

乙肝转阴散对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

唐爱存, 陈兆霓, 罗旭艳, 黄仁彬, 王乃平*
(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究乙肝转阴散(YGZYS)对 HepG2. 2. 15 细胞乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)分泌的影响。方法: 采用四甲基 唑蓝(MIT)法检测 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞的半数毒性浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀); 在 TC₀ 基础上观察药物 5 个不同浓度作用于 HepG2. 2. 15 细胞, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养 4 d 和 8 d 的细胞上清液 HBsAg 和 HBeAg 的滴度。结果: TC₅₀ 5.386 g·L⁻¹, TC₀ 0.736 g·L⁻¹。提示 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞毒性作用较低。在无毒浓度下, YGZYS 能有效地抑制 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg; 且治疗指数(TI)均大于 2, 说明 YGZYS 为高效低毒的抗 HBV 药物。结论: YGZYS 可有效地抑制 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的分泌, 且毒性较低。

[关键词] 乙肝转阴散; 乙肝病毒; 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] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0128-03

Inhibitory Effect of Yigan Zhuanyin San on HBsAg and HBeAg in HepG2. 2. 15 Cell

TANG Ai-cun, CHEN Zhao-ni, LUO Xu-yan, HUANG Ren-bin, WANG Nai-ping*
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of traditional Chinese medicine Yigan Zhuanyin San (YGZYS) on HBsAg and HBeAg of HepG2. 2. 15 cell. **Method:** The TC₅₀ and TC₀ of YGZYS to the HepG2. 2. 15 cell were determined by MTT assay. At non-toxic range of concentration, five different concentrations of YGZYS were added respectively to HepG2. 2. 15 cells. At 4d and 8d after treatment with drugs, the supernatant of HepG2. 2. 15 were collected for determining the levels of HBsAg and HBeAg by ELISA. **Result:** TC₅₀ 5.386 g·L⁻¹, TC₀ 0.736 g·L⁻¹. YGZYS had little cellulotoxicity. YGZYS at the largest non-cellulotoxic concentration could suppress HBsAg and HBeAg expression in HepG2. 2. 15 cell, and the therapeutic index (TI) > 2, YGZYS appeared to be an effective and low toxic anti-HBV drug. **Conclusion:** YGZYS can suppress HBsAg and HBeAg expression in HepG2. 2. 15 cell, and is a lower toxic drug.

[Key words] Yigan Zhuanyin San; hepatitis B virus; HBsAg; HBeAg

乙肝转阴散(YGZYS)是根据民间治疗肝炎经验和中医理论研制的复方制剂,由白花蛇舌草、半枝莲、板蓝根、土茵陈、小田基黄等多种中草药配伍组成,主要用于治疗乙型病毒性肝炎、肝硬化等。实验研究发现, YGZYS 对四氯化碳所致小鼠急性化学性

肝损伤有显著的保护作用^[1]。本实验以转染 HBV-DNA 全基因的 HepG2. 2. 15 细胞株为研究对象^[2], 研究 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)分泌的影响。

1 材料

1.1 药物 乙肝转阴散(YGZYS)为广西医科大学药理学教研室采用全方醇水双提的工艺提取; 拉米夫定, 葛兰素-史克制药(苏州)有限公司, 批号 09010007。

[收稿日期] 2009-12-17

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0992003A-2)

[通讯作者] * 王乃平, Tel: 0771-5339805, E-mail: npwang@gxcmu.edu.cn

1.2 细胞株 HepG2. 2. 15 细胞株购自北京医科大学第一附属医院病毒研究所, 本室自行传代, 定期用 G418 (一种筛选抗生素) 筛选。

1.3 试剂 HBsAg 和 HBeAg 酶联免疫检测试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司, 批号 20090301); 高糖 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 12800-058); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 NTM0133); G418 (美国 Sigma 公司, 批号 108321-42-2)。MIT: 美国 Sigma 公司, 批号 3544B04; 二甲亚砜 (DMSO): AR, 广州市新港化工有限公司, 批号 20080616。

