

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202208034

梁考云, 候师师, 高程海, 等, 2023. 药用红树木榄胚轴抗 HBV 化学成分的研究 [J]. 广西植物, 43(11): 2024–2032.  
LIANG KY, HOU SS, GAO CH, et al., 2023. Anti-HBV chemical constituents from the hypocotyl of pharmaceutical mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Guihaia*, 43(11): 2024–2032.



## 药用红树木榄胚轴抗 HBV 化学成分的研究

梁考云, 候师师, 高程海, 刘永宏, 易湘茜\*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/广西海洋药物重点实验室/药学院, 南宁 530200)

**摘要:** 红树木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 胚轴为京族常用治疗乙肝中草药。为研究木榄胚轴中化学成分及其抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 活性, 该文采用 MTT 法和实时荧光定量 PCR 方法测定木榄胚轴不同萃取部位抗 HBV 活性, 使用现代色谱和波谱方法对活性萃取部位的化学成分进行分离鉴定, 并测试获得的化学成分抗 HBV 活性。结果表明: (1) 红树木榄胚轴的正丁醇萃取部位具有抗 HBV 活性; (2) 从中分离了 11 个化合物, 分别鉴定为尿嘧啶(1)、胸腺嘧啶(2)、腺嘌呤核苷(3)、oryzalactam (4)、正丁基-*O*-D-吡喃果糖苷(5)、nortetillapyrone (6)、(4*R*, 6*S*)-4-methoxyl-2, 3-dihydroaquilegionolide (7)、(4*R*, 6*S*)-2-dihydromenisdaurilide (8)、没食子儿茶素(9)、1-(4-hydroxy-3-methoxy)-phenyl-2-[4-(1, 2, 3-trihydroxypropyl)-2-methoxy]-phenoxy-1, 3-propandiol (10) 和 (-)-南烛木树脂酚-9-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷(11), 其中化合物 4、5、7 和 8 为首次从药用红树木榄中获得, 化合物 4 具有抗 HBV 活性, 其抑制率为 23.59%。该研究结果丰富了木榄胚轴抗 HBV 化学成分。

**关键词:** 木榄胚轴, 化学成分, 分离纯化, 结构鉴定, 抗乙肝病毒活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)11-2024-09

## Anti-HBV chemical constituents from the hypocotyl of pharmaceutical mangrove *Bruguiera gymnorhiza*

LIANG Kaoyun, HOU Shishi, GAO Chenghai, LIU Yonghong, YI Xiangxi\*

(Institute of Marine Drugs/Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy,  
Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

**Abstract:** *Bruguiera gymnorhiza* hypocotyl is a common marine herbal medicine of the Jing people used in the treatment of hepatitis B. Firstly, MTT and real-time fluorescence quantitative PCR methods were used to determine the anti-HBV activity of different extracted parts of *B. gymnorhiza* hypocotyl, the chemical constituents of the active extraction parts were isolated and identified using modern chromatographic techniques and spectroscopic methods, and *in vitro* screening

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(81903533); 广西自然科学基金项目-创新研究团队项目(2020GXNSFGA297002); 广西八桂学者专项基金; 广西中医药大学桂派中医药传承创新团队项目(2022B005); 广西研究生教育创新计划项目(YCXJ2021133); 广西中医药大学桂派杏林拔尖人才资助项目(2022C008); 广西中医药大学高层次人才培育创新团队项目(2022A007)。

第一作者: 梁考云(1997-), 硕士研究生, 主要从事海洋中药物质基础研究, (E-mail) 1906098573@qq.com。

\*通信作者: 易湘茜, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事海洋生物资源应用研究, (E-mail) 42672960@qq.com。

model was employed to test the anti-HBV activity of obtained compounds. The results were as follows: (1) The *n*-butanol phase of the hypocotyl exhibited anti-HBV activity; (2) A total of 11 compounds were isolated and structurally identified, namely uridine (1), thymidine (2), adenosine (3), oryzalactam (4), *n*-butyl-*O*-D-fructopyranoside (5), nortetillapyrone (6), (4*R*, 6*S*)-4-methoxyl-2, 3-dihydroaquilegionolide (7), (4*R*, 6*S*)-2-dihydromenisdaurilide (8), gallcatechin (9), 1-(4-hydroxy-3-methoxy)-phenyl-2-[4-(1, 2, 3-trihydroxypropyl)-2-methoxy]-phenoxy-1, 3-propanediol (10), and (-)-lyoniresinol-9-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (11), among them, compounds 4, 5, 7 and 8 were firstly obtained from *B. gymnorhiza*, and Compound 4 showed anti-HBV activity with an inhibition rate of 23.59%. The study clarify the chemical composition of the anti-HBV of *B. gymnorhiza* hypocotyl.

**Key words:** *Bruguiera gymnorhiza* hypocotyl, chemical constituents, isolation and purification, structural identification, anti-HBV activity

乙型肝炎病毒(HBV)是一种流行性病毒,是引起乙型肝炎(简称乙肝)的病原体,属嗜肝DNA病毒科。全世界目前仍有2.4亿HBV感染者,9300万为中国感染者,其中2000万为乙型肝炎患者。HBV感染引起的乙型肝炎及并发症已成为中国面临的一个主要公共健康问题。目前,临床上应用于治疗乙肝药物拉米夫定(3TC)和干扰素都具有毒副作用且易产生耐药性等缺点(郑慧珂, 2012)。因此,开发抑制HBV复制新型药物,成为乙型肝炎治疗领域急需解决的难题。

