

阿德福韦酯联合拉米夫定 对大鼠肾细胞线粒体DNA的影响

王司, 朱新宇 (山西医科大学第一临床医学院 感染科, 太原 030001)

摘要: 目的 探讨ADV和LAM联合应用对大鼠肾细胞线粒体DNA的损伤情况。方法 SD大鼠随机分为LAM组、ADV组、ADV + LAM组和空白对照组, 连续灌胃给药8周后, 采用实时荧光定量PCR (real-time PCR) 法检测各组大鼠肾细胞线粒体细胞色素b的基因含量; 同时检测各组大鼠的血肌酐、尿素氮水平。并对数据进行单因素方差分析。结果 LAM组、ADV组、ADV + LAM组大鼠肾细胞线粒体细胞色素b的基因含量分别为 0.79 ± 0.12 、 0.59 ± 0.13 、 0.42 ± 0.89 , 较空白对照组 (1.00 ± 0.00) 明显减少 ($F = 63.72$, $P = 0.00$); 其中ADV组较LAM组基因含量低, $t = 3.48$, $P < 0.01$; ADV + LAM组与LAM组、ADV组两个单药组相比, 基因含量最低 ($t = 7.66$ 、 3.51 , P 均 < 0.01)。而各组大鼠血肌酐、尿素氮水平差异均无统计学意义 ($P = 0.14$ 、 0.08)。结论 连续给药8周, LAM组、ADV组、ADV + LAM组的肾细胞线粒体DNA水平均有所下降, 其中ADV + LAM组线粒体DNA含量下降最明显, 即两药联用组的线粒体DNA损伤最重。

关键词: DNA, 线粒体; 拉米夫定; 阿德福韦酯

Effect of adefovir dipivoxil combined therapy with lamivudine on renal cell mitochondrial DNA in rats

WANG Si, ZHU Xin-yu (Department of Infectious Disease, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To explore the damage of mitochondrial DNA of the kidney induced by lamivudine (LAM) and adefovir dipivoxil (ADV) combined therapy in rats. **Methods** Forty healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into four equal groups and treated by oral gavage with ADV [40 mg/(kg·d)], LAM [300 mg/(kg·d)], ADV [40 mg/(kg·d)] + LAM [300 mg/(kg·d)], or saline (equal volume) for 8 weeks. DNA of the kidney was purified from each sample and the mitochondrial DNA (mtDNA) content of the kidney was monitored by quantitative real time PCR. At the same time, the levels of serum creatinine and urea nitrogen were detected. One-way ANOVA, the LSD t -test and Dunnett's T3 were used for data. **Results** Compared with blank control group, the mtDNA content of rats treated with LAM group, ADV group and ADV + LAM group significantly decreased (1.00 ± 0.00 , $F = 63.72$, $P < 0.01$), which were 0.79 ± 0.12 , 0.59 ± 0.13 and 0.42 ± 0.89 , respectively. Among them, the ADV group was lower than LAM group ($P < 0.01$) and the ADV + LAM group was the least ($P < 0.01$). The levels of serum creatinine and urea nitrogen showed no statistically significant difference. **Conclusions** After continuous dosing 8 weeks, the mitochondrial DNA content of the kidney was declined with the three treatment groups. And the ADV + LAM-treated rats had the greatest reduction. The rats of ADV combined with LAM have the most serious injury of mitochondria DNA.

Key words: DNA, mitochondrial; Lamivudine; Adefovir dipivoxil

核苷(酸)类似物是目前临床上用于抗HBV的一线药物, 因其服用方便、治疗效果而被临床广泛应用。但随着应用时间的延长, 其不良反应和耐药问题逐渐显现, 其中不良反应的出现主要与药物对线粒体DNA的损伤有关^[1]; 而耐药问题的产生

主要是由病毒基因位点突变引起。临床上处理耐药问题的方案是换用易突变位点不同的核苷(酸)类似物, 或是选择与上述药物联合应用。由于ADV与LAM、LdT及ETV的耐药位点无交叉或仅有部分交叉, 故当上述药物发生耐药时, 选择与ADV联合应用是常用的治疗方案; 其中ADV和LAM的联合是临

床上经济、有效、且常用的治疗方案。体外研究^[2]发现,核苷(酸)类似物均有抑制线粒体DNA聚合酶 γ 的潜在毒性,临床上ADV的主要不良反应是肾脏损伤,故关于两种药物联用是否对肾脏线粒体的损伤增加的实验鲜有报道。本研究通过检测SD大鼠模型肾细胞线粒体细胞色素b的含量变化,以评估ADV和LAM联合应用对大鼠肾细胞线粒体DNA的损伤情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康SD大鼠40只,清洁级,重量(190 ± 10) g,雌雄各半,购自山西医科大学实验动物中心。

