

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.14.002

## 6-甲基香豆素对乙型肝炎病毒转录和复制的影响\*

齐晓娅<sup>1</sup>, 钟珊<sup>2#</sup>, 王晴<sup>3</sup>, 白瑞雪<sup>1</sup>, 陈曜<sup>1△</sup>

[1. 重庆医科大学附属第二医院健康管理(体检)中心 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院感染病科 400010; 3. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 400010]

**[摘要]** **目的** 探讨 6-甲基香豆素对乙型肝炎病毒(HBV)转录和复制的影响。**方法** MTT 法检测 6-甲基香豆素在 HepG2. 2. 15 和 HepG2-NTCP 细胞中的细胞毒性。使用含 0.1% DMSO 的生理盐水(阴性对照), 6-甲基香豆素(5、10、20 μmol/L)及恩替卡韦(25 nmol/L, 阳性对照)处理 HepG2. 2. 15 和 HepG2-NTCP 细胞 6 d。RT-qPCR 检测细胞中 HBV DNA 和 HBV RNA 的水平, ELISA 检测细胞上清液中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)水平。雄性 HBV 转基因小鼠每 2 天腹腔注射含 0.1% DMSO 的生理盐水(阴性对照), 6-甲基香豆素(5 mg/kg)和恩替卡韦(0.02 mg/kg, 阳性对照)1 次, 每 6 天采血及称重 1 次。药物处理 24 d 后, 处死小鼠并解剖取肝脏。RT-qPCR 检测小鼠血清和肝脏组织中 HBV DNA 水平及肝脏组织中 HBV RNA 水平, ELISA 检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、HBsAg 和 HBeAg 水平。**结果** 与对照组相比, 6-甲基香豆素可以呈浓度依赖性的降低 HepG2. 2. 15 和 HepG2-NTCP 细胞中 HBV DNA 和 HBV RNA 及细胞分泌的 HBsAg 和 HBeAg 水平( $P < 0.05$ )。6-甲基香豆素在不影响小鼠体重及 AST、ALT 的同时, 可以显著降低 HBV 转基因小鼠血清中 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平及小鼠肝脏组织中 HBV DNA 和 HBV RNA 水平( $P < 0.05$ )。**结论** 在 HepG2. 2. 15 细胞、HepG2-NTCP 细胞和 HBV 转基因小鼠模型中 6-甲基香豆素均具有较强的抑制 HBV 转录和复制的作用。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 6-甲基香豆素; 转录; 复制

**[中图分类号]** R512.6+2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2021)14-2346-06

## Effect of 6-methylcoumarin on transcription and replication of hepatitis B virus\*

QI Xiaoya<sup>1</sup>, ZHONG Shan<sup>2#</sup>, WANG Qing<sup>3</sup>, BAI Ruixue<sup>1</sup>, CHEN Yao<sup>1△</sup>

(1. Health Management (Physical Examination) Center, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Education Ministry Key Laboratory of Infectious Diseases Molecular Biology of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of 6-methylcoumarin on the transcription and replication of hepatitis B virus (HBV). **Methods** The cytotoxicity of 6-methylcoumarin in HepG2. 2. 15 and HepG2-NTCP cells was detected by MTT assay. HepG2. 2. 15 and HepG2-NTCP cells were treated with normal saline containing 0.1% DMSO (negative control), 6-methylcoumarin (5, 10, 20 μmol/L) and entecavir (25 nmol/L, positive control) for 6 d. The levels of HBV DNA and HBV RNA in the cells were detected by RT-PCR, and the levels of HBsAg and HBeAg in the supernatant were detected by ELISA. Male HBV transgenic mice were intraperitoneally injected with normal saline containing 0.1% DMSO (negative control), 6-methylcoumarin (5 mg/kg) and entecavir (0.02 mg/kg, positive control) once every 2 d, blood collection and weighing once every 6 d. After 24 d of drug treatment, the mice were sacrificed and the liver was taken. The levels of HBV DNA in serum and liver and HBV RNA in liver tissue were detected by RT-PCR. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), HBsAg and HBeAg levels in serum were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, 6-methylcoumarin could reduce the levels of HBV DNA

