

文章编号 :1000-2375(2015)04-0310-06

# 拉米夫定与原儿茶酸药物组合 体内抗鸭乙型肝炎病毒研究

张建武,马恒,魏一,王玲,孟沫然,韩凤梅,陈勇

(湖北省中药生物技术重点实验室(湖北大学),湖北省生物资源绿色转化协同创新中心(湖北大学),湖北 武汉 430062)

**摘要** 实验动物为感染过鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的雏鸭,抗病毒阳性对照药为阿昔洛韦(100.0 mg/kg),保肝护肝阳性对照药为门冬氨酸鸟氨酸(简称门鸟,5.0 g/kg),研究在不同的给药剂量及不同的给药时间的条件下,原儿茶酸(PA)与拉米夫定(3TC)药物组合(1:1,质量分数)在体内的抗病毒作用与保肝护肝作用的量-效关系及时-效关系。实验结果表明,3TC/PA体内抗DHBV的最佳给药剂量为50.0 mg/kg,一方面其抗病毒效果优于阳性对照阿昔洛韦,另一方面保肝护肝效果优于阳性对照门鸟。

中图分类号:R914 文献标志码:A DOI:10.3969/j.issn.1000-2375.2015.04.002

## The anti-DHBV activity of lamivudine combined with protocatechuic acid in vivo

ZHANG Jianwu, MA Heng, WEI Yi, WANG Ling, MENG Moran, HAN Fengmei, CHEN Yong  
(Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** The experimental animals were ducklings that was infected with duck hepatitis B virus (DHBV). Acyclovir (100.0 mg/kg) and *L*-Ornithine-*L*-Aspartate (O-A, 5.0 g/kg) were used as the positive control drugs which could antiviral and protect liver, we studied the antiviral activity of protocatechuic acid (PA) combined with lamivudine (3TC)(1:1  $\mu$ w/w) at different doses and different times in vivo. The results demonstrated that the most appropriate dose of 3TC/PA was 50.0 mg/kg in anti-DHBV in vivo. In this condition, the antiviral effect of 3TC/PA was better than acyclovir, and the hepatoprotective effect was better than O-A.

**Keywords:** duck hepatitis B virus; lamivudine; protocatechuic acid

## 0 引言

拉米夫定(lamivudine,简称3TC)作为一种口服抗病毒药物是第一个获FDA批准的,它对患者血清HBV(乙型肝炎病毒)-DNA呈现快速显著的抑制作用,但是对抗原的抑制作用较低,而且停药后症状易复发,长期用药会引起DNA聚合酶区YMDD基序变异,可增大病毒对该药的耐受性,因此限制了其临床应用<sup>[1-2]</sup>。原儿茶酸(protocatechuic acid,PA)具有一定的抗HBV的作用,且叶下珠、丹参、五味子等有效抗HBV的中药提取物中均含有PA,前期有研究表明,PA体外对HepG2.2.15细胞中HBV DNA的抑制率高达46.54%,而且对HBsAg和HbeAg均具有一定的抑制作用<sup>[3-5]</sup>。

本实验室前期研究表明,3TC联合PA可抑制HepG 2.2.15细胞分泌HBV DNA和抗原<sup>[6]</sup>,同时对

收稿日期:2015-01-20

基金项目:科技部重大专项(2008ZX10002-009)、湖北省发改委生物产业专项(2008-1365-2)、武汉市科技局攻关项目(201060623264)和湖北大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201410512010)资助

作者简介:张建武(1986-),男,硕士生,E-mail:380698412@qq.com;陈勇,通信作者,教授,E-mail:1740952455@qq.com

