

# 舒肝宁注射液体外抗HBV作用

思兰兰<sup>1</sup>, 刘妍<sup>1</sup>, 徐东平<sup>1</sup>, 成军<sup>2</sup> (1.中国人民解放军总医院第五医学中心(原第302医院) 临床研究管理中心/全军传染病研究所, 北京 100039; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 肝病中心, 北京 100015)

**摘要:** 目的 采用体外细胞模型评价保肝护肝药物舒肝宁注射液(Shuganning Zhusheye, SGN)对HepG2.2.15细胞中稳定复制的野生型(wild type, WT)HBV和HepG2.A64细胞中稳定复制的恩替卡韦(entecavir, ETV)耐药型HBV的抗病毒及协同抗病毒作用。方法 采用CCK8细胞计数法评价SGN细胞毒性作用, 选择安全用药浓度系列稀释后单独或与对照药物[ETV及替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)]联合进行抗HBV实验, 以对HBV DNA、HBsAg和HBeAg的抑制率评价SGN的抗病毒作用。结果 SGN对HepG2.2.15和HepG2.A64细胞的CC<sub>50</sub>分别为198.40 μg/ml和85.81 μg/ml; SGN单独使用对HepG2.2.15和HepG2.A64细胞中HBV DNA的最大抑制率分别为55.89% ( $t = 14.195$ ,  $P = 0.0094$ )和46.29% ( $t = 4.953$ ,  $P = 0.0037$ ), SGN联合ETV对HepG2.2.15和HepG2.A64细胞中HBV DNA的最大抑制率分别为94.28% ( $t = 9.745$ ,  $P = 0.00068$ )和54.75% ( $t = 9.335$ ,  $P = 0.00028$ ), SGN联合TDF组对HepG2.2.15和HepG2.A64细胞中HBV DNA的最大抑制率分别为93.11% ( $t = 9.274$ ,  $P = 0.00071$ )和88.27% ( $t = 43.68$ ,  $P = 6.03 \times 10^{-6}$ ); SGN对野生型HBsAg和HBeAg未见明显抑制作用(抑制率<12.00%), 对ETV耐药型HBsAg抑制率为19.69%~34.26% ( $t = 39.118$ ,  $P = 0.028$ ;  $t = 19.73$ ,  $P = 0.0024$ )。8 μg/ml SGN与低浓度(0.01 μmol/L)ETV联合对WT型HBV DNA的抑制有协同效应, 抑制率为86.28% ( $t = 30.745$ ,  $P = 0.001$ )。8 μg/ml SGN与低浓度(0.2 μmol/L)TDF联合对ETV耐药型HBV的抑制有协同效应, 抑制率为60.26% ( $t = 7.568$ ,  $P = 0.017$ )。结论 SGN可显著抑制WT型和ETV耐药型HBV的复制, 联合低浓度ETV或TDF有显著协同抑制作用。

**关键词:** 肝炎病毒, 乙型; 舒肝宁注射液; 恩替卡韦; 替诺福韦酯; 抗病毒, 体外

## Antiviral effect of Shuganning Zhusheye on hepatitis B virus *in vitro*

SI Lan-lan<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, XU Dong-ping<sup>1</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup> (1. Viral Hepatitis Research Laboratory, Institute of Infectious Diseases and Research Center for Clinical and Translational Medicine, The Fifth Medical Center, General Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Center of Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the antiviral and synergistic antiviral effects of Shuganning Zhusheye (SGN) on wild-type (WT) HBV and entecavir (ETV)-resistant HBV in HepG2.2.15 cell models and HepG2.A64 cell models *in vitro*, respectively. **Methods** Cell counting kit-8 (CCK8) method was used to evaluate the cytotoxicity of SGN, and the cell-safe serial-diluted concentration of SGN single or combined with ETV and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) were selected for antiviral assay. The antiviral effects of SGN were evaluated with the inhibition rates of HBV DNA, HBsAg, and HBeAg levels. **Results** The CC<sub>50</sub> of SGN in HepG2.2.15 cells and HepG2.A64 cells were 198.40 μg/ml and 85.81 μg/ml, respectively. The maximum inhibition rate of HBV DNA was 55.89% ( $t = 14.195$ ,  $P = 0.0094$ ) and 46.29% ( $t = 4.953$ ,  $P = 0.0037$ ) in SGN group, 94.28% ( $t = 9.745$ ,  $P = 0.00068$ ) and 54.75% ( $t = 9.335$ ,  $P = 0.00028$ ) in SGN combined ETV group, and 93.11% ( $t = 9.274$ ,  $P = 0.00071$ ) and 88.27% ( $t = 43.68$ ,  $P = 6.03 \times 10^{-6}$ ) in SGN combined TDF group, respectively. However, SGN had no significant inhibition effect on HBsAg and HBeAg

