

# 玉郎伞水提物对慢性鸭乙型肝炎的保护作用

农志欢, 陶丽群, 左巧云, 陈春霞, 黄仁彬\*  
(广西医科大学 药理教研室, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**建立鸭乙型肝炎慢性感染模型,研究玉郎伞水提物对鸭慢性乙型肝炎的保护作用。**方法:**1日龄的广西麻鸭经颈静脉接种0.2 mL的鸭乙型肝炎病毒(DHBV)强阳性血清,7 d后用荧光定量PCR筛选DHBV阳性鸭,随机分为4组,即:模型组,玉郎伞水提物高、低剂量组(按生药量计分别为20, 10 g·kg<sup>-1</sup>)和秋水仙碱组(0.02 g·kg<sup>-1</sup>)。将未感染鸭作为正常组。除正常组外,其余各组每周均接种0.2 mL的DHBV强阳性血清,直到实验结束,以造成鸭乙型肝炎慢性感染。从造模第25周开始,连续灌胃给药5周。末次给药24 h后,所有动物从颈静脉采血,测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性,血清鸭乙型肝炎病毒表面抗原(DHBsAg),DHBV-DNA含量。将所有动物处死,迅速摘取肝组织,测定肝匀浆超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,丙二醛(MDA)的含量,肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量。通过HE染色观察肝细胞损伤程度。**结果:**与正常组比较,模型组血清ALT,AST活性,HBsAg,DHBV-DNA含量均显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。肝组织中SOD,GSP-Px活性均显著降低,MDA和Hyp含量则显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,玉郎伞水提物高、低剂量组均能降低血清ALT活性和DHBV-DNA含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),均能增加肝组织匀浆中GSH-Px活性,降低MDA和Hyp的含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。玉郎伞水提物高剂量组能降低血清AST活性和HBsAg含量,增加肝组织SOD活性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。HE染色显示玉郎伞水提物能显著减轻肝细胞损伤。**结论:**玉郎伞水提物对DHBV所致的慢性鸭乙型肝炎有一定的保护作用。

**[关键词]** 玉郎伞水提物; 鸭乙型肝炎病毒; 慢性感染

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0158-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100158

**Protective Effect of *Millettia pulchra* Aqueous Extract on Chronic Hepatitis B Duck** NONG Zhi-huan, TAO Li-qun, ZUO Qiao-yun, CHEN Chun-xia, HUANG Ren-bin\* (Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the chronic hepatitis B duck model and study the protective effect of *Millettia pulchra* aqueous extract on chronic hepatitis B duck. **Method:** One-day old Guangxi shelducks were infected with 0.2 mL duck hepatitis B virus (DHBV). The infected ducks, detected by real-time PCR 7 days after infection, were divided into model group, *M. pulchra* high-dose and low-dose group (20, 10 g·kg<sup>-1</sup>) and colchicine group (0.02 g·kg<sup>-1</sup>), and the uninfected ducks were served as normal group. In addition to the normal group, the rest of ducks were vaccinated with 0.2 mL DHBV strong positive serum per week, until the end of the experiment. The corresponding drugs were successively administrated for 5 weeks after 25 weeks of DHBV attack. Blood and liver tissue were collected 24 hours after the last administration. The activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST), and the content of duck hepatitis B virus surface antigen (DHBsAg) and duck hepatitis B virus DNA (DHBV-DNA) in serum were measured. The activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GSH-Px), and the level of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (Hyp) in liver homogenate were determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to

**[收稿日期]** 20141119(018)

**[基金项目]** 广西科学研究与科技开发攻关项目(桂科攻10124008-6,桂科攻0992003A-2);广西科技基础条件平台建设项目(12-97-20, 10-108-19);广西地方性高发疾病防治研究重点实验室基金项目(KFJJ2010-22);广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053094)

