维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0618－04

阿的福韦在鸭乙型肝炎模型及 2.2.15 细胞中抗乙型肝炎病毒的药效研究

陈压西，黄爱龙，郭 晖，齐珍元

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察阿的福韦体内抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用及体外抗乙型肝炎病毒(HBV)效果。方法:采用鸭乙型肝炎动物模型,用阿的福韦口服治疗 10 天,检测用药前后血清中的 DHBV DNA、DHBsAg,并取肝脏样本提取总 DNA,作 Southern Blot 分析。此外,以 2.2.15 细胞为靶细胞,给药后通过检测细胞培养液中 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 观察阿的福韦抗 HBV 效果。结果:阿的福韦各剂量组用药后均能使血清中的 DHBV DNA 显著降低或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但停药后有 DHBV DNA 回升现象;用药前后 DHBsAg 无明显改变。肝组织 Southern Blot 分析亦显示用药后肝脏中 DHBV DNA 有明显降低,停药后 DHBV DNA 反跳明显。大剂量阿的福韦加入细胞培养 12 天,对 HBsAg 抑制率为 17.01%,对 HBeAg 抑制率为 26.80%,对 HBV DNA 抑制率为 26.92%。结论:阿的福韦在鸭体内有抗鸭乙型肝炎病毒的作用,但停药后 DHBV DNA 有"反跳"现象;体外实验无明显抗 HBV 病毒作用。

【关键词】阿的福韦;鸭乙型肝炎病毒;动物模型;2.2.15 细胞

【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－12－30

Therapeutic effect of adefovir anti－duck hepatitis B virus in vivo and anti－HBV activity in vitro (2.2.15 cells)

CHEN Yaxi, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the therapeutic effect of the purine nucleoside analog adefovir against duck hepatitis virus (DHBV) in vivo and anti－HBV activity in vitro. *Methods*: The Chongqing duck hepatitis B animal model was treated with adefovir by intragastric administration once a day for 10 days. DHBV DNA in serum and liver were monitored by serum dot－blot hybridization and Southern blot. DHBsAg in serum was detected simultaneously by ELISA. The anti－HBV activity of adefovir was observed in 2.2.15 cells (human hepatocellular carcinoma cells stably transfected with HBV). *Results*: Adefovir could significantly reduce DHBV DNA level. After stopping the treatment for 3 days, DHBV DNA level in serum and liver returned significantly. The O.D values of DHBsAg in duck serum did not change at the period of the treatment. After 12 days of continuous exposure to adefovir at the concentration of 20μg/ml in vitro culture, the inhibitions of HBsAg, HBeAg, HBV DNA were 17.01%, 26.80%, and 26.92% respectively. *Conclusion*: The study confirms the safety and potent dose－dependent antihepadnaviral activity of adefovir in vivo. The anti－HBV effect is not demonstrated in 2.2.15 cells.

【Key words】Adefovir; Duck hepatitis B virus; Animal model; 2.2.15 cells

核苷类药物是近年来抗乙型肝炎病毒药物研究的热点,进展很快。阿的福韦(adefovir)是腺嘌呤核苷类似物,有抗嗜肝 DNA 病毒、逆转录病毒和疱疹病毒的广谱抗病毒活性。有关该药抗嗜肝 DNA 病毒的研究最初来自转染人 HBV 的肝肿瘤细胞株及原代鸭肝细胞模型[1,2]。本文就阿的福韦体内抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用及体外抗乙型肝炎病毒效果的临床前药效研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试药物

阿的福韦由四川省抗菌素工业研究所提供,批号:

作者介绍:陈压西(1969－),女,副研究员,硕士,主要研究方向:抗乙型病毒性肝炎药物筛选。

维普资讯 http://www.cqvip.com

AD2001701,为白色粉状,分别制成 0.33 mg/粒、0.75 mg/粒、1.5 mg/粒三种剂量胶囊。体外试验时用培养液将其浓度配制成 2mg/ml。拉米夫定(批号:BO38238,葛兰素威康英国行动有限公司生产)购于重庆医科大学第二临床学院,压碎后自制成 5mg/粒的胶囊。