levels in HepG2.2.15 cells (inhibition rate < 12.00%). The inhibition rate of HBsAg in SGN group was 19.69%~34.26% ( $t = 39.118$ ,  $P = 0.028$ ;  $t = 19.73$ ,  $P = 0.0024$ ) in HepG2.A64 cells. SGN (8  $\mu\text{g/ml}$ ) combined with low concentration (0.01  $\mu\text{mol/L}$ ) of ETV had a synergistic antiviral effect on WT HBV DNA and the inhibition rate was 86.28% ( $t = 30.745$ ,  $P = 0.001$ ). SGN (8  $\mu\text{g/ml}$ ) combined with low concentration (0.2  $\mu\text{mol/L}$ ) of TDF had a synergistic antiviral effect on ETV-resistant HBV and the inhibition rate was 60.26% ( $t = 7.568$ ,  $P = 0.017$ ). **Conclusions** SGN can effectively inhibit the replication of both WT and ETV-resistant HBV, and combination of SGN with low concentrations of ETV or TDF also have a significantly synergistic inhibitive efficacy.

**Key words:** Hepatitis B virus; Shuganning Zhushuye; Entecavir; Tenofovir disoproxil fumarate; Antiviral effect, *in vitro*

HBV感染严重危害人类健康, 持续的病毒复制增加了患者肝硬化和肝细胞癌的发病风险, 抗HBV治疗是限制或逆转疾病进展的关键<sup>[1]</sup>。我国约有8600万慢性HBV感染者, 每年近30万人死于HBV感染所致的肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌<sup>[2,3]</sup>。聚乙二醇化干扰素和核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogs, NAs]是临床主要抗HBV药物, 但均无法彻底清除HBV共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA), 且应答率低、难以停药, 长期服用NAs产生的耐药性可能导致抗病毒治疗失败, 这也是困扰临床的难题<sup>[4]</sup>。更多有效的药物和治疗方法在不断研发, 包括寻找天然抗HBV药物如苦味叶下珠、姜黄、水芹、鼠尾草、氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、绿原酸、汉黄芩素和黄芩素等, 以期能够增加慢性乙型肝炎的临床治愈<sup>[5-16]</sup>。舒肝宁注射液(Shuganning Zhushuye, SGN)是一种中草药提取物, 主要成份为茵陈提取物、栀子提取物、黄芩苷、板蓝根提取物和灵芝提取物, 主要功能为清热解毒、利湿退黄、益气扶正及保肝护肝。本研究以恩替卡韦(entecavir, ETV)、替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)与SGN联合作用野生型(wild type, WT)HBV复制的HepG2.2.15细胞和ETV耐药型HBV复制的HepG2.A64细胞, 分析SGN与核苷(酸)类似物联合是否具有协同抗病毒作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料与试剂** DMEM培养基购自美国Gibco公司, ELISA试剂盒购自北京万泰公司, 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒购自北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司。HBV稳定复制型HepG2.2.15细胞是D基因型/ayw亚型野生HBV稳定复制细胞系, 由解放军总医院第五医学中心(原第302医院)病毒性肝炎研究室细胞库保藏, HepG2.A64细

胞是C基因型/adr亚型ETV耐药HBV稳定复制细胞系, 由解放军总医院第五医学中心(原第302医院)病毒性肝炎研究室自主构建[国家发明专利号ZL201010586554.6<sup>[17]</sup>, 中国典型培养物保藏中心(CCTCC)典藏号C201163]。舒肝宁注射液由贵州瑞和制药有限公司提供, ETV由苏州东瑞制药有限公司生产, TDF由葛兰素史克公司生产。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 本研究采用HBV稳定复制HepG2.2.15细胞和HepG2.A64细胞。以含10%胎牛血清及含300  $\mu\text{g/ml}$  G418的DMEM培养基将细胞传代培养至最佳状态进行后续实验。

**1.2.2 SGN细胞药物毒性实验评价** HepG2.2.15细胞以 $0.4 \times 10^5$ 细胞/孔, HepG2.A64细胞以 $0.3 \times 10^5$ 细胞/孔铺种于96孔板中, 设置0  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、2  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、8  $\mu\text{g/ml}$ 、16  $\mu\text{g/ml}$ 、32  $\mu\text{g/ml}$ 、64  $\mu\text{g/ml}$ 、128  $\mu\text{g/ml}$ 、256  $\mu\text{g/ml}$ 、512  $\mu\text{g/ml}$ 及800  $\mu\text{g/ml}$ 系列稀释浓度, 每个药物浓度设置4个重复孔, 培养18 h内弃除培养基, 加入含有不同浓度SGN药液的DMEM培养基, 分别培养24 h、48 h、72 h和96 h, 每个时间段检测时, 弃除含原药液的DMEM培养基,  $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞2遍, 按照CCK8检测试剂盒说明书, 加入含有CCK8的DMEM培养液孵育2 h [CCK8: DMEM = 1: 10 (体积比)], 在450 nm波长处检测吸光度( $A$ )值。细胞活力 =  $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$ , 其中 $A_s$ 为实验孔(含细胞、CCK8溶液和药物溶液的孔)的吸光度值,  $A_c$ 为对照孔(含细胞、CCK8溶液和而无药物溶液的孔)的吸光度值,  $A_b$ 为空白孔(含培养基和CCK8溶液而不含细胞、不含药物溶液的孔)的吸光度值。将细胞活力数据代入GraphPad Prism 5软件计算药物作用的 $\text{CC}_{50}$  (half-maximal cytotoxic concentration causing 50% of cell growth inhibition), 以确定后续安全用药浓度。

