

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20195696

· 论 著 ·

化学合成多肽体外抗 HBV 复制的研究

王晓芳, 范学工, 黄泽炳, 黄 燕, 陈若焯, 易盼盼, 李 宁, 胡兴旺

(中南大学湘雅医院感染病科/病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 观察人工设计并化学合成的多肽在体外乙型肝炎病毒(HBV)复制模型中对 HBV-DNA 复制、病毒标志物表达的影响,及其细胞毒性强弱,筛选高 HBV 抑制且低细胞毒性的多肽,探索多肽作为新型 HBV 抗病毒药物分子的潜力。**方法** 采用传统的甲基丙烯酸聚合物平台设计并合成的 7 种多肽(KBDT-1、2、3……7,以疏水性及阳离子电亲和力大小为依据),将 7 种化学合成多肽(10 mg/mL)、拉米夫定(1 mg/mL,阳性对照)、空白溶剂(阴性对照)作用于 HepG 2. 2. 15 细胞系,检测化学合成多肽对 HBV 的抑制作用,采用结晶紫染色法检测细胞存活率,比较各组药物对细胞毒性的强弱。选取 HBV 抑制作用最强的多肽,设置 10、1、0. 1 mg/mL 浓度梯度,分别处理 HepG 2. 2. 15 细胞 3、6、9 d 后,收集细胞上清液,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测病毒 DNA 拷贝量,化学发光微粒子免疫分析法检测 HBsAg 及 HBeAg 的变化。**结果** 从 7 种化学合成多肽中筛选出多肽 KBDT-2, RT-PCR 结果显示, KBDT-2 具有体外抗 HBV 复制作用,且药物浓度越高,抑制效果越好;化学发光微粒子免疫分析法检测显示, KBDT-2 对 HBV 生物学标志物 HBsAg 及 HBeAg 有抑制作用;结晶紫染色检测结果发现, KBDT-2 对 HepG 2. 2. 15 无明显毒性作用。**结论** KBDT-2 具有抑制 HBV 复制作用,且无明显细胞毒性,可以有效降低 HBsAg、HBeAg 表达,为探索抗 HBV 新型药物提供了实验数据支持。

[关键词] 化学合成多肽; 乙型肝炎病毒; HBV-DNA 复制; 拉米夫定

[中国分类号] R512. 6⁺ 2

Chemically synthesized polypeptides inhibit HBV replication in vitro

WANG Xiao-fang, FAN Xue-gong, HUANG Ze-bing, HUANG Yan, CHEN Ruo-chan, YI Pan-pan, LI Ning, HU Xing-wang (Department of Infectious Diseases, Key Laboratory of Viral Hepatitis of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of artificially designed and chemically synthesized polypeptides on HBV-DNA replication and expression of viral markers, as well as their cytotoxicity, screen polypeptide of high inhibition and low cytotoxicity HBV, and explore the potential of polypeptides as novel antiviral molecules for HBV. **Methods** Seven polypeptides (KBDT-1, 2, 3...7 based on hydrophobicity and cationic electroaffinity) were designed and synthesized using traditional methacrylic acid polymer platform, seven chemically synthesized polypeptides (10 mg/mL), lamivudine (1 mg/mL, positive control) and blank solvent (negative control) were applied to HepG 2. 2. 15 cell line, the inhibition effect of chemically synthesized polypeptides on HBV was detected, cell viability rate was detected by crystal violet staining, cytotoxicity of each group was compared. Polypeptide with the strongest inhibition effect on HBV was selected, concentration gradients of 10, 1 and 0. 1 mg/mL were set, after 3, 6 and 9 days of treatment on HepG 2. 2. 15 cells, the supernatant of cells was collected, copies of viral DNA were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), changes in HBsAg and HBeAg were detected by chemiluminescent microparticle immunoassay. **Results** Peptide KBDT-2 was screened from seven

[收稿日期] 2019-06-25

[基金项目] 科技部国际合作专项(2015DFA31490);国家自然科学基金(81700561、81873574);国家重大科技专项(2017YFC0908104、2018ZX10732-202);湖南省自然科学基金(2019JJ30041)

[作者简介] 王晓芳(1991-),女(汉族),湖南省益阳市人,博士研究生,主要从事肝炎与自身免疫性疾病研究。

[通信作者] 胡兴旺 E-mail:lebithu@csu.edu.cn

chemically synthesized polypeptides, RT-PCR result showed that KBDT-2 had anti-HBV replication effect in vitro, and the higher the concentration of KBDT-2, the better the inhibition effect; chemiluminescence microparticle immunoassay showed that KBDT-2 could inhibit HBsAg and HBeAg, the biological markers of hepatitis B virus; crystal violet staining result showed that KBDT-2 had no obvious toxicity to HepG 2. 2. 15. **Conclusion** KBDT-2 can inhibit the replication of HBV without obvious cytotoxicity, and can effectively reduce the expression of HBsAg and HBeAg, which provides experimental data support for exploring new anti-HBV drugs.

