

# 六棱菊提取物体外抗乙型肝炎的作用

沈钰明, 戴灵豪, 伍义行, 俞晓平, 张永勇, 赵昱

沈钰明, 戴灵豪, 伍义行, 俞晓平, 张永勇, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室 中国计量学院生命科学院药理学系 浙江省杭州市 310018

赵昱, 浙江大学药学院 浙江省杭州市 310053

沈钰明, 主要从事肝脏药理的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30701049

作者贡献分布: 本论文由伍义行设计与撰写; 研究过程具体操作由沈钰明、戴灵豪及张永勇完成; 俞晓平与赵昱提供技术指导 and 平台支持。

通讯作者: 伍义行, 教授, 医学博士, 310018, 浙江省杭州市下沙高教园区学源街258号, 中国计量学院生命科学院药理学系。yihangwu@126.com

电话: 0571-86835702 传真: 0571-86914449

收稿日期: 2014-03-13 修回日期: 2014-04-14

接受日期: 2014-04-24 在线出版日期: 2014-06-18

## Effect of *Laggera alata* extract against hepatitis B virus infection *in vitro*

Yu-Ming Shen, Ling-Hao Dai, Yi-Hang Wu, Xiao-Ping Yu, Yong-Yong Zhang, Yu Zhao

Yu-Ming Shen, Ling-Hao Dai, Yi-Hang Wu, Xiao-Ping Yu, Yong-Yong Zhang, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, Jiliang University of China, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China  
Yu Zhao, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30701049

Correspondence to: Yi-Hang Wu, Professor, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, Jiliang University of China, 258 Xueyuan Street, Xiasha Higher Education Zone, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China. yihangwu@126.com

Received: 2014-03-13 Revised: 2014-04-14

Accepted: 2014-04-24 Published online: 2014-06-18

## Abstract

**AIM:** To assess the effect of *Laggera alata* (*L. alata*) extract against hepatitis B virus (HBV) infection *in vitro*.

**METHODS:** Effect of *L. alata* extract against HBV infection was studied using the D-galactosamine (D-GalN)-induced HL-7702 hepatocyte damage model and HBV-transfected HepG2.2.15 cells. Cytotoxicity induced by *L. alata* extract and hepatocyte viability were detected using MTT

assay. The levels of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B e antigen (HBeAg) were determined by enzyme immunoassay. HBV DNA level was measured by quantitative fluorescence PCR.

**RESULTS:** Hepatocyteprotective assay using the D-GalN-induced hepatocyte damage model indicated that *L. alata* extract markedly improved HL-7702 hepatocyte viability at 25-100 µg/mL and produced a maximum protection of 45.66% at 100 µg/mL. HBsAg and HBeAg levels were assayed after hepG2.2.15 cells were incubated with *L. alata* extract for 3 d. The results showed that *L. alata* extract significantly inhibited HBsAg expression at 10-100 µg/mL and produced a maximum inhibition of 45.92% at 100 µg/mL, while it markedly repressed the expression rate of HBeAg by 50.5% at 100 µg/mL. In addition, HBsAg, HBeAg and HBV DNA levels were measured after the cells were treated with *L. alata* extract for 6 d. At 10-100 µg/mL and 25-100 µg/mL, *L. alata* extract significantly inhibited the expression of HBsAg and HBeAg, respectively. At 100 µg/mL, *L. alata* extract inhibited the expression rates of HBsAg and HBeAg by 84.31% and 88.45%, respectively. In addition, *L. alata* extract showed significant inhibition on HBV DNA replication at 100 µg/mL.

