

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0019-05

红树林淡紫拟青霉胞外多糖体外 抗 HSV-1 的实验研究*

李国军¹, 胡海岩¹, 王永霞², 杜勇俊¹, 张媛媛¹, 常彩红², 林英姿²
(海南医学院 1. 临床学院, 2. 热带医学与检验学院, 海南 海口 571109)

摘要: 目的 探讨红树林淡紫拟青霉胞外多糖体外抗单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 感染的活性, 为开发新型抗病毒药物提供实验基础。**方法** 以 Vero 细胞为病毒感染靶细胞, 以不同浓度淡紫拟青霉胞外多糖作用于 HSV-1 感染的各个阶段, 以细胞病变程度测定病毒半数感染量, MTT 法检测淡紫拟青霉胞外多糖对 Vero 细胞的毒性作用、对 HSV-1 的直接灭活作用、对病毒吸附和生物合成的影响。**结果** 淡紫拟青霉胞外多糖对 Vero 细胞的半数有毒浓度 (CC₅₀) 为 1 724.2 μg/ml, 该多糖浓度 <900 μg/ml 时, 细胞存活率仍 >90%, 且对细胞无增殖作用; 在 25 ~ 1 000 μg/ml 浓度范围内, 该多糖可在一定程度上抑制病毒吸附, 并表现出一定的量效关系, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 650.7 μg/ml; 该多糖还具有抑制 HSV-1 生物合成的作用, 其 IC₅₀ 为 547.7 μg/ml, 在 25 ~ 1 000 μg/ml 浓度范围内, 抑制率与药物浓度呈量效关系, 未发现该多糖对 HSV-1 有直接灭活作用。**结论** 淡紫拟青霉胞外多糖对 Vero 细胞毒性较小, 是一种非常安全的多糖; 该多糖具有一定的抗病毒作用, 在一定浓度范围内可抑制 HSV-1 吸附和生物合成, 且表现出一定的量效关系。

关键词: 淡紫拟青霉; 胞外多糖; Vero 细胞; 单纯疱疹病毒 I 型; 抗病毒

中图分类号: R965

文献标识码: A

*In vitro anti-HSV-1 activity of extracellular polysaccharides from Paecilomyces lilacinus isolated from Mangrove**

Guo-jun Li¹, Hai-yan Hu¹, Yong-xia Wang², Yong-jun Du¹, Yuan-yuan Zhang¹,
Cai-hong Chang², Ying-zi Lin²

(1. Clinical Medical College, 2. School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571109, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-HSV-1 activity of the extracellular polysaccharides from *Paecilomyces lilacinus* isolated from *Mangrove*, so as to provide research basis for the development of new antiviral drugs. **Methods** The maximum safe concentration of the extract to Vero cells was assessed by cytopathic effect (CPE) and MTT assay. The polysaccharides in different concentrations were applied to various phases of HSV-1 replication cycles respectively. The virus infectivity (TCID₅₀) was examined by CPE, and the direct inactivation effect of the extract was observed by MTT assay, the inhibition effect of the extract on HSV-1 absorption and biosynthesis was examined by MTT assay too. **Results** The extracellular polysaccharides had little cytotoxic effect on Vero cells (CC₅₀ = 1724.2 μg/ml). They could inhibit HSV-1 absorption on Vero cells at the dose of 25-1000 μg/ml to some extent in a dose-dependent manner (IC₅₀ = 650.7 μg/ml). The biosynthesis of HSV-1 could be significantly inhibited by the extract at the dose of 25-1000 μg/ml in a dose-dependent manner (IC₅₀ = 547.7 μg/ml), but the extract couldn't inactivate HSV-1 directly. **Conclusions** The extracellular polysaccharides are little harmful to Vero cells. They have conspicuous anti-HSV-1 activity, probably acting at the stage of HSV-1 binding to Vero cells and the virus

收稿日期: 2016-05-26

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81560006); 海南省自然科学基金 (No: 813248); 大学生创新创业训练计划项目 (No: HYCX2014095)

[通信作者] 林英姿, E-mail: 13198997808@126.com

biosynthesis stage in a dose-effect relationship.

