

网络出版时间: 2019-3-26 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.008.html>

红景天苷对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 复制的影响及机制研究

叶雨笙¹ 朱紫衣¹ 刘晨霞^{1, 2} 常 凯² 江忠勇² 熊 杰^{1, 2}

摘要 目的 探讨红景天苷(Sal)对 HepG2. 2. 15 细胞的乙型肝炎病毒 DNA (HBV DNA)、HBV 前基因组 RNA (pgRNA) 的影响以及其可能的作用机制。方法 使用 0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Sal 处理 HepG2. 2. 15 细胞, 分别使用 CCK8、流式细胞仪、实时定量 PCR 检测细胞活性、细胞周期和凋亡、上清液 HBV DNA、细胞内 pgRNA 以及相关调控基因沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (PGC-1 α)、AMP 依赖蛋白激酶 α 2 (AMPK α 2)、P38 蛋白激酶 (P38MAPK) 和 Forkhead 转录因子 1 (FOXO1) mRNA 表达水平; 分析 pgRNA 和各基因的相关性。结果 Sal 对 HepG2. 2. 15 的细胞活性、细胞凋亡率、细胞周期没有较大影响; 50、100 $\mu\text{mol/L}$ Sal 处理细胞 6 d 后, 细胞上清液中的 HBV DNA 较对照组明显增加 ($F = 42.337$, $P = 0.006$); pgRNA 的变化趋势与 SIRT1 mRNA 变化趋势的相关性明显 ($r = 0.891$)。pgRNA 变化趋势与其它基因 PGC-1 α 、AMPK α 2、P38MAPK、FOXO1 的 mRNA 变化趋势相关性系数 r 分别为 0.553、0.135、-0.943、-0.809。结论

Sal 可以通过影响 SIRT1 途径促进 HBV 的复制, 慢性乙型肝炎患者和 HBV 携带者使用 Sal 时应关注乙肝病毒复制情况。

关键词 红景天苷; HepG2. 2. 15; 乙肝病毒; SIRT1

中图分类号 R 373.2⁺1; R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0539-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.008

慢性乙型肝炎一直是威胁世界人民特别是中国民众生命健康的一种慢性疾病, 可能带来肝功能异常、肝硬化甚至肝癌等多种并发症, 慢性乙型肝炎的患者或者乙肝携带者在中国人口中所占比例很大, 而乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染就是这种疾病的“元凶”^[1]。在临床实践中, 一些药物的使用, 例如地塞米松等激素或者顺铂、阿霉素等细胞

毒药物, 可能导致乙肝患者或者携带者体内病毒激活, 病毒由阴转阳或者病毒载量增高^[2], 这显然对患者的治疗是不利的, 应该尽量避免。红景天苷 (salidroside, Sal) 是传统的草本植物红景天的提取物, 其具有抗疲劳、抗氧化、抗衰老等保护作用, 并对多种病毒的复制具有影响^[3]。该文通过研究 HBV 的经典细胞系 HepG2. 2. 15, 针对 Sal 是否具有抗 HBV 或者促进 HBV 复制的作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系 HepG2. 2. 15 购自美国 ATCC 公司。

1.2 试剂及设备 无水乙醇购自成都市科龙化工试剂厂; Sal 购自北京索莱宝公司, 纯度 $\geq 98\%$; 胎牛血清购自澳大利亚 cellmax 公司; 青链霉素、DMEM 培养基、PBS 购自美国 Gibco 公司; G418 购自德国 BioFroxx 公司, 纯度 $\geq 98\%$; HBV 核酸检测试剂盒购自广州中山达安公司; 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司; CCK8 试剂、TransZol Up Plus RNA Kit RNA、TransScript Green One-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒购自北京 Transgen 公司; 酶标自动分析仪 (型号: MK3) 购自芬兰康艺仪器公司; 细胞培养箱 (型号: BC-J80-S) 购自上海博迅公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: CFX 96) 购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HepG2. 2. 15 培养条件为含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、380 $\mu\text{g/ml}$ G418 的 DMEM 培养基, 细胞培养箱的湿度为 36%, CO_2 浓度为 5%, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 CCK8 法检测 Sal 对细胞活性的影响 将 HepG2. 2. 15 的单细胞悬液按照 10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每个药物浓度设置 4 个复孔, 培养基为 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM。24 h 后细胞完全贴壁, 更换为含药培养基, 药物浓度分别为 0 (对照组)、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 每组溶剂乙醇的浓度一致。待加药时间 48、72 h 后, 将培养液更换为含 10 μl CCK8, 总体积为 110 μl 的 DMEM 培养基, 细

