

# 原卟啉二钠体外对丙型肝炎病毒复制子的抑制作用

刘群红\*, 梁 勇, 王克霞

(安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

[摘要] 目的: 探讨原卟啉二钠(PPN) 体外对丙型肝炎病毒(HCV) 的抑制作用。方法: 用不同浓度 PPN 和利巴韦林处理 HCV 复制子细胞模型, MTT 法检测药物的细胞毒性作用; 荧光定量 PCR 检测 HCV RNA。结果: PPN 和利巴韦林浓度在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下时, MTT 法比色 A 值比较, 实验组与对照组间差异均无显著性, 无明显细胞毒性; PPN 在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对 HCV RNA 的抑制率为 73.44%, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 利巴韦林在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对 HCV RNA 的抑制率为 40.78%, 差异无显著性, 二者抑制 HCV RNA 的  $\text{EC}_{50}$  分别为  $0.23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $1.19 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论: PPN 和利巴韦林浓度在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下时对 HCV Replicon 细胞生长无毒性作用; PPN 具有明显的体外抑制在 HCV 复制的作用, 抑制作用强于利巴韦林。

[关键词] 原卟啉二钠; 丙型肝炎病毒; 丙型肝炎病毒复制子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0046-03

## Effect of Protoporphyrin Disodium in Vitro on The Anti-HCV Replicon

LIU Qun-hong\*, LIANG Yong, WANG Ke-xia

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

[Abstract] **Objective:** To study the in vitro inhibitory of protoporphyrin disodium(PPN) on Hepatitis C virus. **Methods:** The different concentration of PPN and ribavirin water solution were respectively added into HCV Replicon cell medium. The cell toxicity of PPN was determined with MTT method. Real-time PCR was used for determining secreted HCV RNA in the culture medium. **Results:** PPN and ribavirin had no obvious cell toxicity at the concentration of  $1 \text{ mg} / \text{mL}$ . When the drug concentration of PPN was  $1 \text{ mg} / \text{mL}$ , inhibitive rates of HCV RNA was 73.44%. The experimental group and control group had striking difference ( $P < 0.05$ ), When the drug concentration of ribavirin was  $1 \text{ mg} / \text{mL}$ , inhibitive rates of HCV RNA was 40.78%.  $\text{EC}_{50}$  were  $0.23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $1.19 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectively. **Conclusion:** PPN can inhibit duplication of Hepatitis C Virus in Vitro and its effect was better than ribavirin.

[Key words] protoporphyrin disodium(PPN); hepatitis C virus(HCV); HCV replicon

原卟啉二钠, 化学名为 1, 3, 5, 8-四甲基-2, 4-二乙烯基卟吩-6, 7-二丙酸钠(Protoporphyrin Disodium PPN), 卟吩的衍生物, 是由 4 个吡咯环经 4 个次甲基链连接而成的含共轭双键的大环化合物, 可由血红蛋白的辅基血红素经人工提取、加工而成。它具有促进细胞呼吸、改善蛋白质和糖代谢、抗补体结合等作用。有关 PPN 抗丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,

HCV) 作用的研究未见报道。本研究以作者实验室提取加工的 PPN 为研究药物, 利用 HCV 复制子(HCV Replicon) 细胞模型, 探讨了其体外抑制 HCV 作用。

### 1 材料

**1.1 研究药物** PPN( $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{Na}_2$ ,  $M = 542$ ) 为红褐色结晶, 可溶于水, 不溶于氯仿、乙醚及丙酮, 易溶于酸性溶液, 溶于酸性溶液后在波长 600, 556, 408 nm 显示吸收峰, 最大吸收峰为 408 nm, 在紫外光照射下可见很强的红色荧光。作者实验室以非抗凝猪血为原料, 经血红素、原卟啉粗品、原卟啉甲酯、原卟啉纯

[收稿日期] 2007-03-09

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

品、原卟啉二钠等制备过程而得<sup>[1]</sup>, 在波长 408 nm 处于  $1.37 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 溶液中比色, 检测其纯度为 97.3%。利巴韦林购自上海信谊药业有限公司。

