

# 甲基阿魏酸对乙型肝炎病毒转基因小鼠的抗病毒作用研究<sup>Δ</sup>

杨成芳\*, 李 丽#, 李勇文, 容明智, 庞勇军, 方舒萍, 韦冰华(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1791-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.18

**摘要** 目的:研究甲基阿魏酸(MFA)对乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠的抗病毒作用。方法:将SPF级HBV转基因BALB/c小鼠随机分为模型对照组、阳性药物组(拉米夫定100 mg/kg)、MFA组(100 mg/kg),每组8只;另取同种同龄非转基因BALB/c小鼠为正常对照组。除模型对照组和正常对照组小鼠ig等剂量蒸馏水外其余各组ig相应药物,每日1次。观察各组小鼠体质量,分别于给药前和给药后7、14、21 d,以及停药3 d采集全血约0.25 ml;检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性,实时荧光定量-聚合酶链式反应检测血清中HBV-DNA的拷贝数,酶联免疫吸附法检测血清中HBV外膜大蛋白(HBV-LP)的相对含量。结果:各组小鼠体质量及ALT、AST活性比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型对照组比较,MFA组小鼠给药后各时间点及停药后血清中HBV-DNA和HBV-LP水平均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );拉米夫定组小鼠给药后各时间点血清中HBV-DNA的拷贝数降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),而HBV-LP的相对含量仅在药后21 d时降低( $P<0.05$ ),停药则立即回升。结论:MFA可有效抑制HBV转基因小鼠血清中HBV-DNA和HBV-LP水平,未见明显反跳现象;对小鼠血清转氨酶和体质量未见明显影响。

**关键词** 甲基阿魏酸;乙型肝炎病毒;转基因小鼠;乙型肝炎病毒外膜大蛋白;脱氧核糖核酸

## Study on the Antivirus Effects of Methyl Ferulic Acid in HBV Transgenic Mice

YANG Chengfang, LI Li, LI Yongwen, RONG Mingzhi, PANG Yongjun, FANG Shuping, WEI Binghua (Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the antivirus effects of methyl ferulic acid (MFA) in HBV transgenic mice. METHODS: Specific pathogen free (SPF) level HBV transgenic BALB/c mice were randomly divided into model control group, positive drug group (lamivudine 100 mg/kg) and MFA group (100 mg/kg) with 8 mice in each group; non-transgenic BALB/c mice with the same age and congener were included in normal control group. Mice were given relevant medicine intragastrically once a day except model control group and normal control group were given constant volume of solution intragastrically. Blood 0.25 ml were collected respectively before treatment and at the 7th, 14th, 21st day during treatment, and at 3rd day after drug withdrawal. Body weight, serum levels of ALT and AST were observed in each group. The serum copies of HBV-DNA were detected by RT fluorescent quantitative-PCR, and relative serum content of HBV large envelope protein (HBV-LP) was detected by ELISA. RESULTS: There was no statistical significance in body weight, the activity of ALT and AST among those groups ( $P>0.05$ ). Compared with model control group, the level of HBV-DNA and HBV-LP in serum of mice decreased in MFA group at each time point after medication and after drug withdrawal ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); serum copies of HBV-DNA in mice decreased in lamivudine group at different time points after medication ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and relative content of HBV-LP decreased only at 21st day after medication ( $P<0.05$ ), but increased immediately after drug withdrawal. CONCLUSIONS: MFA can effectively inhibit the level of HBV-LP and HBV-DNA in serum without obvious bounce phenomenon in HBV transgenic mice; it shows no obvious effects on serum transaminase and body weight.

