

原卟啉二钠的抗鸭乙型肝炎病毒作用

刘群红*, 范巧云

(安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

[摘要] 目的: 研究原卟啉二钠(PPN)抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用。方法: 采用先天感染DHBV的龙岩麻鸭为动物模型, 分设模型对照组、拉米呋啶组和PPN组, 各组按 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药10 d, 斑点杂交法观察用药前、用药5 d、10 d及停药后3 d血清中DHBV DNA表达, HE染色观察肝脏组织病理学变化。结果: PPN组于用药后5 d、10 d, 血清DHBV DNA水平分别为 1.36 ± 0.26 、 1.05 ± 0.28 , 与模型对照组 2.04 ± 0.05 、 1.90 ± 0.31 比较明显降低($T_5 P < 0.05$ 、 $T_{10} P < 0.01$), 病理检查发现PPN组肝细胞点状坏死明显减轻, 与模型对照组比较, 差异有显著性($P < 0.05$)。结论: PPN有抑制DHBV DNA的作用, 并具有明显的抗炎、保肝作用。

[关键词] 原卟啉二钠; 鸭乙型肝炎病毒; 鸭乙肝模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0046-03

Experimental Study on Antiviral Effect of Protoporphyrin Disodium on Duck Hepatitis B Virus

LIU Qun-hong*, FAN Qiao-yun

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-duck Hepatitis B virus (DHBV) action of protoporphyrin disodium (PPN). **Methods:** Longyan ducks with congenital infection of HBV were used as the animal model and the each group of ducks was given the drug with the doses $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 10 successive days. DHBV-DNA in serum was detected by dot-hybridization test before treatment, 5 days and 10 days after treatment, the pathological changes of the duck liver were also examined by HE staining. **Results:** After giving medication with PPN for 5 days and for 10 days, the optic density value of DHBV-DNA in ducks serum were obviously lower than that before treated (1.36 ± 0.26 , 1.05 ± 0.28 VS 2.04 ± 0.05 , 1.90 ± 0.31), there were remarkable difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Spotty hepatocyte necroses in treatment group was improved more obviously than that in model group. **Conclusion:** PPN can protect duck liver against inflammation by the inhibition of DHBV.

[Key words] protoporphyrin disodium(PPN); duck hepatitis B virus; duck hepatitis B model

原卟啉二钠, 化学名为1, 3, 5, 8-四甲基-2, 4-二乙炔基卟吩-6, 7-二丙酸钠(protoporphyrin disodium, PPN), 卟吩的衍生物, 是由四个吡咯环经四个次甲基键连接而成的含共轭双键的大环化合物, 可由血

红蛋白的辅基血红素经人工提取、加工而成。它具有促进细胞呼吸、改善蛋白质和糖代谢、抗补体结合等作用。我们采用先天感染鸭乙型肝炎病毒(duck Hepatitis B virus, DHBV)的龙岩麻鸭为模型^[1], 以作者实验室提取加工的PPN为实验药物, 研究了其体内抗乙肝病毒的作用。

1 材料

1.1 动物 1日龄龙岩麻鸭35只, 雄性, 体重(50 ± 5)g, 购自石井潮阳村孵化场, 常规饲养。饲养环境:

[收稿日期] 2007-08-24

[基金项目] 安徽理工大学青年科学研究基金项目(QN200644)

[通讯作者] * 刘群红, Tel: (0554) 6656492; E-mail: liuqunhong67@ yahoo. com. cn

温度(20~ 25) °C, 相对湿度 60% ~ 80%, 定时通风换气, 每日约 12 h 光照。饲料: 宝鼎 501 小鸭饲料, 由穗屏企业有限公司饲料厂生产。