1.2.3 SGN系列稀释浓度作用WT型HBV复制 HepG2.2.15细胞和ETV耐药HepG2.A64细胞 HepG2.2.15细胞以 $1 \times 10^5$ 细胞/孔、HepG2.A64细胞以 $0.8 \times 10^5$ 细胞/孔铺种于24孔板,选择SGN的安全系列用药浓度:0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、2  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、8  $\mu\text{g/ml}$ 进行抗病毒实验,ETV和TDF作为对照药平行实验,每个药物浓度设置3个重复孔,细胞培养18 h内使用安全系列稀释药物浓度作用HepG2.2.15和HepG2.A64细胞;药物作用4 d,隔天换新鲜的含药液DMEM培养基。第5 d收集细胞上清,采用乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针“一管法”)对细胞上清HBV DNA滴度进行检测,确定药物对HBV DNA的抑制作用;采用双抗体夹心法检测HBsAg和HBeAg,450 nm波长处检测A值,确定药物对HBsAg和HBeAg分泌作用的影响。将药物未处理组HBV DNA、HBsAg和HBeAg相对水平设定为100%,抑制率 =  $100\% - \text{实验组检测值} / \text{药物未处理组检测值} \times 100\%$ 。

1.2.4 SGN联合ETV作用WT型HBV稳定复制 HepG2.2.15细胞 HepG2.2.15细胞以 $1 \times 10^5$ 细胞/孔铺种于24孔板,选择8  $\mu\text{g/ml}$ 的SGN(记作SGN-8)分别与0.01  $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 和1  $\mu\text{mol/L}$ 的ETV联合,8  $\mu\text{g/ml}$ 的SGN单独,0.01  $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 及1  $\mu\text{mol/L}$ 的ETV单独,即按照:0、SGN-8、0.01  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 0.01  $\mu\text{mol/L}$  ETV、0.1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 0.1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 1  $\mu\text{mol/L}$  ETV组合形式,分别作用HepG2.2.15细胞,每种组合浓度设置3个重复孔,分别作用4 d,隔天更换新鲜含药物的DMEM培养基,第5 d收集细胞上清

分别按照HBV DNA、HBsAg及HBeAg检测试剂盒说明书进行检测分析。

1.2.5 SGN联合TDF作用ETV耐药型HBV稳定复制 HepG2.A64细胞 HepG2.A64细胞以 $0.8 \times 10^5$ 细胞/孔铺种于24孔板,选择8  $\mu\text{g/ml}$ 的SGN(记作SGN-8)分别与0.2  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 的TDF联合,8  $\mu\text{g/ml}$ 的SGN单独、0.2  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 的TDF单独,即按照:0、SGN-8、0.2  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 0.2  $\mu\text{mol/L}$  TDF、2.0  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 2.0  $\mu\text{mol/L}$  TDF、20  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 20  $\mu\text{mol/L}$  TDF组合形式,分别作用HepG2.A64细胞,每种组合浓度设置3个重复孔,分别作用4 d,隔天更换新鲜含药物的DMEM培养基,第5 d收集细胞上清,分别按照HBV DNA和HBsAg的检测试剂盒说明书进行检测分析。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 SGN的细胞药物毒性评价 在SGN最长作用时间(96 h)下,HepG2.2.15细胞 $CC_{50}$ 为198.40  $\mu\text{g/ml}$ (图1A),HepG2.A64细胞 $CC_{50}$ 为85.81  $\mu\text{g/ml}$ (图1B)。选择细胞活力 $\geq 90\%$ 的细胞浓度( $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ,即0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、2  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、8  $\mu\text{g/ml}$ )进行后续抗HBV实验,药物最佳作用时长为96 h。

2.2 SGN单独抗病毒效果 SGN注射液作用野生型HBV稳定复制的HepG2.2.15细胞96 h,最大安全用药浓度8  $\mu\text{g/ml}$ 的SGN对WT HBV DNA的抑制率为55.89%,半数有效抑制浓度( $IC_{50}$ )为

