

钝顶螺旋藻多糖抗单纯疱疹病毒 2 型的作用

朱 萧^{1,2}, 于 红¹, 张文卿¹

(1. 青岛大学医学院微生物学教研室//山东省分子病毒学重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 中山大学生命科学学院//有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要:【目的】探讨钝顶螺旋藻多糖(PSP)抗单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)的作用及可能机制,为进一步开发该药提供理论依据。【方法】实验选用 HSV-2 标准株(333 株),以不同剂量的 PSP 作用于 HSV-2 复制周期的不同阶段,终点以病毒半数感染量(TCID₅₀)、细胞病变效应(CPE)、MTT 染色细胞保护率(MTT 法)及荧光定量 PCR(FQ-PCR)作为评价手段,判断 PSP 的抗病毒效果。【结果】PSP 对 Vero 细胞毒性极低(TC₅₀为 1 750 μg/mL),对 HSV-2 无直接灭活作用,可抑制病毒吸附和感染细胞内病毒的复制,其中 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 浓度的 PSP 对病毒复制的抑制率分别为 63.94%、81.41%、85.63%;FQ-PCR 结果显示随着 PSP 浓度及作用时间的增加,PSP 对 HSV-2 DNA 的抑制作用明显增强,具有良好的剂量和时效关系。【结论】PSP 在体外具显著的抗 HSV-2 病毒作用,此作用发生在病毒吸附、病毒基因复制等多个环节上。

关键词:钝顶螺旋藻;多糖;单纯疱疹病毒 2 型;抗病毒作用

中图分类号:R373; R978.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)01-0072-05

Antiviral Activities of Polysaccharide from *Spirulina Platensis* against HSV-2 in Vitro

ZHU Xiao^{1,2}, YU Hong¹, ZHANG Wen-qing¹

(1. Shandong Key Laboratory of Molecular Virology//Microbiology Department, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. State Key Laboratory of Biocontrol//School of Life Sciences, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract:【Objective】To explore the antiviral effect and mechanism of polysaccharide from *Spirulina Platensis* (PSP) on herpes simplex virus type 2 (HSV-2) and to provide a theoretical support for developing new drugs.【Method】A stand strain of HSV-2 (333 strain) was used to investigate the antiviral effect of PSP in vitro. PSP in various concentrations was applied to different stages of HSV-2 replication cycle. Finally, the virus infectivity (TCID₅₀), cytopathic effect (CPE) and MTT stain method for viable cells (MTT assay) were used as markers to evaluate the effect of PSP on HSV-2. The quantity of HSV-DNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR).【Results】PSP had little cytotoxic effect on Vero cells (TC₅₀=1750 μg/mL), it could not directly inactivate HSV-2 infectivity. PSP not only interfered in adsorption of HSV-2 to Vero cells but also inhibited HSV-2 replication in the cells, PSP in the concentrations of 50 μg/mL, 100 μg/mL, and 100μg/mL could significantly inhibit virus replication with high inhibitory rate 63.94%, 81.41%, and 85.63%, respectively. FQ-PCR results showed that the inhibitory rate on HSV-DNA also increased in a dose-dependent and time-dependent manner.【Conclusion】PSP showed good antiviral effect on HSV-2 in vitro, which may be attributed to the inhibition of virus adsorption and virus replication in the cells.

Key words: *Spirulina platensis*; polysaccharides; HSV-2; antiviral activities

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):72-76]

收稿日期:2007-03-01

基金项目:青岛市科技局基金项目(02-2-kj-yi-31)

作者简介:朱 萧(1969-),男,湖北阳新人,硕士,中山大学生命科学学院在读博士生;于 红,通讯作者,教授,硕士生导师,E-mail: yuhong0532@126.com

