

# 肝康对 HBV 转染细胞表达功能的影响\*

张均倡 罗上武 万金志 王 岭 张 云

(广州中医药大学附属珠海市中医院 珠海 519015)

摘要 用 2.2.15 细胞系模型,连续 13d 检测 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA,动态观察肝康对其的抑制作用。结果:①均有一个相似的药物作用曲线,即从用药到见效需 3~4d,较强的抑制可维持 3~5d,然后逐渐减弱、消失;②分泌、复制越是旺盛,抑制作用越强;③有量效依赖关系。

关键词 肝康 叶下珠 2.2.15 细胞

## **Inhibition of Hepatitis B Virus (HBV) Replication from Transfection Cells by Gankang**

*Zhang Junchang, Luo Shangwu, Wan Jinzhi, Wang Ling, Zhang Yun*

*(Affiliated Zhuhai TCM Hospital of Guangzhou University of TCM, Zhuhai, 519015)*

**Abstract:** We used Transfection Cells (HepG2 2.2.15 cells) to observe the inhibiting action of Gankang by detecting HBsAg, HBeAg and HBV-DNA once a day for 13 days. Re-

---

\* 广东省中医药管理局资助项目

sults: a) There was a similar inhibiting action curve on HBsAg and HBeAg secretion and HBV-DNA replication, which showed it needed 3~4 days to introduce the action, the strong action would maintain 3~5 days, then it decreased to disappear gradually. b) The more active HBV replicated, The stronger Gankang inhibiting action was. c) The relationship of drug quantity and its effects was positive correlation.

**Key words:** Gankang, Phyllanthus Amarus, HepG2 2.2.15 Cells

以叶下珠为主药治疗慢性乙肝的系列复方制剂之一——肝康丸剂,经3年临床应用,初步结果:HBsAg、HBeAg及HBV-DNA阴转率分别为6.3%、46.7%及50.6%。取得了较好的效果。本文就肝康抗HBV作用的实验研究报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 药物** 叶下珠、桑寄生、菟丝子、淫羊藿、黄芪、炙甘草、田七、虎杖、板兰根、山豆根、葫芦茶等组成,由广州中医药大学附属珠海市中医院制成丸剂。临床用量每次8g,每日3次,饭后服用。批准文号:粤珠卫药制剂[1996]B003,生产批号:970129。阳性对照药乙肝宁冲剂由长沙九芝堂制药厂生产,批准文号:湘卫药准字[92]02-151号,生产批号:960302。

**1.2 药物处理** 分别取肝康丸剂粉碎后过筛所得细粉及乙肝宁冲剂颗粒20g,分别加10倍蒸馏水文火煎煮10min取煎汁,药渣加蒸馏水再煎2次,合并3次煎汁,用滤纸过滤,水浴蒸发至100%溶液;10磅10min高压后分装小管,4℃保存备用。

**1.3 2.2.15 细胞** 引自北京302医院病毒室。该肝癌细胞系为含有乙型肝炎病毒(HBV)基因的多倍体,能转录、翻译HBV基因并产生HBV表面抗原(HBsAg)、e抗原(HBeAg)、HBV-DNA和HBV颗粒。

## 1.4 主要试剂与仪器

**1.4.1 试剂** DMEM(Gibco),G<sub>418</sub>(Sigma),谷氨酰胺(Sigma),新生小牛血清(广州市畜牧场),HBsAg、HBeAg ELISA检测试剂盒(上海科华),HBV-DNA PCR检测试剂盒

(河南华美),余为分析纯试剂。

**1.4.2 仪器** CO<sub>2</sub>培养箱(MCD175、日本三洋),PCR扩增仪(1169型、北京),紫外分光光度计(745-G、上海),倒置显微镜(德国),紫外透射反射仪(上海),酶标检测仪(南京),电泳仪(北京),细胞培养板(Gibco)。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 2.2.15 细胞的培养** DMEM中加入380mg/L G<sub>418</sub>,15%新生小牛血清,2mmol/L谷氨酰胺,1%青、链霉素,4.4%NaHCO<sub>3</sub>调pH至7.2~7.4,37℃5%CO<sub>2</sub>培养,每10d传代1次。

**1.5.2 药物对细胞的毒性作用试验** 将2.2.15细胞按1×10<sup>4</sup>/ml接种96孔细胞培养板,每孔0.2ml,次日用培养液将各种药物作系列2倍稀释(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600)加入细胞孔,每稀释度5孔,每4d换相同浓度的相同药液,设不加药物细胞对照,每天观察记录结果。毒性判断标准为:不加药物孔细胞无自然蜕变为—,加药物孔细胞被破坏75~100%为++++,50%~74%为+++ ,25~49%为++ ,1~24%为+ ,400倍镜下观察,细胞无明显破坏为一。按Reed-Meuench法计算药物对细胞生长的半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)。

**1.5.3 HBsAg、HBeAg分泌规律和HBV-DNA复制试验** 将2.2.15细胞按2×10<sup>5</sup>/ml接种24孔细胞培养板,每孔1.2ml,共10孔,每天收集培养上清250μl,培养液补足原量至第13d,培养上清—30℃冻存,最后集中按试剂盒说明书ELISA法测定HBsAg、HBeAg,PCR法检测HBV-DNA。



