

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2168-05

霉酚酸对 HepG2. 2. 15 细胞中乙型肝炎病毒复制的影响*

吴李鸣, 谢海洋, 郑树森[△]

(浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰外科, 卫生部多器官联合移植研究重点实验室, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 探讨霉酚酸(MPA)在体外对乙型肝炎病毒(HBV)复制的影响。方法: 将不同浓度的 MPA (1-20 mg/L) 作用于 HepG2. 2. 15 细胞, 在外加或不加鸟嘌呤核苷(简称鸟苷)的情况下, 分别收集第 4 d 细胞培养上清, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清中乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg), 采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测细胞内乙型肝炎病毒核心蛋白 mRNA(HBV core mRNA), 狭缝印迹杂交法定量分析细胞内 HBV DNA。结果: 在不外加鸟苷情况下, MPA 对 HBV 复制具有抑制作用, 随着浓度增加, 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率逐渐上升, 细胞内 HBV DNA 复制水平下降。外加鸟苷后能逆转 MPA 对 HBV 复制的抑制作用。结论: MPA 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 的分泌及 HBV DNA 复制具有抑制作用。MPA 可能通过减少细胞内鸟苷酸的合成来实现对 HBV 复制的抑制。

[关键词] 霉酚酸; 肝炎病毒, 乙型; 抗原; HepG2. 2. 15 细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Mycophenolate acid inhibits hepatitis B virus replication in HepG2. 2. 15 cells

WU Li-ming, XIE Hai-yang, ZHENG Shu-sen

(Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Key Laboratory of Combined Multi-Organ Transplantation, Ministry of Public Health, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China. E-mail: zyzs@zju.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of mycophenolate acid (MPA) on hepatitis B virus (HBV) replication *in vitro*. **METHODS:** In the presence or absence of guanosine, the HepG2. 2. 15 cells were treated with different concentrations of MPA (1-20 mg/L) for 4 days. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis Be antigen (HBeAg) in supernatant were detected by ELISA. Intracellular HBV core mRNA and HBV DNA were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and slot blot hybridization, respectively. **RESULTS:** MPA suppressed the expression of HBsAg and HBeAg, and inhibited the replication of HBV DNA. The effect of MPA on HBV replication was reversed by addition of exogenous guanosine. **CONCLUSION:** MPA suppresses the expression of HBsAg, HBeAg and replication of HBV DNA in HepG2. 2. 15 cells. Reducing the synthesis of guanosine nucleotides may be involved in the mechanism of the inhibitory activity of MPA on HBV replication.

[KEY WORDS] Mycophenolic acid; Hepatitis B virus; Antigens; HepG2. 2. 15 cells

自 1963 年 Starzl 开展首例肝移植以来, 肝脏移植已经发展成为治疗乙肝相关性终末期肝病的常规治疗手段, 1 年生存率可达 80%^[1]。然而, 术后乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的再感染成为导致移植肝慢性失功甚至受体死亡的重要原因, 近年来越来越受到广泛关注。Karliova 等^[2]报道: 如果不给予一定的预防措施, 肝移植术后 HBV 再感染率可

高达 58% - 83%, 最高可达 90%。尽管自 1978 年起乙肝免疫球蛋白 (hepatitis B immune globulin, HBIG) 及 1993 年后核苷类似物等抗病毒制剂的应用对肝移植术后乙肝复发的防治起到一定的作用, 但 5 年的乙肝再感染率仍可达 20%^[3]。对导致 HBV 再感染的相关因素及术后乙肝复发的防治成为近年来研究的热点。在诸多影响因素中, 移植术后免疫抑

[收稿日期] 2005-03-15 [修回日期] 2005-06-15

* [基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目资助(No. 2003CB515501)

△通讯作者 Tel: 0571-87236570; E-mail: zyzs@zju.edu.cn

制剂的应用被认为是一个不可忽视的因素^[4]。本研究利用 HepG2. 2. 15 细胞株来评价免疫抑制剂霉酚酸在体外对 HBV 复制的影响并探讨其可能的机制。

材 料 和 方 法

1 材料

HepG2. 2. 15 细胞株购自中科院上海细胞所;霉酚酸(mycophenolate acid, MPA)、鸟苷(guanosine)均购自 Sigma 公司;胎牛血清、RPMI - 1640 培养基、G418、Trizol 等购自 Gibco 公司;DIG - High - Primer 购自罗氏公司;酶联检测仪为德国 Bio - Rad 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养 将 HepG2. 2. 15 细胞接种于 RPMI - 1640 培养液(含 10% 胎牛血清、200 mg/L G418), 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养,待培养上清液中乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)水平稳定,上清测定吸光度(P)与实验阴性对照(N)比值(P/N)大于 5 时,用于实验。