Keywords: *Paecilomyces lilacinus*; extracellular polysaccharides; Vero cell; *Herpes simplex virus* type I; antiviral

单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus, HSV-1) 属于疱疹病毒科 α 病毒亚科, 为 DNA 病毒, 其引起的角膜炎致盲率居各种角膜病之首, 引起的病毒性脑炎死亡率、致残率较高。临床常用的抗 HSV-1 药物主要为核苷类, 不仅副作用较大且易产生耐药性, 因此研发高效且副作用小的抗病毒药物尤为重要^[1-2]。

课题组前期从海南红树林中分离出一株淡紫拟青霉, 其产生的胞外多糖初步证实具有一定的抗病毒作用。本研究拟进一步探讨该多糖的抗病毒作用, 为筛选新型抗病毒药物提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药 物 淡紫拟青霉胞外多糖由本实验室获得, 用双蒸水配成 20 g/L 母液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。临用时以 DMEM 维持液稀释至所需浓度。

1.1.2 试剂及细胞株 DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 胰酶 (美国 Amersco 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司), MTT (美国 Sigma 公司), Vero 细胞 (美国 ATCC 细胞库, CCL81)。

1.1.3 病毒株 单纯疱疹病毒 I 型由海南医学院热带医学与检验学院实验室保存。

1.1.4 仪器设备 生物安全柜 (美国 Baker 公司, SG403A-HE), 酶联免疫检测仪 (上海天美科学仪器有限公司), 二氧化碳 CO₂ 培养箱 (美国 Nuair 公司, NU-4750E), 倒置显微镜 (深圳拓天科学仪器有限公司), 电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), 细胞培养板 (美国 Corning 公司) 等。

1.2 方 法

1.2.1 病毒滴度测定 将 24 孔板中生长状态良好的 Vero 细胞培养液吸弃, 加入用 DMEM 维持液作 10 倍系列梯度稀释 ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-1}$) 的 HSV-1 病毒株 1 ml, 每一稀释度设 6 个复孔, 将不加病毒液的正常细胞作为对照, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h 后弃上清液, 加入完全培养液 1 ml/孔。逐日观察细胞病变程度 (cytopathic effect, CPE), 记录细胞病变

情况, 无细胞病变为 (-), 1% ~ 25% 细胞病变为 (+), 26% ~ 50% 细胞病变为 (++) , 51% ~ 75% 细胞病变为 (+++) , 76% ~ 100% 细胞病变为 (++++)。当病毒对对照组 CPE 达 (+++) 以上时终止培养, 判定结果。按 Reed-Muench 公式, 计算病毒半数感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 以确定病毒滴度^[3]。实验重复 3 次。

$\lg TCID_{50} = \text{距离比} \times \text{稀释度对数之差} + \text{高于 } 50\% \text{ 病变率的稀释度的对数}$

$\text{距离比} = \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 病变率的百分数} - 50\%}{\text{高于 } 50\% \text{ 病变率的百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 病变率的百分数}}$

1.2.2 淡紫拟青霉胞外多糖的细胞毒性测定 将不同稀释度淡紫拟青霉胞外多糖加入 96 孔板生长状态良好的 Vero 细胞中, 100 μ l/孔, 每个浓度设 6 个复孔, 设不加药物的维持液作为对照, 继续培养 72 h, 隔天换液 1 次, 于培养结束前 4 h, 每孔加入 5.0 mg/ml MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 吸弃上清液, 加入二甲亚砜 100 μ l/孔, 振荡 5 min, 用酶标仪测定 570 nm 处光密度 (optical density, OD) 值, 取 6 孔平均值计算各浓度细胞存活率及药物对细胞的半数有毒浓度 (50% cytotoxic concentration, CC₅₀)。实验重复 3 次。

$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$

$\text{抑制率} = 100\% - \text{存活率}$ 。

$$CC_{50} = \text{Anti log} [\log (<50\% \text{ 药物浓度}) + \frac{50 - <50\% \text{ 细胞死亡率}}{>50\% \text{ 细胞死亡率} - <50\% \text{ 细胞死亡率}} \times \log (>50\% \text{ 药物浓度}) - \log (<50\% \text{ 药物浓度})]$$

1.2.3 MTT 法检测淡紫拟青霉胞外多糖对病毒的直接灭活作用 将不同浓度淡紫拟青霉胞外多糖与 100 TCID₅₀ 病毒液等体积混合, 于 37 $^{\circ}$ C 接触 2 h, 各管病毒依次 10 倍稀释, 加入单层 96 孔板 Vero 细胞中, 100 μ l/孔, 感染 2 h 后换完全培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 逐日观察 CPE, 待病毒对对照孔 CPE 达 (+++)(++++) 且细胞对照正常时, 吸弃培养液, MTT 法检测病毒抑制率。每一药物浓度设 4 个复孔, 同时设病毒对照组和正常细胞对照组。实验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测淡紫拟青霉胞外多糖对病毒的吸附作用 在单层 96 孔板 Vero 细胞中加入 100 TCID₅₀ HSV-1, 100 μ l/孔, 同时加入不同浓度淡紫拟青霉胞

