

苦参碱类生物碱联合恩替卡韦抗耐药 HBV 的作用效果及机制分析

陈佳欣^{1,2}, 沈宏辉², 刘晓琼², 王伽伯²,
邹文俊¹, 王世宇^{1*}, 肖小河^{2,3*}

(1. 成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 2. 解放军第302医院 全军中药研究所, 北京 100039; 3. 解放军第302医院 中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039)

[摘要] 目的:研究苦参碱类生物碱联合恩替卡韦抗耐药乙型肝炎病毒(HBV)的作用效果以及对 p38 MAPK, 钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(NTCP)表达的影响。方法:以解放军第302医院自行构建的恩替卡韦耐药乙型肝炎病毒复制细胞株 HepG2. A64 为模型,采用 CPE, CCK-8 分别考察苦参碱类生物碱氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、槐定碱和核苷类药物恩替卡韦单独用药及两者联合用药的细胞毒性;采用酶免疫法(ELISA),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白质免疫印迹法(Western blot)分别观察联合用药对 HepG2. A64 细胞 HBsAg 分泌, HBV DNA 复制, p38 和 NTCP mRNA 表达, 细胞中 p38 和 p-p38 蛋白表达水平的影响。结果:与单独用药比较,氧化苦参碱和恩替卡韦联合用药 72 h 后能显著抑制 HBsAg 分泌, HBV DNA 复制($P < 0.05$),同时能显著降低 NTCP 基因和蛋白的表达水平以及磷酸化 p38 蛋白水平。结论:氧化苦参碱联合恩替卡韦可能通过下调 NTCP 的表达同时抑制 p38 蛋白磷酸化达到抗病毒的效果。氧化苦参碱联合恩替卡韦能显著增强抗耐药 HBV 病毒的效果。

[关键词] 氧化苦参碱; 恩替卡韦; 乙型肝炎病毒; 联合用药; 抗病毒; 钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白; p38

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0107-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010107

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1434.004.html>

[网络出版时间] 2016-10-27 14:34

Anti-HBV Effect and Mechanism of Sophora Alkaloids Combined with Entecavir

CHEN Jia-xin^{1,2}, SHEN Hong-hui², LIU Xiao-qiong², WANG Jia-bo²,
ZOU Wen-jun¹, WANG Shi-yu^{1*}, XIAO Xiao-he^{2,3*}

(1. *Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China;*
2. *China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;*
3. *Integrative Medical Center, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-hepatitis B virus (HBV) effects of sophora alkaloids combined with entecavir, and observe its effect on p38 MAPK and sodium taurocholate cotransporting poly peptide

[收稿日期] 20151124(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8133090);山东省协同创新项目(XTCX2014B01-06)

[第一作者] 陈佳欣, 硕士, 从事中药学研究, Tel: 028-61800231, Email: qssc@163.com

[通讯作者] *王世宇, 博士, 副教授, 从事中药新制剂、新剂型与中药质量标准研究, Tel: 028-61800231, E-mail: wangshiyu@edutcm.edu.cn;

*肖小河, 博士, 研究员, 从事中药学研究, Tel: 010-66933322, E-mail: pharmacy302@126.com

(NTCP) expression levels. **Method:** Entecavir-resistant hepatitis HBV replication cell lines HepG2. A64 were used as the models, and then CPE and CCK-8 were used respectively to investigate the cytotoxicity in case of oxymatrine, matrine, sophoridine, sophocarpine or nucleoside drug entecavir as well as combined use of entecavir and any above sophora alkaloids. The levels of HbsAg, HBV DNA replication, p38 and NTCP mRNA expression, as well as p38 and p-p38 protein expression levels were detected by ELISA, Real-time PCR and Western blot. **Result:** As compared with medication alone, HbsAg secretion, HBV DNA replication were significantly inhibited 72 h after combined use of oxymatrine and entecavir, and NTCP expression levels and p38 phosphorylation levels were significantly reduced. **Conclusion:** The combined use of oxymatrine and entecavir could achieve the anti-HBV effect by down-regulating the expression of NTCP and inhibiting the phosphorylation of p38. The combined use of oxymatrine and entecavir could significantly increase anti-HBV effect.

