

NAPP 体外抗乙型肝炎病毒作用的实验研究

范巧云, 刘群红, 李朝品, 王健

摘要: [目的] 应用 HepG2.2.15 细胞株作为体外抗乙型肝炎病毒的实验模型, 研究 NAPP 对乙肝病毒的抑制作用。[方法] 以 NAPP 梯度浓度与 HepG2.2.15 细胞混合培养, 通过 MTT 法检测药物的细胞毒性, 9 d 后取细胞培养上清液, 用 ELISA 法测定 HBsAg、HBeAg 含量, 荧光定量 PCR 检测上清液中病毒载量。[结果] NAPP 浓度在 1 mg/ml 时, 对细胞无明显毒性; NAPP 在所稀释的各浓度下, 对 HBsAg、HBeAg 均有抑制作用, 对 HBsAg、HBeAg 的治疗指数分别大于 188.7 和 64.5; NAPP 可抑制 HBV-DNA 的复制。[结论] NAPP 体外对 HBV 有显著的抑制作用。

关键词: 原卟啉二钠; 细胞培养; 乙肝治疗

EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECT OF PROTOPORPHYRIN DISODIUM IN VITRO ON ANTI-HBV FAN Qiao-yun, LIU Qun-hong, LI Chao-pin, et al. (School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China)

Abstract: [Objective] To study the in-vitro inhibition of Hepatitis B virus of NAPP and the cytotoxicity to HepG2.2.15 cell strain. [Methods] The cell toxicity of NAPP was determined with MTT method, and the effect of NAPP on HBsAg and HBeAg extracted by HepG2.2.15 cells was determined under different concentrations on the ninth day with ELISA method. Real-time fluorescence quantitative PCR was used for determining extracted HBV-DNA in the culture medium. [Results] NAPP had no obvious cell toxicity at the concentration of 1mg/ml and depressed duplication of HBV DNA. NAPP had obvious restrain effect on HBsAg and HBeAg. The therapeutic index of NAPP was 188.7 for HBsAg and 64.5 for HBeAg. [Conclusion] NAPP has no obvious immediate cell toxicity on the cells and can inhibit the duplication of Hepatitis B Virus in Vitro.

Key words: Protoporphyrin disodium (NAPP); Cell culture; Hepatitis B treatment

原卟啉钠 (1, 3, 5, 8-四甲基-2, 4-二乙基吡吩-6, 7-二丙酸钠 Protoporphyrin Disodium, NAPP) 是吡吩的衍生物, 由 4 个吡咯环经 4 个次甲基键连接而成的含共扼双键的大环化合物, 可由血红蛋白的辅基血红素经人工提取、加工而成的。NAPP 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, 所以一直作为肝脏机能改善剂加以应用。近年来有研究报道, NAPP 具有抗乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的作用^[1], 但其对 HBV-DNA 的确切抑制效果尚未见报道。为进一步明确其抗 HBV 效果, 取本实验室提取、加工的 NAPP 与 HepG2.2.15 细胞混合培养, 现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 抗病毒药

原卟啉钠 (本实验室提取, 纯度 91.4%), 拉米夫定 (葛兰素史克公司, 批号: 06070026)

1.2 试剂

MEM 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

基金项目: 安徽理工大学青年教师基金项目 (QN200644); 安徽理工大学硕士基金资助项目

作者简介: 范巧云 (1978-), 女, 助教, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗乙肝病毒细胞分子机制研究

作者单位: 安徽理工大学医院病原生物学教研室, 淮南, 232001

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

CO₂ 细胞培养箱 (上海博迅实业有限公司)、超净工作台 (苏州医药净化设备厂)、倒置显微镜 (日本 OLYMPUS)、荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad)、酶标仪 (美国 Perkin-Elmer)

1.4 HepG2.2.15 细胞

引自上海复旦大学医学院分子病毒实验室

1.5 方法

1.5.1 HepG2.2.15 细胞株的培养方法 取 HepG2.2.15 细胞, 用 DMEM 液培养, 培养液添加体积分数为 10% 的胎牛血清、0.03 g/L L-谷氨酰胺、100 mg/LG418, 105 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素, 50 g/L NaHCO₃ 调 pH 值至 7.2。置 37℃、5% CO₂ 环境中生长, 每 2~3 d 更换培养液。细胞生长到 70%~80% 时, 胰酶 (含有 EDTA 的效果较好) 消化传代。