外多糖, 每一浓度设 6 个复孔, 37℃ 孵育 2 h, 吸弃孔内液体, 加入维持液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至病毒对照孔 CPE 达 (+++) (++++) 且细胞对照正常时, MTT 法测淡紫拟青霉胞外多糖对病毒的吸附作用。同时设病毒对照组和正常细胞对照组。实验重复 3 次。

抑制率 (%) = (实验组 OD 值 - 病毒对照组 OD 值) / (正常细胞对照组 OD 值 - 病毒对照组 OD 值)

1.2.5 MTT 法检测淡紫拟青霉胞外多糖对病毒生物合成的影响 以 100 TCID₅₀ 的 HSV-1 感染 96 孔板中 Vero 细胞, 37℃ 孵育 2 h, 吸弃病毒液, 加入不同浓度淡紫拟青霉胞外多糖, 每一浓度设 6 个复孔, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 ~ 72 h, 待病毒对照 CPE 达 (+++) (++++) 且细胞对照正常时, MTT 法测淡紫拟青霉胞外多糖对病毒生物合成的影响。同时设病毒对照组和正常细胞对照组。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 Graph Pad Prism 6 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 方差齐则两两比较用 LSD-*t* 检验, 量效关系采用回落归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接种病毒滴度

按 Reed-Meuench 法计算病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-4.6}, 即 100 μl 接种滴度为 10^{-4.6} 的病毒, 可使 50% Vero 细胞发生明显病变, 实验用病毒为 100 TCID₅₀。

2.2 淡紫拟青霉胞外多糖对 Vero 细胞的毒性

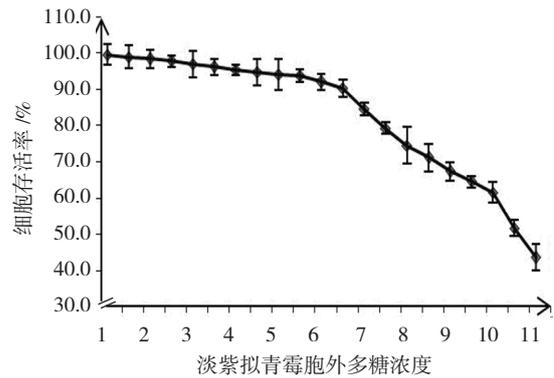
淡紫拟青霉胞外多糖对 Vero 细胞的 CC₅₀ 为 1 724.2 μg/ml, 多糖浓度 < 900.0 μg/ml 时, 细胞存活率 > 90%; 多糖浓度为 1 000 μg/ml 时细胞存活率为 84.6%; 当多糖浓度 > 1 000 μg/ml 时, 细胞存活率 < 80%。因此, 后续实验用多糖浓度控制在 < 1 000 μg/ml, 在所用多糖浓度范围内未见其对 Vero 细胞有增殖作用, 说明该多糖对 Vero 细胞毒性较低, 是一种非常安全的多糖 (见图 1)。正常 Vero 细胞和淡紫拟青霉胞外多糖作用后的 Vero 细胞见图 2、3。

2.3 淡紫拟青霉胞外多糖对病毒无直接灭活作用

25 ~ 1 000 μg/ml 淡紫拟青霉胞外多糖对 HSV-1 直接作用的 TCID₅₀ 相同, 均为 10^{-4.3}, 说明该多糖对 HSV-1 无直接灭活作用。

2.4 淡紫拟青霉胞外多糖干扰 HSV-1 吸附

当病毒对照组 CPE 达 (+++) 以上时, 淡紫拟



1: 12.5 μg/ml; 2: 50.0 μg/ml; 3: 200.0 μg/ml; 4: 400.0 μg/ml; 5: 600.0 μg/ml; 6: 800.0 μg/ml; 7: 1 000.0 μg/ml; 8: 1 200.0 μg/ml; 9: 1 400.0 μg/ml; 10: 1 600.0 μg/ml; 11: 1 800.0 μg/ml

图 1 淡紫拟青霉胞外多糖浓度与 Vero 细胞存活率的关系

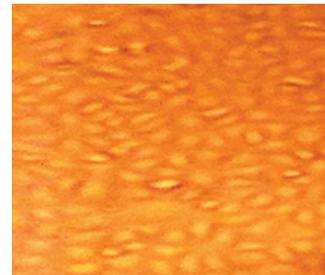


图 2 正常 Vero 细胞 (×100)

