

# 蛞蝓多糖体外抗乙型肝炎病毒作用研究

刘群红\*, 蔡霞, 李朝品

(安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

[摘要] 目的: 研究蛞蝓多糖体外抗乙型肝炎病毒的作用。方法: 以不同浓度的蜗牛多糖和拉米夫定与 HepG 2. 2. 15 细胞混合培养, 通过 MTT 法检测药物的细胞毒性, 9 d 后用 ELISA 法检测细胞培养液中的 HBsAg 和 HBeAg 分泌水平, 用实时荧光定量 PCR 技术检测培养液中的 HBV-DNA 含量。结果: 蛞蝓多糖在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度以下对细胞无毒性。蛞蝓多糖在所稀释的各浓度下, 对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用, 最大抑制率分别为 56.2% 和 58.1%; HBsAg、HBeAg 的治疗指数分别大于 19.98%、22.78%。蛞蝓多糖可抑制 HBV-DNA 的复制 ( $P < 0.05$ )。结论: 蛞蝓多糖在体外具有显著抑制 HBV 的作用。

[关键词] 蛞蝓多糖; HepG 2. 2. 15 细胞; 乙肝治疗

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0058-03

## Studies on Anti-HBV Effect in vitro of Limax Polysaccharide

LIU Qun-hong\*, CAI Xia, LI Chao-pin

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the in-vitro inhibitory of limax polysaccharide on hepatitis B virus. **Methods:** The cell toxicity of limax polysaccharide was determined with MTT method, and the effect of limax polysaccharide on HBsAg and HBeAg secreted by HepG2. 2. 15 cells was evaluated with ELISA method on the ninth day of incubation. real-time PCR was used for determining secreted HBV-DNA in the culture medium. **Results:** limax polysaccharide had no obvious cell toxicity at the concentration less than  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and depressed duplication on HBV-DNA. Limax polysaccharide had obvious restrain effect on HBsAg and HBeAg with maximum inhibition ratio addig up to 56.2% and 58.1%. The therapeutic index of limax polysaccharide was 19.98% for HBsAg and 22.78% for HBeAg. There was certain inhibition on replication of HBV-DNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Limax polysaccharid has no obvious immediate cell toxicity on the HepG 2. 2. 15 cell and can inhibit duplication of hepatitis B virus in vitro.

[Key words] limax polysaccharide; HepG 2. 2. 15 cell strain; hepatitis B cell strain

目前对乙型肝炎尚缺乏理想的药物。本文以蛞蝓多糖为研究对象, 探讨其体外抗 HBV 作用。

### 1 材料

**1.1 药物** 蛞蝓多糖由本实验室提取。方法: 将活体蛞蝓(夏季采于淮南九龙岗)洗净后匀浆, 用水提醇沉法提取多糖<sup>[1]</sup>, 经柱层析分离纯化后即得到微

黄、半透明、水溶性好的蛞蝓多糖粗提物, 得率为 3.24%。经 Molish 反应、Seliwanoff 反应和 Fehling 反应鉴定, 提示多糖成分的存在, 纯度约为 90.2%; 拉米夫定, 苏州葛兰素史克制药有限公司生产。

**1.2 试剂** DMEM 干粉(GIBCO 公司); 胎牛血清 G-418(GIBCO 公司); L-谷氨酰胺(EMERC 公司); HBsAg、HBeAg 抗原检测试剂盒(上海科华生物工程公司); MTT 检测试剂盒(北京碧云天); PCR 试剂盒(华美生物工程公司)。

**1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(上海博迅实业有限公司); 超净工作台(苏州 3 医药净化设备厂); 倒置显

[收稿日期] 2008-12-01

[基金项目] 安徽省 2007 年度第一批重点科研项目(07021001)

[通讯作者] \* 刘群红, Tel: (0554) 6656492; E-mail: liuqunhong67@ yahoo. com. cn

显微镜(日本 Olympus); 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad); 酶标仪(美国 Perkin-Elmer); 多标记微孔板检测仪, 美国 Perkin-Elmer 公司。

**1.4 HepG2.2.15 细胞** 上海复旦大学医学院分子病毒实验室提供。

## 2 方法

**2.1 HepG2.2.15 细胞株的培养方法** 将液氮冷冻保存的 HepG2.2.15 细胞培养于 DMEM 高糖培养基 (pH7.2) 中, 其中含有 10% 胎牛血清  $0.03\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  G418  $105\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$  青霉素  $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  链霉素  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  调 pH 值至 7.2。置细胞培养箱中在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  环境下生长, 每 3 d 更换培养液。倒置显微镜下观察, 细胞生长到 70% ~ 80% 时, 用含有 EDTA 的胰酶消化传代。

