

# 黑枸杞提取物对 HBV 的抑制作用 及抗氧化能力测定

高恩怡<sup>1</sup>, 龚红菲<sup>1</sup>, 张艳群<sup>1</sup>, 曾永联<sup>2</sup>, 杨 扬<sup>1</sup>, 梁成钦<sup>1</sup>, 韦京辰<sup>1,\*</sup>

(1. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004;

2. 广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, 广西桂林 541004)

**摘要:**目的:研究黑枸杞提取物对抗乙肝病毒的作用并检测其抗氧化活性。方法:体外培养 HepG22.2.15 细胞, MTT 法检测黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞的细胞毒作用, 双抗体夹心法检测 HepG22.2.15 细胞培养液中 HBsAg 和 HBeAg 的表达。测定黑枸杞不同浓度提取物的还原能力和对羟自由基、DPPH 自由基的清除能力。结果:MTT 法检测黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞无明显细胞毒作用。与阴性对照组比较, 黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的表达有抑制作用( $p < 0.05$ )。且随着黑枸杞提取物浓度的增加, 其还原能力与清除羟自由基、DPPH 自由基的能力逐渐增强。结论:黑枸杞提取物对乙肝病毒有抑制作用, 并且有着良好的抗氧化能力。

**关键词:**黑枸杞, HepG22.2.15 细胞, HBsAg, HBeAg, 抗氧化能力

## The inhibitory effect of black wolfberry extracts on HBV and the capacity of its antioxidant

GAO En-yi<sup>1</sup>, GONG Hong-fei<sup>1</sup>, ZHANG Yan-qun<sup>1</sup>, ZENG Yong-lian<sup>2</sup>,  
YANG Yang<sup>1</sup>, LIANG Cheng-qin<sup>1</sup>, WEI Jing-chen<sup>1,\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine for Injury and Repair of Liver, Guilin 541004, China)

**Abstract:** Objective: To study the effect of black wolfberry extracts against hepatitis B virus and to detect its antioxidant activity. Methods: HepG22.2.15 cells were cultured *in vitro*, MTT was used to detect the cytotoxicity of black wolfberry extracts against HepG2 2.2.15 cells. The expression of HBsAg and HBeAg in the culture medium of HepG2 2.2.15 cells was detected by double antibody sandwich method. To determine the reducing power and scavenging capacity of hydroxyl radical and DPPH free radical of different concentration of black wolfberry. Results: MTT assay showed no obvious cytotoxicity of black wolfberry extracts on HepG2 2.2.15 cells. Compared with the negative control group, black wolfberry extracts had inhibitory effects on the expression of HBsAg and HBeAg in HepG2 2.2.15 cells ( $p < 0.05$ ). And with the increase of the concentration of black wolfberry extracts, its abilities of reducing and scavenging hydroxyl radical, scavenging DPPH free radical (DPPH·) were also gradually enhanced. Conclusion: black wolfberry extracts have inhibitory effect on hepatitis B virus, and have a good antioxidant capacity.

**Key words:** black wolfberry; HepG2 2.2.15 cells; HBsAg; HBeAg; antioxidant capacity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)01-0029-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.006

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 感染所导致的肝脏疾病, 随着疾病的发展, 最终演变为肝功能异常、肝硬化或甚至肝癌。全球乙肝病毒携带者有 3.5~4 亿人, 中国为乙型肝炎高流行区, HBV 携带者约有 1.3 亿, 慢性肝炎患者约 3000 万人<sup>[1]</sup>。用以拉米夫啉、恩替卡韦等为代表的核苷类药物抗乙肝病毒治疗是目前临床上公认的治

