

金丝桃素抗乙型肝炎病毒作用及机制的体外研究*

蓝天云^{1,2}, 范红^{1,2}, 陈勇彬³, 杨翠萍³, 赵兴旺¹, 李岩^{1,2△}

(1. 昆明理工大学医学院, 昆明 650032; 2. 云南省第一人民医院消化内科, 昆明 650032;

3. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

[摘要] **目的** 从细胞水平评价金丝桃素(HY)的抗乙型肝炎作用,并初步探寻其药物作用靶点。**方法** 选择可分泌乙型肝炎病毒的肝细胞株 HepG2. 2. 15 为实验对象, HY 为 HY 组, 拉米夫定(3TC)为 3TC 组, 去离子水为空白对照组, 对细胞进行分组给药。给药 72 h 后, 采用 Southern 印记杂交及荧光定量 PCR 检测病毒 HBV-DNA 的复制水平; ELISA 检测 HBV 表面抗原(HBsAg)和 HBVe 抗原(HBeAg)的抑制率; 采用 Northern blot 与荧光定量 PCR 检测 pgRNA 的表达水平; Western blot 及荧光定量 PCR 检测调控因子肝细胞核因子 3(HNF3 β)、肝细胞核因子 4(HNF4 α)、过氧化物酶体增殖激活受体/视黄受 X 受体(PPAR α /RXR α)的表达水平。**结果** 与空白对照组相比, HY 组与 3TC 组对 HepG2. 2. 15 细胞中的 HBV DNA 及 HBsAg、HBeAg 的表达有明显抑制作用($P < 0.05$)。与空白对照组相比, HY 可显著减少 pgRNA 的表达($P < 0.05$), 而 3TC 无明显变化($P > 0.05$)。与空白对照组和 3TC 组相比, HY 对调控因子 HNF3 β 与 HNF4 α 的表达有显著影响($P < 0.05$), 但对 PPAR α 和 RXR α 的表达无影响($P > 0.05$)。**结论** HY 具有强效抗乙型肝炎病毒作用, 且其可使负向调控因子 HNF3 β 的表达升高并降低正向调控因子 HNF4 α 的表达。提示其药物作用靶点可能为 pgRNA。

[关键词] 肝炎, 乙型; 肝炎病毒, 乙型; 金丝桃素; DNA, 病毒; pgRNA; 肝富集转录因子

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)01-0040-04

In vitro study on anti-HBV effects and mechanism of hypericin*

Lan Tianyun^{1,2}, Fan Hong^{1,2}, Chen Yongbin³, Yang Cui ping³, Zhao Xingwang¹, Li Yan^{1,2△}

(1. Medical College, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China;

2. Department of Gastroenterology Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China;

3. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the anti-HBV effect of hypericin from the cellular level and to preliminarily explore its potential drug target point. **Methods** Liver cell line HepG2. 2. 15 cells secreting HBV particles were selected as the experimental objects. Hypericin served as the HY group, lamivudine was taken as 3TC group and deionized water as the blank control group. The cells were grouped and administrated. The HBV-DNA copy level was measured at 72 h after medication by Southern blot and fluorescent quantitative PCR; the inhibition rate of HBsAg and HBeAg was detected by using ELISA assay; the pgRNA expression level was tested by using Northern blot and fluorescent quantitative PCR; Western blot and fluorescent quantitative PCR were adopted to detect the expression of regulatory factors including HNF3 β , HNF4 α , PPAR α and RXR α . **Results** Compared to the blank control group, both hypericin and lamivudine had significant inhibiting effect on HBV DNA and expression level of HBsAg and HBeAg in HepG2. 2. 15 cells ($P < 0.05$). Hypericin could significantly decrease the pgRNA expression compared with the blank control group ($P < 0.05$), while lamivudine had no obvious change ($P < 0.05$). Moreover, hypericin exhibited significant effects on the expression of HNF3 β and regulatory factor HNF4 α compared with the blank control group and 3TC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypericin represents a strong anti-HBV effect, moreover could increase the negative regulatory factor HNF3 β expression and decreases the positive factor HNF4 α expression, prompting that its drug target point could be pgRNA.

