

乙肝扶正胶囊的主要药效学研究

金翠英^{1*}, 周建平¹, 马豹山¹, 李 壮², 陈鸿珊²

(1. 北京市药品检验所, 北京 100035; 2. 中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的: 研究乙肝扶正胶囊的主要药效学作用。方法: 选用 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤模型、卡介苗+脂多糖 (BCG+LPS) 造成小鼠免疫性肝损伤模型、四氯化碳 (CCl₄) 致大鼠慢性肝损伤模型, 研究乙肝扶正胶囊的保肝作用。选用鸭乙型肝炎病毒感染雏鸭, 以分子斑点杂交法观察其对鸭血清乙型肝炎病毒 DNA 水平的影响。观察对环磷酰胺抑制免疫功能小鼠血清溶血素含量的影响。结果: 乙肝扶正胶囊能明显降低 D-半乳糖胺致急性肝损伤和 BCG+LPS 致免疫性肝损伤模型小鼠血清中 ALT、AST 的含量; 对 CCl₄ 慢性肝损伤大鼠模型可降低血清中 ALT、AST 及肝羟脯氨酸含量, 提高 TP、ALB 含量。对肝损伤均有明显的修复作用。对乙型肝炎病毒感染鸭血清 DHBV-DNA 水平抑制效果显著, 拮抗环磷酰胺所致的体液免疫抑制, 增加小鼠血清溶血素含量。结论: 乙肝扶正胶囊有一定的保肝降酶、抑制鸭乙型肝炎病毒复制、提高机体免疫力的作用。

[关键词] 乙肝扶正胶囊; 鸭乙型肝炎病毒; 急慢性肝损伤; 免疫性肝损伤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)10-0041-04

Pharmacodynamic Studies of Yiganfuzheng Capsule

JIN Cui-ying^{1*}, ZHOU Jian-ping¹, MA Bao-shan¹, LI Zhuang², CHEN Hong-shan²

(1. Beijing Municipal Institute for Drug Control, Beijing 100035, China;

2. Institute of Medicinal Biothechnology of Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacological effects of Yiganfuzheng Capsule on liver. **Method:** The acute liver injury model, the immunological liver injury model, the chronic liver injury model were caused by D-galactosamine, BCG+LPS and carbon tetrachloride, respectively. The ducklings were infected by hepatitis B virus. The dot-hybridization test was used to evaluate the duck hepatitis B virus' s DNA level in serum. The haemolysin test was used to investigate the effect on the immunosuppressive model caused by the cyclophosphamide. **Result:** The Yiganfuzheng Capsule can markedly decrease the content of the ALT and AST in the serum of the acute liver injury model caused by D-galactosamine and by BCG+LPS. Levels of ALT, AST in serum and hydroxyproline in liver were decreased, and the TP, ALB were increased, compared with the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). It had inhibitory effect on the level of DHBV-DNA in the serum of duckling infected by hepatitis B. It could antagonize the humoral immunity inhibition caused by cyclophosphamide, increased the level of serum haemolysin in mouse. **Conclusion:** Yiganfuzheng Capsule has effects of protecting liver, decreasing enzyme, inhibiting copy of duck hepatitis B virus, and enhancing the body immune function.

[Key words] Yiganfuzheng Capsule; duck hepatitis B virus; acute/chronic liver injury; immunological liver injury

乙肝扶正胶囊是以何首乌、虎杖、贯众等多味中

药制成的具有补肝肾、益气活血功效的复方制剂。临床上用于治疗肝肾两虚的乙型肝炎。我们以联苯双酯滴丸、乙肝宁颗粒为阳性对照药, 采用 D-半乳糖胺致急性肝损伤模型、BCG+LPS 造成免疫性肝损伤模型小鼠、CCl₄ 致慢性肝损伤模型大鼠, 观察乙肝

[收稿日期] 2007-03-05

[通讯作者] * 金翠英, Tel: (010) 66138837; E-mail: jincuiying1111@126.com

扶正胶囊对不同模型动物肝损伤的影响。用鸭乙型肝炎病毒感染雏鸭,以分子斑点杂交法观察其对鸭血清乙型肝炎病毒 DNA 水平的影响。注射环磷酰胺造成免疫功能降低小鼠,以溶血素测定法观察对小鼠免疫功能的影响,实验结果如下:

