

中药安体维康治疗慢性乙型肝炎临床和实验研究

徐向田¹ 李玉英¹ 傅希贤²

(基金项目: 国家科技部创新基金资助项目, 编号: 01C26213700154;

1 山东医学高等专科学校, 山东省临沂市青年路 39 号, 276002; 2 北京大学第一医院)

摘要 目的: 本研究以中药安体维康(Antivirus Compound, ATVC)进行抗乙型肝炎病毒(HBV)的体外实验和治疗慢性乙型肝炎临床研究。方法: 体外实验以 HBV-DNA 转染细胞系(2.2.15 细胞株)为模型。临床治疗慢性乙型肝炎 60 例, 对照组 57 例, 观察治疗 3 个月和 6 个月时 HBV 的复制指标阴转率。结果: 体外实验发现 ATVC 对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)的治疗指数分别为 31.75 和 36.27; 对 HBV-DNA 及其复制中间体成剂量依赖性抑制。临床研究发现 ATVC 对慢性乙型肝炎治疗组 HBeAg 和 HBV-DNA 的转阴率分别为 47.8% 和 54.9%; 均高于对照组($P < 0.05$)。治疗 3 个月和 6 个月时的疗效相似。结论: 研究表明, ATVC 对 HBV 不论在体内或体外均有明显抑制作用。临床治疗慢性乙型肝炎疗效较好。

关键词 乙型肝炎病毒, 慢性乙型肝炎/中医药疗法; @ 安体维康

Clinical and Experimental Study of Treating Chronic HBV with Antivirus Compound

Xu Xiangtian, Li Yuying, Fu Xixian

(Funded by Innovation Foundation of the Ministry of Science and Technology, No. 01C26213700154 Shandong Medical College, Linyi 276002)

Abstract **Objective:** The Chinese medicinal known as Antivirus (ATVC) Compound was studied for HBV-fighting action by vitro experiment and clinical research. **Method:** HBV-DNA transfected cell line(2.2.15 cell strain) were used in vitro experiment. Clinically chronic HBV group(60 cases) and control group(57 cases) were observed for negative conversion rates after three, six month of treatment. **Result:** therapeutic indexes of ATVC on HBsAg and HBeAg were respectively 31.75 and 36.27; and ATVC inhibited HBV-DNA in a dose-dependent manner. Negative conversion rates of HBeAg and HBV-DNA in chronic HBV group were 47.8% and 54.9%, higher than those of the control group ($P < 0.05$). There were little difference between three and six months of treatment. **Conclusion:** as the research suggested, ATVC apparently inhibit HBV both in vitro and in vivo, and proved satisfying therapeutic effects.

Key Words Hepatitis B Virus(HBV), Chronic Hepatitis B/Chinese medical therapy; @ Antivirus Compound

中药安体维康(Antivirus Compound, ATVC, 又名华蟾益肝胶囊, 国家药监局临床批号: 2006L01147)是一种复方中药制剂, 由蟾皮、虎杖、白术等组方。主要成分有华蟾素、葱醌苷、苍术酮等, 已知华蟾素、葱醌苷、苍术酮等, 均有抗乙肝病毒的作用^[1-5]。也有人报道用含有虎杖、丹参、白术、甘草等中草药抗乙肝病毒或治疗乙肝获效^[6-8]。本研究用 ATVC 进行体外抗乙型肝炎病毒(HBV)试验, 并进行了临床对照观察和作用机理探讨, 为筛选乙型肝炎治疗新药提供依据。

1 材料和方法

1.1 体外试验: (1)实验细胞: 2.2.15 细胞是将 HBV-DNA 转染人类肝癌细胞株 HepG2 所建的细胞株, 由美国 Mountain Sinal Medical Center 提供, 采用 MEM 培养液置于 37℃, 5% CO₂, 95% 湿度孵箱中培养^[9]。(2)药物: ATVC 醇提液, 由临沂医专肝病研究所实验药厂提供(批号 950308)。量取药物 0.2 μm 滤膜过滤菌, 置于 4℃ 冰箱备用, 使用时完全 MEM 配成所需浓度。(3)实验仪器: CO₂ 孵育箱 (Forma Scientific 364, USA)、倒置显微镜 (Olympus Ck2, Japan)、酶标自动阅读仪

(Bic-Rad450, USA) 等。(4)实验方法: 细胞培养 48h 后用含有不同浓度的药物培养液, 12 天后测定 HBsAg、HBeAg 效价并提取细胞内 DNA。用经 Hind III 酶切后 HBV-DNA 进行 Southern 转膜杂交测定 ATVC 抑制 HBV-DNA 效果^[10]。

