

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

罗秀,何巧玲,郭雪峰,吕鹏,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:观察六月青多糖(LYQP)对鸭乙型肝炎所致肝损伤的保护作用,为研究和开发新的抗乙型肝炎病毒(HBV)药物提供实验依据。方法:采用鸭乙型肝炎病毒(DHBV)诱导广西麻鸭乙型肝炎病毒肝损伤模型。分别检测给药前(T_0)、给药 7 d(T_7),14 d(T_{14})及停药后 3 d(P_3)血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的活性,同时采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定上清液鸭乙型肝炎病毒表面抗原(DHBsAg)和 e 抗原(DHBeAg)的滴度,HE 染色观察肝损伤程度。结果:与模型组相比,各给药组鸭血清 ALT,AST 的活性及血清 DHBsAg,DHBeAg 的滴度显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);停药 3 d 后,LYQP 高、中剂量组血清 ALT,AST 活性及血清 DHBsAg,DHBeAg 的滴度均无反跳现象。HE 染色结果显示 LYQP 可显著减轻鸭肝组织病理损伤程度。结论:LYQP 对 DHBV 所致肝损伤具有保护作用。

[关键词] 六月青多糖;鸭乙肝病;丙氨酸转氨酶;天冬氨酸转氨酶;乙肝表面抗原;e 抗原

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0219-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1739.021.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:39

Protective Effect of Liuyueqing Polysaccharide against Duck Liver Injury Induced by Duck Hepatitis B Virus

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

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of traditional Chinese medicine Liuyueqing polysaccharide (LYQP) on duck liver injury induced by duck hepatitis B virus (DHBV), and provide an experimental base for research and developing a new drug for anti-HBV. **Method:** Liver injury induced by DHBV in Guangxi brown spotted ducks was used as animal model. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), DHBsAg and DHBeAg in serum were detected before treatment (T_0), 7 days (T_7), 14 days (T_{14}) after treatment, and 3 days after stopping treatment. The extent of liver injury was observed by HE staining. **Result:** Compared with model group, the serum levels of ALT, AST, DHBsAg and DHBeAg were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and at 3 days after stopping treatment, the ALT, AST, DHBsAg and DHBeAg in serum in high-dose and middle-dose did not return. HE staining showed that LYQP had significant protective effects against the duck liver injury induced by DHBV. **Conclusion:** LYQP has a protective effect against the duck liver injury induced by DHBV.

[Key words] Liuyueqing polysaccharide; DHBV; ALT; AST; DHBsAg; DHBeAg

肝脏疾病是一种发病率高、难以根治的疾病,对人类的危害极大。乙型肝炎是由乙型肝炎病毒

HBV 引起的,是以肝脏炎性病变为主的感染性疾病。目前中草药在抗乙型肝炎方面的研究已经成为

[收稿日期] 20120327(017)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 10124008-6),人力资源和社会保障部留学人员科活动项目(人社厅函[2011[508号]);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] 罗秀,硕士研究生,从事抗肝纤维化药物研究,Tel:5358272,E-mail:luoxiuc310@yahoo.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

热点。六月青系爵床科肖鸡笼属植物肖鸡笼(顶花马兰)的干燥地上部分^[1]。六月青在《本草拾遗》中有记载,能活血,凉血,疏肝泻湿,消肿止痛,主要用于急慢性肝炎,黄疸等。与白花蛇舌草、半枝莲等配伍组成的复方六月青具有清热解毒、利湿退黄的功效,主要用于治疗急慢性黄疸性乙型肝炎的湿热黄疸等证,临床疗效显著。六月青在广西民间用于治疗急慢性肝炎、黄疸、流行性腮腺炎、肾性水肿、血尿及高血压等^[1]。本课题组成员已经成功分离出六月青多糖(LYQP)^[2],初步研究发现 LYQP 有明显的体外抗氧化作用^[3]。前期研究发现,六月青多糖对小鼠的急性化学性肝损伤具有保护作用^[4]。以六月青为君药的复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒诱导肝损伤具有保护作用^[5]。本文以广西麻鸭为研究对象,研究六月青多糖对鸭乙型肝炎所致肝损伤的保护作用,本实验是前期系列研究的延续,旨在进一步研究 LYQP 抗乙型肝炎病毒诱导肝损伤的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 1 日龄广西麻鸭,雌雄不限,体重(50 ± 5)g,购自广西畜牧良种养殖场。