**KEYWORDS** Methyl ferulic acid; HBV; Transgenic mice; HBV large envelope protein; DNA

广西特色植物蝉翼藤(*Securidaea inappendicula* Hassk.)为远志科、远志族蝉翼藤属攀援灌木,具有较强的抗菌消炎、抑制病毒复制和增强免疫的活性<sup>[1-2]</sup>。甲基阿魏酸(MFA)是从蝉翼藤的根茎中提取、分离、纯化得到的一种单体。本课题组前期研究证实,MFA对肝癌HepG2.2.15细胞乙肝表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎E抗原(HbeAg)及乙型肝炎病毒的脱氧核糖核酸(HBV-DNA)具有抑制作用,并具有抗乙肝病毒复制和保肝作用<sup>[3-4]</sup>。本研究以HBV转基因小鼠为研究对象,观察

Δ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2013GXNS-FAA019230)

\* 实验师,硕士。研究方向:肝纤维化实验。电话:0773-5895291。E-mail:308823789@qq.com

# 通信作者:高级实验师,硕士。研究方向:抗病毒、抗肝纤维化实验。电话:0773-5895291。E-mail:31910753@qq.com

MFA对其血清中HBV外膜大蛋白(HBV-LP)和HBV-DNA含量的抑制作用及该药体内作用的安全性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Model 450 酶标仪(美国Thermo公司);XL-600全自动生化分析仪(印度Transasia公司);7500实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国AB公司);5418小型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

### 1.2 药品与试剂

注射用MFA粉末(美国Sigma公司,批号:101236152,规格:每瓶25 g);拉米夫定片[商品名:贺普丁,葛兰素-史克制药(苏州)有限公司,批号:09010007,规格:每片0.1 g];HBV-DNA荧光定量PCR检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司,批号:14080111);HBV-LP酶联免疫吸附试验(ELISA)

检测试剂盒(北京贝尔生物有限公司,批号:20140911);丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号:20140206、20140304)。

### 1.3 动物

SPF级HBV转基因和非转基因BALB/c小鼠,6~8周龄,体质量18~22g,♀♂各半,购自解放军第458医院,动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0018。动物实验已通过医院动物伦理委员会同意。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

取HBV转基因BALB/c小鼠适应性喂养1周后,随机分为模型对照组、阳性药物组(拉米夫定100mg/kg)、MFA组(100mg/kg<sup>[5-6]</sup>),每组8只;另取同种同龄非转基因BALB/c小鼠为正常对照组。除正常对照组和模型对照组小鼠ig相同体积的蒸馏水外,其余各组小鼠ig相应药物,每日1次,连续给药21d。

### 2.2 一般情况和体质量的观察

给药前后观察各组小鼠外观和行为活动,并每5天称各组小鼠体质量1次,绘制体质量变化曲线。

### 2.3 样本采集

分别于给药前和给药后7、14、21d,以及停药3d眼眶静脉丛采集全血约0.25ml,室温静置2h,以离心半径3.6cm、3000r/min离心10min,分离血清,-20℃保存,备用。

### 2.4 ALT和AST活性的检测

采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清中ALT、AST的活性。

### 2.5 HBV-DNA拷贝数的检测

采用RP-PCR法检测各组小鼠血清中HBV-DNA的拷贝数。按照HBV-DNA荧光定量PCR检测试剂盒说明书操作提取小鼠血清中的DNA,然后将2μl已处理好的样品加入至已加有28μl PCR反应液的反应管中扩增,并设立阴性对照孔。扩增条件:尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG酶)反应50℃2min,94℃预变性2min,共1个循环;94℃变性10s,60℃退火/延伸30s,共反应40个循环。荧光检测通道为530nm(羧基荧光素FAM)。绘制标准曲线,计算各组小鼠血清中HBV-DNA的拷贝数。

### 2.6 HBV-LP相对含量的检测

按ELISA检测试剂盒说明书操作检测各组小鼠血清中HBV-LP相对含量。将各组小鼠血清与样品稀释液按1:2稀释,取50μl加入至包被了HBV-LP抗体的反应板内,同时设立空白对照、阴性对照、阳性对照孔,各2孔,混匀,37℃孵育30min,洗板5次。除空白对照孔外,各孔加酶标工作液100μl,37℃孵育30min,洗板5次,加入底物A、B液,37℃孵育10min,加入终止液,振荡混匀,于450nm波长测定光密度(OD值)。将各样品的平均OD值与试剂盒阳性对照孔的平均OD值进行比较,得到样品HBV-LP的相对含量。计算公式:样品HBV-LP相对含量=(样品孔OD值-阴性对照孔OD值)/(阳性对照孔OD值-阴性对照孔OD值)。