\* 基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目(81861168035)。 作者简介: 齐晓娅(1971—), 副主任医师, 硕士, 主要从事内分泌及肝脏代谢性疾病、慢性疾病管理相关研究。 # 共同第一作者: 钟珊(1981—), 副主任医师, 博士, 主要从事慢性乙肝、肝衰竭、肝癌及脂肪肝相关研究。

△ 通信作者, Email: chenyaocqmu.edu.cn.

and HBV RNA in HepG2. 2. 15 and HepG2-NTCP cells with concentration-dependent manner, as well as the levels of HBsAg and HBeAg secreted by cells ( $P < 0. 05$ ). In addition, 6-methylcoumarin could significantly reduce the levels of HBV DNA, HBsAg and HBeAg in serum and HBV DNA, HBV RNA in liver tissue of HBV transgenic mice without affecting the body weight, AST and ALT of mice ( $P < 0. 05$ ). **Conclusion** 6-methylcoumarin has a strong inhibitory effect on HBV transcription and replication in HepG2. 2. 15 cells, HepG2-NTCP cells and HBV transgenic mice.

**[Key words]** hepatitis B virus; 6-methylcoumarin; transcription; replication

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒科家族中的一员,其感染已经成为严重的公共卫生问题。据统计,全球约 3.5 亿人为 HBV 慢性感染者,每年约有 78.6 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌等严重疾病<sup>[1]</sup>。目前被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于慢性乙型肝炎(CHB)治疗的药物为干扰素  $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )及 5 种核苷(酸)类似物。IFN- $\alpha$  可以通过免疫调节发挥其抗病毒作用<sup>[2]</sup>,但因其应答率低,不良反应明显且价格昂贵等缺点,使用范围受到限制<sup>[3]</sup>。核苷(酸)类似物作为首选的抗病毒治疗药物,具有较强地抑制病毒 DNA 的能力<sup>[2]</sup>。但是核苷(酸)类似物需长期服药,可能导致 HBV 聚合酶变异而引起耐药,限制了其发展<sup>[4]</sup>。目前,现有的药物均不能有效且全面地抑制 HBV 复制和 HBV 共价闭合环状 DNA(cccDNA)的形成。因此迫切需要研发具有全新作用机制和作用靶点的抗 HBV 药物来解决这一问题。

香豆素类化合物是广泛存在于自然界的一类芳香族化合物,分布于许多花草植物中。研究表明,香豆素类化合物具有多种生物学活性,如:抗艾滋病<sup>[4]</sup>、抗癌<sup>[5]</sup>、抗炎、抗凝血等。有文献报道,多种香豆素类化合物在保肝、护肝及抑制 HBV 感染中起重要作用。7,8-二羟基-6-甲氧基香豆素是从秦皮中提取的天然产物,具有显著的肝保护和抗纤维化作用<sup>[6]</sup>。扶芳藤中分离出的香豆素类化合物七叶亭(esculetin)在体内外均可有效抑制 HBV 复制<sup>[7]</sup>。龙葵提取物香豆素(东茛菪内酯)和酰胺[N-(对-反-香豆酰基)]酰胺对 HBV 感染的肝癌细胞中的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)分泌有阻断作用,说明香豆素类化合物生物碱具有抗 HBV 活性<sup>[8]</sup>。6-甲基香豆素(6-Methylcoumarin)属于香豆素类化合物,常作为香料或添加剂,在化妆品、杀蚜剂、烟用添加剂等领域使用。随着研究的深入,6-甲基香豆素在医疗领域的潜在价值被发现。6-甲基香豆素作为光敏剂,是人和豚鼠光敏性接触性皮炎的重要诱因,紫外线在此过程中起催化作用<sup>[9]</sup>。同时,6-甲基香豆素可以作为模板分子参与分子印迹聚合物微球与共聚微球的制备<sup>[10]</sup>。更重要的是,6-甲基香豆素在抑制细胞生长及抗癌方面发挥了重要作

用。有文献报道马缨丹鲜叶水提取物中的 6-甲基香豆素是抑制水葫芦生长的重要化合物<sup>[11]</sup>。6-甲基香豆素对人食管癌 Ec-109 细胞的增殖和迁移有抑制作用,且其联合紫杉醇后,抑制作用更为显著<sup>[12]</sup>。然而,6-甲基香豆素在 HBV 感染中的作用尚未有研究报道。

