

# 复方芪珠颗粒对慢性乙型肝炎患者细胞免疫的影响

朱银芳 顾锡炳 过小叶 严志函 蒲云川 徒康宛 华 忠 裴 豪

**摘要** **目的** 探讨芪珠颗粒对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者细胞免疫的影响。方法 将拉米夫定(lamivudin, LAM)治疗 CHB 患者 6 个月后发生部分病毒学应答的 103 例(HBeAg 阳性)随机分为治疗组(50 例)和对照组(53 例),两组均给予 LAM100 mg 口服,每日 1 次,加阿德福韦酯(Adefovir Dipivoxil, ADV)10 mg 口服,每日 1 次。治疗组加用中药复方芪珠颗粒,每天 1 剂。比较两组治疗 1 年后的 HBV DNA 转阴率、HBeAg 血清学转换、HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)、非特异性 CTL 和 NK 细胞水平。**结果** 治疗 1 年后,治疗组 HBV DNA 转阴率[44 例(88.0%)]略高于对照组[41 例(77.4%)],但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗组 HBeAg 血清学转换率[16 例(32.0%)]高于对照组[8 例(15.1%)],差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组 HBV 特异性 CTL 水平( $0.79\% \pm 0.07\%$ )、非特异性 CTL 水平( $19.4\% \pm 1.8\%$ )和 NK 细胞水平( $14.1\% \pm 1.5\%$ )均高于对照组(分别为  $0.58\% \pm 0.08\%$ 、 $17.5\% \pm 1.7\%$  和  $11.1\% \pm 1.5\%$ ),差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 对 LAM 治疗 CHB 发生部分病毒学应答的患者采用 ADV 加芪珠颗粒治疗,能提高患者的特异性和非特异性细胞免疫功能,从而提高 HBeAg 血清学转换率。

**关键词** 复方芪珠颗粒;慢性乙型肝炎;拉米夫定;阿德福韦酯;细胞毒性 T 淋巴细胞;自然杀伤细胞

Effect of Compound Qizhu Granule on Cellular Immunity of Chronic Hepatitis B Patients ZHU Yin-fang, GU Xi-bing, GUO Xiao-ye, YAN Zhi-han, PU Yun-chuan, TU Kang-wan, HUA Zhong, and PEI Hao Department of Hepatology, Wuxi No. 5 People's Hospital, Jiangsu (214005), China

**ABSTRACT** **Objective** To explore the effect of Compound Qizhu Granule (CQG) on cellular immunity of chronic hepatitis B (CHB) patients. **Methods** Totally 103 CHB patients treated with lamivudin (LAM) for 6 months, who had partial virological response (HBeAg positive) were randomly assigned to two groups, 50 in the treatment group and 53 in the control group. All patients took LAM 100 mg (once a day) plus ADV 10 mg (once a day). Patients in the treatment group additionally took CQG, one dose per day. After one-year treatment hepatitis B virus (HBV) DNA negative rates, HBeAg seroconversion, levels of HBV specific cytotoxic T lymphocyte (CTL), non-specific CTL and natural killing (NK) cells were compared between the two groups. **Results** After 1-year treatment, HBV DNA negative rate of the treatment group was 88.0% in 44 cases, slightly higher than that of the control group (41 cases, 77.4%), but with no statistical difference ( $P > 0.05$ ). HBeAg seroconversion of the treatment group was 32.0% in 16 cases, higher than that of the control group (8 cases, 15.1%), with statistical difference ( $P < 0.05$ ). Levels of HBV specific CTL ( $0.79\% \pm 0.07\%$ ), non-specific CTL ( $19.4\% \pm 1.8\%$ ) and NK cells ( $14.1\% \pm 1.5\%$ ) of the treatment group were higher than those of the control group ( $0.58\% \pm 0.08\%$ ,  $17.5\% \pm 1.7\%$ , and  $11.1\% \pm 1.5\%$ , respectively; all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Treating CHB patients with partial virological response by ADV plus CQG could improve specific and non-specific cellular immunity, thereby elevating HBeAg seroconversion rate.

