

中药复方肝得宁片体内对鸭乙型肝炎病毒的影响

赵艳玲¹, 袁海龙¹, 孙艳玲², 张新全¹,
肖小河¹, 贺承山¹

(1. 中国人民解放军 302 医院药学部, 北京 100039;
2. 中国人民解放军 302 医院病理科, 北京 100039)

关键词: 肝得宁片; 鸭乙型肝炎病毒 抑制作用

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** E **文章编号:**
1005-9903(2002)02-0064-02

乙型肝炎一直是感染率高且危害严重的传染病之一, 目

收稿日期: 2001-07-05

前尚缺乏理想防治药物。肝得宁片是以五味子等常用中药组成的复方制剂, 其原剂型肝得宁丸多年来一直是我院乙型肝炎治疗的首选药, 在急、慢性乙型肝炎治疗中取得了较好疗效。近年来, 我院通过处方优化、工艺改革和剂型改变, 将其开发为国家中药三类新药。为了验证其对病毒性肝炎的治疗作用, 本实验以鸭乙型肝炎病毒静脉感染雏鸭为模型, 观察肝得宁片治疗后鸭血清中 DHBV DNA 的动态变化, 并检测肝得宁片对 DHBV DNA 复制的抑制作用。从而为肝得宁片在临床应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 动物 1 日龄北京雏鸭购自北京中国医学科学院药用植物研究所鸭场, 在本院实验动物中心以标准饲料喂养。

1.2 药物与试剂 肝得宁片由解放军 302 医院药学部药物研究室提供。拉米夫啉片, 规格 100mg/片, 由英国葛兰素公司生产, 批号: B016612。缺口平移试剂盒购自 Promega 公司, 批号: 990426; α -³²P-dCTP 购自北京福瑞生物技术工程公司, 批号: 981206; 鸭乙型肝炎病毒为鸭乙型肝炎病毒 DNA(DHBV-DNA) 强阳性上海麻鸭血清(中国医学科学院医药生物技术所病毒室提供, -70℃保存)

1.3 病理切片机, 高倍显微境日本 Olympus 公司制造, 本院

病理科提供。

2 实验方法

2.1 动物模型制作及药物治疗 1日龄北京鸭,经腿胫静脉注射上海麻鸭 DHBVDNA 阳性鸭血清^[1],每只 0.3ml,感染后 7 天后,雏鸭血清 DHBV 呈阳性,将鸭随机分为 5 组,病毒对照组、拉米夫定组(100mg/kg)、肝得宁片(22、11、5.5g/kg)三个剂量组,每组 6 只。灌胃给药。分别于药物治疗后 5 天(T₅)、10 天(T₁₀)和停药后 3 天(P₃)自鸭胫静脉取血,分离血清,-70℃保存,待检,同时,取部分肝组织,作病理学检查。

2.2 鸭血清 DHBV-DNA 的检测^[2] 按缺口翻译试剂盒说明

书方法,用³²P 标记 DHBV-DNA 探针,并作鸭血清斑点杂交,放射自显影膜片斑点,酶标仪测定放射自显影膜片杂交斑点的 OD 值,计算血清 DHBV-DNA 光密度,以杂交斑点 OD 值作为标本 DHBV-DNA 水平值。DHBV-DNA 抑制率计算公式:

$$\text{DHBVDNA 抑制率} = \frac{\text{给药前 OD 值} - \text{给药后 OD 值}}{\text{给药前 OD 值}} \times$$

100%

2.3 病理组织学检查 于同一部位肝组织取材,10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察。

表 1 肝得宁片在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒 DHBV-DNA 的影响

组别	剂量 g/kg	DHBV-DNA 水平			
		T ₀	T ₅	T ₁₀	T ₃
病毒对照组		0.42 ± 0.11	0.42 ± 0.13	0.44 ± 0.12	0.42 ± 0.11
肝得宁	22	0.41 ± 0.14	0.30 ± 0.09	0.26 ± 0.10*	0.25 ± 0.09*
	11	0.46 ± 0.09	0.41 ± 0.08	0.38 ± 0.09	0.34 ± 0.11*
	5.5	0.44 ± 0.13	0.40 ± 0.13	0.39 ± 0.16	0.37 ± 0.15
拉米夫定片	0.1	0.51 ± 0.14	0.27 ± 0.12**	0.15 ± 0.05**	0.33 ± 0.13*

