

# 金叶败毒制剂抑制人巨细胞病毒 蛋白激酶 pul97 的实验研究

袁 慧 闻良珍 李 丹 刘继晓

**摘要 目的** 研究中药金叶败毒制剂对人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)蛋白激酶 pul97 的抑制作用,探讨其治疗 HCMV 感染的分子机制。**方法** 采用半定量 RT-PCR 方法,检测中药金叶败毒制剂和更昔洛韦(GCV)干预后感染细胞 HCMV pul 97mRNA 表达水平,应用 MTT 法观察两种药物对感染细胞的增殖活性的影响。**结果** 金叶败毒制剂和更昔洛韦对 HCMV pul 97mRNA 的表达有明显的抑制作用,在 HCMV 感染 72h 后两种药物均可明显增强感染细胞的增殖活性。**结论** 金叶败毒制剂可能通过抑制 HCMV 蛋白激酶 pul 97 基因的表达而抑制 HCMV 的表达和复制,从而促进感染细胞的增殖而达到抗病毒作用。

**关键词** 金叶败毒制剂;巨细胞病毒;蛋白激酶;增殖活性

**Experimental Study on Effect of Jinye Baidu Preparation in Inhibiting Human Cytomegalovirus Protein Kinase pul 97** YUAN Hui, WEN Liang-zhen, LI Dan, et al. *Department of Gynecology and Obstetrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

**Abstract Objective** To study the inhibitory effect of Jinye Baidu Preparation (JBP), a Chinese medicinal preparation, on human cytomegalovirus protein kinase pul97 and to explore its molecular mechanism in treating human cytomegalovirus (HCMV) infection. **Methods** Expression of the HCMV pul97mRNA in infected cells was measured by semi-quantitative RT-PCR before and after intervention of JBP or Ganciclovir (GCV), and effect of the two medicines on the proliferation activity of the infected cells was observed by MTT. **Results** Both JBP and GCV showed obvious inhibitory action on HCMV pul97mRNA. They could significantly enhance the proliferation activity of the cells 72 hours after HCMV infection. **Conclusion** JBP could inhibit the gene expression and duplication of HCMV by inhibiting the gene expression of HCMV protein kinase pul97 to enhance the proliferation activity of the infected cells so as to achieve its anti-virus action.

**Key words** Jinye Baidu Preparation; cytomegalovirus; protein kinase; proliferation activity

妊娠期巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)活动性感染可以通过胎盘垂直传播,导致流产、胎儿畸形、死胎、新生儿神经系统及其他脏器的损害。一些研究表明<sup>[1,2]</sup>,病毒蛋白激酶 pul97 是引起病毒高效复制的重要基因,抑制 pul97 蛋白酶活性可显著降低 HCMV 复制,说明 pul97 的表达及活性与病毒复制有重要关系。Prichard MN<sup>[3]</sup>等研究表明,在巨细胞病毒中删除 pul97 基因,则病毒在感染细胞中的复制显著减少,说明抑制 HCMV pul97 的表达及活性可达到很好的抗病毒治疗作用。本研究室在对金叶败毒

制剂的长期研究中发现<sup>[4]</sup>,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,而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,但其作用机理尚不清楚,是否通过抑制 HCMV pul97 的表达而发挥抗病毒作用,本研究对此进行了探讨。

## 材料与方 法

1 药物 金叶败毒制剂主要成分为金银花、鱼腥草、大青叶及蒲公英等,每支 20ml,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,每支 25mg,批号:950101,取自湖北省医学工业研究所。

2 细胞和病毒 人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)取自妊娠 14 周药物流

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30271673)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科(武汉 430030)

通讯作者:袁 慧,现在江汉大学医学与生命科学学院, Tel: 027-82412280, E-mail: yuanhui02@yeah.net

产胚肺组织,经胰酶消化后按常规方法原代培养、传代,制成单层细胞,第 10~20 代用于本实验。细胞生长液为高糖 DMEM 加 10% 新生小牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml。细胞维持液含 3% 新生小牛血清,其余同细胞生长液。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,并测定半数组织培养感染量  $TCID_{50} = 10^{-4.5}$ 。

3 试剂及仪器 MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐](Amresco 产品);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 产品);Trizol RNA 提取试剂盒(Invitrogen 产品);无 RNA 酶的 DNA 酶、MMV 逆转录酶、dNTP、TaqDNA 聚合酶、高糖 DMEM、Oligo(dT) 等均 Promega 产品;RNA 酶抑制剂(华美公司产品)。

