

较优于醇提取物。

前期研究发现食用土当归中多个化合物具有抗炎镇痛作用,因此本课题组将总有机酸作为整体进行开发研究。经课题组初步研究表明,总有机酸除了具有抗炎镇痛作用外,还具有一定程度的抑制肿瘤细胞生长作用,且课题组的目的是为了开发有效部位,使有效部位有机酸含量达到50%以上,为5类创新中药的研究提供研究方向和研究思路,这对进一步将总有机酸作为创新药物研究具有一定的意义,其相关的毒性试验有待进一步展开。

参考文献:

[1] 包柏林. 中药九眼独活的研究[J]. 药学实践杂志, 1998, 16(1): 34-38.
[2] 王忠壮, 苏中武, 李承祜. 中药九眼独活的商品调查及生药鉴定[J]. 中国中药志, 1994, 19(12): 707-709.
[3] 彭腾, 董小萍, 邓赟, 等. 栽培食用土当归根的化学成分研究[J]. 中药材, 2005, 28(1): 996-997.
[4] 黄蕾蕾, 熊世平, 周治, 等. 食用土当归挥发油化学成分的研究[J]. 中药材, 2001, 24(4): 274-275.
[5] Lim H, Jung H A, Choi J S, et al. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(9): 1237-1243.
[6] Kang O H, Chae H S, Choi J G, et al. Ent-pimara-8 (14),

15-dien-19-oic acid isolated from the roots of *Aralia cordata* inhibits induction of inflammatory mediators by blocking NF- κ B activation and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 601(1-3): 179-185.
[7] Cho J H, Lee J Y, Sim S S, et al. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010, 23(3): 190-199.
[8] 杨菁, 彭腾, 凌智群, 等. 食用土当归中总有机酸的纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 17-19.
[9] 刘向辉, 宋红儒, 谢人明, 等. 圣脑康丸的抗炎镇痛作用[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 181-183.
[10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 101-102.
[11] 范颖, 曾凡波, 崔小瑞, 等. 绿舒筋多糖的抗炎镇痛作用[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 33-35.
[12] 王文静, 王军, 张森, 等. 血满草提取物抗炎镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 82-184.
[13] 杨宇杰, 吕英超, 于海龙, 等. 颈复康颗粒中挥发油成分抗炎镇痛作用及其机制研究[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2420-2424.
[14] 宋英, 盛蓉, 李涓, 等. 吴茱萸碱治疗痛风的药效学研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 17-18.
[15] 莫佳佳, 徐慕蝶, 杨丹丹, 等. 侗族药羊耳菊醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 258-260.

甘草酸体外抗人巨细胞病毒 AD169 的作用

王永洪, 兰婉莹, 陈恬*

(成都医学院基础医学院, 四川 成都 610500)

摘要:目的 探讨甘草酸体外抗人巨细胞病毒 AD169 的作用。方法 人胚肺成纤维细胞感染人巨细胞病毒后,用细胞病变法(CPE)评价甘草酸的抗病毒作用。并计算甘草酸的半数中毒浓度(TC₅₀),病毒半数抑制浓度(IC₅₀)以及治疗指数(TI),并与更昔洛韦抗病毒作用相比较。**结果** 甘草酸的TC₅₀为7.65 mg/mL, IC₅₀为311.55 mg/L, TI为24.55;更昔洛韦的TC₅₀为0.98 mg/mL, IC₅₀为44.15 mg/L, TI为22.20。**结论** 甘草酸的TC₅₀比更昔洛韦的TC₅₀高出将近8倍,其治疗指数也优于更昔洛韦,故甘草酸具有较好的抗人巨细胞病毒应用前景。

关键词: 甘草酸;人巨细胞病毒 AD169;抗病毒活性

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2121-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.006

Antiviral effects of glycyrrhizic acid on human cytomegalovirus AD169 strain

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173637);成都医学院“大学生创新实验计划”项目(CXXS201409, CXJS201301)

