

HH 胶囊治疗 HBV 转基因小鼠的抗 HBV 机制分析

张传涛^{1,2*}, 张莉敏¹, 黄群², 辜海英¹, 杨鸿¹, 黄晓群², 王芳瑜²

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075; 2. 成都中医药大学, 成都 610072)

[摘要] 目的:观察 HH 胶囊的抗乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)疗效及作用机制。方法:采用大连依利特 ODS-BP C₁₈ 色谱柱研究 HH 胶囊的 HPLC 指纹图谱。HBV 转基因小鼠随机分 4 组,苦参素组小鼠按 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给予苦参素混悬液,高、低剂量 HH 胶囊组小鼠分别按 7, 2 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予 HH 混悬液,模型组给予等体积的生理盐水,5 周后,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg),干扰素 α(interferon α, IFN-α),干扰素 β(interferon β, IFN-β)及肝组织 HBsAg,常规苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测血清及肝组织乙肝病毒的脱氧核糖核酸(hepatitis B virus DNA, HBVDNA)。结果:标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱,其中 1 号峰为没食子酸,8 号峰为柯里拉京,9 号峰为虎杖苷,10 号峰为鞣花酸,13 号峰为甘草酸,14 号峰为齐墩果酸。与模型组比较,高剂量 HH 胶囊可以明显降低 HBV 转基因小鼠肝脏和血清中的 HBsAg, HBVDNA 水平,差异具有统计学意义(P < 0.01),与苦参素组比较差异无统计学意义;高剂量 HH 胶囊可显著升高小鼠 IFN-α, IFN-β, 差异有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05)。结论:HH 胶囊具有确切的抗 HBV 作用,可能与升高 IFN-α, IFN-β 有关。

[关键词] HH 胶囊; HBV 转基因小鼠; 抗乙肝病毒; 干扰素-α/β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0081-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190081

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1105.048.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 11:05

Anti-hepatitis B Virus Mechanism of HH Capsule in Treating HBV Transgenic Mice

ZHANG Chuan-tao^{1,2*}, ZHANG Li-min¹, HUANG Qun², GU Hai-ying¹,
YANG Hong¹, HUANG Xiao-qun², WANG Fang-yu²

(1. *Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;*
2. *Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-hepatitis B virus (HBV) efficacy and the action mechanism of HH capsule. **Method:** Dalian Elite ODS-BP C₁₈ column was used to study the HH capsule HPLC fingerprint. HBV transgenic mice were randomly divided into four groups, such as matrine group, high and low dose HH capsule groups, and model group. The mice in matrine group received the same volume of suspension containing 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹ matrine; mice in high and low dose HH capsule groups received the same volume of suspension containing 7 g·kg⁻¹·d⁻¹ and 2 g·kg⁻¹·d⁻¹ HH capsule; the mice in model group received the same volume of normal saline. After treatment for five weeks, ELISA method was used to detect hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), IFNα and IFNβ in the serum as well as HBsAg in liver tissues. Conventional HE staining was used to observe pathological changes in liver tissues, and quantitative PCR was used to detect hepatitis B virus DNA (HBVDNA) in serum and liver tissues. **Result:** The 14 characteristic peaks were identified in HH capsules fingerprint, including the 1st peak of gallic acid, the 8th peak of corilagin, the 9th peak of polydatin, the 10th peak of ellagic acid, the 13th peak of glycyrrhizin, and the 14th peak of oleanolic acid. As compared with the model

[收稿日期] 20151019(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202624, 81102720, 81072902)

[通讯作者] *张传涛, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治肝病及感染病研究, Tel: 18908046008, E-mail: zct801012@126.com

group, high dose ($7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) HH capsule can significantly reduce HBsAg and HBVDNA levels in the serum and liver of HBV transgenic mice, with statistically significant difference ($P < 0.01$), but the difference was not statistically significant as compared with matrine group. High-dose HH capsule could significantly increase the levels of IFN- α and IFN- β in the mice with statistically significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** HH capsule has reliable anti-HBV effect, which may be associated with increasing IFN- α and IFN- β levels.