HBV X蛋白入核<sup>[7]</sup>及感染鸭乙型肝炎病毒(DHBV)吸附、进入和感染鸭原代肝细胞<sup>[8]</sup>均有一定的协同抑制作用,同时还可降低血清AST和ALT<sup>[8]</sup>。在药动学方面:二者联用后3TC和PA的吸收速度均降低,同时3TC的吸收总量增大,PA消除减慢,即可延长二者其在体内作用的时间<sup>[9]</sup>。本实验主要是以樱桃谷鸭雏鸭为研究对象,通过感染DHBV进行造模,结合实验室前期的研究,进一步考察3TC和PA药物组合体内抗DHBV的作用及其保肝护肝的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 拉米夫定(纯度 $\geq 98\%$ )、原儿茶酸(纯度 $\geq 98\%$ )购于武汉施瑞科技有限公司;门冬氨酸鸟氨酸颗粒剂(简称门鸟)获赠于武汉启瑞药业有限公司;阿昔洛韦获赠于邦伦来福药业;重组质粒PCR211-DHBV115(DQ276978片段,含3 024 bp<sup>[10]</sup>)及DHBV强阳性血清(病毒拷贝数 $> 5 \times 10^9$ /mL)获赠于同济医院临床免疫研究室(质粒拷贝数为 $7.06 \times 10^{10}$ /mL);PCR引物是由上海英俊生物技术有限公司合成;SYBR Green qPCR mix购自于TOYOBO(上海)生物科技有限公司;谷草转氨酶(AST)试剂盒、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、碱性磷酸酶(ALP/AKP)测定试剂盒、白蛋白测定试剂盒(ALB)及总胆红素(TBil)测定试剂盒购自于南京建成生物工程研究所;乙肝表面抗原(HBsAg)测定试剂盒购自于上海自科华生物工程股份有限公司;病毒DNAout购自于北京天恩泽基因科技有限公司。

**1.2 主要仪器** TriStar LB941多功能酶标仪(德国Berthold公司);MJ-Mini Option Real-Time PCR system(美国Bio-Rad公司);超低温冰箱(法国Jouan公司)。

**1.3 动物模型** 樱桃谷鸭,1~3日龄(简称雏鸭,雌雄不限)颈静脉采血后分离血清,以灭菌双蒸水作为空白对照、DHBV强阳性血清作为阳性对照,采用荧光定量PCR扩增血清中DHBV DNA特异序列,从而筛选出血清中DHBV DNA拷贝数 $< 10^4$ /mL的雏鸭。筛选后的雏鸭以0.2 mL/只的剂量经腿静脉注射DHBV强阳性血清(DHBV DNA拷贝数 $> 5 \times 10^9$ /mL)进行感染,7 d后,采血分离血清,用RT-PCR筛选拷贝数在 $10^8$ /mL左右的雏鸭,即造模成功的模型动物。

**1.4 RT-PCR标曲的制备<sup>[11]</sup>** 首先,找出重组质粒PCR211-DHBV115 DNA的保守序列(primer-BLAST软件),根据该保守序列设计出荧光定量PCR检测DHBV引物序列(primer3.0软件):Ps1 5'-GCCTTAGCCAATGTGTATGATC-3',Ps2 5'-CGTGCTGAATAAGATAACCTGTG-3';然后配制一系列的标准溶液(质粒拷贝数依次为 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 依次至 $10^{10}$ /mL),再加入DHBV引物,最后进行RT-PCR。PCR扩增条件为:首先94℃预热5 min,再按照94℃ 50 s,51℃ 45 s,72℃ 20 s的条件进行40次PCR扩增循环。以纵坐标为质粒拷贝数对数( $\log_{10}$ 拷贝数),横坐标为样品到达对数期的循环数( $C_t$ 值),分别建立给药周期的RT-PCR标曲: $\log_{10}$ 拷贝数 =  $-0.2857C_t + 13.650$ ,  $r = 0.9978$ 和不同给药剂量的RT-PCR标曲: $\log_{10}$ 拷贝数 =  $-0.3757C_t + 13.076$ ,  $r = 0.9973$ 。

**1.5 血清中DHBV DNA定量分析<sup>[12]</sup>** 用乙醚将雏鸭麻醉之后,经腿静脉采血0.5 mL,12 000 r/min离心10 min,分离血清,再用一管式病毒DNAout试剂盒提取血清中的病毒DNA进行RT-PCR。根据前期已建立的RT-PCR标曲,可测定待测样品中的DHBV DNA拷贝数。