**[第一作者]** 农志欢, 硕士, 从事抗病毒性肝炎药物研究, Tel:0771-5339805, E-mail:15977727360@163.com

**[通讯作者]** \* 黄仁彬, 博士, 教授, 从事抗病毒性肝炎药研究, Tel:0771-5339805, E-mail:huangrenbin518@163.com

observe the damage degree of liver cells. **Result:** In model group, the levels of ALT and AST, and the content of DHBsAg and DHBV-DNA in serum were significantly increased; the activity of SOD and GSH-Px was significantly decreased, and the levels of MDA and Hyp were significantly increased, compared with normal group. *M. pulchra* aqueous extract (20, 10 g · kg<sup>-1</sup>) significantly reduced the activity of ALT, and the content of DHBV-DNA in serum, increased the activity of GSH-Px, and decreased the levels of MDA and Hyp in liver. *M. pulchra* aqueous extract (20 g · kg<sup>-1</sup>) significantly reduced the activity of AST, increased the activity of SOD. HE staining showed that *M. pulchra* aqueous extract could significantly decrease the damage degree of liver cells. **Conclusion:** *Millettia pulchra* aqueous extract has certain protective effect on chronic hepatitis B duck caused by DHBV.

[**Key words**] *Millettia pulchra* aqueous extract; duck hepatitis B virus; chronic infect

玉郎伞是蝶型花科植物疏叶崖豆的块根,民间用于高血压、肝炎、消化不良,跌打损伤和风湿等病症的治疗<sup>[1-2]</sup>。在抗肝损伤方面,玉郎伞不仅对小鼠急性化学性肝损伤具有较好的保护作用<sup>[3]</sup>,而且对大鼠慢性肝炎、肝纤维化有较好的疗效<sup>[4]</sup>,能有效抑制鸭乙型肝炎病毒(DHBV)DNA的复制<sup>[5]</sup>。体外研究还表明,玉郎伞能抑制人肝癌细胞7404(BEL-7404)的生长<sup>[6]</sup>。目前关于鸭乙型肝炎慢性感染的研究较少,仅有朱清静等采用DHBV反复感染樱桃谷鸭致肝组织出现较为严重的损伤,甚至形成肝纤维化<sup>[7]</sup>。本研究采用DHBV强阳性血清反复攻击广西麻鸭,造成鸭乙型肝炎慢性感染模型,之后给予玉郎伞水提物,观察其对鸭乙型肝炎慢性感染所致的肝损伤的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 1日龄广西麻鸭,雌雄不限,体重(50 ± 5)g,由广西南宁古氏珍禽孵化养殖有限公司提供。

**1.2 药物及试剂** 玉郎伞采自广西灵山县,经广西中医药研究院赖茂祥鉴定是蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* var. *laxior* 的块根。玉郎伞水提物(批号20130508),由本实验室自行提取;秋水仙碱(批号20121109,西双版纳药业有限责任公司),丙氨酸转氨酶(ALT,批号20140115)和天冬氨酸转氨酶(AST,批号20140115)改良赖式法检测试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD,批号20140212),丙二醛(MDA,批号2014021),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号20140114),考马斯亮蓝(批号20140113),羟脯氨酸(Hyp,批号20140212)试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供;SYBR Premix Ex Taq TM [批号AK5305,宝生物工程(大连)有限公司];乙型肝炎病毒表面抗原ELISA试剂盒(批号20140101208,上海荣盛生物药业有限公司)。

**1.3 仪器** 722S型可见光光度计(上海精密科学

仪器厂有限公司),AB17300型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司),Spectra Max Plus 384型酶标仪(香港分子仪器公司)。

## 2 方法

**2.1 玉郎伞水提物的制备**<sup>[8]</sup> 1kg玉郎伞药材浸泡1h,然后用6000mL蒸馏水煎煮药材约2h,过滤,再用相同量的蒸馏水煎煮滤渣2次,每次2h。合并3次滤液,将滤液浓缩至500mL(含原生药2g · mL<sup>-1</sup>),将浓缩液放入冷藏室保存。

