

复方肃毒星提取物抑制乙型肝炎病毒cccDNA的作用

思兰兰¹ 李晓东¹ 李乐¹ 牛明² 王伽伯² 兰金初³ 徐东平¹ 刘妍¹

【摘要】目的 研究复方肃毒星提取物(简称肃毒星)体外对乙型肝炎病毒(HBV)复制模板共价闭环状DNA(cccDNA)的抑制作用。**方法** 通过细胞计数试剂盒CCK-8检测肃毒星在恩替卡韦耐药HBV稳定复制细胞系(HepG2.A64)、野生HBV稳定复制细胞系(HepG2.2.15和HepAD38)以及肝癌细胞系(HepG2)中的毒性作用;选择安全有效的高、中、低浓度肃毒星分别处理3个细胞系,采用实时荧光定量PCR法检测细胞内HBV cccDNA水平。以高斯荧光素酶微环cccDNA(mc-cccDNA)转染HepG2细胞,同时选择高、中、低浓度的肃毒星在不同时间点作用转染mc-cccDNA的HepG2细胞,荧光素酶检测试剂盒分析相对荧光强度,计算对cccDNA的抑制率,评价cccDNA转录活性。**结果** 肃毒星在HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38和 HepG2细胞中的半数毒性浓度分别为27.01 $\mu\text{g/ml}$ 、29.36 $\mu\text{g/ml}$ 、31.20 $\mu\text{g/ml}$ 和52.80 $\mu\text{g/ml}$ 。肃毒星对HepG2.A64、HepG2.2.15和HepAD38细胞中HBV cccDNA有抑制作用,最佳作用时间为5 d,5 d最大抑制率分别为(84.24 \pm 2.1) %、(52.02 \pm 4.74) %和(47.16 \pm 6.69) %,与未用药处理组差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。肃毒星对转染HepG2细胞后mc-cccDNA转录活性的最佳抑制率为(48.44 \pm 4.54) %,抑制作用优于干扰素对照组($P < 0.05$),略弱于特异性敲低mc-cccDNA的pLV-CRISPR处理对照组($P < 0.05$),差异有统计学意义。**结论** 肃毒星对恩替卡韦耐药型和野生型细胞系HBV cccDNA的复制及转录均有很好的抑制作用,为慢性乙型肝炎功能学治愈新药的开发提供参考。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;共价闭环状DNA;肃毒星提取物;转录活性

Inhibitory effect of Suduxing extracts on covalently closed circular DNA of hepatitis B virus Si Lanlan¹, Li Xiaodong¹, Li Le¹, Niu Ming², Wang Jiabo², Lan Jinchu³, Xu Dongping¹, Liu Yan¹. ¹Viral Hepatitis Research Laboratory, Institute of Infectious Diseases and Research Center for Clinical and Translational Medicine, ²Institute of Chinese Medicine, the Fifth Medical Centre of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China; ³Department of Chinese Traditional Medicine, Beijing Gulou Hospital of Chinese Medicine, Beijing 100009, China

Corresponding author: Liu Yan, Email: liuyan5360@163.com

【Abstract】Objective To investigate the inhibition effect of compound Suduxing extracts (hereinafter referred as Suduxing) on hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA). **Methods** The toxicity of Suduxing on entecavir (ETV)-resistant HBV-stably-replication cell line (HepG2.A64), wild-type HBV-stably-replication cell lines (HepG2.2.15 and HepAD38) and hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) were assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The three HBV-stably-replication cells were treated with the high, medium and low concentrations of Suduxing at different time points, respectively, and HBV cccDNA were detected by the real-time fluorescent quantitative PCR. Gaussia luciferase microcircle cccDNA (mc-cccDNA) was transfected into HepG2 cells, and HepG2 cells were treated with high, medium and low concentrations of Suduxing at different time points. Then the relative fluorescence intensity was detected

DOI: 10.3877/cmaj.issn.1674-1358.2020.04.001

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81573676); 国家自然科学基金重点项目(No. 81930110)

