

Allostatin 对 1 型和 2 型单纯疱疹病毒 (HSV) 病变的免疫调节潜力和临床疗效

Imene Ben Toumia^{1,2}, Dmitry Tulin³, Andrey Yakovlev³, Anna K. Savva³, Marco Ponassi¹, Franz Heinrich Kohnke⁴, Leila Chekir-Ghedira², Alberto Izzotti^{1,5}, Virgil Schijns^{6,7,#}, Camillo Rosano^{1,#,§}

1 IRCCS Policlinico San Martino Genova, Italy (意大利)

2 Unit of Bioactive Natural Substances and Biotechnology UR17ES47, Faculty of Dental Medicine of Monastir, University of Monastir, Avicenne Street, 5000 Monastir, Tunisia (莫纳斯提尔大学莫纳斯提尔口腔医学院)

3 Laboratory of Insect Biopharmacology and Immunology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, Russia (俄罗斯圣彼得堡国立大学生物学院昆虫生物药理学和免疫学实验室)

4 Department CHIBIOFARAM, University of Messina, Messina, Italy. (意大利墨西拿梅西纳大学)

5 Department of Experimental Medicine, School of Medicine; University of Genoa, Italy (意大利热那亚大学医学院实验医学系)

6 Epitopoietic Research Corporation (ERC), Landerd campus, Nistelrooisebaan 3, 5374 RE Schaijk, The Netherlands (荷兰)

7 Cell Biology and Immunology, Wageningen, University, The Netherlands. (The Netherlands). (荷兰瓦格宁根大学细胞生物学和免疫学)

资深合著者

camillo.rosano@hsanmartino.it

schijns.virgil@gmail.com

§ 通讯作者

只有傻瓜才能保持理智

- 方舟乐队

为纪念谢尔盖·伊万诺维奇·切尔尼什教授 (1951-2020)，Allostatine 的发明者，伟大的科学家和挚友。他的一生都献给了与病毒和细菌的斗争，却在一次过马路时，因人类的愚蠢行为丧失了生命。

摘要

Allostatin 是一种由 Alloferon 多肽衍生而来的肽，Alloferon 是昆虫用来抵御感染的“一线防御分子家族”。据报道，Allostatine 可作为有效的抗病毒药物和疫苗（如治疗性癌症疫苗）中的免疫调节佐剂，因而具有特别的吸引力。Allostatine 能激活人类自然杀伤细胞（NK）和 T 淋巴细胞（CTL），进而杀死多种病毒感染的靶细胞。为了对 Allostatine 这种能力进行有效评估，我们就其对小鼠和人类免疫反应的影响进行了研究。此外，为了研究 Allostatine 在单纯疱疹病毒感染过程中调节免疫系统的能力，还对 HSV 1 型和 2 型感染引起的皮肤和生殖器疱疹患者进行了临床试验。在研究开始前，部分患者的复发性疱疹病变史已超过 4 年。在评估其治疗唇疱疹和消除生殖器疱疹症状的疗效时，引入了阿昔洛韦进行治疗比较。

这是我们首次在报告中指出 Allostatine 的这一功能——增加小鼠体内一氧化氮（NO）的释放，进而显著增强 NK 和 CTL 活性以及巨噬细胞功能。这种肽选择性地定位于白细胞细胞质中，增加了人类 NK 标记物 NKp80、CD244、CD226 和 CD25 的表达。有趣的是，我们还发现了它在增强 CD3⁺/CD28⁺活化 T 细胞的 IL-2 触发和 IFN- γ 合成方面的能力。

我们的临床测试结果提供了证据，证明 Allostatine 影响人类 T 淋巴细胞活化标志物。Allostatine 也有利于单纯疱疹病毒感染患者的病变完全恢复。在使用基于 Allostatine 的产品 Allomedin 治疗的大多数患者的不同解剖位置，都能观察到复发性疱疹病变的明显改善。未发现任何不良/毒性作用。

因此，我们在小鼠和人类的体外、离体和临床研究中观察到，Allostatine 可用于调节 NK 和 T 细胞免疫功能并提高巨噬细胞活性。在一项临床研究中，基于 Allostatine 的制剂消除了单纯疱疹病毒（HSV）引发的病理特征，抑制了复发。

引言

单纯疱疹病毒（HSV）是一种常见的人类病原体。据估计，全球有 40 亿人感染了单纯疱疹病毒。由 HSV1 病毒引起的唇疱疹发病率居世界第二，仅次于普通感冒。世界上约 90% 的人口感染了 HSV1，约 25-35% 的成年人反复患上唇疱疹[Wald and Corey, 2007]。生殖器疱疹是一种由 HSV2 引起的感染，是美国最常见的性传播疾病之一[McQuillan et al., 2018]。生殖器疱疹的发病率在发展中地区的不同国家有所不同。某些非洲国家艾滋病毒肆虐，其民众感染 HSV2 的几率也更高。约 80% 的感染者无症状或症状非常轻微，因而容易忽视。事实上，HSV 毒株最常见的传播方式就是通过无症状感染者传播。而在某些情况下，这种感染可能非常危险。例如，母亲传给新生儿的 HSV2 就可能是致命性的。在极少数情况下，HSV1 还会感染大脑，引起脑炎，这通常也是致命的；越来越多的事实表明，HSV1 慢性大脑感染对阿尔茨海默病有很大影响[Carter, C.J., 2008]。此外，生殖器疱疹还会使感染艾滋病毒的风险增加 40% [Looker et al, 2020]。世卫组织称，因生殖器疱疹自杀的人数占全球自杀总数 10% [Nissen et al., 2019]。单纯疱疹病毒一旦感染终身携带，日常服用的药物也是一项负担。

目前市场上没有可以永久性治愈疱疹感染的药物，然而，可以使用各种抗病毒疗法来缓解感染的疼痛症状。目前治疗疱疹病毒感染的方法包括核苷类似物，如阿昔洛韦和其他相关药物。这些药物的作用是阻止病毒 DNA 的合成。市场上可用的主要药物包括舒维疗(Zovirax)、泛昔洛韦、正二十二烷醇(Abreva)、喷昔洛韦(Denavir)和西多福韦(Vistide)。然而，众所周知，这些药物会干扰人体的自然代谢，导致药物相关毒性。此外，随着病毒对现有的一系列抗病毒药物产生耐药性，对治疗单纯疱疹感染的创新疗法的需求以及对新型抗病毒药物的探索仍在继续。因此，单纯疱疹治疗市场在未来有很大的潜力。

NKs、CTL 和巨噬细胞是免疫系统对抗 HSV1 和 HSV2 病毒感染的主要保护性武器；NK 细胞和 T 细胞产生干扰素- γ ，以应对多种病毒感染。

Alloferons 是从被细菌感染的红头丽蝇中分离出来的一组天然存在的多肽，具有很强的抗病毒和抗肿瘤能力[Chernysh et al., 2002; Chernysh et al., 2012; Chernysh et al., 2013]。与其他外科蛆虫一样，红头丽蝇在伤口和溃疡愈合方面具有悠久的医学应用历史

[Kruglikova A.A: & Chernysh S.I., 2013], 早在十六世纪, 法国外科医生 Abroise Paré (1510-1590)就首次记录了其应用[Whitaker et al., 2007]。众所周知, 丽蝇在受到细菌感染后会产生一系列有效的抗菌物质。这些抗菌肽 (AMPs) 具有与其他昆虫类似的一级结构, 如昆虫防御素、双翅肽、蛾血素和富含脯氨酸的肽[Chernysh et al., 2002]。丽蝇的血淋巴具有类似于人类 NK 细胞的细胞毒性活性[Chernysh et al., 2004]。特别是, 在丽蝇的血淋巴中已鉴定出两种含有 13 个氨基酸和 12 个氨基酸的肽, 分别命名为 Alloferon1 和 Alloferon2[Chernish et al, 2002]。对小鼠施用极微量浓度的 Alloferon1, 可激活天然细胞毒性以及体内抗病毒和抗肿瘤活性[Chernysh et al., 2002; Chernysh et al., 2012]。

Allostatine (也称为 Alloferon3) 是一种“人源化”肽, 通过对 Alloferon1 进行改造得到。通过替换 Alloferon1 序列中的两个氨基酸, 得到了类似于人免疫球蛋白的模式。Allostatine 的抗病毒和抗肿瘤能力已在体外和体内得到证实。特别是, 在接种了肿瘤抗原的 DBA/2 小鼠体内已经证明了 Allostatine 作为治疗性癌症疫苗佐剂的特性[Chernysh and Kozuharova, 2013]。

在这里, 我们介绍 Allostatine 对人类 HSV (唇疱疹和生殖器疱疹) 疗效的结果。

材料与方法

肽

圣彼得堡 Diapharm Co 采用固相合成法根据 Fmoc/But 策略合成了 Allostatine, 并通过反相高效液相色谱法(HPLC)纯化, 使肽的最终纯度超过 98%。它是 13 个氨基酸的线性肽序列 His-Gly-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-His-Gly-Thr-His-Gly, 其经验式为 $C_{56}H_{77}N_{21}O_{17}$, 分子量为 1316 Da。

Allomedin®是一种基于 Allostatine 的凝胶制剂产品, 由 Allopharm 有限公司开发, 谢尔盖·伊万诺维奇·切尔尼什(Sergey Ivanovich Chernysh)教授发明。该复合物由 Allostatine 和水、卡波姆、尿囊素、苯乙醇(phenylethanol)、乙基己基甘油(ethylhexylglyceol)及氢氧化钠作为赋形剂组成, 能保护皮肤和粘膜免受病毒感染, 在俄罗斯和前苏联国家以化妆品注册。

