

一枝蒿总黄酮体外抗乙肝病毒作用机理的实验研究

郭姗姗¹, 高英杰¹, 时宇静¹, 苏 丹¹, 崔晓兰^{1*}, 王意忠^{2*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京大学航天临床医学院, 北京 100049)

[摘要] 目的: 以 HepG2. 2. 15 细胞为乙肝病毒感染的体外实验模型, 观察一枝蒿总黄酮对核转录因子 κB (NF- κB) 活化以及细胞膜谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX 酶) 的影响, 以探讨一枝蒿总黄酮的抗乙肝病毒作用机理。方法: 采用 SABC 免疫组织化学染色法检测 NF- κB 活化的阳性细胞率; 采用酶促反应的比色法检测细胞膜 GSH-PX 酶活性。结果: 一枝蒿总黄酮 0. 250, 0. 125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度作用后, NF- κB 阳性细胞活化率均明显升高, 与细胞对照组比较均有显著性差异; 一枝蒿总黄酮 0. 250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用后, GSH-PX 酶活性明显升高, 与细胞对照组比较有显著性差异。结论: 一枝蒿总黄酮的体外抗乙肝病毒作用机理与 NF- κB 活化以及细胞膜的 GSH-PX 酶活性升高相关。

[关键词] 一枝蒿总黄酮; 乙肝病毒; 核转录因子- κB ; 谷胱甘肽过氧化物酶

[中图分类号] R285. 5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0072-03

The Study on the Mechanism of Anti-hepatitis B Virus in vitro by Flavonoids Extract from Milfoil Herb

GUO Shan-shan¹, GAO Ying-jie¹, SHI Yu-jing¹, SU Dan¹, CUI Xiao-lan^{1*}, WANG Yi-zhong^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Aerospace center hospital, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of anti-hepatitis B virus by flavonoids extract from milfoil herb, we observed the rate of NF- κB positive cells and activity of GSH-PX on HepG2. 2. 15 cells in vitro. **Method:** The rate of NF- κB positive cells and activity of GSH-PX were determined by SABC immunohistochemistry and colorimetry respectively. **Result:** The rate of NF- κB positive cells increased significantly by treatment of flavonoids extract from milfoil herb at both high and low doses, the activity of GSH-PX increased significantly by treatment of flavonoids extract from milfoil herb at high dose while it increased to some extent for the low dose treatment. **Conclusion:** The anti-hepatitis B virus effect of flavonoids extract from milfoil herb may be related to increasing of the rate of NF- κB positive cells and the activity of GSH-PX. HepG2. 2. 15 cells.

[Key words] flavonoids extract from milfoil herb; hepatitis B virus; NF- κB ; GSH-PX

以往研究发现, 一枝蒿总黄酮在体内外均有较好的抗乙肝病毒作用, 在体外能抑制 HepG2. 2. 15 细胞上清液 HBeAg, HBsAg 的分泌和乙肝病毒 DNA

(HBV DNA) 的复制; 在体内能抑制鸭血清中 DHBsAg 的分泌和 DHBV DNA 的复制。本研究是在药效学研究的基础上, 选用一枝蒿总黄酮的两个抗病毒有效剂量, 进一步对其抗病毒作用机理进行探讨。本研究针对抑制病毒复制和肝脏病理损伤的关键环节, 首次对一枝蒿总黄酮的抗乙肝病毒作用机理进行了探讨。

1 材料

1.1 细胞及培养液 HepG2. 2. 15 细胞株, 为乙肝病

[收稿日期] 2009-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30672646); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2006101)

[通讯作者] * 崔晓兰, Tel: (010) 84015200;

* 王意忠, Tel: (010) 59971450

毒 DNA 克隆转染人肝癌细胞 HepG2 的细胞株, 购自北京大学第一医院传染病科病毒室, 本室常规传代培养。细胞培养液: 为含 10% 胎牛血清(Gibco 公司产品), 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ G418(Gibco 公司产品), 80U $\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 Eagle's MEM (Gibco 公司产品); 细胞维持液: 除新生牛血清含量为 2%, 其余含量均与培养液相同。

