

灰树花多糖抑制乙型肝炎病毒活性的研究

赵 霏^{1,2,3}, 宋 雷¹, 郭培燕¹, 马艳庆¹, 杨克虎^{*2,3}

(1. 西北民族大学 医学院,甘肃 兰州 730030;2. 兰州大学 循证医学中心,甘肃 兰州 730000;3. 甘肃省循证医学与临床转化重点实验室,甘肃 兰州 730000)

摘要:用水提取法从新鲜灰树花子实体中提取灰树花多糖(Maitake Polysaccharide, MP),分别以不同质量浓度 MP 作用于 HepG2.2.15 细胞,MTT 法测定细胞生长抑制率,计算半数细胞毒性浓度(CC₅₀)。另以不同质量浓度的 MP 和 0.1 mg/mL 拉米夫定处理 HepG2.2.15 细胞,采用酶联免疫法(ELISA 法)检测分别处理 3、6、9 d 的细胞培养上清液中乙肝表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)滴度,用荧光定量 PCR 法检测处理 9 d 后的细胞培养上清液中 HBV DNA 拷贝数,分别计算对 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的抑制率和半数抑制质量浓度(IC₅₀)及治疗指数(TI₅₀)。结果表明,MP 对 HepG2.2.15 细胞的 CC₅₀ 为 5.154 mg/mL。对 HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 的抑制率呈剂量依赖性,给药 9 d 后的 IC₅₀ 分别是 4.814、0.806、0.621 mg/mL。TI₅₀ 分别为 HBsAg 1.071, HBeAg 6.398 和 HBV DNA 8.306。因此 MP 具有低毒特点并对体外培养的 HBV 复制和表达具有较明显的抑制作用。

关键词:灰树花多糖;乙型肝炎病毒;HepG2.2.15 细胞;抑制率;治疗指数

中图分类号:R 285 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2017)06—0667—05

Study on Inhibit Activity by Maitake Polysaccharide to HBV Virus

ZHAO Fei^{1,2,3}, SONG Lei¹, GUO Peiyan¹, MA Yanqing¹, YANG Kehu^{*2,3}

(1. School of Medicine, Northwest University of Nationality, Lanzhou, 730030, China; 2. Evidence Based Medicine Center, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China; 3. Key Laboratory of Evidence Based Medicine and Knowledge Translation of Gansu Province, Lanzhou, 730000, China)

Abstract: To investigate influence of Maitake Polysaccharide(MP) on expression and replication of HBV in HepG2.2.15 cell. MP from fresh Maitake fruiting bodies was extracted by water. The cell growth inhibition rate of HepG2.2.15 cells was detected by MTT assay in 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL concentration respectively and the half cell toxicity concentration(CC₅₀) was calculated. HepG2.2.15 cells were treated by MP with different concentration or 0.1 mg/mL lamivudine, and the Hepatitis B surface antigen and e antigen (HBsAg and HBeAg) in cell supernatant were evaluated by

收稿日期: 2015-04-15

基金项目: 西北民族大学中央高校基本业务费专项资金项目(31920140070);西北民族大学教学科研启动项目(xbmuyjrc 201120);兰州市科技发展计划项目(2016-3-37)。

作者简介: 赵 霏(1981—),女,山东烟台人,医学博士,讲师,主要从事中医药循证医学、中药提取及实验疗效方面的研究。

E-mail: runforever710@126.com

* 通信作者: 杨克虎(1957—),男,甘肃临泽人,医学硕士,教授,博士研究生导师,从事中医药循证医学研究。

E-mail: kehuyangebm2006@126.com

引用本文: 赵霏,宋雷,郭培燕,等. 灰树花多糖抑制乙型肝炎病毒活性的研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(06):667-671.

enzyme-linked immunoassay assay (ELISA), HBV DNA contents after cells were treated 9 days were detected using quantitative PCR method. Then each inhibition rate, the half inhibition concentration (IC_{50}) and the therapeutic index (TI_{50}) were calculated respectively based on the data. The CC_{50} of MP treated to HepG2.2.15 cells is 5.154 mg/mL. The inhibition rate of MP in HBsAg, HBeAg and of HBV DNA are dose dependent and the IC_{50} are 4.814, 0.806, 0.621 mg/mL, TI_{50} are 1.071, 6.398 and 8.306 respectively. MP has strong inhibitory effect on HBV replication and expression in vitro.

