

复方玉郎伞多糖对鸭乙型肝炎病毒诱导的肝损伤的影响

陶丽群,左巧云,李秀菊,陈春霞,黄仁彬*
(广西医科大学药理教研室,南宁 530021)

[摘要] 目的:研究复方玉郎伞多糖(CYLSP)在鸭乙型肝炎病毒(DHBV)持续性感染模型中对 DHBV 所致的肝损伤的保护作用。方法:采用 1 d 龄雏鸭接种广西麻鸭乙型肝炎病毒(DHBV)强阳性血清,接种 1 周后用聚合酶链式反应(PCR)法筛选出 DHBV 强阳性鸭 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,CYLSP 高、中、低剂量组(10,5,2.5 g·kg⁻¹)、拉米夫定(0.05 g·kg⁻¹)组和模型组,每日上午 ig 给药 1 次,连续 14 d。于用药前(T₀)、用药 7 d(T₇)和 14 d(T₁₄)及停药后 3 d(P₃)分别采血,同时检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的活性;在停药 3 d 后,取肝脏匀浆并除蛋白,检测肝匀浆液中总超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的含量;HE 染色处理肝脏组织切片,光镜观察病理学改变。结果:与同组 T₀ 及模型组比较,各给药组鸭血清高、中剂量治疗组给药 7 d(T₇)和 14 d(T₁₄)即能明显降低血清 ALT、AST 的活性,停药 3(P₃)天后,CYLSP 高剂量组仍能显示出持续有效,没有出现反跳现象(P<0.05 或 P<0.01);检测肝匀浆液中 SOD、GSH-Px 活性以及 GSH、MDA 的含量,CYLSP 高、中剂量组和拉米夫定组仍能显示出持续有效,没有出现反跳现象(P<0.05 或 P<0.01);HE 染色显示 CYLSP 可显著减轻鸭肝组织病理损伤程度。结论:CYLSP 对 DHBV 所致的肝损伤具有保护作用。

[关键词] 复方玉郎伞多糖;鸭乙型肝炎病毒;丙氨酸转氨酶;天冬氨酸转氨酶;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;谷胱甘肽;丙二醛

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0172-05
[doi] 10.11653/syfy2014050172

Effect of Compound Yulangsan Polysaccharide against Duck
Liver Injury Induced by Duck Hepatitis B Virus

TAO Li-qun, ZUO Qiao-yun, LI Xiu-ju, CHEN Chun-xia, HUANG Ren-bin*
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To study the inhibitory effect of compound Yulangsan polysaccharide (CYLSP) on duck hepatitis B virus (DHBV) persistent infection. Method: One-day old Guangxi brown spotted ducks infected with hepatitis B virus (DHBV) were used as the DHBV infected animal model. Fifty positive ducks were detected by PCR at one week after the infection of DHBV, then randomly divided into 5 groups, each group of 10, only CYLSP high, medium and low dose group (10, 5, 2.5 g·kg⁻¹) and lamivudine (0.05 g·kg⁻¹) group and model group, the daily morning lavage 1 time for 14 d. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected before treatment (T₀), 7 days (T₇), 14 days (T₁₄) after treatment, and 3 days after stopping treatment. At 3 days after stopping treatment, the livers were collected, homogenate was prepared to detect superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and reduced glutathion (GSH), malondialdehyde (MDA) levels, HE staining was used to observe the pathological