1.2 动物模型

采用健康成年的重庆麻鸭产的蛋孵化的 1 日龄雏鸭,经腹腔接种 0.1mlDHBV DNA 阳性病毒血清。接种 1 周后,分别颈外静脉抽血,用地高辛标记的 DHBV DNA 探针经斑点杂交检测筛选出感染阳性鸭,饲养至 2 周龄作为实验动物。

1.3 细胞株

2.2.15 细胞株(转染了人 HBV 的肝肿瘤细胞株),由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供。

1.4 对鸭乙型肝炎病毒模型的影响

将感染阳性鸭 66 只随机分为 6 组,分设为①病毒对照组,用淀粉胶囊。②阳性药物对照组,用拉米夫定,剂量为 50mg/(kg.d)。③阿的福韦小剂量组,剂量为 3.3mg/(kg.d)。④阿的福韦中剂量组,剂量为 7.5mg/(kg.d)。⑤阿的福韦大剂量组,剂量为 15mg/(kg.d)。⑥阿的福韦大剂量组,剂量为 15mg/(kg.d),用作肝组织 Southern Blot 分析。每日口腔灌喂 1 次。实验用药时间为 10 天,停药观察 3 天。观察指标:①血清 DHBV DNA 改变情况:于用药前、用药 5 天、用药 10 天、停药 3 天分别颈外静脉抽血,分离血清于 -20℃ 保存待检。采用斑点杂交法,用罗氏公司的地高辛标记试剂盒制备 DHBV DNA 探针统一检测,用 Vuego Scan(Brisa -620ST)扫描仪进行膜片扫描;用 the Discovery Series Quantity One 软件对斑点进行定量分析[3],斑点值为 volume (volume = intensity × mm^2)。②血清 DHBsAg 改变情况:于用药前、用药 5 天、用药 10 天、停药 3 天分别颈外静脉抽血,分离血清于 -20℃ 保存待检。将用药前后的血清统一对比检测,采用 ELISA 快速法、酶标阅读仪(Bio-TEK 公司)490nm 读取 O.D 值。③肝组织 Southern Blot 分析:于用药前、用药 5 天、10 天及停药 3 天将阿的福韦大剂量组(第 6 组)各剖杀 3 只鸭,取肝脏样本,将 12 份鸭肝组织中提取的总 DNA 用 Beckman DU-600 核酸-蛋白定量分析仪定量后,每份样本点样 50μg,在 1% 的琼脂糖凝胶恒压电泳 1 小时。经变性、中和后,将 DNA 从琼脂糖凝胶转移到硝酸纤维素滤膜上(毛细管转移)(方法参照《分子克隆实验指南》第二版 P475),以 HindⅢ限制性内切酶酶切的地高辛标记的 λDNA 作为分子 Marker,用地高辛标记的 DHBV DNA 探针进行杂交,作 Southern Blot 分析。

1.5 体外抗 HBV 活性检测

对 HBsAg 和 HBeAg 抑制率测定:将 2.2.15 细胞复苏培养后,加入 0.25% 胰酶,37℃ 消化,RPMI1640 培养液吹打计数后,配制成 1×10^5 个细胞/ml 后接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100μl,37℃,5.0% CO_2 培养 24h,细胞长成单层后进行试验。药物阿的福韦用培养液配制成 20μg/ml,10μg/ml,5μg/ml,2.5μg/ml,1.25μg/ml 五种浓度,每种药物浓度均加 3 孔,每 4 天换液 1 次,共培养 12 天,换出的上清液置 -20℃ 保存备测。以相同条件不含药物培养液和阳性对照药物(拉米夫定)培养液培养的细胞作为对照。用 Abott 酶免试剂盒检测上清液中 HBsAg,用北京四环生物工程制品厂酶免试剂盒检测上清液中 HBeAg,用下列公式分别计算抑制率:

$$抑制率=\frac{对照孔\ HBsAg(或\ HBeAg)效价-实验孔\ HBsAg(或\ HBeAg)效价}{对照孔\ HBsAg(或\ HBeAg)效价}\times100\%$$