**1.2 HCV 复制子细胞模型** 该细胞模型是用合成的 HCV 亚基因组复制子转染人肝癌细胞株 Huh-7, 通过用含 G418 的培养基培养, 获得抗磷酸新霉素的克隆, 这些克隆可持续表达复制子 RNA<sup>[2]</sup>。本文使用的细胞株引自复旦分子病毒实验室, 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中。

**1.3 主要试剂** 荧光定量 PCR 检测试剂盒 (TAKARA), 细胞 counting Kit-8 (Dojindo), SYBR Green I, Calibration (BIO-RAD), PCR 引物 (中科开瑞生物芯片股份有限公司), 标准品 (复旦悦达生物技术有限公司)。

**1.4 主要仪器** 酶标仪 (BIO-RAD Benchmark), 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD), 电泳系统 (上海复旦科技), 台式离心机 (SORVALL pico)。

## 2 实验方法

**2.1 细胞毒性实验** 取长满的 Replicon 细胞 1 瓶, 加 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备成单细胞悬液。细胞计数, 并调整浓度为  $1 \times 10^5$  细胞/mL, 接种 96 孔板 (100  $\mu\text{L}$ /孔)。细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养过夜, 次日弃去培养上清液, 依次加入含有药物的完全培养基, 药物最高浓度 PPN 为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 利巴韦林为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 各组药物 10 倍稀释, 共 5 个浓度。不同稀释倍数的药物加于单层 HCV Replicon 细胞上, 每种浓度设 4 个复孔, 每日观察细胞生长形态, 检查有无病变。药物作用 72 h 后, MTT 法测定细胞的存活率, 抑制率 (IC) 的计算方法:  $\text{IC} = 1 - (A_{\text{药物处理组}} / A_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$ 。

**2.2 细胞株的药物处理** 另取长满的 HCV 复制子转染细胞 1 瓶, 加 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备成单细胞悬液。细胞计数, 并调整浓度为  $1 \times 10^4$  细胞/mL, 接种 24 孔板 (1 mL/孔)。细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养过夜, 次日弃去培养上清液, 依次加入含有药物的完全培养基, PPN 和利巴韦林的浓度均为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 各组药物 10 倍稀释, 共 4 个浓度, 同时设细胞对照, 每种浓度设 4 个复孔。药物作用 72 h 后收集细胞, 用 Trizol 法提取细胞 HCV RNA。荧光定量 PCR 反应检测 HCV RNA 拷贝数, 与对照组比较, 计算抑制率 (IC) 和半数有效剂量 ( $\text{EC}_{50}$ )。  $\text{IC} = 1 - (\text{给药组拷贝数} / \text{对照组拷贝数}) \times 100\%$ ;  $\text{EC}_{50}$  使用 Logit 法计算。

**2.3 Trizol 法提取 HCV RNA<sup>[3]</sup>** 加入 Trizol 500  $\mu\text{L}$ /孔, 吹打细胞使其裂解, 吸入灭菌的 Eppendorf 管中, 加入氯仿 200  $\mu\text{L}$ /管, 剧烈震荡混匀 30 s, 室温静置 5 min。12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min。将上清转移到新的 Eppendorf 管中, 加入等体积的异丙醇和 1  $\mu\text{L}$  糖原混匀, 室温静置 5 min, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清。用 70% 乙醇 700  $\mu\text{L}$  洗涤 2 次, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清, 空气中凉干, 加入 (30~50)  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  使其溶解, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存待测。

