

萹蒿乙酸乙酯部位体外抗乙型肝炎病毒的实验研究*

罗文艳¹ 段和祥^{2#}

(1 南昌大学第四附属医院药剂科 江西南昌 330003; 2 江西省药品检验检测研究院 南昌 330029)

摘要:目的:研究萹蒿乙酸乙酯部位体外抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用。方法:萹蒿药材用 95%乙醇提取后,用乙酸乙酯萃取获得有效部位,作用于 HBV-DNA 转染的 HepG2.2.15 细胞上。采用 MTT 法检测乙酸乙酯部位对 HepG2.2.15 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀),用 ELISA 法观察乙酸乙酯部位对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制作用。结果:萹蒿乙酸乙酯部位对 HepG2.2.15 细胞有一定的细胞抑制作用,对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 表达有不同程度的抗原抑制作用。结论:萹蒿乙酸乙酯部位有较强的抗乙型肝炎病毒作用。

关键词:乙型肝炎病毒;萹蒿乙酸乙酯部位;乙型肝炎病毒表面抗原;乙型肝炎病毒 e 抗原

Experimental study on Ethyl Acetate Fraction from *Artemisia selengensis* anti-HBV in vitro

LUO Wen-yan¹, DUAN He-xiang^{2#}

(1 Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003;

2 Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029)

Abstract: Objective: To study the effect of ethyl acetate from *Artemisia selengensis* anti-HBV in vitro. Methods: After the *Artemisia selengensis* were extracted with 95% ethanol, extracted with ethyl acetate. Then the effective part was acted on HBV-DNA transfected HepG2.2.15 cells. MTT assay was used to detect ethyl acetate fraction inhibitory concentration 50% of HepG2.2.15 cells. ELISA method was used to investigate the suppressor effect on HBsAg and HBeAg in the cultured HepG2.2.15 cells which were gene transferred with HBV. Results: Ethyl acetate fraction from *Artemisia selengensis* have a certain cell inhibitory effect on HepG2.2.15 cells. HepG2.2.15 cells the secretion of HBsAg and HBeAg express different degrees of antigen inhibition. Conclusion: The ethyl acetate from *Artemisia* has strong anti HBV effect.

Key words: HBV; Ethyl Acetate Fraction from *Artemisia selengensis*; HBsAg; HBeAg

中图分类号:R285.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.09.045

萹蒿 (*Artemisia selengensis* Turcz. ex Bess.) 为菊科 (Compositae) 蒿属 (*Artemisia* Linn.) 植物, 俗名藜蒿, 在我国各地均有分布, 但以生长在长江中下游的鄱阳湖、洞庭湖和太湖等地区的品质为佳^[1]。全草入药, 性平味甘, 有止血消炎、镇咳化痰、开胃健脾、散寒除湿等功效^[2]。目前, 针对萹蒿的研究主要集中在抗菌、抗氧化、降压、抗肿瘤等活性物质及其药理活性方面^[3-7], 而萹蒿抗乙型肝炎的功效, 尚未引起人们的重视。本试验采用 MTT 法和酶联免疫吸附试验法 (ELISA), 研究了萹蒿乙酸乙酯部位对体外乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 和乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 的抑制作用。现报告如下:

1 仪器与材料

1.1 仪器设备 Forma3131 三气细胞培养箱 (Thermo Fishier 公司), ST-360 酶标仪 (上海科华实验系统有限公司), KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司), ST16R 低温离心机 (Thermo Fishier 公司), Synergguv 超纯水仪 (Millipore 公司), 净化工作台 (苏州净化设备有限公司)。

