

二黄乙肝片影响 2215 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的实验研究

□ 王春玲 邓家刚 (广西中医学院 广西 南宁 530001)

摘 要 目的: 观察二黄乙肝片的体外抗乙肝病毒作用。方法: 采用 2215 细胞为模型, 应用 MTT 法进行细胞毒性实验, 在无毒浓度下检测二黄乙肝片对细胞培养上清液中乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 的抑制作用。结果: 二黄乙肝片最大无毒浓度 (TC₀) 为 1375 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 半数有效浓度 (IC₅₀) 小于 171.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对 2215 细胞分泌的 HBsAg 抑制率为 29.85%, 对 2215 细胞分泌的 HBeAg 抑制率为 89.99%。二黄乙肝片对 HBeAg 有较强的抑制作用, 治疗指数为 20.55。结论: 二黄乙肝片对 HBeAg 和 HBsAg 分泌的抑制作用乙型提示其在体外具有抗乙型肝炎病毒的作用。

关键词 二黄乙肝片 2215 细胞 乙型肝炎表面抗原 乙型肝炎 e 抗原

二黄乙肝片主要由黄根、黄芪等四味药材组成, 具有清热解暑, 益气护肝等功效, 为了解该药的体外抗乙型肝炎病毒的作用, 笔者进行了该药影响 2215 细胞分泌 HBeAg 和 HBsAg 的实验研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 药物 二黄乙肝片由广西中医学院药学院制剂中心提供, 4℃ 冰箱保存, 实验时稀释至所需浓度。

1.2 2215 细胞 HBV-DNA 克隆转染人肝癌细胞的 2215 细胞系 (购自中国医学科学院中国医药生物技术研究所)。

1.3 试剂 Eagles MEM 干粉 (美国 Gibco 公司产品); G418, L-谷氨酰胺 (北科化学试剂公司进口

分装); 胎牛血清 (美国 Hyclone Lab 公司产品); HBsAg, HBeAg 检测试剂盒 (厦门新创科技有限公司); 卡那霉素 (Sigma 分装)。细胞用 MEM 培养, 培养液中含 10% 胎牛血清、0.03% 谷氨酰胺、G418 380 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、卡那霉素 50U/ml, 调 pH 至 7.2。细胞消化液含 0.25% 胰蛋白酶, 用 D-Hangs 配制。

1.4 器材 培养瓶 (丹麦 Tuncion 公司产品); 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司产品); 二氧化碳培养箱 (美国 Shel-lab 产品)。

1.5 细胞毒性检测 用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT 法)^[1] 检测药物的细胞毒性。具体方法是: 向吸去上清的细胞孔中加入含 5mg/ml 的 MTT 的无血清培养液 0.1 ml/孔, 37℃ 孵育 4 h, 去上清, 用

二甲基亚砷溶解，于550nm波长下测OD值，破坏率(%) = (OD_{细胞组} - OD_{给药组}) / (OD_{细胞组} - OD_{空白组}) × 100%。半数有度浓度(TC50)是给药孔存活细胞为对照孔50%的药物浓度。

1.6 HBsAg、HBeAg的检测 药物对抗原的抑制率(%) = (OD_{细胞组} - OD_{给药组}) / (OD_{细胞组} - OD_{空白组}) × 100%，(OD为450nm下用酶标仪检测到的光密度)，用t检验进行统计学分析。50%抑制浓度(IC50)为HBsAg或HBeAg在抑制率为50%时的药物浓度。治疗指数SI = TC50/IC50。

1.7 细胞培养法 消化2215细胞，配成1×10⁵个/ml接种于96孔细胞培养板，每孔0.1ml，在37℃，5%的二氧化碳培养箱中培养48小时后细胞长成单层

进行实验，将含各浓度药物的培养液加入到96孔板，每浓度四孔，第四天更换含同浓度的培养液，同时设无药物细胞对照组和培养液空白对照组各4孔，收集第八天细胞培养上清液进行检测。

2 实验结果

本实验通过MTT法测定药物的细胞毒性浓度，选2215细胞分泌的HBsAg、HBeAg作为筛选药物效果的指标，并计算相应的治疗指数来评价药物的临床应用前景，治疗指数(SI) ≥ 2，有效低毒；1 < SI < 2，低效低毒；SI < 1，有毒性作用，不适合作抗病毒药物。

2.1 二黄乙肝片对2215细胞的毒性作用，结果见表1

表1 二黄乙肝片对2215细胞的毒性

药物浓度	44000	22000	11000	5500	2750	1375	687.5	343.75	171.88	85.94(μg/ml)
破坏率%	98.18	99.26	102.15	87.64	28.76	11.36	0	0	0	0
TC50	3531.28									

结果表明，二黄乙肝片对2215细胞的毒性TC₀为687.5 μg/ml，TC50为3531.28 μg/ml。

表2 二黄乙肝片对2215细胞分泌HBeAg、HBsAg的抑制作用 (n=4, $\bar{X} \pm s$)

组别	浓度(μg/ml)	HBeAg		IC50	SI	HBsAg		IC50	SI
		OD值($\bar{X} \pm s$)	抑制率(%)			OD值($\bar{X} \pm s$)	抑制率(%)		
二黄乙肝片	1375	0.34 ± 0.03	89.99	< 171.88	20.55	2.66 ± 0.49	29.85	-	-
	687.5	0.51 ± 0.06	81.13			3.45 ± 0.15	8.04		
	343.75	0.75 ± 0.02	69.38			3.60 ± 0.07	4.00		
	171.88	0.88 ± 0.10	62.80			3.67 ± 0.12	2.08		
细胞对照		2.13 ± 0.22				3.74 ± 0.01			
空白		0.143				0.113			

与细胞对照组比较，P < 0.05

表2结果显示，二黄乙肝片在无毒浓度下对HBeAg、HBsAg的分泌均有抑制作用，对HBeAg的抑制作用强，但对HBsAg的抑制作用比较弱。二黄乙肝片在171.88 μg/ml时对HBeAg的抑制率为62.80%，因此二黄乙肝片抑制2215细胞分泌HBeAg的IC50小于171.88 μg/ml，治疗指数为20.55，远远大于2，说明二黄乙肝片对HBeAg的分泌有抑制作用且毒性低。

3 小结

2215细胞系是目前国内外公认和常用的体外评价抗HBV药物的细胞模型，在体外能稳定、持续分泌HBsAg、HBeAg^[2]。本实验通过MTT法筛选出二黄乙

肝片的无毒浓度，并在无毒浓度下检测各浓度对HBeAg、HBsAg的抑制作用，结果发现二黄乙肝片在无毒浓度下对HBeAg、HBsAg均有抑制作用，并呈明显的量效关系。二黄乙肝片的最大无毒浓度为1375 μg/ml，在最大无毒浓度时对2215细胞分泌的HBeAg、HBsAg的抑制率分别为89.99%，29.85%，对2215细胞分泌的HBsAg治疗指数为20.55，对HBV有抑制作用且毒性低，为进一步研究抗HBV提供依据。

参考文献

[1] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养. 北京：世界图书出版社，2001，182.
[2] 张丰学，汪晓军，刘妮，等. 黄芩对HBsAg和HBeAg的体外抑制作用. 中西医结合肝病杂志，2003，13(5)：267-269.