1.2 药物 六月青多糖(LYQP)是从六月青 *Taraphochlamys affinis* (Giff) Bremekhu [*Strobilanthes affinis* (Griff) Y. C. Tang] 中提取分离,纯度为 90.69%,批号 20100418。由本实验室自行完成提取;阿昔洛韦(acicovir, ACV):湖南迪诺制药有限公司医药工业研究所产品,批号 20110524。

1.3 试剂 丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)改良赖式法检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20111019),乙型肝炎病毒表面抗原(批号 20110802)、e 抗原(批号 20110602) ELISA 试剂盒(上海荣盛药业有限公司)。

2 方法

2.1 LYQP 的提取 参照本课题组前期的提取方法^[2-3],取 LYQ 粗粉,加入 8 倍量 60% 乙醇加热回流 2 次,每次 2 h,趁热过滤,合并 2 次滤液,减压浓缩滤液至无醇味,过滤除去水不溶性杂质,所得滤液过 AB-8 大孔树脂,收集水洗脱馏分,减压浓缩至小体积,加入 8 倍量无水乙醇,4 ℃ 冰箱静置 24 h,过滤,取沉淀,沉淀用无水乙醇洗涤 3 次即得。沉淀为淡黄色粉末,其得率为 0.96%,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 90.69%。

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^[6],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 ℃ 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^[2,4-6] 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。① LYQP 高剂量组 1 300 mg·kg⁻¹·d⁻¹,② LYQP 中剂量组 650 mg·kg⁻¹·d⁻¹,③ LYQP 低剂量组 325 mg·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,给药容积均为 20 mL·kg⁻¹。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 ℃ 保存备用。

2.4 血清 ALT 和 AST 活性测定 采用改良赖式法,具体操作方法按试剂盒要求操作,用分光光度计于 505 nm 波长处测吸光度(A)。血清 DHBsAg 和 DHBcAg 的滴度采用 ELISA 法定量检测。具体操作方法按试剂盒要求操作,用自动酶标仪于 570 nm 和 630 nm 波长处测 A。

2.5 鸭肝脏病理组织学观察 于停药 3 d 后将实验动物麻醉处死,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 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。治疗前后比较采用配对资料 t 检验,组间比较采用方差分析,各均数两两比较。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对鸭乙型肝炎所致肝损伤鸭血清 ALT,AST 活性的影响 与模型组相比,ACV 组,LYQP 高、中、低剂量组给药 1 周后,其血清 ALT,AST 活性均显著性降低(P < 0.05 或 P < 0.01),且随着药物浓度的增加,其抑制作用逐渐增强。停药 3 d 后,LYQP 高、中剂量组血清 ALT,AST 的活性没有反跳现象。见表 1~2。

表1 LYQP对甲乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清ALT活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

U·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型	-	65.95 ± 3.49	59.39 ± 3.30	59.92 ± 3.43	62.87 ± 10.23
ACV	0.1	63.94 ± 3.99	34.06 ± 2.60 ²⁾	31.88 ± 3.14 ²⁾	32.27 ± 3.27 ¹⁾
LYQP	1 300	62.14 ± 3.77 ²⁾	42.54 ± 2.33 ²⁾	32.48 ± 2.47 ¹⁾	32.40 ± 3.47 ²⁾
	650	61.14 ± 3.29 ¹⁾	43.69 ± 2.14 ²⁾	38.79 ± 4.03 ²⁾	35.77 ± 3.07 ¹⁾
	325	60.86 ± 2.35 ¹⁾	45.19 ± 2.25 ²⁾	38.16 ± 3.32 ¹⁾	47.42 ± 2.82 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表2~4同)。

表2 LYQP对甲乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清AST活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

