

· 基础论著 ·

## 苦参类生物碱对 HBV 转基因小鼠 抗病毒作用的比较研究

王维伟 王江蓉 沈艳 宋乐冬 陈建杰

【摘要】 目的 比较研究肝炎灵、苦参素注射液和苦参素胶囊的抗乙型肝炎病毒(HBV)作用。方法 M-Tg HBV 转基因小鼠 38 只,随机分为 5 组,生理盐水组、拉米夫定组、苦参素胶囊组分别按  $20.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $123.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  予以灌胃;肝炎灵注射液组、苦参素注射液组分别按  $14.43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $82.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,予以腹腔注射,共 28 d;应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HBsAg、HBeAg 含量,应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测 HBV DNA 含量。结果 对 HBsAg 表达的抑制作用,生理盐水组与拉米夫定组间以及苦参素注射液与肝炎灵注射液组间比较没有统计学差异,  $P > 0.05$ ,其他各组之间均有显著性差异,  $P < 0.01$ ;对 HBeAg 的抑制作用,生理盐水与拉米夫定组间以及苦参素注射液组与苦参素胶囊组之间差异无统计学差异,  $P > 0.05$ ,其他各组之间比较均有显著性差异,  $P < 0.01$ ;各组之间对 HBV DNA 的抑制作用比较均有显著性差异,  $P < 0.01$ 。结论 肝炎灵注射液、苦参素注射液以及苦参素胶囊均有一定抗 HBV 作用,抗病毒能力由强到弱依次是肝炎灵注射液、苦参素注射液、苦参素胶囊。

【关键词】 乙型肝炎病毒;转基因小鼠

**Comparative study on antiviral action of Ganyanling injection, Kushensu injection and Kushensu capsule in HBV transgenic mice** WANG Wei-wei\*, WANG Jiang-rong, SHEN Yan, SONG Le-dong, CHEN Jian-jie. \*Department of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China  
Corresponding author: CHEN Jian-jie, Email: jianjie\_chen@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To comparatively study antiviral effects of Ganyanling injection, Kushensu injection and Kushensu capsule. **Methods** Thirty-eight M-Tg HBV transgenic mice were randomly divided into five groups. Physiologic saline group, lamivudine group, Kushensu capsule group were respectively intragastrically administrated at dosage of  $20.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $123.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  for 28 days;

基金项目:国家教委博士点基金资助

作者单位:200021 上海,上海中医药大学附属曙光医院肝病科(王维伟、宋乐冬、陈建杰);上海市公共卫生中心(王江蓉、沈艳)

通讯作者:陈建杰 Email: jianjie\_chen@hotmail.com

Ganyanling injection group and Kushensu injection group were respectively administrated at dosage of  $14.43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $82.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  by intraperitoneal injection for 28 days. The levels of HBsAg and HBeAg in the liver were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of HBV DNA in the liver were detected by a quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Results** In repression of HBsAg expression, no obvious change was seen in saline group-to-lamivudine group and Kushensu injection-to-Ganyanling injection ( $P > 0.05$ ); significant difference were seen between other groups ( $P < 0.01$ ). In repression of HBeAg, no obvious change was seen in saline group-to-lamivudine group and Kushensu injection-to-Kushensu capsule ( $P > 0.05$ ); Significant differences were seen between other groups ( $P < 0.01$ ). There was significant difference between each group in repression of HBV DNA. **Conclusions** Ganyanling injection and Kushensu injection and Kushensu capsule all exert definite repressive effects on the HBV. The powerful action is orderly Ganyanling injection, Kushensu injection, Kushensu capsule.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Transgenic mice

乙型肝炎病毒(HBV)感染具有明显的种属特异性,它只感染人和类人猿等高级灵长类动物,使乙型肝炎的研究一直缺乏理想的动物模型。HBV 转基因小鼠的问世,为乙型肝炎发病机制及其防治的深入研究开辟了崭新的途径,特别是为活体抗 HBV 药物疗效验证、评价、比较和筛选提供了较理想的动物模型。本研究以 HBV 转基因小鼠为研究对象,比较研究了常用苦参类生物碱如苦参素胶囊(Kushensu capsule)、苦参素注射液(Kushensu injection)、肝炎灵注射液(Ganyanling injection)的体内抗病毒作用。

## 材料与方法

### 一、动物、药物及试剂

M-Tg HBV(HBV ayw 3.2)转基因小鼠 38 只,雌雄各半,体重  $25 \sim 35 \text{ g}$ ,由上海公共卫生中心提供。肝炎灵注射液是江苏省常熟雷允上制药有限公司产品,批号 Z32020228;苦参素注射液由兰州大得利生物化学制药有限公司提供,批号:H62020894;苦参素胶囊购自江苏正大天晴药业有限公司,批号:H62020894;拉米夫定由上海迪赛诺公司提供。HBsAg 与 HBeAg 诊断试剂盒均为上海实业科华生物技术有限公司产品;Trizol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品;Taq 酶为日本 Takara 公司产品;引物由上海生工生物公司合成。引物序列如下:引物 1:5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3',引物 2:5'-AAGCCATACAATGGGGGAAAGC-3'。