2.2 MTT 实验 用胰蛋白酶将细胞消化分散为单个细胞悬液,细胞计数后将其稀释至 1×10^8 cells/L, 每孔 200 μ L 细胞悬液(2×10^4 个细胞)接种于 96 孔板。24 h 后换含不同浓度 MPA 培养基,以不含 MPA 孔作对照,每个浓度设 4 个平行孔。每 24 h 换相应浓度新鲜培养基,4 d 后每孔加 20 μ L MTT 溶液(5 g/L),继续培养 4 h 后每孔加入 100 μ L DMSO 溶液,振荡溶解后,570 nm 处比色测定。按下式计算药物作用下的细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \text{药物处理孔 } A \text{ 值} \div \text{对照孔 } A \text{ 值} \times 100\%。$$

2.3 MPA 干预实验 MPA 粉剂用甲醇溶解,RPMI - 1640 培养基进一步稀释至贮存浓度 5 g/L。当细胞长至培养瓶 70% - 80% 时,消化细胞并稀释至 5×10^7 cells/L,分种于 24 孔培养板,每孔加细胞悬液 1 mL(5×10^4 个细胞)。24 h 后换含药新鲜培养基,其中 MPA 浓度分别为 0、1、2、5、10 及 20 mg/L,以不含 MPA 孔作对照,每个浓度设 4 个平行孔。每 24 h 换相应浓度新鲜培养基,收集第 4 d 上清液 -20 °C 保存,检测 HBsAg 和 HBeAg。

将细胞稀释至 5×10^8 cells/L,随后分种于 6 孔培养板,每孔加细胞悬液 2 mL(1×10^6 个细胞)。24 h 后换新鲜培养基,其中 MPA 浓度同 24 孔培养板,以不含 MPA 孔作对照。每 24 h 换相应浓度新鲜培养基,培养 4 d 后收集细胞,-80 °C 保存,统一提取 RNA 作 RT - PCR 分析 HBV core mRNA 表达,或提取 DNA 作狭缝印迹杂交定量分析 HBV DNA 复制

情况。

2.4 乙型肝炎病毒标志物测定 采用美国 Abbott 公司生产的抗原检测试剂盒检测 HBsAg 及 HBeAg。

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{实验孔 } A \text{ 值} - \text{对照孔 } A \text{ 值}) \div \text{阴性}$$

$$\text{对照孔 } A \text{ 值} \div (\text{对照孔 } A \text{ 值} \div \text{阴性对照孔 } A \text{ 值} - 2.1)。$$

2.5 HBV core mRNA 表达测定 按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,42 °C 逆转录 1 h 后,以 GAPDH 作为内对照,进行 PCR 法扩增。HBV core 引物(扩增产物 117 bp):上游:5' - ACTGTTCAAGCCTCCAAGC - 3', 下游:5' - AWGGRAAGAARTCAGAAGCC - 3', W = A/T, R = A/G。GAPDH 引物(扩增产物 431 bp):上游:5' - ATGCTGGCGCTGGTACGTC - 3', 下游:5' - AGGCCATGCCAGTGAGCTTC - 3'。引物由上海生物有限公司合成。PCR 反应条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 45 s,62 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 28 个循环。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,以 Kodak DNA Analysis 1.0 凝胶图像分析软件处理。

2.6 狭缝印迹杂交测定 HBV DNA 表达 收集各孔细胞,PBS 液漂洗,用 QIAGEN 试剂盒提取细胞 DNA,经核酸蛋白紫外分析仪检测,260/280 比值为 1.80 - 1.90。以所提取的 DNA 为模板,采用 PCR 法制备 HBV DNA 凝胶,并将 DNA 凝胶回收提纯。探针标记采用 DIG - High - Primer 随机引物标记法。狭缝印迹将 10 μ g DNA 转移至尼龙膜。尼龙膜与 DIG 标记的 HBV DNA 探针杂交、漂洗、发光底物 CSPD 液显影后,室温下 X 线曝光 10 min。X 线胶片吸光度扫描,计算各杂交条带的吸光度(A)值,并按以下公式计算 R 值:

$$R \text{ 值} = \text{药物干预时 HBV DNA 的 } A \text{ 值} \div \text{对照组 HBV DNA 的 } A \text{ 值} \times 100\%。$$