对 2.2.15 细胞内 HBV DNA 的抑制试验:在 25cm^2 培养瓶中培养 2.2.15 细胞,24h 后加入阿的福韦,设 20μg/ml,10μg/ml,5μg/ml,2.5μg/ml,1.25μg/ml 五种浓度组,每种药物浓度各 3 瓶,每 4 天换药液 1 次,以相同条件不含药物培养液和阳性对照药物(拉米夫定)培养液培养的细胞作为对照。培养 12 天后,提取细胞中的 DNA,用上海医科大学预防医学研究所 HBV DNA 试剂盒检测。用下列公式计算抑制率:

$$抵制率=\frac{对照孔\ HBV\ DNA\ 效价-实验孔\ HBV\ DNA\ 效价}{对照孔\ HBV\ DNA\ 效价}\times100\%$$

结果判断:无效:抑制率 < 30%;轻度抑制:抑制率 = 30% ~ 50%;明显抑制:抑制率 > 50%。

1.6 统计学处理

采用 spss 软件,配对 t 检验。

2 结 果

2.1 治疗前后血清 DHBV DNA 水平比较

生理盐水组用药后血清 DHBV DNA 滴度无明显降低,拉米夫定与阿的福韦小剂量用药 10 天均有血清 DHBV DNA 滴度显著降低($P<0.05$),阿的福韦中、大剂量用药 5 天、10 天均有血清 DHBV DNA 滴度极显著降低($P<0.01$),停药 3 天后与拉米夫定组一样阿的福韦各剂量组有病毒 DNA 反跳现象。见表 1。

2.2 治疗前后血清 DHBsAgO.D 值比较

除拉米夫定组用药 10 天有血清 DHBsAgO.D 值显著降低外($P<0.05$),其余未见血清 DHBsAgO.D 值显著改变。见表 2。

2.3 肝组织 Southern Blot 分析

用药 5 天、10 天肝脏中 DHBV 松弛环状 DNA (relaxed circular DNA, RC);共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, CCC);单链 DNA(single - stranded DNA, SS)均有明显降低,停药后 DHBV DNA 反跳明显。见图 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 治疗前后血清 DHBV DNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	DHBV DNA(volume)			
	用药前	用药 5d	用药 10d	停药 3d
生理盐水组	280.05±59.53	260.40±80.88	293.35±72.03	320.07±56.94
拉米夫定组	306.81±40.72	286.02±89.34	253.90±85.19[a]	352.99±79.99
阿的福韦小剂量组	301.88±75.31	272.20±107.00	218.39±96.41[a]	266.17±141.92
阿的福韦中剂量组	374.73±65.55	292.84±75.33[b]	237.15±54.36[b]	313.50±78.86[a]
阿的福韦大剂量组	374.39±93.29	284.14±92.54[b]	286.27±92.63[b]	308.61±128.10[a]

注:上表所列为各组 DNA 斑点 volume 值的平均数及标准差,统计学采用治疗前后自身配对 t 检验,为用药组不同时间 DNA 水平与同组用药前 DNA 水平的比较:[a]$P<0.05$,[b]$P<0.01$

表 2 用药前后血清 DHBsAgO.D 值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	用药前	用药 5d	用药 10d	停药 3d
生理盐水组	0.55±0.40	0.56±0.53	0.63±0.51	0.53±0.41
拉米夫定组	0.53±0.44	0.45±0.34	0.30±0.24[c]	0.31±0.25
阿的福韦小剂量组	0.43±0.37	0.32±0.30	0.28±0.27	0.26±0.27
阿的福韦中剂量组	0.42±0.48	0.30±0.32	0.33±0.39	0.33±0.38
阿的福韦大剂量组	0.81±0.77	0.72±0.74	0.52±0.49	0.57±0.59

注:上表所列为各组 DHBsAgO.D 值平均数及标准差,统计学采用治疗前后自身配对 t 检验,为用药组不同时间 DHBsAgO.D 值与同组用药前 DHBsAgO.D 值的比较:[c]$P<0.05$

