

蜗牛多糖体外抗乙型肝炎病毒作用研究

湛孝东¹, 王克霞², 李朝品^{1*}

(1. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

[摘要] 目的: 探讨蜗牛多糖抗乙肝病毒活性。方法: 将不同浓度蜗牛多糖与 HepG2. 2. 15 细胞株共培养, 以拉米夫定为阳性对照药, 用 ELISA 法检测 HBsAg 和 HBeAg 分泌水平, 实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 含量, 计算抑制率。结果: 蜗牛多糖在体外能有效抑制 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 分泌, 最大抑制率分别为 42.8% 和 52.1%; 对 HBV DNA 的复制有一定抑制作用 ($P < 0.05$)。结论: 蜗牛多糖在体外具有显著的抗乙型肝炎病毒作用, 且毒性较小, 具有良好应用前景。

[关键词] 蜗牛多糖; HepG2. 2. 15 细胞; 乙型肝炎病毒

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0066-04

Studies on Anti-HBV Effect in vitro of Snail Polysaccharide

ZHAN Xiao-dong¹, WANG Ke-xia², LI Chao-pin^{1*}

(1. Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2. Medical School, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the anti-HBV effect of snail polysaccharide (SP). **Methods:** HepG2. 2. 15 cell strain was used in vitro, and we applied Lamivudine as positive control. ELISA was adopted to detect the level of HBsAg and HBeAg in supernatant. The quantity of HBV DNA was checked by RT-PCR. The inhibition ratio was calculated of SP on HBV. **Results:** SP had a inhibiting effect on the HBsAg and HBeAg with maximum inhibition ratio adding up to 42.8% and 52.1% respectively. There was certain inhibition on replication of HBV DNA ($P < 0.05$). **Conclusions:** SP has a noticeable anti-HBV effect in vitro with low toxicity, which shows a fine applying prospect.

[Key words] snail polysaccharide (SP); HepG2. 2. 15 cell strain; HBV

蜗牛入药历史悠久, 在《名医别录》和《本草纲目》均有蜗牛药方的详细论载。蜗牛味咸、寒, 入大肠、肺、肝、肾经, 具有清热解毒、化痰消肿、平喘理疝之功效, 民间亦有用蜗牛治疗肝炎的偏方。文献报道^[1,2]多糖具有抗病毒、抗肿瘤、增强免疫和降血脂等多种活性。本实验从蜗牛体内提取出多糖, 作用于 HepG2. 2. 15 细胞, 观察其体外抗乙肝病毒活性。

1 实验材料

1.1 药物 蜗牛多糖 (Snail Polysaccharides, SP), 本实验室从陆生贝类条华蜗牛 (*Cathaica fasciola*, 经皖

南医学院李朝品教授鉴定) 中提取。方法为: 活体蜗牛去壳洗净后匀浆, 运用“碱提醇沉”法^[3]提取出多糖, 经柱层析分离纯化后得白色微黄、半透明、具粘性的蜗牛多糖, 纯度约 80%。经气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析, 主要组份为葡萄糖和半乳糖, 组成比例约 1:1。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱, 德国 MEMMERT 公司; 倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 多标记微孔板检测仪, 美国 Perkin-Elmer 公司。

1.3 试剂 HepG2. 2. 15 细胞株, 复旦大学上海医学院分子病毒实验室提供; DMEM 培养基 (高糖), 美国 GIBCO 公司 (批号: 1344180); 胰酶, 美国 GIBCO 公司; 胎牛血清, 美国 GIBCO (批号: 160000); MTT 检测