疗方案, 但是长期用药导致耐药病毒株日益增多, HBV 病毒学反弹, 药物治疗不良反应多等现象<sup>[2]</sup>。肝脏的主要功能是代谢, 但同时它也有着去氧化的作用。国内外研究表明肝脏负荷过大, 去氧化能力下降导致肝脏被自由基损伤也与肝脏疾病的发生和发展有着很大的关系<sup>[3]</sup>。因而, 寻求新的治疗方案和开发更安全有效的药物对患者进行抗炎保肝、抗病

收稿日期: 2017-05-02

作者简介: 高恩怡 (1992-), 男, 硕士, 主要从事抗肿瘤抗病毒药理学方面的研究, E-mail: 18715766296@163.com。

\* 通讯作者: 韦京辰 (1976-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事抗肿瘤抗病毒药理学方面的研究, E-mail: w66333@163.com。

基金项目: 广西科学基金 (2016GXNSFAA380041); 国家自然科学基金 (81560574)。

毒、清除自由基和免疫调节综合治疗是一种趋势。

黑枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr) 藏药称“旁玛”,为茄科枸杞属灌木植物,具棘刺,分布于我国西北地区<sup>[4]</sup>。研究发现,黑枸杞有抗血脂、降血糖、免疫调节、延缓衰老、预防及治疗心血管疾病的应用价值<sup>[5]</sup>。本实验运用大孔吸附树脂对黑枸杞分离提纯,得到黑枸杞提取物<sup>[6]</sup>,其提取物具有降低肝脏中脂肪含量及保肝<sup>[7]</sup>、抗肿瘤<sup>[8]</sup>、抗氧化活性<sup>[9]</sup>等多种药理学效应。

研究显示很多植物药具有良好的抗乙肝功效,例如盐酸千金藤碱<sup>[10]</sup>、绿茶儿茶素<sup>[11]</sup>、甘草提取液<sup>[12]</sup>、天花粉水提物<sup>[13]</sup>等多种天然药物均有抗 HBV 作用,但黑枸杞提取物是否有抗乙肝作用尚未见报道。本实验通过研究黑枸杞提取物对体外 HepG22.2.15 细胞模型分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响,从细胞水平上观测和评价其抗 HBV 作用。并通过检测黑枸杞提取物的·OH 的清除率、DPPH· 的清除率、还原能力来测定其抗氧化能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑枸杞干果 购买于甘肃;DMEM 高糖培养基、G418 美国 Gibco 公司;胎牛血清 奥地利 PAA 公司;谷氨酰胺 美国 Sigma 公司;HBsAg、HBeAg 试剂盒 中国上海科华生物工程股份有限公司;MTT 试剂盒 美国 Amresco 公司;HepG22.2.15 细胞系 北京大学医学院第一附属医院病毒研究所;拉米夫定 英国葛兰素史克制药有限公司;硫酸亚铁、铁氰化钾 分析纯,中国国药集团化学试剂有限公司;氯化铁、过氧化氢 分析纯,中国西陇科学股份有限公司;抗坏血酸 中国山东佰仟化工有限公司;DPPH 标准品 中国梯希爱化成工业发展有限公司。

二氧化碳培养箱 日本三洋公司;XSBIA 倒置显微镜 中国上海蔡康光学仪器有限公司;超净工作台 中国天津尘埃净化设备厂;细胞培养瓶、96 孔细胞培养板 美国 Corning 公司;酶联免疫检测仪 美国 BioTek 公司;MVExc47/11-6 液氮存贮罐 美国 MVE 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 黑枸杞提取物的制备 称取经干燥粉碎的黑枸杞粉末 20 g,并按照固液比 1:10 用 55 °C 超纯水浸提,过 D101 大孔树脂,70% 乙醇洗脱,-0.1 MPa 下减压回收乙醇并冷冻干燥得到黑色结晶粉末<sup>[14]</sup>。