2.7 鸟嘌呤核苷逆转试验 细胞稀释至 5×10^7 cells/L 后分种于 24 孔培养板,每孔加细胞悬液 1 mL(5×10^4 个细胞)。24 h 后换新鲜培养基,其中 MPA 浓度同 MPA 干预实验,并在此基础上每孔加入 50 g/L 鸟苷 1 μ L,使培养基中鸟苷终浓度为 50 mg/L,以不含 MPA 孔作对照孔,每个浓度共设 3 个平行孔。第 4 d 收集上清液 -20 °C 保存,检测 HBsAg 和 HBeAg,方法同前 2.4。

细胞稀释至 5×10^8 cells/L 后分种于 6 孔培养板,每孔加细胞悬液 2 mL(1×10^6 个细胞)。24 h 后换新鲜培养基,最终每孔 MPA 及鸟苷浓度同上述 24 孔培养板设置,以不含 MPA 孔作对照孔。培养 4 d 后收集细胞,-80 °C 保存,统一提取 DNA 作狭缝印迹杂交,方法同前 2.6。

3 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异显

著性检验采用方差分析(SPSS11.0)。

结 果

1 MTT 结果

不同浓度 MPA 处理细胞 4 d 后细胞的存活率见图 1。从图 1 可见,MPA 浓度在 0 - 20 mg/L 范围时,细胞存活率未见明显抑制,为药物作用浓度安全范围。

2 不同浓度 MPA 对 2.2.15 细胞培养上清液 HBsAg 和 HBeAg 表达的影响

从表 1 可见,不同浓度的 MPA 处理 2.2.15 细胞 4 d 后,各 MPA 剂量组均显著抑制 HBsAg 的分泌 ($P < 0.05$),且随着 MPA 浓度的增加,对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率均逐渐升高。其中 1 mg/L MPA 组 HBsAg 分泌量高于其它各 MPA 组 ($P < 0.05$),20 mg/L MPA 组的 HBsAg 分泌量则低于其它各 MPA 组,但只与 1 mg/L MPA 组、5 mg/L MPA 组有显著差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与此相类似,各 MPA 剂量组(除 1 mg/L MPA 组外)对 HBeAg 亦具抑制作用 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 MPA 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率的影响
Tab 1 Effects of different concentrations of MPA on inhibitory ratios of HBsAg and HBeAg by ELISA (%. $\bar{x} \pm s, n = 4$)

Group	Inhibitory ratio of HBsAg	Inhibitory ratio of HBeAg
Control	-	-
1 mg/L MPA	30.49 ± 2.76 *	-12.85 ± 6.60
2 mg/L MPA	38.49 ± 1.71 *	27.00 ± 0.86 *
5 mg/L MPA	39.10 ± 1.90 *	34.50 ± 1.83 *
10 mg/L MPA	41.67 ± 0.77 *	35.18 ± 0.49 *
20 mg/L MPA	42.29 ± 0.94 *	36.49 ± 1.37 *

* $P < 0.05$ vs control group.

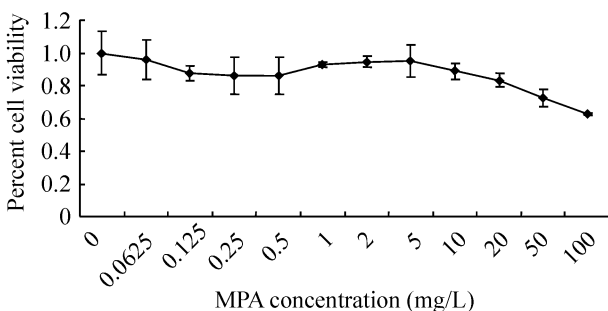


Fig 1 Effect of different concentrations of MPA on the viability of 2.2.15 cell.

