

肝灵对感染乙型肝炎病毒树鼯的疗效观察

广西医学院药理教研室 杨启超 甘俊 周美娇

广西肿瘤医院病理研究室 严瑞琪 苏建家 黄定瑞 杨春 黄国华

提 要 用HBsAg及HBeAg均阳性的乙肝病人血清接种40只树鼯。4周后有32只(80%)血清HBsAg和/或抗-HBc阳性,其SGPT活性显著升高。将这32只动物随机分成3组,两组为实验组,每只动物每天注射肝灵一次,共21天,一组为对照组。到实验第11周时,实验组动物SGPT值显著下降,HBV转阴率高,而对照组不明显。本实验进一步证实树鼯能感染人的HBV,同时表明肝灵注射液对乙型肝炎有一定的疗效。

关键词: 树鼯、肝灵、HBV。

经临床试用,业已证明中草药制剂肝灵(主要成分为苦参硷)对治疗慢性活动性肝炎有一定疗效;还认为对乙肝病毒DNA聚合酶活性有抑制作用。肝灵是肝炎灵的精制品,其对肝炎的疗效如何,需要进一步验证。过去我们用四氯化碳引起肝损动物模型进行药物筛选,与临床观察有一定差异。近几年来,严瑞琪等^[1]用人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼯获得成功,建立了实验感染人HBV的动物模型。树鼯是一种最低等的灵长类动物,在进化上更接近于人类,因此,用感染了HBV的树鼯作动物模型,进行药物疗效观察,进一步证明肝灵对乙肝病毒是否有抑制或加速其转阴作用,可能为临床提供更有实用价值的实验依据。

材料和方法

一、材 料

1. 实验动物 云南成年雄性树鼯(*Tupaia Belangeri Chinensis*)体重105~145克,单只饲养于铁丝笼中,室温控制在20~25℃。喂饲饼干,水果,牛奶、鱼肝油、蛋类、蚕蛹等。自来水通过自动供水系统任饮。

2. 感染血清 取HBsAg及HBeAg均

阳性的数个供血者的混合人血清,置低温冰箱保存备用。

3. 肝灵 由广西天然药物研究中心研制,每支含纯药30毫克,肌注给药。

二、方 法

1. 用血凝法检测实验树鼯血清HBsAg及抗-HBs 实验前采血两次作自身对照。接种含HBV的人血清后,每周采血一次进行检测(试剂由上海生物制品研究所提供)。

2. 固相放射免疫试验 用固相放射免疫“竞争法”检测血清中抗-HBc。操作按试剂盒规定方法进行。样品管及阴、阳性对照管同时加入HBcAg包被球孵育;用1257Y计数仪(美国LKB产)测聚苯乙烯小球放射性(每分钟计数cpm)。样品管 $\text{cpm} \leq \frac{1}{2}$ 阴性对

照管时,认为该样品具有HBcAb活性,即为阳性。树鼯接种HBV后,每周检测一次。(试剂由中国同位素公司北方免疫试剂研究所提供)。

3. 血清生化检测 于实验前,实验第四周及第七周分别采血,用SBA-300型临床化学批量样品自选分析仪定量测定树鼯血清转

氨酶(SGPT)活性。

4. 肝活检 实验前,实验第四周及第七周随机取部分树鼩在乙醚麻醉下剖腹,切取少许肝组织,置10%中性福马林溶液固定,常规石蜡包埋切片,苏木素依红染色,光镜观察。

5. 实验操作 购回的树鼩驯养了两个月之后,经股静脉注射含有HBV的感染人血0.5毫升。以后每周采血查HBsAg、抗-HBs及抗-HBc。到第四周时,取血清HBV标记物阳性并且有SGPT升高等证明已感染上HBV的树鼩,随机分成A、B及C三组。C为对照组,A、B为药物实验组,每日通过肌肉注射给肝灵一次,共计21天。

结 果

接种HBV前,所有树鼩血清的HBV标志物均阴性;SGPT活性在正常范围(丁正梁,1983)。经过接种HBV的40只树鼩中,到实验第四周时,有32只(80%)血清HBV标志物呈阳性;其SGPT活性显著升高,未感染的树鼩SGPT值变化无明显差异(表1)。到实验第11周时,少数动物死亡。A、B和C组动物数分别为9、10和8只。

表1 感染与未感染动物接种HBV前后SGPT*变化比较

组 别	动物数	接种HBV前	接种HBV后4周
感染组	32	80.42±41.2 ①	166.32±45.3 ②
未感染组	8	90.62±30.86 ③	125.7±35.79 ④