1.2.2 黑枸杞提取物体外抗乙肝病毒实验

1.2.2.1 细胞培养与药物分组 培养基制备:DMEM 中加入 380 mg·L<sup>-1</sup> G418,15% 胎牛血清,2 mmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺,1% 青、链霉素,5% 碳酸氢钠并且调节 pH7.2~7.4。HepG22.2.15 细胞以 1 × 10<sup>4</sup> mL 接种于 96 孔板,培养 24 h 后加药。黑枸杞提取物用培养基溶解,无菌过滤,稀释为不同质量浓度:100、50、25、12.5 mg/L,分组加入 96 孔板中,在同等条件下,设无血清培养基并且不加黑枸杞提取物组为阴性对照组,拉米夫定组(终质量浓度 100、50、25、12.5 mg/L)为阳性对照。加药后每 3 d 收集上清液一次,再加入

新的含药培养基,共孵育 9 d。收集的第 3、6、9 d 上清液于-20 °C 冰箱保存待测<sup>[15]</sup>。

1.2.2.2 黑枸杞提取物细胞毒性实验(MTT 法) 体外培养 HepG22.2.15 细胞用于检测黑枸杞提取物的细胞毒作用。细胞接种于 96 孔板,每孔 190 μL,加入药物处理 9 d。第 9 d 收集上清液后加入新的培养基 190 μL,每孔加入 20 μL MTT,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱再培养 4 h。弃掉上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶解孔内生成的 MTT-甲瓩,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长检测各孔吸光度值,对各孔细胞生成的甲瓩进行定量。与对照组(细胞存活率 100%)进行比较,计算出各孔细胞存活率,以判断药物的细胞毒性作用。

细胞存活率(%) = (实验孔 A 值/对照孔 A 值) × 100<sup>[16]</sup>

1.2.2.3 检测黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 表达的影响 根据双抗体夹心 ELISA 试剂盒说明测定 HepG22.2.15 细胞上清液 HBsAg 和 HBeAg 的表达。计算药物对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的抑制率。

抑制率(%) = (N-P)/(N-空白) × 100

式中,N 为阴性对照孔 A 值;P 为实验对照孔 HbsAg 或 HbeAg 的 A 值;空白为空白孔 A 值。

1.2.3 黑枸杞提取物的抗氧化活性的测定

1.2.3.1 不同浓度提取物对羟自由基(·OH)的清除能力测定 通过 Fenten 反应产生·OH,在试管中依次加入 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液 100 μL,9 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 100 μL,黑枸杞提取物分别配制成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mg/mL 溶液不同浓度提取物 100 μL,8.8 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL 启动整个反应。37 °C 水浴加热 15 min,然后离心机 4000 r/min 离心 3 min。最后在 510 nm 下测定吸光度并设为 A<sub>1</sub>。用 100 μL 蒸馏水代替 FeSO<sub>4</sub> 重复实验得到 A<sub>2</sub>,用 100 μL 去离子水代替提取物重复实验得到 A<sub>3</sub>。用抗坏血酸作为阳性对照,最后按下式计算羟基自由基的清除率:

·OH 的清除率(%) = [A<sub>3</sub> - (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>)]/A<sub>3</sub> × 100

1.2.3.2 不同浓度提取物对 DPPH 自由基(DPPH·)清除能力测定 黑枸杞提取物用 70% 的乙醇配制成 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL 的溶液。配制浓度为 2 × 10<sup>-4</sup> mol/L 的 DPPH·溶液,并分别取不同浓度提取物 200 μL,加入 DPPH 溶液 200 μL,在试管中摇匀并静置,30 min 后测定在 517 nm 处的吸光度 A<sub>1</sub>,以不同浓度提取物 200 μL 和 200 μL 70% 乙醇溶液混合测定的吸光度为 A<sub>2</sub>,200 μL DPPH·溶液和 200 μL 70% 乙醇溶液混合测定的吸光度为 A<sub>3</sub><sup>[17]</sup>。用抗坏血酸作为阳性对照,最后按下式计算对 DPPH 自由基的清除率:

DPPH· 的清除率(%) = [A<sub>3</sub> - (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>)]/A<sub>3</sub> × 100

