

文章编号:1009-038X(2004)02-0098-03

苦参灵芝发酵液在 2.2.15 细胞中抗 HBV 作用

李雁群¹, 张莲芬¹, 张志斌², 金 坚¹, 章克昌¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡市中医院, 江苏 无锡 214001)

摘 要: 比较苦参的灵芝发酵液和苦参与灵芝发酵液的混合液体外抗乙肝病毒(HBV)的效果. 用 HBV DNA 转染的 2.2.15 细胞作为模型, 放射免疫法测定 2 种药物作用后细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 量, 计算其对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的抑制率, 用 MTT 法检测细胞毒性. 结果表明: 剂量在 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 均能不同程度地减少细胞培养上清液中的 HBsAg 和 HBeAg 量, 发酵液细胞的毒作用不明显, 而混合液具有一定的细胞毒作用. 结果显示发酵液具有一定的体外抗 HBV 作用.

关键词: 苦参; 灵芝; 发酵; 抗乙肝病毒; 中药

中图分类号: R 2

文献标识码: A

The Inhibitory Effects of Fermentation Broth of *Ganoderma lucidum* in the 2.2.15 Cell with Addition of *Radix Sophorae Flavescentis* on HBV

LI Yan-qun¹, ZHANG Lian-fen¹, ZHANG Zhi-bin², JIN Jian¹, ZHANG Ke-chang¹

(1. Biotechnology School of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Wuxi Hospital of Chinese Traditional Medicine, Wuxi 214001, China)

Abstract: A human hepatoma cell line, 2.2.15 cell, transfected with cloned HBV DNA, was used as a model to evaluate the inhibitory effects on HBV of the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* with *Radix Sophorae Flavescentis*, a traditional Chinese medicine, as a medium component. At the same time, a mixture of the aqueous extract of *Radix Sophorae Flavescentis* and the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* cultured in the basic medium without addition of *Radix Sophorae Flavescentis*, was also prepared and its inhibitory effects on HBV were compared with the model. The contents of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and core-related antigen (HBeAg) in the cell culture medium were measured with radioimmunoassay. The cytotoxic effects on 2.2.15 cell were evaluated with MTT assay. The results showed that both methods reduced the contents of HbsAg and HBeAg in the cell culture medium, when adding dosage of the fermentation broth or the mixture ranging from 12.5 $\mu\text{g/mL}$ to 200 $\mu\text{g/mL}$. The results also showed that the fermentation broth only had slight cytotoxic effects on the cell, while the mixture had stronger cytotoxic effects on the cell. The results indicated that the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* with *Radix Sophorae Flavescentis* addition had an inhibitory effect on HBV in vitro.

Key words: fermentation; Chinese traditional medicine; HBV; *Ganoderma lucidum*; *Radix*

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-09-18.

作者简介: 李雁群(1963-), 男, 江西崇义人, 副教授, 发酵工程博士研究生.
万方数据

Sophorae Flavescentsis

近年的研究表明,一些清热解毒类中药有很好的抗病毒作用.苦参具有抗菌、抗病毒作用,还有保肝护肝的作用^[1],是治疗乙肝病中药类的常见药.灵芝是一味补益性的中药,研究表明,灵芝中的多糖具有调节人体免疫的作用,能增强机体的抗病能力,因此在抗肿瘤、抗病毒方面都有作用^[2~4].灵芝酸是灵芝中的另一类活性成分,有研究表明,灵芝酸具有抗 HIV 的作用^[5].灵芝与清热解毒药物组方,具有扶正祛邪的功效.作者把苦参的水煎汁与培养基混合,用灵芝发酵,以 HBV DNA 转染的 2.2.15 细胞株作为模型^[6],对发酵产物的体外抗 HBV 作用进行了研究,探索苦参在经过灵芝发酵处理后的药效作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦参 植物苦参(*Sophora flavescens*)的干燥根;无锡山禾药业集团提供.苦参用水煎汁后,添加适当的营养培养基,接种灵芝发酵^[7].发酵完成后离心发酵液,取上清液作为苦参灵芝发酵液,用于做体外抗 HBV 效果观察.同时,取等剂量的苦参煎汁,与不含中药发酵完成的灵芝发酵液混合,形成混合液,与上述苦参发酵液做比较实验.