作者单位: 100039 北京, 解放军总医院第五医学中心临床研究管理中心¹, 中药研究所²; 100009 北京, 北京鼓楼中医院中医科³

通信作者: 刘妍, Email: liuyan5360@163.com

by luciferase assay kit, and the inhibition rate of the cccDNA was calculated to evaluate the transcriptional activity. **Results** The toxic concentration 50% of Suduxing in HepG2.A64, HepG2.2.15, HepAD38 and HepG2 cells were 27.01 $\mu\text{g/ml}$, 29.36 $\mu\text{g/ml}$, 31.20 $\mu\text{g/ml}$ and 52.80 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Compared with the untreated group, Suduxing had better inhibitory effect on HBV cccDNA in HepG2.A64, HepG2.2.15 and HepAD38 cells. The optimal treatment time was 5 days after-treatment, and the maximum inhibition rates were $(84.24 \pm 2.1)\%$, $(52.02 \pm 4.74)\%$ and $(47.16 \pm 6.69)\%$, respectively (all $P < 0.05$). The optimal inhibition rate of Suduxing on the mc-cccDNA transcriptional activity in HepG2 cells was $(48.44 \pm 4.54)\%$. The inhibitory effect was better than interferon-treated group ($P < 0.05$), and slightly weaker than the pLV-CRISPR group with specific knockdown of mc-cccDNA ($P < 0.05$), with significant differences. **Conclusions** Suduxing could inhibit the replication and transcription of entecavir-resistant and wild-type HBV cccDNA. The findings provide a new reference strategy for drug development to functional cure of chronic hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; Suduxing; Transcriptional activity

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染严重危害人类健康, 根据2019年最新研究数据显示: 全球有2.57亿慢性HBV感染者, 其中我国约7 000万^[1]。HBV是嗜肝DNA病毒属, 全长基因组约3.2 kb, 其原始的复制转录模板是附着在肝细胞染色体中的共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), cccDNA具有稳定性好、半衰期长的特点。HBV具有独特的逆转录过程, 即由cccDNA转录生成前基因组RNA (pregenome RNA, pgRNA), 以pgRNA为模板逆转录为HBV DNA进行复制。

目前临床常用的抗HBV药物主要有两大类: 干扰素类 (interferon, IFN) 和核苷 (酸) 类 [nucleos(t)ide analogues, NAs]。这两类药物均能有效抑制HBV复制, 阻止疾病进展并改善长期预后。但目前应用的抗HBV药物, 经5年以上长期治疗, 达到“功能学治愈”的指标, 即HBV表面抗原阴转的慢性乙型肝炎患者比例仍不足10%。而且停用抗HBV药物后大多数患者出现病毒学反跳, 原因是这两类药物均难以直接清除cccDNA, 故目前患者需要长期或终身接受抗HBV药物治疗^[2-3]。因目前所获得的临床治愈率均不尽人意, 故亟需开发新型抗病毒药物。

随着对HBV复制、转录、翻译过程的深入研究以及HBV cccDNA检测系统的完善, 抗HBV新药研发亦有了更多进展。本课题组前期研究显示中药复方肃毒星 (Suduxing) 提取物 (以下简称肃毒星) 含有氧化苦参碱、苦参碱、黄芩素以及汉黄芩素等25种主要成份, 对HBV DNA、HBV表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)、HBV e 抗原 (hepatitis B virus e antigens, HBeAg) 有很好

的抑制效果^[4-5]。但肃毒星对HBV cccDNA的抑制作用相关研究尚未见报道, 本研究采用一种恩替卡韦 (entecavir, ETV) 耐药型和两种野生型HBV稳定复制细胞系, 结合新型高斯荧光素酶微环cccDNA (Gaussia luciferase microcircle cccDNA) 体外转染检测系统, 分析肃毒星在体外细胞模型中对HBV cccDNA复制和转录的抑制作用, 现报道如下。

材料与方法

一、试剂与细胞

1. 主要试剂: DMEM细胞培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自Invitrogen公司, HBV DNA PCR定量检测试剂盒购自北京鑫诺美迪基因检测公司, 基因组DNA提取试剂盒QIAamp DNA Mini Kit购自Qiagen公司, CCK8试剂盒购自上海翊圣公司, 转染试剂Transgene TransIntro EL购自全式金公司, 荧光素酶检测试剂盒Dual-Glo[®] Luciferase Assay System购自Promega公司, 干扰素购自赛诺菲公司。能够抑制cccDNA活性的pLV-CRISPR质粒及mc-cccDNA体外转染检测系统由美国北卡大学实验室李峰教授惠赠。

