

## 虎杖乙酸乙酯萃取部分抗人疱疹病毒研究\*

王志洁 方学韞<sup>1</sup> 程仲敏<sup>2</sup> (武汉 430071 湖北医科大学病毒研究所,<sup>1</sup> 武汉 430071 湖北医科大学附属二院中医科)

**摘要** 目的:HSV可引起多种疾病,阿昔洛韦(ACV)治疗 HSV感染效果虽好,但易出现耐药毒株;新药 Cidofovir 对 ACV 耐药毒株效果好,毒性也大。HSV 疫苗临床实验效果也不好。为了解决这些问题,必须继续开发新药。虎杖是一种抗病毒范围广的中药,为了了解虎杖的抗病毒性能并开发利用,我们对虎杖乙酸乙酯萃取部分的抗 HSV 药效进行了研究。方法:我们以 ACV 为阳性对照,利用病毒细胞病变抑制及空斑减数实验观察了药效,并且用中效作用原理对药效进行了分析。结果:在 HEP-2 细胞系统中,ACV 对 HSV-1 F 株直接杀灭、增殖的抑制及感染阻断的 ED<sub>50</sub> 分别为 13.22, 9.09 和 8.71 μg/ml;晶 IV 的相应数值分别为 0.09, 0.07 和 0.03 μg/ml;晶 IV 的三个治疗指数(TI)分别为 ACVTI 的 307, 272 和 609 倍。ACV 对 HSV-2 333 株直接杀灭、增殖抑制及感染阻断的 ED<sub>50</sub> 分别为 16.45, 10.85 和 18.62 μg/ml;晶 IV 的相应数值分别为 0.07, 0.09 和 2.29 μg/ml;晶 IV 的三个 TI 分别为 ACVTI 的 498, 251 和 17 倍。结论:晶 IV 抗 HSV 药效比 ACV 强,毒性比 ACV 小,值得开发利用。

**关键词** 虎杖;人疱疹病毒

### Research about antiviral effect of ethyl acetate component of *Rhizoma polygoni cuspidati* on herpes virus hominis

Wang Zhijie (Wang ZJ), Fang Xieyun (Fang XY), Chen Zhongmian (Chen ZM) (Department of Oncogenic Virus, Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** Herpes simplex virus can induce many diseases, although therapeutical effect of ACV on HSV infection is good, but resistant strains against ACV appear easily, and new drug cidofovir can cure the infection of ACV resistant strains, but it has obvious toxicity, the results of clinical trials of HSV vaccines are not good. In order to resolve these problems, it is necessary to exploit new antiherpes drugs continuously. *Polygonum cuspidati* is a Chinese medicinal herb with wide antiviral range, understanding and exploiting its antiviral property, we observed antiherpes effects of ethylacetate extract component of it. **METHODS:** With ACV as positive control, we investigated antiherpes effects of ethyl acetate extract component, i.e., crystalline III and crystalline IV, by way of CPE inhibition and plaque reduction assays, and analyzed effects with median effect principle. **RESULTS:** In HEP-2 cell system: the ED<sub>50</sub>s of direct virucidal activity, the inhibition effects on the multiplication and infection of HSV-1 F strain of ACV are 13.22 μg/ml, 9.09 μg/ml and 8.71 μg/ml respectively, the corresponding figures of crystalline IV are 0.09, 0.07 and 0.03 μg/ml respectively. The treatment indices of crystalline IV are 307, 272, 609 times of ACV TIs. The ED<sub>50</sub>s of direct virucidal activity, the inhibition effects on the multiplication and infection of HSV-2 333 strain are 16.45 μg/ml, 10.85 μg/ml and 18.62 μg/ml respectively, the corresponding figures of crystalline IV are 0.07 μg/ml, 0.09 μg/ml and 2.29 μg/ml respectively. The treatment indices of crystalline IV are 498, 251, 17 times of ACV TIs. **CONCLUSION:** The antiherpes effects of crystalline IV is stronger than ACV, and the toxicity of crystalline IV is less than ACV, it should be worth exploitation.

