

Determination of Flavonoids and Anti-Hepatitis B Virus Activity of Extracts from *Lysimachia fortunei Maxim*

Shouji Gong^{1,2}, Yin Yang²

¹College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou Guangdong

²Guilin Medical University, Guilin Guangxi

Email: gong5895801@163.com

Received: Feb. 2nd, 2020; accepted: Feb. 17th, 2020; published: Feb. 24th, 2020

Abstract

Objective: To determinate the flavonoids' content and the anti-hepatitis B virus (HBV) effect of the extracts from *Lysimachia fortunei Maxim* *in vitro*. **Methods:** Macroporous resin (D101) was used to isolate and purify the extracts of *Lysimachia fortunei Maxim* and the total flavonoids' content was determined by NaNO₂-AlCl₃ system. Then, the HepG2.2.15 cell line was used to investigate the anti-HBV effects of the extract from *Lysimachia fortunei Maxim*. **Results:** The content of flavonoids reaches 89.29%. The extracts are shown to inhibit the HBeAg secretion in HepG2.2.15 cells. **Conclusions:** Macroporous resin (D101) is efficient for purification of total flavonoids from *Lysimachia fortunei Maxim*. The extracts of *Lysimachia fortunei Maxim* are effective in inhibition of HBV *in vitro*.

Keywords

Lysimachia fortunei Maxim, Flavonoid, HepG2.2.15 Cells

大田基黄总黄酮含量测定及提取物抗乙肝病毒作用

龚受基^{1,2}, 杨茵²

¹北部湾大学食品工程学院, 广东 钦州

²桂林医学院, 广西 桂林

Email: gong5895801@163.com

收稿日期: 2020年2月2日; 录用日期: 2020年2月17日; 发布日期: 2020年2月24日

摘要

目的: 测定大田基黄提取物中总黄酮含量, 研究大田基黄不同提取物体外抗乙肝病毒作用。方法: 采用大孔吸附树脂(D101)纯化工艺技术, 对大田基黄提取物进行提纯, 应用 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 显色法测定总黄酮含量; 应用HepG2.2.15细胞系培养系统检测大田基黄提取物对HBsAg和HBeAg的抑制作用。结果: 经树脂纯化后的大田基黄提取物总黄酮含量达89.29%; 大田基黄提取物对HBsAg表达有抑制作用, 其中对HBsAg抑制作用差别较大。结论: 大孔吸附树脂(D101)分离纯化大田基黄总黄酮效果显著; 大田基黄提取物有体外抗乙肝病毒作用。

关键词

大田基黄, 黄酮, HepG2.2.15细胞系

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大田基黄 *Lysimachia fortunei Maxim* 系报春花科排草属植物红根排草, 别名星宿菜、红根草, 系多年生植物, 多发现于山边、沟坡、溪畔等湿润阴凉区域, 在我国中南、华东等省均有分布。大田基黄全草富含黄酮类、甙体类化合物[1] [2] [3] [4], 具有抗高血压、镇痛抗炎、提高免疫力等药理作用[5] [6] [7]。黄酮类化合物属于植物二次代谢产物, 具有多方面的活性[8], 大田基黄富含黄酮类化合物[9] [10], 可能是潜在的抗病毒活性物质。本实验测定了大田基黄提取物中的总黄酮含量, 利用 HepG2.2.15 细胞系观察不同提取物对 HBeAg、HBsAg 分泌的影响, 分析不同极性提取物的抗乙肝病毒功效。

2. 材料药品与仪器

2.1. 药品试剂

大田基黄全草, 由广西植物研究所黄定中高工鉴定为报春花科排草属植物红根排草 *Lysimachia fortunei Maxim*; 芦丁标准品, AR, 批号 TCM027-080118, 南京替斯艾么中药研究所; D101 大孔吸附树脂(中国沧州远威化工有限公司); HepG2.2.15 细胞系(北京大学医学院第一附属医院病毒研究所); DMEM G418 (Gibco 分装), 谷氨酰胺(Sigma), 新生小牛血清(Sigma); 其他试剂为分析纯。