**KEYWORDS** Compound Qizhu Granule; chronic hepatitis B; Lamivudin; Adefovir Dipivoxil; cytotoxic T lymphocyte; natural killing cell

基金项目:无锡市医院管理中心医学科技发展基金项目(No.YGZ013)

作者单位:江苏省无锡市第五人民医院中西医结合肝病科(江苏 214005)

通讯作者:顾锡炳, Tel: 13812051392, E-mail: gxb188681@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1178

目前拉米夫定 (lamivudin, LAM) 是广泛用于治疗慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 的有效抗病毒药物之一, 治疗后发生部分病毒学应答, 耐药率较高, 加用阿德福韦酯 (Adefovir Dipivoxi, ADV) 治疗, 能取得较好疗效, 但 HBeAg 血清学转换 (HBV DNA 转阴、HBeAg 转阴、抗 HBe 转阳) 率较低。本试验对 LAM 治疗 CHB 发生部分病毒学应答者使用 ADV 联合中药复方芪珠颗粒与仅使用 ADV 进行对比, 以观察中药复方芪珠颗粒对这类患者的 HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)、非特异性 CTL、NK 细胞和 HBeAg 血清学转换的作用。

### 资料与方法

1 诊断标准 CHB 诊断参考《慢性乙型肝炎防治指南》标准<sup>[1]</sup>。

2 纳入及排除标准 纳入标准: HBV DNA  $\geq 10^5$  拷贝/mL; HBeAg 阳性; ALT > 正常参考值上限 2 倍; 人白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-A2 阳性; 18 岁以上; 病程 1 ~ 10 年; 获得本院伦理委员会同意, 患者签署知情同意书。排除标准: 甲型、丙型、丁型、戊型肝炎病毒感染; 自身免疫性疾病史; 嗜酒史; 肝毒性药物使用史; 患 CHB 后未用过核苷 (酸) 类似物和干扰素等抗病毒药物或免疫调节剂; LAM 和 ADV 耐药。

3 一般资料 321 例均为 2009 年 6 月—2012 年 4 月江苏省无锡市第五人民医院的门诊或住院的 CHB 患者。用 LAM [葛兰素史克制药有限公司生产, 批次号: 10010056, 11030013, 12030097] 治疗, 100 mg 口服, 每天 1 次, 治疗 6 个月后发生完全病毒学应答 (HBV DNA 低于检测下限, 即 < 500 拷贝/mL) 212 例 (66.0%), 原发性治疗失败 (HBV DNA 较基线下降 < 2 Igu/mL) 6 例 (1.9%), 部分病毒学应答 (HBV DNA 较基线下降  $\geq 2$  Ig IU/mL) 103 例 (32.1%), 与文献报道相似<sup>[2]</sup>。YMDD 变异 2 例 (0.6%, 为原发性治疗失败的病例, 均为 rtM204V + rtL180M 变异)。将部分病毒学应答 103 例 CHB 患者按随机数字表分为治疗组 (50 例) 和对照组 (53 例)。治疗组男 30 例 (60.0%), 女 20 例 (40.0%), 年龄 19 ~ 59 岁, 平均 (35  $\pm$  8) 岁, 病程 1 ~ 10 (4.5  $\pm$  1.2) 年。对照组 53 例中, 男 33 例 (62.3%), 女 20 例 (37.7%), 年龄 18 ~ 59 (35  $\pm$  8) 岁, 病程 1 ~ 10 (4.4  $\pm$  1.3) 年。另选择 30 名为健康献血员作为健康组, 其中男 22 名 (73.3%), 女 8 名 (26.7%), 平均年

龄 (35  $\pm$  7) 岁。三组一般资料比较 (表 1), 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 治疗组与对照组治疗前 HBV DNA、ALT、TBIL 及 Alb 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HBV DNA (lg 拷贝/mL)	ALT (U/L)	TBIL ( $\mu$ mol/L)	Alb (g/L)
治疗	50	4.0 $\pm$ 1.0	57 $\pm$ 11	15.4 $\pm$ 2.2	41.2 $\pm$ 0.3
对照	53	4.0 $\pm$ 1.0	57 $\pm$ 10	16.0 $\pm$ 2.1	41.2 $\pm$ 0.3

4 治疗方法 两组均给予 LAM (葛兰素史克制药有限公司生产, 批号: 10010056、11030013 和 12030097) 100 mg 口服, 每日 1 次, 加 ADV (葛兰素史克制药有限公司生产, 批号: 10035046, 11125052, 12075043) 10 mg 口服, 每日 1 次。治疗组加用中药复方芪珠颗粒 (黄芪 15 g、叶下珠 20 g、土茯苓 15 g、虎杖 15 g、白花蛇舌草 15 g、赤芍 10 g、丹参 10 g, 江苏省江阴天江药业有限公司) 每天 1 剂口服。根据《慢性乙型肝炎防治指南》标准<sup>[1]</sup>, 两组患者均治疗 1 年以上。

