

实验研究

中草药抑制 HBV-DNA 的实验研究

李 文*

主题词 脱氧核糖核苷酸类/代谢 中草药/治疗应用 肝炎病毒,乙型/药物作用

乙型肝炎病毒(HBV)引起的乙型肝炎有传染性强、流行面广和发病率高的特点。目前我国治疗乙型肝炎多用中药,临床上虽有一定疗效,但对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA)作用的报道甚少。笔者使用斑点杂交法对100种中草药与13种中西药制剂及复方进行了体外抑制HBV-DNA的实验研究,现将结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 药物:受试药来自国内各药物研究所(院)。称取生药10g,粉碎后加入适量无离子水煎煮3次,过滤除渣后配成100mg/ml药液,调至pH7.0,煮沸消毒30分钟,4℃保存。正式实验的终浓度为40mg。中西药制剂购自南昌市各大药店,复方按照资料^[1]配制。

1.2 病毒:收集HBV-DNA斑点杂交法的阳性乙型肝炎患者混合血清200份,倍比加入高渗(30%)蔗糖溶液,经超速($1.56 \times 10^5 g$)冷冻离心沉淀2小时,分离出底层沉淀血清,加入等体积磷酸盐缓冲液(PBS),分装后-40℃备存。

1.3 药效检测:采用HBV-DNA斑点杂交法^[2],每次实验重复4次。

选择受试药物:药物在硝基纤维滤膜上点样,经模拟杂交过程处理后立即加入氮蓝四唑(NBT)和5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐(BCIP)显色,或滴加碱性磷酸酶37℃作用1小时后添加NBT和BCIP,藉以排除药物所致假阳性/阴性结果,此类药为受试药物。

点膜:汲取病毒液40μl加入抗-HBs 40μl后37℃孵育2小时,再滴加受试药物40μl,置于4℃作用24小时后在硝基纤维滤膜上真空抽滤点膜。

变性:使用0.5N NaOH溶液浸泡10分钟,致使DNA变性为单链形式固定在滤膜上,经三羟甲基氨基甲烷(Tris)梯度递减浓液漂洗后80℃烘干。

杂交:滤膜放进塑料袋,经预杂交液42℃处理过

夜,再加入单链生物素探针(Bio-DNA)进行杂交,使用漂洗液漂洗后再与抗生物素碱性磷酸酶作用。

显色:用NBT和BCIP作为底物显色1~2小时。

结果判定:依据有无蓝/紫色斑点和颜色深浅判定药效。病毒对照的蓝/紫色斑点的直径和颜色的深度为“+++”,药物出现斑点的直径抑制1/3、2/3与颜色的递减分别为“++”(低效药)、“+”(中效药),蓝/紫色斑点完全抑制为“-”(高效药)以及斑点与颜色无抑制为“+++”(无效药)。

2 结果

受试的100种中草药中发现26种对纯化的HBV-DNA有不同程度的抑制效果。结果见表1所示,13种中西药制剂及复方实验药效见表2。

表1中的贯众、佩兰、荔枝核、珍珠菜、黄柏、茯苓、大黄、丹参、大活血和犁头草为高效药,其中柴胡、郁金、佩兰、厚朴和大黄为病毒性肝炎防治方案^[3]推荐药物。表2中茵陈蒿汤与小承气汤为高效药。

3 讨论

乙型肝炎病毒缺乏体内外感染模型,目前试用与HBV同属的嗜肝DNA病毒之一的鸭乙型肝炎病毒(DHBV)感染鸭模型,藉以观察抑制血清DHBV-DNA和抑制病毒复制为基本指标。临床抗乙型肝炎病毒药物研究文献报道的绝大部分为临床应用中医辨证论治,疗效指标多属临床症状/体征的改善。

自从Watson和Crick1953年发现DNA双螺旋结构,开创了分子生物学新时代,其后对DNA的研究有了飞速发展,在此基础上发展了分子杂交技术。生物素探针分子杂交技术原理与³²P探针杂交技术相似。待检样品中的DNA经变性处理为单链形式固定于滤膜,通过碱基互补原理与单链生物素探针杂交,在滤膜上形成生物素标记双链DNA,与抗生物素聚合碱性磷酸酶结合后,再经氮蓝四唑(NBT)和5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐(BCIP)作为底物显色。近10余年来,该技术已广泛应用于分子生物学各领域的基础研究和临床诊断。在抗乙型肝炎药物缺乏体内外感染模型条件下,本文采用DNA探针技术进行100种中草药和13种方药抑制HBV-DNA的实验研究。

乙型肝炎是目前已知五型(甲、乙、丙、丁、戊)肝炎中危害最大的一种。1986年资料表明我国乙肝患者

* 江西医学院微生物学教研室,江西省南昌市(330006)

收稿日期:1995-12-11

表1 26种有效中草药对HBV-DNA的抑制作用(n=4)