2. 实验细胞: 3种HBV稳定复制细胞系分别是C基因型ETV耐药HBV稳定复制细胞系HepG2.A64细胞 [(由原解放军第302医院病毒性肝炎研究室自主构建 (国家发明专利号ZL201010586554.6^[6], 中国典型培养物保藏中心典藏号C201163)]、D基因型野生HBV稳定复制细胞系HepG2.2.15细胞和HepAD38细胞 (原解放军302医院病毒性肝炎研究室保存)。3种细胞内均存在稳定的cccDNA, 用于评价肃毒星对细胞内稳定存在cccDNA的抑制效果。HepG2细胞

为肝癌细胞系,无HBV基因组整合,用于瞬时转染系统评价肃毒星对cccDNA转录活性的影响。

二、研究方法

1. 药物对细胞毒性作用的确证实验:肃毒星对HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38、HepG2细胞作用的毒性检测,采用CCK8法,将对数生长期的4种细胞以每孔 2×10^4 个分别接种于96孔板,在37℃、5% CO₂条件下孵育,24 h内加入浓度系列稀释的肃毒星(0.625 μg/ml、1.25 μg/ml、2.5 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml、40 μg/ml、80 μg/ml)处理组、1个未加药处理对照组,隔天换液1次,120 h时每孔分别加入10 μl CCK8溶液继续培养2 h,终止培养。酶联免疫检测仪检测波长450 nm处各个孔的吸光度(A)值。每个实验组重复3次,取平均值。

确定药物对HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38和HepG2细胞生长的影响,计算药物半数毒性浓度(toxic concentration 50%, TC₅₀)、细胞相对活力(%)=(药物处理组A值/未用药物处理组A值)×100%。

2. 3种HBV稳定复制细胞系评价肃毒星抑制cccDNA复制能力实验:肃毒星作用HepG2.A64、HepG2.2.15和HepAD38细胞内cccDNA的检测,选择0 μg/ml、2.5 μg/ml、5 μg/ml和10 μg/ml的肃毒星对HepG2.A64、HepG2.2.15和HepAD38细胞进行病毒抑制实验。HepG2.A64、HepG2.2.15和HepAD38细胞以 2×10^5 细胞/孔铺种于12孔板,药物分别作用5 d、7 d、9 d,隔天换新鲜含药液DMEM培养基,5 d、7 d、9 d分别收集培养细胞,进行细胞计数,收集时每孔细胞至少达到 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个,提取细胞总DNA并进行PSAD酶消化,使用4对引物按照95℃、3 min, 50℃、15 s, 30℃、15 s, 20℃、10 min的程序进行跨缺口滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)cccDNA^[7]。用PCR-荧光探针法按照60℃、10 s, 94℃、3 min, 94℃、15 s, 58℃、45 s(荧光检测), 40个循环,荧光定量PCR检测HBV cccDNA与β-actin值并换算为每个细胞含cccDNA的拷贝数^[8-9]。每个实验组重复3次,取平均值。

将药物未处理组(仅转染mc-cccDNA但未经药物处理的HepG2.A64、HepG2.2.15和HepAD38细胞)即0 μg/ml组HBV cccDNA的复制水平设定为100%,药物对cccDNA的抑制率=100%—实验组检测值/药物未处理组检测值×100%。

3. 瞬时转染HepG2细胞评价肃毒星抑制cccDNA转录活性实验:mc-cccDNA转染HepG2细胞,评价肃毒星抑制cccDNA转录活性的实验,因mc-cccDNA质粒含有GLuc表达标签,故可通过检测细胞上清中GLuc的活性来反映mc-cccDNA的转录活性,GLuc与海肾荧光素酶有共同的底物,因此应用Promega的海肾荧光素酶定量检测试剂盒系统即可快速鉴定上清GLuc活性,进而分析出mc-cccDNA的转录活性。