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,ICR 小鼠:SPF(清洁级)由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。许可证号:SCXK(京)2002-0003。1 日龄北京鸭由北京前进种鸭场动物饲养场提供。

1.2 药物 乙肝扶正胶囊(药粉)由何首乌 15 g,虎杖 25 g,贯众 50 g,肉桂 5 g,明矾 10 g,石榴皮 6 g,当归 10 g,丹参 15 g,沙苑子 10 g,人参 10 g,麻黄 6 g。制法:以上 11 味,其中当归、肉桂、丹参、明矾粉碎为细粉,其余 7 味加水煎煮 2 次,合并煎液,浓缩成稠膏,加入上述粉末,混匀,干燥、粉成细粉,过筛,即得。每 1 g 药粉中含生药 2.7 g,批号:20020625,由北京同仁堂股份有限公司科学研究所提供,试验剂量均为生药量;乙肝宁颗粒,批号:020616,湖南九芝堂股份有限公司;联苯双酯滴丸,批号:020112,北京协和药厂提供。临用时均用 0.5% 羧甲基纤维素钠配成所需浓度。

1.3 病毒 鸭乙型肝炎病毒,鸭乙型肝炎病毒 DNA (DHBV-DNA) 强阳性血清,采自上海麻鸭, - 70 °C 保存。

1.4 仪器与试剂 Lisa 300 Dlus 全自动生化仪,法国制造;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司。卡介苗,批号:20020306,北京生物制品研究所生产;脂多糖,批号:110K4046,USA 制造;门冬氨酸氨基转换酶 (AST) 试剂盒,批号:020701;丙氨酸氨基转换酶 (ALT) 试剂盒,批号:011021;总蛋白 (TP) 试剂盒,批号:011201;白蛋白 (ALB) 试剂盒,批号:011203;以上试剂盒均由北京中生生物高技术公司提供。 α -³²P-dCTP,北京福瑞生物技术工程公司提供;缺口翻译药盒由普洛卖格公司提供。

2 方法

2.1 保肝试验

2.1.1 对 D-半乳糖胺所致小鼠急性肝损伤的保护作用^[1] 取 ICR 健康小鼠,按性别、体重随机分成 6 组(分组、给药剂量见表 1)。灌胃给药,每日给药 1 次,连续给药 7 d,空白对照组和模型组给同体积 0.5% CMC 溶液。给药后第 6 d,除空白对照组外,其

余各组小鼠均腹腔注射 D-半乳糖胺 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。16 h 后末次给药,并于给药后 30 min,小鼠眼静脉丛取血,分离血清,测定血清中 ALT 和 AST 含量。并取肝脏做病理学检查。

2.1.2 对四氯化碳慢性肝损伤的治疗作用^[1] 选用健康 SD 大鼠,随机取出 15 只为空白对照组。其余大鼠皮下注射 40% 四氯化碳油溶液,1 周内注射 2 次,连续 15 次。注射 CCl₄ 50 d 后将大鼠按体重随机分为 6 组,(分组、给药剂量见表 3),灌胃给药,每天 1 次,连续 30 d。空白对照组和模型组给同体积 0.5% CMC 溶液。于末次给药后 1 h,取血,测定血清中 ALT、AST、TP、ALB 含量。另取肝大叶同一部位的肝脏 0.5 g,制备肝匀浆,测定羟脯氨酸含量,另取肝大叶相同部位的肝组织做常规病理组织学检查。

2.1.3 对小鼠免疫性肝损伤的保护作用^[1] 取健康 ICR 雄性小鼠,按体重随机分成 7 组(分组、给药剂量见表 5)。除空白对照组外,小鼠静脉注射卡介苗 $1 \times 10^6 \text{ U}$ /只,并同时灌胃给药,每日 1 次,连续 14 d 后小鼠静脉注射微量脂多糖 3 μg /只。并于注射后 17 h 取血,分离血清,测定血清中 ALT 和 AST 含量。取每只小鼠肝大叶同一部位的肝组织做常规病理组织学检查。

2.2 免疫功能试验 对小鼠体液免疫的影响(溶血素法)^[2] 取健康 ICR 小鼠 60 只,按体重随机分成 6 组(分组、给药剂量见表 7)。各组动物每日给药 1 次,连续给药 14 d。于给药后第 7 天,腹腔注射 5% 鸡红细胞生理盐水混悬液进行免疫。第 8 天、10 天(除空白对照组外)每只小鼠腹腔注射环磷酰胺 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,造成小鼠免疫功能低下模型。并于免疫后第 7 天,各组动物取血,与 5% 鸡红细胞、10% 豚鼠血清(补体)作用,并取上清液于 540 nm 处测定光密度 (OD 值)。

