

在细胞受到刺激剂激活的最初几十秒到几分钟内。细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高,可激活钙调蛋白激酶;使一系列特异蛋白底物的磷酸化水平增加,其中包括细胞因子的转录因子,如核因子 κB (NF- κB),使细胞因子的 mRNA 水平升高,大量细胞因子生成。本研究发现,小鼠脾脏淋巴细胞被 ConA 激活后,细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高。蓝萼甲素可降低 $[Ca^{2+}]_i$,使之接近正常水平,进而可能抑制与细胞因子有关的基因的表达,从而抑制 T 细胞增殖。以往研究表明蓝萼甲素具有免疫抑制作用,蓝萼甲素抑制小鼠脾脏淋巴细胞内钙释放可能是其产生免疫抑制作用的机制之一。

References:

- [1] Chen Z J, Li Y S, Zhou J Y, et al. Study on screening immunocompetent position in *Rabdosia amethystoides* (Benth) Hara. [J]. *J Chin Mater Med* (中草药), 2005, 28(11): 1015-1017.
- [2] Zhu L P, Chen X Q. *Experimental Methods of Immunology in Common Use*. (免疫学常用实验方法) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2000.
- [3] Fu H Q, Lu Z, Ju G Z. Examination of the effect of low dose radiation on $[Ca^{2+}]_i$ in splenocytes of mice by fura-2 dual-wavelength method [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1999, 25(6): 679-681.
- [4] Van Tits L J, Michel M C, Motulsky H J, et al. Cyclic AMP counteracts mitogen-induced inositol phosphate generation and increases in intracellular Ca^{2+} concentrations in human lymphocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 1991, 103(2): 1288-1294.
- [5] Jin Z H, Lin X Z, Ma D L. Effect of emodin and *Rhubarb* polysaccharide on level of intracellular Ca^{2+} in splenocyte of mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(8): 413-415.
- [6] Cui R F, Lin X Z. Effect of Emodin on level of intracellular Ca^{2+} by rat peritoneal macrophage [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 28(4): 199-200.
- [7] Zhang J, Weng F H, Li H Q, et al. Effect of emodin on secretion of TNF- α , IL-1, IL-6, and level of intracellular Ca^{2+} by rat peritoneal macrophage [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(8): 718-721.
- [8] Zeng Q L, Zheng Y F, Lu Z L. Immunomodulatory effects of polysaccharide of *Cistanche deserticola* Y V Ma [J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci* (浙江大学学报:医学版), 2002, 31(4): 284-287.

苦味叶下珠不同制剂对鸭体内乙肝病毒的抑制作用

韩 林, 梁睿敏, 刘 斌

(北京汉典中西药研究开发中心, 北京 100071)

苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. 为大戟科叶下珠属植物, 味苦、性凉, 具有清肝明目、收敛利水和解毒的功效^[1]。1982 年印度学者 Thyagajan 等首次报道苦味叶下珠体外对 HBsAg (乙型肝炎病毒表面抗原) 有灭活作用^[2], 引起国内外研究的热潮, 被认为是一种极具潜力的抗乙肝药物。苦味叶下珠含有大量化合物, 主要包括酚类、三萜类及生物碱类物质^[3], 初步研究表明鞣质为主要活性成分, 但是目前尚无统一的质量标准。有关苦味叶下珠的基础及临床研究日渐增多, 但是结论不一, 药材的产地和制剂都对活性产生很大的影响。目前国内还没有对此进行系统的比较研究。为了研究制剂对药物活性的影响, 为苦味叶下珠药物生产提供依据, 本实验选用云南景洪产苦味叶下珠作为药物原料, 分别采用提取和粉碎的方法获得受试药物, 比较两种制剂体内抗鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 活性的差异。