2018-12-03 接收

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究计划项目 (编号: 2013JY0173)

作者单位: ¹ 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000

² 西部战区总医院检验科, 成都 610083

作者简介: 叶雨笙, 女, 硕士研究生;

熊 杰, 女, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: byx410@163.com

胞培养箱中继续培养 40 min 左右,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。Sal 对 HepG2. 2. 15 的抑制率(%) = [(对照组 OD 值 - 调零孔 OD 值) - (用药组 OD 值 - 调零孔 OD 值)] / (对照组 OD 值 - 调零孔 OD 值) × 100%。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡 将 HepG2. 2. 15 的单细胞悬液均匀接种于 25 cm² 细胞培养瓶,接种密度为 1 × 10⁵ 个/瓶,每瓶使用的培养基为 5 ml。24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,药物浓度分别为 0(对照组)、10、50 μmol/L,每组溶剂乙醇的浓度一致,2 d 后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,其中一部分细胞使用 AnnexinV-FITC 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡,另一部分细胞用 70% 的冰乙醇固定 24 h,PI 染色后流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.4 上清液 HBV DNA 定量检测 将 HepG2. 2. 15 的单细胞悬液均匀接种于 25 cm² 细胞培养瓶,接种密度为 1 × 10⁵ 个/瓶,24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,药物浓度分别为 0(对照组)、50、100 μmol/L,每组溶剂乙醇的浓度一致,用药 3 d 后换一次药,药物总共作用 6 d 后收集上清液,3 000 r/min 离心 5 min 后吸出上清液(重复 2 次),收集的上清液立即使用 HBV 核酸检测试剂盒检测上清液 HBV DNA。

1.3.5 提取 RNA,RT-PCR 检测 HBV 前基因组 RNA (pregenomic RNA pgRNA) 以及相关调控基因的 mRNA 表达水平 将 HepG2. 2. 15 单细胞悬液均匀接种于 6 孔板,接种浓度为 1 × 10⁵ 个/孔。24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,Sal 浓度分别为 50、100 μmol/L,其溶剂乙醇的浓度分别为 0.75% 和 1.5%,设置溶剂乙醇浓度为 0.75% 和 1.5% 的对照组(对照组 1 和对照组 2)。药物作用 24 h 后使用 TransZol Up Plus RNA Kit 提取 RNA,用 TransScript Green One-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 并采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 HBV pgRNA 和其它相关调控基因的 mRNA 表达水平,引物序列见表 1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间数据两两比较采用两独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 直线相关进行分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sal 对 HepG2. 2. 15 细胞活性的影响 CCK8

实验结果表明:50 μmol/L 浓度的 Sal 作用于 HepG2. 2. 15 细胞 48、72 h 后,对细胞活性的影响不明显,100 μmol/L 的 Sal 对 HepG2. 2. 15 细胞活性的抑制率约为 20%。见图 1。

表 1 引物序列

名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT R: GAAGGCTGGGGCTCATTT
HBV pgRNA	F: CTCAATCTCGGGAATCTCAATGT R: TGGATA AAACCTAGCAGGCATAAT
SIRT1	F: CAAAGGAGCAGATTAGTAGGCG R: CTCTGGCATGTCCCACTATCAC
PGC-1α	F: TCAGTCTCTACTGCTGGACA R: TGCTTCGTCGTCAAAAACAG
AMPKα2	F: AGCATGGACGGGTTGAAGAG R: GTGGCGACAGAACGATTGAG
P38MAPK	F: TATGGCTCTGTGTGTCTGCTCT R: CATCATCTGTGTGCCGAGCCA
FOXO1	F: CCCTAATTCGGTCATGTCAAC R: GCATGGTGCTTACCGTGTG