2.3 对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗作用 鸭乙型肝炎病毒感染:取 1 日龄北京鸭,经腿胫静脉注射上海麻鸭 DHBV-DNA 阳性鸭血清,每只 0.2 mL,在感染后 7 d 取血,分离血清, - 70 °C 保存。待检。

DHBV 感染雏鸭 7 d 后,随机分为 4 组,(分组给药见表 8) 每组 6 只,口服给药 1 d 2 次,连续给药 10 d;病毒对照组口服同体积生理盐水,阳性对照组口服拉米夫定。于感染后 7 d 即用药前(T0),用药第 5 天(T5),用药第 10 天(T10)和停药后第 3 天(P3),自鸭腿胫静脉取血,分离血清。 - 70 °C 保存。待检。

将待检鸭血清, 每批同时点膜, 测定鸭血清中 DHBV-DNA 水平动态。按缺口翻译试剂盒说明书方法, 用³²P 标记 DHBV-DNA 探针, 并做鸭血清斑点杂交, 放射自显影膜片斑点, 用酶标检测仪测定 OD 值。以杂交斑点 OD 值作为标本 DHBV-DNA 水平值。计算每组鸭用药后不同时间(T5 T10) 和停药第 3d(P3) 血清 DHBV-DNA 的抑制率。(试验重复 3 批)

2.4 统计学方法 用 NDST 软件进行统计学处理。结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异用 *t* 检验。

3 结果

3.1 保肝试验

3.1.1 对 D-半乳糖胺所致小鼠急性肝损伤的保护作用 结果见表 1~ 2。

表 1 乙肝扶正胶囊对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)
模型组	11	—	355.2 ± 191.6	456.7 ± 175.8
乙肝扶正组	11	2.43	145.6 ± 89.6 ²⁾	236.1 ± 95.5 ²⁾
乙肝扶正组	11	1.22	145.3 ± 123.0 ²⁾	226.5 ± 81.7 ²⁾
乙肝扶正组	12	0.61	242.3 ± 63.2	321.8 ± 143.6
联苯双酯组	12	0.007	60.9 ± 24.7 ²⁾	169.8 ± 45.8 ²⁾
空白对照组	11	—	47.4 ± 20.2 ²⁾	146.3 ± 33.4 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(下同)

表 3 乙肝扶正胶囊对四氯化碳慢性肝损伤大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 15)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)	羟脯氨酸 (μmol·g ⁻¹)	TP (g·L ⁻¹)	ALB (g·L ⁻¹)
模型组	—	325.2 ± 204.9	371.0 ± 154.4	2.75 ± 0.93	68.51 ± 8.82	30.7 ± 3.6
乙肝扶正组	1.90	176.2 ± 120.5 ¹⁾	237.1 ± 103.4 ²⁾	2.13 ± 0.51 ¹⁾	78.27 ± 4.68 ²⁾	34.0 ± 2.3 ²⁾
乙肝扶正组	0.95	108.8 ± 60.2 ²⁾	203.4 ± 78.4 ²⁾	1.98 ± 0.37 ²⁾	76.25 ± 6.95 ¹⁾	34.8 ± 4.1 ²⁾
乙肝扶正组	0.47	176.5 ± 126.8 ¹⁾	291.8 ± 144.0	2.18 ± 0.49	73.50 ± 5.49	34.6 ± 2.1 ²⁾
乙肝宁组	6.00	98.6 ± 57.1 ²⁾	195.1 ± 67.61 ²⁾	2.01 ± 0.61 ¹⁾	76.48 ± 5.11 ²⁾	34.7 ± 2.6 ²⁾
联苯双酯组	0.006	110.7 ± 70.3 ²⁾	187.17 ± 70.39 ²⁾	1.81 ± 0.49 ²⁾	75.47 ± 9.66 ¹⁾	33.9 ± 3.8 ¹⁾
空白对照组	—	51.8 ± 12.5 ²⁾	149.7 ± 37.3 ²⁾	1.54 ± 0.77 ²⁾	79.06 ± 3.50 ²⁾	35.55 ± 2.7

