

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.07.014

化痰祛湿活血方含药血清对 HepG 2.2.15 细胞乙型肝炎病毒复制能力及脂肪代谢相关基因表达的影响

马庆亮, 张丽慧, 刘鸣昊, 郭敏, 赵文霞✉

河南中医药大学第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000

摘要 目的 探讨化痰祛湿活血方治疗慢性乙型肝炎 (CHB) 合并非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的可能作用机制。方法 60 只 SD 大鼠随机分为恩替卡韦组、化痰祛湿活血方组、联合组和正常组, 每组 15 只。恩替卡韦组给予恩替卡韦分散片 0.5 mg/(kg·d) 灌胃, 化痰祛湿活血方组给予化痰祛湿活血方颗粒剂 15 g/(kg·d) 灌胃, 联合组给予恩替卡韦分散片和化痰祛湿活血方颗粒剂灌胃, 剂量同上, 正常组给予正常饲料喂养, 10 天采血制备含药血清。细胞实验分为对照组、模型组、恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组、激动剂组、联合 + 激动剂组, 每组 3 个复孔。除对照组外, 其余各组均用浓度 50 μmol/L 油酸处理 HepG 2.2.15 细胞建立 CHB 合并 NAFLD 细胞模型。造模后对照组和模型组给予 10% 正常大鼠血清, 恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组给予 10% 相应血清, 激动剂组给予 10% 大鼠正常血清 + T0901317, 联合 + 激动剂组给予 10% 联合血清 + T0901317。培养 48 h 后比较各组细胞活力、细胞凋亡率, 检测细胞中肝 X 受体 α (LXRα)、固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、脂肪酸合成酶 (FAS) mRNA 表达和细胞培养上清液中乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 含量。结果 模型组和对细胞活力和细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 恩替卡韦血清组细胞活力升高、细胞凋亡率降低, 而激动剂组细胞活力降低、细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 化痰祛湿活血方血清组和联合血清组细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组 LXRα mRNA 降低、HBV DNA 含量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化痰祛湿活血方血清组和联合血清组 SREBP-1c mRNA 降低, 恩替卡韦血清组和联合血清组 HBV DNA 含量降低 ($P < 0.01$); 激动剂组 LXRα、SREBP-1c、FAS mRNA 和 HBV DNA 含量均高于联合血清组, 而联合 + 激动剂组 LXRα、SREBP-1c mRNA 低于激动剂组 ($P < 0.01$)。结论 化痰祛湿活血方可能通过调控脂代谢相关基因表达影响肝细胞内脂肪合成, 从而增强恩替卡韦抑制 HBV DNA 复制能力。

关键词 慢性乙型肝炎; 非酒精性脂肪性肝病; 化痰祛湿活血方; 病毒复制; 脂肪代谢

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染引起的肝脏慢性炎症性疾病, 可进展为肝纤维化、肝硬化, 并增加肝细胞癌的发生风险^[1-2]。目前中国约有 7000 万 HBV 携带者, 是 HBV 感染的高发地区, 其中有 2000 万 ~ 3000 万人已进展为 CHB^[3]。恩替卡韦等核苷类似物能够抑制 HBV 复制, 减轻肝脏炎症, 是治疗 CHB 的一线药物^[4-5]。研究^[6]发现, 单纯 CHB 患者应用核苷类似物病毒学应答较好, 但对

于合并非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 患者疗效不佳。有研究^[7]还发现, 合并 NAFLD 的 CHB 患者肝细胞内脂肪蓄积会影响药物代谢, 进而影响药物在肝细胞内的利用效率, 降低药物抗病毒的疗效。化痰祛湿活血方是我们临床经验方, 能有效缓解 NAFLD 患者症状, 减轻患者肝细胞内脂肪沉积程度^[8]。本研究通过油酸处理 HepG 2.2.15 细胞建立 CHB 合并 NAFLD 的细胞模型, 观察化痰祛湿活血方含药血清对 Hep G 2.2.15 细胞 HBV 复制能力及脂肪代谢相关基因转录的影响, 为其临床应用提供依据。

基金项目: 河南省自然科学基金 (162300410183); 河南省中医药科学研究专项 (2019JDZX2051)