[收稿日期] 20131010(015)
[基金项目] 广西科学研究与科技开发攻关项目(桂科攻 10124008-6,桂科攻 0992003A-2);广西科技基础条件平台建设项目(12-97-20, 10-108-19),广西地方性高发疾病防治研究重点实验室基金(KFJJ2010-22)
[第一作者] 陶丽群,硕士研究生,从事抗病毒性肝炎药物研究,Tel:0771-5339805,E-mail:taoliquan158@163.com
[通讯作者] * 黄仁彬,教授、博士生导师,从事抗病毒性肝炎药、抗老年性痴呆药、抗心血管药研究工作,Tel:0771-5339805,E-mail:huangrenbin518@163.com

change. **Result:** Compared with T_0 and model group, the serum levels of ALT and AST were decreased significantly and 3 days after stopping treatment, CYLSP high dose group and lamivudine group still showed a protection effect ($P < 0.05$ or $P < 0.05$) SOD, GSH-Px activity and the content of GSH, MDA. CYLSP in high, middle dose group and lamivudine group showed a protection action. In CYLSP low dose group, no change of SOD, GSH-Px activity and GSH, MDA content was found, HE staining showed CYLSP significantly reduced the duck liver histopathologic damage degree. **Conclusion:** The compound Yulangsan polysaccharide has a protection action on duck liver injury induced by duck hepatitis B virus

[**Key words**] CYLSP; duck hepatitis B virus; AST; ALT; SOD; GSH-Px; GSH; MDA

乙型肝炎是感染乙型肝炎病毒(HBV)引起的一种常见传染病和多发病,易转化为慢性,甚至发展为肝硬化、肝癌。玉郎伞(YLS)为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Mittettia puichra* Kurzvar *laxior*(Dunn) Z. Wei 的叶子,具有舒筋活络、补虚润肺之功能,民间用于腰腿痛、风湿痛、慢性肝炎、肺结核等的治疗^[1]。本课题组多年研究证实玉郎伞提取物具有抗氧化和免疫调节作用,并对急、慢性实验性肝损伤均有明显的保护作用^[2-3]。玉郎伞多糖(Yulangsan Polysaccharide)是玉郎伞提取物中主要的有效成分,药理实验表明玉郎伞多糖能明显延长小鼠游泳时间、耐缺氧时间及耐高温时间,显著提高小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,增加还原型谷胱甘肽(GSH)含量及减少丙二醛(MDA)含量,具有较好的抗衰老作用^[4]。六月青(LYQ)系爵床科(Acanthaceae)肖鸡笼属植物肖鸡笼 *Taraphochlamys affinis*(Griff) Bremekhu 的干燥地上部分^[5],为广西民间特色药。初步研究发现 LYQP 有明显的体外抗氧化作用^[6]。前期研究发现,六月青多糖对小鼠的急性化学性肝损伤具有保护作用^[7]。本实验以鸭乙型肝炎病毒动物模型,探讨复方玉郎伞多糖(由玉郎伞多糖与六月青多糖组成,简称 CYLSP)对乙型肝炎病毒的影响,观察其在体内对鸭乙型肝炎病毒诱导的肝损伤的保护作用,为开发 CYLSP 用于乙型肝炎治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 1日龄广西麻鸭,体重(50 ± 5)g,雌雄不限,由广西畜牧良种养殖场提供。常规饲养,饲养环境:温度 25℃左右,相对湿度 60%~80%,每天光照 12 h,房间通风换气,保持空气流通。

1.2 药物 玉郎伞多糖是从玉郎伞(YLS)原植物经考证为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Milletia pulchra* Kurz var-*laxior*(Dunn) Z. Wei 的叶子,六月青(LYQ)系爵床科(Acanthaceae)肖鸡笼属植物肖鸡笼 *Taraphochlamys affinis*(Griff) Bremekhu 的干燥地

上部分,批号 20110920。由广西医科大学药理学教研室采用水提醇沉的最佳工艺提取,经薄层色谱、紫外光谱、凝胶柱层析及高效液相色谱鉴定多糖纯度高^[8],拉米夫定(lamivudine):葛兰素史克制药(苏州)有限公司产品,批号 12040001。

