

疣毒净霜对体外人乳头瘤病毒的影响※

● 江光明^{1*} 邱 茗¹ 吴元胜²

摘 要 目的:观察中药疣毒净霜在体外对 HPV 的影响,以阐明其作用机理。方法:从临床切除的 CA 标本中提取 HPV-DNA,加入中药疣毒净霜后,用 FQ-PCR 法测定其病毒含量。结果:含 HPV 的试管加入疣毒净霜后,经 3 次反复测试,24h 即不能测出 HPV,而对照管及非相关中药管均含同等浓度的 HPV-DNA 拷贝。结论:疣毒净霜具有明确的杀灭 HPV 的作用,这可能是它治疗 CA 的机制。

关键词 尖锐湿疣 HPV 疣毒净霜 FQ-PCR

人乳头瘤病毒(HPV)是一种致尖锐湿疣(CA)的 DNA 病毒,人类又是它的唯一宿主^[1],故难以采用动物模型法进行治疗药物的药效学试验。近年来临床上我们一直应用中药疣毒净系列制剂治疗 CA 取得了较好疗效^[2,3]。最近我们在临床观察中发现部分患者单用疣毒净霜治疗 CA 也可使疣体明显消退,这种单纯局部处理能治愈疾病的机理,有可能是它具有杀灭病毒的功效。为从分子水平探讨疣毒净霜治疗 CA 的作用机理,我们采用核酸荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)观察了疣毒净霜对离体 CA 皮损中 HPV-DNA 的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 HPV 来源 来自我院皮肤性病专科门诊收集符合临床标准的发生于外阴部位的典型新鲜 CA 疣体标本 2 份(分别取自 2 个 CA 患者)。诊断标准:参照全国性病防治中心叶干运等主编的《实用性病学》标准^[4]。标本切取后,用生理盐水洗去血液,每 1 份用电子天平精确称其重量后,在无菌条件下,将标本剪碎,加生理盐水研磨成匀浆备用。2 份标本分别制备。

※基金项目 广东省自然科学基金课题(No:00356)

*作者简介 江光明,男,副主任医师,医学博士,主要从事中西医结合皮肤性病学的临床与实验研究。

•作者单位 1. 广东省深圳市罗湖区医院(518001);2. 广东省中医院(510120)

1.1.2 实验药物 疣毒净霜(由鸦胆子、紫草、莪术等组成)由广东省中医院制剂室提供,同时用该院生产的中药止咳糖浆(由枇杷叶、桔梗、百部、远志等组成)、生理盐水作为非针对性用药对照和空白对照。采用双盲法,将药物分别标号。

1.1.3 试剂与仪器 采用中山大学达安基因诊断中心提供的荧光定量 HPV6/11, HPV16/18 诊断试剂盒。仪器:美国 PE 公司生产的 7700Sequence Petector 荧光定量 PCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 方法 取 CA 组织匀浆 0.6ml,分别加中药标本 2.4ml,对照管加生理盐水 2.4ml,置 4℃ 冰箱内,按 40ul/mg 加入浓度为 500ug/ml 的 DNA 提取液,充分震荡摇匀,56℃ 温浴 2h,37℃ 过夜。沸水裂解 10min 后离心 15000r/min 10min,提取 DNA。第 1 次实验及第 2 次实验系同一病人的 CA 组织匀浆,第 3 次实验系另一病人的标本匀浆。

1.2.2 FQ-PCR 反应步骤 取 DNA 0.2ml 入薄壁反应管中,同时加入一定浓度的引物、F-PROBE、dNTP, DNA 聚合酶及缓冲液等,放入 PE7700 荧光 PCR 仪,按下列温度运行:93℃ 2min 预变性;93℃ 在 0.5min;55℃ 1min,40 个循环。定量结果由电脑软件自动分析计算出初始拷贝数的定量结果。

2 结 果

见表 1,2,3。两份标本均为 HPV6/11 型感染。

疣毒净管 3 次实验结果 HPV 拷贝量均为 0。

表 1 第 1 次实验结果

时间/(d)	对照中药管 (拷贝·ml ⁻¹)	空白对照管 (拷贝·ml ⁻¹)	疣毒净管 (拷贝·ml ⁻¹)
1	3.1 × 10 ⁷	2.9 × 10 ⁷	0
2	2.9 × 10 ¹	2.8 × 10 ⁷	0
5	2.5 × 10 ⁷	2.5 × 10 ⁷	0
7	2.5 × 10 ⁷	2.5 × 10 ⁷	0
13	1.8 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁷	0

表 2 第 2 次实验结果

时间(d)	对照中药管 (拷贝·ml ⁻¹)	疣毒净管 (拷贝·ml ⁻¹)
1	2.9 × 10 ⁷	0
2	2.7 × 10 ⁷	0
5	2.5 × 10 ⁷	0
7	2.3 × 10 ⁷	0
13	1.9 × 10 ⁷	0

