

复方华蟾素口服液抗乙型肝炎病毒体外实验研究

刘 庄¹ 傅希贤² 张乃临² 张国庆² 刘 丹²

内容提要 本研究以乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)转染细胞系(2.2.15 细胞株)为模型,对复方华蟾素口服液体外抗乙型肝炎病毒(HBV)活性进行了研究。结果显示:该药对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)半数抑制剂量(ID₅₀)分别为0.08 mg/ml和0.07 mg/ml,半数中毒剂量(CD₅₀)为2.5 mg/ml,治疗指数(TI)分别为HBsAg 31.3、HBeAg 35.7,提示该药体外有良好的抗HBV活性。Southern印迹杂交显示:复方华蟾素口服液对细胞内HBV DNA及其复制中间体呈剂量依赖型抑制。

关键词 乙型肝炎病毒 转染细胞系 复方华蟾素口服液 Southern印迹杂交

Inhibitory Effects of Co-Cinobufotalin Oral Liquor on Hepatitis B in vitro LIU Zhuang, FU Xi-xian, Zhang Nai-lin, et al *Beijing Ditan Hospital, Beijing (100011)*

Co-Cinobufotalin Oral Liquor (CCOL) was studied for its ability to inhibit hepatitis B virus DNA replication, HBsAg and HBeAg expression in a HBV-transfected cell line (2.2.15 cell). The result showed that ID₅₀ (the drug concentration that inhibits HBsAg or HBeAg secretion by 50%) was 0.08 mg/ml and 0.07 mg/ml on HBsAg and HBeAg respectively. CD₅₀ (the drug concentration that reduces cell growth by 50%) was 2.5 mg/ml. TI (therapeutic index) was 31.3 and 35.7 respectively. The present data suggest that CCOL could exert a potent antiviral activity against HBV in vitro. Southern blot showed that CCOL inhibited HBV-DNA replication in a dose-dependent manner.

Key words hepatitis B virus, transfected cell line, Co-Cinobufotalin Oral Liquor, Southern blot hybridization

华蟾素提取自中华大蟾蜍全皮,药理及临床研究证明它不仅具有抗癌、抗炎等功效,对乙型肝炎病毒(HBV)还有一定的抑制作用^①。本研究以2.2.15细胞为模型,对复方华蟾素口服液体外抗HBV活性进行了研究,并对其作用机理作初步探讨。

材料与方法

1 材料

1.1 实验细胞 2.2.15细胞是将HBV DNA转染人类肝癌细胞株HepG₂所建立的细胞株,由美国Mountain Sinal Medical Center提供,本室传代,采用完全MEM培养液(含10%胎牛血清、200 μg/ml G 418、0.03% L-谷氨酰胺、100 IU/ml青霉素、100 IU/ml链霉素),置于37℃、5%CO₂、95%湿度孵箱中培养。

1. 北京地坛医院(北京 100011); 2. 北京医科大学第一附属医院传染病教研室

1.2 实验药物 复方华蟾素口服液每支10 ml,每毫升含生药400 mg,由山东临沂医学专科学校肝病研究所研制提供(批号:199538)。量取药物,0.2 μm滤膜过滤除菌,置于4℃冰箱备用,使用时用完全MEM配成所需浓度。

1.3 实验仪器 CO₂孵育箱(Forma Scientific 3164 USA),倒置显微镜(Olympus CK₂ Japan),酶标自动阅读仪(Bio-Rad 450 USA),低温高速离心机(Beckman J2-21 USA),紫外分光光度计(日本岛津UV-120-02),电泳仪(北京六一仪器厂DYY-III)。

2 实验方法

2.1 细胞培养及上药 用0.25%胰酶消化细胞,按1×10⁵细胞/孔接种于24孔板,1×10⁶细胞/瓶接种于25 cm培养瓶。48 h后换用含有不同浓度的药物培养液,每4天换1次,共3次,12天后收集24孔板上清液检测HBsAg、HBeAg,测定细胞存活率。

2.2 细胞内 DNA 提取 参照林万明方法⁽²⁾, 收集培养瓶细胞, 经裂解、蛋白酶 k 处理、酚抽提及乙醇沉淀提取细胞内 DNA, 在 260 nm 和 280 nm 紫外灯光下测定 DNA 浓度和纯度。

3 观察项目

3.1 药物抗 HBV 效果测定 采用 HBsAg、HBeAg 固相放免试剂盒(中国同位素公司北方免疫试剂研究所提供), 按说明书检测上清液中 HBsAg、HBeAg 效价, 结果以患者/健康人(P/N)表示, P/N ≥ 2.1 为阳性。受试药物设 5 个浓度, 设对照孔(加等量无药培养液), 采用固相放免法测定 P/N, 根据上述方法分别计算出不同浓度药物对 HBsAg 及 HBeAg 的抑制率, 再根据两个变量之间的关系采用直线回归方程求出 ID₅₀。

3.2 药物细胞毒性测定 根据 Mosmann 建立的四甲基偶氮唑盐(MTT)比色分析法⁽³⁾测定细胞存活率, 参照 Francois 方法⁽⁴⁾加以改进, 待药物作用 12 天后, 吸出上清液, 加入无血清 MTT 培养液继续培养 3 h, 弃上清液, 加入盐酸酸化异丙醇, 充分溶解后测定 595 nm 和 650 nm 波长下的 OD 值。