1.4 器材 96, 24 孔培养板, (美国 Corning 公司); CO₂ 孵箱, 美国 Thermo Forma 公司 Model 311; XD-101 型倒置显微镜, 南京江南光电集团股份有限公司; Model 450 自动酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 HepG2. 2. 15 细胞培养^[3] 在长满 HepG2. 2. 15 细胞的培养瓶内加 0. 25% 胰酶, 37 ℃ 消化 3 ~4 min, 加培养液吹打; 1:2 传代, 7 d 长满。消化后计数, 配成 2 × 10⁴ 个/mL 细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL, 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 37 ℃, 5% CO₂ 培养 24 h, 细胞长成单层后进行以下试验。

2.2 YGZYS 含药培养液的配制 用新鲜三蒸水将 YGZYS 配成 500 g · L⁻¹ (以生药材计, 下同) 的母液, 经 0. 45 μm 微孔滤膜, 再经 0. 22 μm 微孔滤膜过滤除菌后, 置 4 ℃ 冰箱保存备用。试验时用完全培养液将 YGZYS 稀释成所需质量浓度的应用液。

2.3 YGZYS 在 HepG2. 2. 15 细胞培养中的细胞毒性试验 采用 MTT 比色法检测药物对细胞的毒性作用, 将 2 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液加入 96 孔培养板, 每孔 200 μL, 置 CO₂ 孵箱 (37 ℃, 5% CO₂) 中培养 24 h 后, 细胞贴壁且生长良好, 吸弃全部培养液, 加入用完全培养液将 YGZYS 系列 5 倍稀释成 100, 20, 4, 0. 8, 0. 16, 0. 032 g · L⁻¹ 的应用液 200 μL, 每个质量浓度设 6 个复孔。连续培养 4 d, 培养结束前 4 h, 每孔加入 MTT 20 μL, 于 CO₂ 孵箱中继续培养。4 h 后小心吸弃上清后, 每孔加 DMSO 200 μL, 微量振荡器振荡 5 min, 使结晶紫完全溶解。自动酶标仪 (检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm) 读取各孔 A, 按 Reed-Muench 法^[4] 计算半数细胞毒浓度 (TC₅₀) 和最大无毒浓度 (TC₀)。

$$TC_{50} = \text{Antilog} \log B + \frac{50 - <50\% \text{抑制率}}{>50\% \text{抑制率} - <50\% \text{抑制率}} \times C$$

注: B = < 50% 时的药物浓度, C = log 稀释倍数

2.4 YGZYS 在 HepG2. 2. 15 细胞培养中对 HBsAg, HBeAg 分泌的抑制作用 将 2 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板, 每孔 1 mL, 置 CO₂ 孵箱 (37 ℃, 5% CO₂) 中培养 24 h 后, 细胞贴壁且生长良好, 吸弃全部培养液, 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 个质量浓度为 0. 4, 0. 2, 0. 1, 0. 05, 0. 025 g · L⁻¹ 的应用液, 每个浓度设 3 个复孔。以等量的完全培养液为空白对照, 以拉米夫定 (3TC) 为阳性对照药。连续培养 4 d 后, 分别吸出上清液于 1. 5 mL 灭菌 Eppendorf 管中, - 20 ℃ 保存待检。再次加入上述含不同浓度药物的培养液继续培养 4 d 后, 分别吸出上清液于 1. 5 mL 灭菌 Eppendorf 管中, - 20 ℃ 保存, 统一待检。采用酶联免疫吸附实验检测, 结果以抑制率表示, 药物对抗原的抑制率 = [1 - 试验孔抗原 A / 对照孔抗原 A] × 100%, 并按 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$IC_{50} = \text{Antilog} \log B + \frac{50 - <50\% \text{抑制率}}{>50\% \text{抑制率} - <50\% \text{抑制率}} \times C$$

注: B = < 50% 时的药物浓度, C = log 稀释倍数

2.5 药效评价 药物治疗指数 (TI) = TC₅₀ / IC₅₀, TI > 2 为药物有效低毒, 1 < TI < 2 为药物低效有毒, TI < 1 为药物无效。

2.6 统计学处理 采用 SPSS13. 0 统计软件分析数据, 组间比较采用方差分析, P < 0. 05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 YGZYS 的细胞毒性作用 将 100, 20, 4, 0. 8, 0. 16, 0. 032 g · L⁻¹ 的 YGZYS 应用液分别加入 HepG2. 2. 15 细胞中连续培养 4 d 后, 显微镜下观察细胞病变, 按照 Reed-Muench 法计算得出: TC₀ 0. 736 g · L⁻¹, TC₅₀ 5. 386 g · L⁻¹。当给药质量浓度低于 TC₀ 时, HepG2. 2. 15 细胞无论在形态上还是数量上与空白对照相同。试验结果表明 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞毒性很低。

