

氧化苦参碱体外抗乙型肝炎病毒作用

任衍菊¹, 张玉萍¹, 金敏², 陈照立², 谌志强², 邱志刚², 王新为², 李君文^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

[摘要] 目的: 体外观察氧化苦参碱(OM)抗乙型肝炎病毒(HBV)作用, 并初步探讨其作用机制。方法: 用 125, 250, 500, 1 000, 2 000 mg·L⁻¹ OM 连续作用于 90% 汇合度的 HepG2. 2. 15 细胞 9 d, 以 MTT 比色法观察药物细胞毒性; 用酶联免疫法测定细胞上清液中乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg), 乙型肝炎病毒 s 抗原(HBsAg); 采用荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)测定细胞上清液中 HBV DNA, 细胞中 HBV DNA 和共价闭合环状 DNA(cccDNA)。结果: OM 对细胞内 HBV DNA 和 cccDNA, 以及细胞外 HBV DNA 均有抑制作用, 随着浓度升高抑制作用加强, 2 000 mg·L⁻¹ OM 对细胞内 HBV DNA, cccDNA 和细胞外 HBV DNA 的抑制率分别为 64. 56%, 52. 12%, 54. 25%; 对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌也有抑制作用, 且浓度越高、处理时间越长, 抑制作用越明显; 在相同条件下对 HBsAg 的抑制作用强于 HBeAg, OM 浓度为 2 000 mg·L⁻¹ 时对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 51. 59%, 17. 88%。结论: OM 能有效抑制 HepG2. 2. 15 细胞中 HBV 复制, 该作用是抑制病毒核酸复制和基因表达的结果。

[关键词] 氧化苦参碱; 乙型肝炎病毒; HepG2. 2. 15 细胞

[中图分类号] R285. 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0175-05

Inhibitory Effect of Oxymatrine on Hepatitis B Virus *in vitro*

REN Yan-ju¹, ZHANG Yu-ping¹, JIN Min², CHEN Zhao-li², SHEN Zhi-qiang²,
QIU Zhi-gang², WANG Xin-wei², LI Jun-wen^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the antiviral activities of oxymatrine (OM) on hepatitis B virus (HBV) *in vitro* and initially explore the mechanism of it. **Method:** HepG2. 2. 15 cells (at 90% confluencerespectively) were treated with different concentrations (125, 250, 500, 1 000, 2 000 mg·L⁻¹) of OM for 9 d. Cytotoxicity was observed with MTT colorimetric method. HBeAg and HBsAg in the culture supernatant were determined by ELISA assay. Fluorescence quantity PCR assay was used to assay the extracellular HBV DNA, intracellular HBV DNA and covalently closed circular DNA (cccDNA). **Result:** After treatment with 2 000 mg·L⁻¹ OM for 9 d the level of the extracellular HBV DNA, intracellular HBV DNA and (cccDNA) was significantly inhibited in a dose-dependent manner, the inhibitory rates were 54. 25%, 64. 56%, 52. 12% respectively. It can also inhibit the level of HBeAg and HBsAg in culture supernatant and the inhibitory effect showed a dose-and time-dependent manner. In the same condition, the inhibitory effect on HBsAg is stronger than that of HBeAg. When OM concentration was 2 000 mg·L⁻¹, the inhibitory rates on HBsAg and HBeAg were 51. 59%, 17. 88%. **Conclusion:** OM can inhibit HBV DNA replication in HepG2. 2. 15 cells through inhibiting the reproduction of the viral nucleic acid and gene expression.

[Key words] oxymatrine (OM); hepatitis B virus (HBV); HepG2. 2. 15

[收稿日期] 20120208(005)

[基金项目] “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项资助(2009ZX10004-703)

[第一作者] 任衍菊, 硕士在读, 从事抗病毒药物研究, Tel: 15522626876

[通讯作者] * 李君文, 研究员, 博士生导师, 从事微生物检测研究, Tel: 022-84655418, E-mail: junwen9999@ hotmail. com

我国是乙型肝炎的高发区,据第二次全国流行病学调查结果显示我国乙型肝炎病毒(HBV)感染率为 57.63%,约有 1 200 万患者^[1]。HBV 的感染会导致急慢性乙型肝炎的发生,是引起肝硬化、肝细胞癌的重要因素之一。