离体实验

对 Balb/c 小鼠（22-26 g）进行的所有实验均按照欧洲共同体理事会 1986 年 11 月 24 日指令（86/609/EEC）进行。生物技术研究所生命科学与健康研究伦理委员会（cer-svs）批准了规范实验动物福利和实验的指令（突尼斯莫纳斯提尔大学；伦理批准号：2019/02/I/cer-svs/ISBM；2019 年 1 月 9 日）。在经认可的无病原体设施中，将小鼠在标准条件下饲养。向所有动物提供充分的过滤水和标准啮齿动物食物。

巨噬细胞和脾细胞的分离培养

通过颈椎脱位处死小鼠，在无菌条件下提取脾原代细胞，浸入磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)中，用镊子轻轻解剖。暴露于裂解缓冲液(144 mM NH₄Cl, 1.7 mM Tris Base)以去除红细胞，经历两个洗涤步骤，然后将细胞重悬于含有 10%胎牛血清(FBS; Gibco)、1%青霉素(10,000 U/ml)和链霉素(10,000 μg/ml) (GibcoBRL, Paisley, UK)的 RPMI-1640 完全培养基(Gibco, BRL)中。在 37 °C、5%的 CO₂ 浓度环境中进行细胞孵育。使用其他 Balb/c 小鼠，以便在 PBS 腹膜灌洗后获得腹膜巨噬细胞。洗涤步骤后，将提取的细胞重悬于 RPMI-1640 完全培养基中。使用台盼蓝排除技术测定细胞活力。

自然杀伤细胞（NK）活性及细胞介导的细胞毒性试验

如上所述制备的脾脏用作效应细胞的来源；将分离的脾细胞以 5×10^5 个细胞的密度接种于 100μl 小份/孔中，以 5×10^6 个细胞/ml/孔的浓度接种 NK 活性。将这些细胞置于不同浓度（5、10、20 和 40ng/ml）的 Allostatine 中刺激 24 小时。随后，分别向孔中加入 100μl 靶向 K562 细胞和 B16-F10 细胞（ 5×10^4 个细胞/ml；产生 100:1 的预期效应靶比），以检测 NK 和 CTL 活性。使用含有 1% DMSO 的培养基作为阴性对照。然后将平板置于 37°C、5%的 CO₂ 浓度环境中，分别孵育 4 小时和 24 小时以检测 NK 和 CTL 活性。每个孔中加入 40 微升 MTT 溶液。孵育后，通过离心除去上清液，并向每个孔中添加 100μl DMSO 使用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度。

进行靶细胞对照、空白对照和效应细胞对照。NK 细胞活性计算如下：NK 活性或 CTL 活性 (%) = $100 \times (\text{ODT} - (\text{ODS} - \text{ODE})) / \text{ODT}$ ，其中 ODT = 靶细胞对照的光密度值，ODS = 测试样品的光密度数值，ODE = 效应细胞对照的光学密度数值。

体外吞噬法测定细胞溶酶体酶活性及 NO 生成量

细胞溶酶体酶活性已通过酸性磷酸酶活性测定。简言之，将 100 μ l 不同浓度(5,10,20 and 40 ng/ml)的 Allostatine 添加到 100 μ l 平底 96 孔板中的巨噬细胞悬浮液(3×10^6 细胞/ml)中，在 37 $^\circ$ C、5% CO₂ 的加湿环境中静置 48 小时。弃去培养基，用 20 μ l 0.1% Triton X-100 (Biomatik Corporation, Cambridge, UK)溶解每个孔中的巨噬细胞单层。接下来加入 10 μ l 100 mM 对硝基苯基磷酸酯(p-NPP) (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Germany)溶液和 50 μ l 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)。将平板再孵育 30 分钟，使用 150 μ l 0.2M 硼酸盐缓冲液 (pH 9.8)终止反应，并测量 405nm 处的吸光度。根据以下方程式计算活性百分比：

$$\text{溶酶体酶活性 (\%)} = (\text{OD 样品} - \text{OD 阴性对照}) / \text{OD 阴性对照} \times 100$$

使用细胞培养上清液中的 Griess 反应测定巨噬细胞释放的亚硝酸盐浓度(NO₂)。简言之，将每个样品的 100 μ l 上清液与 100 μ l Griess 试剂（等体积的 1%磺胺和 0.1%萘乙二胺二盐酸盐在 2.5%磷酸中的溶液）混合，并在室温下孵育 15 分钟。然后使用酶标仪在 540nm 处测量吸光度，并与亚硝酸钠的标准曲线进行比较。

人外周血单个核细胞(PBMCs)的纯化

签署知情同意后，从 18 至 60 岁健康志愿者身上获取静脉外周血样本。根据制造商推荐的方案，使用 BD Vacutainer CPT (Cat. No. 362780)获得单个核细胞，然后转移到培养基中。

细胞毒性试验中 NK 细胞表型变化的评价

根据制造商的说明书，使用细胞制备管(362753 BD, USA)从每个供体的静脉血中获取单个核细胞。根据制造商的方案，使用磁分离(ThermoFisher 11349D Dynabeads™ Untouched™ Human NK Cells Kit)从单个核细胞中分离 NK 细胞(CD3⁻ / CD16⁺ / CD56⁺)，将所得 NK 细胞纯度调至>90%。使用自动细胞计数器(BioRad)测定获得的 NK 细胞的数量。将分离的细胞在含有 5%灭活的自体血清和抗生素（Sigma-Aldrich A5955 抗生素抗霉菌溶液 100 \times ）的 RPMI 1640 培养基中培养。将一部分 NK 细胞在含有 Allostatine

药物的培养基中预孵育过夜。将 NK 细胞与靶细胞(K562)以 1:10 的 E:T 比例进一步混合。根据实验方案,按体积分离所得混合物,并将其置于 U 形板的孔中,在+37° C 的 CO₂ 恒温培养箱中孵育 18 小时。孵育后评估以下标记物表达的变化: CD25 (Becton Dickinson: anti-Human CD25, 562442), NKp80 (Miltenyi Biotec: anti-Human NKp80-FITC, 130-094-843), CD 226 (BioLegend: anti-Human CD226_FITC 338303) 以及 CD 244 (Miltenyi Biotec: anti-Human CD244 (2B4)-PE, 130-099-071)。

Allostatine 与人类白细胞相互作用的体外可视化研究

向新鲜人血中加入 10 µg / ml 荧光素标记的 Allostatine。在+37° C 下孵育一小时后,根据制造商的建议,使用 BD FACS 裂解溶液(Cat. No. 349202)裂解红细胞。剩余部分的白细胞用 PBS 洗涤,用稀释于 PBS 中的 2%多聚甲醛固定,放置在玻璃上并用 DAPI (Invitrogen™ ProLong™, Cat. No. P36966)封闭在 Diamond Antifade Mountan (一种凝固型封片剂)中。用 Leica TCS SP5 共聚焦扫描显微镜对所得制剂进行分析。

Allostatine 对体外活化的人 T 细胞产生细胞因子的影响

根据制造商的建议,使用涂有 CD3/CD28 抗体的珠粒(Thermo Fisher Scientific, Dynabeads Human T-Activator CD3 / CD28, Cat. No. 11131D)进行 T 细胞的多克隆活化。通过细胞产生 IFN-γ 和 IL-2 细胞因子的情况对反应进行评估。为了检测细胞因子生成情况,采用 Becton Dickinson(BD)推荐的方案,使用 BD Fast Immune Anti-Human IFN-γ-FITC, Cat. No. 340449 对 IFN-γ 进行染色, BD Fast Immune Anti-Human IL-2-PE, Cat. No. 340450 对 IL-2 进行染色。

Allostatine 介导的免疫刺激和临床试验研究设计

伦理声明

2008 年 11 月 18 日,俄罗斯卫生部批准了第 544 号 Allostatine 临床试验,2008 年 7 月 15 日(俄罗斯莫斯科)收到了伦理委员会会议第 12 号方案的摘录。研究开始前对患者进行了筛查,将符合标准的患者纳入研究,给予唯一的盲编码患者识别号(UINP)并随机分组。所有入选患者签署知情同意书,表示同意参与临床研究。

皮下注射 Allostatine 对人 T 淋巴细胞的影响

为了确定整个 T 细胞群的反应，健康志愿者在签署知情同意后，接受了 1 mg Allostatine 的皮下注射。在注射前、注射后 12 小时和注射后 5 天，测定外周血中表达 CD25(with BD BV605 labeled anti-Human CD25, Cat. No. 562661)和 HLA-DR (with BD APC labeled anti-Human HLA-DR, Cat. No. 560744)激活标志物的 T 细胞的比例(Miltenyi Biotec VioBlue labeled anti-Human CD3, Cat. No. 130-098-165)。

单纯疱疹病毒患者的临床研究

Allostatine (Allomedin 凝胶) 治疗复发性疱疹患者的安全性和疗效

共 104 名单纯疱疹病毒患者（81 名女性，23 名男性）参与了评估 Allomedin（一种基于 Allostatine 的凝胶制剂，局部应用）的安全性和疗效的临床研究。将 Allomedin 的临床疗效与阿昔洛韦治疗唇疱疹和消除生殖器疱疹症状的疗效进行比较。患者年龄从 18 岁到 60 岁不等，研究开始前，所有患者都有 4 年以上（不同部位的）复发性疱疹病史。

