

# 新药肝龙胶囊对雏鸭体内鸭乙型肝炎病毒的抑制效果

杜一民<sup>1</sup>, 李树楠<sup>1</sup>, 陈鸿珊<sup>2</sup>, 李 壮<sup>2</sup>

(1.大理学院药学院, 云南大理 671000; 2.中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**[摘要]** 目的: 研究新药肝龙胶囊对鸭乙型肝炎病毒的体内抗病毒作用。方法: 以鸭乙型肝炎病毒(DHBV)静脉注射感染雏鸭为模型, 于感染第7天后分组灌喂肝龙(GL)胶囊浸膏0.5、1.5、3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>及生理盐水(对照组), 阳性对照组腹腔注射无环鸟苷(0.4g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)或磷羧基甲酸钠(0.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。给药每天2次, 连续10d。分别于给药前、给药后第5天、第10天和停药后第3天取血清, 采用斑点杂交方法检测不同时间鸭血清DHBV-DNA, 观察其动态变化, 以病毒抑制率为疗效指标。结果: 三次重复的结果表明, 与给予生理盐水的病毒对照组比较, 肝龙的三个不同剂量组均有不同程度的疗效, 且不同剂量组之间有一定的量效关系, 其中GL3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组疗效明显( $P < 0.01$ ), 与阳性对照组无环鸟苷或磷羧基甲酸钠组的疗效无显著性差异, 而且作用持续时间较长。结论: 肝龙(GL)胶囊可抑制DHBV感染雏鸭体内DHBV-DNA的复制。

**[关键词]** 肝龙胶囊; 鸭乙型肝炎病毒; 鸭乙肝动物模型

**[中图分类号]** R944.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-2345(2006)04-0006-03

## Experimental Research on Antiviral Activity of Ganlong Capsule Against Duck Hepatitis B Virus

DU Yi-ming<sup>1</sup>, LI Shu-nan<sup>1</sup>, CHENG Hong-shan<sup>2</sup>, LI Zhuang<sup>2</sup>

(1. Faculty of Pharmacy, DaLi University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Institution of Pharmacy and Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the antiviral activity of Ganlong capsule against duck Hepatitis B virus(DHBV) *in vivo*. **Methods:** The duck Hepatitis B model was made by injecting DHBV into the veins of one-day-old Beijing duck. In the seventh day after infected by DHBV, Ganlong capsule was given by intragastric administration for 10 days in group I (0.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), group II (1.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), group III (3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), bid, and detected the levels of DHBV-DNA in the duck blood sera obtained separately in the day before giving Ganlong capsule, the fifth day and tenth day after giving Ganlong capsule, and the third day after withdrawing Ganlong Capsule, by serum dot-blot hybridization. The trial was contrasted with acyclovor(ACV) or phosphonoformate(PFA). **Results:** The results of three time experiments showed that the levels of sera DHBV-DNA were decreased in the treatment groups of Ganlong, and had the relationship of dose-effect. The group III (3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) inhibited significantly ( $P < 0.01$ ) the serum DHBV-DNA, and after stopping the treatment for 6 days, serum DHBV-DNA level did not return significantly, and the inhibit effects were no different between with the treatment group of phosphonoformate(PFA) of acyclovor(ACV). **Conclusion:** These results suggested that Ganlong capsule markedly inhibited duck hepatitis virus replication *in vivo*.

**[Key words]** Ganlong capsule; Hepatitis B virus, duck; Animal hepatitis model

**[基金项目]** 国家计委95重点攻关项目(NO.96-20-09)

**[收稿日期]** 2005-12-02

**[作者简介]** 杜一民(1962-), 男, 广西武鸣人, 副教授, 主要从事药理学研究.

乙型肝炎感染率高、危害严重,目前仍缺乏理想的防治药物。大理学院研制的治疗乙肝的新药肝龙胶囊目前已经通过临床试验,正在申请试生产。该药提取自昆虫美洲大蠊(*Periplaneta Americana* L.),对实验性肝损伤有一定的保护作用<sup>[1]</sup>。现将其对雏鸭体内鸭乙型肝炎病毒的抑制效果研究结果报道如下。

## 1 实验材料

1.1 药物 肝龙胶囊由大理医学院药理教研室研制(批号930225),临用前将其浸膏干粉用生理盐水配成所需浓度;阳性对照药物无环鸟苷(ACV)粉剂由湖北医药工业研究院提供,磷羧基甲酸钠(PFA)粉剂由上海第十二制药厂提供,临用前均生理盐水配成所需浓度。

1.2 鸭乙型肝炎病毒 自然感染鸭乙型肝炎病毒的上海麻鸭血清,选用DHBV-DNA强阳性者(+++) -70℃保存备用。

1.3 动物 1日龄北京鸭,购自北京禽蛋养殖场。

1.4 主要试剂 DHBV-DNA探针:无隆自安徽庐江鸭DHBV全基因组(LJ76株)质粒,由中国医学科学院生物技术研究所提供, $\alpha$  <sup>32</sup>P-dCTP标记探针,购自北京福瑞生物技术工程公司;缺口翻译药盒购自普洛麦格公司(Promega Co.);Sephadex G50、Ficol1、PVP,购自瑞典Pharmacia公司;SDS为西德Merck公司产品;鱼精DNA、牛血清白蛋白为中国科学院生物物理所产品。硝酸纤维膜(0.45  $\mu$ m),美国MSI公司产品。