作者简介: 王永洪(1993—),男。Tel: 18328429808, E-mail: 2660064131@qq.com

*通信作者: 陈恬(1967—),女,教授,博士,硕士生导师,研究方向为抗感染药理。Tel: 18010518322, E-mail: chentianchina@

in vitro

WANG Yong-hong, LAN Wan-ying, CHEN Tian*

(Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the antiviral effects of glycyrrhizic acid on human cytomegalovirus AD169 strain *in vitro*. **METHODS** Cytopathic effect (CPE) was used to estimate the inhibitory effects of glycyrrhizic acid on human cytomegalovirus in infected human embryo lung fibroblasts (MRC-5) and to obtain the median toxic concentration (TC₅₀), median inhibition concentration (IC₅₀) and therapeutic index (TI) of glycyrrhizic acid. Ganciclovir was used as the control drug. **RESULTS** The TC₅₀, IC₅₀ and TI of glycyrrhizic acid were 7.65 mg/mL, 311.55 mg/L and 24.55, respectively. The TC₅₀, IC₅₀ and TI of Ganciclovir were relatively 0.98 mg/mL, 44.15 mg/L and 22.20. **CONCLUSION** TC₅₀ of glycyrrhizic acid is nearly 8 times higher than that of Ganciclovir and therapeutic index of glycyrrhizic acid is superior to Ganciclovir. Therefore, glycyrrhizic acid possesses a better application prospect on inhibiting human cytomegalovirus.

KEY WORDS: glycyrrhizic acid; human cytomegalovirus AD169 strain; antiviral activity

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属于疱疹病毒科, 又称为人疱疹病毒 5 型, 是线性双链 DNA 病毒^[1]。在世界范围内, 成人 HCMV 抗体阳性率高达 60% ~ 95%, 最常见的巨细胞病毒相关疾病是先天性巨细胞病毒感染, 这是造成儿童神经系统发育异常的重要原因^[2]。由于 HCMV 是条件致病性病原微生物, 免疫功能正常的人群一般是隐性感染但可以长期携带病毒, 只有在机体免疫功能低下时易发生显性感染, 因此胎儿和免疫功能低下的人群是 HCMV 感染的主要对象^[3]。目前临床用于治疗 HCMV 感染的药物大多数有较强的毒副作用。HCMV 感染的首选药物更昔洛韦, 在动物实验中有致畸和致癌作用, 同时临床上已有耐药 HCMV 毒株的产生^[4]; 而 HCMV 疫苗研究也尚未取得突破性进展^[5], 因此寻找新的有效抗 HCMV 药物有重要意义。

甘草酸 (glycyrrhizic acid), 又称甘草甜素 (glycyrrhizin) 是中药甘草根部的提取物, 是甘草的主要有效成分之一, 易溶于热水, 可水解成两分子的葡萄糖醛酸和一分子的甘草次酸^[6]。甘草酸是一种高甜度的甜味剂, 广泛应用于食品, 饮料和糖果的生产, 还可应用于化妆品中^[7]。现代实验研究表明甘草酸具有抗炎症、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、保肝和稳定细胞膜等作用^[8]。目前关于甘草酸是否具有抗 HCMV 的效果尚未明确, 本实验主要采用 CPE 法探讨甘草酸在体外抗 HCMV 的作用, 初步研究甘草酸的抗 HCMV 效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 人胚肺成纤维细胞 (MRC-5) 购于上海优选生物科技有限公司, 实验细胞代数数为 10 ~ 25 代。细胞培养液的配比为 89% 最低限度基本培养基 (MEM) + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)。细胞维持液的配比为 96% MEM 培养基 + 3% 胎牛血清 + 1% 双抗。细胞冻存液的配制为 90% 胎牛血清 + 5% 二甲基亚砷 + 5% MEM 培养基。本实验使用的毒株是 HCMV-AD169, 由成都医学院病原微生物教研室提供。病毒使用前在 MRC-5 细胞上连续感染 3 ~ 4 次, 以提高病毒滴度。在细胞病变达到 90% 以上时收毒, 将培养瓶中的细胞反复冻融 3 次, 用 0.22 μm 微孔滤器除菌过滤后, 加入 10% 的胎牛血清分装保存。

1.1.2 药物 注射用更昔洛韦, 商品名丽科伟, 由湖北科益药业股份有限公司生产, 产品批号为 150707-2, 性状为干粉, 0.15 g 每支。甘草酸购于北京坛墨质检科技有限公司, 产品批号为 20140818, 性状为干粉, 20 mg 每支。