1.2.3.3 不同浓度提取物还原能力的测定 黑枸杞提取物分别配制成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL

的溶液。将 250  $\mu\text{L}$  pH6.6 磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L)和 250  $\mu\text{L}$  1% 的铁氰化钾溶液混合,取待测提取物溶液 50  $\mu\text{L}$  加到混合液中,在 50  $^{\circ}\text{C}$  条件下保温 20 min,加入 250  $\mu\text{L}$  10% 的三氯乙酸,3000 r/min 离心 10 min,最后取上清液 250  $\mu\text{L}$ ,与 250  $\mu\text{L}$  2.5 mL 蒸馏水和 100  $\mu\text{L}$  0.1% 的氯化铁混合,10 min 后在 700 nm 下测定吸光值,用抗坏血酸作为阳性对照,吸光度值与还原能力呈正比例关系。

### 1.3 数据处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,组间比较采用 t 检验, $p < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞毒性作用

用 MTT 法检测黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞增殖的影响。黑枸杞提取物孵育细胞 9 d 后,结果显示黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞无细胞毒作用,各浓度细胞存活率均  $> 100\%$ ,随着浓度的增加细胞呈增生趋势。而阳性对照组拉米夫定在 50~100 mg/L 对 HepG22.2.15 细胞有一定毒性作用。提示黑枸杞提取物可促进 HepG22.2.15 细胞的生长,结果见表 1。

表 1 黑枸杞提取物对 HepG22.2.15 细胞的毒性作用( $n=3$ )

Table 1 Cytotoxic effects of black wolfberry extracts on HepG22.2.15 cells( $n=3$ )

组别	剂量 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	A 值	存活率 (%)
阴性对照组	-	$0.87 \pm 0.21$	100.00
	100	$1.06 \pm 0.09$	122.61
黑枸杞提取物	50	$1.07 \pm 0.27$	123.54
	25	$0.89 \pm 0.18$	102.25
	12.5	$0.93 \pm 0.08$	107.22
	100	$0.68 \pm 0.08$	78.68
	50	$0.82 \pm 0.07$	94.24
拉米夫定	25	$0.87 \pm 0.01$	100.17
	12.5	$1.01 \pm 0.15$	116.36

### 2.2 黑枸杞提取物对 HBsAg 和 HBeAg 表达影响

黑枸杞提取物作用于细胞后,可抑制 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的分泌。黑枸杞

表 2 黑枸杞提取物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBsAg 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effects of black wolfberry extracts on HBsAg expression in HepG2 2.2.15 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 ( $\text{mg}/\text{L}$ )	3 d		6 d		9 d	
		A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
阴性对照	-	$1.22 \pm 0.16$	-	$0.88 \pm 0.14$	-	$0.33 \pm 0.01$	-
	100	$1.12 \pm 0.01$	8.20	$0.59 \pm 0.05^*$	38.78	$0.29 \pm 0.03^*$	53.22
黑枸杞提取物	50	$1.41 \pm 0.02^*$	-16.80	$0.91 \pm 0.09$	-5.20	$0.48 \pm 0.09$	11.53
	25	$1.48 \pm 0.08$	-23.20	$1.13 \pm 0.04^*$	-32.40	$0.56 \pm 0.11$	-5.80
	100	$0.97 \pm 0.20$	20.49	$0.83 \pm 0.14^*$	33.63	$0.28 \pm 0.07$	55.62
拉米夫定	50	$1.10 \pm 0.20$	24.08	$0.96 \pm 0.02^*$	-3.50	$0.36 \pm 0.06$	-2.10
	25	$1.74 \pm 0.27^*$	-45.30	$1.27 \pm 0.11$	-48.70	$0.70 \pm 0.08^*$	-16.90