### 二、实验方法

M-Tg HBV 转基因小鼠普通饲料喂养,自由进食一周后随机分为 5 组,其中生理盐水组 6 只;拉米夫定组、苦参素胶囊、苦参素注射液组、肝炎灵注射液组每

组各 8 只。生理盐水组、拉米夫定组、苦参素胶囊组分别按  $20.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $123.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  予以灌胃;肝炎灵注射液组、苦参素注射液组分别按  $14.43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $82.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  予以腹腔注射。于实验第 28 天后,取肝脏相同部位  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待测。

### 三、检测项目及方法

于实验第 28 d 后,将小鼠腹腔注射氯胺酮麻醉处死,取肝脏相同部位蛋白质裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂( $30 \text{ mM}$  Tris,  $\text{pH}$  7.5,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $1 \text{ mM}$  PMSF,  $1 \text{ mM}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $1\%$  Nonidet P-40,  $10\%$  甘油),在冰上放置 30 min,离心取上清液,BCA 法测定蛋白质含量,蛋白定量后  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。ELISA 检测时每孔加 5 mg 总蛋白,按试剂盒说明进行操作。Trizol 提取肝组织 DNA 并纯化后按以下程序进行扩增: $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,反复循环 35 次,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取  $10 \mu\text{l}$  扩增产物与  $2 \mu\text{l}$   $16 \times$  上样缓冲液混合后,在  $1.5\%$  的琼脂糖凝胶上电泳,柯达 UV-2000 紫外分析仪观察和扫描分析。

### 四、统计方法

采用 SPSS 13.0,随机区组的单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用最小显著差法(LSD)。若方差不齐则采用 Dunnett T3 方法进行两两比较。

## 结 果

### 一、各组 HBsAg 和 HBeAg 含量比较(见表 1)

与生理盐水组相比,肝炎灵注射液组、苦参素注射液及苦参素胶囊组 HBsAg 和 HBeAg 含量均显著降低,  $P < 0.01$ ,但是拉米夫定组与生理盐水组之间 HBsAg 和 HBeAg 含量差异无显著性,  $P > 0.05$ 。各药物降低 HBsAg 和 HBeAg 的能力分别是肝炎灵注射液组 > 苦参素注射液组 > 苦参素胶囊组 > 拉米夫定组。在降低 HBsAg 含量表达方面,肝炎灵注射液组与苦参素注射液组之间无显著性差异;对 HBeAg 的抑制苦参素注射液组与苦参素胶囊组间无显著性差异,其他各组之间差异均具有显著性。

### 二、各组 HBV DNA 表达变化(见表 2)

拉米夫定、苦参素胶囊、苦参素注射液与肝炎灵注射液均表现出不同程度的 HBV DNA 抑制作用,与生理盐水组相比具有显著性差异,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。各组之间比较均有显著性差异。各组对 HBV DNA 抑制能力由强到弱依次是:肝炎灵注射液组 > 苦参素注射液组 > 苦参素胶囊组 > 拉米夫定组。

## 讨 论

HBV 感染的狭窄的宿主范围一直困扰着 HBV 感染以及相关疾病的研究,建立较理想的 HBV 感染动物模型一直以来都是众多学者研究的热点。HBV 转基因小鼠的问世,为乙型肝炎发病机制及其防治的深入研究开辟了一条新的途径,应用于 HBV 感染的基础研究与抗 HBV 感染药物作用机制的研究,显示出良好的应用前景。

表 1 各组 HBsAg 和 HBeAg 表达变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HBsAg A 值	HBeAg A 值
生理盐水组	6	0.406 ± 0.040	0.339 ± 0.048
拉米夫定组	8	0.381 ± 0.047	0.337 ± 0.063
苦参素胶囊组	8	0.170 ± 0.016 <sup>*#</sup>	0.166 ± 0.022 <sup>*#</sup>
苦参素注射液组	8	0.143 ± 0.010 <sup>*#Δ</sup>	0.171 ± 0.023 <sup>*#</sup>
肝炎灵注射液组	8	0.120 ± 0.018 <sup>*#*</sup>	0.120 ± 0.032 <sup>*#Δ</sup>

注:与生理盐水组比较,\*  $P < 0.01$ ;与拉米夫定组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.01$ ;与苦参素胶囊组比较,<sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>\*</sup>  $P < 0.01$

表 2 各组 HBV DNA 表达变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HBV DNA
生理盐水组	6	0.650 ± 0.028
拉米夫定组	8	0.513 ± 0.063
苦参素胶囊组	8	0.223 ± 0.004 <sup>*#</sup>
苦参素注射液组	8	0.115 ± 0.088 <sup>*#Δ</sup>
肝炎灵注射液组	8	0.094 ± 0.006 <sup>*#Δ</sup>

注:与生理盐水组比较,\*  $P < 0.01$ ;与拉米夫定组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.01$ ;与苦参素胶囊组比较,<sup>Δ</sup>  $P < 0.01$

