

实验研究

珍珠草乙肝舒康胶囊药效学研究

侯敏全¹ 魏红梅²

(1 西安交通大学医学院, 西安市雁塔西路 76 号, 710061; 2 陕西东科中医药研究所)

摘要 目的: 探讨珍珠草乙肝舒康胶囊抗 HBV 及保护肝细胞的药效学作用及其特点。方法: 通过体外 2.2.15 细胞株实验观察珍珠草乙肝舒康胶囊抑制 HBV 的效果, 建立大鼠 CCl₄ 慢性肝损伤模型, 分为空白对照组, CCl₄ 组, 乙肝宁组, 珍珠草乙肝舒康大、中、小剂量组, 检测各组生化及肝左叶病理学组织差异; 参照文献方法, 测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及小鼠血清溶血素含量, 观察珍珠草乙肝舒康对小鼠免疫功能的影响。结果: HBsAg, HBeAg 的最大抑制率为 76.47% (d7), 71.43% (d5), 且呈现 HBV 分泌、复制越是旺盛, 抑制作用越强的特点; 珍珠草乙肝舒康组与模型组相比, 肝功能明显改善, 肝组织结构破坏轻, 纤维组织增生程度轻, 与乙肝宁组相比, 各项指标变化略占优势; 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能增强, 羊红细胞致敏的小鼠血清溶血素含量提高, 显著优于空白对照组, 与阳性对照组盐酸左旋咪唑片相似。结论: 珍珠草乙肝舒康胶囊具有抗 HBV、保护肝细胞作用。

关键词 珍珠草乙肝舒康胶囊/药效学

Pharmacodynamic Research on HBV Recovery Capsule Prepared with Common Leafflower

Hou Minquan¹, Guo Hongmei²

(1 Medical College, Xi'an Jiaotong University, Add.: No. 76, Yanta West Road, Xi'an City, Shan'xi Province, Postal code: 710061; 2. Shaanxi Dongke Research Institute of Chinese Medicine)

Abstract Objective: to conduct a pharmacodynamic research into HBV recovery capsule prepared with Common Leafflower about its anti-HBV and protective effect of liver cells. **Methods:** anti-HBV effect was observed through in vitro experiment in 2.2.15 cell line. Rat model of chronic liver injury was established using CCl₄, and was divided to blank control group, CCl₄ group, Yigan Ning Group, and Leafflower high-dose group, middle-dose group and low-dose group. Each group was subject to biochemical examination and histological examination to pathological changes in left hepatic lobe; peritoneal macrophage phagocytosis and content of haemolysin were determined in mice to observe the capsule's effect on immune function. **Results:** maximum inhibition ratio of HBsAg and HBeAg were respectively 76.47% (d7) and 71.43% (d5), moreover, HBV secretion and replication correlated positively with inhibitive action. When compared with CCl₄ group, the leafflower group improved significantly in liver function, with less severe liver disorganization and fibroplasias; and was superior over various parameter value to Yigan Ning group. The leafflower group had similar effect as Levamisole, which was better than the blank control group; phagocytosis of peritoneal macrophage was reinforced, and content of haemolysin increased following sensitization induced by sheep red blood cell. **Conclusion:** HBV recovery capsule prepared with Common Leafflower had anti-HBV effect and protection of liver cells.

Key Words HBV Recovery Capsule Prepared with Common Leafflower/ Pharmacodynamics

1 实验材料

1.1 药物 珍珠草乙肝舒康胶囊由杨凌东科麦迪森制药有限公司生产, 批号: 070301。乙肝宁颗粒, 批号: 20080102。盐酸左旋咪唑片由山东仁和堂有限公司生产, 批号: 060902。

1.2 2.2.15 细胞 引自北京 302 医院病毒室。

1.3 动物 Wistar 大鼠及 ICR 种小鼠, 均由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 抑制 HBV 的体外 2.2.15 细胞株实验

2.1.1 2.2.15 细胞的培养 DMEM 中加入 380mg/LG₄₁₈, 15% 新生小牛血清, 2mmol/L 谷氨酰胺, 1% 青霉素, 1% 链霉素, 4.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.2~7.4, 37℃ 5% CO₂ 培养, 每隔 10d 传代 1 次。