[收稿日期] 2007-08-06

[通讯作者] * 李朝品, Tel: (0553) 3932587; E-mail: cpli@wnmc.edu.cn

试剂盒,北京碧云天(批号:C0009-1);拉米夫定,葛兰素-威康(每片含 100 mg 拉米夫定);ELISA 试剂盒;上海科华(批号:20060530);荧光定量 PCR 试剂盒,大连 Takara(批号:DRR031A);HBV 探针和引物,美国 ABI 公司;其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 HepG2. 2. 15 细胞的复苏与传代 将液氮冷冻保存的细胞培养于 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清, pH 7.2)。细胞置于细胞培养箱中在 37℃ 5% CO₂ 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 药物细胞毒性实验 参照 Mosmann 建立的四甲基偶氮唑盐法(MTT)^[4],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 2×10^4 cells·mL⁻¹,加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL。培养板置于细胞培养箱中,37℃ 5% CO₂ 培养过夜待贴壁。吸去上清后分别加入含 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1 和 10 mg·mL⁻¹ 蜗牛多糖(SP)的 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, pH 7.2),每孔 100 μL,每个浓度 3 复孔。同时设不加药物的细胞对照组和阳性对照拉米夫定组。作用 48 h 后,各孔加入 10 μL MTT 并继续培养 4 h。仔细吸去上清,避免碰到底部的细胞,然后每孔加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO),轻轻振荡使甲臜颗粒充分溶解,用酶标仪检测 570 nm 波长处 OD 值。按 Reed-Muench 法^[5]计算半数有毒浓度 TC₅₀ 和最大无毒浓度 TC₀。TC₅₀ 即细胞存活率为 50% 时的药物浓度;一般认为在药物作用下若细胞存活率 > 95%,此药物浓度即为 TC₀,对培养细胞无毒性,为药物作用的安全浓度^[6]。

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

$$\text{TC}_{50} = \text{Antilog}(B +$$

$$\frac{50 - < 50\% \text{ 抑制百分率}}{> 50\% \text{ 抑制百分率} - < 50\% \text{ 抑制百分率}} \times C)$$

式中: B = log < 50% 药物浓度, A = log > 50% 药物浓度, C = A - B, 下同。

细胞抑制率(%) =

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

2.3 药物抑制实验 HepG2. 2. 15 细胞用胰酶消化后制成单细胞悬液,调细胞浓度至 2×10^4 cells·

mL⁻¹,加入 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL。37℃、5% CO₂ 培养过夜。取出培养板,吸出上清后依次加入含有 10^{-2} , 10^{-1} 和 1 mg·mL⁻¹ 蜗牛多糖的 DMEM 培养液,每孔 1 mL,即药物低,中,高剂量组,继续培养。同时设拉米夫定阳性药物对照组和细胞对照组,每浓度 3 个复孔。于第 3, 6 d 更换新鲜的含药物培养基。第 9 d 收集各孔上清液至 1.5 mL 离心管中 - 20℃ 冻存,待检测 HBsAg、HBeAg 的水平和 HBV DNA 的含量。

2.4 HBsAg 和 HBeAg 检测 HBsAg、HBeAg 检测采用 ELISA 法,严格按说明书步骤操作。SP 对 HepG2. 2. 15 抗原分泌的抑制效果以抑制率表示。

抗原抑制率(%) =

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

2.5 HBV DNA 含量检测

2.5.1 HBV DNA 抽提 操作步骤:取上述收集的各孔细胞上清液及试剂盒中的阴性对照品和标准品各 50 μL,分别加至 0.5 mL 离心管中;等体积加入 8% 聚乙二醇(PEG) 50 μL 沉淀 HBV,振荡混匀,1 200 r·min⁻¹ 离心 10 min;弃上清,加入等体积 DNA 提取液 12% chelex,振荡混匀,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 s;100℃ 沸水浴 10 min;12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 50 μL 供 PCR 做模板。

2.5.2 HBV DNA 扩增及检测 将提取的 HBV DNA 使用 iCycler 进行荧光定量。PCR 扩增目的片段:115 bp HBV 基因区 p 区 292~407。扩增引物: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℃ 变性 10 s,然后进行 41 个 PCR 循环:94℃ 20 s,60℃ 40 s。激发荧光在 86℃ 检测,数据用 iCycler iQ 3.1 进行分析。