1.1.3 主要的试剂 MEM 培养基, 购于南京凯基生物科技发展有限公司, 产品批号为 151025, 500 mL 每瓶; 胎牛血清, 美国 GIBCO 公司, 生产批号为 1527494, 500 mL 每瓶; 0.25% 胰酶 (美国 Hyclone 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) (美国 Sigma 公司); 二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司); 双抗 (美国 Hyclone 公司); 96 孔板 (德国 COSMO

公司); 0.22 μm 滤器 (美国 Milipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HCMV 病毒滴度的测定 用 0.25% 胰酶将 MRC-5 消化离心后, 加入配制好的细胞培养液调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$, 铺于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μL, 放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。放置 24 h 后细胞生长至单层, 用枪头吸弃每孔的培养液。将 HCMV 病毒原液用维持液按 10 倍传递稀释法^[9] 稀释 7 个梯度 (稀释倍数分别为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})。每个梯度设 8 个复孔, 每孔加 100 μL, 吸附 2 h 后弃去病毒液体, 每孔加 100 μL 细胞维持液, 同时设 MRC-5 细胞对照 8 孔。放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱, 每日在镜下观察细胞病变情况并记录出现病毒致细胞病变效应 (CPE) 的孔数, 待病变稳定时记录实验结果 (一般在 7 d 左右)。CPE 程度的记录方法^[10]: “0” 表示无细胞病变; “1” 表示 ≤25% 的细胞出现病变; “2” 表示 25% ~ 50% 的细胞出现病变; “3” 表示 50% ~ 75% 的细胞出现病变; “4” 表示 75% ~ 100% 的细胞出现病变。最后用 Reed-Muench 方法^[11] 计算病毒的 50% 组织细胞感染量 (TCID₅₀)。Reed-Muench 计算公式为: $\text{TCID}_{50} = 10^a$, $a = \text{细胞病变率大于 50\% 的病毒稀释度的对数} + (\text{细胞病变率大于 50\% 的百分数} - 50\%) / (\text{细胞病变率大于 50\% 的百分数} - \text{细胞病变率小于 50\% 的百分数}) \times \text{稀释系数的对数}$ 。

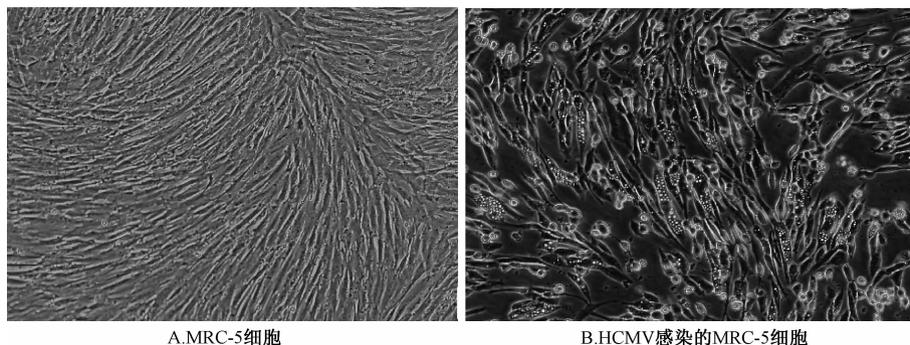
1.2.2 药物细胞毒性的测定 将 MRC-5 消化离心后用细胞培养液调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL, 放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。待细胞长成单层时吸弃孔中的培养液, 用细胞维持液将甘草酸稀释成 12、6、3、1.5、0.75 mg/mL, 将更昔洛韦稀释成 3、1.5、0.75、0.375、0.187 mg/mL, 每孔加入 100 μL, 每个稀释度设 4 个复孔, 同时设 MRC-5 细胞对照 4 孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每天观察并记录在药物不同稀释度下出现的 CPE 情况。3 d 后细胞病变情况基本稳定, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中放置 4 h, 用枪头吸弃各孔的液体后, 每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜, 在微量振荡器上振荡 10 min, 然后在 490 nm 的波长下, 用酶标仪测各孔的吸光度 A 值。计算药物不同质量浓度下的细胞存活率和细胞病变率, 细胞存活率 = 药