京族是世居广西的少数民族,也是中国唯一以海为生的海洋少数民族(何芳东, 2013)。在民族长期发展过程中,京族成就了具有自己民族特色的用药体系,其主要偏重于使用海洋来源的中草药。木榄作为京族传统海洋药物,京族医书有用其主治乙型肝炎的记录(宁小清等, 2013;张帅等, 2016)。依据京族对红树木榄的传统药用,采用现代技术方法阐明其物质基础具有重要的科学意义和潜在的应用价值。课题组前期从木榄胚轴中获得能够抑制乙型肝炎细胞的HBV DNA复制的7个腈类化合物(Yi et al., 2015)。继续深入对木榄胚轴化学成分的研究,从中分离得到一个新生物碱gymnorhizin A,其对乙肝病毒表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎e抗原(HBeAg)有抑制作用(陈志勇等, 2016)。然而,通过分析木榄胚轴提取物中高效液相色谱谱图发现还存在未被报道的化学成分,这不利于木榄胚轴在治疗乙型肝炎药物方面的开发利用。因此,为了全景式阐明木榄胚轴物质基础,继续以木榄胚轴为研究对象,挖掘出更多具有抗HBV活性的化合物,丰富海洋来源的具有抗HBV活性的化合物库,为今后开发木榄胚轴来源新型抗乙肝药物奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器和材料

WatersE2695半制备高效液相色谱仪(美国Waters公司);半制备HPLC色谱柱为Welch Ultimate XB-C18 [10 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, 月旭科技(上海)股份有限公司];分析型HPLC色谱柱为Welch Ultimate XB-C18 [4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, 月旭科技(上海)股份有限公司];Sepacore中压制备色谱(瑞士步琦有限公司);EYELA N-1300V-WB小型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);WFH-203B暗箱式紫外分析仪(杭州奇威仪器有限公司);SW-CJ-2F超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TAdvanced 96 PCR扩增仪(德国Biometra公司);ZWYP-2102恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);Infinite M200PRO全波长多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Light Cycler480 II实时荧光定量PCR系统(瑞士Roche公司);HR1500-II B2生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

柱层析正相硅胶(200~300目,青岛海洋化工厂);薄层硅胶板(烟台化学工业研究所);Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱层析色谱(40~70  $\mu$ m,美国GE Healthcare公司);胎牛血清、DMEM培养液、PBS缓冲液、噻唑蓝MTT、胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司);拉米夫定(3TC)(上海麦克林生化科技有限公司);HBV DNA定量测定试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司)。

实验用的木榄胚轴样品于2019年5月采自广西北仑河口红树林自然保护区(108°12'E、21°36'N),经广西中医药大学海洋药物研究院高程海研

究员鉴别为红树科 (Rhizophoraceae) 木榄属 (*Bruguiera*) 木榄 (*B. gymnorhiza*) 的胚轴, 标本保藏于广西中医药大学海洋药物研究院, 标本编号为 GXIMD M20190517。

### 1.2 提取分离

木榄胚轴新鲜样品 (湿重约 62.0 kg), 使用 95% 工业酒精 (料液比 1 : 3) 浸泡提取 3 次, 每次 7 d, 过滤取滤液, 将滤液合并, 减压浓缩得到浸膏状提取物。依次使用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别依次萃取 3 次, 浓缩后得到石油醚部位 (127.20 g)、乙酸乙酯部位 (178.06 g)、正丁醇部位 (626.00 g) 和水部位 (1 214.00 g)。

### 1.3 抗 HBV 活性部位筛选

通过检测体外 HepG2.2.15 细胞上清液中分泌的 HBV DNA 的含量, 以抑制 HBV DNA 分泌能力大小, 来确定木榄胚轴不同提取部位的抗 HBV 活性。步骤如下。(1) 各部位药液配制: 精密称取各部位粗提物 1 mg, 使用适量 DMSO 溶解后, 加入细胞完全培养基稀释成 500、250、125  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度药液待用。(2) 细胞毒性评价: 采用 MTT 法检测木榄胚轴粗提物和各萃取部位对细胞的毒性作用, 筛选出活性实验给药浓度。将处于对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔板待其贴壁, 加入各萃取部位不同浓度药液, 同时设阴性对照组 (Control) 和拉米夫定 (3TC) 阳性组。培养 72 h 后吸弃上清液, 加入 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 溶液 50  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h, 吸弃旧液每孔加 DMSO 100  $\mu\text{L}$ , 充分振荡。测 490 nm 波长下 OD 值, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) =  $(OD_{\text{实验组A490值}} / OD_{\text{阴性对照孔A490值}}) \times 100$ 。(3) 抗 HBV 活性评价: 利用实时荧光定量 PCR 法 (QPCR), 取对数生长期 HepG2.2.15 细胞, 以每毫升  $5 \times 10^5$  个的细胞密度接种于 24 孔板上, 24 h 贴壁后, 实验组更换含药培养液, 阴性组加入完全培养基, 继续培养。第 6 天收集细胞上清液, 按照病毒 DNA 制备试剂盒的操作步骤获得高纯度的 HBV DNA, 运用乙型肝炎核酸定量检测试剂盒检测细胞上清液 HBV DNA 水平。HBV DNA 抑制率 (%) =  $(\text{阴性对照孔 HBV DNA 拷贝数} - \text{实验孔 HBV DNA 拷贝数}) / \text{阴性对照孔 HBV DNA 拷贝数} \times 100$ 。

### 1.4 化学成分分离

取正丁醇萃取物 (626.0 g) 经硅胶拌样, 采用硅胶柱色谱分离, 以  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 系统 (10 : 0、

