

不同提取物中醇提取物对线粒体内膜功能(膜电位)的损伤最小。

流式细胞仪对线粒体膜电位检测结果的判断标准是: A2 象限(FL1 和 FL2 双阳性)细胞占比越高则说明细胞线粒体膜电位受损越小(越正常), A4 象限(FL1 单阳性)细胞占比越高则说明细胞线粒体膜电位受损越大。本研究提示泽泻不同提取物对线粒体内膜功能(膜电位)的损害程度: 超临界 CO₂ 萃取物组>水提取物组>醇提取物组。

两种检测方法结果表明, 泽泻水提取物、醇提取物与超临界 CO₂ 萃取物对细胞线粒体能量代谢均有影响。对线粒体内膜功能(膜电位)均有一定损害作用, 其中, 泽泻醇提取物组损害较小; 泽泻醇提取物组及水提取物组对细胞 SDH 酶活性均有一定的促进作用, 醇提取物组大于水提取物组, 而超临界 CO₂ 萃取物组则降低 SDH 活性。

作者在预实验过程中还采用 MTT 法对泽泻 3 种提取物 7 个梯度浓度(10, 1.0, 0.1, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ mg·mL⁻¹)进行了细胞毒性研究, 结果发现泽泻水提取物组细胞毒性与浓度无明显的线性相关, 为便于 3 组间比较, 我们选择了 10 mg·mL⁻¹ 浓度条件下进行比较。

泽泻不同提取物对细胞线粒体内膜功能(膜电位)和 SDH 的影响实验结果提示, 泽泻醇提取物具有较明显改善细胞线粒体能量代谢的作用, 为进一步体内

探讨泽泻改善线粒体能量代谢研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 2010: 212-213.
- [2] 熊燕, 张梅, 陈菲, 等. 线粒体功能障碍与心血管疾病[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 364-370.
- [3] 米慧, 林蓓, 管敏鑫. 线粒体功能缺陷和神经系统疾病[J]. 生命科学, 2012, 24(6): 549-556.
- [4] 张俊杰, 柯斌, 秦鉴. 从线粒体功能障碍探讨脾虚与胰岛素抵抗关系[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2947-2949.
- [5] Perry CG, Kane DA, Lanza IR, et al. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes[J]. Diabetes, 2013, 62 (4): 1041-1053.
- [6] Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(11): 1372-1381.
- [7] Huang YT, Huang DM, Chueh SC, et al. Alisol B acetate, a triterpene from Alismatis rhizoma, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells [J]. Cancer Lett, 2006, 231: 270-278.
- [8] 吴水生, 郭改革, 施红, 等. 泽泻提取物 Alisol Monoacetate A 和 B 对 HepG2 细胞胆固醇代谢的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22 (7): 475-477.
- [9] 王静, 郭春荣, 董杨, 等. 耳聋左慈丸及有效拆方拮抗庆大霉素诱导毛细胞凋亡的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2464-2468.
- [10] 王新, 陈凤玲. 线粒体的功能及检测方法[J]. 医学综述, 2011, 17 (1): 12-14.

(编辑: 邓响潮)

红背叶根不同提取物体外抑制 HBsAg 和 HBeAg 的实验研究

沈海容¹, 刘 妮², 张奉学², 杨静雯¹, 陈 淳¹, 朱晓霞¹, 刘 强¹, 黄少慧¹, 吕志平¹(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察红背叶根 4 种不同提取物对 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响, 探讨红背叶根不同提取物体外抗 HBV 作用。 **方法** 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察红背叶根水提取物(WE)、石油醚提取物(EE)及正丁醇提取物(BE)对 HepG 2.2.15 细胞的影响, 采用 ELISA 法检测分析红背叶根 4 种提取物对 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。 **结果** 红背叶根正丁醇提取物在无毒浓度下对 HepG 2.2.15 分泌的 HBsAg、HBeAg 的抑制率分别达 65.2 %、94.4 %, 治疗指数分别为 > 9.8 和 > 67.1; 红背叶根乙酸乙酯提取物对 HBeAg 抑制率达 53.4 %, 治疗指数 > 2, 而对 HBsAg 的无抑制作用; 其他两种提取物对

收稿日期: 2013-08-30

作者简介: 沈海容, 女, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合肝病的临床与实验研究。Email: 415487460@qq.com。通讯作者: 吕志平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合临床肝病的临床与实验研究。Email: lzping@fimmu.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2009A030100009); 广州市科技计划项目(2008Z1-E461-1)。