Allostatin (Allomedin 凝胶) 治疗慢性复发性单纯疱疹患者的疗效和安全性

我们评估了局部施用 Allomedin 凝胶进行皮肤护理的疗效（治疗等效性）。研究了复发性单纯疱疹病毒病变患者客观和主观的症状减轻程度，并与舒维疗(Zovirax)乳膏和 Fenistil Pentsivir 乳膏的治疗效果进行了比较。

此外，通过记录不良反应（AR）和严重不良反应（SAR），检查了局部施用“*Allomedin*”凝胶缓解单纯疱疹病毒复发的安全性、副作用和耐受性。

共有 156 名临床诊断为慢性复发性单纯疱疹病变的患者参与了评估。患者年龄在 18 岁至 80 岁之间，平均年龄 40.7 ± 2.1 岁，其中男性 80 名，女性 76 名。

入选标准

在第一项研究中，选择了 18-60 岁的患者进行研究，患者有男有女，均有复发性（过去 4 年中复发 3 次以上）单纯疱疹病变——该诊断结果已通过临床和实验室证实。

在第二次临床评估中，选择了 156 名临床诊断为慢性复发性单纯疱疹的患者。患者年龄在 18 岁至 80 岁之间，其中男性 80 名，女性 76 名。

排除标准

拒绝参与研究的患者和/或不遵守所提供方案的患者将被排除在外。此外，处于失代偿期（心血管疾病、慢性肺、肾和肝衰竭）的躯体疾病患者，以及对药物成分不耐受（例如苍蝇穿刺过敏）的个人也不会入选。

有酒精中毒和药物成瘾既往病史的，患有无法评估治疗效果的精神疾病的，以及活动性肺结核、全身结缔组织疾病、艾滋病毒感染、急性呼吸道病毒感染、急性和慢性肝炎、急性支气管炎和肺炎患者都将被排除在外。使用过具有抗病毒和免疫调节活性的药物的患者、妊娠期和哺乳期的妇女、备孕妇女、以及在过去 3 个月内参加过另一项临床试验的患者亦不纳入考虑。

可接受的伴随治疗：

如需进行急性或慢性疾病的伴随治疗，应事先和医生进行确认。患者个人注册卡（IRC）中应注明有关伴随用药的信息（名称、剂量或剂量变化、适应症、开始日期、终止日期）。

不可接受的伴随治疗：

研究期间不允许使用除 Allomedin、Fenistil Pentsivir、Zovirax 外其他任何抗病毒药物。

在试验性治疗开始时（第 1 天）和治疗的第 3、5、8、10 天，对疾病的主诉和临床表现（主观存在的症状、所在部位、病变大小、是否存在囊泡、充血、水肿、糜烂、结痂）进行评估。将获取的数据填入患者的个人登记卡（IRC）中。

体征（症状）的严重程度采用 3 分制 VAS 量表进行评估，如下所示：

- 0 - 无症状
- 1 - 症状轻微
- 2 - 中度，可接受
- 3 - 症状明显

治疗期间，将 Allomedin 施用于疱疹性病变表面，每天 2~3 次，持续 3~5 天。

在第 10 天进行第 5 次（即最后一次）访视，研究者和患者再次对治疗的有效性进行主观评估（效果良好、满意或不满意）。

凝胶“**Allomedin**”和参考产品的使用效果评估如下：

- 效果良好——改善明显：疾病的临床表现得到抑制，没有新的临床表现和复发迹象；
- 效果满意——疾病临床表现部分缓解；
- 效果不满意——治疗效果不佳或主客观症状恶化。

安全评估

在试验期间和试验结束时，收集不良反应（AR）评分，并进行分析评估，追溯这些不良反应究竟是由 Allomedin 还是其他药物引起。

不良事件严重程度评估：

- 轻度——非渐进性，仅造成轻微不适；
- 中度——明显，但不影响日常生活；
- 严重——严重影响日常生活。

不良反应（AR）与所研究药物的相关性确定如下：

- 无关联——有明确证据表明不良事件（AE）与 Allomedin 之间不存在关联
- 关联存疑——暂未找到与产品使用间的明确联系，但是否因其它因素（药物、疾病、化学品）导致暂且不明
- 或有关联——不良反应在使用产品时出现，但因患有相关疾病/同时使用其他药物或化合物以致无法确认反应由什么原因导致，且停用产品和复用产品的反应未知
- 关联可能性高——不良反应在使用产品时出现，与合并症或其他因素的关联微乎其微，停用药物后反应减弱，复用反应未知

统计分析

按照程序中的表述，进行了三次分析。所有数据均表示为平均值±标准差。使用 GraphPad Prism®软件绘制图形(Graph- Pad Prism® 6.07, GraphPad Software, Inc., CA, USA)。单向方差分析用于检验数据集之间的差异。P 值小于 0.05 时差异显著。

结果

Allostatine 提高小鼠 NK 和 CTL 细胞活性

自然杀伤细胞(NKs)是抵御许多病原体的天然第一道防线，而 MHC 抑制的溶细胞性 T[淋巴]细胞(CTL)是根除特定病原体所必需的适应性细胞反应。脾脏 NK 细胞和 CTL 细胞对 NK 敏感肿瘤细胞（K562 系）和黑色素瘤细胞（B16-F10）的细胞毒性活性的检测表明，与对照细胞相比，在 10ng/mL 和 20ng/mL 的浓度下，*Allostatine* 能够显著提高 NK 和 CTL 细胞的活性。结果显示，在 20 ng/mL（81.69%）的 *Allostatine* 中，增加幅度最大（图第 1A 段）。此外，与仅用 B16-F10 靶细胞孵育的细胞相比，用 *Allostatine* 处理的细胞，其细胞毒性会随着 *Allostatine* 剂量的变化而变化。（图 2B）20 ng/mL 剂量下活性最高（54.21%）。

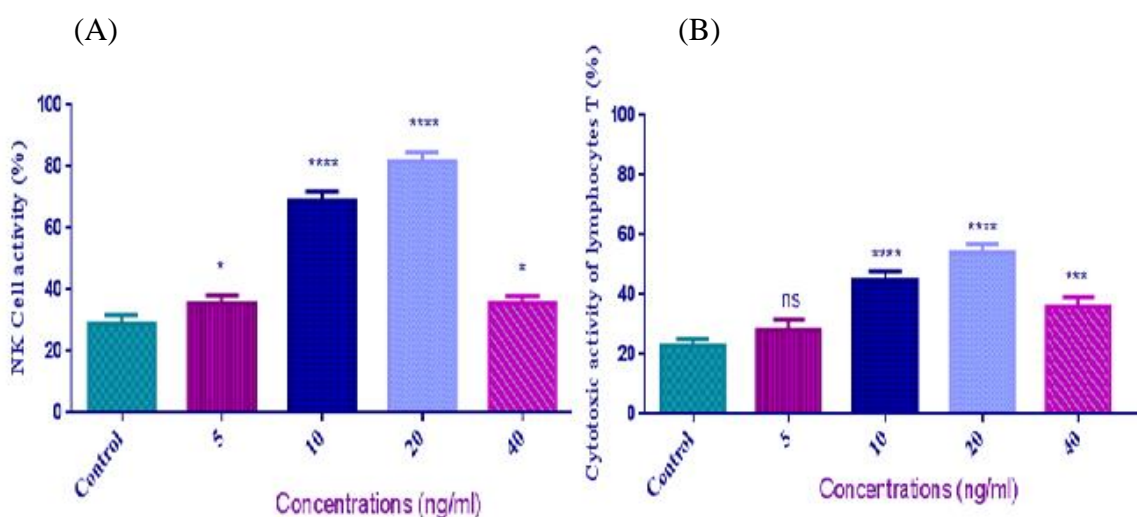


图 1 不同浓度的 *Allostatine* 对 Balb/c 小鼠的离体作用 (A) 自然杀伤细胞；(B) CTL 用高剂量 *Allostatine* 处理脾细胞 24 小时后，分别加入 K562 和 B16F10 靶细胞（预期效应物与靶细胞的比例为 100:1）以测定 NK 和 CTL 活性。数据为 3 次独立实验的平均值

±标准误差；单因素方差分析：与 DMSO（1%）处理的对照细胞相比，* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

Allostatine 抑制细胞溶酶体酶活性并增加一氧化氮的产生

用不同浓度的 Allostatine（5~40ng/ml）孵育腹膜巨噬细胞 48 小时，观察到细胞溶酶体酶活性的抑制程度与 Allostatine 浓度紧密相关。在 40 ng/ml 的浓度下，抑制作用最强（图 2A）。此外，在 LPS 存在的情况下，Allostatine 对巨噬细胞产生一氧化氮（NO）的影响表明，Allostatine 的浓度与巨噬细胞一氧化氮直接相关，40 ng/mL 的浓度下，巨噬细胞能产生高达 49.3 μM 的一氧化氮（图 2B）。

