

2.2.15 细胞株筛选抗乙型肝炎病毒药物的体外实验研究进展

陈宝敏¹ 傅希贤²

乙型肝炎病毒 (HBV) 是导致急性、慢性肝炎、肝硬化、肝癌的主要病因, 据报道, 全球 HBV 感染大约 3 亿多人, 慢性肝炎发展为原发性肝癌的相对危险性高于 200 倍^[1]。每年由于肝癌致死的人数竟达 100 万之多^[2]。我国是乙型肝炎高发区, 但由于乙型肝炎病毒狭窄的宿主范围和缺少体外病毒繁殖系统, 妨碍了抗 HBV 药物的研究, HBV 体外培养系统的建立无疑为我们力图寻找真正有效的抗 HBV 药物提供了重要的实验手段。

八十年代后期, 寻找抗 HBV 药物兴起热潮, 多种乙肝病毒脱氧核糖核酸 (HBV DNA) 转染细胞株的建立应运而生, 由于 HBV 感染典型的嗜肝性, 很多学者首先考虑转染的靶细胞为各种分化和未分化的肝癌细胞株, 此外非肝源性的细胞类型亦已用来作为转染的靶细胞, 有些已获成功。Sureau 等^[3]用电转染法将 HBV DNA 及抗新霉素质粒导入人肝癌细胞株 HepG2 并筛选出能表达 HBV 全部病毒标志的细胞株。Yaginuma 等^[4]应用 DNA-磷酸钙共沉淀技术, 将 HBV DNA 导入到人肝癌细胞株 Huh-7, 得到了能持续复制 Dane 颗粒并短暂表达结构蛋白的细胞株。Tsurimoto 等^[5]也以同样方法将重组的 HBV DNA 导入肝癌细胞株 HuH₇-c15, 建立了能长期稳定表达 HBV 的 HB_{8.11} 细胞株。Hayashi 等^[6]再次用同样方法将重组的 HBV DNA 导入人肝癌细胞株 HepG2, 建立了 HB₁₀₇ 细胞株, 该株亦能长期稳定表达 HBV。Sells 等^[7]用共转染法将克隆的 HBV DNA 及抗 G418 质粒转入人肝癌细胞株 HepG2, 建立了 2.2.15 细胞株, 该细胞株能长期稳定地向培养上清液中分泌 HBsAg、HBeAg 和完整的 Dane 颗粒, 而且还能产生大量的病毒复制中间体, 是体外抗 HBV 药物筛选很好的细胞模型。应用该系统, 已对普通的抗 HBV 药物如病毒唑、逆转录酶抑制剂 DDA、抗超螺旋 HBV DNA 的萘啶酸、干扰 HBV DNA 的氯喹以及干扰素等进行了体外抗 HBV 的研究。闻玉梅^[8]用中国人克隆的 adr 型双体乙型肝炎病毒转染人肝癌细胞株 HepG2, 成功表达 HBsAg、HBeAg, 并在上清液中用电

镜检出类似乙肝病毒颗粒, 说明有病毒复制。各种细胞株的建立对于我们进一步了解 HBV 生物学特性, 探讨治疗药物和疗效机理等提供了理想的实验工具, 本文就近 10 年在这方面的中西药筛选情况做一综述。

