

SIRT3激动剂对乙肝病毒转录和复制的影响

徐红艳 姜慧 秦一萍 任放 任吉华*

(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 400016)

摘要 该文探讨了SIRT3激动剂(Honokiol, HKL)对乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)转录和复制的影响。培养HepG2-NTCP和人原代肝细胞(primary human hepatocytes, PHH), 感染HBV颗粒后, 用Honokiol(5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞后继续培养10天, 通过荧光定量PCR检测细胞内HBV DNA、cccDNA和HBV RNAs水平, Southern blot实验进一步检测胞内HBV DNA水平。构建SIRT3-KO细胞, 检测敲除SIRT3后, Honokiol对细胞内HBV DNA、cccDNA和HBV RNAs的影响。通过小鼠尾静脉高压注射pCMV-KRAB-Cre质粒和precccDNA质粒构建持续感染小鼠模型, 一周后腹腔注射Honokiol持续20天。荧光定量PCR检测小鼠血清中HBV DNA拷贝数, 肝组织内HBV DNA、cccDNA和HBV RNAs水平。结果表明, Honokiol浓度依赖性地抑制HepG2-NTCP和PHH细胞内HBV DNA以及HBV RNAs水平, 此外, Honokiol可以降低cccDNA的转录活性; 敲除SIRT3后, Honokiol不能发挥抗病毒作用; 小鼠模型中, Honokiol能够降低血清中HBV DNA和肝组织内HBV DNA拷贝数, 以及能够显著抑制肝组织内HBV RNAs水平和cccDNA的转录活性。该研究结果表明, Honokiol能够抑制乙肝病毒转录和复制。

关键词 SIRT3; Honokiol; 乙肝病毒; 共价闭合环状DNA

Effects of the SIRT3 Activator on HBV Transcription and Replication

XU Hongyan, JIANG Hui, QIN Yiping, REN Fang, REN Jihua*

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to characterize the role of Honokiol, an activator of SIRT3, in HBV transcription and replication. HepG2-NTCP cells and primary human hepatocytes were inoculated with HBV, then the cells were treated with Honokiol at 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ concentrations for 10 days. Next, the intracellular HBV DNA, cccDNA and HBV RNAs levels were analyzed by Real-time quantitative PCR. The intracellular HBV DNA was further evaluated by Southern blot. SIRT3-KO cells were constructed, then the effect of Honokiol on HBV DNA, cccDNA and HBV RNAs were determined after SIRT3 knockout. The mouse model of HBV infection were developed by hydrodynamic injection of pCMV-KRAB-Cre and precccDNA. After a week, the mouse began intraperitoneal injections of Honokiol for 20 days. Serum HBV DNA, liver HBV DNA, liver cccDNA and RNAs were evaluated by Real-time quantitative PCR. The results showed that intracellular HBV DNA and HBV RNAs levels were reduced by Honokiol treatment in a dose-dependent manner. Moreover, Honokiol significantly

收稿日期: 2019-09-12 接受日期: 2019-11-27

国家自然科学基金(批准号: 81802015)和重庆市渝中区科技计划项目(批准号: 20170102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68486780, E-mail: renjihua@163.com

Received: September 12, 2019 Accepted: November 27, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81802015) and Chongqing Yuzhong District Science and Technology Planning project (Grant No.20170102)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780, E-mail: renjihua@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5180>

reduced *HBV* cccDNA transcriptional activity. Honokiol cannot play a role in anti-*HBV* after *SIRT3* knockout. Furthermore, the serum *HBV* DNA, liver *HBV* DNA and *HBV* RNAs as well as cccDNA transcriptional activity were also decreased on account of the injecting Honokiol in mouse model. These findings indicate that Honokiol can inhibit *HBV* transcription and replication.

Keywords SIRT3; Honokiol; *HBV*; cccDNA

慢性乙肝病毒(Hepatitis B virus, *HBV*)感染是一个重要的公共卫生问题, 可以引起肝纤维化和肝硬化, 最终可发展为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。据世界卫生组织估计, 2016年全球慢性*HBV*感染率为3%~5%, 大约有2.57亿人感染*HBV*^[1-2]。目前批准治疗*HBV*的药物主要包括核苷类似物(nucleos(t)ide analogs)和干扰素(interferon)两大类, 尽管这两类化合物可以在较大程度上抑制*HBV*复制, 但都有其严重不足之处, 并且均不能实现对乙型肝炎的完全治愈^[3]。因此, 开发新型的乙型肝炎治疗药物具有重要意义。

HKL(Honokiol)是从木兰属植物中提取的一种小分子化合物^[4], 具有抑制肿瘤进展、抗炎、抗氧化和神经保护等生物学活性^[5-9]。此外, 芝加哥大学的研究者发现, HKL能直接与SIRT3结合, 增强SIRT3的功能活性, 从而逆转心肌肥厚的发生^[10]。SIRT3是沉默信息调节因子(silent information regulator, sirtuin)家族中的成员, 是一种高度保守的依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的去乙酰化酶, 在细胞生长、细胞凋亡、细胞衰老、代谢、炎症以及氧化应激方面发挥重要调控作用^[11-13]。我们前期研究发现, SIRT3可以调控*HBV* cccDNA微染色体组蛋白的乙酰化和甲基化水平, 并且导致cccDNA上RNA聚合酶和转录因子的结合减少, 从而使cccDNA的转录活性减弱, 最终抑制了*HBV*的转录和复制^[14], 这些发现为cccDNA活性监测及新型抗病毒药物的开发提供了潜在靶点和理论基础。然而, HKL作为SIRT3的激动剂是否具有抗病毒活性还未见报道。因此, 本研究将通过体内外实验充分研究HKL对*HBV*转录和复制的影响, 以期证实HKL的抗病毒作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HepAD38和HepG2-NTCP细胞由本实验室保存; HepG2-NTCP-SIRT3-KO细胞由本实验室构建; (primary human hepatocytes, PHH)细胞购于Sciencell

