

玉郎伞多糖抗鸭乙型肝炎病毒作用

郭雪峰, 罗秀, 何巧玲, 李秀菊, 明建军, 黄仁彬, 张士军*
(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] **目的:** 研究玉郎伞多糖(YLSP)抗鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)的作用。**方法:** 取 1 日龄广西麻鸭 60 只, 在麻鸭颈静脉注射 0.2 mL 强阳性 DHBV DNA 鸭血清, 13 d 后分别从其颈静脉采血 0.5 mL, 分离血清, 用普通 PCR 法筛选出 DHBV 感染强阳性鸭。然后, 将 50 只 DHBV DNA 阳性麻鸭随机分为 5 组: YLSP 高、中、低剂量组(5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹); 阿昔洛韦阳性对照组(0.1 mg·kg⁻¹)和模型组。所有给药组均与模型组比较, 以明确玉郎伞多糖对 DHBV DNA 的作用, 所以未设置正常组。于给药前(T₀), 给药 7 d(T₇), 14 d(T₁₄)及停药后 3 d(P₃)采血, 用实时荧光定量 PCR 法检测鸭血清中 DHBV DNA 的含量。HE 染色观察肝损伤程度。**结果:** 与模型组相比, YLSP 各剂量组及阳性对照组在用药后血清中 DHBV DNA 的含量显著降低, 停药后, 阳性对照组及 YLSP 中、低剂量组 DHBV DNA 含量均有反跳现象。HE 染色结果显示 YLSP 能减轻鸭肝组织的病理损伤程度。**结论:** YLSP 对 DHBV 具有抑制作用同时对肝损伤具有保护作用。

[关键词] 玉郎伞多糖; 鸭乙型肝炎病毒; 实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0175-04

[doi] 10.11653/syfy2014060175

Yulangsan Polysaccharide Affects Anti-Duck Hepatitis B Virus in Brown Duck

GUO Xue-feng, LUO Xiu, HE Qiao-ling, LI Xiu-ju, MING Jian-jun, HUANG Ren-bin, ZHANG Shi-jun*
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Yulangsan Polysaccharide (YLSP) affects the anti-Duck Hepatitis B Virus (anti-DHBV) in brown duck. **Method:** Sixty one-day-old ducks were selected. After 13 days, positive ducks infected 0.2 mL serums of DHBV DNA were detected by PCR, and were randomly divided into five groups: YLSP high-, middle-, low-dose groups (5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹), aciclovir (ACV) group (0.1 mg·kg⁻¹) and model group with 10 brown ducks in every group. The serums were respectively collected before administration, 7 and 14 days after administration and 3 day after withdrawal. The DHBV DNA was detected by fluorescence quantitative (FQ)-PCR assay. The extent of liver injury was observed by HE staining. **Result:** Compared with model group, the serum content of DHBV DNA in ACV group and YLSP 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ groups was significantly decreased. The content of DHBV DNA in ACV group, middle-does group and low-dose groups showed a rebound phenomenon after withdrawal. The results indicated that YLSP had significant protective effects against the injury of ducks' liver. **Conclusion:** YLSP not only has an inhibited effect to DHBV, but also has a protective effect on injury of liver.

[Key words] Yulangsan polysaccharide; DHBV; FQ-PCR

[收稿日期] 20130509(015)

[基金项目] 广西地方特有中药有效成分与机制研究(桂教科研 201202ZD023); 广西地方性高发疾病防治重点实验室开放课题(桂科能 0842009-K4)

[第一作者] 郭雪峰, 硕士研究生, 从事抗肝纤维化药物研究, Tel: 5358272, E-mail: gxf-05411984@163.com

[通讯作者] * 张士军, 博士, 副教授, 从事抗肝炎和肝纤维化药物研究, Tel: 5358272, E-mail: gxykdxzsj@163.com

肝脏疾病是一种发病率高且无特效治疗药物的疾病,对人类的危害极大。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起,以肝脏炎性病变为主的传染性疾病。目前尚无特效的治疗药物。玉郎伞(YLS,又名龙眼参)原植物经考证为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* Kurz var-laxior (Dunn) Z. Wei 的块根,是广西壮族习用药材,民间多用于高血压病、跌打损伤和病后虚弱等。本课题组前期研究发现,玉郎伞多糖(YLSP)主要是由阿拉伯糖和葡萄糖组成,其具有增强免疫功能、抗衰老、保护化学性肝损伤和肝纤维化等方面的作用^[1-4]。而其抗 HBV 的作用尚未见报道,本实验旨在观察 YLSP 抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用及对鸭肝脏损伤的保护作用,为筛选新的抗 HBV 主要活性成分提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 YLSP:玉郎伞(YLS,又名龙眼参)原植物经考证为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* Kurz var-laxior (Dunn) Z. Wei 的块根,是广西壮族习用药材。阿昔洛韦(aciclovir, ACV, 湖南迪诺制药有限公司医药工业研究所产品,批号 20110524)。