**CONCLUSION:** *L. alata* extract have potent anti-HBV and hepatocyteprotective effects *in vitro*. The anti-hepatitis B effect of *L. alata* extract is likely based on their active components dicaffeoylquinic acids.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** *L. alata* extract; Hepatitis B; Hepatocyte protective; Antiviral effect

Shen YM, Dai LH, Wu YH, Yu XP, Zhang YY, Zhao Y. Effect of *Laggera alata* extract against hepatitis B virus infection *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(17): 2421-2426 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2421.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i17.2421>

## ■背景资料

慢性乙型肝炎危害严重, 至今尚无根治的药物和手段。六棱菊作为治疗炎症性疾病的良药, 在民间和中医实践中应用广泛, 开展其现代化研究具有重要的意义。

## ■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

## ■研发前沿

深入开展中药现代化研究是抗肝炎创新药物研制的重要途径之一,而在六棱菊的现代化学研究中,尚未见其提取物直接抗HBV作用的报道。

## 摘要

**目的:**探讨六棱菊(*Laggera alata*, *L. alata*)提取物对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染影响。

**方法:**采用D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)致人源HL-7702肝细胞损伤模型,研究六棱菊提取物对类似乙型肝炎引起的肝细胞损伤的影响;采用HBV基因转染的HepG2.2.15细胞模型,评价六棱菊提取物的体外抗HBV作用。通过MTT法检测细胞毒性和细胞活力;通过ELISA和荧光定量PCR法分别检测乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)/乙型肝炎e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)和HBV DNA水平。

**结果:**六棱菊提取物在25-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度时,对D-GalN致肝细胞损伤均具有显著保护作用,而在100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度时展示了其最高保护率为45.66%。六棱菊提取物作用HepG2.2.15细胞3 d,在10-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对HBsAg有显著抑制作用,其最高抑制率为45.92%;在100  $\mu\text{g/mL}$ 下能显著抑制HBeAg分泌,其抑制率为50.5%。六棱菊提取物作用HepG2.2.15细胞6 d,在10-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对HBsAg有显著抑制作用,其最高抑制率为84.31%;在25-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度下能显著抑制HBeAg分泌,最高抑制率为88.45%;同时,在100  $\mu\text{g/mL}$ 时对HBV DNA复制有显著抑制作用。

**结论:**六棱菊提取物具有较强的体外抗肝细胞损伤作用和抗HBV作用,其抗乙型肝炎作用可能与所含咖啡酰奎宁酸类活性成分有关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:**六棱菊提取物;乙型肝炎;抗肝细胞损伤作用;抗病毒作用

**核心提示:**六棱菊提取物具有较强的体外抗肝细胞损伤作用和抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)作用,其抗乙型肝炎作用可能与所含咖啡酰奎宁酸类活性成分有关。

沈钰明,戴灵豪,伍义行,俞晓平,张永勇,赵昱.六棱菊提取物体外抗乙型肝炎的作用.世界华人消化杂志 2014; 22(17): 2421-2426  
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2421.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i17.2421>

## 0 引言

药用植物六棱菊(*Laggera alata*, *L. alata*)具有清热

解毒、抗菌消炎等功效,长期广泛应用于民间和中医实践中,疗效甚著<sup>[1]</sup>。以“六棱菊”为主要成分的复方制剂在临床上治疗感冒、扁桃体炎、腮腺炎、急性呼吸道感染等取得了显著疗效,具有重要的研发价值。近年来六棱菊属植物研究备受关注,有关该植物化学成分研究已有报道<sup>[2-7]</sup>。在前期对六棱菊药效部位及其抗炎药理作用进行深入研究的基础上<sup>[8-11]</sup>,本文进一步采用D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)致人源HL-7702肝细胞损伤模型和乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因转染的HepG2.2.15细胞模型研究了六棱菊提取物的体外抗乙型肝炎作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 水飞蓟宾(陕西森弗生物技术有限公司产品); D-GalN(武汉祥和精细化工有限公司产品); 拉米夫定(武汉远城医药有限公司); RPMI 1640培养基、DMEM培养基和胎牛血清(美国GIBCO产品); 乙型肝炎e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)、乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)ELISA检测试剂盒和PCR HBV DNA荧光定量试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司); G418(美国Sigma-Aldrich公司产品); 胰酶, MTT(上海生工生物工程技术服务有限公司); 正常人源HL-7702肝细胞株(购自中科院上海细胞库); 转染HBV基因细胞株HepG2.2.15细胞(浙江大学医学院附属第一医院提供)。

