

# 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

陈晓白<sup>1\*</sup>, 王晓平<sup>1</sup>, 韦敏<sup>2</sup>

(1. 玉林师范学院, 广西 玉林 537000; 2. 广西玉林市卫生学校, 广西 玉林 537000)

**[摘要]** 目的: 观察毛鸡骨草体外抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用。方法: 采用 MTT 法检测毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞的半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)和最大无毒浓度(TC<sub>0</sub>), 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法测定 < TC<sub>0</sub> 的 5 个不同浓度的毛鸡骨草醇提液对 HepG2. 2. 15 细胞株表达的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)的影响。结果: 毛鸡骨草醇提液可有效地抑制细胞 HBsAg 和 HBeAg 的分泌; 在质量浓度为 4 g·L<sup>-1</sup> 作用 144 h 对 HBsAg, HBeAg 抑制作用最为明显, 抑制率分别为 33. 1% , 40. 1%。结论: 毛鸡骨草在体外有一定的抗 HBV 作用。

**[关键词]** 毛鸡骨草; HepG2. 2. 15 细胞; 乙型肝炎表面抗原; 乙型肝炎 E 抗原

**[中图分类号]** R285. 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0184-03

## Effect of *Abrus mollis* Hance on HBsAg and HBeAg in the HepG2. 2. 15 Cells

CHEN Xiao-bai<sup>1\*</sup>, WANG Xiao-ping<sup>1</sup>, WEI Min<sup>2</sup>

(1. Yulin Teachers College, Yulin 537000, China;

2. Guangxi Yulin Health School, Yulin 537000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the inhibitive effect of *Abrus mollis* Hance on HBV. **Method:** The TC<sub>50</sub> and TC<sub>0</sub> of *A. mollis* to the HepG2. 2. 15 cells were determined by MTT assay. The effect of < TC<sub>0</sub> five different concentrations of alcohol extract of *A. mollis* on HBsAg and HBeAg in the HepG2. 2. 15 cells was determined by ELISA. **Result:** *A. mollis* had a inhibiting effect on the HBsAg and HBeAg with maximum inhibition ratio adding up to 33. 1% and 40. 1% , respectively, in which the affective time was 144 h and the density was 4 g·L<sup>-1</sup>. **Conclusion:** *A. mollis* can significantly inhibit HBV *in vitro*.

**[Key words]** *Abrus mollis*; HepG 2. 2. 15 cell; HBsAg; HBeAg

毛鸡骨草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<sup>[1]</sup>, 常以复方入药, 在肝胆疾病治疗、抗乙肝病毒方面取得较好的效果。本研究采用在药物抗病毒研究中被广泛应用的肝源性肿瘤细胞株 HepG2. 2. 15<sup>[2]</sup>为乙型肝炎细胞模型, 进一步研究毛鸡骨草体外抗乙型肝炎病毒(HBV)作用。

### 1 材料

**1.1** 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** 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)和 HBeAg(乙型肝炎 E 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 20041209), MEM 培养基(美国 Gibco 公司, 批号 13200-035), 胎牛血清(Hyclone 公司, 批号 20060404), G418(美国 Sigma 公司, 批号 108321-

**[收稿日期]** 20110712(005)

**[基金项目]** 广西教育厅科研资助项目(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

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), 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma 分装), 拉米夫定 (lamivudine, 3TC, 葛兰素史克制药有限公司, 批号 09030037)。

**1.3 仪器与设备** RT-2100C 型酶标仪 (深圳雷杜生命科学服务公司生产), 二氧化碳孵箱 (美国 Shel-Lab),  $\gamma$ -计数仪 (德国 Beckman), 培养瓶 (丹麦 Tunclon™), 96 孔、24 孔培养板 (美国 Corning 公司), RE-52A 型旋转蒸发仪。

## 2 方法

**2.1 毛鸡骨草醇提液的制备及配制** 将 15 g 毛鸡骨草粉碎 (用 FW100 型高速万能粉碎机将毛鸡骨草粉碎) 放于索氏提取器中, 加 75% 的乙醇 150 mL 在 90 °C 水浴中回流提取 3 h, 取出提取液, 再次用 75% 乙醇 150 mL 在 90 °C 水浴中回流提取 3 h, 合并提取液, 用旋转蒸发仪将提取液浓缩至 5 mL, 使样品液质量浓度为 3 g·mL<sup>-1</sup>。用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 4 °C 保存备用。

