

狭叶五味子中化合物扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸 体外抗乙型肝炎病毒活性研究

饶贤高^{1,2}, 肖伟烈³, 杨柳萌², 孙汉董³, 傅颖媛¹, 郑永唐^{2*}

(1. 南昌大学医学院 免疫学教研室, 江西 南昌 330006; 2. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型和人类疾病机理重点实验室 分子免疫药理学实验室, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要:目的 研究从狭叶五味子 *Schisandra lancifolia* 中分离化合物扁枝杉香豆素 (phyllocoumarin) 和 (-)-表儿茶酸[(-)-epicatechin]的体外抗乙型肝炎病毒 (HBV) 活性。方法 为了筛选和确认扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸体外抗 HBV 活性, 以 Hep G2. 2. 15 细胞为体外研究 HBV 模型, 分别用 RPMI 1640 完全培养基稀释不同质量浓度的药物作用于细胞, 培养 3 d 后收集上清, 采用 MTT 法检测药物对 Hep G2. 2. 15 细胞的生长影响和 ELISA 法检测培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的水平, 评价扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对 HBsAg 和 HBeAg 的影响。结果 扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸具有一定的体外抗 HBV 活性, 其细胞毒性非常小, CC_{50} 均大于 200 $\mu\text{g/mL}$ 。扁枝杉香豆素具有较强的抑制 HBsAg 和 HBeAg 分泌作用。阳性对照药物阿德福韦酯也抑制 HBV HBsAg 和 HBeAg 分泌, 但在相同质量浓度 (1.6 $\mu\text{g/mL}$) 下其抑制作用较扁枝杉香豆素弱。结论 狭叶五味子中化合物扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸具有一定体外抑制 HBV HBsAg 和 HBeAg 分泌的作用, 从而起到抗 HBV 作用。

关键词: 狭叶五味子; 扁枝杉香豆素; (-)-表儿茶酸; 乙型肝炎病毒 (HBV); 抗 HBV 活性

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)02-0248-04

In vitro anti-HBV activities of phyllocoumarin and (-)-epicatechin from *Schisandra lancifolia*

RAO Xian-gao^{1,2}, XIAO Wei-lie³, YANG Liu-meng², SUN Han-dong³,
FU Ying-yuan¹, ZHENG Yong-tang²

(1. Department of Immunology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Laboratory of Molecular Immunopharmacology, Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanisms Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: **Objective** To evaluate anti-HBV activities of phyllocoumarin (I) and (-)-epicatechin (II) from *Schisandra lancifolia* in vitro. **Methods** To screen and confirm the anti-HBV activities of compounds, phyllocoumarin and (-)-epicatechin, Hep G2. 2. 15 cells were used as HBV model in vitro. Different concentration of phyllocoumarin and (-)-epicatechin were added to the wells with the growth of Hep G2. 2. 15 cells and the supernatant was collected at the third day. The cytotoxic activity on the growth of Hep G2. 2. 15 cells was detected by MTT. ELISA for HBsAg and HBeAg assays was used to evaluate the effects of phyllocoumarin and (-)-epicatechin on HBsAg and HBeAg secretion. **Results** Both phyllocoumarin and (-)-epicatechin showed anti-HBV activity and exerted cytotoxicity against Hep G2. 2. 15 cells with $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$. But phyllocoumarin decreased the levels of HBsAg and HBeAg secretion more effectively than (-)-epicatechin did. Compared with Adefovir Dipivoxil (ADV), phyllocoumarin inhibited the secretion of HBsAg and HBeAg more effectively at the same concentration (1.6 $\mu\text{g/mL}$). **Conclusion** Phyllocoumarin and (-)-epicatechin are potential anti-HBV agents and show lower cytotoxicity.

Key words: *Schisandra lancifolia* (Rehd. et Wils) A. C. Smith; phyllocoumarin; (-)-epicatechin; hepatitis B virus (HBV); anti-HBV activity

* 收稿日期: 2008-04-14

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2009CB522306); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KSCX1-YW-R-24)

作者简介: 饶贤高 (1976—), 男, 江西省人, 在读硕士生, 研究方向为抗病毒药物研究。

* 通讯作者: 郑永唐 Tel/Fax: (0871) 5195684 E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 属嗜肝 DNA 病毒家族,是一种小的包膜病毒,包含松弛、环状、部份双链的 3.2 kb DNA 基因组^[1],能引起急性和慢性肝脏感染。全世界大约有 5 亿多人感染 HBV^[2]。有些慢性感染者可能进一步恶化发展肝硬化和原发性肝癌^[3]。因此 HBV 已成为全球卫生健康主要问题之一。