2.6 药物效果评价 药物抗 HBV 活性用选择指数(Selectivity Index, SI) 进行评价。SI = TC₅₀/IC₅₀。IC₅₀ (半数有效浓度)表示抑制率为 50% 时的药物浓度。IC₅₀ = Antilog(B +

$$\frac{50 - < 50\% \text{ 抑制百分率}}{> 50\% \text{ 抑制百分率} - < 50\% \text{ 抑制百分率}} \times C)$$

当 SI > 2 时,表明药物有效低毒;当 1 ≤ SI ≤ 2 时,提示药物有效有毒;当 SI < 1 时,则表明药物为毒性作用。SI 值越大,表示药物对 HBV 的抑制作用越强,细胞毒性越小。

2.7 数据处理 所有实验数据运用 SPSS 11.5 统计软件包处理, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 药物毒性检测结果 不同浓度的蜗牛多糖和拉米夫定对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用见表 1。

表 1 蜗牛多糖、拉米夫定对 HepG2. 2. 15 细胞的毒性作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值	细胞存活率 (%)
细胞对照	—	0.457 ± 0.034	
蜗牛多糖	0.001	0.451 ± 0.011	98.7
	0.01	0.443 ± 0.006	96.9
	0.1	0.442 ± 0.003	96.7
	1	0.437 ± 0.007 ²⁾	95.6
	10	0.413 ± 0.009 ¹⁾	90.4
拉米夫定	0.001	0.438 ± 0.012	95.8
	0.01	0.433 ± 0.009	94.7
	0.1	0.426 ± 0.019	93.2
	1	0.413 ± 0.016 ¹⁾	90.4
	10	0.401 ± 0.016 ¹⁾	87.7

注: 与细胞对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与拉米夫定同浓度组比较²⁾ $P < 0.05$ (下同)

从表 1 中可以看出, SP 在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下, 细胞存活率 > 95%, 即 $\text{TC}_0 = 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可认为 SP 在此浓度下对 HepG2. 2. 15 细胞基本无毒性。拉米夫定在 $10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下细胞存活率 > 95%。因此, 药物抑制实验中 SP 的浓度分别设为 10^{-2} , 10^{-1} 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 阳性对照药物拉米夫定浓度设为 $10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。表中结果表明, 相同浓度的蜗牛多糖与拉米夫定相比较, 拉米夫定的细胞存活率较低, 说明拉米夫定的细胞毒性较蜗牛多糖大($P < 0.05$)。

3.2 HBsAg 和 HBeAg 的检测结果 蜗牛多糖对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 抑制作用见表 2。

表 2 蜗牛多糖对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的抑制($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	HBsAg		HBeAg	
		OD 值	抑制率(%)	OD 值	抑制率(%)
细胞对照	—	1.688 ± 0.048	—	1.551 ± 0.044	—
拉米夫定	0.001	1.200 ± 0.140 ¹⁾	28.9	0.906 ± 0.053 ¹⁾	41.6
蜗牛多糖	0.01	1.319 ± 0.014 ¹⁾	21.9	0.990 ± 0.037 ¹⁾	36.2
	0.1	1.247 ± 0.075 ¹⁾	26.1	0.920 ± 0.040 ¹⁾	40.7
	1	0.966 ± 0.031 ¹⁾	42.8	0.743 ± 0.040 ¹⁾	52.1

3.3 荧光定量 PCR 的检测结果 蜗牛多糖对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 复制的抑制作用见表 3。

表 3 蜗牛多糖对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 复制抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	HBV-DNA 含量 log(copies·mL ⁻¹)
细胞对照	—	5.580 ± 0.056
拉米夫定	0.001	4.690 ± 0.078 ¹⁾
蜗牛多糖	0.01	5.166 ± 0.031 ¹⁾
	0.1	5.110 ± 0.044 ¹⁾
	1	4.950 ± 0.118 ¹⁾

3.4 药物效果评价结果 蜗牛多糖 HBV 的药效评价结果见表 4。

表 4 蜗牛多糖抗 HBV 的药效评价结果

组别	TC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SI
HBsAg	> 10	—	—
HBeAg	> 10	0.65	> 15.29

