

荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用

徐庆, 宋芸娟, 李丽亚, 侯巧燕

徐庆, 李丽亚, 侯巧燕, 桂林医学院药理教研室 广西壮族自治区桂林市 541004

宋芸娟, 广西药用植物园 广西壮族自治区南宁市 530023

徐庆, 男, 1956年生, 汉族, 山东省胶州市人, 1990年广西中医学院硕士, 教授, 主要从事抗病毒抗肿瘤天然药物研究。

广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能), No. 0330015-4C

通讯作者: 徐庆, 541004, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院药理教研室. xq5895801@163.com

电话: 0773-5895801

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Effect of total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn on duck hepatitis B virus

Qing Xu, Yun-Juan Song, Li-Ya Li, Qiao-Yan Hou

Qing Xu, Li-Ya Li, Qiao-Yan Hou, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yun-Juan Song, Medicinal Garden of Guangxi, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by the Science and Technology Plan of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0330015-4C

Correspondence to: Qing Xu, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xq5895801@163.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To study the anti-duck hepatitis B virus (DHBV) action of the total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn (TFL).

METHODS: Guilin ducklings with congenital infection of DHBV were used as the animal model. TFL was orally given to the ducks with the doses 2 g/(kg·d) and 1 g/(kg·d) for 15 days. The expression of DHBV DNA was detected by spot blot hybridization before and after TFL was given. The pathological changes of the duck liver were also examined by HE staining.

RESULTS: TFL at the dose of 2 g/(kg·d) can lower the level of serum DHBV DNA significantly (*vs* control group: 0.74 ± 0.42 *vs* 1.64 ± 0.68 , $P < 0.05$) 15 days after treatment. No marked necrosis was observed in the liver of high dose group (0/6), but 4 of 6 cases appeared obvious necrosis in control group after treatment. There was significant difference between them ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TFL can protect duck liver against inflammation by the inhibition of DHBV.

Key Words: Total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn; Anti-hepatitis B virus; Duck hepatitis B model

Xu Q, Song YJ, Li LY, Hou QY. Effect of total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn on duck hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2082-2085

摘要

目的: 研究荔枝核总黄酮(TFL)抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用。

方法: 采用桂林先天感染DHBV的麻鸭为动物模型, 荔枝核总黄酮灌胃给药, 2 g/(kg·d)与1 g/(kg·d), 共15 d, 斑点杂交法观察用药前与用药后(1、5、10、15 d)及停药后5 d血清中DHBV DNA表达, HE染色观察肝脏组织病理学变化。

结果: TFL 2 g/(kg·d)于用药后15 d血清DHBV DNA水平为 0.74 ± 0.42 , 与生理盐水对照组 1.64 ± 0.68 比较, 明显降低(*vs* 对照组, $P < 0.05$ (0/6)), 病理检查发现TFL大剂量组实验鸭肝细胞未发现明显的点灶坏死(0/6), 与生理盐水对照组(4/6)比较有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: TFL有抑制乙肝病毒的作用, 并具有明显的抗炎、保肝作用。

关键词: 荔枝核总黄酮; 抗乙肝病毒; 鸭乙肝模型

徐庆, 宋芸娟, 李丽亚, 侯巧燕. 荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2082-2085

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2082.asp>

0 引言

荔枝核是无患子科植物荔枝(*Litchi Chinensis* Sonn)的成熟种子。又名荔仁或荔枝核, 味甘、微苦, 归肝、肾经。功效行气散结、祛寒止痛。荔枝核的化学成份除含有皂甙、蒽质外, 还含有脂肪酸、聚合花色色素成份、氨基酸、挥发性成份、还原糖、淀粉及总糖、蛋白质, 及钙、磷、钠、钾、锌、铜、锰、铁、镉等元素^[1]。屠鹏飞 *et al*^[2]从700 mL/L乙醇荔枝核提取