1.2 临床对照试验: (1)病例选择: 所选病例均为 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 阳性, 病程超过 6 个月者。孕妇或严重慢性病患者不选入。慢性 HBV 携带者和慢性乙型肝炎的诊断按 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会病毒性肝炎防治方案中的标准确定^[11]。(2)研究设计: 采用随机配对分组方法, 纳入研究者慢性乙型肝炎治疗组 60 例, 对照组 57 例。(3)给药方法: 治疗组给予安体维康胶囊 4 粒(每粒 0.3g, 批号 970408, 980217), 每日 3 次饭后服用。用药 3 或 6 个月。两组均用甘利欣 40ml/d, 静滴至丙氨酸转移酶(ALT)正常, 水飞蓟素 77mg, 每日 3 次饭后服用, 用药 3 或 6 个月。(4)HBeAg、HBV-DNA 和肝功能的检测: HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 的标志物检测采用酶联免疫吸附试验(ELSA)方法测定。

HBV-DNA 采用 PCR 仪测定,血清 ALT,肝胆 B 超等项目,于治疗前和治疗 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月时各检测 1 次。(5)抗 HBV 疗效判断标准:显效:HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 3 项于治疗后转阴;ALT 正常。有效:除 HBsAg 未转阴外,HBeAg、HBV-DNA 转阴;ALT 正常。无效:未达到上述标准者。另外,计算 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 各项转阴率。(6)统计分析:计量资料(均数)显著性检验采用 U(n>100 时)、Z(n=25~100 时)和 T(n<25 时)检测。计数资料采用 χ^2 检验或 U 检验。

2 结果

2.1 体外试验

2.1.1 ATVC 对 HBsAg、HBeAg 的抑制效果:本实验结果显示:药物对 HBsAg 及 HBeAg 的抑制作用与药物浓度呈正相关。其 ID₅₀HBsAg 为 0.08mg/ml, ID₅₀HBeAg 为 0.07mg/ml。安体维康对 HBsAg 的治疗指数 TI = 2.54/0.08 = 31.75。对 HBeAg 的治疗指数 TI = 2.54/0.07 = 36.27。表明该药体外有良好的抗 HBV 作用(见表 1、表 2)。

2.1.2 ATVC 对细胞内 HBV-DNA 的抑制效果:DNA 经 HindⅢ酶切后进行 Southern 转杂交,可分辨出整合型 DNA,线状双 DNA 超螺旋 DNA 等区带。结果显示:药物对细胞内 HBV-DNA 及其复制中间体呈剂量依赖型抑制。当药物浓度为 4mg/ml 时,细胞内 HBV-DNA 几乎达到完全抑制。

表 1 第 1 次体外抗 HBV 实验结果

药物浓度(mg/ml)	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	ID ₅₀	CD ₅₀
HBsAg 抑制率	100	100	100	100	78.63	<0.4	
HBeAg 抑制率	100	100	87.18	100	66.67	<0.4	
细胞的存活率	25.63	19.38	36.88	71.88	99.38		2.54

表 2 第 2 次体外抗 HBV 实验结果

药物浓度(mg/ml)	0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	ID ₅₀
HBsAg 抑制率	100	100	100	78.1	22.4	0.08
HBeAg 抑制率	100	100	97.47	94.94	23.53	0.07
细胞的存活率	无细胞毒表现					

2.2 临床对照研究

2.2.1 ATVC 治疗慢性乙型肝炎:(1)两组慢性乙型肝炎用药 3 个月时 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 转阴率分别为 11.66%、53.33% 和 50%。HBeAg、HBV-DNA 转阴率治疗组显著高于对照组(P<0.01, P<0.05)(见表 3)。(2)两组用药治疗慢性乙型肝炎 6 个月时 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 转阴率分别为 12.20%、51% 和 50%。HBeAg、HBV-DNA 转阴率治疗组显著高于对照组(P<0.01, P<0.05)(见表 4)。(3)慢性乙

型肝炎的 ALT 在治疗 3 个月时治疗组 97% 复常;对照组 93.5% 复常,两组无差异(P>0.02);血清胆红素复常两组无差异。

表 3 两组慢性乙型肝炎用药 3 个月时 HBV 复制指标变化

	治疗组			对照组			P
	阳性	阴性	转阴率%	阳性	阴性	转阴率%	
HBsAg	60	7	11.66	57	4	7.02	>0.05
HBeAg	60	32	53.33	57	13	22.81	<0.01
HBV-DNA	16	8	50.00	15	3	33.33	<0.05