人单纯疱疹病毒-2型 (Herpes simplex virus, HSV-2)为双链DNA病毒,是人类病毒性疾病的常见病原体之一。人类普遍易感,并可在神经节中形成潜伏感染^[1]。螺旋藻是一种古老的原核生物,属蓝藻门,已被作为保健食品及食品添加剂使用多年。钝顶螺旋藻多糖(polysaccharide from spirulina platensis, PSP)是从钝顶螺旋藻中提取的一种水溶性多糖类化合物,属于酸性杂多糖。近年来的研究表明,螺旋藻多糖是螺旋藻中具有抗肿瘤、抗辐射、抗病毒和免疫调节作用的生物活性物质。作为一种新的药物资源,螺旋藻多糖的研究与开发已成为目前海洋生物医药的重要研究领域之一^[2,3]。目前关于藻类多糖抗病毒作用的文献报道不多,且多局限于动物整体及细胞水平某一环节的研究,资料不够全面、系统。至于从分子水平探讨藻类多糖抗病毒作用及机理,尚未见文献报道。我们的前期研究表明PSP可抑制单纯疱疹病毒1型的病毒吸附及复制,并抑制包膜糖蛋白gG基因的转录等;PSP不仅可直接抑制乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)抗原分泌及病毒DNA复制,而且可通过提高机体细胞免疫应答状态发挥其抗HBV作用^[4,5]。为进一步研究PSP的抗病毒活性,我们进行了PSP抗HSV-2的体外实验研究,结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 钝顶螺旋藻多糖

螺旋藻多糖:螺旋藻藻粉由中国海洋大学生命科学学院藻类遗传室提供。参照文献^[6,7],采用改良的三氯乙酸去蛋白法,提取的螺旋藻白色粉末状粗多糖纯度达920 g/kg以上。以双蒸水配成10 g/L母液过滤除菌,分装,4℃保存,临用时以RPMI-1640培养基稀释至所需浓度。阿昔洛韦(acyclovir, ACV)为湖北科益药业股份有限公司产品,批号020103。

1.2 细胞

非洲绿猴肾细胞Vero细胞株为本室保存传代细胞系。于DMEM基础培养液中加入100 mL/L的新生牛血清,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素,置37℃、体积分数5%CO₂饱和湿度下培养。所有的细胞培养试剂均为GIBCO公司产品。

1.3 病毒及病毒滴度的测定

HSV-2(333株)本室保存毒种,于Vero细胞中传代,保存于-70℃备用。以细胞病变效应法(cytopathic effect, CPE)测定50%组织培养感染剂量(the median tissue culture infective dose, TCID₅₀)^[8]。

1.4 药物的细胞毒性测定

Vero细胞经胰酶消化后,以含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液制成 2×10^5 /mL细胞悬液,加入96孔培养板中,每孔200 μL,24~48 h后加入不同稀释度的PSP(3 200 μg/mL, 1 600 μg/mL, 800 μg/mL, 400 μg/mL, 200 μg/mL, 100 μg/mL, 50 μg/mL, 25 μg/mL)每个浓度设6个复孔,置37℃、体积分数5%CO₂饱和湿度下连续培养72 h,培养结束前4 h,每孔加入MTT 20 μL,37℃培养箱中培养4 h,离心弃上清后每孔加二甲基亚砜200 μL,微量振荡器振荡5 min,酶标仪测吸光度A值(波长570 nm)并计算药物对Vero细胞的抑制率。Vero细胞存活率=药物组平均吸光度值/细胞对照组平均吸光度值×100%,抑制率=100% - 存活率^[9]。

1.5 药物抗病毒实验

根据病毒复制周期,设计3个药物抗病毒作用点,实验分3个处理组^[8,9]。① I组:PSP对病毒直接作用组,取不同稀释度的PSP各100 μL分别与100 TCID₅₀的HSV-2病毒液100 μL混合,于37℃接触2 h。各管病毒依次10倍稀释,在Vero细胞内滴定各管病毒TCID₅₀,同时以MTT法检测病毒的抑制率。② II组:PSP抗病毒吸附组,于100 TCID₅₀的HSV-2感染Vero细胞的同时加入不同剂量的PSP(6.25 μg/mL, 12.50 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL),37℃孵育2 h,去除未吸附的病毒和药物,加入培养液,37℃培养48~72 h,观察细胞病变效应(CPE),MTT测A值。③ III组:PSP抗病毒生物合成组,以100 TCID₅₀的HSV-2感染Vero细胞,37℃孵育2 h后,弃病毒液,于培养液中加入不同剂量的PSP(6.25 μg/mL, 12.50 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL),培养24~72 h,观察CPE,MTT测A值。以上每个处理组同时设细胞对照、病毒对照和ACV药物对照,每个药物浓度均设6个复孔,每个处理组实验至少重复3次。

1.6 FQ-PCR检测PSP抗病毒作用的时效关系

以100 TCID₅₀的HSV-2感染Vero细胞,37℃孵育2 h后,弃病毒液,加入不同剂量的PSP(50 μg/mL, 100 μg/mL)分别于感染后2 h、4 h、6 h、

