

毛鸡骨草含药血清体外抗乙型肝炎病毒作用的研究

陈晓白^{*}, 王晓平, 赵仕花

(玉林师范学院生命科学与技术学院, 广西 玉林 537000)

[摘要] 目的:观察毛鸡骨草(*Abrus mollis*)含药血清体外抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用。方法:采取中药血清药理实验方法,以 HepG2. 2. 15 细胞为研究模型,将毛鸡骨草含药血清加入 HepG2. 2. 15 细胞培养液中培养,分别在 72 h 和 144 h 收集细胞培养上清液,采用酶联免疫吸附实验法(ELISA 法)和荧光定量 PCR(FQ-PCR)法检测毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞株表达的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和 HBV DNA 复制的影响。结果:毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的表达和 HBV DNA 复制都有不同程度的抑制,以给药剂量为 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的毛鸡骨草含药血清组作用 144 h 对 HBsAg 的抑制率和对 HBV DNA 复制的抑制率最明显,抑制率分别为 34. 4% 和 41. 7%。结论:毛鸡骨草在体外有一定的抗 HBV 作用。

[关键词] 毛鸡骨草含药血清; HepG2. 2. 15 细胞; 乙型肝炎病毒

[中图分类号] R285. 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0218-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120921.1555.008.html>

[网络出版时间] 2012-09-26 15:55

Inhibitory Effect of Serum Containing *Abrus mollis* on Hepatitis B Virus *in vitro*

CHEN Xiao-bai^{*}, WANG Xiao-ping, ZHAO Shi-hua

(College of Life Science and Technology, Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitive effect of the serum containing *Abrus mollis* on hepatitis B

[收稿日期] 20120620(016)

[基金项目] 广西教育厅科研项目(200710MS052);广西玉林市科技局项目(玉市科攻 0881038)

[通讯作者] ^{*} 陈晓白,副教授,从事药理学教学与科研工作, E-mail: ylsy1016@163.com

- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 834.
- [6] 杜红岩, 娄丽杰, 傅建敏, 等. 杜仲雄花茶对 D-半乳糖衰老模型小鼠 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响[J]. 中成药, 2011, 33(2):331.
- [7] de Oliveira E Silva A M, Vidal-Novoa A, Batista-Gonzalez A E, et al. In vivo and *in vitro* antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux [J]. Redox Rep, 2012, 17(2):47.
- [8] Tong T K, Lin H, Lippi G, et al. Serum oxidant and antioxidant status in adolescents undergoing professional endurance sports training[J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 4(17):239.
- [9] Jian H X, Dai M X, Dai X C, et al. Polysaccharides from the medicinal mushroom *cordyceps taii* show antioxidant and immunoenhancing activities in a D-galactose-induced aging mouse model[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 3(29):1.
- [10] Ke C, Sun L, Qiao D, et al. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(10):2670.
- [11] Esrefoglu M, Iraz M, Ates B, et al. Melatonin and CAPE are able to prevent the liver from oxidative damage in rats: an ultrastructural and biochemical study. [J]. Ultrastruct Pathol, 2012, 36(3):171.

[责任编辑 聂淑琴]

virus (HBV). **Method:** HepG2. 2. 15 cells were cultured in medium containing the serum with *A. mollis* for 72 h and 144 h. The Effect of the serum containing *A. mollis* on HBsAg and HBV DNA reproduction in culture media of the HepG2. 2. 15 cells were determined by ELISA and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Result:** The serum containing *A. mollis* had a inhibiting effect on the HBsAg and HBV DNA reproduction with maximum inhibition ratio adding up to 34. 4% and 41. 7% respectively in which the affective time is 144 h and the density is $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. **Conclusion:** *A. mollis* can significantly inhibit HBV *in vitro*.

