

## 白背叶根抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究

徐 舒, 吕志平, 蔡红兵, 张晓刚, 刘 强, 谭 焱

(南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的:观察白背叶根体内抗鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, D-HBV)的作用。方法:采用 PCR 技术筛选 D-HBV 阳性 3 日龄广州麻鸭 40 只。将麻鸭随机分为空白对照组,白背叶根高、中、低剂量组和拉米夫定组,分别给予相应药物进行干预。用药前、用药第 7、14、21 天及停药第 7 天,取各组麻鸭静脉血,采用实时定量荧光 PCR 技术检测血清 D-HBV DNA 含量;治疗前后取肝脏组织进行病理组织学观察。结果:拉米夫定组于用药后,血清病毒水平迅速降低,但停药后存在反跳现象。白背叶根高、中剂量组分别于治疗第 14、21 天其血清病毒含量明显下降,低剂量组治疗期间未见明显的抑制病毒作用。停药后,白背叶根高、中剂量组与空白对照组比较仍表现出一定的病毒抑制作用。白背叶根高剂量组对肝脏炎症的改善作用较拉米夫定组明显。结论:白背叶根有抑制体内 D-HBV 复制的作用,其作用大小与剂量及用药时间相关;其治疗作用较拉米夫定弱,但作用维持时间长,且用药较为安全。

[关键词] 中草药;白背叶根;鸭乙型肝炎病毒;实时定量 PCR;动物实验

[中图分类号] R512.62 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)03-0285-04

## Inhibiting effects of root of *Mallotus apelta* on duck hepatitis B virus

Shu XU, Zhi-Ping L, Hong-Bing CAI, Xiao-Gang ZHANG, Qiang LIU, Yan TAN

(School of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China)

**ABSTRACT** Objective: To evaluate the inhibiting effects of the root of *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.-Arg. on duck hepatitis B virus (D-HBV) in vivo. Methods: Forty nestling ducks with congenitally infection of D-HBV detected by PCR were randomly divided into five groups: untreated group, lamivudine-treated group, and high-, medium- and low-dose root of *Mallotus apelta*-treated groups. The ducks in the lamivudine-treated group were fed lamivudine with a dose of 50 mg/kg once. Ducks in the three-dose *Mallotus apelta*-treated groups were treated with different doses of decoction of this herbal medicine for 21 days respectively. The serum content of D-HBV DNA was determined by quantitative real-time PCR technique before and 7 days after the treatment, and on the 7th, 14th and 21st day of the treatment. Liver biopsy was also executed before and after the treatment to observe the histopathological changes. Results: Lamivudine showed a rapid inhibiting effect on D-HBV DNA, but this effect didn't last long, and the serum level of D-HBV DNA increased again after treatment. The serum level of D-HBV DNA dropped markedly in the high- and medium-dose *Mallotus apelta*-treated groups on the 14th and 21st day. Low-dose *Mallotus apelta* revealed no obvious inhibiting effect on D-HBV. After treatment, the inhibiting effect in the root of *Mallotus apelta*-treated group continued as compared with that in the untreated group. The histopathological changes of liver tissues showed that the inflammation in the high-dose root of *Mallotus apelta*-treated group was weakened as compared with that in the lamivudine-treated group. Conclusion: The root of *Mallotus apelta* has therapeutic effect on D-HBV. It can restrain the duplication of D-HBV in vivo. Although this effect is weaker than that of lamivudine, it continues longer. Thus this herbal medicine is an effective, safe and economical drug for hepatitis B.

[基金项目] 广东省自然科学基金科技三项资助项目(No. K1022039)

Correspondence to: Zhi-Ping L, MD, Professor. E-mail: lzping@fimmu.com

**KEY WORDS** drugs, Chinese herbal; root of *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.-Arg.; duck hepatitis B virus; quantitative real-time PCR; animal experimentation

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao/ J Chin Integr Med, 2006, 4(3):285-288 www.jcimjournal.com

人乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是导致肝脏疾病的首要病因,每年因慢性乙型肝炎(或因其继发的肝硬化、肝细胞癌)导致 50 万~120 万患者死亡,是全球第 10 大死亡病因<sup>[1]</sup>。抗病毒治疗是降低乙型肝炎致死率的重要途径。天然药物具有副作用小、经济及长期使用安全等优点。在长期的临床观察中,我们发现白背叶根对慢性乙型肝炎和肝纤维化有较好的疗效。本实验旨在观察白背叶根体内抗鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, D-HBV)的效果,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 3 日龄广州麻鸭 150 只,购自广州大沥江夏村鸭场,雌雄不拘,体质量 40~50 g,常规 PCR 法筛选 D-HBV 阳性鸭子。

