

脱氧野尻霉素抑制乙型肝炎病毒复制的体外实验研究

谢琼^{1,2}, 谭德明¹, 彭忠田³, 侯周华¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008; 2 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011; 3 南华大学附属第一医院, 湖南衡阳 421001)

[摘要] **目的** 探讨脱氧野尻霉素(Deoxynojirimycin, DNJ)及其衍生物 N-丁基-脱氧野尻霉素(N-butyl-Deoxynojirimycin, N-butyl-DNJ)的体外抗乙型肝炎病毒(HBV)作用。**方法** 以 HepG2 2.2.15 细胞为模型,与药物共培养观察 9 d,于第 3、6、9 d 收集培养上清行乙型肝炎表面抗原及 e 抗原(HBsAg 及 HBeAg)、HBV DNA 定量检测。**结果** 培养第 9 d,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNJ、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-butyl-DNJ 具有较明显抑制病毒复制的作用,与对照组比较,差异均具显著性(均 $P=0.001$)。**结论** DNJ 及其衍生物在实验浓度下无明显和直接的细胞毒性作用,分别在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有较明显的抑制 HBV 复制的作用。

[关键词] 脱氧野尻霉素; N-丁基-脱氧野尻霉素; HepG2 2.2.15 细胞; 肝炎病毒, 乙型; 体外实验

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)01-0003-05

The inhibitory effects of deoxynojirimycin on hepatitis B virus replication in vitro

XIE Qiong^{1,2}, TAN De-ming¹, PENG Zhong-tian³, HOU Zhou-hua¹ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 3 The First Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the inhibitory activities of deoxynojirimycin (DNJ) and its derivate N-butyl-deoxynojirimycin (N-butyl-DNJ) against hepatitis B virus(HBV) in vitro. **Methods** HepG2 2.2.15 cell were treated with DNJ. At 3rd, 6th and 9th day after treatment, the supernatant was collected for HBsAg, HBeAg and HBV DNA quantitative assay. **Results** At 9th day of incubation, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNJ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-butyl-DNJ had obvious inhibitory effect on the replication of virus, there were significant differences compared with control group (both $P=0.001$). **Conclusion** DNJ and its derivate have no obvious and direct cytotoxicity effect at the experimental concentration, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNJ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-butyl-DNJ can inhibit the replication of HBV in HepG2 2.2.15 cell.

[Key words] deoxynojirimycin; N-butyl-deoxynojirimycin; HepG2 2.2.15 cells; hepatitis B virus; in vitro test

[Chin Infect Control, 2009, 8(1): 3-6, 17]

慢性乙型肝炎的抗病毒治疗仍是临床面临的一道难题。现有的抗病毒药物(包括干扰素和核苷类抗病毒药物)在疗效和安全性等方面均存在一定的局限性,尚不能完全满足临床用药的需求。寻求、开发新的安全有效的治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染药物仍是目前国内外研究的热点^[1-2]。脱氧野尻霉素(Deoxynojirimycin, DNJ)及其衍生物 N-丁基-脱氧野尻霉素(N-butyl-Deoxynojirimycin, N-butyl-DNJ)是 α -葡萄糖苷酶的抑制剂,具有降血糖、抗病

毒、抗肿瘤转移等作用^[3]。我们选择 HepG2 2.2.15 细胞系为模型^[4],对 DNJ 体外抗 HBV 的作用进行研究,并应用四甲基偶氮哇盐(MTT)比色分析法检测药物的细胞毒性,以评价药物的安全性。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)及 G-418 购自 GIBCO 公司;二甲基亚砜(DMSO)及

[收稿日期] 2008-02-05

[作者简介] 谢琼(1980-),女(汉族),湖南省衡阳市人,博士研究生,主要从事病毒性肝炎诊治研究。

[通讯作者] 谭德明 E-mail: dmt2008@yahoo.com.cn

MTT 购自 Sigma 公司; DNJ 及 N-butyl-DNJ 由中南大学湘雅药学院研制; 干扰素 (IFN)- α 2b 由先灵葆雅公司提供; 乙型肝炎表面抗原及 e 抗原 (HBsAg、HBeAg) 定量检测试剂盒购自苏州新波生物技术有限公司; HBV 核酸扩增荧光检测试剂盒购自上海申友生物技术有限责任公司。