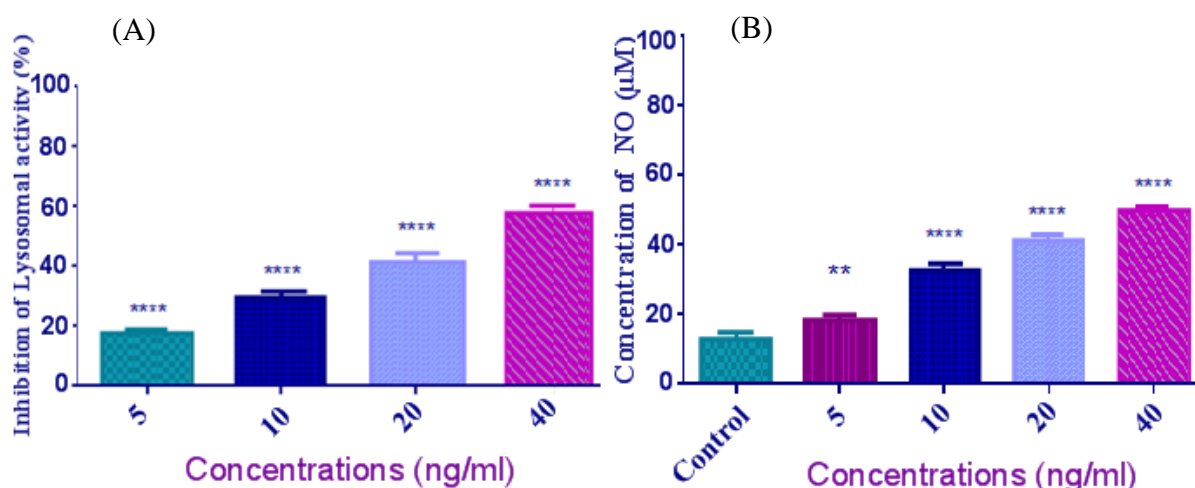


图 2 腹膜 Balb/c 小鼠巨噬细胞 (A) Allostatine 对溶酶体酶活性的抑制作用；(B) 脂多糖(LPS)(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 Allostatine 刺激下产生亚硝酸盐，取 3 次独立实验的平均值±标准误差数据；单因素方差分析，与经 1% DMSO 处理的对照细胞相比，* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ 。

NKp80 和 CD244 的表达

NKs 与靶细胞反应后，NKp80 和 CD244 激活标志物的表达减少，转为非活动性状态。我们使用 NK 和 K562 细胞进行细胞毒性测试，分析 Allostatine 如何影响 NK 细胞的功能状态。值得注意的是，有 Allostatine 存在时，无活性 NK 细胞的数量减少了 3 倍，这表明 Allostatine 可以通过激活表面免疫受体 CD244 和 NKp80 来诱导细胞毒性（图 3）。

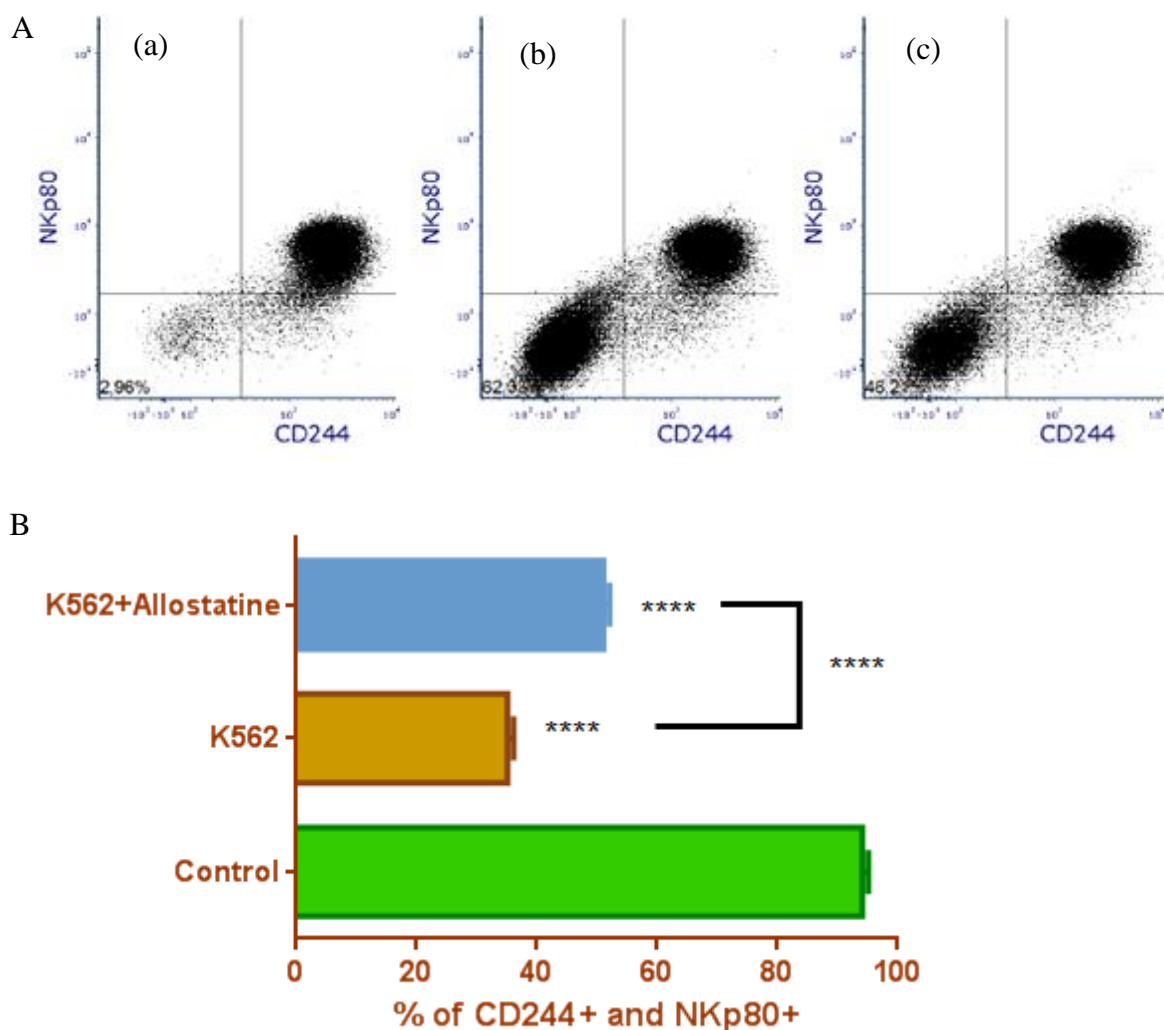


图 3 在肿瘤细胞（K562）的细胞毒性试验中，Allostatine 预孵育后 NK 细胞 CD244 和 NKp80 受体表达的变化（A）用 NKp80 和 CD244 抗体染色的 NK 细胞的代表性流式细胞术点图（a）显示了在没有 K562 细胞靶标的情况下活化标志物的初始表达水平，（b）活化标志物与靶 K562 细胞的表达水平，（c）用 10 μ g/ml 浓度的 Allostatine 孵育的靶 K562 细胞的活化标志物的表达水平。

活化标志物 CD244 和 CD226 的表达

另一种在 Allostatine 处理后保持其表达的活化标志物是 CD226（图 4）。因此，一种可能的 Allostatine 作用模式是增强 NK 细胞的细胞毒作用。我们就 Allostatine 对 NK 细胞

功能状态的作用机制进行了评估。研究表明，当与 k562 细胞相互作用时，Allostatine 处理能增加携带 CD244 和 CD226 活化标志物的活化 NKs 的数量。