## 2 实验方法

2.1 鸭乙型肝炎病毒感染 孵出24h之内的北京鸭,经静脉注射上海麻鸭DHBV-DNA阳性鸭血清,每只0.2ml,在感染后7d取血,分离血清,-70℃保存待检。

2.2 药物治疗试验 感染DHBV 7d后雏鸭分组进行药物治疗试验,每组6~8只;GL口服给药,分I、II、III 3个剂量组,分别为0.5, 1.5, 3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,每日二次,连用10 d;同批实验设病毒对照组以生理盐

水代替药物;阳性药物对照组用ACV(0.4g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)或PFA(0.5g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>);各组分别在用药前(T<sub>0</sub>)、用药第5天(T<sub>5</sub>)、用药第10天(T<sub>10</sub>)和停药后第3天(P<sub>3</sub>),自鸭腿静脉取血,分离血清,-70℃保存待检。共进行3批试验,其中第三批实验观察GL的作用持续时间,并于停药后第8天再取血一次。

2.3 DHBV-DNA检测方法 取上述待检血清,每批各组样品同时点膜(30  $\mu$ l),测定鸭血清中DHBV-DNA水平参照文献<sup>[2]</sup>进行。按缺口翻译试剂盒说明方法,用<sup>32</sup>P标记DHBV-DNA探针,作鸭血清斑点杂交,放射自显影膜片斑点,用DG3022型酶标检测仪测定光密度值(OD值)( $\lambda$  =490nm),以杂交斑点OD值作为鸭血清DHBV-DNA水平值。

2.4 结果处理和统计分析 计算每组鸭不同时间血清DHBV-DNA OD490均值( $\bar{x} \pm s$ ),并将每组鸭用药后第5天、第10天和停药后第3天血清DHBV-DNA水平与给药前比较,计算每组鸭用药后不同时间和停药后血清DHBV-DNA的变化率——抑制或增长百分率(%)。

DHBV-DNA抑制率(I%) = [(给药前OD值 - 给药后OD值) / 给药前OD值] × 100%;

统计学采用SPSS10.0软件,采用成组t检验。将各给药组不同时间DHBV-DNA抑制率分别与病毒对照相同时间的同一指标比较,计算 $t_1$ 、 $P_1$ 值,以确定疗效。将各给药组不同时间DHBV-DNA抑制率分别与阳性药物对照相同时间的同一指标比较,计算 $t_2$ 、 $P_2$ 值,比较GL与阳性药物之间的药效差别。

## 3 结果

3.1 1日龄北京鸭感染DHBV后血清DHBV-DNA动态 三批实验结果,包括放射自显影斑点杂交照片和各组不同时间鸭血清DHBV-DNA抑制率(见表1),从实验结果可见,雏鸭感染DHBV后第7天血清DHBV-DNA均呈阳性,在整个实验过程中,病毒对照组鸭血清DHBV-DNA水平虽有一定程度的波动,但无显著性差异。说明数值差别为鸭个体差异所致自然波动。

表1 肝龙胶囊 (GL) 对DHBV感染雏鸭体内 DHBV-DNA的抑制作用

实验 批次	组别	鸭数 (只)	给药前OD值 ( $\bar{x} \pm s$ )	DHBV-DNA抑制率均值 (%)			
				T5	T10	P3	P6
I	病毒对照组	7	1.19±0.09	17.34	5.12	37.24	
	GL 0.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	7	1.25±0.12	3.77 <sup>**</sup>	57.50 <sup>**</sup>	53.64	
	GL 1.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	7	1.26±0.19	33.27	29.50 <sup>**</sup>	37.96	
	GL 3.0g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	7	1.26±0.16	25.48	61.75 <sup>**</sup>	69.52 <sup>**</sup>	
	PFA0.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	7	1.11±0.22	53.46 <sup>*</sup>	80.65 <sup>**</sup>	64.68 <sup>**</sup>	
II	病毒对照组	6	0.54±0.17	-12.49	30.94	12.40	
	GL 0.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	6	0.43±0.11	50.88 <sup>*</sup>	34.39	10.03	
	GL 1.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	6	0.48±0.12	54.25 <sup>**</sup>	46.99	25.39	
	GL 3.0g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	6	0.77±0.08	51.32 <sup>**</sup>	58.14	35.85	
	ACV 0.4g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	6	0.65±0.12	65.87 <sup>**</sup>	58.63 <sup>*</sup>	34.15 <sup>*</sup>	
III	病毒对照组	7	0.61±0.08	1.94	28.27	-13.65	19.47
	GL 0.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	8	0.87±0.08	38.94 <sup>**</sup>	30.60	38.81 <sup>**</sup>	27.35
	GL 1.5g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	8	0.70±0.07	45.71 <sup>**</sup>	37.94	32.19 <sup>**</sup>	19.63
	GL 3.0g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	8	0.63±0.16	69.33 <sup>**</sup>	71.12	66.78 <sup>**</sup>	58.88 <sup>**</sup>