物中首次分离、鉴定了13个化合物. 荔枝核具有降血糖、调血脂和抗氧化、保肝作用, 水提取物体外实验对HBsAg、HBV-DNA有明显的抑制作用^[3]. 杨燕^{et al}^[4,5]发现荔枝核提取物对HBsAg、HBeAg具有显著的抑制作用. 我们发现, 荔枝核提取物对HBsAg、HBeAg有明显的抑制作用与抑制HBV-DNA复制的作用^[6]. 肖柳英^{et al}报道荔枝核对小鼠免疫性肝炎有明显的保护作用与抗肿瘤作用^[7,8]. 我们采用先天感染DHBV的桂林麻鸭为模型, 研究了荔枝核总黄酮体内抗乙肝病毒的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 桂林市临桂县五通镇农贸市场5日龄麻鸭, 腿胫静脉采血, 血清应用PCR法检测先天感染DHBV的阳性雏鸭. DHBV质粒: 由广州中医药大学热带医学研究所技术人员自行提取. 缺口翻译试剂盒购自Promega公司. A-³²P-dCTP购自北京亚辉公司. NC膜购自Amersham公司. 96孔杂交点样器为美国Bio-Rad公司产品. 盖氏计数器由美国S. E. International公司生产. 酶联免疫检测仪由中国华东电子管厂生产. 荔枝核总黄酮(Total Flavone of *Litchi Chinensis* Sonn. TFL)经分光光度计法检测, 总黄酮含量为852 g/kg. 阳性药物拉米呋啶(LA)用无菌蒸馏水配成100 g/L.

1.2 方法 先天感染DHBV鸭24只, 随机分为4组, 每组6只: 阳性对照组(LA)、生理盐水对照组及TFL大、小剂量组. 阳性对照组给予配好的LA 100 mg/(kg·d), 生理盐水对照组给予生理盐水1 mL/(kg·d), TFL大剂量组给予药量为2 g/(kg·d), TFL小剂量组给予药量为1 g/(kg·d). 每天1次, 连续灌胃给药15 d. 在给药前1 d, 用药5 d, 用药10 d, 用药15 d, 停药后5 d, 自鸭腿胫静脉取血分离血清, -20℃冻存待检. DHBV-DNA的检测采用斑点杂交法^[9], 用地高辛标记探针将用药前后的血清统一对比检测, 以与探针同源的质粒DNA倍比稀释后点样于硝酸纤维薄膜上杂交显示的斑点颜色深浅为标准, 与待检测血清斑点杂交的斑点颜色深浅比较来半定量, 自动酶标仪检测数据后(A_{490nm}), 计算每组鸭用药后不同时间血清DHBV-DNA的抑制率, 将治疗组DHBV-DNA抑制率分别与对照组相同时间DHBV-DNA抑制率比较. 停药5 d将实验动物全部颈动脉放血处死, 立即摘取肝脏, 称肝湿重后取肝右叶组织一小块, 用中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片, HE染色, 光镜观察. 将各组鸭肝病理表现进行分级评分.

统计学处理 用PEMS 3.1对实验数据进行多因素的分差分析及Ridit分析.

2 结果

2.1 血清DHBV DNA 拉米呋啶100 mg/(kg·d)可明

显降低鸭血清的DHBV-DNA滴度, 与生理盐水对照组比较, T_5 时, $P<0.01$; T_{10} 时, $P<0.01$; T_{15} 时, $P<0.01$; 与同组给药前比较, T_5 时, $P<0.01$, T_{10} 时, $P<0.01$; T_{15} 时, $P<0.01$, 但是停药后很快出现反跳. TFL小剂量组不能降低鸭血清中DHBV-DNA滴度, TFL大剂量组可缓慢降低血清中DHBV-DNA滴度, 与同组给药前比较, T_5 时, $P<0.01$; T_{10} 时, $P<0.01$; 与生理盐水对照组比较, T_{15} 时, $P<0.05$, TFL大剂量组用药后不同时间血清DHBV-DNA的抑制率在 T_5 时是62.5%, T_{10} 时是46.2%, T_{15} 时是28.8%, P_5 时是22.1%; 与生理盐水对照组相同时间DHBV-DNA的抑制率在 T_{10} 时是49.5%, T_{15} 时是54.9%, P_5 时是22.1%. 实验期间生理盐水对照组 T_5 时DHBV-DNA滴度下降($P<0.05$), 但在 T_{10} 后回升(表1).

表1 药物TFL对DHBV-DNA的抑制作用 (mean \pm SD, A_{490nm})

分组	T_0	T_5	T_{10}	T_{15}	P_5
TFL小剂量	0.63 \pm 0.45	0.25 \pm 0.14 ^c	1.73 \pm 0.66	1.41 \pm 0.77	1.61 \pm 0.79
TFL大剂量	1.04 \pm 0.80	0.39 \pm 0.32 ^d	0.56 \pm 0.38 ^d	0.74 \pm 0.42 ^a	0.81 \pm 0.69
生理盐水	1.20 \pm 0.65	0.41 \pm 0.13 ^c	1.11 \pm 0.59	1.64 \pm 0.68	1.04 \pm 0.61
阳性对照	0.73 \pm 0.74	0.05 \pm 0.03 ^{bd}	0.06 \pm 0.04 ^{bd}	0.10 \pm 0.08 ^{bd}	0.86 \pm 0.72

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 生理盐水; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 给药前.