**1.6 体内量-效实验方法<sup>[13]</sup>** 实验分组:感染DHBV模型雏鸭对照组(灌胃等量0.85%氯化钠),阿昔洛韦100.0 mg/kg组,门冬氨酸鸟氨酸(简称门鸟)5.0 g/kg组,以及3TC/PA(1:1)分别为12.5、25.0、50.0、100.0、150.0 mg/kg的合用组,将感染后的雏鸭进行随机分组,每组10只。各组一日灌胃一次,连续灌胃给药14 d。分别在给药之前( $T_0$ )、给药后第7天( $T_7$ )、给药后第14天( $T_{14}$ )以及停药后的第3天( $P_3$ ),每只雏鸭经腿静脉采血0.5 mL,然后分离血清进行肝功能相关的生化指标和DHBV DNA拷贝数的检测。

**1.7 体内时-效实验方法<sup>[14]</sup>** 实验分为感染DHBV模型雏鸭对照组,正常雏鸭对照组,阿昔洛韦100.0 mg/kg组,门鸟5.0 g/kg组,以及3TC/PA(1:1)50.0 mg/kg合用组,随机分组,每组10只。每日灌胃给药一次,连续给药28 d。对照组灌胃等量0.85%氯化钠。分别于给药前( $T_0$ )、给药7 d( $T_7$ )、给药14 d( $T_{14}$ )、给药21 d( $T_{21}$ )、给药28 d( $T_{28}$ )和停药5 d( $P_5$ ),经腿静脉采血,每只0.8 mL,然后分离血清进行DHBV DNA拷贝数和ALT、AST以及HBsAg检测。

**1.8 统计学分析** 使用SPSS 17.0统计软件对每组数据进行单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 不同的给药剂量对病毒抑制作用及肝功能的影响 研究不同的给药剂量情况下,血清中DHBV DNA含量的变化,结果见表1.

表1 每组用药前后血清中DHBV DNA的含量( $\bar{x} \pm s$ )

组类	n	Log DHBV DNA (拷贝数/mL)			
		T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>14</sub>	P <sub>3</sub>
模型组	9	6.39±1.04	6.35±1.25	6.12±0.60	6.14±0.52
阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	6.41±1.01	5.93±0.94*	5.91±0.33*	6.24±1.18
门鸟 5.0 g/kg 组	9	6.76±0.69	6.74±0.84	6.61±0.29	6.85±0.97
3TC/PA 12.5 mg/kg 组	9	6.26±1.27	5.77±0.75*	5.61±0.21**	5.27±0.35**
3TC/PA 25.0 mg/kg 组	9	6.41±1.36	5.81±0.77**	5.79±0.73**	5.32±0.67**
3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	6.64±1.26	5.80±1.10**	5.64±0.78** <sup>△</sup>	5.20±0.45** <sup>△△</sup>
3TC/PA 100.0 mg/kg 组	9	6.80±1.02	5.59±0.60**	5.36±0.54**	5.39±0.25**
3TC/PA 150.0 mg/kg 组	8	6.88±1.60	5.47±0.41**	5.14±0.23**	5.40±0.39**

3TC/PA 12.5、25.0、50.0、100.0和150.0 mg/kg 指同组中3TC与PA的剂量,\* $P < 0.05$ 及\*\* $P < 0.01$ 指与同组T<sub>0</sub>进行比较;<sup>△</sup> $P < 0.05$ 及<sup>△△</sup> $P < 0.01$ 指相同的药物作用时间下,50.0 mg/kg 剂量组的3TC/PA与100.0 mg/kg 剂量的阿昔洛韦进行比较.

模型对照组和门鸟 5.0 g/kg 组在用药T<sub>0</sub>~T<sub>14</sub>及P<sub>3</sub>时,血清DHBV DNA含量没有出现显著变化( $P > 0.05$ ).阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组给药T<sub>7</sub>、T<sub>14</sub>时血清DHBV DNA含量显著下降( $P < 0.05$ ),P<sub>3</sub>后DHBV DNA含量与用药T<sub>14</sub>相比显著升高( $P < 0.05$ ),出现明显反跳.3TC/PA的各个剂量组于用药第T<sub>7</sub>、T<sub>14</sub>时对血清DHBV DNA含量均有显著的抑制作用,并且抑制作用随着给药剂量的加大而增强,P<sub>3</sub>时对DHBV DNA的抑制率分别为15.8%、17.0%、21.7%、20.7%、21.5%,其中25.0、50.0、100.0 mg/kg 组P<sub>3</sub>时DHBV DNA含量无明显反跳,12.5、150.0 mg/kg 组有较明显反跳.另外,3TC/PA 50.0 mg/kg 给药T<sub>14</sub>及P<sub>3</sub>时血清DHBV DNA含量均显著低于阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ).