10 : 1、5 : 1、20 : 7、0 : 10, V : V) 梯度洗脱, 收集到 13 个组分 [Z(1); Z2(2~3); Z3(4~8); Z4(9); Z5(10~20); Z6(21~28); Z7(29~33); Z8(34~37); Z9(38~43); Z10(44~57); Z11(58~63); Z12(64~82); Z13(83)]。组分 Z3 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇系统 (10 : 0、10 : 1、10 : 2、10 : 4、10 : 10、0 : 10, V : V) 系统洗脱, 得 6 个组分 (d1~d6), 其中 d3 经半制备 HPLC (MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 10 : 90, V : V) 纯化后得化合物 7 (2.3 mg,  $t_{\text{R}}$  = 13.56 min)、化合物 8 (1.6 mg,  $t_{\text{R}}$  = 19.18 min)、化合物 4 (1.1 mg,  $t_{\text{R}}$  = 21.89 min)。组分 Z4 经硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇系统 (10 : 0、10 : 1、10 : 2、10 : 4、10 : 8、0 : 10, V : V) 梯度洗脱, 得 7 个组分 (e1~e7), 其中组分 e4 经半制备 HPLC 纯化后, 在梯度 MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 20 : 80 (V : V) 处得化合物 10 (3.2 mg,  $t_{\text{R}}$  = 21.52 min), 在 MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 40 : 60 (V : V) 处得化合物 11 (2.4 mg,  $t_{\text{R}}$  = 30.52 min)。组分 Z6 在放置过程中出现白色结晶, 多次重结晶后, 经半制备 HPLC 分析为较纯单体, 得化合物 5 (10.2 mg)。组分 Z10 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析色谱, 以甲醇为洗脱溶剂, 流经薄层板合并后得 11 个组分 (a1~a11), 其中组分 a4 经半制备 HPLC (MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 95 : 5, V : V) 纯化后, 得化合物 1 (10.09 mg,  $t_{\text{R}}$  = 7.08 min)、化合物 2 (9.14 mg,  $t_{\text{R}}$  = 17.32 min)、化合物 6 (6.64 mg,  $t_{\text{R}}$  = 9.79 min), 组分 a5 经半制备 HPLC (MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 95 : 5, V : V) 纯化后, 得化合物 3 (4.23 mg,  $t_{\text{R}}$  = 13.05 min)。组分 Z13 (湿重 15 g) 经大孔树脂柱色谱 (流动相分别为水、50% 甲醇、100% 甲醇, 依次冲 5 个柱体积), 得 3 个组分 (b1~b3), 其中组分 b3 经半制备 HPLC (MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 80 : 20, V : V) 纯化后得化合物 9 (2.01 mg,  $t_{\text{R}}$  = 23.45 min)。

### 1.5 单体化合物抗 HBV 活性评价

使用 MTT 实验方法, 以每孔 5 000 个 HepG2.2.15 细胞铺于 96 孔板, 贴壁后, 将分离得到的单体化合物稀释成 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 同时使用 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  拉米夫定 (3TC) 作为阳性对照, 另设阴性对照组。与给药 72 h 后, 酶标仪下 490 nm 处测定 OD 值, 并计算细胞存活率。细胞存活率 (%) =  $(OD_{\text{实验组A490值}} / OD_{\text{阴性对照孔A490值}}) \times 100$ 。

使用实时定量 PCR 实验方法, 将每孔 50 万个 HepG2.2.15 细胞铺于 24 孔板, 贴壁后, 将分离得

到的单体化合物稀释成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 同时使用  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  拉米夫定 (3TC) 作为阳性对照, 另设阴性对照组。使用乙型肝炎核酸定量检测试剂盒检测第 6 天细胞上清液中 HBV DNA 的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性部位筛选结果

高浓度药物作用于细胞, 会引起细胞变形、死亡, 从而导致乙肝病毒标志物分泌量减少, 对药物抗乙肝病毒作用的判定产生影响 (刘建京和林秀玉, 1995)。因此, 需确定对 HepG2.2.15 细胞基本无毒性的药物剂量进行乙肝病毒实验。采用 MTT 方法测定木榄胚轴粗提物 and 不同萃取部位对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响, 确保后续抗 HBV 活性实验在基本无毒的条件下进行。由表 1 可知, 与阴性对照组相比, 粗提物和其他部位在  $500, 250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度下对细胞增殖均有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 水部位对细胞的增殖无抑制作用。粗提物和其他部位在  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  下对 HepG2.2.15 细胞无毒副作用, 后续活性实验可使用  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  或者更低量为给药浓度。

HBV-DNA 为乙肝病毒复制的基础, 也是检测乙肝病毒复制的直接指标, 研究表明慢性 HBV 感染的传染性强弱跟 HBV DNA 水平密切相关, 同时 HBV DNA 复制水平会变化, 乙肝疾病的病理现象也会变化。乙肝病毒 DNA 定量检测是最直接检测其是否发生复制的方法 (王光彦等, 2022)。现今可通过检测给药后 HBV DNA 复制水平来判断是否具有抗 HBV 活性。木榄胚轴粗提物及萃取部位对 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 影响。实验结果如图 1 所示, 与阴性对照组相比, 石油醚部位未表现出抑制细胞上清 HBV DNA 水平作用。木榄粗提物、水部位、正丁醇部位均使细胞上清 HBV DNA 的水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。正丁醇部位抑制 HepG2.2.15 细胞分泌的 HBV DNA 具有极显著作用 ( $P < 0.01$ ), 抑制效果强于木榄胚轴粗提物, 因此选择木榄胚轴正丁醇部位作为研究对象, 进行物质基础研究。

### 2.2 化学成分结构鉴定 (具体结构见图 2)

化合物 1 白色结晶。ESI-MS  $m/z$ : 244.7  $[M+H]^+$ , 分子式:  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 11.31 (1H, s, H-3), 7.89

表 1 木榄胚轴粗提物及各萃取部位对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响

Table 1 Effects of crude extracts and extracted parts of hypocotyl of *Bruguiera gymnorhiza* on proliferation of HepG2.2.15 cells

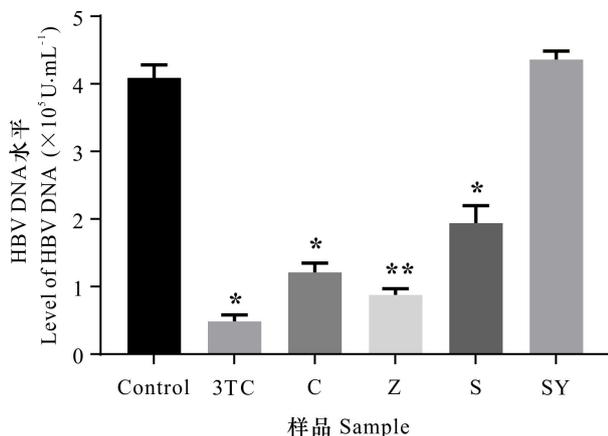
提取物 Extract	细胞存活率 Cell viability (%)		
	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
粗提物 Crude extract	73.66± 6.28a	95.05± 4.61b	102.62± 4.14
石油醚部位 Petroleum ether extract	64.54± 1.81a	90.51± 1.26b	101.59± 6.88
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate extract	44.08± 1.28a	50.81± 0.91a	76.29± 0.86a
正丁醇部位 <i>n</i> -butanol extract	62.22± 3.37a	87.04± 1.37a	93.62± 5.54
水部位 Water extract	95.49± 1.61	92.13± 5.75	95.24± 9.56
拉米夫定 3TC	—	88.11± 1.61	—
阴性对照 Control	—	100.00± 2.36	—

