

不同品种、不同产地叶下珠属植物 在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究

广州中医药大学热带医学研究所(510407)

陈征途* 李凤仙 邓文娣
朱宇同 郭兴伯 王新华

叶下珠属为大戟科(*Euphorbiaceae*)中的一个属,在全球约有 600 种,而我国已发现有 30 余种^[1]。Shead 等曾对 5 种澳大利亚的叶下珠属植物抗乙型肝炎病毒(HBV)作用进行过研究^[2]。目前我国尚未见到对不同品种叶下珠属植物的抗 HBV 作用进行较系统的比较研究。本实验对 8 种不同品种、不同产地叶下珠属植物的水提物在体外 2215 细胞培养中进行抗 HBV 作用的观察。

1 材料与方法

1.1 药物:苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* Schum (海南采集)、黄珠子草(*P. virgatus* Forst. f)(海南采集)、珠子草延益亚种(*P. amarus*. Subsp. *yanyianus* Schum zhu et Li, Subsp. *nov.*)(海南采集)、广东产叶下珠(*P. urinaria* L.)(广东采集)、广西产叶下珠(*P. urinaria* L.)(广西采集)、余甘子(*P. emblica* L.)(云南采集)、云泰叶下珠(*P. sootepensis* Craib)(云南采集)、云贵叶下珠(*P. franchetianus* Levl)(云南采集)、无环鸟甘(ACV)(湖北潜江制药厂,批号:960507)。以上 8 种中药均取全草,洗净、打碎后,浸泡于清水中,置 60℃水浴 2 h,间隔搅拌 4~5 次^[3],离心后,上清于 0.45 μm 滤膜过滤。实验时以培养液稀释至所需浓度。

1.2 试剂:DMEM(GIBCO)培养液;含 10%胎牛血清(GIBCO)、G418(GIBCO) 0.38 g/L、Hepes(Sigma)2.3 g/L、0.3%L-谷氨酰胺。MTT(Sigma):用 DMEM 配成 0.4 g/L。二甲基亚砷(DMSO)(如皋市化学试剂厂)。HBeAg、HBsAg 放免试剂盒(北方免疫试剂研究所)。

1.3 2215 细胞系:北京 302 医院病毒室转赠。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养:将长满 2215 细胞的培养瓶用 0.06%胰蛋白酶-EDTA 消化 2~3 min,弃消化液,加培养液轻轻吹打,将细胞配制成 10 万个/mL 种

于细胞培养板中,96 孔板 0.1 mL/孔,24 孔板 1 mL/孔,于 37℃ 5%CO₂ 培养箱内培养 48 h,贴壁后用于实验。

1.4.2 药物对细胞的毒性试验:8 种中草药水提物用培养液分别配成多种不同的浓度,加于 96 孔细胞板中,每种浓度 3 孔,0.1 mL/孔。并设无药细胞对照及阳性对照药 ACV,ACV 做 3 种浓度。加药后培养 4 d,换加药液,继续培养到第 8 天,用 MTT 染色,每孔 0.1 mL,37℃ 5%CO₂ 孵育 4 h,弃上清后加 DMSO 0.1 mL/孔溶解,然后以波长 570 nm 比色测定 OD 值。

1.4.3 药物对 HBV 抑制试验:将 8 种叶下珠属植物水提物分别用培养基配成 3 种浓度,均取无毒或接近无毒的浓度,分别加于 24 孔板,1 mL/孔,每种浓度 3 孔,另设无药对照及阳性对照药 ACV,培养于 37℃,5%CO₂ 培养箱内,每 4d 换加原浓度药液继续培养,第 12 天收集培养液,即进行 HBsAg 和 HBeAg 测定,用 γ-计数器测定每孔药液 cpm 值。实验重复 3 次。

计算各药物对细胞生长的半数毒性浓度(TC₅₀)、药物对抗原的抑制百分率(%)、药物抑制抗原的半数有效浓度(IC₅₀)和药物的治疗指数(TI)。

2 结果与讨论

2.1 药物对 2215 细胞的毒性作用:用 MTT 染色法观察 TC₅₀(g/L):苦味叶下珠 9.0、黄珠子草 6.0、珠子草延益亚种 9.0、广东产叶下珠 8.6、广西产叶下珠 6.1、余甘子 6.0、云泰叶下珠 97.2、云贵叶下珠 0.6、ACV 1.8。云泰叶下珠毒性最小,云贵叶下珠毒性最大,其余 6 种的半数毒性剂量差别不太大。

2.2 不同叶下珠属植物水提物在 2215 细胞培养中对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制效果:采用的 8 种叶下珠属植物的水提物在体外细胞培养中,由于品种不同,产地不同表现出对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作