1.2 动物 1 日龄广西麻鸭,雌雄不限,体重(45 ± 5)g,购于广西畜牧良种养殖场。

1.3 引物 根据 GenBank 鸭 HBV 基因序列(登录号 M329900)及参考文献^[5]设计以下序列:FP:5'-AACCATTGAAGCAATCACTAGAC-3'; RP:5'-ATCTATGCTGGCTGCTCGAACTA-3'。该目的片段大小为 218 bp。由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 试剂 SYBR Premix Ex *Taq*TM [宝生生物工程(大连)有限公司,批号 04913914001],琼脂糖(西班牙 Biowest 公司),I 型核酸生物染料(批号 G8140),DNA 片段玻璃奶快速回收试剂盒(成都福际生物技术有限公司),50 × TAE [生工生物工程(上海)有限公司,批号 10116872]。

1.5 仪器 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf Mastercyclerep realplex),核酸蛋白测定仪(岛津 UV-1800),GelDoc2000 凝胶电泳成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 YLSP 的提取 参照本课题组前期的提取方法^[6],YLS 根块粉碎后,加 70% 乙醇回流提取除去脂溶性杂质,药渣加蒸馏水煮 3 次,每次 3 h,合并滤液,离心分离,浓缩至适当体积,加入 5 倍量 95% 乙醇,醇沉 24 h,过滤,分别依次用 95% 乙醇、丙酮洗涤 3 次,抽滤,所得滤渣(采用 Sevage 法除去蛋

白^[7]),用氯仿-正丁醇(4:1)溶液对其进行回流 40 min,抽滤,弃滤液,重复操作 3 次,干燥滤渣,再将其溶于适量蒸馏水,透析 48 h,除去小分子杂质及色素,透析后浓缩到适当体积,加 5 倍量无水乙醇,醇沉 24 h,收集沉淀物,真空干燥得 YLSP。该多糖为白色粉末,得率为 0.87%,经常规化学定性试验证实为多糖类。以葡萄糖为对照品,用苯酚-浓硫酸法检测该多糖的纯度为 92.31%。

2.2 广西麻鸭乙型肝炎病毒 肝损伤动物模型的建立 参照本课题组前期已成功建立的研究方法^[8],本实验在稍有改进的基础上,采用健康成年的广西麻鸭的蛋孵化的 1 日龄雏鸭,经颈静脉注射 0.2 mL DHBV DNA 强阳性病毒血清。接种 1 周后,分别从颈静脉采血 0.5 mL,装入一次性 Eppendoff 管中,整个过程防止交叉污染。4 000 r·min⁻¹离心 5 min,取血清于 -20 °C 保存备用。采用 PCR 法检测筛选出感染强阳性鸭。

2.3 分组及给药 在前期研究的基础上,经 PCR 法检测筛选出的感染强阳性鸭,饲养到第 13 天作为实验动物进行药物治疗实验。将 50 只鸭随机分为 5 组,每组 10 只。其分组为:① YLSP 高剂量组 5 g·kg⁻¹·d⁻¹;② YLSP 中剂量组 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹;③ YLSP 低剂量组 1.25 g·kg⁻¹·d⁻¹;④ 阳性对照组 ACV 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹;⑤ 模型组等量的生理盐水。各组动物在相同条件下饲养,均以每天 2 次(早晚各 1 次)空腹 ig,连续给药 14 d。分别于用药前(T₀)、用药 7 d(T₇),14 d(T₁₄)及停药后 3 d(P₃)从颈静脉采血,每只 2 mL 左右,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取血清于 -20 °C 保存备用。