**KEY WORDS** rhizoma polygoni cuspidati, pharmacology, herpes virus hominis

I 型人类单纯疱疹病毒可引起唇疱疹、疱疹性角膜结膜炎、新生儿脑炎等多种疾病, II 型人类单纯疱疹

\* 本课题由湖北省卫生厅科教处资助

病毒可引起外阴疱疹,是宫颈癌的协同诱因,也是性传播性病原体之一。阿昔洛韦(aciclovir, ACV)对小鼠脉络膜视网膜炎<sup>[1]</sup>及疱疹性角膜结膜炎<sup>[2]</sup>有显著疗效,也可以抑制无毛小鼠皮下 HSV-1 KOS 株的感染<sup>[3]</sup>,然而在治疗人类感染时易产生 ACV 耐药株<sup>[4,5]</sup>。流式细胞仪分析表明,HSV-1 ACV 敏感株  $ED_{50}$  为 0.45 ~ 1.47  $\mu\text{M}$ , ACV 耐药株  $ED_{50}$  为 140 ~ 3134  $\mu\text{M}$ <sup>[6]</sup>,为 ACV 的应用造成了一定的困难。目前用新药 Cidofovir 治疗患 HSV 感染而对 ACV 无反应的 AIDS 病人效果较好<sup>[4]</sup>,可是 Cidofovir 静注有很大肾的毒性:12% 表现为蛋白尿,5% 尿肌酐增加,而且 15% 的病人有中性粒细胞减少<sup>[5]</sup>。另外,HSV-2 糖蛋白 D 和 B 重组疫苗对人类反复发作的生殖道疱疹没有作用<sup>[7]</sup>, HSV-1 亚单位疫苗(Skinner 疫苗)虽可使女病人生殖道疱疹复发频率降低,但是结果不具统计学显著性<sup>[8]</sup>。筛选研制新的抗病毒药的确是重要而紧急的任务。

虎杖是蓼科蓼属植物(Polygonum Cuspidatum Siebet Zucc)的根茎。国内报道对多种病毒,如 HSV-1、HSV-2 流感病毒 J1 型及 9 型埃可病毒、A<sub>9</sub> 及 B<sub>5</sub> 型柯萨基病毒有抑制作用。国外报道<sup>[9,10]</sup>虎杖大黄素(Emodin)对 HSV-1、HSV-2、VZV、假狂犬病毒、流感及副流感病毒、痘苗病毒等有抑制作用。为了了解虎杖的抗病毒性能并开发利用,又由于虎杖蒽醌类化合物含量较高,我们对此类化合物进行了分级分离,分离出晶 I、晶 III、晶 IV,并对乙酸乙酯萃取部份晶 III、晶 IV 的抗 HSV 药效进行了研究,现将实验结果报道如下。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 中药 虎杖由湖北医科大学附属二院中药房提供。将虎杖用水提醇沉法处理,水液经苯萃取后,用乙酸乙酯萃取,这时有深棕色沉淀析出,用无水乙醇重结晶得晶 III。回收乙酸乙酯至浸膏,用稀乙醇溶解、放置、过滤,有红棕色沉淀析出,重结晶得晶 IV。用含 1% Tween-80(分析纯)的 PBS 配制晶 III、晶 IV 母液, G6 漏斗抽滤、分装待用。晶 III、晶 IV 母液浓度分别为 229.7 和 4190  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。实验液培养液含 Tween-80 为 0.001%。

1.1.2 阿昔洛韦(ACV) 曲号为 980751-3(丽珠集团湖北科益药业有限公司)。

1.1.3 细胞与病毒 HEp-2 细胞(湖北省医学科学院病毒研究所)。HSV-1F 株及 HSV-2 333 株(本室保存)。按本室常规培养细胞,繁殖病毒。HSV-1F 株  $TCID_{50}$  为  $10^8/0.1 \text{ ml}$ , HSV-2 333 株  $TCID_{50}$  为  $10^9/0.1 \text{ ml}$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 空斑减数实验 本研究所所有抗病毒实验均设

置了 ACV 阳性对照组。本实验以 3 种方式进行。①药物对 HSV 的直接杀灭,病毒悬液与含药培养液 37℃ 孵 1h 后,感染细胞。②药物对 HSV 感染细胞的阻断作用,以含药培养液预先与细胞孵 2h,再以 HSV 感染细胞。③药物对 HSV 增殖的抑制作用,先感染细胞,再以含药培养液孵育。每组均设置正常细胞对照组以及用病毒感染的加入等体积含 Tween-80 PBS 的阴性对照组。所用感染复数为 1pFu/细胞。经过上述处理的细胞加入细胞维持液(含 0.5% 羧甲基纤维素),培养 48h,弃维持液,用 10% 甲醛固定,以 0.5% 结晶紫染色,计算空斑。空斑减数率(%) = (病毒对照组空斑数 - 药物处理组空斑数) / 病毒对照组空斑数。