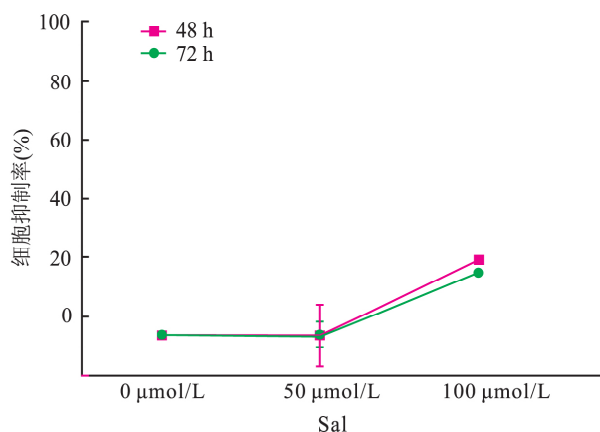


图 1 Sal 对细胞活性的抑制

2.2 Sal 对细胞凋亡以及细胞周期的影响 10、50 μmol/L 的 Sal 作用于 HepG2. 2. 15 细胞 48 h,细胞凋亡率分别为 1.0%、1.1%,与对照组 0 μmol/L 的 1.4% 差异不大;与对照组 0 μmol/L 比较,10、50 μmol/L Sal 对 HepG2. 2. 15 细胞周期分布的影响不明显。见表 2、图 2。

表 2 Sal 对细胞凋亡以及细胞周期的影响(%)

药物浓度 (μmol/L)	凋亡细胞	G0G1 期 细胞	G2M 期 细胞	S 期细胞
Sal 0	1.4	12.24	16.95	70.81
Sal 10	1.0	8.50	17.45	74.05
Sal 50	1.1	9.53	18.04	72.42

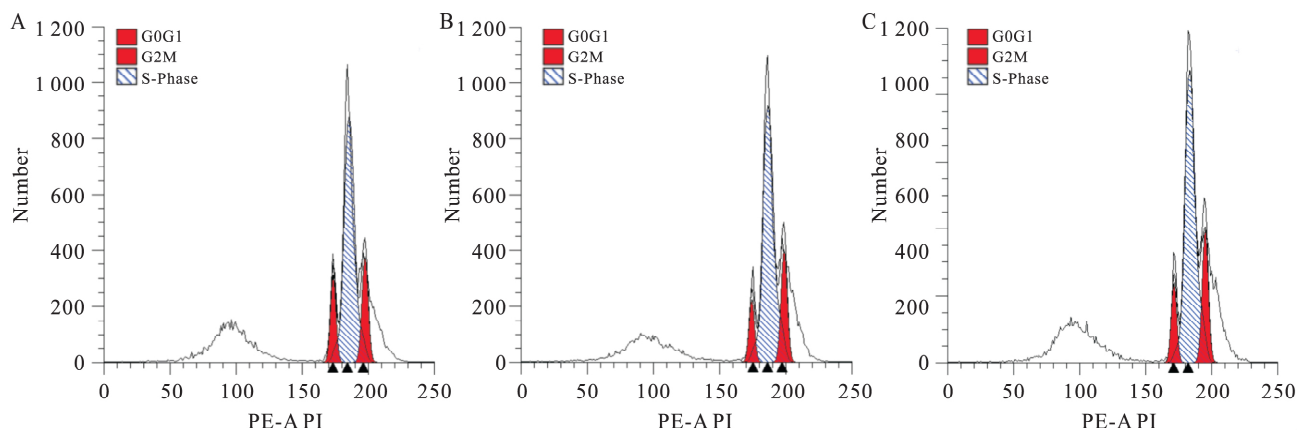


图2 Sal 对细胞周期的影响

A: Sal 0 $\mu\text{mol/L}$; B: Sal 10 $\mu\text{mol/L}$; C: Sal 50 $\mu\text{mol/L}$

2.3 Sal 对 HepG2. 2. 15 细胞上清中 HBV DNA 定量的影响 用 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Sal 处理 HepG2. 2. 15 细胞 6 d 后, 细胞培养上清液中的 HBV DNA 分别是 $(7.020 \pm 0.132) \times 10^4$ IU/ml、 $(6.102 \pm 0.327) \times 10^4$ IU/ml, 和对照组 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 $(4.801 \pm 0.227) \times 10^4$ IU/ml 相比, 差异有统计学意义 ($F=42.337$, $P=0.006$)。见图 3。

