

山芝麻水提液对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

黄权芳¹, 林兴², 张士军², 黄仁彬², 陈兆霓²(1.广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023; 2.广西医科大学, 南宁 530021)

摘要: 目的 观察山芝麻水提液(water extracts from *Helicteres angustifolia*, WHA)的体外抗乙型肝炎病毒的作用。方法 采用 HepG2.2.15 细胞模型进行体外培养, 给予不同浓度山芝麻, 以拉米夫定作阳性对照, 作用 72 h 后检测上清液中 HBsAg、HBeAg 的分泌, 观察药物对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV 病毒抗原的影响, 同时以 MTT 法检测药物在体外对 HepG2.2.15 细胞的生长抑制作用, 从而评价药物的抗 HBV 作用。结果 山芝麻水提液对 HepG2.2.15 细胞的半数细胞毒浓度(TC₅₀)为 482.1 mg·L⁻¹; 对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 的半数抑制浓度(IC₅₀)为 7.3 mg·L⁻¹, 其治疗指数(TI)为 66; 对 HBeAg, 其 IC₅₀ 为 14.6 mg·L⁻¹, TI 为 33。结论 山芝麻水提液在体外有显著的抗 HBV 的作用, 且毒性较低。

关键词: 山芝麻; HepG2.2.15 细胞; HBsAg; HBeAg

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0594-04

Inhibitory Effect of Water Extracts from *Helicteres Angustifolia* on HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 Cells

HUANG Quanfang¹, LIN Xing², ZHANG Shijun², HUANG Renbin², CHEN Zhaoni²(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of water extracts from *Helicteres angustifolia* (WHA) on excreting HBsAg and HBeAg of HepG2.2.15 cells. **METHODS** The toxicity of WHA on HepG2.2.15 cells was detected by means of MTT. The inhibitory effects of WHA on HepG2.2.15 cells excreting HBsAg and HBeAg were evaluated with method of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **RESULTS** The half toxic concentration (TC₅₀) of WHA on HepG2.2.15 cells was 482.1 mg·L⁻¹. The half inhibitory concentration (IC₅₀) of WHA on HBsAg was 7.3 mg·L⁻¹, the treatment index (TI) of WHA on HBsAg was 66, and the IC₅₀ of WHA on HBeAg was 14.6 mg·L⁻¹, TI was 33. **CONCLUSION** WHA can significantly inhibit HBV *in vitro*, and is a lower toxic drug.

KEY WORDS: *Helicteres angustifolia*; HepG2.2.15 cell; HbsAg; HBeAg

乙型肝炎是由 HBV 引起的, 以肝脏炎性病变为主的一种传染性疾病, 对乙型肝炎病毒引起的慢性肝病尚无理想的治疗方法。目前, 中草药抗病毒已成为国内、外研究的热点^[1]。本课题组多年来一直致力于发掘广西特色中草药用于抗乙型肝炎的研究, 首次成功建立了广西麻鸭乙肝动物模型, 实验证实该品种麻鸭易感染, 其病程较规律, 病毒血症持续时间较长且较稳定, 无明显的自然转阴现象, 保证了模型的稳定性和可靠性, 并先后利用该模型开展了大量的抗乙肝中药的筛查研究工作^[2-4]。此外, 体外细胞模型因其实验周期较短, 试剂用量少等优点, 而被广泛用于药物的高通量初筛, 前期利用 HepG2.2.15 细胞模型筛查了几十种广西民族习用抗乙肝草药^[5-7], 山芝麻即是本课题组目前重点研究的民族药之一。前期实验

发现山芝麻能保护 CCl₄所致小鼠肝损伤, 具有显著的抗脂质过氧化作用^[8], 为进一步研究其是否具有抗乙肝病毒作用奠定了前期研究基础。

山芝麻系梧桐科植物山芝麻 *Helicteres angustifolia* L. 的根, 能清热解毒, 主要用于感冒发热、肺热咳嗽、咽喉肿痛、麻疹等。至今, 对山芝麻公开报道的研究主要集中在其化学成分的分、鉴定方面, 其药效学研究很少。本研究以 HepG2.2.15 细胞模型, 探讨山芝麻对乙型肝炎病毒的影响, 首次评价山芝麻对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。

1 材料与试药

1.1 仪器

CO₂ 孵箱(美国 ThermoForma 公司); Model450 自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

基金项目: 广西教育厅自然科学基金项目(200911MS28)

作者简介: 黄权芳, 女, 硕士, 中药师 Tel: (0771)5645433
Tel: (0771)5358342 E-mail: gxLx60@163.com