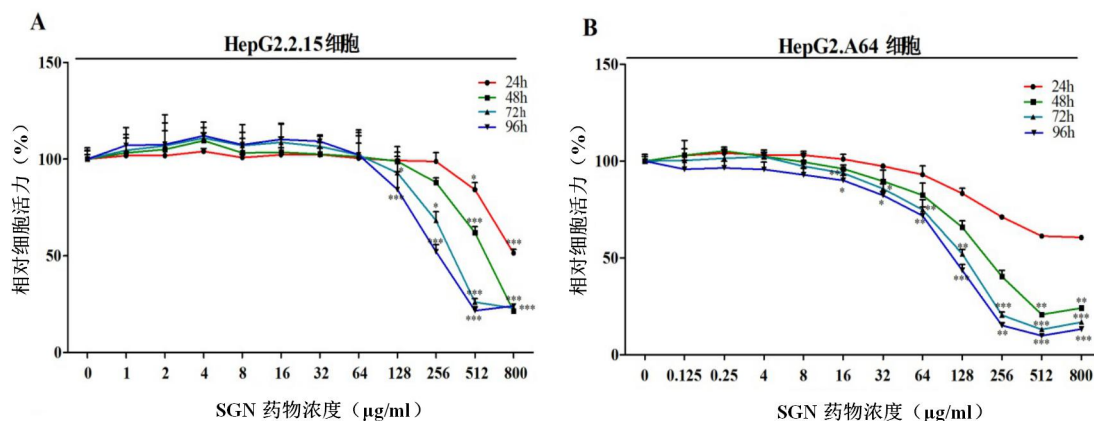


图1 舒肝宁注射液细胞毒性作用分析

注: A为SGN药物毒性的HepG2.2.15细胞评价; B为SGN药物毒性的HepG2.A64细胞评价; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

1.103  $\mu\text{g/ml}$ , 对照药物 ETV 和 TDF 对 WT HBV DNA 的抑制率分别为 94.28%、93.11% (图 2A); SGN 注射液对 HBsAg、HBeAg 有微弱抑制作用, 抑制率  $< 12.00\%$ , 对照药物 ETV 和 TDF 对 HBsAg 的抑制率分别为 7.64% 和 9.65% (图 2B), 对 HBeAg 几乎无抑制作用 (图 2C)。8  $\mu\text{g/ml}$  的 SGN 对 HepG2.A64 细胞作用 96 h, 对 HBV DNA 的抑制率为 46.29%,  $\text{IC}_{50}$  为 3.029  $\mu\text{g/ml}$ , 对照药物 ETV 和 TDF 对 HepG2.A64 细胞 HBV DNA 的抑制率分别为 54.75%、88.27% (图 2D); SGN 对 HBsAg 抑制率在 19.69% ~ 34.26%, 对照药物 ETV 和 TDF 对 HBsAg 的抑制率分别为 10% 和 29.35%, 差异有统计学意义 ( $t = 39.118$ ,  $P = 0.028$ ;  $t = 19.73$ ,  $P = 0.0024$ ) (图 2E)。

2.3 SGN 联合 ETV 对 WT 型 HBV 的抗病毒效果 8  $\mu\text{g/ml}$  SGN 与 ETV 按照 0、SGN-8、0.01  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 0.01  $\mu\text{mol/L}$  ETV、0.1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 0.1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、1  $\mu\text{mol/L}$  ETV、SGN-8 + 1  $\mu\text{mol/L}$  ETV 组合形式作用 HepG2.2.15 细胞 96 h, HBV DNA 抑制率分别为 0.00%、32.15%、78.08%、86.28%、91.12%、88.35%、92.83% 和 91.33%, SGN

(8  $\mu\text{g/ml}$ ) 与低浓度 (0.01  $\mu\text{mol/L}$ ) ETV 联合作用对 HepG2.2.15 细胞 HBV DNA 有协同抑制作用 ( $t = 30.745$ ,  $P = 0.001$ ) (图 3A)。8  $\mu\text{g/ml}$  SGN 和 ETV 单独应用对 HBsAg 的抑制率分别为 7.64% 和 10% ~ 15%, 两者联合应用未显示协同抑制作用 (图 3B)。8  $\mu\text{g/ml}$  SGN 和 ETV 单独应用对 HBeAg 的抑制率分别为 1.18% 和 0.23% ~ 3.95%, 两者联合无协同抑制作用 (图 3C)。

2.4 SGN 联合 TDF 对 ETV 耐药型 HBV 的抗病毒效果 8  $\mu\text{g/ml}$  SGN 与 TDF 按照 0、SGN-8、0.2  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 0.2  $\mu\text{mol/L}$  TDF、2.0  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 2.0  $\mu\text{mol/L}$  TDF、20  $\mu\text{mol/L}$  TDF、SGN-8 + 20  $\mu\text{mol/L}$  TDF 组合形式作用于 HepG2.A64 细胞 96 h, HBV DNA 的抑制率分别为 0.00%、50.85%、14.53%、60.26%、50.35%、58.76%、69.10%、71.96%, SGN (8  $\mu\text{g/ml}$ ) 与低浓度 (0.2  $\mu\text{mol/L}$ ) TDF 联合应用对 HBV DNA 抑制有协同作用 ( $t = 7.568$ ,  $P = 0.017$ ) (图 4A)。8  $\mu\text{g/ml}$  SGN 对 HBsAg 的抑制率为 17.02%, TDF 对 HBsAg 的抑制率为 9.64% ~ 13.60%, 但两者联合应用无明显协同抑制作用 (图 4B)。