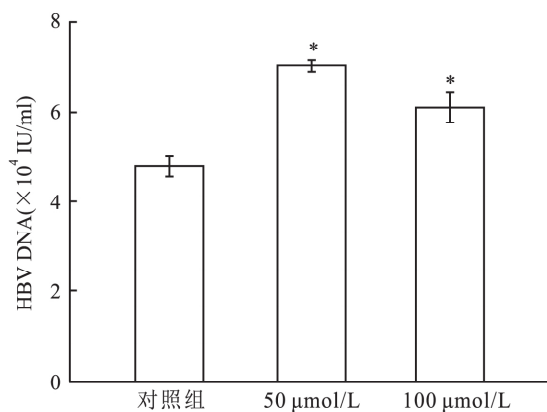


图3 Sal 对上清液 HBV DNA 的影响

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 Sal 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV pgRNA 和相关调控基因的 mRNA 表达水平的影响 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法计算用药 24 h 后 RNA 的表达量(表 3)。为研究在不同浓度 Sal 处理时 HBV pgRNA 的变化趋势与各调控基因 mRNA 变化趋势的相关性, 使用相邻两浓度 HBV pgRNA 的差值以及 mRNA 的差值进行相关性分析, HBV pgRNA 变化趋势与沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (sirtuin 1, SIRT1) mRNA 的相关系数 $r = 0.891$; HBV pgRNA 与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1 α) mRNA 变化趋势的相关系数 $r = 0.553$; HBV pgRNA 与 AMP 依赖蛋白激酶 $\alpha 2$ (adenosine monophosphate-activated protein kinase $\alpha 2$, AMPK $\alpha 2$) mRNA 变化趋势的相关系数 $r = 0.135$; HBV pgRNA 与 P38 蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK) mRNA 变化趋势的相关系数 $r = -0.943$; HBV pgRNA 与 Forkhead 转录因子 1 (forkhead box protein O1, FOXO1) mRNA 变化趋势的相关系数 $r = -0.809$ 。见图 4。

3 讨论

肝细胞是 HBV 的宿主, 为 HBV 的复制提供了场所和物质基础^[4], 影响肝脏内环境的药物包括临

表3 HBV pgRNA 以及各调控基因的 mRNA 表达量 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 1	50 $\mu\text{mol/L}$	P 值	对照组 2	100 $\mu\text{mol/L}$	P 值
HBV pgRNA	1.285 ± 0.402	1.434 ± 0.028	0.653	0.879 ± 0.171	0.643 ± 0.141	0.271
SIRT1	0.858 ± 0.200	1.190 ± 0.058	0.153	0.861 ± 0.197	0.531 ± 0.044	0.147
PGC1 α	2.241 ± 0.414	1.680 ± 0.156	0.696	0.861 ± 0.197	0.471 ± 0.134	0.147
AMPK $\alpha 2$	1.290 ± 0.410	1.152 ± 0.124	0.693	1.000 ± 0.000	0.707 ± 0.248	0.237
P38MAPK	1.040 ± 0.056	0.624 ± 0.018	0.01	0.980 ± 0.029	0.755 ± 0.081	0.066
FOXO1	1.296 ± 0.418	0.925 ± 0.136	0.355	1.074 ± 0.105	0.673 ± 0.205	0.133

