

山芝麻抗鸭乙型肝炎病毒作用

黄权芳¹, 杨辉², 韦刚², 林兴^{3*}, 张士军³, 黄仁彬³

(1. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西分析测试研究中心, 南宁 530022; 3. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] **目的:** 研究山芝麻水提取物(*helicteres angustifolia*)体内抗鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)的作用。**方法:** 将 DHBV-DNA 阳性麻鸭随机分为山芝麻高、中、低剂量组(10, 5, 2.5 g·kg⁻¹)、拉米夫定 50 mg·kg⁻¹组和模型组, 分别给予相应药物进行干预。用药前、用药第 7, 14 天及停药第 7 天, 取静脉血用实时荧光定量 PCR 法检测血清 DHBV-DNA 含量。治疗后取肝脏组织作病理学检查。**结果:** 拉米夫定组用药后血清 DHBV-DNA 水平迅速降低, 停药后立即反跳; 山芝麻高、中剂量组用药 7, 14 d 血清中的 DHBV-DNA 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 停药后仍表现有持续的抑制作用; 在给药及停药过程中山芝麻低剂量组血清 DHBV-DNA 变化不明显。镜下观察显示山芝麻高剂量组与阳性药组鸭肝脏的病理改变有一定的改善。**结论:** 山芝麻在鸭体内有一定的抑制鸭乙型肝炎病毒 DNA 的作用, 其作用有明显的量效和时效反应关系。

[关键词] 鸭乙型肝炎病毒; 山芝麻; 麻鸭

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0179-03

Experimental Study of Water Extract from *Helicteres Angustifolia* on Duck Hepatitis B Virus *in vivo*

HUANG Quan-fang¹, YANG Hui², WEI Gang², LIN Xing^{3*}, ZHANG Shi-jun³, HUANG Ren-bin³

(1. The First Affiliated Hospital Of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning 530022, China; 3. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of the water extract from *helicteres angustifolia* on duck hepatitis B virus(DHBV) *in vivo*. **Method:** Ducks infected with DHBV were randomly divided into five groups: three dose groups of *helicteres angustifolia* (10, 5, 2.5 g·kg⁻¹), lamivudine group and model group. Ducks in the lamivudine group were administrated with lamivudine (50 mg·kg⁻¹) once per day. Ducks in the three-dose groups of *helicteres angustifolia* were administrated with different dose of *helicteres angustifolia* for 14 days respectively. The serum content of DHBV-DNA was determined by FQ-PCR method before treatment and on the 7th, 14th day after treatment. The pathological changes of liver were evaluated after the treatment. **Result:** Lamivudine showed a rapid inhibiting effect on DHBV-DNA, but this effect didn't last long, and the serum level of DHBV-DNA increased again after treatment stopped. The serum level of DHBV-DNA dropped markedly in the high-, medium-dose groups of *helicteres angustifolia* on the 7th and 14th day. And the hepatic pathological changes in the high-dose *helicteres angustifolia* group and lamivudine group were slighter than those in the model group. **Conclusion:** *Helicteres angustifolia* could inhibit DHBV DNA significantly, and its inhibitory effect was in a dose and time dependent manner.

[Key words] duck hepatitis B virus; *Helicteres angustifolia*; brown spot duckling

[收稿日期] 20110304(003)

[基金项目] 广西教育厅自然科学基金项目(200911MS28)

[第一作者] 黄权芳, 中药师, 硕士学位, 从事中药鉴定及开发研究, E-mail: hqf00@163.com

[通讯作者] * 林兴, 副教授, 从事肝炎、肝纤维化靶向诊断和治疗, Tel: 0771-5358342

乙型肝炎为我国常见病、多发病。近年来许多中草药抗病毒、调节免疫功能、改善肝脏炎症及纤维化的作用受到重视^[1]。山芝麻系梧桐科植物山芝麻的根,功能清热解毒,主要用于感冒发热、肺热咳嗽、咽喉肿痛、麻疹等^[2]。本研究以 DHBV-DNA 阳性麻鸭乙肝模型,探讨山芝麻对鸭乙型肝炎病毒的影响,首次评价山芝麻对鸭乙型肝炎病毒 DNA 的抑制作用。

1 材料

1.1 试药 山芝麻经广西中医学院第一附属医院药学部黄权芳药师鉴定为梧桐科植物山芝麻 *Helicteres angustifolia* L. 的根,其水提物由广西医科大学药理学教研室和广西医学科学实验中心自行提取。拉米夫定,中国苏州葛兰素史克制药有限公司产品,批号 07090016。