U·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型	-	98.59 ± 2.89	100.29 ± 2.76	97.74 ± 2.14	101.2 ± 2.30
ACV	0.1	98.49 ± 2.61	80.40 ± 2.31 ²⁾	69.28 ± 2.06 ²⁾	66.75 ± 3.49 ²⁾
LYQP	1 300	100.78 ± 3.63 ²⁾	82.13 ± 2.60 ²⁾	71.32 ± 1.93 ²⁾	70.67 ± 3.24 ¹⁾
	650	100.54 ± 4.78 ¹⁾	83.50 ± 1.54 ²⁾	75.58 ± 3.92 ¹⁾	74.67 ± 2.63 ²⁾
	325	101.65 ± 7.13 ¹⁾	88.71 ± 2.91 ²⁾	78.19 ± 2.83 ¹⁾	85.91 ± 2.52 ¹⁾

3.2 对鸭乙型肝炎所致肝损伤鸭血清DHBsAg, DHBsAg滴度的影响 与模型组相比,ACV组,LYQP高、中剂量组用药7,14 d后,其血清DHBsAg,

DHBsAg, DHBsAg的滴度显著降低(P < 0.05 或 P < 0.01);停药3 d后,LYQP高、中剂量组血清DHBsAg的滴度均无反跳现象。见表3~4。

表3 LYQP对甲乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清DHBsAg表达的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

A

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型	-	0.37 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03
ACV	0.1	0.38 ± 0.03	0.29 ± 0.03 ²⁾	0.27 ± 0.03 ²⁾	0.28 ± 0.03 ²⁾
LYQP	1 300	0.36 ± 0.03 ¹⁾	0.31 ± 0.02 ²⁾	0.30 ± 0.02 ¹⁾	0.30 ± 0.02 ²⁾
	650	0.39 ± 0.02 ¹⁾	0.33 ± 0.03 ²⁾	0.32 ± 0.02 ¹⁾	0.31 ± 0.04 ²⁾
	325	0.40 ± 0.03 ¹⁾	0.35 ± 0.04 ¹⁾	0.33 ± 0.03 ¹⁾	0.36 ± 0.03 ¹⁾

表4 LYQP对甲乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清DHBsAg表达的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

A

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型	-	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.02
ACV	0.1	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.01 ²⁾	0.07 ± 0.02 ²⁾	0.09 ± 0.01 ²⁾
LYQP	1 300	0.13 ± 0.02 ²⁾	0.10 ± 0.02 ¹⁾	0.10 ± 0.02 ²⁾	0.10 ± 0.02 ²⁾
	650	0.15 ± 0.03 ¹⁾	0.13 ± 0.03 ²⁾	0.11 ± 0.02 ²⁾	0.11 ± 0.01 ¹⁾
	325	0.14 ± 0.02 ¹⁾	0.13 ± 0.02 ¹⁾	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.02

3.3 LYQP对鸭肝脏病理组织学的影响 病毒性肝炎主要病理变化是肝细胞变性(中、重度水变性或脂肪变性)以及坏死、间质性炎症。模型组肝细胞出现弥漫性重度胞浆疏松化,大部分细胞气球样变性;LYQP高剂量组肝病变与ACV组相似,结构基本完整,个别细胞有气球样变性;说明LYQP具有保肝作用;LYQP中剂量组肝细胞部分胞浆疏松化,个别细胞有气球样变性;LYQP低剂量组肝细胞弥

漫性重度胞浆疏松化,细胞气球样变性。结果表明LYQP对肝组织无明显毒性作用。

4 讨论

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的,以肝脏爆炸性病变为主的一种传染性疾病。乙型肝炎病毒(HBV)感染人体后,其引起的肝脏病变及其疾病的发生、发展并不是病毒本身所致,而是与人体的免疫状态有一定的关系^[7]。由于乙肝病毒感染的