表 4 两组慢性乙型肝炎用药 6 个月时 HBV 复制指标变化

	治疗组			对照组			P
	阳性	阴性	转阴率%	阳性	阴性	转阴率%	
HBsAg	49	6	12.20	44	3	7	<0.5
HBeAg	49	25	51.00	44	10	23	<0.005
HBV-DNA	16	8	50.00	14	2	14	<0.05

2.2.2 ATVC 的副反应:(1)体外试验显示 2.2.15 细胞的存活率与药物浓度呈负相关,其 CD₅₀ 为 2.54mg/ml。(2)动物急性毒性试验小鼠口服 ATVC 1 日内最大耐受量为 528g 生药/kg,按公斤体重计算,此剂量是临床用量的 889 倍,观察 7 日内无任何毒副反应^[5]。(3)临床发现 3 例患者服药(每次 4 粒)3~5 日后有胃部不适,轻度恶心,减量至 3 粒后症状减轻。

3 讨论

评价治疗乙型肝炎药物的疗效常用方法是体外实验、鸭乙型肝炎动物试验和临床对照试验。体外实验如证实此药的 CD₅₀ 远大于 ID₅₀ 提示其体外有良好的抗 HBV 活性。2.2.15 细胞不仅能分泌高水平的病毒蛋白,其细胞内及培养上清液中还可检测到病毒复制中间体。根据 Southern 杂交所反映的各区带变化,可分析药物对病毒复制的影响,以推断药物可能的作用环节和部位^[9~10]。

本次体外实验证实,ATVC 能有效抑制细胞内 HBV-DNA 及其复制中间体,并呈剂量依赖型。在同等剂量下,药物对 HBeAg 的抑制较对 HBV-DNA 的抑制为佳。提示该药对病毒颗粒产生抑制不仅在转录前水平,可能对 mRNA 翻译及蛋白分泌等环节也有影响。

临床对照试验发现,ATVC 对慢性乙肝的 HBeAg 和 HBV-DNA 转阴有较好疗效,治疗组 HBeAg 和 HBV-DNA 转阴率在治疗 3 个月时即有较好的疗效,分别为 47.80% 和 54.9%,明显高于对照组的 22.81% 和 33.33%(P<0.05)。临床研究提示 ATVC 有抗 HBV 作用,对慢性乙型肝炎的疗效较好。

ATVC 在动物实验中发现,对四氯化碳和 D-半乳糖胺急性肝损伤均有保肝降酶作用。本次临床观察表明 ATVC 治疗慢性乙型肝炎时,治疗组 ALT 在治疗 3

个月时 97% 复常;对照组 93.5% 复常,两组无明显差异。分析原因与两组都应用了保肝药物有关。

ATVC 服用方便,但个别人口服后有胃部不适、轻度恶心的不良反应。这与其中的提取物对胃肠黏膜有刺激作用有关。减量或饭后即服可减轻不良反应。

体外实验和人体内用药均证实 ATVC 有抗 HBV 作用。其他研究发现,ATVC 有抗艾滋病毒作用,对 HIV-1(人类免疫缺陷病毒 I 型)复制的抑制率达 86.95%,治疗指数为 6^[12]。佐证了 ATVC 的抗 HBV 作用。另外的研究还发现,ATVC 有诱导肝癌细胞凋亡作用^[13-14]。它能抑制人肝癌的细胞株 BEL-7402 的生长并诱导其凋亡。这体现了中草药复方制剂的多靶向作用。

本研究表明,ATVC 在体内外均有抗 HBV 作用,在体外还有抗 HIV 和诱导肝癌细胞凋亡作用,临床应用对慢性乙型肝炎疗效较好,且副作用小,服用方便,是有希望的抗 HBV 和诱导肝癌细胞凋亡的复方中药。