1.2 动物 1 日龄广西麻鸭,雌雄不拘,体重 40 ~ 50 g,购自广西畜牧良种养殖场。

1.3 引物^[3] 上游引物:5'-AACCATTGAAGCA ATCACTAGAC-3',下游引物:5'-ATCTATGGTGGC TGCTCGA ACTA-3'。目的片段大小为 218 bp。由上海基康生物技术有限公司合成。

1.4 仪器 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 山芝麻水提物^[4] 山芝麻饮片 1 000 g,加 10 倍量水提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩至 500 mL(即相当于生药 2 g·mL⁻¹)作为备用液 4 ℃ 保存。

2.2 给药方法 每次使用时分别取 5, 2.5, 1.25 mL 备用液,加蒸馏水稀释至 10 mL,得山芝麻 3 个剂量组给药浓度,即按生药计算分别为 1, 0.5, 0.25 g·mL⁻¹,各组灌胃给药容积 10 mL·kg⁻¹。山芝麻高、中、低剂量分别为 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹。

2.3 广西麻鸭乙肝动物模型的建立^[3] 采用健康成年的广西麻鸭产的蛋孵化的 1 日龄雏鸭,经腹腔注射 0.2 mL DHBV-DNA 强阳性病毒血清。接种 7 d 后,分别从胫静脉采血约 0.2 ~ 0.3 mL,装入一次性 Eppendorf 管中,整个过程注意不要交叉污染。4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取血清。-20 ℃ 保存备用。采用 PCR 法检测筛选出感染阳性鸭。

2.4 分组及用药^[3] 经 PCR 法检测筛选出感染阳

性鸭,饲养至 13 日龄作为实验动物进行药物治疗试验。将 50 只鸭随机分为 5 组,每组 10 只。①模型组:ig 等量的生理盐水;②拉米夫定组:ig 拉米夫定 50 × 10⁻³ g·kg⁻¹·d⁻¹;③山芝麻高剂量组:ig 山芝麻 10 g·kg⁻¹·d⁻¹;④山芝麻中剂量组:ig 5 g·kg⁻¹·d⁻¹;⑤山芝麻低剂量组:ig 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹。各组每天早上 8 ~ 9 点 ig 给药,1 天 1 次,连续 14 d,实验期间动物自由取食和饮水。并于用药前 0 d,用药 7, 14 d,停药 7 d(p7)时,分别从胫静脉采血,每只 0.5 mL 左右,分离血清,于 -20 ℃ 保存备用。

2.5 FQ-PCR 检测血清 DHBV-DNA^[3] ①DHBV-DNA 提取:采用直接加热法。每次取血清 100 μL,沸水浴 10 min,1 万 r·min⁻¹ 离心 5 min。②加样:2 × SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL;10 μmol·L⁻¹ 上游引物 1.0 μL;10 μmol·L⁻¹ 下游引物 1.0 μL;加无菌双蒸水至 23 μL;血清提取物 2.0 μL。③ FQ-PCR 反应条件:95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 30 s,共反应 45 个循环。④ FQ-PCR 的结果判读: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。

2.6 各组肝脏病理(HE 染色)检测 于停药 7 d 分别剖杀各组试验动物,各取小块肝组织固定于 10% 甲醛溶液,石蜡切片,用 HE 染色,病理检查。

2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学采用 SPSS 10.0 软件,药物治疗组的血清 DHBV-DNA 水平与同时时间点的模型对照组比较,采用成组数据 *t* 检验;治疗后血清 DHBV-DNA 水平与治疗前(*T*₀)比较,采用配对 *t* 检验;*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 治疗前后不同时间血清 DHBV-DNA 水平变化 与模型组比较,山芝麻高、中剂量组在给药 7, 14 d 和停药 7 d 鸭血清 DHBV-DNA 拷贝数有明显降低 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);与治疗前(*t*₀)比较,山芝麻各治疗组鸭血清 DHBV-DNA 水平下降程度与用药剂量及用药时间相关,并且山芝麻高剂量组停药后没有出现明显的反跳现象。小剂量组在治疗过程中和停药后 DHBV-DNA 水平变化不明显。拉米夫定组用药后,血清 DHBV-DNA 拷贝数开始明显下降,第 14 天下降到最低值,停药 7 d 后 DHBV-DNA 拷贝数即显著回升,病毒含量变化总体表现为用药时持续下降、停药即出现反跳的规律。见表 1。