1.2 实验药物及试剂 LAM、ADV均由葛兰素史克有限公司生产。组织DNA提取试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购自博士德生物技术有限公司。

1.3 动物实验方案及样品采集 SD大鼠40只,随机分为空白对照组、LAM组、ADV组、LAM + ADV组4组,每组10只,各组雌雄各半,灌胃给药,LAM组给予LAM 300 mg/d,ADV组给予ADV 40 mg/d^[3],LAM + ADV组给予LAM 300 mg/d、ADV 40 mg/d,空白对照组给予等量生理盐水,每日1次,持续给药8周^[3,4]。给药结束后,将各组大鼠用2%戊巴比妥液腹腔注射麻醉,取腹正中切口,分别采集肾脏组织,用液氮速冻后放入-80℃冰箱保存。

1.4 方法

1.4.1 mtDNA定量检测 ①Total DNA提取;②DNA浓度和纯度测定;③Real-time PCR:目的DNA和内参(β -Actin)分别进行Real-time PCR反应。

1.4.2 Real-time PCR反应条件 95℃ 15分钟,1个循环;95℃ 15秒,60℃ 32秒,共40个循环。

1.4.3 数据分析 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基}} - Ct_{\beta\text{-Actin}}$ 内参, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{空白对照组}}$,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。实验重复3次。

1.4.4 各引物序列 β -肌动蛋白:上游5'-CTAATGAGGCTGGTGATAAA-3',下游5'-CCTAAAGCCACAAGAAACA-3'。细胞色素b:上游5'-CGACCTCCCCGCCCATCTAA-3',下游5'-GCGCCGTTGGCGTGTAGGTAT-3'。引物由

赛百盛生物技术有限公司合成。

1.5 统计学处理 所有数据均采用SPSS 17.0软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以LSD-*t*法进行组间比较;若方差不齐,采用Dunnett's T3法进行比较; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾细胞线粒体细胞色素b基因含量 LAM组、ADV组、LAM + ADV组大鼠肾细胞线粒体细胞色素b的含量较空白对照组明显减少,差异均有统计学意义($F = 63.72$, P 均 < 0.01);ADV组较LAM组基因含量低,ADV + LAM组较LAM组和ADV组基因含量更低(P 均 < 0.01),见表1。

表1 大鼠肾细胞线粒体细胞色素b基因含量的比较
(相对表达量, $\bar{x} \pm s$)

组别	mtDNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
LAM组 (n = 10)	0.79 ± 0.12 ^a
ADV组 (n = 10)	0.59 ± 0.13 ^{bc}
LAM + ADV组 (n = 10)	0.42 ± 0.09 ^{def}
空白对照组 (n = 10)	1.00 ± 0.00
<i>F</i>	63.72
<i>P</i>	0.00

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.01$,^d $P < 0.01$;与LAM组比较,^c $t = 3.48$, $P < 0.01$;与LAM组比较,^e $t = 7.66$, $P < 0.01$;与ADV组比较,^f $t = 3.51$, $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血肌酐及尿素氮水平 给药后大鼠重量正常增加,其中LAM + ADV组大鼠的毛色光泽度较之前略有下降,但LAM组、ADV组、LAM + ADV组3组与空白对照组的血肌酐、尿素氮水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表2。

3 讨论

线粒体是一种半自主性细胞器,可独立于核染色体自主地进行复制、转录和翻译。线粒体DNA由16 569 bp组成,能够编码多种与线粒体功能相关的基因,线粒体细胞色素b是由线粒体DNA编码,并对线粒体氧化磷酸化过程中的电子传递起着重要作用。线粒体DNA能够单独合成自身所需的多种蛋白,其合成主要由位于线粒体内的DNA聚合酶完成,线粒体DNA聚合酶 γ (mtDNApol γ)是线粒体内惟一的DNA聚合酶,同时具有DNA聚合酶和核酸外切酶两种催化活性,对线粒体内DNA的合成和损伤修复起着重要作用^[5]。故当mtDNApol γ 受抑制

表2 各组大鼠血肌酐、尿素氮水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 (mmol/L)
LAM组 (n=10)	61.38 \pm 9.81	5.28 \pm 0.84
ADV组 (n=10)	63.76 \pm 9.09	5.61 \pm 0.72
LAM + ADV组 (n=10)	68.04 \pm 8.77	5.85 \pm 0.83
空白对照组 (n=10)	58.95 \pm 6.98	4.97 \pm 0.75
F	1.98	2.41
P	0.14	0.08