[**Key words**] oxymatrine; entecavir; hepatitis B virus; drug combination; antiviral; sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP); p38

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒(HBV)感染导致的肝脏炎症,我国约有 1 亿 2 千万的慢性感染者,是我国最严重的公共卫生问题之一。目前慢性乙型肝炎多采用恩替卡韦(entecavir, ETV)等核苷类药物进行抗 HBV 治疗,研究表明该类药物的主要作用在于病毒 DNA 聚合酶起到抗病毒作用^[1]。但是,HBV 基因组具有高变异性,长期应用核苷类药物容易诱发病毒基因耐药性突变、病毒学反弹和突破,随着核苷类药物耐药病毒株的日益增多,单一用药将导致药物疗效的持续降低耽误患者病程。因此,寻求新的治疗手段,改善恩替卡韦等核苷类药物的病毒耐药性,是治疗乙肝的关键。目前,联合用药是改善乙肝病毒耐药性并提高疗效的重要手段^[2]。

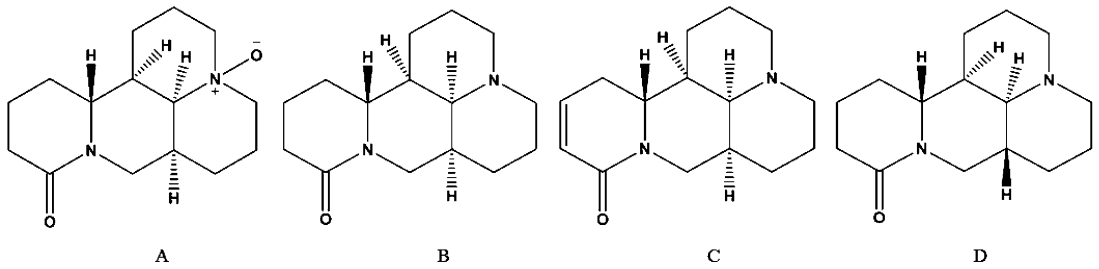
在中药抗 HBV 的探究过程中,研究显示山豆根、苦参等富含苦参碱类生物碱的中药材具有显著抑制乙肝病毒的作用,而起作用的化学成分主要为氧化苦参碱、苦参碱,槐果碱和槐定碱^[3-7]。苦参碱类生物碱可以通过改变细胞内环境发挥抗病毒作用^[8],其作用机制不同于核苷类药物,同时前期实验结果表明氧化苦参碱、苦参碱与拉米夫定的体外联合作用能显著改善病毒耐药性并且增强对乙肝的治疗效果。然而目前的研究多针对于苦参碱类生物碱中的氧化苦参碱和苦参碱进行单独或与拉米夫定联合的抗病毒实验,对于苦参碱类生物碱的其他生物碱槐果碱、槐定碱体外抗乙肝病毒效果以及针对耐药病毒的抗病毒作用机制的研究却鲜有报道。因此,为评价苦参碱类生物碱与核苷类药物联合用药的抗耐药 HBV 效果,本实验选择耐药 HBV 复制细胞株 HepG2. A64 作为体外模型^[9-10],选用氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、槐定碱等苦参碱类生物碱联合

恩替卡韦进行抗 HBV 实验,并进一步研究联合用药对 p38, 钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)蛋白的影响,并探讨其潜在作用机制。

1 材料

1.1 细胞系 HepG2. A64 细胞由解放军第 302 医院徐东平教授构建并惠赠,本实验室传代保存。HepG 2. A64 细胞为自主复制 HBV 的肝癌细胞系,能够持续复制并产生特异性抗原和分泌型病毒颗粒,病毒来源于我国流行的 C 基因型病毒株,含有典型的恩替卡韦耐药突变位点(rtL180M + rtM204V + rtT184L)。

1.2 药物及试剂 氧化苦参碱(oxymatrine, 纯度 98%), 苦参碱(matrine, 纯度 98%), 槐果碱(sophocarpine, 纯度 98%), 槐定碱(sophoridine, 纯度 98%) 购自陕西昂盛生物医药科技有限公司,4 种生物碱的结构式如图 1;恩替卡韦为中美上海施贵宝制药有限公司产品。HbsAg 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(北京科卫临床诊断试剂有限公司,批号 20080202),细胞增殖试剂盒(CCK-8)试剂盒(日本东仁化学公司,批号 JA845),乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司,批号 20150108);RIPA 蛋白裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒,p38, p-p38, β -肌动蛋白(β -actin)一抗,山羊抗小鼠二抗(上海碧云天生物技术有效公司,批号分别为 20150506, 8690S, 9211S, 12262);NTCP 一抗及对应二抗均(美国 Abcom 公司,批号均为 Ab131084),p38 及 NTCP 引物(上海捷瑞生物工程有限公司),cDNA 逆转录试剂盒(美国 ABI 公司,批号 4368813),SYBGreen 荧光定量试剂盒(美国 Life 公司,批号 KA1202EA)。