1.1.2 2.2.15 细胞 克隆的 HBV DNA 转染的 Hep-G₂ 细胞^[8];由解放军 302 医院病毒室惠赠.

细胞培养基:1640 干粉、胎牛血清、G418(Geneticin)、MTT;均由美国 GibCo 公司生产;HBsAg 固相放射免疫试剂盒:中国原子能研究院同位素所原博公司产品;HBeAg 固相放射免疫试剂盒:北京北方生物技术研究所以生产;INFα 2b:安徽安科生物工程股份有限公司生产.

1.1.3 培养瓶及 96 孔培养板 美国 Corning 公司产品;γ-计数器:GC911 型,科大创新股份有限公司中佳分公司产品;酶标仪:3022A 型东方电子仪器厂生产.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 2.2.15 细胞悬液接种于 96 孔板,细胞数为 6.5×10^3 /孔,加培养液 0.15 mL,培养液中含体积分数 10%胎牛血清、200 μg/mL G418、100 μg/mL 链霉素、100 IU/mL 青霉素,置体积分数 5%二氧化碳培养箱 37 ℃培养.60 h 后换含药培养液,培养液中胎牛血清体积分数降低为

2%,G418 增加到 380 μg/mL.用干扰素做阳性药物对照.培养 4 d 换一次培养液,培养第 8 天取出培养孔中的上清液,2 次取出的上清液进行 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 检测.板中细胞用 MTT 法测细胞活性.药物浓度分 5 级,12 个平行,重复 3 次.

1.2.2 HBsAg、HBeAg 测定 采用固相放射免疫分析法(RIA).

1.2.3 药物的细胞毒性测定 培养 8 d 后,吸出各孔上清液用于 RIA 检测.每孔加质量浓度为 0.5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液 100 μL,37 ℃培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,振荡 10 min,置酶标仪下 490 nm 测定 A 值,与空白对照孔 A 值比较,以空白对照孔的细胞存活率为 100%,计算各孔存活细胞百分比.

1.2.4 药物抗 HBV 效果的评价 药物对 HBsAg (或 HBeAg)的抑制率计算:

抑制率 = [实验孔 HBsAg (或 HBeAg) - 对照孔 HBsAg (或 HBeAg)] ÷ [对照孔 HBsAg (或 HBeAg) - 2.1]

2 结果与讨论

2.1 阳性对照药物干扰素的抗 HBV 作用

实验用 5 个用量的 IFNα2b 作用于 2.2.15 细胞,结果见表 1.结果显示,随着用量增加,对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率也增加,但在剂量低于 5.0×10^4 IU/mL 时未观察到细胞毒性作用,在剂量为 10×10^4 IU/mL 时观察到细胞存活率略有下降^[9].

表 1 IFNα2b 体外抗 HBV 效果

Tab. 1 The anti-HBV effects of IFNα2b in vitro

药物用量/ 10 ⁴ IU/mL	HBsAg 抑制 率/%	HBeAg 抑制 率/%	细胞 存活率/%
0.625	0	0	100
1.25	5.3	6.8	100
2.5	13.6	15.6	100
5.0	25.7	23.7	100
10	39.9	33.4	93.25

2.2 苦参灵芝发酵液的抗 HBV 作用

苦参灵芝发酵液在 2.2.15 细胞模型上的抗

HBV 的作用结果见表 2。从表 2 的结果可见,苦参的灵芝发酵液对 HBsAg 和 HBeAg 的一定的抑制作用,并且随着质量浓度的增大,抑制率相应增大,说明具有剂量相关性。苦参灵芝发酵液对细胞活性的影响不明显,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量以下时未显示出细胞毒性,在这个剂量以上对细胞的存活率具有一定的降低作用。

表 2 苦参灵芝发酵液体外抗 HBV 的效果比较
Tab. 2 The anti-HBV effects *in vitro* of the fermentation broth of *G. lucidum* with addition of *Radix Sophorae Flavescentis*