表3 不同药物抑制 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 的治疗指数

组别	时间(d)	TC <sub>50</sub> (mg/ml)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	TI
肝康	5	3.25±0.37	0.78±0.13	4.17±0.03
	6	3.25±0.37	0.75±0.21	4.33±0.05
	7	3.25±0.37	0.63±0.19	5.16±0.03
	8	3.25±0.37	0.72±0.11	4.51±0.02
乙肝宁	5	2.98±0.24	1.53±0.15	1.95±0.02
	6	2.98±0.24	1.49±0.32	2.00±0.05
	7	2.98±0.24	1.24±0.28	2.40±0.05
	8	2.98±0.24	1.36±0.17	2.19±0.04

表4 不同药物抑制 2.2.15 细胞分泌 HBeAg 的治疗指数

组别	时间(d)	TC <sub>50</sub> (mg/ml)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	TI
肝康	5	3.25±0.37	0.48±0.12	6.77±0.05
	6	3.25±0.37	0.39±0.18	8.33±0.07
乙肝宁	5	2.98±0.24	0.92±0.14	3.24±0.04
	6	2.98±0.24	0.85±0.27	3.51±0.09

表5 不同药物对 2.2.15 细胞 HBV-DNA 复制的抑制作用

组别	剂量(mg/ml)	抑 制 作 用					
		2d	4d	6d	8d	10d	12d
肝康	2.0	++++	++	-	++	++++	++++
	1.0	++++	++	-	++	++++	++++
	0.5	++++	++++	++	++	++++	++++
	0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
乙肝宁	2.0	++++	++	++	++	++++	++++
	1.0	++++	++++	++	++	++++	++++
	0.5	++++	++++	++	++++	++++	++++
	0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2.2.15 细胞对照		++++	++++	++++	++++	++++	++++
阴性对照		-	-	-	-	-	-

**2.4 不同药物对 HBV-DNA 复制的抑制作用** 以当天不加药物 2.2.15 细胞上清经 PCR 扩增 DNA 条带荧光强度为++++,较之有减弱为++,不出现条带为一。不同药物对 HBV-DNA 复制的抑制作用结果见表 5。

### 3 讨论

近几年,国内外不少学者对叶下珠抗 HBV 的作用进行了多方面的研究,反映不一,但也取得了一些成绩<sup>[1~3]</sup>;近来国外有学者利用体外细胞模型进一步阐述了叶下珠抗 HBV 的机制<sup>[4,5]</sup>,并证实了其能降低 HBV 复制过程中 HBsAg mRNA 的水平。

为了动态观察临床应用效果良好的叶下

珠复方肝康对 HBV 的作用情况,本项实验在细胞培养更换培养液方面与以往方法<sup>[3]</sup>有所不同,改每 4d 全部更换 1 次为每天更换约 1/5 的培养液稀释的药液并连续每天测定相关数据。分析结果可以看出有如下特征:①均存在一个相似的药物作用曲线,即从开始用药到见到效果有个过程,需 3~4d,较强的抑制 HBV 作用可维持 3~5d,然后逐渐减弱、消失;②在 HBV 分泌、复制越是旺盛的时期,药物对 HBV 的抑制作用表现得越强,越能显示出药物的作用;③药物作用的强弱与剂量大小有一定的依赖关系。由此可以说明肝康具有抗 HBV 的作用。

从本实验的药物作用曲线看,如何维持药物作用是个值得关注的问题,尚需从多方面进一步探讨。

另外,从临床应用情况看,肝康对慢乙肝 HBV 复制指标(HBeAg、HBV-DNA)阳性的患者,具有促复制指标阴转的作用,能反映出其抗病毒效果,而对复制指标阴性者,除复制指标外其他变化不明显(即 HBsAg 阴转率不高),这种 HBV 复制越明显越能反映抗 HBV 作用的临床疗效特征,看来与本实验的 HBV 分泌、复制越强,抗 HBV 的作用越明显的药物作用特点有一定关系。此外,干扰素在慢乙肝的临床应用中亦有类似的临床疗效特征,有关机制值得进一步多方探讨。

本项实验研究从体外抗 HBV 方面证实了叶下珠复方“肝康”具有抗 HBV 的作用。值得进一步研究与开发。

### 参考文献

- 1 王灵台,何燕,任家滩,等. 苦味叶下珠抗乙肝病毒的临床研究. 中西医结合肝病,1992,2(2):6
- 2 万振先,喻庆禄,易扬华. 叶下珠化学成分的研究. 中草药,1997,28(3):134
- 3 陈征途,李凤仙,邓文娣,等. 不同品种、不同产地叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究. 中草药,1997,28(10):616
- 4 Jayaram-S, Thyagarajan-SP. Inhibition of HB-

sAg Secretion from Alexander Cell Line by  
Phyllanthus Amarus. Indian-J-Pathol-Microbi-  
ol, 1996 Jul, 39(3):211

5 Lee-CD, Ott-M, Thyagarajan-SP, et al. Phyl-  
lanthus Amarus Down-regulates Hepatitis B

Virus mRNA Transcription and Replication.  
Eur-J-Clin-Invest, 1996 Dec, 26(12):1069

致谢:贵阳医学院李淑芳、左丽等老师对本实验  
研究工作给予大力支持,特致以谢忱!

(收稿:1998-03-18)