### 2.7 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 17.0软件进行统计分析。同组不同时间点间比较用重复测量方差分析;同时不同组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用Welch检

验,组间两两比较采用Student-Newman-Keuls检验,检验水准=0.05。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 小鼠一般情况与体质量变化

实验期间,各组小鼠外观及行为活动未见明显异常。与模型组对照比较,各组小鼠体质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这表明用药期间药物对小鼠一般情况和体质量几乎无影响。各组小鼠体质量变化情况见图1。

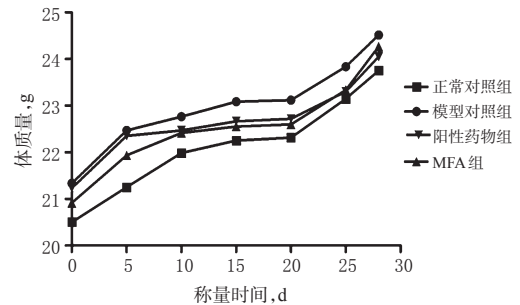


图1 各组小鼠体质量变化情况

Fig 1 Body weight of mice in each group

### 3.2 小鼠血清中ALT和AST活性变化

结果显示,各组小鼠不同时间点血清中ALT和AST活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与模型对照组比较,阳性药物组和MFA组小鼠相同时间点血清中ALT和AST活性差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ )。这表明用药期间药物对小鼠血清中ALT和AST活性几乎无影响。各组小鼠血清中ALT、AST活性变化情况分别见表1、表2。

表1 各组小鼠血清中ALT活性( $\bar{x} \pm s, n=8, U/L$ )

Tab 1 Activity of serum ALT in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8, U/L$ )

组别	给药前	给药7 d	给药14 d	给药21 d	停药3 d
正常对照组	33.49 ± 6.62	34.31 ± 7.72	34.98 ± 7.11	35.76 ± 6.67	35.68 ± 7.13
模型对照组	34.62 ± 7.49	35.96 ± 7.35	38.25 ± 6.57	36.64 ± 7.09	35.82 ± 6.44
阳性药物组	35.90 ± 8.06	36.71 ± 8.21	38.12 ± 8.16	38.45 ± 8.13	36.50 ± 8.29
MFA组	34.59 ± 8.25	37.51 ± 7.74	36.79 ± 7.84	35.38 ± 8.08	36.14 ± 9.33

表2 各组小鼠血清中AST活性( $\bar{x} \pm s, n=8, U/L$ )

Tab 2 Activity of serum AST in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8, U/L$ )

组别	给药前	给药7 d	给药14 d	给药21 d	停药3 d
正常对照组	67.51 ± 9.01	70.43 ± 10.14	69.46 ± 7.98	68.27 ± 7.39	69.20 ± 9.88
模型对照组	68.45 ± 7.44	70.02 ± 7.45	70.69 ± 10.84	72.71 ± 11.37	69.95 ± 8.77
阳性药物组	70.84 ± 8.76	69.73 ± 9.98	71.27 ± 8.52	70.29 ± 11.90	69.17 ± 6.99
MFA组	69.65 ± 6.99	70.28 ± 7.69	72.28 ± 6.68	73.79 ± 9.11	71.54 ± 8.31