18 h 收集细胞,冻存于-70℃备用。参照 HSV 核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒说明书(深圳匹基生物公司)提取 DNA 并建立 FQ-PCR 反应体系,进行 PCR 扩增。

1.7 分析方法

药物对细胞的半数毒性浓度(TC₅₀)依据 Reed-Muench 法计算。病毒抑制率=(实验组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)/(正常细胞对照组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)×100%。统计学处理应用 Dunnet *t* 检验。

2 结 果

2.1 PSP 的细胞毒性

PSP 对 Vero 细胞的增殖无明显作用,且对 Vero 细胞毒性极低(TC₅₀ 为 1 750 μg/mL),光镜下 Vero 细胞生长良好,立体感强,数目密集,未见明显细胞脱落。

2.2 PSP 对病毒的直接作用

CPE 法检测结果显示各管 TCID₅₀(CPE)均为 10⁻²,说明 PSP 对 HSV-2 无直接灭活作用。

2.3 PSP 抗病毒吸附组

结果显示不同浓度的 PSP 均可不同程度地减轻细胞病变程度,随着 PSP 浓度的增加,病毒抑制率逐渐升高,表现出良好的量效关系,说明 PSP 可干扰 HSV-2 向 Vero 细胞的吸附,但没有达到完全抑制,而对照药物 ACV 对病毒吸附的抑制作用较弱(表 1,2)。

表 1 PSP 对 HSV-2 吸附及复制的影响

Table 1 Effects of PSP on HSV-2 adsorption and replication

Groups		PSP concentrations (μg/mL)					
		6.25	12.5	25	50	100	200
Adsorption	CPE	+++	+++	++	+	+	+
	Inhibitory rate (%)	20.78	27.27	53.90	66.45	71.43	81.82
Replication	CPE	+++	++	++	+	+	+
	Inhibitory rate (%)	36.06	43.82	57.46	63.94	81.41	85.63

表 2 ACV 对 HSV-2 吸附及复制的影响

Table 2 Effects of ACV on HSV-2 adsorption and replication

Groups		PSP concentrations (μg/mL)					
		6.25	12.5	25	50	100	200
Adsorption	CPE	+++	+++	++	+	+	+
	Inhibitory rate (%)	16.67	18.23	26.58	43.12	53.16	53.57
Replication	CPE	+++	++	++	+	+	+
	Inhibitory rate (%)	26.32	39.49	60.12	71.56	80.09	83.76

2.4 PSP 抗病毒生物合成组

结果表明不同浓度的 PSP 均可明显地抑制 HSV-2 的致细胞病变作用。MTT 结果亦显示,随着 PSP 浓度的增加,病毒抑制率逐渐升高,表现出良好的量效关系。其中 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 浓度的 PSP 可使细胞病变不超过“+”(25%),对病毒复制的抑制率分别为 63.94%、81.41%、85.63%,其抗病毒活性优于对照组 ACV(表 1,2,图 1)。

2.5 PSP 对病毒 DNA 复制的作用

FQ-PCR 测得不同剂量的 PSP 作用 2h、4h、

6h、18h 细胞中 HSV-DNA 拷贝数,结果表明随着 PSP 浓度及作用时间的增加,PSP 对 HSV-DNA 的抑制作用明显增强,具有良好的剂量和时效关系(表 3)。