1.2 药物 白背叶根购于南方医科大学中医系中药房,水煎 3 次后经 75 ℃ 水浴浓缩成含生药 10 g/ml。拉米夫定,Glaxowellcome 公司产品,100 mg/片。

1.3 主要试剂 标准 D-HBV 阳性血清由广州中医药大学张奉学教授惠赠。Taq 酶,10×PCR buffer、dNTP mixture、6×loading buffer,均购自大连宝生物工程有限公司。DNA 提取液,购自中山大学达安公司。引物参照文献<sup>[2]</sup>设计,由北京赛百盛生物工程有限公司合成,扩增产物 217 bp;上游引物 5' AACCATTGAAGCAATCACTAGAC 3',下游引物 5' ATCTATGGTGGCTGCTCGAACTA 3'。LightCycler FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green [含 PCR Grade, Master Mix (Taq 酶,10×buffer, dNTP, SYBR Green, Mg<sup>2+</sup>), 双蒸水], 购自 Roche 公司。常规 HE 染色及 D-HBsAg 特殊染色(地衣红)所需试剂由南方医科大学病理学教研室提供。

1.4 主要仪器 PCR System 9700 扩增仪,美国 GeneAmp 公司产品; Light Cycler 实时定量 PCR 检测仪, Roche 公司产品。

1.5 动物模型筛选 150 只雏鸭均颈静脉取血各 0.1~0.2 ml, 10 000 r/min 离心 5 min 后取血清。将 10 μl DNA 提取液加入 10 μl 待测血清中,混匀后经沸水浴 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清。PCR 反应液组成: 10×PCR buffer 5 μl、

dNTP 4 μl, 上游引物(10 μmol/L) 2 μl、下游引物(10 μmol/L) 2 μl、Taq 酶 0.5 μl、血清提取物 5 μl、双蒸水 31.5 μl, 构建成 50 μl 反应体系。反应条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 共 37 个循环; 扩增产物 217 bp。在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 参照阳性血清和标准分子量印迹检测 PCR 结果。

1.6 动物分组和药物干预 PCR 筛选 H-DBV 阳性雏鸭共 40 只, 随机分成 5 组, 每组 8 只: 空白对照组、拉米夫定组、白背叶根高剂量组、白背叶根中剂量组、白背叶根低剂量组。各组均喂以普通饲料, 自由饮水。将拉米夫定研碎溶于水, 按 50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 给拉米夫定组雏鸭 1 次性灌胃。白背叶根高、中、低剂量组分别按 30、20、10 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 白背叶根浓缩液灌胃, 1 次/d; 复测体质量 1 次/周, 根据体质量调整用药剂量。连续喂药 21 d 后, 停药观察 1 周。

1.7 D-HBV DNA 定量检测 于用药前、用药第 7、14、21 天及停药后第 7 天各抽取雏鸭颈静脉血 0.2 ml, 离心后 -20 ℃ 保存待检。参照说明书, 反应液组成: 上游引物(10 μmol/L) 1 μl, 下游引物(10 μmol/L) 1 μl (引物序列同前), LightCycler FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green 13 μl, 血清提取物 5 μl。构建 20 μl 反应体系。反应条件: 93 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 12 s, 共 40 个循环; 温度变化速率设定为 20 ℃/s; 参照标准样品拷贝数为 1.0×10<sup>7</sup>。实验条件设置、荧光信号检查、数据读取和分析均由 Roche LightCycler Run 5.32 软件完成。

1.8 肝脏组织病理学检查 用药前剖杀 D-HBV 阳性雏鸭 2 只, 灌药第 21 天剖杀白背叶根高剂量组和拉米夫定组雏鸭各 2 只, 取肝脏组织行常规 HE 染色后观察炎症情况, 地衣红特殊染色观察 D-HBsAg 分布的变化。

1.9 统计学方法 所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 血清 D-HBV DNA 含量组内比较采用配对 *t* 检验, 各时间段组间比较采用单因素方差分析(LSD 法)。