Keywords: maitake polysaccharide (MP), hepatitis B virus, HepG2.2.15 cell, inhibition rate, therapeutic index

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是导致急慢性肝炎、肝硬化及肝癌的主要病因。世界卫生组织报道全世界范围内有 20 亿患者感染乙肝病毒, 其中超过 350 万为慢性乙肝患者^[1]。目前临床上抗 HBV 的药物主要为干扰素和核苷类药物, 这两类药物在 HBV 感染的治疗上均取得了较好的疗效, 但干扰素免疫治疗在治疗效应上存在适应证范围窄、不良反应多等局限性^[2]。而核苷类似物虽然在消除血清中 HBV 方面显示出很高的效应, 但停药后 HBV 突变体仍旧存在, 易反复感染, 长期使用易产生耐药性和出现肾毒性、骨髓抑制等不良反应^[3]。灰树花 (*Grifola frondosa*, Maitake) 是一种药食同源的担子菌类植物, 俗称舞茸等从其子实体中提取出的灰树花多聚糖 (Maitake Polysaccharide, MP) 可以刺激增强机体中的巨噬细胞、树突细胞的免疫调节功能, 因而可作为肿瘤和 HIV 感染的辅助治疗药物^[4-5]。另有研究显示, MP 可直接抑制 HIV 病毒复制^[6]。此外, 从灰树花中分离的物质可以抑制烟草花叶病毒^[7], 提示其可能具有广谱抗病毒作用, 但 MP 对 HBV 病毒影响的研究鲜有报道。作者以体外培养 HBV 转染细胞 HepG2.2.15 模型来研究 MP 对 HBV 的潜在抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养条件 人肝癌细胞株 HepG2.2.15 稳定转染 HBV DNA 头尾二聚体, 能长期向培养液上清液中分泌 HBV 表面抗原和 e 抗原 (HBsAg 和 HBeAg), 此为 HBV 药物筛选的常规细胞模型。该细胞购置于上海美轩生物公司, 由作者所在实验室自行传代培养, 为获得稳定转染, 培养

基中加入 380 mg/L 的新霉素类似物 G418 (美国 Invitrogen 公司) 进行筛选。细胞用含 10% 胎牛血清 (杭州四季青产品) 的 DMEM 培养基 (Sigma 公司) 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 培养基中添加有 100 U/mL 的青霉素 G 和 100 mg/L 的链霉素。

1.1.2 试剂及仪器 拉米夫定 (lamivudine, 3TC): 阳性对照药物, 葛兰素-史克制药苏州有限公司; 胰蛋白酶和 MTT: 美国 Amersco 公司; HBV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒: 深圳匹基生物工程股份有限公司; HBsAg 及 HBeAg ELISA 诊断试剂盒: 上海科华生物技术有限公司; DNA 提取试剂盒: 美国 Omega 公司; Hfsafe-1200 生物安全柜和水套式二氧化碳培养箱 (HF160 W): 香港力康公司; 酶标仪 (168-1000XC) 和荧光 PCR 检测仪: 美国 BIO RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 灰树花多糖 (MP) 样品的制备与测定 参照 Kodama 报道的方法^[8], 将 500 g 灰树花新鲜子实体粉末溶于 5 000 mL 的 90 °C 热水中, 放置 12 h 后高速离心 15 min, 上清液中加入无水乙醇至终质量浓度为 80%, 4 °C 放置 12 h 后高速离心 0.5 h, 去除沉淀中的酸性物质后, 在上清液中加入氢氧化钠再次离心, 收集上清液中碱性物质经透析去除其中低相对分子质量物质, 干燥后即得灰树花多糖 (Maitake Polysaccharide, MP) 样品。取 5 mg 样品溶于 80% 乙醇中, 超声溶解除去单糖、低聚糖等杂质, 加入 5% 苯酚溶液和浓硫酸后用紫外分光光度法测定其中多糖纯度。