1.2 一枝蒿总黄酮 由国家中医药管理局中医药科技开发交流中心提供, 总黄酮含量 > 80%, 用高纯水分别配成 25.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 12.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的原药液灭菌后备用, 临用时以细胞维持液分别稀释成 0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液。

1.3 试剂 NF- κB 免疫组化试剂 一抗: NF- κB p65, 100 倍稀释, 二抗, DAB 显色试剂盒等均为武汉博士德生物工程有限公司产品。谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒: 南京建成生物工程研究所生产, 批号 20070803。考马斯亮兰蛋白试剂盒: 南京建成生物工程研究所生产, 批号 20070813。

1.4 仪器 DMIRB 显微镜 德国 Leica 公司产品。Leica Qwin 图像分析仪系统: 德国 Leica 公司产品。分光光度计: 型号为 UV-3000。CO₂ 培养箱: 日本 Yamato 公司产品。

2 方法

2.1 对 NF- κB 阳性细胞活化率的影响

2.1.1 细胞爬片及药物处理 将 HepG2.2.15 细胞接种于经多聚赖氨酸处理的载玻片上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养, 待细胞长成单层, 弃培养液, 加入分别含 0.250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 一枝蒿总黄酮的细胞维持液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 48 h 后, 进行培养细胞的免疫组化实验。

2.1.2 免疫组化实验 按照免疫组化试剂盒提供的方法操作。实验分为细胞对照组、一枝蒿总黄酮大剂量组和一枝蒿总黄酮小剂量组, 每组各做 5 张细胞爬片, 实验重复 2 次, 同时设阴性对照, 显微镜下观察, 每张细胞爬片计数 1 000 个细胞中阳性细胞数, 计算阳性细胞百分率, 统计采用 *t* 检验。

2.2 HepG2.2.15 细胞膜 GSH-PX 酶活性测定 长满单层的 HepG2.2.15 细胞, 分为细胞对照组、一枝蒿总黄酮大剂量和小剂量组, 两用药组分别加入含 0.250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 一枝蒿总黄酮的细胞维持液, 细胞对照组加入细胞维持液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5%

CO₂ 培养 48 h。将各组细胞用胰酶和 EDTA 混合液消化, PBS 离洗 2 遍后, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将细胞用超声波破碎仪粉碎后, 按试剂盒提供的方法, 分别于 412 nm 和 595 nm 处, 1 cm 光径下进行比色测定。计算公式如下:

$$\text{GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度} (20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{稀释倍数} (5^*) \div \text{反应时间} \div (\text{取样量} \times \text{样本蛋白含量})$$

GSH-PX 酶活力的单位规定每毫克蛋白质, 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为一个酶活力单位。

$$\text{蛋白含量} (\text{g/L}) = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度} (\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$$

每组各做 6 个复管, 实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 一枝蒿总黄酮对 HepG2.2.15 细胞 NF- κB 活化的干预作用 结果见表 1。HepG2.2.15 细胞对照组核转录因子 NF- κB 的阳性细胞活化率为 (7.84 \pm 1.94) %; 一枝蒿总黄酮大剂量和小剂量作用后, NF- κB 阳性细胞活化率明显升高, 与细胞对照组比较均有极显著性差异 ($P < 0.001$)。以上 3 组的核转录因子 NF- κB 阳性 HepG2.2.15 细胞染色表达情况见图 1-A, 1-B, 1-C。其中胞浆核被染成棕黄色的为 NF- κB 活化的阳性细胞; 其他未着色或淡黄色的细胞为 NF- κB 未活化细胞。

表 1 一枝蒿总黄酮对 HepG2.2.15 细胞 NF- κB 活化的干预作用 ($n = 5$)

组别	终浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NF- κB 阳性细胞活化率 (%)
细胞对照组	—	7.84 \pm 1.94
一枝蒿总黄酮	0.250	23.41 \pm 3.56 ²⁾
	0.125	14.64 \pm 4.19 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 一枝蒿总黄酮对 HepG2.2.15 细胞膜 GSH-PX 酶活性的影响 结果见表 2。表达乙肝病毒基因的 HepG2.2.15 细胞膜 GSH-PX 酶活性为 39.60 \pm 15.54 活力单位; 一枝蒿总黄酮大剂量作用后, GSH-PX 酶活性明显升高, 与细胞对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

