

- [6] 曹纯章, 杨绍娟, 卜丽莎, 等. 过氧化氢诱导心肌细胞凋亡性和非凋亡性死亡的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(5): 457-461.
- [7] Sugawara T, Chen P H. Reactive oxygen radicals and

pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(5): 597-607.

- [8] 岳平, 傅世英, 黄水麟, 等. 再灌注损伤心肌线粒体呼吸酶系的变化 [J]. 中华心血管病杂志, 1991, 19(1): 19-38.

壮药依肝达含药血清对 2215 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响

梁宁, 邓家刚, 韦松基*

(广西中医学院, 广西南宁 530021)

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的, 以肝脏炎性病变为主的一种传染性疾病。尽管已有干扰素及核苷类等各种抗 HBV 药物, 但其疗效均不理想。目前, 中药抗 HBV 已成为国内外的研究热点。壮药依肝达是通过长期的民间临床观察而拟定的治疗急性慢性乙型肝炎和肝硬化的验方, 主要由壮族民间草药饭汤子、田基黄、三姐妹等组成, 具有清热解暑、利湿退黄和促进肝功能恢复之功效, 临床疗效显著。本实验以 2215 细胞株为研究对象, 采用中药血清药理学方法, 研究依肝达的体外抗 HBV 作用。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 (18~22) g, 动物使用许可证: SYKG 桂 2003—2005, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 细胞: 2215 细胞株, 广西中医学院新药开发中心惠赠。

1.3 药品与试剂: 依肝达, 由广西中医学院壮医药学院壮药教研室提取制备 (取组方药材饭汤子、田基黄、三姐妹以 3:5:3 的比例按常规水提法提取); 阿德福韦酯片 (ADF): 天津药物研究院药业有限公司产品, 批号 20070804; MEM 培养基: 美国 Gibco 公司; 胎牛血清: 美国 Gibco 公司; HBsAg 和 HBeAg 酶联免疫检测试剂盒: 北京万泰有限公司, 批号 20080302。

1.4 主要仪器与设备: CO₂ 孵箱 (美国 Thermo Forma 公司); 自动酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 培养瓶 (美国 Promega 公司产品); 96 孔板 (美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 依肝达含药血清的制备: 18~20 g 小鼠, 随机

分为 3 组, 每组 3 只。对照组: 等量的蒸馏水; 阳性组 (ADF): 20 mg/kg; 依肝达组: 40 g/kg。各组动物在同样条件下饲养, 均以每日 2 次, 早晚各 1 次空腹 ig 给药, 连续给药 3 d。于末次给药 (禁食不禁水) 后 1 h, 摘眼球取血, 分离血清, 经 56 °C 30 min 灭活处理, 培养液分别稀释至 40%、20%, 再经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后, 置 -20 °C 冰箱保存备用。

2.2 ELISA 法定量检测 HBsAg 和 HBeAg: 将 2215 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 环境中的孵养箱中培养, 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, 约 7~10 d 长满培养瓶。在长满 2215 细胞的培养瓶中, 用 0.25% 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 1×10⁵/mL 细胞, 接种于 96 孔板, 每孔加 100 μL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。在接种 2215 细胞 24 h 后加 40%、20% 含药血清 (终末体积分数为 20%、10%), 每种体积分数设 3 孔, 于第 4 天换含相同体积分数的含药血清, 维持 8 d, 于第 8 天时收集培养液, 同时采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法测定 HBsAg、HBeAg。结果以抑制率表示。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{给药组 } A \text{ 值}}{\text{对照组 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

2.3 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 组间比较采用方差分析, 各均数两两比较。

3 结果

实验结果表明, 依肝达含药血清 (20%、10%) 明显降低 2215 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 抗原水平 ($P < 0.01$), 与阳性组无明显差别, 结果见表 1。

收稿日期: 2008-06-06

基金项目: 科技部“十一五”支撑项目 (2006BAI06A17-03)

作者简介: 梁宁 (1974—), 女, 广西容县人, 讲师, 硕士, 主要从事民族药研究与开发工作。E-mail: liangning_ron@163.com

* 通讯作者 韦松基 E-mail: weisongji@126.com

表 1 依肝达含药血清对 2215 细胞分泌、HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibition of Yiganda drug-containing serum on 2215 cells secretion of HBsAg and HBeAg ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/ %	HBsAg		HBeAg	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
对照	20	1.28±0.06	—	1.68±0.18	—
	10	1.27±0.11	—	1.71±0.11	—
ADF	20	0.60±0.11**	53.13	0.81±0.19**	51.79
	10	0.67±0.10**	47.24	1.23±0.15**	28.07
依肝达	20	0.54±0.06**	57.81	0.74±0.12**	55.95
	10	0.73±0.10**	42.52	1.19±0.15**	30.41

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

2215 细胞模型是 Sells 等^[1]在 1987 年将克隆的 2 个头尾相连的 HBV DNA 全基因及抗 G418 质粒直接导入受体细胞—人肝癌细胞株 HepG2 细胞构建而成。该细胞不仅支持 HBV DNA 的复制,且支持 Dane 样颗粒的包装与分泌^[2]。目前,该细胞模型已被国内外学者公认且广泛用于抗 HBV 药物筛选和评价等研究,现已成为申报抗 HBV 新药必须进行的体外实验模型^[3]。中药血清药理学方法是近年来兴起的一种适合中药特点的更科学的中药药理

学实验方法。它可防止中药粗制剂本身的理化性质对实验的干扰,还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真实过程,并代表了药物在体内产生作用的真正有效成分,尤其是适合中药及中药复方化学成分复杂的特点,为中药及其复方的药理学研究开辟了新纪元^[4]。本实验采用 2215 细胞模型和中药血清药理学方法,采用 ELISA 法检测依肝达含药血清在作用 2215 细胞 72 h 后上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的量。实验结果表明依肝达有一定的抑制 2215 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的作用,提示其抗病毒作用是通过抑制 HBV 的复制而产生疗效的。

参考文献:

- [1] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (4): 1005-1009.
- [2] Sells M A, Zelent A Z, Shvartsman M, et al. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions [J]. *J Virol*, 1988, 62(8): 2836-2844.
- [3] Lampertico P, Malter J S, Gerber M A. Development and application of an *in vitro* model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics [J]. *Hepatology*, 1991, 13(3): 422-426.
- [4] 刘建文. 药理实验方法学—新技术与新方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

(上接第 1824 页)

大黄素对照品溶液 8、10、12 mL, 制备供试品溶液, 按上述方法测定, 计算回收率, 结果本方法加样回收平均回收率为 96.8%, RSD 为 0.90% ($n=6$)。

2.9 样品测定: 取 3 批样品, 每批 2 份, 依法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样, 每份平行测定 2 次, 采用外标二点法计算大黄素的质量分数, 结果见表 1。

3 讨论

《中国药典》记载首乌藤具有养血安神、祛风通络的功效, 用于失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛, 为养血安神分散片处方中主要养心安神药, 是反映制剂功能主治的重要组成部分。而大黄素是首乌藤中主

表 1 养血安神分散片中大黄素的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of emodin in Yangxue Anshen Dispersible Tablets ($n=2$)

批号	大黄素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1})$
20050302	29.5
20050310	29.9
20050321	30.0

要成分, 因此选用大黄素作为指标成分以控制养血安神分散片的质量。

实验结果显示, HPLC 法测定养血安神分散片中大黄素的方法简便、准确、重现性好, 可为本品的质量控制提供依据。