1.2 材料 萹蒿药材采自鄱阳湖畔草滩, 经江西省药品检验检测研究院袁桂平主任中药师鉴定为菊科

蒿属植物萹蒿的全草。DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 GIBCO 公司; 胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 均购于 Sigma 公司; 青霉素、链霉素 (上海先锋药业有限公司); HBsAg 检测试剂盒、HBeAg 检测试剂盒 (美国 BD 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株及细胞培养 HepG2.2.15 是 HBV-DNA 细胞转染 HepG2 而建立的 HepG2.2.15 细胞株, 由军事医学科学院放射与医学辐射学研究所提供, 培养基为 DMEM 高糖型培养基, 含 10% FBS, 0.2 mg/ml 的 G418, 用前加入 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素。

2 方法

2.1 样品的制备 称取鲜萹蒿 1.0 kg, 切碎, 晾干, 用 95%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并回流液, 回收乙醇, 浓缩至干浸膏, 加适量的水使溶解, 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯萃取, 弃去石油醚与三氯甲烷萃取液, 取乙酸乙酯萃取液, 浓缩蒸干, 即得萹蒿的乙酸乙酯部位。

2.2 细胞培养 在长满 HepG2.2.15 细胞的培养瓶内加 0.25%胰蛋白酶消化、传代、保种。取对数生长期的细胞用 DMEM 高糖型培养基制备成 1×10^5 个

* 基金项目:江西省卫生厅中医指导性计划 (编号: 2013B014);

江西省科技厅青年科学基金资助项目 (编号: 20122BAB215044)

通信作者: 段和祥, E-mail: duanhx_007@163.com

/ml 的混悬液,按每孔 100 μ l 接种于 96 孔细胞培养板中,置 37 $^{\circ}$ C,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞长成单层后,每孔加入含有不同浓度的药物(蒺藜乙酸乙酯部位用培养基系列倍比稀释,制备成 0.004、0.02、0.1、0.5、2.5、12.5、62.5 mg/ml 等 7 个不同浓度),每个浓度平行 4 个孔。同时设细胞对照组(不含药液的细胞培养液)及空白对照组(仅含培养液)。将 96 孔细胞培养板放回培养箱培养,每 2 天更换 1 次新鲜的培养液,10 d 后,取上清液,用 ELISA 法计算抗原抑制率,余下细胞用 MTT 法测定半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 细胞培养结果测定 取“2.2”项下的上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书操作,采用酶标仪于 450

nm 的波长处测定 OD 值。余下细胞,每孔加 0.2 ml 新鲜配制的含有 0.2 ml MTT 的无血清培养基,在 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h 后,以 3 000 r/min 的速度离心 5 min,倒出上清液,加 0.2 ml DMSO 溶解 MTT 甲臜沉淀,超声 5 min 后,用酶标仪于 570 nm 下测定 OD 值。按 $(1-OD_{\text{给药组}}/OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 计算抑制率。

2.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件分析,试验数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

药液对 HepG2.2.15 细胞的 IC₅₀ 值为 2.55 mg/ml,对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的 IC₅₀ 值分别为 48.52 mg/ml 和 1.86 mg/ml。见表 1。

表 1 蒺藜提取物乙酸乙酯部位对 HepG2.2.15 细胞及其分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度(mg/ml)	HepG2.2.15 细胞		HBsAg		HBeAg	
		OD ₅₇₀	抑制率(%)	OD ₄₅₀	抑制率(%)	OD ₄₅₀	抑制率(%)
蒺藜乙酸乙酯部位	62.5	0.351 \pm 0.053*	84.30	0.351 \pm 0.067	65.72*	0.151 \pm 0.011	77.12*
	12.5	0.502 \pm 0.070*	77.54	0.614 \pm 0.049	40.04*	0.202 \pm 0.017	69.39*
	2.5	1.125 \pm 0.059*	49.66	0.727 \pm 0.065	29.00*	0.209 \pm 0.039	68.33*
	0.5	1.551 \pm 0.074*	30.60	0.843 \pm 0.052	17.68	0.426 \pm 0.051	35.45*
	0.1	1.993 \pm 0.126	10.83	0.956 \pm 0.104	6.64	0.587 \pm 0.072	11.06
	0.02	2.222 \pm 0.102	0.58	1.022 \pm 0.083	0.20	0.651 \pm 0.054	1.36
	0.004	2.256 \pm 0.095	0	1.055 \pm 0.077	0	0.671 \pm 0.085	0
细胞对照组	-	2.246 \pm 0.098	-	1.027 \pm 0.091	-	0.668 \pm 0.048	-
空白对照组	-	0.011 \pm 0.003	-	0.003 \pm 0.001	-	0.008 \pm 0.002	-