过去 20 多年里,干扰素 (IFN) 在临床广泛用来治疗慢性 HBV 感染性疾病。IFN 有效地发挥抗 HBV 功能主要通过两种机制^[4]。在临床治疗过程中 IFN 虽起到一定的疗效,但总体效果低、成本高^[5],给病人带来严重的负面影响。FDA 批准抑制 HBV 多聚酶的几种核苷类药物^[6],主要有拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦等。其中拉米夫定疗效较好,副作用也较少,但是在长期服药过程中易产生耐药,Ⅱ期临床实验表明,随着拉米夫定治疗时间延长,患者耐药率也随着上升,经拉米夫定治疗 2 年后约 31% 病人产生耐药,治疗 4 年后约有 70% 病人发生耐药^[7]。多数研究评估,IFN 和拉米夫定联合用药治疗 HBV 感染病人效果比它们单独用药效果好^[8,9],但联合用药可能产生的负面影响和低效率仍然存在。因此,需要不断研发新的 HBV 药物,从天然资源和中草药中寻找有效抗 HBV 化合物是重要途径之一。

我国科学家发现中药北五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 粗提物及其多种有效成分作用于多靶点,具有保肝解毒、抗氧化和抗 HBV 等多方面的作用,并研发成功联苯双酯和双环醇两种具有我国自主知识产权的治疗肝炎药物^[10]。通过对狭叶五味子 *Schisandra lancifolia* (Rehd. et Wils.) A. C. Smith 茎叶的化学成分和抗病毒活性研究,发现了狭叶五味子二内酯 F (lancifodilactone F) 和 lancifodilactone G 等多个具有抗 I 型艾滋病毒 (HIV-1) 活性的化合物^[11~14]。本实验对来源于狭叶五味子的化合物扁枝杉香豆素^[15]和 (-)-表儿茶酸^[16]抗 HBV 活性进行初步研究,为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 化合物扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸的分离纯化:狭叶五味子 *S. lancifolia* (Rehd. et Wils.) A. C. Smith 茎叶于 2002 年 8 月采集于云南省大理地区,由中国科学院昆明植物研究所李锡文研究员鉴定,标本 (No. KIB 2002-08-11) 存放于昆明植物所植物化学与西部资源可持续利用国家重

点实验室。5.7 kg 干燥狭叶五味子茎和叶,粉碎后用 70% 丙酮浸泡 3 次 (每次 15 L),每次 24 h,提取液合并,减压蒸馏,用醋酸乙酯萃取,得到醋酸乙酯部分 101 g。硅胶拌样,氯仿-甲醇梯度 (10 : 0、9 : 1、8 : 1、5 : 5、0 : 10) 洗脱,用 TLC 进行检测,合并相同流份,得 I~V 5 个流份段。流份 III 用 MCI 脱色 (甲醇-水,0 : 1、9 : 1、1 : 0、100% 丙酮),90% 甲醇洗脱部分经硅胶柱色谱 (石油醚-醋酸乙酯,9 : 1、8 : 2、5 : 5) 分离得到 4 个流份段 A~D,流份段 B 经过 Sephadex LH-20 (溶剂为甲醇) 色谱得到 5 个流份段 a~e,流份段 c 经半制备 HPLC (Rp-18,甲醇-水,55 : 45 和 54 : 66) 分离得到扁枝杉香豆素 (20 mg) 和 (-)-表儿茶酸 (24 mg),其得率分别为 0.007% 和 0.0098%,质量分数均大于 98%。

1.2 试剂:RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司;十二烷基磺酸钠 (SDS)、MTT、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和 G418 均购自 Sigma 公司;阿德福韦酯 (ADV) 购自华美公司。HBsAg 和 HBeAg ELISA 检测试剂盒购自上海科华生物技术有限公司。

1.3 仪器:酶标仪 ELX-800 (BIO-TEK),微量移液器 (GILSON),倒置显微镜 Eclipse TS100 (Nikon);二级生物安全柜 Forma Class II,CO₂ 细胞培养箱为 Thermo 公司产品。