3 讨 论

3.1 抗疱疹病毒药物的作用机制

目前临床应用的抗疱疹病毒药物有 20 多种,其中 2/3 为核苷或核苷类衍生物,其作用靶点为病毒复制过程中的关键酶,如 DNA 合成酶,它们

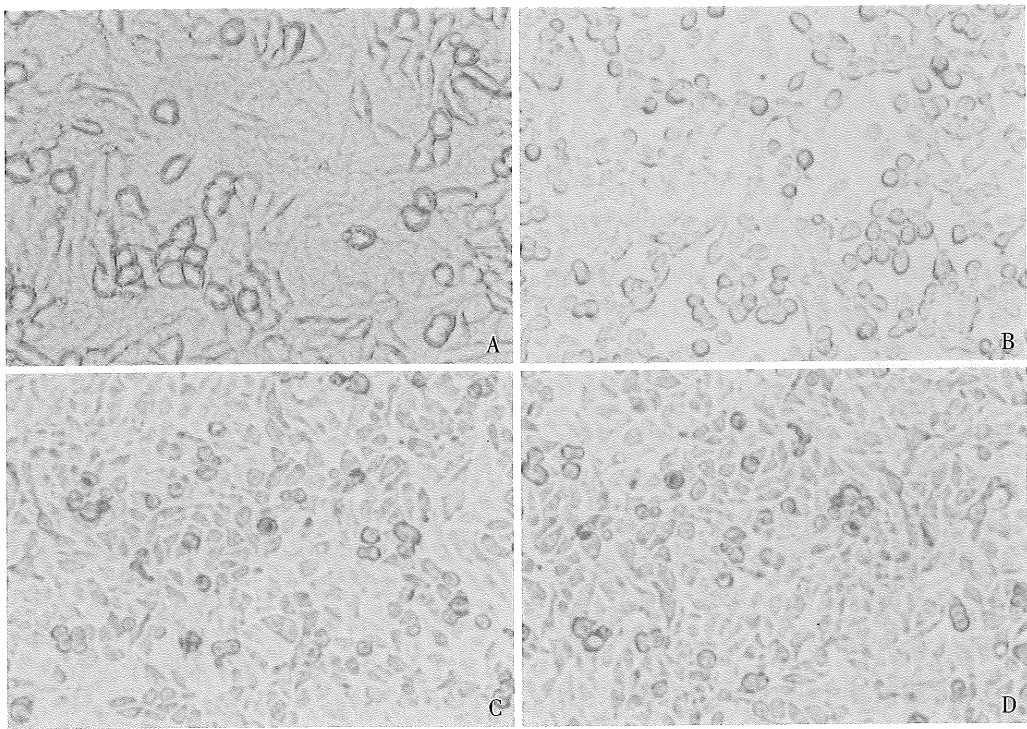


图 1 PSP 对 HSV-2 细胞病变的作用

Fig.1 The effects of PSP on the CPE of HSV-2

(A) Normal Vero cells; (B) HSV-2- infected Vero cells at 48h post infection; (C) HSV-2-infected Vero cells treated by 50 µg/mL PSP at 48 h post infection; (D) HSV-2-infected Vero cells treated by 100 µg/mL PSP at 48 h post infection; × 150

表 3 PSP 抗 HSV-2 作用的时效关系

Table 3 The time-dependent manner of PSP against HSV-2

Time (h)	HSV control	50 µg/mL PSP		100 µg/mL PSP	
	Log (copies/mL)	Log (copies/mL)	Inhibitory rate (%)	Log (copies/mL)	Inhibitory rate (%)
0	5.46±0.21 ²⁾				
2	5.78±0.35	5.36±0.56	7.20±2.13	5.02±0.29 ¹⁾	13.15±2.17
4	5.89±0.236	4.86±0.39 ¹⁾	18.34±1.82	4.35±0.18 ¹⁾	26.15±1.76
6	6.21±0.37	4.12±0.71 ²⁾	33.66±1.96	3.67±0.37 ²⁾	40.91±1.93
18	6.76±0.11	4.08±0.63 ²⁾	39.65±0.95	3.59±0.62 ²⁾	46.89±1.59

Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

以酶反应底物类似物的形式与正常底物竞争掺入病毒核酸链,抑制酶活性,阻碍病毒 DNA 合成,并终止病毒 DNA 链的延长,它们均需在细胞内转化为活性三磷酸或二磷酸衍生物,才能发挥抑制 HSV 的 DNA 合成酶作用,其中第一步磷酸化是限速因子,与 HSV 编码的胸腺嘧啶核苷激酶有关^[10,11]。阿昔洛韦是目前临床治疗 HSV 病毒感染的首选药物,但易产生耐药毒株,而且对于复发性 HSV 感染疗效不佳^[12,13]。因此,研究开发抑制病毒基因复制、转录及翻译等多环节的药物和制剂已势在必行。

3.2 藻类多糖抗病毒作用的研究

自 1958 年 Gerber 等^[14]发现从石花菜(*Gelidium cartilagenium*)提取出的多糖具有抗流感病毒 B 和腮腺炎病毒后,科学家逐渐发现藻类多糖对多种病毒有抗性。目前关于藻类多糖的抗病毒作用已有不少报道,但关于 PSP 抗病毒作用的文献不多,仅见日本科学家报道从钝顶螺旋藻的热水抽提物中,分离出一种天然硫酸多糖,能选择性地抑制包膜病毒(单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、流感病毒及人类免疫缺陷病毒等)穿入细胞^[15]。Ayehunie 等^[16]研究表明钝顶螺旋藻多糖可抑制 T 淋巴细胞、外