注: a 表示与阴性对照组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); b 表示与阴性对照组比较, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同。

Note: a indicates significant differences vs Control ( $P < 0.05$ ); b indicates extremely significant differences vs Control ( $P < 0.01$ ). The same below.

(1H, d,  $J = 8.07$  Hz, H-6), 5.78 (1H, d,  $J = 5.46$  Hz, H-1'), 5.65 (1H, d,  $J = 8.04$  Hz, H-5), 4.02 (1H, t,  $J = 5.34$  Hz, H-2'), 3.96 (1H, t,  $J = 4.53$  Hz, H-3'), 3.84 (1H, q,  $J = 3.44$  Hz, H-4'), 3.62 (1H, dt,  $J = 3.06, 12.11$  Hz, H-5'), 3.55 (1H, dt,  $J = 3.01, 12.20$  Hz, H-6');  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 150.8 (C-2), 163.2 (C-4), 101.8 (C-5), 140.8 (C-6), 87.7 (C-1'), 69.9 (C-2'), 73.6 (C-3'), 84.9 (C-4'), 60.9 (C-5')。化合物波谱数据与文献 (Wang et al., 2010) 具体报道基本一致, 故鉴定为尿嘧啶。

化合物 2 白色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 243.1  $[M+H]^+$ , 分子式:  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ 。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 11.27 (1H, s, H-3), 7.70 (1H, d,  $J = 1.51$  Hz, H-6), 6.17 (1H, dd,  $J = 6.13, 7.63$  Hz, H-1'), 4.24 (1H, dt,  $J = 2.98, 2.98, 5.86$  Hz, H-3'), 3.76 (1H, q,  $J = 3.72, 3.72, 3.73$  Hz, H-4'), 3.56 (2H, m, H-5'), 2.07 (2H, m, H-2'), 1.77 (3H, d,  $J = 1.18$  Hz,



与阴性对照组比较, \* 表示差异显著( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。C 为粗提物; Z 为正丁醇部位; S 为水部位; SY 为石油醚部位。下同。

Compared with Control, \* indicates significant differences ( $P < 0.05$ ), \*\* indicates extremely significant differences ( $P < 0.01$ ). C is crude extract; Z is *n*-butanol extract; S is water extract; SY is petroleum ether extract. The same below.

图 1 木榄胚轴各提取物对 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 影响

Fig. 1 Effects of each extract of *Bruguiera gymnorhiza* on HBV DNA of HepG2.2.15 cell supernatant

-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 150.5 (C-2), 163.8 (C-4), 109.4 (C-5), 136.2 (C-6), 83.7 (C-1'), 70.4 (C-3'), 87.3 (C-4'), 61.3 (C-5'), 12.3 (5-CH<sub>3</sub>)。化合物波谱数据与文献(姚成芬等, 2018)具体报道基本一致, 故鉴定为胸腺嘧啶。

化合物 3 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 268.1 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式: C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.35 (1H, s, H-8), 8.13 (1H, s, H-2), 7.34 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5.87 (1H, d, *J*=6.24 Hz, H-1'), 4.61 (1H, m, H-2'), 4.14 (1H, dd, *J*=4.97, 2.95 Hz, H-3'), 3.96 (1H, m, H-4'), 3.67 (1H, dd, *J*=12.19, 3.66 Hz, H-5'), 3.55 (1H, dd, *J*=12.17, 3.66 Hz, H-5'); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 119.4 (C-5), 156.2 (C-6), 139.9 (C-8), 87.9 (C-1'), 73.4 (C-2'), 70.7 (C-3'), 85.9 (C-4'), 61.7 (C-5')。化合物波谱数据与文献(Kun et al., 1991)具体报道基本一致, 故鉴定为腺嘌呤核苷。

化合物 4 黄色粉末。ESI-MS *m/z*: 238.2

[M+H]<sup>+</sup>, 分子式: C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.76 (1H, t, *J*=1.55 Hz, 3-H), 6.58 (2H, d, *J*=1.49 Hz, 1, 4-H), 6.05 (1H, s, 6-H), 3.41 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub>), 2.89 (2H, d, *J*=10.83 Hz, 8-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 114.9 (C-1), 152.3 (C-2), 112.0 (C-3), 109.8 (C-4), 72.9 (C-5), 177.6 (C-7), 41.3 (C-8), 134.0 (C-9), 131.8 (C-10), 169.0 (C-11), 51.1 (C-12)。化合物波谱数据与文献(Wang et al., 2014)具体报道基本一致, 故鉴定为 oryzalactam。

化合物 5 无色针状结晶。ESI-MS *m/z*: 235.2 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式: C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ<sub>H</sub>: 3.91 (1H, d, *J*=9.90 Hz, 3'-H), 3.87 (1H, dt, *J*=3.35, 1.65 Hz, 5'-H), 3.76 (3H, m, 1', 4'-H), 3.67 (2H, m, 6'-H), 3.51 (2H, m, 1-CH<sub>2</sub>), 1.56 (2H, dqd, *J*=8.60, 6.64, 2.50 Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 1.40 (2H, m, 3-CH<sub>2</sub>), 0.94 (3H, t, *J*=7.38 Hz, 4-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ<sub>C</sub>: 61.6 (C-1), 33.3 (C-2), 20.5 (C-3), 14.3 (C-4), 63.5 (C-1'), 101.6 (C-2'), 70.6 (C-3'), 71.6 (C-4'), 71.1 (C-5'), 65.2 (C-6')。化合物波谱数据与文献(An et al., 2006)具体报道基本一致, 故鉴定为正丁基-*O*-D-吡喃果糖苷。