### 1.2 方法

**1.2.1 六棱菊提取物的制备:**按本课题组前期报道的方法制备<sup>[10]</sup>,六棱菊提取物的总酚含量为56.5 g GAE/100 g提取物;其主要成分二咖啡酰奎宁酸类化合物的含量为53.0%。

**1.2.2 HL-7702肝细胞和HepG2.2.15细胞的培养:**正常人源HL-7702肝细胞采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,置于含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,37 °C下进行培养。转染HBV基因的HepG2.2.15细胞采用含10%胎牛血清和280  $\mu\text{g/mL}$  G418的DMEM培养液,置于含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,37 °C下进行培养。

**1.2.3 对HL-7702肝细胞正常生长的影响:**以MTT法测定样品对HL-7702肝细胞生长的影响。将HL-7702肝细胞用胰蛋白酶-EDTA消化并稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ,接种200  $\mu\text{L}$ 于96孔板中培养。待细胞贴壁后弃去培养基,加入200  $\mu\text{L}$ 用培养基稀

表 1 六棱菊提取物对HL-7702肝细胞的毒性作用 (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ )

分组	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{570}$ 值	细胞存活率(%)
溶剂	—	$1.299 \pm 0.051$	100.00
水飞蓟素	100	$1.256 \pm 0.072$	96.69
	50	$1.271 \pm 0.054$	97.84
	25	$1.282 \pm 0.052$	98.69
	10	$1.289 \pm 0.045$	99.23
	1	$1.295 \pm 0.063$	99.69
六棱菊 提取物	100	$1.275 \pm 0.055$	98.15
	50	$1.287 \pm 0.038$	99.08
	25	$1.291 \pm 0.053$	99.38
	10	$1.297 \pm 0.062$	99.85
	1	$1.298 \pm 0.049$	99.92

表 2 六棱菊提取物对HepG2.2.15细胞的毒性作用 (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ )

分组	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$A_{570}$ 值	细胞存活率(%)
溶剂	—	$0.944 \pm 0.047$	100.00
拉米夫定	100	$0.921 \pm 0.099$	97.56
	50	$0.925 \pm 0.089$	97.99
	25	$0.934 \pm 0.101$	98.94
	10	$0.939 \pm 0.087$	99.47
	1	$0.942 \pm 0.078$	99.79
六棱菊 提取物	100	$0.931 \pm 0.075$	98.62
	50	$0.933 \pm 0.097$	98.83
	25	$0.940 \pm 0.091$	99.58
	10	$0.941 \pm 0.088$	99.68
	1	$0.944 \pm 0.071$	100.00

## ■ 相关报道

本课题组系统研究了六棱菊治疗肝炎的潜力, 已发表了多篇有关其抗炎和保肝作用的论文, 其他课题组只报道过该植物化学成分研究。

释成不同浓度的样品, 每个浓度设4个平行, 同时设溶剂对照。继续培养48 h后弃掉培养基, 每孔分别加入200  $\mu\text{L}$  PBS和20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)溶液。再培养4 h后弃上清, 每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO振荡10 min。在酶标仪上检测570 nm波长处的吸光度。根据 $A_{570}$ 值判断样品本身对细胞的毒性, 以决定试验样品的浓度。

1.2.4 对D-GalN致HL-7702肝细胞损伤的影响: 将HL-7702肝细胞用胰蛋白酶-EDTA消化并稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种200  $\mu\text{L}$ 于96孔板中培养。待细胞贴壁后弃去培养基, 加入200  $\mu\text{L}$ 用培养基稀释成不同浓度的样品, 每个浓度设4个平行, 同时设模型对照、阳性对照和溶剂对照。培养40 h后, 试验孔与模型孔换上含80 mmol/mL D-GalN的新鲜培养基, 确保试验样品浓度不变。又培养8 h后弃培养基, 每孔分别加入200  $\mu\text{L}$  PBS和20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)溶液。再培养4 h后弃去上清, 每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO振荡10 min。在酶标仪上检测570 nm波长处的吸光度。