[**Key words**] chemically synthesized polypeptide; hepatitis B virus; HBV-DNA replication; lamivudine

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个重要的公共卫生问题。全世界约三分之一的人既往或现症感染 HBV,慢性 HBV 携带者约 3.5 亿~4 亿^[1]。HBV 感染慢性化后需要长期服抗病毒药物,往往发展为肝硬化,甚至肝细胞癌。HBV 表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)血清清除及 HBV-DNA 复制抑制是治疗 HBV 感染最重要的临床观察指标,也是慢性乙型肝炎治疗的主要目标。血清 HBsAg 是肝炎病毒感染的生物学标记, HBeAg 阳性表示患者处于高感染低应答期,而 HBV-DNA 拷贝量被认为是 HBV 复制活跃的标志,这三个指标常用来衡量 HBV 感染的情况。目前,临床治疗乙型肝炎的抗病毒药物主要有干扰素、核苷(酸)类似物等。由于慢性 HBV 感染难根治,上述药物治疗需长期使用,致病毒耐药性逐年增加,且存在多种副作用。因此临床一线抗病毒药物的选择要求药物具有低耐药率和高病毒抑制率。新型抗 HBV 药物成为医学界关注点之一。

二十世纪八十年代以来,抗微生物肽(antimicrobial peptides, AMPs)也称抗菌肽,因其对感染性微生物具有抑制作用而备受关注,被认为是最有希望的抗生素替代物^[2-3]。随着人们对抗菌肽研究的深入,其抗病毒作用也不断被挖掘,可通过多种机制阻止病毒感染过程,如疱疹病毒、肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)等都具有包膜结构,抗菌肽通过结合病毒表面包膜并使其穿孔,从而影响病毒的繁殖、组装和释放。根据目前 HBV 感染及治疗的难点,结合现已发现的抗菌肽抗病毒作用,笔者模拟天然抗菌肽的结构特点,设计并合成了一系列化学合成多肽,在体外测试化学合成多肽抗 HBV 作用,研究不仅证明了多肽抗 HBV 的可行性和有效性,也为未来寻找新的 HBV 临床治疗药物提供思

路,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HepG 2. 2. 15 细胞系购自中南大学湘雅医学院细胞库,该细胞株为重组载体 pDoLT-HBV-1 转染后的 HepG 2 细胞,可稳定分泌病毒颗粒和病毒蛋白^[4-5],广泛应用于 HBV 复制相关研究。本研究所用多肽由湖南师范大学生命与科学学院容明强教授友情提供。采用传统的甲基丙烯酸聚合物平台设计 7 种化学合成多肽。在传甲基丙烯酸聚合物基础上设计聚合物,合成侧链上带有阳离子和疏水基团的甲基丙烯酸酯,侧链基团随机分布在聚合物链中。天然存在及既往设计的抗菌肽序列中,存在丰富的赖氨酸残基,其可发挥阳离子官能团作用,通过静电引力增强抗菌肽与细菌表面的结合。因此,本研究设计的无规共聚物以伯铵基团作为阳离子来源,模拟赖氨酸残基的阳离子功能。同时为了探索净阳离子电荷和疏水性之间的平衡,疏水基团(MPHB)的摩尔百分比(基团/阳离子多聚物)从 0 到 60% 变化。基于以上原则设计了 7 种多肽,并以固相法合成。序列见表 1。阳性对照药物拉米夫定购自 Sigma 公司(Sigma PHR1365),HBsAg 检测试剂盒(ARCHITECT Anti-HBs Reagent Kit)和 HBeAg 检测试剂盒(ARCHITECT Anti-HBe Reagent Kit)购自雅培制药有限公司。HBV 核酸定量检测试剂盒购自湖南圣湘生物科技有限公司。

1.2 实验方法 将 7 种化学合成多肽(10 mg/mL)、拉米夫定(1 mg/mL,阳性对照)、空白溶剂(阴性对照)作用于 HepG 2. 2. 15 细胞系,检测化学合成多肽对 HBV 的抑制作用。

表 1 7 种化学合成多肽及序列

Table 1 Seven chemically synthesized polypeptides and their sequences

化学合成多肽	序列
KBDT-1	CKRWKKWWRKWKWC(两个 C 形成一个分子内二硫键)pI/Mw: 10.67/2236.78
KBDT-2	VKRWKKWWRKWKWF-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2276.81
KBDT-3	VKRWKKWFRKWKWW-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2276.81
KBDT-4	VKRWKKFWRKWKWW-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2276.81
KBDT-5	VKRWKKWFRKWKWV-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2189.73
KBDT-6	VKRWKKFWRKWKWV-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2189.73
KBDT-7	VKWRWKWKWRWKWKV-NH ₂ (C-末端酰胺化)pI/Mw: 12.05/2601.19

1.2.1 HBV-DNA 滴度测定 使用 HBV 核酸定量检测试剂盒对 HBV-DNA 进行检测。该试剂盒基于磁珠法,提取细胞上清液中的 HBV-DNA,使用 Taq-Man 荧光探针法,在病毒核酸序列中相对保守区设计两条特异性引物、一条特异荧光探针,通过实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR),于药物处理后第 2、4 天检测 HBV-DNA。考虑到多肽可能受细胞吸收、降解等因素影响,挑选对 HBV-DNA 复制有抑制作用的多肽,将细胞处理时间延长至 6 d 及 9 d 以检测其抗病毒作用的稳定性。

1.2.2 HBsAg 及 HBeAg 测定 为明确化学合成多肽能否对 HBsAg 及 HBeAg 产生抑制作用,使用雅培制药有限公司 HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒,检测 HepG 2.2.15 细胞培养上清液中 HBsAg 及 HBeAg 情况(药物处理后第 2、4 天)。该试剂盒基于化学发光微粒子免疫检测技术,通过将样品与试剂中包被有 HBs/HBe 抗体的顺磁微粒子孵育,冲洗后加入吖啶脂标记,再次冲洗后依次加入预激发液及激发液,定量测量化学发光强弱,计算 HBsAg 和 HBeAg 含量。全检测流程在 Abbott i2000SR 仪器(雅培)中自动完成。