引物:内参( $\beta$ -actin)两条引物序列为:U 5'-GC-CGGACTCGTCATACTCCT-3' 和 L 5'-ATGCCATCCT-GCGTCTGGA-3', 扩增片断为 581bp; pul97 引物序列为 U 5'-ACATCGACGTTTCCACACAG-3' 和 L 5'-CATCTTGGCCTGGACAAAGC-3', 其基因位置分别位于 1230~1249 和 1923~1904, 扩增片断为 694bp, 两对引物均由北京奥科生物技术有限公司合成。

仪器:紫外分光光度计 DU<sup>R</sup>650 型,由 Beckman 公司提供;PCR 扩增仪 SRX-481 型,由 MJ Research. Inc 公司提供;超级酶标仪 ELX808 型,由美国 Bio-Tech 公司提供。

#### 4 方法

4.1 金叶败毒制剂对 HCMV 感染细胞增殖活性的影响 按文献<sup>[5]</sup>报道的 MTT 法人流胚肺组织胰蛋白酶消化,收集 HELF 细胞,用 10% DMEM 培养液配制细胞悬液,0.4% 台盼蓝染色后计数活细胞数,调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个细胞/ml,接种于 96 孔细胞培养板内,0.2ml/孔,置于含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内(37℃)过夜贴壁后,次日加入无血清培养基(吸去旧培养基)100 $\mu$ l 过夜,让细胞均休息于 G<sub>0</sub> 期。将 100TCID<sub>50</sub> 的 AD169 毒株接种于 96 孔板,置 CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 吸附 1.5h 后换液,病毒对照组更换维持液(DMEM-3% FCS);药物实验组更换用维持液稀释的金叶败毒制剂,终浓度为 4mg/ml;药物对照组更换用维持液稀释的 GCV,终浓度为 25 $\mu$ l/ml;细胞对照组更换维持液(DMEM-3% FCS)。以上各组均设 20 个实验孔。去上清,每孔加入 MTT 100 $\mu$ l(5g/L),置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4h,去上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)100 $\mu$ l 混匀,5~10min 后,置 96 孔酶标仪检测,测定 570nm 处吸光度 A 值。计算细胞增殖指数(growth index, GI),表示细胞增殖活性。GI=感染组细胞 A 值/细胞对照组 A 值。

4.2 细胞总 RNA 的提取 分别于感染后 12、24、48、72、96、120h 收获细胞,按一次性 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。所得 RNA 均经紫外分光光度计检测其纯度和浓度,纯度在 1.8~2.0 者进行 RT-PCR 检测。RNA 提取及 RT-PCR 所用的玻璃及塑料器具均经 1%DEPC 处理以灭活 RNA 酶。

4.3 半定量 RT-PCR 测定 取 1 $\mu$ g 总 RNA,加 1u 无 RNA 酶的 DNA 酶以灭活可能存在的 DNA 污染,25~37℃ 反应 10min 后,PCR 扩增仪上 90℃ 15min 灭活 DNA 酶。冰上冷却后加入 1 $\mu$ l Oligo(dT)及 DEPC 水至总体积 13 $\mu$ l,混匀后置 PCR 扩增仪上 70℃ 5min 后立即冰上冷却,然后依次加入 5 $\times$ MMV 酶缓冲液 2.5 $\mu$ l, RNA 酶抑制剂 0.5 $\mu$ l (20 U/ $\mu$ l), dNTP1.25 $\mu$ l, MMV 逆转录酶 1 $\mu$ l 并补加 DEPC 水至总体积 25 $\mu$ l,混匀后置 PCR 扩增仪上进行逆转录反应。反应条件:42℃ 60min, 95℃ 5min 灭活逆转录酶, -20℃ 保存 cDNA。取 cDNA 5 $\mu$ l 为模板,依次加入 dNTP 1 $\mu$ l, 10 $\times$  TaqDNA 酶缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 $\mu$ l,  $\beta$ -actin 及 pul97 各引物 0.5 $\mu$ l (10 $\mu$ mol/L), TaqDNA 聚合酶 0.5 $\mu$ l (5u/ $\mu$ l), 补加 DEPC 水至总体积 25 $\mu$ l,混匀后置 PCR 扩增仪上进行扩增反应。反应条件:94℃ 5min 预变性, 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 60s, 反应 32 个循环, 72℃ 延伸 10min, -20℃ 保存 PCR 产物。取反应产物 5 $\mu$ l 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶上 80V 电泳 40min, 在激光密度扫描仪上扫描分析,以 pul97 的扩增条带与  $\beta$ -actin 条带扫描峰面积比值,表示 HCMV pul97 mRNA 的表达水平。