目前常用的抗 HBV 药物,如干扰素、核苷类药物等,价格比较昂贵,疗效也不够满意,寻求有抗病毒作用的天然药物已成为当前研究热点。我国有数千年应用中草药治疗疾病的传统和经验,从中已发现了不少抗 HBV 药物。其中氧化苦参碱(OM)是苦参碱型生物碱(matrine type alkaloid)中的一个单体,它广泛存在于豆科植物苦参、苦豆子及广豆根中,具有良好的抗 HBV^[2-4]、抗肝纤维化作用^[5]。OM 目前在治疗慢性病毒性肝病的应用中十分普遍,但其抗病毒机制尚不明确。

本文选择 HepG2.2.15 细胞模型,对 OM 进行体外抗病毒实验研究,以拉米夫定(3TC)作为对照,不仅检测了药物作用后细胞上清液中乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎病毒 s 抗原(HBsAg)和 HBV DNA 水平,还检测了细胞内 HBV DNA、共价闭合环状 DNA(cccDNA)水平,旨在从细胞和分子水平观察其抗 HBV 作用,并初步分析作用机制。

1 材料

1.1 试药 氧化苦参碱(OM,中国药品生物制品检定所,批号 110780-201007),拉米夫定(3TC,葛兰素史克制药有限公司,批号 10100044),四甲基偶氮唑盐(Sigma USA),MEM 培养基粉、丙酮酸钠、胎牛血清、G418(Gibco, USA),Tryple express(Invitrogen, USA),乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒(批号 201108011)、乙型肝炎病毒 s 抗原检测试剂盒(批号 201106011)、乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(批号 20111111)(上海科华生物工程股份有限公司),HBV cccDNA 核酸扩增检测试剂盒(北京索奥生物技术有限公司,批号 20110906)。

1.2 仪器 -80℃ 冰箱,酶标仪,CO₂ 恒温培养箱(Thermo Fisher, USA),倒置显微镜(Olympus, Japan),生物安全柜(上海振梓创空气净化设备有限公司),荧光定量 PCR 仪(ABI7300, ABI, USA)。

1.3 细胞模型 HepG2.2.15 细胞系(购自武汉大学细胞库)。细胞用 MEM 培养液(含 10% 胎牛血清,380 mg·L⁻¹ G418),置 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中培养,隔 3 d 换液,6 d 传代 1 次。待 HBV DNA 表达稳定后开始实验。

2 方法

2.1 OM,3TC 溶液的配制 准确称取 OM,3TC 适量,溶解于无菌双蒸水中,按每次用量分装成若干份,保存于 -20℃ 冰箱中(切记不要反复冻融,保证药物溶液只冻融一次),用时取出一份,用含 2% 胎牛血清,380 mg·L⁻¹ G418 的培养基稀释为不同浓度。

2.2 药物细胞毒性实验 细胞毒性实验选用 OM 为 125,250,500,1 000,2 000,4 000 mg·L⁻¹;3TC 的浓度为 0.01,0.1,1,10,100,1 000 μmol·L⁻¹。长在 96 孔板中的 HepG2.2.15 细胞(90% 汇合度)用以上不同浓度的 OM 和 3TC 分别作用 9 d,每天更换新鲜含药培养基,每个浓度做 4 个重复。9 d 后,采用 Mosmann 等^[6]建立的 MTT 比色分析法,测定 570 nm 的吸光度(A),观察药物对细胞的毒性,实验重复 3 次。计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = A_{570}(\text{样品}) / A_{570}(\text{对照}) \times 100\% \quad (1)$$

其中 A₅₇₀(样品)为加入 OM 或 3TC 后的细胞吸光度,A₅₇₀(对照)为空白对照的细胞吸光度。

2.3 药物抗 HBV 实验 消化 HepG2.2.15 细胞并接种于 24 孔板中,待细胞达到 90% 汇合度时,更换新鲜的不同质量浓度 OM(125,250,500,1 000,2 000 mg·L⁻¹)和 3TC(0.001,0.01,0.1,1,10 μmol·L⁻¹)含药培养液(每个浓度做 3 个重复)。同条件下继续培养,每天收取上清液(-80℃ 冰箱保存)并更换原浓度新鲜药液,共加药培养 9 d,9 d 后将细胞消化冻存于液氮罐中。实验同时设 3 孔无药物细胞对照,并重复 3 次。