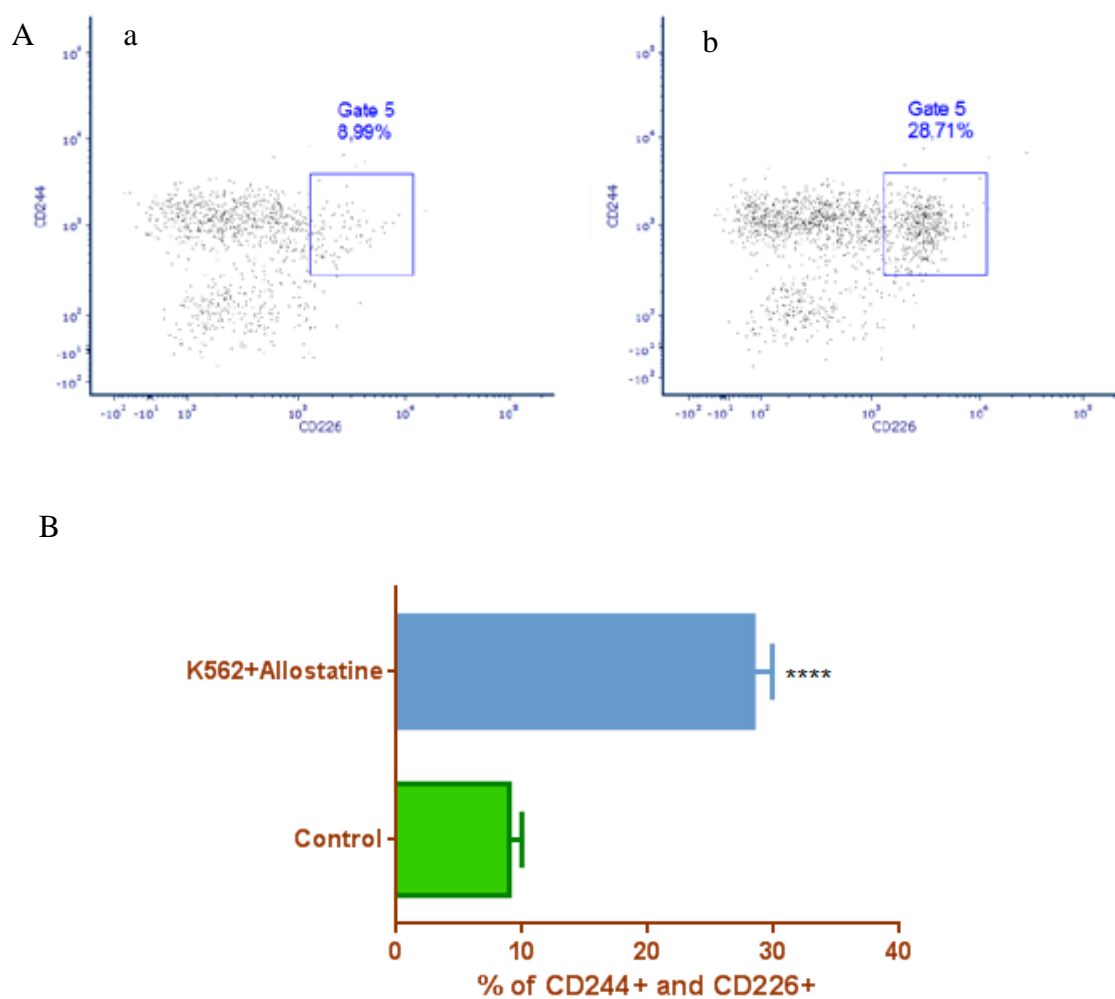


图 4 在与 K562 细胞的细胞毒性反应过程中，Allostatine 对 NK 细胞活化标志物 CD244 和 CD226 表达的影响；(A) 用 CD244 和 CD226 染色的 NK 细胞的代表性流式细胞术点图(a): 仅用 K562 靶细胞培养的对照 NK 细胞，(c): NK 细胞和 K562 靶细胞与 Allostatine 共同孵育。(B) 活 CD244+和 CD226+的百分比 (n = 3 次生物重复)，通过单因素方差分析与对照细胞相比，* $p < 0.05$ **； $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

CD25 对 Allostatine 预活化的人 NK 细胞的诱导作用

CD25 表达测定

除了表型标记外，NKs 与 Allostatine 的相互作用还会影响功能标记的表达（图 5）。尤其是 NK 细胞表达更高水平的 CD25 标记物（IL-2 受体），这对于 NK 细胞的活化和存活至关重要。

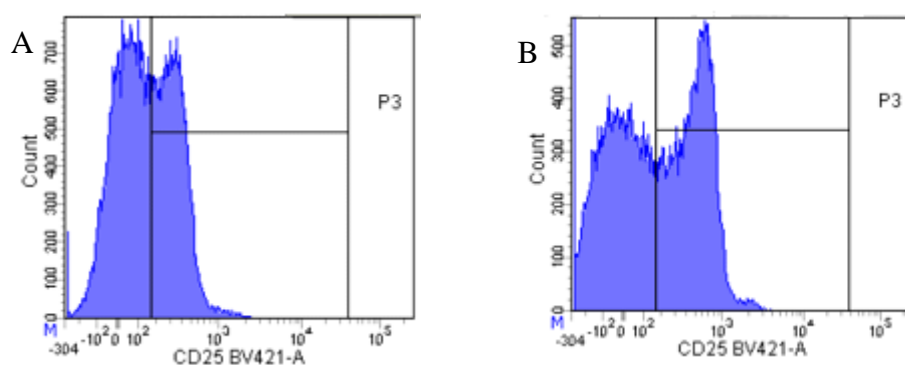


图 5 在与 K562 细胞的细胞毒性反应期间，Allostatine 对 NK 细胞上的活化标志物 CD25 水平的影响的代表性流动直方图。A: 对照；B: 用 Allostatine 治疗（3 次独立实验）。

Allostatine 与人类白细胞的相互作用

为识别出可能对 Allostatine 敏感的靶细胞，将荧光染料标记的肽添加到全血中，然后研究标记物在白细胞中的分布。一个需要澄清的问题是肽在哪里定位以及肽是否进入细胞核。分析表明，人类白细胞会选择性地与标记的 Allostatine 结合（图 6）。在这种情况下，标记物定位在细胞质中，不会穿透细胞核。

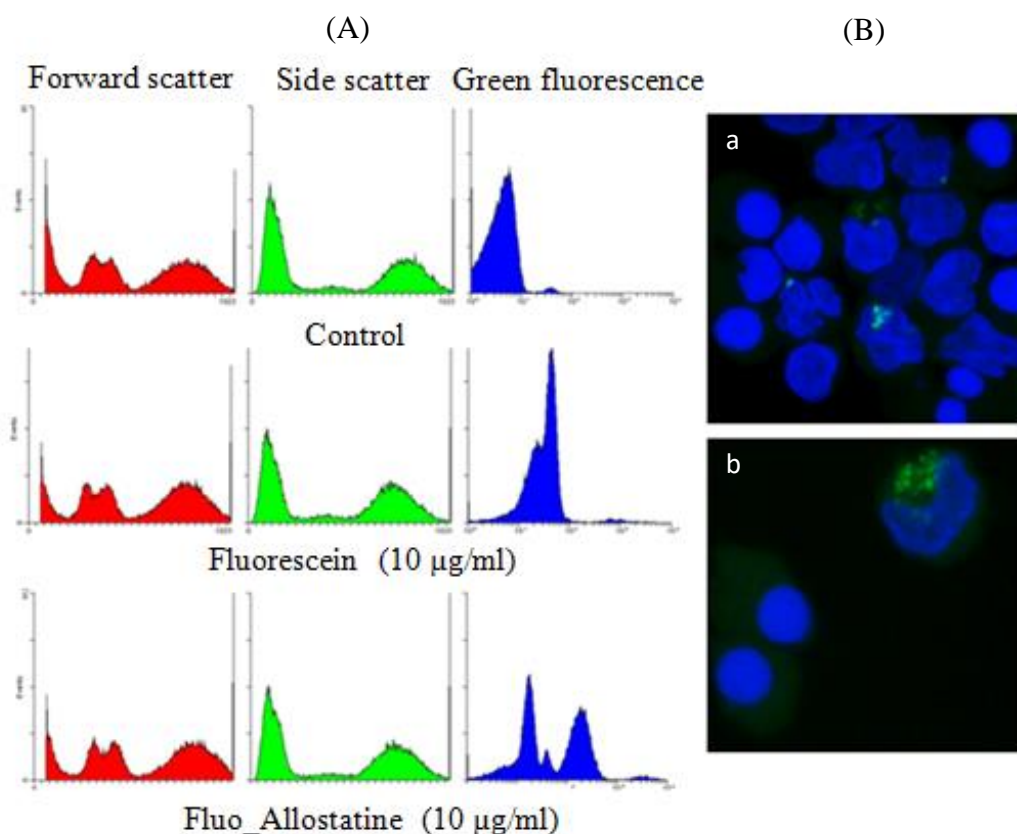


图 6 Allostatine 与人类白细胞相互作用的特异性（解释见正文）；图 B 显示了人白细胞和细胞质内的 Allostatine 定位。绿色荧光标记为 Allostatine，蓝色荧光标记为 DAPI。Allostatine 与不同类型的细胞相互作用：粒细胞（a）和单核细胞（b）。

IFN- γ 或 IL-2 细胞因子表达分析

为了评估 Allostatine 对活化 T 细胞产生细胞因子的影响，将部分细胞在浓度为 10 μ g/ml 的肽的培养基中预孵育 12 小时。对结果进行比较发现，用 Allostatine 对 T 淋巴细胞进行预孵育可使产生 IFN- γ 和 IL-2 的活化细胞数量增加约两倍（图 7）。