**2.2 细胞毒性检测** 参照 Mosmann 建立的四甲基偶氮唑盐法<sup>[2]</sup> (MTT) 检测药物对 HepG2.2.15 细胞生长的抑制作用。具体方法为: 取 HepG2.2.15 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  $2\times 10^4$  个  $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 加入 96 孔培养板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每个浓度 3 复孔。培养板置于细胞培养箱中,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养过夜待贴壁。吸去上清后分别加入含  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的蛭螭多糖的 DMEM 培养基。同时设不加药物的细胞对照组。作用 72 h 后, 各孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 并继续培养 4 h。仔细吸去上清, 然后每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 轻轻振荡使甲贻颗粒充分溶解, 用酶标仪检测 570 nm 处 OD 值。按 Reed-Muench 法<sup>[3]</sup> 计算细胞存活率和药物的半数毒性浓度  $\text{TC}_{50}$ ,  $\text{TC}_{50}$  是实验组存活细胞为对照组的 50% 时的药物浓度。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{药物处理组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

$$\text{TC}_{50} = \text{Antilog}$$

$$\left| \text{B} + \frac{50 - < 50\% \text{抑制百分率}}{> 50\% \text{抑制百分率} - < 50\% \text{抑制百分率}} \times \text{C} \right|$$

$$\text{C} = \text{A} - \text{B}, \text{A} = \log > 50\% \text{药物浓度} \quad \text{B} = \log < 50\% \text{药物浓度}$$

**2.3 药物对细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 抑制作用** 实验组分实验药物组(蛭螭多糖)、阳性药物对照组(拉米夫定)和细胞对照组。HepG2.2.15 细胞胰酶消化后制成单细胞悬液, 调节细胞浓度至  $2\times 10^4$  个  $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 接种 24 孔培养板, 每孔 1 mL,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h, 细胞长成单层后进行实验。根据药物毒性实验结果, 以对细胞无明显毒性的浓度为起始浓度, 药物梯度稀释成 5 种浓度即 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,

$10^{-3}$ ,  $10^{-4}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每种药物的每浓度加 3 孔, 同时设不加药细胞对照 3 孔及培养液空白对照 3 孔, 并于第 3、6 天更换新鲜的含药液培养, 第 9 天收集各孔细胞上清液置于 1.5 mL 离心管中  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻备用。采用 ELISA 法检测上清液中 HBsAg、HBeAg 含量, 计算药物对抗原的抑制百分率。

$$\text{药物对抗原的抑制率}(\%) =$$

$$\frac{\text{对照组 OD 值} - \text{药物处理组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

**2.4 HBV-DNA 含量检测** 首先提取细胞培养上清液中的 HBV 病毒颗粒中的病毒 DNA, 使用 iCycler 对 HBV-DNA 进行荧光定量。Taq 酶 0.25  $\mu\text{L}$ ; 模板 1.0  $\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{M}$  引物 1.0  $\mu\text{L}$ ; 补充  $\text{ddH}_2\text{O}$  至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增目的片段: 115bp HBV 基因区 p 区 292 to 407。扩增引物是: HBVFP:  $5'$ -TGT CCT GGT TAT CGC TGG- $3'$  和 HBVRP:  $5'$ -CAA ACG GGC AAC ATA CCT T- $3'$ 。TaqMan 探针序列是 FAM- $5'$ -TGT GTC TGC GGC GTT TTA TCA T- $3'$ -TAMRA。样品  $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 s, 然后进行 41 个 PCR 循环:  $94\text{ }^\circ\text{C}$  20 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  40 s。激发荧光在  $86\text{ }^\circ\text{C}$  检测, 数据用 iCycler iQ 3.1 进行分析。

**2.5 数据分析** 采用 *t* 检验作组间均数比较, 所有数据统计分析由 SPSS11.5 软件处理。

## 3 结果

**3.1 药物对 HepG2.2.15 细胞的毒性作用** MTT 试验结果显示蛭螭多糖、拉米夫定浓度在  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 细胞存活率均大于 95%, 表明对 HepG2.2.15 细胞均无明显毒性。因而选择浓度  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  来评价药效。

**3.2 药物对 2.2.15 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的作用** 测定结果显示蛭螭多糖对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用, 与细胞对照组相比抑制作用差异显著 ( $P < 0.05$ ), 且随着蛭螭多糖浓度的增加, 其抑制作用增强, 呈一定的量效关系(见表 1)。蛭螭多糖和拉米夫定的各浓度组, 相同浓度的蛭螭多糖与拉米夫定之间相比, 对 HBsAg、HBeAg 抑制作用无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