1.2.5 对HepG2.2.15细胞生长的影响: 以MTT法测定样品对HepG2.2.15细胞生长的影响。将HepG2.2.15细胞用胰蛋白酶-EDTA消化并稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种200  $\mu\text{L}$ 于96孔板中培养。待细胞贴壁后倾去培养基, 加入用培养基稀释成不同浓度的样品, 每孔200  $\mu\text{L}$ , 每个浓度设4个平行, 同时设阳性和溶剂对照。培养6 d后弃掉培养基, 每孔分别加入200  $\mu\text{L}$  PBS和20  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)溶液。再培养4 h后弃去上清, 每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO振荡10 min。用酶标仪检测570 nm波长处的吸光度。

1.2.6 体外抗HBV作用: 以转染HBV基因的

HepG2.2.15细胞为模型, 通过被测样品对细胞培养上清中的HBsAg、HBeAg、HBV DNA的抑制情况, 来评价样品的抗HBV作用。将HepG2.2.15细胞用胰蛋白酶-EDTA消化并稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种200  $\mu\text{L}$ 于96孔板中培养。待细胞贴壁后倾去培养基, 加入用培养基稀释成不同浓度的样品, 每孔200  $\mu\text{L}$ , 每个浓度设3个平行, 同时设阳性和溶剂对照。每3 d换含无毒浓度样品的培养基, 将换出的同一样品同一浓度的培养基等体积混匀, 作为待测样品。在加药后第3天和第6天分别提取培养上清, 用ELISA试剂测定培养基中HBsAg和HBeAg浓度, 以P/N表示; 用HBV DNA定量PCR试剂测定培养基中HBV DNA浓度。

**统计学处理** 实验数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)和 $t$ 检验统计,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 六棱菊提取物对HL-7702和HepG2.2.15细胞的毒性作用 采用MTT方法研究六棱菊提取物对HL-7702肝细胞和HepG2.2.15细胞的毒性, 结果表明: 六棱菊提取物在1-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对HL-7702肝细胞和HepG2.2.15细胞生长均无显著影响(表1, 2)。

2.2 六棱菊提取物对D-GalN致HL-7702肝细胞损伤的保护作用 如表3所示, D-GalN损伤组与溶剂组比较具有显著性差异( $P < 0.01$ ); 六棱菊提取物在25-100  $\mu\text{g/mL}$ 浓度时, 对D-GalN致肝细胞损伤有显著的保护作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 最高保护率为45.66%; 阳性对照水飞蓟素显示了相对较弱



## ■创新盘点

采用HBV基因转染的HepG2.2.15细胞模型和D-GalN致人源HL-7702肝细胞损伤模型研究六棱菊提取物体外抗乙型肝炎作用。

表 3 六棱菊提取物对D-GalN致HL-7702肝细胞损伤的保护作用 (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ )

分组	浓度( $\mu$ g/mL)	A <sub>570</sub> 值	保护率(%)
溶剂对照	—	1.242 $\pm$ 0.043 <sup>b</sup>	—
D-GalN对照	—	0.655 $\pm$ 0.056	—
水飞蓟	100	0.832 $\pm$ 0.039 <sup>a</sup>	30.15
膜-D-GalN	50	0.789 $\pm$ 0.047 <sup>a</sup>	22.83
	25	0.732 $\pm$ 0.056	13.12
	10	0.711 $\pm$ 0.038	9.54
	1	0.687 $\pm$ 0.057	5.45
六棱菊提取	100	0.923 $\pm$ 0.041 <sup>b</sup>	45.66
物-D-GalN	50	0.874 $\pm$ 0.054 <sup>a</sup>	37.31
	25	0.781 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup>	21.46
	10	0.741 $\pm$ 0.057	14.65
	1	0.706 $\pm$ 0.045	8.69

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs D-GalN对照组. 保护率(%) = (试验组A<sub>570</sub>均值 - D-GalN组A<sub>570</sub>均值) / (溶剂组A<sub>570</sub>均值 - D-GalN组A<sub>570</sub>均值)  $\times$  100%. D-GalN: D-氨基半乳糖。