3.3 药物抑制 HBVDNA 效果测定 取 10 μ g 细胞 DNA, 经 Hind III 酶切(Hind III 在 HBVDNA 上无切点), 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 经变性、中和, 按 Southern 法⁽⁵⁾转膜, 80°C 烘干, 预杂交, 采用 HBVDNA 标记的地高辛探针(中国预防医学科学院病毒所提供)杂交, 洗膜, 显色。

4 对结果的评价方法 药物抗 HBV 效果以其对 HBsAg、HBeAg 的抑制率表示。药物对细胞的毒性以细胞存活率反映。

抑制率 = (实验孔 HBsAg(或 HBeAg) P/N - 对照孔 HBsAg(或 HBeAg) P/N) / (对照孔 HBsAg(或 HBeAg) P/N - 2.1) $\times 100\%$ ⁽⁶⁾。

细胞存活率 = $\frac{\text{实验孔}(OD_{595} - OD_{650})}{\text{对照孔}(OD_{595} - OD_{650})} \times 100\%$ ⁽⁵⁾。

药物抗 HBV 效果以治疗指数(TI)评价。TI = CD₅₀ (半数中毒剂量) / ID₅₀ (半数抑制剂量)。TI > 2 为有效, TI ≤ 1 表示受试药物毒性大, 不宜于抗 HBV 治疗, TI 越大, 表明该药物对 HBsAg(或 HBeAg)抑制作用越强或细胞毒性小。

5 统计学方法 采用直线回归及 t 检验。

结 果

1 药物对 HBsAg、HBeAg 的抑制效果 本实验结果显示: 药物对 HBsAg 及 HBeAg 的抑制作用

与药物浓度呈正相关, 其 ID₅₀ HBsAg 为 0.08 mg/ml, ID₅₀ HBeAg 为 0.07 mg/ml, TI 值 HBsAg 为 31.3, TI 值 HBeAg 为 35.7, 表明该药体外有良好的抗 HBV 作用。

2 药物对 2.2.15 细胞的毒性作用 光镜下观察药物对 2.2.15 细胞的毒性作用表现为细胞形态改变, 固缩和破碎。用 MTT 法检测, 表现为对 MTT 摄入及转化减少, OD 值下降。实验结果显示: 细胞存活率与药物浓度呈负相关, 其 CD₅₀ 为 2.5 mg/ml。

3 药物对细胞内 HBVDNA 的抑制效果 DNA 经 Hind III 酶切后进行 Southern 转膜杂交, 可分辨出整合型 DNA, 环状双链 DNA, 线状双链 DNA, 超螺旋 DNA 等区带, 结果显示: 药物对细胞内 HBVDNA 及其复制中间体呈剂量依赖型抑制。当药物浓度为 4 mg/ml 时, 细胞内 HBVDNA 几乎达到完全抑制。

讨 论

华蟾素是我国传统的生物药材, 具有消炎解毒、消肿止痛等功效, 并能增强巨噬细胞的吞噬作用, 提高机体免疫功能, 抑制肿瘤细胞 DNA、RNA 的合成。动物实验研究证实: 华蟾素能明显抑制鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的复制, 并有较好的病理改善作用⁽⁷⁾。近年来已用于治疗慢性 HBV 携带者及慢性乙型肝炎患者, 临床取得一定疗效^(8, 9)。复方华蟾素口服液提取自蟾皮、虎杖等, 本实验利用 2.2.15 细胞对该药体外抗 HBV 活性进行了初步观察, 结果证实此药的 CD₅₀ 远大于 ID₅₀, 提示其体外有良好的抗 HBV 活性, 且服用方便, 是有希望的抗 HBV 药物。2.2.15 细胞不仅能分泌高水平的病毒蛋白, 其细胞内及培养上清液中还可检测到病毒复制中间体⁽¹⁰⁾。根据 Southern 杂交所反映的各区带变化, 可分析药物对病毒复制的影响, 以推断药物可能的作用环节和部位。本实验证实复方华蟾素口服液能有效地抑制细胞内 HBVDNA 及其复制中间体, 并呈剂量依赖型。在同等剂量下, 药物对 HBsAg、HBeAg 的抑制较对 HBVDNA 的抑制为佳, 提示该药对病毒颗粒产生的抑制不仅在转录前水平, 是否对 mRNA 翻译及蛋白分泌等环节也有影响, 有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 徐向田, 荆培棠, 高凌泰, 等. 华蟾素治疗慢性乙肝病毒携带者疗效观察. 临床医学 1990; 10(4): 169-170.
2. 林万明. 核酸探针杂交实验技术. 第 1 版. 北京: 中国科