[**Key words**] serum containing *Abrus mollis*; HepG2. 2. 15 cells; HBV

毛鸡骨草(MJGC)为豆科相思子属植物,具有清热解毒、利湿、活血化瘀、舒肝止痛等功效^[1],常以复方入药,在肝胆疾病治疗、抗乙型肝炎方面取得较好的效果。中国的广东、广西等地有丰富的毛鸡骨草资源。为了更好地开发、利用这一丰富的中草药资源,进一步明确毛鸡骨草抗乙肝病病毒的作用,本课题组在前期以毛鸡骨草醇提液进行体外抗乙肝病病毒研究的基础上,采用中药血清药理学实验方法,以肝源性肿瘤细胞株 2. 2. 15 (HepG2. 2. 15)^[2]为乙型肝炎细胞模型,观察毛鸡骨草含药血清体外抗乙型肝炎病毒的作用。

1 材料

1.1 细胞株 HepG 2. 2. 15 细胞株,美国 The Mount Sinai Medical Center 于 1987 年构建,广西中医学院提供,本室自行传代,定期用 G418(一种筛选抗生素)筛选。

1.2 动物 SD 大鼠,体重(250 ± 15)g,雌雄各半,购于广西医科大学实验动物中心,生产许可证号 SCXK(桂)2003-0003。

1.3 药物与试剂 毛鸡骨草干燥全草,广西玉林制药有限责任公司提供,经玉林制药质检科鉴定为毛鸡骨草(*Abrus mollis* Hance);HBsAg(乙型肝炎表面抗原)酶联免疫检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司,批号 20090402);HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒(深圳匹基生物工程股份有限公司,批号 20090702/02);MEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 13200-035);胎牛血清(Hyclone 公司,批号 20090402);G418(美国 Sigma 公司,批号 108321-42);卡那霉素(Amreso 公司);胰蛋白酶(Amreso 公司)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(Serva 公司);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 分装);拉米夫定(lamivudine, 3TC, 葛兰素史克制药有限公司,批号 09030037)。

1.4 仪器 RT-2100C 型酶标仪(深圳雷杜生命科学服务公司生产),iCycler FQ 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),二氧化碳孵箱(美国 Shel-

Lab); γ -计数仪(德国 Beckman),RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 毛鸡骨草水煎剂的制备 取毛鸡骨草(去莢果)全草,第 1 次用 10 倍水浸泡 30 min,煮沸 1 h,取出提取液;第 2 次用 8 倍水煮 1 h,取出提取液;第 3 次用 8 倍水煮 1 h,取出提取液,3 次过滤的药液合并浓缩至相当于生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,冰箱保存备用。

2.2 毛鸡骨草含药血清的制备 参考文献[3-4],将大鼠随机分为 5 组。空白对照组:等量生理盐水;阳性对照组:拉米夫定 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;毛鸡骨草高剂量组:相当于毛鸡骨草生药 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;毛鸡骨草中剂量组:相当于毛鸡骨草生药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;毛鸡骨草低剂量组:相当于毛鸡骨草生药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。各组动物在同样条件下饲养,早、晚各 1 次空腹 ig 相应药物,连续给药 7 d。于末次给药后 2 h,乙醚吸入麻醉,腹主动脉抽血,分离血清,并将每组动物的血清混合。于 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 灭活,经 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜,再经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后,置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 细胞培养 HepG2. 2. 15 细胞用 15% 胎牛血清,0.03% L-谷氨酰胺, G418 $380 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,卡那霉素 $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 7.2 的 MEM 培养液常规培养。细胞消化液为含 0.25% 胰蛋白酶,用 D-Hanks 配制。

2.4 定量检测毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 的影响 实验参考文献[4]并稍加改进。将 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,每孔 1 mL, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 24 h 后,分别加入各组含药血清 100 μL (血清终体积为 10%),每个浓度 3 复孔。以等量的完全培养液为空白对照。 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 连续培养 72 h 后,将收集的培养液 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存待检。再次加入上述含药血清的培养液继续培养 72 h 后收集培养液 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存待检。ELISA 操作严格按照试剂盒说明书进行,结果用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度(A),以波长 630

nm 为参照,并计算药物对抗原的抑制率。

$$\text{抗原抑制率} = [1 - A_{\text{实验孔抗原}} / A_{\text{对照孔抗原}}] \times 100\%$$

2.5 荧光定量 PCR (FQ-PCR) 法检测 HBV DNA

实验方法同 2.4。将毛鸡骨草含药血清加入 HepG2. 2. 15 细胞培养液中培养,分别收集含药血清与细胞作用 72 h 和 144 h 的细胞培养上清液,采用 PCR 荧光定量技术检测细胞培养上清液中 HBV DNA 含量。按试剂盒方法提取样品 HBV DNA,各反应管放入荧光定量 PCR 仪,按以下条件进行扩增:94 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 变性 5 s;60 ℃ 退火、延伸 20 s。共反应 42 个循环。扩增过程及荧光信号检查、数据的储存和分析均由仪器及自带的软件自动完成。