统计学采用成组t检验。给药组治疗不同时间DHBV-DNA的抑制率分别与病毒对照组相应时间DHBV-DNA的抑制率比较：<sup>\*</sup>P<sub>1</sub><0.05, <sup>\*\*</sup>P<sub>1</sub><0.01; 阳性对照组不同时间DHBV-DNA的抑制率分别与GL各剂量组相应时间DHBV-DNA的抑制率比较：<sup>\*</sup>P<sub>2</sub><0.05, <sup>\*\*</sup>P<sub>2</sub><0.01。

3.2 阳性药磷羧基甲酸钠 (PFA) 和无环鸟苷 (ACV) 对DHBV感染鸭血清DHBV-DNA的影响结果见表1。PFA给药第5、10天和停药后第3天对鸭血清DHBV-DNA的抑制率分别为53.48%、80.85%和64.68%, ACV分别为85.78%、58.83%和34.15%。与病毒对照组比较均有显著性差异, 表明PFA和ACV作为抗DHBV阳性药作用是明显的。证明实验方法可靠。

3.3 肝龙在DHBV感染鸭体内对鸭血清DHBV-DNA的影响 GL大剂量组 (3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 给药后第10天鸭血清DHBV-DNA抑制率三批实验分别为61.75%、58.14%和71.12%, 接近阳性药对照组同一时间的抑制率。给药后不同时间鸭血清DHBV-DNA抑制率与病毒对照组比较, 第二、三批实验在T5时有非常显著性差异 (P<0.01); 第一、三批实验在T10时有非常显著性差异 (P<0.01); 并且在停药后 (P3或P6) 差异亦有显著性。提示肝龙大剂量组对鸭血清DHBV-DNA有明显的抑制作用。疗效显著, 并且作用持续时间较长。GL中、小剂量组三批实验在T5、T10时均显示对DHBV-DNA有明显的抑制作用, 但与大剂量组比较, 疗效仍有一定的差距。表明GL的

不同剂量组之间有一定的量效关系。

3.4 GL与阳性药PFA和ACV的效果比较 GL各剂量组与阳性药PFA和ACV组的DHBV-DNA抑制率比较, 除第一批实验的中、小剂量组分别在T5和T10明显低于PFA外, 第一批实验的大剂量组及第二、三批实验的各剂量组不同时间的抑制率与PFA或ACV比较, 差异均无统计学意义。

#### 4 讨论

美洲大蠊属于有翅亚纲外生翅类蜚蠊目, 俗称蟑螂。其生活环境肮脏, 能携带并传播50多种致病菌, 自身却不罹病。研究表明, 与许多其他昆虫一样, 蟑螂在长期的生存进化中形成了其独特、有效的防御机能和适应能力, 在外界物质的诱导下, 能迅速产生抑杀多种细菌、真菌、病毒及原虫, 甚至癌细胞的物质<sup>[3,4]</sup>。肝龙胶囊就是利用现代工艺从美洲大蠊中提取的一组有效成分。

鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 与人乙型肝炎病毒同属嗜肝病毒科, 其病毒复制及致病性十分相似。以鸭乙型肝炎动物模型评价抗乙肝病毒药物是一种较为有效而简便的方法, 已被作为筛选抗乙肝病毒新药必做的药效学方法。肝龙胶囊口服对鸭乙型肝炎病毒感染鸭血清DHBV-DNA抑制作用的研究, 三批实验结果表明: 肝龙0.5、1.5和3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组对鸭乙型肝炎病毒感染鸭血清DHBV-DNA均有明显的抑制作用, 尤以第III组 (3.0g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 效果最好, 与阳性药PFA和ACV接近。以上实验结果表明, 肝龙对实验性鸭乙型肝炎有一定的治疗效果, 且毒性很小, 值得进一步临床验证。

#### [参考文献]

- [1] 杜一民, 张华明, 方春生, 等. 肝龙浸膏对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 大理医学院学报, 1987, (1):4-6.
- [2] 陈渊卿, 顾建人, 蒋惠秋, 等. 斑点杂交实验直接检测血清中乙型肝炎病毒DNA[J]. 中华传染病学杂志, 1983, 1(2):63-65.
- [3] Motoyukis, Horomasa I, Tamony Y, et al. Induction of antibacterial activity in the haemolymph of the silkworm, Bombyx mori, by injection of formalin-treated Escherichia coli K-12 in the anterior and posterior body part of ligated larvae[J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 101(1/2):173-178.
- [4] 蓝江林, 吴珍泉. 美洲大蠊抗菌物质的诱导与提取[J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2004, 33(1):30-33.