HBsAg、HBeAg 则无抑制效果。**结论** 红背叶根乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物均有抗 HBV 作用, 正丁醇提取物效果比乙酸乙酯效果更好, 具有潜在的抗 HBV 开发前景。

关键词: 红背叶根提取物; HepG2.2.15; HBsAg; HBeAg; 抗病毒

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)01-0039-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.011

Experimental Study of Radix Alchorneae Trewioidis Extracts on Inhibiting HBsAg and HBeAg *in vitro*

SHEN Hairong¹, LIU Ni², ZHANG Fengxue², YANG Jingwen¹, CHEN Chun¹, ZHU Xiaoxia¹, LIU Qiang¹, HUANG Shaohui¹, LV Zhiping¹ (1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China; 2. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effect of four kinds of extracts from Radix Alchorneae Trewioidis on the secretion of HBsAg and HBeAg from HepG2.2.15 cells, and to investigate the effect of Radix Alchorneae Trewioidis extracts against HBV. **Methods** The dried Radix Alchorneae Trewioidis powder was dissolved in distilled water, and then was extracted with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol alcohol in order for 2 times. Water extract(WE), petroleum ether extract(PE), ethyl acetate extract (EE), n-butanol extract(BE) were obtained respectively. MTT assay was used to observe the effect of different Radix Alchorneae Trewioidis extracts on HepG2.2.15 cell, and ELISA assay was used to detect the inhibition on HBsAg and HBeAg secretion from HepG2.2.15 cells. **Results** The inhibition rate of Radix Alchorneae Trewioidis BE on the secretion of HBsAg, HBeAg from HepG 2.2.15 reached 65.2 %, 94.4 % respectively at non-toxic concentrations, and the therapeutic index was over 9.8, 67.1 respectively. The inhibition rate of Radix Alchorneae Trewioidis EE on HBeAg was 53.4 %, the therapeutic index was over 2, while Radix Alchorneae Trewioidis EE had no inhibitory effect on HbsAg. Radix Alchorneae Trewioidis WE and PE had no effect on the inhibition of HBsAg and HBeAg. **Conclusion** Both BE and EE of Radix Alchorneae Trewioidis can inhibit HBV *in vitro*, and the effect of BE is stronger, showing potential development prospects against HBV.

Keywords: Radix Alchorneae Trewioidis extracts; HepG 2.2.15; HBsAg; HBeAg; Anti-virus

红背叶根为双子叶植物药大戟科植物红背山麻杆 *Alchornea trewioides* (Benth.) Muell-Arg. 的根, 别名红背娘、红帽顶、红罗裙, 主要分布于我国中部和东南、华南, 其味甘、性平, 具有清热解毒, 祛风除湿、散瘀止血、平喘、杀虫止痒等作用。临床实践表明红背叶根具有抗乙肝病毒功效^[1], 但其抗乙肝病毒的体外实验鲜有报道。本实验以红背叶根 4 种不同提取物, 运用体外抑制 HBV 药物筛选体系 HepG 2.2.15 细胞作为细胞模型, 观察红背叶根不同提取物对分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响, 以探讨红背叶根抗乙肝病毒的作用机制, 为该药的开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物 红背叶根采自广东惠州, 经南方医科大学中药鉴定与药用植物教研室鉴定为大戟科植物红背山麻杆 *Alchornea trewioides* (Benth.) Muell-Arg. 的根。

红背叶根 4 种不同提取物: 水提物(WE), 石油醚提取物(PE), 乙酸乙酯提取物(EE), 正丁醇提取物(BE), 均由南方医科大学中医药学院药剂室陈兴兴老师提取。提取步骤与方法: 红背叶根干燥粉碎后, 用蒸馏水溶解, 然后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 2 次, 分别得到水提取物(WE)、石油醚提取物(PE)、乙酸乙酯提取物(EE)、正丁醇提取物(BE)。

1.2 细胞株 HepG2.2.15 细胞株, 南方医科大学肝病中心惠赠。

1.3 试剂及仪器 高糖 DMEM 培养液, 稳定转染用的抗性筛选试剂(G418), GIBCO 格兰特岛生物公司; 小牛血清(56 ℃、30 min 灭活), 批号: 110117, 中国浙江天杭生物科技有限公司; 谷氨酰胺、MTT、二甲基亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司; 0.25 %胰蛋白