2.2 TFL对鸭肝病理的影响 各组实验鸭肝脏色泽均正常, 表面光滑, 质地柔软. 光镜下均可见肝细胞水肿、气球样变; 生理盐水对照组实验鸭肝细胞出现点状坏死和片状坏死, 但未见桥接坏死, 出现了轻度的纤维化和间质炎细胞浸润(图1A); 阳性对照组实验鸭肝细胞出现点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润(图1B), 但与生理盐水对照组比较不具有显著性差异($P>0.05$, 表2); TFL小剂量组实验鸭肝细胞出现轻度的点灶坏死, 比生理盐水对照组相比有一定的好转, 但不具有显著性差异($P>0.05$, 表2), 未见桥接坏死和纤维化, 但是间质炎细胞浸润的现象没有减轻(图1C). TFL大剂量组实验鸭肝细胞没有发现明显的点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润(图1D), 肝细胞变性改变明显减轻, 与生理盐水对照组比较具有显著性差异($P<0.05$, 表2).

表2 各组鸭肝病理学变化

分组	水肿				气球样变				间质炎细胞浸润				点灶坏死			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
生理盐水组	0	0	0	6	0	0	6	0	5	0	1	0	2	0	2	2
阳性对照组	0	0	1	5	0	0	6	0	3	0	3	0	2	0	3	1
TFL高剂量组	0	1	0	5	1	0	5	0	6	0	0	0	6 ^a	0	0	0
TFL低剂量组	0	2	0	4	2	0	4	0	3	0	3	0	4	0	1	1

^a $P<0.05$ vs 生理盐水组.

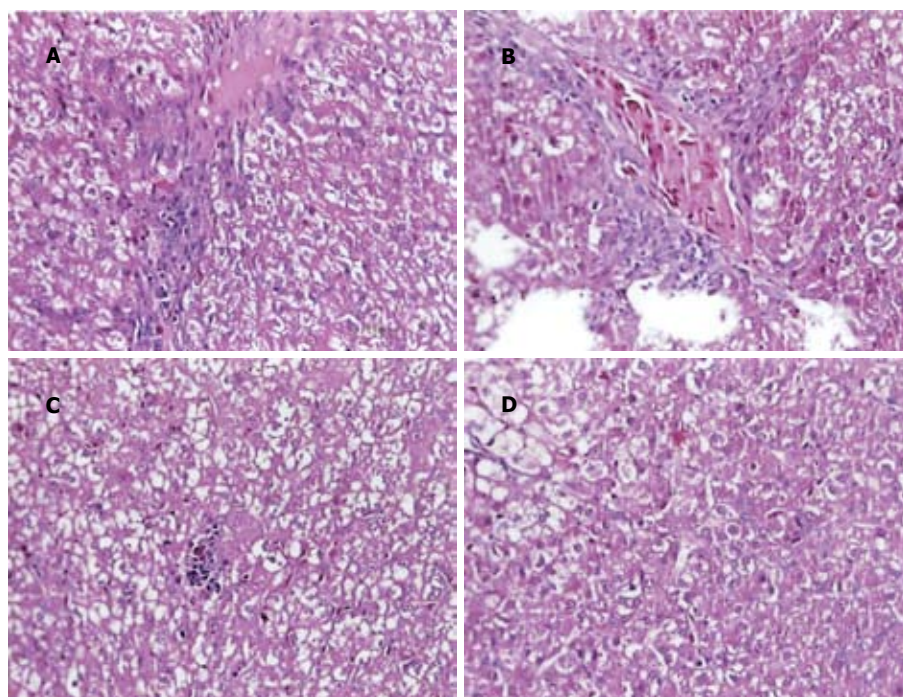


图1 TFL对鸭乙型肝炎病理检查结果. A: 生理盐水; B: 阳性对照; C: TFL小剂量; D: TFL大剂量.