目前,临床对高病毒血症但肝功能正常的 HBV 携带者不主张治疗,但是不治疗并不等于不需要治疗,而是至今尚无满意的治疗方法<sup>[1]</sup>,因为有报道认为 HBV 载量是影响乙型肝炎预后的独立危险因素<sup>[2,3]</sup>,即使是 HBeAg 阴性且低病毒载量( $< 10\ 000$  拷贝/ml)的患者仍然有可能发展为严重的肝病,强调了获得最大限度的病毒抑制治疗的重要性<sup>[4,5]</sup>。虽然 HBV 转基因小鼠对转基因的表达产物处于免疫耐受状态,不发生免疫反应,但是并不妨碍其作为 HBV 病毒血症的携带者来研究药物的抗 HBV 作用。

目前肝病治疗领域中的两大类药物干扰素和核苷类似物对 HBV 携带者均无满意疗效,这就为中医药发挥作用提供了很好的空间。中医中药在病毒性肝炎的治疗领域中发挥着越来越不可替代的作用。临床上常用的苦参类生物碱(苦参素注射液、苦参素胶囊与肝炎灵注射液)均被证实具有抗乙型肝炎病毒作用,但其抗病毒能力与作用环节尚不甚清楚。拉米夫定是具有明确抗 HBV 作用的核苷类似物,已有研究证实拉米夫定可以抑制 HBV 转基因小鼠的 HBV DNA 复制<sup>[6]</sup>。本实验以拉米夫定为对照,比较研究苦参素注射液、肝炎灵注射液以及苦参素胶囊抑制 HBV 转基因小鼠基因复制与蛋白表达的作用。结果发现各个药物的抗病毒能力不尽相同,但是它们抑制基因复制能力与抑制蛋白表达能力相一致,由强到弱分别是肝炎灵注射液、苦参素注射液、苦参素胶囊、拉米夫定。拉米夫定是一种核苷类似物,是 RNA 逆转录酶的有效抑制剂,通过竞争性作用抑制了 HBV 病毒的复制,具有明确的抗 HBV 作用,本试验也发现拉米夫定组肝组织 HBV DNA 含量明显低于生理盐水组,但是还发现拉米夫定的抗病毒作用弱于其它药物组,分析其具体原因可能有以下两点:(1) 本试验中拉米夫定的用量是按照成人用量来换算的,小于文献报道中的用量,剂量不足可能是造成抗病毒能力降低的原因之一;(2) HBV 转基因小鼠免疫系统处于对 HBV 的耐受状态,没有肝组织的病理损伤,只是 HBV 携带者的良好模型,对于乙型肝炎携带者,拉米夫定难以取得



持续应答,可能导致 HBV DNA 下降不明显。苦参素注射液与苦参素胶囊主要成分相同,都是氧化苦参碱,临床应用已经发现两者具有一定的抗 HBV 作用,但是两者的抗病毒能力是否存在差异,相关报道甚少,本研究结果发现两者均可降低肝组织 HBV DNA,但是苦参素注射液的抗病毒能力强于苦参素胶囊,两者之间比较具有显著性差异,只是苦参素注射液用药不便,患者不易耐受,不利于临床长期用药。肝炎灵注射液是从山豆根的根茎中提取的有效成分,主要含有苦参碱,亦能使损伤的肝组织的变性和坏死程度减轻,促使肝细胞再生与修复,降低转氨酶<sup>[7]</sup>,并有一定的抑制 HBV 复制和增强免疫功能等作用<sup>[8]</sup>;本研究发现肝炎灵注射液组小鼠肝组织 HBV DNA 含量明显低于其他用药组,具有强大的抗 HBV 作用。本次试验结果说明苦参素注射液、苦参素胶囊与肝炎灵注射液均可以在基因水平抑制 HBV,进而抑制蛋白合成,他们的抗病毒能力由强到弱依次是肝炎灵注射液,苦参素注射液,苦参素胶囊,但是它们的作用机理尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 姚集鲁 主编. 传染病学临床专论. 广州:广东高等教育出版社,2000. 2.
- 2 Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. JAMA, 2006, 295: 65-73.
- 3 Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. Gastroenterology, 2006, 130: 678-686.
- 4 Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004, 2: 87-106.
- 5 Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Perez RM, et al. HBV DNA levels in HBsAg-positive blood donors and its relationship with liver histology. J Clin Gastroenterol, 2007, 41: 194-198.
- 6 Morrey JD, Bailey KW, Korba BE. Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. Antiviral Res, 1999, 2: 97-108.
- 7 文睿, 徐乾, 王坚. 肝炎灵复方丹参注射液穴位注射对 HBeAg 定量及 HBV DNA 影响的临床疗效观察. 中华实用中西医杂志, 2002, 15: 203-204.
- 8 陆群, 朱路佳, 薛洁. 肝炎灵对实验性慢性肝损伤的治疗作用. 苏州医学院学报, 2001, 5: 517-519.

(收稿日期: 2007-04-03)

(本文编辑: 李晓光)