周血单核细胞和郎罕氏细胞中的人类免疫缺陷病毒 1 型复制,并直接灭活人类免疫缺陷病毒 1 型的感染性,显示了良好的药用前景。Rechter 等^[17]最近报道了钝顶螺旋藻多糖(包括其胞内与胞外多糖)的不同组分均显示良好的抗病毒作用,其对巨细胞病毒,HSV-1,HSV-6 及人类免疫缺陷病毒 1 型的抑制作用较强,而对 EB 病毒及流感病毒 A 的抑制作用较弱,其抗疱疹病毒的作用机理可能与抑制病毒的穿入有关。

3.3 PSP 抗 HSV-2 作用的研究

我们的前期研究表明,PSP 在体内外对 HSV-1 均有明显的抑制作用,而且对 Vero 细胞的毒性极小^[4]。本研究采用体外细胞培养法,探讨了 PSP 抗 HSV-2 的作用及可能机制。首先以不同剂量的 PSP 作用于病毒复制周期的不同环节,结果表明 PSP 对 HSV-2 无直接灭活作用,可抑制病毒吸附及感染细胞内病毒的复制;在此基础上,应用 FQ-PCR 技术进一步从分子水平检测 PSP 抗病毒作用的时效关系。结果亦表明,PSP 可有效地抑制病毒 DNA 的复制,且随着 PSP 浓度及作用时间的增加,PSP 对 HSV-DNA 的抑制作用明显增强,具有良好的剂量和时效关系。

3.4 本研究的展望

本研究结果表明 PSP 在体外具显著的抗 HSV-2 病毒作用,此作用发生在抑制病毒吸附、病毒基因复制等多环节上,明显不同于 ACV,因此不易产生耐药性,而且由于 PSP 为天然化合物,具有无毒,高效的特点,同时兼有抗病毒和免疫调节双重作用,也是合成药所不具有的优点,因此具有开发成抗病毒新药的前景。但 PSP 如何在宿主细胞内影响病毒的复制周期,其确切的作用机制有待下一步深入研究。

参考文献:

- [1] 韩建德,张云青,廖绮曼,等. HSV 型特异性糖蛋白抗体检测及其意义 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005,26(2):211-213.
- [2] 涂芳,杨芳,郑文杰,等. 螺旋藻多糖的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005,17(1):115-119.
- [3] 张学成,信式样,李清华,等. 螺旋藻—最完美的功能食品 [M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1999:54-120.
- [4] 于红,张学成. 螺旋藻多糖抗 HSV-1 作用的体外实验研究 [J]. 高技术通讯, 2002,9:65-69.
- [5] Zhang WQ, Liu B, Yu H. et al. Effects of the polysaccharides from *Spirula platensis* on the activities of hepatitis B virus [J]. J Microbiol Immunol, 2005,3(3):211-218.
- [6] 章银良,李红旗,高峻,等. 螺旋藻多糖提取新工艺研究 [J]. 食品与发酵工业, 1999,25(2):15-18.
- [7] 钱志刚. 螺旋藻多糖提取新工艺研究 [J]. 淮海工学院学报, 2000,9(2):50-52.
- [8] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京:北京科学技术出版社, 1990:661-693.
- [9] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京:北京出版社, 1995:202-206.
- [10] Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults [J]. Antiviral Res, 2006,71(2-3):141-148.
- [11] Simposon D, Lyseng-Williamson KA. Famciclovir: a review of its use in herpes zoster and genital and orolabial herpes [J]. Drugs, 2006,66(18):2397-2416.
- [12] Field HJ. Herpes simplex virus antiviral drug resistance-current trends and future prospects [J]. J Clin Virol, 2001,21(3):261-269.
- [13] Chibo D, Druce J, Sasadeusz J, et al. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus [J]. Antiviral Res, 2004,61(2):83-91.
- [14] Gerber P, Dutcher JD, Adams EV, et al. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1958,99(3):590-593.
- [15] Lee JB, Srisomporn P, Hayashi K, et al. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001,49(1):108-110.
- [16] Ayehunie S, Belay A, Baba TW, et al. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) [J]. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998,18(1):7-12.
- [17] Rechter S, Konig T, Auerochs S, et al. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances [J]. Antiviral Res, 2006,72(3):197-206.

(编辑 徐杰)