1.3 试剂 丙氨酸转氨酶(ALT,批号 20120420)和天冬氨酸转氨酶(AST,批号 20120420)改良赖式法检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),超氧化物歧化酶(SOD,批号 20120427)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号 20120523)、谷胱甘肽(GSH,批号 20120518)、丙二醛(MDA,批号 20120523)、考马斯亮蓝(批号 20120510)试剂盒(均为南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 广西麻鸭乙肝动物模型的建立^[9] 采用健康成年广西麻鸭产的蛋孵化 1 日龄雏鸭,颈静脉注射 0.2 mL DHBV-DNA 强阳性病毒血清。接种 1 周后分别从颈静脉采血约 0.5 mL,装入一次性 Eppendoff 管中,整个过程不能交叉污染。4 000 r·min⁻¹离心 5 min,取血清,-20℃保存备用。采用聚合酶链式反应(PCR)法检测筛选出阳性感染鸭。

2.2 实验分组及用药^[9-10] 经 PCR 法检测筛选出感染强阳性鸭共 50 只,饲养到 13 d 作为实验动物进行药物治疗,将 50 只鸭随机分为 5 组,每组 10 只。受试药配成质量浓度为 2 g·mL⁻¹溶液,每次使用时分别取 5,2.5,1.25 mL 备用液,加蒸馏水稀释 10 mL,得 CYLSP 3 个剂量组给药浓度,即按生药计算分别为 1,0.5,0.25 g·mL⁻¹,各组灌胃给药容积 10 mL·kg⁻¹。CYLSP 高、中、低剂量分别为 10,5,2.5 g·kg⁻¹,阳性对照组 lamivudine 0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹,模型组等量的生理盐水,各组动物在同样条件下饲养,空腹灌胃给药 14 d。于用药前(T_0)、用药 7 d(T_7)、14 d(T_{14})及停药 3 d(P_3)时,从颈静脉采血,每只采血 2 mL 左右,4 000 r·min⁻¹,离心 10 min,分离血清,-20℃保存备用。

2.3 血清 ALT,AST 的测定 采用改良赖式法,具体操作方法按试剂盒要求操作,用分光光度计于 505 nm 波长处测吸光度(*A*)。

2.4 肝匀浆液中 SOD,GSH-Px 活性以及 GSH,MDA 含量的测定 按照试剂盒提供的测定说明,SOD,GSH-Px 活性以及 GSH,MDA 含量的测定采用分光光度计法。

2.5 鸭肝脏病理检测 停药 3 d 后,将每只实验动

物处死,立即摘取肝脏,每只实验动物均于肝右叶同一部位取大小约为 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 的肝组织用 4% 的多聚甲醛固定,常规脱水石蜡包埋切片,HE 染色后光镜下观察鸭肝组织损伤程度。依据 Scheuer^[11] 在第九届亚太肝病会议上,提倡用改良的 Knodell 指标来评价病变程度,将病变分为汇管区及其周围和小叶内炎症及纤维化 3 部分,各依程度划分为 4 级。见表 1。

表 1 肝脏病理检测炎症活动度分级

炎症活动度分级			纤维化程度	
Grade	汇管区及周围	小叶内	Stage	纤维化程度
G0	无或轻度炎症	无炎症	S0	无
G1	汇管区炎症	炎症但无坏死	S1	无或汇管区扩大纤维化
G2	轻度碎屑状坏死	点灶状坏死或嗜酸小体	S2	汇管区周围纤维化或纤维隔形成,小叶结构保留
G3	中度碎屑状坏死	重度灶状坏死	S3	纤维化伴小叶结构紊乱 (distortion),无肝硬化
G4	重度碎屑状坏死	损伤包括桥接坏死 (多小叶坏死)	S4	可能的或肯定的肝硬化

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后比较采用配对资料 *t* 检验,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对鸭乙型肝炎所致肝损伤鸭血清 ALT,AST 的滴度的影响 与 T_0 相比,各给药组均能降低血清

ALT,AST 活性,停药 3 d 后,CYLSP 高剂量组没有反跳现象。与模型组相比,CYLSP 高、中剂量组给药 1 周后,血清 ALT,AST 活性均显著性降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着药物浓度和作用时间的增加,其抑制作用逐渐增强。停药 3 d 后,CYLSP 高剂量组血清 ALT,AST 的活性没有反跳现象。见表 2 ~ 3。