1.4 细胞培养:Hep G2.2.15 细胞由中国科学院生物物理研究所唐宏研究员惠赠,能分泌 HBeAg、HBsAg 和感染性完整病毒颗粒^[17]。细胞复苏培养:从液氮中取出细胞,37℃水浴快速复苏,直接加入预温 RPMI 1640 完全培养基 (含 400 μg/mL G418,10% FBS,2 mmol/L L-Gln) 7 mL,37℃、5% CO₂ 培养。细胞每隔 1 d 换液 1 次,7 d 左右传代 1 次。

1.5 细胞毒性实验:用 MTT 比色法测定化合物扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对细胞的毒性^[18]。Hep G2.2.15 细胞在药物作用前 24 h 以 6×10^4 /孔铺于 96 孔板。用 RPMI 1640 完全培养基将化合物稀释成 0.064、0.32、1.6、8、40、200 μg/mL,每个质量浓度设 3 个复孔,同时设置阴性对照孔 (细胞对照),空白对照孔 (只加培养液) 及 ADV 药物 (1.6 μg/mL) 对照孔。37℃、5% CO₂ 培养箱培养 3 d 后,吸出培养基 110 μL/孔,加 4 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL/孔,培养 4 h 后,100 μL/孔 SDS-DMF 溶液溶解。ELx800 酶标仪测定吸光度 (A) 值,测

定波长为 595 nm, 参考波长为 630 nm。计算出对 50 % Hep G2. 2. 15 细胞产生毒性的样品浓度 CC_{50} (50 % cytotoxic concentration)。

1. 6 ELISA 法检测抗原 HBsAg 和 HBeAg 水平: Hep G2. 2. 15 细胞在药物作用前 24 h 以 6×10^4 /孔铺于 96 孔板。化合物采用 RPMI 1640 完全培养基稀释, 以 0. 064、0. 32、1. 6、8、40、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于细胞, 培养体系 200 μL , 每个质量浓度设 3 个复孔, 同时设置阴性对照孔, 空白对照孔及 ADV 药物对照孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 培养箱培养 3 d, 收集细胞上清, 以 ELISA 法检测 HBsAg 和 HBeAg 水平。结果以化合物对抗原的抑制率表示。抑制率 = [(阴性对照孔 A 值 - 空白对照孔 A 值) - (实验孔 A 值 - 空白对照孔 A 值)] / (阴性对照孔 A 值 - 空白对照孔 A 值) $\times 100$ %。

1. 7 统计学处理: 实验资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10. 0 统计软件分析数据, 对组间数据进行单因素方差分析及 LSD- t 检验。

2 结果

2. 1 化合物扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对 Hep G2. 2. 15 细胞的毒性作用: 扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对 Hep G2. 2. 15 细胞的毒性较小, CC_{50} 均大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1)。与 ADV 阳性对照药物相比较, 相同质量浓度 1. 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用下 (-)-表儿茶酸对 Hep G2. 2. 15 细胞毒性比 ADV 毒性要小, 1. 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时扁枝杉香豆素、(-)-表儿茶酸及 ADV 组细胞存活率分别为 86. 45 %、96. 38 %、83. 56 %。

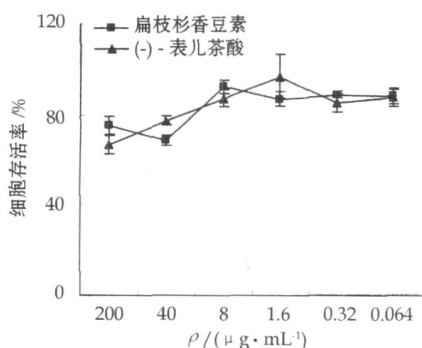


图1 化合物扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Cytotoxicity of phyllocoumarin and (-)-epicatechin on HepG2. 2. 15 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2. 2 化合物扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对 Hep G2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 抗原的抑制作用: Hep G2. 2. 15 细胞是稳定转染 HBV 的

