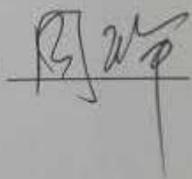


复旦大学药学院抗病毒药物研究室

实验动物伦理审批件

伦药批第(2012-05-KBD-ZP-01)号

项目名称	AP0100 抗乙肝病毒动物体内初步药效学试验		
项目类别	技术服务		
项目来源	云南白药企事业合作	经费(万元)	20.0万
申办单位	复旦大学药学院抗病毒研究室	单位负责人	周珮
研究部门	抗病毒研究室	项目负责人	周珮
		职 称	教授
伦理审查意见			
Δ 同意		Δ	
Δ 修改后同意			
Δ 不同意(项目终止或暂停)			
审批意见			
同意!			
主任(签名)			
	复旦大学药学院抗病毒研究室 (盖章)		
	2012年05月12日		

Ap0100 抗乙肝病毒动物体内初步药效试验及文献资料

项目负责人：周珮

试验单位：复旦大学药学院

试验参加者：周 伟 黄 海 史训龙 盛德鑫

试验日期：2012.6~2012.8

试验资料保存处：复旦大学药学院

联系人：周 珮

联系电话：02154237431

Ap0100、GR0113 抗乙肝病毒初步药效试验

一、试验目的:

观察 Ap0100（牡丹皮提取物）、GR0113（茜草提取物）体内抗乙肝病毒的药效作用。

二、试验材料和检测方法:

1. 毒株：鸭乙肝病毒（DHBV），新鲜分离的阳性麻鸭血清。

2. 动物模型：北京鸭，一日龄，上海青浦金连种禽场提供。

3. 动物试验分组：

牡丹皮组：600mg/kg 剂量组，300mg/kg 剂量组和 150mg/kg 剂量组

茜草组：300mg/kg 剂量组，150mg/kg 剂量组和 75mg/kg 剂量组

4、阳性对照药物：阿德福韦酯 10 mg/kg 剂量组

5、受试药物 Ap0100、GR0113 由云南白药中草药芯片有限公司杨晓源高工提供。

6、血清抗原检测：Dot blot 法

方法:

取 5ul 血清点膜（硝酸纤维素膜），PBST 溶液洗涤（3*10min），30%小牛血清封闭 15min；加入一抗，室温孵育 2 小时，PBST 溶液洗涤（3*10min）；加入二抗，室温孵育 2 小时，PBST 溶液洗涤（3*10min）；加入显色液显色，显色后以蒸馏水漂洗终止反应；Image Master TotalLab Software 测定斑点像素，计算抑制率。

仪器与试剂:

Image Master VDS 凝胶成像仪（Pharmacia Biotech）

硝酸纤维素膜（GE Healthcare）

Biodancer Hybridization 水浴摇床（NBS）

Arium631 纯水仪（Sartorius）

PBST 溶液:

0.01M PBS + 0.05% Tween 20, pH7.2

显色液:

4-氯- α -萘酚	3mg
甲醇	1ml
0.01M PBS, pH7.2	5ml
30% H_2O_2	5ul

7、血清 DHBV- DNA 检测: 地高辛试剂盒 (Dot-blot)

方法:

取 50ul 血清点样于膜(阳离子尼龙膜), 变性液处理 30min, 中和液 1、2 各处理 15min, 120 $^{\circ}C$ 烤膜 30min, 按地高辛试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I) 说明完成 Dot-blot 杂交显色, 显色后以蒸馏水漂洗终止反应; Image Master TotalLab Software 测定斑点像素, 计算抑制率。

仪器与试剂:

Image Master VDS 凝胶成像仪 (Pharmacia Biotech)

阳离子尼龙膜 (GE Healthcare)

DHG-9053A 型电热恒温干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)

Hybrigene 杂交仪 (Techne)

地高辛试剂盒 (Roche)

变性液:

NaOH	0.5mol/L
NaCl	1.5mol/L

中和液 1:

Tris-HCl	1mol/L
NaCl	0.6mol/L

中和液 2:

Tris-HCl	0.5mol/L
NaCl	3mol/L

8、肝脏 RNA 提取和检测: 采用 Trizol 试剂盒提取 RNA, 用 Real-time 方法检测肝脏 DHBV copy 数。

方法:

取 100mg 肝脏，加入 1ml Trizol 研磨成匀浆，离心取上清，0.2ml 氯仿抽提，取水相加入 0.5ml 异丙醇沉淀，离心取沉淀，1ml 75% 乙醇洗涤，200ul DEPC 水溶解沉淀，按 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒完成逆转录，按 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒检测 DHBV copy 数。

仪器与试剂:

Biofuge Stratos 高速离心机 (Heraeus)

RG-300A Rotor-Gene (Rcorbert)

PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒 (Takara)

PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒 (Takara)

DEPC 水:

0.1% DEPC-无菌水

9、肝脏 DHBV- DNA 检测: 地高辛试剂盒 (Southern-blot)

方法:

取 500mg 肝脏，加入 6ml 裂解液，研磨至匀浆，蛋白酶 K 消化过夜 (55°C)，10ml 酚/氯仿抽提，4°C 离心取上清，加入 12ml 乙醇沉淀，绕出 DNA，1ml 75% 乙醇洗涤，离心取沉淀，加入 300ul RNA 酶水溶液溶解，37°C 过夜，500ul 酚/氯仿抽提，离心取上清，1ml 无水乙醇沉淀，离心取沉淀，0.5ml 75% 乙醇洗涤，DNA 37°C 干燥 30min，加入 100ul 无菌水溶解，琼脂糖电泳检测 DNA 浓度。取 20ug DNA 进行 Eco I 酶切，琼脂糖电泳分离，胶变性 40min，dH₂O 洗涤，中和液中和 2*30min，20*SSC 转膜 (阳离子尼龙膜) 18 小时，120°C 烤膜 30min，按地高辛试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I) 说明完成 Southern-blot 杂交显色，显色后以蒸馏水漂洗终止反应; Image Master TotalLab Software 测定斑点像素，计算抑制率。

仪器与试剂:

Power PAC300 电泳仪 (Bio-Rad)

地高辛试剂盒 (Roche)

裂解液:

Tris-HCl

10mmol/L

EDTA	0.1mol/L (pH 8.0)
SDS	0.5%
酚/氯仿:	
饱和酚: 氯仿: 异丙醇 = 25: 24: 1	
变性液:	
NaOH	0.5mol/L
NaCl	1.5mol/L
中和液:	
Tris-HCl	1mol/L
NaCl	0.5mol/L
20*SSC:	
柠檬酸三钠	0.3mol/L
NaCl	3mol/L

三、Ap0100、GR0113 体内抗鸭乙肝病毒药效试验

一日龄北京雏鸭取血检测，阴性鸭静脉感染病毒后 7-10 天取血检测，去除阴性鸭。将阳性鸭按三个剂量随机分组，口服给药，一日一次，另设病毒对照组（给生理盐水）和阳性药物对照组阿德福韦酯 10mg/kg。给药后第 5、10 天和停药后 3 天取鸭血分离血清。停药后第 3 天杀剖鸭，采血、取肝，检测血清抗原及血清 DHBV-DNA，检测肝脏 DHBV-DNA，并提取肝脏 RNA 采用 Real-time 方法检测肝脏中 DHBV RNA copy 数。