表 3 第 3 次实验结果

时间(d)	对照中药管 (拷贝·ml ⁻¹)	空白对照管 (拷贝·ml ⁻¹)	疣毒净管 (拷贝·mL ⁻¹)
1	1.8 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁷	0
2	1.7 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁷	0
5	1.3 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	0
7	1.2 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁷	0

3 讨 论

据报道我国 CA 发病率仅次于淋病,居第 2 位^[5]。近几年发病率仍居高不下。CA 的长期存在可致癌变,约 5%~15% 的生殖器癌与此有关^[6]。目前的治疗多采用局部物理或药物治疗。但无论化学的、物理的或药物的方法均是以局部破坏瘤体为目的,破坏 CA 的上皮细胞使之坏死脱落,除形成局部的创面、痛苦、易感染外,对 HPV 无杀灭作用。采用激光、电灼、手术切除及局部外涂药物等疗法虽能将 CA 临床治愈,但无法杀灭病毒,病情易潜伏和复发。目前全世界尚无有效的杀灭 HPV 的药物,在我国采用中医药的抗病毒作用及对机体免疫功能调节有一定的优势,是目前防治 CA 的热点。

中医认为 CA 的病因病机是由于房事不洁或间接接触污秽之品,湿热淫毒从外侵入外阴皮肤粘膜,导致肝经郁热,气血不和,湿热毒邪搏结而成疣。CA 以局部病变为主,故外治法在治疗中占重要地位。疣毒净是我们近年研制用于治疗 CA 的系列中药制剂,疣毒净(外涂)霜的主要药物是鸦胆子、紫草、莪术等,具有腐蚀疣体、清热解毒、祛瘀散结、收敛止痛的作用,临床治疗取得了较好疗效^[7]。其处方中的鸦胆子据《中药志》记载:“鸦胆子主治疣赘”,对鸦胆子外用治疗疣赘早有记载。药理研究发现本品含生物碱,甙

类,鸦胆子油,对赘疣细胞可使细胞核固缩,细胞坏死,脱落。近代还发现鸦胆子制剂可用于治疗乳头瘤、指甲癣、恶性肿瘤等。莪术含挥发油,近年从中分离出抗癌有效成分莪术醇、莪术双酮。除直接抗癌作用以外,还可使宿主特异性免疫功能增强而获得明显的免疫保护效应。紫草含紫草醌,有抗肿瘤作用,对绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎有一定的治疗作用^[8]。

由于引起 CA 的 HPV 不能寄生在其他动物体内(仅能寄生在人身),目前尚无成熟、公认的动物模型来进行药效学研究,而 FQ-PCR 融汇了 PCR 技术的高灵敏性、DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确定量等优点,直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化以获得定量的结果,不需要 PCR 后处理或电泳检测,完全闭管操作,克服了常规 PCR 技术易污染和不能定量,探针杂交灵敏性不高、分离和洗脱条件不易控制等不足,极大地提高了试验的特异性与灵敏性,保证了实验的可靠性,在中医药研究领域正得到广泛应用。

本研究发现 CA 标本中的病毒在 4℃ 冰箱中存活至 13d 仍可测出为 1.0~1.9 × 10⁷ 拷贝/mL。CA 的组织匀浆在加入中药疣毒净霜后,自 24h 至 13d, FQ-PCR 恒定地不能再检出病毒,而空白对照管及中药对照管却仍继续维持原有浓度,说明中药疣毒净霜在体外能快速有效地破坏病毒 DNA,具有杀灭病毒的能力。本实验设空白对照及非相关中药对照,并经过 3 次重复测试,其结果均相同,有一定的重复性及可信性。疣毒净霜在临床上对部分患者单纯外用即能治愈 CA,而且极少复发这一事实的机理,可能是由于它具有直接降解病毒 DNA,杀灭病毒的功能所致。本研究只是初步从分子水平探讨疣毒净霜治疗 CA 的作用机理,对不同型别的病毒作用机制并不清楚,本研究尚需扩大标本量并在许多环节进一步完善和深入。

参考文献

- [1]周坤主编. 分子生物学与中药开发[M]. 北京:人民卫生出版, 2000:276.
- [2]江光明,查旭山,禡国维. 疣毒净制剂治疗尖锐湿疣的远期疗效观察[J]. 新中医,2001,33(6):16-17.
- [3]禡国维. 疣毒净治疗尖锐湿疣的多中心临床观察[J]. 广州中医药大学学报,1998,15(4):251-254.
- [4]叶干运,徐文严,邵长庚,等. 实用性病学[M]. 第 2 版,北京:人民卫生出版社,1991:89-95.
- [5]叶干运. 性传播疾病诊断及预防[M]. 广州:广东科技出版,1996:25.
- [6]吴志华. 现代性病学[M]. 广州:广东科技出版社,1996:158.
- [7]练露云,范瑞强,禡国维. 疣毒净外用治疗尖锐湿疣 30 例[J]. 陕西中医,2006,27(8):937-939.
- [8]雷载权. 中药学[M]. 上海科技出版社,1995:80-218.