表 4 乙肝扶正胶囊对大鼠四氯化碳肝损伤的影响(*n* = 15)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	0	+	++	+++
模型组	—	0	0	0	10
乙肝扶正组	1.90	0	4	4	2 ²⁾
乙肝扶正组	0.95	0	3	4	3 ²⁾
乙肝扶正组	0.47	0	1	4	5
乙肝宁组	6.00	4	3	2	1 ²⁾
联苯双酯组	0.006	1	3	3	3 ²⁾
空白对照组	—	10	0	0	0 ²⁾

病理分级:

“0”级正常肝组织: 肝索排列整齐, 肝窦明显, 细胞大小正常, 胞浆均匀, 核仁、核膜清楚。

“+”级 为肝细胞轻度变性, 肝索基本整齐, 肝

表 2 乙肝扶正胶囊对 D-半乳糖胺致小鼠肝损伤的影响(*n* = 10)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	病理分级			
		0	+	++	+++
模型组	—	0	0	8	2
乙肝扶正组	2.43	1	7	2	0 ²⁾
乙肝扶正组	1.22	0	4	6	0 ¹⁾
乙肝扶正组	0.61	0	3	7	0
联苯双酯组	0.007	3	5	2	0 ²⁾
空白对照组	—	10	0	0	0 ²⁾

小鼠 D-半乳糖胺急性肝损伤病变组织学分级标准。

“0”级 肝索排列整齐, 肝窦明显, 细胞大小正常, 胞浆均匀, 核仁、核膜清楚。

“+”级 肝索基本整齐, 肝窦可见, 肝细胞稍大。

“++”级 肝索排列紊乱, 肝细胞肿胀, 肝窦不很明显。

“+++”级 肝小叶不完整, 肝索排列紊乱, 肝细胞肿大, 肝窦不能见到, 小区可见点状坏死。

3.1.2 对四氯化碳慢性肝损伤的治疗作用 结果见表 3, 4。

窦可见, 肝细胞稍大。病变在 1/3 以下。

“++”级 为肝细胞中度变性, 以肝细胞气球样变性为主, 肝索排列紊乱, 病变在 1/2 以下。

“+++”级 为肝细胞重度变性, 以肝细胞气球样变性为主, 肝小叶结构消失, 肝索排列紊乱, 小区可见点状坏死, 病变在 2/3 以上。

3.1.3 对小鼠免疫性肝损伤的保护作用 试验结果表明: 乙肝扶正胶囊对小鼠免疫性肝损伤有一定的保护作用, 小鼠血清中 ALT、AST 值显著降低, 与模型组比较差异有显著性意义(*P* < 0.01 或 0.05)。结果见表 5。

表 5 乙肝扶正胶囊对小鼠免疫性肝损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)
模型组	10	—	599.9 ± 328.5	580.6 ± 144.4
乙肝扶正组	11	2.43	224.8 ± 116.1 ²⁾	445.5 ± 196.8
乙肝扶正组	10	1.22	193.7 ± 151.5 ²⁾	426.0 ± 170.5 ¹⁾
乙肝扶正组	11	0.61	277.7 ± 171.9 ²⁾	388.1 ± 185.6 ¹⁾
乙肝宁组	10	8.00	258.0 ± 133.7 ¹⁾	501.3 ± 166.6
环磷酰胺组	10	0.03	253.8 ± 180.7 ²⁾	317.4 ± 119.2 ²⁾
空白对照组	10	—	49.8 ± 20.0 ²⁾	135.3 ± 12.8 ²⁾

病理组织学检查结果:与空白对照组比较,模型组肝小叶不完整,肝索排列紊乱,肝细胞肿大,不能见到肝窦,大量炎细胞浸润,其中以血管周围最为显著,形成炎性肉芽肿,小区可见点状坏死($P < 0.01$),与模型组比较,乙肝扶正胶囊组可见明显的修复作用($P < 0.01$)结果见表 6。

表 6 乙肝扶正胶囊对小鼠免疫性肝损伤变化坏死的影响

组别	n	剂量 (g·kg ⁻¹)	病理分级			
			0	+	++	+++
模型组	10	—	0	0	0	10
乙肝扶正组	11	2.43	0	0	5	5
乙肝扶正组	10	1.22	0	1	6	3 ²⁾
乙肝扶正组	11	0.61	0	1	5	4 ¹⁾
乙肝宁组	10	8.00	0	0	6	4 ¹⁾
环磷酰胺组	10	0.03	0	0	6	4 ¹⁾
空白对照组	10	—	10	0	0	0 ²⁾