公司; DMEM培养基、William's E培养基、胎牛血清(FBS)购于Gibco公司; HM培养基购于Sciencell公司; 尼龙膜购于GE公司; 蛋白酶K、Southern blot试剂盒购于Roche公司; T5 exonuclease购于Biolabs公司; 逆转录试剂盒购于TIANGEN公司; SYBR Green Supermix购于Bio-Rad公司; 蛋白浓度检测试剂盒购于Thermo公司; 蛋白酶抑制剂购于Roche公司; PVDF膜购于GE公司; Rabbit anti-SIRT3 monoclonal antibody(#2627)购于Cell Signaling Technology公司; Rabbit anti- β -actin monoclonal antibody (sc-1616-R)购于Santa Cruz公司; 酚氯仿购于Solarbio公司; 甲醇、乙醇、异丙醇、马来酸购于川东化工公司; Tris、Glycine、NaCl、SDS、NAOH、EDTA购于Genview公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepAD38、HepG2-NTCP细胞用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素(Hyclone公司)的DMEM培养基培养, PHH细胞用HM培养基培养, 所有细胞均放置到37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养。

1.2.2 *HBV* DNA的提取及Southern blot实验 细胞去除培养基后用PBS洗涤2次, 加入500 μ L裂解液后放置在37 $^{\circ}$ C孵箱中裂解15 min, 转移裂解产物至1.5 mL EP管, 15 000 \times g离心5 min; 去除沉淀后加入5 μ L的1 mol/L MgCl₂和4 μ L的DNase I(5 U/ μ L)(TaKaRa公司), 于37 $^{\circ}$ C水浴4 h; 加入35% PEG8000(Sigma公司)溶液, 冰浴1 h; 然后4 $^{\circ}$ C离心、11 000 \times g离心5 min, 去除上清, 随后加入500 μ L蛋白酶K消化液, 并加入蛋白酶K至终浓度为500 μ g/mL, 充分混匀后45 $^{\circ}$ C水浴过夜; 次日, 用等体积的酚氯仿抽提2次, 70%的异丙醇沉淀核酸, 随后用70%的乙醇洗涤核酸, 室温干燥后用双蒸水溶解。溶解后的*HBV* DNA经0.9%琼脂糖凝胶电泳分离后进行Southern blot。将凝胶碱变性1 h后, 用虹吸法将凝胶上的DNA转移至尼龙膜上; 紫外交联仪进行交联固定, 随后将膜放入42 $^{\circ}$ C预杂交液中杂交1 h, 用地高辛标记的*HBV* DNA探针于42 $^{\circ}$ C

杂交过夜;然后洗膜、封闭、洗涤后用胶片进行曝光,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 血清及肝组织HBV DNA的提取 小鼠血清和肝组织HBV DNA提取分别使用Biospin病毒DNA提取试剂盒和Biospin组织基因组DNA提取试剂盒(BioFlux公司),具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 Hirt法提取HBV cccDNA 细胞去除培养基后用PBS洗涤2次,加入500 μ L裂解液,37 $^{\circ}$ C裂解15 min,转移裂解产物至1.5 mL EP管,加入125 μ L的2.5 mol/L KCl(重庆博艺化学试剂有限公司)溶液4 $^{\circ}$ C旋转过夜;次日,4 $^{\circ}$ C离心,14 000 \times g离心20 min,转移上清重复离心一次;随后将上清用等体积的酚氯仿抽提3次,70%的异丙醇沉淀核酸,70%的乙醇洗涤核酸,干燥后用20 μ L双蒸水溶解;用1 000 IU/mL的T5核酸外切酶酶切样品1 h去除非闭合环状DNA,随后将样品于99 $^{\circ}$ C加热5 min使酶失活。肝组织cccDNA提取方法类似,称取相同重量的肝组织,用SDS裂解缓冲液对组织进行连续粉碎和裂解,后续实验与细胞提取cccDNA的方法相同。

1.2.5 荧光定量PCR 细胞总RNA和肝组织RNA提取使用TRI-zol RNA试剂(TIANGEN公司),具体操作按照试剂盒说明书进行。提取的RNA取1 μ g用iScriptTM cDNA Synthesis Kit(TIANGEN公司)进行gDNA去除,随后将RNA逆转录成cDNA,用SYBR Green Supermix(Bio-Rad公司)进行荧光定量PCR,PCR反应体系为:0.2 μ L 10 μ mol/L引物、5 μ L SYBR Green Supermix、3.6 μ L双蒸水以及1 μ L逆转录产物。PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,循环34次,以 β -actin为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的RNA的相对水平。HBV DNA用SYBR Green Supermix进行荧光定量PCR,以HBV表达质粒作为定量标准品,PCR反应体系为:0.5 μ L 10 μ mol/L引物、10 μ L SYBR Green Supermix、7 μ L双蒸水以及2 μ L HBV DNA提取物。PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,循环39次。HBV cccDNA样品用双蒸水稀释10倍,Taqman探针特异性PCR检测cccDNA水平,PCR反应体系为:0.5 μ L 10 μ mol/L引物、0.5 μ L 10 μ mol/L探针、10 μ L GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix、6.5 μ L双蒸水以及2 μ L HBV cccDNA提取物。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 5 s,62 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,循环44次,以HBV表达质粒作为定量标准品。以标准品的拷贝数log值为横坐标,以Ct值为纵坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计

算相应样品的拷贝数。引物序列Total HBV RNAs: 5'-ACC GAC CTT GAG GCA TAC TT-3'(正向引物),5'-GCC TAC AGC CTC CTA GTA CA-3'(反向引物);HBV 3.5 Kb RNA: 5'-GCC TTA GAG TCT CCT GAG CA-3'(正向引物),5'-GAG GGA GTT CTT CTT CTA GG-3'(反向引物); β -actin mRNA: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3'(正向引物),5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'(反向引物);HBV DNA: 5'-CCT AGT AGT CAG TTA TGT CAA C-3'(正向引物),5'-TCT ATA AGC TGG AGG AGT GCG A-3'(反向引物);小鼠血清HBV DNA: 5'-CCT CTT CAT CCT GCT GCT-3'(正向引物),5'-AAC TGA AAG CCA AAC AGT G-3'(反向引物);HBV cccDNA: 5'-CTC CCC GTC TGT GCC TTC T-3'(正向引物),5'-GCC CCA AAG CCA CCC AAG-3'(反向引物),5'-ACG TCG CAT GGA GAC CAC CGT GAA CGC C-3'(探针序列)。本研究所用引物序列均由华大基因公司合成,探针序列由Invitrogen公司合成。

1.2.6 MTT实验 96孔板细胞加药处理10天后,加入10 μ L 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(生工公司),37 $^{\circ}$ C避光孵育4 h,去除上清后,每孔加入100 μ L二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Solarbio公司),置室温摇床上振荡10 min,使结晶充分溶解,随后用酶联检测仪检测490 nm波长处各孔吸光度值。