1.5.2 细胞毒性检测 取 HepG2.2.15 细胞 1 瓶, 用 0.06% 胰酶消化后制备成单细胞悬液, 计数后调整细胞浓度至 2×10⁴ cell/ml, 加入 96 孔培养板中, 每孔 100 μl, 每个浓度设 3 个复孔。置于细胞培养箱中, 37℃、5% CO₂ 培养过夜待贴壁。吸去上清后加入含有不同浓度药物 (1 mg/ml, 10⁻¹ mg/ml, 10⁻² mg/ml, 10⁻³ mg/ml, 10⁻⁴ mg/ml) 的 DMEM 培养基。作用 72 h 之后, 各孔中加入 10 μl 的 MTT 并继续培养 4 h。仔细吸去上清, 每孔加入 100 μl DMSO, 轻轻振荡使甲臞溶解, 用酶标仪检测 570 nm 波长测定吸光度的 OD 值。计算细胞存活率

和药物的半数毒性浓度 TC_{50} , TC_{50} 是实验组存活细胞为对照组的 50% 时的药物浓度。细胞存活率 = $[(OD \text{ 实验孔} - OD \text{ 空白对照}) / (OD \text{ 细胞对照} - OD \text{ 空白对照})] \times 100\%$

按 Reed 及 Muench 法计算各种药物的半数毒性浓度 TC_{50} , 公式如下:

$$TC_{50} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - < 50\% \text{抑制百分率}}{> 50\% \text{抑制百分率} - < 50\% \text{抑制百分率}} \times C \right)$$

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

$$B = \log < 50\% \text{药物浓度}$$

1.5.3 药物对细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 抑制作用 HepG2

2.2.1 5 细胞胰酶消化后, 按 2×10^4 cell/ml 接种 24 孔培养板, 每孔 1 ml, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养, 4 d 后换用含药培养液, 并设拉米夫定为阳性对照组。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, 梯度稀释成 5 种浓度。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, 并与 d 3、6 更换新鲜的含药液培养, d 9 收集各孔细胞上清液, -20°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。

药物对抗原的抑制率 (%) =

$$\frac{\text{细胞对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{细胞对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}} \times 100\%$$

IC_{50} 为 HBsAg、HBeAg 抑制率为 50% 时的药物浓度。

治疗指数 $TI = TC_{50} / IC_{50}$ 。

1.5.4 定量检测细胞上清液中 HBV-DNA 从细胞培养上清中的

HBV 病毒颗粒中提取的病毒 DNA, 使用 Icyclus 进行荧光定量。在反应体系中加入以下试剂: $5 \times \text{R-PCR Buffer } 5.0 \mu\text{l}$; $250 \text{ mM Mg}^{2+} 0.5 \mu\text{l}$; $10 \text{ mM dNTP } 0.75 \mu\text{l}$; 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 ddH_2O 至 $25 \mu\text{l}$ 。扩增引物是: HBVFP: $5' - \text{TgT CCT ggT TAT CgC Tgg} - 3'$ 和 HBVRP: $5' - \text{CAA ACg ggC AAC ATA CCT T} - 3'$ 。样品 95°C 预变性 5

min, 然后 $94^\circ\text{C } 20 \text{ s}$; $60^\circ\text{C } 40 \text{ s}$, 共 41 个 PCR 循环。激发荧光在 86°C 检测, 数据用 Icyclus IQ 3.1 进行分析。

2 结果

2.1 药物对 2.2.15 细胞的毒性作用

通过 MTT 法测得 NAPP 和拉米夫定浓度为 1 mg/ml 时, 对 HepG2.2.15 细胞均无明显毒性, 所以可选择 1 mg/ml 的药物浓度来评价药效。

2.2 药物对 2.2.15 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的影响

NAPP 在所稀释的各浓度下对 HBsAg、HBeAg 均有一定的抑制作用, 并呈剂量依赖关系 (见表 1)。表中数据经统计学分析, NAPP 和拉米夫定的各浓度组与细胞对照组相比 HBsAg、HBeAg 的 OD 值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。NAPP 的各剂量组之间 HBsAg、HBeAg 的 OD 值差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。NAPP 组与拉米夫定组同浓度相比, 浓度为 10^{-4} 时, 对 HBsAg、HBeAg 抑制差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 其他浓度时, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$))

用治疗指数 (TI) 评价 NAPP 的抗 HBV 效果。当 $TI < 1$ 时, 受试药物为低效有毒, 当 $1 < TI < 2$ 时受试药物有效有毒, 当 $TI > 2$ 时, 受试药物高效低毒, TI 越大, 则表明该药对 HBV 的抑制作用越强, 细胞毒越小^[2]。由表 2 可知 NAPP 和拉米夫定的治疗指数都大于 2, NAPP 对 HBsAg、HBeAg 的治疗指数分别大于 188.7 和 64.5, 提示对 HBsAg、HBeAg 的分泌均有抑制作用且毒性低。