2.6 统计学处理 数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行 *t* 检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的抑制作用 阳性对照物拉米夫定、毛鸡骨草各剂量组含药血清在与 HepG2. 2. 15 细胞作用 72 h 和 144 h 后,均可抑制 HepG 2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的分泌,与空白对照组比较有显著差异 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),抑制呈现一个明显的量效关系和时效反应关系,但各组毛鸡骨草含药血清对 HBsAg 抑制率低于 0.000 1 g·kg⁻¹ 的阳性对照物拉米夫定。见表 1。

3.2 毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBV DNA 的影响 阳性对照药物拉米夫定和毛鸡骨草含药血清在与 HepG2. 2. 15 细胞作用 72 h,144 h 后,对 HBV DNA 的复制有明显的抑制作用,与空白对照组比较,有显著差异 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),且随着药物浓度和作用时间的增加,其抑制作用逐渐增强,呈现较明显的量-效和时-效反应关系。见表 2。

4 讨论

本课题组在前期的研究中,采取以 HepG2. 2. 15 为乙型肝炎细胞模型的体外实验研究方法观察了毛鸡骨草醇提液抗乙型肝炎病毒作用,结果表明毛鸡骨草醇提液在体外具有一定的抗乙型肝炎病毒作用^[5]。体外实验具有干扰因素少,受动物机能状态、个体差异的影响少以及反应的指标特异性好,重复性好、需要样品少、实验效率高等优点。但考虑体外实验方法对于中药而言,存在许多问题,一是中药粗制剂中含有大量杂质会严重干扰实验,产生假阳性或假阴性结果^[3];二是体外实验由于没有在体实验产生的体内过程的影响,故不能完全、真实反映药物的作用和直接发挥药效的成分。为了更进一步明确毛鸡骨草抗乙型肝炎病毒的作用,课题组在本实验中采取了一种改良的中药体外实验方法—中药血清药理实验方法。此方法排除了中药制剂由于杂质造成的理化性质干扰,还能反映中药在胃肠道的消化吸收、生物转化,产生生物效应的最后过程,并代

表 1 毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	72 h		144 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白对照	-	0.39 ± 0.02	-	0.57 ± 0.03	-
拉米夫定	0.000 1	0.22 ± 0.02 ²⁾	44.6	0.31 ± 0.01 ²⁾	46.6
MJGC	30	0.27 ± 0.01 ²⁾	29.4	0.38 ± 0.01 ²⁾	34.4
	20	0.30 ± 0.01 ²⁾	24.5	0.42 ± 0.02 ²⁾	27.1
	10	0.31 ± 0.01 ²⁾	18.5	0.46 ± 0.02 ¹⁾	19.2

注:与空白对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2 同)。

表 2 毛鸡骨草含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	72 h		144 h	
		HBV DNA 拷贝/×10 ⁴ /mL	抑制率/%	HBV DNA 拷贝/×10 ⁴ /mL	抑制率/%
空白对照	-	3.07 ± 0.13	-	5.13 ± 0.19	-
拉米夫定	0.000 1	1.55 ± 0.14 ²⁾	49.5	2.39 ± 0.21 ²⁾	53.4
MJGC	30	1.95 ± 0.07 ²⁾	36.5	2.99 ± 0.12 ²⁾	41.7
	20	2.26 ± 0.11 ²⁾	26.4	3.33 ± 0.18 ²⁾	35.1
	10	2.62 ± 0.13 ¹⁾	14.7	4.12 ± 0.23 ¹⁾	20.0