的保护作用, 在50-100  $\mu$ g/mL浓度时, 对D-GalN致肝细胞损伤有显著的保护作用( $P < 0.05$ ), 最高保护率为30.15%。结果表明六棱菊提取物具有较强的抗D-GalN损伤肝细胞的作用。

**2.3 六棱菊提取物体外抗HBV作用** 六棱菊提取物作用于HepG2.2.15细胞3 d后其结果如表4所示, 在浓度为100、50和25  $\mu$ g/mL时, 对HBsAg和HBeAg均有抑制作用, 且其抑制作用随药物浓度的增加而增强。与溶剂对照组比较, 六棱菊提取物在100、50、25和10  $\mu$ g/mL时, 对HBsAg分泌有显著抑制作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其抑制率分别为45.92%、40.89%、34.03%和10.72%。同时, 六棱菊提取物在100  $\mu$ g/mL下能显著抑制HBeAg分泌( $P < 0.05$ ), 其抑制率为50.5%。而阳性对照拉米夫定显示了相似的影响, 但在相同浓度下其抑制作用弱于试验药物六棱菊提取物。

六棱菊提取物作用于HepG2.2.15细胞6 d后其结果如表5所示, 六棱菊提取物在浓度为100、50和25  $\mu$ g/mL时, 对HBsAg和HBeAg均有抑制作用, 且抑制作用随药物浓度的增加而增强。与溶剂对照组相比, 六棱菊提取物在100、50、25和10  $\mu$ g/mL时, 对HBsAg分泌具有显著抑制作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其抑制率分别为84.31%、71.49%、58.98%和12.41%。同时, 六棱菊提取物在100、50和25  $\mu$ g/mL时, 显著抑制了HBeAg的分泌水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其抑制率分别为88.45%、67.38%和51.76%。更为重要的是,

六棱菊提取物在100  $\mu$ g/mL时对HBV DNA复制有显著抑制作用( $P < 0.05$ )。而阳性对照拉米夫定显示了相似的影响, 但对HBsAg和HBeAg的抑制作用弱于试验药物。综合作用3和6 d的结果, 说明六棱菊提取物具有较强的体外抗HBV作用。

### 3 讨论

乙型肝炎是由HBV引起的一种危害极大的世界性流行的传染病, 据统计目前全世界约有3.5亿HBV携带者, 而中国是HBV高感染地区, HBV携带者占总人口比例高达10%-15%, 其中慢性乙型肝炎患者约3000万例, 每年约有35万例死于慢性乙型肝炎相关疾病<sup>[12]</sup>。HBV主要通过血液和性接触传播, 母婴垂直传播也很常见。成人感染HBV多表现为无症状感染或急性肝炎, 约有15%-20%患者转为慢性携带者和慢性患者, 部分慢性乙型肝炎患者进一步转化为肝硬化和原发性肝细胞性肝癌。虽然目前HBV基因工程亚单位疫苗可控制感染流行, 但大量已感染HBV的携带者和慢性患者依然存在。1990年起我国开展的新生儿疫苗接种显著降低了儿童慢性乙型肝炎感染率, 但并未遏止乙型肝炎发病率的上升趋势, 乙型肝炎及其相关疾病仍是中国乃至全球的重要公共卫生问题之一<sup>[13]</sup>。尽管国内外研制的一些抗乙型肝炎药物(如 $\alpha$ -干扰素和核苷类似物)可一定程度抑制病毒复制、控制病情发展, 但其疗效距离清除病毒感染、治愈绝大多数乙型肝炎患者及病毒携带者的目标尚有很长的距离<sup>[14]</sup>。因此, 在目前生物药物和化学药物无重大突破的情况下, 深入开展中药现代化研究, 研制安全有效的抗乙型肝炎创新药物具有重大意义。