1 材料

- 1.1 动物: 1 日龄北京鸭, 购自北京前进种鸭饲养场。
- 1.2 药物: 苦味叶下珠采自云南西双版纳景洪, 经中国中医研究院胡世林老师鉴定为大戟科植物苦味叶下珠。苦味叶下珠粉剂 (P1, 苦味叶下珠全草粉碎, 过 80 目筛, 经分光光度法及滴定法测定, 含鞣质 2.48%)、苦味叶下珠提取剂 (P2, 苦味叶下珠粉末先用 80% 乙醇回流提取 1.5 h, 提取 3 次, 合并提取液, 浓缩; 提取残渣继续用水煮 3 次, 每次 1.5 h, 合并水液, 浓缩。两次浓缩液合并得到苦味叶下珠提取液, 质量浓度为 0.5 mg/mL, 含鞣质 2.87%) 均为自制; 阳性药物拉米夫定 (葛兰素威康制药公司, 批号 00211004)。
- 1.3 主要试剂: 鸭乙型肝炎病毒 DNA (DHBV-DNA) 强阳性鸭血清 (采自上海麻鸭, -70 °C 保存); α -32p-dCTP (北京福瑞生物技术工程公司);

缺口翻译药盒 (普洛麦格公司); Sephadex G-50、Ficoll PVP (瑞典 Pharmacia 公司); SDS (Merck 公司); 鱼精 DNA、牛血清白蛋白 (中国科学院生物物理研究所); 硝酸纤维素膜 $0.45 \mu\text{m}$ (Amersham 公司)。

2 方法

2.1 DHBV 感染: 1 日龄北京鸭, 经腿胫 iv DHBV-DNA 强阳性鸭血清, 感染后 7 d 取血, 分离血清, -70°C 保存待检。

2.2 药物治疗试验: DHBV 感染鸭随机分组, 给药组分 3 个剂量 *po* 药物, 分别为 25、50、100 mg/kg, 每天 2 次, 连续给药 10 d; 病毒对照组, 以生理盐水代替药物; 阳性药物 (拉米夫定) 组, *po* 药物 50 mg/kg, 每天 2 次, 连续 10 d。给药前, 给药 5、10 d 和停药后 3 d, 分别自鸭腿胫静脉取血, 分离血清, 于 -70°C 保存待检。

2.3 检测方法: 取上述待检鸭血清, 每批同时点膜, 测定鸭血清中 DHBV-DNA 的动态水平。按缺口翻译试剂盒说明书方法, 用 32p 标记 DHBV-DNA 探针, 作鸭血清斑点杂交, 放射自显影膜片斑点, 测定吸光度 (A) 值 (490 nm), 计算血清 DHBV-DNA 密度, 以杂交斑点 A 值作为标本 DHBV-DNA 水平值。

2.4 药效计算: 计算每组不同时间点血清 DHBV-

DNA 水平的 $\bar{x} \pm s$, 各组用药前后比较采用配对 *t* 检验, 计算 DHBV-DNA 抑制率, 比较各组鸭血清 DHBV-DNA 抑制率的动态变化。给药组与病毒对照组比较, 采用成组 *t* 检验。

DHBV-DNA 抑制率 = (给药前 A 值 - 给药后 A 值) / 给药前 A 值 $\times 100\%$

3 结果

DHBV-DNA 感染鸭各组用药前后血清 DHBV-DNA 水平半定量结果见表 1。P1 25、50 mg/kg 组给药后与病毒对照组比较, 鸭血清 DHBV-DNA 水平无显著性降低; P1 100 mg/kg 组给药 10 d, 鸭血清 DHBV-DNA 水平较给药前显著降低 ($P < 0.05$), 与病毒对照组比较, P1 100 mg/kg 组给药后 10 d 及停药后 3 d, 鸭血清 DHBV-DNA 抑制率显著提高 ($P < 0.05, 0.01$), 药效较显著, 且随疗程增长而效果更明显, 停药后鸭血清 DHBV-DNA 持续降低。3 个剂量组 P2 在给药后鸭血清 DHBV-DNA 均降低, 100 mg/kg 剂量组给药 5、10 d 与给药前比较, DHBV-DNA 显著降低 ($P < 0.01, 0.05$); 与病毒对照组比较, 给药 5、10 d 鸭血清 DHBV-DNA 抑制率显著提高 ($P < 0.05, 0.01$), 药效显著, 停药后鸭血清 DHBV-DNA 有回升现象。