本研究采用 HBV 稳定表达细胞系 HepG2. 2. 15 细胞和 HBV 感染细胞模型 HepG2-NTCP 细胞及 HBV 转基因小鼠模型,研究 6-甲基香豆素在 HBV 转录和复制中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HepG2. 2. 15 细胞购自美国 ATCC 公司; HepG2-NTCP 细胞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保存;胎牛血清,DMEM 高糖型培养基购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素购自美国 Hyclone 公司;6-甲基香豆素购自美国 Sigma 公司;MTT 试剂购自中国生工生物公司;TRIzol、逆转录试剂盒、血清病毒基因组 DNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒购自中国天根生化科技公司;SYBR GREEN 购自美国 Bio-Rad 公司;ELISA 检测试剂盒[HBsAg 和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)]购自上海科华生物工程股份有限公司;SPF 级 HBV 转基因小鼠(C57BL/6),雄性,体重(17 $\pm$ 2)g,6~8 周龄,由厦门大学提供;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

HepG2. 2. 15 细胞培养于含 10% 胎牛血清、400  $\mu$ g/mL G418 的 DMEM 培养基中, HepG2-NTCP 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中。以上细胞均在含 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 的孵箱中培养。分别设置阴性对照组、实验组和阳性对照组,分别采用含 0. 1% DMSO 的生理盐水(阴性对照组),不同浓度的 6-甲基香豆素(5、10、20  $\mu$ mol/L,实验组)和采用 25 nmol/L 的恩替卡韦(阳性对照组)进行处理,6 d 后检测 HBV 相关指标。

### 1.2.2 HepG2-NTCP 细胞感染 HBV

取  $2.5 \times 10^5$  个/孔的 HepG2-NTCP 细胞接种于 12 孔板中。培养 1 d 后, 换为感染培养基。感染培养基处理 1 d 后, 进行感染, 感染复数为 1 000。感染后 1 d, PBS 清洗细胞 3 次, 洗去残留病毒颗粒, 并进行药物处理。

### 1.2.3 动物实验

HBV 转基因小鼠饲养于 SPF 级环境。选取 15 只体重及 HBV DNA 拷贝数相近的雄性小鼠分为对照组(0.1% DMSO 的生理盐水组), 实验组(6-甲基香豆素组)和恩替卡韦(ETV)组(阳性对照组), 每组 5 只。3 组分别为 6-甲基香豆素溶于 DMSO, 并用生理盐水稀释 1 000 倍。通过预实验确定实验组(6-甲基香豆素组)给药剂量为 5 mg, 阳性对照组(ETV 组)给药剂量为 0.02 mg, 阴性对照组注射含 0.1% DMSO 的生理盐水, 采用腹腔注射的方式给药, 每 2 天给药 1 次, 每 6 天采血及称重 1 次。24 d 后处死小鼠, 解剖并收集肝脏。

### 1.2.4 MTT 法检测 6-甲基香豆素的细胞毒性

将  $2 \times 10^4$  个/孔的 HepG2.2.15 细胞和 HepG2-NTCP 细胞接种于 96 孔板, 培养 1 d 后, 加入不同浓度的 6-甲基香豆素(倍比稀释, 从  $200 \mu\text{mol/L}$  至  $1.56 \mu\text{mol/L}$ )处理, 每 3 天更换 1 次含药培养基。6 d 后, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  MTT 溶液( $5 \text{ mg/mL}$ ), 避光培养 4 h。去除上清液, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  DMSO 充分溶解, 酶标仪测定  $490 \text{ nm}$  处的吸光度(A)值。

### 1.2.5 RT-qPCR 检测 HBV RNA 表达水平

使用 TRIzol 法提取细胞和小鼠肝脏组织的总 RNA, 取  $1 \mu\text{g}$  总 RNA 进行反转录, 得到 cDNA。RT-qPCR 检测 HBV RNA 的表达水平,  $\beta$ -actin 为内参。HBV RNA 上游引物序列为  $5'$ -ACC GAC CTT GAG GCA TAC TT- $3'$ , 下游引物序列为  $5'$ -GCC TAC AGC CTC CTA GTA CA- $3'$ ; 内参  $\beta$ -actin 上游引物序列为  $5'$ -CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT- $3'$ , 下游引物序列为  $5'$ -AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG- $3'$ 。实验设置 3 个复孔并重复 3 次。