药物	药物质量 浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	HBsAg 抑 制率/%	HBeAg 抑 制率/%	细胞 存活率/%
苦参灵芝 发酵液	12.5	34.4	49.5	100
	25	77.15	57.8	100
	50	77.8	63.9	100
	100	82.2	67.6	100
	200	96.3	72.1	78.1
苦参灵芝 混合液	12.5	60.2	52.9	100
	25	75.6	61.4	96.6
	50	93.1	72.9	78.8
	100	99.0	73.8	57.2
	200	99.4	76.8	35.8

比较苦参灵芝发酵液与苦参灵芝混合液的结果可以看出,混合液的抑制率比发酵液的略高,同时发酵液和混合液在细胞存活率上具有明显差异,发酵液在试验剂量范围内未见明显细胞毒作用,但是混合液在同样的剂量范围内却具有较为明显的

参考文献:

[1] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994.
[2] 张群豪,林志彬. 灵芝多糖(GL-B)对肿瘤坏死因子 α 和 γ 干扰素产生及其 mRNA 表达的影响[J]. 北京医科大学学报, 1999,31(2):179-183.
[3] 李明春,雷林生,梁东升,等. 灵芝多糖对小鼠巨噬细胞白介素 1α 和肿瘤坏死因子 α mRNA 表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2000,14(3):237-240.
[4] Eo S K. Antihepatic activities of various protein bound polysaccharides isolated from ganoderma lucidium[J]. J Ethno-pharmacol,1999, 68(1-3): 175-181.
[5] Min BS, Nakamura N, Miyashio H, *et al.* Triterpenes from the spores of ganoderma lucidum and their inhibitory activity against HIV-1 protease [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 6(10):1607-1612.
[6] 米抒,傅希贤,张国庆,等. 用 2.2.15 细胞株筛选抗乙型肝炎病毒药物的研究[J]. 中华医学杂志,1992, 72(10):612-615.
[7] 李雁群,章克昌. 十二味中药对灵芝菌液体培养的影响[J]. 食品与发酵工业,2003,(3):38-40.
[8] Sells MA. 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.
[9] Lampertico P, Malter JS, Gerber MA. Development and application of an *in vitro* model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics[J]. Hepatology, 1991, 13(3): 422-426.

细胞毒作用. 由于混合液具有比较明显的细胞毒作用,混合液得到较高的抑制率是抗 HBV 作用较高还是细胞活性的降低导致 HBsAg 和 HBeAg 表达降低,有待进一步研究.

3 结 论

1987 年 Sells 等^[8]用共转染法将克隆的 HBV DNA 及抗 G418 质粒转入人肝癌细胞株 HepG2 建立了 2.2.15 细胞株,该细胞株能长期稳定地向培养上清液中分泌 HBsAg、HBeAg 和完整的 Dane 颗粒,而且还能产生大量的病毒复制中间体,是体外抗 HBV 药物筛选很好的细胞模型. 国内外应用该系统对多种抗 HBV 药物进行了体外抗 HBV 的药效学研究.

苦参和灵芝是治疗慢性乙肝中药的常用药,作者将苦参的水煎汁接种灵芝发酵是一种新的制药方法,这将可能增强或降低苦参和灵芝的药效. 作者采用 2.2.15 细胞抑制试验初步评价了苦参水煎汁灵芝发酵液的药效学价值. 作者观察到苦参的灵芝发酵液能减少 2.2.15 细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量,这个结果显示苦参灵芝发酵液可能具有抗 HBV 的作用. 试验还表明,苦参经过灵芝发酵以后,没有明显改变其抗 HBV 的药效作用,相反还降低了毒性. 试验没有测定细胞培养上清液中以及细胞浆内是否存在 HBV DNA 或是否减少其含量,所以对药物是否影响了 HBV DNA 的复制不能下结论. 对于药物是在 HBsAg 和 HBeAg 表达和分泌的那个环节上产生抑制作用,也需要进一步研究.