

六月青皂苷体外对乙型肝炎病毒共价闭合环状脱氧核糖核酸抑制作用的研究

黄权芳¹, 林兴^{2*}, 黄仁彬², 张士军²

(1. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 观察六月青皂苷(terpenoids of Liuyueqing, TLYQ) 体外抗乙型肝炎病毒(HBV) 共价闭合环状脱氧核糖核酸(cccDNA) 复制的作用。方法: 取 HepG2. 2. 15 细胞, 分为正常对照组、阿昔洛韦(ACV) 阳性对照组、TLYQ 低、中、高剂量组, 各组细胞置 CO₂ 孵箱(37 ℃, 5% CO₂) 中培养 24 h 后, TLYQ 低、中、高剂量组加入 TLYQ(终浓度分别为 21. 25, 42. 5, 85 mg·L⁻¹), 阳性对照组加 ACV(终浓度为 1. 02 mg·L⁻¹), 正常对照组加等体积培养液, 以上每个浓度设 3 瓶, 于培养 72 h, 144 h 分别取细胞上清液, 用实时荧光定量 PCR 法检测 HBV cccDNA 拷贝数。结果: 在细胞培养 72 h 时, TLYQ 高剂量组 HBV cccDNA 拷贝数即明显下降(P<0. 05), 在 144 h 高、中剂量组下降显著(P<0. 05 或 P<0. 01), 低剂量组下降不明显。TLYQ 作用呈明显的量效和时效反应关系。结论: TLYQ 在体外有明显的抑制乙肝病毒的作用, 可能是六月青主要活性成分之一。

[关键词] 六月青皂苷; HepG2. 2. 15 细胞; 乙型肝炎病毒; 共价闭合环状脱氧核糖核酸

[中图分类号] R285. 5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 13-0149-02

六月青系爵床科(Acanthaceae) 植物肖鸡笼(顶花马兰) *Taraphochlanys affinis* (Griff) Bremekhu [*Strobilanthes affinis* (Griff) Y. C. Tang] 的干燥地上部分^[1]。本课题组前期研究发现, 六月青含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞系乙肝病毒(HBV) 表面抗原(HBsAg), 乙肝病毒 e 抗原(HBeAg) 有明显抑制作用^[2]; 其总皂苷对乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA) 的复制有显著的抑制作用^[3], 对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的脂质过氧化有较好的保护作用^[4]。本实验研究六月青总皂苷对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 共价闭合环状脱氧核糖核酸(cccDNA) 的作用, 进一步探讨六月青抗 HBV 作用机制。

1 材料与方 法

1. 1 材 料

1. 1. 1 药 物 六月青药材, 系爵床科(Acanthaceae) 植物肖鸡笼(顶花马兰) *T. affinis* (Griff) Bremekhu (*Strobilanthes affinis* (Griff) Y. C. Tang) 的干燥地上部分, 采于广西灵山, 由广西中医学院第一附属医院

黄权芳中药师鉴定。

1. 1. 2 细胞株^[3] HepG2. 2. 15 细胞株(北京医科大学第一附属医院病毒研究所), 本室自行传代, 定期用 G418 筛选, 置 CO₂ 孵箱(37 ℃, 5% CO₂) 中培养。

1. 1. 3 试剂 阿昔洛韦(Aciclovir, ACV, 湖南迪诺制药有限公司医药工业研究所产品, 批号 20070518); RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司, 批号 21202-016); 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 21607-042); G418(美国 Sigma 公司, 批号 228527-72); QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒(Qiagen 公司, 批号 127141405); HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒(深圳匹基生物工程股份有限公司, 批号 20070613); SYBR Green PCR Kit (Qiagen 公司, 批号 127144035)。

1. 1. 4 仪器 iCycler FQ 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); CO₂ 孵箱(美国 Thermo Forma 公司, Model311)。

1. 2 方 法

1. 2. 1 六月青皂苷的制备 由广西医科大学药理学教研室和医学科学实验中心自行提取, 经常规化学定性试验证实为皂苷类, 纯度为 85. 8%^[4]。实验前临时取 50 mg 皂苷用 200 mL 蒸馏水溶解(即浓度为 250 mg·L⁻¹), 接着采用梯度稀释法取 100 mL 进一步分别稀释成 125, 62. 5 mg·L⁻¹。

1. 2. 2 引物合成 P1: 5'-ACCGTGTGCACT-TCGCTFC-3, P2: 5'-AGTAGGACATGAACAAGAG-

[收稿日期] 20100427(011)

[基金项目] 广西教育厅自然科学基金项目(200710MS014)

[第一作者] 黄权芳, 主管中药师, 主要从事中药临床及中药鉴定研究工作, Tel: 0771-5840015, E-mail: hqf00@163. com

[通讯作者] * 林兴, 讲师, 主要从事生化药理学、心血管药理学研究工作, Tel: 0771-5358342, E-mail: gxLx60@163. com