1 利用体外细胞培养筛选抗 HBV 中草药 临床上已有不少用中草药治疗乙型肝炎的观察, 但尚缺乏实验研究依据。唐红等^[9]利用 2.2.15 这一细胞模型对 8 种中草药注射液的抗 HBV 活性进行了观察, 提示板蓝根和银黄 (银花、黄芩) 注射液在达到一定药物浓度时有一定的体外抗 HBV 活性, 两药治疗指数 (TI) 分别为 6.43 和 11.43, 板蓝根和黄芩的抗 HBV 作用机理和有效成分尚不清楚, 有研究提示板蓝根所含的靛甙可能具抗病毒活性, 而黄芩的作用机理与其具有抗逆转录酶活性有关^[10]。米抒等^[11]也用 2.2.15 细胞株对 43 种药物的抗 HBV 活性进行评价, 结果提示抗肝 I 号、抗肝 II 号、复方黄芪浸膏片水提取物、复方仙茅浸膏片水提取物、518B I-甲-6 (广豆根提取物) 为有效低毒药物 (TI>2)。抗肝 I 号、抗肝 II 号均为中药制剂, 它们的抗 HBV 作用机理尚在研究之中, 北京医科大学肝病研究所体外实验也证实它们能抑制 HBV DNA 多聚酶, 复方黄芪和复方仙茅浸膏片水提取物两种药已被河南中医院用于临床, 认为疗效较好, 518B I-甲-6 能有效抑制 HBsAg、HBeAg。范涛等^[12]利用上述模型对 4 种中草药的抗 HBV 作用进行了研究, 结果表明: 乾坤宁、双黄连注射液、复方仙茅浸膏水提取液、复方黄芪浸膏水提取液均为有效低毒药物, TI 均大于 2, 但复方黄芪浸膏水提取液对 HBV DNA 无明显抑制作用, 推测可能是作用于病毒的转录、翻译和蛋白合成等环节或直接与病毒蛋白结合而致 HBsAg、HBeAg 滴度下降。杨新科等^[13]应用 3 种细胞株 (包括 2.2.15 细胞株) 测定天花粉蛋白对包括乙肝病毒在内的 7 种病毒的抑制活性, 指出天花粉蛋白对乙肝病毒有明显的抑制作用, 机理不清, 作者认为天花粉蛋白可能是继干扰素以后另一种具有广谱抗病毒作用的蛋白。彭齐荣等^[14]观察纯草药方肝毒清对 2.2.15 细胞株分泌的 HBsAg、HBeAg 的影响, 结果显示有显著的抑制作用, 提示肝毒清在体外有一定的抗 HBV 活性, 抗病毒机理不详。

1. 北京地坛医院 (北京 100011); 2. 北京医科大学第一附属医院

2 利用体外细胞培养筛选抗 HBV 西药及探讨可能的疗效机理

2.1 通过抑制 HBV DNA 复制发挥抗 HBV 作用药物。

2.1.1 喹诺酮类药物 范涛等⁽¹⁶⁾利用 2. 2. 15 细胞株综合评价了喹诺酮类药物吡哌酸、氟哌酸、环丙氟哌酸、氟嗪酸体外抗 HBV 效果,提示该 4 种药物在表现对 HBsAg、HBeAg 的表达抑制的同时,亦能不同程度地抑制培养上清液及细胞内 HBV DNA 及其复制中间体的产生,尤其对超螺旋结构有不同程度的抑制作用,提示作用环节主要在 HBV DNA 水平,而不是 mRNA 翻译水平。

2.1.2 2', 3'-双脱氧 3'-硫胺胞苷、5-氟-2', 3'-双脱氧-3'-硫胺胞苷 (Sddc, 5-FSddc) Doong 等⁽¹⁶⁾利用 2. 2. 15 细胞研究认为 Sddc 和 5-FSddc 在所检验的药物中为最有潜力的抗 HBV 药物,提示作用的靶向是 HBV DNA 合成,但作用是可逆的,机理尚在探讨中。Sddc 的立体异构体分为顺式和反式异构体 ($\pm$ Sddc); Chang 等⁽¹⁷⁾用 2. 2. 15 研究证实 (—) 式 Sddc 磷酸化产物 (—) Sddc CTP 对病毒 DNAP 的作用较 (+) -Sddc CTP 强 3 倍以上,推测 Sddc 的活性构型为 (—) 式异构体。

2.1.3 2', 3'-双脱氧胸苷 (FddThd)、2', 3'-双脱氧-5-甲基胸苷 (FddMecyt) Matthes 等⁽¹⁸⁾用 2. 2. 15 细胞比较 Fddthd 和 FddMecyt 等 14 个合成类似物,指出该两种药是很有希望的抗 HBV 药物,作用可逆,在此研究中发现它们的三磷酸盐形式起抗 DNAP 作用, FddMecyt 抗 HBV 较 FddThd 明显。