A. 氧化苦参碱; B. 苦参碱; C. 槐果碱; D. 槐定碱

图 1 各苦参碱类生物碱化学结构式

Fig. 1 Structures of sophora alkaloids

1.3 仪器 MCO3/15AC 型二氧化碳培养箱(日本三洋公司), XSB3/1A 型倒置显微(上海蔡康光学仪器有限公司), ELX 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), ABI7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 采用 DMEM(含 5% 胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素及 100 mg·L⁻¹链霉素)于 37 ℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 HepG2. A64, 2~3 d 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 对 HepG2. A64 细胞的毒性检测

2.2.1 单独用药对 HepG2. A64 细胞的毒性检测 采用细胞病变(CPE)法, 将 HepG2. A64 细胞以 2 × 10⁵ 个/mL 接种 96 孔板, 每孔加入细胞悬液 100 μL。24 h 后换含药完全培养基, 将氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、槐定碱质量浓度配为 12 800, 6 400, 3 200, 1 600, 800, 400, 200 mg·L⁻¹, 恩替卡韦质量浓度分别为 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L⁻¹, 每个质量浓度接种 4 个复孔, 设置细胞空白, 置于 5% CO₂ 37 ℃ 孵箱中培养, 每天观察细胞形态, 连续观察 7 d, 记录 CPE 结果, “0”为无 CPE, “1”为 CPE 为 1%~25%, “2”为 CPE 为 25%~50%, “3”为 CPE 为 50%~75%, “4”为 CPE 为 75%~100%, 计算各稀释度的细胞死亡率。按 Reed-Meunch 法计算半数毒性浓度(TC₅₀)。

2.2.2 联合用药对 HepG2. A64 细胞的毒性检测

根据单独用药结果, 选择药物浓度为 0.2, 0.4, 0.8 mmol·L⁻¹的氧化苦参碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱分别与 10 μmol·L⁻¹恩替卡韦联合应用。细胞毒性检测方法按照 CCK-8 试剂盒说明书, 药物作用细胞 3 d 后吸出上清, 加入新鲜的 DMEM 与 CCK-8 混合液 100 μL(9:1), 置于 37 ℃ 孵箱中孵育 1 h 后检测 450 nm 吸光度 A, 对照组只加培养液, 并根据公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2.3 对 HepG2. A64 细胞分泌 HBsAg 的检测

2.3.1 单独用药对 HepG2. A64 细胞 HBsAg 表达的抑制作用 将 HepG2. A64 细胞以 2 × 10⁵ 个/mL 接种 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液。24 h 后换含药完全培养基, 药物浓度选择同 2.2.1 项, 每个浓度 3 个复孔, 作用 3 d 后收集上清, ELISA 法检测培养上清的 HBsAg, 实验操作按试剂盒说明书执行。显色反应后, 酶标仪读取 A 值, 结果根据公式计算抑制率。采用 SPSS 17 软件中 Probit 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。根据 TC₅₀ 和 IC₅₀ 计算治疗指数(TI = TC₅₀/IC₅₀), 以作用 3 d 的 TI 为标准, TI ≤ 1 评判此药物为无效高毒, 1 < TI < 2 评判此药物为低效高毒, TI > 2 评判此药物为有效低毒。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3.2 联合用药对 HepG2. A64 细胞 HBsAg 表达的抑制作用 接种及加药方法同 2.2.2 项, 设置单独用药空白和空白空白, 收集药物作用 24 h 和 72 h 后的细胞培养上清, -20 ℃ 保存统一检测, ELISA 法检测培养上清的 HBsAg, 实验操作按试剂盒说明书执行。

2.4 Real-time PCR 法检测 HepG2. A64 细胞 HBV DNA, p38, NTCP 核酸的表达 采用 Real-time PCR 检测 2.3.2 项收集上清液中的 HBV DNA, 实验操作按试剂盒说明书进行, 每个样品做 3 个重复。根据公式计算抑制率。另接种细胞于 6 孔板中, 给药 3 d 后使用试剂盒提取细胞总 RNA, 逆转录后扩增目的基因(基因序列见表 1)。

$$\text{抑制率} = (\text{空白组 HBV DNA 量} - \text{用药组 HBV DNA 量}) / \text{空白组 HBV DNA 量} \times 100\%$$