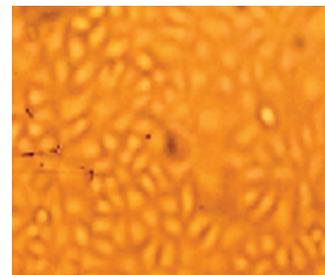


图 3 1 000.0 μg/ml 淡紫拟青霉胞外多糖作用 72 h 的 Vero 细胞 (×100)

青霉胞外多糖作用的 Vero 细胞 CPE (+) ~ (+++) 不等, 说明在所用浓度范围内该多糖具有一定的抗病毒作用, 且表现出一定量效关系。HSV-1 回归方程: $Y = 0.0647X + 7.879$, $R = 0.982$, 其半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC₅₀) 为 650.7 μg/ml。50 ~ 1 000 μg/ml 多糖对病毒吸附的抑制作用与病毒对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明该多糖可在一定程度上干扰病毒吸附, 即使多糖浓度达 1 000 μg/ml 时, 抑制率仅为 65.3%, 并未达到完全抑制。见附表。

2.5 淡紫拟青霉胞外多糖抑制 HSV-1 的生物合成

25 ~ 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖对 HSV-1 生物合成作用有不同程度的抑制, 且随着药物浓度增加, 抑制率逐渐升高, CPE 逐渐减轻, 表现出一定的量效关系。HSV-1 回归方程: $Y=0.076X+8.376$, $R=0.980$,

其 IC_{50} 为 547.7 $\mu\text{g/ml}$, 25 ~ 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 多糖对病毒吸附的抑制作用与病毒对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。当多糖浓度达 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 时, 抑制率为 75.3%, 说明该多糖对病毒生物合成作用有较强的抑制作用, 但仍不能达到完全抑制。见附表。

附表 淡紫拟青霉胞外多糖对 HSV-1 吸附及生物合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	对吸附的抑制作用			对生物合成的影响		
	CPE	OD 值	抑制率 /%	CPE	OD 值	抑制率 /%
25 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+++)	0.456 \pm 0.06	8.3 \pm 5.7	(+++)	0.457 \pm 0.05	5.1 \pm 3.8
50 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+++)	0.468 \pm 0.13	10.8 \pm 12.6	(+++)	0.487 \pm 0.06	11.3 \pm 7.6
100 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+++)	0.489 \pm 0.06	15.0 \pm 5.3	(+++)	0.523 \pm 0.12	18.6 \pm 13.5
200 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+++)	0.511 \pm 0.02	19.5 \pm 1.8	(+++)	0.556 \pm 0.02	25.4 \pm 3.9
300 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+++)	0.568 \pm 0.11	31.0 \pm 10.9	(+++)	0.591 \pm 0.14	32.5 \pm 21.6
400 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.601 \pm 0.04	37.7 \pm 4.3	(++)	0.642 \pm 0.06	42.9 \pm 11.6
500 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.633 \pm 0.01	45.1 \pm 0.9	(++)	0.694 \pm 0.02	53.6 \pm 3.7
600 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.665 \pm 0.05	51.8 \pm 5.1	(++)	0.730 \pm 0.04	60.9 \pm 8.1
700 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.689 \pm 0.13	56.7 \pm 12.9	(++)	0.750 \pm 0.11	65.1 \pm 15.0
800 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.703 \pm 0.12	59.6 \pm 12.1	(++)	0.773 \pm 0.05	69.8 \pm 9.1
900 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(++)	0.719 \pm 0.02	62.9 \pm 1.5	(++)	0.786 \pm 0.02	72.4 \pm 4.0
1 000 $\mu\text{g/ml}$ 淡紫拟青霉胞外多糖	(+)	0.730 \pm 0.07	65.3 \pm 7.0	(+)	0.800 \pm 0.06	75.3 \pm 11.9
病毒对照组	(+++)	0.415 \pm 0.06		(+++)	0.432 \pm 0.01	
Vero 细胞对照组	(-)	0.908 \pm 0.12		(-)	0.921 \pm 0.03	
F 值		48.392	129.704		84.413	96.832
P 值		0.000	0.000		0.000	0.000

