

江西巴蜗牛生物活性成分提取及其 抗乙肝病毒作用的初步研究

张超, 刘群红

(安徽淮南工业学院医学分院, 安徽 淮南 232001)

摘要: 目的: 提取江西巴蜗牛的生物活性成分, 并研究其是否具有抑制乙型肝炎病毒复制的生物学功能。方法: 将江西巴蜗牛去壳、匀浆后采用溶剂提取法提取并复溶精制, 制得提取物。该提取物以 Pitrowsky 试验、碘液试验、Molisch 试验及 Seliwanoff 试验作初步定性后, 再用 PCR 法体外实验观察其对乙型肝炎病毒复制过程的抑制作用。结果: 该提取物经初步鉴定为一类多糖物质, 体外实验观察结果显示其具有抑制乙型肝炎病毒复制生物学功能。结论: 江西巴蜗牛经人工提取可获得一类多糖物质, 即天螺霜; 且天螺霜具有体外抗乙型肝炎病毒复制的生物学功能。

关键词: 江西巴蜗牛; 多糖; 乙型肝炎病毒

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)03-0029-02

Studies on the Active Constituents and Anti-hepatitis B Virus of *Bradybaena* of *Jiangxinensis*

ZHANG Chao, LIU Qun-hong

(Medical college of Huainan Institute of Technology, Huainan, 232001, China)

Abstract: After rinding and homogenation, we extracted the organic element by Solvent extraction methods. Then the extract was qualitatively analysed through pitrowsky test, Iodine test, Molisch test and Seliwanoff test. Inhibitive effect hepatitis B virus was observed. Results showed the extract was initially identified as polysaccharide. The results showed the polysaccharide had organic function to inhibit duplication of Hepatitis B virus *in vitro*.

Key words: jiangxinensis; polysaccharide; HBV

天螺汤系我国民间较常使用的以蜗、螺类动物为主药的中药方剂, 药源材料常用天螺、蜗螺、田螺、扁螺等, 可根据当地资源任选一种或混用。主要用于治疗“黄疸、诸疸”及其他有湿热症候之疾患, 在浙、苏、皖等地应用已久, 对于病毒性肝炎的治疗具有较好的疗效, 可促进乙型肝炎表面抗原阴转。为揭示天螺等在肝病治疗中的作用价值和作用机理, 我们以抗乙肝病毒作用为追踪目标, 进行有效成分的筛选与分离, 并借助聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术对其有效成分进行药理学研究, 期望从中发现并提取其活性成分。

1 实验材料

1.1 仪器、试剂 基因扩增仪 (TCL, 美国 Perkin Elmer 公司)、高速冷冻离心机 (TLL-C, 北京四环科学仪器厂)、紫外荧光分析仪 (2F, 上海康华生化仪器厂); PCR 试剂由华美生物工程公司提供 (批号:

97.6.22)

1.2 药材 天螺, 在本地采集, 经叶克强教授鉴定, 确认为江西巴蜗牛 (*Bradybaena. Jiangxinensis*)。

2 实验方法

2.1 成分提取 以溶剂提取法^[1]进行, 取鲜活江西巴蜗牛流水冲洗后脱壳, 加水匀浆, 加入 36% 乙酸至 pH5.0, 加热 10~20 分钟, 冷却后离心, 于滤液中加入 2 倍量无水乙醇, 取沉淀物, 经复溶精制, 得白色颗粒状结晶 (暂名为天螺霜)。

2.2 成分鉴定 以 1% 天螺霜水溶液分别进行 Pitrowsky 试验^[1]、碘液试验^[2]、Molisch 试验^[2] 及 Seliwanoff 试验^[2], 以初步确定天螺霜的化学本质及定量检测方法。

2.3 HBV-PCR 抑制实验^[3]

2.3.1 标本处理 选择临床上 PCR-HBV 阳性标本 11 份, 以浓度 200ug/ml 的天螺霜无菌水溶液依如下方法进行乙型肝炎病毒基因复制抑制试验:

表 1 乙肝病毒基因复制抑制试验

	n	裂解液 (μl)	血清 (μl)	天螺霜液 (μl)	蒸馏水 (μl)
病例对照组(A)	11	20	20		20
试剂阳性对照(A)	1	20	20		20
试剂阴性对照(A)	1	20	20		20
实验组(B)	11	20	20	20	
试剂阳性对照(B)	1	20	20	20	
试剂阴性对照(B)	1	20	20	20	

以快速混匀器混匀 封口,沸水浴 20min,取出以 14000 转/分离心 5min,留取上清液待用。

2.3.2 扩增 取出试剂盒中已分装有 Taq 酶的试管编号,未加天螺霜组为 A,加天螺霜组为 B,两组均设试剂阳性、阴性对照。各管依次加入 HBV 混合液 26ul,液体石蜡 30ul,再加入上述已处理过的上清液 2ul,在混匀器上混匀,离心 20s,放入基因扩增仪内 94℃预变性 5min。依次经 94℃~ 45s、72℃~ 45s、55℃~ 45s,循环 35 次,延伸 5min。

2.3.3 电泳 以 2% 琼脂糖(加入溴化银)制胶、打孔,将其放入电泳槽内,使电泳液(1×TAE 缓冲液)刚刚漫过板面,然后每孔加入扩增好的样品 15ul,电泳 20min,电流强度为 80~ 100mA。

2.3.4 观察结果 取出琼脂板,在紫外荧光分析仪上观察结果。

3 结果

3.1 一般性状 天螺霜为白色颗粒状晶体,易溶于水,不溶于乙醇。

3.2 定性实验 天螺霜水溶液 Pitrowsky 试验呈阴性;与稀碘液作用呈红棕色;Molisch 试验出现紫红色环,提示该物质系多糖类化合物。

3.3 定量实验 Seliwanoff 试验显示天螺霜在酸性环境中加温后的生成物与间苯二酚作用可产生红色反应,被测物浓度在 1~ 10g/L 时,于 505nm 处比色,

线性关系良好,可用于天螺霜质量检测。

3.4 HBV-PCR 抑制试验 病例对照组 11 例全部出现阳性条带,阴性对照为阴性,阳性对照呈阳性。实验组 11 例均未出现阳性条带,阳性对照也未出现阳性条带。提示天螺霜可抑制乙型肝炎病毒 DNA 复制。

4 讨论

蜗、螺为动物类中药的主要类别之一,在我国具有较长的应用历史,明李时珍《本草纲目》对田螺、蜗螺、天螺(缘桑螺、桑牛)、蜗牛、蛞蝓等药用功能和使用方法均有详细记载。天螺即缘桑螺,载《本草纲目》虫部,品种较多,但以江西巴蜗牛为多见,李时珍称田螺具有利湿热、去黄疸之功效^[4]。在浙、苏、皖地区民间常将此类动物用于肝病治疗。高士贤等也曾以田螺肉加茵陈等炖汤饮服,治疗黄疸^[5]。本研究由江西巴蜗牛中发现并首次提取、分离其有效成分——天螺霜,初步证实此物为一类多糖物质,且具有一定的体外抑制乙型肝炎病毒复制的作用,似可揭示天螺汤长期被用于肝病治疗的药物学基础。但有关该物质的化学结构及其抗乙型肝炎病毒复制的作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 北京医学院. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 197-198.
- [2] 朱寿民. 生物化学实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1965. 13-23.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第二版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 458-482.
- [4] 李时珍(明). 本草纲目(校点本)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 2359-2550.
- [5] 高士贤, 戴定远, 范勤德, 等. 常见药用动物[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984. 30-32.