2.2. 仪器设备

BP211D 电子天平, 德国 Sartorius 公司产品; 752 紫外光栅分光光度计, 上海分析仪器总厂产品; MCO-15AC CO₂ 培养箱, 日本三洋公司产品; XSBIA 倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司产品; KHB ST-360 酶标仪, 上海科华实验系统有限公司产品; 96 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司产品。

3. 方法

3.1. 总黄酮提取

大田基黄全草粉碎, 过 14 目筛, 取过筛物 20 g, 加 60%乙醇 200 mL 超声提取 0.5 h, 抽滤, 滤渣按

相同条件再提取一次, 合并滤液, 减压浓缩至稠状物。稠状物加 500 mL 蒸馏水搅拌溶解, 静置过夜, 抽滤。取滤液上 D101 树脂柱, 待大孔树脂吸附完全后, 用蒸馏水洗脱至馏出液无色, 弃去此柱流液。再用 400 mL 80%乙醇洗脱树脂, 收集洗脱液, 旋转蒸发仪减压浓缩, 将浓缩液于真空干燥器中 45℃干燥成疏松固体, 粉碎得粗黄酮, 备用。

3.2. 样品制备

干燥大田基黄全草粉碎, 过 14 目筛, 称取 10 g 用 10 倍量 95%乙醇超声提取 0.5 h, 抽滤, 滤渣同样条件再提取一次, 合并滤液, 浓缩、真空干燥得提取物 E₁; 滤渣用 60%乙醇按上述方法处理得提取物 E₂; 上述滤渣用蒸馏水按上述方法处理得提取物 E₃。

3.3. 总黄酮的含量测定

3.3.1. 标准曲线的制备

精确称量 20.00 mg 芦丁标准品, 以 60%乙醇超声溶解后, 定容至 50 mL 容量瓶, 取 8.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加入浓度为 0.50 mol/L 的 NaNO₂ 1.0 mL, 摇匀静置 5 min, 再加入 0.30 mol/L 的 AlCl₃ 1.0 mL, 摇匀静置 5 min, 再加 1.00 mol/L 的 NaOH 5.0 mL, 摇匀显色后, 用 60%乙醇定容并摇匀, 放置 10 min, 用 1 cm 比色皿在 360~600 nm 区间扫描, 确定最大吸收波长为 504.6 nm。分别移取上述标准液 0、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 于 7 个 25 mL 的容量瓶中, 同上述方法显色后, 用 60%乙醇定容, 于 504.6 nm 处测定吸光度, 空白试剂为参比液, 绘制标准曲线。

3.3.2. 精密度试验

取上述芦丁标准液 5 份, 每份 3.0 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 显色后用 60%乙醇定容, 测定 5 份溶液的吸光度值。

3.3.3. 稳定性试验

量取同一供试品溶液, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 处测定吸光度值, 每一时间段测 5 次, 计算 RSD%。

3.3.4. 样品中总黄酮含量测定

精确称量粗黄酮干燥产物 120 mg, 用 60%乙醇超声溶解, 定容至 50 mL 容量瓶。再精密量取 5.00 mL 于 25 mL 容量瓶, 按标准曲线制备方法加入试剂显色摇匀后, 用 60%乙醇定容放置 10 min, 测定吸光度, 测定 3 次, 并将此值代入回归方程, 计算总黄酮的含量。

3.4. 总黄酮的体外抗乙肝作用

3.4.1. 药物配制

将大田基黄提取物 E₁、E₂、E₃ 用 100%二甲基亚砷溶解, 使二甲基亚砷浓度为 10%, 过滤灭菌备用。

3.4.2. HepG2.2.15 细胞的培养

DMEM 中加入 380 mg/L G418、15%新生小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、1%青霉素链霉素、5%碳酸氢钠调 pH 7.2~7.4, 于 37 ℃5%二氧化碳条件下培养, 每 10 d 传代一次。

3.4.3. 药物对细胞的毒性作用试验

将 HepG2.2.15 细胞按 1×10^8 /mL 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 190 μ L, 置 CO₂ 培养箱培养 30 min, 酶标仪于波长 515 nm 条件下测其吸光度。依次将提取物 E₁、E₂、E₃ 各 50 μ L 加入培养板中, 每 3 d 换相同浓度的相同药液和培养基, 设不加药物的 100 mL/L DMSO 为对照孔, 于第 9 天测定药物对细胞的毒性。

