

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000595

细胞毒性化疗药物表柔比星对 HBV 复制水平影响的体外试验

赖晓霏¹, 徐 蕾²

(1. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 40016; 2. 重庆医科大学病原生物学教研室、重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 40016)

【摘要】目的:在体外研究细胞毒性化疗药物表柔比星对乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)复制水平的影响。**方法:**3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]法检测 0、0.1、0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度表柔比星对 HBV 稳定细胞系 HepG2.2.15 细胞和 HepG2-HBV1.1 细胞活力的影响。将药物直接添加在 HepG2.2.15 细胞和 HepG2-HBV1.1 细胞中,提取细胞内及上清中的 HBV 复制中间体,通过 real-time PCR 法和 southern-blot 法检测 HBV DNA 拷贝量。**结果:**HepG2.2.15 细胞分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞内 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 3.53 ± 0.26 、 5.39 ± 0.23 、 9.40 ± 0.92 、 19.07 ± 1.47 ,各组间有统计学差异($F=10.984$, $P=0.005$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞也分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞内 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 2.80 ± 0.37 、 5.14 ± 0.49 、 14.24 ± 1.29 、 26.59 ± 1.98 ,各组间有统计学差异($F=13.122$, $P=0.003$)。Southern-blot 检测表明 HepG2.2.15 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量在对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)和处理组(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)中分别为 (1.00 ± 0.01) 和 (1.53 ± 0.05) ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=19.202$, $P=0.002$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组和处理组中分别为 1.01 ± 0.02 、 3.12 ± 0.20 ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=18.034$, $P=0.003$)。上述结果提示表柔比星促进细胞内 HBV 的复制。HepG2.2.15 细胞分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞上清液中 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 2.37 ± 0.22 、 3.50 ± 0.27 、 6.02 ± 0.56 、 17.74 ± 0.96 ,各组间有统计学差异($F=20.726$, $P=0.001$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞也分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞上清液中 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 3.75 ± 0.35 、 6.05 ± 0.48 、 10.28 ± 1.01 、 20.86 ± 1.81 ,各组间有统计学差异($F=14.761$, $P=0.002$)。Southern-blot 检测表明 HepG2.2.15 细胞上清中 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组和药物处理组中分别为 1.08 ± 0.02 和 2.69 ± 0.05 ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=58.33$, $P=0.000$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组和药物处理组中分别为 1.03 ± 0.01 、 3.52 ± 0.05 ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=85.801$, $P=0.000$)。该结果提示表柔比星促进细胞分泌或释放更多的 HBV 到细胞上清液中。**结论:**表柔比星有直接的促 HBV 复制的作用,该作用可能成为化疗后 HBV 再激活的新机制。

【关键词】乙肝病毒;复制;表柔比星;细胞毒性**【中图分类号】**R373.21;R394.33;R329.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-07-02

Effect of cytotoxic chemotherapy drug epirubicin on hepatitis B virus replication *in vitro*

Lai Xiaofei¹, Xu Lei²(1. Department of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
2. Teaching and Research Section of Pathogenic Biology, Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Chongqing Medical University)**【Abstract】Objective:** To study the effect of cytotoxic chemotherapy drug epirubicin on hepatitis B virus (HBV) replication *in vitro*.

Methods: The cell viability after epirubicin treatment was detected by MTT assay. The epirubicin was added into the culture of two stable HBV-expression cell lines (HepG2.2.15 cells and HepG2-HBV1.1 cells). The HBV replication intermediates were extracted from the cytoplasm and supernatant, and then HBV DNA copies were detected by quantitative fluorescent PCR and Southern blot. **Results:** HepG2.2.15 cells were treated by 0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ epirubicin respectively, and the intracellular HBV DNA copies ($\times 10^6$) were 3.53 ± 0.26 , 5.39 ± 0.23 , $9.40 \pm$

作者介绍: 赖晓霏, lxf224234@163.com,

研究方向: 细菌的感染与免疫。

通信作者: 徐 蕾, bear111xu@126.com。

基金项目: 国家临床重点专科建设经费资助项目【编号: (财社 2010) 305号】。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150403.0930.016.html>
(2015-04-03)