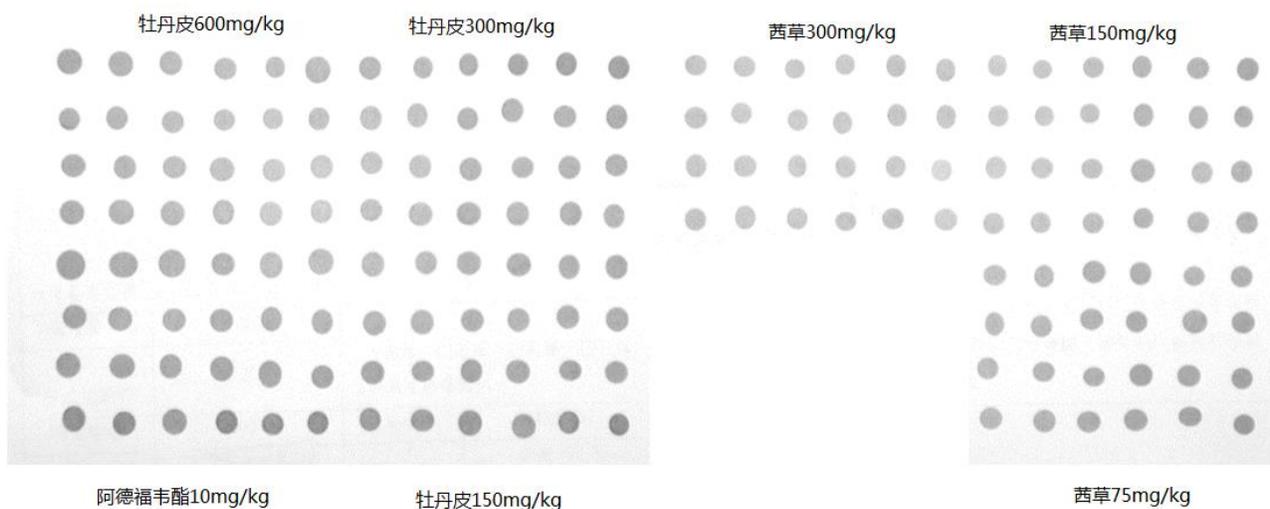
四、结果

1、对血清抗原的影响

	时间	平均值	抑制率
茜草 300mg/kg	0 (天)	12599 ±1224.997	
	5 (天)	12679.83±1434.351	0%
	10 (天)	11761.26 ±1908.933 (p=0.387)	6.6%
	13 (天)	13513.53 ±1312.192	0%
茜草 150mg/kg	0 (天)	15603.83±4848.439	
	5 (天)	14298.83 ±3111.413 (p=0.591)	8.4%

	10 (天)	15408.83±3812.097 (p=0.940)	0%
	13 (天)	15645.69 ±2847.81 (p=0.986)	0%
茜草 75mg/kg	0 (天)	17825.71 ±2863.617	
	5 (天)	20009.2±3559.495	0%
	10 (天)	20160.51±3510.867	0%
	13 (天)	20586.33 ±1539.606	0%
牡丹皮 600mg/kg	0 (天)	21645.33 ±5933.101	
	5 (天)	16434.83±3143.448 (p=0.087)	24.1%
	10 (天)	18201.41±3824.76 (p=0.260)	15.9%
	13 (天)	19766.53 ±5346.253 (p=0.577)	8.7%
牡丹皮 300mg/kg	0 (天)	20492.67±3641.49	
	5 (天)	18983.5±2597.621 (p=0.428)	7.4%
	10 (天)	18066.67±2443.612 (p=0.205)	11.8%
	13 (天)	19787.5 ±2456.746 (p=0.702)	3.4%
牡丹皮 150mg/kg	0 (天)	21491.5 ±2390.34	
	5 (天)	22519.75±1159.865	0%
	10 (天)	23996.72±1904.858	0%
	13 (天)	27341.52 ±2549.329	0%
阿德福韦酯 10mg/kg	0 (天)	28191.96 ±8559.847	
	5 (天)	22955.41±2379.44 (p=0.179)	18.5%
	10 (天)	28162.39±2758.868	0%
	13 (天)	30050.23±2551.754	0%

各组对抗原均未为显示显著抑制，见附图 1



附图 1 对血清抗原的影响

2、对肝脏中 DHBV-RNA 复制的影响

组别	剂量	抑制率
阿德福韦酯	10mg/kg	98.88% (p=0.104)
茵草	75mg/kg	37.46% (p=0.400)
	150mg/kg	59.60% (p=0.275)
	300mg/kg	89.58% (p=0.135)
	150mg/kg	0
牡丹皮	300mg/kg	10.09% (p=0.879)
	600mg/kg	14.69% (p=0.848)