化合物 6 白色粉末。ESI-MS *m/z*: 227.2 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.85 (1H, d, *J*=8.09 Hz, H-4), 6.15 (1H, m, H-7), 5.63 (1H, d, *J*=8.08 Hz, H-3), 4.23 (1H, dq, *J*=3.10, 3.21, 6.34 Hz, H-9), 3.78 (1H, q, *J*=3.58 Hz, H-11), 3.55 (2H, m, H-11), 2.08 (2H, m, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 163.2 (C-2), 101.8 (C-3), 140.6 (C-4), 150.5 (C-6), 84.1 (C-7), 39.7 (C-8), 70.4 (C-9), 87.4 (C-10), 61.3 (C-11)。化合物波谱数据与文献(Watanadilok et al., 2001)具体报道基本一致, 故鉴定为 nortetillapyrone。

化合物 7 无色粉末。ESI-MS *m/z*: 169.1 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式: C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 5.86 (1H, d, *J*=1.97 Hz, H-9), 4.92 (1H, ddd, *J*=11.67, 6.18, 1.58 Hz, H-6), 3.75 (1H, m, H-4), 3.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.75

(1H, ddd,  $J=14.23, 4.73, 2.16$  Hz, H-2), 2.33 (1H, tdd,  $J=14.00, 5.60, 1.98$  Hz, H-2), 2.04 (1H, dtd,  $J=12.34, 3.87, 2.03$  Hz, H-5), 1.19 (3H, m, H-5, H-3);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 172.4 (C-1), 34.7 (C-2), 23.7 (C-3), 79.4 (C-4), 42.3 (C-5), 65.1 (C-6), 173.0 (C-8), 111.9 (C-9), 51.3 (CH<sub>3</sub>)。化合物波谱数据与文献(Otsuka et al., 1993)具体报道基本一致,故鉴定为(4*R*, 6*S*)-4-methoxy-2, 3-dihydroaquilegionolide。

化合物 **8** 无色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 155.1 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.86 (1H, d,  $J=1.92$  Hz, H-9), 5.04 (1H, m, H-6), 4.12 (1H, p,  $J=2.87$  Hz, H-4), 2.64 (2H, m, H-2), 2.48 (1H, dd,  $J=6.32, 3.17$  Hz, H-5), 1.96 (1H, ddq,  $J=13.37, 5.30, 2.38$  Hz, H-3), 1.46 (1H, tdd,  $J=13.34, 5.20, 2.34$  Hz, H-3), 1.31 (1H, td,  $J=11.95, 2.39$  Hz, H-5);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 173.1 (C-1), 32.7 (C-2), 40.3 (C-3), 63.9 (C-4), 22.5 (C-5), 78.7 (C-6), 111.4 (C-7), 173.4 (C-8)。化合物波谱数据与文献(Otsuka et al., 1993)具体报道基本一致,故鉴定为(4*R*, 6*S*)-2-dihydromenisdaurilide。

化合物 **9** 黄色油状物。ESI-MS  $m/z$ : 305.2 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.24 (2H, s, H-2', 6'), 5.88 (1H, d,  $J=2.34$  Hz, H-6), 5.69 (1H, d,  $J=2.26$  Hz, H-8), 4.42 (1H, d,  $J=7.04$  Hz, H-2), 3.78 (1H, ddd,  $J=12.44, 7.48, 5.04$  Hz, H-3), 2.61 (1H, m, H-4), 2.34 (1H, m, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 81.0 (C-2), 66.3 (C-3), 27.4 (C-4), 156.4 (C-5), 95.0 (C-6), 156.2 (C-7), 93.8 (C-8), 155.3 (C-9), 98.9 (C-10), 129.8 (C-1'), 106.0 (C-2', C-6'), 145.6 (C-3', C-5'), 132.5 (C-4')。化合物波谱数据与文献(肖云川等, 2015)具体报道基本一致,故鉴定为没食子儿茶素。

化合物 **10** 无色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 411.2 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式: C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.97 (1H, d,  $J=2.07$  Hz, H-2'), 6.93 (1H, m, H-5'), 6.91 (1H, s, H-2), 6.76 (2H, ddt,  $J=14.21, 7.87, 1.70$  Hz, H-6, 6'),

6.65 (1H, dd,  $J=8.19, 1.23$  Hz, H-5), 4.80 (1H, m, H-7), 4.47 (1H, d, 5.84 Hz, H-7'), 4.18 (1H, m, H-8), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (3H, s, OCH<sub>3</sub>'), 3.56 (1H, m, H-8'), 3.39 (1H, dd,  $J=11.94, 5.37$  Hz, H-9), 3.27 (1H, m, H-9'), 1.80 (s, 1H), 1.25 (d,  $J=6.75$  Hz, 2H), 1.19 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 132.4 (C-1), 110.3 (C-2), 147.5 (C-3), 147.4 (C-4), 117.2 (C-5), 119.2 (C-6), 72.6 (C-7), 85.8 (C-8), 60.5 (C-9), 136.5 (C-1'), 110.8 (C-2'), 150.1 (C-3'), 145.8 (C-4'), 114.4 (C-5'), 119.3 (C-6'), 73.7 (C-7'), 76.0 (C-8'), 62.8 (C-9'), 55.1 (OCH<sub>3</sub>), 54.9 (OCH<sub>3</sub>')。化合物波谱数据与文献(Greca et al., 1998)具体报道基本一致,故鉴定为1-(4-hydroxy-3-methoxy)-phenyl-2-[4-(1,2,3-trihydroxypropyl)-2-methoxy]-phenoxy-1,3-propanediol。