2.3 药物对细胞上清液中 HBV DNA 的作用

通过实时荧光定量 PCR 检测细胞上清液中病毒载量, 测定值以均数 \pm 标准差表示 (见表 1), NAPP 和拉米夫定各浓度组分别与细胞对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); NAPP 组和拉米夫定组同浓度相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 NAPP 和拉米夫定均可抑制 HBV-DNA 复制, 且药物的抑制作用与药物浓度呈剂量依赖关系。

表1 药物对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg和HBV-DNA的抑制作用

组别	浓度 (mg/ml)	OD值		抑制率		HBV-DNA (logcopies/ml)
		HBsAg	HBeAg	HBsAg	HBeAg	
NAPP组	1	0.40 ± 0.06**	0.59 ± 0.02**	78.2	63.8	4.45 ± 0.07**
	10^{-1}	0.82 ± 0.06**	0.85 ± 0.07**	52.9	46.5	4.51 ± 0.09*
	10^{-2}	1.09 ± 0.04**	1.06 ± 0.10*	36.1	32.7	4.60 ± 0.09*
	10^{-3}	1.45 ± 0.03*	1.21 ± 0.06*	14.2	23.0	4.60 ± 0.13*
	10^{-4}	1.55 ± 0.06* [△]	1.26 ± 0.06*	8.5	19.6	4.81 ± 0.05*
拉米夫定组	1	0.38 ± 0.03**	0.55 ± 0.05**	82.2	66.5	4.12 ± 0.17**
	10^{-1}	0.75 ± 0.13**	0.79 ± 0.06**	56.8	47.0	4.15 ± 0.24*
	10^{-2}	1.20 ± 0.14**	0.91 ± 0.07**	29.6	42.4	3.80 ± 0.88*
	10^{-3}	1.32 ± 0.07*	0.98 ± 0.10*	22.2	37.7	4.69 ± 0.08*
	10^{-4}	1.41 ± 0.03*	1.21 ± 0.01*	16.7	22.8	4.79 ± 0.11*
细胞对照组		1.69 ± 0.05	1.55 ± 0.06			5.58 ± 0.06
空白对照组		0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.003			

[注] 给药组与细胞对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NAPP组与拉米夫定组同浓度组比较 [△] $P < 0.05$

表2 NAPP和3TC对HBsAg、HBeAg 的治疗指数

组别	TC_{50} (mg/ml)	IC_{50} (HBsAg/HBeAg) (mg/ml)	TI (HBsAg/HBeAg)
NAPP组	> 1	0.053/0.155	> 188.7 / > 64.5
拉米夫定组	> 1	0.039/0.398	> 256.4 / > 251.3

3 讨论

抗病毒治疗是治疗慢性乙型肝炎的关键。近年来拉米夫定作为口服抗乙型肝炎病毒 (HBV) 药物在临床应用中较好的疗效, 但需长期服用, 而长期服用可以引起乙肝病毒的基因变异而出现耐药, 从而影响疗效, 而且停药后 HBV-DNA

(下转第 3618 页)

表 3 3 组调查对象 SF-36 量表各维度得分比较

分组	n	PF	RP	RE	VT	MH	SF	BP	GH
对照	59	91.17 ± 22.73 ^a	44.92 ± 17.75	52.54 ± 18.82	57.80 ± 18.53 ^c	63.53 ± 18.66	83.35 ± 20.18	71.44 ± 26.00 ^f	53.30 ± 21.77 ^e
治疗	33	83.03 ± 24.93	46.97 ± 18.72	67.68 ± 13.68 ^b	58.18 ± 18.57 ^d	66.42 ± 18.52	86.82 ± 17.64	76.43 ± 21.67 ^f	51.21 ± 10.50 ^b
未治疗	26	77.88 ± 27.86 ^a	41.35 ± 18.45	39.74 ± 19.01 ^b	45.38 ± 21.63 ^{cd}	58.62 ± 17.96	77.98 ± 20.56	54.52 ± 26.01 ^{ef}	35.96 ± 23.02 ^{gh}
F 值		2.969	0.100	2.568	4.309	1.312	1.487	6.075	6.312
P 值		0.055	0.905	0.081	0.016	0.273	0.230	0.003	0.003

[注] 字母 a-h, 相同字母表示两两比较 P < 0.05

质量有差别的人群的能力大小。本研究发现, 在反映生理健康的维度上 (如 PF、BP、GH), 三组人群间得分有显著性差异, 例如对照组 GH 得分显著高于治疗组和未治疗组, 治疗组 GH 得分亦显著高于未治疗组。在反映心理健康的维度上, 三组人群间除了 VT 维度得分有显著性差异之外, 其他维度 (RE、SF、MH) 均未见显著性差异。这提示 SF-36 量表对艾滋病病毒感染者和普通村民的生理健康有较好的区分能力, 而对二者的心理健康区分能力不理想。