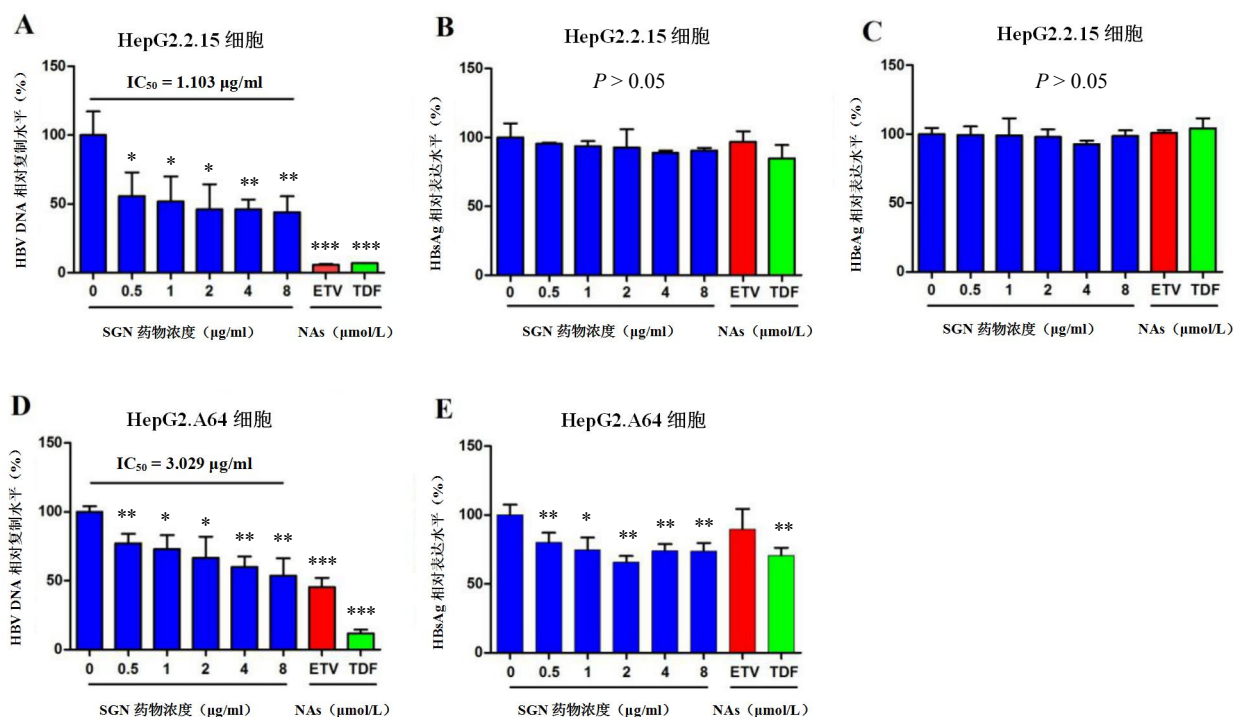


图 2 舒肝宁注射液抗 HBV 作用分析

注: A 为 SGN 对 HepG2.2.15 细胞 HBV DNA 抑制作用; B 为 SGN 对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 抑制作用; C 为 SGN 对 HepG2.2.15 细胞 HBeAg 抑制作用; D 为 SGN 对 HepG2.A64 细胞 HBV DNA 抑制作用; E 为 SGN 对 HepG2.A64 细胞 HBsAg 抑制作用; A ~ E 图纵坐标的相对水平均为与未用药组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