**2.2 造模、分组及给药** 造模方法参考文献[9]并作适当改进。1日龄的广西麻鸭经颈静脉接种0.2mL的DHBV强阳性血清,以造成乙肝感染模型。于接种病毒后第7天抽血,分离出血清,用荧光定量PCR检测感染情况。将感染鸭随机分成4组,即模型组(ig等容量生理盐水),玉郎伞水提物高、低剂量组(按生药量计为20,10g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,ig),秋水仙碱组(20mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)。未感染鸭作为正常组(ig等容量生理盐水)。除了正常组外,其余4组每周注射1次DHBV强阳性血清直到实验结束,正常组不做处理。造模第25周开始ig给药,连续给药5周,末次给药24h后,颈静脉取血,分离出血清-20℃保存。迅速取肝组织数块,做相应处理,按相关试剂盒要求保存。

**2.3 血清DHBsAg, DHBV-DNA, ALT, AST的测定** 血清DHBV-DNA含量测定参照文献[9],采用荧光定量PCR法进行测定,引物序列为,上游引物:5-AACCATTGAAGCAATCACTAGAC-3,下游引物:5-ATCTATGGTGGCTGCTCGAACTA-3。血清ALT和AST活性测定具体操作方法按试剂盒要求,用分光光度计于505nm波长处测吸光度A。血清DHBsAg含量采用ELISA法定量检测。具体操作方法按试剂盒要求操作,用酶标仪于450nm波长处测A。

**2.4 肝组织SOD, GSH-Px, MDA, Hyp的测定** 肝

组织 SOD, GSH-Px, MDA, Hyp 的测定均严格按照试剂盒要求操作, 采用分光光度法进行测定。

**2.5 肝脏病理组织学观察** 每只鸭于肝左叶同一部位取约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小的肝组织用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察鸭肝组织损伤程度。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据, 各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析, 之后用 LSD 法进行两两比较。P < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对血清 ALT, AST 活性的影响** 与正常组比较, 模型组 ALT, AST 均显著升高 (P < 0.05, P < 0.01)。与模型组比较, 玉郎伞水提物和秋水仙碱均能明显降低 ALT, AST (P < 0.05, P < 0.01)。见表 1。

**3.2 对血清 HBsAg, DHBV-DNA 含量的影响** 与正常组比较, 模型组血清 HBsAg, DHBV-DNA 均显著升高 (P < 0.05, P < 0.01)。与模型组比较, 玉郎伞水提物能显著降低血清 HBsAg, DHBV-DNA 的含量 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 2。

**3.3 对肝组织 SOD, MDA, GSH-Px, Hyp 的影响** 与正常组比较, 模型组 SOD 和 GSH-Px 均显著降低, 而 MDA 和 Hyp 则显著升高 (P < 0.05, P < 0.01)。与模型组比较玉郎伞水提物和秋水仙碱均能显著升

表 1 玉郎伞水提物对慢性鸭乙型肝炎血清 ALT, AST 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of *M. pulchra* aqueous extract on serum ALT, AST of DHBV chronic infected duck ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量		ALT	AST
	/g · kg <sup>-1</sup>	n	/U · L <sup>-1</sup>	/U · L <sup>-1</sup>
正常	-	8	30.84 ± 4.45	46.46 ± 2.57
模型	-	7	40.57 ± 5.85 <sup>4)</sup>	52.00 ± 3.82 <sup>3)</sup>
玉郎伞水提物	20	8	32.63 ± 3.68 <sup>2)</sup>	47.33 ± 2.26 <sup>1)</sup>
	10	8	35.33 ± 3.21 <sup>1)</sup>	48.43 ± 2.54
秋水仙碱	0.02	7	34.68 ± 3.52 <sup>1)</sup>	45.74 ± 2.02 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01; 与正常组比较<sup>3)</sup> P < 0.05, <sup>4)</sup> P < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

表 2 玉郎伞水提物对慢性鸭乙型肝炎血清 HBsAg, DHBV-DNA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of *M. pulchra* aqueous extract on serum HBsAg, DHBV-DNA of DHBV chronic infected duck ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量		HBsAg	DHBV-DNA
	/g · kg <sup>-1</sup>	n	/A	/ × 10 <sup>6</sup> copy/mL
正常	-	8	0.106 ± 0.058	0.042 ± 0.022
模型	-	7	0.219 ± 0.094 <sup>3)</sup>	3.810 ± 2.800 <sup>4)</sup>
玉郎伞水提物	20	8	0.124 ± 0.035 <sup>1)</sup>	0.600 ± 1.470 <sup>2)</sup>
	10	8	0.186 ± 0.044	1.231 ± 1.774 <sup>1)</sup>
秋水仙碱	0.02	7	0.194 ± 0.124	3.030 ± 2.570