图 1 不同浓度 MPA 对 2.2.15 细胞存活的影响

3 不同浓度 MPA 培养 4 d 后对 2.2.15 细胞 HBV core mRNA 的影响

从图 2 可见,不同浓度 MPA 处理 2.2.15 细胞

4 d 后,HBV core mRNA 的表达未表现出明显抑制。

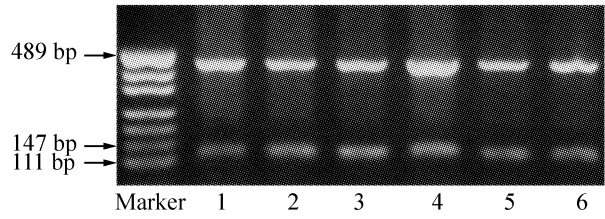


Fig 2 Effects of different concentrations of MPA on HBV core mRNA expression. 1: control; 2: 1 mg/L MPA; 3: 2 mg/L MPA; 4: 5 mg/L MPA; 5: 10 mg/L MPA; 6: 20 mg/L MPA.

图 2 不同浓度 MPA 对 HBV core mRNA 的影响

4 不同浓度 MPA 处理 2.2.15 细胞对 HBV DNA 的影响

从图 3 可见,不同浓度 MPA 处理 2.2.15 细胞 4 d 后,与对照组相比,各 MPA 药物组的 HBV DNA 表达均受到抑制,高浓度时尤为明显 ($P < 0.01$)。

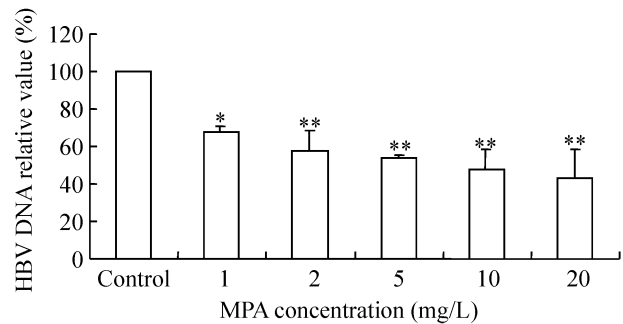


Fig 3 Effects of different concentrations of MPA on the relative value of HBV DNA. HepG2.2.15 cells were treated with no MPA (control) or different concentrations of MPA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $\bar{x} \pm s, n = 4$.

图 3 不同浓度 MPA 对 HBV DNA 相对表达量的影响

5 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBsAg 的影响

从图 4 可见,MPA 作用浓度为 1、2、5、10、20 mg/L 时,各组 HBsAg 的表达量均受到抑制 ($P < 0.05$)。外加鸟苷于各组后,HBsAg 的表达量均得到逆转 ($P < 0.01$)。

6 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBeAg 的影响

从图 5 可见,MPA 作用浓度为 1、2、5、10、20 mg/L 时,各组 HBeAg 的表达量均受到抑制 ($P < 0.05$)。外加鸟苷于各组后,各组 HBeAg 的表达量亦均得到逆转 ($P < 0.05$)。

7 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBV DNA 表达的影响

图 6a、6b 可见,MPA 作用浓度为 1、2、5、10、

20 mg/L 时,各组 HBV DNA 的表达量显著低于空白对照组 ($P < 0.01$),外加鸟苷于各组后,HBV DNA 的表达量不同程度得到提高 ($P < 0.01$)。

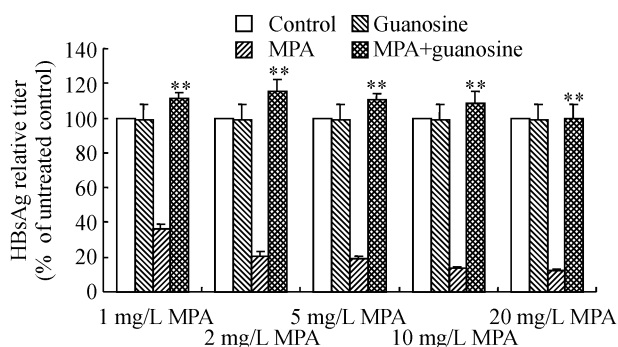


Fig 4 Effect of exogenous guanosine on HBsAg expression in the presence of different concentrations of MPA. HepG2. 2. 15 cells were maintained with either no MPA and no guanosine (control), 50 mg/L guanosine only, different concentrations of MPA only, or combination of different concentrations of MPA plus 50 mg/L guanosine. ** $P < 0.01$ vs MPA only group. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