3 讨论

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种严重的世界范围内危害人类健康的疾病,全世界大约有20亿人感染过HBV,在我国感染率高达10-20%,并有1亿多人是乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带者. HBV持续感染会导致肝硬化和原发性肝细胞肝癌等肝脏疾病^[10],虽然乙肝疫苗已经广泛使用,在一定范围内对乙型肝炎起到有效的预防,但存在有无应答和不良反应等问题,而且现有的抗病毒药物(如 α -干扰素、拉米呋啶、阿的福韦^[11]、泛昔洛韦^[12])的疗效仍然不能令人满意,因此寻找安全有效的抗HBV药物已成为当今医药学界一项迫切任务. 研究有效抗乙肝病毒药物的关键是寻求合适的病毒模型与建立合适的实验方法. 目前,药物抗乙型肝炎病毒的实验方法主要有:(1)利用中草药直接作用患者血清抑制HBV标志物^[13]. (2)利用体外细胞培养系筛选抗HBV的药物^[14]. (3)以噬肝DNA病毒感染动物模型评价中草药抗HBV的活性.

抗乙肝病毒药物体内实验可采用的动物包括对HBV敏感的黑猩猩、长臂猿、熊猴、树鼯、以及对WHBV敏感的土拨鼠、对DHBV敏感的北京鸭、麻鸭等^[15],黑猩猩、长臂猿稀少,价格昂贵,土拨鼠我国缺少,因此不宜用于抗乙肝病毒药物的筛选. DHBV属嗜肝DNA病毒科,其形态结构、核酸组成、生物学特性及发病机理等方面与HBV相似. 鸭对DHBV易感染,且来源丰富,价格低廉,易于饲养,是研究HBV分子生物学、发病机理及抗HBV药物最常用的动物模型,也是研究

乙型肝炎比较公认的模式^[16]. 国外多用先天感染的北京鸭雏鸭或康贝尔鸭作为乙型肝炎的动物模型,这种鸭带病毒时间长,在1 mo内病毒持续在较高的滴度,一个月末病毒颗粒仍能达到 $5.8 \times 10^{12}/L$,之后逐渐下降,可一直持续2 a^[17]. 国内目前选用后天感染的北京鸭为肝炎的动物模型,但是其存在带病毒时间短的缺点,而且毒种的收集和保存也有一定难度. 后天感染麻鸭适宜的给药时间为11-15 d,先天感染麻鸭一出生即可给药,适宜的持续给药时间较长为26 d,并且病毒血症波动较小. 由于其有DHBV先天免疫耐受,因此无免疫因素的影响,可直接观察药物对DHBV的抑制作用,其缺点是要获得大量先天性感染DHBV的雏鸭,国外许多学者都证实DHBV的主要传播途径为垂直传播,而雌鸭起的作用更大,一般鸭群中雏鸭自然感染DHBV率都不高^[18,19]. 因此,饲养DHBV感染的母鸭与公鸭及孵化所需费用很大,虽然野水鸭DHBV垂直感染率为80%,是较为理想的HBV动物模型,但其饲养条件要求高,来源困难,价格昂贵,不适宜大批量做药物筛选. 要解决这个问题,就必须找到自然感染DHBV率较高的鸭种并建立快速灵敏的检测方法. DHBV感染率有明显的种属及地区差异,湖南长沙麻鸭的DHBV自染携带病毒率24.19%^[20],广东广州麻鸭的DHBV自染携带病毒率28%,广州野水鸭,学名绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)系由美国初步驯化引进,据考证公认家鸭祖先为野生绿头鸭与斑嘴鸭演化而来,在绿头鸭检测中发现DHBV垂直感染率为80%^[21]. 桂林地区麻鸭DHBV的感染率据我们考察约为35%,为较合适的

先天感染鸭乙肝病毒的模型。

实验结果表明荔枝核总黄酮TFL大剂量组在用药期间有一定抑制DHBV-DNA的作用, 血清中HBV-DNA均较给药前(T_0)明显下降, 但抑制率在5 d最高, 达到62.5%, 10 d的抑制率是46.2%, 15 d的抑制率是28.8%, 停药5 d后的抑制率为22.1%, 有反跳的趋势, 但反跳的趋势不大, 荔枝核总黄酮TFL在用药期间具有一定的抑制乙肝病毒的作用。拉米呋啶有较强的抗病毒作用, 用药后病毒滴度下降迅速, 但停药后反跳严重, 病理检查证实拉米呋啶没有明显的保肝作用, TFL大剂量组用药后病毒滴度下降缓慢, 但病理检查发现TFL大剂量组实验鸭肝细胞未发现明显的点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润, 具有明显的肝组织病变减轻的现象(与生理盐水对照组比较具有显著性差异, $P < 0.05$), 肝细胞坏死特别是点灶坏死是判断肝组织炎症活动的重要指标, 这说明荔枝核总黄酮大剂量组有明显的抗炎、保肝作用, 使肝脏炎症反应减轻, 肝细胞受损情况好转。荔枝核总黄酮抗乙型肝炎作用的有效成份、作用机制、体内代谢过程、毒性、质控标准等还需要进一步的研究。荔枝作为广西特产, 资源极其丰富, 目前荔枝核仍为废弃物, 如能利用荔枝核的抗乙肝病毒作用研制出抗乙肝病毒新药, 对乙型肝炎的治疗及发展地方经济将具有重大的意义。