0.92, 19.07 ± 1.47 ; there were significant differences among these groups ($F=10.984, P=0.005$). Similarly, HepG2-HBV1.1 cells were treated by 0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ epirubicin respectively, and the intracellular HBV DNA copies ($\times 10^6$) were $2.80 \pm 0.37, 5.14 \pm 0.49, 14.24 \pm 1.29, 26.59 \pm 1.98$; there were significant differences among these groups ($F=13.122, P=0.003$). The Southern blot showed that the relative volume of HBV DNA replicative intermediate in HepG2.2.15 cells were 1.00 ± 0.01 and 1.53 ± 0.05 in control group and drug group respectively; there were significant differences between two groups ($t=19.202, P=0.002$). Similarly, the relative volume of HBV DNA replicative intermediate in HepG2-HBV1.1 cells were 1.01 ± 0.02 and 3.12 ± 0.20 , there were significant differences between two groups ($t=18.034, P=0.003$). These results suggested that epirubicin promoted intracellular replication of HBV. Meanwhile, HepG2.2.15 cells were treated by 0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ epirubicin respectively, and the HBV DNA copies ($\times 10^6$) in the supernatant were $2.37 \pm 0.22, 3.50 \pm 0.27, 6.02 \pm 0.56, 17.74 \pm 0.96$, there were significant differences among these groups ($F=20.726, P=0.001$). Similarly, HepG2-HBV1.1 cells were treated by 0, 0.1, 0.2, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ epirubicin respectively, and the HBV DNA copies ($\times 10^6$) in the supernatant were $3.75 \pm 0.35, 6.05 \pm 0.48, 10.28 \pm 1.01, 20.86 \pm 1.81$, there were significant differences among these groups ($F=14.761, P=0.002$). The Southern blot showed that the relative amount of HBV DNA replicative intermediate in the supernatant of HepG2.2.15 cells were 1.08 ± 0.02 and 2.69 ± 0.05 in control group and drug group respectively; there were significant differences between two groups ($t=58.33, P=0.000$). Similarly, the relative amount of HBV DNA replicative intermediate in the supernatant of HepG2-HBV1.1 cells were 1.03 ± 0.01 and 3.52 ± 0.05 in control group and drug group respectively, there were significant differences between two groups ($t=85.801, P=0.000$). The results indicated that epirubicin promoted cells secreting or releasing HBV particles.

Conclusion: Epirubicin has a direct role in promoting HBV replication, which may be a new mechanism of HBV reactivation after chemotherapy.

【Key words】hepatitis B virus; replication; epirubicin; cytotoxicity

乙型病毒性肝炎是一个影响全世界人们健康的重要公共卫生问题。全球约有 20 亿人感染乙肝病毒 (Hepatitis B virus, HBV), 其中约 4 亿为 HbsAg 阳性的慢性感染者^[1], 而这类人群的 3/4 是来源于中国^[1-2]。通常情况下, 慢性 HBV 感染者和无症状 HBV 携带者极少发生 HBV 再激活现象, 但若接受肿瘤化疗或免疫抑制治疗时, 则很有可能使静息状态或是低复制状态的 HBV 活化; 病毒的大量复制使肝功能受到损伤, 从而导致急性肝炎、急性重症肝炎、急性肝衰竭等严重的临床问题^[3]。

但是, 目前肿瘤患者接受化疗后 HBV 再激活的机制尚不清楚。比较公认的有 2 种机制可以解释该现象: 其一, 引发 HBV 再激活的抗肿瘤药物大致可分为 2 类: 传统的细胞毒性药物及与抗 B、T 细胞单克隆抗体治疗相关的生物制剂, 这些药物多具有较强的免疫抑制效果, 而机体的免疫力是抑制病毒复制和感染的最核心因素, 当机体免疫力受到抑制时病毒的复制自然就增强。其二, 部分免疫抑制剂可以直接的促 HBV 复制。HBV DNA 中含有糖皮质激素的作用元件, 该类物质可以直接作用于 HBV 增强子 I, 促进 HBV 基因的转录和复制。但是鲜有报道化疗药物对 HBV 复制有无直接促进作用。本实验选择了临床常见的化疗药物表柔比星, 将其直接添加在 HBV 复制的稳定细胞系中, 研究在有机