* 卡尔门氏单位。①:②P<0.001 ③:④P>0.05

从实验第5周开始,A和B组给以肌注肝灵。给药剂量见表2。给药21天后,A、B组树鼩SGPT活性明显下降,尤以B组为甚,而对照组无显著变化(表3)。

到实验第11周,血凝法检测3组动物血清HBsAg滴度均在阳性值之下。而用敏感

表2 A、B组动物肌注肝灵剂量

组 别	动物数	给药剂量 (mg/kg/d)	给药天数	平均每只动物 给药总量 mg($\bar{x} \pm SD$)
A	9	35	21	93.51±11
B	10	7	21	19.55±3.87

表3 各组不同时期SGPT活性值

(卡尔门氏单位 $\bar{x} \pm SD$)

组 别	接种HBV前	接种HBV后 第 四 周 (即给药前)	接种HBV后 第 7 周 (即给药后3周)
A	33±51 ①	167±61 ②	119±25 ③
B	94±44 ④	175±48 ⑤	116±33 ⑥
C*	66±31 ⑦	121±49 ⑧	110±27 ⑨

* 对照组,不给肝灵。

①:②P<0.01 ②:③P<0.05 ④:⑤P<0.01

⑤:⑥P<0.01 ⑦:⑧P<0.05 ⑧:⑨P>0.05

表4 第11周时各组动物血清HBV转阴情况

组 别	动物数	HBV转阴动物数	转阴率(%)
A	9	6	66.67
B	10	7	70.0
C	8	3	37.5

P>0.05

的固相放免试验仍能在部分动物血清查到抗-HBc,其中以对照组阳性率最高,给药的B组最低。换言之,HBV标志物转阴率以B组最高,对照组最低。

肝组织学检查:接种HBV前,树鼩肝组织无特异性病变。接种后第四周(即给药前),血清出现感染指标的各组大多数动物肝脏均显示较多的散在的肝细胞点状坏死,局部有炎症反应;部分有明显的汇管区炎。多数切片上可见少量散在的嗜酸性变的肝细胞。偶见个别肝细胞气球样变。第8周时(即给药一疗程后),肝活检上述病变无明显转变。给药组动物与对照组肝组织病变程度差别不显著。

讨 论

实验树鼯接种 HBV 前,血清 HBV 标志物均阴性,表明这些动物无自发性的 HBV 感染。接种 HBV 后 4 周,大多数树鼯血清能检测出 HBV 标志物;同时转氨酶活性显著升高,提示这些树鼯已感染上人的 HBV,并引起肝组织一定程度的损害。其感染与我们过去的实验研究相似^[1],证明树鼯能感染人的 HBV,而且在不同批次的树鼯中感染率较恒定,表明树鼯是一种有一定使用价值的感染入 HBV 的动物模型,可用于防治乙型肝炎药物的实验研究和筛选。感染的树鼯于接种后第 11 周血凝法检测 HBsAg 已呈阴性,表明这些动物只是急性感染过程。

感染的树鼯给肝灵 3 周后,即能使血清转氨酶活性显著下降。提示以连续 3 周给药作为肝灵的一个疗程,即可观察和判断 HBV 感染者对该药物的治疗反应性。A 组动物接受的药物剂量相当于人使用量的 50 倍。给药期间,动物活动性好,无异常表现。说明肝灵用量的安全范围大,毒性小。在停止给药一周后,活检发现给药组与对照组肝组织病变程度无显著差别。这可能是肝灵能促进转氨酶的降解,但是对于已发生病变的肝细胞及炎症反应,没有明显促进其修复及消退的作用。本实验中,肝灵用量较小的 B 组,其降转氨酶活性效果及 HBV 标志物阴转率略强于大剂量的 A 组。可能的解释为:药物的

两重性在其过大剂量时,对肝细胞的副作用较小剂量时突出。另一方面,树鼯对药物的不同剂量反应效果不同,说明树鼯对该药物反应敏感,可用于检测药物的剂量反应曲线,为临床用药提供实验依据。

到第 11 周,虽然用血凝法检测 3 组动物的血清 HBsAg 均阴性,但是用固相放免法仍能在部分动物血清查到抗-HBc,表明这些动物肝细胞仍在复制 HBV^[2]。由于实验动物数少,各组动物血清 HBV 标志物阴转率差别不显著 ($P > 0.05$),但是 B 组阴转率几乎比对照组高一倍,提示肝灵对 HBV 有一定抑制或拮抗作用,可能是有用的治疗乙型肝炎的药物。该药物对乙肝病毒转阴的确切效果及其作用机理,有待进一步研究。

小 结

本实验进一步证实树鼯能感染人的 HBV。同时表明肝灵注射液有显著的降血清转氨酶活性效果,对乙肝病毒转阴也有一定作用。表明肝灵是一种有效的治疗乙型肝炎药物。也提示感染入 HBV 的树鼯模型对肝灵的实验治疗反应良好,可用于乙肝防治药物的筛选和研究。

参 考 文 献

- [1] 严瑞琪等:广西医学院学报.1984年;(1):10—15
- [2] Paraevangelon. G., et al: Hepatology.1984, 14:40