1.2.7 Western blot实验 细胞去培养基后用PBS洗涤2次,随后加入RIPA裂解液(含1%蛋白酶抑制剂),4 $^{\circ}$ C裂解15 min,转移裂解产物至1.5 mL EP管,4 $^{\circ}$ C离心、15 000 \times g离心5 min,转移上清,经BCA法测定蛋白浓度。吸取等质量的蛋白高温变性10 min,随后在10%浓度聚丙烯酰胺凝胶中电泳90 min,90 V恒压将蛋白转移至PVDF膜。采用5%脱脂牛奶封闭1 h,然后4 $^{\circ}$ C孵育抗体过夜,次日孵育二抗,TBST洗膜后用胶片进行曝光。

1.2.8 动物实验 C57BL/6小鼠,5~6周龄雄性,购自重庆医科大学动物研究中心。动物在相对无菌(SPF级)条件下饲养。所有的动物研究都由重庆医科大学实验动物护理与使用制度委员会批准。将纯化的pCMV-KRAB-Cre质粒和precccDNA质粒溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,经尾静脉注射到小鼠体内,注射在5~8 s完成,每只小鼠的注射体积约为体重的8%~10%。在注射后7天取小鼠眼球后静脉丛

血,进行血清 HBV DNA检测,根据血清 HBV DNA拷贝数将小鼠分为四组,每两天经腹腔注射10 mg/kg或者20 mg/kg的HKL;恩替卡韦(ETV)作为阳性对照,每2天通过灌胃的方式灌入0.02 mg/kg ETV。20天后,再一次取小鼠眼球后静脉丛血,随后处死小鼠,分离肝组织,进行肝组织cccDNA、 HBV DNA、 HBV 3.5 Kb RNA和 HBV total RNAs的检测。

1.2.9 统计学分析 本研究采用Graphpad Prism7.0软件进行统计学分析,两独立样本 t 检验用于两组间均数比较,单因素方差分析用于多组间均数比较,所有试验数据以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm s$)表示,每一个实验至少重复3次, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞毒性的影响

采用不同浓度的HKL处理HepG2-NTCP和PHH细胞,MTT实验检测药物对细胞毒性的影响。结果显示,在HepG2-NTCP和PHH细胞中,HKL引起50%细胞死亡浓度(IC_{50})分别为49.68 $\mu\text{mol/L}$ (图1A)和43.31 $\mu\text{mol/L}$ (图1B),并且HKL浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 以下时对两个细胞系均没有明显的毒性作用。因此,接下来我们以20 $\mu\text{mol/L}$ 为最大浓度进行后续实验。

2.2 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞 HBV DNA水平的影响

为了研究HKL对 HBV DNA水平的影响,用来源于HepAD38细胞的病毒分别感染HepG2-NTCP和PHH细胞,24 h后分别用5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的HKL处理细胞,1 $\mu\text{mol/L}$ ETV作为阳

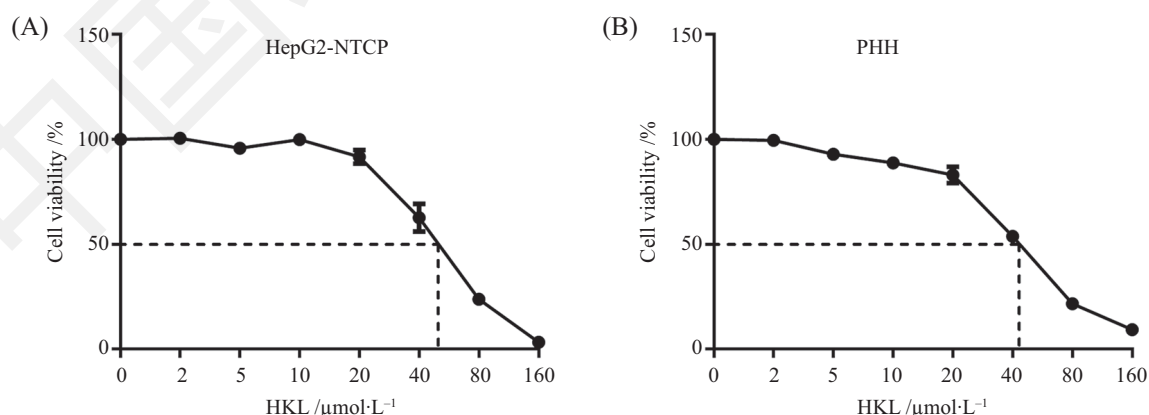
性对照,处理10天后收集细胞并提取细胞内的 HBV DNA,随后分别用荧光定量PCR和Southern blot实验检测细胞内 HBV DNA水平。荧光定量PCR结果显示,HKL浓度依赖性地抑制HepG2-NTCP和PHH细胞内 HBV DNA的水平,HKL浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时对两个细胞内 HBV DNA的抑制率分别为55.77%(图2A)和47.84%(图2B);Southern blot实验也表明,HKL显著抑制HepG2-NTCP和PHH细胞内 HBV DNA的水平(图2C和图2D)。

2.3 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞 HBV RNAs水平的影响

为了进一步研究HKL对 HBV RNAs水平的影响,我们用上述相同的方式处理细胞,处理10天后收集细胞并提取细胞内的 HBV RNAs,随后用荧光定量PCR检测细胞内 HBV RNAs水平。结果显示,HKL浓度依赖性地抑制HepG2-NTCP和PHH细胞 HBV RNAs水平,并且在浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,HKL对HepG2-NTCP细胞total HBV RNAs和3.5 Kb RNA水平的抑制率分别为44.55%(图3A)和44.19%(图3B);在PHH细胞中,HKL浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时对total HBV RNAs和3.5 Kb RNA水平的抑制率分别为38.05%(图3C)和41.73%(图3D)。这些数据说明,HKL可以显著抑制 HBV RNAs水平。