1.2.2 MTT 法检测 MP 和 3TC 对 HepG2.2.15 细胞毒性 取对数生长期的 HepG2.2.15 细胞接种于 96

孔板,每孔接种 5×10^4 个细胞,细胞悬液体积为 200 μL ,置二氧化碳培养箱 24 h 贴壁后,以 2% 血清浓度配制的含有不同质量浓度灰树花多糖(MP)(4、2、1、0.5、0.25 mg/mL) 和阳性对照药物 3TC (0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL) 的培养基置换原培养基,同时设置空白细胞阴性对照组,每个质量浓度设 3 个复孔。培养第 5 天重复加药一次,培养 9 d 后每孔加入 MTT 溶液(0.5 mg/mL)20 μL ,继续孵育 4 h,弃上清液,每孔加 150 μL DMSO,水平摇床充分振荡至完全溶解,用酶标仪测定 570 nm 处 OD 值,此实验重复 3 次后,计算对细胞生长的抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = 1 - \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值}}$$

并计算半数细胞毒性浓度(50%, CC_{50})。

1.2.3 ELISA 检测 HepG2.2.15 细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 表达 取 HepG2.2.15 细胞接种于 24 孔板,每孔接种 2×10^5 个细胞,加 1 mL 细胞培养液,常规培养 24 h 后,用含 2% 血清的培养基分别配制 MP (2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL) 和 3TC (0.1 mg/mL) 培养液置换原培养基,同时设置空白细胞阴性对照组,每个质量浓度设 3 个复孔。培养 3 d 和 6 d 时再以新鲜配置的 MP 和 3TC 培养基换液,同时收集培养 3、6、9 d 的原细胞培养液上清液置于 -80°C 冰箱保存备用。按 HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒说明操作,用酶标仪检测上述收集得到培养液上清液在 450 nm 时的 OD 值,此实验重复 3 次后,用前述公式计算 MP 和 3TC 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率及用药 9 d 的 MP 半数抑制浓度(50%, IC_{50})。

1.2.4 荧光定量 PCR 法检测 HepG2.2.15 细胞培养上清液中 HBV DNA 含量 用 DNA 提取试剂盒提取不同质量浓度 MP 和 3TC (0.1 mg/mL) 处理第 9 天各组细胞上清液及空白细胞对照组中的 DNA,然后按照 HBV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒的说明进行操作,反应条件为: 94°C 预变性 1 min, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火,延伸 20 s,共反应 35 个循环。依据结果计算 MP 和 3TC 处理对 HBV DNA 的抑制率和 MP 处理 9 d 后的 IC_{50} 。

1.2.5 统计学分析及药效学评价 所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),均数间采用 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。采用线性回归法计算 CC_{50} 、 IC_{50} ,

依照公式 $\text{TI}_{50} = \text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$ 计算治疗指数(therapeutic index, TI)。并根据计算结果判断, $\text{TI}_{50} < 1$ 表示受试样品无效, $1 \leq \text{TI}_{50} \leq 2$ 为低效有毒, $2 < \text{TI}_{50} < 10$ 为有效低毒, $\text{TI}_{50} \geq 10$ 为高效低毒^[9]。