研究了给药剂量对雏鸭肝功能的影响,各组用药前后血清中各项肝功能生化指标测定结果见表2.

表2 各组用药前后血清中肝功能生化指标( $\bar{x} \pm s$ )

天数	组别	n	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	ALB/(g/L)	AKP/(U/L)	Tbil/( $\mu$ mol/L)
T <sub>0</sub>	模型对照组	9	97.1±9.1	108.2±10.6	16.2±1.8	110±13.3	4.8±0.4
	阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	84.8±26.4	108.8±12.7	16.7±2.0	111±12.1	5.1±0.1
	门鸟 5.0 g/kg 组	9	88.2±3.0	132.4±12.4	16.4±1.4	106±8.7	5.7±0.4
	3TC/PA 12.5 mg/kg 组	9	91.6±2.4	110.6±13.4	15.6±1.1	154±6.5	5.5±0.2
	3TC/PA 25.0 mg/kg 组	9	84.0±6.3	121.7±6.3	15.2±1.6	180±7.7	5.7±0.2
	3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	79.8±18.4	142.5±5.7	15.4±2.1	174±14.7	5.3±0.3
	3TC/PA 100.0 mg/kg 组	9	80.1±18.6	124.2±17.0	15.9±1.3	102±10.1	5.6±0.3
	3TC/PA 150.0 mg/kg 组	8	98.0±12.6	121.0±13.4	16.7±1.1	96±8.9	5.7±0.2
T <sub>14</sub>	模型对照组	9	110.2±17.0	106.6±11.4	17.2±2.9	54±7.7	5.2±0.2
	阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	88.1±9.4	96.4±11.6	16.7±0.6	46±14.5	4.8±0.2
	门鸟 5.0 g/kg 组	9	84.3±18.9*	114.3±7.6*	14.5±1.4*	45±5.0	5.3±0.1*
	3TC/PA 12.5 mg/kg 组	9	91.7±9.5	112.5±7.2	15.3±1.1	54±7.9	5.3±0.4
	3TC/PA 25.0 mg/kg 组	9	76.7±8.4	105.6±12.8	14.4±0.9*	50±11.6	5.1±0.4*
	3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	59.3±8.8*#	95.2±7.1*#	13.3±0.5*	47±14.6	4.3±0.3*##
	3TC/PA 100.0 mg/kg 组	9	68.1±6.8*	104.0±9.3*	14.7±0.4*	44±3.9	4.7±0.1*
	3TC/PA 150.0 mg/kg 组	8	89.6±6.5	116.9±9.6	16.1±1.1	47±8.5	5.8±0.2

3TC/PA 12.5、25.0、50.0、100.0和150.0 mg/kg 指同组中3TC与PA的剂量,\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 指T<sub>14</sub>与同组T<sub>0</sub>进行比较,# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 指相同的药物作用时间下,50.0 mg/kg 剂量组的3TC/PA与5.0 g/kg 剂量组的门鸟进行比较.

结果显示,在T<sub>14</sub>后,门鸟 5.0 g/kg、3TC/PA (1:1)50.0及100.0 mg/kg 组血清中的ALT、AST、ALB及Tbil 与同组给药前水平相比,均显著低于给药前水平( $P < 0.05$ ),3TC/PA 25.0 mg/kg 组ALB、Tbil亦显著低于

同组给药前水平( $P < 0.05$ );各组 AKP 活性较用药前均大幅下降,即使模型对照组也不例外(原因尚不明确);阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组给药前后各项指标(除 AKP 外)无显著变化( $P > 0.05$ ).另外,  $T_{14}$ 时 50.0 mg/kg 3TC/PA 组 AST、ALT 和 Tbil 值亦显著低于 5.0 g/kg 门鸟组( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ).