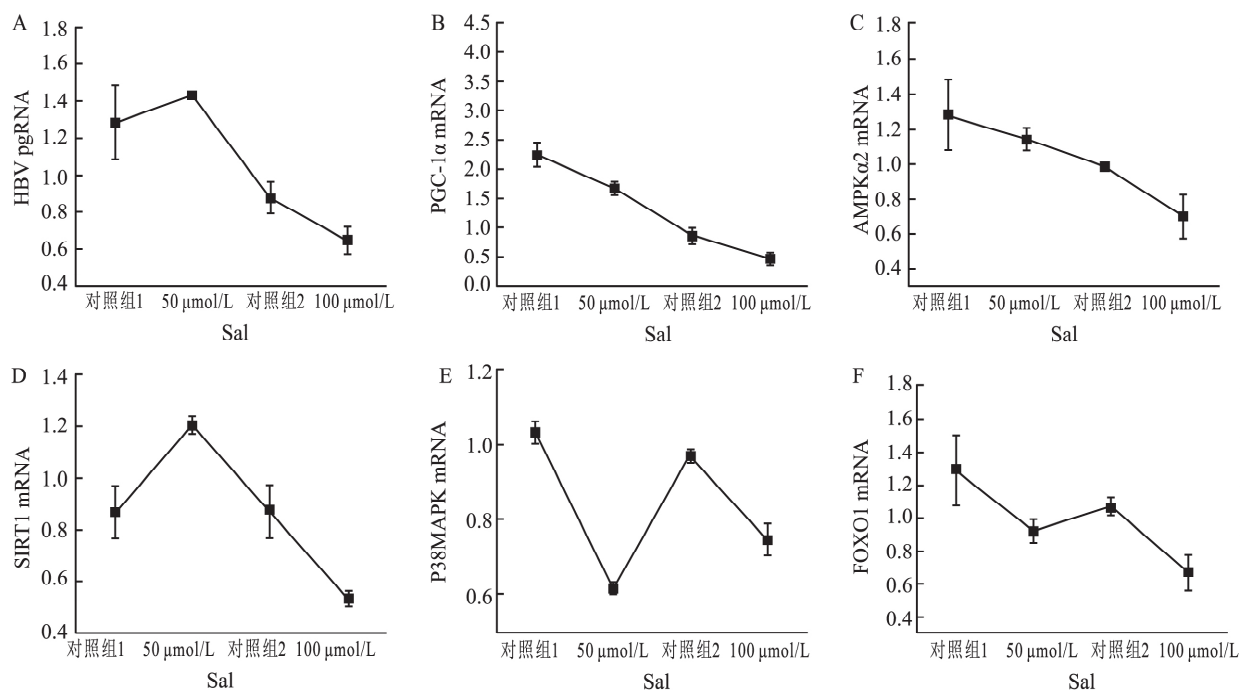


图4 Sal 对 HBV pgRNA 以及各调控基因 mRNA 的影响

A: HBV pgRNA; B: PGC1α; C: AMPKα2; D: SIRT1; E: P38MAPK; F: FOXO1

床常用的治疗其他疾病的药物可能对 HBV 的复制产生影响。越来越多的药理研究^[5-6]表明 Sal 这种来自传统药用植物的提取物具有保护组织器官、抗氧化、抗疲劳等多种作用,且早已在中医中药领域广泛应用。本实验显示,所选浓度的 Sal 与对照组相比对 HepG2. 2. 15 细胞活性没有明显的影响,但细胞上清液分泌的 HBV DNA 却表现出明显的增加,证明 Sal 可以促进 HBV 的复制。对于我国广大慢性乙型肝炎患者或者携带者来说,在使用含 Sal 中药或中成药时应警惕病毒再活化继而加剧慢性乙型肝炎的病情,并应关注病毒定量和肝功能。已有研究^[3]证明 Sal 具有抗多种肿瘤的作用,若 Sal 直接应用于抗肝肿瘤的治疗时,慢性乙肝患者或者携带者,特别是乙肝引起的肝癌患者,也应警惕其引起的 HBV 的激活,必要时需要联合使用抗病毒药物。

HBV 是一种嗜肝病毒,其通过与肝细胞表面特异性受体结合后进入肝细胞,被转运入细胞核后以共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 的形式存在。cccDNA 是病毒复制的模板,肝细胞富含的各种调控因子调控 cccDNA 转录成 pgRNA、precore RNA、X mRNA、preS1 RNA 和 preS2 RNA,其中以 pgRNA 为模板逆转成 DNA,开启一个新的病毒生命周期,由此可见 pgRNA 是 HBV 复制过程中的重要环节,反映了 HBV 的复制情况^[4]。

HBV 的转录与复制受肝细胞内多种调控因子影响,包括直接与 cccDNA 结合的转录因子以及上游通路的调控因子。既往研究表明,SIRT1 可以通过增加转录因子激活子蛋白-1 或过氧化物酶体增殖物激活受体 α 的活性来促进 HBV 的转录^[7];抑制 P38 MAPK 会抑制 HBV 的转录和复制^[8];Shlomai et al^[9]研究证明细胞内 PGC-1α 增加都以剂量依赖性方式促进 HBV 的转录,在肝细胞中 PGC-1α 是核受体的转录共激活因子,与各种核受体相互作用并共同激活;PGC-1α 促进 HBV 转录的机制之一便是与直接结合在 HBV 基因组上的 FOXO1 共同活化,促进 HBV 的转录^[10];AMPK 可以通过促进细胞自噬降解来抑制 HBV 的复制^[11]。为探索 Sal 影响 HBV 复制的相关机制,本实验选择上述有研究^[7-11]证明与 HBV 的转录或者复制相关的调控因子,检测其在 HepG2. 2. 15 细胞中 mRNA 的表达水平,并分析其与 HBV pgRNA 的关系。本研究显示,在不同浓度 Sal 作用下,HBV pgRNA 的变化趋势与 SIRT1 mRNA 变化趋势的相关性最高 ($r = 0.891$),而与其它 4 种基因 (PGC-1α、AMPKα2、P38MAPK、FOXO1) mRNA 的变化趋势的相关性较低,相关系数 r 分别为 0.553、0.135、-0.943、-0.809,因此 Sal 更大可能是通过影响 SIRT1 通路来影响 HBV 的复制。