### 5 观察指标及方法

5.1 肝功能检测 采用日本 Olympus 公司 AU600 型全自动生化分析仪检测。

5.2 HBVM 及 HBV DNA 检测 HBVM (HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc) 采用 1235 全自动时间分辨荧光法, 苏州新波试剂 (苏州新波技术有限公司生产) 检测, HBsAg 批号: 8600019233, 抗-HBs 批号: 8600019616, HBeAg 批号: 8300019670, 抗-HBe 批号: 8600019491, 抗-HBc 批号: 8600018910。HBV DNA 采用用实时荧光定量 PCR 法, 上海科华试剂 (上海科华生物工程股份有限公司生产) 检测, 批次号: 14020111。

5.3 HLA-A<sub>2</sub> 等位基因型鉴定 取 100  $\mu$ L 肝素钠抗凝新鲜全血, 加入检测管和对照管, 分别加入 HLA-A<sub>2</sub> - 藻红蛋白及同型对照 10  $\mu$ L, 室温避光孵育 30 min, 经溶血处理后用流式细胞仪 (Beckman-coulter 3XL) 检测, 试剂购自英国 Proimmune 公司, 批号: 2202593。

5.4 HBV 特异性 CTL 的检测 试管中加入 10  $\mu$ L 藻红蛋白标记的 HLA-肽四聚体和 CD8<sup>-</sup> 异硫氰酸荧光素、CD3-PC5, 和 HBVcore18 - 27 抗原肽 1  $\mu$ L, 再加入 100  $\mu$ L 的肝素抗凝血, 同时做同型对照 (不加抗原肽的非特异性抗体), 混匀室温避光孵育 20 min, 溶血洗涤后上流式细胞仪检测, 以 CD3<sup>+</sup> 淋巴细胞设门计数 50 000 个 CD8<sup>+</sup> 细胞, 同时计数 CD8<sup>+</sup> 和 HLA-肽四聚体双阳性细胞为特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞, 并以

占总计数 CD8<sup>+</sup> 细胞的百分比表示,试剂购自美国 Beckman Coulter 公司。

**5.5 非特异性 CTL 和 NK 细胞的检测** 取 100 μL 乙二胺四乙酸二钾抗凝新鲜全血加入检测管和对照管,分别加入单克隆抗体及同型对照 10 μL,室温避光孵育 15 min,经溶血处理后上流式细胞仪检测。所用试剂购自美国 Beckman coulter 公司。

**5.6 LAM 和 ADV 耐药检测** HBV 耐药位点检测应用多重聚合酶连接反应——连接酶检测反应分型法 (PCR-LDR),引物、探针由上海东华大学合成,电泳胶、缓冲液、内参试剂均购自美国 ABI 公司;所用仪器为 ABI 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 3130 DNA Sequencer,购自美国 ABI 公司。实验按说明书操作。

**6 不良反应观察** 观察与复方苈珠颗粒有关的不良反应:恶心、呕吐、腹痛、腹泻、皮疹,每 2 个月检测外周血白细胞、红细胞、血小板,尿蛋白、肾功能(尿素氮和肌酐)和心电图,观察复方苈珠颗粒对外周血细胞、肾脏和心脏的影响。

**7 统计学方法** 用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, *t* 检验,计数资料用  $\chi^2$  检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 两组治疗后 HBV DNA 转阴率、HBeAg 血清学转换率、耐药情况及肝功能恢复情况比较(表 2)** 与对照组比较,治疗组治疗后 HBeAg 血清学转换率升高(*P* < 0.05)。两组治疗后 HBV DNA 转阴率、耐药情况及肝功能恢复情况比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

**2 三组治疗前后 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 及 NK 细胞水平比较(表 3)** 与本组治疗前比较,治疗组治疗后 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 及 NK 细胞水平均升高(*P* < 0.01),对照组治疗后 HBV 特异性 CTL 水平升高(*P* < 0.01)。与健康组比较,两个患者组治疗前 NK 细胞水平均降低(*P* < 0.01)。与对照组同期比较,治疗组治疗后 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 及 NK 细胞水平均升高(*P* < 0.01)。

