

金丝桃苷对鸭乙肝病毒 cccDNA 清除及免疫调节作用探讨

耿 森^{1*}, 王建华¹, 陈红艳¹, 杨新波¹, 黄正明²

(1. 解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853; 2. 解放军 302 医院药学部, 北京 100039)

关键词: 金丝桃苷; 乙肝病毒共价闭合 DNA; 免疫调节

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1440-05

Effects of hyperin on the cccDNA of duck hepatitis B virus and its immunological regulation

GENG Miao^{1*}, WANG Jian-hua¹, CHEN Hong-yan¹, YANG Xin-bo¹, HUANG Zheng-ming²

(1. Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the effect of hyperin on the cccDNA of duck hepatitis B virus and its immunological regulation. Duck hepatitis B virus (DHBV) infection model and normal mouse spleen lymphocyte were used to evaluate the anti-HBV and immunoregulation effects. The DHBV-DNA of serum was detected at different time points by using serum DOT-BLOT hybridization. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the determination of nuclear covalent closed circular DNA (cccDNA). Cytokine secretion was determined by ELISA method. DHBV-DNA were inhibited by hyperin (25 or 50 mg·kg⁻¹), while cccDNA of liver could be eliminated efficiently by hyperin (25 or 50 mg·kg⁻¹, $P < 0.05$, $P < 0.01$). The T helper 1 effector cytokine was markedly enhanced by hyperin (25 or 50 μg·mL⁻¹, $P < 0.01$). In conclusion, hyperin has anti-HBV activity via multiple targets and pathways, and cccDNA may be one of the important targets.

Key words: hyperin; hepatitis B virus covalently close circular DNA; immunological regulation

据世界卫生组织报道, 全球约 20 亿人曾感染过乙肝病毒, 乙型肝炎仍然严重威胁人类健康, 其中很大一部分都会发展成为慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌^[1]。目前常见的乙肝治疗药物主要以核苷(酸)类似物及干扰素为主, 但由于存在疗程长、副作用严重及停药后反弹等因素, 目前的治疗效果仍不理想^[2]。近年来的研究表明, 机体特异性免疫功能低下, 尤其是细胞免疫的缺陷^[3], 以及乙肝病毒复制过程中共价闭环 DNA (covalently close circular DNA, cccDNA) 的稳定存在是病毒持续感染的关键因素^[4]。因此在新的乙肝治疗策略中, 帮助机体消除免疫耐受, 恢复、

增强特异性细胞免疫, 抑制、清除 cccDNA, 将能提高治疗效果, 并有可能根治 HBV 感染。

金丝桃苷 (hyperin, Hyp) 广泛存在于藤黄科、豆科、杜鹃花科及卫矛科等多种植物的黄酮醇苷化合物中, 已在 20 多种植物中被发现。药理研究表明, 金丝桃苷在镇痛、抗自由基损伤及免疫调节等方面具有良好的作用^[5-6]。作者以往的抗乙肝病毒的研究显示, 金丝桃苷体内内外均具有抗病毒作用, 且存在量效关系, 停药后并未出现明显反弹^[7-8]。但 cccDNA 是否是该作用的靶点以及金丝桃苷是否具备免疫调节能力尚未探讨。本实验采用鸭乙肝病毒模型及脾细胞作为实验的体内外模型, 探讨金丝桃苷对乙肝病毒复制模版 cccDNA 的清除能力以及细胞免疫调节能力, 进一步为金丝桃苷的临床应用提供依据。

收稿日期: 2009-06-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572350).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-66876422,

E-mail: gengmiao_2000@yahoo.com

材料与方法

药品、试剂与仪器 金丝桃苷 (分子式 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 相对分子量 464.3) 系从锦葵科秋葵属植物黄蜀葵 (*Abelmoschus manihot* L. Medic) 的花中提取分离, 纯度为 95.0%, 由解放军 302 医院药学部提供; 拉米夫定 (葛兰素史克制药有限公司, 批号: 06020019); 斑点杂交所用缺口翻译试剂盒 (Promega 试剂公司); α - 32 PdCTP (北京福瑞生物技术工程公司); 硝酸纤维素膜采用 0.45 μ m (Amersham 公司); DHBV 阳性血清 (中国医学科学院提供); 动物 DNAOUT 试剂盒 (天泽生物技术有限公司); ELISA 检测试剂盒 (达克维生物技术有限公司)。刀豆素 (Con A, 美国 Sigma 公司)。DG3022 型酶标检测仪 (南京); DELTA CYCLE 型 PCR 扩增仪 (美国)。