HepG2细胞以 1×10^4 细胞/孔铺种于96孔板,将mc-cccDNA质粒使用Transgene TransIntro EL转染试剂转染HepG2细胞,转染5 h后分别加入0 μg/ml和5 μg/ml肃毒星处理HepG2细胞,干扰素-β、pLV-CRISPR阳性对照组进行平行实验,分别作用5 d、7 d、9 d后收集细胞上清,室温13 000 r/min离心15 s(离心半径r=8.6 cm);首先在96孔酶标板中加入50 μl荧光素酶检测试剂II(luciferase assay reagent II, LAR II),然后再加入10 μl离心后的细胞上清,随即放入酶标仪振荡混匀并读取萤火虫荧光素酶活性数据,然后再向反应液中加50 μl Stop & Glo缓冲液,终止上述反应,同时启动海肾荧光素酶反应,酶标仪振荡混匀并读取海肾荧光素酶活性数据。每个浓度组设置3个重复,取平均值,进行3次独立重复实验。每个样品荧光素酶表达强度=萤火虫荧光素酶的活性数值/海肾荧光素酶的活性数值。

将药物未处理组(瞬时转染mc-cccDNA的HepG2细胞)HBV cccDNA的转录水平设定为100%,药物对cccDNA转录活性的抑制率=100%—实验组检测值/药物未处理组检测值×100%。

三、统计学处理

实验数据的统计分析使用SPSS 13.0软件,绘图使用GraphPad Prism 5软件,各组实验数据(细胞相对活力、抑制率)为计量资料且呈正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用LSD-*t*检验方差分析,不同处理时间对cccDNA的影响,采用重复测量方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、肃毒星在HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38和HepG2细胞中的毒性

肃毒星作用HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38和HepG2细胞120 h, TC₅₀分别为27.01 μg/ml、29.36 μg/ml、31.20 μg/ml和 52.80 μg/ml,见图1。

肃毒星提取物 $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ 浓度时 ($0.625 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$) 对 HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38 和 HepG2 细胞的生长无毒性作用, 细胞相对活力 $> 90\%$, 最大安全浓度 $10 \mu\text{g/ml}$ 肃毒星对 4 种细胞生长的相对活力分别为 (92.25 ± 0.62)%、(94.03 ± 0.72)%、(93.10 ± 3.66)% 和 (99.81 ± 4.01)%。可选择细胞相对活力 $> 90\%$ 的安全无毒浓度, 即 $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ 浓度进行后续研究。

二、不同浓度肃毒星抑制 HepG2.A64、HepG2.2.15 和 HepAD38 细胞中 HBV cccDNA 的复制

根据前期研究^[4,5], 本研究选择相应的时间 (5 d、7 d、9 d) 及浓度 ($2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$) 进行实验。肃毒星作用 HepG2.A64、HepG2.2.15 和 HepAD38 细胞 5 d、7 d、9 d, 收集细胞进行 DNA 提取, 经过滚环扩增, 进行 cccDNA 定量检测。3 种细胞系经不同浓度肃毒星处理不同时间 cccDNA 抑制率见表 1~3。

1. HepG2.A64、HepG2.2.15 和 HepAD38 细胞经 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 肃毒星处理的 cccDNA 抑制率组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 处理组较未处理组抑制率显著提高, 随肃毒星浓度增加, 抑制率逐渐升高。

2. 3 种细胞系中 cccDNA 的抑制率随肃毒星作用

时间延长而逐渐降低, 5 d 作用效果最佳, 7 d 效果次之, 9 d 抑制作用最弱 (P 均 < 0.001)。

3. 3 种细胞不同浓度处理组和处理时间之间均存在交互效应 (P 均 < 0.01), 随处理时间的延长, 各组抑制 cccDNA 的作用逐渐减弱。

三、肃毒星抑制瞬时转染 mc-cccDNA 质粒 HepG2 细胞中 cccDNA 的转录活性

根据肃毒星 CCK8 实验及肃毒星对 3 个稳定细胞系 cccDNA 的作用, 本研究选择中间浓度 ($5 \mu\text{g/ml}$) 肃毒星处理 mc-cccDNA 质粒转染的 HepG2 细胞。转染 mc-cccDNA 质粒 HepG2 细胞经 $5 \mu\text{g/ml}$ 肃毒星、pLV-CRISPR (特异性敲低 cccDNA 阳性质粒对照)、干扰素 (IFN, 阳性对照药) 分别处理 5 d、7 d 和 9 d 后进行荧光强度检测。