注:与阴性对照组比较,\* $p < 0.05$ ;表 3 同。

提取物高浓度和中浓度对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 表达的抑制率呈递增趋势。高质量浓度 100 mg/L 第 3、6、9 d 对 HBsAg 的抑制率分别是 8.20%、38.78%、53.22%。质量浓度 50 mg/L 第 3、6、9 d 对 HBsAg 的抑制率分别是 -16.80%、-5.2%、11.53%,实验结果分析说明,黑枸杞提取物在第 9 d 最高质量浓度 100 mg/L 对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 有抑制作用,其在质量浓度 50 mg/L 时对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 的表达抑制作用弱,前中期第 3、6 d 对 HepG22.2.15 细胞 HBsAg 的表达可能还有促进作用。阳性对照组拉米夫定对 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制作用弱,最高质量浓度 100 mg/L 第 9 d 对 HBsAg 和 HBeAg 抑制率为 17.37%、27.10%,这与本实验室以前的实验结果<sup>[18]</sup>及李桂秋、刘江霞报道的结果一致<sup>[19-20]</sup>。结果见表 2。

黑枸杞提取物高质量浓度和中质量浓度对 HepG22.2.15 细胞 HBeAg 表达的抑制率也呈递增趋势。最高质量浓度 100 mg/L 第 3、6、9 d 对 HBeAg 的抑制率分别是 41.67%、60.45%、72.83%。在质量浓度 50 mg/L 第 3、6、9 d 对 HBeAg 的抑制率分别是 13.34%、14.62%、47.31%,见表 3。根据实验结果分析说明黑枸杞提取物在第 6、9 d 最高质量浓度 100 mg/L 对 HepG22.2.15 细胞 HBeAg 的表达有明显抑制作用,而在质量浓度 50 mg/L 时对 HepG22.2.15 细胞 HBeAg 的表达抑制作用弱,在质量浓度 25 mg/L 时,前中期第 3、6 d 对 HepG22.2.15 细胞 HBeAg 的表达可能还有促进作用。结果见表 3。

### 2.3 黑枸杞提取物的抗氧化活性

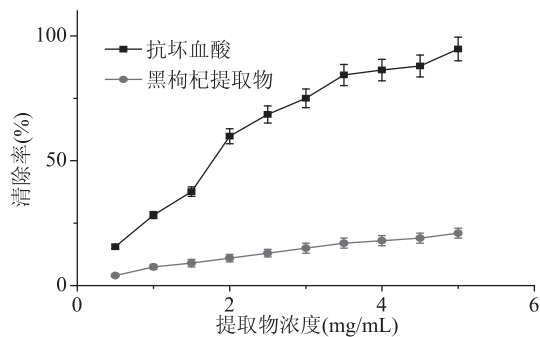
2.3.1 不同浓度提取物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的清除能力 由图 1 可知,黑枸杞提取物浓度与抗坏血酸清除率呈正相关的关系。在相同浓度下,抗坏血酸对  $\cdot\text{OH}$  的清除率要高于黑枸杞提取物对  $\cdot\text{OH}$  的清除率。抗坏血酸  $\text{IC}_{50}$  值为 1.501 mg/mL,黑枸杞提取物  $\text{IC}_{50}$  值为 26.559 mg/mL。图 1 中黑枸杞提取物浓度为 5.0 mg/mL 时清除率最高,为 21.07%。由此可知黑枸杞提取物有羟自由基清除能力,但在同等浓度条件下要低于阳性对照抗坏血酸。

2.3.2 不同浓度提取物对 DPPH 自由基(DPPH $\cdot$ )清除能力 由图 2 可知,黑枸杞提取物浓度的 DPPH $\cdot$  的清除率较高。当黑枸杞提取物在 0.05~0.15 mg/mL