2.4 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞 HBV cccDNA水平及转录活性的影响

cccDNA是病毒转录的模板,在 HBV 复制周期和持续感染中具有重要作用。为了研究HKL是否通过影响cccDNA水平或者cccDNA转录活性而抑制

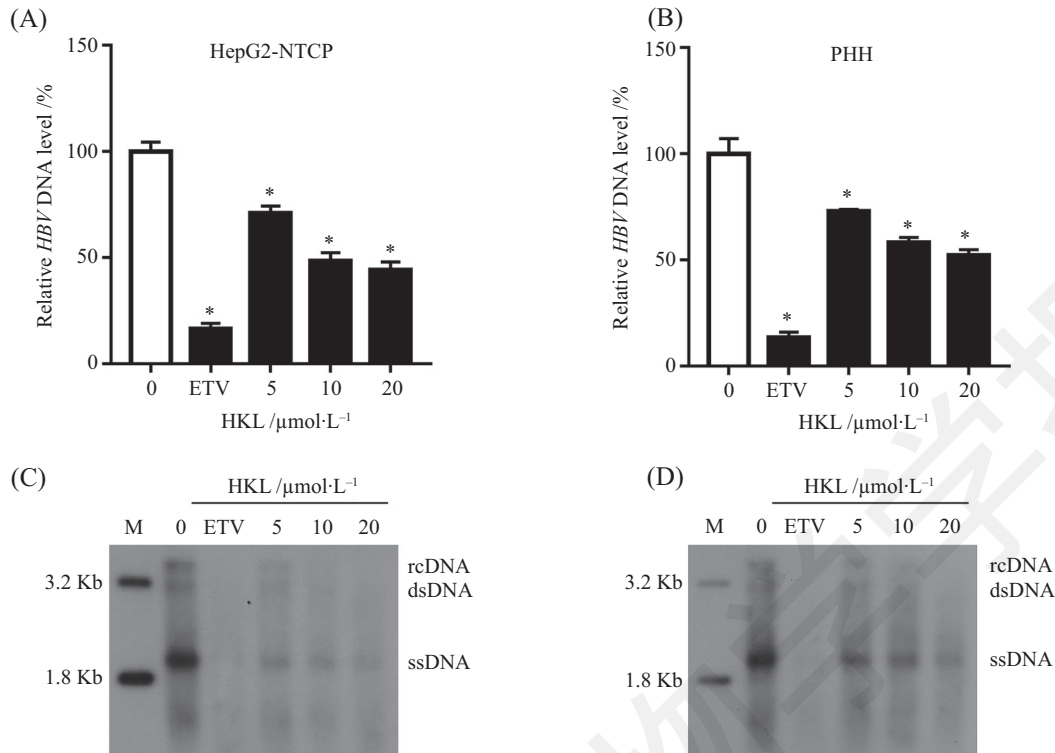


MTT检测HepG2-NTCP(A)和PHH(B)细胞的活力情况。

The viability of HepG2-NTCP (A) and PHH (B) cells were determined by MTT.

图1 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞的毒性作用

Fig.1 Cytotoxic effects of HKL in HepG2-NTCP and PHH cells



A: 荧光定量PCR实验检测HepG2-NTCP细胞经HKL处理后细胞内HBV DNA水平; B: 荧光定量PCR实验检测PHH细胞经HKL处理后细胞内HBV DNA水平; C: Southern blot实验检测HepG2-NTCP细胞经HKL处理后细胞内HBV DNA水平; D: Southern blot实验检测PHH细胞经HKL处理后细胞内HBV DNA水平。M: 分子量标记。* $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ HKL处理组比较。

A: the effects of HKL on the HBV DNA of HepG2-NTCP cells were determined by real-time quantitative PCR; B: the effects of HKL on the HBV DNA of PHH cells were determined by real-time quantitative PCR; C: the effects of HKL on the HBV DNA of HepG2-NTCP cells were determined by Southern blot; D: the effects of HKL on the HBV DNA of PHH cells were determined by Southern blot. M: marker. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL treatment group.

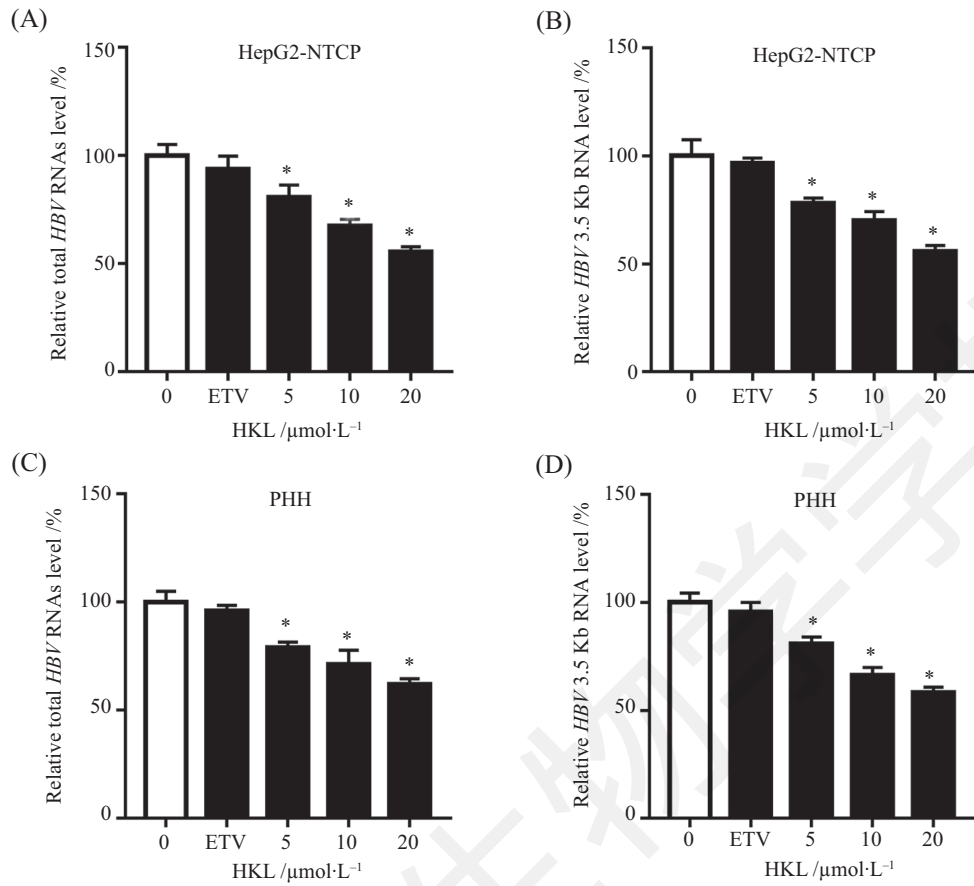
图2 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞HBV DNA水平的影响