表示了药物在体内产生作用的真正有效成分^[6],实验结果更可信,与整体实验的相关性更好^[3]。

本实验以 HepG2. 2. 15 细胞为研究模型,用含有毛鸡骨草的血清作为药物源加入 HepG2. 2. 15 细胞培养液中,通过酶联免疫吸附实验法和实时荧光定量 PCR 法检测毛鸡骨草含药血清在作用 HepG2. 2. 15 细胞 72,144 h 后细胞上清液中 HBsAg 的表达和上清液中 HBV DNA 的含量都有不同程度的抑制作用,抑制呈现一个明显的量-效关系和时-效反应关系,以质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的实验组抑制作用最明显,在作用 72 h 对 HBsAg 抑制率最高为 29.4%,对 HBV DNA 的复制抑制率为 36.5%;作用 144 h 对 HBsAg 抑制率最高为 34.4%,对 HBV DNA 的抑制率为 41.7%。此实验结果提示,毛鸡骨草在体外有一定抗 HBV 作用,此作用与前阶段用毛鸡骨草醇提液体外实验作用相符,并显示出更明显的抑制作用。

从目前抗乙型肝炎病毒的药物研究表明,抗乙肝药物作用机制主要通过阻断病毒与宿主细胞的吸附、抑制病毒逆转录酶和增强机体免疫这三方面实现,中草药抗病毒成分主要为黄酮类、皂苷类、多糖类、生物碱类等^[7]。有报道,藤茶中提取的总黄酮对 HBV 基因转染的人肝癌细胞系 2. 2. 15 细胞 HBV-DNA 的合成有一定抑制作用^[8]。周艳萌等^[9]通过体外实验得出不同浓度的土贝母皂苷对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌均有一定的抑制作用。陈亚西等^[10]研究表明广西叶下珠、云南叶下珠能使鸭血清中 DHBV-DNA 水平下降。叶下珠的化学成分研究发现含有鞣花酸,没食子酸, β -谷甾醇,胡萝卜苷,短叶苏木酚,槲皮素,芸香苷,十八碳烯酸乙酯和原儿茶酚^[11]。

毛鸡骨草具有清热解毒、利湿、活血化瘀、舒肝止痛等功效,现代药理学研究表明还有保肝、增强免疫、抗氧化等作用。其主要成分为脂肪酸、三萜皂苷、甾体和异黄酮类化合物^[12]。这些成分和作用与以上分析的抗乙型肝炎病毒的中草药相类似。由此推测这些成分和作用可能是毛鸡骨草抗乙型肝炎病毒的药效学基础。

本研究采用的是单味的毛鸡骨草通过血清药理

学研究方法进行的体外抗乙肝病毒实验,虽然单味毛鸡骨草对 HBV 的抑制率不是很理想,体外实验与体内实验的结果也有一定的差异,但此实验,在一定程度上可以说明毛鸡骨草对乙型肝炎病毒有直接的抑制作用。

[参考文献]

- [1] 白隆华,董青松,蒲瑞翎. 中药鸡骨草研究概况[J]. 广西农业科学,2005,36(5):476.
- [2] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987,84(4):1005.
- [3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:50.
- [4] 林兴,黄权芳,张士军,等. 六月青含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 复制的抑制作用[J]. 中国药房,2009,20(24):1847.
- [5] 陈晓白,王晓平,韦敏. 毛鸡骨草醇提液对 HepG2. 2. 15 细胞乙型肝炎表面抗原及乙型肝炎 E 抗原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):184.
- [6] 刘建文. 药理实验方法学. 新技术与新方法[M]. 北京:化学工业出版社,2003(6):258.
- [7] 赖进科,钟振国,李舒. 中草药抗乙型肝炎病毒有效成分的研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2009,11(12):132.
- [8] 郑作文. 藤茶总黄酮在 2215 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg, HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东中医药杂志,2003,22(9):561.
- [9] 周艳萌,吴中明. 土贝母皂苷对 HBV 转染的 HepG₂. 2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用[J]. 遵义医学院学报,2005,28(2):112.
- [10] 陈亚西,郭树华,张定凤,等. 不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,1995,15(4):225.
- [11] 万振先,詹永成,薛德钧. 叶下珠化学成分的研究[J]. 江西中医学院学报,1999,11(2):79.
- [12] 温晶,史海明,屠鹏飞. 毛鸡骨草的化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(5):658.

[责任编辑 聂淑琴]