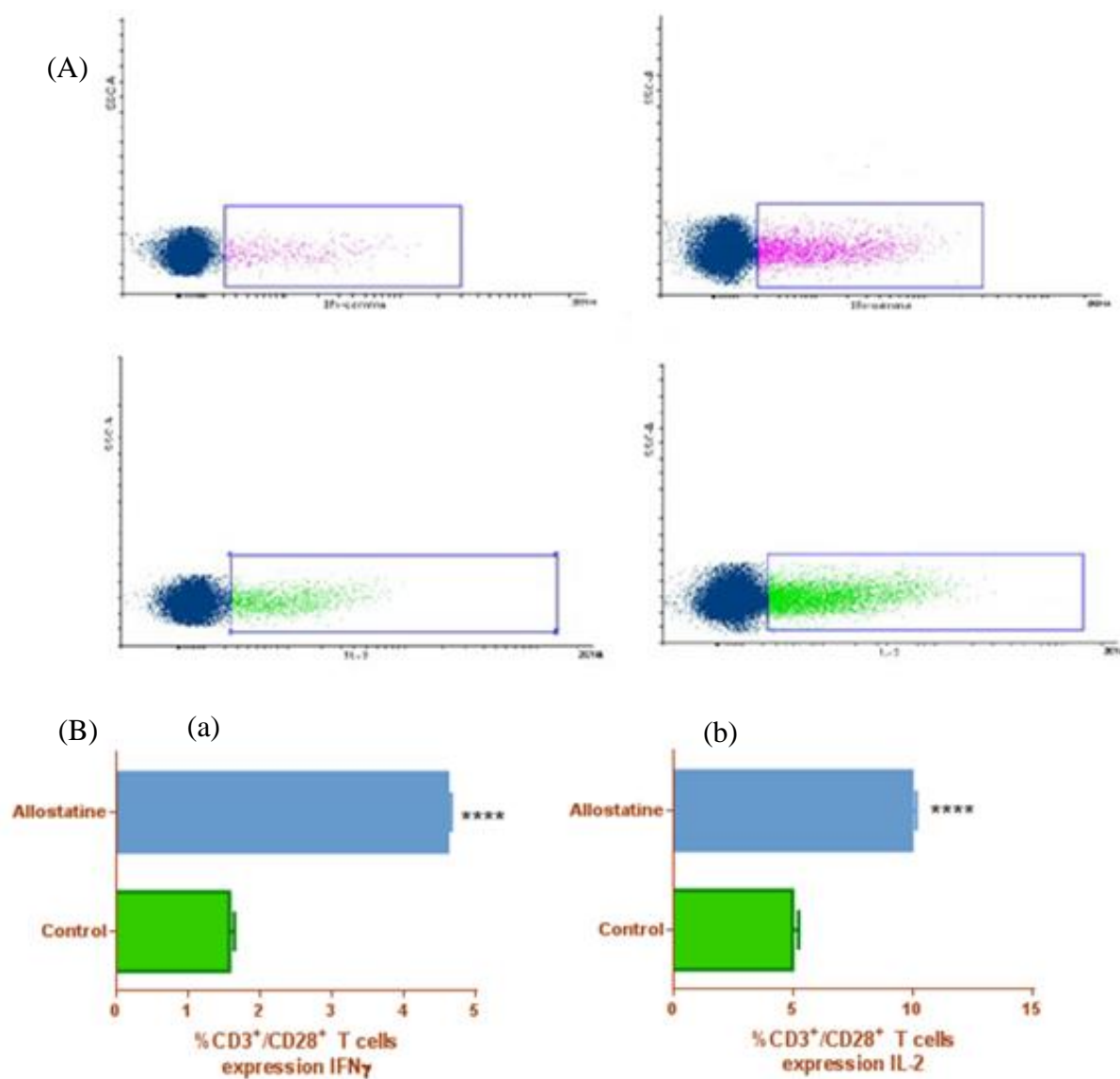


图 7 Allostatine 对活化 T 淋巴细胞产生细胞因子的影响

初步临床研究

活化标志物表达的动态过程如表 1 所示。分析显示，在所有志愿者中，注射 1mg 的 Allostatine 后，外周血中出现具有 CD3⁺/CD25⁺表型的细胞群（峰值）。这种反应的时间和程度因人而异（图 8）。

表 1 注射 Allostatine 后志愿者血液中活化白细胞的百分比

	CD3 ⁻ /HLA-DR ⁺			CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺			CD3 ⁺ /CD25 ⁺		
	0h	12h	5 days	0h	12h	5 days	0h	12h	5 days
志愿者 1	8.18	6.20	8.33	13.95	12.05	9.14	15.58	56.04	13.94
志愿者 2	6.05	6.56	7.70	5.49	8.21	3.35	20.39	17.19	81.52

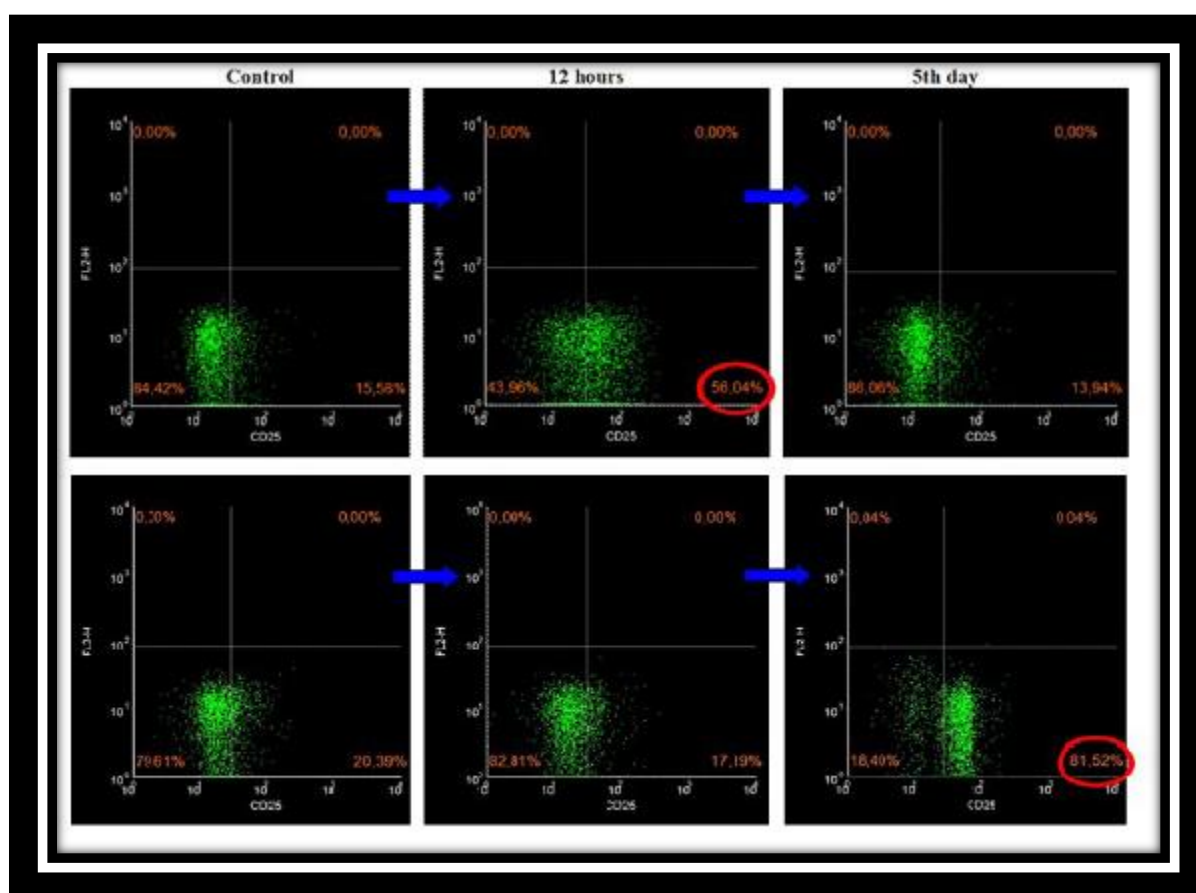


图 8 注射 1 mg Allostatine 后 T 淋巴细胞活化的动态过程

HSV 感染，4 年以上复发性疱疹病史

患者年龄从 18 岁到 60 岁不等，包括 81 名女性和 23 名男性，研究开始前，所有患者都有 4 年以上（不同部位的）复发性疱疹病史。通过对这些患者的初步临床数据进行分析，可了解 Allomedin 对单纯疱疹病毒感染的疗效。将 Allomedin 施用于疱疹性病变表面，每天 2~3 次，持续施用 3~5 天。研究结果汇总于表 2。

表 2 Allomedin 治疗不同部位复发疱疹病变的临床疗效（一项多中心临床研究综述）

部位	疗效评价		
	患者数	积极反应	
		N	%
皮肤	27	26	96,3
阴道或尿道粘膜	44	41	93,1
口腔粘膜	33	20	66,6

表 2 的数据表明，大多数患有皮肤疱疹和生殖器粘膜疱疹（对应唇疱疹和生殖器疱疹）的患者可以通过 Allomedin 有效治疗。Allomedin 治疗唇疱疹和生殖器疱疹的临床研究也表明，与标准抗病毒药物阿昔洛韦相比，Allomedin 能更快地缓解疱疹症状，如能大幅缩减灼烧感持续时间，使水肿区缩小。表 3 和表 4 均说明了这一事实。Allomedin 能迅速消除瘙痒、灼烧感、水肿等炎症症状，与阿昔洛韦治疗相比，症状持续时间缩短约 10 倍。

表 3 Allomedin 和阿昔洛韦治疗唇疱疹症状的疗效比较

指标	指标率（持续时间（小时））	
	阿昔洛韦	Allomedin
瘙痒和灼烧感持续时间	60 – 84	4-8
水肿区大小减少 50%	84 -108	8-12
复发总持续时间	168 – 192	72 – 96

表 4 Allomedin 和阿昔洛韦消除生殖器疱疹症状的疗效比较

指标和阶段	症状持续时间，小时	
	阿昔洛韦	Allomedin
瘙痒	84,3 ± 9,4	13,6 ± 3,7
灼烧感	93,2 ± 12,8	14,0 ± 2,2

水泡侵蚀期	96,2 ± 12,8	54,6 ± 10,2
结痂期	114,1 ± 20,8	98,0 ± 12,8

慢性复发性单纯疱疹患者单纯疱疹病毒感染的治疗

在第二项研究中，共 156 名临床诊断为慢性复发性单纯疱疹的患者（80 名男性和 76 名女性）参与了治疗。生殖器疱疹 53 例（33.97%），口腔面疱疹 98 例（62.82%），其他部位疱疹 5 例（3.21%）（腹部-1 例，手背-1 例，腹部-3 例）。所有参与研究的患者都经历过疱疹感染的恶化（不迟于复发后 3 天）。