1.2.3 结晶紫染色法检测细胞存活率 为观察化学合成多肽对细胞状态的影响,在药物培养过程中采用光镜观察细胞形态变化。同时在药物处理至

9 d 后,采用结晶紫染色法检测其细胞毒性作用。结晶紫可被活细胞摄取并将细胞核染成深紫色,而死亡细胞几乎不与结晶紫试剂结合,用于细胞存活检测。细胞在 37℃ 培养并药物处理后,吸去上清培养基,PBS 清洗后加入结晶紫染色液(碧云天生物技术有限公司,C0121)染色,随后弃去染色液,双蒸水充分洗涤游离染色剂,晾干后加入 1% SDS 溶液洗脱溶解。取 100 μL 于 Perkinelmer EnSight 多功能酶标仪中检测 570 nm 吸光 OD 值。

1.2.4 不同浓度的化学合成多肽抗 HBV 复制的影响 为明确不同浓度的化学合成多肽对 HBV-DNA 复制抑制的作用,选取了 HBV 抑制作用最强的多肽,设置 10、1、0.1 mg/mL 浓度梯度,分别处理 HepG 2.2.15 细胞 3、6、9 d 后,收集细胞上清液,采用 RT-PCR 检测病毒 DNA 拷贝量,化学发光微粒子免疫分析法检测 HBsAg 及 HBeAg 的变化。

1.3 数据分析 应用 Prism Graphpad 5.0 和 SPSS 22 软件对所有数据进行处理,各数据组采用 t-test, Dunnett-t test, 单因素重复测量方差分析等方法进行统计分析, P ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

$$\text{HBV-DNA 抑制率}(\%) =$$

$$\frac{(\text{空白对照组 HBV-DNA} - \text{实验组 HBV-DNA})}{\text{空白对照组 HBV-DNA}}$$

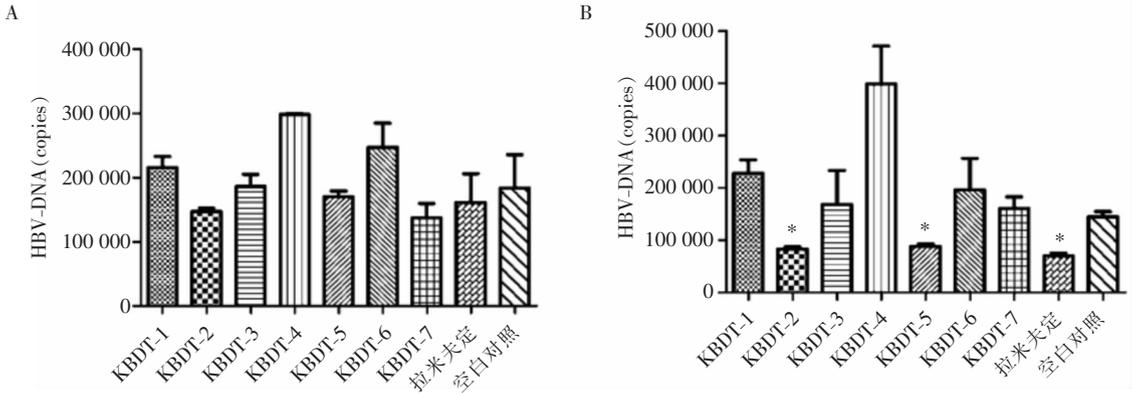
2 结果

2.1 化学合成多肽对 HBV 的抑制作用

2.1.1 化学合成多肽抑制 HBV-DNA 复制 采用 RT-PCR 法检测细胞培养上清液中 HBV-DNA 拷贝量的变化。药物处理 2 d 时,各组药物、拉米夫定对 HBV-DNA 复制无明显抑制效果;药物处理 4 d 后,KBDT-2、5 对 HBV-DNA 的抑制效果与拉米夫定类似,其余各组无明显抑制效果。见图 1。