4.4 统计学方法 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行分析。

## 结 果

1 金叶败毒制剂对 HCMV 感染 HELF 细胞增殖活性的影响 见表 1。HCMV 感染 HELF 细胞 24~48h 内,细胞增殖仍活跃,自 72h 后随感染时间延长细胞增殖指数逐渐降低;而金叶败毒制剂及 GCV 干预后,72~96h 内细胞增殖指数仍较高,显著高于病毒对照组,此后随感染时间延长细胞增殖指数逐渐降低,但高于病毒对照组 ( $P < 0.05$ )。金叶败毒制剂干预后不同时间细胞增殖指数虽低于 GCV 干预组,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

2 金叶败毒制剂对 HCMV pul 97 mRNA 的抑制作用 见图 1 及表 2。随 HCMV 感染时间延长, HCMV pul 97 mRNA 表达水平逐渐增强,而金叶败毒制剂及 GCV 干预后,对 HCMV pul97 mRNA 的抑制

表 1 3 组不同感染时间细胞 GI 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GI					
		24h	48h	72h	96h	120h	144h
HCMV	20	1.52 ± 0.12	1.36 ± 0.09	0.86 ± 0.02	0.51 ± 0.03	0.35 ± 0.11	0.16 ± 0.01
HCMV + 中药	20	1.58 ± 0.06	1.38 ± 0.04	1.08 ± 0.05*	0.89 ± 0.06*	0.58 ± 0.03*	0.36 ± 0.04*
HCMV + GCV	20	1.56 ± 0.02	1.45 ± 0.03	1.13 ± 0.02*	1.02 ± 0.03*	0.62 ± 0.01*	0.43 ± 0.03*

注:与 HCMV 组比较,\* $P < 0.05$ 表 2 各组不同时间 HCMV 感染细胞 pul 97 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

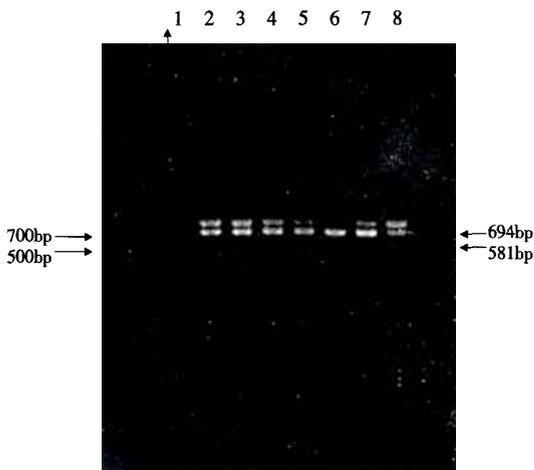
组别	n	pul 97 mRNA					
		12h	24h	48h	72h	96h	120h
HCMV	5	0.42 ± 0.06	0.53 ± 0.03	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.05	0.85 ± 0.01	0.89 ± 0.02
HCMV + 中药	5	0.33 ± 0.02* <sup>△</sup>	0.25 ± 0.02* <sup>△</sup>	0.31 ± 0.03*	0.39 ± 0.02*	0.51 ± 0.04*	0.63 ± 0.03*
HCMV + GCV	5	0.36 ± 0.03*	0.28 ± 0.01*	0.26 ± 0.02*	0.33 ± 0.01*	0.43 ± 0.03*	0.56 ± 0.06*

注:与 HCMV 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 HCMV + GCV 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 

作用在感染后 12h 就出现,感染 24~48h 抑制作用达到高峰。此后随感染时间延长,pul 97 mRNA 水平又逐渐升高,但均低于病毒对照组,经统计分析,差异均有显著性( $P < 0.05$ )。金叶败毒制剂对 pul 97 mRNA 的抑制作用与 GCV 相当,但在用药 24h 内强于 GCV,差异有显著性( $P < 0.05$ ),而用药 48h 后弱于 GCV,差异均无显著性。

基因缺失或表达减弱则严重影响病毒的复制效率。He ZW<sup>[7]</sup>等研究表明 pul 97 蛋白是能在丝氨酸和苏氨酸位点自动磷酸化的蛋白激酶,Michel D<sup>[8]</sup>等研究发现 pul 97 蛋白激酶的自动磷酸化与它的活性状态和调节病毒复制功能有着必然的联系,因此提出应用酶抑制剂直接干预人巨细胞病毒 pul 97 蛋白激酶活性是抗病毒治疗的新理念。