3.2 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg, HBeAg 的抑制作用 与空白对照组相比较, 阳性对照药物 3TC 和 YGZYS 在最大无毒浓度下作用 4 d, 8 d 后, 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg, HBeAg 的分泌具有显著的抑制作用, 均可使 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg, HBeAg 的拷贝数降低 (P < 0. 05, P < 0. 01), 且随着药物质量浓度和作用时间的增加, 其抑制作用逐渐增强, 呈现明显的量效和时效反应关

系。其中 YGZYS 在作用 8 d 后, 0.4 g·L⁻¹ 时抑制率最高, 分别为 51.2%, 50.2%, 结果见表 1, 2。

表 1 YGZYS 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 ⁻¹	4 d		8 d	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
空白对照	-	0.938 ±0.184	-	0.988 ±0.134	-
YGZYS	0.4	0.538 ±0.109 ²⁾	42.6	0.483 ±0.083 ²⁾	51.2
	0.2	0.615 ±0.079 ²⁾	34.5	0.534 ±0.080 ²⁾	46.0
	0.1	0.786 ±0.102	16.3	0.720 ±0.064 ²⁾	27.2
	0.05	0.888 ±0.122	5.3	0.832 ±0.065 ¹⁾	15.9
	0.025	0.931 ±0.063	0.7	0.968 ±0.116	2.1
3TC	0.1	0.535 ±0.091 ²⁾	43.0	0.468 ±0.051 ²⁾	52.6

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

表 2 YGZYS 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 ⁻¹	4 d		8 d	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
空白对照	-	0.732 ±0.102	-	0.830 ±0.113	-
YGZYS	0.4	0.450 ±0.111 ²⁾	38.4	0.413 ±0.097 ²⁾	50.2
	0.2	0.472 ±0.077 ²⁾	35.4	0.466 ±0.100 ²⁾	43.8
	0.1	0.570 ±0.131	22.1	0.567 ±0.123 ²⁾	31.7
	0.05	0.719 ±0.130	1.8	0.722 ±0.126	13.0
	0.025	0.731 ±0.062	0.1	0.811 ±0.103	2.4
3TC	0.1	0.373 ±0.054 ²⁾	49.0	0.385 ±0.054 ²⁾	53.6

3.3 YGZYS 的药效评价(治疗指数) YGZYS 作用 HepG2. 2. 15 细胞 4 d 后对 HBsAg 抑制作用的 TI 为 16.8, YGZYS 作用 HepG2. 2. 15 细胞 4 d 后对 HBeAg 抑制作用的 TI 为 15.4。YGZYS 的 TI 均大于 2, 表明为高效低毒的药物。

4 讨论

HepG2. 2. 15 细胞系是由美国 Mount Sinai 医学中心以 HBV DNA 转染人类肝癌细胞株 HepG2 所建立的细胞系, 能有效表达 HBV 复制的全部标志, 目前, 该细胞模型被认为是在细胞培养中筛选和评价抗 HBV 药物的一个标准模型, 现已成为申报抗乙肝病毒新药必做的体外试验模型。

本试验采用 MTT 法测定 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用, 结果表明, TC₅₀ 为 5.386 g·L⁻¹, TC₀ 为 0.736 g·L⁻¹, 提示 YGZYS 对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性很低。在最大无毒浓度时 YGZYS 可抑制 HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的表达, 且随着药物浓度和作用时间的增

加, 其抑制作用逐渐增强, 呈现明显的量效和时效反应关系。本试验为临床进一步研究提供了依据, YGZYS 在体内抗乙肝病毒的作用机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 何萍, 黄仁彬, 林军, 等. 乙肝转阴散对小鼠四氯化碳急性肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(5): 732.
- [2] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, Feb, 84(4): 1005.
- [3] 傅希贤, 张乃临, 张国庆. 试用 2215 细胞进行乙肝病毒药物实验的初步结果[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 6(2): 143.
- [4] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 143.

[责任编辑 何伟]