1.2 HepG2 2.2.15 细胞培养 将 HepG2 2.2.15 细胞接种至 25 cm² 培养瓶中, 每瓶加入 DMEM 混合培养液 (含 10% FBS、380 μ g/mL G-418、青霉素与链霉素各 100 U/mL) 5~10 mL。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育, 3~4 d 传代。

1.3 药物作用 将细胞以 3×10^5 /cm² 接种于 12 孔培养板, 每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 1.5 mL, 次日移去上述培养基, 每孔加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基 1 mL。实验组培养基中含相应终浓度的药物, 包括不同浓度 DNJ 组、N-butyl-DNJ 组、IFN- α 组; 对照组只加培养基。每组设 3 个复孔。每 3 天更换含有相应药物的培养基并收集培养上清待测 HBsAg、HBeAg、HBV DNA。

1.4 细胞毒性研究 采用 MTT 法。用含 10% FBS 的 DMEM 配制成单个细胞悬液, 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板, 每孔体积 200 μ L。实验组培养基中含相应终浓度的药物, 包括不同浓度 DNJ 组、N-butyl-DNJ 组、IFN- α 组; 对照组只加培养基。每组设 2 个复孔。空白孔不加细胞, 只加培养基。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中。每 3 天更换含相同浓度药物的培养基。培养 9 d 后, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养基后每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min, 使甲臞充分溶解, 在酶标仪上选择 490 nm 波长, 以空白孔调零, 测定各孔吸光值 (A 值)。

1.5 HBsAg、HBeAg 定量测定 取 100 μ L 阴性、阳性对照及参考标准品、待检测样品, 按顺序加入微孔反应小条中并加贴封片。微孔反应条在室温下, 用振荡仪缓慢振摇孵育 1 h; 在第 1 次孵育结束后, 小心将封片揭下并弃掉, 将微孔反应条放入洗板机吸干各孔并每孔注入洗涤液 400 μ L, 再吸干各孔, 重复以上洗涤 4 次, 拍干; 每孔加入 100 μ L 标记物工作液, 并加贴封片。微孔反应条在室温下, 用振荡仪缓慢振摇孵育 1 h; 在第 2 次孵育结束后, 小心将封片揭下并弃掉, 用洗板机洗涤 6 次, 拍干; 每孔加入增强液 100 μ L, 并加贴封片。微孔反应条在室温下, 用振荡仪缓慢振摇孵育 5 min; 用 ANYTEST 2000 时间分辨荧光测定仪测定 HBsAg、HBeAg 浓

度值。

1.6 HBV DNA 定量检测 (荧光实时定量聚合酶链反应) 取 20 μ L 裂解缓冲液加入 0.5 mL 离心管后, 再分别加入 20 μ L 标本、阴性对照、临界对照、阳性对照, 混匀, 沸水浴 10 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μ L 进行聚合酶链反应 (PCR)。取 DNA 2 μ L 加入已准备的 PCR 管, 以不同浓度 HBV 全基因质粒为标准模板, 置于荧光实时 PCR 仪 (美国 BIO-RAD) 上反应。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 min, 随后以 3 步循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 时收集荧光) 扩增 DNA, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。实验结束后, 由软件自动分析得出结果。将所得结果取对数作统计学分析。

1.7 统计学分析 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用方差分析, 与对照组比较采用 Dunnett 分析法, 由 SPSS 13.0 软件包自动完成。

2 结果

2.1 药物的细胞毒性作用 各实验组之间以及各实验组和对照组之间 A 值均无统计学差异 (均 $P > 0.05$), 表明各不同药物及不同药物浓度的作用对细胞活性无明显影响, 也即 DNJ 和 N-butyl-DNJ 在实验药物浓度内对细胞无明显毒性。见图 1。