2.4 FQ-PCR 法检测血清中 DHBV DNA 的含量

2.4.1 DHBV DNA 的提取 采用直接加热法。每个样本取血清 100 μL,沸水浴 10 min,10 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清备用。

2.4.2 DHBV DNA 定量对照品的制备 以 2.4.1 中制备的 DHBV DNA 为模板,进行 FQ-PCR 扩增,在紫外仪下切取目的条带后用 DNA 片段玻璃奶快速纯化回收(其操作步骤按回收试剂盒操作),在核酸蛋白仪上测定回收产物的浓度后将其作为定量对照品。将定理对照品以 10 倍系列稀释,终浓度在 1.0 × 10⁴ ~ 1.0 × 10⁷ Copy/mL。

2.4.3 FQ-PCR 反应体系的组成为 ddH₂O 11.00 μL;10 μmol·L⁻¹ FP,RP 各 1.00 μL;Taq 混合酶 10.00 μL;血清提取物 2.00 μL,每个样本的总体积为 25.00 μL。其反应条件为 94 °C 10 min;

94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,45 s;72 ℃,10 min,共40个循环。FQ-PCR结果的判读:扩增过程及数据的储存和分析均由仪器及自带的软件自动完成。

2.4.4 鸭肝脏病理检测 于停药后3 d将各组鸭剖杀后于肝右叶同一部位取相同大小的肝组织,用10%甲醛固定,HE染色作病理检查。

3 结果

3.1 YLSP 治疗前后鸭血清 DHBV DNA 水平变化 与模型组相比,LYSP各剂量组及ACV组在给药后DHBV DNA的含量均有不同程度的下降,其下降程度与给药剂量及给药时间有关。中、低剂量组及ACV组在停药3 d后血清中DHBV DNA的含量有反跳现象,高剂量组则无此现象。见表1。

表1 YLSP 治疗前后鸭血清 DHBV DNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\times 10^7$ Copy/mL

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	DHBV DNA			
		T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型	-	3.63 ± 1.30	3.57 ± 1.21	3.72 ± 0.63	3.70 ± 0.59
ACV	0.1	3.82 ± 1.67	0.55 ± 0.28 ²⁾	0.42 ± 0.04 ²⁾	1.03 ± 0.24 ²⁾
YLSP	5 000	3.57 ± 0.77	1.65 ± 0.42 ²⁾	1.01 ± 0.40 ²⁾	1.00 ± 0.08 ²⁾
	2 500	3.71 ± 1.82	2.60 ± 1.52	1.88 ± 0.20 ²⁾	2.19 ± 0.33 ²⁾
	1 250	3.53 ± 0.65	3.11 ± 0.82	2.11 ± 0.24 ¹⁾	2.79 ± 0.80 ¹⁾

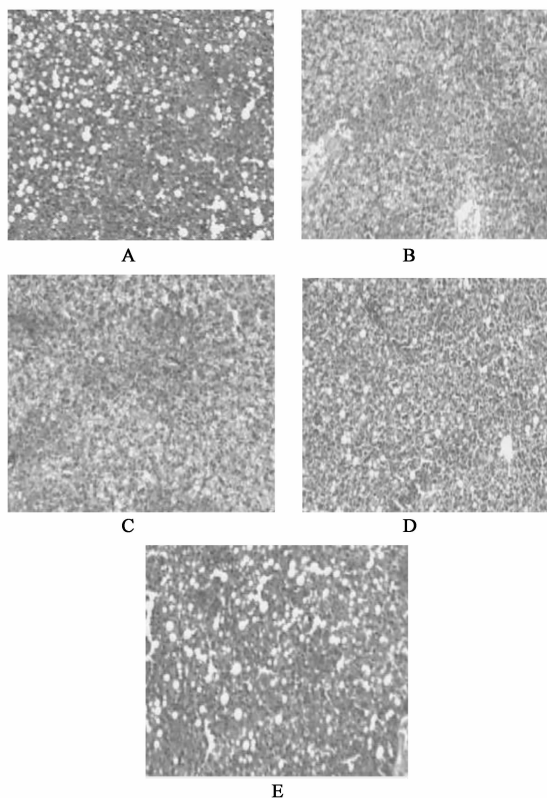
注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 YLSP 对鸭肝脏病理组织学的影响 显微镜下观察可见,模型组肝细胞出现重度弥漫性脂变,肝细胞有大量气球样变化;给药14 d后YLSP高剂量组与ACV组肝细胞偶有气球样变化中剂量组肝细胞偶见脂变,肝细胞有小量的气球样变化,低剂量组脂变稍明显,肝细胞气球样变化增加,见图1。结果表明,YLSP对DHBV诱导的肝损伤具有保护作用。