图 4 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBsAg 的影响

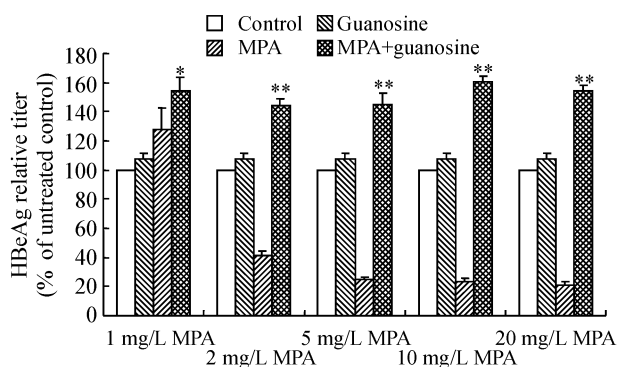


Fig 5 Effect of exogenous guanosine on HBeAg expression in the presence of different concentrations of MPA. HepG2. 2. 15 cells were treated with either no MPA and no guanosine (control), 50 mg/L guanosine, different concentration of MPA, or combinations of different concentrations of MPA plus 50 mg/L guanosine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MPA only group. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

图 5 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBeAg 的影响

讨 论

霉酚酸酯(MMF)是临床常用的免疫抑制剂,霉酚酸(MPA)是其代谢后在体内发挥作用的有效成分,而 2. 2. 15 细胞是目前应用最广泛的乙型肝炎细胞模型。本实验直接以 MPA 作用于 2. 2. 15 细胞株来观察其对 HBV 复制的影响,采用的 MPA 浓度均是临床应用中的常见浓度。从 MTT 实验看出,本实验采用的 MPA 浓度对细胞无明显的毒性作用。

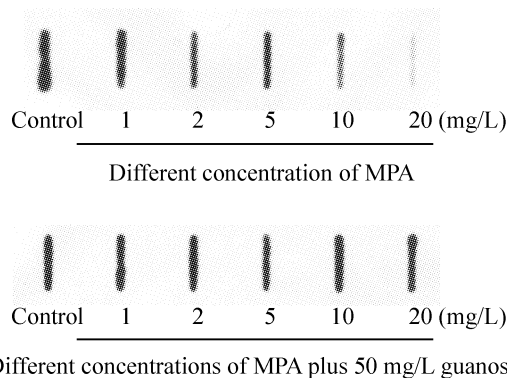


Fig 6a Expression of HBV DNA in the presence of different concentrations of MPA plus exogenous 50 mg/L guanosine or no guanosine by slot blot hybridization.

图 6a 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷前后 HBV DNA 表达的狭缝印迹杂交条带

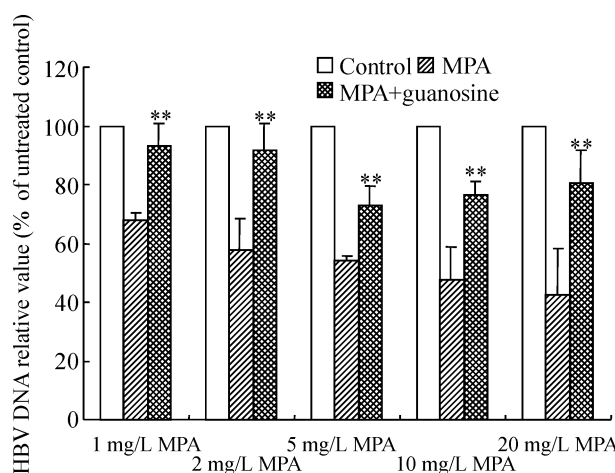


Fig 6b Expression of exogenous guanosine on HBV DNA expression in the presence of different concentrations of MPA. HepG2. 2. 15 cells were maintained with either no MPA and no guanosine (control), 50 mg/L guanosine only, different concentrations of MPA only, or combination of different concentrations of MPA plus 50 mg/L guanosine. ** $P < 0.01$ vs MPA only group. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

图 6b 不同浓度 MPA 存在情况下外加鸟苷对 HBV DNA 表达的影响

ELISA 结果发现 MPA 能抑制 2. 2. 15 细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的分泌,其抑制率随着剂量增大而提高。狭缝印记杂交分析也发现 MPA 对 HBV DNA 表达的抑制。以上结果均表明在 2. 2. 15 细胞中 MPA 具有抑制 HBV 复制的作用。曾有文献报道在人类肝细胞培养中观察到类似现象,但在 2. 2. 15 细胞中未得到证实^[5],本实验是对 MPA 在体外抑制 HBV 复制的一大补充和进一步证实。