## 2 结 果

2.1 PCR 筛选 D-HBV 阳性雏鸭的结果 从

150 只雏鸭中共筛选出 43 只 D-HBV 阳性雏鸭, 阳性率为 28.7%, 符合文献报道<sup>[3]</sup>。见图 1。

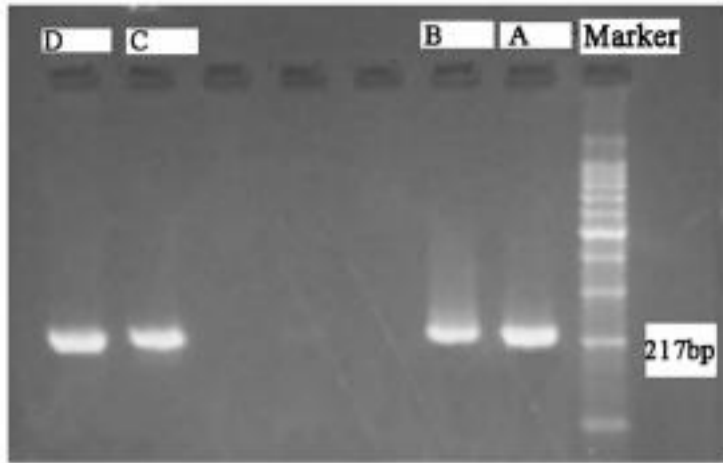


图 1 PCR 扩增产物电泳图谱

Figure 1 Electrophoregram of PCR products of D-HBV  
A & B: Positive samples; C & D: Positive-detected samples.

2.2 各组雏鸭治疗效果的比较 拉米夫定起效最快, 白背叶根组血清 D-HBV DNA 含量则缓慢下

降, 下降程度与剂量和用药时间相关。治疗第 7、14 天时, 拉米夫定组的疗效要优于白背叶根各组; 治疗第 21 天, 拉米夫定组和白背叶根高、中剂量组疗效比较无统计学差异; 停药后, 拉米夫定组 D-HBV DNA 含量明显回升, 而白背叶根组则有后续抑制 D-HBV 复制的作用, 但两组比较无统计学差异。见表 1。

2.3 各组雏鸭治疗前后肝脏组织的病理学变化  
治疗前后肝脏组织 HE 染色结果: 治疗前雏鸭肝脏组织可见肝细胞小灶状坏死, 炎性细胞浸润, 周边部分肝脏细胞肿胀, 水样变性; 治疗后, 白背叶根高剂量组和拉米夫定组肝脏组织可见炎症有不同程度的减轻, 未见小灶状坏死, 变性肝细胞减少。治疗前后肝脏组织地衣红特殊染色结果: 伴随炎症程度的减轻, D-HBsAg 分布减少, 白背叶根高剂量组较拉米夫定组炎症改善明显。见图 2、3。

表 1 各组治疗不同时期血清 D-HBV DNA 含量的比较

Table 1 Copy number of D-HBV DNA in serum of nestling ducks before, during and after treatment in different groups  
( $\bar{x} \pm s$ , copy/ml)

Group	n	Copy number of D-HBV DNA				
		Pre-treatment	Treatment for 7 days	Treatment for 14 days	Treatment for 21 days	7 days after treatment
Untreated	8	$(1.95 \pm 0.95) \times 10^8$	$(1.73 \pm 0.74) \times 10^8$	$(1.47 \pm 0.71) \times 10^8$	$(6.64 \pm 0.77) \times 10^8$	$(1.45 \pm 0.75) \times 10^8^*$
High-dose <i>M. apelta</i> -treated	8	$(1.92 \pm 1.13) \times 10^8$	$(1.80 \pm 1.09) \times 10^8$	$(6.69 \pm 2.84) \times 10^7^*$	$(4.97 \pm 4.83) \times 10^7^*$	$(4.02 \pm 3.53) \times 10^7^*$
Medium-dose <i>M. apelta</i> -treated	8	$(1.87 \pm 0.90) \times 10^8$	$(1.54 \pm 0.69) \times 10^8$	$(7.48 \pm 4.81) \times 10^7$	$(5.66 \pm 4.14) \times 10^7^*$	$(4.87 \pm 4.27) \times 10^7^*$
Low-dose <i>M. apelta</i> -treated	8	$(1.73 \pm 0.66) \times 10^8$	$(1.52 \pm 0.61) \times 10^8$	$(1.51 \pm 0.61) \times 10^8$	$(1.36 \pm 0.47) \times 10^8$	$(1.28 \pm 0.65) \times 10^8^*$
Lamivudine-treated	8	$(1.68 \pm 1.17) \times 10^8$	$(1.14 \pm 0.57) \times 10^7^*$	$(6.35 \pm 8.79) \times 10^6^*$	$(3.77 \pm 3.43) \times 10^6^*$	$(6.82 \pm 6.39) \times 10^7$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs pre-treatment;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , vs untreated group;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , vs lamivudine-treated group.