物处理组 A 值/细胞对照组 A 值 × 100%, 细胞病变率 = 100% - 细胞存活率, 最后用 Reed-Muench 方法计算甘草酸和更昔洛韦的半数中毒浓度 (TC₅₀)。1.2.3 药物对 HCMV 增殖的抑制作用 调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$, 加入 96 孔板中, 每孔加入 100 μL, 放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。待细胞长成单层后用枪头吸弃孔中的培养液, 每孔加入 100 μL 100 倍 50% 组织细胞感染量 (100 TCID₅₀) 的 HCMV 病毒感染细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中放置 2 h 后吸弃孔中的病毒液体, 用细胞维持液将甘草酸稀释成 2 000、1 000、500、250、125、62.5 mg/L, 将更昔洛韦稀释成 500、250、125、62.5、31.25、15.63 mg/L, 每孔加 100 μL, 药物不同质量浓度各设 4 个复孔, 同时设 MRC-5 细胞对照组和 HCMV 病毒对照组各 4 个复孔。置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养, 每天在镜下观察不同质量浓度药物处理组的细胞病变情况, 待病毒对照组的病变达 90% 以上时, 记录各孔的 CPE 情况, 记录方法与感染性滴度的测定相同。然后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中放置 4 h, 用枪头吸弃各孔的液体后, 每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜, 在微量振荡器上振荡 10 min, 然后在 490 nm 的波长下, 用酶标仪测各孔的吸光度 A 值。最后用 Reed-Muench 方法计算甘草酸和更昔洛韦的病毒半数抑制浓度 (IC₅₀)。以治疗指数 (TI) 评价甘草酸和更昔洛韦的体外抗 HCMV 效果, $\text{TI} = \text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。

1.2.4 统计分析 用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 不同质量浓度药物处理组与对照组间 CPE 情况的比较使用秩和检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCMV 病毒滴度 正常的 MRC-5 细胞长成单层后在镜下呈漩涡样排列, 细胞呈条梭状生长, 细胞排列规则紧密, 细胞边界清晰, 胞质中没有黑色小颗粒。感染上人巨细胞病毒后, 细胞开始变圆, 胞质膨胀变亮, 病变细胞可聚集在一起, 结果见图 1。在细胞和病毒状态都良好的情况下, 测定病毒感染性滴度。不同稀释度下, 病毒感染的判读结果见表 1, 用 Reed-Muench 方法计算病毒感染性滴度 TCID₅₀。病毒的 TCID₅₀ = $10^{-4.60}$, 即接种病毒滴度为 $10^{-4.60}$ 的病毒 100 μL 每孔, 可以使 50% 的细胞发生明显病变。



A.MRC-5细胞 B.HCMV感染的MRC-5细胞

图1 HCMV 感染前后的 MRC-5 细胞 (×100)

Fig.1 MRC-5 cells before and after HCMV infection (×100)