2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 HepG2. A64 中 p38, p-p38 蛋白的表达 接种及加药方法同 2.2.2 项, 加药 72 h 后加入 RIPA 及磷酸酶

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of NTCP, p38 and β -actin

基因	引物序列
NTCP	上游 5'-CCTCAATGACCGTGACAGAC-3'
	下游 5'-GAGAAGCCCTTCTCCAAGCTG-3'
p38	上游 5'-TACGTGGCCACTAGGTGGTA-3'
	下游 5'-CAACAGCTCGGCCATTATGC-3'
β -actin	上游 5'-ACGGCCAGGTCATCACCAT-3'
	下游 5'-AGGCTGGAAGAGTGCCTCAG-3'

抑制剂提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白质浓度,变性后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将凝胶中分离的蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶室温封闭 2 h 后,分别加入 1:1 000 稀释的 p38, p-p38, β -肌动蛋白(β -actin)一抗溶液,4 °C 孵育过夜,次日用 TBST 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗溶液,室温孵育 2 h, ECL 化学发光显影,暗匣中曝光,显影、定影。将胶片进行凝胶图像分析,扫描存档,Alpha 软件处理系统分析目标带的吸光度。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 单独用药对 HepG2. A64 细胞 TI 指数比较 根据 CPE 和 IC_{50} 结果计算治疗指数 TI,氧化苦参碱的 TI 值为 3.25,苦参碱的 TI 值为 2.15,槐果碱的 TI 值为 2.02,槐定碱的 TI 值 2.24,4 种生物碱均属于有效低毒药物。为了进一步比较 4 种苦参碱类生物碱和恩替卡韦联合抗病毒效果,需要选择联合之后仍然无毒的浓度,故选择生物碱 TC_{50} 及以下, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (约 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (约 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (约 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为实验浓度。见表 2,3。

3.2 联合用药细胞毒性 通过 CCK-8 法检测给药后细胞存活率,结果显示 4 种苦参碱类生物碱(氧化苦参碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱)与恩替卡韦联合用药后的细胞存活率均能达到 90% 以上,说明联合用药对细胞毒性较小。

3.3 联合用药对 HepG2. A64 细胞分泌 HBsAg 的抑制作用 氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱和槐定碱联合恩替卡韦的抗 HBV 效果见图 2,苦参碱类生物碱单用对 HBsAg 的表达呈浓度依赖性地抑制。给药 24 h 后,4 种生物碱在 $0.2, 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,苦参碱/恩替卡韦、槐果碱/恩替卡韦联合给药组对 HBsAg 的抑制效果优于其他 2 种联合给药组;4 种生物碱在 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,恩替卡韦联合 4 种苦参

表 2 各组 CPE 的观察

Table 2 Observation of CPE in each groups

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	每孔病变 程度				平均病变 程度	病变率 /%	
氧化苦参碱	12 800	4	4	4	4	4	100	
	6 400	4	3	4	4	3.75	93.75	
	3 200	1	2	1	1	1.25	31.25	
	1 600	0	0	0	0	0	0	
	800	0	0	0	0	0	0	
	400	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	
苦参碱	3 200	4	4	4	4	4	100	
	1 600	3	3	3	3	3	75	
	800	1	0	1	1	0.75	18.75	
	400	0	0	0	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	
	槐果碱	3 200	4	4	4	4	4	100
		1 600	4	4	4	4	4	100
800		3	3	3	3	3	75	
400		1	1	1	1	1	25	
200		0	0	0	0	0	0	
0		0	0	0	0	0	0	
槐定碱		3 200	4	4	4	4	4	100
		1 600	3	3	4	3	3.25	81.25
	800	1	2	1	1	1.25	31.25	
	400	1	0	1	0	0.5	12.5	
	200	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	
	恩替卡韦	100	4	4	4	4	4	100
		50	3	2	2	2	2.25	56.25
25		1	2	1	1	1.25	31.25	
12.5		0	0	0	0	0	0	
6.25		0	0	0	0	0	0	
0		0	0	0	0	0	0	
0		0	0	0	0	0	0	
0		0	0	0	0	0	0	