中药金叶败毒制剂是我院中西医结合研究所研制的一种纯中药制剂,其主要成分为金银花、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和安全性实验均证明该制剂无毒,使用安全。本研究结果表明,金叶败毒制剂能明显抑制 HCMV 引起的细胞病变,在 HCMV 感染 72h 后能明显增强感染细胞的增殖活性,表现出与 GCV 相近的抗病毒能力。半定量 RT-PCR 检测结果表明,中药金叶败毒制剂干预 HCMV 感染细胞后,HCMV pul 97 mRNA 表达水平显著下降,其抑制作用在用药后 12h 就出现,24~48h 抑制作用达到高峰,表现出与 GCV 及相近的抑制能力。因此中药金叶败毒制剂可能通过抑制 HCMV pul 97 mRNA 的表达,抑制病毒蛋白激酶 pul 97 的合成,降低病毒 DNA 的合成效率及抑制病毒壳体的成熟和装配,从而抑制细胞病变的发展,增强感染细胞的增殖活性。本实验从分子水平证实中药金叶败毒制剂治疗 HCMV 感染的作用机理,在于其可抑制 HCMV pul 97 mRNA 的表达水平。



注:第 1 泳道为 DNA Marker 标准分子量为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500bp;2、3、4、5、8 分别为 HCMV 感染 72、48、24、12、120h pul 97 mRNA 的表达;6、7 分别为金叶败毒制剂干预 24、12h pul 97 mRNA 的表达

图 1 不同感染时间及中药干预后 pul 97 mRNA 表达半定量凝胶电泳图

## 讨 论

人巨细胞病毒编码的 pul 97 蛋白在调控病毒复制方面起着决定性作用,Wolf DG<sup>[6]</sup>等研究发现 pul 97 参与调节病毒早期和晚期的复制,其功能是增强病毒 DNA 的合成效率及促进病毒壳体的成熟,同时还报道 pul 97 的活性部分还直接掺入病毒壳体的装配,pul 97

## 参 考 文 献

- 1 Manfred M, Matthias SG, Martina F, et al. Direct targeting of human cytomegalovirus protein kinase pul97 by kinase inhibitors is a novel principle for antiviral therapy. J Gen Virol 2002;83(Pt 5):1013—1023.
- 2 Manfred M, Matthias SG, Martina F, et al. Inhibitors of hu-

man cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pul97. *J Gen Virol* 2001;82(pt 6): 1439—1450.

3 Prichard MN, Gao N, Jairath S, et al. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol* 1999;73(7):5663—5670.

4 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—179.

Jiang H, Wen LZ, Ling XZ, et al. The experimental and clinical study of inhibitory effects of Re-Du Qing on human cytomegalovirus. *Chin J Exp Clin Virol* 1999;13(2):175—179.

5 司徒振强, 吴军正, 刘 斌等主编. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 2003:186—187.

Situ ZQ, Wu JZ, Liu B, editors. *Cell culture*. Beijing: The World Books Publication Corporation, 2003:186—187.

6 Wolf DG, Courcelle CT, Prichard MN, et al. Distinct and separate roles for herpes virus-conserved pul97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;1998:1895—1900.

7 He ZW, He YS, Kim Y, et al. The human cytomegalovirus pul97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J Virol* 1997;71(1):405—411.

8 Michel D, Schaarschmidt P, Wunderlick K, et al. Functional regions of the human cytomegalovirus protein pul 97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pul97 itself. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 9):2105—2112.

(收稿:2004-09-15 修回:2005-01-11)

## 川芎嗪对新生儿缺血缺氧性脑病一氧化氮及氧自由基的影响

朱 芮 邹典定

氧自由基、氮氧自由基损伤在新生儿缺血缺氧性脑病(HIE)病理生理过程中的作用越来越受到重视。川芎嗪是活血化瘀中药川芎的一种生物碱,具有扩张血管,改善微循环等作用,本研究旨在观察它对 HIE 一氧化氮(NO)及氧自由基(SOD、MDA)的影响,以便为临床应用提供新的依据。