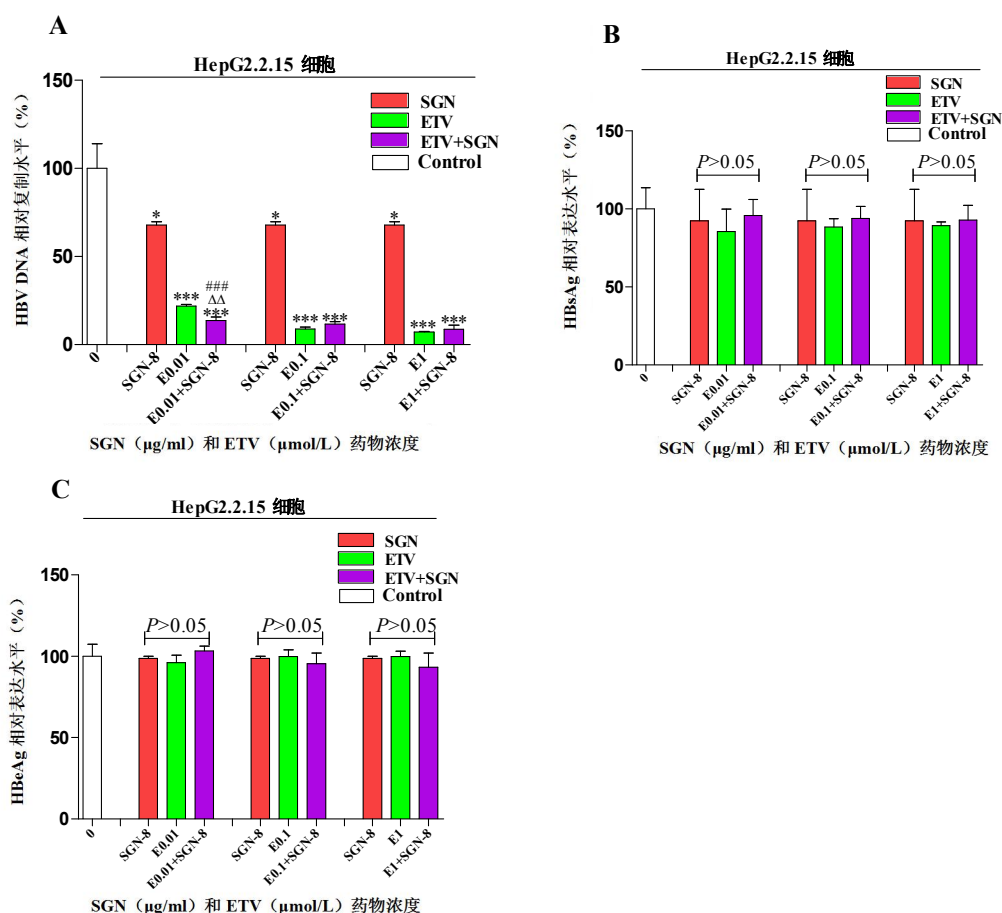


图3 舒肝宁注射液联合 ETV 抗病毒作用分析

注: A 为 SGN 联合 ETV 对 HepG2.2.15 细胞 HBV DNA 的抑制作用; B 为 SGN 联合 ETV 对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 的抑制作用; C 为 SGN 联合 ETV 对 HepG2.2.15 细胞 HBeAg 的抑制作用; SGN-8 指 SGN 浓度为 8 μg/ml, E 0.01 指 ETV 浓度为 0.01 μmol/L, E 0.1 指 ETV 浓度为 0.1 μmol/L, E 1 指 ETV 浓度为 1 μmol/L; A ~ C 图纵坐标的相对水平均为与未用药组相比; \* $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta\Delta$ 、###、\*\*\* $P < 0.001$

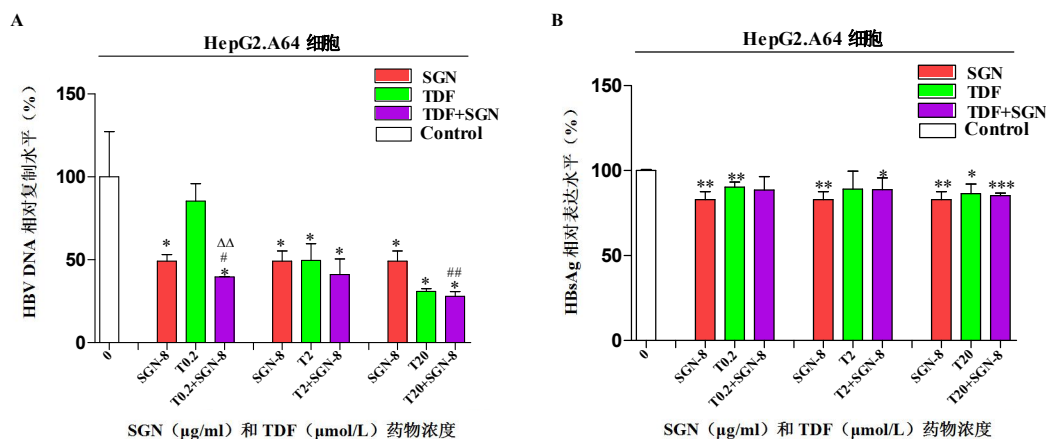


图4 舒肝宁注射液对 HepG2.A64 细胞 HBV DNA 和 HBsAg 的抑制作用

注: A 为 SGN 对 HepG2.A64 细胞 HBV DNA 的抑制作用; B 为 SGN 对 HepG2.A64 细胞 HBsAg 的抑制作用; SGN-8 指 SGN 浓度为 8 μg/ml, T 0.2 指 TDF 浓度为 0.2 μmol/L, T 2 指 TDF 浓度为 2 μmol/L, T 20 指 TDF 浓度为 20 μmol/L; A ~ C 图纵坐标的相对水平均为与未用药组相比; #、\* $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$ 、##、\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

### 3 讨论

我国北方以C基因型HBV感染较普遍,约占85%<sup>[18]</sup>。HepG2.2.15细胞系是经典的D基因型野生HBV稳定细胞复制模型<sup>[19]</sup>, HepG2.A64细胞系是由本课题组自主创新建立的我国患者来源的C基因ETV耐药型HBV稳定细胞复制模型<sup>[17]</sup>,其HBV复制力和表达水平与HepG2.2.15细胞系相当,已被应用于HBV的分子治疗和耐药研究<sup>[20-22]</sup>。联合使用两种细胞模型可更好地评价针对野生型和核苷(酸)类似物耐药HBV药物的活性。