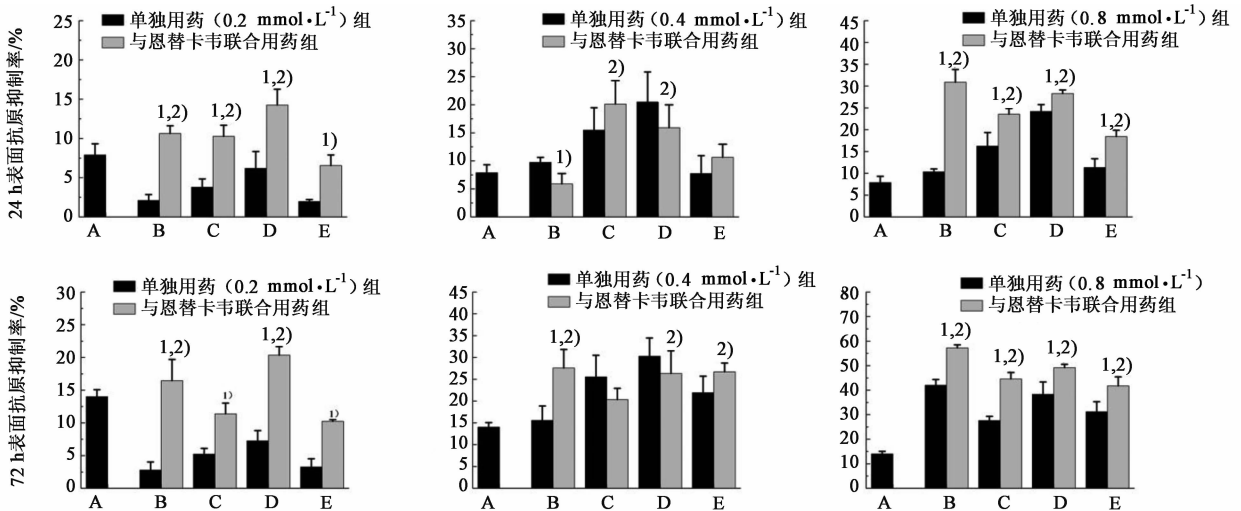
表 3 各给药组的 TC_{50} 和 IC_{50}

Table 3 TC_{50} and IC_{50} of each dosage group $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	TC_{50}	TC_{50}	IC_{50}
氧化苦参碱	1 600	3 981.07	1 224.00
苦参碱	400	1 166.00	541.67
槐果碱	200	562.34	277.808
槐定碱	200	1 036.55	463.406
恩替卡韦	12.5	42.17	40.555

类生物碱对 HBsAg 的抑制率均高于相应的生物碱和恩替卡韦单用组,氧化苦参碱联合恩替卡韦给药组抑制率最强(42.05%),明显高于其他 3 种生物碱联合给药组。给药 72 h 后,4 种生物碱在 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,氧化苦参碱、槐定碱与恩替卡韦的联合给药组抑制效果明显增强,尤其是氧化苦参碱联合恩替卡韦给药组,抑制率分别达到 27.58% 和 57.23% 显著优于 2 种药物单独效果。苦参碱类生物碱与恩替卡韦联合各组间比较,具有统计学差异($P < 0.05$)。

3.4 联合用药对耐药 HBV DNA 的抑制作用



A. 恩替卡韦组; B. 氧化苦参碱组; C. 苦参碱组; D. 槐果碱组; E. 槐定碱组。与生物碱单独使用比较¹⁾ $P < 0.05$; 与恩替卡韦单独使用比较²⁾ $P < 0.05$ (图 3 同)

图 2 联合用药对 HepG2. A64 细胞分泌 HBsAg 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Inhibitory effect of combination on HBsAg in HepG2. A64 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

单独用药及联合用药对细胞上清中 HBV DNA 的抑制作用见图 3。给药 24 h 后, 4 种生物碱在 0.8 mmol·L⁻¹ 浓度下, 苦参碱类生物碱单独用药对 HBV DNA 的抑制效果与恩替卡韦的单用比较并无明显优势, 2 种药物联合后对 HBV DNA 的抑制率增加, 显著优于两者单独用药, 联合用药对 HBV DNA 的

抑制率均在 50% 以上; 给药 72 h 后, 4 种苦参碱类生物碱分别联合恩替卡韦应用后对 HBV DNA 的抑制率均大于 50%, 优于两者的单独用药, 其中氧化苦参碱联合恩替卡韦的抑制率最高达到 76.35%。苦参碱类生物碱与恩替卡韦联合各组分间比较, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