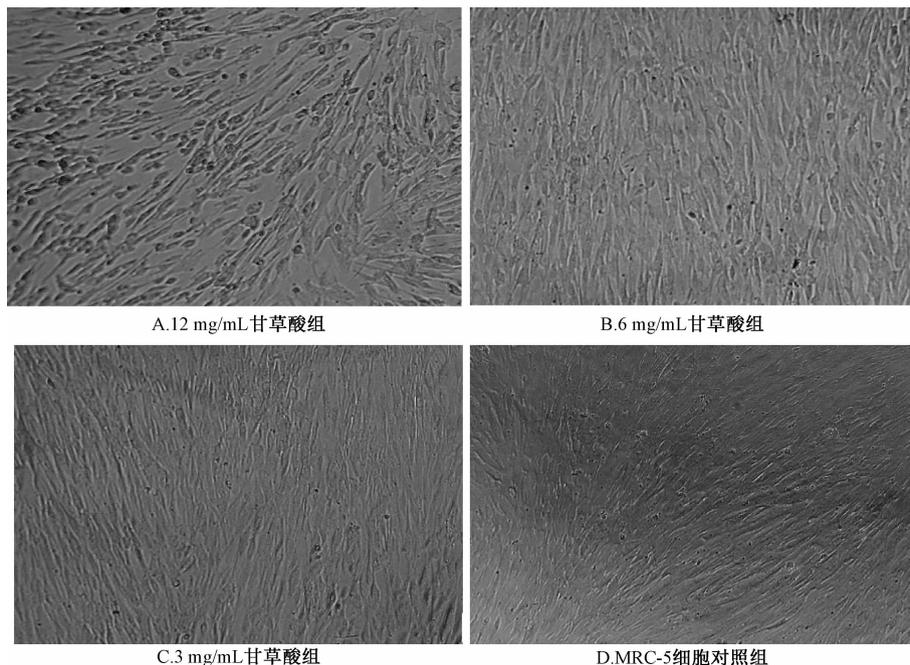
表1 HCMV 病毒滴度的测定

Tab.1 Determination of HCMV virus titer

病毒稀释度	孔数/孔	观察结果		累计孔数		感染比	感染率/%
		CPE	Non-CPE	CPE	Non-CPE		
10^{-1}	8	8	0	33	0	33/33	100.00
10^{-2}	8	8	0	25	0	25/25	100.00
10^{-3}	8	7	1	17	1	17/18	94.44
10^{-4}	8	5	3	10	4	10/14	71.43
10^{-5}	8	3	5	5	9	5/14	35.71
10^{-6}	8	2	6	2	15	2/17	11.76
10^{-7}	8	0	8	0	23	0/23	0

2.2 药物的细胞毒性 将高质量浓度的甘草酸和更昔洛韦加入细胞后,在光镜下大部分的细胞从条梭状开始收缩变圆,多散在分布,细胞间隙明显增大,胞质里出现许多细小颗粒,和病毒感染后的病变有较大区别,随着药物质量浓度的降低细胞毒性作用明显减弱,结果见图2。甘草酸和更昔洛韦的药物

质量浓度分别在3、0.75 mg/mL以下时细胞病变率均明显小于50%。将不同质量浓度药物处理组分别与MRC-5细胞对照组比较,当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,结果见表2。采用Reed-Muench法计算甘草酸和更昔洛韦的半数中毒浓度(TC_{50}),计算结果分别为7.65 mg/mL和0.98 mg/mL。



A.12 mg/mL甘草酸组

B.6 mg/mL甘草酸组

C.3 mg/mL甘草酸组

D.MRC-5细胞对照组

图2 甘草酸对 MRC-5 的毒性作用 (×100)

Fig.2 Toxic effects of glycyrrhizic acid on MRC-5 (×100)

表2 不同质量浓度的甘草酸和更昔洛韦对 MRC-5 的细胞毒性作用 (CPE 法)

Tab.2 Cytotoxicity of different concentrations of glycyrrhizic acid and Ganciclovir on MRC-5 (CPE)

组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	4个复孔的 CPE				细胞病变率/%
甘草酸组	12	3	4	3	4	81.25*
甘草酸组	6	2	2	2	1	33.00*
甘草酸组	3	1	1	1	1	15.50*
甘草酸组	1.5	1	1	0	1	7.35
甘草酸组	0.75	0	1	1	0	4.00
更昔洛韦组	3	4	4	4	4	91.50*
更昔洛韦组	1.5	3	3	4	3	75.32*
更昔洛韦组	0.75	2	2	1	2	34.15*
更昔洛韦组	0.375	1	1	1	1	18.30*
更昔洛韦组	0.187	1	0	1	1	8.43
细胞对照组	-	0	0	0	0	-

注:与细胞对照组比较,* $P < 0.05$

2.3 药物对 HCMV 致细胞病变的抑制效果

MRC-5 细胞对照组的细胞形态良好,排列规则紧密,见图 3F。HCMV 病毒对照组细胞大部分变圆变大,聚集到一起,病变程度大于 90%,见图 3E。

甘草酸药物质量浓度为 2 000 ~ 500 mg/L 时,对 HCMV 致细胞病变的抑制率明显大于 50%,随着甘草酸药物质量浓度的下降,对 HCMV 增殖的抑制效果逐渐减弱。更昔洛韦的药物质量浓度在 500 ~ 62.50 mg/L 内对 HCMV 致细胞病变有较强的抑制作用,结果见图 3 和表 3。由于多次重复实验发现,虽然在显微镜下 MRC-5 细胞对照组的细胞形态良好, HCMV 病毒对照组的细胞病变率达 90% 以上,但是 MTT 法测得的吸光度 A 值却始终是 HCMV 病毒对照组的 A 值高于 MRC-5 细胞对照组,见图 4。鉴于 CPE 法和 MTT 法结果不平行,且用 CPE 法时 MRC-5 细胞对照组与 HCMV 病毒对照组间对照成立,故采用 CPE 法记录实验结果。将不同质量浓度药物处理组分别与 HCMV 病毒对照组比较,当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,结果见表 3。用 Reed-Muench 法计算甘草酸和更昔洛韦的病毒半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 311.55 mg/L 和 44.15 mg/L。根据 $TI = TC_{50}/IC_{50}$, 计算得出甘草酸的治疗指数为 24.55,更昔洛韦的治疗指数为 22.20。