酶+0.02 % EDTA, 批号: 11102001, 吉诺生物医药技术有限公司; 青-链霉素溶液, 批号: 11102101 吉诺生物医药技术有限公司; HBsAg、HBeAg ELISA 检测试剂盒, 上海科华生物工程公司。宝特 ELx800 全自动酶标检测仪, 美国 Biotek 公司; 倒置显微镜 (Olympus, Bx60), 日本奥林巴斯公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞毒性实验 用胰酶消化并将 HepG 2.2.15 细胞轻轻吹打分散成单个细胞悬液, 用含 10 % 小牛血清的 DMEM 培养液配成细胞浓度为 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 按每孔 0.1 mL 分种于 96 孔板, 置 37 ℃、饱和湿度、5 % CO_2 培养箱内培养, 待细胞长成单层后每孔加含药培养维持液 0.1 mL, 每个浓度 4 孔。各药物实验原液以含 2 % 小牛血清、380 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G418 的 DMEM 高糖培养液作系列倍比稀释, WE 设 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 等 8 个浓度; EE、BE 设 8 个浓度: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; PE 设 7 个浓度: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156。设细胞对照孔 4 个复孔, 每孔加 0.1 mL 药液。置于 37 ℃、饱和湿度、5 % CO_2 培养箱内继续培养, 待药物与细胞作用 5 d, 观察细胞形态及其生长状态后, 轻轻吸取培养细胞上清液以备 ELISA 法测定 HBsAg、HBeAg, 所余细胞用 MTT 法测定药物细胞毒性。测定药物对细胞生长的半数毒性浓度 (TC_{50}): 按 Sargent JM 等^[2]建立的 MTT 法检测。向前述所余细胞加入 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 0.1 mL/孔, 置于 37 ℃、饱和湿度、5 % CO_2 培养箱内孵育 4 h, 即可见有黄黑色甲瓚颗粒, 轻轻吸去 MTT 液但不接触细胞层, 再每孔加入 100 % DMSO 0.1 mL, 37 ℃、5 % CO_2 培养箱内密闭孵育待甲瓚颗粒完全溶解 (约 10 min) 后, 用酶标仪在 490 nm 波长处作比色法测定各孔 A(OD) 值, 空白对照设 4 孔, 每孔加 100 % DMSO 0.1 mL, 测得 4 孔 A(OD) 值后取平均数, 计算细胞破坏百分率和 TC_{50} 。细胞破坏率 (%) = (细胞对照组平均 OD 值 - 给药实验组平均 OD 值) / (细胞对照组平均 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times 100$ %。

1.4.2 培养细胞上清液中 HBsAg、HBeAg 的检测 用 1.4.1 项下所留取培养细胞上清液, 用 ELISA 法测定 HBsAg、HBeAg。按说明书操作。取所测的 OD 值求平均数, 计算红背叶根提取物对抗原的抑制率及半数有效浓度 (IC_{50})。药物对抗原的抑制率 (%) = (细胞

对照组平均 OD 值 - 给药实验组平均 OD 值) / (细胞对照组平均 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times 100$ %。

1.4.3 药物效价评定标准 按照 Reed-Meuench 法^[3]计算药物的 $\text{TC}_{50} = \text{Anti}^{\log} [B + (50 \% - < 50 \% \text{破坏率}) / (> 50 \% - < 50 \% \text{破坏率}) \times C]$; $A = \log > 50 \% \text{药物浓度}$, $B = \log < 50 \% \text{药物浓度}$, $C = A - B$; 药物的 $\text{IC}_{50} = \text{Anti}^{\log} [B + (50 \% - < 50 \% \text{抑制率}) / (> 50 \% - < 50 \% \text{抑制率}) \times C]$; $A = \log > 50 \% \text{药物浓度}$; $B = \log < 50 \% \text{药物浓度}$; $C = A - B$ 。治疗指数 (TI) = $\text{TC}_{50} / \text{IC}_{50}$ 。TI ≥ 2 : 有效低毒; $1 < \text{TI} < 2$: 低效低毒; TI < 1 : 有毒性作用, 不适宜作为抗病毒药物。

2 结果

2.1 红背叶根不同提取物对细胞的毒性作用 见表 1。用 MTT 染色法检测, 红背叶根 WE、PE、EE 随浓度降低对 2, 2.15 细胞破坏率逐渐降低, BE 则对细胞破坏小, 最大浓度 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 破坏率仍未达到 50 %。

