

苜蓿绿原酸体外抗乙型肝炎病毒的作用研究*

龚红菲, 高 昇, 韦京辰**

(桂林医学院药学院, 广西桂林 5410004)

摘要: 为了考察苜蓿绿原酸对 HepG 2 2.2.15 细胞毒性作用, 以及对其 HBsAg、HBeAg 表达的抑制作用, 本研究提取苜蓿中的绿原酸, 配成 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 、50.00 $\mu\text{g/mL}$ 、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 、12.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 5 个浓度, 作用于 HepG 2 2.2.15 细胞, 在第 3 日、第 6 日和第 9 日分别收集上清液, 四甲基噻唑蓝 (MTT) 法检测药物的细胞毒性; 酶联免疫 (ELISA) 法检测 HBsAg 和 HBeAg 水平。实验结果表明: 苜蓿绿原酸对 HepG 2 2.2.15 细胞无毒性作用, 其对 HBsAg 的表达呈现一定的抑制作用, 且呈时间依赖性和浓度依赖性抑制, 在第 9 日, 最高浓度 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率为 70.12%; 对 HBeAg 的分泌无抑制作用。苜蓿绿原酸无细胞毒性作用, 能明显抑制 HepG 2 2.2.15 细胞 HBsAg 的表达。

关键词: 苜蓿 绿原酸 HepG 2 2.2.15 细胞 HBsAg HBeAg

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)01-0078-05

0 引言

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染仍然是影响人类健康最普遍的问题之一, 全球约有 2.4 亿人长期感染, 每年死亡人数超过 60 万 (世界卫生组织, 2015 年)^[1]。这使得研究新型的抗乙肝病毒药物显得尤其重要。然而, 因为现有的抗乙肝病毒药物包括干扰素- α 和抑制病毒逆转录酶的核苷酸类似物的副作用, 耐药性以及治疗的高成本, 导致许多 HBV 感染的患者尚未接受抗病毒药物治疗^[2-3]。在中国, 几千年来用于医药用途的中药始终是新的抗 HBV 候选物的有力来源^[4]。

近几年, 苜蓿的药用价值引起了越来越多学者

的关注。前人研究已确定苜蓿含有三萜、多酚、黄酮、绿原酸、槲皮素、熊果酸等成分, 其成分被证明具有抗肿瘤作用、抗病毒、抗菌、保肝、降血糖和抗氧化作用^[5]。为此, 笔者对苜蓿叶绿原酸在 HepG 2 2.2.15 细胞中对乙型肝炎病毒 HBsAg 和 HBeAg 抑制作用进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

HepG 2 2.2.15 细胞由北京大学医学院第一附属医院病毒研究所提供, 桂林医学院药理实验室定期用 G418 筛选。

*国家自然科学基金项目 (81560574) 资助。

【作者简介】

龚红菲 (1993—), 女, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤抗病毒药理研究。

【**通信作者】

韦京辰 (1976—), 女, 副教授, 主要从事抗肿瘤抗病毒药理研究, E-mail: 82579354@qq.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190131.004

龚红菲, 高昇, 韦京辰. 苜蓿绿原酸体外抗乙型肝炎病毒的作用研究[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(1): 78-82.

GONG H F, GAO S, WEI J C. Research of anti-hepatitis B virus effects of chlorogenic acid extracted from ramie *in vitro*[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(1): 78-82.

1.1.2 药物与试剂

苕麻绿原酸(武汉大学提供), 替诺福韦(上海源叶), DMEM(Gibco), G418(Gibco), 胰蛋白酶-EDTA消化酶(Solarbio), 胎牛血清(浙江天杭), 青霉素-链霉素混合液(NOVON), PBS(Solarbio), HBsAg, HBeAg试剂盒(上海科华)。

1.1.3 仪器与设备

CO₂培养箱(SANYO), 倒置显微镜(上海蔡康), 超净工作台(天津市尘埃净化设备厂), 酶联免疫检测仪(BioTek), 细胞培养瓶(Corning), 96孔板(Corning)。

1.2 方法

1.2.1 苕麻绿原酸药液的制备与配置

苕麻绿原酸溶于DMSO后加入DMEM培养液混匀, 配制成1 000 μg/mL浓度(使其DMSO浓度为10%)。用含10%DMSO的DMEM培养液按梯度稀释法, 稀释成500.0 μg/mL、250.0 μg/mL、125.0 μg/mL、62.5 μg/mL 4种浓度。