HBV是一种较为严格的嗜肝DNA病毒, 其感染有高度的种属和组织特异性, 由于病毒黏附以及DNA转录和复制对宿主有严格的要求, HBV只感染人类和类人猿, 建立常规的细胞及动物模型比较困难, 大大限制了HBV感染机制研究和抗HBV药物的发展。HepG2.2.15细胞是将含有HBV基因组的重组载体质粒转染肝癌HepG2细胞, 经G418筛选得到的克隆, 该细胞能在体外长期培养, 并能稳定分泌HBsAg、HBeAg及Dane颗粒, 可检测到细胞内DNA和RNA(包括细胞内cccDNA), 能很好地模拟HBV感染肝细胞的过程, 将该细胞培养上清静脉注射黑猩猩可致典型肝炎<sup>[15,16]</sup>。HepG2.2.15细胞是目前抗乙型肝炎药物药效评价最常用的细胞模

表 4 六棱菊提取物作用3 d后对HBsAg和HBeAg表达的影响 (mean ± SD, n = 3)

试验药物	浓度(μg/mL)	HBsAg		HBeAg	
		A <sub>570</sub> 值	抑制率(%)	A <sub>570</sub> 值	抑制率(%)
溶剂对照	—	1.200 ± 0.033	—	0.893 ± 0.079	—
拉米夫定	100	0.794 ± 0.147 <sup>b</sup>	33.81	0.729 ± 0.045 <sup>a</sup>	18.36
	50	0.945 ± 0.064 <sup>b</sup>	21.20	0.793 ± 0.027	11.20
	25	1.096 ± 0.013 <sup>b</sup>	8.69	0.849 ± 0.107	4.96
	10	1.153 ± 0.123	3.89	0.964 ± 0.059	—
	1	1.229 ± 0.079	—	0.916 ± 0.104	—
六棱菊提取物	100	0.649 ± 0.066 <sup>b</sup>	45.92	0.442 ± 0.057 <sup>a</sup>	50.50
	50	0.709 ± 0.016 <sup>b</sup>	40.89	0.764 ± 0.007	14.48
	25	0.792 ± 0.051	34.03	0.867 ± 0.080	2.95
	10	1.071 ± 0.052 <sup>a</sup>	10.72	0.999 ± 0.066	—
	1	1.306 ± 0.034 <sup>a</sup>	—	0.922 ± 0.143	—

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 溶剂对照组(DMSO含量<0.1%). 抑制率(%) = (对照组平均A值-实验组平均A值)/(对照组平均A值) × 100%. HBeAg: 乙型肝炎e抗原; HBsAg: 乙型肝炎表面抗原.

表 5 六棱菊提取物作用6 d对HBsAg、HBeAg、HBV DNA的影响 (mean ± SD, n = 3)

试验药物	浓度 (μg/mL)	HBsAg		HBeAg		log (HBV DNA)
		A <sub>570</sub> 值	抑制率(%)	A <sub>570</sub> 值	抑制率(%)	
溶剂对照	—	2.497 ± 0.009	—	2.360 ± 0.088	—	5.137 ± 0.032
拉米夫定	100	1.728 ± 0.173 <sup>b</sup>	30.60	1.921 ± 0.145 <sup>a</sup>	18.24	4.923 ± 0.127 <sup>a</sup>
	50	1.905 ± 0.095 <sup>b</sup>	23.48	2.002 ± 0.175 <sup>a</sup>	14.79	5.078 ± 0.048
	25	2.150 ± 0.091 <sup>b</sup>	13.67	2.084 ± 0.126 <sup>a</sup>	11.32	5.081 ± 0.036
	10	2.175 ± 0.142 <sup>a</sup>	12.66	2.244 ± 0.102	4.52	5.228 ± 0.024
	1	2.475 ± 0.142	0.61	2.387 ± 0.169	—	5.281 ± 0.149
六棱菊提取物	100	0.391 ± 0.018 <sup>b</sup>	84.31	0.271 ± 0.054 <sup>b</sup>	88.45	4.951 ± 0.106 <sup>a</sup>
	50	0.710 ± 0.021 <sup>b</sup>	71.49	0.767 ± 0.094 <sup>b</sup>	67.38	5.070 ± 0.037
	25	1.021 ± 0.071 <sup>b</sup>	58.98	1.133 ± 0.123 <sup>b</sup>	51.76	5.140 ± 0.050
	10	2.181 ± 0.073 <sup>a</sup>	12.41	2.261 ± 0.049	3.81	5.412 ± 0.123
	1	2.478 ± 0.029	0.48	2.345 ± 0.025	0.21	5.388 ± 0.108