2.1.2 化学合成多肽抑制 HBsAg 及 HBeAg 表达

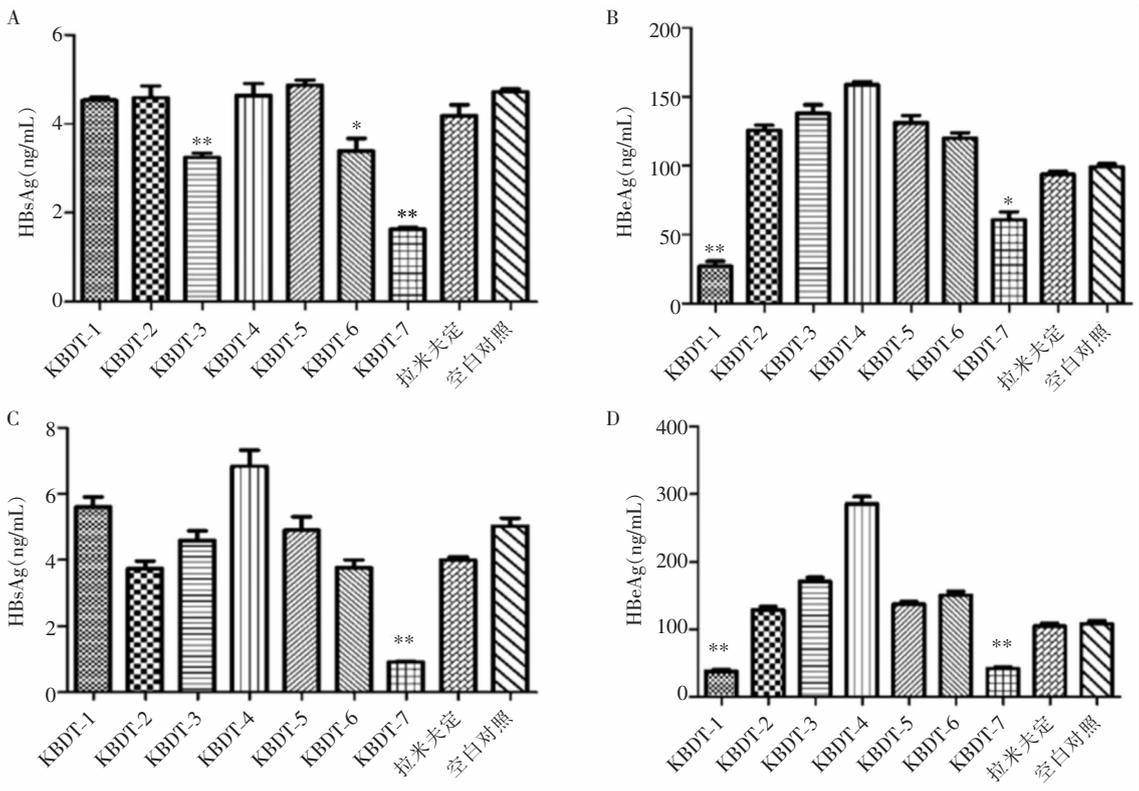
分别使用 7 种化学合成多肽、拉米夫定(阳性对照)或空白溶剂(阴性对照)处理 HepG 2.2.15 细胞,结果显示,药物处理 2 d 时,KBDT-3、6、7 对 HBsAg 有抑制效果,KBDT-1、7 对 HBeAg 有抑制效果,其余各组无明显抑制效果;药物处理 4 d 时,KBDT-7 对 HBsAg 有抑制效果,KBDT-1、7 对 HBeAg 有抑制效果,其余各组无明显抑制效果。见图 2。



A:各药物处理第 2 天 HBV-DNA 测定结果;B:各药物处理第 4 天 HBV-DNA 测定结果 (* : $P < 0.05$)

图 1 7 种化学合成多肽对 HBV-DNA 复制的影响

Figure 1 Effect of 7 chemically synthesized polypeptides on HBV-DNA replication



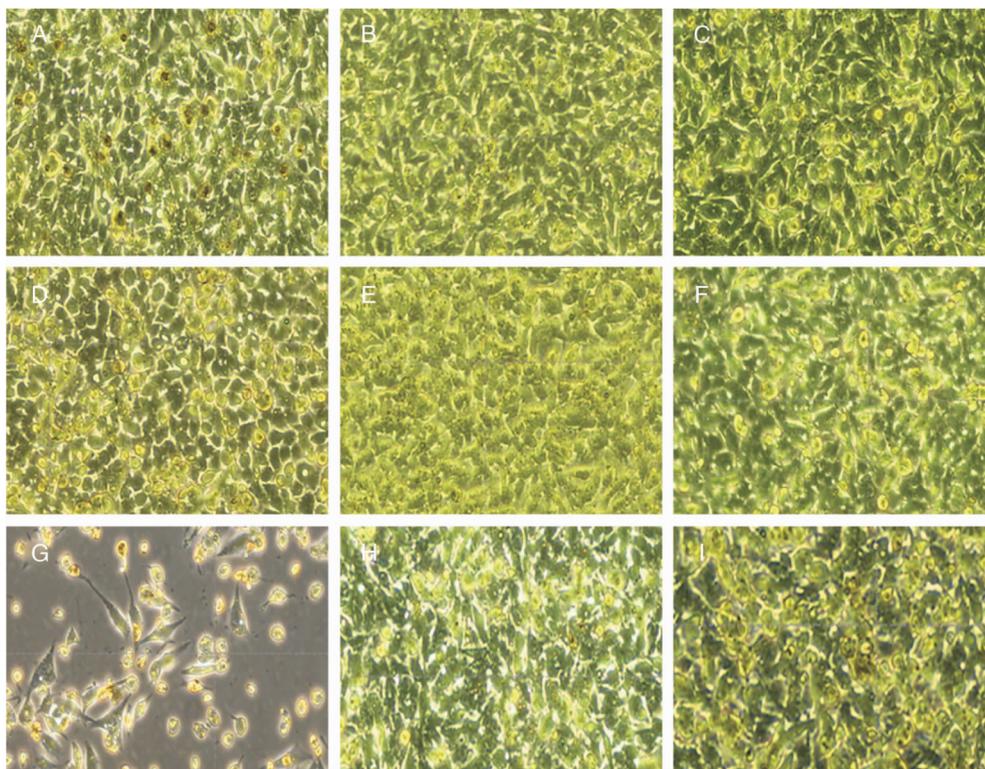
A:各药物处理 2 d 后 HBsAg 测定;B:处理 2 d 后 HBeAg 测定;C:各药物处理 4 d 后 HBsAg 测定;D:处理 4 d 后 HBeAg 测定。* : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01, n = 3$

图 2 化学合成多肽对 HBsAg 及 HBeAg 的影响

Figure 2 Effect of chemically synthesized polypeptides on HBsAg and HBeAg

2.1.3 化学合成多肽对细胞状态的影响 药物处理 4 d 后,镜下可见 KBDT-7 处理组 HepG 2.2.15 细胞数量明显减少,大片脱落,细胞变圆且透亮,细