给药组各时相(T₀, T₅, T₁₀, P₃) DHBV-DNA OD 值与病毒对照组各时相 DHBV-DNA OD 值比较 ** P < 0.01, * P < 0.05; n = 6。

3 结果

3.1 肝得宁片对 DHBV-DNA 的作用 雏鸭感染乙肝病毒后 DHBV-DNA 全部阳性。肝得宁高、中剂量组在给药 5 天(T₅)、10 天(T₁₀),无论给药前后比较(横向)还是与对照组比较(纵向),鸭血清中 DHBV-DNA 水平都所降低(P < 0.05, P < 0.01)。并且呈一定的时间依赖性和剂量依赖性。(见表 1)低剂量组则无明显抑制作用(P > 0.05),但停药 3 天后抑制率有所上升。抑制率升高程度与病毒对照组比较虽无显著性差异,但体现了肝得宁抑制 DHBV-DNA 复制的时间依赖性。阳性药拉米夫定在用药期间可显著抑制鸭 DHBV-DNA,但停药后下降至 18.63%,出现病毒重新复制的“反跳”现象。(见图 1)

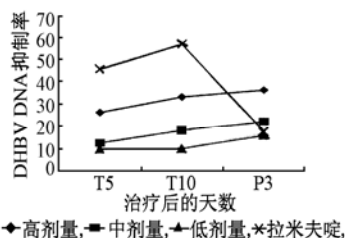


图 1 肝得宁片治疗后鸭血清 DHBV DNA 的动态变化

3.2 药物对鸭肝病理的影响 鸭肝病理组织学观察,病毒对照组鸭肝细胞出现弥漫性水样变性,部分肝细胞呈气球样病变及脂肪变性,肝小叶有点、灶性坏死。汇管区内较多单核细胞浸润。肝得宁片中剂量及大剂量组治疗的鸭肝细胞仅见少数出现水样变性及脂肪变性。少数汇管区受累,肝小叶点状坏死明显减少,结构基本完整。拉米夫定治疗的鸭肝

组织内仅见少数散在点、灶状坏死,肝细胞变性改变较轻,多数肝小叶结构比较完整。

4 讨论

以嗜肝 DNA 病毒感染动物作模型评价药物的抗 HBV 活性,近年来受到抗乙肝病毒基础研究和应用研究的广泛应用^[3]。选用鸭乙型肝炎动物模型考察药物对肝炎病毒的治疗作用是一种较为有效而简便的方法。核苷类似物如阿昔洛韦、拉米夫定等对乙型肝炎病毒具有良好的抑制作用,但在停药后出现血清 DHBVDNA 回升现象。因此,深入挖掘祖国医药宝库,结合现代的检测分析手段,为中药及其复方的研究提供治疗基础及理论依据已成为一种趋势。本文实验结果表明,肝得宁片对乙型肝炎病毒具有一定的抑制作用,其抑制作用呈剂量依赖性及时间依赖性。停药后没有出现病毒升高的反跳现象。初步的实验结果证明肝和得宁片具有一定的抗乙型肝炎病毒作用,为肝得宁片在临床的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Tsiquaye KN. Maternal transmission of duck hepatitis B virus in peigree Pekin ducks[J]. Hepatology, 1985, 5: 622-625.
- [2] 陈渊清,顾建人,蒋惠秋,等.阿糖腺苷单磷酸呀鸭乙型肝炎的治疗效果[J].中华传染病杂志,1983,1: 64.
- [3] 巫善明,徐伟民.苦参碱抗鸭乙肝病毒作用的实验观察[J].中西医结合肝病杂志,1993,4(10): 18-20