[Key words] hepatitis B; hepatitis B virus; hypericin; DNA, viral; pregenomic RNA; liver enriched transcription factor

乙型病毒性肝炎(简称乙肝)是由乙型嗜肝 DNA 病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种世界范围内的传染性疾病,对人类健康危害重大^[1]。目前,国际上应用最广泛的抗 HBV 药物是核苷类化合物,代表药物有拉米夫定(lamivudine, 3TC)、替比夫定(sebivo)等^[2],其作用靶点为 HBV DNA 聚合酶/逆转录酶^[3-4]。但长期应用核苷类药物时,编码 HBV DNA 聚合酶/逆转录酶的基因区域发生点突变使酶活性部位变化而

产生病毒变异株和耐药株^[5],从而使得抗病毒效果大为下降,因此,寻找新的抗病毒药物靶点成为乙肝研究中的重点与热点。HBV 前体 RNA(pregenomic RNA, pgRNA)是乙肝复制过程中的重要中间体,其表达量下调,不仅可以减少生成核衣壳的核心蛋白的表达,更能直接减少病毒逆转录生成新的 HBV DNA^[6]。因此,pgRNA 是目前 HBV 复制过程中的关键点,也是目前抗 HBV 新靶点的研究热点。

表 1 荧光定量 PCR 引物

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	序列长度(bp)
HBV DNA ^[8]	TCCTCTTCATCCTGCTGCTATG	CGTGCTGGTAGTTGATGTTCTCT	107
pgRNA ^[8]	CTCAATCTCGGGAATCTCAATGT	TGGATAAAACCTAGCAGGCATAAT	231
HNF3 β ^[9]	AGGAGGAAAACGGGAAAGAA	CAACAACAGCAATGGAGGAG	134
HNF4 α ^[10]	AGCTGCAGATCGATGACAATGAG	CATACTGGCGGTCTGTTGATGTAG	153
PPAR α ^[11]	CATTACGGAGTCCACGCGT	ACCAGCTTGAGTCCAATCGTT	68
RXR α ^[12]	ACATTTCTGCGCTCGATT	ATGTCTCGCTGCTGCTGAC	309
GAPDH ^[10]	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138

金丝桃素(hypericin, HY)是贯叶连翘等 HY 植物的主要活性成分之一。本课题组的前期研究显示, HY 具有强效抗 HBV 活性, 但对 HBV DNA 聚合酶/逆转录酶无抑制作用, 而可以明显下调 pgRNA 表达水平, 提示其药物作用靶点可能与 pgRNA 相关^[7]。pgRNA 主要是通过肝富集转录因子(liver enriched transcription factor, LETFs)肝细胞核因子 3(HNF3), 肝细胞核因子 4(HNF4), 过氧化物酶体增殖激活受体/视黄素 X 受体(PPAR α /RXR α)调控。因此, 本实验对 HY 抗 HBV 作用进行验证, 并在此基础上对 HY 的可能靶点 pgRNA 及靶点相关调控因子的表达进行了更加深入的研究。

1 材料与与方法

1.1 材料 可分泌 HBV 活病毒的肝细胞株 HepG2. 2. 15 由武汉同济医院肝病研究所馈赠 HY(95%, HPLC)购自 Sigma 公司; 3TC 由武汉同济医院肝病研究所馈赠。高糖 DMEM 培养液及胎牛血清购自 GIBCO 公司; 胰酶购自碧云天公司; 地高辛标记及检测试剂盒购自 Roche; HBV 表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)和 HBV e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)检测试剂盒购自上海科华生物工程公司; 反转录试剂盒及 SYBRGreen 荧光定量 PCR 检测试剂盒均购自 Bio-rad 公司; AxyPrep 液体病毒 DNA/RNA 提取试剂盒及总 RNA 小量制备试剂盒; 试验所用抗体一抗及二抗体均购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及化合物干预 将细胞以 $(1\sim 2)\times 10^6$ 接种于 10 cm 培养皿中, 所有细胞均使用含有 10% 小牛血清的培养基培养。细胞培养 24 h 后, 细胞分为 3 组, 分别为空白对照组、HY 组及 3TC 组。去离子水加入空白对照组的细胞的培养基中; 3TC 以半数有效浓度 $1.0\ \mu\text{mol/L}$ 为终浓度加入 3TC 组细胞的培养基中; HY 以半数有效浓度 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ 为终浓度加入 HY 组细胞的培养基中, HY 的配制与给药均在弱光条件下进行, 给药后, 将 HY 置于 $4\ 000\ \text{W/m}^2$ 光源下照射 1 h 后, 放入 $37\ ^\circ\text{C}$, 5%CO₂ 的培养箱中培养。24 h 更换一次培养基, 72 h 后进行指标检测。