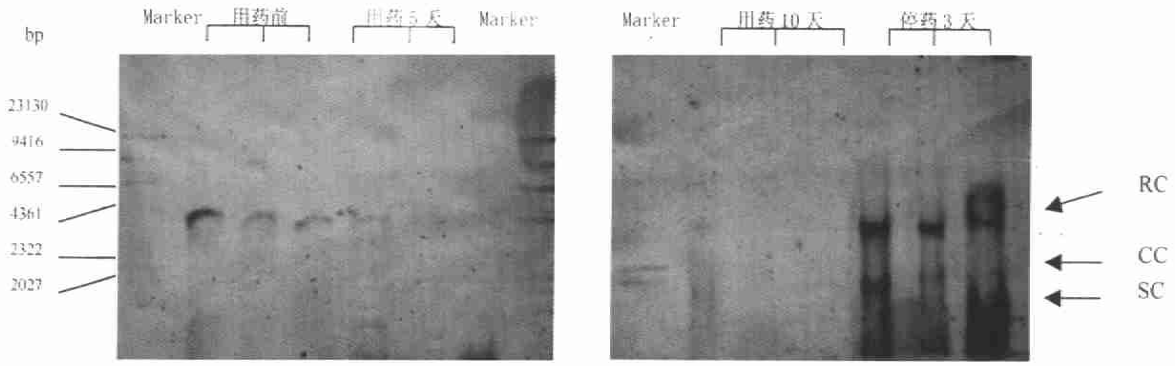


图 1 12 份鸭肝组织 Southern Blot 结果

表 3 阿的福韦不同时间对 HBsAg/HBeAg 的平均抑制率(%)

药物浓度(μg/ml)	4d	8d	12d
1.25	1.18/1.26	2.04/1.43	2.34/6.70
2.50	2.59/2.21	3.63/2.86	5.94/19.60
5.00	3.54/3.15	6.92/3.29	8.33/20.77
10.00	7.78/4.42	12.26/13.29	12.44/25.80
20.00	8.73/4.42	16.69/15.71	17.01/26.80

表 4 用药第 12 天阿的福韦抗 HBV DNA 效果(平均抑制率%)

药物浓度(μg/ml)	HBV DNA 抑制率(%)	存活细胞
1.25	0	97.52
2.50	0	96.10
5.00	14.89	92.20
10.00	19.30	91.84
20.00	26.92	91.31

2.4 在 2.2.15 细胞培养中对 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的作用

阿的福韦最大无毒浓度为 20μg/ml,5 个稀释浓度的 3 批试验结果显示:各浓度阿的福韦对 2.2.15 细胞培养第 12 天上清液中 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 均无明显抑制作用。见表 3、4。

3 讨 论

用 DHBV 感染鸭作为乙型肝炎动物模型来研究人类乙型肝炎发病机理、病毒复制过程及筛选有效的治疗药物,已为国内外学者所公认。1~3 日龄雏鸭感染 DHBV 可维持长期病毒血症而无明显的自然转阴现象,因此,我们应用 1 日龄雏鸭经腹腔感染 DHBV 的方法来建立鸭乙型肝炎动物模型进行

