

# 广州地区绿头鸭乙型肝炎病毒携带调查及其在抗 HBV 药物评价中的应用

张奉学\* 马霄行\* 冯劲立\* 李向阳\* 周红燕\* 董伯振\* 朱宇同\*

(\*广州中医药大学热带医学研究所病毒室,广东省广州市机场路,510405)

**摘要** 目的:建立先天性感染鸭乙型肝炎动物模型,筛选有效的抗乙肝病毒药物。方法:应用斑点分子杂交法(Dot Blot)对广州地区绿头鸭的乙肝病毒(DHBV)的自然感染率进行调查,并对先天性感染和后天性感染的鸭子 DHBV-DNA 水平进行比较分析。采用该模型评价了拉米夫定等的抗病毒效果,并用其筛选了中药成分。结果:广州地区绿头鸭 DHBV 的自然感染率中最高的是 A 孵化场的野水鸭,为 46.7%;先天性感染的绿头鸭 DHBV-DNA 水平明显较后天性感染的绿头鸭稳定、持久。核苷类药物在给药时均可不同程度抑制 DHBV,但在停药后均出现反跳,与临床应用治疗慢性乙型肝炎结果相似。叶下珠醇提物等显示了一定的抗病毒效果。结论:先天感染的绿头鸭是目前比较理想的乙型肝炎的动物模型。

**关键词** 乙型肝炎病毒绿头鸭/动物模型

## A Survey of *Anas Platyrhynchos* Linnaeus with Hepatitis B Virus in Guangzhou and Application in Evaluation of anti-HBV Drug

Zhang Fengxue, Ma Xiaoxing, Feng Jinli, et al.

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guang Dong 510405)

**Abstract Objective:** To establish a congenital hepatitis B model with ducks, and select effective anti-HBV drugs. **Methods:** A survey on natural infection rate was carried out among *Anas Platyrhynchos* Linnaeus in the area of Guang Zhou using Dot Blot, then a comparison of DHBV-DNA level was drawn between congenital and after -birth infected ducks. Anti-virus effect of several chemicals and Chinese material medical were also evaluated using the established model. **Results:** Hatching farm A had the highest natural infection rate at 46.7%, congenitally infected ducks had more stable and lasting level of DHBV-DNA than those infected after birth. Nucleoside drugs could inhibit that level to various extents upon medication; nevertheless, symptoms rebounded on withdrawal of drugs which resembled clinical treatment of hepatitis B. Extracts of *Phyllanthus urinaria* L showed good anti-virus effects. **Conclusions:** Congenitally infected *Anas Platyrhynchos* Linnaeus are ideal model for hepatitis B study.

**Key Words** *Anas platyrhynchos* linnaeus with hepatitis B virus/Animal model

鸭乙型肝炎病毒(DHBV)与人乙型肝炎病毒(HBV)同属嗜肝病毒,两类病毒大分子结构和复制过程有很多相似之处。用 DHBV 感染鸭作为乙型肝炎动物模型来研究乙型肝炎及与乙型肝炎相关的肝硬化和肝癌的发病机理、筛选抗 HBV 的有效治疗药物,是国内外学者所公认的理想实验动物模型。本文通过广州地区绿头鸭乙型肝炎病毒携带调查,建立先天性感染鸭乙型肝炎动物模型,从而探讨不同鸭种 DHBV 的感染率,及影响 DHBV 水平的因素,并采用该模型筛选抗乙肝病毒药物,包括成药、复方、单味药及其成分,现报告如下。

### 1 材料与方

1.1 动物绿头鸭品种的鉴定:我所曾用斑点分子杂交(Dot Blot)法对华南不同鸭种的 1 日龄雏鸭乙肝病毒垂直感染情况展开调查实验:发现华南绿头鸭的 DHBV 自然携带率较高,且持续带毒时间长,因此认为绿头鸭可能是较为理想的慢性乙肝感染动物模型。本研