**2.2 给药周期对病毒抑制作用及肝功能的影响** 研究给药期间对血清 DHBV DNA、DHBsAg 含量的影响,其结果分别见于表 3 和表 4.结果显示,100.0 mg/kg 剂量组的阿昔洛韦给药  $T_7 \sim T_{28}$  及  $P_5$  后的血清 DHBV DNA 含量与同组用药前相比较具有显著性降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但是在  $P_5$  后 DHBV DNA 含量与同组给药  $T_{28}$  时的水平相比,出现反跳现象,显著高于给药前水平( $P < 0.05$ ).50.0 mg/kg 剂量组的 3TC/PA 在给药  $T_{28}$  内,血清中 DHBV DNA 的水平均显著低于同组给药前水平( $P < 0.01$ ),虽然在  $P_5$  后 DHBV DNA 含量出现一定的反跳现象,但与  $T_{28}$  时的 DHBV DNA 水平相比并没有显著差异( $P > 0.05$ ).而且 50.0 mg/kg 剂量组的 3TC/PA 在给药  $T_{21}$ 、 $T_{28}$  以及  $P_5$  的血清 DHBV DNA 水平均显著低于 100.0 mg/kg 剂量的阿昔洛韦组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ).

表3 各组给药前后血清中DHBV DNA的含量( $\bar{X} \pm s$ )

组别	n	log DHBV DNA (拷贝数/mL)					
		$T_0$	$T_7$	$T_{14}$	$T_{21}$	$T_{28}$	$P_5$
正常对照组	9	3.99±0.14	3.72±0.51	3.74±0.52	3.92±0.25	3.84±0.26	3.96±0.21
模型对照组	8	6.88±0.23	6.89±0.27	6.78±0.49	6.75±0.30	6.85±1.00	6.46±0.58
阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	6.81±0.31	6.36±0.58**	5.98±0.51*	6.07±0.22**	5.89±0.34**	6.26±0.38**
门鸟 5.0 mg/kg 组	9	6.61±0.32	6.64±0.58	6.61±0.37	6.58±0.52	6.56±0.38	6.73±0.52
3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	6.71±0.78	5.95±0.67**	5.76±0.57**	5.79±1.04*** $\Delta\Delta$	5.61±0.33*** $\Delta$	5.69±0.28**

3TC/PA 50.0 mg/kg 指 3TC、PA 的剂量均为 50.0 mg/kg; \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  指与同组  $T_0$  比较;  $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$  指相同的药物作用时间下, 50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 组与 100.0 mg/kg 剂量阿昔洛韦组比较.

表4 各组给药前后血清中DHBsAg水平( $\bar{X} \pm s$ )

组别	n	$T_0$	$T_7$	$T_{14}$	$T_{21}$	$T_{28}$	$P_5$
正常对照组	9	0.20±0.10	0.17±0.05	0.14±0.02	0.20±0.46	0.10±0.01	0.11±0.01
模型对照组	8	0.81±0.09	0.87±0.06	0.83±0.07	0.85±0.05	0.84±0.05	0.82±0.03
阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	0.85±0.06	0.79±0.04*	0.71±0.01**	0.71±0.01**	0.77±0.05*	0.81±0.04*
门鸟 5.0 g/kg 组	9	0.84±0.07	0.84±0.05	0.85±0.05	0.87±0.01	0.86±0.05	0.81±0.01
3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	0.89±0.04	0.69±0.25**	0.66±0.05**	0.68±0.04*** $\Delta$	0.61±0.03*** $\Delta\Delta$	0.63±0.04*** $\Delta\Delta$

3TC/PA 50.0 mg/kg 组是指 3TC、PA 的剂量均为 50.0 mg/kg; \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  是指与同组  $T_0$  进行比较;  $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$  指相同的药物作用时间下, 50.0 mg/kg 剂量组的 3TC/PA 与 100.0 mg/kg 剂量组的阿昔洛韦进行比较.