**2.2 细胞培养** HepG2. 2. 15 细胞用 15% 胎牛血清、0.03% L-谷氨酰胺、G418 380 mg·L<sup>-1</sup>、卡那霉素 50 U·mL<sup>-1</sup>, 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。

**2.3 毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞毒性** 参考文献 [3-4], 取生长状态良好的 HepG2. 2. 15 细胞, 胰酶消化后制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 置于孵箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中培养 24 h 后, 细胞贴壁且生长良好, 吸除全部培养液, 加入用完全培养液将毛鸡骨草系列 5 倍稀释成 500, 100, 20, 4, 0.8, 0.16 g·L<sup>-1</sup>, 每个质量浓度设 6 个复孔。连续培养 72 h, 培养结束前 4 h, 每孔加入 MTT 10  $\mu$ L, 于 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养。4 h 后小心吸弃上清液后, 每孔加 DMSO 100  $\mu$ L, 全自动酶标仪 (检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm) 读取各孔吸光度 (A), 记录结果。按 Reed-Muench 法计算半数细胞毒浓度 (TC<sub>50</sub>) 和最大无毒浓度 (TC<sub>0</sub>)。

**2.4 毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBeAg 和 HBsAg 的影响** 将 5 × 10<sup>4</sup>/mL 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL, 置 CO<sub>2</sub> 孵箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中培养 24 h 后, 细胞贴壁且生长良好, 吸除全部培养液, 根据细胞毒性试验结果, 分别加入最大无

毒浓度以下系列 2 倍稀释成 5 个终质量浓度的应用液: 4, 2, 1, 0.5, 0.25 g·L<sup>-1</sup>, 每个质量浓度设 3 个复孔。以等量的完全培养液为空白对照, 以证实有效的拉米夫定 (3TC, 0.1 g·L<sup>-1</sup>) 为阳性对照药。连续培养 72 h 后, 分别吸出上清液于 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管中, -20 °C 保存, 统一待检。再次加入上述含不同浓度药物的培养液继续培养 72 h 后, 分别吸出上清液于 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管中, -20 °C 保存, 统一待检。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 统计学处理** 数据采用 SPSS17.0 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 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 HepG2. 2. 15 细胞毒性** 将 500, 100, 20, 4, 0.8, 0.16 g·L<sup>-1</sup> 的毛鸡骨草应用液分别加入 HepG2. 2. 15 细胞中连续培养 72 h 后, 显微镜下观察细胞病变, 按照 Reed-Muench 法计算得出: TC<sub>0</sub> = 4.87 g·L<sup>-1</sup>, TC<sub>50</sub> = 23.13 g·L<sup>-1</sup>, 即当药物浓度 ≤ TC<sub>0</sub> 时, HepG2. 2. 15 细胞无论在形态上还是数量上与空白对照组比较没有发生明显变化。结果提示鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞毒性较低。

**3.2 对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的抑制作用** 阳性对照药物 3TC 和毛鸡骨草醇提液作用 72 h, 144 h 后, 均可抑制 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 的分泌, 与空白组比较有显著差异 (P < 0.05, P < 0.01)。毛鸡骨草醇提液在作用 144 h 后质量浓度为 4 g·L<sup>-1</sup> 时抑制率最高, 达 33.1%, 但抑制作用弱于阳性对照物 3TC。毛鸡骨草对 HBsAg 的分泌抑制呈现一个明显的量效关系和时效反应关系。结果见表 1。

**3.3 对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBeAg 的抑制作用** 阳性对照药物 3TC 和毛鸡骨草在最大无毒浓度下作用 72 h, 144 h 后, 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBeAg 具有一定的抑制作用, 与空白组比较有显著差异 (P < 0.05, 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。