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。

4 讨论

由表 1 的结果可见,蒺藜提取物乙酸乙酯部位对 HepG2.2.15 细胞及其分泌 HBsAg、HBeAg 具有明显的抑制作用,并且抑制率的大小与浓度成正比。这为进一步分离、纯化、鉴定乙酸乙酯部位抗乙型肝炎病毒的活性成分提供了理论依据和技术支持。本课题组前期研究了蒺藜乙酸乙酯部位的化学成分,并首次从蒺藜药材中分离鉴定出反式白藜芦醇等 11 种化学成分^[8]。白藜芦醇是一种生物活性很强的天然多酚类物质,查阅相关文献^[9],也发现白藜芦醇及其衍生物有一定的抗乙型肝炎病毒的作用。

乙型肝炎是一种损害肝脏的病毒感染,可造成急性或慢性疾病。从中国疾病预防控制中心获悉,我国现有约 9000 万慢性乙肝病毒感染者,其中约 2800 万为慢性乙肝患者,每年约有 90 万发展为肝硬化,约 30 万发展为原发性肝癌。在全球肝癌发病和死亡人数最多的 20 个国家中,我国排在首位。我国人口约占全球人口的 20%,但肝癌发生及死亡人数占全球的 50%以上。虽然我国中药资源非常丰富,但从广阔的中药资源库中研究并开发出一种高效低毒的抗 HBV 的药物,还有很长一段路要走。

目前,通常是利用活性指导下的靶向追踪分离技术,把目标药物作用于 HBV-DNA 转染的 HepG2.2.15 细胞,用 MTT 法检测目标药物对

HepG2.2.15 细胞的 IC₅₀,用 ELISA 法观察目标药物对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制作用。本研究结果为进一步研究抗乙型肝炎病毒的活性化学物质基础,得到一系列抗乙型肝炎病毒的活性成分,研究和开发具有自主知识产权的高效低毒的抗肿瘤药物奠定了基础。

参考文献

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第七十六卷第二册)[M].北京:科学出版社,1991.144
- [2]仲雨,秦明珠.蒺藜的研究进展[J].中医药学刊,2006,24(9):1749-1750
- [3]李晓明,刘跃钧,邓荣华,等.蒺藜不同部位清除自由基活性研究[J].食品与机械,2012,28(5):116-119
- [4]宇宙,胡居吾,付俊鹤,等.野生蒺藜提取物降压作用研究[J].食品工业科技,2010(6):306-309
- [5]Lu Zhang,Zong-cai Tu,Tao Yuan,et al.Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from Artemisia selengensis Turcz [J].Industrial Crops and Products, 2014,56(5):223-230
- [6]Sandra Gouveia,Paula C.Castilho.Antioxidant potential of Artemisia argentea L'Her alcoholic extract and its relation with the phenolic composition[J].Food Research International,2011,44(6):1620-1631
- [7]Chen Ze-yu,Li Shui-qing,Liu Yun.Microwave-assisted Extraction and Biological Activity Determination of Insecticidal Components of Seleng Wormwood (Artemisia selengensis Turcz.)[J].Plant Diseases and Pests,2010,1(6):51-53
- [8]段和祥,罗文艳,杨毅生,等.蒺藜醋酸乙酯部位化学成分研究[J].中草药,2015,46(10):1441-1444
- [9]周侠,吕秋军,王林,等.白藜芦醇及其衍生物抗乙型肝炎病毒体外实验研究[J].中国药理学杂志,2005,40(24):1904-1906

(收稿日期:2016-06-02)