表 1 苦味叶下珠两种制剂 (P1 和 P2) 对 DHBV 感染鸭血清 DHBV-DNA 水平的影响 ($n=6$)

Table 1 Effects of P1 and P2 on DHBV-DNA level in duck serum with DHBV infection ($n=6$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	鸭血清 DHBV-DNA 水平 (A 值)				DHBV-DNA 抑制率/%		
		给药前	给药 5 d	给药 10 d	停药后 3 d	给药 5 d	给药 10 d	停药后 3 d
对照	—	1.085 ± 0.14	1.157 ± 0.18	1.242 ± 0.18	1.420 ± 0.10	-6.81	-14.73	-32.29
P1	25	1.203 ± 0.14	1.179 ± 0.12	1.251 ± 0.08	1.228 ± 0.10	1.50	-5.19	-2.66
	50	0.766 ± 0.21	0.665 ± 0.17	0.892 ± 0.26	0.914 ± 0.33	11.72*	-17.05	-16.48
	100	1.526 ± 0.20	1.568 ± 0.17	1.405 ± 0.18*	1.396 ± 0.15	-3.24	7.70*	7.94*
P2	25	1.185 ± 0.16	1.185 ± 0.28	1.236 ± 0.17	1.138 ± 0.13	0.20	-4.86	2.63*
	50	1.276 ± 0.32	1.489 ± 0.27	1.281 ± 0.25	1.868 ± 0.45	-19.42	-1.96	-47.12
	100	1.186 ± 0.24	1.038 ± 0.24**	1.026 ± 0.27*	1.286 ± 0.23	12.60*	14.10**	-9.67*
拉米夫定	25	1.384 ± 0.23	1.275 ± 0.22	0.683 ± 0.08**	1.212 ± 0.18	7.58	49.27**	10.87**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

刘庄等研究了苦味叶下珠不同品种和制剂体外抗乙型肝炎病毒 (HBV) 作用, 以该植物浓缩水提取物效果最好^[4]。Venkateswaran 证实苦味叶下珠水溶性提取物可抑制 HBV 内源性 DNA 多聚酶^[5]。Thyagarajan 等首次利用苦味叶下珠干粉胶囊 600 mg/d 口服治疗 HBsAg 携带者, 转阴率为 59%^[6]。Venkateswaran 应用鸭乙肝动物模型还发现, 同一苦味叶下珠全草浸液 ip 给药有效, 而 iv 给药无效。

目前普遍认为苦味叶下珠给药方式以全草粉末口服效果最佳, 原因是全草粉末活性成分不易丢失, 而煎服不能提取全部有效成分。

本实验通过鸭乙型肝炎模型证明了苦味叶下珠提取液具有更好的抗鸭乙肝病毒活性, 对病毒 DNA 的抑制率为全草粉末抑制率的 2 倍。说明利用水和乙醇可以充分提取出各种有效成分, 可以减少苦味叶下珠的服用量。而全草粉末虽然保留了大量的活性成分, 但是服药量少效果不明显, 且短期内不

易吸收。本实验结果对苦味叶下珠类药物产品生产具有重要的参考价值,对临床用药也具有重要的指导意义。加大给药量,增加治疗时间,增加实验动物数量,有可能获得更好的实验结果,进一步的研究正在进行中。

致谢:本实验得到中国医学科学院生物技术研究所在李壮老师的帮助。

References:

- [1] Gupta D R, Ahmed B. Nirurm: a new prenylated flavanone glycoside from *Phyllanthus niruri* [J]. *J Nat Prod*, 1984, 47(6): 958.
- [2] Thyagarajan S P, Thiruneelakuntan K, Subramanian S, et al. *In vitro* inactivation of HBsAg by *Eclipta alba* Hassk and

Phyllanthus niruri Linn [J]. *Ind J Med Res*, 1982, 76(Suppl): 124-130.