✉ 通讯作者: zhao-wenxia@163.com, 13837139536

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (210 ± 10) g, 购自河南省实验动物中心, 实验动物使用许可证号: SCXK (豫) 2018-0003。饲养于河南中医药大学实验动物中心, 环境温度为 (25 ± 1) °C, 湿度 55%, 自由进食饮水, 自然光照。

细胞系 HepG 2. 2. 15 购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 药物

化痰祛湿活血方颗粒剂组成: 泽泻 30 g (批号: 15120135), 丹参 15 g (批号: 15060138), 海藻 15 g (批号: 15070027), 郁金 15 g (批号: 15060128), 山楂 15 g (批号: 15060020), 水飞蓟 15 g (批号: 15070223), 决明子 10 g (批号: 15090036), 柴胡 6 g (批号: 15070208), 颗粒剂购自四川新绿色药业科技发展股份有限公司。恩替卡韦分散片 (批号: 20170210), 正大天晴药业集团股份有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

胎牛血清 (批号: 1706126), 以色列 BI 公司; G418 (批号: C10314555)、油酸 (药用级) (批号: C10089676), 上海麦克林生化科技有限公司; MEM 细胞培养液 (批号: 13H28C29), 武汉博士德生物工程有限公司; 激动剂 T0901317 (批号: S7076), 美国 Selleck Chemicals 公司; 胰蛋白酶消化液 (批号: 20181213)、青链霉素混合液 (批号: 20180607)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号: D8371)、MTT 细胞增殖及细胞毒性试剂盒 (批号: 20180728)、总 RNA 提取试剂盒 (批号: 20181217)、Annexin-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (批号: 20190124), 北京索莱宝生物科技有限公司; 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (离心柱法, 批号: 20190730)、乙型肝炎病毒核酸定量试剂盒 (荧光 PCR 法, 批号: 20190513), 江苏默乐生物科技股份有限公司; GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) (批号: A277A、P119A、A276A), 美国 Promega 公司; Power Up™ TMSYBRTM Green Master Mix (批号: 00662399), 美国 Thermo Fisher 公司; 引物由 GENEWIZ 公司合成。

CO₂ 培养箱 (HF90 型, 上海 Heal Force 公司); 酶标仪 (MULTISKAN MK3 型, 美国 Thermo Fisher 公司); 实时荧光定量 PCR (cobas Z 480 型,

瑞士 Roche 公司); 流式细胞仪 (cytoflex 型, 美国 Beckman 公司); 低温冷冻离心机 (Fresco 型, 美国 Thermo 公司)。

1.4 含药血清制备

60 只大鼠适应性饲养 7 天后按体重排序采用随机数字表法分为恩替卡韦组、化痰祛湿活血方组、联合组、正常组, 每组 15 只。大鼠灌胃剂量采用体表面积换算公式^[8] 计算获得。恩替卡韦组给予恩替卡韦分散片 0.5 mg/(kg·d) 灌胃; 化痰祛湿活血方组给予化痰祛湿活血方颗粒剂 15 g/(kg·d) 灌胃; 联合组给予恩替卡韦分散片和化痰祛湿活血方颗粒剂, 用法同替卡韦组和化痰祛湿活血方组; 正常组给予正常饲料喂养。各组均干预 10 天。在末次给药 6 h 后腹主动脉取血, 4 °C 3000 r/min (离心半径 6 cm) 离心 10 min 取血清, 灭活, 无菌过滤器过滤、分装, -80 °C 保存备用。

1.5 细胞分组和模型制备

将 HepG 2. 2. 15 单细胞悬液浓度调整为 1 × 10⁵/ml, 按每孔 100 μl 接种于 96 孔板中。HepG 2. 2. 15 细胞完全培养液组成: 10% FBS + 1% 青链霉素混合液 + 480 μg/ml G418 + MEM 培养基。细胞培养箱温度设置为 37 °C, CO₂ 浓度为 5%。细胞实验分为 7 组: 模型组、恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组、激动剂组、联合 + 激动剂组和正常血清, 每组 3 个复孔。24 h 后细胞完全贴壁, 除正常血清组外, 其余各组均加油酸浓度为 50 μmol/L 的培养液继续培养 48 h 复制 CHB 合并 NAFLD 细胞模型^[9]; 油红 O 染色后细胞内出现较多被染成红色的脂滴证明造模成功^[10]。