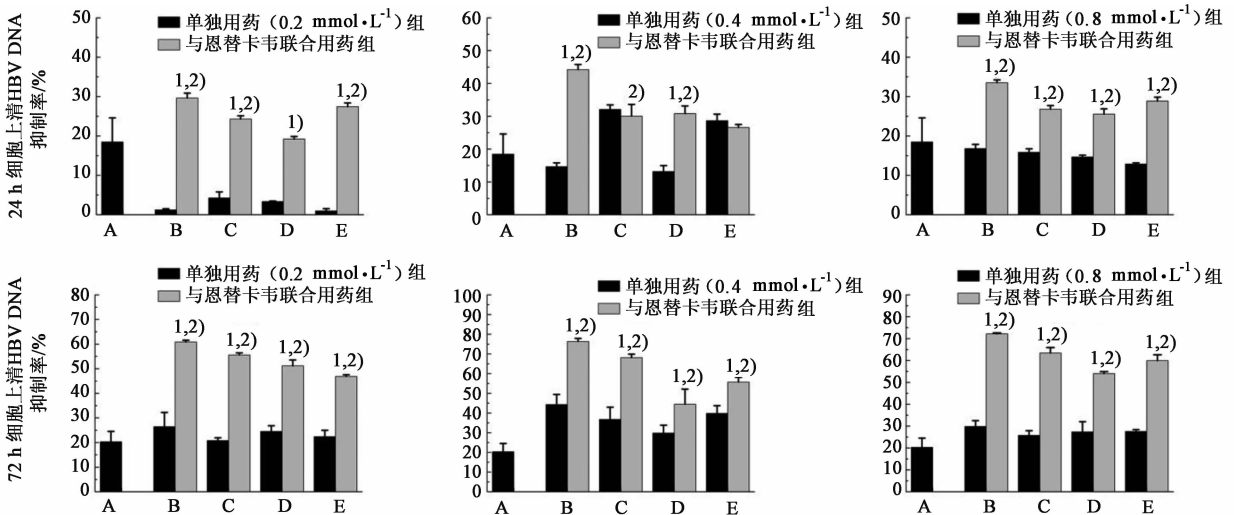


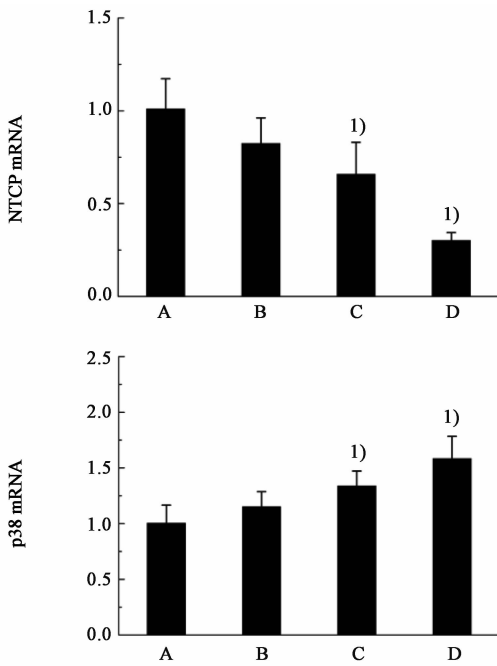
图 3 联合用药对耐药 HBV DNA 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Inhibitory effect of combination on resistant HBV DNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 氧化苦参碱与恩替卡韦联用对 p38, NTCP mRNA 表达的影响 与空白组比较, 氧化苦参碱与恩替卡韦联用组的 p38 mRNA 表达水平升高, NTCP mRNA 表达水平下降, 有统计学差异 ($P < 0.01$)。见图 4。

3.6 氧化苦参碱与恩替卡韦联用对 p38, p-p38 蛋

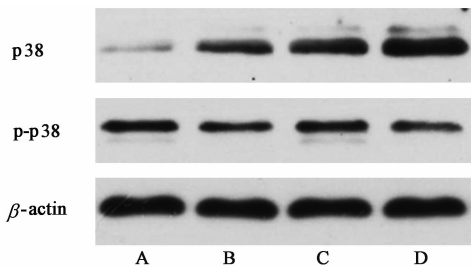
白表达的影响 联合给药组 p-p38 蛋白条带明显减弱, 而 p38 蛋白条带明显增强。半定量灰度值分析结果显示, 联合给药组比较单独给药及空白组, p-p38 蛋白表达水平显著下降, 而 p38 蛋白总量显著上升 ($P < 0.01$), 各组管家蛋白 β -actin 条带基本一致。见图 5, 表 4。



A. 空白组; B. 恩替卡韦 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 氧化苦参碱 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 氧化苦参碱 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 恩替卡韦 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