Fig.2 The effects of HKL on the HBV DNA of HepG2-NTCP and PHH cells

HBV RNAs转录以及HBV DNA复制, 我们采取上述方式处理细胞, 检测细胞内cccDNA的水平。Taqman探针特异性PCR结果表明, 相较于对照组, HKL浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 对HepG2-NTCP细胞内cccDNA的水平无显著影响(图4A)。Total HBV RNAs与cccDNA的比值(total RNA/cccDNA)或者3.5 Kb RNA与cccDNA的比值(3.5 Kb RNA/cccDNA)可以反映cccDNA的转录活性。荧光定量PCR结果显示, HKL可以浓度依赖性地降低total RNA/cccDNA比值以及3.5 Kb RNA/cccDNA比值(图4A)。进一步, 我们在PHH细胞上验证这一发现, 荧光定量PCR结果表明, HKL浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞内的cccDNA无显著影响, 但其可以明显降低total RNA/cccDNA比值以及3.5 Kb RNA/cccDNA比值(图4B)。这些结果表明, HKL对cccDNA的转录活性有明显抑制作用。

2.5 HKL抑制HBV复制和转录与SIRT3相关

上述实验结果表明, HKL能够抑制HBV复制和转录。而我们前期研究发现, 过表达SIRT3可以显著地抑制HBV复制, 而沉默SIRT3可以明显增强HBV的复制能力, 为进一步研究HKL抑制作用是否依赖于SIRT3, 我们分别在SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞中观察HKL对HBV复制和转录的影响。Western blot实验结果表明, SIRT3-KO细胞系构建成功(图5A)。SIRT3-KO细胞及其野生型对照组感染HBV病毒后, 分别用20 $\mu\text{mol/L}$ HKL处理10天, 随后用荧光定量PCR检测细胞内HBV DNA、total HBV RNAs、3.5 Kb RNA、cccDNA水平。与预期结果一致, 在野生型细胞中, HKL可以明显抑制HBV DNA、total HBV RNAs和3.5 Kb RNA水平, 同时可以抑制cccDNA转录活性(图5B~图5E); 而敲除SIRT3后, HBV DNA、total HBV RNAs和3.5 Kb RNA水平显著



A: 荧光定量PCR实验检测HepG2-NTCP细胞经HKL处理后细胞内total *HBV* RNAs水平; B: 荧光定量PCR实验检测HepG2-NTCP细胞经HKL处理后细胞内*HBV* 3.5 Kb RNA水平; C: 荧光定量PCR实验检测PHH细胞经HKL处理后细胞内total *HBV* RNAs水平; D: 荧光定量PCR实验检测PHH细胞经HKL处理后细胞内*HBV* 3.5 Kb RNA水平。* $P < 0.05$, 与HKL 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较。

A: the effects of HKL on the total *HBV* RNAs of HepG2-NTCP cells were determined by real-time quantitative PCR; B: the effects of HKL on the *HBV* 3.5 Kb RNA of HepG2-NTCP cells were determined by real-time quantitative PCR; C: the effects of HKL on the total *HBV* RNAs of PHH cells were determined by real-time quantitative PCR; D: the effects of HKL on the *HBV* 3.5 Kb RNA of PHH cells were determined by real-time quantitative PCR. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL treatment group.

图3 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞*HBV* RNAs水平的影响

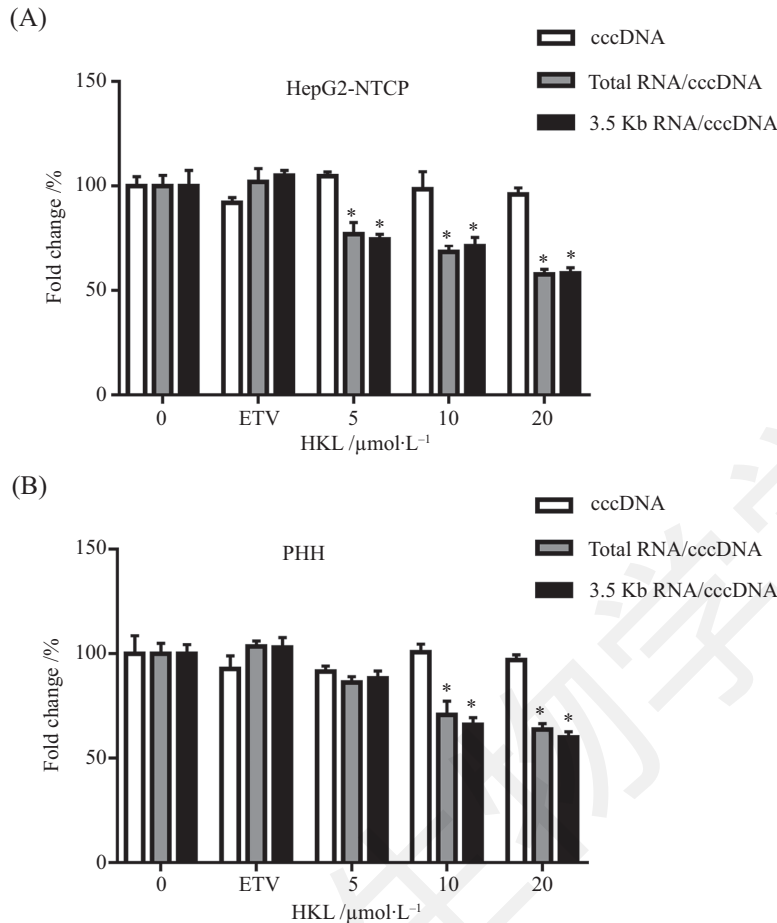
Fig.3 The effects of HKL on the *HBV* RNAs of HepG2-NTCP and PHH cells

增加, 加入20 $\mu\text{mol/L}$ HKL处理后, 发现*HBV* DNA、total *HBV* RNAs和3.5 Kb RNA水平并未受影响(图5B~图5E)。进一步发现*SIRT3*基因敲除后, HKL对cccDNA的转录活性(图5E)无明显的抑制作用。这些结果表明, HKL对HBV的复制和转录水平的抑制作用依赖于*SIRT3*。

2.6 在HBV持续感染小鼠模型中验证HKL的抗病毒作用

为了进一步探讨HKL在体内对HBV转录和复制的影响, 本实验通过尾静脉高压注射的方式, 将纯化的pCMV-KRAB-Cre质粒和precccDNA质粒注射到小鼠体内构建HBV持续感染小鼠模型, 随后用不同浓度的HKL处理小鼠, 共持续20天, 恩替卡韦