1.2 药物 PPN(C₃₄H₃₂N₄Na₂, M= 542) 为红褐色结晶, 可溶于水, 不溶于氯仿、乙醚及丙酮, 易溶于酸性溶液, 在紫外光照射下可见很强的红色荧光。PPN 溶于酸性溶液后在波长 600 nm 556 nm 408 nm 显示吸收峰, 最大吸收峰为 408 nm。作者实验室以非抗凝猪血为原料, 经血红素、原卟啉粗品、原卟啉甲酯、原卟啉纯品、原卟啉二钠等制备过程而得^[2], 在波长 408 nm 处于 1.37 mol·L⁻¹ HCl 溶液中比色, 检测其纯度为 94.1%。拉米呋啉(国药准字 H20030581), 由中国苏州葛兰素史克制药(苏州)有限公司生产。

1.3 主要试剂 缺口翻译平移试剂盒, 购自美国 Promega CO 公司; α-32P-dCTP 购自北京市亚辉生物医学工程公司; NC 膜, 购自 Amersham 公司; DHBV 质粒, 由广州中医药大学热带病研究所病毒室保存; Sephadex G-50, 购自 Pharmacia 公司; 96 孔杂交点样器, 美国 Bio-rad 公司产品。

2 方法

2.1 动物筛选与分组 1 日龄龙岩麻鸭购回后适应性喂养 2 d, 于 4 日龄胫静脉取血, 离心, 收集血清, 斑点杂交法^[3]检测 DHBV DNA, 第 13 天出结果, 筛选出先天自然感染鸭。将 DHBV DNA 阳性鸭随机分为 3 组: 模型对照组、拉米呋啉组和 PPN 组, 每组 8 只。

2.2 给药方法 PPN 组和拉米呋啉组每天按 20 mg·kg⁻¹ 剂量口服给药, 给药体积为 1 mL/次, 模型组以生理盐水代替。开始给药时鸭体重约 120 g/只。每 5 d 称体重 1 次, 按体重调整给药量, 连续给药 10 d。血样采集为 13 日龄用药前(T₀)、用药第 5 天(T₅)、用药第 10 天(T₁₀) 及停药后第 3 天(P₃), 自鸭胫静脉取血, 分离血清, - 70 °C 冻存待检。

2.3 鸭血清 DHBV DNA 的检测 采用 DHBV DNA Dot Blot 法测定^[4]。取上述鸭血清, 每批同时点膜, 测定鸭血清中 DHBV DNA 水平, 观察其动态变化。按缺口翻译试剂盒说明书方法, 用³²P 标记 DHBV DNA 探针, 将 40 μL 血清点于硝酸纤维膜上, 然后杂交、放射自显影, 在酶标检测仪上测定 OD 值(滤光片波长为 490 nm), 计算血清 DHBV DNA 密度。

2.4 鸭肝组织病理变化 实验结束后, 全部鸭颈动脉放血处死, 立即摘取肝脏, 各组取肝右叶同一部位 1 cm×0.5 cm 大小的肝组织, 用 10% 中性福尔马林

固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察。

2.5 统计学处理 用 PEMS 3.1 对实验数据进行多因素方差分析及 Ridit 分析。

3 结果

3.1 PPN 对鸭血清 DHBV DNA 的抑制作用 各组用药后不同时间点光密度值与同组给药前光密度值的比较, 结果见表 1。PPN 组在给药后第 5 天, 鸭血清 DHBV DNA 水平开始下降, 第 10 天继续下降, 与 T₀ 值比较, 差异非常显著(P < 0.01)。拉米呋啉组在给药后第 5 天鸭血清 DHBV DNA 水平明显下降, 与给药前自身比较, 差异非常显著(P < 0.01)。

表 1 PPN 对 DHBV DNA 的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	OD ₄₉₀ 值			
	T ₀	T ₅	T ₁₀	P ₃
模型对照组	2.10 ± 0.09	2.04 ± 0.05	1.90 ± 0.31	1.86 ± 0.22
拉米呋啉组	2.03 ± 0.11	0.33 ± 0.15 ^{2,4)}	0.26 ± 0.10 ^{2,4)}	1.53 ± 0.33
PPN 组	2.04 ± 0.07	1.36 ± 0.26 ^{2,4)}	1.05 ± 0.28 ^{2,4)}	1.95 ± 0.13