1.2.2 HBV DNA 复制水平检测 使用 AxyPrep 液体病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒提取 HepG. 2. 2. 15 细胞培养基中细胞分泌的 HBV DNA, 具体方法如下: 取 $250\ \mu\text{L}$ 样品, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 裂解液, 振荡混匀, 静置 5 min 后加入 $125\ \mu\text{L}$ 蛋白去除液, $125\ \mu\text{L}$ 蛋白沉淀液, 混匀后 $12\ 000\times g$ 离心 5 min, 转入制备管中, $5\ 000\times g$ 离心 1 min 后, 弃去滤液, 加入 $700\ \mu\text{L}$ 洗涤液, $6\ 000\times g$ 离心 1 min, 并重复洗涤 1 次, $12\ 000\times g$ 离心

1 min, 用 $60\ \mu\text{L}$ 去离子水洗脱。取各组所提取的 DNA 样品 $30\ \mu\text{g}$, 使用 Southern 印记杂交(Southern blot)检测 HBV DNA 的复制情况, 尼龙膜转印, 紫外交联, 使用地高辛标记试剂盒标记的 HBV DNA 探针杂交过夜, 化学发光显影。取各组 DNA 样品, 使用染料法荧光定量 PCR, 检测 HBV DNA 复制水平, 引物列表见表 1。使用 Bio-rad 荧光定量 PCR 仪进行检测。95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^\circ\text{C}$ 15 s; 60 $^\circ\text{C}$ 1 min 扩增 40 个循环。

1.2.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率 吸取不同药物处理后的各组细胞上清液, 用 ELISA 法测定细胞上清液中的 HBsAg 和 HBeAg 抗原量, 具体方法为: 设置空白对照与阴性、阳性对照组各两孔, 每个实验样品设置 3 个复孔, 每孔加入相应样品 $50\ \mu\text{L}$, 除空白对照孔外每孔加入酶结合物 $50\ \mu\text{L}$, 加盖封板膜, 振荡混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 1 h 后弃反应液, $50\ \mu\text{L}$ 洗液反复洗涤 5 次, 加入显色液, 加封板膜振荡混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 避光显色 15 min, 显色终止后在酶标仪 $450\ \text{nm}$ 波长处进行扫描。

1.2.4 总 RNA 的提取与目标 mRNA 表达水平检测 收集 HepG2. 2. 15 各组细胞, 使用 AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒提取所收集细胞中的总 RNA, 具体步骤如下。收集各组细胞, 加入 $400\ \mu\text{L}$ 细胞裂解液, 漩涡振荡, 加入 $150\ \mu\text{L}$ 裂解中和液, 漩涡振荡, $12\ 000\times g$ 离心 5 min, 取上清液, 加入 $250\ \mu\text{L}$ 异丙醇, 混合均匀后转移至制备管中, $6\ 000\times g$ 离心 1 min, 弃滤液, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 洗涤液, $12\ 000\times g$ 离心 1 min, 弃去滤液, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 去盐液, $12\ 000\times g$ 离心 1 min, 重复洗涤 1 次后 $1\ 200\times g$ 离心 1 min, 使用 $100\ \mu\text{L}$ RNase-free 水洗脱。取各组所提取的总 RNA $10\ \mu\text{g}$, 进行 Northern 印记杂交(Northern blot)检测 pgRNA 表达水平尼龙膜印迹, 地高辛标记试剂盒标记的 pgRNA 探针杂交, 化学发光显影。取各组所提取的总 RNA $1\ \mu\text{g}$ 进行反转录, 得到 cDNA, 使用染料法荧光定量 PCR 检测 pgRNA 及各肝富集因子 mRNA 的表达水平进行检测, 引物列表见表 1。