1.6 MTT 法检测细胞活力

细胞造模成功后更换为药物血清培养基 100 μl/孔继续培养 48 h。恩替卡韦血清组给予 10% 恩替卡韦含药血清; 化痰祛湿活血方血清组给予 10% 化痰祛湿活血方含药血清; 联合血清组给予 10% 联合血清; 激动剂组给予 10% 正常血清 + T0901317 (浓度 10 μmol/ml); 联合 + 激动剂组给予 10% 联合血清 + T0901317 (浓度 10 μmol/ml); 模型组给予 10% 正常血清; 对照组给予 10% 正常血清。弃去上清, 加入 90 μl 新鲜培养液和 10 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃去上清, 每孔加入 110 μl 溶解液, 置摇床上震荡 10 min, 酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光值。预实验中曾用 CCK8 对药物导致的细胞毒性进行评估, 结果显示所用药物剂量对细胞毒性小, 其影响可不予考虑。细胞活

力 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HepG 2.2.15 单细胞悬液均匀接种于六孔板中, 接种密度 1×10^5 个/ml, 每孔 2 ml 培养液。24 h 后细胞贴壁, 细胞造模和药物血清干预同上, 结束后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 每组收集细胞 1×10^6 个, 冷 PBS 洗涤, 再用 1 ml Binding 缓冲液洗涤 2 次, 向管中加入 5 μ l Annexin V-FITC 后混匀, 室温避光孵育 10 min, 再加入 5 μ l PI 室温避光孵育 5 min, 加 PBS 400 μ l, 混匀后置于冰上, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。总凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。

1.8 RT-qPCR 法检测细胞中脂肪酸合成酶 (FAS)、固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、肝 X 受体 α (LXR α) mRNA 表达

HepG 2.2.15 细胞培养和干预方法同上, 基因扩增的引物序列见表 1。先按照总 RNA 提取试剂盒说明书进行 HepG 2.2.15 细胞总 RNA 提取, 逆转录成 cDNA, 按 RT-qPCR 步骤进行扩增, 以 GAPDH 为内参。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 水解 2 min; 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 40 个循环。mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}) - (\text{对照组基因 Ct 值} - \text{对照组内参基因 Ct 值})$ 。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAT	197
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	
FAS	上游 TCTGGTTCTTACGCTCTGTGC	197
	下游 CTGTGCAGTCCCTAGCTTTCC	
SREBP-1c	上游 ACAGTGAATCCCTGGCCTAT	222
	下游 GCATGGACGGGTACATCTTCAA	
LXR α	上游 CCTTCAGAACCCACAGAGATCC	83
	下游 ACGCTGCATAGCTCGTTCC	

注: FAS, 脂肪酸合成酶; SREBP-1c, 固醇调节元件结合蛋白 1c; LXR α , 肝 X 受体 α 。

1.9 细胞培养上清液中 HBV DNA 含量检测

细胞培养、造模和药物血清干预同上。取细胞上清液, 按照病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书步骤提取细胞上清液和标准品中的 HBV DNA; 然后按照 HBV 核酸定量检测试剂盒说明书步骤检测 HBV DNA 量。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s,

72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环。扩增结束后根据标准品扩增曲线, 读取待检样品中 HBV DNA 定量数据。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 满足方差齐性, 两两比较用 LSD- t 检验, 不满足方差齐性, 两两比较用 Dunnett's T^3 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组细胞活力比较

表 2 示, 对照组、模型组、化痰祛湿活血方血清组和联合血清组细胞活力比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 恩替卡韦血清组细胞活力高于其他各组 ($P < 0.01$); 激动剂组和联合 + 激动剂组细胞活力低于其他各组 ($P < 0.01$), 且联合 + 激动剂组高于激动剂组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组 HepG 2.2.15 细胞活力和凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞活力	细胞凋亡率
对照组	3	100.00 $\pm$ 0.09	9.41 $\pm$ 0.09
模型组	3	100.00 $\pm$ 4.84	9.47 $\pm$ 0.11
恩替卡韦血清组	3	119.45 $\pm$ 4.49 ^{a) c)}	7.75 $\pm$ 0.07 ^{a) c)}
化痰祛湿活血方血清组	3	104.40 $\pm$ 3.71 ^{c)}	8.30 $\pm$ 0.06 ^{b) d)}
联合血清组	3	103.82 $\pm$ 5.42 ^{c)}	6.50 $\pm$ 0.10 ^{a) c) f) g)}
激动剂组	3	79.10 $\pm$ 0.94 ^{a) c) e) g) h)}	14.96 $\pm$ 0.56 ^{a) c) e) g) h)}
联合 + 激动剂组	3	85.66 $\pm$ 1.94 ^{a) c) e) g) h) i)}	10.03 $\pm$ 0.09 ^{c) g) h) i)}