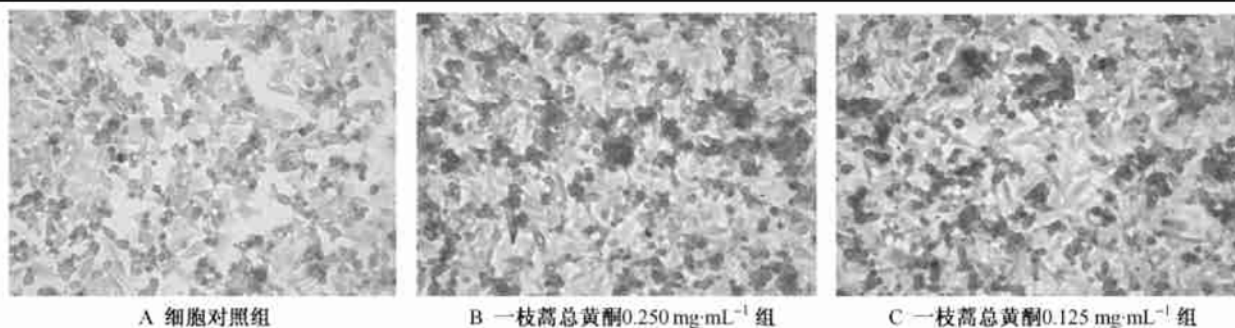


图 1 HepG2. 2. 15 细胞 NF-κB 阳性细胞染色图

表 2 一枝蒿总黄酮对 HepG2. 2. 15 细胞膜 GSH-PX 酶的影响 (n = 6)

组别	终浓度(mg·mL ⁻¹)	GSH-PX 活性(酶活力单位)
细胞对照组	—	39.60 ± 15.54
一枝蒿总黄酮	0.250	64.71 ± 21.54 ¹⁾
	0.125	50.72 ± 20.62

4 讨论

研究表明,肝细胞不仅是 HBV 感染后被攻击的被动受害的靶细胞,而且是一种可以直接清除 HBV 的主动的免疫效应细胞, HepG2 细胞株能表达多种细胞因子^[1],如直接抑制病毒复制的干扰素,而 NF-κB 的活化可启动细胞因子(如 IFN-γ)的激活和释放,增加 NK 细胞活性,进而增强免疫功能^[2-3],在 HBV 感染的结局中起着关键作用。

本实验结果表明,一枝蒿总黄酮能有效地活化 NF-κB,进而通过诱导干扰素等自身效应细胞因子起到清除病毒的作用。

在肝炎病毒感染引起的免疫性和非免疫性肝细胞损伤中,自由基损伤及脂质过氧化损伤占有重要地位,它们作用于细胞膜和细胞大分子,引起脂质过氧化反应,并损伤细胞内 DNA,破坏核苷酸辅酶。GSH-PX 酶是体内主要的抗自由基和抗过氧化因子,

在人体各组织中,以肝脏 GSH-PX 的活性最高。研究表明,肝炎病毒蛋白可通过异常调节 GSH-PX 基因及其表达而引起肝细胞的病理损伤。本实验结果表明,一枝蒿总黄酮大剂量能显著提高乙肝病毒感染后的 GSH-PX 酶活性,从而改善过氧化反应引起的肝损伤;一枝蒿总黄酮小剂量也能在一定程度上提高乙肝病毒感染后的 GSH-PX 酶活性,从而改善过氧化反应引起的肝损伤。

一枝蒿总黄酮的抗病毒作用机理与 NF-κB 的活化及 GSH-PX 酶的活性升高相关,其具体机制有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Ilmars Stonans, Elita Stonane, Stefan Rußwurm *et al.* HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes [J]. *Cytokine*, 1999, 11(2): 151-156.
- [2] 张红栓, 杨运高, 华何与, 等. 乙肝扶正排毒胶囊体外抗乙肝病毒及对 NF-κB 活化干预的实验研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2006, 3(5): 84-86.
- [3] 刘 达, 姚 智. NF-κB 及其活化的研究进展 [J]. *天津医科大学学报*, 2001, 1: 139-142.
- [4] 白桂芹, 成 军, 张树林. 谷胱甘肽过氧化物酶与肝炎病毒蛋白关系的研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 1(2): 82-84.