1.2.2 药物对细胞病变的抑制作用 也以 3 种方式进行。经过直接杀灭处理的病毒悬液按对数比例稀释  $10^{-1}$  ~  $10^{-10}$ ,每一稀释度接种 4 小瓶细胞,培养 48h 后判定病毒滴度。而②及③种方式则是在细胞接受抗病毒处理后,孵育 24h,弃维持液,加入 1.0ml PBS 冻融 3 次后,再检测病毒滴度。

1.2.3 细胞毒性试验 长成单层的细胞加入含药培养液孵育达 72h 后,以苔盼蓝拒染法计数死活细胞数。

## 1.3 结果的统计学处理

1.3.1  $ED_{50}$  及  $IC_{50}$  的计算采用“加权直线回归法”。

1.3.2 药物抗病毒药效的评价 根据 Chou 和 Talalay<sup>[11]</sup>导出的中效方程式,评价药物浓度与药效间的剂量反应关系。

## 2 结果

### 2.1 晶 III 与晶 IV 的基本化学性质

晶 III 难溶于水、乙酸乙酯,能溶于乙醇,不溶于苯。可使  $\text{KMnO}_4$  液褪色,但遇氨水不显红色。晶 IV 难溶于冷水,能溶于乙醇、乙酸乙酯、丙酮,遇氨水显红色,这是蒽醌类化合物特有的 Bornträger 反应,与醋酸镁的甲醇溶液反应显粉红色。晶 III 不是蒽醌类化合物,晶 IV 可能是蒽醌类化合物。

### 2.2 晶 IV 对 HSV 的直接杀灭作用

15, 20, 25, 30 和 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ACV 使 HSV-1F 株滴度依次降低了 4log10, 5log10, 6log10, 7log10 和 8log10; 而 0.57, 3.30 和 5.70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  晶 IV 使 HSV-1F 株滴度相应降低了 2log10, 3log10 和 5log10(图 1)。8, 20, 30, 40 和 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ACV 使 HSV-2 333 株病毒滴度依次降低了 2log10, 4log10, 5log10, 7log10 和 9log10; 而 2.30, 4.60 和 5.70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  晶 IV 使 HSV-2 333 株病毒滴度相应降低了 3log10, 7.5log10 和 9log10(图 1)。说明晶 IV 对 HSV-1F 株、HSV-2 333 株均具有直接杀灭作用,传染性病毒滴度的降低取决于晶 IV 浓度的增加并与之成反比,而且

晶 IV 的直接杀灭作用比 ACV 强。

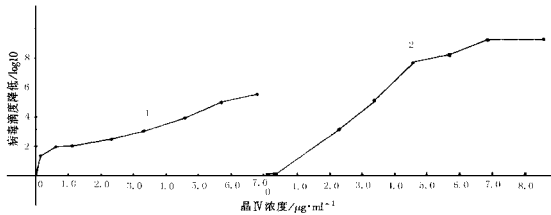


图1 晶IV对 HSV 的直接杀灭

1 - HSV-1F 株; 2 - HSV-2 333 株

### 2.3 晶 IV 对 HSV 增殖的抑制作用

15, 20, 25 和 30 μg/ml ACV 使 HSV-1F 株滴度依次降低了 2log10, 4log10, 5log10 和 8log10; 而 1.14, 2.30 和 6.90 μg/ml 晶 IV 就使 HSV-1F 株滴度降低了 2log10, 4log10 和 8log10 (图 2)。20, 40, 50 和 60 μg/ml ACV 使 HSV-2 333 株滴度相应降低了 2log10, 6log10, 8log10 和 9log10; 而 1.10, 2.30 和 3.40 μg/ml 晶 IV 就使 HSV-2 333 株滴度降低了 2log10, 7log10 和 8log10 (图 2)。证实晶 IV 对以上两株 HSV 的增殖均具有抑制作用, 传染性病毒滴度的降低取决于晶 IV 浓度的增加并与其成反比, 而且晶 IV 对两株 HSV 增殖的抑制作用比 ACV 强。

