

广西藤茶提取物 TTF 含药血清 对乙型肝炎病毒 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用*

杨 柯,郑作文,欧贤红
(广西中医学院药学院,南宁 530001)

[摘要] 目的 观察从广西藤茶中提取出的一有效部位 TTF 抗乙型肝炎病毒的作用。方法 采用 MTT 法观察 TTF 含药血清对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用。结果 TTF 含药血清对 2.2.15 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 有显著抑制作用。结论 TTF 可明显抑制 2.2.15 细胞 HBsAg、HBeAg 的分泌,提示 TTF 具有抗 HBV 的作用。

[关键词] 藤茶 TTF;2.2.15 细胞;血清药理学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)04-0390-03

Anti-HBV Effects of TTF Contained Sera *in Vitro*

YANG Ke, ZHENG Zuo-wen, OU Xian-hong (School of Pharmacy, Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning, 530001, China)

ABSTRACT Objective To investigate the anti-HBV effects of TTF extracted from *Guangxi Teng Tea*. **Methods** The inhibition of TTF contained sera on 2.2.15 cells expressing HBsAg and HBeAg were studied by MTT assay. **Results** TTF contained sera significantly inhibited HBsAg and HBeAg secreted from 2.2.15 cells. **Conclusion** TTF contained sera inhibit the HBsAg and HBeAg secretion from 2.2.15 cells in a dose-related manner, which indicates that TTF posses the anti-HBV effect.

KEY WORDS TTF contained sera; 2.2.15 cell line; Serum-pharmacology

藤茶系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang) 的嫩茎叶,在广西、广东、云南、贵州、福建等均有分布,亦称甜藤茶、田婆茶、乌蕊、红五爪金龙、大齿蛇葡萄。其味甘、淡,性凉。具有清热解毒、祛风湿、强筋骨、抗炎镇痛之功效。藤茶在民间流传应用已有数百年历史,是瑶族群众的家常备用药。民间用于治疗黄疸型肝炎、感冒发热、咽喉肿痛、急性结膜炎或水煎外洗治疗痈疮湿毒等^[1-3]。藤茶主要成分是黄酮类化合物,含量约为 45.52%^[4]。郑作文等^[5] 研究结果表明藤茶总黄酮对 2.2.15 细胞分泌的 HBsAg 抑制率为 43.14%,半数有效剂量 (IC_{50}) 为 40.21 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,治疗指数 (SI) 为 3.11;对 2.2.15 细胞分泌的 HBeAg 抑制率为 33.76%;对 HBV-DNA 有一定抑制作用。为此,笔者应用血清药理学原理对从广西藤茶中提取出的一有效部位 TTF 进行半体内抗乙型肝炎病毒的实验研究。

现报道如下。

1 实验材料

1.1 药物 TTF 为浅黄色粉末结晶,由本校中药化学教研室提供,含量 >90%。阳性对照药:拉米夫定,葛兰素威康制药公司生产,批号:B008923。

1.2 细胞和病毒 2.2.15 细胞是 HBV-DNA 克隆转染人肝癌细胞株,由美国 Mount Sinai 医学中心构建,购自中国医学科学院医药生物技术研究所以。

1.3 试剂 Eagles MEM 干粉(美国 GIBCO 公司产品);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);G-418 (Genticin);L-谷氨酰胺 (Amresco 分装);MTT (Fluka, MW414.3);DMSO (AR,广州市新港化工有限公司);HBsAg、HBeAg 试剂盒(厦门英科新创科技有限公司产品,批号:20060311)。

1.4 仪器 BP211D 万分之一克电子天平(德国赛多利斯);倒置显微镜(德国 LEICA BMIRB);酶标仪(奥地利 SUNRISE);培养瓶(美国 Promega Corporation);96 孔板、24 孔板(美国 Corning 公司);微量移液器(法国 Gilson);Biofuge Stratos 高速低温离心机(德国 Heraeus);二氧化碳 (CO₂) 培养箱(美国 Thermo Forma);DLE560 超净工作台(荷兰 Clean Air);座式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

[收稿日期] 2007-07-23

[基金项目] *广西区科技厅攻关项目(基金编号:桂科攻 0322024-5B)

[作者简介] 杨 柯(1975 -),男,侗族,广西三江人,讲师,硕士,主要从事中草药抗乙型肝炎病毒及抗肿瘤的药理学研究。电话:0771 - 2279423, E-mail:kyang_11@126.com。

2 方法

2.1 TTF 含药血清在 2.2.15 细胞培养中对 HBV 的抑制作用^[6]

2.1.1 细胞培养 把 2.2.15 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 环境中的孵育箱中培养,每天在倒置显微镜下观察其生长情况,2~3 d 换培养液 1 次,7~10 d 长满培养瓶。