高 SOD 和 GSH-Px, 降低 MDA 和 Hyp (P < 0.05, P < 0.01)。见表 3。

表 3 玉郎伞水提物对慢性鸭乙型肝炎肝组织 SOD, MDA, GSH-Px, Hyp 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of *M. pulchra* aqueous extract on liver SOD, MDA, GSH-Px and Hyp of DHBV chronic infected duck ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量		SOD	MDA	GSH-Px	Hye
	/g · kg <sup>-1</sup>	n	/U · mg <sup>-1</sup>	/μmol · g <sup>-1</sup>	/U · mg <sup>-1</sup>	/mg · g <sup>-1</sup>
正常	-	8	63.18 ± 5.39	2.35 ± 0.31	138.12 ± 17.17	0.202 ± 0.027
模型	-	7	53.65 ± 7.59 <sup>3)</sup>	3.07 ± 0.42 <sup>4)</sup>	95.23 ± 22.08 <sup>4)</sup>	0.310 ± 0.047 <sup>4)</sup>
玉郎伞水提物	20	8	64.14 ± 9.17 <sup>1)</sup>	2.61 ± 0.37 <sup>1)</sup>	146.68 ± 29.81 <sup>2)</sup>	0.222 ± 0.027 <sup>2)</sup>
	10	8	60.35 ± 8.85	2.83 ± 0.51 <sup>1)</sup>	135.57 ± 25.69 <sup>1)</sup>	0.263 ± 0.028 <sup>1)</sup>
秋水仙碱	0.02	7	63.35 ± 8.25 <sup>1)</sup>	2.32 ± 0.48 <sup>2)</sup>	145.50 ± 23.87 <sup>2)</sup>	0.242 ± 0.036 <sup>1)</sup>

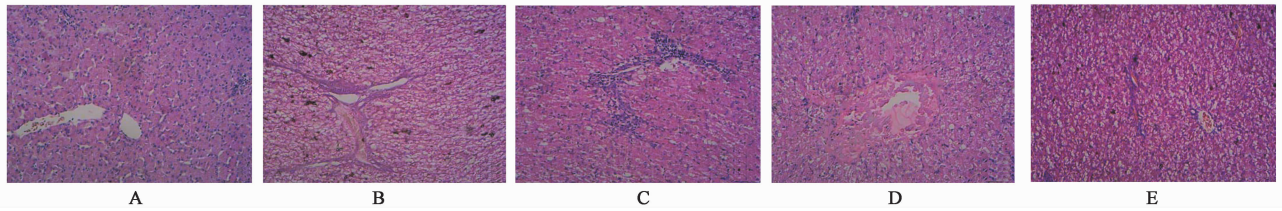
**3.4 对肝组织病理损伤的影响** HE 染色显示, 模型组肝细胞出现弥漫性重度颗粒样变; 玉郎伞水提物高剂量组与秋水仙碱组相似, 为轻度颗粒样变, 均有不同程度肝细胞空泡变性、肿胀, 部分组织汇管区小叶间隔可见炎症细胞浸润, 结构基本完整; 玉郎伞水提物低剂量组呈中度颗粒样变。见图 1。

### 4 讨论

DHBV 与人类乙型肝炎病毒 (HBV) 同属嗜肝 DNA 病毒科, 它们在形态结构、基因序列、病毒复制

及致病机制等方面均较为相似<sup>[10]</sup>。目前, 用 DHBV 感染鸭作为乙型肝炎动物模型来研究人类乙型肝炎发病机制、病毒复制过程及筛选有效的治疗药物, 已为国内外学者所公认<sup>[11]</sup>。前期研究发现广西南宁地区成年麻鸭对 DHBV 易感, 采用 DHBV 诱导建立的广西麻鸭乙型肝炎模型其病程较规律, 病毒血症持续时间较长且较稳定, 无明显的自然转阴现象, 保证了模型的稳定性和可靠性<sup>[12]</sup>。