1. pLV-CRISPR 组、干扰素组、 $5 \mu\text{g/ml}$ 肃毒星组处理后 cccDNA 转录活性具有统计学差异 ($P < 0.001$), pLV-CRISPR 组抑制效果最佳。

2. 各组作用时间对 cccDNA 转录活性也有影响 ($P = 0.001$), 随时间延长, pLV-CRISPR 组抑制 cccDNA 转录活性的作用逐渐减弱, IFN 处理组抑制 cccDNA 转录活性的作用逐渐增强, $5 \mu\text{g/ml}$ 肃毒星处理组对 cccDNA 转录活性的抑制作用随时间延长也逐渐减弱 (作用 5 d 抑制效果最佳)。

3. 不同处理组和作用时间之间存在交互效应

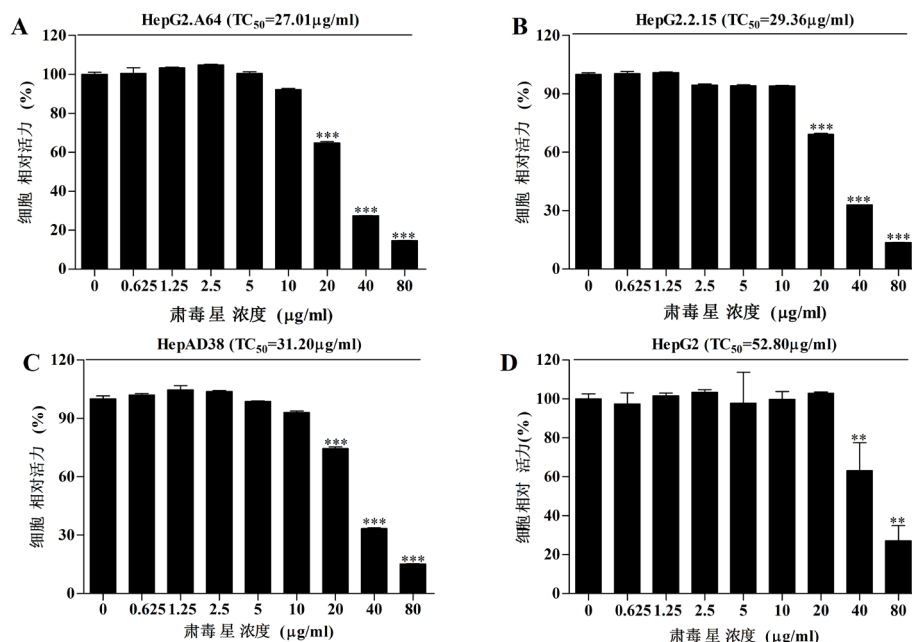


图1 不同浓度肃毒星对HepG2.A64、HepG2.2.15、HepAD38和HepG2细胞毒性

($P < 0.001$)。随处理时间延长, 5 $\mu\text{g/ml}$ 肃毒星组 cccDNA 抑制率下降幅度 (35.81%) 大于 pLV-CRISPR 组 (28.86%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 132.00$, $P < 0.001$)。见表4。

表1 不同浓度肃毒星作用不同时间对 HepG2.A64 细胞内 cccDNA 的抑制率

肃毒星	cccDNA的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)		
	处理5 d	处理7 d	处理9 d
0 $\mu\text{g/ml}$	0.00 \pm 10.58	0.00 \pm 24.89	0.00 \pm 9.69
2.5 $\mu\text{g/ml}$	6.59 \pm 2.61	3.72 \pm 5.01	3.77 \pm 2.64
5 $\mu\text{g/ml}$	35.32 \pm 3.55	24.70 \pm 1.40	6.34 \pm 0.65
10 $\mu\text{g/ml}$	84.24 \pm 2.10	43.69 \pm 11.23	6.60 \pm 0.46
$F_{\text{组间}}/P$ 值	303.159/ < 0.001		
$F_{\text{时间}}/P$ 值	93.307/ < 0.001		
$F_{\text{组间} \times \text{时间}}/P$ 值	40.978/ < 0.001		

注: LSD- t 检验, 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)