2.1.2 药物对细胞的毒性作用试验 将 2.2.15 细胞按 (1×10^4)/mL 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 0.2mL, 次日用培养液将各种药物做系列 2 倍稀释 (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) 加入细胞孔, 每稀释度 5 孔, 每 4d 换相同浓度的相同药液, 设不加药物细胞对照, 每天观察记录结果。毒性判断标准为: 不加药物孔细胞无自然蜕变为 -, 加药物孔细胞被破坏 75%~100% 为 ++, 50%~74% 为 +, 25%~49% 为 ++, 1%~24% 为 +。按 Reed-Muench 法计算药物对细胞生长的半数毒性浓度 (TC₅₀)。

2.1.3 HBsAg, HBeAg 分泌和 HBV-DNA 复制规律试验 将 2.2.15 细胞按 (2×10^5)/mL 接种 24 孔细胞培养板, 1.2mL/孔, 共 10 孔, 收集培养液上清液 250μL/d, 培养液补足原量至第 13 天量, 培养上清 -30℃ 冻

存,最后集中按试剂盒说明书用 ELISA 法测定 HBsAg、HBeAg,用 PCR 法检测 HBV-DNA。

2.1.4 药物对 HbsAg 表达和 HBV-DNA 复制的抑制试验 将 2.2.15 细胞按 $(2 \times 10^5)/\text{mL}$ 接种 24 孔细胞培养板,1.2mL/孔,次日弃培养液。以不同药物对 2.2.15 细胞的最大无毒剂量为起始浓度,加入培养液稀释(系列 2 倍稀释)的不同浓度的不同药物,每浓度 6 孔,同时设不加药物对照,以后每天每孔取培养上清 250 μL ,补足原液, -30°C 冻存,集中用 ELISA 法检测 HBsAg、HBeAg,用 400nm 波测定 A 值;并计算药物对抗原的抑制率、半数有效浓度 (IC_{50})、治疗指数 (TI) 判断药物效果。用 PCR 法测定 HBV-DNA,结果表示方法为:以当天不加药物 2.2.15 细胞上清经 PCR 扩增 DNA 条带荧光强度为 ++,较之有减弱为 +,不出现条带为 -。药物对抗原的半数有效浓度 (IC_{50}):按 Reed-Muench 法计算;治疗指数 (TI) = $\text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$,以上实验均重复 1 次。

2.2 对慢性肝损伤 (CCl_4 模型) 的保护作用 取大鼠 60 只,除空白对照组 (10 只动物) 外,其余动物每 3d 皮下注射 10% 四氯化碳 (CCl_4) 0.5mL/100g 体重,连续注射 10 周,于第 5 周由尾静脉取血测定 ALT,根据其活力高低分层随机分为 5 组:四氯化碳模型组,乙肝宁组,珍珠草乙肝舒康大剂量组 (1.5g/kg)、中剂量组 (0.75g/kg)、小剂量组 (0.38g/kg),按 1mL/100g 体重给生理盐水或药,每天 1 次,灌胃,连续 5 周,末次用药或生理盐水 24h 后处死全部动物,取血标本做生化检查 (ALT, AST, 总蛋白/白蛋白) 并对结果均数进行方差分析 (F 检验, One Way ANOVA),取肝左叶做病理组织学检查 (HE 染色、Van Gieson 胶原纤维染色)。

2.3 珍珠草乙肝舒康对小鼠免疫功能影响的实验

取小鼠 60 只,随机分为 5 个组:空白对照组、阳性对照 (盐酸左旋咪唑片) 组、珍珠草乙肝舒康 3 个剂量组,按 0.2mL/10g 体重给生理盐水或药,每天 1 次,灌胃,按文献^[2]方法进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及小鼠血清溶血素含量测定实验,对吞噬百分率、吞噬指数及 HV50 的均数进行方差分析 (F 检验, One Way ANOVA)。

3 结果

3.1 对 2.2.15 细胞的毒性作用 珍珠草乙肝舒康胶囊、乙肝宁颗粒对 2.2.15 细胞的最大无毒剂量分别为 2.5mg/mL, 2.0mg/mL; 对 2.2.15 细胞的 TC_{50} 分别为 $(3.75 \pm 0.25)\text{mg/mL}$ 和 $(2.98 \pm 0.24)\text{mg/mL}$ 。