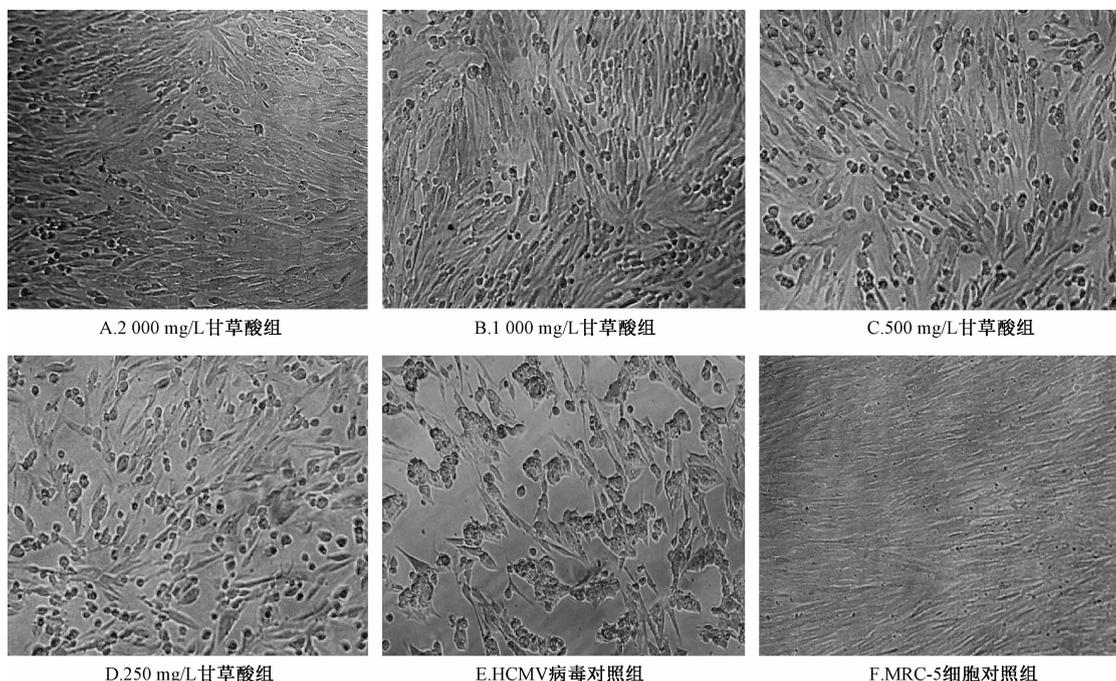


图3 不同质量浓度的甘草酸对 HCMV 的抑制效果 (×100)

Fig.3 Inhibitory effects of different concentrations of glycyrrhizic acid on HCMV (×100)

3 讨论

HCMV 在世界范围内引起广泛感染,中国育龄妇女的 HCMV 抗体阳性率为 96.8%^[12]。病毒的传播途径较多,如唾液,尿液,精液,乳汁,血液和

胎盘传播等^[13]。HCMV 感染后是否出现症状主要取决于病毒的感染量、患者自身免疫力及有无伴随疾病等因素有关^[14]。妊娠妇女感染 HCMV 后病毒常通过胎盘传给胎儿,导致流产、早产、死胎以及