表 2 CYLSP 对乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清 ALT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) U · L⁻¹

组别	剂量/g · kg ⁻¹ · d ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型对照	—	79.06 ± 17.68	80.37 ± 19.58	77.18 ± 13.78	83.56 ± 16.84
lamivudine	0.05	78.66 ± 15.30	42.11 ± 16.61 ^{2,4)}	28.93 ± 9.07 ^{2,4)}	32.80 ± 11.08 ^{2,4)}
CYLSP	10	79.40 ± 16.59	46.07 ± 22.84 ^{2,4)}	41.52 ± 6.77 ^{2,4)}	33.75 ± 14.94 ^{2,4)}
	5	78.62 ± 14.02	60.68 ± 21.19 ^{1,3)}	50.34 ± 16.76 ^{2,4)}	70.20 ± 23.74
	2.5	77.98 ± 14.61	70.63 ± 20.44	63.12 ± 20.27	71.75 ± 21.55

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同组 T_0 比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 4 同)。

表 3 CYLSP 对乙型肝炎病毒致肝损伤鸭血清 AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) U · L⁻¹

组别	剂量/g · kg ⁻¹ · d ⁻¹	T ₀	T ₇	T ₁₄	P ₃
模型对照	—	106.21 ± 9.26	108.60 ± 13.58	109.23 ± 13.20	108.07 ± 17.34
lamivudine	0.05	107.79 ± 9.35	84.43 ± 10.71 ^{2,4)}	71.82 ± 11.78 ^{2,4)}	80.55 ± 13.49 ^{2,4)}
CYLSP	10	107.66 ± 5.75	88.70 ± 11.86 ^{2,4)}	75.98 ± 12.14 ^{2,4)}	68.39 ± 12.82 ^{2,4)}
	5	107.45 ± 7.88	93.30 ± 15.31 ^{1,3)}	81.02 ± 13.62 ^{2,4)}	90.37 ± 20.11 ³⁾
	2.5	106.12 ± 4.89	98.30 ± 15.78	89.90 ± 17.87 ^{1,3)}	95.33 ± 17.86

3.2 对鸭乙型肝炎所致肝损伤肝匀浆液中 SOD,GSH-Px 活性以及 GSH,MDA 含量的影响 与模型组比较,lamivudin 组,CYLSP 高、中剂量组停药 3 d 后肝匀浆液中 SOD,GSH-Px 活性明显升高,GSH 的

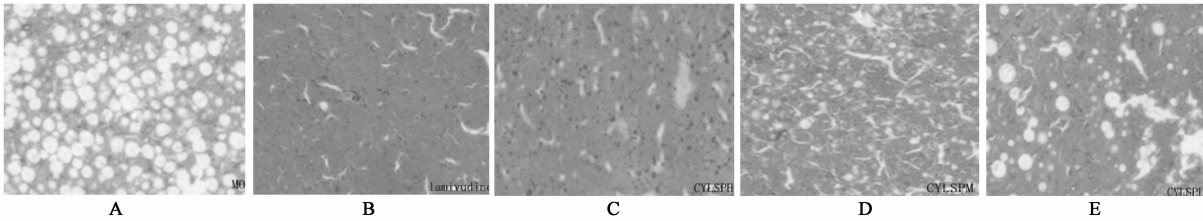
含量明显升高,MDA 的含量明显降低,CYLSP 低剂量组肝匀浆液中 SOD,GSH-Px 的活性,GSH,MDA 含量没有明显变化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