结果显示,100.0 mg/kg 剂量组的阿昔洛韦给药  $T_7 \sim T_{28}$  以及  $P_5$  后血清 DHBsAg 含量与同组用药前相比较具有显著性降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但是在  $P_5$  后 DHBsAg 含量与同组  $T_{28}$  时的水平相比出现反跳现象,显著高于  $T_{28}$  时水平( $P < 0.05$ ).50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 组给药  $T_7 \sim T_{28}$  以及  $P_5$  后血清 DHBsAg 含量与同组用药前相比较具有显著性降低( $P < 0.01$ ),且  $P_5$  后与同组  $T_{28}$  时水平无显著差异,并无明显的反跳.另外, 50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 组在给药的  $T_{21}$ 、 $T_{28}$  及  $P_5$  的血清 DHBsAg 水平均显著低于 100.0 mg/kg 剂量的阿昔洛韦组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ).

研究给药周期对雏鸭肝功能的影响,各组给药前后血清 AST、ALT 测定结果见表 5 和表 6.

表5 各组用药前后血清中ALT(U/L)水平( $\bar{X} \pm s$ )

组别	n	$T_0$	$T_7$	$T_{14}$	$T_{21}$	$T_{28}$	$P_5$
空白对照组	9	13.4±3.4	13.8±2.7	16.9±2.9	14.5±2.8	16.0±2.7	14.3±2.9
模型对照组	8	57.0±19.1	62.4±13.2	59.0±5.4	55.8±6.1	59.0±3.4	62.3±3.8
阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	56.4±9.2	54.0±3.9	54.1±9.7	56.0±6.7	62.4±4.4	66.0±4.0
门鸟 5.0 g/kg 组	9	55.9±6.8	50.9±7.4	46.1±5.0**	46.8±5.9*	41.0±5.8**	54.9±3.2
3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	56.4±5.6	51.3±5.0*	47.3±5.0**	44.9±3.6**	39.3±7.5**	43.2±5.1***

3TC/PA 50.0 mg/kg 指 3TC、PA 的剂量均为 50.0 mg/kg; \* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  指与同组  $T_0$  进行比较;  $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$  指相同的药物作用时间下, 50.0 mg/kg 剂量组的 3TC/PA 与 5.0 g/kg 剂量组的门鸟进行比较.

结果显示,100.0 mg/kg 剂量组的阿昔洛韦对血清中的 ALT 含量没有明显的影响( $P > 0.05$ ).5.0 g/kg 剂

量组的门鸟在给药的  $T_{14}$ 、 $T_{21}$  及  $T_{28}$  血清中的 ALT 值同给药前水平比较均显著性降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) ,但是在  $P_5$  后 ALT 值同组  $T_{28}$  时水平相比较 ,具有明显反跳 .50.0 mg/kg 剂量组的 3TC/PA 在给药  $T_7 \sim T_{28}$  期间的 ALT 值同给药前水平相比较 ,均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) 并且  $P_5$  后血清 ALT 值无明显反跳 .另外 , $P_5$  后 50.0 mg/kg 剂量 3TC/PA 组的血清 ALT 水平亦显著低于 5.0 g/kg 剂量门鸟组 ( $P < 0.05$ ) .

表6 各组用药前后血清中AST(U/L)水平( $\bar{X} \pm s$ )

组别	n	T <sub>0</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>14</sub>	T <sub>21</sub>	T <sub>28</sub>	P <sub>5</sub>
空白对照组	9	20.5±5.0	21.0±4.1	14.1±2.8	13.8±2.3	15.0±2.5	19.9±8.2
模型对照组	8	74.7±3.1	73.3±12.3	75.7±5.1	73.5±2.9	74.1±3.2	74.7±6.3
阿昔洛韦 100.0 mg/kg 组	9	73.1±2.6	71.8±6.0*	74.1±15.8	68.2±8.5	73.1±2.7	76.7±6.1
门鸟 5.0 g/kg 组	9	71.7±4.4	64.8±14.4	52.9±19.3**	52.6±12.6*	57.8±12.6**	58.8±3.7**
3TC/PA 50.0 mg/kg 组	8	70.1±4.6	61.0±8.3**	51.2±9.1**	48.6±7.8***	41.0±8.2***	45.7±17.0***

3TC/PA 50.0 mg/kg 指 3TC、PA 的剂量均为 50.0 mg/kg ;\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  指与同组  $T_0$  进行比较 ;# $P < 0.05$ 、### $P < 0.01$  指相同的药物作用时间下 ,50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 组与 5.0 g/kg 剂量的门鸟组比较 .