达到一定程度时,可能出现线粒体DNA的合成减少和突变增加,甚至可能影响线粒体的功能。

近年来,随着核苷(酸)类似物的长期及广泛应用,出现了包括肌病、周围神经病、急性胰腺炎、脂肪代谢障碍、高乳酸血症、乳酸酸中毒、肾脏损害和横纹肌溶解症等多种不良反应^[6]。已知核苷(酸)类似物的抗病毒机制为竞争性地抑制DNA聚合酶和整合嵌入到病毒DNA以终止病毒DNA链的合成。体外研究发现,核苷(酸)类似物在抗病毒的同时对mtDNA γ 也有低度的抑制作用^[7],故上述不良反应的出现可能是该类药物在抗病毒的同时抑制了mtDNA γ ,使线粒体DNA合成减少和突变增加,进而对器官线粒体造成了损伤。ADV的主要不良反应是肾小管肾病,并且肾毒性的发生率与药物剂量相关^[8]。有学者研究^[9]认为肾小管部位较高浓度的ADV可抑制肾细胞线粒体DNA的合成,主要是由于肾小管阴离子转运蛋白-1(HOAT-1)对ADV的亲和力较强,可以主动摄取ADV,使其在肾脏近曲小管的浓度升高,抑制了近曲小管细胞的mtDNA聚合酶,使肾小管线粒体DNA数量减少和突变增加,导致肾小管功能障碍。由于ADV与其余核苷(酸)类似物的耐药位点不同,故当LAM发生耐药时,选择ADV和LAM联合应用是常用、且有效的治疗方案。

近年来,有报道^[10]称LAM也可能引起与线粒体损伤相关的不良反应。本课题组主要针对这两种药物联合应用时对肾脏线粒体DNA的损伤情况进行研究,结果显示3个用药组的血肌酐、尿素氮水平与空白对照组差异无统计学意义,可能是由于血肌酐、尿素氮检测不够敏感,故对轻微的肾脏损伤不能及时反映。而实验中通过检测大鼠肾脏线粒体DNA含量证实:较大剂量的ADV可以引起大鼠肾细胞线粒体DNA损伤,这与相关研究结果一致^[11]。本实验中

LAM组大鼠肾细胞线粒体DNA在3个用药组中损伤最轻,但与空白对照组相比仍有损伤,且差异有统计学意义;这一实验结果显示较大剂量的LAM也可以引起肾细胞线粒体DNA损伤,说明LAM组大鼠肾细胞线粒体DNA γ 受到了抑制;该实验结果与美国食品药品监督管理局(FDA)提出的核苷(酸)类似物有潜在线粒体毒性的警示相符^[6]。本实验结果还显示ADV和LAM联合组大鼠肾细胞线粒体DNA含量最低,差异有统计学意义($P < 0.05$);说明这两种药物联合应用时对肾细胞线粒体DNA的损伤较单药组增加,该结论提示临床上选择ADV和LAM联合治疗时需要密切监测肾脏损伤情况,必要时进一步监测反应肾脏损伤较敏感的指标。

核苷(酸)类似物的耐药问题,是乙型肝炎治疗急需解决的问题之一,而核苷(酸)类似物的联合应用是目前常用的方案,故其联合应用的安全性需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Lewis W, Copeland WC, Day BJ. Mitochondrial and depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors[J]. Lab Invest, 2001, 81: 777-790.
- [2] Fontana RJ. Side effects of long-term oral antiviral therapy for hepatitis B[J]. Hepatology, 2009, 49: S185-S195.
- [3] Biesecker G, Karimi S, Desjardins J, et al. Evaluation of mitochondrial DNA content and enzyme levels in tenofovir DF-treated rats, rhesus monkeys and woodchucks[J]. Antiviral Res, 2003, 58: 217-225.
- [4] Zhang P, Zhang L, Jiang Z, et al. Evaluation of mitochondrial toxicity in Marmota himalayana treated with metacavir, a novel 2',3'-dideoxyguanosine prodrug for treatment of hepatitis B Virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55: 1930-1936.
- [5] Bakhanashvili M, Grinberg S, Bonda E, et al. Excision of nucleoside analogs in mitochondria by p53 protein[J]. AIDS, 2009, 23: 779-788.
- [6] Khungar V, Han SH. A systematic review of side effects of nucleoside and nucleotide drugs used for treatment of chronic hepatitis B[J]. Curr Hepatitis Rep, 2010, 9: 75-90.
- [7] 刘党生. 抗逆转录病毒疗法与儿童线粒体毒性[J]. 国外医药抗生素分册, 2009, 1: 34-36.
- [8] 王桂爽, 蔡皓东. 阿德福韦酯和替诺福韦相关性肾小管病[J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12: 31-40.
- [9] Isnard-Bagnis C, Moulin B, Launay-Vacher V, et al. Anticancer drug-induced nephrotoxicity[J]. Nephrol Ther, 2005, 1: 101-114.
- [10] Liaw YF, Gane E, Leung N, et al. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2009, 136: 486-495.
- [11] Gara N, Zhao X, Collins MT, et al. Renal tubular dysfunction during long-term adefovir or tenofovir therapy in chronic hepatitis B[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35: 1317-1325.

收稿日期: 2013-12-09