2.2 红背叶根不同提取物对 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用 结合 MTT 结果, WE、PE 对 HBsAg、HBeAg 两抗原的影响为药物毒性的结果, 无抑制作用; EE 在无毒浓度下对 HBsAg 无抑制作用, 对 HBeAg 的抑制率为 53.4 %。BE 在无毒浓度下其抑制 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制率分别为 56.7 %~65.2 %、52.0 %~94.4 %。见表 2。

2.3 红背叶根不同提取物的治疗指数 见表 3。WE、PE 对 HBsAg 的 TI 分别为 0.03, < 0.25 , 对 HBeAg 的 TI 分别为 0.21, < 0.25 , 以上各值均小于 1, 提示 WE、PE 有毒无效; EE 对 HBsAg 的 TI 为 0.096, 对 HBeAg 的 TI 为 > 2 , 提示 EE 对 HBsAg 无抑制作用, 但是有较好的抑制 HBeAg 作用。BE 对 HBsAg 的 TI 为 > 9.8 , 对 HBeAg 的 TI 为 > 67.1 , 均大于 2, 表明 BE 对两抗原有较好的抑制作用。

3 讨论

HepG2.2.15 细胞株系以重组载体 pDolTHBV-1 (含 2 个 HBV 头对尾二聚体, 以尾对尾方向串联) 转染人肝癌细胞株 HepG2, 经 G418 筛选, 获得的一个产生高水平 HBsAg、HBeAg 的细胞克隆^[4], 由美国 The Mount Sinai Medical Center 于 1986 年建立^[5], 并且已成功地应用于抗 HBV 药物的筛选, 作为抗 HBV 作用的指标, 被中国卫生部收载于治疗肝炎的《中药

表 1 红背叶根不同提取物对 HepG 2.2.15 的细胞毒性作用
($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 The cytotoxicity of Radix Alchorneae Trewioidis extracts on HepG2.2.15

组别	剂量 /mg·mL ⁻¹	OD _{490 nm}	破坏率 /%	TC ₅₀
WE 组	50	2.63 ± 0.17	-157*	0.98
	25	0.04 ± 0.16	96.1	
	12.5	0.12 ± 0.08	88.2	
	6.25	0.44 ± 0.04	56.9	
	3.125	0.49 ± 0.06	52.0	
	1.56	0.49 ± 0.11	52.0	
	0.78	0.52 ± 0.26	49.0	
	0.39	0.55 ± 0.10	46.1	
PE 组	10	1.21 ± 0.39	-18.6*	2.5
	5	0.28 ± 0.06	72.5	
	2.5	0.51 ± 0.05	50.0	
	1.25	0.77 ± 0.11	24.5	
	0.625	0.87 ± 0.23	14.7	
	0.3125	0.91 ± 0.37	10.8	
	0.156	1.02 ± 0.19	0	
EE 组	10	2.76 ± 0.08	-170.6*	0.625
	5	2.32 ± 0.44	-157.1*	
	2.5	2.14 ± 0.04	86.3	
	1.25	0.31 ± 0.04	69.6	
	0.625	0.58 ± 0.03	50.0	
	0.3125	0.78 ± 0.18	56.9	
	0.156	0.86 ± 0.39	43.1	
细胞对照组	0.078	0.91 ± 0.17	15.7	>10 mg
		1.02 ± 0.4		
	10	0.51 ± 0.07	43.3	
	5	0.54 ± 0.12	40.0	
	2.5	0.61 ± 0.20	32.2	
	1.25	0.63 ± 0.27	30.0	
	0.625	0.66 ± 0.19	26.7	
BE 组	0.3125	0.75 ± 0.13	16.7	
	0.156	0.93 ± 0.37	-3.3	
	0.078	0.88 ± 0.20	2.2	
细胞对照组		0.90 ± 0.33		
		0.001		
空白对照组				

注：“*” 镜下观细胞破碎 +++++；中药颜色对 MTT 读值有影响；“-” 因读值大于细胞对照，结果为负值。

新药药效学研究指南》^[6]。

水、石油醚、乙酸乙酯和正丁醇是中药有效成分提取的 4 种常见溶剂。水可以提取氨基酸、糖类、无机盐等水溶性成分；石油醚或汽油可以提出油脂、蜡、叶绿素、挥发油、游离甾体及三萜类化合物；酯类溶剂可以提出游离生物碱、有机酸及黄酮、香豆素的苷元等中等极性化合物，醇类溶剂可提出苷类、生物碱盐以及鞣质等极性化合物^[7]。本实验结果表明，