2.2 通过抑制 HBV DNA 转录发挥抗 HBV 作用药物 干扰素 (IFN), 分为 3 种类型 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ , 而 IFN- α 已广泛应用于临床治疗病毒性肝炎。Ueda 等⁽¹⁹⁾用 HB₆₁₁ 细胞株进行 IFN 抗 HBV 作用评价指出: IFN- α 、IFN- β 能抑制 HBV DNA 合成且呈剂量-效应关系, IFN- β 较 IFN- α 更有效, IFN- γ 无效, 并发现应用 IFN 可导致 2', 5'-寡腺苷酸合成酶增加, 因而抑制了 HBV DNA 复制。Hayashi 等⁽⁶⁾用 HB₁₀₇ 细胞株研究发现 3 种 IFN 均能抑制 HBV DNA 复制。机理可能与阻断了引导核心颗粒装配的前基因组 RNA 某个环节有关。Lampertico 等⁽²⁰⁾用 2. 2. 15 细胞报道了当 IFN 剂量在 10^4 IU/ml 浓度时使细胞外 HBV DNA 减少 45%, 但同时它也出现了 20% 细胞毒性, 与 Ara-Amp 联合应用无协同作用。

2.3 其他 (1) 阿糖腺苷 (Ara-a)、阿糖腺苷单磷酸盐 (Ara-Amp)。该药已多年用于临床治疗慢性乙

肝, 临床验证发现用此药的患者组中约有三分之一表现兼有有效和细胞毒反应。Lampertico 等⁽²⁰⁾用 2. 2. 15 细胞研究 Ara-A、Ara-Amp 抗 HBV 作用, 指出二药虽有一定的抗 HBV 活性, 但即使在相对低的浓度下亦出现细胞毒性, 故使其在临床应用受到限制。(2) 9-(2-磷酸甲氧乙基)-2, 6-二氨基嘌呤 (PMEDAP)、9-(2-磷酸甲氧丙基)-2, 6-二氨基嘌呤 (PMPDAP)、9-(2-磷酸甲氧乙基)-腺嘌呤 (PMEA) (R), -磷酸甲氧丙基腺嘌呤 [(R)-PMPA]、(S)-3-羟基-2-磷酸甲氧丙基-腺嘌呤 [(S)-HPMPA (S)-9-]。Yokota 等⁽²¹⁾用 HB₆₁₁ 细胞研究发现 PMEDAP、PMEA、(S)-HPMPA 是抗 HBV 有效药物。Heijtkink 等⁽²²⁾用 2. 2. 15 细胞研究证实 (R)-PMPDAP 和 (R)-PMPA 最有效, 机理不清。(3) Block TM 等⁽²³⁾用 2. 2. 15 细胞株研究亚胺基丁基脱氧野尻霉素 (Imino Sugar N-butyl-deoxynok-jirimycin, NBDNJ), 抗 HBV 作用指出: 寡聚糖修饰作用的抑制因子可用于抗病毒治疗。

综上所述, 转染细胞株为我们体外大量筛选抗 HBV 药物提供了很好的细胞模型。目前国外筛选药物主要为核苷类的合成药物, 其作用机理又多为抑制 DNAP, 未能抑制超螺旋 DNA (SC DNA), 而 SC DNA 持续存在是抗病毒停药后反跳的主要原因, 故应寻找其他更为有效的药物。我国传统中草药品种繁多, 已广泛应用于临床治疗慢性乙型肝炎并取得一定疗效, 积累了一定的临床经验, 故筛选中草药抗 HBV 这方面的工作尚有很大的潜力。喹诺酮类药物体外显示有一定的抑制 SC DNA 作用, 期待将来对这类药物进行结构改造使之成为高效低毒的抗 HBV 药物。虽然体外筛选药物距离药物应用于临床还有很长的一段时间, 尚需动物、人体实验, 但已建立的各种抗 HBV 药物筛选方法为全面准确评价药物抗 HBV 效果及指导临床用药等方面提供了科学依据。

参 考 文 献

1. Price PM, Banerjee R, Jeffrey AM, et al. The mechanism of inhibition of Hepatitis B virus replication by the carbocyclic analog of 2'-deoxyguanosine. *Hepatology* 1992; 16 (1): 8-12.
2. Shizuko AS, O'Brien MC, Ford H, et al. In vitro inhibition of B hepatitis B virus replication by 2', 3'-dideoxyguanosine and 3'-azido-2', 3'-dideoxyinosine in 2. 2. 15 (PR) cell. *J Infectious Diseases* 1991; 164: 843-851.
3. Sureau C, Romet-Lomenne JL, Mullins JI, et al. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 1986; 47: 37-47.

4. Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, et al. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 2678—2682.
5. Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K. Stable expression and replication of hepatitis virus genome in an integrated state in human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 444—448.
6. Hayashi Y, Koike K. Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA. *J Virology* 1989; 63 (7): 2936—2940.
7. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 1005—1009.
8. 闻玉梅, 何丽芳, 楼惠珍, 等. 克隆乙型肝炎病毒 DNA 在 HepG2 细胞中的表达. *中华医学杂志* 1989; 69 (5): 260—263.
9. 唐红, 赵连三, 王锦蓉, 等. 利用体外细胞培养系统筛选抗 HBV 活性中草药的初步研究. *中华传染病杂志* 1992; 10 (4): 215—218.
10. 颜凯新, 高成, 王长洪, 等. 中药抗病毒研究的现代进展. *辽宁中医杂志* 1990; 7 (3): 47.
11. 米抒, 傅希贤, 张国庆. 用 2, 2, 15 细胞株筛选抗乙型肝炎病毒药物的研究. *中华医学杂志* 1992; 72 (10): 612—615.
12. 范涛, 傅希贤, 张国庆, 等. 中草药抗乙型肝炎病毒活性及其作用机理体外实验研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 1996; 10 (1): 27—31.
13. 杨新科, 陈章良, 段淑敏, 等. 天花粉蛋白在组织培养细胞抗病毒作用的研究. *病毒学报* 1990; 6 (3): 217—223.
14. 彭齐荣, 李灼亮, 徐荫国, 等. 肝毒清对 HBV 转染细胞表达功能的抑制. *中西医结合肝病杂志* 1995; 5 (2): 20—22.
15. 范涛, 傅希贤, 张国庆, 等. 噻诺酮类药物抗乙型肝炎病毒体外实验研究. *中国病毒学* 1994; 9 (2): 113—118.
16. Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, et al. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 8495—8499.
17. Chang CN, Doong SL, Zhou JH, et al. Deoxycytidine deaminaseresistant stereoisomer is the active form of (±)-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine in the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Biological chemistry* 1992; 267 (20): 13938—13942.
18. Matthes E, Von-Janta-Lipinski-M, Will H, et al. Inhibition of hepatitis B virus production by modified 2', 3'-dideoxy-thymidine and 2', 3'-dideoxy-5-methylcytidine derivatives. In vitro and in vivo study. *Biochem-pharmacol* 1992; 43 (7): 1571—1577.
19. Ueda K, Tsurimoto T, Nagahata T, et al. An in vitro system for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology* 1989; 169: 213—216.
20. Lampertico P, Malter JS, Gerber MA. Development and application of an in vitro model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics. *Hepatology* 1991; 13 (3): 422—426.
21. Yokota T, Mochizuki S, Konno K, et al. Inhibition effects of selected antiviral compounds on human hepatitis B virus DNA synthesis. *Antimicro agents and chemother* 1991; 35 (2): 394—397.
22. Heijntink RA, Kruining J, de Wilde GA, et al. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonates on human hepatitis B virus and duck hepatitis B virus infections in tissue culture. *Antimicro agents and chemother* 1994; 38 (9): 2180—2182.
23. Block TM, Lu XY, Platt FM, et al. Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butylidexynojirimycin. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 2235—2239.

(收稿: 1996—09—01 修回: 1996—12—11)

国际会议信息

为进一步推动中西医学的有机结合, 加强国际间学术交流, 促进中华医学更纵深地走向世界, 使中西医各自的优势能真正互补, 以提高对多个病种的整体治疗水平, 由美国全美东方医学研究院〔简称 OMIA, ADD: 701 W. Valley Blvd., #222, Alhambra CA 91803, U. S. A. Tel: (818) 281-8640, 系美国政府立案注册之纯学术机构, 政府批准号为 95-1966700〕主办的第一届国际中西医学结合大会和第三届美国东方医学学术研讨会分别定于 1997 年 9 月 1 日~9 月 8 日和 1997 年 11 月 28 日~12 月 5 日在美国洛杉矶举行。

凡欲与会者, 可去电去函向 OMIA 驻中国上海代办处索取详细资料, 了解具体事宜, 咨询相关问题。地址: 上海市永年路 234 弄 1 号 105 室 邮编: 200025, 电话传真: 021-63260224, 联系人: 杨慧芬。