胞大片死亡,显示 KBDT-7 对细胞毒性较大。其他 6 种多肽、阳性对照拉米夫定及阴性对照未见明显 HepG 2.2.15 细胞死亡及细胞形态变化。见图 3。



注:A~G 分别为 KBDT-1~7,H 为拉米夫定组,I 为空白溶剂处理组

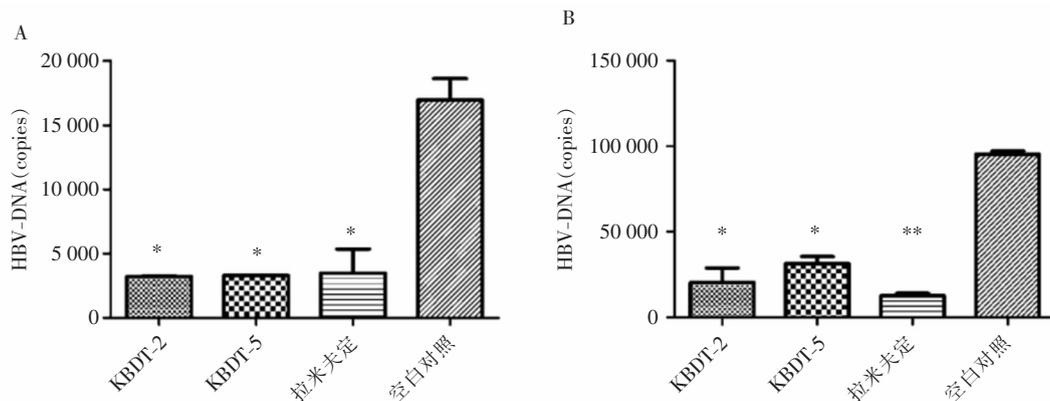
图 3 经药物处理 4 d 后 HepG 2.2.15 光镜下细胞形态(100×)

Figure 3 Cell morphology of HepG 2.2.15 under light microscope after 4 days of drug treatment (100 ×)

2.2 化学合成多肽 KBDT-2、5 具有稳定的抗 HBV 作用

2.2.1 化学合成多肽可稳定抑制 HBV-DNA 复制 上述实验证实,化学合成多肽 KBDT-2、5 可有效

抑制 HBV-DNA 复制,将细胞处理时间延长至 6 d 及 9 d 以检测其抗病毒作用的稳定性。结果显示,处理 6 d 及 9 d,KBDT-2、5、拉米夫定仍对 HBV-DNA 复制有良好抑制效果。见图 4。



A: 药物处理 6 d 时 HBV-DNA 测定;B: 药物处理 9 d 时 HBV-DNA 测定; * : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$

图 4 化学合成多肽抑制 HBV-DNA 复制稳定性测定

Figure 4 Stability of chemically synthesized polypeptides in inhibiting HBV-DNA replication

2.2.2 化学合成多肽长时间处理不影响细胞存活 将多肽 KBDT-2、5 处理 HepG 2.2.15 细胞时间

延长至 9 d,采用结晶紫染色法检测其细胞毒性作用,结果显示处理 9 d 后,与空白对照比较,KBDT-

2.5 及拉米夫定对 HepG 2. 2. 15 无明显细胞毒性作用($P>0.05$)。见图 5。

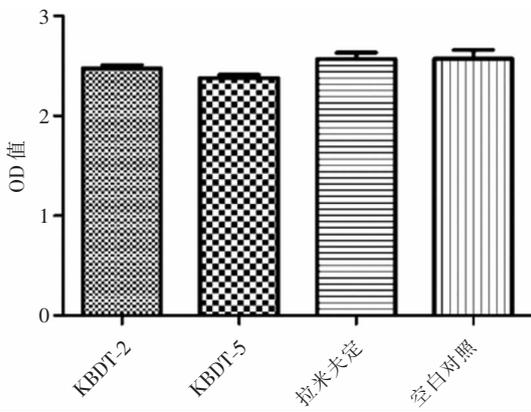


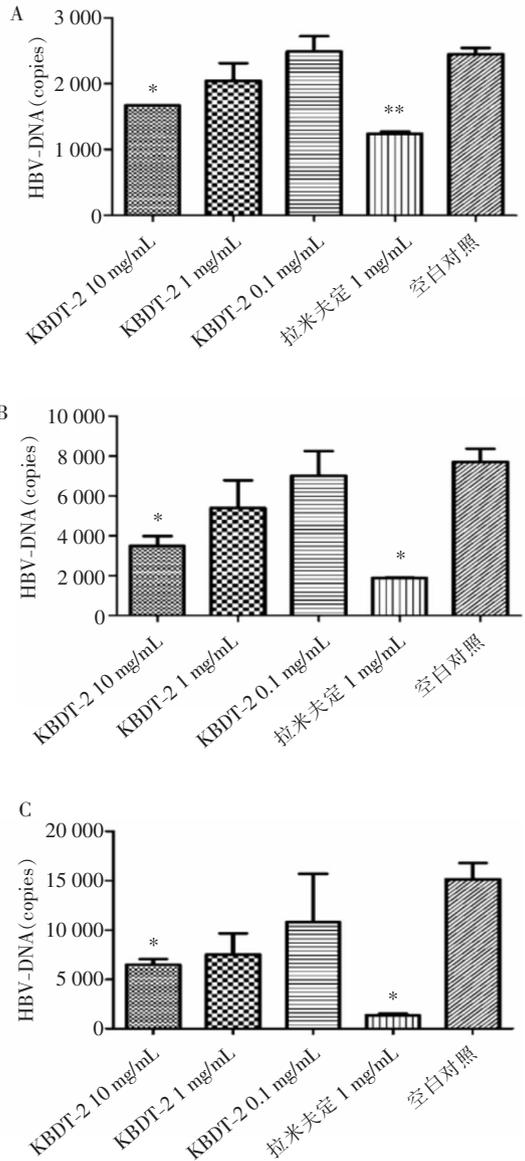
图 5 多肽 KBDT-2、5 处理 HepG 2. 2. 15 细胞 9 d 后结晶紫法检测细胞存活(OD = 570 nm, $n = 3$)