体免疫细胞、免疫分子的影响下, 药物是否也有直接促进 HBV 复制的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

地高辛检测试剂盒、Fast Start Universal SYBR Green Master、Hybond-N+膜购自 Roche 公司。最低基础培养基 (minimum essential medium, MEM), opti-MEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清为 Hyclone 公司产品; G418 购自德国默克公司。MTT 试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞及培养

HepG2.2.15 细胞购自中南大学湘雅医学院; HepG2-HBV1.1 (原名为 HepG2-H7, 含 CMV 启动子和 HBV 1.1 倍基因组) 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室构建^[4], 均保存于该实验室。HepG2-HBV1.1 细胞和 HepG2.2.15 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 G418 的 MEM 培养基中。

1.3 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 法检测化疗药物对细胞活力的影响

HepG2.2.15 细胞、HepG2-HBV1.1 分别接种于 96 孔板中, 每孔 1×10^4 个细胞, 次日细胞贴壁后换液并加入不同浓度的表柔比星 (0, 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度均为 3 个复孔; 用药 24 h 后换液。按照 MTT 试剂盒说明, 每孔细胞中加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h

后,吸尽孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 A 490 处测量各孔的吸光度值。同时设置调零孔(培养基、MTT、DMSO)。

1.4 提取 HBV DNA 复制中间体

往收集的细胞中加入 200 μl 的 NP-40 细胞裂解液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25 min,室温条件下 13 500 g 离心 5 min。将上清转移至干净 1.5 ml EP 管中,每管加入 500 μl 预冷的 35% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)8000 (1.5 M),充分震荡后冰浴 1~2 h,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 15 min,小心弃去上清。然后在沉淀中加入 380 μl 蛋白酶 K 消化液、20 μl 蛋白酶 K、灭菌的超纯水 50 μl ;吹打混匀后放置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中过夜。次日,每管加入 500 μl 酚氯仿,震荡混匀后室温下最大转速离心,小心吸取上层液体至新的一组干净 EP 管中,重复 1~2 次(每次加入与液体等倍体积的酚氯仿),以抽提 HBV DNA。之后,每管加入等倍体积的异丙醇,颠倒数次混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 18 000 g 离心 20 min 后小心弃去上清。每管加入 200 μl 75% 乙醇,颠倒数次洗涤沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 18 000 g 离心 20 min,小心弃去上清,真空抽干残留的乙醇,并用 6 μl 灭菌的超纯水溶解 DNA,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 Real-time PCR 法检测化疗药物对 HBV 复制的影响

HepG2.2.15 细胞、HepG2-HBV1.1 分别接种于 6 孔板中,每孔 6×10^5 个细胞,次日细胞贴壁后换液并加入表柔比星(终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$);用药 24 h 后换液,继续培养 48 h,收集细胞。提取细胞内病毒核心颗粒 DNA 复制中间体,并通过 real-time PCR 法对其定量。引物针对 HBV 基因组保守区 2 150~2 300 的位点;上游引物:5'-CCTAGTAGTCAGTTAT-GTCAAC-3';下游引物:5'-TCTATAAGCTGGAGGAGTCCGA-3'。反应条件:首先预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;然后变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,退火 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,10 个循环;再变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,退火 65 $^{\circ}\text{C}$ ~55 $^{\circ}\text{C}$ (从 65 $^{\circ}\text{C}$ 开始,每完成一个循环退火温度下降 1 $^{\circ}\text{C}$,最低为 55 $^{\circ}\text{C}$),30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,30 个循环,同时荧光读值。