表 2 红背叶根不同提取物对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibitory effect of Radix Alchorneae Trewioidis extracts on HBsAg and HBeAg secreted by 2.2.15 cells

组别	浓度 (mg·mL ⁻¹)	HBsAg			HBeAg		
		OD	抑制率 /%	IC ₅₀	OD	抑制率 /%	IC ₅₀
WE 组	50	0.071 ± 0.04	95.3		0.027 ± 0.00	97.5	
	25	1.006 ± 0.07	34.8	29.7	0.118 ± 0.03	86.9	
	12.5	1.540 ± 0.10	1.2		0.343 ± 0.14	60.7	
	6.25	1.690 ± 0.36	-		0.392 ± 0.01	55.0	
	3.125	1.708 ± 0.17	-		0.500 ± 0.13	42.4	4.74
	1.56	2.595 ± 0.42	-		0.868 ± 0.49	-	
	0.78	2.759 ± 0.33	-		1.087 ± 0.53	-	
	0.39	2.898 ± 0.04	-		1.848 ± 0.28	-	
PE 组	10	1.635 ± 0.13	-		0.640 ± 0.03	26.0	
	5	2.320 ± 0.09	-		0.727 ± 0.02	15.9	
	2.5	2.542 ± 0.12	-		0.810 ± 0.04	6.2	
	1.25	2.607 ± 0.46	-		0.910 ± 0.47	-	
	0.625	2.741 ± 0.08	-		2.325 ± 0.17	-	
	0.3125	2.773 ± 0.21	-		2.383 ± 0.48	-	
	0.156	2.820 ± 0.33	-		2.417 ± 0.11	-	
EE 组	10	0.233 ± 0.00	85.5		0.195 ± 0.01	77.9	
	5	1.113 ± 0.03	27.9	6.51	0.199 ± 0.05	77.5	
	2.5	1.379 ± 0.02	10.9		0.231 ± 0.00	73.7	
	1.25	1.483 ± 0.44	4.3		0.295 ± 0.02	66.3	
	0.625	1.773 ± 0.00	-		0.382 ± 0.23	56.1	
	0.3125	2.311 ± 0.27	-		0.405 ± 0.04	53.4	<0.
	0.156	2.781 ± 0.14	-		1.130 ± 0.41	-	3125
	0.078	2.861 ± 0.11	-		1.984 ± 0.53	-	
细胞对照		1.549 ± 0.32			0.863 ± 0.40		
空白对照		-0.002			0.006		
BE 组	10	1.040 ± 0.21	65.2		0.161 ± 0.02	93.6	
	5	1.000 ± 0.17	66.5		1.143 ± 0.05	94.4	
	2.5	1.289 ± 0.22	56.9		0.298 ± 0.05	88.0	
	1.25	1.297 ± 0.22	56.7	1.02	0.307 ± 0.01	87.6	
	0.625	1.976 ± 0.49	34.0		0.411 ± 0.04	83.3	
	0.3125	2.732 ± 0.28	8.7		0.785 ± 0.22	67.9	
	0.156	2.999 ± 0.11	0		1.170 ± 0.50	52.0	
	0.078	2.454 ± 0.22	18.0		2.012 ± 0.54	17.3	0.149
细胞对照		2.993 ± 0.04			2.432 ± 0.28		
空白对照		-0.002			0.006		

注：“-” 因读值大于细胞对照，结果为负值。

表 3 红背叶根不同提取物的治疗指数

Table 3 Therapeutic index of Radix Alchorneae Trewioidis extracts

药物	TC ₅₀ /mg·mL ⁻¹	HBsAg		HBeAg	
		IC ₅₀ /mg·mL ⁻¹	TI	IC ₅₀ /mg·mL ⁻¹	TI
WE	0.98	29.7	0.03	4.74	0.21
PE	2.5	> 10	< 0.25	> 10	< 0.25
EE	0.625	6.51	0.096	< 0.3125	> 2
BE	> 10	1.02	> 9.8	0.149	> 67.1