表3 黑枸杞提取物对 HepG2.2.15 细胞 HBeAg 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 3 Effects of black wolfberry extracts on HBeAg expression in HepG2 2.2.15 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 (mg/L)	3 d		6 d		9 d	
		A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
阴性对照	-	1.12 ± 0.08	-	1.67 ± 0.42	-	1.03 ± 0.25	-
	100	0.68 ± 0.06	41.67	0.70 ± 0.05	60.45	0.28 ± 0.02 *	72.83
黑枸杞提取物	50	0.98 ± 0.06	13.34	1.44 ± 0.18	14.62	0.54 ± 0.08 *	47.31
	25	1.19 ± 0.06	-6.08	1.85 ± 0.13 *	-11.20	0.81 ± 0.11	21.37
	100	1.18 ± 0.19	-5.70	1.82 ± 0.64	-9.20	0.97 ± 0.37	27.10
拉米夫定	50	1.33 ± 0.21	-20.10	2.28 ± 0.36 *	-37.70	1.22 ± 0.37	6.92
	25	1.56 ± 0.13 *	-42.50	2.27 ± 0.35 *	-65.90	1.46 ± 0.27	-12.20

图1 黑枸杞提取物对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的清除能力Fig.1 Scavenging effects on hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) of black wolfberry extracts

浓度范围内时,其对 DPPH· 的清除能力明显高于阳性对照抗坏血酸。抗坏血酸  $\text{IC}_{50}$  值为 0.276 mg/mL,图中黑枸杞提取物浓度为 0.30 mg/mL 清除率最高,为 97.25%。所以,黑枸杞提取物具有良好的清除 DPPH· 能力。

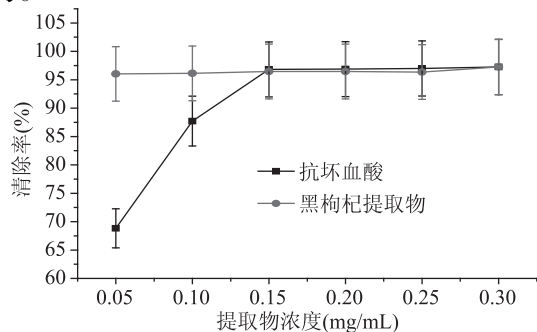


图2 黑枸杞提取物对 DPPH 自由基(DPPH·)清除能力

Fig.2 Scavenging effects on DPPH free radical(DPPH·) of black wolfberry extracts

2.3.3 不同浓度提取物的还原能力 由图3可知,黑枸杞提取物的还原能力随着浓度的增加而逐渐增强。但是在相同浓度下,抗坏血酸的还原能力要高于黑枸杞提取物对的还原能力。图中黑枸杞提取物浓度为 3.0 mg/mL 时清除率最高,为 1.440。因此黑枸杞提取物有还原能力,但同等浓度条件下要低于阳性对照抗坏血酸。

### 3 结论

在研究中发现,黑枸杞提取物在体外对 HepG2.2.15 细胞没有毒性作用,可抑制 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的表达,具有明

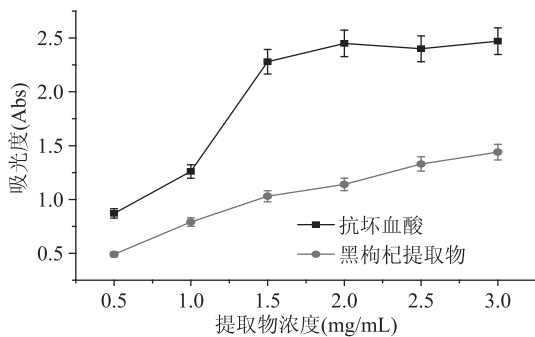


图3 黑枸杞提取物的还原能力

Fig.3 Reducing power of black wolfberry extracts

显的量效和时效关系。同时,黑枸杞提取物有清除  $\cdot\text{OH}$  和 DPPH· 的能力和还原能力,随着提取物浓度的增加其清除能力与还原能力逐渐增强。实验结果与闫亚美等证实黑枸杞提取物抗氧化作用基本一致<sup>[21]</sup>。花青素是黑枸杞的有效成分和呈色的物质<sup>[22]</sup>,所以黑枸杞是天然的自由基清除剂,其抗氧化活性与花青素有关,对肝脏有一定的保护作用,其提取物抗病毒的有效成分和原理值得进行进一步研究。