[**Key words**] HH capsule; hepatitis B virus transgenic mice; anti-HBV, interferon- α/β .

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈世界性流行,我国属于 HBV 高流行区,全球约 20 亿人曾感染过 HBV,每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌^[1-2]。目前西医抗病毒药物(核苷类和干扰素)仍是一线治疗措施,但却难以彻底清除病毒,药物的耐药率逐年增加,加上药物的不良反应,这些因素均困扰慢乙肝的临床治疗,开发抗病毒能力强、副反应小、具备不同作用位点的新药成了慢性 HBV 感染治疗的关键^[3-5]。HH 胶囊是笔者临床治疗慢乙肝的有效经验方,在既往的研究中,笔者不断增减、优化组方,改进后的 HH 胶囊具有利湿活血之功,前期研究证实具有较好的抗 HBV 作用^[6-7],本研究借助 HBV 转基因小鼠模型进一步证实 HH 胶囊的抗 HBV 作用及其对小鼠干扰素 IFN- α , IFN- β 的影响以揭示其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 HBV 转基因小鼠 36 只,6~8 周龄,雌雄各半,购置于中国人民解放军第 458 医院全军肝病中心,合格证号 SCXK(军)2012-0018。

1.2 药物及试剂 苦参素胶囊(正大天晴药业集团股份有限公司,批号 131121102),HH 胶囊(组成:虎杖 15 g,扯根菜 20 g,马鞭草 15 g,叶下珠 24 g,郁金 15 g,薏苡仁 30 g,猪苓 20 g 等。上述药物 20 倍量,粉碎后加水浸泡 20 min,常压下煮沸 1 h 后,低温低压蒸发浓缩干燥,取粉,备用);乙型肝炎表面抗原(HBsAg),小鼠干扰素- α (IFN- α)及干扰素- β (IFN- β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(英国 West 公司,批号分别为 F58200, F10640, F10650);乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBVDNA)试剂盒(上海科华生物,批号 201408151),没食子酸、柯里拉京、虎杖苷、甘草酸铵及齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110831-200302, 111623-200302, 111575-200301, 110731-200615, 110709-200304)。

1.3 仪器 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),ABI Stepone plus 型实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)仪(美国应用生物系统公司),

MK3 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将 HBV 转基因小鼠随机分为 4 组,分别为模型组,苦参素组,HH 胶囊高、低剂量组,模型组小鼠给予同体积生理盐水灌胃,苦参素组按 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予同体积苦参素混悬液,HH 胶囊高、低剂量组分别按 $7, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予同体积 HH 混悬液,疗程 5 周。

2.2 检测指标

2.2.1 HH 胶囊指纹图谱研究 大连依利特 ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 230 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 10 μL ,采样时间 77 min,流动相 A 相 0.1% 磷酸溶液, B 相乙腈,进行二元梯度洗脱(0~10 min, 95%~92% A; 10~40 min, 92%~80% A; 40~50 min, 80%~70% A; 50~70 min, 70%~20% A)。

2.2.2 肝组织病理 常规 HE 染色法,具体步骤参照说明书。

2.2.3 血清及肝脏组织 HBsAg 股动脉取血清离心取血清,肝组织取匀浆。用 ELISA 检测,具体方法参照说明书。

2.2.4 血清及肝组织 HBVDNA 股动脉取血清离心取血清,肝组织取匀浆。用 HBVDNA 试剂盒(qPCR 法)检测血清及肝组织中 HBVDNA 水平。

2.2.5 IFN- α , IFN- β 检测 股动脉取血清离心取血清,ELISA 法检测血清 IFN- α , IFN- β 水平。

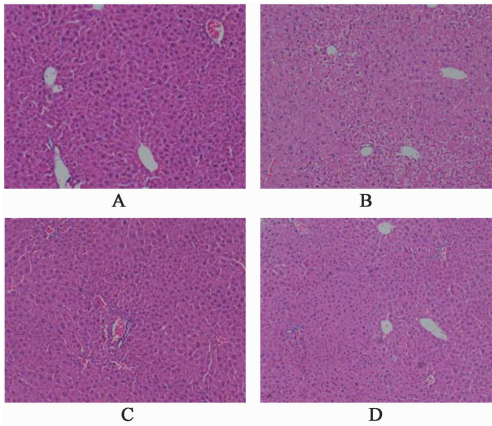
2.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 指纹图谱研究 最终标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱,通过与标准品对照,确定其中 1 号峰为没食子酸,8 号峰为柯里拉京,9 号峰为虎杖苷,10 号峰为鞣花酸,13 号峰为甘草酸,14 号峰为齐墩果酸。