实验动物 1 日龄北京鸭 (购自北京前进种鸭厂); 昆明种小鼠 (18~20 g) 由解放军总医院动物中心提供 (合格证号: SCSK-(京)-2004-001)。

鸭乙型肝炎病毒模型制备及分组 1 日龄北京鸭经腿胫静脉注射上海麻鸭 DHBV-DNA 阳性鸭血清, 每只 0.2 mL, 在感染后 7 d 取血, 分离血清, -70°C 保存待检。待 DHBV 感染雏鸭 7 d 血清检测为阳性后, 将雏鸭随机分组, 逐只用脚环给动物编号记录, 每组 6 只。金丝桃苷治疗组: 每天分 2 次灌胃给药, 分别为 12.5、25 和 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 共 10 d; 病毒对照组 (DHBV): 灌胃给予等体积生理盐水。拉米夫定组 (lamivudine, 3TC, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$): 每天分 2 次灌胃给药, 共 10 d。在感染后第 7 天即用药前 (D0)、用药第 5 天 (D5)、用药第 10 天 (D10) 和停药后第 3 天 (D13), 从鸭腿胫静脉取血, 分离血清, -70°C 保存待检。最后颈静脉取血, 分离血清, -70°C 保存。剪断气管, 处死动物, 剖腹取肝, 预冷的生理盐水冲洗肝脏, 剪成小块分装, 置 -70°C 保存。

血清斑点杂交 (DOT-BLOT) 取血清 30 μ L 点膜, 测定鸭血清中 DHBV-DNA 水平, 参照缺口翻译试剂盒说明书方法, 用 32 P 标记 DHBV-DNA 探针, 做鸭血清斑点杂交, 放射自显影膜片斑点, 用 DG3022 型酶标检测仪测定吸收度 (A) 值 ($\lambda = 490 \text{ nm}$), 以杂交斑点 A 值作为鸭血清 DHBV-DNA 水平值。

肝脏 DNA 提取 称取肝组织 50~100 mg, 按照动物 DNAOUT 试剂盒说明书对肝脏中的 DNA 进行提取。产物经紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} , 并计算相应的浓度。

PCR 扩增检测肝脏中 cccDNA 由于松弛环状

DNA (rcDNA) 的正链和负链上均存在缺口, 故设计跨越两个缺口的引物使 rcDNA 不会被扩增, 只能特异性扩增 cccDNA。上游引物: 5'-CACAGACCGCCT GATTGGA-3'; 下游引物: 5'-TCACAGTTGACAACA GCAATGTAGAC-3', 产物片段为 177 bp。鸭 GAPDH 作为内参^[9], 上游引物: 5'-CACAGCCACACACGAA GACA-3'; 下游引物: 5'-CCTTAGCCAGCCCCAGTA GA-3', 产物片段为 107 bp, 引物均由上海基康公司合成。PCR 反应条件分别为: 95°C 10 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min, 95°C 10 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物的检测采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Tanon Gis 1000 凝胶成像系统进行吸收度测量, 以 GAPDH 作为内参照校正, 用目的基因的吸收度与 GAPDH 吸收度的比值代表目的基因的相对表达量, 实验重复 3 次。

IL-12、IFN- γ 测定 正常小鼠处死后无菌分离脾脏淋巴细胞, 调细胞数至 $2\times 10^6/\text{mL}$, 加入 96 孔培养板, 每孔 0.2 mL, 各实验组均以 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 刀豆素 (ConA) 刺激, 药物干预组采用不同浓度的金丝桃苷 (50 、 25 和 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 单纯 ConA 刺激组作为对照。每个处理组做 6 个复孔, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后, $1500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集上清液。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA), 对细胞 IL-12、IFN- γ 的分泌情况进行测定。实验操作按 ELISA 试剂盒说明进行, 酶标仪测定 A_{450} 值。