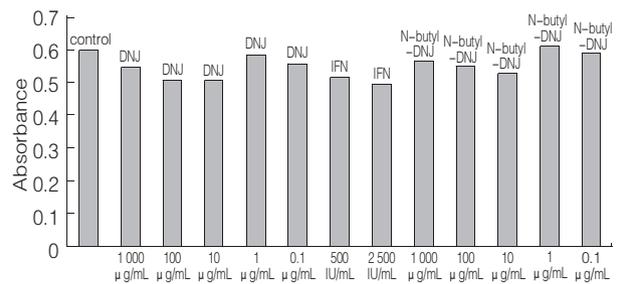


图 1 DNJ 与 N-butyl-DNJ 的细胞毒性试验

Figure 1 Cytotoxicity test analysis of DNJ and N-butyl-DNJ

2.2 药物对 HepG2 2.2.15 细胞产生 HBsAg 和 HBeAg 的影响 见图 2。DNJ 浓度为 0.10~100 μ g/mL 时, 培养上清中 HBsAg 浓度无明显变化; 当浓度增至 1 000 μ g/mL, 作用第 9 天时, HBsAg 浓度较对照组降低, 差异有显著性 ($P = 0.001$)。IFN- α 2b 浓度为 500 IU/mL、2 500 IU/mL, 作用第 9 天时, HBsAg 浓度较对照组均有降低, 且差异均有显著性 (分别 $P = 0.000$, $P = 0.014$)。N-butyl-DNJ 浓度为 0.10~10 μ g/mL 时, 培养上清中 HB-

sAg 浓度无明显变化;当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作用第 9 天时,HBsAg 浓度较对照组均降低,差异均有显著性(分别 $P = 0.000, P = 0.015$)。经药物作用后,HepG2 2.2.15 细胞产生 HBeAg 的变化趋势与药物对 HBsAg 的影响相似。
 2.3 药物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBV DNA 复制的抑制 见表 1。DNJ 浓度为 0.10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,培养上清中 HBV DNA 水平无明显变化;当浓度增至 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作用第 9 天时,HBV DNA 水平较对照组降低 2lg,差异有显著性($P = 0.001$)。

IFN- α 药物浓度为 500 IU/mL、2 500 IU/mL,作用第 9 天时,HBV DNA 水平与对照组比较,前者降低 2lg,差异有显著性($P = 0.001$),后者降低 1lg~2lg,差异亦有显著性($P = 0.045$)。N-butyl-DNJ 药物浓度为 0.10~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,培养上清中 HBV DNA 水平无明显变化;当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作用第 9 天时,HBV DNA 水平较对照组分别降低 2lg、1lg~2lg,差异均有显著性(分别 $P = 0.001, P = 0.034$)。

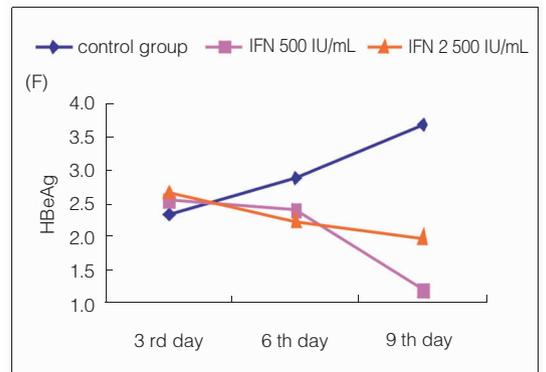
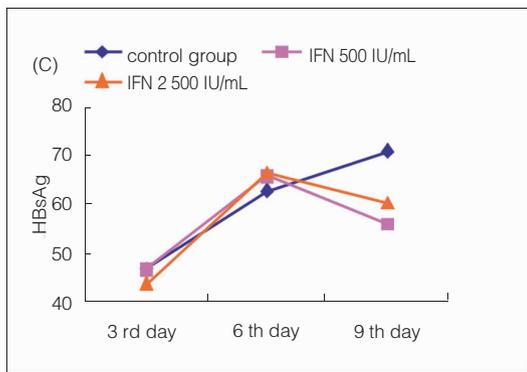
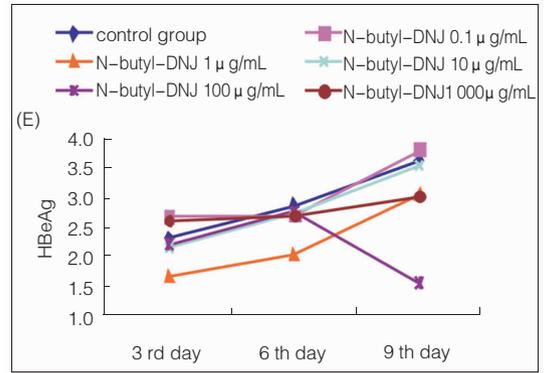
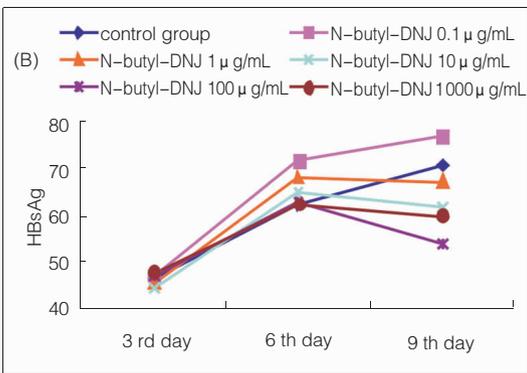
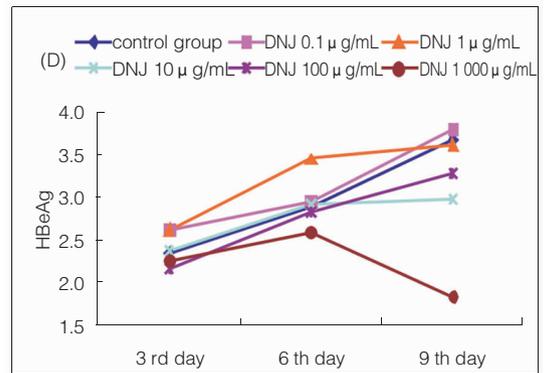
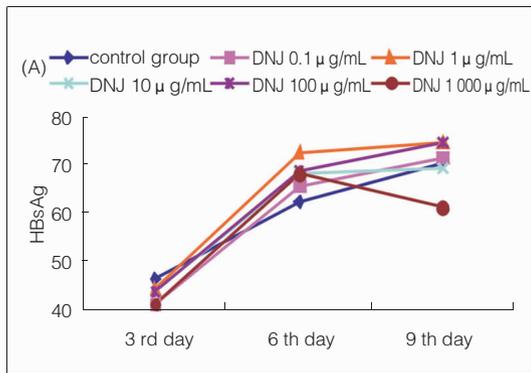