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

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	72 h		144 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白对照	-	0. 614 ± 0. 021	-	0. 787 ± 0. 023	-
3TC	0. 1	0. 424 ± 0. 024 <sup>2)</sup>	31	0. 485 ± 0. 012 <sup>2)</sup>	38. 4
MJGC	4. 0	0. 443 ± 0. 030 <sup>2)</sup>	27. 9	0. 528 ± 0. 017 <sup>2)</sup>	33. 1
	2. 0	0. 496 ± 0. 017 <sup>2)</sup>	19. 3	0. 569 ± 0. 012 <sup>2)</sup>	27. 8
	1. 0	0. 536 ± 0. 011 <sup>1)</sup>	12. 8	0. 606 ± 0. 009 <sup>2)</sup>	23
	0. 5	0. 558 ± 0. 015 <sup>1)</sup>	9. 8	0. 649 ± 0. 017 <sup>2)</sup>	17. 6
	0. 25	0. 572 ± 0. 004	7	0. 689 ± 0. 012 <sup>1)</sup>	12. 5

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup> P < 0. 05, <sup>2)</sup> P < 0. 01(表 2 同)。

表 2 毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	72 h		144 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白对照	-	0. 884 ± 0. 017	-	1. 020 ± 0. 033	-
3TC	0. 1	0. 653 ± 0. 026 <sup>2)</sup>	26. 2	0. 741 ± 0. 027 <sup>2)</sup>	27. 4
MJGC	4. 0	0. 563 ± 0. 018 <sup>2)</sup>	36. 3	0. 603 ± 0. 016 <sup>2)</sup>	40. 1
	2. 0	0. 630 ± 0. 023 <sup>2)</sup>	28. 8	0. 692 ± 0. 008 <sup>2)</sup>	32. 2
	1. 0	0. 667 ± 0. 011 <sup>2)</sup>	24. 5	0. 775 ± 0. 025 <sup>2)</sup>	24. 1
	0. 5	0. 775 ± 0. 036 <sup>1)</sup>	12. 3	0. 875 ± 0. 017 <sup>2)</sup>	14. 2
	0. 25	0. 819 ± 0. 016 <sup>1)</sup>	7. 4	0. 941 ± 0. 024	7. 7

#### 4 讨论

毛鸡骨草在临床上广泛使用,尤其在慢性病毒性肝病的应用中十分普遍,多以复方入药。传统医学认为毛鸡骨草具有具有清热解毒、利湿、活血化瘀、舒肝止痛等功效,现代药理研究表明毛鸡骨草有护肝、利胆、抗菌、抗炎、增强免疫、抗氧化作用<sup>[5]</sup>。为了更好了解、证实毛鸡骨草抗乙肝病毒的作用,在前期以乙肝病人血清为研究对象的基础上,本实验采用在药物抗病毒研究中被广泛应用的肝源性肿瘤细胞株 2. 2. 15(HepG2. 2. 15)为乙型肝炎细胞模型。观察毛鸡骨草体外抗乙肝病毒的作用。为了排除药物非特异性细胞毒性作用造成细胞死亡而影响实验数据,本实验采用 MTT 法观察毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用,结果表明 TC<sub>0</sub> 4. 87 g·L<sup>-1</sup>, TC<sub>50</sub> 23. 13 g·L<sup>-1</sup>,且 TC<sub>50</sub>是 TC<sub>0</sub>的 5 倍多,提示毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性较低。

实验采用 ELISA 法检测毛鸡骨草醇提液在最大无毒浓度下的 5 个浓度在作用 72 h, 144 h 后,对 HepG 2. 2. 15 细胞 HBsAg, HBeAg 分泌的抑制作用,结果表明毛鸡骨草对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg, HBeAg 都有不同程度的抑制作用,并呈现一个明显的量效关系和时效反应关系,在作用 72 h 对 HBsAg, HBeAg 抑制率最高分别为 27. 9% , 36. 3% , 作用 144 h 对 HBsAg, HBeAg 抑制率最高分别为 33. 1% , 40. 1% , 在同一浓度下,对 HBeAg 的抑制率

高于对 HBsAg 的抑制率。

毛鸡骨草抗 HBV 的有效成分及作用机制还不明确,可能与其具有调节免疫、抗氧化作用有关。

本研究采用的是单味的毛鸡骨草醇提液进行体外的抗乙肝病毒实验,虽然单味的毛鸡骨草对 HBsAg, HBeAg 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] 张士军,黄春喜,谢海源,等. 复方六月雪对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(6):715.
- [4] 湛孝东,王克霞,李朝品. 蜗牛多糖体外抗乙型肝炎病毒作用研究. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):66.
- [5] 周芳,李爱媛. 鸡骨草与毛鸡骨草抗炎免疫的实验研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2005, 26(4):33.

[责任编辑 聂淑琴]