

· 实验研究 ·

天花粉蛋白对小鼠单纯疱疹病毒感染性脑损伤的保护作用

陈光福¹, 黄文革², 陈凤英², 单金兰³

(1. 深圳市第二人民医院儿科, 广东 深圳 518035; 2. 中山大学动物实验中心, 广东 广州; 3. 深圳市东湖医院)

[摘要] 目的 探讨天花粉蛋白对小鼠实验性单纯疱疹病毒感染性脑损伤的保护作用。方法 动物随机分为3组, 空白对照组(空白组), 模型对照组(模型组), 模型+天花粉蛋白处理组(治疗组)。小鼠颅内接种单纯疱疹病毒I型(HSV-1)建立病毒性脑炎模型, 于接种HSV-1前30 min腹腔注射天花粉蛋白注射液, 接种病毒后1, 12, 24, 48 h、4和7 d测定脑组织含水量; 感染后7 d测定脑组织病毒滴度, 观察脑组织形态变化及动物神经症状评分。结果 天花粉蛋白治疗组于接种HSV-1后48 h至7 d脑组织含水量明显低于对照组, 差异有显著性($P < 0.05$), 治疗组脑组织病毒滴度为 1.16 ± 0.45 , 明显低于模型组的 2.89 ± 0.44 , 差异有显著性; 治疗组神经缺陷症状评分也明显低于对照组, 病理形态观察治疗组脑组织间质水肿较轻, 神经元无浓染、无坏死。结论 天花粉蛋白对小鼠实验性单纯疱疹病毒感染性脑损伤具有保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(3): 239-241]

[关键词] 天花粉蛋白; 脑炎/单纯疱疹病毒; 小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)03-0239-03

Protective effects of trichosanthin in Herpes simplex virus-1 encephalitis in mice

CHEN Guang-Fu, HUANG Wen-Ge, CHEN Feng-Ying, SHAN Jin-Lan. Department of Pediatrics, Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China (Email: szchengf@163.com)

Abstract: Objective Trichosanthin (TCS), a ribosome-inactivating protein extracted from the root tuber of Chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii maximowicz*, has various pharmacological properties including abortifacient, anti-tumor and anti-virus. This study aimed to evaluate the effects of TCS on infectious brain injury induced by Herpes simplex virus-1 (HSV-1) in mice. **Methods** Ninety mice were randomly assigned into three groups: Normal control group ($n=30$), Model group ($n=30$) and TCS-treated group ($n=30$). Viral encephalitis was induced by intracranial inoculation of HSV-1 in the latter two groups. The TCS-treated group was injected with TCS 30 minutes before HSV-1 inoculation. The water content of brain tissue was measured at 1, 12, 24 and 48 hrs, and at 4 and 7 days after HSV-1 inoculation. The viral titer of brain tissue and brain histopathological changes were detected at 7 days after HSV-1 inoculation. The neurological deficient scores were determined daily. **Results** The water content of brain tissue in the TCS-treated group between 48 hrs and 7 days after HSV-1 inoculation was significantly lower than that in the Model group ($P < 0.05$), although it was significantly higher than that in the Normal control group ($P < 0.05$). The viral titer of brain tissue in the TCS-treated group was markedly lower than that in the Model group (1.16 ± 0.45 vs 2.89 ± 0.44 ; $P < 0.05$) 7 days after HSV-1 inoculation. The neurological deficient scores of the TCS-treated group after 24 hrs of HSV-1 inoculation were significantly lower than that in the Model group but were higher than those of the Normal control group. TCS treatment resulted in alleviated pathological changes of brain tissue compared with the Model group 7 days after HSV-1 inoculation. **Conclusions** TCS has protective effects against infectious brain injury induced by HSV-1 in mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(3): 239-241]

Key words: Trichosanthin; Encephalitis / Herpes simplex virus-1; Mice

病毒性脑炎是儿内科临床常见的危急重症,病死率高,后遗症严重。目前公认单纯疱疹病毒I型(Herpes simplex virus-1, HSV-1)是病毒性脑炎的最

常见病因,约占全部脑炎的10%~20%^[1]。目前尚无有效的治疗方法。天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是从葫芦科植物栝蒌提取的有效成分,具有引