图 A~C 为 DNJ、N-butyl-DNJ 和 IFN- α 2b 对 HepG2 2.2.15 细胞产生 HBsAg 影响的结果;图 D~F 为 DNJ、N-butyl-DNJ 和 IFN- α 2b 对 HepG2 2.2.15 细胞产生 HBeAg 影响的结果

图 2 DNJ、N-butyl-DNJ 和 IFN- α 2b 对 HepG2 2.2.15 细胞产生 HBsAg 和 HBeAg 的影响

Figure 2 Effects of DNJ, N-butyl-DNJ and IFN- α 2b on HBsAg and HBeAg protein production in HepG2 2.2.15 culture medium

表 1 DNJ 和 N-butyl-DNJ 对 HepG2 2. 2. 15 细胞培养上清 HBV DNA 水平的影响 (lg 拷贝/mL)

Table 1 Effect of DNJ and N-butyl-DNJ on HBV DNA level in supernatant of HepG2 2. 2. 15 cells (lg copy/mL)

组别	HBV DNA		
	第 3 天	第 6 天	第 9 天
对照组	5.55 ± 0.33	6.62 ± 0.22	6.98 ± 0.03
DNJ 1 000 μg/mL	5.63 ± 0.19	6.42 ± 0.38	4.74 ± 0.24**★
DNJ 100 μg/mL	5.67 ± 0.25	6.98 ± 0.07	6.18 ± 0.65
DNJ 10 μg/mL	5.46 ± 0.43	6.42 ± 0.36	6.62 ± 0.31
DNJ 1 μg/mL	5.31 ± 0.63	6.45 ± 0.44	6.26 ± 0.44
DNJ 0.1 μg/mL	5.66 ± 0.23	5.82 ± 0.86	6.36 ± 0.54
IFN 500 IU/mL	5.50 ± 0.43	6.26 ± 0.21	4.71 ± 0.52**
IFN 2 500 IU/mL	5.68 ± 0.26	6.44 ± 0.30	5.58 ± 1.12*★
N-butyl-DNJ 1 000 μg/mL	5.39 ± 0.38	6.45 ± 0.42	5.65 ± 0.64*
N-butyl-DNJ 100 μg/mL	5.50 ± 0.31	6.42 ± 0.32	4.92 ± 0.12**★
N-butyl-DNJ 10 μg/mL	5.44 ± 0.49	6.09 ± 0.79	5.84 ± 0.83
N-butyl-DNJ 1 μg/mL	5.46 ± 0.40	6.63 ± 0.22	6.62 ± 0.50
N-butyl-DNJ 0.1 μg/mL	5.45 ± 0.37	6.74 ± 0.21	6.23 ± 0.77