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 溶剂对照组(DMSO含量<0.1%). 抑制率(%) = (对照组平均A值-实验组平均A值)/(对照组平均A值) × 100%. HBeAg: 乙型肝炎e抗原; HBsAg: 乙型肝炎表面抗原.

型<sup>[17]</sup>. 本文通过运用HepG2.2.15细胞研究六棱菊提取物对HBV基因表达(HBV DNA、HBV抗原表达)的影响, 从而评价其抗HBV作用. 结果表明: 六棱菊提取物具有较强的体外抗HBV作用.

在肝炎治疗中, 抗病毒药、免疫增强剂及保肝药都很重要, 除了抗病毒治疗外, 保肝药物对减少肝细胞破坏、延缓慢性肝病的发展具有十分重要的意义. Keppler等<sup>[18]</sup>于1968年首次应用D-GaIN制备大鼠肝损伤模型, 认为其肝脏病理和生理改变与人类病毒性肝炎相似, 经反复多次给药, D-GaIN还能够诱发动植物产生慢性肝损伤甚至癌变. 对于D-GaIN的损伤作用机制, 过去

大都认为D-GaIN是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂, 能竞争性捕捉UTP生成二磷酸尿苷半乳糖(UTP-galactose), 使磷酸尿苷耗竭, 导致物质代谢障碍, 引起肝细胞变性、花丝<sup>[19]</sup>. 随着研究的深入, 人们发现自由基和脂质过氧化反应在D-GaIN引起的肝损伤中起着十分重要的作用<sup>[20]</sup>. 鉴于D-GaIN诱发的肝损伤与人类乙型肝炎等病毒性肝炎引起肝损伤非常相似, 且D-GaIN诱导的肝损伤模型已成为目前最常用的保肝药物评价模型之一. 因此, 本研究采用D-GaIN引起正常人源HL-7702肝细胞损伤模型探讨了六棱菊提取物的体外抗肝细胞损伤作用, 结果表明六棱

#### 应用要点

为六棱菊的现代化学研究及开发利用打下了基础, 同时也为其民间应用和中医临床应用提供了部分科学依据.

## ■同行评价

本文设计合理, 方法可靠, 具有一定创新性, 对六棱菊的开发应用具有重要意义。

菊提取物具有较强的抗D-GalN损伤肝细胞的作用, 其作用强于阳性对照水飞蓟宾。

菊科六棱菊属(*Laggersa genus*)约有20余种, 主要分布在非洲热带及亚洲东南部。国内仅有六棱菊(*L. alata*)和齿翼六棱菊(*L. pterodonta*)两个种药用, 别名臭灵丹, 主产长江流域以南地区, 资源丰富。六棱菊和齿翼六棱菊民间广泛应用于炎症性疾病的治疗, 取得了显著疗效<sup>[1]</sup>。在前期研究中, 通过活性跟踪分离纯化六棱菊提取物, 并对其主要成分类型进行了量化分析; 抗炎药理研究证明了该提取物的药效物质基础主要是酚酸类尤其是咖啡酰奎宁酸类成分<sup>[8-10]</sup>。在此基础上<sup>[1-4]</sup>。本研究采用HBV基因转染的HepG2.2.15细胞模型和D-GalN致人源HL-7702肝细胞损伤模型, 进一步探讨并证明了六棱菊提取物具有较强的抗乙型肝炎作用, 提示六棱菊提取物的抗乙型肝炎作用可能与咖啡酰奎宁酸类成分有关<sup>[11]</sup>。总之, 该研究为六棱菊的现代化研究及开发利用打下了基础。