表 3 三组治疗前后 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL 及 NK 细胞水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	例数	HBV 特异性 CTL (%)	非特异性 CTL (%)	NK 细胞 (%)
治疗	治疗前	50	0.42 ± 0.05	17.7 ± 1.7	11.0 ± 1.9 <sup>△</sup>
	治疗后 1 年	50	0.79 ± 0.07 <sup>*▲</sup>	19.4 ± 1.8 <sup>*▲</sup>	14.1 ± 1.5 <sup>*▲</sup>
对照	治疗前	53	0.41 ± 0.04	17.6 ± 1.9	11.1 ± 1.7 <sup>△</sup>
	治疗后 1 年	53	0.58 ± 0.08 <sup>*</sup>	17.5 ± 1.7	11.0 ± 1.5
健康		30	—	15.8 ± 5.0	15.0 ± 4.2

注:与本组治疗前比较,<sup>\*</sup>*P* < 0.01;与健康组比较,<sup>△</sup>*P* < 0.01;与对照组同期比较,<sup>▲</sup>*P* < 0.01

**3 不良反应** 治疗组未发现与复方苈珠颗粒有关的不良反应。

## 讨 论

LAM 是目前治疗 CHB 的有效药物之一<sup>[3]</sup>。LAM 治疗 CHB 的优点是不良反应发生率低,安全性好,但病毒耐药突变的发生率较高。CHB 患者的抗病毒治疗早期病毒学应答情况可预测长期疗效和耐药发生率,早期病毒学应答不佳者长期疗效较差和耐药发生率较高<sup>[4,5]</sup>, LAM 治疗 CHB 的耐药从治疗 6 个月开始出现,并随着治疗时间延长而逐渐增加,所以主张在 LAM 治疗至 6 个月时对疗效进行评估,一旦发现应答不佳,要增加另一无交叉耐药的药物<sup>[6,7]</sup>。因此,本研究对 LAM 治疗 6 个月时进行评估,对发生部分病毒学应答的患者给予调整治疗方案,以增加疗效和减少耐药发生。目前认为,对 LAM 治疗 6 个月发生部分病毒学应答的优化治疗方法之一是在 LAM 基础上加 ADV 联合治疗,但 HBeAg 血清学转换率仍较低(14.5%)<sup>[2]</sup>,因此,需要研究能提高 HBeAg 血清学转换率的治疗方法。本研究对 LAM 治疗 6 个月时发生部分病毒学应答 103 例随机分为两组,治疗组在 LAM 基础上加用 ADV 和中药复方苈珠颗粒,以观察苈珠颗粒对这类患者的特异性和非特异性细胞免疫功能以及 HBeAg 血清学转换的作用。

中医学认为 HBV 持续复制既有正气不足,又有瘀毒互结,故复方苈珠颗粒剂治疗作用为益气扶正、解毒化瘀。方以黄芪、叶下珠益气解毒,配合虎杖、土茯苓、白花蛇舌草解毒兼能活血、利湿。丹参、赤芍凉血

表 2 两组治疗后 HBV DNA 转阴率、HBeAg 血清学转换率、耐药情况及肝功能恢复情况比较 [例(%)]

组别	例数	HBV DNA 转阴	HBeAg 血清学转换	ALT 恢复正常	TBil 恢复正常	Alb 恢复正常	耐药
治疗	50	44(88.0)	16(32.0)	47(94.0)	50(100.0)	50(100.0)	1(2.0)
对照	53	41(77.4)	8(15.1)	44(83.0)	53(100.0)	53(100.0)	1(1.9)
$\chi^2$ 值	2.023	4.114	3.024	—	—	—	0.002
<i>P</i> 值		>0.05	<0.05	>0.05	—	—	>0.05

化痰,众药合用,共奏益气扶正、清肝解毒之功效。研究表明,黄芪能提高 T 细胞功能<sup>[8,9]</sup>,可提高 CHB 患者的辅助性 T 细胞(Th)1 类细胞因子的水平<sup>[10]</sup>,赤芍能提高 Th1 水平<sup>[11]</sup>,而 Th1 升高能使 CTL 升高,可促进慢性肝炎病毒感染患者体内病毒的清除<sup>[12,13]</sup>,白花蛇舌草和丹参能增强 CTL 活性提高机体免疫力<sup>[9,14]</sup>,叶下珠、土茯苓和虎杖对 HBV 有抑制作用<sup>[8,9,15]</sup>。