维普资讯 http://www.cqvip.com

阿的福韦抗病毒疗效的实验，为治疗肝炎病人提供临床前研究资料，并用对乙型肝炎病毒有明显抑制作用的上市药物拉米夫定作为阳性药物对照。

近年研究发现在体内或体外对嗜肝 DNA 病毒复制有抑制作用的核苷类药物大致分为脱氧鸟嘌呤核苷类似物，如阿昔洛韦(acyclovir, ACV)、更昔洛韦(ganciclovir, GCV)、喷昔洛韦(penciclovir, PCV)、泛昔洛韦(famciclovir, FCV)等；脱氧胞嘧啶核苷类似物，如拉米夫定(Lamivudine, 3TC)。此外，还有 2'氟代尿嘧啶核苷类；环烷基核苷类，如洛布可韦(Lobucavir)。阿的福韦(adefovir)是腺嘌呤核苷类似物，同嘧啶核苷类似物拉米夫定的作用类似，阿的福韦也可以强有力地抑制乙肝病毒 DNA 复制，使 HBV DNA 的滴度迅速降低或转阴，阿的福韦在细胞内的活性代谢物为阿的福韦双磷酸酯，后者选择性抑制 HBV DNA 聚合酶。此外，体外试验发现，阿的福韦对原代肝细胞有抗鸭乙肝病毒(DHBV)的抗病毒活性[4]，还可以促进肝细胞的再生和更新速度，抑制土拨鼠肝炎病毒(WHV)的复制[5]。由于阿的福韦的磷酸酯基带负电荷，阿的福韦口服后在肠内吸收不佳，因此美国 Gilead Sciences 公司开发了前药—阿的福韦酯，9－[2－[双(特戊酰氧基甲氧基)磷酰甲氧基]乙基]腺嘌呤(Adefovir dipivoxil, $C_{20}H_{32}N_5O_8P = 501.48$)，以提高生物利用度，口服后前药部分迅速被酯酶水解释放出游离的阿的福韦进入门静脉和全身循环，对拉米夫定和泛昔洛韦耐药的 HBV 病毒株，均有很强的抑制作用。不仅如此，离体耐药性研究中，阿的福韦酯对常见类型的拉米夫定耐药 HBV、泛昔洛韦相关的突变和乙肝免疫球蛋白缺失突变都有活性[6]。

本次鸭体内实验结果表明阿的福韦在 3.3、7.5、15mg/(kg.d)的剂量下用药 5 天、10 天有明显抑制病毒 DNA 的作用，停药后与其它许多核苷酸类似物一样有病毒 DNA 回升现象。各剂量组在用药前后血清 DHBsAgO.D 值无明显改变，提示该药对鸭乙型肝炎病毒表面抗原的抑制作用不明显。用药前后肝组织 Southern Blot 结果与血清中 DHBV DNA 改变一致，同样提示阿的福韦有明显抑制肝内 DHBV DNA 复制的作用，但停药后有"反跳"现象。

本次体外实验表明，在最大无毒浓度下选择的 5 个浓度的阿的福韦对 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 均无明显抑制作用，推测可能是阿的福韦在体外不能有效地被细胞吸收转化成活性代谢物阿的福韦双磷酸酯有关。而 Danni 等[7]报道用前药—阿的福韦酯与其它核苷类药物如：喷昔洛韦(penciclovir)、拉米夫定(lamivudine)联合应用，将会大大提高其体外抑制病毒 DNA 的效果。

参 考 文 献

[1] Heijtink, R. A., G. A. De Wilde, et al. Inhabitory effect of 9－(2－phosphpnylmethoxyethyl)－adenine(PMEA) on human and duck hepatitis B virus infection[J]. Antivir. Res, 1993; 21:141－153.

[2] Heijtink, R. A., J. Kruining, et al. Inhabitory effect of acyclic nucleoside phosphonates on human hepatitis B virus and duck hepatitis B virus infection in tissue culture[J]. Antimicrob. Agents Chemother, 1994; 38:2180－2182.

[3] 陈压西，黄爱龙，齐珍元，等. 碱性磷酸酶直接标记核酸探针检测乙型肝炎病毒 DNA[J]. 中华肝脏病杂志，2002; 10(6):429－431.

[4] Delmas J, Schorr O, Jamard C, et al. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus－infected hepatocytes in vivo and in vitro[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46(2):425－433.

[5] Dandri M, Burda MR, Will H, et al. Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA[J]. Hepatology, 2000; 32(1):139－146.

[6] Xiong X, C. Flores, H. Yang, et al. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro[J]. Hepatology, 1998; 28:1669－1673.

[7] Danni Colledge, Gilda Civttico, Stephen Locarnini, et al. In vitro antihepadnaviral activities of combinations of penciclovir, lamivudine, and adefovir [J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2000; 44:551－560.