1.2.2 细胞培养

将HepG 2 2.2.15细胞以1×10⁴个/mL接种于96孔板, 置于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h后, 细胞贴壁且状态良好, 去除原有培养基, 加入180 μL完全培养基, 再加入20 μL上述苕麻绿原酸药液(终浓度为100.00 μg/mL、50.00 μg/mL、25.00 μg/mL、12.50 μg/mL、6.25 μg/mL), 每3 d更换相同培养基和药液。同时设置替诺福韦阳性对照组(终浓度为100.00 μg/mL、50.00 μg/mL、25.00 μg/mL、12.50 μg/mL、6.25 μg/mL), 以及无药物的阴性对照组, 收集上清液置-20℃保存待测定。

1.2.3 四甲基噻唑蓝(MTT)法检测细胞毒性

96孔板中每孔加入完全培养基100 μL和MTT 20 μL, 置培养箱培养4 h, 去除上清, 加入DMSO 100 μL, 置摇床轻轻震荡10~15 min, 用酶标仪在490 nm处读取OD值, 根据以下公式计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=(实验组平均OD值/对照组平均OD值)×100%。

1.2.4 酶联免疫(ELISA)法检测HBsAg和HBeAg水平

将第3, 6, 9日的上清液按HBsAg和HBeAg试剂盒说明书操作, 用酶标仪在450 nm读取OD值,

根据以下公式计算HBsAg和HBeAg的抑制率。

抑制率(%)=(对照组平均OD值-实验组平均OD值)÷(对照组平均OD值-空白组平均OD值)×100%。

1.2.5 统计学处理

用SPSS 23.0统计学软件进行分析, OD值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 实验数据采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 对HepG 2 2.2.15细胞毒性

MTT结果显示: 与阴性对照组相比, 苕麻提取的绿原酸及阳性药物替诺福韦在所设浓度范围对HepG 2 2.2.15细胞毒性较低(表1)。

表1 苕麻提取物绿原酸对HepG 2 2.2.15细胞的毒性作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Cytotoxic effects of chlorogenic acid of ramie extracts on HepG 2 2.2.15 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	浓度 Concentration (μg/mL)	吸光度 OD	存活率 Survival(%)
阴性对照 Negative control	—	1.03±0.03	—
替诺福韦 Tenofovir	6.25	0.98±0.06	95.45
	12.50	1.27±0.18	123.39
	25.00	1.19±0.15	115.79
	50.00	1.14±0.11	111.18
	100.00	1.00±0.16	97.92
苕麻绿原酸 Chlorogenic acid of ramie extracts	6.25	1.08±0.17	105.72
	12.50	1.05±0.12	102.14
	25.00	1.14±0.26	110.75
	50.00	1.25±0.07*	121.38
	100.00	0.93±0.15	90.16

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

Note: Compared with the negative control group, * $P < 0.05$

2.2 对HepG 2 2.2.15细胞HBsAg和HBeAg的抑制作用

通过检测HepG 2 2.2.15细胞第3, 6, 9日上清液的HBsAg和HBeAg, 结果显示: 与阴性对照组相比,

苕麻提取物绿原酸对 HepG 2 2.2.15 细胞的 HBsAg 的表达呈现明显的时间依赖性和浓度依赖性抑制, 且在第 9 日达到峰值, 阳性药替诺福韦对 HepG 2 2.2.15 细胞的 HBsAg 的表达抑制率很低。苕麻提取物绿原酸和阳性药物替诺福韦对 HepG 2 2.2.15 细胞的 HBeAg 均无抑制作用(表 2~3)。

表 2 苕麻提取物绿原酸对 HepG 2 2.2.15 细胞 HBsAg 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of chlorogenic acid of ramie extracts on HBsAg expression in HepG 2 2.2.15 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 OD			抑制率 Inhibition (%)		
		3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d
阴性对照 Negative control	—	2.63 \pm 0.26	3.21 \pm 0.30	2.21 \pm 0.20	—	—	—
替诺福韦 Tenofovir	6.25	2.79 \pm 0.74	3.14 \pm 0.17	2.38 \pm 0.32	-6.41	2.12	-7.70
	12.50	2.83 \pm 0.25	3.09 \pm 0.22	2.12 \pm 0.16	-7.78	3.61	3.77
	25.00	2.46 \pm 0.20	2.88 \pm 0.15	1.76 \pm 0.28	6.13	10.23	20.46
	50.00	2.30 \pm 0.48	2.74 \pm 0.23	1.75 \pm 0.15*	12.42	14.43	20.96
	100.00	2.28 \pm 0.20	3.03 \pm 0.36	1.81 \pm 0.34	13.14	5.60	17.98
苕麻绿原酸 Chlorogenic of ramie extracts	6.25	2.89 \pm 0.94	2.70 \pm 0.25	1.73 \pm 0.30	-9.97	15.86	21.47
	12.50	2.18 \pm 0.31	2.43 \pm 0.10*	1.39 \pm 0.08*	16.84	24.30	36.96
	25.00	1.88 \pm 0.16*	2.02 \pm 0.11*	1.11 \pm 0.04*	28.52	37.13	49.55
	50.00	1.70 \pm 0.19*	1.72 \pm 0.18*	1.10 \pm 0.10*	35.07	46.33	50.17
	100.00	1.79 \pm 0.11*	1.36 \pm 0.07*	0.66 \pm 0.09*	31.74	57.57	70.12

