

乙肝转阴散对鸭乙型肝炎病毒的抑制作用

唐爱存, 陈兆霓, 黄仁彬*, 王乃平(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

摘要: 目的 观察乙肝转阴散(YGZYS)对鸭乙型肝炎病毒乙型肝炎表面抗原(DHBsAg)和乙型肝炎 E 抗原(DHBeAg)的抑制作用。方法 采用 1 d 龄雏鸭接种广西麻鸭乙型肝炎病毒(DHBV)强阳性血清, 接种 1 周后用聚合酶链式反应(PCR)法筛选出 DHBV 强阳性鸭。随机分成 5 组: 模型组、阳性对照组和 YGZYS 高、中、低剂量组, 每组 10 只, 各组雏鸭均灌胃给药 14 d。于用药前(T0)、用药 7 d (T7)和 14 d (T14)及停药后 3 d (P3)分别采血, 采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定血清 DHBsAg 和 DHBeAg 的滴度。结果 与模型组比较, YGZYS 高、中剂量组用药后血清 DHBsAg 和 DHBeAg 的滴度显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 停药 3 d 后, YGZYS 高、中剂量组血清 DHBsAg 和 DHBeAg 的滴度无反跳现象。YGZYS 抑制 DHBsAg 和 DHBeAg 的作用有明显的量效和时效反应关系。结论 YGZYS 可有效地抑制 DHBsAg 和 DHBeAg 的表达。**关键词:** 乙肝转阴散; 鸭乙型肝炎病毒; 鸭乙型肝炎表面抗原; 鸭乙型肝炎 E 抗原。

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)06-0476-04

Inhibitory Effect of Yiganzhuanyinsan on Duck Hepatitis B Virus

TANG Aicun, CHEN Zhaoni, HUANG Renbin*, WANG Naiping(*Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the inhibitory effects of traditional Chinese medicine Yiganzhuanyinsan (YGZYS) on hepatitis B surface antigen (DHBsAg) and hepatitis B e-antigen (DHBeAg). **METHODS** One-day old Guangxi brown spotted

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0992003A-2); 广西科学基金项目(0731066)

作者简介: 唐爱存, 男, 硕士生 Tel: (0771)5358014 E-mail: tangaicun321@126.com *通信作者: 黄仁彬, 博士, 教授, 博导
Tel: (0771)5358272 E-mail: huangrenbin518@163.com

ducks infected with hepatitis B virus (DHBV) were used as the DHBV infected animal model. Positive ducks were detected by PCR at one week after the infection of DHBV, and were randomly divided into five groups: the high dose group, middle dose group and low dose group of Yiganzhuanyinsan(YGZYS), model group and positive control group, with 10 ducks in each group. YGZYS was given ig. for 14 days. Serum samples were collected on the 0, 7 th, 14 th day respectively after the treatment with drugs and the 3rd day after drug withdrawal, and the contents of DHBsAg and DHBcAg in serum were measured by ELISA. **RESULTS** The serum DHBsAg and DHBcAg contents in high dose and middle dose groups of YGZYS were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), and did not rebound on the 3rd day after drug withdrawal, and its inhibitory effects on DHBsAg and DHBcAg were an obvious dose-and time-dependent manners. **CONCLUSION** YGZYS can effectively inhibit the expressions of DHBsAg and DHBcAg.

KEY WORDS: Yiganzhuanyinsan; duck hepatitis B virus; DHBsAg; DHBcAg

乙肝转阴散(YGZYS)系根据民间治疗肝炎经验和中医理论研制的复方制剂,由白花蛇舌草、半枝莲、板兰根、土茵陈、小田基黄等多种中草药配伍组成,通过长时期的临床观察而拟定的治疗慢性乙型肝炎的验方,具有清热解毒等功效,主要用于治疗乙型病毒性肝炎、肝硬化等,对促进乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎 E 抗原(hepatitis B e-antigen, HBeAg)、乙肝核心抗体(抗 HBc)和乙型肝炎病毒 DNA(HBV-DNA)转阴和改善肝功能具有显著疗效。笔者前期研究发现 YGZYS 能有效地抑制 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg。试验研究表明 YGZYS 对四氯化碳所致小鼠急性化学性肝损伤有显著的保护作用^[1]。笔者以广西麻鸭为研究对象,观察 YGZYS 在体内对鸭乙型肝炎病毒 DHBsAg 和 DHBcAg 的抑制作用,为开发 YGZYS 用于乙型肝炎治疗提供实验依据。

1 材料与试药

1.1 仪器

Model 450 型自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), HH-W21-Cr600 电热恒温水浴箱(北京长安科学仪器厂)。

1.2 试药

YGZYS(由广西医科大学药理学教研室采用水提醇沉的最佳工艺提取);拉米夫定[3TC,葛兰素-史克制药(苏州)有限公司,批号:09010007,100 mg];HBsAg 和 HBeAg 酶联免疫检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)。根据 GenBank 鸭 HBV 基因序列(登录号: M32990)并参照文献[2],设计如下引物:上游引物:5'-AACCATTGAAGCA ATCACTAGAC-3';下游引物:5'-ATCTATGGTGG CTGCT CGAACTA-3',目的片段大小为 218 bp,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 病毒