1.6 Southern-blot 法检测化疗药物对 HBV 复制的影响

首先提取细胞内病毒核心颗粒 DNA 复制中间体,上样于 0.9% 琼脂糖凝胶电泳,100 V 恒压电泳 1 h。将凝胶完全浸没于碱变性液中,缓慢振荡 35 min,使其充分变性。参照《分子克隆第三版》自上向下转膜法,将 DNA 从凝胶中转移到 Hybond-N+尼龙膜上。然后将尼龙膜在 120 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘烤 45 min。之后将膜放入预杂交液中 42 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动 1 h,再在放入含有地高辛标记的探针中 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。洗膜后,滴加 3~4 滴化学发光底物,暗室曝光并洗片。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,各组结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间采用单因素方差分析,多重比较采用 Dunnett- t 方法,分析不同处理组与对照组之间的差异性;Southern-blot 结果的统计分析,处理组与对照组的比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 表柔比星对细胞活力的影响

MTT 结果表明药物在一定浓度下对细胞活力无明显影响,但超过了该浓度细胞活力则逐渐下降。表柔比星在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 2 种细胞活力无明显损伤(细胞相对活力 > 94%)。因此,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 作为本实验中表柔比星的工作浓度。

2.2 Real-time PCR 法检测表柔比星对 HBV 稳定表达细胞系胞内 HBV DNA 水平的影响

如表 1 所示,HepG2.2.15 细胞分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞内 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 3.53 ± 0.26 、 5.39 ± 0.23 、 9.40 ± 0.92 、 19.07 ± 1.47 ,各组间有统计学差异($F=10.984$, $P=0.005$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞也分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞内 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 2.80 ± 0.37 、 5.14 ± 0.49 、 14.24 ± 1.29 、 26.59 ± 1.98 ,各组间有统计学差异($F=13.122$, $P=0.003$)。提示表柔比星处理细胞后,HepG2.2.15 和 HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV 病毒拷贝量的增加。HepG2-HBV1.1 细胞与 HepG2.2.15 细胞相比,HepG2-HBV1.1 细胞对药物反应更明显,病毒拷贝量的增加更多。

表 1 Real-time PCR 检测表柔比星对 HepG2-HBV1.1 与 HepG2.2.15 细胞内 HBV DNA 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab.1 Effects of epirubicin treatment on HBV DNA in HepG2-HBV1.1 cells and HepG2.2.15 cells detected by real-time PCR($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表柔比星浓度	细胞内 HBV DNA 拷贝量($\times 10^6$)	
	HepG2.2.15 细胞	HepG2-HBV1.1 细胞
0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)	3.53 ± 0.26	2.80 ± 0.37
0.1 $\mu\text{mol/L}$	5.39 ± 0.23^a	5.14 ± 0.49^d
0.2 $\mu\text{mol/L}$	9.40 ± 0.92^b	14.24 ± 1.29^e
0.5 $\mu\text{mol/L}$	19.07 ± 1.47^c	26.59 ± 1.98^f
F 值	10.984	13.122
P 值	0.005	0.003

注:a,b,c 分别代表与 HepG2.2.15 细胞对照组比较的 P 值, $a=0.887$, $b=0.008$, $c=0.000$;d,e,f 分别代表与 HepG2-HBV1.1 细胞对照组比较的 P 值, $d=0.546$, $e=0.000$, $f=0.000$

2.3 Southern-blot 法检测表柔比星对 HBV 稳定表达细胞系胞内 HBV 复制中间体水平的影响

如图 1、2 所示,无论是 HepG2.2.15 细胞,还是 HepG2-HBV1.1 细胞均可观察到 3 种 HBV DNA 复制中间体(rcDNA, dsDNA, ssDNA)在药物处理组比对照组明显增加,利用 Quantity-One 软件对图片中 HBV DNA 条带的灰度定量,然后经 SPSS 统计分析。HepG2.2.15 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)和药物处理组(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)中分别为 1.00 ± 0.01 和 1.53 ± 0.05 ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=19.202$, $P=0.002$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组和药物处理组中分别为 1.01 ± 0.02 、 3.12 ± 0.20 ,对照组和药物处理组比较有统计学差异($t=18.034$, $P=0.003$)。见表 2。