3.4.4. 大田基黄提取物对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响

将 HepG2.2.15 细胞按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 190 μL , 加入不同浓度提取物 E₁、E₂、E₃, 每个浓度设 3 个平行孔, 同时设 10% DMSO 阴性对照组, 3 天后取培养孔上清液用 ELISA 法测定吸光度值, 计算药物对 HBsAg、HBeAg 分泌的抑制率。

3.4.5. 统计处理

各组检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

4. 结果

4.1. 方法试验

精密度试验: 5 份芦丁标准液, 吸光值分别为 0.135、0.135、0.135、0.136、0.135, 平均值为 0.1352, RSD% = 0.33, 显示精密度良好。

稳定性试验: 0~8 h 不同时间点吸光度值 RSD% 分别为 0.18、0.28、0.19、0.17、0.15、0.28、0.36、0.43、0.67, 统计结果表明, 在 8h 内试验结果稳定性良好, 检测方法可行。

4.2. 黄酮含量测定

测定提取物中总黄酮含量 3 次, 平均含量为 89.29%。

4.3. 提取物对 HepG2.2.15 细胞系的作用

大田基黄提取物体外抗乙肝病毒作用, 提取物 E₁ 为 60% 乙醇提取物, 提取物 E₂ 为大田基黄 95% 乙醇提取物, 提取物 E₃ 为 95% 乙醇提取完后再用水提取。72h 的抑制结果见表 1、表 2 和表 3。提取物对 HBeAg 分泌具有较好的抑制作用, 对 HBsAg 的分泌作用影响有差异, 仅提取物 E₂ 具有较好的抑制作用。三种提取物对 HBeAg 的抑制作用呈现剂量性关系, E₂ 对 HBsAg 的抑制作用也呈现出抑制作用。

Table 1. Effects of extract E₁ on the expression of HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 cell lines (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

表 1. 提取物 E₁ 对 HepG2.2.15 细胞株 HBsAg、HBeAg 表达的影响(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

浓度(mg/L)	HBsAg		HBeAg	
	A	抑制率%	A	抑制率%
Control	0.397 ± 0.023	—	1.363 ± 0.510	—
400	0.213 ± 0.173	62.9	0.237 ± 0.103	92.7
200	0.233 ± 0.023	56.1	0.277 ± 0.093	89.4
100	0.257 ± 0.011	47.8	0.403 ± 0.101	79.0
50	0.358 ± 0.025	13.3	0.643 ± 0.093	59.3

Table 2. Effects of extract E₂ on the expression of HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 cell lines (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

表 2. 提取物 E₂ 对 HepG2.2.15 细胞株 HBsAg、HBeAg 表达的影响(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

浓度(mg/L)	HBsAg		HBeAg	
	A	抑制率%	A	抑制率%
Control	0.397 ± 0.023	—	1.363 ± 0.510	—
400	0.516 ± 0.044	—	0.355 ± 0.023	84.3
200	0.451 ± 0.041	—	0.599 ± 0.082	68.4
100	0.381 ± 0.019	5.4	0.829 ± 0.073	53.5
50	0.380 ± 0.010	5.7	1.566 ± 0.255	5.6

Table 3. Effects of extract E₃ on the expression of HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 cell lines (n = 3, $\bar{x} \pm s$)
表 3. 提取物 E₃ 对 HepG2.2.15 细胞株 HBsAg、HBeAg 表达的影响(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

浓度(mg/L)	HBsAg		HBeAg	
	A	抑制率%	A	抑制率%
Control	0.397 ± 0.023	—	1.363 ± 0.510	—
400	0.621 ± 0.107	—	0.268 ± 0.125	91.0
200	0.560 ± 0.053	—	0.325 ± 0.067	86.3
100	0.647 ± 0.022	—	0.710 ± 0.220	54.3
50	0.654 ± 0.076	—	1.073 ± 0.083	24.1