ATGATTAGG-3 ;另一对引物,其正义引物与反义引物均位于负链缺口下游双链区域,可同时扩增:松弛环状双链 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) 和 cccDNA。P3: 5'-GCCTCCAAGCTGTGCCTFG-3, P4: 5'-TCTGCGACGCGGCGATTGAG-3。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 细胞的培养 取 HepG 2. 2. 15 细胞 1 瓶,用胰酶消化后制备成单细胞悬液,计数后调整细胞浓度至 $2 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,加入 75 cm^2 培养瓶,6.6 mL/瓶,置 CO_2 孵箱 (37°C , 5% CO_2) 中培养 24 h 后, TLYQ 低、中、高剂量组分别加入 62.5, 125, 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 TLYQ 各 3.4 mL,即 TLYQ 在培养瓶中的终浓度分别为 21.25, 42.5, 85 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;阳性药组加 ACV 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3.4 mL,即终浓度为 1.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;细胞对照组加 3.4 mL 培养液;以上每个浓度设 3 瓶。连续培养 72 h 后,分别吸出上清液于 1.5 mL 灭菌 Eppendor 管中, -20°C 保存,统一待检。接着继续培养 72 h 后,又分别吸出上清液于 1.5 mL 灭菌 Eppendor 管中, -20°C 保存,统一待检。

1.2.4 HBV 闭环 DNA (closed circular DNA, ccDNA) 的提取 分别取含药培养 72 h, 144 h 细胞样本,离心去上清液,用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒抽提 cccDNA,按试剂盒说明书操作。cccDNA 产物溶于 50 mL pH8.0 的 TE 溶液。测定提取物吸光度 $A_{260 \text{ nm}}$ 和 $A_{280 \text{ nm}}$,根据 A_{260} 和 A_{280} 的比值计算样品的 DNA 纯度。

1.2.5 酶切 cccDNA 取 cccDNA 提取物 10 μL ,用绿豆核酸酶酶切。 37°C 温育 25 min,用 2 μL 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA (pH 7.4) 灭活绿豆核酸酶。

1.2.6 PCR 扩增^[5] 取 5 μL 样品,加入 PCR 试剂和引物,各反应管放入 FQ-PCR 仪,按以下条件进行扩增: 94°C 预变性 1 min, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火、延伸 20 s。共反应 42 个循环。扩增过程及荧光信号检查、数据的储存和分析均由仪器及其自带的软件自动完成。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

与细胞对照组比较, TLYQ 中、高剂量作用 72, 144 h 后, HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBV cccDNA 的拷贝数明显降低,提示对 HBV cccDNA 具有显著

的抑制作用,并且随着药物浓度和作用时间的增加,其抑制作用逐渐增强,呈现一个明显的量效和时效反应关系。见表 1。

表 1 TLYQ 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV cccDNA 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 组别 | 终浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 72 h/拷贝 | 抑制率 /% | 144 h/拷贝 | 抑制率 /% |
|------|---|----------------------|-----------|----------------------|-----------|
| 细胞对照 | - | 7.92 ± 0.68 | | 9.78 ± 0.87 | |
| ACV | 1.02 | 3.37 $\pm 0.51^{2)}$ | 57.4 | 3.69 $\pm 0.48^{2)}$ | 62.3 |
| TLYQ | 21.25 | 6.33 ± 0.82 | 20.1 | 7.66 ± 1.11 | 21.7 |
| | 42.5 | 5.67 ± 0.44 | 28.4 | 6.73 $\pm 0.77^{1)}$ | 31.2 |
| | 85 | 4.68 $\pm 0.75^{1)}$ | 40.9 | 5.29 $\pm 0.67^{2)}$ | 45.9 |

注:与细胞对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

目前慢性乙型肝炎已成为危害人类健康的主要疾病。分子生物学研究表明,HBV DNA 的复制机制复杂且独特,其复制周期开始于 cccDNA,以其为模板利用宿主细胞的酶转录为前基因组 RNA,逆转录为负链 DNA,再合成正链 DNA,双链 DNA 又成熟为 cccDNA,是一个连续的过程。cccDNA 水平的高低与病情复发密切相关。因此检测 cccDNA 的表达,不仅可作为评价药物疗效的重要指标,对病情的诊断及用药指导也有重要的意义。

本课题组之前的研究显示,六月青含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞系 HBsAg, HBeAg 有明显抑制作用^[2],其总皂苷对 HBV DNA 的复制也有显著的抑制作用^[3],提示六月青体外有较好的抗 HBV 作用。本实验结果表明, TLYQ 中、高剂量作用 72, 144 h 后, HepG2. 2. 15 细胞上清液中 HBV cccDNA 的拷贝数明显降低(与细胞对照组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示对 HBV cccDNA 具有明显的抑制作用,并且呈现明显的量效和时效反应关系,鉴于此,认为总皂苷应是六月青体外抑制 HBV 主要活性部位之一。

[参考文献]

- [1] 林兴,黄权芳,李江,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J],中药材,2005,28(7):541.
- [2] 林兴,黄权芳,张士军,等. 六月青含药血清对 HepG2. 2. 15 细胞系 HBsAg 与 HBeAg 表达的影响[J],时珍国医国药,2009,20(7):1603.
- [3] 林兴,黄权芳,张士军,等. 六月青总皂苷对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 复制的抑制作用[J],时珍国医国药,2009,20(11):2728.
- [4] 林兴,黄权芳,张士军,等. 六月青总皂苷对四氯化碳诱导小鼠脂质过氧化反应的影响[J]. 中成药,2009,31(12):133.
- [5] 彭忠田,申瑾,谭德明. 等,脱氧野尻霉素衍生物抗乙型肝炎病毒的体外试验研究[J]. 中国药房,2007,18(1):22.

[责任编辑 聂淑琴]