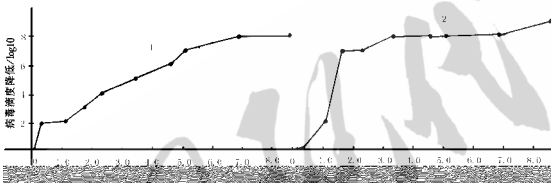


图2 晶IV对 HSV 增殖的抑制

1 - HSV-1F 株; 2 - HSV-2 333 株

### 2.4 晶 IV 对 HSV 感染的阻断作用

10, 12, 20 和 25 μg/ml ACV 与细胞预孵 2h 后, HSV-1F 株滴度相应降低了 2log10, 3log10, 4log10 和 8log10; 而 1.10, 2.30 和 6.90 μg/ml 晶 IV 与细胞预孵 2h 后, HSV-1F 株滴度依次降低了 2log10, 4log10 和 8log10 (图 3)。10, 15, 20 和 25 μg/ml ACV 与细胞预孵 2h 后, HSV-2 333 株滴度相应降低了 4log10, 6log10, 7log10 和 9log10; 而 1.70, 4.60 和 8.60 μg/ml 晶 IV 与细胞预孵 2h 后, HSV-2 333 株滴度依次降低了 2log10, 6log10 和 9log10 (图 3)。指出晶 IV 对 HSV-1F 株及 HSV-2 333 株感染具有阻断作用, 传染性病毒滴度的降低取决于晶 IV 浓度的增加并与其成反比, 而且晶 IV 对两株 HSV 感染的阻断作用比 ACV 强。

### 2.5 晶 III 抗病毒试验的结果

晶 III 用到 8.30 μg/ml 剂量, 在三组对 HSV-1F 株及 HSV-2 333 株的抗病毒试验中, 空斑减数率为 0。表明晶 III 对两株 HSV 无抗病毒活性。

### 2.6 晶 IV 的抗 HSV 药效具有剂量反应关系

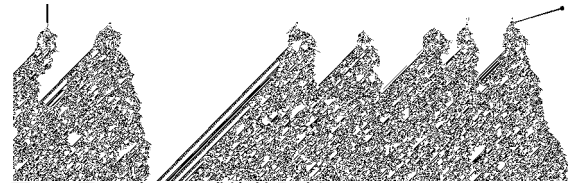


图3 晶IV对 HSV 感染的阻断

1 - HSV-1 株; 2 - HSV-2 333 株

ACV 对 HSV-1F 株的直接杀灭, 对其增殖的抑制及感染的阻断 ED<sub>50</sub> 分别为 13.22, 9.09 和 8.71 μg/ml; ED<sub>90</sub> 分别为 36.46, 48.68 和 50.16 μg/ml; 相关系数依次为 0.99 (自由度为 6), 0.99 (7), 1.00 (5), P 均 < 0.0005。晶 IV 对 HSV-1F 株的直接杀灭, 对其增殖的抑制及感染的阻断 ED<sub>50</sub> 分别为 0.09, 0.07 和 0.03 μg/ml; ED<sub>90</sub> 分别为 3.50, 3.40 和 1.81 μg/ml; 相关系数依次为 0.96 (自由度 = 9), 0.90 (9), 0.94 (9); P 均 < 0.0005 (表 1, 表 2, 图 4)。ACV 对 HSV-2 333 株的直接杀灭, 对其增殖的抑制及感染的阻断 ED<sub>50</sub> 分别为 16.45, 10.85 和 18.62 μg/ml; ED<sub>90</sub> 分别为 70.68, 44.86 和 63.68 μg/ml; 相关系数依次为 0.98 (自由度 = 7), 0.99 (8), 0.99 (7); P 均 < 0.0005。晶 IV 对 HSV-2 333 株的直接杀灭, 对增殖的抑制及感染的阻断 ED<sub>50</sub> 分别为 0.07, 0.09 和 2.29 μg/ml; ED<sub>90</sub> 分别为 1.78, 1.95 和 7.13 μg/ml; 相关系数分别为 0.96 (自由度 = 10), 0.96 (9), 0.89 (9); P 均 < 0.0005 (表 1, 表 2, 图 4)。说明晶 IV 抗 HSV-1F 株及 HSV-2 333 株的作用具有剂量反应关系, 这种关系具有统计学显著性, 并且再次证实晶 IV 抗两株 HSV 的作用比 ACV 强, 是值得开发利用的。