注: a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与对照组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与模型组比较, $P < 0.05$; e) 与恩替卡韦血清组比较, $P < 0.01$; f) 与恩替卡韦血清组比较, $P < 0.05$; g) 与化痰祛湿活血方血清组比较, $P < 0.01$; h) 与联合血清组比较, $P < 0.01$; i) 与激动剂组比较, $P < 0.01$; j) 与激动剂组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组细胞凋亡率比较

表 2 示, 模型组与对照组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组细胞凋亡率低于对照组和模型组, 且联合血清组低于恩替卡韦血清组和化痰祛湿活血方血清组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 激动剂组和联合 + 激动剂组细胞凋亡率高于恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组和联合血清组, 且联合 + 激动剂组低于激动剂组 ($P < 0.01$)。

2.3 各组细胞中 LXR α 、SREBP-1c、FAS mRNA 表达比较

表 3 示, LXR α mRNA 表达: 模型组、恩替卡

表 3 各组 HepG 2. 2. 15 细胞中 LXR α 、SREBP-1c、FAS mRNA 表达及 HBV DNA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LXR α mRNA /2 ⁻ ΔΔCt	SREBP-1c mRNA /2 ⁻ ΔΔCt	FAS mRNA /2 ⁻ ΔΔCt	HBV DNA 含量 / × 10 ⁵ (IU · ml ⁻¹)
对照组	3	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.09	5.07 ± 1.19
模型组	3	0.72 ± 0.05 ^{a)}	0.95 ± 0.03	1.71 ± 0.41	9.49 ± 3.78 ^{a)}
恩替卡韦血清组	3	0.77 ± 0.10 ^{a)}	0.85 ± 0.04 ^{a)}	1.83 ± 0.25	3.88 ± 0.99 ^{c)}
化痰祛湿活血方血清组	3	0.67 ± 0.04 ^{a)}	0.83 ± 0.05 ^{a)}	0.78 ± 0.04	8.91 ± 1.15 ^{c)}
联合血清组	3	0.67 ± 0.03 ^{a)}	0.75 ± 0.05 ^{a)}	0.85 ± 0.04	2.67 ± 0.26 ^{c)}
激动剂组	3	1.01 ± 0.12 ^{c)}	2.37 ± 0.06 ^{a)}	5.26 ± 0.62 ^{a)}	10.73 ± 3.72 ^{a)}
联合 + 激动剂组	3	0.77 ± 0.07 ^{a)}	1.46 ± 0.01 ^{a)}	4.59 ± 0.28 ^{b)}	7.40 ± 2.09 ^{d)}

注: LXR α , 肝 X 受体 α ; SREBP-1c, 固醇调节元件结合蛋白 1c; FAS, 脂肪酸合成酶; HBV, 乙型肝炎病毒。

a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与对照组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与模型组比较, $P < 0.05$; e) 与恩替卡韦血清组比较, $P < 0.01$; f) 与恩替卡韦血清组比较, $P < 0.05$; g) 与化痰祛湿活血方血清组比较, $P < 0.01$; h) 与联合血清组比较, $P < 0.01$; i) 与激动剂组比较, $P < 0.01$ 。

韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组、联合 + 激动剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但均低于对照组和激动剂组 ($P < 0.01$), 对照组和激动剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SREBP-1c mRNA 表达: 模型组和对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但均低于对照组、激动剂组和联合 + 激动剂组 ($P < 0.01$); 化痰祛湿活血方血清组、联合血清组低于模型组 ($P < 0.01$); 对照组、模型组均低于激动剂组和联合 + 激动剂组 ($P < 0.01$); 联合 + 激动剂组低于激动剂组 ($P < 0.01$)。FAS mRNA 表达: 对照组、模型组、恩替卡韦血清组、化痰祛湿活血方血清组、联合血清组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但均低于激动剂组和联合 + 激动剂组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 激动剂组和联合 + 激动剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组细胞培养上清液中 HBV DNA 含量比较