红背叶根乙酸乙酯提取物对 HBeAg 的治疗指数 >2, 红背叶根正丁醇提取物对 HBsAg、HBeAg 的治疗指数分别为 >9.8 和 >67.1。提示红背叶根乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物都有体外抗 HBV 作用, 正丁醇提取物效果比乙酸乙酯提取物效果更好, 亦即是醇类提取出来的极性化合物比酯类提取出来的中等极性化合物效果更好。中药醇提物在体外抗 HBV 值得重视。刘妮等研究^[8-9]发现诃子醇提物能明显地抑制 HBsAg、HBeAg; 另外, 采用大黄醇提液和大黄蒽醌类衍生物对比探讨其对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用, 实验结果表明大黄醇提液对两抗原有很好的抑制作用, 而大黄蒽醌类衍生物对 HBsAg 有一定的抑制作用, 但对 HBeAg 无抑制作用。这为抗病毒中药成分提供了一个很好的思路和途径。另一方面, 酯类溶剂提取出来的游离生物碱属于中等极性化合物, 醇类溶剂提取出来的生物碱盐属于极性化合物, 而游离生物碱及生物碱均属于生物碱类。生物碱是多种药用植物的主要有效成分, 一般具有抗炎、镇痛、免疫抑制等生物活性, 生物碱抗病毒的效果显著^[10]。药用植物中的多种生物碱类化合物均有抗病毒活性。如苦豆子总碱和 6 种单体生物碱苦参碱、氧化苦参碱、苦豆碱、槐定碱、氧化槐定碱、槐果碱均有明显的抗柯萨奇 B 组 3 型病毒作用^[11]。本实验室前期研究亦提示红背叶根护肝的有效成分是其总生物碱^[12]。因此, 可推测红背叶根生物碱类成分可能是其体外抗 HBV 有效成分, 正丁醇提取物抑制两抗原的作用可能与提取的生物碱密切相关。红背叶根抗 HBV 的具体化合物成分有待进一步研究认证。

HBsAg 是 HBV 转录合成的外膜蛋白上的 S 基因编码的主蛋白, 属于结构蛋白。外膜蛋白携带有 B 和 T 淋巴细胞表位, 刺激机体产生保护性免疫应答反应。HBeAg 是 C 基因编码的核壳蛋白的分泌型, 是 preC 蛋白翻译后加工的产物, 属于功能蛋白。

HBeAg 在 HBV 感染中的确切功能仍不清楚, 推测其可调节免疫反应^[13]。本实验结果表明, 乙酸乙酯提取物对 HBeAg 有抑制作用, 而对 HBsAg 的无抑制作用。鉴于此两种蛋白的不同之处, 推测可能是由于药物作用靶点的不同而导致。为了全面准确地评价红背叶根的抗 HBV 作用及指导临床治疗提供科学依据, 其抗 HBV 的确切机制有待进一步进行体内实验加以验证。

参考文献:

- [1] 吕志平. 红背叶根在制备治疗慢性肝炎药物中的应用[P]. 中国专利: 2006, 10: 122307.
- [2] Sarent JM, Tylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Br J Cancer, 1989, 60 (2): 206-210.
- [3] 蒋美娟, 李玉虎. 中药单方乙醇提取液抗乙型肝炎的实验研究[J]. 医学信息, 2011, 24(8): 4910-4912.
- [4] 郑浩杰. 利用 2.2.15 细胞株筛选抗乙型肝炎中草药的体外实验研究进展[J]. 陕西中医学院学报, 2003, 26(2): 61-63.
- [5] Sells MA, Chen ML, Aes G. Production of hepatitis B virus particles in Hep-G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. ProcNad Acad Sci USA, 1987, 84: 1005.
- [6] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南[S]. 北京: 1994. 82.
- [7] 宋晓凯. 天然药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 21-22.
- [8] 周长征. 生物碱类成分抗病毒研究进展[J]. 健康必读, 2012, 11 (5): 5.
- [9] 杨志伟, 周娅, 曹秀琴. 苦豆子生物碱体外抗柯萨奇 B3 病毒的作用[J]. 四川中医, 2003, 21(3): 14-16.
- [10] 张燕明, 刘妮, 朱宇同, 等. 诃子醇提物抗 HBV 的体外实验研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(3): 383-384.
- [11] 刘妮, 朱辨弦, 黄正昌, 等. 大黄醇提液对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制作用[J]. 中药材, 2004, 27(6): 419-421.
- [12] 黄洁春, 吕志平, 刘强, 等. 红背叶根提取物对四氯化碳致小鼠肝损伤的作用研究[J]. 陕西中医, 2011, 32(1): 113-115.
- [13] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科技出版社, 2001: 338.

(编辑: 邓响潮)

欢迎订阅 《中药新药与临床药理》, 邮发代号: 46-210