3.2 2.2.15 细胞的 HBsAg、HBeAg 分泌规律及 HBV-DNA 复制规律 2.2.15 细胞分别于第 2、3 天及第 1 天开始有 HBsAg、HBeAg 分泌及 HBV-DNA 复制,以后逐渐增加,于第 7 天达到高峰,然后逐渐减弱,持续到第 13 天。分泌、复制规律相似。

3.3 不同药物对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 及复制 HBV-DNA 的抑制作用 结果见表 1。作用较强时期的 IC_{50} (mg/mL) 为 HBsAg (d7) 0.48 ± 0.26 , HBeAg (d5) 0.47 ± 0.23 ; TI 为 HBsAg (d7) 7.81 ± 0.4 , HBeAg (d5) 7.98 ± 0.03 。抑制率 = $(2.2.15 \text{ 细胞孔 A 值} - \text{药物孔 A 值}) / (2.2.15 \text{ 细胞孔 A 值} - \text{阴性血清对照 A 值}) \times 100\%$ 。

3.4 对 ALT、AST 活力及白蛋白/球蛋白比值作用 珍珠草乙肝舒康胶囊各剂量组与模型组比较,能使 ALT 及 AST 活力明显降低,并提高白蛋白与球蛋白比值;炎症、肝细胞浊肿及疏松化、肝细胞变形坏死 (脂

表 1 不同浓度不同药物对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 及复制 HBV-DNA 的抑制作用

时间 (d)	药物	HBsAg 抑制率 (%)				HBeAg 抑制率 (%)				HBV-DNA 条带荧光强度			
		2.0	1.0	0.5	0.25	2.0	1.0	0.5	0.25	2.0	1.0	0.5	0.25
1	珍珠草乙肝舒康	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++
	乙肝宁	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++
3	珍珠草乙肝舒康	61.53	53.85	53.85	46.15	63.63	63.63	63.63	45.45	+	+	++	++
	乙肝宁	23.08	15.38	15.38	7.06	45.45	63.63	27.27	18.18	++	++	++	++
5	珍珠草乙肝舒康	73.91	73.91	65.21	34.78	71.43	27.27	61.90	61.90	+	+	+	++
	乙肝宁	34.78	34.78	26.05	30.43	42.86	39.10	33.30	28.57	+	+	+	++
7	珍珠草乙肝舒康	76.47	76.47	70.59	38.24	63.67	63.67	59.10	54.55	-	-	+	++
	乙肝宁	52.49	47.06	44.12	32.35	40.90	40.90	31.82	27.27	-	+	+	++
9	珍珠草乙肝舒康	64.00	52.00	48.00	12.00	46.15	30.80	30.80	30.80	+	+	+	++
	乙肝宁	24.00	20.00	20.00	8.00	15.38	7.69	7.69	7.69	+	++	++	++
11	珍珠草乙肝舒康	30.00	10.00	10.00	5.00	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++
	乙肝宁	5.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++
13	珍珠草乙肝舒康	12.50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++
	乙肝宁	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	++	++	++	++

表2 对 CCl₄ 所致慢性肝损伤大鼠 ALT、AST 活力及白蛋白/球蛋白比值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg d)	ALT(卡式 u)	AST(卡式 u)	A/G
空白对照	10	-	20.05	22.1	0.98
CCl ₄	10	-	72.00**	53.90**	0.82**
乙肝宁	10	9.0	45.95 ^{△△}	32.40 ^{□□}	0.93 ^{△△}
珍珠草乙肝舒康大剂量	10	1.5	39.80 ^{△△}	32.60 ^{□□}	0.94 ^{△△}
珍珠草乙肝舒康中剂量	10	0.75	40.20 ^{△△}	32.20 ^{□□}	0.99 ^{△△}
珍珠草乙肝舒康小剂量	10	0.38	42.40 ^{△△}	33.70 ^{□□}	0.90 [△]