2 结果与讨论

2.1 灰树花多糖样品中灰树花多糖纯度测定

按前述方法共获得灰树花水提取物样品 1.25 g,经紫外分光光度法检测,提取物中 MP 纯度达到 90% 以上。

2.2 细胞增殖抑制实验

MP 和 3TC 作用于 HepG2.2.15 细胞 9 d 后,对细胞的增殖抑制均呈剂量依赖性,见表 1。MP 质量浓度为 4 mg/mL 时,细胞抑制率为 36.65%,而阳性对照 3TC 质量浓度为 0.4 mg/mL 时,抑制率为 47.64%,二者与空白细胞对照组相比均有统计学意义($P < 0.05$)。对于 HepG2.2.15 细胞,灰树花多糖的 CC_{50} 为 (5.154 ± 0.143) mg/mL, 3TC 的 CC_{50} 为 (0.426 ± 0.106) mg/mL,两者之间差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 灰树花多糖及拉米夫定处理 9 d 后对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Influence of MP and lamivudine on cell proliferation of HepG2.2.15 after 9 days treatment ($n=9, \bar{x} \pm s, \%$)

药物	质量浓度/(mg/mL)	抑制率/%	CC_{50} /(mg/mL)
MP	0	8.012 ± 0.131	$5.154 \pm 0.143^{**}$
	4	$36.647 \pm 0.558^{**}$	
	2	$25.717 \pm 0.578^*$	
	1	$18.417 \pm 0.262^{**}$	
	0.5	10.670 ± 0.039	
	0.25	4.800 ± 0.331	
3TC	0	5.028 ± 0.167	0.426 ± 0.106
	0.4	$47.641 \pm 0.130^{**}$	
	0.2	$33.432 \pm 0.130^*$	
	0.1	$23.942 \pm 0.592^*$	
	0.05	$13.871 \pm 0.884^*$	
	0.025	6.236 ± 0.075	

注: * 与空白对照组相比, $P < 0.05$; ** 与空白对照组相比, $P < 0.01$; **MP 与 3TC 处理间差异用 T-test 表明具有显著性, $P < 0.05$; CC_{50} : 半数细胞毒性浓度; MP: 灰树花多糖; 3TC: 拉米夫定。

2.3 灰树花多糖对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响

MP 对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg

抑制率均呈剂量和时间依赖性,见表2-3。MP对HBsAg分泌抑制作用不明显,最大质量浓度2 mg/mL作用9 d后,对HBsAg分泌抑制率仅为(20.74±0.153)%,低于阳性对照药物3TC的(56.85±0.231)%。而MP对HBeAg分泌抑制作用明显,最大质量浓度2 mg/mL作用6 d后,HBeAg抑制率为(70.31±0.134)%,超过阳性对照3TC的(56.17±0.201)%;9 d后MP对HBeAg抑制率高达(91.29±0.107)%,超过3TC的(77.43±0.254)%,且T检验MP处理组和3TC处理组的抑制率差异均有统计学意义($P<0.05$)。MP对HBsAg抑制9 d的 IC_{50} 为(4.814±0.129) mg/mL,对HBeAg抑制9 d的 IC_{50} 为(0.806±0.030) mg/mL。

表2 灰树花多糖及拉米夫定对HepG2.2.15细胞分泌HBsAg的影响($n=9, x\pm s, \%$)

Table 2 Influence of MP and lamivudine on the expression of HBsAg in HepG2.2.15 cells($n=9, x\pm s, \%$)

药物	质量浓度/(mg/mL)	抑制率/%		
		3 d	6 d	9 d
3TC	0.1	29.763±0.630*	47.737±0.388*	56.853±0.399*
MP	0	0±0.098	0±0.134	0±0.192
	0.125	0.490±0.027*	1.703±0.06	1.537±0.342
	0.25	1.100±0.103	1.770±0.025*	4.413±0.408
	0.5	1.863±0.019**	4.223±0.042**	7.460±0.054*
	1	2.987±0.192*	-7.787±0.098	11.960±0.189
	2	5.180±0.077**	12.373±0.135*	20.743±0.153**

注:*与空白对照组相比 $P<0.05$; **与空白对照组相比 $P<0.01$; MP:灰树花多糖; 3TC:拉米夫定。

表3 灰树花多糖和拉米夫定对HepG2.2.15细胞分泌HBeAg的影响($n=9, x\pm s, \%$)

