

杜仲总黄酮体外抗乙肝病毒实验研究

Experimental study of Eucommia ulmoides flavonoids in vitro against hepatitis B virus

周建辉

(南阳医学高等专科学校, 河南 南阳, 473058)

中图分类号: R256.4 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2015) 27-0077-02 证型: IGD

【摘要】目的: 探讨杜仲总黄酮体外抗乙肝病毒的临床疗效。方法: 本文采用传染乙型肝炎病毒患者的人肝癌细胞作为研究对象, 观察杜仲总黄酮外抗乙肝病毒的效果, 为研究和开发杜仲总黄酮外抗乙肝病毒的药效成分提供理论依据。结果: 杜仲总黄酮各剂量组和拉米夫定抑制率均高于空白对照组。杜仲总黄酮各剂量组以及拉米夫定的 OD 值均低于空白对照组; 且杜仲总黄酮以及拉米夫定的抑制率明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 杜仲总黄酮体外具有抗乙型肝炎病毒作用。

【关键词】杜仲总黄酮体; 外抗; 乙肝病毒

【Abstract】 Objective: To investigate the clinical efficacy of anti hepatitis B virus total flavonoids of Eucommia ulmoides in vitro. Methods: This paper by transfection of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma cell as the research object, the effect of anti hepatitis B virus total flavonoids of Eucommia ulmoides was observed in order to provide a theoretical basis for the research. Results: The total flavonoids of Eucommia ulmoides in each dose group and lamivudine inhibition rate was higher than the control group. Eucommia ulmoides flavonoids in each dosage group and lamivudine OD values were lower than the blank control group; and Eucommia ulmoides flavonoids and lamivudine inhibiting rate was significantly higher than that of the control group, the difference is statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion: Eucommia flavonoids in vitro has the function of anti hepatitis B virus.

【Keywords】 Flavonoids of Eucommia ulmoides; In vitro; Hepatitis B virus

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2015.27.038

杜仲属于名贵的中药材, 其中含有多有效药用成分, 包括黄酮类、糖类、木脂类、生物碱等, 其中黄酮类化合物在药用中具有抗病毒、衰老、氧化以及降脂减肥和抗癌防癌等功效^[1]。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒引发的传染性疾病, 严重威胁到人们的生命安全。因此, 本文采用转染乙型肝炎病毒患者的人肝癌细胞作为研究对象, 观察杜仲总黄酮外抗乙肝病毒的效果, 为研究和开发杜仲总黄酮外抗乙肝病毒的药效成分提供理论依据。现将具体研究内容报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用传染乙型肝炎病毒患者的人肝癌细胞作为研究对象。所用到的试剂包括: 乙型肝炎病毒荧光定量试剂盒、DMEM 细胞培养液、乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原试剂盒、胎牛血清、芦丁标准品以及拉米夫定。所应用到的主要仪器包括: 荧光定量 PCR 仪、ELX800 通用酶标仪以及 CO₂ 孵箱。

1.2 一般方法

1.2.1 杜仲总黄酮的提取方法

将杜仲皮研磨成粉状后, 采用乙醇分段提取法对杜仲总黄酮进行提取, 采用醋酸铅胺沉淀过滤, 浓缩后过大孔树脂、聚

酰胺以及硅胶柱, 然后将样品与标准品芦丁进行对照, 测得杜仲中总黄酮的含量为 69.0%。

1.2.2 杜仲总黄酮的毒性实验

取对数处于生长期的 HepG2.2.15 细胞, 采用细胞培养液将细胞浓度调整为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 然后将细胞接种于 96 孔板中, 每孔为 200 μL , 若其贴壁后, 丢弃原培养液。最后在各孔加入总黄酮, 浓度分别为 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 以及 200 $\mu\text{g/mL}$ 培养液 200 μL , 并将不加药细胞培养孔作为对照组, 重复 6 孔/组。将各组细胞置于 CO₂ 孵箱培养 72 h, 用 MTT 法测定各组细胞在 490 nm 处的 OD 值。并计算不同浓度杜仲总黄酮对 HepG 2.2.15 细胞生长抑制率。

1.2.3 杜仲总黄酮对 HBV-DNA 的作用

按照上述杜仲总黄酮的毒性实验方法加入不同浓度的杜仲总黄酮药液, 并将药物浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的拉米夫定作为阳性对照, 重复 3 孔/组。并将其放置在 CO₂ 孵箱培养 72 h 后, 提取 HBV-DNA, 并测定 HBV-DNA 拷贝数和抑制率。

1.2.4 测量乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原含量

按照上述杜仲总黄酮的毒性实验方法加入不同浓度的杜仲总黄酮药液, 并设置空白对照组, 对每组细胞培养的上清液进行测量, 并计算抑制率。

1.3 统计学方法

应用统计学软件 SPSS19.0 对相关数据进行分析 and 处理, 计数资料采取 (%) 表示, 对比采取 χ^2 检验; 计量资料采取 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较进行 t 检验; 对比以 $P < 0.05$ 为有显著性差异和统计学意义。