2.1.2 含药血清的制备 取健康小鼠 15 只,分为空白对照组(给予 0.9% 氯化钠溶液)、实验药物组(给予 TTF 600 mg·kg⁻¹)和阳性对照组(给予拉米夫定 80 mg·kg⁻¹)。均灌胃给药,bid,连续 3 d。末次药后 1 h 尾部静脉取血,分离血清,于 56 °C 温育 30 min 灭活,用实验用培养液分别稀释至 40% 和 20%,滤菌,4 °C 保存备用。

2.1.3 TTF 含药血清在 2.2.15 细胞培养中对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用 在长满 2.2.15 细胞的培养瓶中,用 0.25% 的胰酶消化液进行消化成为单个细胞悬液,取少量消化后的细胞置于细胞计数板进行计数。调其浓度为含细胞 1×10⁵ 个·mL⁻¹,接种于 96 孔板,每孔加 100 μL,于 37 °C、5% CO₂ 培养。在接种 2.2.15 细胞 24 h 后加 40%,20% 含药血清以及 40%,20% 不含药血清(终末浓度为 20%,10%),每种浓度 3 孔,另设细胞对照孔,于第 4 天换含相同浓度的含药

血清、不含药血清及完全培养液,维持至第 8 天,于第 8 天时观察细胞形态并收集培养液,采用 ELISA 法按试剂盒进行操作,测定 HBsAg、HBeAg。按公式计算每种浓度 TTF 含药血清的抗原抑制百分率(%)。抗原抑制百分率(%)=[细胞对照吸光度(A)-给药实验吸光度]/细胞对照吸光度×100%。

3 结果

3.1 TTF 含药血清在 2.2.15 细胞培养第 8 天后细胞的形态学改变 以不同浓度(20%,10%)含药血清和细胞对照(细胞培养液)培养 2.2.15 细胞 8 d,于第 4 天时换相同药液或培养液,同时于倒置显微镜下观察细胞形态变化。20% TTF 含药血清组出现细胞皱缩、生长缓慢,细胞数量明显减少等现象;10% TTF 含药血清组细胞生长较好,形态与细胞对照组比较相似,但细胞数量仍明显减少;空白对照组细胞生长状态与细胞对照组比较细胞形态无明显改变,细胞数量也没有明显减少。

3.2 TTF 含药血清在 2.2.15 细胞培养中对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用 实验结果表明:TTF 含药血清能明显降低 HBsAg、HBeAg 吸光度值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);对 HBsAg、HBeAg 的抑制率均显著升高($P < 0.01$)。与阳性对照组比较差异无显著性。见表 1。

表 1 TTF 对体外培养 2.2.15 细胞表达 HBsAg、HBeAg 的影响

$\bar{x} \pm s, n=5$

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	HBsAg				HBeAg			
		20%		10%		20%		10%	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
细胞对照组	-	1.31±0.23	-	0.84±0.64	-	1.29±0.43	-	0.92±0.21	-
空白对照组	-	1.12±0.32	14.45±10.54	0.80±0.46	4.67±5.37	1.16±0.33	10.05±4.19	0.89±0.14	3.18±1.52
阳性对照组	80	0.24±0.04 ^{*2}	82.07±5.18 ^{*2}	0.35±0.04 ^{*2}	56.70±7.34 ^{*2}	0.67±0.15 ^{*2}	48.67±9.77 ^{*2}	0.64±0.11 ^{*2}	33.42±7.90 ^{*2}
实验药物组	600	0.33±0.06 ^{*2}	73.91±8.64 ^{*2}	0.45±0.09 ^{*1}	49.42±7.52 ^{*2}	0.78±0.30 ^{*2}	39.56±12.16 ^{*2}	0.65±0.18 ^{*2}	30.66±11.65 ^{*2}

与空白组比较,^{*1} $P < 0.05$,^{*2} $P < 0.01$ 。

4 讨论

中药血清药理学是指在动物经口服给药后一定时间采血分离血清,用此含药血清进行体外实验的一种实验方法^[7]。目前认为,该方法适合在细胞、亚细胞、分子水平对中药及中药复方进行深入的机制研究;其可信度、科学性、可行性都较以往应用中药粗制剂直接体外给药进行中药药理研究具有一定的优势。既能防止中药粗制剂本身理化性质对体外实验的干扰,又能反映中药在胃肠道消化吸收,再经生物转化,最后产生药理效应的过程,代表了药物在体内产生作用的真正有效成分;不仅反映了药物中可吸收部分的直接作用,而且能反映药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱导产生的机体内源性物质的间接效果。

笔者采用血清药理学方法观察 TTF 在 2.2.15 细胞培养中对 HBV 的抑制作用。结果表明 TTF 有抑制 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的作用。提示 TTF 具有体内抗 HBV 的可能性。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图谱补编[M]. 2 册. 北京:科学出版社,1983:342.
- [2] 广西壮族自治区中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社,1986:300.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:789.
- [4] 周桂霞,何群. 瑶族藤茶中总黄酮类成分的含量测定[J]. 湖南中医药学报,1999,5(12):30-31.