### 1.2.6 RT-qPCR 检测 HBV DNA 表达水平

$0.5 \text{ mL}$  裂解缓冲液 [ $10 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl (pH 8.0)、 $1 \text{ mmol/L}$  EDTA、 $1\%$  NP-40 和  $2\%$  sucrose] 于  $37^\circ\text{C}$  裂解细胞 15 min, 离心去除细胞碎片; 加入  $5 \mu\text{L}$  的  $1 \text{ mol/L}$   $\text{MgCl}_2$  和  $4 \mu\text{L}$  的  $1 \times 10^5 \text{ U/L}$  DNase I,  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h; 加入  $200 \mu\text{L}$   $35\%$  PEG-8000, 冰浴 1 h;  $4^\circ\text{C}$   $12\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清液; 加入  $500 \mu\text{L}$  蛋白酶 K 消化液 [ $0.5\%$  SDS、 $150 \text{ mmol/L}$  NaCl、 $25 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl (pH 8.0) 和  $10 \text{ mmol/L}$  EDTA] 和终浓度为  $500 \text{ mg/L}$  的蛋白酶 K,  $45^\circ\text{C}$  孵育过

夜后进行酚氯仿抽提, 异丙醇沉淀,  $70\%$  乙醇洗涤, 最后使用 ddH<sub>2</sub>O 溶解 HBV DNA。

小鼠血清 HBV DNA 提取按照血清病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行; 小鼠肝脏组织 HBV DNA 提取按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。细胞中 HBV DNA 的上游引物序列为  $5'$ -CCT AGT AGT CAG TTA TGT CAA C- $3'$ , 下游引物序列为  $5'$ -TCT ATA AGC TGG AGG AGT GCG A- $3'$ ; 小鼠血清和肝脏组织中 HBV DNA 的上游引物序列为  $5'$ -CCT CTT CAT CCT GCT GCT- $3'$ , 下游引物序列为  $5'$ -AAC TGA AAG CCA AAC AGT G- $3'$ 。实验设置 3 个复孔并重复 3 次。

### 1.2.7 ELISA 检测 HBsAg 和 HBeAg 表达水平

ELISA 试剂盒检测细胞上清液和小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平。药物处理后, 在指定时间收集细胞上清液和小鼠血清, 按照说明书进行检测, 用酶标仪测定  $450 \text{ nm}$  处 A 值。

### 1.2.8 酶标法检测血清 AST 和 ALT

小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平采用酶标法(赖氏法)检测。试剂盒购自江苏建成生物工程研究所, ALT 检测试剂盒(货号: C009-2)和 AST 检测试剂盒(货号: C010-2)。将全血标本  $1\ 000 \text{ r/min}$  离心 10 min, 分离血清; 血清样品与基质缓冲液在  $37^\circ\text{C}$  下混合 30 min; 然后加入显色液 2, 4-二硝基苯肼在  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min; 随后加入终止液  $0.4 \text{ mol/L}$  NaOH, 室温静置 5 min, 酶标仪测定  $510 \text{ nm}$  处 A 值。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用非配对  $t$  检验, 多组间比较采用双因素方差分析(Two-Way ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 6-甲基香豆素对细胞活性的影响

6-甲基香豆素在 HepG2.2.15 和 HepG2-NTCP 细胞中的  $\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{mol/L}$ , 见图 1。

### 2.2 6-甲基香豆素对 HepG2.2.15 细胞中 HBV 转录和复制的影响

6-甲基香豆素呈浓度依赖性地抑制 HepG2.2.15 细胞中 HBV DNA 和 HBV RNA 的水平,  $20 \mu\text{mol/L}$  浓度的 6-甲基香豆素对 HBV DNA 和 HBV RNA 的抑制率分别为  $48.33\%$ (图 2A) 和  $58.87\%$ (图 2B); ETV 能够显著抑制 HBV DNA 水平, 但对 HBV RNA 无明显影响。6-甲基香豆素呈浓度依赖性地降低 HepG2.2.15 细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平,  $20 \mu\text{mol/L}$  浓度的 6-甲基香豆素对

HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 38.33% (图 2C) 和 31.67% (图 2D); ETV 组 HBsAg 和 HBeAg 水平变化差异无统计学意义。

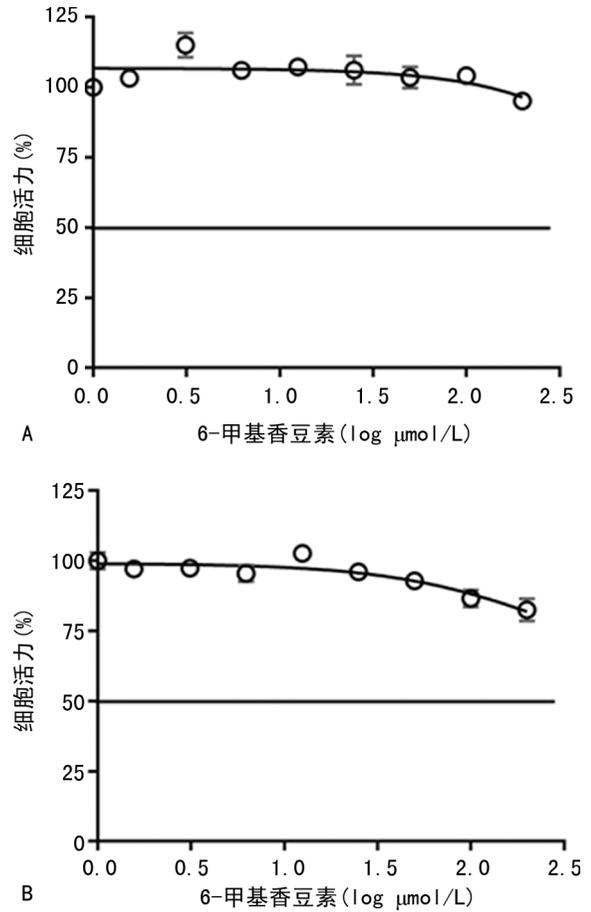
**2.3 6-甲基香豆素对 HepG2-NTCP 细胞中 HBV 转录和复制的影响**

6-甲基香豆素能够显著抑制细胞中 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达, 20 μmol/L 的 6-甲基香豆素对 HBV DNA 和 HBV RNA 的抑制率分别为 41.67% 和 45.33%; ETV 同样能够显著抑制 HBV DNA 水平, 而对 HBV RNA 无明显影响。同时, ELISA 实验证实, 6-甲基香豆素可有效降低 HepG2-NTCP 细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平, 20 μmol/L 的 6-甲基香豆素对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 29.67% 和 37.00%; ETV 组 HBsAg 和 HBeAg 的水平无明显变化, 见图 3。

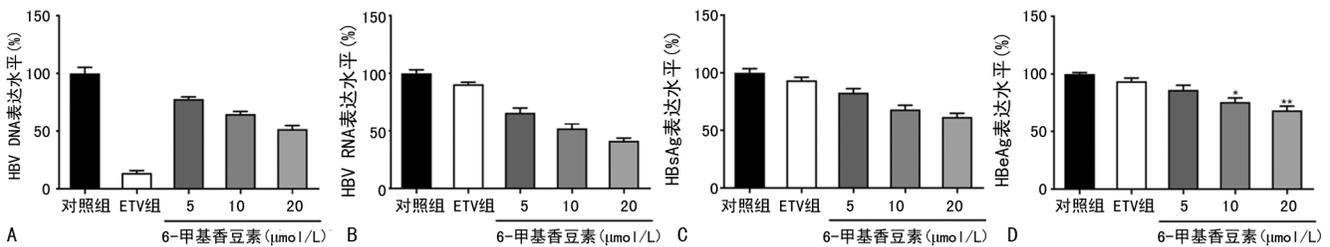
**2.4 6-甲基香豆素对 HBV 转基因小鼠的抗病毒效能**

3 组小鼠体重未出现异常的增高或降低(图 4A), ALT、AST 均无明显变化(图 4B、C)。与对照组相比, 试验组小鼠血清中 HBV DNA 的拷贝数减少, 且抑制效果随着时间的延长而增强; ETV 组小鼠血清中的 HBV DNA 拷贝数降低(图 4D)。与对照组相比, 试验组血清中 HBsAg 和 HBeAg 的水平持续降低, 抑制率分别为 51.80% 和 42.80%, 而 ETV 组 HBsAg 和 HBeAg 水平变化不明显(图 4E、F)。与对照组相比, 试验组和 ETV 组肝脏组织 HBV DNA 均被明显抑制(图 4G), 试验组对 HBV RNA 的抑制率