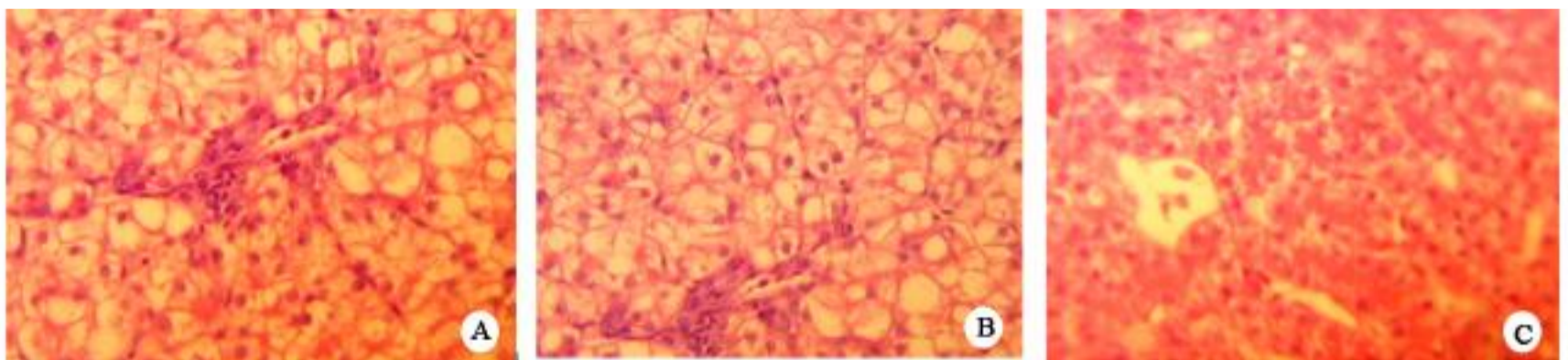


图 2 治疗前后肝脏组织病理学改变(HE 染色,  $\times 400$ )

Figure 2 Histopathological changes of liver tissue in nestling ducks with D-HBV infection before and after treatment (HE staining,  $\times 400$ )

A: Pre-treatment; B: Lamivudine-treated group after treatment;

C: High-dose *Mallotus apelta*-treated group after treatment.

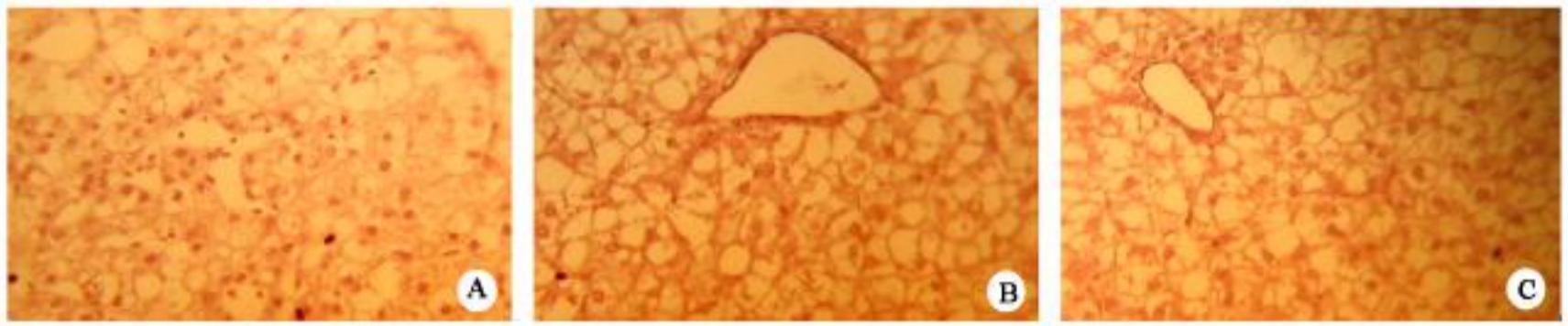


图 3 治疗前后肝脏组织病理学改变(地衣红染色, × 400)

Figure 3 Histopathological changes of liver tissue in nestling ducks with D-HBV infection before and after treatment (aceto-orcein staining, × 400)

A: Pre-treatment; B: Lamivudine-treated group after treatment; C: High-dose *Mallotus apelta*-treated group after treatment.