化合物 **11** 黄色粉末。ESI-MS  $m/z$ : 551.5 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式: C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>12</sub>。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.57 (1H, s, H-2'), 6.43 (2H, s, H-2, 6), 4.38 (1H, d,  $J=6.63$  Hz, H-7), 4.21 (1H, d,  $J=7.55$  Hz, H-1''), 3.84 (6H, m, 3', 5'-CH<sub>3</sub>), 3.74 (6H, s, 3, 5-CH<sub>3</sub>), 3.64-3.16 (9H, 3', H-9, 9', 2''~5''), 2.71 (1H, dd,  $J=15.20, 4.59$  Hz, H-7'), 2.63 (1H, dd,  $J=15.16, 11.56$  Hz, H-7'), 2.05 (1H, dddd,  $J=10.70, 6.80, 4.08, 2.64$  Hz, H-8), 1.70 (1H, m, H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 138.9 (C-1), 134.4 (C-4), 149.0 (C-3, 5), 106.9 (C-2, 6), 43.0 (C-7), 46.7 (C-8), 70.9 (C-9), 56.8 (3, 5-OCH<sub>3</sub>), 130.1 (C-1'), 107.8 (C-2'), 148.6 (C-3'), 139.4 (C-4'), 147.6 (C-5'), 126.4 (C-6'), 33.9 (C-7'), 40.5 (C-8'), 66.0 (C-9'), 56.6 (3'-OCH<sub>3</sub>), 105.5 (C-1''), 75.0 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 67.0 (C-5''), 60.0 (5''-OCH<sub>3</sub>)。化合物波谱数据与文献(吴兆圆和李蓉涛, 2011)具体报道基本一致,故鉴定为(-)-南烛木树脂酚-9-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷。

### 2.3 单体化合物抗 HBV 活性结果

在给药浓度 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  条件下,与阴性对照组相比,化合物 **1** 和化合物 **10** 作用下 HepG2.2.15 细胞的存活率分别降低了 14.05%、11.10%, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其余化合物对细胞增

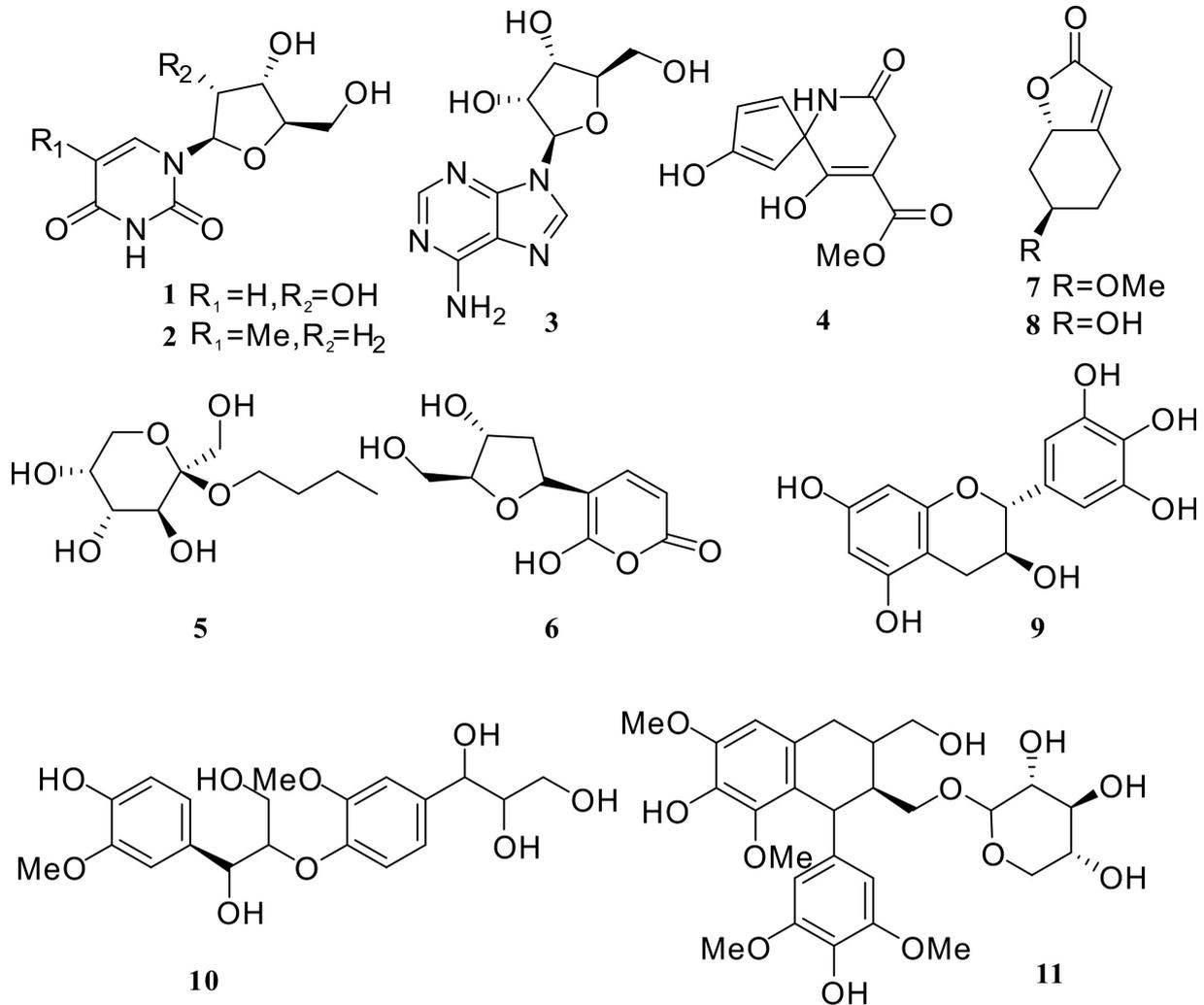


图 2 木榄胚轴的正丁醇部位获得的单体化合物结构式

Fig. 2 Structures formula of monomer compounds from the *n*-butanol extract of *Bruguiera gymnorhiza* hypocotyl