为 49.80%, 而 ETV 组 HBV RNA 水平无明显变化(图 4H)。

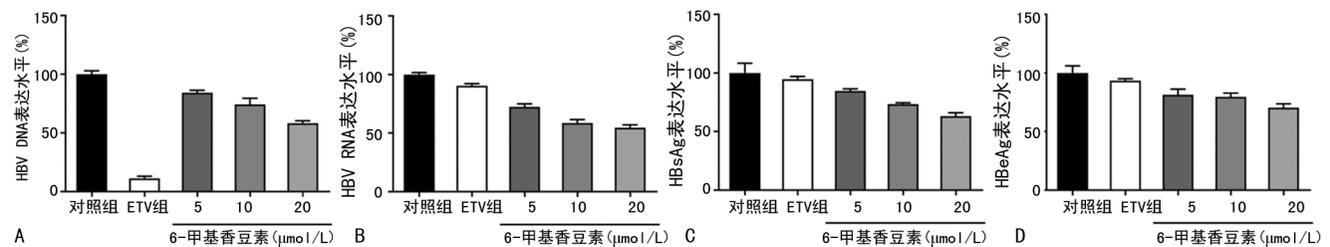


A: HepG2.2.15 细胞; B: HepG2-NTCP 细胞。  
图 1 6-甲基香豆素对 HepG2.2.15 和 HepG2-NTCP 细胞活性的影响



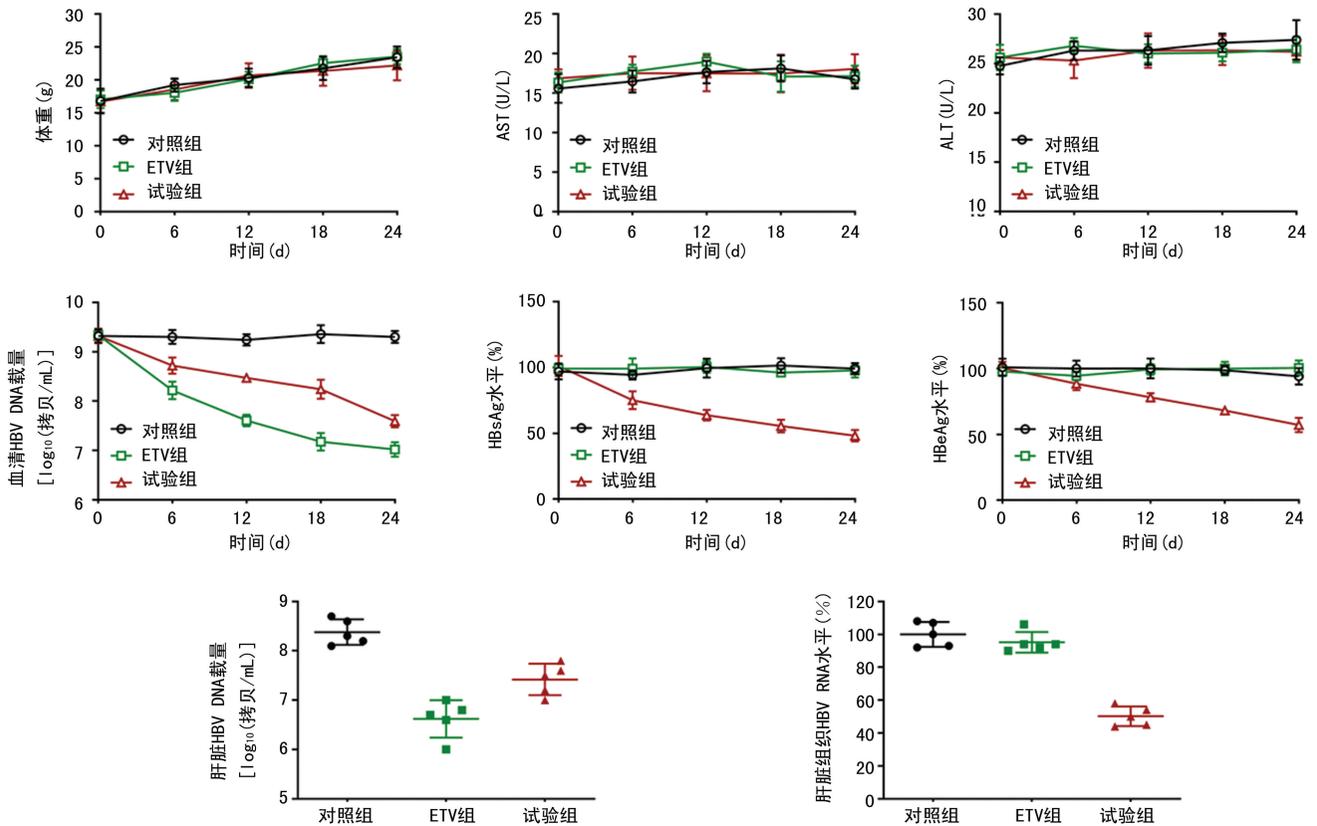
A、B: RT-PCR 检测 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达水平; C、D: ELISA 检测细胞上清液中 HBsAg and HBeAg 的表达水平。