- [3] Wan Z X, Yu Q L, Yi Y H. Studies on the chemical constituents of common leafflower (*Phyllanthus urinaria*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(3): 134-135.
- [4] Liu Z, Fu X X, Zhang N L, et al. The inhibitory effect of Chinese herb *Phyllanthus* on hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Chin J Exp Clin Virol* (中华实验和临床病毒学杂志), 1997, 11(3): 282-285.
- [5] Venkateswaran P S, Millman I, Blumberg B S, et al. Effects of an extract from *Phyllanthus urinaria* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses; *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(1): 274-278.
- [6] Thyagarajan S P, Subramanian S, Thirumalasundari T, et al. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus [J]. *Lancet*, 1998, 11: 764-766.

荆防解毒合剂治疗感冒临床观察

王艳玲, 张曾擘

(天津中医药研究院附属医院, 天津 300120)

感冒是临床上最常见的上呼吸道感染性疾病,又分为普通感冒和流行性感,以秋、冬季多见,但一年四季均可出现,其中尤以风寒型感冒最常见。感冒的病源有多种,如鼻病毒、流感病毒、副流感病毒、腺病毒等,其中流感病毒可以导致很多并发症,如诱发鼻窦炎、气管-支气管炎、肺炎等,严重时可能因病毒感染造成中毒性休克、心力衰竭、呼吸衰竭而死亡。本院张曾擘教授根据多年的临床经验,在明代王肯堂的“荆防败毒散”基础上化裁而成“荆防解毒合剂”,治疗感冒 608 例,取得显著疗效。现报道如下。

1 临床资料

病例来源:自 2002 年至 2003 年底,分别在天津中医药研究院附属医院、天津市和平区中医医院、京津名中医门诊部 3 个医疗单位,选择符合观察条件的感冒患者 1 144 例,分组分型进行疗效观察。患者年龄:2~86 岁,平均年龄 39 岁。性别:男性 581 例,女性 563 例。

2 诊断标准

符合国家中医药管理局 1994 年颁布的《中医病症诊断疗效标准》:(1)鼻塞流涕,喷嚏,咽痒或痛,咳嗽。(2)恶寒发热,无汗或少汗,头痛,肢体酸楚。凡符合以上诊断标准,且发病在 48 h 以内,午后体温在 38℃ 以上或清晨体温在 37.5℃ 以上并无合并

或并发症者,将其分为 4 个证型:(1)风寒型 626 例:恶寒多,发热少,头痛无汗,鼻塞流清涕,肢体酸痛,或兼有咳嗽喉痒,苔薄白,脉浮或浮紧。(2)风寒化热型(含寒包热型)180 例:恶寒、无汗、身痛、喉痒等风寒闭表之证未解,已见咽干、便秘、苔薄黄等化热之征,或咳嗽不爽、口干咽痛、暗哑气喘等寒包热之征。(3)风热型 199 例:发热恶风,汗泄不畅,咳嗽喉燥,头胀口干;或咽部红肿作痛,便秘,痰稠黄,舌苔薄黄,脉浮数。(4)挟湿型(胃肠型)139 例:发热不扬,恶寒头重,肢体困倦,口淡胸闷,恶心呕吐,腹胀,大便或溏或泄,舌苔厚腻,脉濡。

3 治疗方法

3.1 荆防解毒合剂:羌活、防风、柴胡、连翘、薄荷、芦根、桔梗、枳壳等 15 味,制成口服液,含生药 1 g/mL。药物来源于天津中医药研究院附属医院制剂室。制剂批准文号[津药制字(2001)Z 第 0356 号]。该药符合 2005 版《中国药典》口服液项下标准。

3.2 治疗方法:采用随机表方式,随机抽取 608 例单纯性感冒患者,为荆防解毒合剂观察组,抽取 536 例分别作为清瘟解毒片(160 例)、通宣理肺片(45 例)、银翘解毒片(50 例)、藿香正气软胶囊(35 例)、康泰克(76 例)、天津感冒片(110 例)和抗病毒口服液(60 例)对照组。观察组与对照组病例数之比为