** 与对照组比较, $P < 0.01$; * 与对照组比较, $P < 0.05$; ★ 与 IFN 500 IU/mL 组比较, $P > 0.05$

3 讨论

本实验选用 IFN- α 作为阳性对照药物,结果显示,IFN 可以明显降低细胞培养上清中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 浓度,提示其可以抑制 HepG2 2. 2. 15 细胞内 HBV 复制,具有一定的体外抗 HBV 活性作用^[5]。

本实验选用的 DNJ 是一种嘧啶生物碱,首先由 Yagi 等从桑根皮中分离得到。它作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂,具有降血糖、抗病毒、抗肿瘤转移等作用。经 DNJ 对莫洛尼鼠白血病病毒 (MoLV) 的抑制试验表明, DNJ 具有显著的抗逆转录病毒活性; 还有实验表明 DNJ 可以改变人免疫缺陷病毒 (HIV) 在 CD4+ 细胞中的感染力^[6-7]。

从本实验结果看, DNJ、N-butyl-DNJ 均能有效地抑制细胞 HBV DNA 的分泌 (HBV DNA 水平较对照组下降 2lg), 对 HBsAg 表达也有抑制作用 (HBsAg 滴度较对照组下降 10~20 ng/mL), 但对于后者的抑制强度不如前者, 这可能与用药浓度、实验时间长短及 HBV 自身复制特点有关。N-butyl-DNJ 对 HBV 复制最大抑制作用浓度较 DNJ 低, 可能是 N 烷基化作用降低了 DNJ 衍生物的亲油性, 影响 PK 值 (解离常数的负对数), 继而改变药物细胞间分布浓度以及亲油性 N 烷基团与酶中可能存在的疏水口袋的相互作用^[8]。同时结果表明, N-

butyl-DNJ 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的抗病毒效果好于该药 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可能是因为药物在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右时达到了抗病毒的最大活性, 再增加药物剂量后则进入了药物效果平台期, 抗病毒效果不再随剂量的增加而增加; 也可能与所使用的培养细胞的敏感性问题有关, 不能进一步观察到更强的抗病毒活性。

DNJ 抗 HBV 的机制目前少见报道, 其抗 HBV 作用机制也待进一步研究。对于包膜病毒而言, 糖蛋白形成过程中, 多糖前体转移到新生肽和以后的葡萄糖修饰等糖基化步骤对病毒包膜的加工折叠是必要的。葡萄糖修饰是通过 α -葡萄糖苷酶 I 和 II 切断外接 α -1, 2 葡萄糖残基和内接 α -1, 3 葡萄糖残基完成的。某些新生的糖蛋白其糖链部分需经一系列修饰剪切后, 才能被分子伴侣识别, 从而完成其正确折叠, 获得生理功能。DNJ 作为这些葡萄糖苷酶抑制剂则能抑制这一剪切过程的起始步骤, 通过抑制葡萄糖的修饰, 干扰糖蛋白的成熟, 造成糖蛋白折叠错误并在内质网停留。Mehta 等^[9]认为 3 种乙型肝炎被膜蛋白中 M 蛋白即属上述糖蛋白, N-butyl-DNJ 可使与 M 蛋白前 S2 区域相连的糖链剪切受阻, 抑制 M 蛋白分泌。被膜蛋白的错误折叠能干扰病毒的成熟, 这一点在乙型肝炎慢性感染的土拨鼠模型中已得到证实^[10]。

本实验结果表明, DNJ 和 N-butyl-DNJ 抑制 HBsAg 形成的能力小于药物对 HBV DNA 复制的影响, 提示 DNJ 和 N-butyl-DNJ 除可能干扰了 HBsAg 的形成和病毒的包装成熟外, 可能更重要的是对 HBV 基因复制和转录过程有明显的抑制作用。这与 Mehta 等^[9]研究发现 DNJ 衍生物可能通过干扰前基因组 RNA 衣壳的形成, 加速病毒核心颗粒的降解, 影响前基因组 RNA 逆转录酶而发挥抗病毒作用一致。尽管 DNJ 和 N-butyl-DNJ 抑制 HBV 复制的机制尚不十分明确, 但其与目前使用的核苷类抗 HBV 药物的作用机制是迥然不同的。这些不同作用机制抗病毒药物的研发将有助于提高抗病毒药物联合应用治疗效果。

[参考文献]

- [1] Shepard C W, Simard E P, Finelli L, et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination [J]. Epidemiol Rev, 2006, 28(1): 112-125.