2.4 HBsAg,HBeAg 的检测 采用 ELISA 法检测上清液中 HBsAg,HBeAg。实验操作按试剂盒说明书执行。每个样品做 3 个重复。实验重复 3 次。结果按(2)式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{用药组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (2)$$

2.5 HBV DNA 的检测 采用 FQ-PCR 法检测细胞外和细胞内 HBV DNA,实验操作按试剂盒说明书进行。其中,细胞内 HBV DNA 检测,首先用 3 冻 3 融法裂解细胞,使病毒释放出来,然后 13 000 r·min 离心 10 min,取上清液作为样品按试剂盒说明书进行操作。每个样品做 3 个重复,实验重复 3 次。PCR 反应的循环参数为 50℃,2 min;94℃,2 min;94℃,10 s,60℃,30 s,40 个循环;35℃,10 s。结果按(3)式计算抑制率。

抑制率 = (对照组 HBVDNA 量 - 用药组 HBVDNA 量) / 对照组 HBVDNA 量 × 100% (3)

2.6 HBV cccDNA 的检测 采用 FQ-PCR 法检测细胞内 HBV cccDNA 的含量。操作按试剂盒说明书进行。每个样品做 3 个重复,实验重复 3 次。PCR 反应的循环参数为 93 ℃, 2 min; 93 ℃, 5 s, 56 ℃, 45 s, 40 个循环。结果按(4)式计算抑制率。

抑制率 = (对照组 cccDNA 量 - 用药组 cccDNA 量) / 对照组 cccDNA 量 × 100% (4)

2.7 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件包进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞毒性作用 HepG2. 2. 15 细胞分别用 125 ~ 4 000 mg · L⁻¹ 的 OM 或 0.01 ~ 1 000 μmol · L⁻¹ 的 3TC 作用 9 d 后。结果显示, OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用均较小, 当 OM 的浓度低于 2 000 mg · L⁻¹; 3TC 的浓度

低于 10 μmol · L⁻¹ 时, OM 和 3TC 对细胞活力的抑制作用均小于 10%, 无明显细胞毒性, 可用于观察药物对细胞中 HBV 复制的抑制作用。

3.2 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg, HBeAg 的影响 选择 1, 3, 5, 7, 9 d 加药后收集的细胞上清液作为样品, 用 ELISA 法检测其中 HBsAg, HBeAg 分泌情况。结果如表 1, 2 所示, 不同浓度 OM 对 HBsAg 和 HBeAg 分泌均有一定抑制作用, 药物浓度增加、作用时间延长, 抑制作用也随之增强。OM 对 HBeAg 的抑制作用的出现早于 HBsAg, 125 mg · L⁻¹ OM 作用 5 d 即表现出对 HBeAg 有抑制作用, 而对 HBsAg 到第 7 天才表现出抑制作用。但其对 HBsAg 的抑制作用强于 HBeAg, 2 000 mg · L⁻¹ OM 作用 9 d 后, 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 51.59%, 17.88%。3TC 对 HBeAg 和 HBsAg 的抑制作用明显弱于 OM, 10 μmol · L⁻¹ 3TC 作用 9 d 后, 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 9.71%, 14.48% (表 3, 4)。

表 1 OM 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

质量浓度 / mg · L ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	%
0	0 ± 0.00	0 ± 0.01	0 ± 0.04	0 ± 0.04	0 ± 0.04	
125	-57.30 ± 0.00 ²⁾	2.13 ± 0.03	4.62 ± 0.01	7.01 ± 0.03 ¹⁾	19.31 ± 0.01 ²⁾	
250	-29.13 ± 0.00 ²⁾	-3.38 ± 0.01	3.84 ± 0.01	5.47 ± 0.03	28.08 ± 0.03 ²⁾	
500	-53.42 ± 0.01 ²⁾	-5.00 ± 0.01	2.58 ± 0.04	10.38 ± 0.03 ²⁾	32.76 ± 0.03 ²⁾	
1 000	-108.77 ± 0.00 ²⁾	-14.20 ± 0.02	17.24 ± 0.02 ²⁾	15.74 ± 0.02 ²⁾	40.57 ± 0.03 ²⁾	
2 000	-195.17 ± 0.01 ²⁾	19.32 ± 0.02 ²⁾	36.49 ± 0.04 ²⁾	34.60 ± 0.03 ²⁾	51.59 ± 0.02 ²⁾	