药名	药效
茵陈(Artemisia Capillaris)	++
黄芪(Astragalus Membranaceus)	+
柴胡(Bupleurum Chinense)	+
郁金(Curcuma Aromatica)	+
贯众(Cytomium fortunei)	-
石斛(Dendrobium Nobile)	++
佩兰(Eupatorium Fortunei)	-
连翘(Forsythia Suspensa)	+
甘草(Glycyrrhiza Uralensis)	+
地耳草(Hypericum Japonicum)	++
益母草(Leonurus Heterophyllus)	++
荔枝核(Litchi Chinensis)	-
珍珠菜(Lysimachia Clethroides)	-
厚朴(Magnolia Officinalis)	+
巴戟天(Morinda Officinalis)	+
荷叶(Nelumbo Nucifera)	+
白花蛇舌草(Oldenlandia Diffusa)	++
黄柏(Phellodendron Amurense)	-
茯苓(Poria Cocos)	-
半支莲(Portulaca Grandiflora)	+
葛根(Pueraria Lobata)	++
大黄(Rheum Palmatum)	-
丹参(Salvia Miltiorrhiza)	-
大活血(Sargentodoxa Cuneata)	-
五味子(Schisandra Chinensis)	+
犁头草(Viola Japonica)	-

和携带者近2亿人,1991年报道我国至少有6亿人感染过乙型肝炎,约有1.2亿人群携带乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg),其中1/4最终将发展为慢性肝病(肝硬化与原发性肝癌),每年因肝病死亡约30万人,每年约有80~100万新生儿乙型肝炎携带者,其中一部分人成年后发展成肝硬化和原发性肝癌,每年直接经济损失222.64亿元^[4]。目前国内市场上虽有保肝护肝药、免疫增强剂和“乙肝灵”等,但亦有每疗程上万元的化学合成药与生物制品(诸如Ara-AMP、iRNA和IFN),乙型肝炎患者仍与日剧增,大多数研究酶标法的HBsAg/HBeAg阴转率为30%~40%^[5~10],且小样本研究常不能进行更精确的统计,美国报道多中心研究169例慢性活动性乙型肝炎患者随机分组治疗,IFN治疗组与强的松治疗组血清学转换率无显著性差异^[5],若采用生物探针技术或DNA扩增技术检测这部分“阴转”病人血清的HBV-DNA,其中45%仍为阳性,说明存在着持续低水平HBV复制,此类药物存在溶解性、稳定性、毒性与停药“反跳”等问题^[5~10]。故寻找疗效高、副作用少能推广使用的有效药物为当务之急,希望本实验研究提供的初步信息能对临床工作有所补

益。

表2 13种药物对HBV-DNA的抑制作用(n=4)

药名	药效
田基黄注射液	+++
肌苷注射液	+++
乙肝宁冲剂	++
灭澳灵	++
肝泰乐片	+
护肝片	+++
肝宁片	+++
甘草甜素片	+
云芝肝泰片	++
茵陈蒿汤	-
小承气汤	-
黄芩汤	++
小柴胡汤	+

4 参考文献

- 魏菊仙,等. 中医名方应用进展. 中国医药科技出版社, 1991: 50.
- 杜绍财. DNA分子杂交检测血清中HBV-DNA. 北京医科大学学报 1985;1: 36.
- 第六次全国病毒性肝炎学术会议. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 1985;3(3): 192.
- 袁桂清. 全国乙型肝炎防治研讨会. 中华医学信息导报 1991;(5): 5.
- J. Altorfer. 病毒性肝炎诊断和治疗的新观点. 德国医学 1993;10(11): 11.
- 黄华芳,等. HBIG、无环鸟苷、干扰素联合对慢性乙型肝炎抗病毒疗效观察. 中国病毒学 1994;9(4): 78.
- De Man RA,等. 慢性病毒性肝炎的治疗. 国外医学抗生素分册 1992;13(4): 303.
- 孔令峰. 病毒性疾病的干扰素治疗. 中国医院药学杂志 1995;15(2): 78.
- 高耀先. 慢性肝炎的干扰素疗法. 日本医学介绍 1993;14(11): 522.
- Buti M, et al. Disappearance of serum hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction after adenine arabinoside 5' - monophosphate therapy in chronic hepatitis B. Liver 1993;13(30): 136.

江西省卫生厅重点中医药科研课题(940223),江西省青年科学基金资助项目(950064)

• 征 文 •

为促进中医特效方药的开发与推广交流,中国中西医结合学会中药专业委员会、中国中医研究院中药研究所医药技术推广中心定于1997年7月在河北秦皇岛召开“全国首届特效方药临床应用与实验研究学术交流会”。现征文:(1)有关中医特效方药(包括院内制剂、协定处方、经方、验方)的临床应用、药理实验研究或综述;(2)开发特效方药的思路与方法;(3)中医特效方药的推广与发展方向;(4)中药药剂学研究;(5)院内制剂的制备工艺改进与质量研究。要求全文及500字摘要各1份,截稿至1997年4月30日,征文录入《中国实验方剂学杂志》文库,凡已投其他刊物者,望来稿说明。来稿请寄:北京东直门内北新仓18号中国中医研究院中药所医药技术推广中心(100700)黄晖收,电话:64052409,随信请附寄20元审稿费。本会欢迎有关中药制品、中医药书刊、仪器、试剂等厂商来会介绍、展销。