作为阳性对照。与对照组相比, HKL能显著抑制小鼠血清*HBV* DNA拷贝数, 且高浓度(20 mg/kg)的抑制效果更强(图6A)。分离小鼠肝组织, PCR检测肝组织内HBV相关指标, 发现HKL能显著降低组织内*HBV* DNA拷贝数(图6B), 与血清中的结果一致, 同时HKL能够极大抑制total *HBV* RNAs和3.5 Kb RNA水平, 注射20 mg/kg HKL对total *HBV* RNAs和3.5 Kb RNA的抑制率分别为46.6%和42.1%(图6C和图6D); 阳性对照恩替卡韦能够极大抑制*HBV* DNA拷贝数, 但其对*HBV* RNAs水平无明显影响(图6B~图6D)。进一步我们发现, HKL对cccDNA水平无显著影响, 但其可以降低cccDNA转录活性(图6E)。本研究提示, HKL能够抑制HBV持续感染小鼠模型中



A: Taqman探针特异性PCR实验检测HepG2-NTCP细胞经HKL处理后细胞内total *HBV* RNAs与cccDNA比值以及*HBV* 3.5 Kb RNA与cccDNA比值; B: 荧光定量PCR实验检测PHH细胞经HKL处理后细胞内total *HBV* RNAs与cccDNA比值以及*HBV* 3.5 Kb RNA与cccDNA比值。* $P < 0.05$, 与HKL 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较。

A: the effects of HKL on the ratios of total *HBV* RNAs/ccdDNA and *HBV* 3.5 Kb RNA/ccdDNA in HepG2-NTCP cells were determined by Taqman probe specific PCR; B: the effects of HKL on the ratios of total *HBV* RNAs/ccdDNA and *HBV* 3.5 Kb RNA/ccdDNA in PHH cells were determined by real-time quantitative PCR. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL treatment group.

图4 HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞*HBV* cccDNA转录活性的影响

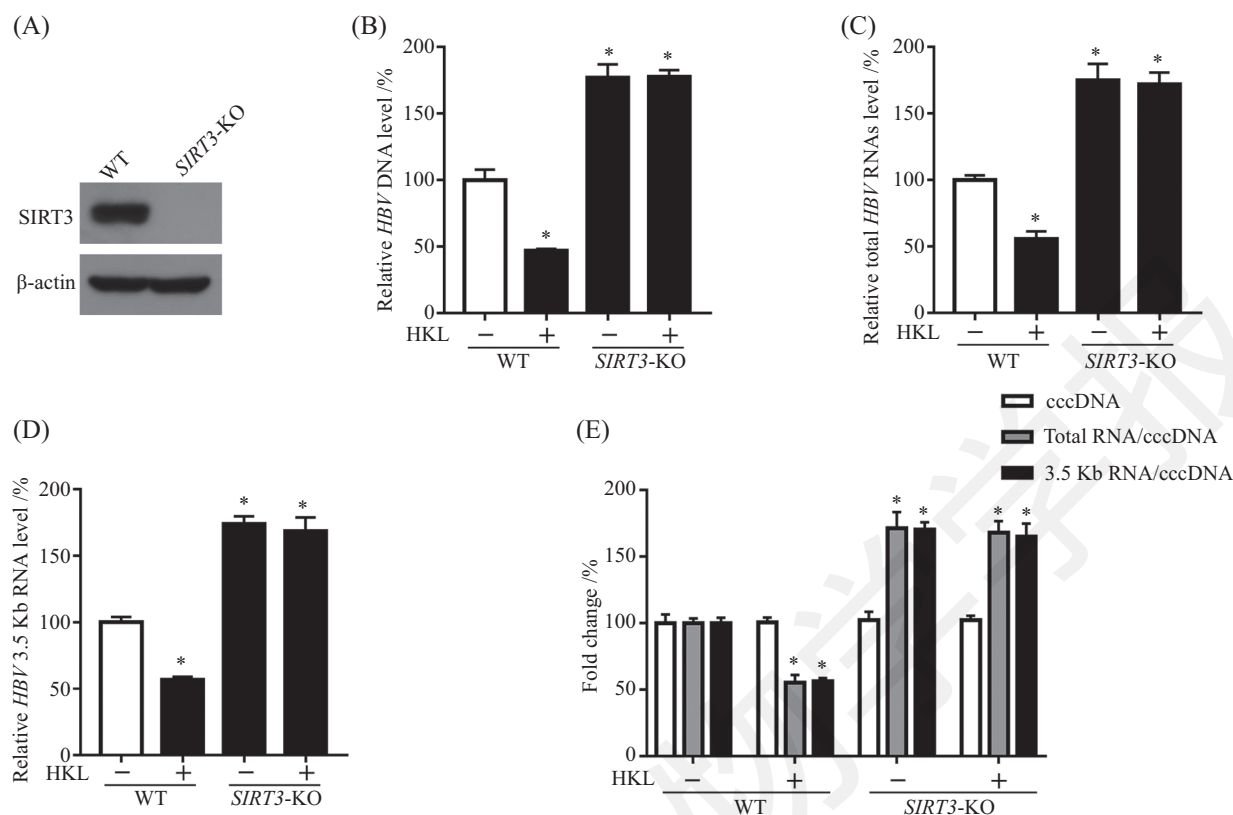
Fig.4 The effects of HKL on the *HBV* cccDNA transcriptional activity of HepG2-NTCP and PHH cells

HBV DNA复制和*HBV* RNAs水平以及cccDNA转录活性。

3 讨论

乙肝病毒是一种嗜肝DNA病毒, 其进入肝细胞后在胞核内形成共价闭环状DNA(cccDNA), cccDNA的持续存在是HBV无法彻底被清除的根本原因^[15]。我们前期的研究发现, SIRT3在cccDNA的表观遗传修饰以及HBV的转录复制中发挥了重要的调控作用。在HepG2-NTCP和PHH细胞中过表达SIRT3可以显著下调total *HBV* RNAs、3.5 Kb RNA以及*HBV* DNA水平及cccDNA转录活性。相反地, 沉默SIRT3可以显著增强HBV转录复制水平^[14]。而HKL