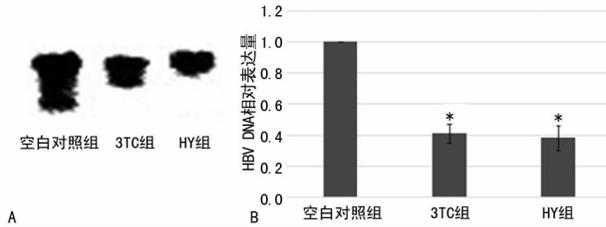
1.2.5 总蛋白提取及指标检测 将收集细胞使用 RIPA Lysis Buffer [$50\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl (pH7. 4) + $150\ \text{mmol/L}$ NaCl + 1% NP-40 + PMSF] 进行重悬, 冰上放置 10 min 后, 将装有细胞悬液的 EP 管放入液氮中反复冻融 2~3 次。4 $^\circ\text{C}$ $13\ 000\ \text{r/min}$ 离心 20 min, 取上清液。取各组所提取蛋白 $20\ \mu\text{g}$, Western blot 检测肝富集因子 NF3 β , HNF4 α , PPAR α /RXR α 的表达水平, β -actin 为内参基因, 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜印迹, 所用抗体均购自 abcam 公司, 化学发光法显影。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS13.0 进行分析, 计量

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HY 对 HBV DNA 复制的影响 HY 作用可分泌活病毒的 HepG2. 2. 15 细胞后, 对 HBV DNA 的 Southern blot 检测表明, 与空白对照组相比, HY 组与 3TC 组 HBV DNA 的表达有明显下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。荧光定量 PCR 的结果同样表明了相同的结果, 见图 1。



*: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。A: Southern blot 检测 HBV DNA 表达; B: 荧光定量法检测 HBV DNA 表达。

图 1 药物处理后各组 HBV DNA 的表达变化

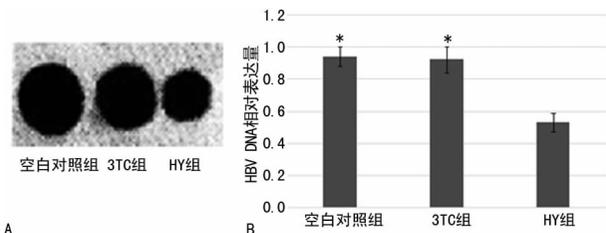
2.2 HY 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率 实验同时用 ELISA 法检测了各组 HBsAg 和 HBeAg 在药物处理后的表达变化。3TC 组、HY 组与空白对照组相比, HBsAg 和 HBeAg 的抑制率均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 HY 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	HBsAg 抑制率(%)	HBeAg 抑制率(%)
空白对照组		1.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.4
3TC 组	1.0	32.4 \pm 4.2 ^a	41.2 \pm 5.5 ^b
HY 组	0.5	34.6 \pm 5.1 ^a	42.7 \pm 5.2 ^b

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

2.3 HY 对 pgRNA 的表达水平的影响 Northern blot 结果显示 HY 组与 3TC 组及空白对照组相比, HepG2. 2. 15 细胞株 pgRNA 下降明显 ($P < 0.05$), 但 3TC 组及空白对照组相比, pgRNA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。荧光定量 PCR 的结果显示与 Northern blot 一致, 见图 2。

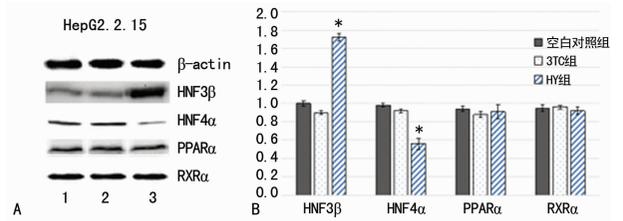


*: $P < 0.05$, 与 HY 组比较。A: Northern blot 检测 pgRNA 表达; B: 荧光定量法检测 pgRNA 的表达。

图 2 给药后各组 pgRNA 的表达变化

2.4 HY 对各肝富集因子的影响 研究分别从 mRNA 与蛋白质水平初步探查了 HY 和调控 pgRNA 转录的几个相关的肝富集转录因子的表达水平。HepG2. 2. 15 细胞组的 Western blot 结果与荧光定量 PCR 结果 (图 3) 相同, HY 组与空白对照组相比, HepG2. 2. 15 细胞株 HNF3 β 的表达明显升高 ($P < 0.05$), HNF4 α 表达降低 ($P < 0.05$), 而 PPAR α 和 RXR α 的表