表 4 CYLSP 对鸭肝脏匀浆液 SOD, GSH-Px 活性及 GSH, MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH-Px/U	GSH/mg	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
模型对照	—	218.69 $\pm$ 56.04	109.28 $\pm$ 18.17	33.35 $\pm$ 8.15	57.22 $\pm$ 9.89
Lamivudine	0.05	278.43 $\pm$ 26.08 ²⁾	145.76 $\pm$ 17.70 ²⁾	45.29 $\pm$ 5.23 ²⁾	27.25 $\pm$ 7.10 ²⁾
CYLSP	10	283.30 $\pm$ 29.64 ²⁾	144.99 $\pm$ 10.76 ²⁾	54.76 $\pm$ 11.36 ²⁾	26.21 $\pm$ 8.67 ²⁾
	5	273.36 $\pm$ 52.33 ¹⁾	129.55 $\pm$ 19.88 ¹⁾	43.14 $\pm$ 5.26 ²⁾	40.58 $\pm$ 16.11 ¹⁾
	2.5	255.40 $\pm$ 67.98	117.48 $\pm$ 20.29	39.17 $\pm$ 5.53	47.90 $\pm$ 16.13

3.3 CYLSP 对鸭肝脏病理组织学的影响 病毒性肝炎主要病理变化是肝细胞变性(中、重度水变性或脂肪变性)以及坏死间质性炎症。实验中观察切片,模型组肝细胞出现弥漫性重度胞浆疏松化,细胞气球样变性;高剂量组肝病变与 lamivudine 组相似,结构基本完整,个别细胞有气球样变性,说明

CYLSP 具有保肝作用;CYLSP 中剂量组肝细胞部分胞浆疏松化,少部分细胞有气球样变性,大多细胞正常;CYLSP 低剂量组肝细胞弥漫性重度胞浆疏松化,细胞气球样变性严重,由此可见其保肝作用与药物剂量大小有一定的量效关系。结果见图 1。



A. 模型对照组;B. 拉米夫定 0.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;C. CYLSP 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. CYLSP 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. CYLSP 2.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 CYLSP 对 DHBV 致肝损伤鸭肝组织病理学检查影响 (HE, $\times 200$)

根据该标准将麻鸭肝组织病理结果进行分级,经秩和检验发现,与模型对照组比较,lamivudine 组和 CYLSP 高、中、低剂量组均存在统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 5。

表 5 肝损伤麻鸭病理检查结果 ($n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	G0	G1	G2	G3	G4	P
模型对照	—	0	0	2	6	2	—
lamivudine	0.05	2	6	1	1	0	< 0.01
CYLSP	10	1	7	1	1	0	< 0.01
	5	0	3	4	2	1	< 0.01
	2.5	0	1	5	3	1	< 0.05

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

乙型肝炎抗病毒药物开发和评价中的重要环节之一就是建立一种方便有效的体内病毒感染模型。HBV 是比较严格的嗜肝 DNA 病毒,其感染的宿主范围狭窄,具有明显的种属特异性,Mason 等^[12]观察到鸭乙肝病毒直径约为 40 nm,其形态与 HBV 相似,说明鸭乙型肝炎病毒与人乙型肝炎病毒属于同一病毒属。本课题组前期做了大量的调查研究工

作,发现广西南宁地区成年麻鸭对 DHBV 易感,是研究抗乙型肝炎药物较理想的动物模型^[13]。由于麻鸭易于繁育、饲养等,容易在麻鸭等品种的雏鸭中获得实验感染成功和建立 DHBV 持续感染状态的动物模型,从而建立一个与 HBV 感染相近的体内实验系统。目前因抗病毒药物的不良反应及耐药株的出现,故对中草药及其提取成分的抗 HBV 作用的研究逐渐受到重视。

本实验以 1 日期龄广西麻鸭颈静脉感染 DHBV 的方法来建立鸭乙型肝炎动物模型,研究对鸭乙型肝炎病毒诱导肝损伤的保护作用。一般认为,ALT 活性上升作为肝细胞浆膜损伤的标志,而 AST 活性作为线粒损伤的重要指标,可反映肝脏损伤程度^[14],血清 ALT 和 AST 水平可用于观察药物的保肝降酶效果^[15]。结果表明,与 T₀ 比较,各给药组均能降低血清 AST,ALT 活性且高剂量组无反跳现象。模型组 AST,ALT 活性明显升高,CYLSP 高、中剂量组可显著降低血清 ALT 和 AST 的活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明 CYLSP 具有很好的保肝降酶作用且抗病毒效果与药物剂量大小有一定的量效关系。