### 3.3 小鼠血清中HBV-DNA拷贝数变化

HBV-DNA的回归方程为 $y = -3.41 \times \lg x + 44.584$  ( $r^2 = 0.995$ ),可见标准曲线具有较好的线性关系。结果显示,与模型对照组比较,阳性药物组和MFA组小鼠给药期间相应时间点血清中HBV-DNA拷贝数减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),其中在给药14、21d时较显著( $P < 0.01$ );停药3d时阳性药物组小鼠血清中HBV-DNA拷贝数迅速回升到给药前水平,MFA组小鼠血清中HBV-DNA拷贝数轻微回升,反跳现象不明显。这表明MFA可抑制HBV转基因小鼠HBV-DNA的复制作用,且呈时间依赖性,停药后未见反跳现象。各组小鼠血清中HBV-DNA拷贝数变化情况见表3。

表3 各组小鼠血清中HBV-DNA拷贝数( $\bar{x} \pm s, n=8, \times 10^2$ 拷贝数/ml)

Tab 3 Copies of serum HBV-DNA in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8, \times 10^2$  copies/ml)

组别	给药前	给药7 d	给药14 d	给药21 d	停药3 d
正常对照组	0	0	0	0	0
模型对照组	199.22 ± 10.84*	198.58 ± 8.29*	198.42 ± 7.17*	197.90 ± 9.49*	198.73 ± 9.63*
阳性药物组	199.26 ± 11.56	184.60 ± 10.84 <sup>Δ</sup>	172.65 ± 11.27 <sup>ΔΔ</sup>	158.86 ± 9.80 <sup>ΔΔ</sup>	201.09 ± 10.59
MFA组	199.70 ± 12.83	185.14 ± 11.54 <sup>Δ</sup>	161.36 ± 11.48 <sup>ΔΔ</sup>	143.51 ± 11.36 <sup>ΔΔ</sup>	153.96 ± 10.74 <sup>ΔΔ</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ , $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.01$ ; vs. model control group, $^{\Delta}P < 0.05$ , $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

### 3.4 小鼠血清中HBV-LP相对含量变化

与模型对照组比较,阳性药物组小鼠仅给药21 d时血清中HBV-LP相对含量减少( $P < 0.05$ ),停药3 d后迅速回升到给药前水平;而MFA组小鼠随着给药时间的延长,血清中HBV-LP相对含量逐渐减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );停药3 d后HBV-LP相对含量轻微回升,但与模型对照组比较差异仍有统计学意义( $P < 0.01$ )。这表明MFA可抑制HBV转基因小鼠HBV-LP的表达,且呈时间依赖性,停药后未见反跳现象。各组小鼠血清中HBV-LP相对含量变化情况见表4。

表4 各组小鼠血清中HBV-LP相对含量( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 4 Relative content of serum HBV-LP in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	给药前	给药7 d	给药14 d	给药21 d	停药3 d
正常对照组	0.040 ± 0.008	0.044 ± 0.014	0.043 ± 0.011	0.051 ± 0.012	0.038 ± 0.014
模型对照组	0.800 ± 0.112*	0.782 ± 0.064*	0.795 ± 0.080*	0.807 ± 0.074*	0.788 ± 0.089*
阳性药物组	0.807 ± 0.103	0.783 ± 0.073	0.758 ± 0.079	0.723 ± 0.081 <sup>Δ</sup>	0.808 ± 0.093
MFA组	0.797 ± 0.089	0.683 ± 0.095 <sup>Δ</sup>	0.483 ± 0.088 <sup>ΔΔ</sup>	0.352 ± 0.052 <sup>ΔΔ</sup>	0.373 ± 0.051 <sup>ΔΔ</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ , $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.01$ ; vs. model control group, $^{\Delta}P < 0.05$ , $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

## 4 讨论

自1995年Guidotti等使用1.3倍HBV超长序列制备出高复制HBV转基因小鼠,使血清HBV-DNA可量化到 $10^7 \sim 10^9$ 拷贝数/L以后,李秀梅等<sup>[7]</sup>获得1.3倍D基因型HBV基因组建立复制型HBV转基因小鼠已稳定传至36代,极大地提高了HBV转基因小鼠模型在国内科研单位的应用。因HBV转基因小鼠能进行病毒复制和稳定表达病毒蛋白和传代,与人类感染HBV的指标相似,因此是目前公认较为理想的抗HBV药物筛选的动物模型。