表2 不同浓度肃毒星作用不同时间对 HepG2.2.15 细胞内 cccDNA 的抑制率

肃毒星	cccDNA的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)		
	处理5 d	处理7 d	处理9 d
0 $\mu\text{g/ml}$	0.00 \pm 5.10	0.00 \pm 0.81	0.00 \pm 3.91
2.5 $\mu\text{g/ml}$	38.46 \pm 3.58	1.93 \pm 0.43	0.58 \pm 0.99
5 $\mu\text{g/ml}$	47.88 \pm 4.30	6.64 \pm 3.86	0.95 \pm 8.50
10 $\mu\text{g/ml}$	52.02 \pm 4.74	25.13 \pm 6.01	22.03 \pm 3.71
$F_{\text{组间}}/P$ 值	180.282/ < 0.001		
$F_{\text{时间}}/P$ 值	332.193/ < 0.001		
$F_{\text{组间} \times \text{时间}}/P$ 值	42.117/ < 0.001		

注: LSD- t 检验, 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)

表3 不同浓度肃毒星作用不同时间对 HepAD38 细胞内 cccDNA 的抑制率

肃毒星	cccDNA的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)		
	处理5 d	处理7 d	处理9 d
0 $\mu\text{g/ml}$	0.00 \pm 1.42	0.00 \pm 2.31	0.00 \pm 1.57
2.5 $\mu\text{g/ml}$	6.83 \pm 5.20	5.54 \pm 7.42	0.83 \pm 1.82
5 $\mu\text{g/ml}$	12.24 \pm 4.84	9.49 \pm 1.22	6.01 \pm 0.69
10 $\mu\text{g/ml}$	47.16 \pm 6.69	14.67 \pm 6.99	6.86 \pm 0.73
$F_{\text{组间}}/P$ 值	115.308/ < 0.001		
$F_{\text{时间}}/P$ 值	103.171/ < 0.001		
$F_{\text{组间} \times \text{时间}}/P$ 值	4.762/0.003		

注: LSD- t 检验, 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)

表4 5 $\mu\text{g/ml}$ 肃毒星、pLV-CRISPR 和干扰素作用不同时间抑制 cccDNA 转录活性

组别	cccDNA转录活性抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)		
	处理5 d	处理7 d	处理9 d
药物未处理组	0.00 \pm 5.70	0.00 \pm 4.58	0.00 \pm 6.57
pLV-CRISPR处理组	49.56 \pm 4.44	39.32 \pm 9.16	20.70 \pm 4.25
IFN处理组	16.89 \pm 5.67	34.06 \pm 4.26	33.33 \pm 6.85
肃毒星-5 $\mu\text{g/ml}$	48.44 \pm 4.54	19.81 \pm 6.85	12.63 \pm 5.57
$F_{\text{组间}}/P$ 值	132.775/ < 0.001		
$F_{\text{时间}}/P$ 值	10.114/ $= 0.001$		
$F_{\text{组间} \times \text{时间}}/P$ 值	12.055/ < 0.001		

注: LSD- t 检验, 两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)

讨 论

cccDNA是HBV复制的原始模板,是评价病毒清除最具代表性的指标。在抗病毒药物作用下,cccDNA仍具有较长的代谢周期,能通过细胞分裂传递至子代细胞,其体内代谢的主要途径是细胞凋亡或坏死。目前临床现有的抗HBV药物NAs能有效阻止病毒松弛环状DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)形成,抑制病毒复制并阻止疾病进展,但NAs并不直接作用于cccDNA,导致停药后易复发,因此患者需长期用药,进而出现依从性差,病毒产生耐药等系列问题。IFN具有免疫调节和抑制病毒基因转录的双重作用,但其不良反应大,疗程有限,仍难以彻底清除HBV。因此,寻找新的抗病毒靶向药物是当前临床根治HBV感染的迫切需求。经过长期实践和大量临床数据及研究证明,中药提取物具有多环节、多靶点抗HBV作用^[10-15],可为彻底清除HBV cccDNA开辟新的研究思路。

研究显示,肃毒星在HIV感染者的抗病毒治疗及纠正免疫力方面有良好作用,其具体机制主要是通过提高患者CD4⁺T细胞数量,进而增强机体免疫力来实现^[16]。本课题组前期对肃毒星的体内外研究显示其具有很好的抑制HBV DNA复制及HBsAg和HBeAg表达的作用^[4-5],但其对HBV cccDNA的作用尚未见报道,因此本文就肃毒星对HBV cccDNA的作用进行相应研究。