核苷(酸)类似物是临床最常用的抗HBV药物,其中ETV具有强效反转录酶/聚合酶抑制活性,对核苷(酸)类药物初治患者的耐药率极低,是指南推荐的一线抗HBV药物,在我国临床实践中已广泛应用,但对于拉米夫定(lamivudine, LAM)和替比夫定(telbivudine, LdT)耐药的患者,ETV耐药率随用药时间延长而不断增加<sup>[23]</sup>。2014年TDF被我国批准用于慢性乙型肝炎的抗病毒治疗, TDF与ADV类似,均经肾脏排泄,肾功能损伤病例也频见报道<sup>[24]</sup>,是困扰临床抗HBV治疗的难题。SGN制剂中含有多种成分,大量药理学研究证实其中的黄芩苷具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、降压、镇静、利胆、保肝、抗氧化和解痉等作用<sup>[25]</sup>,也有研究报道,黄芩苷在体外细胞水平和体内动物模型水平均对HBV的复制和转录有抑制作用,在临床上黄芩苷也作为乙型肝炎治疗的联合用药<sup>[26-33]</sup>,但其确切作用机制尚未明确。本研究显示,中药提取物SGN可有效抑制野生和ETV耐药HBV的复制力,且HBV DNA呈剂量依赖性减少;SGN对野生HBV的HBsAg和HBeAg未见明显抑制作用,对ETV耐药HBV的HBsAg有抑制作用。推测SGN作用机制可能与本制剂能够激活体液和细胞免疫活性,经过免疫信使信号诱导抗病毒作用路径等一系列生物化学过程有关。SGN有可能成为慢性HBV感染尤其是核苷(酸)类似物耐药的乙型肝炎患者的一种新治疗药物。

随着中西医结合学科的发展,中西药物联合用于抗病毒治疗越来越受到临床研究者的关注。药物协同作用是指两种药物合用时其总效应比每一种药物单独作用更优<sup>[34]</sup>。中西药物联合应用既可发挥协同作用而增强疗效,又可减少用药剂量,缩短疗程,通过相互制约降低毒性及耐药性,减少用药禁忌,扩大临床应用范围。本研究联合用药结果显示,8  $\mu\text{g/ml}$  SGN与0.01  $\mu\text{mol/L}$  ETV联合应用对WT型HBV DNA复制的抑制率为86.28%,相对

于未用药组显著升高,联用后抑制率显著优于单用SGN(32.15%)或ETV(78.08%)。8  $\mu\text{g/ml}$  SGN与0.2  $\mu\text{mol/L}$  TDF联合应用对ETV耐药型HBV DNA抑制率为60.26%,相对于未用药组抑制率也显著升高,联用后抑制率显著优于单用SGN(50.85%)或TDF(14.53%)。SGN与低浓度ETV或TDF联合,抗病毒效果较好,同时还可降低用药成本,减少TDF引起的肾毒性和ETV所致的耐药问题,是临床抗HBV治疗较好的备选方案。

中药是多个成分协同作用而非单一成分起作用,成分复杂及毒性效应制约着传统中草药的发展。中药粗提物中可能存在一些具有毒性的非必需成分,导致有效提取物的治疗效果下降。本研究通过对细胞活力和剂量浓度的观察,预测体外0.5~8  $\mu\text{g/ml}$  SGN的抗病毒效应是最佳作用剂量,为临床合理安全使用提供参考。

### 参考文献

- [1] Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(6): 383-403.
- [2] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [3] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2015, 7(3): 1-18.
- [4] 徐东平, 刘妍. 结合基因型耐药突变检测与表型耐药分析探索乙肝病耐药的新认识[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(6): 535-538.
- [5] Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, et al. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure[J]. *Hepatology*, 2015, 62(6): 1893-1908.
- [6] Fletcher SP, Delaney WE 4th. New therapeutic targets and drugs for the treatment of chronic hepatitis B[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(2): 130-137.
- [7] Chen JX, Shen HH, Niu M, et al. Anti-hepatitis B virus effect of matrine-type alkaloid and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6[J]. *Virus Res*, 2016, 215: 104-113.
- [8] Sang X, Wang R, Han Y, et al. T cell-associated immunoregulation and antiviral effect of oxymatrine in hydrodynamic injection HBV mouse model[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(3): 311-318.
- [9] 刘晓琼, 沈宏辉, 陈佳欣, 等. 苦参碱类生物碱联合胸腺肽抗HBV作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(7): 1275-1281.
- [10] Wu Y, Lu Y, Li SY, et al. Extract from *Phyllanthus urinaria* L. inhibits hepatitis B virus replication and expression in hepatitis B virus transfection model in vitro[J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(12): 938-943.
- [11] Zhao Y, Geng CA, Ma YB, et al. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 156: 147-154.
- [12] Han YQ, Huang ZM, Yang XB, et al. In vivo and in vitro anti-hepatitis