### 3 讨论

D-HBV 与人 HBV 两者的分子结构和发病机制存在许多相似之处。近年来,鸭乙型肝炎动物模型已经成为国内外公认的用以筛选抗 HBV 药物、评价疗效和研究其发病机制的模型。先天感染 D-HBV 模型较后天感染 D-HBV 模型有更好的实验价值,血清 D-HBV DNA 相对稳定,维持时间长<sup>[4]</sup>,有利于客观地评价药物疗效。本实验采用 PCR 法筛选较常用的 Dot-blot 法灵敏度高、特异性强、时间短<sup>[2]</sup>。筛选出的雏鸭可立即用于实验,保证用药期间血清 D-HBV DNA 的稳定性,可进一步减小实验误差。

荧光实时定量 PCR 技术利用能特异标记 PCR 产物的荧光物质,以显示 PCR 产物的动态积累,从而得到 S 型的扩增曲线。在曲线的前期阶段,PCR 反应符合指数性扩增,因此可以在单纯指数方程的基础上,通过比较产物积累的速度(时间)进而确定初始模板的分子量。其与传统的 Dot-blot 检测方法存在着本质的区别,是一种全定量的方法,具有灵敏度高、误差小、可重复的优点<sup>[5]</sup>。

目前对乙型肝炎病毒引起的慢性肝病尚无理想的治疗方法。临床常用的两类抗病毒药为干扰素和核苷类药物。干扰素治疗的有效率较低以及难以耐受的副作用限制了其临床应用;核苷类代表药物拉米夫定同样因为需要较长的疗程及耐药性问题而难以成为理想的治疗药物<sup>[1]</sup>。因此,寻找疗效确切、长期服用安全且价格低廉的药物是亟待解决的问题。

本实验观察了白背叶根抗 D-HBV DNA 的作用。实验结果表明,白背叶根具有一定的体内抑制 D-HBV 的作用,其起效较慢,且疗效与用药剂量及用药时间相关。白背叶根高剂量组在治疗第 14 天显效;而中剂量组在治疗第 21 天显效;低剂量组在治疗期间未见明确的抑制病毒作用。白背叶根高、中剂量组在停药后仍显示有明显的抑制病毒的作用。拉米夫定抑制 D-HBV 起效较早,在治疗第

14 天其病毒含量已降至较低水平,但停药后病毒含量又立即回升。拉米夫定组和空白对照组血清病毒含量的动态变化结果与其他学者的实验报道一致,实验过程中各组血清 D-HBV 均未转阴。白背叶根组与拉米夫定组比较,白背叶根起效慢,但其抑制病毒复制的作用平稳而持久,提示白背叶根抑制体内 D-HBV 复制的机制不同于拉米夫定。血清病毒检测结果与肝脏病理组织学表现基本一致,随着病毒复制水平的降低,肝脏炎症也有所减轻,但白背叶根高剂量组比拉米夫定组炎症改善程度更为明显。说明白背叶根不仅能抑制病毒的复制,同时具有保护肝脏细胞、抗氧化及抑制炎症反应的作用,这与我们先期对白背叶根抗肝纤维化研究所得的结论一致<sup>[6]</sup>。

本实验结果证实,白背叶根能够抑制 D-HBV 在体内的复制,其作用较拉米夫定弱但疗效稳定。关于白背叶根抗病毒的作用机制及其抗病毒的有效成分,尚待进一步研究。

#### [参考文献]

- 1 Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, current and emerging prevention and control measures: a review. J Viral Hepat, 2004, 11(2): 97-107.
- 2 杨书兰,张奉学,朱宇同,等.用 PCR 法筛选先天感染鸭乙型肝炎模型及与后天感染模型比较.广州中医药大学学报,2001,18(3): 256-259.
- 3 邓学龙,朱宇同,方宏勋,等.广州地区 3 个鸭种 1 日龄雏鸭垂直感染鸭乙型肝炎病毒调查.广州中医药大学学报,1997,14(4): 274-276.
- 4 邓学龙,朱宇同,郭兴伯,等.先天和后天感染鸭乙型肝炎病毒的广州麻鸭外周血中病毒血症的动态比较及应用.广州中医药大学学报,1999,16(1): 56-60.
- 5 邹文,杨旭,杨立平,等.SYBR 实时定量聚合酶链反应检测鸭乙型肝炎病毒的研究.中华肝脏病杂志,2004,12(7): 444.
- 6 赵进军,吕志平,张绪富.白背叶根对肝纤维化大鼠的实验研究.现代诊断与治疗,2002,13(5): 257-259.

[收稿日期] 2005-07-27