[收稿日期] 2005-11-25; [修回日期] 2006-01-08

[基金资助] 广东省医学科研基金资助项目(基金号: A2001629)

[作者简介] 陈光福,男,博士,主任医师。主攻方向: 小儿神经、心理行为性疾病。

产,抗肿瘤,抗病毒作用^[2]。为了探讨天花粉蛋白对病毒性脑炎的治疗效果,本研究应用小鼠实验性单纯疱疹病毒脑炎模型,观察天花粉蛋白对 I 型单纯疱疹病毒感染性脑损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

90 只昆明小鼠,雌雄各半,4 周龄大,体重 15 ~ 18 g,由中山大学动物实验中心提供;HSV-1 病毒株由中国药品生物制品鉴定所提供;天花粉蛋白注射剂由上海金山制药有限公司提供;vero 细胞株由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 实验分组

随机分为 3 组,空白对照组,模型加生理盐水对照组(模型组),模型加天花粉蛋白治疗组(治疗组)。每组设 6 个亚组($n=5$)。

1.3 模型制作与处理

参照衣曼等^[3]方法复制小鼠病毒性脑炎模型。将单纯疱疹病毒株放在非洲绿猴肾细胞(vero)中培养 72 h,当有 50% 细胞产生变大、变圆或融合性病变时,收集病毒测定该病毒滴度为 $TCID_{50} 10^{-5}$,选择 $TCID_{50} 10^{-3}$ 病毒浓度接种模型组和治疗组小鼠。在小鼠右侧眼角和耳根连线中点进针 2 ~ 3 mm,有落空感后注射 HSV-1 0.03 mL,空白组小鼠颅内注射不含病毒的培养液 0.03 mL,方法同上。治疗组小鼠于颅内接种病毒前 30 min 腹腔注射天花粉蛋白 0.03 mg/只,每天 1 次,共 7 d;空白组、模型组小鼠于接种前 30 min 腹腔注射生理盐水 0.1 mL,每天 1 次,共 7 d。分别于接种病毒后 1,12,24 h、4 和 7 d 处死小鼠,迅速开颅取脑组织,测定脑组织含水量,取左侧半球皮质全层脑组织和海马进行病理形态检查。

1.4 脑组织含水量测定

采用干湿法^[4]测定脑组织含水量。

1.5 脑组织病毒滴度测定

模型组和治疗组感染后第 7 天各取 5 只小鼠,处死后迅速开颅无菌取出脑组织,置于无菌 PBS 液 1 mL 内,捣碎,1 500 r/min 离心 15 min,取上清液,于 -20 °C 冻存备用。按病毒的细胞致病效应实验(微量实验法)^[5]于 vero 单层细胞上测定其组织培养半数感染量($TCID_{50}$)。

1.6 脑组织病理形态观察

分别于接种病毒后 1,12,24 h、4 和 7 d 处死小鼠,迅速开颅取左侧半球皮质全层脑组织和海马置

多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片、脱蜡、染色,于光镜下观察病理形态改变。

1.7 神经症状观察

按 Bederson 分级评分法^[6]每日观察动物的体态、活动及一般状况,将症状分为 3 级,I 级:将小鼠尾巴提起,瘫痪侧前肢回收屈曲于腋下,正常侧前肢向地面伸展(0 ~ 4 分);II 级:除 I 级体征外,向瘫痪侧推小鼠时阻力较健侧明显降低(0 ~ 4 分);III 级:除以上体征外,小鼠有向瘫痪侧旋转的行为(0 ~ 4 分)。

1.8 统计学处理

测定值用平均值 ± 标准差表示,组间比较用方差分析,两两比较用 q 检验,采用 SPSS 8.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 各组脑组织含水量变化

模型组于接种病毒后 12,24,48 h 和 4 d 脑组织含水量明显高于空白组,差异有显著性($P < 0.05$),随着时间的延长,脑组织含水量逐渐增加,接种病毒后 7 d 脑组织含水量显著高于空白组($P < 0.01$)。治疗组于接种病毒后 48 h、4 d 和 7 d 脑组织含水量明显低于模型组,差异有显著性($P < 0.05$),但仍高于空白组,差异亦有显著性($P < 0.05$)。各组脑组织含水量变化,见表 1。