图 4 氧化苦参碱与恩替卡韦联合用药对 HepG2. A64 中 NTCP 和 p38 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of combination of oxymatrine and entecavir on expression of NTCP and p38 mRNA in the cell of HepG2. A64 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A. 空白组; B. 氧化苦参碱 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 恩替卡韦 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 氧化苦参碱 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 恩替卡韦 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 5 HepG2. A64 细胞中 p38, p-p38 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of p38 and p-p38 protein in HepG2. A64

表 4 氧化苦参碱和恩替卡韦联合用药对 HepG2. A64 细胞中 p38, p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of concomitant drugs (oxymatrine and entecavir) on expression of p38 and p-p38 protein ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-p38/ β -actin	p38/ β -actin
空白	-	0.551 \pm 0.025	0.112 \pm 0.124
氧化苦参碱	800	0.417 \pm 0.017 ¹⁾	0.515 \pm 0.243 ¹⁾
恩替卡韦	0.4	0.540 \pm 0.058	0.698 \pm 0.315 ²⁾
氧化苦参碱 + 恩替卡韦	800 + 0.4	0.363 \pm 0.005 ²⁾	0.912 \pm 0.187 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

恩替卡韦是目前临床使用的抗乙肝病毒核苷类药物,主要通过作用于病毒 DNA 聚合酶抑制 HBV 复制,虽然具有较好的疗效,但是长期使用后病毒会产生耐药性。为了缓解病毒基因变异导致病毒对恩替卡韦产生耐药性,同时提高药效,本研究以氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、槐定碱等 4 种苦参和山豆根中含有的生物碱与核苷类药物恩替卡韦联用,考察了二者联用对恩替卡韦耐药 HBV 复制细胞株 HepG2. A64 的体外抗病毒效果。结果表明,在选择的实验浓度下,氧化苦参碱和恩替卡韦联用可显著降低 HBV DNA 和 HBsAg 的水平,且抑制率随时间延长而升高,并且不具有细胞毒性,药效优于两种药物的单独使用。

进一步探究发现,氧化苦参碱与恩替卡韦联合用药能够有效地降低 p38 的磷酸化水平。研究显示, p38 作为入核蛋白在 HBV 过程中起着重要作用。HBV 的复制将诱导 p38 MAPK 的活化,其主要通过 MAPK 级联活化,激活的 p38 能够调节多种核转录因子,如核转录因子- κ B (NF- κ B), 转录激活因子-2 (ATF-2) 等基因的表达,还能影响转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的合成^[11]。这些蛋白的活化将进一步加重乙肝病毒对机体的侵袭,加快 HBV 的转录复制,因此抑制 p38 的活化能够降低 HBV 的复制表达^[12-14]。在本实验中,氧化苦参碱与恩替卡韦的联合用药显示, p38 的磷酸化水平得到有效降低, HepG2. A64 细胞分泌 HBsAg 的抑制率以及 HBV DNA 的抑制率实验结果进一步佐证氧化苦参碱/恩替卡韦联合用药可能竞争性抑制 p38 蛋白激酶。这也提示,氧化苦参碱/恩替卡韦联合用药能够通过抑制 p38 的磷酸化发挥抗 HBV 的作用。

NTCP 作为 HBV 的功能性受体蛋白,其主要介导 HBV 感染过程。Urban 和 Petersen 等^[15-16] 人的研究显示,药物以 NTCP 作为抗 HBV 干预靶标不但可以通过竞争性结合 NTCP 阻碍 HBV 通过与受体结合进入机体细胞,同时也可以抑制 NTCP 的合成从而起到抗 HBV 的作用。在本研究中,氧化苦参碱/恩替卡韦的联合用药能够有效的降低 NTCP mRNA 的表达水平,说明联合用药可以通过抑制 NTCP 生成的方式进一步发挥抗 HBV 的作用。

在本次实验中发现 HepG2. A64 细胞在给予氧化苦参碱/恩替卡韦联合用药干预后,其 p38 mRNA 以及 p38 蛋白的表达量都明显升高但是 p38 磷酸化

水平降低。YANG 等^[17]研究发现, p38 存在负反馈调节机制。当 p38 磷酸化被抑制时, 活化入核的 p38 的量减少, 机体随即通过 MEK/MAPK 和 mTOR 通路对 p38 进行负反馈调节, 增加 p38 mRNA 的表达量, 促使活化入核的 p38 的量增加。本实验进一步证明氧化苦参碱/恩替卡韦联合用药可以通过抑制 p38 的活化而增强抗 HBV 的作用。