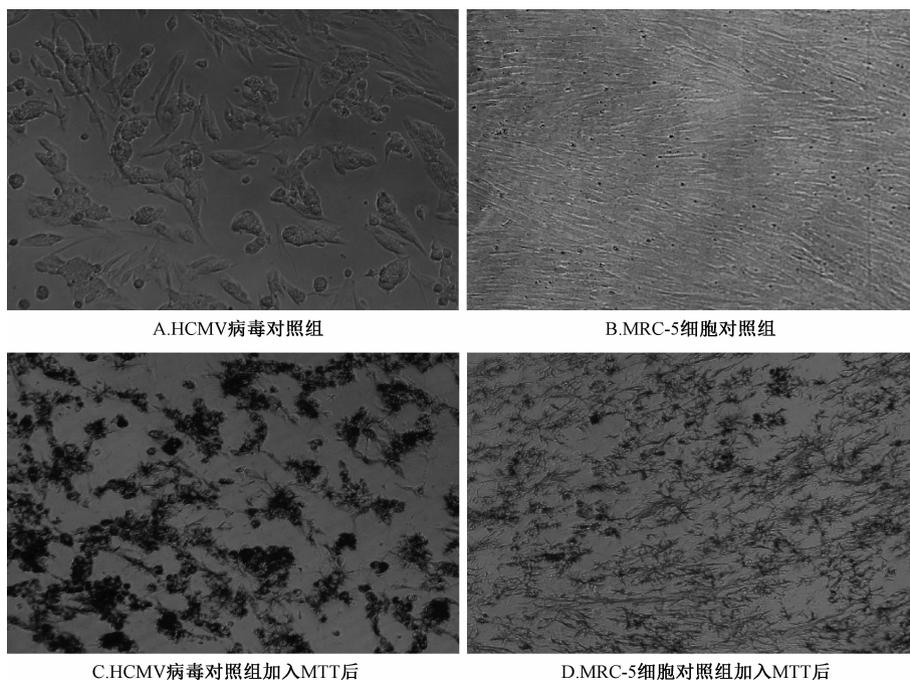


图4 HCMV病毒对照组和MRC-5细胞对照组用CPE法和MTT法的结果比较(×100)

Fig. 4 Comparison of the results of CPE method and MTT method in HCMV control group and MRC-5 control group (×100)

表3 不同质量浓度的甘草酸和更昔洛韦对HCMV的抑制效果(CPE法)

Tab. 3 Inhibitory effects of different concentrations of glycyrrhizic acid and Ganciclovir on HCMV (CPE)

组别	质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	4个复孔的CPE				病毒抑制率/%
		0	1	0	1	
甘草酸组	2 000	0	1	0	1	96.75*
甘草酸组	1 000	1	1	1	1	85.25*
甘草酸组	500	2	1	2	2	72.50*
甘草酸组	250	3	3	2	3	41.35*
甘草酸组	125	3	4	3	3	32.50*
甘草酸组	62.5	4	3	4	3	18.00*
更昔洛韦组	500	0	0	1	0	97.50*
更昔洛韦组	250	1	1	0	1	91.75*
更昔洛韦组	125	2	1	2	2	77.34*
更昔洛韦组	62.5	3	2	3	3	64.53*
更昔洛韦组	31.25	3	3	3	3	35.45*
更昔洛韦组	15.63	3	4	3	3	21.50*
病毒对照组	-	4	4	4	4	-

注：与病毒对照组比较，*P<0.05

幸存胎儿先天性感染，遗留严重的后遗症^[15]。器官移植的患者若接受HCMV抗体阳性者的器官，则有很大的可能发生HCMV感染，导致移植手术的失败^[16]。HCMV的感染是艾滋病患者最常见的机会性感染和死亡原因之一^[17]。

甘草酸是中药甘草的主要有效成分之一。已有许多研究表明，甘草酸具有良好的抗病毒活

性。在体外细胞模型上，甘草酸有抗EB病毒(EBV)复制的作用，病毒半数抑制浓度为0.04 mmol/L，发挥作用的阶段可能是EBV复制周期的早期，对病毒的吸附没有影响，也没有直接灭活病毒的作用^[18]。甘草酸在体外能有效的抑制水痘-带状疱疹病毒(VZV)的复制，病毒半数抑制浓度是0.71 mmol/L，治疗指数为30。此外，用2.4 mmol/L的药物浓度处理病毒，在37℃的环境中放置30 min，可以使99%以上的VZV病毒失活^[19]。甘草酸可以抑制丙肝病毒颗粒的释放，可能的机制是甘草酸抑制细胞膜的1B组磷脂酶A2(PLA2G1B)；同时甘草酸还可以增强干扰素对丙肝病毒的作用^[20]。在单纯疱疹病毒1型(HSV-1)吸附进入细胞后，加入甘草酸可以明显的减少病毒空斑形成，IC₅₀是0.56 mmol/L。甘草酸既不能抑制HSV-1的吸附，也不能直接灭活HSV-1^[21]。