本实验中所用的阳性药物拉米夫定主要是通过抑制 HBV DNA 的表达<sup>[12]</sup> 发挥治疗乙肝的作用,实验数据显示其对 HepG2.2.15 细胞中 HBsAg 和 HBeAg 的分泌抑制作用不强。本实验结果与 Kruijing 等<sup>[23]</sup> 和 Willian 等<sup>[24]</sup> 报道拉米夫定 HepG2.2.15 细胞中基本不影响 HBsAg 和 HBeAg 的分泌相同。在低浓度 (12.5、25 mg/L) 的时候,反而似乎有促进抗原表达的现象,但这现象随着用药时间的沿长,呈降低趋势,在任衍菊等<sup>[25]</sup> 的报道中也有类似现象。考虑是药物浓度相对低并且作用间短的情况下,受到细胞种板密度和细胞生长速度较快等因素影响造成。

综上所述,黑枸杞提取物能抑制乙肝病毒,并且有着良好的抗氧化保肝作用,可在后续研究中进一步分离提取找到活性单体成分,探讨其体内外抗 HBV 机制,为抗乙肝药物研发提供参考。

### 参考文献

- [1] World Health Organization. Guidelines for the Prevention, Care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection [M]. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] Jung J, Kim N K, Park S, et al. Inhibitory effect of Phyllanthus

urinary L. extract on the replication of lamivudine - resistant hepatitis B virus *in vitro* [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15(1): 255.

[3] Notas G, Koutroubakis I E, Kouroumalis E A. Oxidants and antioxidants in liver disease [J]. Antioxidants: New Research, 2006, (3): 2-48.

[4] 殷红梅. 黑果枸杞色素的提取及其药动学研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2010.

[5] 马继雄. 地道药材黑果枸杞的应用研究进展及青海的发展前景 [J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2012(3): 53-56, 85.

[6] 王宏, 付燕秋, 韩静, 等. AB-8 大孔树脂吸附黑枸杞中花青素行为研究 [J]. 林产化学与工业, 2016(4): 79-86.

[7] 张元德. 黑果枸杞色素微胶囊的制备 [D]. 新疆: 塔里木大学, 2010.

[8] 王二雷. 蓝莓花青素高纯提取物的制备技术及诱导肿瘤细胞凋亡作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.

[9] 赵旭彤. 蓝莓加工废弃物中花青素提取纯化及抗氧化活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[10] 张晶敏, 魏青青, 马琳, 等. 盐酸千金藤碱对 HepG2.2.15 细胞 HBX/NF- $\kappa$ B 通路的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(5): 409-414.

[11] 许君, 高振兴, 马倩, 等. 绿茶儿茶素抗乙型肝炎病毒的分子机制研究 [J]. 营养学报, 2012, 34(4): 368-372.

[12] 蔡旭玲, 邹志辉, 黄晓晖, 等. 不同产地甘草对 HepG2.2.15 细胞表达乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎 e 抗原的影响 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(5): 689-392.

[13] 陈佳, 许昭发, 欧阳红涛, 等. 天花粉提取物对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 表达的影响 [J]. 中南大学学报(医学版), 2012, 37(1): 38-41.

[14] 王宏, 付燕秋, 韩静, 等. AB-8 大孔树脂吸附黑枸杞中花青素行为研究 [J]. 林产化学与工业, 2016(4): 79-86.

(上接第 28 页)

[10] 娄秋艳, 孙汉巨. 黑米花青素微胶囊制备的工艺研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 166-168.