根据使用药物的不同将患者分为 3 组，采用适应性随机化的方法，性别特征和疱疹部位不作区分（生殖器疱疹和唇疱疹被视为等效病理）。第 1 组患者接受为期 10 天的外用凝胶“*Allomedin*”治疗（8 小时一次，每天 3 次），第 2 组患者接受 *Zovirax* 乳膏治疗（4 小时一次，每天 5 次），第三组患者接受“*Fenistil Pentsivir*”乳膏治疗（2 小时一次，每天 8 次）。患者接受单一疗法形式的药物治疗。如果病变消退较早，则中断药物使用。对于第 1 组的“*Allomedin*”治疗，瘙痒、疼痛和灼烧感在第 2 次就诊时（第 3 天）消退。此外，第 1 组接受 *Allomedin* 治疗的患者的所有主诉症状几乎同时消退：瘙痒 3.8 ± 0.4 天，疼痛和灼烧感 3.7 ± 0.4 天。第 2 组和第 3 组的疼痛消退时间分别为 3.3 ± 0.3 天和 4.3 ± 0.5 天，灼烧感 3.9 ± 0.5 和 4.3 ± 0.7 天。疱疹性病变和瘙痒的消退速度比第 1 组稍慢（第 2 组和第 3 组分别为 4.3 ± 0.5 , $p > 0.05$; 5.3 ± 0.7 , $p > 0.05$ ）。

第 1 组患者的生殖器感染（GI）客观症状平均在 8.76 ± 0.4 天（ 210.4 ± 10.2 小时）消退，第 2 组的消退时间为 9.7 ± 0.3 天（ 232.9 ± 7.1 小时， $p > 0.05$ ），第 3 组为 9.5 ± 0.3 天（ 227.3 ± 7.7 小时， $p > 0.1$ ）。这些数据也可描述为复发的平均持续时间。

所有参与的研究人员都注意到，与其他药物相比，*Allomedin* 具有潜在的上皮化作用。与对照药物治疗相比，第 1 组 58.8% 的患者在暴露的水疱部位出现皮疹。相比第 1 组，第 2 组和第 3 组的皮疹率更高，分别为 $88.2\%*$ （ $p < 0.05$ ）和 $94.1\%*$ （ $p < 0.01$ ）。此外，与其他组相比，第 1 组上皮化速度更快，为 5.0 ± 0.6 天。第 2 组上皮化耗时 $7.1 \pm 0.6*$ 天（与第 1 组相比， $p < 0.02$ ），第三组 $6.6 \pm 0.4*$ 天（相对于第 1 组， $p < 0.05$ ）。结果

是 Allomedin 组在发疹部位结皮及硬皮脱落速度也更快，仅 8.4 ± 0.4 天（第 2 组 9.5 ± 0.3 *天， $p < 0.05$ ；第 3 组 9.2 ± 0.5 天， $p > 0.05$ ）

疱疹发疹水平下降了 2 倍（第 1 组为 4.8 ± 0.4 天（ 114.4 ± 10.8 小时）。第 2 组为 6.0 ± 0.4 天（ 144.0 ± 10.2 小时，与第 1 组相比 $p < 0.05$ ），第 3 组为 5.7 ± 0.5 天（ 136.9 ± 11.0 小时，与第一组相比 $p > 0.01$ ）。第二次就诊时，在第三组中 1 位生殖器疱疹患者的主要病灶周围发现 2 处新颗粒/凸起（该患者规律使用 Fenistil Pentsivir 凝胶）。

观察期结束时，第一组中病变完全消退的患者有 47 名（90.4%）；第二组 36 名（69.23%），第三组 35 名（67.3%）（图 9）。在第 1 组中，5 名患者（9.6%）病变中心部位有轻度水肿和充血，病变部位有结痂。在第 2 组中，16 名患者（30.8%）有轻微充血，残留不明硬皮。而第 3 组中，17 例（32.69%）患者病变部位出现结痂。

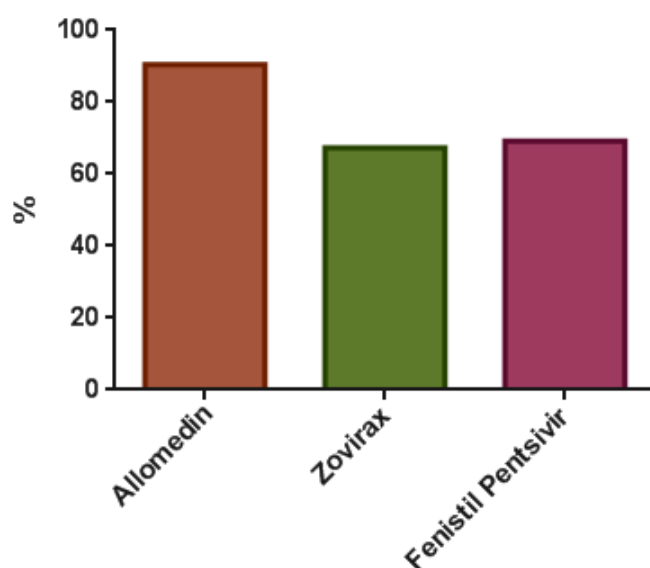


图 9 Allomedin、Fenistil Pentsivir 和 Zovirax 治疗后疱疹临床表现的完全消退率

使用凝胶“Allomedin”不会引发任何不良事件，也不存在局部和常见的不良反应及过敏反应，由此可见其安全性。因此，可将该药物作为广泛临床实践中的用药选择进行推荐。根据所有指标的总和（主诉症状缓解、临床症状、处方药耐受性），患者和医学研究人员对疱疹病毒感染恶化的治疗效果进行了评估（表 5）。第一组 92.3% 的患者、

第二组 75%的患者和第三组 69.23%的患者认同治疗效果“良好”。第 1 组 7.7%的患者、第 2 组 25%的患者和第三组 28.85%的患者认为治疗效果“满意”。3 组中有 1 名患者的治疗效果“不满意”（虽然医生认为本例的治疗效果“满意”）。在大多数情况下，患者和医生对治疗的主观评估在各组中都是一致的。在第 1 组中，98.08%的患者和医生的意见一致，只有 1 例存在差别——患者认为治疗结果“满意”，医生认为“良好”。在第 2 组中有 5 例，医生和患者本人在治疗评估意见上存在差异：其中 3 例患者认为“满意”，医生认为“良好”；另外 2 例恰好相反。在第 3 组中，4 例（7.69%）出现差异：1 例患者认为治疗效果“良好”，医生认为“满意”；2 例患者认为治疗效果“满意”，医生认为“良好”；在第 4 例中，患者认为治疗效果“不满意”，而医生认为“满意”。

表 5: 治疗效果评估

效果	患者观点			研究员观点			观点差异
	良好	满意	不满意	良好	满意	不满意	
第一组 (52 名患者)	48 (92,3%)	4 (7,7%)	-	49 (94,23%)	3 (5,77%)	-	1 (1,92%)
第二组 (52 名患者)	39 (75%)	13 (25%)	-	40 (76,92%)	12 (23,08%)	-	5 (9,61%)
第三组 (52 名患者)	36 (69,23%)	15 (28,85%)	1 (1,92%)	37 (71,15%)	15 (28,85%)	-	4 (7,69%)

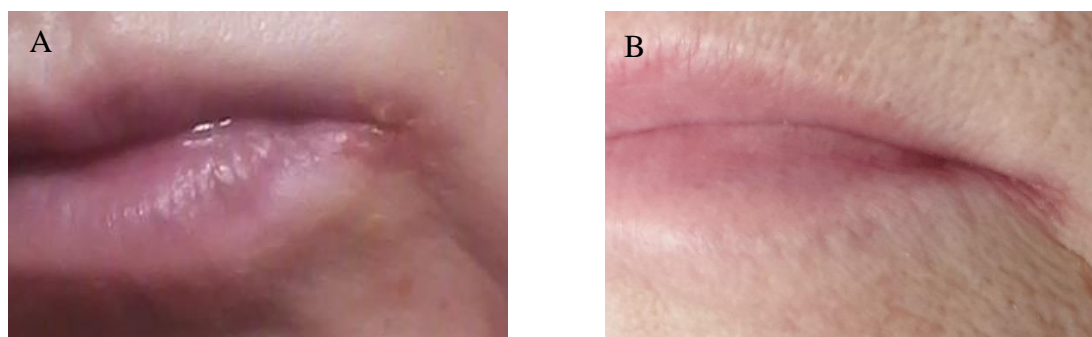


图 9 复发唇疱疹；图 A: 治疗前，图 B: Allomedin 治疗后

讨论

在本研究中，我们证明了 Allostatine 能诱导不同的免疫反应以有效抵抗病毒。对于感染 1 型和 2 型单纯疱疹病毒的患者，Allostatin 配制的 Allomedin®凝胶能对其皮肤损伤产生积极疗效。

Allostatine（一级结构：His-Gly-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-His-Gly-Thr-His-Gly）属于 Alloferons，Alloferons 是一组从红头丽蝇中分离出的天然抗病毒肽[2]，能够诱导干扰素的合成并改变细胞因子的产生。它被认为是 Alloferon-1(His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly)的一种新的结构类似物，能够调节转录因子 NF-kB 以及 NKs 和 T 细胞的反应[1]。

NK 细胞和 T 细胞在宿主对病毒感染的反应中起着重要作用。活化的 NK 细胞和 T 细胞能够通过产生不同的直接溶细胞因子和刺激抗病毒适应性免疫反应的细胞因子（特别是 IFN- γ ），直接杀死病毒感染的细胞[3]。