LAM 能提高乙型肝炎肝硬化患者的 HBV 特异性 CTL 水平<sup>[16]</sup>,ADV 能提高 CHB 患者的 HBV 特异性 CTL 水平<sup>[17]</sup>,本研究两个患者组治疗后 HBV 特异性 CTL 水平高于治疗前,提示 LAM 和 ADV 抑制 HBV 复制的机制除了能够直接抑制 HBV 复制外尚可通过提高 HBV 特异性 CTL 水平而发挥抑制或清除 HBV 的作用。而治疗组治疗后 HBV 特异性 CTL 水平、非特异性 CTL 水平、NK 细胞水平和 HBeAg 血清学转换率明显高于对照组,提示对 LAM 治疗后发生部分病毒学应答的患者在加用 ADV 的基础上再加用复方芪珠颗粒能提高 CHB 患者的特异性和非特异性细胞免疫功能,从而提高 HBeAg 血清学转换率<sup>[17,18]</sup>,提高抗病毒的疗效。试验过程中未发现与复方芪珠颗粒有关的不良反应,值得临床应用。

本研究未对 LAM 初治 CHB 患者进行研究,有必要对 LAM 加复方芪珠颗粒初治 CHB 患者进行研究,以观察复方芪珠颗粒对初治的 CHB 患者细胞免疫和 HBV DNA 转阴和 HBeAg 血清学转换的效果。

### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 版)[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(2): 65-80.
- [2] 郭新会,金瑞,张世斌,等.拉米夫定抗乙肝病毒应答不佳联合应用阿德福韦酯的疗效分析[J]. 北京医学, 2011, 3(9): 717-719.
- [3] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. N Engl J Med, 2004, 351(15): 1521-1531.
- [4] Perrillo RP, Wright T, Rakela J, et al. A multi-center United States-Canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after liver transplantation for chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2001, 33(2): 424-432.
- [5] Yao FY, Terrault NA, Freise C, et al. Lamivudine

treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study using a matched, untreated cohort[J]. Hepatology, 2001, 34(2): 411-416.

- [6] Liaw YF, Leung N, Kao JH, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update[J]. Hepatol Int, 2008, 2(3): 263-283.
- [7] Keeffe EB, Zeuzem S, Koff RS, et al. Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5(8): 890-897.
- [8] 李爱君. 愈肝煎治疗慢性乙型肝炎 80 例[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 805.
- [9] 戴琦,郭小秋,陈昆山.益气养阴清热解毒法联合拉米夫定治疗慢性乙型肝炎及对 T 细胞亚群和免疫学指标的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(1): 28-30.
- [10] 吴晓蔓,袁文声. 黄芪对慢性乙型肝炎患者外周血 Th1/Th2 功能平衡的影响[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(11): 1088-1090.
- [11] 齐法莲,徐军,陈英剑.白细胞介素-10 与临床研究[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(1): 66-70.
- [12] 顾锡炳,杨小娟,王栋,等.苦参素对慢性乙型肝炎患者特异性、非特异性细胞免疫影响的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(4): 288-291.
- [13] 董宇红,席宏丽,田枫,等.苦参素对 HBsAg 转基因小鼠血清 Th1 和 Th2 细胞因子水平的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3): 277-280.
- [14] 单保恩,张金艳,杜肖娜,等.白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(5): 370-374.
- [15] 张美义,白万明,邹静,等.云南珠子草的调查及其抗病毒作用[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(5): 259.
- [16] 王栋,顾锡炳,朱银芳,等.拉米夫定治疗失代偿乙型肝炎肝硬化的疗效与 HBV 基因型及细胞毒性 T 淋巴细胞的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(4): 283-285.
- [17] 周玉麟,王学才,吴寅涛,等.阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎 HBeAg 血清学转换与基因型、HBV 特异性 CTL 的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(3): 220-223.
- [18] 周玉麟,王学才,吴寅涛,等.慢性乙型肝炎抗病毒治疗后病毒学应答与特异性细胞免疫的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(6): 455-457.

(收稿:2014-01-22 修回:2014-06-18)