5. 讨论

乙型肝炎由乙型肝炎病毒(HBV)感染所致, 肝脏感染后产生炎性病变, 具有传染性。乙肝病毒感染者血清中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)呈阳性, 是感染 HBV 的标志。乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)是判断 HBV 复制活跃与否的重要标志, 其存在于 HBsAg 阳性患者的血液中, HBeAg 呈阳性反映 HBV 病毒复制活跃、传染性强。目前, 抗乙型肝炎药物主要有 α -干扰素和核苷类似物两大类, 但是其治疗效果并不令人满意, 而且具有类感冒、疲倦和低血球等副作用[11][12]。传统中药作为一种补充替代疗法, 在临床上中国、日本和韩国等多个国家广泛应用其治疗乙型肝炎[13]。传统中药活性因子复杂多样, 很多活性因子没有完全分离纯化, 结构没有阐明, 但是由于其来源广泛, 而且化学特征与生物合成或者化学合成药物类似, 易吸收、代谢, 因此近年来传统中药引起了药物研究者的广泛关注[14]。

黄酮类化合物是一类发现于植物的酚型结构次生代谢产物, 种类繁多, 活性多样。多种黄酮被证实对乙型肝炎具有治疗作用, 茶叶中富含 EGCG, 其能够破坏 HBV DNA 复制中间体的合成从而抑制 HBV 复制, 最终减少共价环状病毒 DNA 链的表达[15]。汉黄芩素和 5-甲氧基-(3,4"-二氢-3",4"-二乙酰氧基)-2",2'-二甲基-吡喃酮-(7,8,5",6")-黄酮降低 HBsAg 和 HBeAg 分泌水平, 同时降低 HBV DNA 表达, 从而抑制 HBV 复制[16][17]。苎麻叶提取物含黄酮类化合物, 对 HBV 的 HBsAg、HBeAg 和 DNA 表达都有显著抑制作用[18]。

大田基黄中槲皮素含量达 3.25 mg/g, 总黄酮含量高达 3.83%, 黄酮含量丰富, 以大孔树脂 D101 富集纯化效率较高[9][10]。已经鉴定的黄酮类化合物有 5000 多种, 包括无糖基的苷元和连接有糖基的苷。不同黄酮类化合物极性不同, 溶解于有机溶剂的特性也不同, 苷元和连接较少糖基的苷极性小, 容易溶解于高浓度乙醇溶液中, 含有稍多糖基的苷极性中等, 比较容易溶解于中等浓度乙醇溶液, 当苷中糖基数目比较多时极性较大, 比较容易溶解在水中。所以利用 95%乙醇提取出极性较小的黄酮苷元和黄酮苷 E₁, 60%乙醇溶液提取出中等极性黄酮苷 E₂, 水提取出极性大的黄酮苷 E₃。

本实验以乙型肝炎病毒感染肝癌细胞得到的细胞系 HepG2.2.15 为体外研究模型, 检测了 HBsAg、HBeAg 的表达水平, 观察了大田基黄三种提取物不同浓度体外对 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制作用。结果表明, 提取物 E₂、E₃ 仅对 HBeAg 表达有抑制作用, 提取物 E₁ 对 HBsAg 与 HBeAg 均有抑制作用, 且其抑制作用呈现剂量依赖性。三种提取物极性不同, 表明其所含糖基数目不等, 但均对 HBeAg 有抑制作用, 且抑制作用相差不大, 从构效角度表明苷元糖基存在与否对 HBeAg 表达影响不大, 糖基对 HBeAg 的抑制作用不是必须的。但是糖基的存在对抑制 HBsAg 表达存在较大差异, 提取物 E₁ 极性较小, 说明其含糖基数目少, 有较好的抑制 HBsAg 表达作用, 而提取物 E₂、E₃ 极性较大, 对 HBsAg 表达的抑制较弱, 说明糖基的存在不利于抑制 HBsAg 表达。