注: 与不加药组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

表 2 OM 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBeAg 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

质量浓度 / mg · L ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	%
0	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.04	0 ± 0.00	0 ± 0.06	
125	14.02 ± 0.02 ²⁾	1.35 ± 0.020	3.697 ± 0.02 ¹⁾	2.94 ± 0.03 ¹⁾	4.27 ± 0.04 ²⁾	
250	13.38 ± 0.01 ²⁾	-0.43 ± 0.00	8.56 ± 0.02 ²⁾	4.89 ± 0.01 ²⁾	12.03 ± 0.01 ²⁾	
500	-2.97 ± 0.00	1.27 ± 0.01	11.52 ± 0.03 ²⁾	6.5 ± 0.01 ²⁾	14.66 ± 0.02 ²⁾	
1 000	8.59 ± 0.01 ²⁾	2.27 ± 0.01	15.65 ± 0.01 ²⁾	9.96 ± 0.01 ²⁾	15.20 ± 0.05 ²⁾	
2 000	-5.87 ± 0.00 ²⁾	-5.90 ± 0.02 ¹⁾	16.15 ± 0.02 ²⁾	11.19 ± 0.04 ²⁾	17.88 ± 0.02 ²⁾	

表 3 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

质量浓度 / μmol · L ⁻¹	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	%
0	0 ± 0.002	0 ± 0.00	0 ± 0.02	0 ± 0.00	0 ± 0.01	
0.001	2.78 ± 0.01 ²⁾	2.13 ± 0.00	1.36 ± 0.02	1.47 ± 0.00	2.81 ± 0.00 ²⁾	
0.01	4.93 ± 0.00 ²⁾	3.10 ± 0.01 ¹⁾	-1.52 ± 0.01	3.15 ± 0.01 ²⁾	3.87 ± 0.01 ²⁾	
0.1	1.15 ± 0.01 ¹⁾	1.64 ± 0.00	-1.42 ± 0.02	4.34 ± 0.01 ²⁾	5.81 ± 0.01 ²⁾	
1	3.19 ± 0.00 ²⁾	-0.07 ± 0.02	0.29 ± 0.01	5.19 ± 0.01 ²⁾	8.20 ± 0.02 ²⁾	
10	2.60 ± 0.00 ²⁾	2.83 ± 0.00 ¹⁾	-0.36 ± 0.02	7.06 ± 0.01 ²⁾	9.71 ± 0.01 ²⁾	

表 4 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBeAg 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

质量浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
0	0 ± 0.02	0 ± 0.01	0 ± 0.02	0 ± 0.04	0 ± 0.00
0.001	11.14 ± 0.00 ²⁾	15.84 ± 0.00	2.19 ± 0.04	6.30 ± 0.05	6.26 ± 0.00 ²⁾
0.01	0.65 ± 0.01	8.75 ± 0.00	-1.66 ± 0.07	4.69 ± 0.07	10.17 ± 0.03 ²⁾
0.1	-6.78 ± 0.00	3.32 ± 0.01	4.33 ± 0.02	5.40 ± 0.03	15.23 ± 0.01 ²⁾
1	7.52 ± 0.01	-8.92 ± 0.10	0.69 ± 0.01	7.33 ± 0.05	17.95 ± 0.01 ²⁾
10	-11.98 ± 0.00 ²⁾	2.40 ± 0.01	-0.61 ± 0.01	5.83 ± 0.03	14.88 ± 0.00 ²⁾

3.3 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 合成的影响 选择最后一次收取的上清液和药物处理的细胞作为样品,考察 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞外和细胞内 HBV DNA 合成的影响。结果如表 5 所示,OM 对 HBV DNA 有明显的抑制作用,且该