综上所述,Sal 可能通过 SIRT1 途径增强 HBV

的复制,期待后续在更多种类细胞例如原代肝细胞或者在动物实验水平开展进一步的研究。

参考文献

- [1] Tang C M, Yau T O, Yu J. Management of chronic hepatitis B infection: current treatment guidelines, challenges, and new developments[J]. *World J Gastroenterol* 2014, 20(20): 6262–78.
- [2] Moulé Rectman M, Burdelova E O, Bar-Yishay I, et al. The metabolic regulator PGC-1 α links anti-cancer cytotoxic chemotherapy to reactivation of hepatitis B virus[J]. *J Viral Hepat* 2013, 20(1): 34–41.
- [3] 韩雪娇, 郭娜, 朱美宣, 等. Sal 药理作用及其作用机理研究进展[J]. *中国生化药物杂志* 2015, 35(1): 171–5.
- [4] Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B [J]. *Gut* 2015, 64(12): 1972–84.
- [5] 李浩, 赵凤春, 袁贤达, 等. 大血藤药材和饮片中的酚类和皂苷类成分的含量[J]. *中国中药杂志* 2015, 40(10): 1865–71.
- [6] 於娜. 复方保心片的制备工艺及质量标准研究[D]. 青岛: 青岛科技大学 2013.
- [7] Ren J H, Tao Y, Zhang Z Z, et al. Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1 [J]. *J Virol* 2014, 88(5): 2442–51.
- [8] Chang W W, Su I J, Chang W T, et al. Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: the antiviral role of nitric oxide [J]. *J Viral Hepat* 2008, 15(7): 490–7.
- [9] Shlomai A, Paran N, Shaul Y. PGC-1 α controls hepatitis B virus through nutritional signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(43): 16003–8.
- [10] Shlomai A, Shaul Y. The metabolic activator FOXO1 binds hepatitis B virus DNA and activates its transcription [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 381(4): 544–8.
- [11] Xie N, Yuan K, Zhou L, et al. PRKAA/AMPK restricts HBV replication through promotion of autophagic degradation [J]. *Autophagy* 2016, 12(9): 1507–20.

Effect of salidroside on HBV DNA replication of HepG2. 2. 15 cells and its mechanism

Ye Yusheng¹, Zhu Ziyi¹, Liu Chenxia^{1, 2}, et al

(¹*School of Clinical Medicine, Southwestern Medical University, Luzhou 646000;*

²*Dept of Clinical Laboratory, The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083*)

Abstract Objective To explore the effects of salidroside (Sal) on hepatitis B virus DNA (HBV DNA) and HBV pregenomic RNA (pgRNA) of HepG2. 2. 15 cells and its possible mechanism. **Methods** HepG2. 2. 15 cells was treated with salidroside at 0, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Cell activity, cell cycle and apoptosis, HBV DNA in supernatant, pgRNA and the mRNA expression levels of related regulatory genes sirtuin 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α), adenosine monophosphate-activated protein kinase α 2 (AMPK α 2), p38 mitogen-activated protein kinase (P38MAPK) and forkhead box protein O1 (FOXO1) were detected by CCK8, flow cytometry and real-time quantitative PCR, respectively. The correlations between pgRNA and these genes was analyzed. **Results** The cell activity, apoptosis rate and cell cycle of HepG2. 2. 15 were not significantly affected by salidroside and with 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ salidroside for 6 days, the HBV DNA in the supernatant was significantly higher than that in the control group ($F=42.337$, $P=0.006$). The correlation between the change trend of pgRNA and the change trend of SIRT1 mRNA was significant ($r=0.891$). The correlation coefficient r of the change trend of pgRNA and other genes PGC-1 α , AMPK α 2, P38MAPK, FOXO1 mRNA were 0.553, 0.135, -0.943 and -0.809, respectively. **Conclusion** Sal can promote the replication of HBV by affecting the SIRT1 pathway. In patients with chronic hepatitis B and hepatitis B virus carriers, attention should be paid to the replication of hepatitis B virus when salidroside is used.

Key words salidroside; HepG2. 2. 15; hepatitis B virus; SIRT1