达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但 3TC 组与空白对照组相比, 4 种调控因子均无明显表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



*: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。1: 空白对照组; 2: 3TC 组; 3: HY 组, β -catin 为内参。A: Western blot 检测肝富集因子表达; B: 荧光定量法检测肝富集因子表达。

图 3 给药后检测各组肝富集因子表达变化

3 讨论

现有的抗 HBV 药物中, 主要以核苷类化合物为主, 在临床的应用过程中, 耐药株与变异株的产生导致药物疗效明显下降, 所以寻找新的抗病毒药物靶点成为乙肝研究中的重点与热点。许多研究分别从 HBV 周期中的不同阶段寻找 HBV 新靶点。Krepstakies 等^[13] 发现人工合成的抗脂多肽端可以结合硫酸乙酰肝素以抑制 HBV 和 HCV 等包膜病毒进入宿主细胞。Park 等^[14] 发现 shRNA 可诱导 HBV cccDNA 甲基化, 从而降低其转录活性。Cai 等^[15] 发现了可抑制 RC DNA 转化成 cccDNA 的磺胺类替代物 CCC-0975 和 CCC-0346。有研究筛选对 HBV DNA 的复制有抑制作用的 siRNA, 这些 siRNA 可以作为未来基因治疗的备选方案^[16-17]。

在众多新靶点研究中, pgRNA 由于其在病毒复制中的多重角色与关键身份成为了研究的热门。因为 pgRNA 是乙肝复制过程中的重要中间体, 其不仅是 HBcAg 与 HBeAg 的翻译模板, 同时也是 HBV DNA 的反转录模板^[18-19]。因此, 如果 pgRNA 表达量下调, 势必会抑制 HBV DNA 的复制。pgRNA 长 3.5×10^3 , 由 Cp 启动子转录 HBV 基因组 C 开放阅读框生成, Cp 启动子含有特异的 DNA 结合位点, 蛋白质调控因子结合特异性与之结合可以直接调节其活性^[20]。这些蛋白质调控因子主要有肝富集转录因子, 如: HNF3 β 、HNF4 α 和 PPAR α /RXR α ^[21]。现已有多篇文章报道了通过降低 pgRNA 的表达来抑制 HBV DNA 的表达: 合成的 Phenylpropanamide 衍生物 AT-130 可以通过阻碍胞内 pgRNA 的壳体化过程^[22]。而另一研究发现的缺失一个 DNA 结合域的小异源二聚体 (small heterodimer partner, SHP) 与 Yeo 从中国台湾杉芯材中分离出的木酚素化合物 (helioxanthin) 则是通过影响调控 Cp 启动子调控因子表达水平, 降低 Cp 启动子的活性来抑制 pgRNA 的转录^[20, 23]。

有研究表明, HY 有广泛抗包膜病毒的作用, 对鼠巨细胞病毒、艾滋病病毒、单纯疱疹病毒以及鸭乙肝病毒均有较好的抑制作用^[24]。本课题组前期研究发现, HY 对 HepG2. 2. 15 中的 HBV DNA 的复制有明显抑制作用^[7]。但其对核苷类药物靶点 HBV DNA 聚合酶/逆转录酶无抑制作用, 证明其作用机制与核苷类药物不同^[7]。此次研究结果表明, HY 具有强效抗 HBV 活性, 且可引起 pgRNA 的表达水平的降低; 而 3TC 组, 不影响 pgRNA 的表达, 提示 HY 的药物靶点可能与 pgRNA 相关。