产生的最佳、最有效的策略。防治耐多药结核病的具体措施^[12]:一是采用 DOTS 治疗新发痰涂片阳性肺结核病以阻止耐多药结核病的发生;二是在 DOTS 管理基础上,采用二线抗结核药物治疗已有的耐多药结核病患者。目前,WHO 建议在高耐药国家采用耐多药结核病控制策略(DOTS-PLUS 策略)^[13]以控制耐药结核病的流行。总之,耐药和耐多药结核病的防治是一项艰巨的工作,这有赖于政府的支持、全社会的参与、多部门的合作,结核病专科医院发挥医疗诊治的优势,最终达到控制结核病的流行及耐药结核病的蔓延。

[参考文献]

[1] World Health Organization. International union against tuberculosis and lung disease. anti-tuberculosis drug resistance in the world; the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance [R]. geneva: WHO/IUATLD,1997;1-120.

[2] World Health Organization. International union against tuberculosis and lung disease. anti-tuberculosis drug resistance in the world; the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Report No. 2 prevalence and trends[R]. geneva: WHO/IUATLD,2000;1-107.

[3] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志,2002,24(2):65-108.

[4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.

[5] 中国防痨协会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006:13-45.

[6] Canetti G, Fox W, Khomenko A, *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmers[J]. Bull World Health Organ,1969,41:21-43.

[7] 刘宇红,姜广路,赵立平,等. 第四次全国结核病流行病学抽样调查——结核分枝杆菌耐药性分析与评价[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(4):224-227.

[8] World Health Organization. International union against tuberculosis and lung disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world; the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance; report No. 3. prevalence and trends[R]. Geneva: WHO/IUATLD,2004;1-94.

[9] 梅建,薛桢,沈鑫,等. 原发性耐药是耐药结核病产生的重要原因[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(2):75-78.

[10] World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world (third Global Report)[R]. Geneva: WHO, 2004; 15-18.

[11] World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis [R]. Geneva: WHO,2006;361.

[12] 张立兴,屠德华. 加强预防和合理治疗耐多药结核病[J]. 中国防痨杂志,2003,25(1):1.

[13] World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis[R]. WHO,2006;8-18.

(上接第 6 页)

[2] Feld J J, Ghany M G. Evolution of therapy for chronic hepatitis B; progressing from the simple to the complex[J]. Ann Intern Med,2007,147(11):806-808.

[3] Asano N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use[J]. Glycobiology, 2003, 13(10):93R-104R.

[4] Liu M C, Yu M, Zhang N L, *et al.* Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2. 2. 15 cells[J]. J Viral Hepat, 2004, 11(2):124-129.

[5] Guan R. Treatment of chronic hepatitis B infection using interferon[J]. Med J Malaysia,2005,60(Suppl B): 28-33.

[6] Fenouillet E, Papandreou M J, Ian M, *et al.* Recombinant HIV envelope expressed in an α -glucosidase 1-deficient CHO cell line and its parental cell line in the presence of 1-deoxynojirimycin is functional[J]. Virology, 1997, 231(1):89-95.

[7] Taylor D L, Sunkara P S, Liu P S. 6-0-butanoylcastanosper-

mine (MDL 28,574) inhibits glycoprotein processing and the growth of HIVs[J]. AIDS, 1991, 5(6):693-698.

[8] Tan A, van den Brock L, van Boeckel S, *et al.* Chemical modification of the glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin structure activity relation ship[J]. J Bio Chem, 1998, 266(22): 14504-15410.

[9] Mehta A, Lu X, Block T M, *et al.* Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(5):1822-1827.

[10] Lu X, Mehta A, Dwek R, *et al.* Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion[J]. Virology, 1995, 213 (2):660-665.