鸭乙型肝炎病毒 DNA(DHBV DNA)强阳性血清由广西医科大学在读研究生唐爱存采自广西麻鸭, -80°C 保存。

1.4 动物

广西麻鸭,体重(50 ± 5)g,1 d 龄,♀♂不限,70 只,由广西畜牧种苗场提供(动物生产许可证号:SYKG 桂 2003-0003)。常规饲养,饲养环境:温度 25°C 左右,相对湿度 60%~80%,每天光照约 12 h,房间定时通风换气,保持空气流通。喂养方法:圆满牌 513 小鸭料(柳州市农乐饲料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 广西麻鸭乙肝动物模型的建立^[3]

采用健康成年广西麻鸭产的蛋孵化 1 d 龄雏鸭,颈静脉注射 0.1 mL DHBV DNA 强阳性病毒血清。接种 1 周后分别从腔静脉采血约 0.2~0.3 mL 左右,装入一次性 Eppendoff 管中,整个过程不能交叉污染。 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取血清, -20°C 保存,备用。采用聚合酶链式反应(PCR)法检测筛选出阳性感染鸭。PCR 扩增条件: 94°C 预变性,10 min; 94°C 变性,30 s; 55°C 退火,30 s; 72°C 延伸,45 s。共反应 40 个循环。最后一个循环后 72°C 延伸 10 min。

2.2 实验分组及用药

经 PCR 法检测筛选出阳性感染鸭共 50 只,饲养至 13 d,作为实验动物。将 50 只鸭随机分为 5 组,每组 10 只。各组动物在同样条件下饲养,均按下列药物以每日 2 次(早、晚各 1 次)、空腹灌胃给药 14 d。模型组:生理盐水 $50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;阳性对照组:3TC, $50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; YGZYS 高、中、低剂量组(YGZYS_H, YGZYS_M, YGZYS_L)分别为: YGZYS $6.0\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $3.0\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $1.5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。于用药前(T0)、用药 7 d(T7)、用药 14 d(T14)、停药 3 d(P3)时,分别从腔静脉采血,每只采血 1.5 mL

左右, 分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 计量资料先经正态分布和方差齐性检验, 方差不齐性采用非参数检验。同组样本前后比较采用配对资料 t 检验。 P 值预设为 0.05。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4 酶联免疫吸附(ELISA)法定量检测 DHBsAg 和 DHBcAg 的滴度^[4]

采用 ELISA 法, 按照 DHBsAg 检测试剂盒说明书检测 YGZYS 治疗前后鸭血清 DHBsAg 的滴度。计算药物对 DHBcAg, DHBsAg 表达的抑制百分率。药物对抗原的抑制百分率= $[1-\text{实验孔抗原}$

$\text{OD 值}/\text{对照孔抗原 OD 值}] \times 100\%$ 。

结果显示: 与模型组比较, 3TC 组与 YGZYS_H、YGZYS_M 组用药 7 d (T7) 后, 均可使鸭血清 DHBsAg 的滴度显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且随着药物浓度和作用时间的增加, 其抑制作用逐渐增强, 呈现明显的量效和时效反应关系; 停药 3 d (P3) 后, YGZYS_H 组血清 DHBsAg 的滴度无反跳现象。YGZYS 体内抗 DHBV DNA 的作用强于阳性对照药物 3TC, 其中 YGZYS_H 组抑制效果最佳, 其用药 14 d (T14) 和停药 3 d (P3) 的抑制率分别达到 29.9% 和 33.2%。YGZYS 对鸭血清 DHBsAg 表达的抑制作用见表 1。

表 1 YGZYS 对鸭血清 DHBsAg 表达的抑制作用 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Inhibitory effect of YGZYS on DHBsAg in serum of duck ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	T ₀	T ₇	抑制率/%	T ₁₄	抑制率/%	P ₃	抑制率/%
模型组	0.296±0.049	0.299±0.046	—	0.301±0.051	—	0.301±0.051	—
阳性对照组	0.303±0.040	0.215±0.049 ²⁾	28.1	0.201±0.055 ²⁾	33.2	0.225±0.052 ²⁾	25.3
YGZYS _L	0.299±0.048	0.268±0.044	10.4	0.251±0.054	16.6	0.273±0.061	9.3
YGZYS _M	0.300±0.049	0.249±0.048 ¹⁾	16.7	0.231±0.057 ¹⁾	23.3	0.254±0.053	15.6
YGZYS _H	0.302±0.047	0.230±0.051 ²⁾	23.1	0.211±0.055 ²⁾	29.9	0.201±0.056 ²⁾	33.2

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

采用 ELISA 法, 检测 YGZYS 治疗前、后鸭血清 DHBcAg 的滴度。结果表明: 与模型组比较, 3TC 组与 YGZYS_H、YGZYS_M 组用药 7 d (T7) 后, 均可使鸭血清 DHBcAg 的滴度显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且随着药物浓度和作用时间的增加, 其抑制作用逐渐增强, 呈现明显的量效和时效反应