Table 3 Influence of MP and lamivudine on the expression of HBeAg in HepG2.2.15 cells($n=9, x\pm s, \%$)

药物	质量浓度/(mg/mL)	抑制率/%		
		3 d	6 d	9 d
3TC	0.1	44.013±0.471*	56.167±0.349**	77.427±0.440*
MP	0	0±0.017	0±0.023	0±0.009
	0.125	2.523±0.039	2.187±0.090	8.110±0.023**
	0.25	5.540±0.065	4.673±0.051	29.340±0.122*
	0.5	11.303±0.053**	30.967±0.106*	42.207±0.201*
	1	21.133±0.068*	32.063±0.102*	63.113±0.133**
	2	26.327±0.090*	70.310±0.134*	91.293±0.107

注:*与空白对照组相比 $P<0.05$; **与空白对照组相比 $P<$

0.01; MP:灰树花多糖; 3TC:拉米夫定。

2.4 灰树花多糖对HepG2.2.15细胞培养上清液中HBV DNA合成抑制率

给药9 d后,0.1 mg/mL 3TC对HepG2.2.15细胞HBV DNA的合成抑制率为92.13%。而MP对HBV DNA的合成抑制率呈剂量依赖性,见图1。2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL MP对HepG2.2.15细胞HBV DNA的合成抑制率分别为(89.477±0.352)%、(81.930±0.017)%、(55.743±0.147)%、(36.610±0.040)%和(19.237±0.037)%,与空白对照组相比差异均有统计学意义($P<0.5$), IC_{50} 为(0.626±0.032) mg/mL。MP对HBV DNA的合成抑制作用有剂量依赖性,所用的最大质量浓度2 mg/mL达到了与0.1 mg/mL 3TC近似的抑制水平。

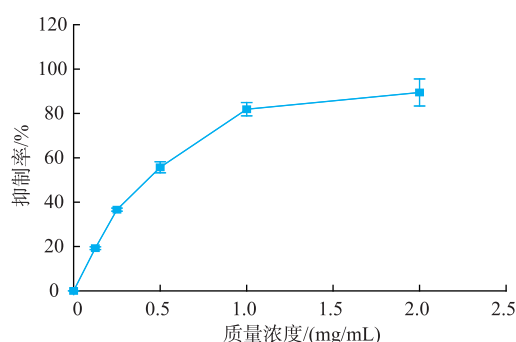


图1 灰树花多糖处理9 d后对HepG2.2.15细胞合成HBV DNA的抑制率($n=9, x\pm s, \%$)

Fig. 1 Inhibition of MP on HBV DNA synthesis of HepG2.2.15 after 9 days treatment($n=9, x\pm s, \%$)

2.5 治疗指数

给药9 d后,灰树花多糖对HepG2.2.15分泌HBsAg、HBeAg及合成HBV DNA的 TI_{50} 分别为1.071、6.398和8.305。根据前述对TI值判断结果提示,灰树花多糖在抑制HepG2.2.15细胞分泌HBsAg方面呈现低效有毒效应,但在抑制HBeAg及合成HBV DNA方面具有有效低毒作用。

3 结语

国内外研究结果一致认为,HBV持续感染是诱发肝炎、肝硬化乃至肝癌的最重要因素。因而探寻可以有效阻断HBV感染或是抑制HBV复制的药物显得至关重要。HepG2.2.15是用共转染法将重组的HBV DNA全基因组和抗G418质粒转染人肝癌细胞株HepG2所建立的细胞株,能转录并翻译