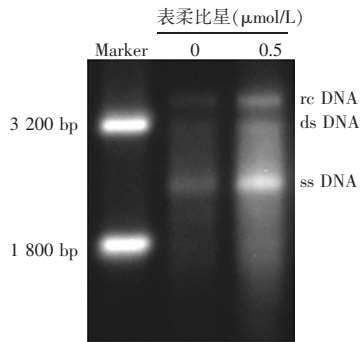


图 1 Southern-blot 检测表柔比星对 HepG2.2.15 细胞内 HBV 复制中间体水平的影响

Fig.1 Detection of HBV DNA in HepG2.2.15 cells after epirubicin treatment by Southern blot

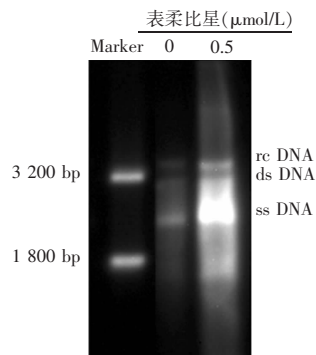


图 2 Southern-blot 检测表柔比星对 HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV 复制中间体水平的影响

Fig.2 Detection of HBV DNA in HepG2-HBV1.1 cells after epirubicin treatment by Southern blot

表 2 Southern-blot 结果中表柔比星对 HepG2-HBV1.1 与 HepG2.2.15 细胞内 HBV DNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 10^6$)

Tab.2 Effects of epirubicin treatment on HBV DNA in HepG2-HBV1.1 cells and HepG2.2.15 cells detected by Southern blot ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 10^6$)

表柔比星浓度	HepG2.2.15 细胞	HepG2-HBV1.1 细胞
0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)	1.00 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.02
0.5 $\mu\text{mol/L}$	1.53 $\pm$ 0.05	3.12 $\pm$ 0.20
<i>F</i> 值	19.202	18.034
<i>P</i> 值	0.002	0.003

2.4 Real-time PCR 法检测表柔比星对细胞上清中 HBV DNA 水平的影响

表柔比星处理 HBV 稳定表达系细胞后,收集细胞上清,35% PEG 8000 沉淀细胞内病毒核心颗粒,再提取 HBV 中间复制体,进行 real-time PCR。结果如表 3 所示,HepG2.2.15 细胞分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞上清液中 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)分别是 2.37 ± 0.22 、 3.50 ± 0.27 、 6.02 ± 0.56 、 17.74 ± 0.96 ,各组间有统计学差异($F=20.726, P=0.001$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞也分别经 0、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星处理后,细胞上清液中 HBV 病毒拷贝量($\times 10^6$)

分别是 3.75 ± 0.35 、 6.05 ± 0.48 、 10.28 ± 1.01 、 20.86 ± 1.81 ,各组间有统计学差异($F=14.761, P=0.002$)。提示表柔比星处理细胞后,HepG2.2.15 和 HepG2-HBV1.1 细胞分泌或释放到上清中的 HBV 病毒拷贝量增加。

表 3 Real-time PCR 检测表柔比星对 HepG2.2.15 和 HepG2-HBV1.1 细胞上清中 HBV DNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 Effects of epirubicin treatment on HBV DNA in the supernatant of HepG2-HBV1.1 cells and HepG2.2.15 cells detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表柔比星浓度	上清中 HBV DNA 拷贝量 ($\times 10^6$)	
	HepG2.2.15 细胞	HepG2-HBV1.1 细胞
0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)	2.37 $\pm$ 0.22	3.75 $\pm$ 0.35
0.1 $\mu\text{mol/L}$	3.50 $\pm$ 0.27 ^a	6.05 $\pm$ 0.48 ^d
0.2 $\mu\text{mol/L}$	6.02 $\pm$ 0.56 ^b	10.28 $\pm$ 1.01 ^e
0.5 $\mu\text{mol/L}$	17.74 $\pm$ 0.96 ^c	20.86 $\pm$ 1.81 ^f
<i>F</i> 值	20.726	14.761
<i>P</i> 值	0.001	0.002