从本次调查样本中显示, 接受抗病毒治疗者与未接受治疗者相比, 前者的 VT、BP 以及 GH 维度得分显著高于后者, 例如, 接受治疗组比未接受治疗组 BP 维度得分高 21.91 分, GH 维度得分高 15.25 分。这一方面说明抗病毒治疗可以缓解病人的躯体疼痛感, 增强病人的活力, 使病人对自己的健康状况满意度提高; 另一方面也提示, 对未接受治疗的艾滋病病人, 应当进行适当的健康指导和心理咨询, 最大限度地缓解病人身心受到的压力, 改善病人的主观生活质量。

总之, 本研究结果表明, SF-36 量表在中国农村地区艾滋病病毒感染者中使用具有较好的信度, 但在生活质量的心理健康维度方面的判别效度不理想。国内外许多研究表明, 艾滋病病毒感染者由于对疾病感到恐惧、遭受别人的侮辱和歧视等而普遍存在心理健康问题, 社会功能也受到影响^[7-9]。因此有必要在国内开发或引进艾滋病病毒感染者特异性生活质量量表, 对艾滋病病毒感染者健康状况, 特别是心理健康状况进行全面细致的评价。

(云南省德宏州陇川县疾病预防控制中心刀庆芬、黄森、张好芬、何志群和郭艳华等同志参与现场调查工作, 特此致

谢!)

参考文献:

[1] Enger C, Graham N, Peng Y, et al. Survival from early, intermediate, and late stages of HIV infection [J]. JAMA, 1996, 275 (17): 1329-1334.

[2] Lee GM, Gortmaker SL, McIntosh K, et al. Quality of life for children and adolescents: impact of HIV infection and antiretroviral treatment [J]. Pediatrics, 2006, 117 (2): 273-283.

[3] 王素华, 李立明, 李俊. SF-36 健康调查量表的应用 [J]. 国外医学社会学分册, 2001, 18 (1): 4-8.

[4] 方积乾. 生存质量测定方法及应用 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 263-267.

[5] 何朝阳, 和丽梅, 李梅华. 应用 SF-36 量表测定中国云南和泰国南部肺结核患者效果分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26 (3): 187-189.

[6] 李鲁, 姜敏敏. SF-36 量表在血液透析患者中的信度、效度与反应度评价 [J]. 中华医学杂志, 2002, 115: 1002-1004.

[7] 杨翌, 张孔来, 王克荣, 等. HIV 感染者/AIDS 病人生活质量及其影响因素研究 [J]. 中国艾滋病性病, 2005, 11 (4): 244-246.

[8] Liu C, Ostrow D, Detels R, et al. Impacts of HIV infection and HAART use on quality of life [J]. Qual Life Res, 2006, 15 (6): 941-949.

[9] Jin H, Hampton Atkinson J, Yu X, et al. Depression and suicidality in HIV/AIDS in China [J]. J Affect Disord, 2006, 94 (1-3): 269-275.

(收稿日期: 2007-01-10)

(上接第 3615 页)

往往又再出现^[3,4]。本实验结果表明, NAPP 在体外对 HepG 2.2.15 分泌 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 复制有一定的抑制作用, 其细胞毒性和抗病毒效果与拉米夫定相比, 无明显差异性, 而 NAPP 制备原料来源广泛, 成本便宜, 所以有进一步研究和应用的价值。NAPP 对 HBeAg 和对 HBsAg 的抑制的作用可能与影响 HBeAg、HBsAg 的不同基因编码区有关。

本实验采用 HepG2.2.15 细胞株为靶细胞。HBV-DNA 转染人类肝癌细胞株 HepG2 所建立的 2.2.15 细胞株能有效表达 HBV 复制的全部标志, 应用 HepG2.2.15 细胞培养具有易于控制实验条件及均衡性好等特点, 但 HepG2.2.15 模型研究抗 HBV 药物也有局限性, 它再现了 HBV 在肝细胞的复制和表达, 但脱离了机体免疫系统对 HBV 产生影响的环境。因此, 本实验研究虽然显示 NAPP 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, 其作用机制也有待于更深入的研究。

参考文献:

[1] Chao-Pin Li, Li-Fa Xu, Hong-Qun Liu, et al. Extraction of protoporphyrin disodium and its inhibitory effects on HBV-DNA [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (3): 433.

[2] 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.

[3] Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type. After cessation of therapy [J]. Hepatology, 1998, 27 (6): 1711.

[4] Shaw T, Locarnini S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004, 2 (6): 853-871.

(收稿日期: 2006-12-25)