表 3 示, 细胞培养上清液中 HBV DNA 含量对照组低于模型组和激动剂组 ($P < 0.01$); 恩替卡韦血清组、联合血清组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 均低于模型组、化痰祛湿活血方血清组、激动剂组和联合 + 激动剂组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 模型组、化痰祛湿活血方血清组、激动剂组和联合 + 激动剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

现代医学认为, NAFLD 是一种代谢紊乱性疾病, 其具体发病机制涉及多途径、多成分的代谢。其中, 肝细胞内脂肪大量蓄积、变性是 NAFLD 发病过程的初始变化和重要特征。肝细胞长期暴露于过量脂肪酸中会引起炎症、氧化应激增加、细胞因

子释放, 最终引起肝细胞凋亡^[2]。肝细胞内脂肪蓄积是由多种因素共同作用的结果, 其中, 脂肪酸和胆固醇合成途径中一系列因子的激活致使肝细胞内脂肪酸大量合成是脂肪过量蓄积的重要因素之一, 合成途径中 LXR α 、SREBP-1c、FAS 被认为是调控脂肪酸代谢的重要转录因子^[3]。LXR α 是 LXR α 亚型之一, 属于核受体超家族成员, 主要表达于肝细胞中^[4]。SREBP-1c 是位于内质网上的膜结合转录因子, 在肝脏中表达并调节脂肪酸和胆固醇合成^[5]。FAS 是一种多功能复合酶, 是脂肪酸合成的限速酶, 其表达受 SREBP-1c 调控^[6]。LXR α 能够与 FAS 启动子结合直接促进 FAS 的转录, 也可以间接通过 SREBP-1c 途径使 FAS 的表达增加, 从而调节肝细胞内脂肪的合成^[3]。

CHB 合并 NAFLD 属中医学“胁痛”“肝着”“肝癖”范畴, 以邪毒内侵伴饮食不节、劳逸失度、情志失调等为诱因。中医学认为, 此病病机为湿热疫毒蕴结于肝, 肝失疏泄, 嗜食肥甘厚味酿生湿热, 脾失健运, 久之则气滞血瘀, 痰、湿、瘀、热互结于肝, 故治法应以化痰、祛湿、活血为主^[7-18]。化痰祛湿活血方在临床上被用于改善肝细胞脂肪变^[9], 方中泽泻利水渗湿, 丹参活血化瘀, 共为君药; 郁金行气活血, 海藻软坚消痰, 山楂消食化瘀, 共为臣药; 决明子清肝利湿, 水飞蓟清热舒肝, 共为佐药; 柴胡疏肝解郁、引药归经, 为使药。

我们以往研究^[8,19]发现, 化痰祛湿活血方能够改善 NAFLD 症状。本实验结果也显示, 经化痰祛湿活血方血清干预后, 化痰祛湿活血方血清组、联合血清组 SREBP-1c mRNA 表达量较模型组和对照组降低, 这说明化痰祛湿活血方能够影响脂代谢中 SREBP-1c 转录因子的表达, 进而对 LXR α /FAS 通路下游因子及肝细胞内脂肪合成产生影响。

T0901317 作为肝 X 受体激动剂,能够激活 LXR α /FAS 信号通路。本实验结果显示,激动剂组细胞内 LXR α 、SREBP-1c、FAS mRNA 表达量比模型组升高,而联合 + 激动剂组 LXR α 、SREBP-1c mRNA 表达量比激动剂组均降低,恩替卡韦血清组对 LXR α 、SREBP-1c、FAS mRNA 表达没有明显影响,所以上述现象可能是因为化痰祛湿活血方对 T0901317 导致的 LXR α /FAS 信号通路激活存在一定的拮抗作用。实验中还发现,化痰祛湿活血方在干预脂质代谢的同时还能够影响细胞的活力和凋亡率。本研究结果显示,恩替卡韦血清组细胞活力最高,这可能与恩替卡韦抗 HBV 有关,恩替卡韦可抑制 HBV DNA 复制,减轻病毒对细胞的损害,提高细胞活力,降低细胞凋亡率。T0901317 通过激活 LXR α /FAS 通路,导致肝细胞内脂肪酸合成酶量升高,脂肪合成增多,所以激动剂组比模型组细胞活力降低,凋亡率升高。与模型组比较,化痰祛湿活血方能够降低细胞凋亡率,化痰祛湿活血方和恩替卡韦的联合使用对降低细胞凋亡率的作用大于二者单独使用。综上分析表明,化痰祛湿活血方可能通过调控脂肪酸代谢相关基因 LXR α 、SREBP-1c、FAS 转录,进而影响肝细胞脂肪量,并最终影响细胞活力和凋亡。