HBV-DNA检测仍然是目前作为HBV复制和疗效评价的“金标准”,但在长期抗病毒治疗导致的病毒变异及HBeAg阴转情况下,患者血清学应答检测的准确性非常低下,导致其对临床的支持度不断下降。HBV-LP在病毒进入肝细胞时作为受体蛋白起作用,在病毒组装时,则是基质类似蛋白,同时还行使调节功能。HBV-LP存在于感染性颗粒(Dane颗粒)和亚病毒管状颗粒上,是病毒形成完整外膜的重要标志,与血清HBV-DNA拷贝数具有良好的相关性,能反映患者机体内HBV

复制情况<sup>[8]</sup>。HBV-LP前S区具有拓扑结构,并具有反式激活病毒复制的作用,其作为监测病毒复制状态及感染性的血清学指标具有重要意义<sup>[9]</sup>。有研究显示,血清HBV-LP含量与HBV-DNA联检有利于提高HBV感染者体内病毒复制、疗效和预后判断的血清学诊断与监测水平,两者对HBV诊治及预后评估有互补作用<sup>[10-11]</sup>。

肝脏是最易受到毒性药物攻击的器官之一,故本研究选取血清转氨酶和体质量变化分析MFA对HBV转基因小鼠体内作用的安全性。

本研究结果显示,MFA在有效抑制HBV-DNA复制的同时还能明显抑制HBV转基因小鼠血清HBV-LP的表达,且停药后反跳现象不明显,且MFA对肝脏未见有明显的毒性作用;拉米夫定能有效抑制HBV-DNA的表达,但对HBV-LP的抑制作用较弱,停药后HBV-DNA和HBV-LP迅速反弹。MFA停药后反跳现象不明显的机制是否与其能够明显抑制HBV-LP的表达有关?这个问题仍需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] 常银霞,陈业高.蝉翼藤属药用植物的研究进展[J].山西师范大学学报:自然科学版,2005,19(1):95.
- [2] 李丽,李勇文,唐爱存,等.蝉翼藤氯仿提取物的抗炎和免疫增强作用[J].中药药理与临床,2011,27(4):62.
- [3] 李丽,李勇文,唐爱存,等.甲基阿魏酸对HepG2.2.15细胞HBsAg和HBeAg的抑制作用[J].中药药理与临床,2011,27(3):14.
- [4] 李勇文,李丽,唐爱存,等.甲基阿魏酸在HepG2.2.15细胞培养中对HBV-DNA的抑制作用[J].中药药理与临床,2010,26(6):39.
- [5] 庞文箫,李勇军,李勇文,等.蝉翼藤中甲基阿魏酸对CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤小鼠模型的影响[J].中国药房,2015,26(1):21.
- [6] 容明智,庞勇军,李勇文,等.甲基阿魏酸抗鸭乙型肝炎病毒复制及保肝作用[J].中药药理与临床,2015,31(3):14.
- [7] 李秀梅,陈阳述,刘光泽,等.抗乙型肝炎病毒新药Bay41-4109在HBV转基因小鼠中的药理学研究[J].解放军医学杂志,2011,36(9):893.
- [8] Datta S, Chatterjee S, Veer V, et al. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians[J]. J Clin Exp Hepatol, 2012,2(4):353.
- [9] Schulze A, Schieck A, Ni Y, et al. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction[J]. J Virol, 2010,84(4):1 989.
- [10] 龚丽敏,乐爱平. HBV-LP与HBV-DNA联检的临床应用[J].放射免疫学杂志,2010,23(5):544.
- [11] 陈海潮,单平因,许德顺. HBV-LP和HBV-DNA检测在乙型肝炎诊治中的互补作用[J].中华医院感染学杂志,2012,22(18):4 051.

(收稿日期:2015-12-08 修回日期:2016-02-25)

(编辑:邹丽娟)