NK 细胞效应器的作用机制会对不同细胞受体的参与做出反应。本研究证明了 Allostatine 在与 NKs 相互作用时通过激活此类受体引发反应的潜力；因此，也可以把 Allostatine 看作是一种抗病毒肽。与 K562 靶细胞共孵育的 Allostatine 增加了表面分子 CD244（2B4）、NKp80（杀伤细胞凝集素样受体亚家族 F 成员 1-KLRF1）和 CD226 的表达。CD244 信号通路涉及与细胞内含有 SH2 结构域的小蛋白 1，SH2D1A 和 Src 酪氨酸家族成员 Fyn 的 Src 同源性 2（SH2）结构域的相互作用，Fyn 是一种在 NK、T 和 B 细胞中表达的非受体酪氨酸蛋白激酶(Engel et al., 2003) [5]。已知 NKp80 在人类 NK 细胞中表现为 C 型凝集素样免疫受体（CTLR）的激活剂[6]。还表明，Allostatine 可以激活 CD226（又名 DNAM-1 或 DNAX 辅助分子-1），这是一种在 NKs、血小板、单核细胞和 T 细胞亚群表面表达的 65kDa 糖蛋白[7]。

有趣的是，先前已将 CD244、Nkp80 和 CD226 描述为 IFN γ 产生的诱导物[8]。CD244 是 SLAM（信号淋巴细胞活化分子）蛋白家族的一员，具有诱导 IFN γ 分泌和细胞毒性的能力。这种刺激作用是由于胞浆内尾部存在额外酪氨酸基序(Watzl et al., 2000) [9]。细胞因子的产生和 NK 细胞毒性可以解释为 NKp80 上调及其与同源配体“活化诱导的

C型凝集素”（AICL）结合的结果[10]。此外，CD226诱导NK细胞介导的细胞毒性刺激，并增加IFN- γ 的分泌[11]。

用Allostatine孵育T细胞后，经CD3和CD28激活，观察到IL2和IFN γ 的分泌增加。这些发现与先前证明的数据一致，表明Alloferons家族的肽能通过上调NK活化受体CD244以及产生IFN γ 、TNF- α 和促进颗粒胞吐作用，诱导NK细胞对癌症细胞的细胞毒性。

在这项研究中，我们通过体外激活NK细胞的CD25标记物，强调了Allostatine治疗后可能产生针对病毒感染的免疫反应。此外，我们还评估了在接受Allostatine治疗的患者中，T淋巴细胞CD3和CD25表达的增加。CD25是白细胞介素2（IL-2R α ）的 α 链受体(Waldmann, 1989) [14]。我们的数据表明，Allostatine刺激人NK细胞上的IL-2R α 受体并激活T细胞，然后是细胞因子预激活。

许多研究表明，HSV感染的初始阶段受到IFNs、NK细胞和T细胞活性的影响，这些细胞会限制病毒向神经系统的传播[5, 6, 15] 其他实验报告称，巨噬细胞被认为是HSV感染的有效早期抑制剂[16]。活化的巨噬细胞通过释放一氧化氮抑制病原体复制[17]。

观察到的Allostatine相关的免疫反应数据与用Allostatine治疗复发性单纯疱疹病变的临床研究结果一致。我们的数据证明了Allostatine对HSV1和HSV2的有效性和安全性。它作为一种局部治疗，甚至作为这些疾病的单一疗法，具有很高的疗效和良好的耐受性。

含Allostatine的凝胶“Allomedin”能迅速抑制疱疹感染恶化的主观感觉和客观表现，尤其是在早期治疗阶段。与Zovirax和Fenistil Petsivir乳膏治疗相比，Allomedin治疗显示出优越且显著不同的临床益处。临床数据也显示了治疗的高度依从性。此外，Allomedin引起了更明显的上皮化作用，缩短了结皮形成和脱落的时间。每天施用2-3次该药物显示出优异的美容特性，这表明使用Allomedin凝胶可以阻止唇疱疹或生殖器疱疹的恶化（无论其严重程度如何）。患者和医生对治疗的主观评估也证实了这一点。这些发现都为Allomedin在临床实践中的普及提供了支撑。

所有外用药物的耐受性均被评为良好，无局部不良反应、一般反应和过敏反应。值得注意的是，接受 Allomedin 治疗的患者都表示，每日 2-3 次涂抹 Allomedin 凝胶操作起来十分方便。Allomedin 还具有良好的感官特性，质地透明，涂抹后不会出现表面发亮。

结论

根据我们的临床数据，Allostatine 及其凝胶制剂 Allomedin 作为治疗皮肤和粘膜 HSV1 和 HSV2 感染的药物，表现出优异的疗效和安全性。事实上，本研究的临床数据证实，90%~95% 的唇疱疹和生殖器疱疹病例都可通过 Allomedin 治疗得到有效控制。据我们所知，尚无任何药物或化妆品能像 Allomedin 一样有效地治疗这种适应症。如今，大约 90% 的人口感染了 HSV。HSV 感染后会终身携带，表现为不同的形式，从轻度疾病（唇疱疹）到严重的慢性形式，如复发性生殖器疱疹。根据世界卫生组织批准的欧洲 STD 指南[Patel et al., 2017]，鉴于局部制剂的疗效非常有限，建议全身给药（口服或静脉给药）。我们证明，相比阿昔洛韦，Allomedin 能更快消除 HSV 感染的大多数症状，如瘙痒、灼烧感、水肿。值得注意的是，长期使用阿昔洛韦进行治疗还会产生阿昔洛韦耐药性菌株，恶化疱疹治疗的前景。但由于 Allostatine 的作用方式与阿昔洛韦完全不同，Allomedin 也可以有效地对抗对阿昔洛韦耐药的 HSV。

参考文献

Carter C.J. Interactions between the products of the Herpes simplex genome and Alzheimer's disease susceptibility genes: relevance to pathological-signalling cascades. (单纯疱疹病毒基因组产物与阿尔茨海默病易感基因之间的相互作用：与病理信号级联的相关性) *Neurochem Int.* 2008 May;52(6):920-34.

Chernysh S., Kim S.I., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., Platonov V.G., Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects. (昆虫的抗病毒和抗肿瘤肽) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12628-32.

Chernysh S.I., Filatova N.A., Chernysh N.S., Nesin A.P. Cytotoxic activity of blowfly *Calliphora vicina* hemocytes(丽蝇血细胞的细胞毒活性) *J Insect Physiol.* 2004 Sep;50(9):777-81.

Chernysh S., Irina K., Irina A. Anti-tumor activity of immunomodulatory peptide alloferon-1 in mouse tumor transplantation model. (免疫调节肽alloferon-1在小鼠肿瘤移植模型中的抗肿瘤活性) *Int Immunopharmacol.* 2012 Jan;12(1):312-4.

Chernysh S., Kozuharova I. Anti-tumor activity of a peptide combining patterns of insect alloferons and mammalian immunoglobulins in naïve and tumor antigen vaccinated mice. (结合了昆虫alloferons和哺乳动物免疫球蛋白模式的肽在接种了肿瘤抗原的小鼠中的抗肿瘤活性) *Int Immunopharmacol.* 2013 Dec;17(4):1090-3

Kruglikova A.A: & Chernysh S.I. Surgical Maggots and the history of their medical use. (手术蛆虫及其医学应用史) *Entomological Review.* 2013, v.93(6), 667-674

Looker K.J., Welton N.J., Sabin K.M., Dalal S., Vickerman P., Turner K.M.E., Boily M.C., Gottlieb S.L. Global and regional estimates of the contribution of herpes simplex virus type 2 infection to HIV incidence: a population attributable fraction analysis using published epidemiological data. (全球和区域单纯疱疹病毒2型感染对艾滋病毒发病率贡献的估计：利用已发表的流行病学数据进行的人口归因比例分析) *Lancet Infect Dis.* 2020 Feb;20(2):240-249.

McQuillan G., Kruszon-Moran D., Flagg E.W., Paulose-Ram R. Prevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in persons aged 14–49: United States, 2015–2016. (2015~2016年美国14~49岁人群中单纯疱疹病毒1型和2型的流行率) *NCHS Data Brief*, no 304. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2018.

Nissen J., Trabjerg B., Pedersen M.G., Banasik K., Pedersen O.B., Sørensen E., Nielsen K.R., Erikstrup C., Petersen M.S., Paarup H.M., Bruun-Rasmussen P., Westergaard D., Hansen T.F., Pedersen C.B., Werge T., Torrey F., Hjalgrim H., Mortensen P.B., Yolken R., Brunak S., Ullum H., Burgdorf K.S. Herpes Simplex Virus Type 1 infection is associated with suicidal behavior and first registered psychiatric diagnosis in a healthy population. (单纯疱疹病毒1型感染与健康人群的自杀行为和首次登记的精神病诊断有关) *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Oct;108:150-154.

Patel R1, Kennedy OJ2, Clarke E1, Geretti A3, Nilsen A4, Lautenschlager S5, Green J6, Donders G7, van der Meijden W8, Gomberg M9, Moi H10,11, Foley E1. 2017 European guidelines for the management of genital herpes. (欧洲生殖器疱疹管理指南) *Int J STD AIDS*. 2017 Dec;28(14):1366-1379. doi: 10.1177/0956462417727194. Epub 2017 Aug 24.

Wald A. & Corey, L. (2007). "Chapter 36: Persistence in the population: epidemiology, transmission". *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. (“第36章：人口中的持久性：流行病学、传播” 。人类疱疹病毒：生物学、治疗和免疫预防) Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-82714-0.

Whitaker I.S., Twine C., Whitaker M.J., Welck M., Brown C.S., Shandall A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. (从古至今的幼虫治疗：作用机制，临床应用和未来的潜力) *Postgrad Med J*. 2007 Jun;83(980):409-13