病理分级:

“0”级 肝索排列整齐,肝窦明显,细胞大小正常,胞浆均匀,核仁、核膜清楚。

“+”级 肝索基本整齐,肝窦可见,肝细胞稍大。少量炎细胞浸润。占切片 1/3 以下。

“++”级 肝索排列紊乱,肝细胞肿胀,肝窦不很明显,炎细胞浸润,有炎性肉芽肿形成,占切片 1/2 以下。

“+++”级 肝小叶不完整,肝索排列紊乱,肝细胞肿大,肝窦不能见到,大量炎细胞浸润,其中以血管周围为著,形成炎性肉芽肿,占切片 2/3 以上。

3.2 对小鼠体液免疫的影响 结果见表 7。

表 7 乙肝扶正胶囊对小鼠血清溶血素含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g·kg ⁻¹)	OD 值
模型组	11	—	0.148 ± 0.05
乙肝扶正组	11	2.43	0.247 ± 0.09 ¹⁾
乙肝扶正组	11	1.22	0.293 ± 0.09 ²⁾
乙肝扶正组	12	0.61	0.194 ± 0.08
乙肝宁组	12	8.00	0.214 ± 0.05 ¹⁾
空白对照组	11	—	0.311 ± 0.07 ²⁾

3.3 对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗作用 试验结

果表明:乙肝扶正胶囊治疗 2.0 g·kg⁻¹ 组对感染鸭血清 DHBV-DNA 水平的抑制效果显著,与模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),结果见表 8。

表 8 乙肝扶正胶囊对鸭乙型肝炎病毒感染鸭血清 DHBV-DNA 水平抑制率的影响

实验 批次	组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	抑制率%		
			T ₅	T ₁₀	P ₃
1	模型组	—	-16.56	-2.50	-2.35
	乙肝扶正组	2.0	28.85 ¹⁾	28.86 ²⁾	-6.98
	乙肝扶正组	1.0	12.64	-13.70	-5.323
	乙肝扶正组	0.5	-4.05	4.91	23.51 ²⁾
2	模型组	—	-6.55	3.99	5.26
	乙肝扶正组	2.0	21.33 ¹⁾	30.92 ²⁾	16.21
	乙肝扶正组	1.0	4.58	17.32	14.88
	乙肝扶正组	0.5	7.17	5.84	14.85
3	模型组	—	-5.58	3.28	-8.76
	乙肝扶正组	2.0	19.22 ²⁾	23.49 ¹⁾	-7.60
	乙肝扶正组	1.0	34.80 ²⁾	33.48 ²⁾	27.91 ¹⁾
	乙肝扶正组	0.5	-1.35	8.97	1.79
	拉米夫定组	0.05	56.77 ²⁾	30.43 ¹⁾	20.23

4 小结

乙肝扶正胶囊具有保肝降酶作用:对 D-半乳糖胺所致小鼠急性肝损伤有一定的保护作用,血清中 ALT、AST 值显著降低($P < 0.05$),病理检查结果表明乙肝扶正胶囊大、中剂量对损伤肝脏均可见明显的修复作用;对小鼠免疫性肝损伤有一定的保护作用,降低血清中 ALT、AST 含量,修复免疫性肝损伤;对四氯化碳慢性肝损伤可降低血清中 ALT、AST、肝脏羟脯氨酸含量,提高血清中 TP 和白蛋白 ALB 含量($P < 0.05$),病理检查结果表明对损伤肝脏有明显的修复作用。口服乙肝扶正胶囊 2.0 g·kg⁻¹ 对感染乙型肝炎病毒鸭血清 DHBV-DNA 水平抑制效果显著。对环磷酰胺造成的免疫低下小鼠可提高血清溶血素含量,提示乙肝扶正胶囊有一定的提高机体免疫功能的作用。

综上所述:乙肝扶正胶囊有一定的保肝降酶、提高机体免疫能力,抑制感染乙型肝炎病毒鸭血清 DHBV-DNA 水平的作用。

[参考文献]

- [1] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997. 1397-1400.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:科学技术出版社, 1991. 158-470.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 1342.