注: 药物组给药不同时间与给药前(T₀)比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组相同时间比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01

3.2 鸭肝组织病理学检查 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。镜下观察可见汇管区的炎性细胞浸润, 胆小管增生, 肝细胞轻、中度变性(气球样变、脂肪变), 点灶状及碎屑样坏死, 但无纤维增生。光镜观察结果见表 2。

表 2 各实验组肝组织病理变化情况(n = 8)

组别	点状坏死	气球样变	炎性细胞浸润
模型对照组	6	7	8
拉米呋啉组	3	7	8
PPN 组	2 ¹⁾	6	8

注: 与模型对照组比较¹⁾ P < 0.05

4 讨论

原卟啉是机体构成血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶及色氨酸吡咯酶的必需成分。原卟啉在细胞内呈环状结构, 易与金属离子结合成金属卟啉。当肝脏发生疾病引起功能障碍时, 胆汁中卟啉与金属卟啉减少, 肝脏过氧化氢酶活性降低, 因此, 体外给予 PPN 就可在细胞内激发卟啉和金属卟

(下转第 52 页)

(上接第 47 页)

淋的生物合成,提高细胞内金属卟啉的含量,阻止肝脏过氧化氢酶活性的降低,促进细胞的呼吸和再生,在减少肝细胞病变坏死的同时恢复细胞功能。因上述代谢特点,使 PPN 具有提高肝脏及有关脏器血流量及氧气利用率、促进组织细胞呼吸、改善蛋白质和糖代谢、增强抗补体结合作用和机体免疫力及抗炎、抗过敏等作用,所以 PPN 一直作为肝脏机能改善剂加以研究和应用,关于 PPN 的抗鸭乙型肝炎病毒作用未见报道。

鸭乙型肝炎病毒(DHBV)与人乙型肝炎病毒(HBV)同属嗜肝 DNA 病毒科,两者的病毒大分子结构与复制有很多相似之处。先天感染 DHBV 的鸭因其病毒血症持续时间较长且较稳定,无明显的自然转阴现象,是研究人类乙型肝炎发病机制、病毒复制过程及筛选有效治疗药物的理想动物模型^[5]。实验结果显示,阳性药物拉米呋啶灌胃 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 10 d 给药,可显著抑制血清 DHBV DNA,停药 3 d(P_3) DHBV DNA 显著回升,与临床结果相吻合,说明本次实验的有效性。受试药物原卟啉二钠 10 d 疗程各时点血清 DHBV DNA 变化差异也有显著性意义($P < 0.01$),停药 3 d(P_3) DHBV DNA 显著回升,提

示 PPN 在鸭体内对 DHBV DNA 有明显抑制作用。病理学检查结果表明,PPN 组肝细胞点状坏死与模型对照组比较有显著差异($P < 0.05$),表明 PPN 有抗炎作用,可使肝脏炎症反应减轻,有一定的保肝作用,与以前的研究结果相符合。综上所述,PPN 能有效抑制鸭乙型肝炎病毒的复制,具有明显的抗炎、保肝作用。

[参考文献]

- [1] 陶 鹏,黄爱龙.乙型肝炎病毒感染模型研究新进展[J].中华肝脏病杂志,2003,11(11):701-702.
- [2] 刘群红,李朝品,张 超,等.非抗凝动物血提取原卟啉二钠的实验研究[J].淮南工业学院学报,2002,22(4):74-78.
- [3] 陈渊卿,顾健人,蒋惠秋,等.斑点杂交试验直接检测血清中乙型肝炎病毒 DNA[J].中华传染病杂志,1983,1(2):63.
- [4] 徐 庆,宋芸娟,李丽亚,等.荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用[J].世界华人消化杂志,2005,13(17):2082-2085.
- [5] 杨书兰,张奉学,朱宇同,等.用 PCR 法筛选先天感染鸭乙肝模型及与后天感染模型比较[J].广州中医药大学学报,2001,18(3):256-259.