统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计学软件分析数据, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

结果

1 金丝桃苷对鸭乙肝病毒 DNA 的影响

血清斑点杂交结果显示, 拉米夫定组与金丝桃苷 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组在治疗 5 d 后 (D5), 明显抑制鸭血清 DHBV-DNA, 与用药前及空白对照组比较均有显著差异 ($P < 0.01$)。金丝桃苷 $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组则在持续治疗 10 d 后 (D10) 显示出抑制 DHBV-DNA 的作用, 与空白对照组及给药前比较有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。金丝桃苷 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组具有抑制病毒 DNA 的趋势 ($P > 0.05$)。停药 3 d 后 (D13), 拉米夫定组的病毒 DNA 出现反弹, 而金丝桃苷 (50 和 $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组的病毒 DNA 则显示仍持续治疗时的水平 (表 1)。

2 金丝桃苷对鸭乙肝病毒 cccDNA 的影响

采用 PCR 扩增检测了鸭肝脏中的 cccDNA 的表达, 经凝胶成像分析系统对结果进行分析显示, 金丝桃苷 (50 和 25 mg·kg⁻¹) 能有效清除肝细胞内的 cccDNA, 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。金丝桃苷 12.5 mg·kg⁻¹ 组与拉米夫定组对 cccDNA 并无明显的清除作用 (图 1)。

3 金丝桃苷对小鼠脾淋巴细胞 IL-12、IFN- γ 分泌的影响

ELISA 检测结果 (图 2) 显示, 体外经金丝桃苷 (50 和 25 mg·kg⁻¹) 干预后能够有效刺激脾细胞分泌 IL-12、IFN- γ , 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。金丝桃苷 (12.5 mg·kg⁻¹) 仅有增加 IL-12、IFN- γ 分泌的趋势 ($P > 0.05$)。

Table 1 Inhibitory effect of hyperin on duck serum DHBV-DNA level (A) determined by DOT-BLOT assay

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	Day 0	Day 5	Day 10	Day 13
Control		1.525 ± 0.23	1.470 ± 0.07	1.500 ± 0.25	1.501 ± 0.18
Hyperin	12.5	1.408 ± 0.16	1.344 ± 0.06	1.351 ± 0.29	1.370 ± 0.26
	25	1.561 ± 0.23	1.318 ± 0.21	1.172 ± 0.25 ^{###}	1.19 ± 0.18 ^{##}
	50	1.453 ± 0.15	1.139 ± 0.09 ^{###}	0.962 ± 0.15 ^{###}	0.976 ± 0.13 ^{###}
3TC	50	1.552 ± 0.09	0.820 ± 0.12 ^{###}	0.673 ± 0.02 ^{###}	1.200 ± 0.19 ^{###}