关系; 停药 3 d (P3) 后, YGZYS_H 组血清 DHBcAg 的滴度无反跳现象。YGZYS_H 组抑制效果最佳, 其用药 14 d (T14) 和停药 3 d (P3) 的抑制率分别达到 35.7% 和 42.5%。YGZYS 对鸭血清 DHBcAg 表达的抑制作用见表 2。

表 2 YGZYS 对鸭血清 DHBcAg 表达的抑制作用 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Inhibitory effect of YGZYS on DHBcAg in serum of duck ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	T ₀	T ₇	抑制率/%	T ₁₄	抑制率/%	P ₃	抑制率/%
模型组	0.140±0.022	0.141±0.021	—	0.140±0.021	—	0.139±0.026	—
阳性对照组	0.140±0.020	0.090±0.020 ²⁾	36.2	0.081±0.024 ²⁾	42.1	0.111±0.023 ¹⁾	20.1
YGZYS _L	0.139±0.031	0.122±0.020	13.5	0.110±0.040	21.4	0.132±0.021	5.0
YGZYS _M	0.141±0.022	0.113±0.024 ¹⁾	19.9	0.103±0.038 ¹⁾	26.4	0.120±0.025	13.7
YGZYS _H	0.141±0.022	0.101±0.026 ²⁾	28.4	0.090±0.021 ²⁾	35.7	0.080±0.024 ²⁾	42.5

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

乙型肝炎抗病毒药物开发和评价中的重要环节之一就是建立一种方便有效的体内病毒感染模型。HBV 是比较严格的嗜肝 DNA 病毒, 其感染的宿主范围狭窄, 具有明显的种属特异性, 很难在普通实验动物中建立疾病模型。1980 年,

Mason 等^[5]观察到鸭乙肝病毒直径约为 40 nm, 其形态与 HBV 相似; 病毒 DNA 呈环状或部分单链结构, 内源性 DNA 聚合酶可将其转变为双链环状, 其 DNA 长度约为 3 000 bp, 和 HBV 一样; 病毒基因不仅在肝脏内复制, 而且也可在肝外脏器, 如肾、心、胰、脾等脏器中复制, 说明

鸭乙肝病毒与人乙肝病毒属于同一病毒属。由于麻鸭易于繁育、饲养，容易在麻鸭等品种的雏鸭中获得实验感染成功和建立 DHBV 持续感染状态，从而较易建立一个与 HBV 感染相近似的体内实验系统。因此，鸭乙型肝炎病毒实验动物模型已被作为 HBV 感染的模型用于实验研究^[6]。现已成为申报抗乙肝病毒新药必做的体内实验模型。

乙型肝炎是由 HBV 引起的，以肝脏炎性病变为主的一种传染性疾病。目前对乙型肝炎病毒引起的慢性肝病尚无理想的治疗方法。临床常用的 2 类抗病毒药为干扰素 α 和核苷类药物。干扰素 α 治疗的有效率低，不良反应较大；核苷类代表药物拉米夫定需要的疗程较长、存在较严重的耐药性，极大限制了其临床应用^[6]。因此，寻找疗效确切、长期服用安全且价格低廉的药物是亟待解决的问题。目前，中草药抗病毒已成为国内、外研究的热点。本研究应用广西 1 d 龄雏鸭经颈静脉注射 DHBV 的方法来建立鸭乙型肝炎动物模型，进行 YGZYS 抗乙肝病毒实验。研究表明，YGZYS 能够有效抑制 DHBsAg 和 DHBcAg 的分泌，说明 YGZYS 在体内有抗乙肝病毒作用，且抗病毒效果与药物剂量大小有一定的量效关系。研

究结果显示，YGZYS 可有效地抑制 DHBsAg 和 DHBcAg 的分泌，这可能是其治疗慢性乙型肝炎的途径之一。

REFERENCES

- [1] HE P, HUANG R B, LING J, et al. Protective effects of Yiganzhuanyinsan on carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice [J]. J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报), 2006, 23(5): 732-733.
- [2] DUFLOT A, MEHROTRA R, YU S Z, et al. Spectrum of liver disease and duck hepatitis B virus infection in a large series of Chinese ducks with hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1995, 21(6): 1483-1491.
- [3] ZHENG M S, ZHANG J G, LIU Z Y. An experimental investigation into assessment of 200 Chinese medicinal herbs against HBsAg using ELISA technique [J]. J Microbiol(微生物学杂志), 1996, 16(1): 1-4.
- [4] MASON W S, SEAL G, SUMMERS J. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus [J]. J Virol, 1980, 36(3): 829-836.
- [5] DELMAS J, SCHORR O, JAMARD C, et al. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus - infected hepatocytes *in vivo* and *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 425-433.
- [6] LAVANCHY D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, current and emerging prevention and control measures: a review [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(2): 97-107.

收稿日期：2009-08-10