E-mail: hqf00@163.com

*通信作者: 林兴, 男, 硕士, 副教授

1.2 试药

山芝麻经广西中医学院第一附属医院药学部黄权芳中药师鉴定为梧桐科植物山芝麻 *Helicteres angustifolia* L.的根,其水提物由广西医科大学药理学教研室和广西医学科学实验中心自行提取。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)。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。拉米夫定(中国苏州葛兰素史克制药有限公司,规格:100 mg,批号:2007090016)。RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号:13200-035)。小牛血清(美国 Gibco 公司,批号:16000-036)。G418(美国 Sigma 公司,批号:108321-42)。

2 方法与结果

2.1 山芝麻含药培养液的配制

山芝麻饮片 10 g,加 10 倍量水提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩成 100 mL(相当于生药 100 g·L⁻¹),经 0.45 μm 微孔滤膜,再经 0.22 μm 微滤膜过滤除菌后,即得山芝麻水提物母液,置 4℃冰箱保存备用。实验时用完全培养液将母液稀释成所需终浓度的应用液。

2.2 山芝麻的细胞毒性实验(MTT 法)

取 HepG2.2.15 细胞 1 瓶,用胰酶消化后制备成单细胞悬液,计数后调整细胞浓度至 2×10^4 个·mL⁻¹,加入 96 孔培养板中(每孔 100 μL),置 CO₂ 孵箱(37℃,5%CO₂)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山芝麻稀释成 1 000,500,250,125,62.5 mg·L⁻¹ 的应用液 100 μL,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 μL,于 CO₂ 孵箱中继续培养。4 h 后小心吸弃上清液后,每孔加 DMSO 100 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 OD 值,记录结果。按 Reed-Muench 法计算半数细胞毒浓度(TC₅₀)和最大无毒浓度(TC₀)。

2.3 ELISA 法定量检测 HBsAg 和 HBeAg

将 2×10^4 个·mL⁻¹ 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,每孔 1 mL,置 CO₂ 孵箱中培养 24 h 后,细胞贴壁且生长良好,除去全部培养液,根据细胞毒性试验结果,分别加入以下 5 个终质量浓度

为:100,50,25,12.5,6.25 mg·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,以拉米夫定为阳性对照药。连续培养 72 h 后,分别吸出上清液置于 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管中,-20℃保存,统一待检。

采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测,结果以抑制率表示,药物对抗原的抑制百分率= $\{1 - [(实验孔抗原 OD 值 - 空白 OD 值) / (对照孔抗原 OD 值 - 空白 OD 值)]\} \times 100\%$,并按 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)^[9]。

2.4 药效评价

一般用治疗指数(TI)来评价药物的临床应用前景。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。

2.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学采用 SPSS 13.0 软件,配对 *t* 检验。

2.6 结果

2.6.1 药物毒性实验 不同稀释倍数的药物加于单层 HepG2.2.15 细胞上,连续培养 72 h 后,观察细胞生长形态,检测有无病变,并以 MTT 法测定细胞的活力,按照 Reed-Muench 法计算得出:TC₀=105.7 mg·L⁻¹,TC₅₀=482.1 mg·L⁻¹,即当山芝麻药物浓度≤TC₀(105.7 mg·L⁻¹)时,HepG2.2.15 细胞无论在形态上还是数量上与空白对照没有明显差异,对 HepG2.2.15 细胞毒性低。结果见表 1。

表 1 山芝麻对 HepG 2.2.15 的生长抑制作用(n=6)

Tab 1 Inhibitory effect of *Helicteres angustifolia* on HepG 2.2.15 cell (n=6)

组别	终浓度/mg·L ⁻¹	OD ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
山芝麻	1 000.0	0.686±0.075	81.3
	500.0	1.975±0.493	41.4
	250.0	2.891±0.603	12.9
	125.0	3.137±0.582	5.3
	62.5	3.283±0.616	0.8
细胞对照	—	3.309±0.431	—
拉米夫定	1 000.0	0.805±0.091	76.9
	500.0	1.643±0.237	50.2
	250.0	2.054±0.427	37.1
	125.0	3.029±0.513	5.9
	62.5	2.793±0.441	13.5
细胞对照	—	3.216±0.602	—
空白对照	—	0.084±0.007	—

2.6.2 病毒抗原抑制试验 HepG2.2.15 在 24 孔培

养板上生长至单层,加入不同稀释倍数的山芝麻,同时设细胞对照组和药物对照组,培养 72 h,分别取上清液测定 HBsAg 和 HBeAg,并与细胞对照组比较,计算抑制率、IC₅₀ 以及 TI。

山芝麻对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 有明显抑制作用,其作用与浓度呈明显的

正相关。山芝麻浓度对细胞分泌 HBsAg 的抑制率与细胞对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),对 HBsAg 的 IC₅₀=7.3 mg·L⁻¹, TI=66。山芝麻浓度对细胞分泌 HBeAg 的抑制率与细胞对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),其 IC₅₀=14.6 mg·L⁻¹, TI=33。结果见表 2。