HBV 是一种定居于肝细胞内的 DNA 病毒,通过与肝细胞表面特异受体结合后进入肝细胞,在细胞核内以细胞外乙型肝炎病毒 DNA (cccDNA) 形式存在^[20]。在本实验 CHB 合并 NAFLD 细胞模型中,与模型组比较,恩替卡韦血清组和联合血清组 HBV DNA 含量明显降低,表明恩替卡韦在 CHB 合并 NAFLD 细胞模型中仍然具备抑制 HBV 复制的能力,这与李知玉等^[21]观察到的结果类似。与模型组比较发现,化痰祛湿活血方对 HBV DNA 量变化无显著影响,推测可能是化痰祛湿活血方主要是调控脂肪合成。尽管激动剂组和联合 + 激动剂组 HBV DNA 在细胞上清液中降低量未达到统计学上的差异,但我们仍然能够从上述趋势中看出化痰祛湿活血方可能通过减少肝细胞内脂肪合成和含量对提高恩替卡韦抑制 HBV DNA 复制的能力有一定的积极作用。

综上所述,临床上采用恩替卡韦抗病毒的同时辅以化痰祛湿活血方干预,对改善 CHB 合并 NAFLD 患者肝细胞活力,降低凋亡率,增强恩替卡韦抗病毒疗效,延缓向肝硬化、肝癌进展会起到较好的效果。受分组过多影响,本研究未将激动剂实验也做纯中药和西药对照,有一定缺憾。另外中药

方剂一般是通过多通路和靶点起作用,本实验对其他通路和靶点未涉及,这也是今后我们关注的方向。

参考文献

- [1] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 中华肝脏病杂志,2019,27(1b):938-961.
- [2] TANG CM, YAU TO, YU J. Management of chronic hepatitis B infection: current treatment guidelines, challenges, and new development [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(20):6262-6278.
- [3] LIU J, LIANG W, JING W, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China [J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3):230-238.
- [4] CHANG TT, GISH RG, DE MAN R, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B [J]. N Engl J Med, 2006, 354(10):1001-1010.
- [5] CHANG TT, LAI CL, KEW YOON S, et al. Entecavir-treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2010, 51(b):422-430.
- [6] CHEN J, WANG ML, LONG Q, et al. High value of controlled at-tenuation parameter predicts a poor_x0007_antiviral response in patients with chronic hepatitisB [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2017, 16(4):370-374.
- [7] 吴艳琴,沈黎俊,于集虹,等. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎合并肝脂肪变的效果评价 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(5):849-852.
- [8] 赵文霞,闫乐,段荣章. 化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏病理的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14):1223-1226.
- [9] 徐宝林. 补肾活血胶囊对激素干预大鼠 BMSCs 增殖及分化的影响 [J]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [10] ZHANG RN, PAN Q, ZHANG Z, et al. Saturated fatty acid inhibits viral replication in chronic hepatitis B virus infection with nonalcoholic fatty liver disease by toll-like receptor 4-mediated innate immune response [J]. Hepat Mon, 2014, 15(15):e27909.
- [11] 杨林辉,陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立 [J]. 重庆医学, 2007, 36(8):698-700.
- [12] CHAVEZ-TAPIA NC, ROSSO N, TIRIBELLI C. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12:20. doi: 10.1186/1471-230X-12-20.
- [13] 王冰,程丽静,高政南,等. 肝 X 受体的激活对小鼠糖尿病肝脏脂肪酸合成酶表达的调节 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(1b):848-852.
- [14] SCHULTZ JR, TU H, LUK A, et al. Role of LXRs in con-