pgRNA 是 HBs 和 HBe 蛋白的翻译模板,但众多研究已经证实,下游产物 HBs 和 HBe 对 pgRNA 的生成不具有调节作用^[25]。因此 pgRNA 的表达由上游转录部分调控。肝富集调控因子 HNF3 β 、HNF4 α 和 PPAR α /RXR α 等蛋白调控因子可以与上游转录部分特定定位点结合,调控 pgRNA 的表达^[19]。Tang 等^[26]在 NIH3T3 细胞中分别共转染 HBV DNA 与各肝富集因子表达质粒实验中发现,HNF3 β 对 HBV 的复制有抑制作用而 HNF4 α 和 PPAR α /RXR α 对 HBV 的复制起正向调控的作用^[19,27]。本研究为了进一步探究 HY 如何作用于 pgRNA,实验在药物干预后,检测了 HepG2. 2. 15 细胞中的四种调控因子表达水平。结果显示,HY 在肝脏细胞中能使 pgRNA 表达下调的肝富集因子 HNF3 β 蛋白表达水平升高,使 pgRNA 表达上调的 HNF4 α 蛋白表达水平下降。而另外两种调控因子 PPAR α /RXR α 表达无变化。这说明 HY 有可能作用于调控 pgRNA 转录的肝富集因子 HNF3 β 、HNF4 α ,使其表达水平发生变化,从而使 pgRNA 的表达降低。

本研究对 HY 抗 HBV 的靶点进行了初步的探寻,实验结果显示其可能通过调控 HNF3 β 与 HNF4 α 的表达水平以抑制 pgRNA 的转录活性。下一步拟在非肝源细胞系中通过转染各调控因子来研究 HY 抗病毒作用机理,对这些机理的深入研究不仅为 HY 对 pgRNA 的作用及抗病毒机制得到阐明,也为其将来的临床应用提供实验基础。

参考文献

[1] Chatterjee K. An improved NAT assay with enhanced sensitivity for HBV for donor blood screening[J]. *J Lab Physicians*, 2012, 4(2): 127.

[2] Alexander HK, Bonhoeffer S. Pre-existence and emergence of drug resistance in a generalized model of intra-host viral dynamics[J]. *Epidemics*, 2012, 4(4): 187-202.

[3] Gagey D, Ravetti S, Castro EF, et al. Antiviral activity of 5'-O-carbonate-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine prodrugs against hepatitis B virus in HepG2 2. 2. 15 cells[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(6): 566-569.

[4] Bertoli A, Giovannini A, Ruffoni B, et al. Bioactive constituent production in *St. John's Wort* in vitro hairy Roots. Regenerated plant lines[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(13): 5078-5082.

[5] Fernandes H, Konieczna M, Kolodziejczyk R, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of Hyp-1, a *St. John's wort* protein implicated in the biosynthesis of hypericin [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(5): 405-408.

[6] Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Verbeeck J, et al. Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(3): 379-389.

[7] 李岩, 汤敏, 安琪, 等. 金丝桃素体外抗乙型肝炎病毒的作用[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(8): 459-462.

[8] Xu WS, Zhao KK, Miao XH, et al. Effect of oxymatrine on

the replication cycle of hepatitis B virus in vitro[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 30(16): 2028-2037.

[9] Pethe P, Nagvenkar P, Bhartiya D. Polycomb group protein expression during differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic lineage in vitro[J]. *BMC Cell Biol*, 2014, 15(8): 18.

[10] Cui L, Shi Y, Zhou X, et al. A set of microRNAs mediate direct conversion of human umbilical cord lining-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(11): e918.

[11] Alexandra R, Carine L, Rozenn J, et al. Comparative gene expression profiles induced by PPARc and PPARa/c agonists in human hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18816.

[12] Guérit D, Philipot D, Chuchana P, et al. Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62582.

[13] Krepstakies M, Lucifora J, Nagel CH, et al. A new class of synthetic peptide inhibitors blocks attachment and entry of human pathogenic viruses[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(11): 1654-1664.

[14] Park HK, Min BY, Kim NY, et al. Short hairpin RNA induces methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in human hepatoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2): 152-155.

[15] Cai D, Mills C, Yu W, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(8): 4277-4288.

[16] Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line[J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 842-850.

[17] Liu J, Guo Y, Xue CF, et al. Effect of vector-expressed siRNA on HBV replication in hepatoblastoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(13): 1898-1901.