图 2 6-甲基香豆素对 HepG2.2.15 细胞中 HBV 复制的影响



A、B: RT-PCR 检测 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达水平; C、D: ELISA 检测细胞上清液中 HBsAg and HBeAg 的表达水平。

图 3 6-甲基香豆素对 HepG2-NTCP 细胞中 HBV 复制的影响



A, 时间-体重曲线评估毒性作用; B, C: 血清 AST、ALT 水平; D: RT-PCR 检测小鼠血清中 HBV DNA 的表达水平; E, F: ELISA 检测小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平; G, H: RT-PCR 检测小鼠肝脏组织中 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达水平。

图 4 6-甲基香豆素对 HBV 转基因小鼠的抗病毒效能

### 3 讨论

在 HBV 生活周期中, HBV 病毒颗粒通过 NTCP 受体内化入胞, 脱去衣壳生成 rcDNA, rcDNA 进一步被修复形成 HBV 复制模板即 HBV 的 cccDNA, cccDNA 转录生成 4 种不同大小的 HBV RNAs, 其中 3.5 kb RNA 可作为模板逆转录形成 HBV DNA<sup>[13]</sup>。为开发新型的抗 HBV 药物, 需要选择真实反映体内 HBV 生活周期且操作简易的 HBV 复制细胞模型和动物模型。本研究结果显示, 6-甲基香豆素可呈浓度依赖性的抑制 HepG2. 2. 15 细胞和 HepG2-NTCP 细胞中 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达水平, 同时可以降低细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平。表明 6-甲基香豆素在体外可显著抑制 HBV 生活周期中的转录和复制过程。随后, 在 HBV 转基因小鼠中对 6-甲基香豆素的抗 HBV 效能进行验证。结果显示, 6-甲基香豆素可以显著抑制小鼠血清中 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg, 以及小鼠肝脏组织中 HBV DNA 和 HBV RNA 的表达水平, 且呈时间依赖性。这些结果充分证实 6-甲基香豆素在 HBV 转录和复制中发挥了重要的负向调节作用, 表明 6-甲基香豆素具有良好的治疗 HBV 感染的应用前景。

由于香豆素类化合物具有分子量小, 合成简单,

生物利用度高, 药理作用广泛, 毒性小等特点, 近年来已经成为许多药物研发工作的研究重点。有相当数量的香豆素类化合物被报道具有抗 HBV 活性, 且机制各不相同。扶芳藤中分离出的香豆素类化合物七叶亭, 以剂量依赖的方式抑制 HBx 蛋白的表达, 在体内外均可有效抑制 HBV 复制<sup>[7]</sup>。龙须草提取物 6-羟基-7-甲氧基-香豆素在无细胞毒性的条件下显示中等抗 HBV 活性, 降低 HBsAg 和 HBeAg 水平, 但 6, 7 二甲氧基-香豆素没有显示抗 HBV 活性。从构效关系的角度来看, C6 羟基的甲基化降低或消除了抗 HBV 活性, 说明 C6 羟基在香豆素的抗 HBV 活性中起重要作用<sup>[14]</sup>。双香豆素为天然香豆素的衍生物之一, 具有较强的抗 HBV 效应。双香豆素可以降低细胞内 HBV RNA、HBV DNA, 甚至能降低 HBV 感染细胞中 cccDNA 的水平, 但不影响 HBV 的吸附/进入<sup>[15]</sup>。目前 6-甲基香豆素的研究报道较少, 作用机制尚未明确。本研究显示 6-甲基香豆素在 HBV 转录和复制中发挥了重要的负向调节作用, 且 6-甲基香豆素对 HBV RNA 的抑制作用更为明显。