究所述绿头鸭(*Anas Platyrhynchos* Linnaeus)又名青头鸭,属于野鸭。华南区内的绿头鸭于 1988 年从美国引进,是从野生鸭驯化选育而成,主要作为经济动物。初生绿头鸭重约 40g,头顶部、背部、尾、喙、蹼、爪均为黑色,余为黄色绒毛,黑色眉纹明显。成年公鸭头部和颈上部羽毛均为绿色,有金属光泽,颈下部有一圈白色环,前胸和背部羽毛棕灰色,缀有深褐色条斑,喙、脚、蹼为黄绿色,爪黑色,两翅的翼镜呈金属紫蓝色,腹部羽毛灰白色,臀部羽毛呈黑色;雌鸭全身羽毛浅褐色,缀有黑色细花纹,翼镜蓝绿色,其外观与雌麻鸭相似。被调查的绿头鸭经华南农业大学动物科学系鉴定,确认为绿头鸭。绿头鸭一般采用鱼塘塘基搭建棚舍方式饲养,鸭饲料为市售全价营养鸭饲料。肉鸭(青年鸭)一般饲养 30~40d 左右出售,种鸭需要饲养 150~180d 左右。因绿头鸭 2~3 个月可以飞翔,故种鸭棚安装尼龙网以防止其飞走<sup>[1]</sup>。

1.2 仪器和试剂:仪器:NC 膜,购自 Amersham 公司。

96孔杂交点样器,购自美国 Bio-rad 公司。盖革氏计数器,购自美国 S. E. International 公司。DG3022A 型酶联免疫析测仪(使用 490nm 波长滤片),购自南京华东电子管厂。

试剂: DHBV 质粒,由本室技术人员提取。缺口翻译盒,购自 promega 公司。a-<sup>32</sup>P-dCTP,购自北京亚辉生物有限公司。Sephadex G-50,购自 Pharmacia 公司。20 × SSC、甲酰胺、100 × Denhardt、10% SDS、10% 焦磷酸钠 ppi、变性鲑精 SSDNA 均购自华美生物工程公司。  
1.3 接种病毒途径及观察方法:上海鸭 DHBV 阳性传代血清。广州绿头鸭购回后,当天于胫静脉注射阳性病毒血清 0.2ml/只,于第 2 天、第 10 天分别于胫静脉采血(0.5ml/只),分离血清,用斑点杂交方法检测,第 15 天出结果。保留先天感染 DHBV 阳性鸭子,同时将先天和后天性感染的鸭子进行比较研究。

1.4 HBV-DNA 的试验和检测方法:取上述鸭血清,每批同时点膜,测定鸭血清中 DHBV-DNA 水平的变化,按缺口翻译试剂盒说明书方法,用 <sup>32</sup>P 标记 DHBV-DNA 探针,并作鸭血清斑点杂交(Dot Blot)实验。放射自显影后进行结果判断:X 线胶片上有斑点阴影者为阳性。DHBV-DNA 含量定量分析采用酶联免疫析测仪对放射自显影 X 胶片上斑点进行光谱吸光度(A)检测。

1.5 统计学处理:计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料比较采用方差分析。

2 实验结果

2.1 不同地区绿头鸭的 DHBV 自然感染率的比较:见表 1。在以往的研究中,已有很多文献报道各地区鸭种的自然感染率,其结果随地区和鸭种的不同而有很大的变化。本研究显示:孵化场 A、孵化场 B 和孵化场 C 的绿头鸭其自然感染率分别为 46.7%、35.4%、21%,其中孵化场 A 的野水鸭自然感染率较高,为 46.7%; $\chi^2$  为 34.4%。

2.2 先天性感染与后天性感染鸭子的带毒时间比较:见表 2。结果表明:先天性感染的广州绿头鸭血中病毒水平相对较高,第 27 天时下降到较低水平,到第 72

天还可以维持较高水平。而出生后第 1 天感染上海绿头鸭 DHBV 毒株的广州绿头鸭在第 10 天时血中开始出现低水平的 DHBV-DNA,第 15 天时达到高峰,之后逐渐下降,直到第 72 天时仍能维持低 DHBV-DNA 水平。从以上可以看出,二者虽同为乙型肝炎的动物模型,先天性感染的绿头鸭外周血中的 DHBV-DNA 水平较高,波动不大,持续时间较长,适宜的给药时间也就相对较长,因此,作为鸭乙肝模型筛选药物,先天性感染的鸭子明显优于后天性感染的鸭子。

表 1 不同地区绿头鸭的 DHBV 自然感染率的比较

鸭子产地	孵化场 A	孵化场 B	孵化场 C
阳性数	56/120	39/110	21/100
自然感染率	46.7%	35.4%	21%

表 2 DHBV-DNA OD<sub>490</sub>值( $\bar{x} \pm s$ )