抑制作用有明显的量效关系。OM 为 2 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对细胞外和细胞内 HBV DNA 的抑制率分别为 54.25% ,64.56%。但 OM 对 HBVDNA 的抑制作用弱于 3TC,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3TC 对细胞外和细胞内 HBV DNA 的抑制率分别为 99.66% ,99.80%。

表 5 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞合成 HBV DNA 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

OM/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞内		细胞外	
	3TC/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞内	细胞外	细胞外
0	0	0 ± 3.05	0 ± 4.78	0 ± 6.04
125	0.001	11.25 ± 3.2 ¹⁾	9.85 ± 1.43 ¹⁾	15.45 ± 3.98 ¹⁾
250	0.01	27.14 ± 2.08 ²⁾	17.59 ± 2.72 ²⁾	26.72 ± 6.33 ²⁾
500	0.1	50.05 ± 3.95 ²⁾	21.23 ± 2.05 ²⁾	86.45 ± 7.30 ²⁾
1 000	1	55.78 ± 2.80 ²⁾	37.12 ± 4.45 ²⁾	99.33 ± 0.27 ²⁾
2 000	10	64.56 ± 3.08 ²⁾	54.25 ± 6.60 ²⁾	99.64 ± 0.25 ²⁾

3.4 OM 和 3TC 对 HepG2. 2. 15 细胞中 HBV cccDNA 的影响 OM 对 cccDNA 有明显的抑制作用,且抑制作用随着药物浓度增加而加强。OM 浓度为 125,250,500,1 000,2 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 cccDNA 抑制率分别为, (18.22 ± 0.98)%, (26.75 ± 0.32)%, (22.90 ± 1.17)%, (36.29 ± 0.21)%, (52.12 ± 0.76)%。而 3TC 对 cccDNA 作用结果显示,3TC 对 cccDNA 没有抑制作用。

4 讨论

HepG2. 2. 15 细胞是带有 G418 抗性基因片段与含 HBV DNA 重组质粒转染人肝癌细胞系 (HepG2) 的 2. 2. 15 细胞系,能够长期完整地分泌 HBV 颗粒 (Dane 颗粒)、HBsAg, HBeAg 以及 HBV DNA,并能产生大量复制中间体,再现 HBV 在肝细胞中的复制和表达^[7]。用该细胞系进行抗 HBV 药物筛选,结果可以比较准确地预测药物在人体内的作用,是目前各实验室广泛用于筛选和评价体外抗 HBV 药物的细胞模型^[8-10]。

HBV DNA 进入细胞后首先转变为 rcDNA (relaxed circular DNA),再转变为 cccDNA。cccDNA

可作为模板转录为 4 种 mRNA,分别为 2.1 kb 的 S-mRNA,2.4 kb 的 S-mRNA,3.5 kb 的 C-mRNA 和 0.8 kb 的 X-mRNA。HBeAg 由 3.5 kb 的 C-mRNA 翻译产生;HBsAg 由 2.1 kb 和 2.4 kb 的 S-mRNA 翻译产生;3.5 kb 的 C-mRNA 还可以编码合成具有聚合酶功能的 P 蛋白^[11]。

本研究结果表明,OM 能有效抑制 HepG2. 2. 15 细胞中 HBV 的复制。药物作用后,细胞内 HBV DNA 和 HBV DNA 复制中间体 cccDNA,以及细胞外的 HBV DNA 均减少,随着药物浓度增加,减少越多。分泌到细胞外的 HBsAg 和 HBeAg 也显著降低,且 OM 浓度越高、处理时间越长,降低越明显,但在相同浓度,相同处理时间的条件下,HBsAg 降低较多。对 cccDNA 有抑制作用,说明 OM 对 rcDNA 向 cccDNA 的转变有一定的阻断作用。细胞内 HBV DNA 的减少有可能是这一阻断作用导致。也有可能是 OM 对 cccDNA 转录为 C-mRNA 的抑制,从而导致 P 蛋白的减少,进而其聚合酶功能降低所致。分泌到细胞外 HBV DNA 的减少可能是由于细胞内 HBV DNA 降低所致,也可能是 OM 对病毒的装配和