- B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica*[J]. *J Ethnopharmacol*,2008,118(1):148-153.
- [13] Kim H, Jang E, Kim SY, et al. Preclinical evaluation of in vitro and in vivo antiviral activities of KCT-01, a new herbal formula against hepatitis B virus[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2018,2018:1073509.
- [14] Hesari A, Ghasemi F, Salarinia R, et al. Effects of curcumin on NF- $\kappa$ B, AP-1, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection[J]. *J Cell Biochem*, 2018,119(10):7898-7904.
- [15] Qi FH, Wang ZX, Cai PP, et al. Traditional Chinese medicine and related active compounds: a review of their role on hepatitis B virus infection[J]. *Drug Discov Ther*,2013,7(6):212-224.
- [16] Liu Y, Yao W, Si L, et al. Chinese herbal extract Su-duxing had potent inhibitory effects on both wild-type and entecavir-resistant hepatitis B virus (HBV) in vitro and effectively suppressed HBV replication in mouse model[J]. *Antivir Res*,2018,155:39-47.
- [17] Wang L, Liu Y, Liu W, et al. Establishment of three hepatoma cell lines stably replicating wild-type, entecavir-resistant or multidrug-resistant genotype C hepatitis B viruses[J]. *Hepatology*,2011,54(4 Suppl):1082A.
- [18] Li X, Wang L, Zhong YW, et al. Hepatitis B virus (HBV) subgenotypes C2 and B2 differ in lamivudine-and adefovir-resistance-associated mutational patterns in HBV-infected Chinese patients[J]. *J Clin Microbiol*,2010,48(12):4363-4369.
- [19] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1987,84(4):1005-1009.
- [20] Li H, Sheng C, Liu H, et al. An effective molecular target site in hepatitis B virus S gene for Cas9 cleavage and mutational inactivation[J]. *Int J Biol Sci*,2016,12(9):1104-1113.
- [21] Li H, Sheng C, Wang S, et al. Removal of integrated hepatitis B virus DNA using CRISPR-Cas9[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2017,7:91.
- [22] Liu W, Song H, Chen Q, et al. Multidrug resistance protein 4 is a critical protein associated with the antiviral efficacy of nucleos(t)ide analogues[J]. *Liver Int*,2016,36(9):1284-1294.
- [23] Liu Y, Xu Z, Liu L, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of HBV entecavir resistance in Chinese patients[J]. *Hepatology*,2013,58(suppl 4):719A.
- [24] Perazella MA. Tenofovir-induced kidney disease: an acquired renal tubular mitochondriopathy[J]. *Kidney Int*,2010,78(11):1060-1063.
- [25] 周红潮, 杜锐, 王慧, 等. 黄芩苷药代动力学研究进展[J]. *中国中药杂志*,2018,43(4):684-688.
- [26] 成扬, 平键, 许怀栋, 等. 氧化苦参碱黄芩苷组合对HepG2.2.15细胞乙肝病毒抗原表达的抑制作用[J]. *中国药理学通报*,2006,22(10):1258-1263.
- [27] 陈焯彬, 姚钦江, 刘辉林. 黄芩苷胶囊联合阿德福韦酯片治疗慢性乙型肝炎临床观察[J]. *广西中医学院学报*,2010,13(1):5-7.
- [28] 李金科, 李芳, 胡波, 等. 干扰素联合黄芩苷胶囊治疗慢性乙型肝炎和早期肝硬化临床观察[J]. *山西医药杂志*,2010,39(6):501-502.
- [29] 元民, 张国强, 王灵菊, 等. 恩替卡韦分散片联合黄芩苷胶囊治疗慢性乙型肝炎临床观察[J]. *中国实用医刊*,2012,39(20):44-46.
- [30] Pollicino T, Musolino C, Irrera N, et al. Flavocoxid exerts a potent antiviral effect against hepatitis B virus[J]. *Inflamm Res*,2018,67(1):89-103.
- [31] Huang H, Zhou W, Zhu H, et al. Baicalin benefits the anti-HBV therapy via inhibiting HBV viral RNAs[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2017,323:36-43.
- [32] Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review[J]. *J Tradit Complement Med*,2014,4(2):93-98.
- [33] Li Z, Li L, Zhou H, et al. Radix isatidis polysaccharides inhibit influenza A virus and influenza A virus-induced inflammation via suppression of host TLR3 signaling in vitro[J]. *Molecules*,2017, 22(1). pii:E116.
- [34] 李洁. 药物联用的协同作用[J]. *现代中医药(北京)*,2004,6:9-21.

收稿日期: 2018-08-06

思兰兰, 刘妍, 徐东平, 等. 舒肝宁注射液体外抗HBV作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2018,10(4):66-72.