采血时间	组别	
	先天性感染鸭(7 只)	后天性感染鸭(13 只)
D <sub>0</sub>	0.88 ± 0.39	0
D <sub>5</sub>	0.98 ± 0.36	0
D <sub>10</sub>	0.52 ± 0.31	0.63 ± 0.12
D <sub>15</sub>	0.73 ± 0.46	0.60 ± 0.43
D <sub>20</sub>	1.60 ± 0.31	0.38 ± 0.21
D <sub>23</sub>	1.50 ± 0.38	0.30 ± 0.23
D <sub>25</sub>	0.66 ± 0.18	0.18 ± 0.15
D <sub>27</sub>	0.48 ± 0.26	0.24 ± 0.40
D <sub>29</sub>	0.79 ± 0.11	0.10 ± 0.14
D <sub>33</sub>	0.67 ± 0.16	0.08 ± 0.12
D <sub>40</sub>	0.85 ± 0.04	0.06 ± 0.11
D <sub>52</sub>	0.86 ± 0.15	0.10 ± 0.11
D <sub>62</sub>	0.68 ± 0.06	0.05 ± 0.02
D <sub>72</sub>	0.40 ± 0.36	0.19 ± 0.32

2.3 几种核苷酸类化合物对 DHBV 的抑制作用:药物及分组:(1)拉米夫定(3TC):葛兰素史克制药(苏州)有限公司生产,产品批号:03100009。(2)阿昔洛韦(ACV):湖北省医药工业研究所生产,为白色粉末状原料药,批号 980207。(3)更昔洛韦(GCV):由丽珠-科益制药集团赠送。以上药物除更昔洛韦腹腔注射给药外,其余均为灌胃给药。39 只绿头鸭,分为 5 组,分别为病毒对照组、ACV100mg/kg 组、3TC10mg/kg

表 3 核苷类化合物在先天性感染 DHBV 的广州绿头鸭体内对 DHBV-DNA 的抑制作用

组名	剂量	鸭数	T <sub>0</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>10</sub>	P <sub>3</sub>
病毒对照组	-	9	1.79 ± 0.83	2.38 ± 0.58	1.23 ± 0.66	1.27 ± 0.58
ACV 组	100mg/kg	8	1.25 ± 0.88	0.44 ± 0.32 * $\Delta\Delta$	0.07 ± 0.05 * $\Delta\Delta$	0.80 ± 0.78
3TC 组	10mg/kg	8	1.56 ± 1.00	1.08 ± 0.75 $\Delta\Delta$	0.22 ± 0.15 * $\Delta\Delta$	0.57 ± 0.24 * $\Delta\Delta$
3TC 组	20mg/kg	8	0.76 ± 0.54	0.17 ± 0.15 **	0.16 ± 0.20 * $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.19 $\Delta\Delta$
GCV 组	2mg/kg	6	2.42 ± 0.01	1.69 ± 0.68 *	0.70 ± 0.25 * $\Delta$	2.43 ± 0.00

注:药物组给药不同时间与给药前(T<sub>0</sub>)比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;药物组与对照组相同时间比较, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$

表4 中药在先天性感染 DHBV 的广州绿头鸭体内对 DHBV-DNA 的抑制作用

组名	剂量	鸭数	T <sub>0</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>10</sub>	P <sub>3</sub>
病毒对照组	-	8	1.41 ± 0.79	1.78 ± 0.87	1.81 ± 0.93	1.58 ± 0.74
槐花水提物组	20g/kg	7	1.79 ± 0.92	1.07 ± 0.91	0.73 ± 0.45 <sup>△</sup>	1.29 ± 0.93
黄芩苷组	200mg/kg	8	1.55 ± 0.80	1.20 ± 1.01	1.12 ± 0.95	1.33 ± 0.86
叶下珠醇提组	10g/kg	8	2.43 ± 0.30	1.42 ± 0.95 <sup>*</sup>	1.75 ± 0.78 <sup>*</sup>	1.46 ± 0.69 <sup>**</sup>

注:药物组给药不同时间与给药前(T<sub>0</sub>)比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 药物组与对照组相同时间比较, △P < 0.05, △△P < 0.01

组, 3TC20mg/kg 组和 GCV2mg/kg 组。表3 结果表明, 以上所有核苷类药物在给药时均可不同程度抑制 DHBV, 但在停药后均出现了反跳。

2.4 几种中药对 DHBV 的抑制作用: 药物的配制: (给药时每只鸭子重约 130g), 以下中药均购自广州中医药大学第一附属医院药房, 所有制剂均由本所技术人员自行提取, 按所需浓度配制而成。以下所有药物均为灌胃给药。从表4 结果表明, 以上中药中, 叶下珠醇提物可以降低 DHBV-DNA 水平, 且在停药后没有出现反跳, 充分显示了中药在抑制 DHBV 上独特的优势。