分泌环节抑制作用的结果。cccDNA 的降低可以引起 HBeAg 和 HBsAg 的降低,除此之外,OM 对 cccDNA 转录为 C-mRNA 和 S-mRNA 的抑制也可降低 HBeAg 和 HBsAg 的水平。OM 对 HBsAg 的抑制能力优于对 HBeAg 的抑制,说明 OM 对 S-mRNA 转录的抑制作用强于 C-mRNA。综上所述,OM 对 HBV 的抑制作用是抑制病毒核酸复制和基因表达的结果。由于本实验未对 rcDNA, RNA 等进行检测,所以其作用机制有待进一步实验考察。由于 HepG2. 2. 15 细胞本身的局限性,OM 对病毒的侵入环节是否有影响也有待验证。

3TC 是目前治疗病毒性肝炎的常用药物^[12-13]。其主要作用机制为与 dCTP 竞争结合位点,抑制 HBV 逆转录酶的活性及渗入 HBV DNA 导致链合成终止^[14]。本实验观察到 3TC 对 HBV DNA 有显著抑制作用,对细胞外 HBV DNA 的 IC₅₀ 为 0. 03 μmol·L⁻¹,与文献报道相接近^[15-16]。但 3TC 对病毒抗原抑制作用较弱,对 cccDNA 没有直接的抑制作用。可见 3TC 和 OM 抑制 HepG2. 2. 15 细胞中 HBV 的复制作用各具特色,作用机制不同,可以考虑二者的联合用药。

[参考文献]

[1] 戴志澄,祁国明. 中国病毒性肝炎血清流行病学调查. 上卷[M]. 北京:科学技术文献出版社,1997:39.

[2] Chen Xiao Song, Wang Guo Jun, Cai Xiong, et al. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine *in vivo* [J]. WJG, 2001, 7(1):49.

[3] Cheng Yang, Ping Jian, Xu Huai-Dong, et al. Synergistic effect of a novel oxymatrine-baicalin combination against hepatitis B virus replication, α smooth muscle actin expression and type I collagen synthesis *in vitro*[J]. WJG, 2006, 12(32): 5153.

[4] Wang Yu-Ping, Zhao Wei, Xue Rong, et al. Oxymatrine inhibits hepatitis B infection with an advantage of overcoming drug-resistance [J]. Antiviral Res, 2011,89:227.

[5] 平键,成扬,许怀栋,等. 氧化苦参碱黄芩苷组合物抗乙型肝炎病毒和抗肝纤维化的体外实验[J]. 实用肝

脏病杂志,2007,10(3):148.

[6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.

[7] Sells M A, Chen M L, Acs G, et al. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1987,84:1005.

[8] Fu Xiao zhong, Jiang Sai hong, Li Chuan, et al. Design and synthesis of novel bis(*L*-amino acid) ester prodrugs of 9-[2-(phosphonomethoxy) ethyl] adenine (PMEA) with improved anti-HBV activity [J]. Bioorg Med Chem Let, 2007, 17:465.

[9] Zheng Zi rui, Li Jun yan, Jing Sund, et al. Inhibition of HBV replication by theophylline [J]. Antiviral Res, 2011, 89:149.

[10] Jia Wei, Zhao Yan-fang, Li Rong-dong, et al. Synthesis and in-vitro anti-hepatitis-B virus activity of 6H-[1] benzothioopyrano [4, 3-b] quinolin-10-ols [J]. Arch Pharm Chem Life Sci, 2009, 342: 507.

[11] 骆抗先. 乙型肝炎基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:27.

[12] Julesl Dienstag, Eugener Schiff, Teresa L Wright, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis [J]. N Engl J Med, 1999, 341(17):1256.

[13] George K K Lau, Teerha Piratvisuth, Luo Kang Xian, et al. Peginterferon Alfa-2a, Lamivudine, and the Combination for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B [J]. NEJM, 2005, 352:2682.

[14] 倪若愚. 抗乙型肝炎新药—拉米夫定. 中华肝脏杂志 [J]. 1998,6:55.

[15] William E Delaney I V, Yang Hui ling, Michael D Miller, et al. Combinations of adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against hepatitis B virus *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10):3702.

[16] Badera Ted, Korbab Brent. Simvastatin potentiates the anti-hepatitis B virus activity of FDA-approved nucleoside analogue inhibitors *in vitro* [J]. Antiviral Res, 2010, 86(3): 241.

[责任编辑 聂淑琴]