HBV 基因,并能长期稳定地向培养上清液中分泌 HBsAg、HBeAg 和完整的 Dane 颗粒。因其可表达 HBV 的全部标志,是当前体外筛选抗 HBV 药物和药物评价较好的细胞模型,被广泛用于抗 HBV 药物的体外研究^[9]。中医学认为“乙型肝炎”应归属于“黄疸”、“胁痛”、“郁证”、“臌胀”、“积聚”、“虚劳”等范畴。1995 年 1 月,在中医内科疾病名称标准化方案工作会议上提出将病毒性肝炎的中医病名定为“肝瘟”,认为“肝瘟”是指湿热疫毒侵袭肝脏所致的一种传染性疾病。湿热疫毒内侵,邪伏血分,以致正气亏损、气血失调是慢性乙型肝炎的基本致病机理。目前对从灰树花子实体中提取多糖成分的研究日益增多,其中医疗效为益气健脾、补虚扶正。有研究证实诱导肿瘤细胞凋亡、增强机体免疫、抗 HIV 病毒方面均有明显的作用^[10-11],也有报道显示

其联合干扰素具有明显的抑制 HBV 的作用^[8],但其单独对 HBV 影响的研究未见报道。作者以 HepG2.2.15 细胞为模型,研究灰树花多糖对 HBV 复制和表达的影响。结果显示,体外实验中灰树花多糖对 HepG2.2.15 细胞增殖影响较小,而对 HBeAg 的分泌和 HBV DNA 的复制有较强的抑制作用,2 mg/mL 处理细胞 6 d 后对 HBeAg 的分泌抑制率即超过阳性对照药物拉米夫定,而此质量浓度作用细胞 9 d 后,对 HBV DNA 抑制效应也与拉米夫定相近。MP 对 HBeAg 分泌和 HBV DNA 合成的治疗指数均大于 2,但对 HBsAg 分泌的抑制作用不显著,治疗指数接近 1。以上结果提示灰树花多糖可作为一种有效低毒的抗 HBV 药物,为其作为治疗 HBV 感染辅助治疗进一步的动物体内实验和临床应用提供实验基础。

参考文献:

- [1] TREPO C, CHAN H L, LOK A. Hepatitis B virus infection[J]. **Lancet**, 2014, 384(9959): 2053-2063.
- [2] AZIZ S, RAJPER J, NOOR-UL-AIN W, et al. Interferon-alpha treatment of children and young adults with chronic hepatitis delta virus(HDV) infection[J]. **Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan**, 2011, 1(12): 735-740.
- [3] ZE E, BAEK E K, LEE J J, et al. Long-term outcomes of two rescue therapies in lamivudine-refractory patients with chronic hepatitis B; combined lamivudine and adefovir, and 1-mg entecavir [J]. **Clinical and Molecular Hepatology**, 2014, 20(3): 267-73.
- [4] HISHIDA I, NANBA H, KURODA H. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa*(maitake)[J]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 1988, 36(5): 1819-1827.
- [5] VETVICKA V, VETVICKOVA J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts[J]. **Annals of Translational Medicine**, 2014, 2(2): 14.
- [6] KODAMA N, MURATA Y, ASAKAWA A, et al. Maitake D-fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice[J]. **Nutrition**, 2005, 21(5): 624-629.
- [7] CHEN N, WU Z J, LIN QY, et al. Purification and partial characterization of a protein inhibitor of tobacco mosaic virus infection from Maitake(*Grifola frondosa*)[J]. **Progress in Inorganic Biochemistry and Biophysics**, 2004, 31: 283-286.
- [8] GU C Q, LI J, CHAO F H. Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: synergistic effect of combination with interferon-alpha in HepG2 2.2.15[J]. **Antiviral Research**, 2006, 72(2): 162-165.
- [9] SELLS M A, CHEN M L, ACS G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1987, 84(4): 1005-1009.
- [10] MA X, ZHOU F, CHEN Y, et al. A polysaccharide from *Grifola frondosa* relieves insulin resistance of HepG2 cell by Akt-GSK-3 pathway[J]. **Glycoconjugate Journal**, 2014, 31(5): 355-363.
- [11] ULBRICHT C, WEISSNER W, BASCH E, et al. Maitake mushroom(*Grifola frondosa*): systematic review by the natural standard research collaboration[J]. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, 2009, 7(2): 66-72.