3.2 对小鼠肝组织病理影响 模型组可见肝细胞中肝糖原沉积,脉管区(中央静脉及汇管区)周围轻

度炎细胞浸润,部分视野下可见肝细胞轻度脂肪变性及肝细胞轻度水肿,并可见部分切片中 Kuffer 细胞增生。HH 胶囊高剂量组、苦参素组可见肝细胞中肝糖原沉积外,仅部分切片中可见脉管区(中央静脉及汇管区)周围轻度炎细胞浸润,未见肝细胞轻度脂肪变性、肝细胞轻度水肿及 Kuffer 细胞增生等其他改变。HH 胶囊低剂量组除未见明显脂肪变性细胞外,其余同模型组。见图 1。



A. 模型组;B. 苦参素 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹组;C. HH 胶囊 7 g·kg⁻¹·d⁻¹组;D. HH 胶囊 2 g·kg⁻¹组

图 1 HH 胶囊对小鼠肝组织病理影响(HE, ×100)

Fig.1 Effects of HH capsule on liver histopathology in mice(HE, ×100)

表 2 HH 胶囊对小鼠肝组织及血清 HBVDNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	肝组织	血清
模型	-	1 343 000.00 ± 278 991.55	19 828.75 ± 3 874.08
苦参素	0.15	879 500.00 ± 199 999.29 ^{1,4)}	2 573.75 ± 454.59 ^{1,4)}
HH 胶囊	7	765 625.00 ± 287 161.94 ¹⁾	2 276.38 ± 402.53 ¹⁾
	2	1 163 500.00 ± 106 361.92 ³⁾	16 640.00 ± 432.74 ⁴⁾

3.5 对小鼠及血清 IFN- α , IFN- β 的影响 与模型组比较,苦参素组及 HH 胶囊高剂量组的小鼠 IFN- α , IFN- β 明显升高($P < 0.01$)。与 HH 胶囊低剂量组比较,高剂量组的小鼠 IFN- α , IFN- β 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 HH 胶囊对小鼠血清 IFN- α , IFN- β 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of HH capsule on IFN- α , IFN- β in mice serum($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	IFN- α	IFN- β
模型	-	19.39 ± 3.47	19.44 ± 7.34
苦参素	0.15	30.76 ± 10.36 ¹⁾	32.87 ± 13.62 ¹⁾
HH 胶囊	7	33.11 ± 9.06 ¹⁾	36.01 ± 14.11 ¹⁾
	2	20.12 ± 3.84 ³⁾	24.85 ± 8.194 ⁴⁾

3.3 对小鼠肝组织及血清 HBsAg 的影响 与模型组比较,苦参素组及 HH 胶囊高剂量组 HBV 转基因小鼠肝组织和血清 HBsAg 水平明显下降($P < 0.01$);与 HH 胶囊低剂量组比较,HH 胶囊高剂量组的小鼠肝组织和血清 HBsAg 水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 HH 胶囊对小鼠肝组织及血清 HBsAg 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of HH capsule on HBsAg in mice liver tissue and serum($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	肝组织	血清
模型	-	21.35 ± 1.55	19.02 ± 0.37
苦参素	0.15	13.14 ± 1.46 ¹⁾	10.58 ± 2.19 ¹⁾
HH 胶囊	7	11.98 ± 0.85 ¹⁾	9.93 ± 2.28 ¹⁾
	2	17.91 ± 3.03 ³⁾	14.53 ± 3.27 ⁴⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与 HH 胶囊高剂量组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.4 对小鼠肝组织及血清 HBVDNA 水平的影响 与模型组比较,苦参素组,HH 胶囊高剂量组 HBV 转基因小鼠肝组织及血清 HBVDNA 水平明显下降($P < 0.01$);与 HH 胶囊低剂量组比较,高剂量组的小鼠肝组织及血清 HBVDNA 水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