注:a,b,c 分别代表与 HepG2.2.15 细胞对照组比较的 *P* 值,a=0.781,b=0.006,c=0.000;d,e,f 分别代表与 HepG2-HBV1.1 细胞对照组比较的 *P* 值,d=0.715,e=0.000,f=0.000

2.5 Southern-blot 法检测表柔比星对细胞上清中 HBV 复制中间体水平的影响

收集细胞上清,35% PEG 8000 沉淀细胞内病毒核心颗粒,再提取 HBV 中间复制体,进行 Southern-blot。结果提示 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星比对照组上清中 HBV 复制中间体含量明显增加(见图 3)。利用 Quantity-One 软件对图片中 HBV DNA 条带的灰度定量,然后经 SPSS 统计分析。HepG2.2.15 细胞上清中 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)和药物处理组(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 表柔比星)中分别为 1.08 ± 0.02 和 2.69 ± 0.05 ,比较有统计学差异($t=58.33, P=0.000$)。同样,HepG2-HBV1.1 细胞内 HBV DNA 复制中间体相对量,在对照组和药物处理组中分别为 1.03 ± 0.01 、 3.52 ± 0.05 ,比较有统计学差异($t=85.801, P=0.000$)。见表 4。

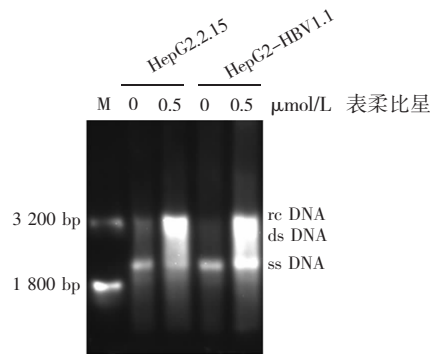


图 3 Southern-blot 检测表柔比星对 2 种 HBV 稳定表达细胞系上清中 HBV 复制中间体水平的影响

Fig.3 HBV DNA in the supernatant of HepG2-HBV1.1 cells and HepG2.2.15 cells after 0.5 $\mu\text{mol/L}$ epirubicin treatment detected by Southern blot

表 4 Southern-blot 结果中表柔比星对 HepG2-HBV1.1 与 HepG2.2.15 细胞上清中 HBV DNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab.4 Effects of epirubicin treatment on HBV DNA in the supernatant of HepG2-HBV1.1 cells and HepG2.2.15 cells detected by Southern blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表柔比星浓度	上清中 HBV DNA 拷贝量 ($\times 10^6$)	
	HepG2.2.15 细胞	HepG2-HBV1.1 细胞
0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)	1.08 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.01
0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.69 $\pm$ 0.05	3.52 $\pm$ 0.05
F 值	58.33	85.80
P 值	0.000	0.000

3 讨 论

HBV 再激活已成为 HBV 感染者在接受抗癌化疗后面临的新挑战。在癌症治疗中所应用的化疗药物包括细胞毒性药物,单克隆抗体,激素均被证实可以诱导 HBV 再激活的发生^[5]。其中,乳腺癌和淋巴瘤患者出现该现象的几率很高,分别为 41%~56% 和 24%~67%。而表柔比星是治疗乳腺癌和淋巴瘤最常用的药物之一,也有表柔比星引起 HBV 再激活的临床报道^[6-7]。