虽然本研究发现氧化苦参碱联合恩替卡韦用药优于单独用药, 但是也有不足之处, 本实验中未检测 HBeAg 抑制率, 因为 HepG2. A64 细胞在培养传代过程中 HBV 的 1896 位碱基由 G 突变为 A, 导致密码子 TGG 变为终止密码子 TAG, 影响 HBeAg 翻译, 导致该细胞系不分泌 HBeAg, 由于临床上也存在大量 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者, 因此细胞不分泌 HBeAg 并不影响对药物作用的结果判断^[18], HBV DNA 做为反映病毒复制力和传染力最直接的指标, 其滴度改变可以很好地反映药物的抗 HBV 效应^[9]。本实验中药物对 HBsAg 的抑制率偏低, 可能是与药物作用时间短, 并且缺乏体内免疫反应过程有关^[19], 因此笔者将 HBsAg 作为辅助指标判断单独用药及联合用药对 HBV 的抑制作用。

综上所述, 氧化苦参碱与恩替卡韦的联合用药或许可作为一种更安全、有效的治疗方法应用于慢性乙型肝炎, 为 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者的临床给药方案提供了参考依据。

[参考文献]

[1] Coppola N, Stanzione M, Messina V, et al. Tolerability and efficacy of anti-HBV nucleos (t) ide analogues in HBV-DNA-positive cirrhotic patients with HBV/HCV dual infection[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(12): 890-896.

[2] MA Z J, LI Q, WANG J B, et al. Combining oxymatrine or matrine with lamivudine increased its antireplication effect against the hepatitis B virus *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10.1155/2013/186573.

[3] 聂红明, 陈建杰, 高月求, 等. 苦参碱与氧化苦参碱体外抗乙肝病毒的比较[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(36): 4046-4050.

[4] 聂红明, 陈建杰, 高月求, 等. 槐定碱体外抗乙肝病毒的研究[J]. 北京中医, 2007, 26(10): 678-680.

[5] 冉贤金, 胡虞乾. 氧化苦参碱和拉米夫定体外抗乙肝病毒的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(2): 142-144.

[6] 戴五好, 钱利武, 杨士友, 等. 苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,

2012, 18(3): 177-180.

[7] 聂红明, 王灵台, 陈建杰, 等. 槐果碱体外对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg, HBeAg 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 33(11): 1478-1479.

[8] WANG Y P, LIU F, HE H W, et al. Heat stress cognate 70 host protein as a potential drug target against drug resistance in hepatitis B virus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 2070-2077.

[9] 姚伟明, 刘妍, 思兰兰, 等. 新型中药制剂肃毒星对乙型肝炎病毒体外复制的抑制作用研究[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(2): 121-124.

[10] 徐东平, 王琳, 刘妍, 等. 中国患者 C 基因型多重耐药突变 HBV 稳定复制表达细胞系: 中国, CN102399749A [P]. 2012-04-04.

[11] Enslen H, Raingeaud J, Davis R J. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6 [J]. J Biol Chem, 1998, 273(3): 1741-1748.

[12] Lim K H, Choi H S, Park Y K, et al. HBx-induced NF- κ B signaling in liver cells is potentially mediated by the ternary complex of HBx with p22-FLIP and NEMO [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57331.

[13] LU H Z, ZHOU J H. Hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor- α expression in cultured mesangial cells via ERKs and NF- κ B pathways [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2013, 3(3): 217-222.

[14] CHANG W W, SU I J, LAI M D, et al. Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell; the antiviral role of nitric oxide [J]. J Viral Hepat, 2008, 15(7): 490-497.

[15] Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, et al. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes [J]. Gastroenterology, 2014, 147(1): 48-64.

[16] Petersen J, Dandri M, Mier W, et al. Prevention of hepatitis B virus infection *in vivo* by entry inhibitors derived from the large envelope protein [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(3): 335-341.

[17] YANG X L, LIN F J, GUO Y J, et al. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K/AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK/MAPK and mTOR pathways [J]. Onco Targets Ther, 2014, doi: 10.2147/OTT.S63145.

[18] 邹宇宏, 杨雁, 吴强, 等. 黄芪提取物的体外抗乙肝病毒作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(4): 267-269.

[19] 陆海英, 王勤环, 曾争, 等. 不同剂型苦参素体外抗 2. 2. 15 细胞乙型肝炎病毒的作用及其作用机理的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(S1): 168-170.

[责任编辑 周冰冰]