参考文献

- 徐向田,邹鲁贤主编.病毒性肝炎综合防治,第 1 版,天津科技出版社,1992:122~152.
- 傅希贤,徐向田,范涛,等.华蟾素抗乙肝病毒体外实验研究.中华肝病杂志,1996,04:51.
- 巫善明,徐向田,徐伟民,等.华蟾素抗鸭乙型肝炎病毒实验研究.中华传染病杂志,1995,13(1):25~27.
- 徐向田等.华蟾素治疗慢性乙肝病毒携带者临床研究,中国中西医结合杂志,1993,13(8):437~438.
- 荆培荣,徐向田,王家爱,等.华蟾素治疗乙型肝炎的临床观察,山东医药,1992,(30):6~7.
- 梁水庭,巫山,林进令,等.软坚护肝片的护肝及抗乙肝病毒作用的实验研究,中医研究,1997;13(3):50~52.
- 万传贵,万明秀,瞿瑶.中药序贯疗法治疗 100 例无症状 HBsAg 携带者临床观察.中医杂志,1997,38(10):609~609.
- 陈洁,韩晓燕,张树贤,等.白丹转阴合剂治疗慢性乙型肝炎 130 例临床研究.河北中医,1997,19(1):21~23.
- 傅希贤,张国庆.用 2215 细胞株筛选抗乙肝病毒药物的研究.中华医学杂志,1992,72(10):612~613.
- Sells Ma et al. Production of hepa B Virus partieles in HepGz cells transfected with colind hepa B Virus DNA,Proc, natl Acad Sci USA,1987,84:1005.
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案.中华肝病杂志,2000,8:342~349.
- 徐向田,马建民,李玉兰,等.安体维康抗艾滋病毒实验研究和临床初步观察.中国中医药信息杂志,2003,(11):17~18.
- 马建民,徐向田,胡顺晓,等.安体维康诱导肝细胞凋亡实验研究及临床观察.浙江中西医结合杂志,2002,(4):15~16.
- 王春霞,徐向田.安体维康诱导肝癌细胞凋亡模型的建立.山东医药,1999,039(008):26~27.

(2007-04-27 收稿)

针刺方向和疗效的关系

徐国强*

(* 北京正德堂中西医结合门诊部中医科,100013)

关键词 针刺方向

笔者从事针灸工作已有十载,在临床实践中深深体会到治病疗效不仅与辨证论治、取穴、配穴正确有关,而且与针刺方向也有很大关系。正如《内经》中提到“刺之而气不至,无问其数,刺之而气至,乃去之,勿复针”。现介绍 3 个病例,说明气至病所之作用。

例 1:鲁某,男,40 岁,2003 年 9 月 17 日初诊。患者左侧面神经麻痹,已有 2 个月余,自述得病时经外院以针灸治疗近 2 个月,病情好转,唯眼及口角下垂不易恢复,后经人介绍来我处就诊。症见左眼外侧下垂,眼内侧闭不紧,口角下垂较明显,有漏水、漏气之现象,根据此情况,调整其穴位及针刺方向。取穴:四白透睛明,瞳子髎透丝竹空,地仓透颧髎,禾髎透迎香,隔日 1 次。经 5 次治疗后痊愈,彻底解决左侧面神经麻痹之苦。

按:通过该病例说明,在治疗面神经麻痹过程中,要按病情变化调整其穴位及针刺方向,不能一成不变,否则同样取穴,方向不同,取得的效果也不一样。

例 2:沈某,女,33 岁,2005 年 3 月 6 日初诊。右侧胸、胁部疼痛,呼吸、咳嗽时牵引痛,已有 3 日,经服止痛片、外敷膏药以及局部针刺,均未见效,来我科就诊。经检查局部无红肿,唯动

则痛甚,呼吸、咳嗽牵引痛。自述曾有扭伤史。取穴:支沟(同侧),孔最。针刺方向,向肘,得气要向上走,走向病处最好;再令患者做呼吸、咳嗽等动作,疼痛明显减轻,留针 30min,中间行针 2 次,起针后症情全除,临床告愈。

按:该患者经局部针刺未愈,由于局部针刺靠近肺脏,不宜深刺,得气较差,故收效不理想。乃用支沟、孔最二穴,并调整针刺方向,针感一定要传向患处,方能收到理想效果。

例 3:余某,女,57 岁,2007 年 4 月 23 日初诊。患者尿频、尿急、尿痛已有 3 日,刻下:尿频、尿急、尿痛,少腹胀痛,纳谷不香,舌质淡红,苔薄黄,脉弦数。查尿常规示:尿混,脓细胞(+++),蛋白少许,诊断:急性泌尿系统感染。证属湿热下注膀胱,使其气化不利。治拟清热利湿,通利膀胱。取穴:中极,足三里,三阴交。经 1 次治疗后,尿痛显减,尿急好转。继续采用此法治疗 5 次,临床告愈。

按:该患者取穴相同,采用一般针刺方法,不考虑针刺方向,则收到效果较差。于是,针刺中极穴方向朝下,针感要传至尿道口,三阴交针刺方向朝上,针感要沿大腿内侧放射至会阴部,这样才能起到及时效果。

(2007-08-20 收稿)