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

Note: Compared with the negative control group,* $P < 0.05$

表 3 苕麻提取物绿原酸对 HepG 2 2.2.15 细胞 HBeAg 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of chlorogenic acid of ramie extracts on HBeAg expression in HepG 2 2.2.15 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度 OD			抑制率 Inhibition (%)		
		3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d
阴性对照 Negative control	—	3.69 \pm 0.02	3.70 \pm 0.06	3.73 \pm 0.06	—	—	—
替诺福韦 Tenofovir	6.25	3.64 \pm 0.06	3.72 \pm 0.02	3.67 \pm 0.14	1.17	-0.67	1.66
	12.50	3.72 \pm 0.05	3.65 \pm 0.05	3.80 \pm 0.17	-0.79	1.21	-1.76
	25.00	3.79 \pm 0.13	3.68 \pm 0.04	3.51 \pm 0.42	-2.78	0.50	6.01
	50.00	3.71 \pm 0.07	3.79 \pm 0.04	3.80 \pm 0.08	-0.61	-2.40	-1.93
	100.00	3.66 \pm 0.05	3.73 \pm 0.09	3.68 \pm 0.14	0.63	-0.96	1.36
苕麻绿原酸 Chlorogenic of ramie extracts	6.25	3.67 \pm 0.10	3.65 \pm 0.04	3.81 \pm 0.07	0.48	1.19	-1.97
	12.50	3.60 \pm 0.01*	3.69 \pm 0.09	3.68 \pm 0.18	2.46	0.12	1.35
	25.00	3.60 \pm 0.04*	3.79 \pm 0.02	3.83 \pm 0.11	2.34	-2.40	-2.76
	50.00	3.47 \pm 0.07*	3.73 \pm 0.08	3.76 \pm 0.04	5.79	-0.77	-0.77
	100.00	3.43 \pm 0.07*	3.57 \pm 0.18	3.74 \pm 0.10	7.00	3.41	-0.12

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$

Note: Compared with the negative control group,* $P < 0.05$

3 讨论

HepG 2 2.2.15细胞是由HBV-DNA体外转染人肝癌细胞HepG2后建立的细胞系,经实验室自行传代培养,细胞状态良好,它能长期、稳定分泌大量感染性病毒颗粒HBsAg和HBeAg,是目前各实验室广泛应用于筛选和评价体外抗HBV药物主要的细胞模型^[6-7]。

替诺福韦是一种新型核苷酸类逆转录酶抑制剂,美国FDA于2008年批准其用于治疗成人的慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)。2014年替诺福韦也被我国食品与药品监督管理局批准用于CHB患者的抗病毒治疗。替诺福韦以其前体药物富马酸替诺福韦酯的形式给药,可磷酸化转变为活性代谢产物二磷酸替诺福韦。二磷酸替诺福韦整合入DNA链后可终止DNA链,起到抑制病毒复制的作用^[8-10]。在体外实验中,替诺福韦对HepG 2 2.2.15细胞分泌的HBsAg及HBeAg无明显抑制作用,与文献相符^[11],其通过抑制HBV-DNA的复制来治疗乙型肝炎。

在这项研究中,我们首次证明了苳麻提取物绿原酸在HepG 2 2.2.15细胞中明显抑制HBsAg的分泌,且呈时间依赖性和浓度依赖性。与阳性药物替诺福韦比较,苳麻提取物绿原酸抑制HBsAg效果更明显。苳麻提取物绿原酸对HBeAg无抑制作用。苳麻提取物绿原酸对细胞无毒性作用且抑制HBsAg效果佳,可能成为高效安全的新型抗HBV药物。

参考文献

[1] LIU Y, YAO W, SI L, et al. Chinese herbal extract *Su-duxing* had potent inhibitory effects on both wild-type

and entecavir-resistant hepatitis B virus (HBV) in vitro and effectively suppressed HBV replication in mouse model[J]. *Antiviral Research*, 2018: S0166354217305302.