被报道是一种SIRT3激动剂^[16-18], 可以增强SIRT3的活性, 并且多项研究表明, HKL对单纯疱疹病毒1(herpes simplex virus type 1, HSV-1)^[19]、血清2型登革热病毒(dengue virus serotype 2, DENV-2)^[20]、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)^[21]均具有较强的抑制作用, 这些研究提示, HKL对HBV感染可能也具有抗病毒作用。我们通过分析体内外实验结果也发现, HKL可能通过下调cccDNA转录活性, 从而抑制HBV转录和复制。HKL在160 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度时可以引起HepG2-NTCP和PHH细胞毒性和细胞死亡, 这与其他肿瘤细胞中报道的HKL的抗癌活性一致^[4]。然而, 在低浓度(10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$)且无明显细胞毒性的情况下, HKL对HepG2-NTCP和PHH细胞中HBV



A: Western blot实验检测SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞中SIRT3水平; B: 荧光定量PCR实验检测SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞经HKL处理后细胞内HBV DNA水平; C: 荧光定量PCR实验检测SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞经HKL处理后细胞内total HBV RNAs水平; D: 荧光定量PCR实验检测SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞经HKL处理后细胞内HBV 3.5 Kb RNA水平; E: SIRT3-KO细胞及其野生型对照细胞经HKL处理后细胞内total HBV RNAs与cccDNA比值以及HBV 3.5 Kb RNA与cccDNA比值。-: 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL; +: 20 $\mu\text{mol/L}$ HKL; WT: 野生型对照细胞。* $P < 0.05$, 与WT细胞中0 $\mu\text{mol/L}$ HKL处理组比较。

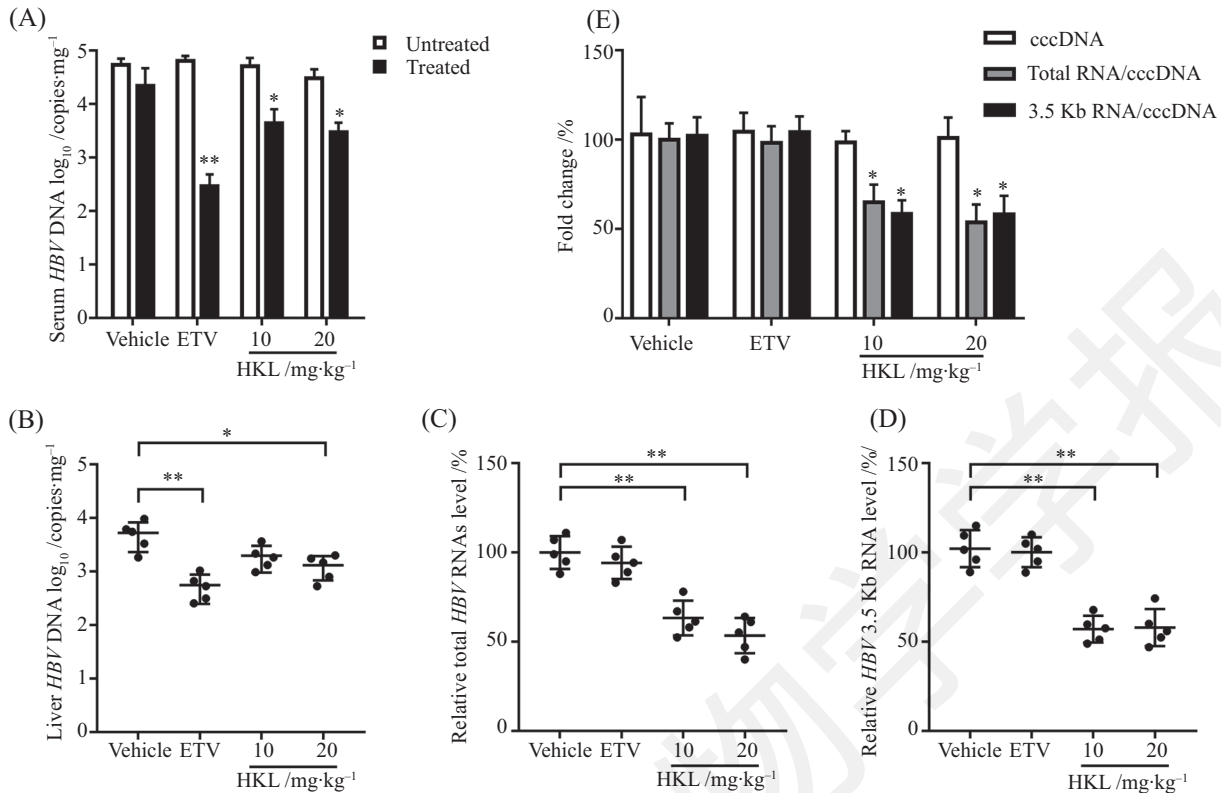
A: the level of SIRT3 in SIRT3-KO and WT cells were determined by Western blot; B: the effects of HKL on the HBV DNA of SIRT3-KO and WT cells were determined by real-time quantitative PCR; C: the effects of HKL on the total HBV RNAs of SIRT3-KO and WT cells were determined by real-time quantitative PCR; D: the effects of HKL on the HBV 3.5 Kb RNA of SIRT3-KO and WT cells were determined by real-time quantitative PCR; E: the effects of HKL on the ratios of total HBV RNAs/cccDNA and HBV 3.5 Kb RNA/cccDNA in SIRT3-KO and WT cells were determined. -: 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL; +: 20 $\mu\text{mol/L}$ HKL; WT: Wild type cells. * $P < 0.05$ compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ HKL treatment group in WT cells.

图5 HKL抑制HBV复制和转录与SIRT3相关

Fig.5 The effects of HKL on the HBV replication and transcription were associated with SIRT3

复制具有显著抑制作用,提示HKL可能是一种潜在的抗HBV候选药物。与之前报道的HKL抑制HCV^[21]和DENV-2^[20]复制的浓度一致。本研究中,我们发现HKL浓度依耐性地抑制HepG2-NTCP和PHH细胞中HBV DNA、HBV RNAs水平(图2和图3)。在浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,HKL对HBV DNA、HBV RNAs水平的抑制作用最强(图2和图3),与之前报道的HKL在浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 可以显著抑制DENV-2 dsRNA水平一致^[20]。此外,我们发现HKL可以显著降低HepG2-NTCP和PHH细胞内cccDNA转录活性(图4)。在浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,HKL可以使HepG2-NTCP细胞和PHH细胞的cccDNA转录活性降低到60%左右(图4)。敲除SIRT3后,HKL不能降低HBV DNA、HBV