## 4 参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典(下册). 上海: 上海科技出版社, 2009: 1889-1890, 2238-2239
- 2 Bohlmann F, Wallmeyer M, Jakupovic J, Gerke T, King RM, Robinson H. Cuauthemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*. *Phytochemistry* 1985; 24: 505-509 [DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80757-8]
- 3 Raharivelomanana P, Bianchini JP, Ramanelina ARP, Rasoarhona JRE, Faure R, Cambon A. Eudesmane sesquiterpenes from *Laggersa alata*. *Phytochemistry* 1998; 47: 1085-1088 [DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00692-4]
- 4 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Gueritte Françoise, Cesario Michele, Cheng Christopher HK, Sun HD, Zhao Y. New eudesmane and eremophilane derivatives from *Laggersa alata*. *Chin Chem Lett* 2003; 14: 393-396
- 5 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Guérutte F, Cesario M, Sun HD, Cheng CH, Hao XJ, Zhao Y. Eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from *Laggersa alata*. *J Nat Prod* 2003; 66: 1078-1081 [PMID: 12932128 DOI: 10.1021/np0205856]
- 6 Zheng Q, Xu Z, Sun X, Yao W, Sun H, Cheng CH, Zhao Y. Eudesmane and megastigmane glucosides from *Laggersa alata*. *Phytochemistry* 2003; 63: 835-839 [PMID: 12877925 DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00370-4]
- 7 Ekundayo O, Oguntimein B, Laakso I, Hiltunen R. Composition of the Essential Oil of *Laggersa alata*. *Planta Med* 1989; 55: 573-574 [PMID: 17262484 DOI: 10.1055/s-2006-962103]
- 8 Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Mo J, Chen H, Bai H, Wu X, Zhao J, Zhang R, Hao X, Sun H, Zhao Y. Effect of total phenolics from *Laggersa alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 243-250 [PMID: 16814499 DOI: 10.1016/j.jep.2006.05.017]
- 9 Wu YH, Zhang XM, Hu MH, Wu XM, Zhao Y. Effect of *Laggersa alata* on hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2009; 126: 50-56 [PMID: 19703545 DOI: 10.1016/j.jep.2009.08.030]
- 10 伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱. 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 711-715
- 11 Hao BJ, Wu YH, Wang JG, Hu SQ, Keil DJ, Hu HJ, Lou JD, Zhao Y. Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggersa alata* against hepatitis B virus infection. *J Ethnopharmacol* 2012; 144: 190-194 [PMID: 22982394 DOI: 10.1016/j.jep.2012.09.003]
- 12 张顺财, 石碧坚, 王伟岸. 慢性肝病. 北京: 科学技术文献出版社, 2005: 55-88
- 13 Liu J, Fan D. Hepatitis B in China. *Lancet* 2007; 369: 1582-1583 [PMID: 17499584 DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60723-5]
- 14 陈鸿珊, 张兴权. 抗病毒药物及其研究方法. 北京: 化学工业出版社, 2006: 386-392
- 15 Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 1986; 47: 37-47 [PMID: 3019565 DOI: 10.1016/0092-8674(86)90364-8]
- 16 Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4641-4644 [PMID: 2885842 DOI: 10.1073/pnas.84.13.4641]
- 17 Korba BE, Milman G. A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Res* 1991; 15: 217-228 [PMID: 1716089 DOI: 10.1016/0166-3542(91)90068-3]
- 18 Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 279-290 [PMID: 4952077 DOI: 10.1016/0014-4800(68)90042-7]
- 19 Decker K, Keppler D. Galactosamine induced liver injury. *Prog Liver Dis* 1972; 4: 183-199 [PMID: 4631501]
- 20 Hu HL, Chen RD. Changes in free radicals, trace elements, and neurophysiological function in rats with liver damage induced by D-galactosamine. *Biol Trace Elem Res* 1992; 34: 19-25 [PMID: 1382518 DOI: 10.1007/BF02783894]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