2.2 脑组织病毒滴度

感染后第 7 天,天花粉蛋白治疗组,脑组织病毒滴度 1.16 ± 0.45 ($\lg TCID_{50}$),明显低于模型组($\lg TCID_{50}$ 为 2.89 ± 0.44)。两者差异有显著性($t=6.1658, P < 0.01$)。

2.3 各组神经症状变化

各组小鼠麻醉后约 30 ~ 90 min 清醒,空白组小鼠清醒后及随后 7 d 内均未见明显的神经功能缺陷症状,术后小鼠活动、食欲均恢复良好。模型组小鼠在接种病毒后 12 h 观察即有明显的偏瘫症状,表现为小鼠朝左侧卧,翻身或正位困难,扶正后迅即朝左侧翻倒,提尾后左前肢屈曲,左前肢不能抓杆,爬杆困难等,症状逐渐加重,1 h 后神经症状评分明显高于空白组,差异有显著性($P < 0.01$)。而天花粉蛋白治疗组小鼠神经缺陷症状较轻,24 h 后神经症状评分明显低于模型组,但仍明显高于空白组($P < 0.05$)。根据神经症状三级评分法,3 组小鼠神经缺陷评分结果,见表 2。

2.4 脑组织病理形态变化

肉眼观空白组小鼠大脑表面正常;模型组两侧

表1 各组脑组织含水量变化								(%, $\bar{x} \pm s$)
组别	n		1 h	12 h	24 h	48 h	4 d	7 d
空白组	11	左侧	76.13 $\pm$ 0.22	76.24 $\pm$ 0.20	76.60 $\pm$ 0.26	76.18 $\pm$ 0.20	76.54 $\pm$ 0.24	76.46 $\pm$ 0.19
		右侧	76.36 $\pm$ 0.20	76.18 $\pm$ 0.21	76.61 $\pm$ 0.24	76.14 $\pm$ 0.18	76.62 $\pm$ 0.25	76.53 $\pm$ 0.18
模型组	11	左侧	77.18 $\pm$ 0.25	79.57 $\pm$ 0.32 ^a	79.91 $\pm$ 0.55 ^a	80.36 $\pm$ 0.62 ^a	80.67 $\pm$ 0.67 ^a	81.33 $\pm$ 0.68 ^b
		右侧	77.19 $\pm$ 0.21	79.69 $\pm$ 0.30 ^a	79.89 $\pm$ 0.56 ^a	80.37 $\pm$ 0.58 ^a	80.83 $\pm$ 0.63 ^a	81.32 $\pm$ 0.65 ^b
治疗组	11	左侧	77.14 $\pm$ 0.22	79.44 $\pm$ 0.31 ^a	79.23 $\pm$ 0.54 ^a	79.21 $\pm$ 0.35 ^{a,c}	78.46 $\pm$ 0.35 ^{a,c}	78.12 $\pm$ 0.29 ^{a,c}
		右侧	77.16 $\pm$ 0.24	79.35 $\pm$ 0.37 ^a	79.22 $\pm$ 0.55 ^a	79.18 $\pm$ 0.34 ^{a,c}	78.55 $\pm$ 0.40 ^{a,c}	78.23 $\pm$ 0.35 ^{a,c}

与空白组同侧比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$, c 与模型组同侧比较 $P < 0.05$

表2 各组神经缺陷评分								($\bar{x} \pm s$)
组别	n		1 h	12 h	24 h	48 h	4 d	7 d
空白组	13		0.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
模型组	13		1.1 $\pm$ 0.3 ^a	2.5 $\pm$ 1.2 ^b	4.3 $\pm$ 1.7 ^b	5.6 $\pm$ 1.8 ^b	8.8 $\pm$ 2.1 ^b	9.6 $\pm$ 2.0 ^b
治疗组	13		1.0 $\pm$ 0.3 ^a	1.9 $\pm$ 0.8 ^b	3.2 $\pm$ 0.8 ^{b,c}	3.1 $\pm$ 0.9 ^{b,d}	3.6 $\pm$ 0.8 ^{b,d}	3.3 $\pm$ 1.3 ^{b,d}

与空白组比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$; 与模型组比较 c $P < 0.05$, d $P < 0.01$