殖无明显抑制作用,即表明对细胞本身无毒副作用,结果如表 2 所示。后续可以选择化合物 2-9 和 11 在给药浓度  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  条件下,进行抗 HBV 活性实验。

由图 3 可知,与阴性对照组相比,化合物 4 能降低 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 水平,但不显著( $P>0.05$ ),其抑制率为 23.59%,其他化合物对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV DNA 水平无明显降低作用( $P>0.05$ )。

### 3 讨论与结论

京族俗称红树为“海榄山”。由于解放前京族聚集区缺乏纯净饮用水,又长期以鱼虾蟹等为主要

食物,因此,肝炎一直是京族的易发疾病。“海榄山”木榄具有清热解毒功效,京族用其主治乙型肝炎。木榄胚轴属可再生生物资源,采摘不会破坏生态环境和红树资源,本研究发发现红树木榄胚轴的正丁醇萃取部位具有抗 HBV 活性,从而验证了京族传统用药的科学性。从活性部位正丁醇萃取相中获得了 11 个化合物,包括 4 个首次从药用红树木榄中获得,即 oryzalactam (4)、正丁基-*O*-D-吡喃果糖苷 (5)、(4*R*, 6*S*)-4-methoxyl-2, 3-dihydroaquilegionide (7)和(4*R*, 6*S*)-2-dihydromenisdaurilide (8),丰富了木榄的化学成分。从木榄中获得的主要有二萜、三萜、酚类、含硫化合物、生物碱类等结构类型(高程海等,2022)。获得的化合物 4 为生物碱类化合物,化合物 5 为糖苷类化合物,化合物 7 和化合物 8 为

表 2 单体化合物对 HepG2.2.15 细胞增殖的作用

Table 2 Effects of monomer compounds on proliferation of HepG2.2.15 cells

样品 Sample	细胞存活率 Cell viability (%)	抑制率 Inhibition rate (%)
Control	100.0±1.4	—
3TC	80.7±3.5a	19.29
1	85.9±0.5a	14.05
2	107.3±0.2a	—
3	102.3±2.6	—
4	101.1±3.1	—
5	106.1±2.5a	—
6	107.8±0.7a	—
7	102.7±0.7	—
8	111.6±1.5a	—
9	110.2±1.3a	—
10	88.9±0.5a	11.10
11	103.0±1.5	—

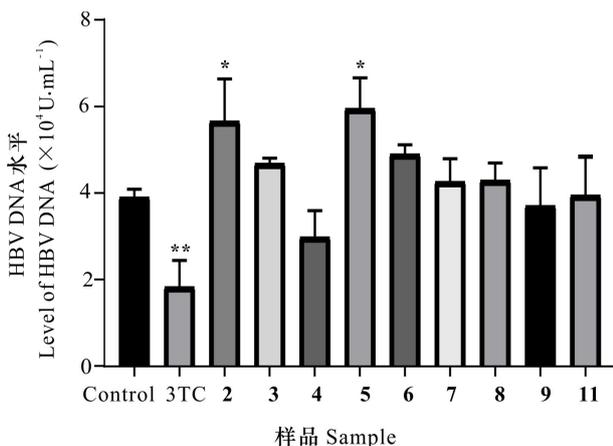


图 3 化合物 2-9 和 11 对 HepG2.2.15 细胞产生 HBV DNA 的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of compounds 2-9, and 11 on production of HBV DNA in HepG2.2.15 cells

内酯类化合物,同时扩大了木榄的化合物结构类型。

研究同时还获得 4 个生物碱类化合物尿嘧啶(1)、胸腺嘧啶(2)、腺嘌呤核苷(3)和 oryzalactam(4)。生物碱是天然产物的重要组成部分,对多种病毒表现出抑制活性,如甲型流感病毒、HBV、HCV、HSV、HIV、寨卡病毒、柯萨奇病毒和烟草花

叶病毒(王宏等,2022)。研究首次报道了生物碱 oryzalactam(4)具有抗乙型肝炎病毒活性,也具有强 ABTS<sup>+</sup>和 DPPH 自由基清除能力(Wang et al., 2014)。因此,猜测 oryzalactam 抗 HBV 活性与其强抗氧化活性有着一定联系,可能是发挥抗氧化活性的基团协同或拮抗了一些生理因子,有利因子的表达水平增强,从而在非细胞毒性浓度下表征出抑制 HBV 的活性。梁晓莲等(2021)研究表明,生物碱发挥抗 HBV 活性机制为直接抑制 HBV DNA 和 HBV cccDNA 产生,而其他生物碱如槐定碱等是通过介导的蛋白激酶(p38 MAPK)水平降低,间接发挥抗 HBV 活性,本研究中生物碱化合物 4 的强抗氧化活性拮抗 HBV DNA 因子的表达水平,进而体现出较为显著的抗 HBV 活性,符合以上猜测。本研究目前关于木榄胚轴化学成分中抗 HBV 活性方面研究较少,后续将根据化合物 4 的紫外吸收波长等关键信息,借助高效液相色谱方法,定向获得更多化合物 4 的同系物科研工作奠定基础,为研制海洋来源的新型抑制 HBV 复制的药物提供先导化合物,来提升红树木榄胚轴的药用价值。

## 参考文献:

- AN N, LIN J, YANG SL, et al., 2006. A new glycoside from *Alpinia officinarum* [J]. *Acta Pharm Sin*, 41(3): 233-235.
- CHEN ZY, QU CH, LU J, et al., 2016. A new antiviral alkaloid from the hypocotyl of *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Guihaia*, 36(2): 236-239. [陈志勇, 曲彩红, 卢静, 等, 2016. 木榄胚轴中一个新生物碱及其抗乙肝病病毒活性研究 [J]. *广西植物*, 36(2): 236-239.]
- DU CZ, HOU XT, HAO EW, et al., 2019. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of marine plant Chinese medicine [J]. *Guangxi Sci*, 26(5): 466-476. [杜成智, 侯小涛, 郝二伟, 等, 2019. 植物类海洋中药化学成分及药理作用研究进展 [J]. *广西科学*, 26(5): 466-476.]
- DU Q, WEI WM, MI DQ, 2016. Knowledge and existing status of medicinal ethnobotany of mangrove among Jing people in Guangxi [J]. *Guihaia*, 36(4): 405-412. [杜钦, 韦文猛, 米东清, 2016. 京族药用红树林民族植物学知识及现状 [J]. *广西植物*, 36(4): 405-412.]
- GAO CH, XIA JL, LIANG KY, et al., 2022. Research progress on secondary metabolites of marine plants and their coepiphytic microorganisms in the Beibu Gulf [J]. *Guihaia*,