**2.4 荧光定量 PCR 反应检测 HCV RNA<sup>[3]</sup>** 在反应体系中加入以下试剂:  $5 \times \text{R-PCR Buffer}$  5.0  $\mu\text{L}$ ;  $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$  0.3  $\mu\text{L}$ ;  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{dNTP}$  0.75  $\mu\text{L}$ ;  $25 \times \text{SYBR Green I}$  荧光染料 1.0  $\mu\text{L}$ ;  $10^{-3} \times \text{Calibration}$  1.0  $\mu\text{L}$ ; 5 U/ $\mu\text{L}$  HSEx-Taq 酶 0.25  $\mu\text{L}$ ; 模板 1.0  $\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$  引物 (HCVs:  $5' \text{-TgAggAACCGgTgAgTACA-3'}$ , HCVas:  $5' \text{-CTTAAggTTTAggATTCgTgCTCAT-3'}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ ; 补充 dd $\text{H}_2\text{O}$  至 25  $\mu\text{L}$ , PCR 检测 HCV RNA。

## 3 结果

**3.1 药物的细胞毒性作用** 结果见表 1, PPN 在最高浓度  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下时对细胞基本无毒性; 利巴韦林在  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对细胞生长有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 在  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下时对细胞基本无毒性。

表 1 药物对 HCV 复制子转染细胞的毒性作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	药物浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	A 值	抑制率 (%)
PPN 组	1	$2.052 \pm 0.122$	2.75
	$1 \times 10^{-1}$	$2.056 \pm 0.112$	2.63
	$1 \times 10^{-2}$	$2.056 \pm 0.101$	2.54
	$1 \times 10^{-3}$	$2.067 \pm 0.140$	2.02
	$1 \times 10^{-4}$	$2.070 \pm 0.137$	1.89
利巴韦林组	10	$1.775 \pm 0.128^{1)}$	15.88
	1	$2.058 \pm 0.196$	2.45
	$1 \times 10^{-1}$	$2.059 \pm 0.087$	2.51
	$1 \times 10^{-2}$	$2.060 \pm 0.143$	2.36
	$1 \times 10^{-3}$	$2.071 \pm 0.157$	1.96
空白对照组	0	$2.112 \pm 0.066$	0

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (下同)

**3.2 药物对 HCV 的抑制作用** 结果见表 2。PPN 在  $1 \text{ mg/mL}$  时与空白对照组相比具有明显的体外抑制 HCV 复制的作用 ( $P < 0.05$ ),  $\text{EC}_{50}$  显示, PPN 的抑制作用强于利巴韦林。

表 2 药物对 HCV RNA 的抑制作用

组别	药物浓度 (mg·mL <sup>-1</sup> )	HCV RNA (10 <sup>4</sup> copies·mL <sup>-1</sup> )	抑制率 (%)	EC <sub>50</sub> (mg·mL <sup>-1</sup> )
PPN 组	1	1.15 ± 0.13 <sup>1)</sup>	73.44	0.23
	1 × 10 <sup>-1</sup>	2.73 ± 0.43	36.95	
	1 × 10 <sup>-2</sup>	3.87 ± 0.52	10.62	
	1 × 10 <sup>-3</sup>	3.91 ± 0.49	9.70	
空白对照组	0	4.33 ± 0.39	0	
利巴韦林组	1	2.44 ± 0.31	40.78	1.19
	1 × 10 <sup>-1</sup>	2.76 ± 0.52	33.01	
	1 × 10 <sup>-2</sup>	3.84 ± 0.28	6.80	
	1 × 10 <sup>-3</sup>	4.01 ± 0.47	2.67	
空白对照组	0	4.12 ± 0.23	0	

#### 4 讨论

HCV Replicon 细胞模型由 Lohmann 等于 1999 年在 Science 上首先报道<sup>[4]</sup>, 因其具有在人肝癌细胞株 Huh-7 中能高水平的自主复制, 病毒复制所需的酶系如 NS 2-3 和 NS3/4 的蛋白水解酶、NS3 的 NTPase、NS5B 的 RdRp 及 RNA 解旋酶等在此系统中均能被编码, 复制子在细胞中复制对宿主细胞生长和代谢无明显影响等特点, 使其成为目前公认的研究 HCV 致病机制、治疗药物筛选及疫苗的理想模型<sup>[5]</sup>。MTT 法的原理是利用活细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶能将 MTT 盐还原成蓝紫色的甲瓩颗粒, 以颗粒溶解后呈现的颜色深浅反映细胞活性, 以此数据换算得出 EC<sub>50</sub>, 比在镜下观察和判断细胞破坏程度的传统方法更客观、可信<sup>[6]</sup>。