- [2] GENG C A, HUANG X Y, CHEN X L, et al. Three new anti-HBV active constituents from the traditional Chinese herb of Yin-Chen (*Artemisia scoparia*)[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 176(4): 109-117.
- [3] LAI Y H, SUN C P, HUANG H C, et al. Epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus infection in human liver chimeric mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 248.
- [4] GENG C A, YANG T H, HUANG X Y, et al. Anti-hepatitis B virus effects of the traditional Chinese herb *Artemisia capillaris* and its active enynes[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018.
- [5] WEI J, LIN L, SU X, et al. Anti-hepatitis B virus activity of *Boehmeria nivea* leaf extracts in human HepG2.2.15 cells[J]. *Biomedical Reports*, 2014, 2(1): 147.
- [6] 王盼丽,刘青川,王晨吟,等. 替芬泰对HepG2-2.2.15细胞HBV-DNA的抑制作用[J]. *解放军药理学学报*, 2015(1): 1-3.
- [7] 武谦虎,徐卫东,李伟东,等. 空心莲子草总皂苷对HepG2.2.15细胞系HBsAg和HBeAg表达及HBV-DNA含量的影响[J]. *药学与临床研究*, 2017, 25(5): 381-384.
- [8] 朱浩翔,张继明. 抗HBV药物——替诺福韦[J]. *肝脏*, 2011, 16(2): 145-147.
- [9] 何雅婧,孙剑,侯金林. 抗乙型肝炎病毒治疗新药替诺福韦[J]. *药学与临床研究*, 2011, 19(5): 385-387.
- [10] 苟运浩,俞秀丽,过建春. 认识抑制乙型肝炎病毒更强的口服药——替诺福韦[J]. *肝博士*, 2017(2): 40-42.
- [11] GUO R H, GENG C A, HUANG X Y, et al. Synthesis of hemslecin A derivatives: A new class of hepatitis B virus inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(5): 1201-1205.

Research of Anti-hepatitis B Virus Effects of Chlorogenic Acid Extracted from Ramie *in Vitro*

GONG Hongfei, GAO Sheng, WEI Jingchen

(College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

Abstract: To investigate the cytotoxic effect of chlorogenic acid extracted from ramie on HepG 2 2.2.15 cells and its inhibitory effect on the expression of HBsAg and HBeAg. Chlorogenic acid of ramie was extracted and formulated into different concentration of 100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to act on the HepG 2 2.2.15 cells. Supernatants of the cell cultures were collected on the 3rd, 6th and 9th day. The methyl thiazol tetrazolium (MTT) method was used to evaluate the cytotoxic effects. And ELISA assay was used to test the levels of HBsAg and HBeAg. The results showed that ramie chlorogenic acid had no toxic effect on HepG 2 2.2.15 cells. In ELISA, ramie chlorogenic acid inhibited the expression of HBsAg in a time-dependent and concentration-dependent manner. On the 9th, the inhibition rate was 70.12% at the highest concentration of 100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, it had no inhibitory effect on the secretion of HBeAg. The chlorogenic acid extracted from ramie has no cytotoxic effect and can significantly inhibit the expression of HBsAg in HepG 2 2.2.15 cells.

Key words: ramie, chlorogenic acid, HepG 2 2.2.15 cells, HBsAg, HBeAg

责任编辑:陆 雁

我编辑部编委范航清应邀参加自然资源部广西片区红树林保护修复专题调研

2019年2月25—26日,以自然资源部副部长赵龙为组长,国家林草局副局长彭有冬为副组长的全国红树林保护修复调研组到广西考察。我编辑部编委兼专刊特邀主编、广西红树林研究中心主任范航清研究员作为专家,应邀全程陪同了广西片区的现场考察和座谈。

范航清研究员在考察现场向与会主要领导赠送了我编辑部于2018年8月公开发行的《广西科学》第4期。该期主推栏目为范航清研究员科研团队关于“广西红树林资源及其恢复与利用”的最新研究成果,该栏目在概述广西红树林资源情况、简要回顾广西红树林造林历史和科学研究历程、评估造林成效、总结经验教训的基础上,探讨宜林滩涂潜在规模、红树林生态恢复类型划分理论问题、生态修复成本与收益问题。其详实的研究数据和多年的实践经验总结,为国家相关调研工作提供了具体事例和政策建议,是本次调研决策的重要依据,得到领导的一致好评。



广西北部湾作为中国红树林的重要分布区及典型滨海湿地区域,具有重大的科研价值和区域生态价值,据悉,国家有关部门高度重视湿地保护工作,2018年起将湿地列为一类土地类型,红树林滨海湿地为二类土地类型,这在中国历史上还是第一次。我编辑部自1993年起便与广西红树林研究中心建立合作,邀请范航清研究员等专家学者担任编委和组稿工作,策划了多期红树林与滨海湿地相关的专栏、专刊。编辑部整理了两刊近年来发表的相关研究成果,对广西红树林保护研究成果以及滨海生态保护与研究情况作全面系统的展示,以便相关部门和专家学者浏览索引(详情可到编辑部官网查阅)。

(本刊编辑部)