2 结果

2.1 杜仲总黄酮的毒性实验结果

杜仲总黄酮各剂量组的 OD 值分别为低于空白对照组; 且杜仲总黄酮 50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 剂量组的抑制率分别为 13.0%、16.6% 以及 26.1%, 明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如表 1 所示。

表 1 杜仲总黄酮的毒性实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD 值	抑制率 (%)
杜仲总黄酮组	25	1.16 $\pm$ 0.08	2.22
	50	1.04 $\pm$ 0.17	13.01
	100	0.99 $\pm$ 0.06	16.62
	200	0.88 $\pm$ 0.07	26.13
对照组	0	1.19 $\pm$ 0.10	0.00

2.2 杜仲总黄酮对 HBV-DNA 的影响

杜仲总黄酮各剂量组抑制率分别为 32.0%、40.3%、50.1% 以及 34.1%, 拉米夫定抑制率为 45.2%; 这表明杜仲总黄酮各剂量以及拉米夫定对 HBV-DNA 的复制均有抑制作用, 两者与空白对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如表 2 所示。

表 2 杜仲总黄酮对 HBV-DNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	抑制率 (%)
杜仲总黄酮组	25	32.0
	50	40.3
	100	50.1
	200	34.1
拉米夫定组	50	45.2
对照组	0	0.0

2.3 杜仲总黄酮对乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原含量影响

杜仲总黄酮各剂量组及拉米夫定的 OD 值均低于空白对照组; 且杜仲总黄酮剂量组及拉米夫定的抑制率明显高于对照组。这说明杜仲总黄酮对乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原的分泌均有抑制作用, 且与空白对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。如表 3 所示。

表 3 杜仲总黄酮对乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原含量影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD 值	抑制率 (%)
杜仲总黄酮组	25	0.50 $\pm$ 0.04	26.7
	50	0.52 $\pm$ 0.06	22.7
	100	0.48 $\pm$ 0.05	29.0
	200	0.45 $\pm$ 0.01	23.1
拉米夫定	50	0.43 $\pm$ 0.02	36.0
对照组	0	0.64 $\pm$ 0.03	0.0

3 讨论

杜仲中主要的活性成分为黄酮类化合物, 黄酮类化合物具有高度的抗氧化、肿瘤、病毒及骨质疏松功效, 并能起到调节血脂、增强免疫力等作用^[2]。目前我国对杜仲黄酮抗乙型肝炎病毒的相关研究报道较少^[3,4]。

本文中对传染乙型肝炎病毒作为研究对象, 分析研究杜仲总黄酮对 HBV-DNA 及乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原含量影响。结果表明不同浓度的杜仲总黄酮及拉米夫定均对 HBV-DNA 复制有较强的抑制作用, 并且不同浓度的黄酮、拉米夫定均对乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原的有抑制作用, 其中对乙型肝炎病毒 DNA 的复制抑制作用强于对乙型肝炎 e 抗原和乙型肝炎表面抗原的作用, 这表明杜仲总黄酮抗乙型肝炎病毒的机制可能与抑制病毒 DNA 复制有关。研究结果表明, 杜仲总黄酮体外具有抗乙型肝炎病毒作用, 但其抗病毒机制还有待进一步研究。

综上所述, 杜仲总黄酮体外具有抗乙型肝炎病毒作用。

参考文献:

- [1] 余晓, 罗果. 杜仲总黄酮体外抗乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 现代医药卫生, 2015, 26(2): 187-188, 191.
- [2] 仇豪文, 沈晖, 曾里, 等. 杜仲叶中总黄酮检测方法的改进研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 96-100.
- [3] 李三华, 何志全, 陈全利, 等. 杜仲总黄酮对成骨细胞增殖及 I 型胶原蛋白表达的影响[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(4): 272-274.
- [4] 李三华, 陈全利, 何志全, 等. 杜仲总黄酮对大鼠成骨细胞护骨素表达的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(25): 15279-15280, 15282.

编辑: 赵聪 编号: EB-15081204F (修回: 2015-09-02)

相似文献:

双探针 FQ-PCR 法与基因测序法联合检测乙肝病毒耐药基因

目的: 建立一种检测乙型肝炎病毒耐药基因的方法。方法: 采用双探针实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对 46 例 HBV-DNA 阳性的标本进行 YMDD 变异株的检测, 对阳性结果进行基因测序。结果: 双探针 FQ-PCR 法检测出 YMDD 变异株 18 例, 占 36.96%, 18 例阳性标本中拉米夫定耐药株 17 例、阿德福韦

耐药株 6 例、替比夫定耐药株 8 例、恩替卡韦耐药株 2 例。结论: 本法既有 FQ-PCR 简便、快速、灵敏、经济的特点, 又有测序法对基因突变的明确性, 为临床用药提供及时、准确的指导。

作者: 陈莹 袁建芬 喻海忠 张小洁 肖春红

刊名: 中医临床研究 2014 年 21 期 91-93