HCV 全基因组是一条约 9.6 kb 长的单正链 RNA, 包括 5' 非编码区 (untranslated region, 5'-UTR), 一条长的开放阅读框和 3' 非编码区。HCV 的功能蛋白来自一个大的蛋白质前体的剪接和加工, 在宿主和病毒蛋白酶的共同作用下, (3 010~ 3 040) 个氨基酸残基的前体多肽被水解成至少 10 个不同的蛋白产物, 其中细胞蛋白包括 C, E1, E2 和 P7, 非结构蛋白包括 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B。其中结构蛋白 E2 的变异性最大, 这使病毒能够逃避宿主的免疫监视, 是丙型肝炎难以治愈和慢性化的主要原因<sup>[7]</sup>。目前, 对丙型肝炎治疗的有效药物为干扰素-α 或其与利巴韦林联合应用, 但二者联合治疗后仅有 40% 的病例能保持持续性病毒学指标阴性, 治疗成功的病例仅有 10%~ 15%<sup>[8]</sup>, 因此, 研制出新的

丙型肝炎治疗药物显得日益迫切。

原卟啉是机体构成血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶及色氨酸吡咯酶的必需成分。原卟啉在细胞内呈环状结构, 易与金属离子结合成金属卟啉。当肝脏发生疾病引起功能障碍时, 胆汁中卟啉与金属卟啉减少, 肝脏过氧化氢酶活性降低, 因此, 体外给予 PPN 就可在细胞内激发卟啉和金属卟啉的生物合成, 提高细胞内金属卟啉的含量, 阻止肝脏过氧化氢酶活性的降低, 促进细胞的呼吸和再生, 在减少肝细胞病变坏死的同时恢复细胞功能。因上述代谢特点, 使 PPN 具有提高肝脏及有关脏器血流量及氧气利用率, 促进组织细胞呼吸, 改善蛋白质和糖代谢, 增强抗补体结合作用和机体免疫力及抗炎、抗过敏等作用, 所以 PPN 一直作为肝脏机能改善剂加以研究和应用。本研究从另外一个角度入手, 探讨 PPN 体外抑制 HCV 的作用, 研究结果显示, PPN 可有效抑制丙型肝炎病毒的复制, 且对靶细胞 (肝细胞) 无细胞毒作用。此作用的机理可能是 PPN 在肝细胞内代谢的某种中间产物可作用于 HCV 基因区, 通过影响 HCV 调节基因的表达 (如一些蛋白酶), 最终抑制 HCV 的复制, 因此, PPN 对 HCV 的抑制作用机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 刘群红, 李朝品, 张超, 等. 非抗凝动物血提取原卟啉二钠的实验研究[J]. 淮南工业学院学报, 2002, 22(4): 74-78.
- [2] 巨立中, 成军, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒复制模型系统[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(12): 1954-1956.
- [3] 王健, 赵金红, 江水清, 等. 慢性乙肝患者 CXCL10 的表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(12): 1049-1050.
- [4] Lohmann V., Korner F., Koch J., et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line[J]. Science, 1999, 285(5424): 110-113.
- [5] Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture[J]. Science, 2000, 290(5498): 1972-1974.
- [6] 邵文爱, 张丽媛, 李康生. 抗病毒药物筛选中两种方法的比较[J]. 汕头大学医学院学报, 2006, 1: 52-54.
- [7] 刘辉生, 周晓峰, 刘立德. 分子病毒学[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 2000. 338-339.
- [8] 姚光弼. 展望慢性病毒性肝炎的治疗[J]. 肝脏, 2002, 7(1): 62-65.