注:与空白对照组比较,** $P < 0.001$,与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$,^{□□} $P < 0.0015$ 。

表3 对 CCl₄ 所致慢性肝损伤大鼠病理组织学改变的影响

不同等级病理改变的动物数(只)															
细胞胞浆疏松化				肝细胞脂肪化				肝细胞坏死				肝间质纤维增生			
0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
0	0	10	0	0	1	6	3	0	0	7	3	0	1	5	4
5	2	2	1	5	3	1	1	4	6	0	0	2	3	4	1
2	5	3	0	4	6	0	0	6	4	0	0	5	5	0	0
3	4	3	0	8	1	1	0	4	6	0	0	6	4	0	0
4	3	3	0	5	3	2	0	4	6	0	0	4	4	2	0

表4 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及血清溶血素含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	剂量(g/kg d)	吞噬百分率	吞噬指数	HC ₅₀
空白对照	12	-	28.90 ± 4.65	0.37 ± 0.06	98.05 ± 40.64
盐酸左旋咪唑片	12	0.04	50.20 ± 6.27**	0.63 ± 0.09**	168.03 ± 57.42**
珍珠草乙肝舒康大剂量	12	1.5	53.64 ± 6.42**	0.67 ± 0.08**	158.06 ± 52.48*
珍珠草乙肝舒康中剂量	12	0.75	47.20 ± 3.43**	0.57 ± 0.07**	152.66 ± 39.01*
珍珠草乙肝舒康小剂量	12	0.38	41.30 ± 3.89*	0.50 ± 0.07*	143.68 ± 26.19*

注:与空白对照组比较,** $P < 0.001$,* $P < 0.01$ 。

肪点、点灶状及碎屑状坏死等),肝间质纤维增生等形态学病理改变均较之轻,且有一定的量效关系,见表2、表3。

3.5 对巨噬细胞的吞噬功能 珍珠草乙肝舒康胶囊能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,对绵羊红细胞所致小鼠特异性抗体生成有明显增强作用。见表4。

4 结论

近来国外有学者利用体外细胞模型进一步阐述了叶下珠抗 HBV 的机制,并证实了其能降低 HBV 复制过程中 HBsAg mRNA 的水平。在我们的体外抗 HBV 实验中亦证实了以叶下珠(珍珠草)为主,配清热、解毒、祛湿、健脾的治疗肝病常用中药而成的珍珠草乙肝舒康胶囊具有较好的抑制 HBsAg、HBeAg 及 HBV-DNA 作用,分析动态结果可以看出有如下特征:1)均存在一个相似的药物作用曲线,即从开始用药到见到效果有个过程,需3~4d,较强的抑制 HBV 作用可维持3~5d,然后逐渐减弱、消失;2)对照本实验方法的 HBV 分泌与复制规律可以看出,在 HBV 分泌、复制越是旺盛的时期,药物对 HBV 的抑制作用表现得越强,

越能显示出药物的作用;3)药物的作用具有呈正比的量效关系,即药效强弱与剂量大小有一定的依赖关系。

从分层分组后的对照结果可以看出,珍珠草乙肝舒康胶囊使肝细胞得到有效的保护,肝损伤明显减轻,而同时病理显示肝纤维化的发生发展亦得到了阻止,中药的抗肝损伤、抗肝纤维化研究往往出现这种现象,2个免疫实验结果还看出珍珠草乙肝舒康胶囊具有调节小鼠的免疫机制、提高免疫能力的作用。上述实验说明珍珠草乙肝舒康胶囊在治疗慢性乙型肝炎中所发挥的抗肝纤维化作用,除了可能与抑制肝星状细胞的增生、活化及减少胶原蛋白合成有关外,与药物直接减轻肝损伤、保护肝细胞、调节机体免疫机能、直接影响结缔组织代谢等多条途径也有很大关系。

综上所述实验研究所述,本项实验研究证实了“珍珠草乙肝舒康胶囊”具有抑制 HBV、抗慢性肝损伤及调节机体免疫功能作用。另外,我们还发现珍珠草乙肝舒康胶囊的抗 HBV 作用的特点是 HBV 复制越明显越能反映药物抗 HBV 作用,作用越强。

(2008-11-10 收稿)