* 陈征途 毕业于第一军医大学,现任实验师。曾在军事医学科学院从事神经生物学、生物化学等方面工作,近年来主要的研究课题为《肝癌多指标诊断》、《抗肝炎药物的评价》等。先后在国内杂志上发表文章 10 余篇,曾获得军内科技进步二等奖 2 项,三等奖 1 项,总后科技四等奖 1 项,省级科技成果奖 2 项。

用不同。在浓度为 3.13 g/L 时,黄珠子草和广东产叶下珠对 HBsAg 和 HBeAg 均有很好的抑制作用,抑制率分别为 67.67%和 75.90%、63.03%和 68.40%;珠子草延益亚种对 HBsAg 的抑制率为 57.17%,而对 HBeAg 抑制作用差;苦味叶下珠、广西产叶下珠、余甘子对 HBeAg 的抑制率分别为 63.75%、69.1%和 64.20%,而对 HBsAg 的抑制率仅为 20%~30%左右。云泰叶下珠对 HBeAg 的抑制作用很强,浓度为 1.25 g/L 时就表现出抑制率为 60.82%,对 HBsAg 则几乎无抑制作用。云贵叶下珠在 0.5 g/L 时对 HBsAg 的抑制率为 70.87%。

一般用 TI 来评价药物临床应用前景, $TI > 2$ 为有效低毒, $TI > 1$ 、 $TI < 2$ 为低效有毒, $TI < 1$ 为毒性作用^[4]。黄珠子草和广东产叶下珠对 HBsAg 和 HBeAg 的 TI 均 > 2 ;苦味叶下珠、余甘子、广西产叶下珠和云泰叶下珠对 HBeAg 以及珠子草延益亚种和云贵叶下珠对 HBsAg 的 TI > 2 。ACV 为实验的阳性对照药,对两种抗原的 TI 均 < 2 。

国内外已对叶下珠属植物的成分做了许多分析

研究,并有报道证实不同品种、不同产地则所含成分有许多差别,所表现的结果也各有差异^[5,6]。如本文中云贵叶下珠和云泰叶下珠均采自于云南元江峡谷海拔 600 m 处,但在 2215 细胞培养中,云贵叶下珠表现出毒性较大,对 HBsAg 的抑制作用好;而云泰叶下珠的毒性很小,对 HBeAg 抑制作用强,可见两种草药虽产于一地,但品种不同表现也明显不同。

致谢:本研究承郑孙文淑基金会赞助,特此谢忱。

参考文献

- 1 金存礼. 植物分类学报,1981,19(3):345
- 2 Shead A, et al. Antiviral Res, 1992, 18:127
- 3 Venkateswaran S P, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(1):274
- 4 范涛,等. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10(1): 27
- 5 方雷,等. 国外医药-植物药分册, 1992, 7(6):249
- 6 陈压西,等. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4):225

(1997-05-23 收稿)

(上接第 603 页)

的色谱图,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归。得回归方程: $A = 4.06 \times 10^6 C - 2.83 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。

4 加样回收实验

精密吸取上述各稀释标准液 5 mL 与等量的样品注射液混合均匀,依次按样品液、标准液及混合液直接进样分析测定,进样量为 10 mL,计算回收率为 99.08%,RSD 为 1.43% ($n=5$)。

5 样品测定

取川芎嗪的标准对照液 (0.06 mg/mL) 与样品

液各 10 mL,依上述测定方法进样标定,测得样品血立通注射液 中川芎嗪含量,测 3 次,得平均含量为 7.71 $\mu\text{g/mL}$,RSD 为 0.69%。

6 小结

6.1 本法一次色谱分析在 10 min 内完成,测得峰保留时间在 8.5 min 左右。本品甲醇水溶液比较稳定,一周内测定含量几乎无变化。

6.2 采用此法进行含量测定,结果表明操作方法较简单,灵敏度高,结果准确,适于该制剂的质量控制。

(1996-11-22 收稿)

新 书 介 绍

近期由辽宁科技出版社出版的《中草药及其制剂质量分析方法》新书,系统介绍了中草药及其制剂分析中的常用方法,包括高效液相色谱法,气相色谱法,薄层扫描法等,并对这些方法的基本原理、操作条件、定性和定量分析的程度进行了详细的论述。各论介绍了 200 种单味药及其制剂的含量测定方法,是从事中医中药科研、生产、临床特别是开发的工作人员较好的一本工具参考书。

本书作者赵余庆,男,40 岁。现任辽宁中医学院教授。《中草药》杂志副主任编委。从事天然药物研究近二十年,在国内外刊物发表学术论文 50 余篇,出版专著三部。该书是作者结合本人多年研究经验编写而成。

本书分精装与简装两种。精装定价 26.00 元,简装定价 19.80 元,另加邮费 5 元,欲购者请将书款寄至: 110003 沈阳市和平区文化路 41 号沈阳飞龙保健品有限公司科技发展中心 王月敏收,款到即寄书。