阻碍直接靶向cccDNA药物研发的原因是缺乏合适的HBV cccDNA研究模型,目前应用于HBV cccDNA的研究模型主要包括:①病毒感染细胞模型(如原代人肝细胞模型、HepaRG细胞模型、稳定表达外源性牛磺胆酸钠协同转运多肽的HepG2和Huh7细胞模型^[17-18]、cccDNA转染细胞模型(如HBV稳定转染的HepG2.2.15细胞、HepAD38细胞、HepDE19细胞、Minicircle cccDNA细胞模型)^[19-20];②用于小鼠cccDNA研究的模型^[21-22]。本研究使用cccDNA转染细胞模型。

3种HBV稳定复制细胞系:HepG2.A64细胞、HepG2.2.15细胞和HepAD38细胞主要用来研究肃毒星对cccDNA合成的抑制作用,结果显示5 μg/ml肃毒星对HepG2.A64细胞、HepG2.2.15细胞和HepAD38细胞cccDNA作用5 d的最大抑制率分别为84.24%、52.02%和47.16%。此前Xin等^[23]课题组使用HBV特异性的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNAs)

沉默HepG2.2.15细胞中的cccDNA,沉默效果达50.4%~69.83%,Wei等^[24]课题组使用姜黄素作用HepG2.2.15细胞,cccDNA抑制水平达75.5%。本研究结果表明肃毒星抑制cccDNA的效果与siRNAs沉默效果相当,但较姜黄素稍弱。同时本研究还应用本课题组在完成国家“十一五”传染病重大专项期间自主创建的恩替卡韦耐药的cccDNA细胞模型HepG2.A64细胞进行平行实验,结果显示5 μg/ml肃毒星作用HepG2.A64细胞5 d抑制率达84.24%,对ETV耐药型cccDNA也有很好的抑制效应。ETV耐药的cccDNA细胞模型HepG2.A64首次用于cccDNA的相关研究,这是本研究的创新点,结果表明肃毒星对ETV耐药的cccDNA作用更为明显。

为进一步了解肃毒星对cccDNA的转录活性是否有抑制效果,本研究还应用了另一种cccDNA细胞模型:minicircle cccDNA(mc-cccDNA)细胞模型,结果显示5 μg/ml肃毒星作用转染HepG2细胞的mc-cccDNA第5天时,cccDNA转录活性抑制了48.44%,特异性沉默cccDNA的pLV-CRISPR阳性质粒抑制cccDNA转录活性为49.56%,肃毒星抑制cccDNA作用略弱于特异性沉默cccDNA的pLV-CRISPR阳性质粒,但抑制作用又优于干扰素对照组(16.89%)。本研究选择mc-cccDNA系统进行实验,原因是mc-cccDNA模型中GLuc处于HBV核心启动子和核心起始密码子ATG之间,可快速、灵敏地检测出痕量的cccDNA,并且可将cccDNA与其他形式的HBV DNA(如整合HBV DNA, rcDNA、dsDNA)区分开,而且mc-cccDNA模型不依赖于HBV感染,GLuc活性可持续23 d以上,易于获得且可转染多种细胞类型,对研究HBV cccDNA生物学和开发cccDNA靶向药物有重要价值^[20]。

综上,肃毒星不仅可直接抑制ETV耐药和野生型HBV cccDNA复制,同时对cccDNA的转录活性具有抑制作用,推测可能与中药复方提取物的多组分、多靶点、多通路起作用有关,下一步本课题组将进行复方肃毒星主要组分cccDNA的作用机制研究,旨在彻底治愈HBV感染开发新的研究思路及治疗策略。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会感染病分会,中华医学会肝病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J].临床肝胆病杂志,2019,35(12):2648-2669.
- [2] Gehring AJ. New treatments to reach functional cure: Rationale and challenges for emerging immune-based therapies[J]. Best Pract Res

