

不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究

陈压西 郭树华 张定凤 陈学华

内容提要 本文应用重庆麻鸭乙型肝炎动物模型进行了不同产地中草药叶下珠及其联合中药苦参及抗菌药环丙沙星的抗鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B Virus, DHBV)疗效初探,连续用药1个月后,结果表明:广西叶下珠、云南叶下珠能使鸭血清中鸭乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(DHBV DNA)滴度下降($P < 0.05$),而重庆叶下珠无此作用($P > 0.05$);云南叶下珠停药后有血清 DHBV DNA 回升现象;广西叶下珠与苦参合用,无明显协同作用,但与环丙沙星合用,似有增强抗病毒的作用($P < 0.05$)。

关键词 叶下珠 鸭乙型肝炎病毒 动物模型

Experimental Study on Anti-Duck Hepatitis B Viral Effect of *Phyllanthus urinaria* of Different Areas and Combined Therapy with Other Drugs Chen Ya-xi, Guo Shu-hua, Zhang Ding-feng, et al *Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Sichuan(630010)*

The duck hepatitis B virus model was treated with *phyllanthus urinaria* of different area and combined with *Sophora flavescens* as well as ciprofloxacin once a day for one month, the results indicated: Guangxi and Yunnan *Phyllanthus* could lower the serum DHBV DNA significantly ($P < 0.05$), but Chongqing *Phyllanthus* couldn't. And the amount of serum DHBV DNA rose a week after stopping of Yunnan *Phyllanthus*. The antiviral effect of Guangxi *Phyllanthus* combined with ciprofloxacin seems to be strengthened ($P < 0.05$).

Key words *Phyllanthus urinaria*, Duck hepatitis B virus, Animal model

中草药叶下珠(*phyllanthus urinaria*)是近年发现的抗乙型肝炎病毒药物,属大戟科^[1],有平肝清热、利水解毒之功,与苦味叶下珠(*phyllanthus amarus*)同为一属,其抗病毒机制目前尚不清楚。本文对国内部分地区的叶下珠及其联合用药的抗病毒疗效在鸭乙型肝炎病毒感染鸭内进行了研究,旨在了解叶下珠产地的不同对其疗效的影响及其抗病毒疗效机理。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 血清鸭乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(DHBV DNA)阴性的重庆麻鸭产蛋孵化的雏鸭,1~2日龄内经腹腔接种0.1 ml DHBV DNA 阳性病毒血清后,经检测血清将阳性感染鸭饲养至1月龄,即感染病毒后4周,平均体重0.2 kg/只,随机

分组用药。

1.2 药物与试剂 所用叶下珠分别来自广西、云南、四川省,经生药学鉴定,其原植物为 *phyllanthus urinaria*。将新鲜叶下珠洗净晒干,全草入药,打碎制成粉末备用。苦参来自四川省,经煎煮浓缩,含生药浓度2 g/ml,4℃冰箱储存。环丙沙星注射液购于重庆制药六厂,人 α 1 型基因工程干扰素购于上海生物制品研究所。地高辛标记的 DHBV DNA 探针,本所制备,敏感性为1 pg,地高辛标记药盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。STE 液:0.1 mol NaCl; 10 mmol Tris · Cl; 1 mmol EDTA, pH 7.4。

1.3 动物分组与用药 取阳性感染的雏鸭77只,随机分为8组,分别为生理盐水对照组(10只)、干扰素对照组(9只)、重庆叶下珠组(9只)、广西叶下珠组(10只)、云南叶下珠组(10只)、环丙沙星组(10只)、广西叶下珠加环丙沙星组(10只)、广西叶下珠加苦参组(9只)。各组每日用药1次,连续用药1月,每

日用药剂量为生理盐水 2 ml、干扰素 10 万 u/kg、环丙沙星 5 mg/kg, 各叶下珠均为 10 g/kg。除干扰素、环丙沙星肌肉注射外, 其余药于每日晨空腹灌喂。

2 方法

2.1 用药前、中、后及停药 1 周取鸭血 0.5 ml/只, 分离血清, 用地高辛探针检测 DHBV DNA 含量变化, 采用斑点杂交法^[2]统一对比检测, 并以与探针同源性的 DHBV 质粒 DNA 作对照, 倍比稀释后点样于硝酸纤维薄膜, 以杂交显示斑点颜色为标准, 与待检血清斑点杂交的斑点颜色深浅比较, 半定量。

2.2 于停药后各组随机抽取 1 例肝组织固定于 10% 甲醛溶液, 作常规 HE 染色病理检查。

2.3 将单用广西、云南叶下珠组的鸭各随机选用 3 只, 于用药前、中、后同一只鸭每次剖腹取肝约 200 mg, 缝合切口, 将肝组织用冰筒(1℃)运回实验室, -70℃ 保存, 供 Southern Blot 法检测。检测时