### 参考文献

[1] TREPO C, CHAN H L, LOK A. Hepatitis B

- virus infection [J]. *Lancet*, 2014, 384 (9959): 2053-2063.
- [2] KENNEDY P T F, SANDALOVA E, JO J, et al. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143 (3): 637-645.
- [3] PERRILLO R. Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2009, 49 (5 Suppl): S103-111.
- [4] ONG E B, WATANABE N, SAITO A, et al. Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (16): 14049-14056.
- [5] 黄月芬. 香豆素类化合物在肿瘤治疗上的应用 [J]. *海峡药学*, 2015, 27 (8): 1-4.
- [6] WU B, WANG R, LI S, et al. Antifibrotic effects of fraxetin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by targeting NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , MAPKs and Bcl-2/Bax pathways [J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71 (3): 409-416.
- [7] HUANG S X, MOU J F, LUO Q, et al. Anti-hepatitis B virus activity of esculetin from *microsorium fortunei* in vitro and in vivo [J]. *Molecules*, 2019, 24 (19): 3475.
- [8] YIN H L, LI J H, LI J, et al. Four new coumarinolignoids from seeds of *Solanum indicum* [J]. *Fitoterapia*, 2013, 84: 360-365.
- [9] KATO S, SEKI T, KATSUMURA Y, et al. Mechanism for 6-methylcoumarin photoallergenicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985, 81 (2): 295-301.
- [10] 张观流, 杨明, 夏娟娟, 等. 6-甲基香豆素分子印迹聚合物微球与共聚微球的制备与研究 [J]. *武汉工业学院学报*, 2013, 32 (3): 22-26.
- [11] 易振, 张茂新, 凌冰, 等. 马缨丹及其酚类化合物对水葫芦生长的抑制作用 [J]. *应用生态学报*, 2006, 17 (9): 1637-1640.
- [12] 卢红, 朱一帆, 吕品, 等. 6-甲基香豆素联合紫杉醇对人食管癌细胞增殖, 迁移的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2020, 55 (1): 29-32.
- [13] SETO W K, LO Y R, PAWLOTSKY J M, et al. Chronic hepatitis B virus infection [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10161): 2313-2324.
- [14] LI LQ, LI J, HUANG Y, WU Q, et al. Lignans from the heartwood of *Streblus asper* and their inhibiting activities to hepatitis B virus [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83 (2): 303-309.
- [15] TAKEUCHI F, IKEDA S, TSUKAMOTO Y, et al. Screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a hepatitis B virus inhibitor [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (2): e0212233.

(收稿日期: 2021-01-12 修回日期: 2021-04-17)

(上接第 2345 页)

- [20] KONG Y H, SHI Q, HAN N, et al. Structural modulation of gut microbiota in rats with allergic bronchial asthma treated with recuperating lung decoction [J]. *Biomed Environ Sci*, 2016, 29 (8): 574-583.
- [21] YU L, YAN J, SUN Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15 (4): 2339-2346.
- [22] FENG Y, YANG C, YANG W, et al. Effect of dexamethasone on TGF- $\beta$ 1/Smad3 signalling pathway in airway remodelling model of asthmatic rats [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29 (6): 537-540.
- [23] DREVYTSKA T, MORHACHOV R, TUMA NOVSKA L, et al. shRNA-induced knockdown of a bioinformatically predicted target IL10 influences functional parameters in spontaneously hypertensive rats with asthma [J]. *J Integr Bioinform*, 2018, 15 (4): 20180053.

(收稿日期: 2020-09-22 修回日期: 2021-02-28)