本研究采用 1 日龄广西麻鸭作为研究实验动



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组; D. 玉郎伞水提物  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组; E. 玉郎伞水提物  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  组

图 1 玉郎伞水提物对慢性鸭乙型肝炎肝组织病理损伤的保护作用(HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Protective effect of *M. pulchra* aqueous extract on liver Pathological damage of DHBV chronic infected duck(HE,  $\times 200$ )

物,通过反复的接种 DHBV 病毒,使其长期保持高拷贝量的病毒感染。之后给予玉郎伞水提物,观察其对乙型肝炎慢性肝损伤的保护作用。结果显示,玉郎伞水提物能显著降低血清 HBsAg 和 DHBV-DNA 的含量,显著降低 ALT 和 AST 活性,说明其抗病毒作用明显,能有效的抑制病毒 DNA 的复制,进而减少肝细胞的损伤。玉郎伞水提物能显著降低肝匀浆中 MDA 的含量,而增加 SOD 和 GSP-Px 的活性,可见其能抑制脂质过氧化,减轻自由基对肝脏的损伤。本研究中,在 30 周的时间内,从肝组织病理切片中,并未发现明显的纤维化形成。而在肝组织羟脯氨酸含量这一反应肝脏胶原纤维含量的指标中,与正常组比较,模型组显著升高。而与模型组比较,玉郎伞水提物组和秋水仙碱组均显著降低。提示玉郎伞水提物能有效抑制慢性乙型肝炎向肝纤维化这一过程,对慢性乙型肝炎有较好的保护作用。

[参考文献]

[1] 黄媛恒,陈健,黄仁彬,等. 玉郎伞提取物对角叉菜胶致大鼠急性胸膜炎的影响[J]. 中国新药与临床杂志,2008,27(3):195-197.  
[2] 陈丽,张绪东,焦杨,等. 玉郎伞提取物对食饵性高脂血症大鼠肝脏脂蛋白代谢相关酶活性及脂肪肝的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):254-258.  
[3] 黄仁彬,段小群,焦杨,等. 玉郎伞提取物对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用及其机制的研究[J]. 广西医科大学学报,2003,20(6):874-877.

[4] 郭又嘉,文坎,张士军,等. 玉郎伞皂苷对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(4):554-558.  
[5] 左巧云,陶丽群,罗秀,等. 玉郎伞多糖抗鸭乙型肝炎病毒及保护肝细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):222-226.  
[6] 欧灿纯,余术宜,黄建春,等. 玉郎伞提取物的抗肝癌作用研究[J]. 中国药房,2009,20(27):2087-2089.  
[7] 朱清静,聂广,李翰旻,等. 鸭乙型肝炎肝纤维化模型的研究[J]. 临床与实验病理学杂志,2000,16(6):501-503.  
[8] 桂茂林,冯自成,廉广,等. 玉郎伞水提物对小鼠耐缺氧抗疲劳及耐高温能力的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1394-1395.  
[9] 张士军,林军,蒋伟哲,等. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒 DNA 的抑制作用[J]. 中药材,2007,30(2):191-193.  
[10] 胡权,张正茂,张小勇,等. 鸭乙型肝炎病毒全基因重组质粒构建及表达[J]. 中国公共卫生,2007,23(5):562-564.  
[11] Miller D S, Halpern M, Kotlarski I, et al. DNA vaccines expressing the duck hepatitis B virus surface proteins lead to reduced numbers of infected hepatocytes and protect ducks against the development of chronic infection in a virus dose-dependent manner [J]. Virology, 2006,348(2):297-308.  
[12] 张士军,李勇文,陈兆霓,等. 广西南宁地区麻鸭乙型肝炎病毒携带状况调查[J]. 中国公共卫生,2008,24(10):173-174.

[责任编辑 聂淑琴]