb 磷酸化活化,释放出 E2Fs,启动 S 期相关基因的转录,促进与病毒 DNA 复制的相关蛋白合成^[8]。因此,金叶败毒颗粒可能通过调节 MAPK 信号通路而抑制 HCMV 基因的表达和复制,为该药的进一步深入研究提供了新的思路。两种药物均能抑制 HCMV 在 HEL 中的增殖,但 GCV 对

MAPK 通路无明显的作用,提示两种药物抗 HCMV 感染的机制可能不同。

参 考 文 献

1. Rodems SM, Spector DH. Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1998;72(11):9173—9180.
2. Rodems SM, Clark CL, Spector DH. Separate DNA elements containing ATF/CREB and IE86 binding sites differentially regulate the human cytomegalovirus UL112-113 promoter at early and late times in the infection. *J Virol* 1998;72(4):2697—2707.
3. Frost JA, Geppert TD, Cobb MH, et al. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate and serum. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91(9):3844—3848.
4. Yurochko AD, Kowalik TF, Huang SM, et al. Human cytomegalovirus upregulates NF- κ B activity by transactivating the NF- κ B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol* 1995;69(9):5391—5400.
5. 姜 宏, 闻良珍, 凌霞珍, 等. 中药“热毒清”对人巨细胞病毒抑制作用的实验与临床研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 1999;13(2):175—178.
6. Dhanasekaran N, RemRumor Reddy E. Signaling by dual specificity kinase. *Oncogene* 1998;17(11):1447—1455.
7. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):180—186.
8. Johnson RA, Huang SM, Huang ES. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol* 2000;74(3):1158—1167.
9. 江汉珍, 卢银平, 董继华, 等. 金叶败毒颗粒抗合胞病毒、流感病毒的实验研究. *同济医科大学学报* 1996;25(suppl 1):5—8.

(收稿:2002-05 10 修回:2002-07-15)

欢迎订阅《中国中西医结合杂志》

中文版《中国中西医结合杂志》1988~1995 年各年合订本每册 50.00 元;1996 年合订本每册 60.00 元;1997、1998 年合订本每册 70.00 元;1999 年合订本每册 80.00 元;2000 年合订本每册 90.00 元;2001 年合订本每册 90.00 元。1994~1996 年单行本(无 1995 年第 1、2 期)每本 3.90 元;1997 及 1998 年单行本每本 4.90 元;1999 年每本 5.90 元;2000 年每本 6.90 元,2001 年每本 6.90 元。各年的基础理论特集:1986 年每本 2.90 元;1988 年特 1 集 3.60 元,特 2 集 4.50 元;1989 年每本 4.90 元;1990 年每本 6.50 元;1991 年每本 15.00 元;1993 年每本 18.00 元;1994 年每本 25.00 元;1995 年每本 36.00 元;1996 年每本 38.00 元;1997 年每本 40.00 元;1998 年每本 40.00 元;1999~2001 年每本 20.00 元,2002 年每本 30.00 元;以上均另加 10% 邮资。2002 年单行本每本 7.80 元(含邮资)。

英文版《中国中西医结合杂志》1995 年创刊(季刊,每季度末出刊),1995~2000 年每本 25.00 元,另加 10% 邮资;2001 年每本 25.00 元(含邮资)。

欲购者请直接向本社邮购部汇款订购。本社地址:北京西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社邮购部(邮政编码:100091)。请在汇款附言内注明所要年、期及册数,并写清购刊者姓名、详细地址及邮政编码。