- trol of lipogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2b) : 2831 – 2838.
- [5] UMP BD, BOTOLIN D, WANG Y, et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription [J]. *J Nutr*, 2005, 135(11) : 2503 – 2506.
- [6] JOSEPH SB, LAFFITTE BA, PATEL PH, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13) : 11019 – 11025.
- [7] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. *中医杂志*, 2017, 58(19) : 1706 – 1710.
- [8] 梁浩卫, 赵文霞. 浅谈赵文霞教授治疗脂肪性肝病经验 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2018, 28(3) : 187 – 188.
- [9] 赵文霞, 张丽慧, 崔健娇. 化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠炎症损伤及纤维化的干预作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(9) : 2229 – 2231.
- [10] BECK J, NASSAL M. Hepatitis B virus replication [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1) : 48 – 64.
- [11] 李知玉, 何清, 敖飞健, 等. 化痰消脂方对慢性乙型肝炎并发非酒精性脂肪性肝病患者抗病毒治疗疗效的影响 [J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2012, 4(1) : 16 – 19.

Effect of *Huatan Qushi Huoxue Formula* (化痰祛湿活血方) Drug – Containing Serum on Virus Replication Ability and Fat Metabolism – related Gene Expression in HepG 2. 2. 15 Cell

MA Qingliang, ZHANG Lihui, LIU Minghao, GUO Min, ZHAO Wenxia

The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huatan Qushi Huoxue Formula* (HQHF, 化痰祛湿活血方) in treating chronic hepatitis B (CHB) combined with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into entecavir group, HQHF group, combination group (entecavir plus HQHF), and normal group, with 15 rats in each group. Entecavir dispersible tablets at a dose of 0. 5 mg/ (kg · d) was given by gavage in entecavir group, while HQHF granule at a dose of 15 g/ (kg · d) was given by gavage in HQHF group; both entecavir and HQHF granule with same amount mentioned above were administered in combination group; the normal group was fed as normal. Blood was collected after 10 days to prepare medicated serum. In cell experiment, there were seven groups including control group, model group, entecavir serum group, HQHF serum group, combined serum group, agonist group, and combined serum plus agonist group, with three holes in each group. In all groups except for the control group, 50 μmol/L oleic acid was used for HepG 2. 2. 15 cells to establish a CHB combined with NAFLD cell model. After modeling, the control group and the model group were given 10% normal rat serum; the entecavir serum group, HQHF serum group, and combined serum group received 10% corresponding entecavir and/or HQHF serum; the agonist group received 10% rat normal serum plus T0901317; combined serum plus agonist group was administered with entecavir and HQHF serum plus T0901317. After 48 hours of culture, the cell viability and apoptosis rate were compared among different groups; liver X receptor α (LXRA), sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS) mRNA expression, and hepatitis virus (HBV) DNA content in the supernatant cell culture were detected. **Results** There were no statistically significant differences in cell viability and apoptosis rate between the model group and the control group ($P > 0. 05$). Compared with the model group, the entecavir serum group significantly increased cell viability and decreased apoptosis rate, while the agonist group significantly decreased cell viability and increased apoptotic rate ($P < 0. 01$); and both the HQHF serum group and the combined serum group significantly decreased cell apoptosis rate ($P < 0. 05$ or $P < 0. 01$). Compared with the control group, the model group had significantly lower LXRA mRNA and higher HBV DNA content ($P < 0. 01$). Compared with those of the model group, the SREBP-1c mRNA of the HQHF serum group and the combined serum group significantly decreased, while HBV DNA content of the entecavir serum group and the combined serum group decreased ($P < 0. 01$). The LXRA, SREBP-1c, FAS mRNA and HBV DNA levels of the agonist group were significantly higher than those of the combined serum group, while the LXRA and SREBP-1c mRNA levels of the combined serum plus agonist group were lower than those of the agonist group ($P < 0. 01$). **Conclusion** HQHF may affect the fat synthesis in liver cells by regulating the expression of lipid metabolism-related genes, thereby enhancing the ability of entecavir to inhibit HBV DNA replication.

Keywords chronic hepatitis B; non-alcoholic fatty liver disease; *Huatan Qushi Huoxue Formula* (化痰祛湿活血方); virus replication; fat metabolism

(收稿日期: 2020 – 04 – 29; 修回日期: 2021 – 01 – 03)

编辑: 王利菊