文献资料显示,作为一种广谱的抗病毒药物,MPA 能干预许多病毒的复制,包括 DNA 病毒(如巨细胞病毒,单纯疱疹病毒 I 型)、RNA 病毒(黄热病

毒,禽呼孤肠病毒)^[6-8]和人类免疫缺陷病毒(HIV)^[9]。其作用机制主要涉及到MPA对次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH)的抑制作用。IMPDH是嘌呤核苷酸合成的限速酶,在鸟苷酸(GMP)的生物合成中起到了重要作用^[10]。IMPDH抑制剂作用于IMPDH来影响次黄苷酸(IMP)向黄苷酸(XMP)的转变,逐而影响鸟苷酸、鸟苷二磷酸(GDP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、鸟苷三磷酸(GTP)及脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)的合成,而dGTP和GTP恰恰分别对DNA及RNA的合成至关重要^[11]。因此,从这种意义上说,抑制了鸟苷酸的合成必然导致细胞DNA及RNA合成的减少。作为一种非竞争性、可逆性的IMPDH抑制剂,MPA正是通过抑制细胞内鸟苷酸合成,逐而导致DNA和RNA合成的减少。本实验发现,外加鸟苷后,MPA对HBV复制的抑制作用被逆转(图4、图5、图6b),其机制在于外加的鸟苷通过核苷酸合成的补救通路部分甚至完全抵消MPA对鸟苷酸的抑制,进而逆转了MPA对HBV复制的抑制。这进一步证实MPA在体外对HBV复制的抑制作用是通过抑制细胞内鸟苷酸的合成来实现的。

本研究证实MPA在2.2.15细胞中对HBV复制具有抑制作用。结合以往相关研究,我们认为本实验具有以下临床意义:(1)目前肝移植术后的免疫抑制方案中基本采用MMF替代硫唑嘌呤,这不仅有利于降低移植后排斥反应的发生率^[12],减轻对骨髓和肝脏的毒性作用^[13],以及有效治疗慢性移植抗宿主病^[14],而且可减少或延迟HBV相关终末期肝病患者肝移植后的HBV再感染;(2)移植术后常给予核苷类似物(如更昔洛韦等)用作抗病毒治疗,MMF与其联用可能对包括HBV在内的其它病毒发挥协同抗病毒作用。此外,大胆推想其它IMPDH抑制剂也可能具有相似的作用,这可能为预防HBV再感染药物的筛选提供了思路。

[参 考 文 献]

- [1] Wu J, Zheng SS. Liver transplantation in China: problems and their solutions [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(2): 170-174.
- [2] Karliova M, Malago M, Trippler M, et al. Seroconversion in patients with acute hepatitis B reinfection after liver transplantation with a combined treatment of lamivudine and hepatitis B immune globulin [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(8): 3319-3322.
- [3] Roche B, Samuel D. Liver transplantation for hepatitis B virus-related liver disease: Indications, prevention of recurrence and results [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(suppl 1): S181-S189.
- [4] Liaw YF. Hepatitis viruses under immunosuppressive agents [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998, 13(1): 14-20.
- [5] Gong ZJ, De Meyer S, Clarysse C, et al. Mycophenolic acid, an immunosuppressive agent, inhibits HBV replication *in vitro* [J]. *J Viral Hepat*, 1999, 6(3): 229-236.
- [6] Markland W, McQuaid TJ, Jain J, et al. Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4): 859-866.
- [7] Diamond MS, Zachariah M, Harris E. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA [J]. *Virology*, 2002, 304(2): 211-221.
- [8] Robertson CM, Hermann LL, Coombs KM. Mycophenolic acid inhibits avian reovirus replication [J]. *Antiviral res*, 2004, 64(1): 55-61.
- [9] Hossain MM, Coull JJ, Drusano GL, et al. Dose proportional inhibition of HIV-1 replication by mycophenolic acid and synergistic inhibition in combination with abacavir, didanosine, and tenofovir [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1): 41-52.
- [10] Sintchak MD, Nimmesgern E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3): 163-184.
- [11] Allison AC, Eugui EM. Mycophenolic mofetil and its mechanisms of action [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3): 85-118.
- [12] Wiesner R, Rabkin J, Klintmalm G, et al. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients [J]. *Liver Transpl*, 2001, 7(5): 442-450.
- [13] Filomena C, Emmanuel M, Yvon C. Immunosuppressive therapy in liver transplantation [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(5): 664-678.
- [14] 陈纯, 方建培, 段连宁, 等. CD158分子表达在他克莫司、霉酚酸酯联合甲基强的松龙治疗顽固性慢性移植抗宿主病中的追踪观察 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(2): 285-288.