以上结果显示：在鸭急性感染模型中，停药 3 天后，茵草提取物对肝脏 DHBV-RNA 水平复制具有明显抑制作用，但与阿德福韦酯 10mg/kg 比较，不如阿德福韦酯。 详见附表 1。

附表 1 对肝脏中 DHBV-RNA 复制的影响

组别		样品号	拷贝数	平均值	SD	抑制率
病毒阳性		24	1.72E+03			
		9	5.34E+02			
		62	1.03E+02			
		64	3.45E+03	1.45E+03	1.50E+03	
阿德福韦酯	10mg/kg	38	4.66E-02			
		89	6.22E+01			
		25	2.59E+00			
		53	1.69E-01	1.62E+01	3.06E+01	98.88%
茵草	小剂量	91	1.33E+03			
	75mg/kg	79	7.21E+02			
		78	6.01E+02			
		55	1.25E+03			
		40	8.18E+02			
		17	7.23E+02	9.07E+02	3.06E+02	37.46%
	中剂量	6	5.54E+02			
	150mg/kg	30	1.67E+03			
		76	3.62E+02			
		11	3.16E+02			
		84	2.47E+01	5.86E+02	6.36E+02	59.60%
	大剂量	59	1.62E+02			
	300mg/kg	22	7.03E+00			
		46	3.61E+02			

		70	7.44E+01	1.51E+02	1.54E+02	89.58%
牡丹皮	小剂量	16	3.85E+07			
	150mg/kg	36	2.80E+05			
		7	1.15E+07			
		34	4.56E+07			
		8	4.54E-03	1.92E+07	2.15E+07	0
	中剂量	1	4.52E+02			
	300mg/kg	37	4.96E+02			
		74	2.58E+03			
		43	1.70E+03	1.31E+03	1.03E+03	10.09%
	大剂量	82	1.01E+03			
	600mg/kg	21	4.73E+02			
		56	7.71E+00			
		61	3.46E+03	1.24E+03	1.54E+03	14.69%