细胞系, 能稳定分泌 HBsAg、HBeAg 和感染性 HBV 颗粒。本实验采用 Hep G2. 2. 15 细胞系检测扁枝杉香豆素和 (-)-表儿茶酸对 HBV 分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。与 ADV 阳性对照药物相比较, 扁枝杉香豆素对 HBV 分泌的 HBsAg 抑制效果较好, 而 (-)-表儿茶酸抑制作用稍弱 (表 1); 与阴性对照相比较, 各质量浓度对 HBV 分泌 HBeAg 均有抑制作用, 而 (-)-表儿茶酸只有在高质量浓度 ($> 1. 6 \mu\text{g}/\text{mL}$) 下才有明显的抑制作用 (表 1)。不同质量浓度 (200~0. 064 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的扁枝杉香豆素在第 3 天对细胞培养上清 HBeAg 分泌的抑制率为 45. 81 %~18. 62 %, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 01$, 表 1); 扁枝杉香豆素 (200~1. 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对细胞培养上清 HBsAg 分泌的抑制率为 52. 16 %~23. 22 %, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$, 表 1)。(-)-表儿茶酸在质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 第 3 天对细胞培养上清 HBsAg 分泌的抑制率为 19. 69 %, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 01$, 表 1); 在质量浓度为 200~1. 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对细胞培养上清 HBeAg 分泌的抑制率为 27. 67 %~7. 00 %, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$, 表 1)。

表1 扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸对 HepG2. 2. 15 细胞产生 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Inhibition of phyllocoumarin and (-)-epicatechin on HBsAg and HBeAg secretion of HepG2. 2. 15 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

化合物	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	HBsAg		HBeAg	
		A 值	抑制率/ %	A 值	抑制率/ %
阴性对照	-	2.89 $\pm$ 0.31	-	2.02 $\pm$ 0.21	-
ADV	1.6	2.30 $\pm$ 0.04 **	20.46	1.78 $\pm$ 0.15 **	11.92
扁枝杉香豆素	200	7.39 $\pm$ 0.74 ** $\triangle$	52.16	1.10 $\pm$ 0.11 ** $\triangle$	45.81
	40	1.69 $\pm$ 0.41 ** $\triangle$	41.59	1.50 $\pm$ 0.23 ** $\triangle$	26.05
	8	2.09 $\pm$ 0.21 *	27.73	1.64 $\pm$ 0.11 **	18.88
	1.6	2.22 $\pm$ 0.03 *	23.22	1.48 $\pm$ 0.13 ** $\triangle$	26.83
	0.32	2.33 $\pm$ 0.04	19.57	1.63 $\pm$ 0.14 **	19.56
	0.064	2.37 $\pm$ 0.18	18.03	1.64 $\pm$ 0.20 **	18.62
(-)-表儿茶酸	200	2.32 $\pm$ 0.22 **	19.69	1.46 $\pm$ 0.27 ** $\triangle$	27.67
	40	2.60 $\pm$ 0.17	10.21	1.69 $\pm$ 0.08 **	16.39
	8	2.36 $\pm$ 0.12	18.42	1.67 $\pm$ 0.15 **	17.25
	1.6	2.53 $\pm$ 0.28	12.38	1.88 $\pm$ 0.08 *	7.00
	0.32	2.55 $\pm$ 0.09	11.67	1.98 $\pm$ 0.10	1.92
	0.064	2.52 $\pm$ 0.14	12.79	2.01 $\pm$ 0.11	0.40

与阴性对照比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

与 ADV 比较: $\triangle P < 0. 05$ $\triangle\triangle P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs negative control

$\triangle P < 0. 05$ $\triangle\triangle P < 0. 01$ vs ADV

3 讨论

HBV 引起的感染性疾病是预防性疾病。从 1983 年开始,全世界主要采取乙肝疫苗预防 HBV 感染,但有很大一部分人群注射了乙肝疫苗不能产生乙肝抗体和疫苗覆盖面有限,导致乙肝病人持续增多。因此,采取 HBV 药物治疗必不可少。由 FDA 批准的抗乙型肝炎病毒核苷类药物在临床上有一定的疗效^[6],但它们的负面影响很大和易产生耐药性等问题,迫切需要开发新的具有高效低毒抗乙型肝炎病毒药物,从天然资源和中草药中寻找有效抗 HBV 的化合物是重要途径之一。我国科学家基于北五味子中有效成分研发成功了联苯双酯和双环醇两种治疗肝炎新药,有显著的保肝降转氨酶作用和一定的抗肝炎病毒作用^[10,19,20]。通过对狭叶五味子茎叶的化学成分和抗病毒活性研究,发现了 Lancifodilactone F 和 Lancifodilactone G 等多个具有抗 HIV-1 活性的化合物^[11~14]。同时,也对从狭叶五味子中分离得到的部分化合物进行了抗 HBV 活性的筛选,发现化合物扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸也具有一定的抗 HBV 活性作用。