- 42(8): 1259–1272. [高程海, 夏家朗, 梁考云, 等, 2022. 北部湾海洋植物及其共附生微生物次级代谢产物研究进展 [J]. 广西植物, 42(8): 1259–1272.]
- GRECA MD, FERRARA M, FIORENTINO A, et al., 1998. Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica* [J]. *Phytochemistry*, 49(5): 1299–1304.
- HE FD, 2013. Dongxing city of Guangxi Jing-ethnic research [D]. Guangzhou: Guangdong Normal University of Technology. [何芳东, 2013. 广西东兴市京族海洋文化研究 [D]. 广州: 广东技术师范学院.]
- KUN HS, JAE CD, SAM SK, 1991. Isolation of adenosine from the rhizomes of *Polygonatum sibiricum* [J]. *Arch Pharm Res*, 14(2): 193–194.
- LIANG XL, LIU XX, LI WL, et al., 2021. Research progress on antiviral of natural products of alkaloids [J]. *J Liaoning Univ Trad Chin Med*, 23(4): 51–57. [梁晓莲, 刘纤纤, 李文莉, 等, 2021. 生物碱类化合物抗病毒研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 23(4): 51–57.]
- LIU JJ, LIN XY, 1995. 2.2.15 the role and limitations of cell lines in the study of anti-HBV drugs [J]. *J Metrop Med Coll*, 16(4): 3–5. [刘建京, 林秀玉, 1995. 2.2.15 细胞系在抗 HBV 药物研究中的作用和局限 [J]. 首都医学院学报, 16(4): 3–5.]
- NING XQ, LIN YB, TAN YF, 2013. Study on the species of medicinal mangroves in Guangxi and their folk medicinal efficacy [J]. *Chin Med Guid*, 11(18): 73–75. [宁小清, 林莹波, 谈远锋, 2013. 广西药用红树植物种类及其民间药用功效研究 [J]. 中国医药指南, 11(18): 73–75.]
- OTSUKA H, ITO A, FUJIOKA N, et al., 1993. Butenolides from *Sinomenium acutum* [J]. *Phytochemistry*, 33(2): 389–392.
- WANG CY, HAN L, KANG K, et al., 2010. Secondary metabolites from green algae *Ulva pertusa* [J]. *Chem Nat Compd*, 46(5): 828–830.
- WANG GY, MU XQ, ZENG ZJ, et al., 2022. Research progress on the correlation between hepatitis B surface antigen quantitative detection technology and HBV-DNA [J]. *J Mol Diagn Ther*, 14(1): 177–180. [王光彦, 慕晓琼, 曾昭杰, 等, 2022. 乙肝表面抗原定量与 HBV-DNA 相关性的研究进展 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 14(1): 177–180.]
- WANG H, LIU Y, YANG LY, et al., 2022. Research progress on antiviral activities and mechanism of alkaloids [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 53(9): 2839–2850. [王宏, 刘月, 杨梁钰, 等, 2022. 生物碱类化合物抗病毒活性及其机制研究进展 [J]. 中草药, 53(9): 2839–2850.]
- WANG W, GUO J, ZHANG J, et al., 2014. New screw lactam and two new carbohydrate derivatives from the methanol extract of rice bran [J]. *J Agric Food Chem*, 62(44): 10744–10751.
- WATANADILOK R, SONCHAENG P, KIJJOA A, et al., 2001. Tetillapyrone and nortetillapyrone, two unusual hydroxypyran-2-ones from the marine sponge *Tetilla japonica* [J]. *J Nat Prod*, 64(8): 1056–1058.
- WU ZY, LI RT, 2011. Chemical constituents from the roots of *Rhododendron spiciferum* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 23(2): 253–257. [吴兆圆, 李蓉涛, 2011. 碎米花杜鹃根的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 23(2): 253–257.]
- XIAO YC, ZHAO MX, YAN CQ, et al., 2015. Studies on chemical constituents from fresh pine needles of *Pinus massoniana* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 46(23): 3460–3465. [肖云川, 赵曼茜, 闫翠起, 等, 2015. 马尾松鲜松叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 46(23): 3460–3465.]
- YAO CF, WANG Y, JIANG L, et al., 2018. Chemical constituents from *Sedum bulbiferum* [J]. *J Chin Med Mat*, 41(6): 1369–1371. [姚成芬, 汪洋, 蒋礼, 等, 2018. 珠芽景天的化学成分研究 [J]. 中药材, 41(6): 1369–1371.]
- YI XX, DENG JG, GAO CH, et al., 2015. Four new cyclohexylideneacetone nitrile derivatives from the hypocotyl of mangrove (*Bruguiera gymnorhiza*) [J]. *Molecules*, 20(8): 14565–14575.
- ZHANG S, HUANG SS, YANG JF, et al., 2016. First exploration of Jing nationality medicine [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 25(2): 1–2. [张帅, 黄思诗, 杨家福, 等, 2016. 京族医药初探 [J]. 中国民族民间医药, 25(2): 1–2.]
- ZHENG HK, 2012. Evolution of YMDD mutant and its impact on virologic response during rescue therapy in chronic hepatitis B patients with lamivudine resistance [D]. Guangzhou: Southern Medical University. [郑慧珂, 2012. 拉米夫定耐药的慢乙肝患者救援治疗过程中 YMDD 变异的演化及其对治疗疗效的影响 [D]. 广州: 南方医科大学.]

(责任编辑 周翠鸣)