Figure 5 Cell viability detected by crystal violet staining after HepG 2. 2. 15 cells were treated with KBDT-2 and 5 for 9 days(OD = 570 nm, $n = 3$)

2.3 化学合成多肽 KBDT-2 对 HBV 抑制作用呈浓度梯度依赖

2.3.1 不同浓度的 KBDT-2 对 HBV-DNA 的抑制作用 为明确不同浓度的化学合成多肽对 HBV-DNA 复制抑制的作用,选取 HBV 抑制作用最强的多肽 KBDT-2,设置 10、1、0.1 mg/mL 浓度梯度,分别处理 HepG 2. 2. 15 细胞 3、6、9 d 后,收集细胞上清液,采用 RT-PCR 检测病毒 DNA 拷贝量。结果显示药物处理后,10 mg/mL KBDT-2、拉米夫定对 HBV-DNA 复制有抑制效果;比较 10 mg/mL 的 KBDT-2 处理 3、6、9 d HBV-DNA 抑制率分别为 36.0%、51.5%、56.3%,抑制效果在第 6 天达到高峰,单因素重复测量方差分析显示,延长处理 9 d 后仍然维持较高抑制率,不随时间延长继续升高($F = 1.240, P = 0.381$)。其余各组对 HBV-DNA 复制无明显抑制效果。见图 6。

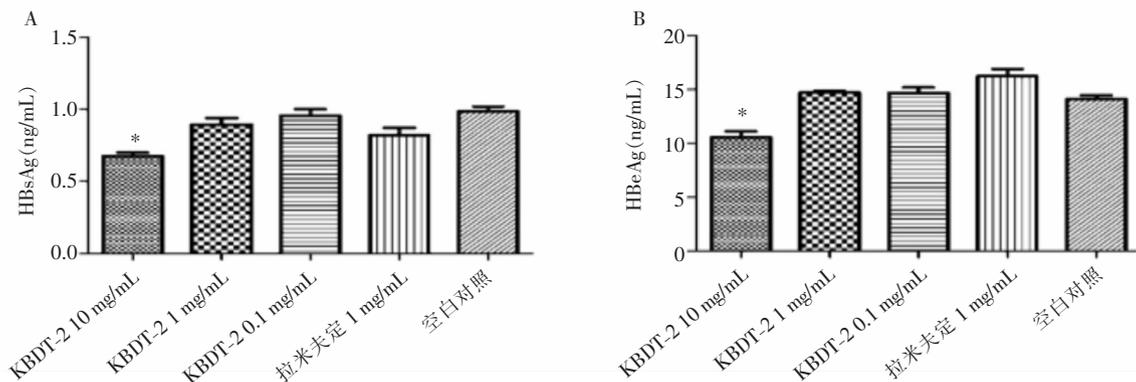
2.3.2 不同浓度化学合成多肽 KBDT-2 对 HBsAg 及 HBeAg 的作用 为明确不同浓度的 KBDT-2 对 HBsAg 及 HBeAg 的作用,同样处理后收集细胞上清液,采用化学发光微粒子免疫分析法检测 HBsAg 及 HBeAg 的变化,KBDT-2 处理 9 d 时,10 mg/mL KBDT-2 对 HBsAg、HBeAg 有抑制效果,其余各组无明显抑制效果。见图 7。



A: 药物处理第 3 天时 HBV-DNA 测定;B: 药物处理第 6 天时 HBV-DNA 测定;C: 药物处理第 9 天时 HBV-DNA 测定 (Dunnett-t test, * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$)

图 6 不同浓度梯度的 KBDT-2 对 HBV-DNA 复制影响
Figure 6 Effect of different concentration gradients of KBDT-2 on HBV-DNA replication

2.3.3 不同浓度的化学合成多肽 KBDT-2 对细胞存活的影响 采用结晶紫染色法检测不同浓度的化学合成多肽 KBDT-2 对细胞毒性作用,结果显示,处理 9 d 后,各浓度的 KBDT-2 及拉米夫定对 HepG 2. 2. 15 无明显毒性作用,见图 8。KBDT-2 (10、1、0.1 mg/mL)、拉米夫定以及空白溶剂处理 HepG 2. 2. 15 细胞 9 d 后,结晶紫法检测细胞存活相比,各组差异无统计学意义($P>0.05$)。



A: 药物处理 9 d 后 HBsAg 测定; B: 药物处理 9 d 后 HBeAg 测定 (* : $P < 0.05, n = 3$)