### 3 讨论

世界上有 12 个国家、美国有 26 个研究机构采用鸭乙型肝炎模型进行实验研究, 我国肝炎新药申报也要求必须用鸭乙型肝炎模型进行体内评价。鸭种根据各国具体情况而不同, 国外多用先天感染的北京雏鸭或康贝鸭作为乙型肝炎的动物模型; 而国内目前选用后天感染的北京鸭作为肝炎的动物模型, 这使筛选有效的治疗药物时存在着很大的局限性。为此, 我们对先天性感染 DHBV 的广州绿头鸭进行了研究。

DHBV 与 HBV 同属于嗜肝病毒, 两者核苷酸序列同源性约为 40%。垂直传播是 DHBV 的主要传播途径, 其自然感染率随地理分布及鸭种的不同而有差异。本研究结果表明, 广州地区绿头鸭 DHBV 自然感染率最高的是 A 孵化场的野水鸭, 为 46.7%, 最低的则为 C 孵化场, 仅有 21%。由于先天性感染与后天性感染鸭子的带毒时间长短不同, 其稳定性也不同, 决定了先天性感染绿头鸭在筛选有效的治疗乙肝药物时的优越

性和可靠性。近年研究发现在体内或体外对嗜肝 DNA 病毒复制有抑制作用的药物大致分为脱氧鸟嘌呤核苷类似物, 如阿昔洛韦 (acyclovir ACV)、更昔洛韦 (ganciclovir GCV)<sup>[2]</sup>、泛昔洛韦 (famciclovir FCV)<sup>[3]</sup> 等; 和脱氧胞嘧啶核苷类似物, 如拉米夫定 (3TC)。我们应用先天性感染的广州绿头鸭进行阿昔洛韦、拉米夫定、更昔洛韦的抗病毒作用的观察, 为治疗肝炎患者提供临床前研究资料。实验研究表明: 阿昔洛韦、拉米夫定、更昔洛韦这三种核苷类药物用药后能使血清中 DHBV-DNA 含量总体水平显著降低, 但停药 3 天后均出现不同程度的反跳。同时我们运用鸭乙型肝炎模型筛选抗病毒中药, 结果显示, 有几类中药可以有效抑制 DHBV 复制, 降低 DHBV-DNA 水平, 且停药后无反跳, 如叶下珠醇提物等。

先天性感染绿头鸭由于带毒时间较后天感染绿头鸭长, 且 DHBV-DNA 水平较之稳定, 因而用于抗乙型肝炎药物的筛选可靠性更强。中药在抗乙型肝炎病毒方面也显示其独特的优势, 这有待于我们去更加深入地研究。

### 参考文献

- 1 邹移海, 张薇, 张奉学, 等. 广东省绿头鸭场鸭乙型肝炎自然携带状况调查. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(1): 9~14.
- 2 Luscombe C, Pedersen J, Uren E, et al. Long-term ganciclovir chemotherapy for congenital duck hepatitis B virus infection in vivo effect on intrahepatic viral DNA, RNA, and protein expression. Hepatology, 1996, 24: 766~773.
- 3 Tsiquaye KN, Sutton D, Maung M, et al. Antiviral activities and pharmacokinetics of penciclovir and famciclovir in Pekin ducks chronically infected with duck hepatitis B virus. Antiviral Chemistry Chemother. 1996, 7: 153~159.

(2007-01-04 收稿)

## 投稿须知: 关于数字

数字执行中华人民共和国国家标准 GB/T 15835/1995《出版物上数字用法的规定》。

时间: 公历世纪、年代、年、月、日和时, 必须用阿拉伯数字。年份用 4 位数表示, 如 1994 年不宜写成 94 年。避免用时间代词, 如“今年”, “去年”等。时间小时用“h”表示, 分钟用“min”表示, 秒用“s”表示。

数字范围的表示形式: 表示范围用“~”不用“-”。5 至 10 应为 5~10; 5 万至 10 万应为 5 万~10 万, 不能写成 5~10 万;  $3 \times 10^3$  至  $5 \times 10^3$  应为  $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ , 或  $(3 \sim 5) \times 10^3$ , 不能写成  $3 \sim 5 \times 10^3$ ; 60% 至 70% 应写为 60%~70%, 不能写成 60~70%; 60mg 至 70mg 应写为 60~70mg, 不能写成 60mg~70mg;  $25.5 \pm 0.5$  摄氏温度应写为  $(25.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$

长度单位的数值表示方法: 每个数值后的单位不能省略。如 40mm × 20mm × 30mm, 不能写成 40 × 20 × 30mm, 也不能写成 40 × 20 × 30mm<sup>3</sup>。