$n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs day 0

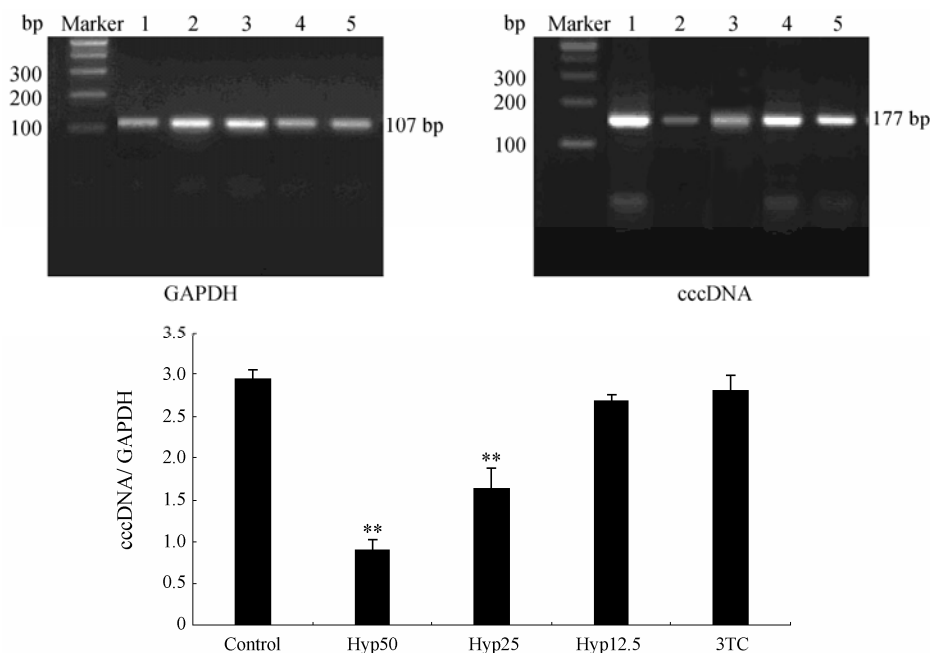


Figure 1 Effect of hyperin on the expression of cccDNA determined by PCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group. Lane 1: Control; Lane 2: Hyperin (50 mg·kg⁻¹); Lane 3: Hyperin (25 mg·kg⁻¹); Lane 4: Hyperin (12.5 mg·kg⁻¹); Lane 5: 3TC (50 mg·kg⁻¹)

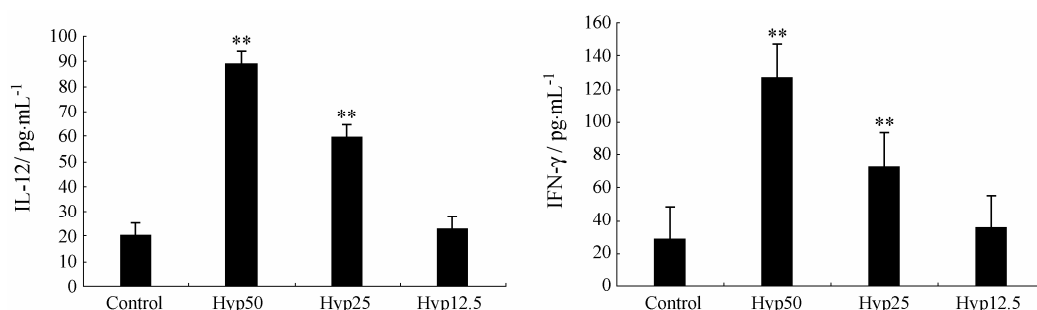


Figure 2 Effect of hyperin on the cytokine production of IL-12 and IFN- γ in the culture medium of mouse spleen lymphocyte. After incubation up to 48 h, the level of IL-12 and IFN- γ in the supernatant of culture medium was determined by ELISA. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{**} $P < 0.01$ vs control group

讨论

以往研究显示, 金丝桃苷具有很好的抗乙肝病毒效果, 体外能明显减低 HepG2.2.15 的表面抗原与核心抗原的表达; 动物实验表明其能够有效降低体内的谷丙转氨酶, 并有效抑制 HBV-DNA 复制保护肝损伤。本实验则以后天感染的鸭乙肝模型及脾细胞为模型, 探讨其对乙肝治疗的关键靶点 cccDNA 以及细胞免疫调节作用。

cccDNA 作为乙型肝炎病毒的原始复制模板, 是病毒进行复制的起始步骤。cccDNA 池的稳定存在则是病毒持续感染的关键因素^[10], 临床上乙肝的复发及停药后的反弹往往并不是因为病毒的再次感染而是宿主细胞核内 cccDNA 的持续存在, 因此对乙肝的治疗并不能仅限于降低病毒 DNA 的复制, 同时 cccDNA 的清除更是乙肝治疗的关键。本研究结果显示, 金丝桃苷 (50 和 25 mg·kg⁻¹) 不但能有效抑制鸭乙肝模型中 DHBV-DNA 复制, 同时对其复制模板 cccDNA 也有较好的清除作用, 这可能是停药后病毒仍然维持在低水平的关键。拉米夫定 (50 mg·kg⁻¹) 组虽然在用药早期就能有效抑制 DNA, 但其对 cccDNA 并无有效的清除作用, 这与以往研究结果一致^[11]。拉米夫定治疗乙肝的主要作用途径是抑制 HBV 的多聚酶, 直接阻断 DNA 合成, 而对 cccDNA 并不能有效清除。因此实验结果显示拉米夫定虽在用药早期能够有效降低体内 DHBV-DNA 水平, 但由于胞内仍然存在 cccDNA 持续复制, 停药后出现病毒高反弹。金丝桃苷对 cccDNA 的有效清除作用, 可能是其抗乙肝治疗的关键。