图 7 KBDT-2 对细胞培养上清中 HBsAg 及 HBeAg 的影响

Figure 7 Effect of KBDT-2 on HBsAg and HBeAg in cell culture supernatant

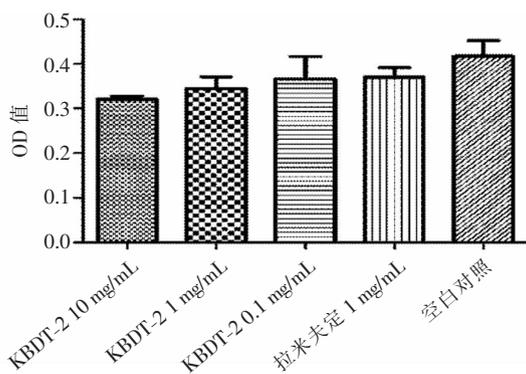


图 8 不同浓度 KBDT-2 处理 HepG 2. 2. 15 细胞 9 d 后结晶紫法检测细胞存活 (OD = 570 nm, $n = 3$)

Figure 8 Cell viability detected by crystal violet staining after HepG 2. 2. 15 cells were treated with different concentrations of KBDT-2 for 9 days (OD = 570 nm, $n = 3$)

3 讨论

HBV 是一种严重威胁世界各国人民健康的传染病, 宿主细胞中长期的 HBV 活动, 激活多种信号传导通路及激酶, 如 NF- κ B、PI3K-Akt、SAPK/JNK、Jak1-STAT、MAPK^[6], 激活促癌基因^[7], 抑制抑癌基因^[8], 改变细胞遗传学^[9]和表观遗传学性状^[10]等多种途径, 导致肝细胞癌的发生^[11-12], 因此, 有效控制慢性 HBV 复制是控制慢性乙肝病情进展、恶化的关键因素。

目前, 临床主要抗病毒药物包括干扰素与核苷类似物。由于慢性 HBV 感染难根治, 上述药物治疗需长期使用, 存在不良反应及副作用, 病毒耐药, 停药后复发等不足^[13]。研发新型、高效的抗 HBV

药物可以丰富抗 HBV 的“武器库”, 对促进 HBV 感染的治疗具有积极作用。

抗菌肽广泛存在于自然界各种微生物、植物和动物(无脊椎动物和脊椎动物)中, 具有抑制和杀灭细菌、真菌、包膜病毒等多种微生物的作用。抗菌肽作为潜在的“新型抗生素”, 具有许多天然的优点, 如相对较小的分子量(小于 25 kDa~30 kDa)、两性结构(亲水亲脂)、带阴阳离子电荷等, 有利于其结合并作用于微生物; 同时由于其天然存在于人体内, 因此, 对真核细胞杀伤作用小, 副作用少, 产生微生物耐药性的可能性较低。近期研究发现, 通过模拟天然存在的抗菌肽, 设计并合成的化学类似物, 在体外测试中展现出抗微生物的活性。如树枝状聚合物是基于丙烯酸酯单体的超分枝聚合物^[14-15], 在克服收率低和纯化难问题的同时, 其高分子量和多价结合的特性可通过空间屏蔽或竞争性抑制, 干扰病毒-宿主细胞相互作用, 从而产生抗病毒活性^[16]。另如基孔肯雅病毒(CHIKV, 基孔肯雅热的病原体)正链 RNA 转录翻译的 nsP2 蛋白酶对病毒复制至关重要。通过电脑设计针对 nsP2 蛋白酶结构的多肽, 从而抑制 nsP2 的活性, 抑制 CHIKV 复制^[17]。因此, 设计并合成的破坏病毒结构或抑制关键酶类活性的多肽, 可干扰病毒复制或感染过程, 从而达到抗病毒的目的。抗菌肽的出现为病毒感染治疗提供了新的选择^[18]。最新研究^[19]表明, 哺乳动物、植物、昆虫甚至化学合成来源的抗菌肽, 可对 HIV、疱疹病毒等产生抑制作用。与目前的抗病毒药物相比, 这类多肽具有低耐药性、快速起效、限制感染扩散等优点^[20], 因此, 本研究探索化学合成多肽对 HBV 复制抑制作用, 可为慢性乙肝治疗提供新思路。

本研究利用传统的甲基丙烯酸聚合物平台设计 7 种化学合成多肽,将 7 种化学合成多肽作用于 HepG 2. 2. 15 细胞系,研究结果显示,化学合成多肽 KBDT-2 具有体外抗 HBV-DNA 复制作用,呈剂量依赖。首先,KBDT-2 可抑制 HBsAg、HBeAg 病毒基因表达,但变化时间晚于 HBV-DNA 降低。推测这种趋势可能是由于病毒 DNA 复制受抑制后,HBsAg、HBeAg 转录或翻译过程滞后导致的抑制作用延迟。其次,KBDT-7 虽然对 HBV-DNA 等检测指标具有较强抑制作用,但伴随着大量细胞的死亡。与之形成鲜明对比的是,KBDT-2 在发挥抗 HBV 作用的同时对 HepG 2. 2. 15 无明显毒性,提示 KBDT-2 抗菌肽抗病毒作用并非通过对宿主细胞杀伤而起作用,可能通过某种未知机制作用于病毒复制过程,然而具体机制仍然有待进一步研究。根据已有报道,多肽可能通过影响 DNA、RNA 聚合酶、逆转录酶活性,或通过影响病毒复制过程中的蛋白合成以及病毒组装、成熟、释放等过程而发挥抗病毒作用效果^[21];另一方面,多肽也可能依赖负电荷静电力,与宿主细胞膜中糖胺聚糖相互作用^[22],对细胞外病毒产生竞争反应,从而抑制病毒与宿主细胞膜结合;最后多肽也可结合并破坏病毒包膜,造成病毒颗粒不稳定^[23],从而阻断病毒的感染和复制。