[5] 郑作文,邓家刚,杨 柯. 芒果苷在 2. 2. 15 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg 分泌的影响[J]. 中医药学刊, 2002,22(9):1645-1646.

[6] 张友祥,王灵台,章晓鹰. 补肾冲剂体外抗乙型肝炎病毒

作用研究[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(10):26.

[7] 田代真一. 血清药理学“と”血清药化学 2 汉方の薬理学がい始つた药物血中浓度测定の新しい世界[J]. TDM 研究,1988,(5):54.

复方抗病毒制剂体外抗流感病毒和 呼吸道合胞病毒作用及毒性研究

杨道锋¹,徐 莉¹,邵静芳²,张 悦²,龚非力²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院感染科;2. 免疫学研究所,武汉 430030)

[摘要] 目的 测定复方抗病毒制剂体外对流感病毒和呼吸道合胞病毒的抗病毒作用。方法 用鸡红细胞血凝素滴定法测定不同浓度复方抗病毒制剂在狗肾传代细胞(MDCK)中对流感病毒的抑制作用;用中和实验测定复方抗病毒制剂在 Hep-2 细胞中对呼吸道合胞病毒的活性。结果 复方抗病毒制剂浓度 < 1.5 mg · mL⁻¹ 时对 MDCK 细胞及 Hep-2 细胞无明显毒性。浓度 > 0.15 mg · mL⁻¹ 能抑制流感病毒的血凝活性和呼吸道合胞病毒对靶细胞的攻击作用。结论 复方抗病毒制剂体外对流感病毒和呼吸道合胞病毒具有较强的抑制作用,且有较大的安全性。

[关键词] 抗病毒制剂,复方;病毒,流感;合胞病毒,呼吸道;体外活性

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)04-0392-03

Toxicity and Effect of the Antiviral Herb Compound on Influenza Virus and Respiratory Syncytial Virus *in Vitro*

YANG Dao-feng¹, XU Li¹, SHAO Jing-fang², ZHANG Yue², GONG Fei-li² (1. Department of Infection Disease, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College; 2. Institute of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the antiviral activity of the antiviral herb compound on influenza virus and respiratory syncytial virus(RSV). **Methods** The suppression on influenza virus by different doses of antiviral herb compound in MDCK passage cells was evaluated by hemagglutinin titration test, while the effect on RSV was studied by the neutralization test in Hep-2 cells. **Results** No obvious toxic effects on MDCK cells and Hep-2 cells were observed by the compound with the concentration lower than 1.5 mg · mL⁻¹. However, it suppressed the hemagglutination of influenza virus and the aggression of RSV on target cells at the concentration over 0.15 mg · mL⁻¹. **Conclusion** The antiviral herb compound shows potent inhibition on the influenza virus and RSV *in vitro* with a high safety.

KEY WORDS Antiviral herb compound; Influenza virus; Respiratory syncytial virus; Antiviral activity

目前抗病毒西药虽然品种较多,但多数选择性低和不良反应较重,长期使用易产生耐药性。中药在抗病毒方面有其独特优点,特别是不良反应相对较低,不易形成耐药性,目前在病毒性疾病,特别是呼吸道病毒性疾病的治疗中仍占重要地位。笔者研究了复方抗病毒制剂体外对流感病毒和呼吸道合胞病毒的抑制作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株和细胞 甲型流感病毒 A/PR/8/34

(H1N1)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、狗肾传代细胞 MDCK 细胞株和 Hep-2 细胞(喉癌细胞)均由武汉大学医学院病毒所杨占秋教授提供。

1.1.2 药物 复方抗病毒制剂由佛山康立泰有限公司生产提供。复方抗病毒制剂由板蓝根、菊花、金银花、连翘、鱼腥草、紫草、贯众、黄连、黄芩、黄柏、穿心莲、甘草等 17 味中药组成,加水煮沸后过滤浓缩,浓度为 12%。干扰素 α-2b(商品名:万复因)由上海万兴制药有限公司出品,每支 100 万 U,加 2 mL RPMI 1640 溶解,定为原液。

1.2 复方抗病毒制剂对流感病毒抑制作用的测定

1.2.1 复方抗病毒制剂对正常 MDCK 细胞的毒性测定 将复方抗病毒制剂作 1 : 4 ~ 1 : 256 倍比稀释,加

[收稿日期] 2007-09-20

[作者简介] 杨道锋(1964 -),男,湖北安陆人,副教授,副主任医师,博士,从事感染性疾病的研究和临床工作。电话:027-83663605,E-mail: yangdaofeng@yahoo.com.cn。