基金项目

北部湾大学校级科研项目(2017KYQD223), 广西高校科学技术研究项目(KY2015ZD086)。

参考文献

- [1] 夏欣, 刘梅芳, 林立东. 星宿菜的黄酮类化学成分[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(1): 93-95.
- [2] 黄新安, 蔡佳仲, 胡英杰, 张玉虎. 星宿菜化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7): 596-599.
- [3] Yasukawa, K., Sekine, H. and Takido, M. (1989) Two Flavonol Glycosides from *Lysimachia fortunei*. *Phytochemistry*, **28**, 2215-2216. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97951-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97951-2)
- [4] 方午浦, 张亚均, 孙小芳. 星宿菜脂溶性部分的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(12): 35-37 + 59.
- [5] 龚受基, 苏小建, 阮俊, 梁映, 何乐琼, 徐庆. 大田基黄多糖降血压作用的动物实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 579-580.
- [6] 付远清, 陆海鹏, 陆翠林. 星宿菜水提取物及醇提取物毒性及抗炎镇痛作用初探[J]. 黑龙江医学, 2013, 37(2): 157-159.
- [7] 陆海鹏, 陆翠林, 付远清. 星宿菜提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国执业药师, 2013, 10(2): 23-25+55.
- [8] Asif, A., Muhammad, K., Zaheer, A. and Hammad, S. (2015) Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action against Microbial and Viral Infections: A Review. *Food Research International*, **77**, 221-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.021>
- [9] 龚受基, 黄耀锋, 滕翠琴, 徐庆. 大田基黄中槲皮素含量分析和总黄酮的提取工艺优化[J]. 食品科技, 2010(5): 199-203.
- [10] 吴丽, 龚受基. 大孔吸附树脂-超声波法纯化大田基黄总黄酮[J]. 今日药学, 2016, 26(3): 172-174 + 178.
- [11] Lu, J., Zhang, S., Liu, Y., Du, X., Ren, S., Zhang, H., Ma, L., Chen, Y., Chen, X. and Shen, C. (2015) Effect of Peg-Interferon Alpha-2a Combined with Adefovir in HBV Postpartum Women with Normal Levels of ALT and High Levels of HBV DNA. *Liver International*, **35**, 1692-1699. <https://doi.org/10.1111/liv.12753>
- [12] Palacios-Alvarez, I., Roman-Curto, C., Mir-Bonafé, J.M., Canueto, J., Usero-Barcelona, T. and Fernandez-Lopez, E. (2015) Autoimmune Response as a Side Effect of Treatment with Interferon-Alpha in Melanoma: Does This Have Prognostic Implications. *International Journal of Dermatology*, **54**, e91-e93. <https://doi.org/10.1111/ijd.12698>
- [13] Tsai, D.-S., Huang, M.-H., Chang, Y.-S., Li, T.-C. and Peng, W.-H. (2015) The Use of Chinese Herbal Medicines Associated with Reduced Mortality in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Lamivudine Treatment. *Journal of Ethnopharmacology*, **174**, 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.002>
- [14] Xia, J.F., Gao, J.J., Inagaki, Y., Kokudo, N., Nakata, M. and Tang, W. (2013) Flavonoids as Potential Anti-Hepatocellular Carcinoma Agents: Recent Approaches Using HepG2 Cell Line. *Drug Discoveries & Therapeutics*, **7**, 1-8. <https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.1.1>
- [15] He, W., Li, L.-X., Liao, Q.-J., Liu, C.-L. and Chen, X.-L. (2011) Epigallocatechin Gallate Inhibits HBV DNA Synthesis in a Viral Replication-Inducible Cell Line. *World Journal of Gastroenterology*, **17**, 1507-1514. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i11.1507>
- [16] Chou, S.C., Huang, T.J., Lin, E.H., Huang, C.H. and Chou, C.H. (2012) Antihepatitis B Virus Constituents of *Solanum erianthum*. *Natural Product Communications*, **7**, 153-156. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700205>
- [17] Guo, Q.L., Zhao, L., You, Q.D., Yang, Y., Gu, H.Y., Song, G.L., Lu, N. and Xin, J. (2007) Anti-Hepatitis B Virus Activity of Wogonin *in Vitro* and *in Vivo*. *Antiviral Research*, **74**, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.01.002>
- [18] Wei, J.C., Lin, L.K., Su, X.J., Qin, S.Y., Xu, Q., Tang, Z.N., Deng, Y., Zhou, Y.H. and He, S.Q. (2014) Anti-Hepatitis B Virus Activity of *Boehmeria nivea* Leaf Extracts in Human HepG2.2.15 Cells. *Biomedical Reports*, **2**, 147-151. <https://doi.org/10.3892/br.2013.205>