[11] Zhang Liguang, Ouyang Xiaowen, Ni Lijun, et al. Preparation and evaluation of microcapsule containing volatile oil of Herba Schizonepetae by emulsion solvent diffusion method [J]. 天津大学学报: 英文版, 2014, 32(2): 103-111.

[12] Yasushi Y, Kiyomi F, Yoshinari T, et al. Preparation of microcapsules with liquid droplet coalescence method followed by phase separation [J]. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 2013, 3(3): 93-97. [13] Xie Yuliang, Wang Mingjun, Yao Shanqing. Preparation and characterization of biocompatible microcapsules of sodium cellulose sulfate/chitosan by means of layer-by-layer self-assembly [J]. Langmuir, 2009, 25(16): 8999-9005.

[14] Dong Die, Qi Zhengliang, Hua Yufei, et al. Microencapsulation of flaxseed oil by soya proteins-gum arabic complex coacervation [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(8): 1785-1791.

[15] 于安然, 龚普阳, 顾健, 等. 波棱素脂质体对乙肝病毒复制和抗原表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016(5): 45-48.

[16] 赵志鸿, 王丽阳, 郑立运, 等. 艾叶挥发油对 HBV 的抑制作用 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2015(2): 301-304.

[17] 樊星, 闫静, 刘舒, 等. 刺五加根有效组分的抗氧化活性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016(9): 5-8.

[18] 徐庆, 宋芸娟, 陈全斌, 义祥辉. 荔枝核黄酮类化合物对 HepG2.2.15 细胞系 HBsAg 与 HBeAg 表达及 HBVDNA 含量的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2004(20): 1862-1866.

[19] 李桂秋, 陈淑兰, 崔兰英, 等. HepG2.2.15 细胞中 siRNA 与拉米夫定抗乙型肝炎病毒复制作用的比较 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010(7): 727-731.

[20] 刘江霞, 宋武慧, 熊雅婷, 等. 核酸类似物 PNA 在 HepG2.2.15 细胞中对乙型肝炎病毒复制的抑制作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012(6): 363-366.

[21] 闫亚美, 代彦满, 冉林武, 等. 黑果枸杞与 5 种果蔬中花色苷组成及体外抗氧化活性比较 [J]. 食品工业科技, 2014(16): 133-136.

[22] 顾林, 朱洪梅, 顾振新. 花青素的生物合成和成色机理及提高其稳定性的途径 [J]. 食品工业科技, 2007(11): 240-244.

[23] Kruining J, Heijink R A, Schalm S W. Antiviral agents in hepatitis B virus transfected cell lines: inhibitory and cytotoxic effect related to time of treatment [J]. Journal of Hepatology, 1995, 22(3): 263-267.

[24] Delaney W E, Miller T G, Isom H C. Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of (-)- $\beta$ -2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(8): 2017-2026.

[25] 任衍菊, 张玉萍, 金敏, 等. 氧化苦参碱体外抗乙型肝炎病毒作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(14): 175-179.

[15] 廖霞, 杨小兰, 李瑶, 等. 槲皮素微胶囊的贮藏稳定性及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2017, 38(1): 60-66.

[16] 刘嘉. OS-燕麦  $\beta$ -葡聚糖酯自聚集体的构建及应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2015: 1-16.

[17] 樊金玲, 朱文学, 沈军卫, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法分析牡丹花中花色苷类化合物 [J]. 食品科学, 2007, 31(8): 367-371.

[18] 高愿军, 郝莉花, 张鑫, 等. 猕猴桃汁维生素 C 降解动力学的研究 [J]. 农业工程学报, 2006, 22(5): 157-160.

[19] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study [J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(5): 1269-1278.

[20] 闫亚美, 冉林武, 曹有龙. 黑果枸杞花色苷含量测定方法 [J]. 食品工业, 2012, 33(6): 145-147.

[21] 何丽君. 叶黄素油微胶囊的制备及其质量研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.