半球脑沟回变平变浅;治疗组大脑表面脑沟回变平变浅。实验7 d后脑组织切片苏木素-伊红染色光学显微镜下观察,空白组神经元与胶质细胞结构正常;模型组脑组织充血水肿,出血性坏死,神经元变性,表现为核固缩,染色深,树突消失,毛细血管周隙增宽,内皮细胞肿胀,尼氏小体消失;而治疗组脑组织间质水肿程度较轻,神经元无浓染、无坏死。

3 讨论

单纯疱疹病毒是一种嗜神经性的双链DNA包膜病毒,激活的病毒可特异性地进入轴索并沿轴索延伸到周围组织,通过诱导细胞凋亡、氧化作用和宿主细胞免疫反应,造成宿主神经细胞损伤,从而引发脑炎^[7]。TCS是从中药天花粉分离提纯得到的单一蛋白结晶,是一种单链核糖体失活蛋白,具有RNA N-糖苷酶活性和5'-AMP磷酸酯酶活性,通过切除28S rRNA的A4324的一个腺嘌呤使核糖体失活,从而抑制核糖体和蛋白质合成,有学者^[8]又发现TCS具有使超螺旋DNA解旋和断裂为线状DNA的活性,即TCS具有核酸内切酶的活性。杨新科^[9]采用细胞病变抑制法和放射免疫抑制法,在细胞系统上研究TCS对7种病毒的抑制作用,表明TCS对乙型脑炎病毒、柯萨奇B2病毒、麻疹病毒、3型腺病毒、单纯疱疹病毒、水疱性口腔炎病毒以及乙型肝炎病毒等均具有明显的抑制作用。

本研究发现TCS治疗组于接种病毒后48 h、4 d和7 d脑组织含水量明显低于对照组,感染后第7天脑组织病毒滴度亦明显低于模型组,差异有显著意义($P < 0.05$);接种病毒后48 h治疗组的脑组织含水量以及神经症状评分均明显低于对照组。提示

TCS具有抑制HSV-1和保护感染性脑损伤的作用。作用机制可能与TCS具有核酸内切酶活性,同时使CD₄⁺细胞增多,CD₈⁺细胞减少,CD₄⁺/CD₈⁺比值升高,增强NK细胞杀伤活性有关^[10,11]。本研究表明TCS可能为一种有效的抗I型单纯疱疹病毒的药物,对单纯疱疹病毒脑炎具有抑制病毒、减轻脑损伤和脑水肿的作用,值得进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

[1] 魏桂荣,张敏.单纯疱疹病毒性脑炎研究进展[J].国外医学内科学分册,2004,31(9):399-402.

[2] 郑永唐,袁昆龙,王金焕,齐瑾,黄生民.用猴艾滋病D型逆转录病毒筛选抗艾滋病药物实验模型的建立及应用[J].中国病毒学,1997,12(1):61-65.

[3] 衣曼,魏克伦,王雪峰,姜丽娟.小鼠单纯疱疹病毒性脑炎模型的建立[J].小儿急救医学,2000,7(1):26-27.

[4] Elliott KAC, Jasper H. Measurement of experimentally induced brain swelling and shrinkage[J]. Am J Physiol, 1949, 157(1): 122-129.

[5] 杜平.医用实验病毒学[M].北京:人民军医出版社,1985,107-109.

[6] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Segal M. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.

[7] 王曼芝,杨亚玲.婴幼儿单纯疱疹病毒性脑炎临床分析[J].中国当代儿科杂志,2000,2(5):349-35.

[8] 琦祖和,蒋效松,杨显荣,李慧云.天花粉蛋白改变DNA构型的活性1. DNA解旋与链结[J].中草药,1999, 30(11):807.

[9] 杨新科,陈章良,段淑敏,魏金平.天花粉蛋白在组织培养上抗病毒作用的研究[J].病毒学报,1990,6(2):219-223.

[10] 周广宇,毕黎琦,高申,郑德明.天花粉蛋白对淋巴细胞亚群的免疫调节作用[J].吉林大学学报(医学版),2003,29(3):289-290.

[11] 田维毅,马春玲,白惠卿.天花粉及其组份对小鼠NK细胞杀伤活性的影响[J].贵州医药,2001,25(11):982-984.

(本文编辑:吉耕中)