### 资料与方法

1 临床资料 40 例均为我科 2001 年 2 月—2003 年 12 月住院 HIE 新生儿,均符合 HIE 诊断和分度标准[中华儿科杂志 1997;35(2):99]。随机分为川芎嗪治疗组(简称治疗组)和常规治疗对照组(简称对照组)。治疗组 20 例,其中男 11 例,女 9 例;日龄 1~3 天;中度 11 例,重度 9 例;对照组 20 例,男 12 例,女 8 例;日龄 1~3 天;中度 12 例,重度 8 例;选择同期无宫内窘迫及 1 min Apgar 评分为 8~10 分的正常足月新生儿 20 名为正常组,其中男 8 名,女 12 名,日龄 1~3 天。

2 治疗方法 对照组采用常规治疗方法[苯巴比妥首次 30 mg/kg 体重,12 h 后给维持量 5 mg/(kg·d)],控制惊厥,症状明显好转后停药;静脉注射速尿 1 mg/kg,6 h 后可用甘露醇 0.25~0.5 g/kg,静脉注射,2~3 天以降低颅内压;纳络酮 0.05~0.1 mg/kg 静脉注射,随后改为 0.03~0.05 mg/kg 静脉注射,2~3 天以消除脑干症状;胞二磷胆碱 100~125 mg/d 加入 50 ml 液体内,10~14 天以促进脑细胞代谢,治疗组患儿除采用常规治疗外,同时每天加川芎嗪 2~4 mg/kg 至生理盐水 50 ml 中静脉滴注,疗程 10 天。

3 观察项目及检查方法 正常新生儿,HIE 患儿入院当天和第 15 天清晨空腹取静脉血 3 ml,NO 测定采用硝酸还原酶法;SOD、MDA 测定采用化学比色法。均由南京建成生物工程研究所提供检测试剂盒。具体操作按说明要求进行。

4 统计学方法 两样本均数的 *t* 检验。

### 结 果

各组治疗前后 NO、SOD 及 MDA 的变化比较 见表 1。HIE 患儿治疗前血浆 NO 及 MDA 含量较正常新生儿明显升高,SOD 的活性明显降低,差异均有显著性( $t = 6.17, P < 0.01$ );治疗后两组血浆 NO、MDA 下降,SOD 活性明显升高,与治疗前比较,差异均有显著性( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且治疗组与对照组比较差异亦有显著性( $P < 0.01$ )。

表 1 各组治疗前后 NO、SOD 及 MDA 测定结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	时间	NO(mmol/L)	SOD(kU/L)	MDA(mmol/L)
对照	20	疗前	278.20 ± 101.01*	823.64 ± 132.17*	18.32 ± 8.24*
		疗后	242.74 ± 90.33 <sup>△</sup>	832.45 ± 199.94 <sup>△</sup>	15.36 ± 7.68 <sup>△</sup>
治疗	20	疗前	273.37 ± 104.03*	825.72 ± 129.20*	18.45 ± 8.31*
		疗后	205.25 ± 96.2 <sup>△△▲</sup>	973.83 ± 127.86 <sup>△▲</sup>	14.04 ± 8.09 <sup>△▲</sup>
正常	20		63.34 ± 14.42	995.91 ± 114.35	5.98 ± 1.02

注:与正常组比较,\*  $P < 0.01$ ;与本组治疗前比较,<sup>△</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup>  $P < 0.01$ ;与对照组治疗后比较,<sup>▲</sup>  $P < 0.01$

讨 论 HIE 严重地威胁着新生儿的生存及生存质量。近年来,钙离子、氧自由基(OFR)及 NO 在脑缺血损伤中的改变颇受关注。缺血性脑损伤中,由于酶合成障碍及大量 OFR 生成消耗了 OFR 防御物质(SOD)使脑损伤加重。

NO 是一种活性很强的自由基,可介导谷氨酸(Glu)神经毒作用,干扰正常细胞代谢,造成膜脂质过氧化,OFR、NO 本身是重要的炎性介质,可激活多种炎性物质,致炎性介质大量释放,导致炎性损伤。本研究显示加用川芎嗪治疗患儿的 NO、MDA 明显下降,SOD 明显的升高,与常规治疗组之间存在显著性差异,说明川芎嗪在一定程度上能调节患儿氧自由基代谢状况,减少体内过多的氧自由基,降低脂质过氧化反应程度,从而减轻了机体细胞的受害程度,且未发现明显不良反应。因此,川芎嗪可作为临床治疗 HIE 的有效药物。

作者单位:武汉大学中南医院(武汉 430071)

通讯作者:朱 芮,Tel:027-67813138,E-mail: hj10910@126.com

(收稿:2004-12-01 修回:2005-04-08)