根据 HBV 致病特点,笔者认为 HBV 多属于中医“湿热”、“寒湿”、“疫毒”等病邪范畴,且《金贵要略·黄疸病》提出“黄家所得,从湿得之”,历代医家治疗黄疸,多不离治“湿”。脾为湿邪来源,《金匮要略》云:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾,四季脾旺不受邪,即勿补之”,提示治疗治肝不忘健脾。叶天士《临证指南医案》指出“大凡经主气,络主血,久病血瘀,初为气结在经,久则血伤入络”,慢乙肝均病久缠绵,多“久则血伤入络”,综上笔者提出肝病核心病机是“脾虚湿盛血瘀”,并制定利湿、健脾、活血的基本治法,总结了抗 HBV 中药复方 HH 胶囊,并在实践中不断优化,方中以虎杖、马鞭草、扯根菜、叶下珠等清热利湿解毒,为君药。以猪苓、薏苡仁等渗

湿、健脾,给“湿”以去路,并鼓舞驱邪之正气,为臣药,郁金等活血通络,纠正“络病”状态,阻止病理状态持续进展,共为臣药。甘草调和诸药,为使药,该方共奏清热利湿、健脾、活血之功,是慢乙肝“脾虚湿盛血瘀”的核心病机。

本研究中笔者首先对 HH 胶囊进行了 HPLC 指纹图谱研究,最终标定 14 个特征峰构成 HH 胶囊的指纹图谱,为复方 HH 胶囊全面质量评价及鉴定提供依据,也保证今后 HH 胶囊相关研究结果的可重复性。笔者进一步研究发现高剂量($7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) HH 胶囊可以显著降低 HBV 转基因小鼠小鼠肝脏和血清中的 HBsAg, HBVDNA 水平,其与苦参素作用强度无明显差异,提示 HH 胶囊具有确切的抗 HBV 作用。笔者还研究发现高剂量的 HH 胶囊可以显著升高小鼠血清 IFN- α , IFN- β 水平,推测 HH 胶囊抗 HBV 可能与诱导小鼠内源性干扰素生成、增加机体抗病毒免疫力有关。另外,笔者研究还发现 HH 胶囊可以减轻小鼠肝细胞轻度脂肪变性、肝细胞轻度水肿及 Kuffer 细胞增生等病理改变,对肝组织炎细胞浸润未见明显影响,对 Kuffer 细胞的影响是否是 HH 胶囊抗 HBV 的作用机制之一,HH 胶囊是直接抑制 Kuffer 细胞增生还是通过抗病毒而负反馈 Kuffer 细胞增生等问题仍需要进一步研究确认。

[参考文献]

[1] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection-

natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med,2004,350(11):1118-1129.

- [2] Fact Sheet. Hepatitis B [M/OL]. World Health Organization. 2010 [2010-12-9]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- [3] Lanford R E, Guerra B, Chavez D, et al. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees [J]. Gastroenterology, 2013, 144 (7): 1508-1517.
- [4] Li G, Fu L, Jiang J, et al. siRNA combinations mediate greater suppression of hepatitis B virus replication in mice [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(3): 641-647.
- [5] Park I H, Kwon Y C, Ryu W S, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by ligand-mediated activation of RNase L [J]. Antiviral Res, 2014, 104 (1):118-127.
- [6] 张传涛,廖志航,吴疆,等. HH 胶囊抗乙肝病毒的体外(2.2.15 细胞)实验研究 [J]. 时珍国医国药,2011, 22(1):78-80.
- [7] 张传涛,廖志航,吴疆,等. HH 胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制 [J]. 世界华人消化杂志,2010, 18(7):652-656.
- [8] 张传涛,张莉敏,吴疆,等. 新 HH 方对 HBV 转基因小鼠脾脏源树突状细胞功能影响的实验研究 [J]. 四川中医,2013,31(8):45-47.

[责任编辑 周冰冰]