[18] Mohamadkhani A, Pourdadash A, Tayebi S, et al. The potential role of APOBEC3G in limiting replication of hepatitis B virus[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2012, 13(4): 170-173.

[19] Seitz G, Krause R, Fuchs J, et al. In vitro photodynamic therapy in pediatric epithelial liver tumors promoted by hypericin [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(5): 1277-1282.

[20] Oropeza CE, Li L, McLachlan A. Differential inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by the small heterodimer partner[J]. *J Virol*, 2008, 82(8): 3814-3821.

[21] Mogilenko DA, Dizhe EB, Shavva VS, et al. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(50): 11950-11960.

[22] Delaney WE, Edwards R, Colledge D, et al. Phenylpropanamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication(下转第 47 页)

- [9] Pietrolongo E, Giordano A, Kleinfeld M, et al. Decision-making in multiple sclerosis consultations in Italy: third observer and patient assessments[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e60721.
- [10] Linker RA, Lühder F, Kallen KJ, et al. IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 205(1/2): 64-72.
- [11] Shiryayev SA, Savinov AY, Cieplak P, et al. Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2009, 3(4):e4952.
- [12] Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis[J]. *Mult Scler*, 2007, 13(5):687-690.
- [13] Prat A, Biemacki K, Lavoi JF, et al. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium [J]. *Arch Neurol*, 2002(59):391-397.
- [14] Tomioka R, Matsui M. Biomarkers for multiple sclerosis [J]. *Intern Med*, 2014, 53(5):361-365.
- [15] Cantagrel A, Navaux F, Nourhashemi F, et al. Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-24, and interleukin-10 gene polymorphisms[J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6):1093-1100.
- [16] 孙雅菲, 高娟, 檀国军, 等. 阿托伐他汀对实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠 TNF- α 和 iNOS 表达的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(9):533-536.
- [17] 李婧, 曾丽, 邹东华. 外源性雄激素对 EAE 大鼠血中 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 34(2):115-117.
- [18] Sun D, Newman TA, Perry VH, et al. Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004, 30(4):374-384.
- [19] Ivanov H, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells[J]. *Cell*, 2006(126):1121-1133.
- [20] Chung IY, Norris JG, Benveniste EN. Differential tumor necrosis factor alpha expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant rat strains[J]. *J Exp Med*, 1991, 173(4):801-811.
- [21] Keating P, O'sullivan D, Tierney JB, et al. Protection from EAE by IL-4R α (-/-) macrophages depends upon T regulatory cell involvement [J]. *Immunol Cell Biol*, 2009, 87(7):534-545.
- [22] Bai XF, Shi FD, Xiao BG, et al. Nasal administration of myelin basic protein prevents relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats by activating regulatory cells expressing IL-4 and TGF-beta mRNA[J]. *J Neuroimmunol*, 1997, 80(1/2):65-75.
- [23] Mes Z, Stem JN, Reddy J, et al. Modified amino acid copolymers suppress myelin basic protein 85-99-induced encephalomyelitis in humanized mice through different effects on T cells [J]. *PNAS*, 2004, 101(32):11749-11754.
- [24] Sonobe Y, Jin S, Wang J, et al. Chronological changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2007, 213(4):329-339.
- [25] Minagar A, Alexander JS, Schwendimann RN, et al. Combination therapy with interferon beta-1a and doxycycline in multiple sclerosis: an open-label trial[J]. *Arch Neurol*, 2008, 65(2):199-204.
- [26] Su W, Wan Q, Han L, et al. Doxycycline exerts multiple anti-allergy effects to attenuate murine allergic conjunctivitis and systemic anaphylaxis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(3):359-368.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-08-18)

(上接第 43 页)

- of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(9):3057-3060.
- [23] Li Y, Fu L, Yeo H, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by helioxanthin and its derivative[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2005, 16(3):193-201.
- [24] Sharma KV, Davids LM. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2012, 9(2):156-163.
- [25] Malmström S, Larsson SB, Hannoun C, et al. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load--down-regulated transcription of PgRNA has limited impact[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e36349.
- [26] Tang H, Mclachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(4):1841-1846.
- [27] Tang H, Raney AK, Mclachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture [J]. *J Virol*, 2001, 75(19):8937-8948.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-12)