- 学出版社, 1992: 4—10.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1): 55—63.
 4. Franscois D, Rita L. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271—277.
 5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 478—479.
 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. *中华医学杂志* 1992; 72(10): 612—615.
 7. 巫善明, 徐向田, 徐伟民, 等. 华蟾素抗鸭乙型肝炎病毒实验研究. *中华传染病杂志* 1995; 13(1): 25—28.
 8. 荆培棠, 徐向田, 王家爱, 等. 华蟾素治疗慢性乙型肝炎的临床观察. *山东医药* 1992; 32(7): 6—7.
 9. 徐向田, 荆培棠, 李永华, 等. 华蟾素治疗慢性乙肝病毒携带者临床研究. *中国中西医结合杂志* 1993; 13(8): 473—475.
 10. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(2): 1005—1009.
- (收稿: 1995—10—25 修回: 1996—03—20)

洁尔阴冲洗鼓室治疗慢性化脓性中耳炎 40 例

廖伯才¹ 张淑琼¹ 徐木先¹ 朱世清¹ 傅培楠²

慢性化脓性中耳炎(chronic suppurative otitis media, CSOM)治疗中局部用药非常重要。我科自 1993 年 5 月~1994 年 12 月用洁尔阴冲洗鼓室治疗 CSOM 40 例, 疗效满意, 报告如下。

临床资料 将我科门诊符合 CSOM 诊断标准(魏能润主编. 耳鼻咽喉科学. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 298)的患者 80 例随机分为洁尔阴组和对照组各 40 例。洁尔阴组中男 24 例, 女 16 例; 年龄 10~73 岁, 平均 38 岁; CSOM 单纯型 30 例, 骨疡型 6 例, 胆脂瘤型 2 例, 乳突手术后不干耳 2 例。对照组中男 22 例, 女 18 例; 年龄 14~70 岁, 平均 40 岁; CSOM 单纯型 31 例, 骨疡型 7 例, 胆脂瘤型 1 例, 乳突手术后不干耳 1 例。

治疗方法 对照组: 口服琥乙红霉素 0.25 g, 每天 3 次, 并用 2.5% 氯霉素甘油滴患耳, 每天 3 次, 共 8 天。鼓室脓液多者滴药前用 3% 双氧水清洗。洁尔阴组: 在对照组治疗基础上, 停用 2.5% 氯霉素甘油滴耳, 加热洁尔阴(中外合资成都恩威世亨制药有限公司生产, 批号 9312084, 规格 150 ml)原液至微温, 用 5 ml 注射器配 7 号针头抽吸洁尔阴 5 ml, 将针头置入外耳道内, 通过鼓膜穿孔处对准鼓岬冲洗鼓室, 使药液在中耳腔内形成涡流或湍流后随鼓室内脓液、脱落上皮团块、胆脂瘤碎块流出外耳道, 并经负压管引流。据鼓室脓液多少, 每次冲洗鼓室药液总量 10~15 ml, 冲洗结束用干棉签拭净外耳道内残余药液及脓液, 并用洁尔阴滴患耳, 每 6~8 h 1 次, 每次 2~3 滴, 每日冲洗 1~2 次, 4 天为 1 个疗程, 连用两个疗程。

结 果 疗效判定标准: 治愈: 不干耳, 鼓室炎症消失; 显效: 无分泌物, 但鼓室粘膜轻度红肿、潮湿; 好转: 脓液较前减少; 无效: 与治疗前相同。洁尔阴组治愈 34 例(85.0%), 其中 1 个疗程 13 例, 2 个疗程 21 例; 显效 2 例(5.0%); 好转 1 例(2.5%); 无效 3 例(7.5%), 其中 2 例为骨疡型, 1 例为胆脂瘤型; 总有效率 92.5%。治疗前后均行纯音测听, 36 例(90.0%)治疗后听力有不同程度提高。36 例行脑干听觉诱发电位(ABR)无潜伏期及波间期延长。仅 2 例用洁尔阴冲洗鼓室时发生轻微眩晕, 停止治疗则消失。对照组: 治愈 20 例(50.0%); 显效 3 例(7.5%); 好转 2 例(5.0%); 无效 15 例(37.5%), 其中 7 例为单纯型, 6 例为骨疡型, 1 例为胆脂瘤型, 1 例为乳突手术后不干耳; 总有效率 62.5%。治疗前后均行纯音测听, 仅 22 例(55.0%)治疗后听力有不同程度提高。治愈患者随访 1 年, 洁尔阴组复发 2 例(5.9%); 对照组复发 5 例(25.0%), 经 χ^2 检验, $P < 0.05$, 有显著性差异。

讨 论 洁尔阴主要成分为黄柏、苦参、蛇床子及苍术。经证实其对多种细菌和真菌均有抗菌作用。而 CSOM 以绿脓杆菌、大肠杆菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌为主要致病菌。用洁尔阴冲洗起清创引流作用, 又对其残留细菌或真菌起抗菌作用, 同时增强机体免疫功能。

洁尔阴属纯中药制剂, 纯音测听及 ABR 未发现其对中耳、内耳有损害, 临床应用安全。其治疗 CSOM 主要适用于单纯型及部分骨疡型, 而胆脂瘤型以手术为主, 以预防颅内并发症。

(收稿: 1996—06—14 修回: 1996—08—01)

1. 四川省自贡市第四人民医院(四川 643008); 2. 四川省自贡卫生学校五官科