4 讨论

HBV是一种“嗜肝性病毒”,其利用宿主细胞的DNA、RNA及蛋白合成系统进行复制,并将自身的核酸信息整合到宿主细胞DNA中,与宿主细胞同期复制。目前对乙型肝炎病毒引起的慢性肝脏疾病尚无理想的治疗方法及药物。临床上常用的抗病毒药物有 α 干扰素及核苷类药物。但是这类药物长期服药易产生耐受性并非理想的治疗药物^[9]。因此寻找疗效确切、长期服用安全且价格低廉的药物成为HBV研究者们关注的焦点。

研究发现,HBV、土拨鼠肝炎病毒(WHBV)、地松鼠肝炎病毒(GSHV)、鸭乙型肝炎病毒(DHBV)均属嗜肝DNA病毒科,这些病毒在毒粒形态、结构、基因组成、复制及传播方式等方面均相似^[10]。由于鸭具有易饲养、价格低廉且对DHBV易感在近年来成为研究HBV者关注的动物模型。该模型在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方面已经得到国内外学者的公认^[11]。研究发现1~3日龄雏鸭感染DHBV后可长期维持病毒血症且无明显的自然阴转现象,DHBV DNA含



A. 模型组;B. ACV 0.1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;C. YLSP 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D. YLSP 2.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. YLSP 1.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图1 YLSP 对鸭肝脏病理组织学的影响(HE, $\times 100$)

量在感染14 d左右达到峰值^[12]。本课题组前期研究发现,广西南宁地区成年麻鸭对DHBV易感,是研究抗HBV药物较理想的动物模型^[13]。

本实验采用水提醇沉法提取多糖操作简介

行,试剂便宜无害,所得的多糖含量也较高,不失为一种可行的提取方法^[14]。本实验采用1日龄广西麻鸭颈静脉注射DHBV的方法来建立鸭乙型肝炎动物模型,研究YLSP对DHBV的抑制作用。研究表明,YLSP各剂量组均能抑制鸭血清中DHBV DNA的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),停药3d后,中、低剂量组鸭血清中DHBV DNA有反跳现象。病理学检查发现,YLSP可显著减轻鸭肝组织损伤,与模型组比较,各给药组鸭肝细胞气球样变化少,高剂量组与ACV组无气球样变化。研究结果进一步提示,YLSP对DHBV DNA具有抑制作用,这可能是YLSP治疗慢性乙型肝炎的一条途径,值得深入研究开发。

[参考文献]

- [1] 段小群,焦杨,黄仁彬,等. 玉郎伞提取物对大鼠自发性高血压的影响[J]. 广西医科大学学报,2003,20(1):18.
- [2] 黄仁彬,林兴,蒋伟哲,等. 玉郎伞化学成分对自发性高血压大鼠血压的影响[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(2):130.
- [3] 黄仁彬,焦杨,蒋伟哲,等. 玉郎伞提取物对心脏血流动力学和冠脉流量的影响[J]. 中国医院药学杂志,2003,23(6):321.
- [4] 焦杨,段小群,孔晓龙,等. 玉郎伞提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(12):726.
- [5] Duflo 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.
- [6] 林兴,蒋伟哲,焦杨,等. 玉郎伞多糖的分离纯化和组成性质研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):901.
- [7] 张国升,樊明月,张佳美,等. 芦根多糖的提取及含量测定[J]. 安徽中医学杂志,2002,21(1):51.
- [8] 罗秀,何巧玲,郭雪峰,等. 六月青多糖对鸭乙型肝炎病毒诱导肝损伤的保护作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):219.
- [9] 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.
- [10] Summers J. Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus [J]. *Hepatology*, 1981, 1(2):179.
- [11] Durbin J E, Fernandez-Sesma A, Lee C K, et al. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity [J]. *J Immunol*, 2000, 164(8):4220.
- [12] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferons-like cytokines, and their receptors [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202:8.
- [13] 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.
- [14] 龚千锋,余香,钟凌云,等. 大蓟生品及炭品中多糖不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):94.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎投稿

欢迎订阅