表1 晶IV抗 HSV-1F 株的中效方程参数

		中效方程参数			
		斜率 / m	Dm / ED <sub>50</sub>	Y 轴截距	相关系数 / 自由度
直接杀灭	ACV	0.99	13.22	- 0.61	0.99(6)
	晶 IV	0.61	0.09	- 0.06	0.96(9)
对增殖抑制	ACV	0.60	9.09	- 0.08	0.99(7)
	晶 IV	0.56	0.07	0.01	0.90(9)
对感染阻断	ACV	0.56	8.71	- 0.02	1.00(5)
	晶 IV	0.60	0.03	- 0.13	0.94(9)

注: P 均 < 0.0005

### 2.7 晶 IV 的细胞毒作用

晶 IV 细胞毒 IC<sub>50</sub> 为 2266 μg/ml。治疗指数 (Treatment Index, TI)  $TI = \frac{IC_{50}}{ED_{50}}$ 。统一按直接杀灭, 对增殖的抑制, 对感染的阻断的顺序排列, 晶 IV 对 HSV-1F 株的 TI 为 25177, 32371, 75533; ACV 的 IC<sub>50</sub> 为 1085 μg/ml, 对 HSV-1F 株的 TI 为 82; 119; 124; 晶 IV 的 TI

表 2 晶 IV 抗 HSV-2 333 株的中效方程参数

		中效方程参数			
		斜率 / m	Dm / ED <sub>50</sub>	Y 轴截距	相关系数 / 自由度
直接杀灭	ACV	0.58	16.45	- 0.21	0.98(7)
	晶 IV	0.67	0.07	- 0.11	0.96(10)
对增殖抑制	ACV	0.69	10.85	- 0.20	0.99(8)
	晶 IV	0.70	0.09	- 0.03	0.96(9)
对感染阻断	ACV	0.76	18.62	- 0.47	0.99(7)
	晶 IV	0.64	2.29	0.53	0.89(9)

注: P 均 < 0.0005

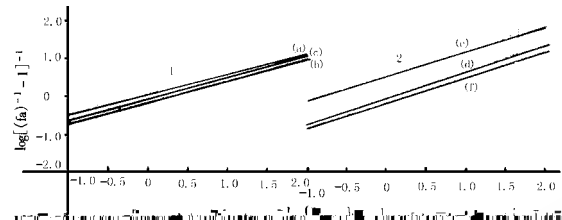


图 4 晶 IV 抗 HSV 的中效作用图

中效线(a),(b),(c)分别代表晶 IV 对 HSV-1F 株增殖的抑制、感染的阻断以及直接杀灭。中效线(d),(e),(f)分别代表晶 IV 对 HSV-2 333 株增殖的抑制、感染的阻断以及直接杀灭;1 - HSV-1F 株;2 - HSV-2333 株

为 ACV TI 的 307,272,609 倍。晶 IV 对 HSV-2 333 株的 TI 为 32371 ;25177 ;989 ;ACV 对 HSV-2 333 株的 TI 为 65 ;100 ;58 ;晶 IV 的 TI 为 ACV TI 的 498 ,251 ,17 倍。进一步说明晶 IV 是值得开发利用的。

### 3 讨论

从对细胞病变抑制的结果来看,晶 IV 对 HSV-1F 株及 HSV-2 333 株具有明显的直接杀灭、抑制增殖及阻断感染的作用,而且传染性病毒滴度的降低是取决于晶 IV 浓度的增加并与其成反比的。与阳性对照 ACV 比较,就抗 HSV-1F 株而言,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ACV 在直接杀灭试验中使其滴度降低了 5log<sub>10</sub>,在对增殖抑制及感染阻断的试验中使其滴度降低了 4log<sub>10</sub>;晶 IV 依次用 5.70,2.30 和 2.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  就达到了同样的效果。就抗 HSV-2 333 株而言,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ACV 在直接杀灭试验中,使病毒滴度降低了 9log<sub>10</sub>,在对增殖抑制的试验中,使病毒滴度降低了 8log<sub>10</sub>;而 5.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$  及 3.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  晶 IV 就分别达到了同样的效果;25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ACV 在对感染的阻断中,使病毒滴度降低了 9log<sub>10</sub>,8.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  晶 IV 就达到了同样的效果。说明晶 IV 的药效比 ACV 强。