乙肝病毒持续存在的另一个原因与细胞 (尤其是 Th1 细胞) 免疫的功能缺陷密切相关。Th1 型细胞因子可诱导机体产生中和性抗 HBsAg 特异性抗体^[12]。因此加强机体细胞免疫, 有效提高 Th1 型细胞因子的分泌, 是治疗乙肝的又一关键靶点。本实验显示, 金丝桃苷体外能有效诱导 Th1 型细胞因子 IL-12 及 IFN- γ 分泌。IL-12 由抗原递呈细胞分泌, 能激活 NK 细胞的杀伤功能和刺激其分泌 IFN- γ , 并刺激 Th0 型 T 细胞活化为 Th1 型^[13], 进而分泌 IL-2、IFN- γ 和淋巴毒素等细胞因子, 这些细胞因子又能促进病毒特异性 CTL 的活化杀伤病毒, 因此促进 IL-12 的分泌是活化 Th1 型免疫应答的关键。IFN- γ 作为 Th1 型特异的细胞因子, 是一种重要的巨噬细胞激活因子, 可激活单核吞噬细胞杀灭微生物, 增强 NK 细胞的细胞毒活性, 同时促进 CTL 成熟。IFN- γ 的分泌增加不仅

可直接抑制病毒的复制, 而且对许多免疫细胞发挥强大的免疫调节作用, 加强病毒的清除能力^[14], 最近研究则显示其对乙肝病毒引起的肝纤维化也有一定的预防与治疗作用^[15]。金丝桃苷有效促进 Th1 型细胞因子的分泌是其抗乙肝病毒的又一有效机制。

本研究显示, 金丝桃苷既能抑制 DHBV-DNA 合成, 减少 DHBV-DNA 进入细胞形成 cccDNA 库, 又能直接有效地清除 cccDNA, 同时对机体的免疫功能进行调节, 通过改善 Th1 细胞功能促进细胞因子的分泌, 阻止 HBV 感染细胞。金丝桃苷的抗病毒作用是通过多靶点多机制共同作用的, 本研究的结果为金丝桃苷抗病毒治疗的临床应用提供了实验依据。

References

- [1] Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection [J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 395-403.
- [2] Ayres A, Bartholomeusz A, Lau G, et al. Lamivudine and famciclovir resistant hepatitis B virus associated with fatal hepatic failure [J]. *J Clin Virol*, 2003, 27: 111-116.
- [3] Stoop JN, Vander Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cell contributes to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 771-778.
- [4] Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2009, 51: 581-592.
- [5] Wen JY, Chen ZW. Protective effect of pharmacological preconditioning of total flavones of *Abelmoschus manihot* on cerebral ischemic reperfusion injury in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35: 653-661.
- [6] Puel C, Mathey J, Kati-Coulibaly S, et al. Preventive effect of *Abelmoschus manihot* (L.) Medik. on bone loss in the ovariectomised rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99: 55-60.
- [7] Lu XJ, Huang ZM, Yang XB, et al. Liver protective effects of hyperin on duck hepatitis B virus infection [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2007, 23: 10-13.
- [8] Wu LL, Yang XB, Hang ZM, et al. *In vivo* and *in vitro* activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L.) Medik [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 404-409.
- [9] Yang FL, Yue HX, Jia WX. Development of real-time PCR assay for duck GAPDH gene [J]. *J Southwest Univ Nationalities (Nat Sci) (西南民族大学学报 自然科学版)*, 2007, 33: 92-95.
- [10] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B