**3.3 药物效果评价<sup>[4]</sup>** 药物抗 HBV 活性用选择指数 (Selectivity Index, SI) 进行评价。SI =  $\text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。 $\text{IC}_{50}$  为抑制率为 50% 时的药物浓度。

$$\text{IC}_{50} = \text{Antilog}$$

$$\left| \text{B} + \frac{50 - < 50\% \text{抑制百分率}}{> 50\% \text{抑制百分率} - < 50\% \text{抑制百分率}} \times \text{C} \right|$$

表 1 蛭螭多糖对 HepG 2. 2. 15 细胞培养中分泌 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**Table 1 Inhibition of Limax Polysaccharide on the HBsAg and HBeAg and HBV-DNA from HepG2. 2. 15 cell line( $\bar{x} \pm s, n=3$ )**

组别	浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	HBsAg		HBeAg		HBV-DNA $\log(\text{copies} \cdot \text{mL}^{-1})$
		OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)	
蛭螭多糖	1	0.87 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>	48.5	0.81 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	47.7	4.08 $\pm$ 0.20 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-1</sup>	1.14 $\pm$ 0.80 <sup>1)</sup>	32.5	0.90 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	41.9	4.83 $\pm$ 0.04
	10 <sup>-2</sup>	1.32 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	21.9	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	36.8	4.27 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-3</sup>	1.48 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>	12.4	1.07 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	31.0	4.41 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-4</sup>	1.63 $\pm$ 0.06	3.6	1.19 $\pm$ 0.09	23.2	4.56 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>
拉米夫定	1	0.48 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>	71.6	0.65 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	58.1	4.00 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-1</sup>	0.74 $\pm$ 0.70 <sup>2)</sup>	56.2	0.82 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	47.1	4.10 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-2</sup>	1.19 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	29.6	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	36.8	4.27 $\pm$ 0.78 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-3</sup>	1.42 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	16.0	1.04 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	32.9	4.38 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
	10 <sup>-4</sup>	1.56 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	7.7	1.33 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	14.2	4.98 $\pm$ 0.14
细胞对照组	—	1.69 $\pm$ 0.05	—	1.55 $\pm$ 0.06	—	5.58 $\pm$ 0.06

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

当  $SI > 2$  时, 表明药物有效低毒; 当  $1 \leq SI \leq 2$  时, 提示药物有效有毒; 当  $SI < 1$  时, 则表明药物有毒性作用。SI 值越大, 表示药物对 HBV 的抑制作用越强, 细胞毒性越小。由表 2 可知蛭螭多糖和拉米夫定的治疗指数都为 2, 蛭螭多糖对 HBsAg、HBeAg 的  $IC_{50}$  分别大于 0.512 和 0.388, SI 分别 19.98 和 22.78; 结果表明蛭螭多糖可有效地抑制 HBsAg、HBeAg 的分泌且毒性低。

#### 4 讨论

HBV-DNA 体外转染人类肝癌细胞株 HepG2 2. 2. 15 能有效表达全部病毒标记包括 HBsAg、HBeAg

表 2 蛭螭多糖抗 HBV 的药效评价结果

Table 2 Evaluation results of Limax Polysaccharide on anti-HBV

组别	HBsAg			HBeAg		
	TC <sub>50</sub> ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	SI	TC <sub>50</sub> ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	SI
蛭螭多糖	> 10	0.512	> 19.98	> 10	0.388	> 22.78
拉米夫定	> 10	0.064	> 158.79	> 10	0.216	> 41.37

和 HBV-DNA 等, 同时在该细胞株的培养上清液和细胞裂解物中证实有完整乙型肝炎病毒颗粒(Dane 颗粒)存在。该细胞系的建立为研究体外抗 HBV 药物的初步筛选提供了理想的模型。但在 HBV 临床感染中, 受感染细胞 HBV-DNA 的复制、HBsAg 及 HBeAg 的合成均受到机体免疫功能状态和病理状态的影响, 其变化比体外细胞水平研究要复杂得多。因此, 本实验研究虽然显示蛭螭多糖有较好的抗 HBV-DNA 的表达和复制作用, 但进一步证实其抗病毒作用还须结合体内实验来确定, 其作用机制也有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 叶振南, 邵家坪, 陆惠文. 粗多糖的提取、分离及结构研究[J]. 中国药事, 2000, 14(5): 329-332.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [3] 郑作文. 藤茶总黄酮在 2215 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 561-563.
- [4] 何金洋, 郭兴伯, 朱宇同, 等. 复方肝毒清对乙型肝炎病毒的体内外抑制作用[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(2): 134.