宿主范围狭窄,具有明显的种属特性,很难在普通实验动物中建立疾病模型,而鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)属于嗜肝 DNA 病毒(hepadna-virus),它与乙型肝炎病毒(HBV)、土拨鼠肝炎病毒(WHV)、地松鼠肝炎病毒(GHSV)在形态、DNA 大小和结构、DNA 聚合酶等方面具有相似的特征^[8-9]。这说明鸭乙型肝炎病毒与人的乙肝病毒属于同一病毒属。本课题组前期做了大量的调查研究工作,发现广西南宁地区成年麻鸭对 DHBV 易感,是研究抗乙型肝炎药物较理想的动物模型^[10]。并且,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^[6]。且麻鸭易于繁育、饲养等,容易在麻鸭等品种的雏鸭中获得实验感染成功的建立 DHBV 持续感染状态的动物模型,从而建立一个与 HBV 感染相近的体内实验系统。

我们采用 1 日期龄广西麻鸭颈静脉感染 DHBV 的方法来建立鸭乙型肝炎动物模型,研究 LYQP 对鸭乙型肝炎病毒诱导肝损伤的保护作用,研究结果表明,LYQP 高、中剂量组可显著降低血清 ALT 和 AST 的活性及血清 DHBsAg 和 DHBcAg 的滴度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),停药 3 d 后,LYQP 高、中剂量组没有反跳现象($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理学检查表明 LYQP 可减轻 DHBV 引起的肝损伤,LYQP 高、中剂量组鸭肝细胞较正常,仅有个别细胞气球样变化。研究结果进一步提示 LYQP 对 DHBV 引起的肝损伤具有良好的保护作用,这与我们的前期研究结果一致。这可能是 LYQP 治疗慢性乙型肝炎的一条途径,值得进一步研究开发。

[参考文献]

- [1] 林兴,黄权芳,黄仁彬,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材,2005,28(7):541.
- [2] 刘曦. 六月青多糖的分离纯化及其抗肝损伤作用的研究[D]. 南宁:广西医科大学,2009.
- [3] 刘曦,黄仁彬,朱金芳,等. 六月青多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 中国医院药学杂志,2008(23):1983.
- [4] 苏洁寒,荣延平,蒋伟哲,等. 复方六月雪对急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报,2003,20(4):497.
- [5] 张士军,陈兆霓,林兴,等. 复方六月青对鸭乙型肝炎病毒诱导肝损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1582.
- [6] 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.
- [7] Mainimk, Bonic, Lee C K, et al. The role of virus-specific CD8⁺ cell in liver damage and viral control during persistent B virus infection [J]. J Exp, 2000, 191(8):1269.
- [8] Summers J. Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus [J]. Hepatol,1981,1(2):179.
- [9] Mason W S, Seal S, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus[J]. J Virol,1980,36:829.
- [10] 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.

[责任编辑 聂淑琴]

《天津中医药》2013 年征订启事

《天津中医药》(原名《天津中医》)创刊于 1984 年,是由天津市卫生局主管、天津中医药大学、天津中医药学会和天津中西医结合学会主办的综合性中医药学术期刊。本刊继承与发展并重,中医与中药兼顾,理论与实践并举,坚持中医特色,内容丰富,实用性强,是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊、美国《化学文摘》(CA)俄罗斯《文摘杂志》(AJ)和波兰哥白尼索引(IC)源期刊、天津市一级期刊。2011 年被评为天津市优秀期刊、获得全国高校优秀科技期刊二等奖、第 3 届全国中医药优秀期刊奖。本刊设有专家论坛、名医精粹、博士之窗、临床论著、针灸与推拿、理论探讨、实验研究、中药研究、国际交流、留学生园地、科研动态、综述等专栏,以满足广大读者日益增长的需要。

请新老读者注意 2013 年征订日期,及时到当地邮局办理征订手续。本刊国内外公开发行,ISSN:1672-1519,CN:12-1349/R。国内邮发代号为 6-83,国外发行代号:1040-BM,2013 年每期定价 6.00 元,全年 6 期定价为 36 元。合订本 60 元。本刊编辑部也办理邮购。

邮购地址:天津市南开区鞍山西道 312 号《天津中医药》编辑部收

邮 编:300193

电 话:(022)59596310 传 真:(022)59596595

E-mail: xuebaobj@tjutc.edu.cn; xuebaobj@126.com