从空斑减数实验的结果来看,晶 IV 抗 HSV-1F 株及 HSV-2 333 株的作用具有剂量反应关系。与 ACV 比较,就抗 HSV-1F 株而言,ACV 直接杀灭的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>90</sub> 分别为 13.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,36.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV 则为 0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,

3.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;ACV 抑制其增殖的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>90</sub> 分别为 9.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,48.68 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV 则为 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,3.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;ACV 阻断其感染的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>50</sub> 分别为 8.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,50.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;晶 IV 则为 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,1.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。就抗 HSV-2 333 株而言,ACV 直接杀灭的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>90</sub> 分别为 16.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,70.68 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV 则为 0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,1.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;ACV 对其增殖抑制的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>90</sub> 分别为 10.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,44.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV 则为 0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,1.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;ACV 对其感染阻断的 ED<sub>50</sub>、ED<sub>90</sub> 分别为 18.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,63.68 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV 则为 2.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,7.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。晶 IV 的药效仍比 ACV 强。

从细胞毒作用而言,ACV IC<sub>50</sub> 为 1085 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,晶 IV IC<sub>50</sub> 为 2266 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对 HSV-1F 株而言,晶 IV 直接杀灭、对增殖抑制、对感染阻断的 TI 为 ACV TI 的 307,272,609 倍;对 HSV-2 333 株而言,晶 IV 3 种抗病毒试验的 TI 为 ACV TI 的 498,251,17 倍。晶 IV 的药效比 ACV 强,毒性比 ACV 小,无疑值得进一步开发利用。

### 参考文献

- 1 Merchant A, Fl-etcher J, Medina CA, et al. Pharmacomanipulation of HSV-1 induced chorioretinitis in mice. Eye, 1997, 11 (pt4): 504.
- 2 Hu S, Dutt J, Zhao T, et al. Tetradrine potently inhibits herpes simplex virus type-1 induced keratitis in BALB/c mice. Ocul Immunol Inflamm, 1997, 5(3): 173.
- 3 Bolger GT, Al-len T, Garnean M, et al. Cutaneously applied acyclovir acts systemically in the treatemnt of herpetic infection in the hairless mouse. Antiviral res, 1997, 35(3): 157.
- 4 Lalezar J, Schacker T, Feinberg J, et al. A randomized doubleblindplacebo-controlled trial of cidofovir gel for the treatment of acyclovir-unresponsive mucocutaneous herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J Infect Dis, 1997, 176(4): 892.
- 5 Martinez CM, Luks-Galger DB. Cidofovir use in acyclovir-resistant herpes infection. Ann Pharmacother, 1997, 31(12): 1519.
- 6 Pavic L, Hartmen A, Zimmerman A, et al. Flowcytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir and foscarnet. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(12): 686.
- 7 Strans SE, Kost RG, McKenZie R, et al. Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type-2 glycoprotein D and B; results of a placebo-controlled vaccine trial. J Infect Dis, 1997, 176(5): 1129.
- 8 Skinner GR, Turgk ME, Benson CA, et al. The efficacy and

safety of skinner herpes simplex vaccine towards modulation of herpesgenitalis , report of a prospective double-blind placebo-controlled trial . Med Microbiol Immunol Berl ,1997 , 186(1): 31 .

- 9 Douglas OA ,Norbert DW ,Steven GW ,*et al* .In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives .Antiviral Res ,1991 ,16: 185 .
- 10 Sydiskis RJ , Owen DG , Lohr JL , *et al* . Inactivation of

enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants . Antimicrob Agents and Chemother ,1991 ,35(12): 2463 .

- 11 Ting Chao Chou ,Paul TaLaLay .General-ized equations for the analysis of inhibition of Michaelis-Menten and higher-order systems with two or more mutually exclusive and non-exclusive inhibition .Eur J Biochem ,1981 ,115: 207 .

收稿日期 :1998 - 04 - 13