结果显示 ,100.0 mg/kg 剂量的阿昔洛韦在给药期间对血清 AST 值水平没有显著性影响 ( $P > 0.05$ ) .5.0 g/kg 剂量的门鸟在给药  $T_{14}$ 、 $T_{21}$  和  $T_{28}$  时 AST 值与给药前水平相比较 ,均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) ,同时在  $P_5$  时 AST 水平值与  $T_{28}$  时水平相比并无显著差异 .50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 在给药  $T_7$ 、 $T_{14}$ 、 $T_{21}$  和  $T_{28}$  时 AST 水平值与同组给药前水平相比较均有显著性降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) ,在  $P_5$  后 AST 值水平具有一定程度的反跳 .另外 ,在给药的  $T_{14}$ 、 $T_{28}$  及  $P_5$  时 ,50.0 mg/kg 剂量的 3TC/PA 组血清 AST 值均显著低于 5.0 g/kg 剂量的门鸟组 ( $P < 0.01$ ) .

### 3 讨论

本实验室前期研究工作表明 ,3TC 与 PA 的联合给药 ,当二者的剂量比(质量分数)为 1 :1 时 ,对 DHBV DNA 的抑制作用最好 ,同时具有较好的保肝护肝作用<sup>[12]</sup> .本实验选用门鸟<sup>[15]</sup> 为保肝护肝的阳性对照药 ,阿昔洛韦为抗 DHBV 的阳性对照药<sup>[13]</sup> ,结合实验室前期的研究 ,进一步考察 3TC 和 PA 药物组合体内抗 DHBV 及其保肝护肝的作用 .

量-效关系研究表明 ,3TC/PA 对血清中 DHBV DNA 的抑制作用随着给药剂量(12.5~150 mg/kg)的加大而增强 ,其中 100.0 mg/kg 和 150.0 mg/kg 剂量组在  $P_5$  后 DHBV DNA 量出现明显的反跳现象 .50.0 mg/kg 剂量组在给药的  $T_7 \sim T_{14}$  期间及  $P_5$  时 DHBV DNA 的含量显著低于对照组阿昔洛韦 ,ALT、AST 及 Tbil 值水平均显著低于门鸟对照组 ,该结果说明 3TC/PA 体内抗 DHBV 的最佳给药剂量为 50.0 mg/kg .时-效关系研究表明 ,在给药的  $T_0 \sim T_{28}$  期间 ,3TC/PA 在 50.0 mg/kg 时 ,对血清中 DHBV DNA、DHBsAg、AST 和 ALT 的抑制作用随着给药周期的延长而增强 ,并且在给药周期中以及  $P_5$  后血清中 DHBV DNA 和 DHBsAg 的水平均显著低于阿昔洛韦对照组 ,同时血清 AST 和 ALT 的水平也显著低于门鸟对照组 .该实验结果再次表明 ,3TC/PA 体内抗 DHBV 的最佳给药剂量为 50.0 mg/kg ,一方面其抗病毒效果优于阿昔洛韦 ,另一方面保肝护肝效果优于门鸟 .结合早期大量的研究工作 ,本实验结果进一步证明了 3TC 联合 PA 用于抗 HBV 的科学性与合理性 .

### 4 参考文献

- [1] Chang CN, Skalski V, Zhou H, et al. Biochemical pharmacology of (+) and (-)-2,3-dideoxy-3-thiacytidine as anti-hepatitis B virus agents[J]. J Biol Chem, 1992, 276:22414-22420.
- [2] Severint A, Liu X Y. Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-2,3-dideoxy-3-thiacytidine[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39:1430-1435.
- [3] 刘厚佳,胡晋红,孙莲娜,等. 原儿茶酸等化合物对 HBV DNA 转染人肝癌细胞株的作用[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(7):661-663.