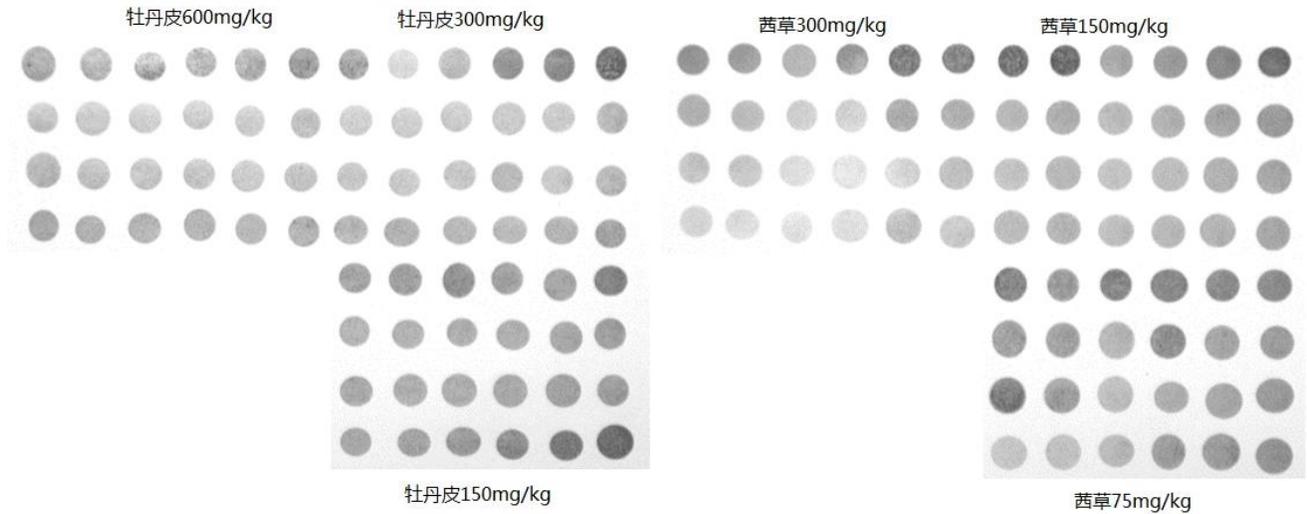
3、对血清中 DHBV-DNA 复制的影响

样品	天数	抑制率%
茵草 300mg/kg	5	34.64 (p=0.007) **
	10	53.77 (p<0.001) **
	13	56.01 (p<0.001) **
茵草 150mg/kg	5	25.43 (p=0.021) **
	10	33.36 (p=0.003) **
	13	32.79 (p=0.002) **
茵草 75mg/kg	5	10.77 (p=0.136)
	10	11.67 (p=0.321)
	13	29.47 (p=0.020) **
牡丹皮 600mg/kg	5	35.28 (p=0.004) **
	10	19.02 (p=0.114)
	13	2.38 (p=0.800)
牡丹皮 300mg/kg	5	41.97 (p=0.054) *
	10	39.04 (p=0.069)
	13	20.01 (p=0.316)
牡丹皮 150mg/kg	5	24.14 (p=0.009) **
	10	14.46 (p=0.055) *
	13	0.69 (p=0.964)
阿德福韦酯 10mg/kg	5	83.72 (p<0.001) **
	10	93.11 (p<0.001) **
	13	24.22 (p<0.005) **

以上结果显示：在鸭急性感染模型中，停药 3 天后，茵草提取物对血清 DHBV-DNA 水平复

制具有抑制作用，但与阿德福韦酯 10mg/kg 比较，不如阿德福韦酯。但是它对抑制的反跳在停药后也不是很明显。见附图 2。

附图 2 对血清中 DHBV-DNA 复制的影响

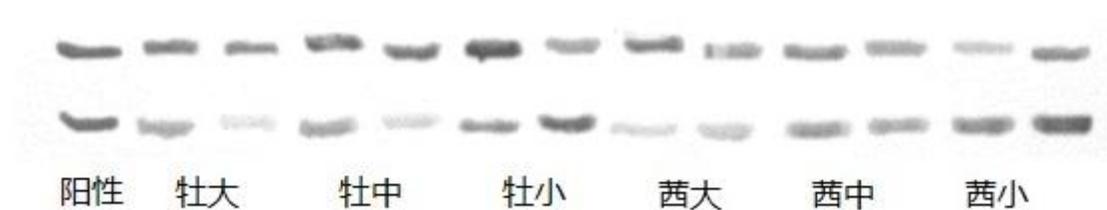


4、对肝脏 DHBV-DNA 复制的影响

组别	剂量	抑制率
阿德福韦酯	10mg/kg	46.52% (p<0.001)
茜草	300mg/kg	46.06% (p=0.008)
	150mg/kg	32.22% (p=0.002)
	75mg/kg	10.85% (p=0.628)
牡丹皮	600mg/kg	27.55% (p=0.104)
	300mg/kg	28.72% (p=0.072)
	150mg/kg	13.94% (p=0.479)

茜草和牡丹皮对肝脏 DHBV-DNA 均有抑制复制作用，见如图 3。

附图 3 对肝脏 DHBV-DNA 复制的影响



5、讨论:

1、以上结果显示茜草的抑制 DHBV-DNA 作用比牡丹皮略好，但是在抑制 DHBV-RNA 复制中茜草作用更为显著。

2、本次实验仅是初步检测，在蛋白方面的工作还要继续探讨。因为粗提物是不是有影响？

参考文献:

- 1、中华人民共和国卫生部药政局. 新药临床及临床前研究指导原则汇编. 1993。
- 2、黄正明, 杨新波, 曹文斌等. 水芹提取物抗鸭乙型肝炎病毒机理的研究. 科学通报, 1997, 17: 1863-1867.
- 3、赵艳玲, 蔡光明, 张新金等. 赋肝能抗病毒作用实验研究. 中国药学杂志, 2001, 5: 305-308.

报告人: 周珮

报告日期: 2012.8