本实验选择了 2 个 HBV 稳定表达细胞系。其一是 HepG2.2.15 细胞^[8],它是由 HepG2 细胞衍生而来,整合了头对尾串联的 4 个 ayw 型 HBV 全基因组,可以分泌 HBsAg 和 HBeAg,细胞上清经电镜检测到 HBV 完整的病毒颗粒即 DANE 颗粒。其二是 HepG2-HBV1.1 细胞系^[4],该细胞的前身也是 HepG2 细胞,它整合了巨细胞病毒启动子(cytomegalovirus, CMV)和 1.1 倍体的 HBV 基因组,由于该细胞系含有巨细胞病毒启动子,所以比拥于 HBV 自身启动子的 HepG2.2.15 细胞能更稳定高效地复制 HBV 病毒颗粒和表达相应抗原。2 个细胞系同时验证表柔比星对 HBV 复制的影响,可以避免单一细胞的个体性因素,保证结果的可靠性。

目前,化疗后 HBV 再激活的机制尚不完全清楚。研究表明,在抗癌治疗疗程中,化疗药物撤退后机体免疫系统的逐渐恢复在肝细胞的损伤中起至关重要的作用^[1]。还有研究者认为该现象主要是因为是在化疗过程中使用了激素类药物,由于 HBV DNA 中含有糖皮质激素的作用元件,该类物质可以直接作用于 HBV 增强子 I,促进 HBV 基因的转录和复制^[9-10]。然而,无激素的化疗方案同样可以导致 HBV 再激活的发生^[11]。而且有病例报道,HBV 再激活发生在化疗治疗头 2 周内,这个阶段免疫因素发挥的作用应该很小。所以,还有一个可能就是细胞毒性

的化疗药物有直接的促 HBV 复制的作用。

本实验结果表明上述假设是成立的。在无细胞毒性的浓度下,表柔比星能够促进 HBV 稳定表达细胞的胞内复制更多的 HBV DNA,同时细胞也能分泌更多的 HBV DNA 到上清中。这证实,在无免疫因素的参与下,细胞毒性化疗药物表柔比星有直接的促 HBV 复制的作用,而且这种作用有剂量依赖关系,药物浓度越高时,促 HBV 复制的作用越明显。总而言之,细胞毒性化疗药物直接的促 HBV 复制的作用可能成为 HBV 再激活的新机制。下一步将从 HBV 复制相关的信号通路着手,探索化疗药物是通过哪些信号通路引起 HBV 复制增强的,并从分子生物学的水平上找到抑制该现象的靶点,从而全面解析化疗药物引起 HBV 再激活的机制,最终获得从根本上解决该问题的新思路。

参 考 文 献

- [1] Liu CJ, Chen PJ, Chen DS, et al. Hepatitis B virus reactivation in patients receiving cancer chemotherapy: natural history, pathogenesis, and management[J]. Hepatol Int, 2013, 7(2): 316-326.
- [2] Manzano-Alonso ML, Castellano-Tortajada G. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(12): 1531-1537.
- [3] 罗 强, 苏怀彬, 梁盼盼, 等. 1.1 倍全长 HBV 基因组克隆转染细胞系的建立[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(16): 1672-1674.
- [4] Manzano Alonso ML, Castellano Tortajada G. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(12): 1531-1537.
- [5] Dai MS, Wu PF, Shyu RY, et al. Hepatitis B virus reactivation in breast cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy and the role of preemptive lamivudine administration[J]. Liver Int, 2004, 24(6): 540-546.
- [6] Lubel JS, Angus PW. Hepatitis B reactivation in patients receiving cytotoxic chemotherapy: diagnosis and management[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(5): 864-871.
- [7] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(4): 1005-1009.
- [8] Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, et al. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid responsive element[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(6): 1627-1631.
- [9] Liaw YF. Hepatitis viruses under immunosuppressive agents[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998, 13(1): 14-20.
- [10] Cheng AL, Hsiung CA, Su IJ, et al. Steroid-free chemotherapy decreases risk of hepatitis B virus (HBV) reactivation in HBV-carriers with lymphoma[J]. Hepatology, 2003, 37(6): 1320-1328.
- [11] Hwang JP, Vierling JM, Zelenetz AD, et al. Hepatitis B virus management to prevent reactivation after chemotherapy: a review[J]. Support Care Cancer, 2012, 20(11): 2999-3008.

(责任编辑:关蕴良)