本研究采用 MTT 法测定了化合物扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸对 Hep G2.2.15 细胞的毒性作用,观察两者对 Hep G2.2.15 细胞本身的生长是否有影响。结果表明,扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸的 CC₅₀ 都大于 200 μg/mL,说明扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸均对 Hep G2.2.15 细胞的毒性非常小。与 ADV 阳性对照药物相比较,相同质量浓度 1.6 μg/mL 作用下扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸组对 Hep G2.2.15 细胞存活率均在 86% 以上,其毒性比 ADV 小。

Hep G2.2.15 细胞是稳定分泌 HBsAg、HBeAg 和感染性 HBV 颗粒,是目前体外抗 HBV 药物筛选和研究常用实验模型。本实验采用 Hep G2.2.15 细胞系检测扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸对 HBV 分泌的 HBsAg 和 HBeAg 抑制作用。不同质量浓度的扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸作用 Hep G2.2.15 细胞 3 d 后,对上清 HBsAg 和 HBeAg 均有抑制作用。与 ADV 阳性对照药物相比较,其中扁枝杉香豆素对 HBV 分泌的 HBsAg 抑制效果较好,而(-)-表儿茶酸抑制作用稍弱;与阴性对照相比较,在所有检测质量浓度下扁枝杉香豆素对 HBV 分泌的 HBeAg 均有抑制作用,而(-)-表儿茶酸只有在高质量浓度下才有明显的抑制作用。这说明扁枝杉香豆素和(-)-表儿茶酸均

具有一定的体外抗 HBV 作用。

参考文献:

- [1] Scaglioni P P, Melegari M, Wands J R. Recent advances in the molecular biology of hepatitis B virus [J]. *Bailliers Clin Gastroenterol*, 1996, 10(2): 207-225.
- [2] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3): 215-229.
- [3] Fleming J. Current treatments for hepatitis [J]. *J Infus Nurs*, 2002, 25(6): 379-382.
- [4] Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Treatment of chronic hepatitis B [J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(4): 333-345.
- [5] Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(22): 1422-1427.
- [6] Mailliard M E, Collan J L. Emerging therapeutics for chronic hepatitis B [J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 155-166.
- [7] Lai C L, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B [J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 36(6): 687-696.
- [8] Lau G K, Piratvisuth T, Luo K X, et al. Peginterferon alfa-2a, lamivudine and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(26): 2682-2695.
- [9] Sarin S K, Kumar M, Kumar R, et al. Higher efficacy of sequential therapy with interferon-alpha and lamivudine combination compared to lamivudine monotherapy in HBeAg positive chronic hepatitis B patients [J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(11): 2463-2471.
- [10] 刘耕陶. 双环醇的抗病毒与肝细胞保护作用及其机制 [J]. *中国新药杂志*, 2001, 10(5): 325-327.
- [11] Xiao W L, Li R T, Li S H, et al. Lancifodilactone F: A novel nortriterpenoid possessing a unique skeleton from *Schisandra lancifolia* and its anti-HIV activity [J]. *Org Lett*, 2005, 7(7): 1263-1266.
- [12] Xiao W L, Zhu H J, Shen Y H, et al. Lancifodilactone G: A unique nortriterpenoid isolated from *Schisandra lancifolia* and its anti-HIV activity [J]. *Org Lett*, 2005, 7(11): 2145-2148.
- [13] Xiao W L, Tian R R, Pu J X, et al. Triterpenoids from *Schisandra lancifolia* with anti-HIV activities [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 277-279.
- [14] Xiao W L, Huang S X, Zhang L, et al. Nortriterpenoids from *Schisandra lancifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 650-653.
- [15] Foo L Y. Flavanocoumarins and flavanophenylpropanoids from *Phyllocladus trichomanoides* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(9): 2477-2481.
- [16] Spek A L, Kojic-Prodic B, Labadie R P. Structure of (-)-epicatechin: (2R, 3R)-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3, 4-dihydro-2H-1-benzopyran-3, 5, 7-triol, C₁₅H₁₄O₆ [J]. *Acta Crystallogr C*, 1984, C40(12): 2068-2071.
- [17] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4): 1005-1009.
- [18] 郑永康, 黄昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(4): 266-269.
- [19] 沈玲, 赵伟, 方之勋, 等. 双环醇治疗慢性乙型肝炎临床研究 [J]. *世界感染杂志*, 2006, 6(1): 67-69.
- [20] 阮冰, 王军伟, 白雪玲. 双环醇片对乙型肝炎病毒 B、C 基因型感染的疗效比较 [J]. *中华实验和临床病理学杂志*, 2007, 21(4): 366-368.