本研究取得了令人鼓舞的测试结果,但仍存在不足。首先,本研究仅对化学合成多肽对病毒复制,HBV 生物学标志蛋白的作用,细胞毒性等进行了观察研究,但对其中的分子机制深入挖掘不足。其次,本研究仅对化学合成多肽进行了小规模、小样本的体外细胞学研究,未进行动物实验及其他临床实验,在活体中的抗 HBV 作用效果及毒副作用有待进一步证实。最后,抗菌肽虽然展现了一定的抗 HBV 作用,但与传统药物相比,其有效性仍有待提高。值得一提的是,鉴于多肽分子结构的复杂性,化学合成多肽的抗 HBV 作用仍然具有较大优化的空间。

综上所述,本研究在分析天然抗菌肽结构特点的基础上,优化合成了多条多肽,并测试了其抗 HBV 的效果,是对传统意义上抗菌肽“抗细菌”作用的拓展、挖掘。同时与传统抗 HBV 药物相比,抗菌肽具有低耐药率、起效快、限制病原菌扩散、中和毒素、增强抗菌作用效果等诸多优势,是一种从新的机制出发抑制 HBV 的可能途径。因此,本研究不仅筛选出具有抑制 HBV 复制作用的化学合成多肽 KBDT-2,也为开发新型的抗 HBV 药物,改善 HBV 临床耐药提供实验数据支持。

致谢:感谢湖南师范大学生命科学学院容明强教授友情设计并提供抗菌肽。

[参 考 文 献]

- [1] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. *Vaccine*, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [2] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(15): 5449-5453.
- [3] Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D933-D937.
- [4] Zhu X, Xie C, Li YM, et al. TMEM2 inhibits hepatitis B virus infection in HepG 2 and HepG 2. 2. 15 cells by activating the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2239.
- [5] Wang J, Li N, Huang ZB, et al. HBx regulates transcription factor PAX8 stabilization to promote the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, 38: 6696-6710.
- [6] Han B, Wu J. Dcr3 protects islet beta cells from apoptosis through modulating Adcyap1 and Bank1 expression[J]. *J Immunol*, 2009, 183(12): 8157-8166.
- [7] Fu S, Wang J, Hu X, et al. Crosstalk between hepatitis B virus X and high-mobility group box 1 facilitates autophagy in hepatocytes[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(3): 322-338.
- [8] Chen BC, Wu WT, Ho FM, et al. Inhibition of interleukin-1 beta-induced NF-kappa B activation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase occurs through Akt activation associated with interleukin-1 receptor-associated kinase phosphorylation and uncoupling of MyD88[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24169-24179.
- [9] Huang YK, Fan XG, Qiu F, et al. Genomics of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and adjacent noncancerous tissues with cDNA microarray[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 2057-2064.
- [10] Yu S, Li N, Huang Z, et al. A novel lncRNA, TCONS_00006195, represses hepatocellular carcinoma progression by inhibiting enzymatic activity of ENO1[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1184.
- [11] Chan SL, Wong VW, Qin S, et al. Infection and cancer: the case of hepatitis B[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(1): 83-90.
- [12] Fu S, Zhou RR, Li N, et al. Hepatitis B virus X protein in liver tumor microenvironment[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15371-15381.
- [13] 陈若蝉,刘振国,范学工. DAA 与 HCC——丙肝治疗新时期的挑战[J]. *中国感染控制杂志*, 2018, 17(5): 369-372.

- [14] McCarthy TD, Karellas P, Henderson SA, et al. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention[J]. *Mol Pharm*, 2005, 2(4): 312 - 318.
- [15] Toms S, Carnachan SM, Hermans IF, et al. Poly ethoxy ethyl glycinamide (PEE-G) dendrimers: dendrimers specifically designed for pharmaceutical applications[J]. *ChemMedChem*, 2016, 11(15): 1583 - 1586.
- [16] Pini A, Giuliani A, Falciani C, et al. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2665 - 2672.
- [17] Das PK, Puusepp L, Varghese FS, et al. Design and validation of novel chikungunya virus protease inhibitors[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(12): 7382 - 7395.
- [18] Ahmed A, Siman-Tov G, Hall G, et al. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections[J]. *Viruses*, 2019, 11(8), pii: E704.
- [19] 黎观红, 洪智敏, 贾永杰, 等. 抗菌肽的抗菌作用及其机制[J]. *动物营养学报*, 2011, 23(4): 546 - 555.
- [20] Sierra JM, Fuste M, Rabanal F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(6): 663 - 676.
- [21] Wilson SS, Wiens ME, Smith JG. Antiviral mechanisms of human defensins[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(24): 4965 - 4980.
- [22] Joo HS, Fu CI, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1695), pii: 20150292.
- [23] Wilmes M, Cammue BP, Sahl HG, et al. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation[J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(8): 1350 - 1358.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式: 王晓芳, 范学工, 黄泽炳, 等. 化学合成多肽体外抗 HBV 复制的研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(10): 893 - 901. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195696.

Cite this article as: WANG Xiao-fang, FAN Xue-gong, HUANG Ze-bing, et al. Chemically synthesized polypeptides inhibit HBV replication in vitro[J]. *Chin J Infect Control*, 2019, 18(10): 893 - 901. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195696.