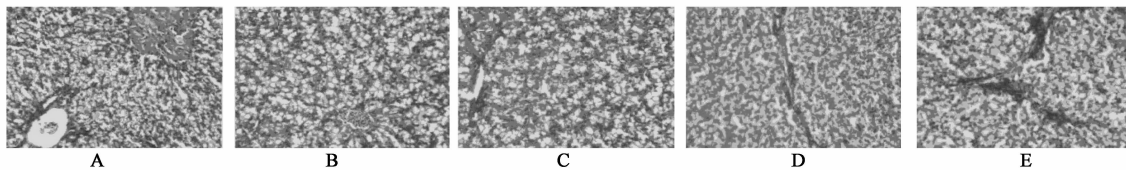
表 1 治疗前后鸭血清 DHBV-DNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\times 10^8 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	DHBV-DNA			
		t_0	t_7	t_{14}	P_7
模型对照	-	2.51 ± 1.09	2.83 ± 1.04	2.76 ± 0.98	2.51 ± 0.87
拉米夫定	50×10^{-3}	2.73 ± 1.35	1.16 ± 0.81 ^{2,4)}	0.67 ± 0.32 ^{2,4)}	1.72 ± 0.83
山芝麻	2.5	2.68 ± 1.26	2.34 ± 1.16	1.89 ± 0.92	1.81 ± 0.78
	5	2.35 ± 1.15	1.77 ± 0.98 ¹⁾	1.26 ± 0.83 ^{2,3)}	1.56 ± 0.75 ¹⁾
	10	2.59 ± 1.20	1.59 ± 0.71 ^{1,3)}	1.05 ± 0.88 ^{2,4)}	1.23 ± 0.84 ^{2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同组 t_0 比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 病理检查 肉眼观察各组鸭肝脏,色泽鲜嫩暗红,表面光滑,质地柔软,未扪及结节。镜下观察,模型组肝细胞出现炎性细胞浸润,周边部分肝脏细胞肿胀,弥漫性重度脂变;治疗后拉米夫定组和山芝麻

高剂量组炎症有不同程度减轻,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,变性肝细胞减少;山芝麻中、低剂量组炎症改善不明显,可见炎症细胞浸润及桥接坏死。见图 1。



A. 模型组; B. 拉米夫定 $50 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; C. 山芝麻 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; D. 山芝麻 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; E. 山芝麻 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组

图 1 山芝麻对鸭乙型肝炎肝脏组织病变的影响(HE, $\times 400$)

4 讨论

本课题组多年来一直致力于发掘广西特色中草药用于抗肝炎的研究,我们前期已成功建立了广西麻鸭乙肝动物模型,实验证实该品种麻鸭易感染,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,并先后利用该模型开展了大量的抗乙肝中药的筛查研究工作^[3,5-8]。山芝麻即是我们目前重点研究的民族药之一,前期初筛实验发现山芝麻能保护 CCl_4 所致小鼠肝损伤,具有显著的抗脂质过氧化作用^[4],为我们进一步研究其是否具有抗乙肝病毒作用奠定了前期研究基础。

本次实验发现,与模型组比较,山芝麻高、中剂量组在治疗第 7,14 天鸭血清 DHBV-DNA 即明显下降,且停药后 DHBV-DNA 仍维持在较低的水平,提示一定剂量的山芝麻在体内具有明显的抑制 DHBV 的作用,且疗效与用药剂量及用药时间相关。拉米夫定抑制 DHBV 起效较早,在治疗第 14 天其病毒 DNA 拷贝数已降至较低水平,但停药后病毒含量又立即回升。山芝麻治疗组与拉米夫定组比较,山芝麻起效慢,但其抑制病毒复制的作用平稳而持久,提示山芝麻体内抑制 DHBV 复制的机制不同于拉米夫定。本实验中肝脏 HE 染色病理检查发现,山芝麻高剂量组与阳性药组鸭肝脏炎症有不同程度减轻,病理改变有一定程度的改善。

本实验结果证实,山芝麻在体内能够抑制 DHBV 的复制,其作用较拉米夫定弱但疗效稳定。关于山芝麻抗病毒的作用机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张洪泉,葛慧,李心,等.参灵益肝颗粒抗乙型肝炎病毒作用的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2007,27(3):244.
- [2] 高玉桥,苏丹,梅全喜.山芝麻的研究进展[J].中国药业,2009,18(6):88.
- [3] 黄仁彬,黄权芳,张士军,等.六月青总皂苷抗鸭乙型肝炎病毒作用研究[J].中药药理与临床,2010,26(1):37.
- [4] 林兴,黄权芳,张士军,等.山芝麻对 CCl_4 诱导小鼠肝损伤的脂质过氧化反应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):147.
- [5] 张士军,黄仁彬,林军,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.
- [6] 张士军,焦杨,林兴,等.复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒的抑制作用研究[J].中国药房,2008,19(33):2563.
- [7] 张士军,陈兆宽,林兴,等.六月青乙醇提取物对鸭乙型肝炎病毒 DNA 的抑制作用[J].中成药,2009,31(3):470.
- [8] 张士军,陈兆宽,李勇文,等.六月青乙醇提取物对鸭乙型肝炎病毒抑制作用[J].中国公共卫生,2009,25(5):543.

[责任编辑 聂淑琴]