RNAs水平及cccDNA转录活性,表明其抑制HBV复制及转录与SIRT3相关(图5)。在HBV转基因小鼠中,HKL(10 mg/kg、20 mg/kg)可以显著降低血清中HBV DNA拷贝数以及肝组织内HBV DNA、HBV RNAs水平,同时可以降低肝细胞内cccDNA转录活性(图6)。阳性对照ETV可以极大地降低HBV DNA水平,但其对HBV RNAs水平以及cccDNA转录活性均无显著影响。这些结果提示,HKL发挥抗病毒作用的机制与ETV不同。ETV是通过抑制HBV聚合酶启动和RNA逆转录过程来阻止HBV复制,但其极易发生耐药^[22-23]。而本研究中HKL是从传统中草药中提取的天然化合物,其副作用较少^[24]。HKL对HBV作用的机制可能是影响cccDNA转录活性,并不是影



A: 荧光定量PCR实验检测HKL处理后小鼠血清HBV DNA水平; B: 荧光定量PCR实验检测HKL处理后小鼠肝组织内HBV DNA水平; C: 荧光定量PCR实验检测HKL处理后小鼠肝组织内total HBV RNAs水平; D: 荧光定量PCR实验检测HKL处理后小鼠肝组织内HBV 3.5 Kb RNA水平; E: Taqman探针特异性PCR实验检测HKL处理后小鼠肝组织内HBV cccDNA水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与Vehicle组比较。

A: the effects of HKL on the serum HBV DNA in mouse model were determined by real-time quantitative PCR; B: the effects of HKL on the liver HBV DNA in mouse model were determined by real-time quantitative PCR; C: the effects of HKL on the liver total HBV RNAs in mouse model were determined by real-time quantitative PCR; D: the effects of HKL on the liver HBV 3.5 Kb RNA in mouse model were determined by real-time quantitative PCR; E: the effects of HKL on the liver HBV cccDNA in mouse model were determined by Taqman probe specific PCR assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the Vehicle treatment group.

图6 HKL在小鼠模型中对HBV转录和复制的影响

Fig.6 The effects of HKL on the HBV transcription and replication in mouse model

响HBV聚合酶启动。尽管HKL抑制HBV转录与复制的机制还有待进一步研究,但其提供了一种潜在的候选药物,其功能可能与ETV不同,从而可以避免ETV等核苷类似物耐药问题。

我们的研究揭示了HKL作为SIRT3激动剂在体内均具有较强的抗病毒作用,其通过激活SIRT3,抑制HBV复制和转录。综上所述,HKL可以作为一种潜在的HBV治疗药物。

参考文献 (References)

- [1] KWON H, LOK A S. Hepatitis B therapy [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(5): 275-84.
- [2] WONG M C S, HUANG J L W, GEORGE J, et al. The changing epidemiology of liver diseases in the Asia-Pacific region [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(1): 57-73.
- [3] FENG S, GAO L, HAN X, et al. Discovery of small molecule therapeutics for treatment of chronic HBV infection [J]. ACS Infect Dis, 2018, 4(3): 257-77.
- [4] FRIED L E, ARBISER J L. Honokiol, a multifunctional antiangiogenic and antitumor agent [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(5): 1139-48.
- [5] ARORA S, SINGH S, PIAZZA G A, et al. Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy [J]. Curr Mol Med, 2012, 12(10): 1244-52.
- [6] AVERETT C, BHARDWAJ A, ARORA S, et al. Honokiol suppresses pancreatic tumor growth, metastasis and desmoplasia by interfering with tumor-stromal cross-talk [J]. Carcinogenesis, 2016, 37(11): 1052-61.
- [7] PONNURANGAM S, MAMMEN J M, RAMALINGAM S, et al. Honokiol in combination with radiation targets notch signaling to inhibit colon cancer stem cells [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(4): 963-72.
- [8] WANG W D, SHANG Y, LI Y, et al. Honokiol inhibits breast cancer cell metastasis by blocking EMT through modulation of Snail/Slug protein translation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(9): 1219-27.

- [9] BAI X, CERIMELE F, USHIO-FUKAI M, et al. Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis *in vitro* and tumor growth *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 35501-7.
- [10] PILLAI V B, SAMANT S, SUNDARESAN N R, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6656.
- [11] SCHLICKER C, GERTZ M, PAPTAEODOROU P, et al. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5 [J]. *J Mol Biol*, 2008, 382(3): 790-801.
- [12] HIRSCHHEY M D, SHIMAZU T, GOETZMAN E, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation [J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 121-5.
- [13] SOMEYA S, YU W, HALLOWS W C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction [J]. *Cell*, 2010, 143(5): 802-12.
- [14] REN J H, HU J L, CHENG S T, et al. SIRT3 restricts hepatitis B virus transcription and replication through epigenetic regulation of covalently closed circular DNA involving suppressor of variegation 3-9 homolog 1 and SET domain containing 1A histone methyltransferases [J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1260-76.
- [15] HONG X, KIM E S, GUO H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2017, 66(6): 2066-77.
- [16] YE J S, CHEN L, LU Y Y, et al. SIRT3 activator honokiol ameliorates surgery/anesthesia-induced cognitive decline in mice through anti-oxidative stress and anti-inflammatory in hippocampus [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(3): 355-66.
- [17] PILLAI V B, KANWAL A, FANG Y H, et al. Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34082-98.
- [18] WANG J, NISAR M, HUANG C, et al. Small molecule natural compound agonist of SIRT3 as a therapeutic target for the treatment of intervertebral disc degeneration [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(11): 146.
- [19] LIU S, LI L, TAN L, et al. Inhibition of herpes simplex virus-1 replication by natural compound honokiol [J]. *Virology*, 2019, 543(3): 315-23.
- [20] FANG C Y, CHEN S J, WU H N, et al. Honokiol, a lignan biphenol derived from the magnolia tree, inhibits dengue virus type 2 infection [J]. *Viruses*, 2015, 7(9): 4894-910.
- [21] LAN K H, WANG Y W, LEE W P, et al. Multiple effects of Honokiol on the life cycle of hepatitis C virus [J]. *Liver Int*, 2012, 32(6): 989-97.
- [22] LOK A S, ZOULIM F, LOCARNINI S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management [J]. *Hepatology*, 2007, 46(1): 254-65.
- [23] LIU Y, ZHOU Y, LI X, et al. Hepatitis B virus mutation pattern rtL180M+A181C+M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 354-65.
- [24] WOODBURY A, YU S P, WEI L, et al. Neuro-modulating effects of honokiol: a review [J]. *Front Neuro*, 2013, 4: 130.