- and decline during adefovir dipivoxil therapy [J]. Gastroenterology, 2004, 126: 1750-1758.
- [11] Chien RN, Liaw YF. Nucleos(t)ide analogues for hepatitis B virus: strategies for long-term success [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008, 22: 1081-1092.
- [12] Bocher WO, Galun E, Marcus H, et al. Reduced hepatitis B virus surface antigen-specific Th1helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen specific antibodies in the trimera mouse [J]. Hepatology, 2000, 31: 480-487.
- [13] Zeuzem S, Carreño V. Interleukin-12 in the treatment of chronic hepatitis B and C [J]. Antiviral Res, 2001, 52: 181-188.
- [14] Khalili M, Perrillo RP. Interferon therapy of hepatitis B [J]. Clin Liver Dis, 1999, 3: 363-387.
- [15] Wang L, Hu GL, Liu F, et al. Therapeutic effect of interferon gamma on rat with immune hepatic fibrosis [J]. China J Mod Med (中华现代医药杂志), 2004, 14: 56-60.

第二届全国药物性损害与安全用药学术会议

—— 抗感染药物的严重不良反应与临床安全应用专题研讨会征文通知

抗感染药物是临床使用最广泛最重要药物之一,但其一些严重不良反应、不合理用药及微生物耐药性等问题引起的危害受到医药卫生工作者的密切关注。为了使临床重视抗感染药物的安全性,避免或减少其危害,维护患者安全,药物不良反应杂志社继 2009 年首届“药物性损害与安全用药学术会议-神经精神疾病用药安全与药源性神经精神疾病防治学术会议”之后,定于 2010 年 4 月召开第二届全国药物性损害与安全用药学术会议,主题为“抗感染药物的严重不良反应与临床安全应用”。会议由中国药学会抗生素专业委员会、中国药学会药物临床评价研究专业委员会和药物不良反应杂志社共同主办。届时将邀请卫生部有关领导和著名专家、学者就会议主题作重要专题报告,并进行学术交流和研讨。现将征文内容及有关事项通知如下。欢迎广大临床医师、护士、药师、研究者、管理者及相关专业人员踊跃投稿。

一 征文内容及要求

- 1 征文内容: ① 抗感染药物安全性的临床研究、基础实验研究及流行病学调查研究; ② 抗感染药物严重、罕见、新的不良反应病例报告与分析; ③ 抗感染药物严重不良反应循证医学研究; ④ 抗感染药物 I~IV 期临床研究中安全耐受性评价; ⑤ 抗感染药物所致药源性疾病的临床特点、诊断及防治; ⑥ 抗感染药物滥用、误用、不合理预防应用及对策; ⑦ 特殊人群与肝肾疾病患者抗感染药物的安全使用; ⑧ 突发群体性抗感染药物不良反应的研究; ⑨ 微生物耐药性的监测、调查及研究; ⑩ 抗感染药物联合应用的安全性评估; □ 抗感染药品的质量与安全性; □ 抗感染药物不良反应风险因素研究; □ 抗感染药物安全性监测与管理; □ 其他相关内容。
- 2 征文要求: ① 论文未在公开发行期刊上发表或全国性学术会议上交流,文责自负; ② 综述文章不超过 5000 字,研究论文不超过 3000 字,并附 200~400 字中英文摘要; ③ 征文稿请按《药物不良反应杂志》稿约要求撰写; ④ 论文用电子邮件传递,请注明作者姓名、职称、单位、科室、联系电话、E-mail 等。来稿一律不退,自留底稿。
- 3 征文截止日期: 截止日期 2010 年 1 月 31 日,一经录用,将另函通知。

二 优秀论文评选

大会设立优秀论文评选活动。来稿由医学、药学专家组成的评审组进行审评,对优秀论文予以奖励并颁发获奖证书,有关优秀论文将在《药物不良反应杂志》发表。

三 联系方式

地 址: 第二届全国药物性损害与安全用药学术会议会务组 北京市宣武区长椿街 45 号, 药物不良反应杂志社
邮 编: 100053 联系电话: (010) 83198246 传真: (010) 83156049 邮箱: cadrlj@sina.com
联系人: 吴瑞芳 陈 冰 耿 蕊