4 讨论

本实验以肝源性肿瘤细胞株 2. 2. 15(HepG2. 2. 15) 为乙型肝炎细胞模型。HepG2. 2. 15 是将含有 HBV 基因组(2 个 HBV 头对尾二聚体, 以尾对尾方向串联) 的重组载体质粒转染 HepG2 细胞而得到的克隆。该细胞株能在体外长期培养, 稳定、高水平地分泌 HBsAg, HBeAg 及 Dane 颗粒, 还能产生大量的复制中间体, 在培养上清中也可检测到病毒 DNA^[7]。该模型在中药成分抗病毒研究中被广泛应用。细胞对照组中检测到了较高水平的 HBsAg, HBeAg 分泌, 说明该模型评价结果具有可信性。

实验中以拉米夫定为阳性实验对照药物。该药是新型核苷类药物, 进入细胞后, 在细胞内磷酸化为拉米夫定三磷酸盐(L-TP), 可竞争性抑制 HBV 聚合酶从而抑制前基因 RNA 反转录为负链 DNA, 阻断新合成 HBV DNA 的链化, 达到抑制 HBV 复制的目的。该药为目前国际公认治疗慢性乙肝理想药物, 但其治疗乙肝存在副作用大、停药后反弹和耐药性问题^[8]。本实验结果表明拉米夫定抗 HBV 效果虽优于蜗牛多糖, 但其细胞毒性作用明显大于蜗牛多糖($P < 0.05$)。此外, 蜗牛多糖提取方法简单, 制备成本较低。综合考虑我们认为蜗牛多糖作为临床抗 HBV 药物仍有研究应用前景。

实验结果表明蜗牛多糖在体外能显著抑制 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的分泌, 同时对 (下转第 72 页)

(上接第 68 页)

HBV DNA 的复制也有一定抑制作用($P < 0.05$), 抑制率随蜗牛多糖浓度增大而增强, 具有良好的量效关系, 而且毒性小。对 HBeAg 的抑制效果明显好于 HBsAg, 这同以往文献结果一致^[9], 可能是由于蜗牛多糖对编码 HBsAg 和 HBeAg 的基因抑制效果不同所导致。有关多糖抗病毒机制目前意见还不统一, 主要包括阻断病毒与宿主细胞的吸附、抑制病毒逆转录酶和增强机体免疫这三方面^[10]。本研究表明蜗牛多糖可能是通过抑制病毒逆转录酶, 从而干扰了 HBV DNA 的复制, 达到抗 HBV 效果。因为体外实验排除了阻止病毒对宿主细胞的吸附及免疫增强这两种机制的可能。

多糖类药物的活性很大程度上决定于其分子构象, 由于条件限制, 未能对蜗牛多糖的构象和多糖组份进行深入研究。体外实验并不能反映体内所特有的免疫调节和体内代谢对药物效果的影响, 因此还需进行体内实验。此外, 文献报道多糖类药物还具有抗肿瘤, 抗氧化和降血糖等作用, 蜗牛多糖是否具有此类活性, 还有待深入研究。

[参考文献]

- [1] 湛孝东, 王克霞, 李朝品, 等. 贝类多糖生物学活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1285-1286.
- [2] 湛孝东, 王克霞, 李朝品, 等. 蜗牛多糖的提取和免疫

学活性研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2191-2192.

- [3] 张璐, 刘强. 茯苓多糖制备工艺及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 61-64.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 夏伟良, 谢海洋, 沈岩, 等. 环孢素和他克莫司在体外对乙型肝炎病毒复制影响的对比研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(2): 111-115.
- [7] Romero MR, Efferth T, Serrano MA, *et al.* Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system[J]. Antiviral Res, 2005, 68(2): 75-83.
- [8] 王建设. 拉米夫定对慢性乙型肝炎治疗的突破及面临的问题[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 16(3): 134.
- [9] Gu CQ, LI J, Chao FH. Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: synergistic effect of combination with interferon alpha in HepG2. 2. 15 [J]. Antiviral Res, 2006, 72(2): 162-165.
- [10] Collins RA, Ng TB. Polysaccharopeptide from *coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type I infection[J]. Life Sci, 1997, 60(25): 383.