将每份肝组织加冷 STE 液制成匀浆, 经酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 0.8% 琼脂凝胶电泳, 以 Hind III 酶切的入噬菌体 DNA 作为分子量标准, 最后将肝组织中提取的 DNA 转印到硝酸纤维薄膜上, 用地高辛探针杂交检测, 方法参照 Molecular Cloning 方法^[2]。

结 果

1 各组用药前、用药 2 周、用药 1 月、停药 1 周血清 DHBV DNA 半定量结果表明, 生理盐水对照组、重庆叶下珠组、环丙沙星组血清 DHBV DNA 无显著性降低($P > 0.05$), 而人干扰素对照组用药 1 个月及停药 1 周后血清病毒 DNA 有极显著降低($P < 0.01$), 云南叶下珠组随疗程延长, DHBV DNA 降低越加明显, 但停药后有血清 DHBV DNA 回升现象, 见表 1。

此外, 广西叶下珠合用环丙沙星 1 月后比单用广

表 1 不同时间血清 DHBV DNA 检测结果 (pg/ μ l, $\bar{x} \pm S$)

组 别	n	logDHBV DNA			
		用药前	用药 2 周	用药 1 个月	停药 1 周
生理盐水	10	1.34 $\pm$ 0.21	1.29 $\pm$ 0.27	1.30 $\pm$ 0.35	1.26 $\pm$ 0.32
干扰素	9	1.40 $\pm$ 0.37	1.25 $\pm$ 0.23	0.82 $\pm$ 0.67 **	0.82 $\pm$ 0.62 **
重庆叶下珠	9	1.40 $\pm$ 0.31	1.40 $\pm$ 0.41	1.30 $\pm$ 0.38	1.20 $\pm$ 0.37
广西叶下珠	10	1.13 $\pm$ 0.24	0.56 $\pm$ 0.72 *	0.52 $\pm$ 0.67 *	0.52 $\pm$ 0.67 *
云南叶下珠	10	1.56 $\pm$ 0.21	0.84 $\pm$ 0.59 *	0.29 $\pm$ 0.49 **	1.16 $\pm$ 0.58
环丙沙星	10	1.30 $\pm$ 0.35	1.26 $\pm$ 0.21	1.26 $\pm$ 0.21	1.26 $\pm$ 0.21
广西叶下珠+环丙沙星	10	1.65 $\pm$ 0.37	1.07 $\pm$ 0.52 *	0.80 $\pm$ 0.56 **	0.89 $\pm$ 0.64 **
广西叶下珠+苦参	9	1.35 $\pm$ 0.35	0.82 $\pm$ 0.67 *	0.82 $\pm$ 0.67 *	0.82 $\pm$ 0.67 *

注: 与用药前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

西叶下珠及广西叶下珠合用苦参的血清 DHBV DNA 阴转率高($P < 0.05$), 似可认为广西叶下珠与环丙沙星合用有协同作用, 而与苦参合用无协同作用, 见表 2。

表 2 用药 1 个月及停药 1 周后血清 DHBV DNA 阴转率 (%)

组 别	n	用药 1 月	停药 1 周
生理盐水	10	0	0
干扰素	9	33.33	33.33
重庆叶下珠	9	0	0
广西叶下珠	10	30.00	30.00
云南叶下珠	10	60.00	10.00 Δ
环丙沙星	10	0	0
广西叶下珠+环丙沙星	10	60.00	60.00 *
广西叶下珠+苦参	9	33.33	33.33

注: 与单用广西叶下珠比较, * $P < 0.05$; 与用药 1 个月比较, Δ $P < 0.05$

2 日检各组肝脏均色泽正常、表面光滑、质地柔软、未扪及结节等改变。常规病理检查均无特异性的肝脏炎症表现和药物对肝组织的毒性损害。

3 Southern Blot 检测发现, 单用广西、云南叶下珠治疗 2 周、1 个月后肝组织中 DHBV 的松弛环状 DNA(relaxed Circular viral DNA, RC)、超螺旋 DNA(Supercoiled DNA, SC)、单链 DNA(Single-stranded DNA, SS)较用药前均有明显降低。

讨 论

1987 年 Venkateswaran^[3]证实苦味叶下珠水溶性提取物可以抑制 HBV 内源性的 DNA 多聚酶, 在体外可使乙肝表面抗原转阴, 也能使感染土拨鼠肝炎病毒(WHV)的土拨鼠体内的 WHV 表面抗原滴度