3 讨论

多糖类化合物具有良好的生物活性, 早在 1943 年便开始作为药物使用。红树林真菌由于生活在寡营养、弱碱性的含盐海洋环境中, 形成了独特的耐饥、耐碱和耐盐特性, 使其可产生出完全不同于陆生真菌的新颖生物活性物质^[4-5]。研究表明, 红树林真菌胞外多糖主要为杂多糖, 具有良好的抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等生物活性^[6-7]。

课题组前期从海南红树林中分离获得一株淡紫拟青霉^[8]。经证实该株真菌产生的胞外多糖在体外有减轻单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒的致细胞病变效应^[9]。体内实验证实, 该多糖可延长单纯疱疹病毒颅内感染小鼠的生存时间, 提高存活率^[11], 说明该多糖具有一定的抗病毒作用。在前期研究基础上, 本研究以 Vero 细胞作为病毒感染靶细胞, 进一步探讨其

抗 HSV-1 的作用。研究发现, 该多糖对 Vero 细胞的 CC_{50} 为 1 724.2 $\mu\text{g/ml}$, 多糖浓度 <900 $\mu\text{g/ml}$ 时细胞存活率 >90%, 说明该多糖对 Vero 细胞的毒性作用较小, 对细胞无明显增殖作用, 是一种非常安全的多糖。本实验将不同浓度淡紫拟青霉胞外多糖作用于 HSV-1 感染的不同环节, 发现该多糖对 HSV-1 无直接杀伤作用, 但可抑制病毒吸附, 尤其 600 ~ 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 多糖抑制作用较强, 抑制率 >50%, 说明该多糖可能具有一定的封闭、改变或竞争细胞表面病毒受体的作用, 亦或作用于细胞使细胞处于抗病毒应激状态。研究还发现, 该多糖对 HSV-1 生物合成具有一定的抑制作用, 其 IC_{50} 为 547.7 $\mu\text{g/ml}$, 在所用浓度范围内抑制率与药物浓度呈量效关系, 尤其 600 ~ 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 多糖抑制作用较强, 抑制率达 >60%, 但抑制作用的靶点仍需进一步研究。

总之, 本研究发现红树林来源的淡紫拟青霉胞外多糖具有一定的抗 HSV-1 作用, 在一定浓度范围内可抑制病毒吸附和生物合成, 在 900 ~ 1 000 μ g/ml 浓度范围内该多糖对 HSV-1 吸附的抑制率 >60%, 对病毒生物合成的抑制率 >70%, 说明其抑制病毒生物合成的作用稍强于抑制吸附的作用, 但均不能达到完全抑制。本研究仅对淡紫拟青霉胞外多糖的抗病毒作用进行初探, 其结构和作用机制仍需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] SZPARA M L, PARSONS L R, ENQUIST L. Sequence variability in clinical and laboratory isolates of herpes simplex virus 1 reveals new mutations[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(10): 5303-5313.
- [2] ANTOINE T E, PARK P J, SHUKLA D. Glycoprotein targeted therapeutics: a new era of anti-herpes simplex virus-1 therapeutics[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2013, 23(3): 194-208.
- [3] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 61-63.
- [4] CHI Z M, FANG Y. Exopolysaccharides from marine bacteria[J]. *J Ocean Uni China*, 2005, 4(1): 67-74.
- [5] AL-SAYED H A, GHANEM E H, SALEH K M. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50: 147-155.
- [6] YAMADA T, IRITANI M, OHISHI H, et al. Pericosines, antitumour metabolites from the sea hare-derived fungus *Periconia byssoidea*. Structures and biological activities[J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 5(24): 3979-3986.
- [7] AFIYATULLOV S H, KALINOVSKY A I, PIVKIN M V, et al. New diterpene glycosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber[J]. *Nat Prod Res*, 2006, 20(10): 902-908.
- [8] 饶朗毓, 陈政良, 林英姿. 一株具免疫增强活性红树林真菌的筛选及鉴定 [J]. *中国热带医学*, 2011, 11(6): 683-685.
- [9] 裴华, 林英姿, 饶朗毓. 一株海南红树林真菌胞外多糖抗病毒活性初步研究 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 18(2): 152-154.
- [10] 裴华, 林英姿, 饶朗毓. 一株红树林真菌抗单纯疱疹病毒 II 型的研究 [J]. *海南医学*, 2012, 23(3): 1-3.
- [11] 裴华, 林英姿, 饶朗毓. 红树林真菌 PH0016 胞外多糖对单纯疱疹病毒 I 型活性的影响 [J]. *山东医药*, 2012, 52(7): 24-26.

(童颖丹 编辑)