表 2 山芝麻对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用($n=3$)

Tab 2 Inhibitory effect of Helicteres angustifolia on HBsAg and HBeAg($n=3$)

组别	终浓度/mg·L ⁻¹	HBsAg		HBeAg	
		OD ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%	OD ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
山芝麻	100.00	0.141±0.057 ²⁾	81.8	0.892±0.085 ²⁾	71.3
	50.00	0.207±0.043 ²⁾	70.2	1.083±0.091 ²⁾	64.8
	25.00	0.263±0.066 ²⁾	60.3	1.738±0.144 ²⁾	42.3
	12.50	0.325±0.071 ¹⁾	49.4	1.821±0.147 ²⁾	39.5
	6.25	0.413±0.048 ¹⁾	33.9	2.513±0.125 ¹⁾	15.8
拉米夫定	100.00	0.288±0.037 ²⁾	55.9	1.016±0.097 ²⁾	67.1
	50.00	0.313±0.069 ¹⁾	51.5	1.695±0.111 ²⁾	43.8
	25.00	0.386±0.082 ¹⁾	38.6	2.258±0.109 ²⁾	24.5
	12.50	0.458±0.055	25.9	2.456±0.131 ¹⁾	17.7
	6.25	0.481±0.073	21.9	2.735±0.128	8.2
细胞对照	—	0.605±0.088	—	2.974±0.136	—
空白对照	—	0.038±0.004	—	0.055±0.002	—

注:与细胞对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal cell control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3 讨论

HepG2.2.15 细胞系是通过将重组 HBV-DNA 直接导入受体细胞而建立的转染细胞株,该细胞能长期、稳定地向培养上清液中分泌 HBsAg、HBeAg 和 HBV 颗粒及对人具有感染性,可表达乙肝病毒的全部标志,HepG2.2.15 细胞是当前体外筛选抗 HBV 药物和药物评价的较好细胞模型,已被广泛用于抗乙型肝炎病毒药物的体外研究^[9]。

本研究以 HepG2.2.15 细胞株作为对象,观察不同质量浓度山芝麻对 HepG2.2.15 细胞的毒性作用,提示山芝麻浓度 ≤ 105.7 mg·L⁻¹ 时,对 HepG2.2.15 细胞的毒性低。而山芝麻对抗原抑制作用的实验发现,药物作用 72 h 后,山芝麻对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 有明显抑制作用,与细胞对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),其作用与浓度呈明显的正相关。本实验初步表明山芝麻体外有明显的抗 HBV 的作用,且毒性较低,至于其通过何种途径实现其抑制 HepG2.2.15 细胞分泌 HBeAg 和 HBsAg,还有待于进一步研究;而其具有抑制作用的化学活性成分也有待于进一步筛选。

REFERENCES

- [1] TANG A, CHEN Z N, HUANG R B, et al. Inhibitory effect of Yiganzhuanyinsan on duck hepatitis B virus [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(6): 476-479.
- [2] HUANG R B, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Study of the terpenoids of Liuyueqing on duck hepatitis B virus in ducklings [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2010, 26(1): 37-39.
- [3] ZHANG S J, JIAO Y, LIN X, et al. Inhibitory effect of compound Liuyueqing on duck hepatitis B virus [J]. J Chin Pharm(中国药房), 2008, 19(33): 2563-2565.
- [4] ZHANG S J, CHEN Z N, LI Y W, et al. Inhibitory effect of ethanol extract of Liuyueqing on hepatitis B virus in duck [J]. Chin J Public Health(中国公共卫生), 2009, 25(5): 543-544.
- [5] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. The inhibitory effect of the serum containing Liuyueqing on HBV DNA in the HepG2.2.15 cells [J]. J Chin Pharm(中国药房), 2009, 20(24): 1847-1849.
- [6] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Effect of the terpenoids of Liuyueqing on HBsAg and HBeAg in the HepG2.2.15 cells [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2009, 29(17): 1445-1448.
- [7] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. The inhibitory effect of the serum containing Liuyueqing on the expression of HBsAg and HBeAg in the HepG2.2.15 cells [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20(7): 1603-1604.
- [8] LIN X, HUANG Q F, ZHANG S J, et al. Influence of the water extract from helicteres angustifolia on lipid peroxidation induced by CCl₄ in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中

国实验方剂学杂志), 2010, 16(10): 147-149.

- [9] ZHANG S J, HUANG C X, XIE H Y, et al. The inhibitory effect of compound Liuyuexue on HBsAg and HBeAg in the

HepG2.2.15 cells [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2007, 27(6): 715-717.

收稿日期: 2010-10-29