迅速下降和DNA多聚酶活性降低。1988年Thyagarajan等⁽⁴⁾用苦味叶下珠全草制成粉剂胶囊治疗HBV携带者,随访9个月后HBsAg阴转率达59%,而1990年Leelarusamee等⁽⁵⁾用此药治疗HBV携带者无一例HBsAg、HBeAg转阴。Thyagarajan等⁽⁶⁾再次用此药治疗HBV携带者,结果HBsAg清除率为20%,认为苦味叶下珠水溶性提取物可以抑制HBsAg和抗HBsAg之间的反应及HBV内源性DNA多聚酶。我国各地用叶下珠治疗临床肝炎患者的疗效也不大相同,浙江叶下珠与福建叶下珠对HBsAg阴转无明显效果,但对HBeAg阴转效果明显,而湖南叶下珠对乙肝病毒标志无阴转效果^(7~9)。此外,Niu等⁽¹⁰⁾应用鸭乙肝动物模型发现用Thyagarajan赠送的产自印度南部的苦味叶下珠每天500 mg/kg体重,连续用药10周,血清中HBsAg、前S蛋白、肝内DHBV DNA均无明显变化。可见,叶下珠的疗效受多种因素影响,如产地、品种、采集季节、疗程、制备方法、剂型及抗病毒指标检测技术等。

我们的研究同样发现不同产地叶下珠抗乙肝病毒作用不同。云南叶下珠停药后血清DHBV DNA有回升现象,似可说明其远期抑制效应差,但因药源困难,整个疗程及观察时间偏短,该现象还不能充分证实。

在应用清热解毒的叶下珠治疗基础上,我们加用具有利胆退黄、清热利尿作用的苦参及喹诺酮类抗菌药环丙沙星,以期提高疗效,结果表明广西叶下珠与环丙沙星合用似有增强抗病毒的作用。喹诺酮类抗菌作用机制是通过抑制细菌的DNA回旋酶(该酶作用是维持染色体的负超螺旋形式)而抑制DNA合成,是否环丙沙星也能抑制乙肝病毒形成超螺旋DNA(SC),从而与叶下珠产生协同作用,也有待进一步探讨。

干扰素是一类具有广谱抗病毒活性的蛋白质,国外重组干扰素已成为治疗乙型肝炎的抗病毒疗法的主要药物。我们利用人 α I型基因工程干扰素作为用药对照组,用药1个月后血清DHBV DNA显著降低,

因考虑到干扰素有相对的种属特异性,仅在同一种属动物细胞中发挥抗病毒作用,而国内外似未见类似报道,是否为受某个实验环节的影响产生的“假象”,尚需我们重复验证。

参 考 文 献

1. 江西医学院编. 中药大辞典. 下册. 上海: 上海人民出版社. 1977(附编): 51.
2. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1989; 9: 31.
3. Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS, et al. Effects of an extract from *phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: In vitro and in vivo studies. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 274.
4. Thyagarajan SP, Subramanian S, Thirumalasundari T, et al. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. Lancet 1988; 11: 764.
5. Leelarusamee A, Trakulsomboon S, Maunwongyathi P, et al. Failure of *Phyllanthus amarus* to eradicate hepatitis B surface antigen from symptomless carriers. Lancet 1990; 335: 1600.
6. Thyagarajan SP, Jayaram S, Valliammai T, et al. *Phyllanthus amarus* and hepatitis B. Lancet 1990; 336: 949.
7. 张金龙, 何文南, 叶平, 等. 苦味叶下珠治疗慢性HBV感染临床观察. 中西医结合肝病杂志 1992; 2(1): 8.
8. 诸福明, 张嘉祺, 张孝秩, 等. 福建产叶下珠对乙肝病毒标志作用临床观察. 中西医结合肝病杂志 1992; 2(2): 10.
9. 万运松, 钟长庚. 叶下珠对乙肝病毒标志转阴的观察. 中西医结合肝病杂志 1991; 1(3): 38.
10. Niu JZ, Wang YY, Qiao M, et al. Effect of *Phyllanthus amarus* on duck hepatitis B virus replication in vivo. J Med Viral 1990; 32(4): 212.

(收稿: 1994-01-31 修回: 1994-08-23)

· 简 讯 ·

《中国民间疗法》杂志为全国性期刊, 由中国民间中医药研究开发协会与中国中医药出版社主办, 国家中医药管理局主管。通过邮局向国内外公开发行人, 该刊坚持面向临床、面向基层、面向家庭的方针; 以医疗为主、保健康复为辅, 充分体现中国自然疗法的优势和特色。该刊为双月刊, 双月月底出版, 投稿可与编辑部联系, 地址: 北京市朝阳区东兴路7号, 邮政编码: 100027。可在当地邮局订阅, 也可与该刊发行部联系。地址: 广东省韶关市武江南路61号, 邮政编码: 512026。