- Clin Gastroenterol,2017,31(3):337-345.
- [3] Testoni B, Levrero M, Zoulim F. Challenges to a cure for HBV infection[J]. Semin Liver Dis,2017,37(3):231-242.
- [4] 姚伟明, 刘妍, 思兰兰, 等. 新型中药制剂肃毒星对乙型肝炎病毒体外复制的抑制作用研究[J]. 解放军医学杂志,2014,39(2):121-124.
- [5] Liu Y, Yao W, Si L, et al. Chinese herbal extract Su-duxing had potent inhibitory effects on both wild-type and entecavir-resistant hepatitis B virus (HBV) in vitro and effectively suppressed HBV replication in mouse model[J]. Antiviral Res,2018,155:39-47.
- [6] Wang L, Liu Y, Liu W, et al. Establishment of three hepatoma cell lines stably replicating wild-type, entecavir-resistant or multidrug-resistant genotype C hepatitis B viruses[J]. Hepatology,2011,54(4 Suppl):1082A.
- [7] 任晓强, 苏何玲, 邹正升, 等. 滚环扩增在乙型肝炎病毒cccDNA检测中的应用[J]. 解放军医学杂志,2009,34(6):675-678.
- [8] Zhong Y, Han J, Zou Z, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling circle amplification in combination with real-time PCR[J]. Clin Chim Acta,2011,412(21-22):1905-1911.
- [9] Li W, Zhao J, Zou Z, et al. Analysis of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA and serum viral markers in treatment-naive patients with acute and chronic HBV infection[J]. PLoS One,2014,9(2):e89046.
- [10] 吴莹, 雷宇, 王媛媛, 等. 叶下珠提取物对急性乙型肝炎小鼠乙型肝炎病毒复制及其抗原表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(12):51-54.
- [11] Li Z, Li LJ, Sun Y, et al. Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum Palmatum L.* Ethanol extract[J]. Chemotherapy,2007,53(5):320-326.
- [12] 孙燕, 李晶, 李治. 茵陈对HBV稳定产毒细胞株HepAD38 HBV DNA复制的抑制作用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2008,17(1):9-13.
- [13] 赵志鸿, 王丽阳, 郑立运, 等. 艾叶挥发油对HBV的抑制作用[J]. 郑州大学学报(医学版),2015,50(2):301-304.
- [14] 孙晓慧, 王者令, 刘中景, 等. 加味小柴胡汤对乙型肝炎病毒转基因小鼠血清和肝组织中HBV DNA及乙肝抗原影响的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2011,19(2):91-93.
- [15] 刘亚梅, 郭兴伯. 疏肝健脾补肾方对乙型肝炎病毒转基因小鼠脾T淋巴细胞及病毒载量的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(7):937-940.
- [16] 李鹏高, 李德益, 唐玉平, 等. 单独使用肃毒星提取物治疗HIV感染的临床观察试验. 中华中医药学会防治艾滋病分会第六届学术年会[C]. 中国安徽合肥,2008:196-202.
- [17] Chen X, Oidovsambuu O, Liu P, et al. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians[J]. Hepatology,2017,66(6):1739-1749.
- [18] Yan H, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and D virus[J]. Dig Dis,2015,33(3):388-396.
- [19] Guo JT, Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics[J]. Antiviral Res,2015,122:91-100.
- [20] Li F, Cheng L, Murphy CM, et al. Minicircle HBV cccDNA with a Gaussia luciferase reporter for investigating HBV cccDNA biology and developing cccDNA-targeting drugs[J]. Sci Rep,2016,6:36483.
- [21] Li G, Zhu Y, Shao D, et al. Recombinant covalently closed circular DNA of hepatitis B virus induces long-term viral persistence with chronic hepatitis in a mouse model[J]. Hepatology,2018,67(1):56-70.
- [22] Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure[J]. J Hepatol,2016,64(Suppl 1):S41-S48.
- [23] Xin XM, Li GQ, Jin YY, et al. Combination of small interfering RNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus cccDNA in HepG2.2.15 cells[J]. World J Gastroenterol,2008,14(24):3849-3854.
- [24] Wei ZQ, Zhang YH, Ke CZ, et al. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation[J]. World J Gastroenterol,2017,23(34):6252-6260.

(收稿日期: 2019-11-02)

(本文编辑: 孙荣华)

思兰兰, 李晓东, 李乐, 等. 复方肃毒星提取物抑制乙型肝炎病毒cccDNA的作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020,14(4):265-271.