本实验用HCMV感染MRC-5细胞作为甘草酸体外抗病毒的细胞模型。最初采用CPE法和MTT法来综合评价甘草酸和更昔洛韦的抗HCMV作用，但在多次重复实验中发现MTT法评价HCMV病毒对照组和MRC-5细胞对照组的结果时，MTT法测得的A值与显微镜下观察到的相应的细胞病变程度不一致(见图4)，故本实验采用CPE法判定实

验结果。导致 CPE 法与 MTT 法检测结果不平行的原因可能是 HCMV 感染后细胞虽会发生明显病变,但线粒体损伤并不明显。

用 CPE 法判定实验结果,计算出甘草酸和更昔洛韦的 TC_{50} 分别为 7.65 mg/mL 和 0.98 mg/mL。甘草酸和更昔洛韦的 IC_{50} 分别为 311.55 mg/L 和 44.15 mg/L。根据 $TI = TC_{50}/IC_{50}$, 甘草酸的治疗指数为 24.55, 更昔洛韦的治疗指数为 22.20。虽甘草酸的 IC_{50} 明显高于更昔洛韦的 IC_{50} , 但甘草酸的 TC_{50} 为 7.65 mg/mL 比更昔洛韦的 TC_{50} 高出将近 8 倍, 甘草酸的治疗指数也大于更昔洛韦, 故甘草酸在体外具有较好的抗人巨细胞病毒作用。在临床上甘草酸类药物有多种生物活性, 不良反应比更昔洛韦少。目前使用的抗 HCMV 药物大多都是核苷类衍生物, 主要的缺点是毒副作用大, 抗病毒谱窄和易造成 HCMV 耐药等。甘草酸类药物长期应用于临床, 尚未发现其对人体有严重的毒副作用, 同时甘草酸还具有广谱抗病毒作用, 且原料易获得、价格低廉。因此, 甘草酸具有较好的抗 HCMV 应用前景, 值得进一步研究。

参考文献:

[1] Britt W J, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins [J]. *Hum Immunol*, 2004, 65(5): 395-402.

[2] Dollard S C, Grosse S D, Ross D S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection[J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(5): 355-363.

[3] Neuwirth J, Gutman I, Hofeldt A J, et al. Cytomegalovirus retinitis in a young homosexual male with acquired immunodeficiency[J]. *Ophthalmology*, 1982, 89(7): 805-808.

[4] Lurain N S, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(4): 689-712.

[5] Wu S J, Villarreal D O, Shedlock D J, et al. Synthetic DNA approach to cytomegalovirus vaccine/immune therapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 848: 131-148.

[6] Wang L, Yang R, Yuan B, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 310-315.

[7] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 709-724.

[8] Li J Y, Cao H Y, Liu P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 872139.

[9] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990, 267.

[10] 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.

[11] 中国医学科学院流行病学防治研究所. 常见病毒实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1978, 34.

[12] Chen J, Hu L, Wu M, et al. Kinetics of IgG antibody to cytomegalovirus (CMV) after birth and seroprevalence of anti-CMV IgG in Chinese children [J]. *Viol J*, 2012, 9: 304.

[13] Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1): 76-98.

[14] 刘晓林, 王同展, 王海岩, 等. 人巨细胞病毒感染的危害及其疫苗研发进展 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(10): 973-976.

[15] Goderis J, De L E, Smets K, et al. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review [J]. *Pediatrics*, 2014, 134(5): 972-982.

[16] Grundy J E, Super M, Sweny P, et al. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: Reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus [J]. *Lancet*, 1988, 332(8603): 132-135.

[17] Cannon M J, Schmid D S, Hyde T B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection [J]. *Rev Med Virol*, 2010, 20(4): 202-213.

[18] Lin J C. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 2003, 59(1): 41-47.

[19] Baba M, Shigeta S. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 1987, 7(2): 99-107.

[20] Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68992.

[21] 赵高年, 谢鹏, 李平. 甘草甜素对 HSV-1 抑制作用的实验研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(2): 243-245.