- [4] ZHOU Zhe ,ZHANG Yi ,DING Xiao-Ran ,et al. Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis B virus replication both in vitro and in vivo[J]. Antiviral Research ,2007 ,74:59-64.
- [5] Li J ,Huang H ,Feng M ,et al. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of a plant extract form *Geranium carolinianum* L[J]. Antiviral Research ,2008 ,79: 114-200.
- [6] 吴文华,张晓雷,韩凤梅. 原儿茶酸与拉米夫定体外联合抗 HBV 药效学研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2011,33(2):193-196.
- [7] 朱文婷,陈勇,吴建国,等. 拉米夫定与原儿茶酸药物组合对 HBV X 蛋白入核的影响[J]. 中国药学杂志,2010,45(11): 832-834.
- [8] 王玲,陈勇,韩凤梅,等. 拉米夫定联合原儿茶酸在鸭原代肝细胞中抗鸭乙肝病毒的研究[J]. 中华中医药杂志,2012,27(9): 2308-2312.
- [9] 柳力,蔡文涛,陈勇,等. 拉米夫定与原儿茶酸在大鼠体内的药动学相互作用[J]. 中国药学杂志,2010,6(46):450-453.
- [10] 胡权,张正茂,张小勇,等. 鸭乙型肝炎病毒全基因组质粒构建及表达[J]. 中国公共卫生,2007,23(5):562-564.
- [11] Wang Chi-Young J ,Giambrone Joseph J ,Smith Bruce F ,et al. Comparison of cell culture systems for duck hepatitis B virus using SyBr green quantitative PCR[J]. Journal of Virological Methods ,2002 ,106:175-184.
- [12] 潘琪,王玲,陈勇,等. 拉米夫定与原儿茶酸药物组合体内抗鸭乙肝病毒研究[J]. 中华中医药杂志,2011,11(26): 2500-2504.
- [13] 王健,张士军,巫世红,等. 岩黄连提取物体内抗乙型肝炎病毒作用研究[J]. 中国药业,2009,11:7-9.
- [14] 李小月. 叶下珠复方 II 号抗乙型肝炎及免疫性肝损伤药效学及机理研究[D]. 广州:广州中医药大学,2009.
- [15] 陈明妃,李如成,陈长虹,等. 左旋门冬氨酸鸟氨酸治疗肝硬化合并肝性脑病疗效观察[J]. 第一军医大学学报,2005,26(6):718-722.

(责任编辑 游俊)

(上接第 309 页)

- [13] 雷义. 铅诱导的 HK-2 细胞氧化应激及线粒体损伤的实验研究[D]. 衡阳:华南大学,2007.
- [14] Steffens A A ,Hong G M ,Bain L J. Sodium arsenite delays the differentiation of C2C12 mouse myoblast cells and alters methylation patterns on the transcription factor myogenin[J]. Toxicol Appl Pharmacol ,2011 ,250: 154-161.
- [15] O' Flaherty E J. Physiologically based models for bone-seeking elements V: lead absorption and disposition in childhood[J]. Toxicol Appl Pharmacol ,1995 ,131: 297-308.
- [16] Hsu P C ,Guo Y L. Antioxidant nutrients and lead toxicity[J]. Toxicol ,2002 ,180: 33-44.
- [17] Chen X ,Wang K Y ,Wang Z Q ,et al. Effects of lead and cadmium co-exposure on bone mineral density in a Chinese population[J]. Bone ,2014 ,63: 76-80.
- [18] 洪玮,付欣,周问渠,等. 醋酸铅对体外培养大鼠肾小管上皮细胞的毒性损伤[J]. 激光生物学报,2011,20: 315-318.
- [19] 刘欣梅,项黎新,邵健忠,等. 重金属诱导凋亡的分子机制[J]. 细胞生物学杂志,2004,26: 235-240.
- [20] Liu G ,Li Z F ,Wang J Q ,et al. Puerarin protects against lead-induced cytotoxicity in cultured primary rat proximal tubular cells[J]. Hum Exp Toxicol ,2014 ,33: 1071-1080.
- [21] Chander K ,Vaibhav K ,Ahmed M E ,et al. Quercetin mitigates lead acetate-induced behavioral and histological alterations via suppression of oxidative stress ,Hsp-70 ,Bak and up regulation of Bcl-2[J]. Food Chem Toxicol ,2014 ,68:297-306.
- [22] Xu J ,Ji L D ,Xu L H. Lead-induced apoptosis in PC 12cells: involvement of p53 ,Bcl-2family and caspase-3[J]. Toxicol Lett ,2006 ,166:160-167.

(责任编辑 游俊)