生物体内存在氧化与还原的平衡调节体系，一方面机体产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可与生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸反应，产生脂质过氧化作用，形成大量的脂质过氧化物，其中 MDA 最具代表性；另一方面机体又可通过由以 SOD 为代表的抗氧化酶的抗氧化防御体系清除脂质过氧化物，以达到动态平衡。SOD 的活性变化成为最常用的判定药物护肝作用及药物抗氧化作用的重要指标，本研究中发现，模型组 SOD 和 GSH-Px 的活性均明显下降，体内自由基失平衡，引起脂质过氧化产物 MDA 含量显著增加，而 CYLSP 高、中剂量组显著提高 SOD、GSH-Px 的活性，降低 MDA 的含量，鸭肝脏病理切片表明 CYLSP 可以减轻 DHBV 引起的肝损伤，说明 CYLSP 具有保护肝脏的作用。

综合我们前期的研究结果可以推测，CYLSP 可能是通过抑制 HBV-DNA 复制，同时提高机体免疫功能达到抗 HBV 的作用。CYLSP 高、中剂量组均能明显降低血清 AST 和 ALT 的活性，明显增加 SOD 及 GSH-Px 的活性，降低脂质过氧化产物 MDA 的生成，病理切片观察高剂量组肝细胞结构完整，无明显肝损伤变化，说明 CYLSP 具有较好的对肝损伤的保护的作用和开发前景。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科技出版社, 1992: 31.

[2] 焦杨, 段小群, 黄仁彬, 等. 玉郎伞提取物对超氧阴离子自由基和羟自由基的抑制和清除作用[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(1): 22.

[3] 黄仁彬, 段小群, 焦杨, 等. 玉郎伞提取物对小鼠急性化学性肝损伤保护作用及其机制的研究[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(6): 874.

[4] 黄忠仕, 黄仁彬, 林兴, 等. 龙眼参粗多糖抗衰老作用

的实验研究[J]. 中华现代中西医杂志, 2004, 2(2): 97.

[5] 林兴, 黄权芳, 黄仁彬, 等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材, 2005, 28(7): 541.

[6] 刘曦, 黄仁彬, 朱金芳, 等. 六月青多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008(23): 1983.

[7] 苏洁寒, 荣延平, 蒋伟哲, 等. 复方六月雪对急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(4): 497.

[8] 林兴, 蒋伟哲, 焦杨, 等. 玉郎伞多糖化学成分的研究[J]. 中成药, 2009, 31(6): 903.

[9] 张士军, 林军, 蒋伟哲, 等. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒的抑制作用[J]. 中药材, 2007, 30(2): 191.

[10] 黄权芳, 杨辉, 韦刚, 等. 山芝麻抗鸭乙型肝炎病毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志. 2011, 17(20): 180.

[11] Scheuer P J. Taxonomy of chronic hepatitis[M]. In: IX th Biennial Scientific Meeting Ascia-Pacific association for the study of the liver. 1994: 403.

[12] Mason W S, Seal G, Summers J. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus [J]. J Virol, 1980, 36(3): 829.

[13] Delmas J, Schorr O, Jamard C, et al. Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus - infected hepatocytes *in vivo* and *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 425.

[14] 陈克平, 徐白泉, 李丽, 等. 乙肝患者体内 HBV 复制与肝损伤的相关性探讨[J]. 山东医药, 2009, 49(51): 33.

[15] Kato Y, Onishi H, Macjiad Y. Biological characteristics of lactosam inated *N*-succinyl-chitosan as a liver specific drug carrier in mice [J]. J Con Trol Release, 2001, 70(3): 295.

[责任编辑 聂淑琴]