4 参考文献

- 1 郑琳颖, 韩超, 潘竞锵. 荔枝核的化学、药理和临床研究概况. 中医药学报 1998;5:51-53
- 2 屠鹏飞, 罗青, 郑俊华. 荔枝核的化学成分研究. 中草药 2002;33:300-303
- 3 潘竞锵, 郭洁文, 韩超, 刘惠纯. 荔枝核的药理实验研究. 中国新药杂志 2000;9:14-16
- 4 杨燕, 义祥辉, 陈全斌, 谭明雄. 荔枝核对HBsAg和HBeAg的体外抑制作用. 化工时刊 2001;7:24-26
- 5 徐庆, 陈全斌, 义祥辉, 陈重阳. 荔枝核提取物对HepG2.2.15细胞系HBsAg与HBeAg表达的影响. 中国医院药学杂志 2004;24:393-395
- 6 徐庆, 宋芸娟, 陈全斌, 义祥辉. 荔枝核黄酮类化合物对HepG2.2.15细胞系HBsAg与HBeAg表达及HBV-DNA含量的影响. 第四军医大学学报 2004;25:1862-1866
- 7 肖柳英, 潘竞锵, 饶卫农, 韩超, 肖丽珊. 荔枝核对小鼠免疫性肝炎的实验研究. 中国新医药 2004;3:7-8
- 8 肖柳英, 张丹, 冯昭明, 陈筠文, 张宏, 林培英. 荔枝核对小鼠抗肿瘤作用研究. 中药材 2004;27:517-518
- 9 杨书兰, 黄正昌, 朱辨弦, 张奉学, 郭兴伯, 朱宇同. 柴胡与小柴胡汤对鸭乙型肝炎治疗作用的研究. 广州中医药大学学报 2003;20:289-292
- 10 陈志强、董俊兴. 抗乙型肝炎病毒药物研究进展. 中国药理学杂志 2000;35:435-437
- 11 陈压西, 黄爱龙, 郭晖, 齐珍元. 阿的福韦在鸭乙型肝炎模型及2.2.15细胞中抗乙型肝炎病毒的药效研究. 重庆医科大学学报 2004;29:618-620
- 12 陈压西, 郭树华, 齐珍元, 张定凤. 泛昔洛韦体内抗鸭乙型肝炎病毒核酸的疗效研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:51
- 13 郑民实, 邱健辉. 使用ELISA技术检测中草药抗HBeAg的实验研究. 天然产物研究与开发 1995;7:10-14
- 14 郑浩杰, 刘国强. 利用2.2.15细胞株筛选抗乙肝病毒中草药的体外实验研究进展. 陕西中医学院学报 2003;26:61-63
- 15 Msaon WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J Virol 1980;36:829-836
- 16 邓学龙, 朱宇同, 方宏勋, 容秉培, 郭兴伯, 王新华, 刘妮, 符林春. 广州地区3个鸭种1日龄雏鸭垂直感染鸭乙肝病毒调查. 广东中医药大学学报 1997;14:274-275
- 17 谢青, 郭清, 周霞秋, 谷瑞瑛. 乳糖化清蛋白单磷酸阿糖腺苷的抗鸭乙型肝炎病毒作用. 世界华人消化杂志 1999;7:125-126
- 18 李虹, 陈文, 徐纬, 王平, 郭巨涛, 侯云德. 核酶对鸭乙型肝炎病毒感染体内抗病毒作用效果的观察. 中华实验和临床病毒学杂志 1998;12:118-121
- 19 莫小余, 李向阳, 潘宗奇, 朱宇同, 周红燕. 中药抗先天性华南绿头鸭乙肝病毒的实验研究. 中华医学研究杂志 2003;3:696-697
- 20 邹文, 杨旭. 长沙麻鸭携带鸭乙型肝炎病毒调查研究. 中国感染控制杂志 2003;2:168-169
- 21 夏瑾瑜, 李天望, 朱小红, 严春海, 李晓东. 补锌去铁对保肝康抗鸭乙肝病毒作用的实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:225-227

编辑 潘伯荣 审读 张海宁