

# 扶正祛毒方对慢性乙肝病毒携带者血 IFN- $\gamma$ 表达影响的研究

郭子宁 张立平 黄象安 彭龙 金艳

**【摘要】 目的** 观察扶正祛毒方对慢性乙肝病毒携带者血 IFN- $\gamma$  表达的影响,探讨扶正祛毒方对慢性乙肝病毒携带者的免疫调节作用。**方法** 对慢性乙肝病毒携带者给予扶正祛毒方口服干预 12 周,于入组第 1 天和第 12 周分别采血取血清,RT-PCR 法检测 HBV DNA 滴度,生化法测 ALT、AST 水平,ELISA 测 HBeAg 滴度、细胞因子 IFN- $\gamma$  表达。**结果** 扶正祛毒方治疗 12 周后,慢性乙肝病毒携带者血 ALT、AST 水平均在正常范围;慢性乙肝病毒携带者血 HBV DNA 滴度较入组第 1 天下降,差异显著( $P<0.05$ );HBeAg 滴度较入组第 1 天下降,差异显著( $P<0.05$ );细胞因子 IFN- $\gamma$  表达较入组第 1 天上升,差异显著( $P<0.05$ )。**结论** (1)用药 12 周后,扶正祛毒方对慢性乙肝病毒携带者肝脏炎症反应无加剧,作用安全;(2)用药 12 周后,扶正祛毒方对慢性乙肝病毒携带者病毒复制有抑制作用;(3)用药 12 周后,扶正祛毒方可以提高慢性乙肝病毒携带者血清 IFN- $\gamma$  表达,这可能是其抑制病毒复制的重要机制之一。

**【关键词】** 慢性乙肝病毒携带者; 扶正祛毒方; 免疫调节; 干扰素- $\gamma$

**【中图分类号】** R575.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.12.007

## Effect of Fuzheng Qudu formula on the expression of serum IFN- $\gamma$ in chronic hepatitis B carriers

GUO Zining, ZHANG Liping, HUANG Xiang'an, et al. Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China  
Corresponding author: ZHANG Liping, E-mail: lpzhang2005@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of Fuzheng Qudu formula on the expression of serum IFN- $\gamma$  in chronic hepatitis B carriers, and to discuss the immunoregulatory effects of Fuzheng Qudu formula in chronic hepatitis B carriers. **Methods** Chronic hepatitis B carriers were treated with Fuzheng Qudu formula orally for 12 weeks. The serum was collected at the first day and the last day. The expression of HBV DNA in serum was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction method. The level of ALT and AST in serum was detected by biochemical process. The expression of HBeAg, and serum IFN- $\gamma$  was detected by enzyme-linked immune sorbent assay method. **Results** After 12 weeks treatment with Fuzheng Qudu formula, the levels of serum ALT and AST were normal in chronic hepatitis B carriers; The expression of HBV DNA in serum was lower than that of the first day began the treatment, and the difference was significant( $P<0.05$ ). The expression of HBeAg in serum was lower than the first day began the treatment, and the difference was significant( $P<0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$  in serum was higher than the first day began the treatment, and the difference was significant( $P<0.05$ ). **Conclusion** (1) After 12 weeks of treatment, Fuzheng Qudu formula have no side effect on liver inflammation in Chronic

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81503473);北京中医药大学基本科研业务项目(2015-JYB-JSMS112)

作者单位: 100078 北京中医药大学东方医院感染科(郭子宁、黄象安);北京中医药大学研究生院[张立平、彭龙(硕士研究生)、金艳(硕士研究生)]

作者简介: 郭子宁(1983-),女,硕士,主治医师。研究方向:慢性肝炎、肝纤维化的中西医治疗。E-mail: guozining@126.com

通信作者: 张立平(1960-),女,博士,教授。研究方向:慢性消化系统疾病以及代谢综合征的中西医治疗。E-mail: lpzhang2005@126.com

hepatitis B carriers, the action is safe. (2) After 12 weeks of treatment, *Fuzheng Qudu* formula has inhibitory effect on viral replication of chronic hepatitis B virus carriers. (3) After 12 weeks of treatment, *Fuzheng Qudu* formula can improve the expression of serum IFN- $\gamma$  in chronic hepatitis B virus carriers, which may be one of the important mechanisms of inhibiting viral replication.

**【Key words】** Chronic hepatitis B carriers; *Fuzheng Qudu* formula; Immunoregulatory; IFN- $\gamma$

慢性乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)携带者具有“HBV 高水平复制”和“转氨酶正常或低水平”两大特点,结局高危,需要早期干预已经成为共识<sup>[1]</sup>。目前研究认识到其核心机制为免疫耐受<sup>[2]</sup>,遗憾的是,当前除了早期随访,定期观察外无有效治疗手段。中医药具有多靶标、双向调节作用,近年来在诸多疑难问题上取得可观成绩,具备深入研究价值。扶正祛毒方以扶正祛毒立法,课题组早期在临床及实验中观察到其抑制 HBV 复制和保护肝细胞的作用,本研究拟观察其对慢性 HBV 携带者的治疗作用,探讨其对在免疫清除机制中起关键作用的细胞因子干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )表达的影响。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选取 2015 年 10 月~2017 年 4 月期间来北京中医药大学东方医院肝炎门诊就诊,年龄 18~65 岁,符合慢性 HBV 携带者诊断的患者,诊断标准参照《2010 版中华医学会肝病学分会、感染病学分会联合修订的“慢性乙型肝炎防治指南”》,排除同时感染其他类型肝炎、HIV 者;合并有其他脏器的衰竭,如心、肾功能衰竭,以及精神疾病、恶性肿瘤等疾病者;患有自身免疫系统疾病如原发性胆汁性肝硬化、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎者;入组前 6 个月内有干扰素或核苷类抗病毒药物以及免疫增强或抑制剂的用药史者;妊娠或哺乳期以及 3 个月内参加过其他临床试验者。知情同意后入组,共入组 30 例,失访 4 例。

### 1.2 试验药物

扶正祛毒方由黄芪 30 g、当归 15 g、蒲公英 15 g、半枝莲 15 g、郁金 10 g、白花蛇舌草 15 g、醋柴胡 10 g、炙甘草 6 g 组成,制备成 200 mL 汤剂,2 密封袋分装,由北京中医药大学东方医院药学部完成鉴定和制备,4℃冷藏。服用方法为早、晚各 1 袋,餐后半小时口服,连续服药 12 周。

### 1.3 主要仪器与试剂

全自动多功能酶标仪(MULTISKAN MK3,

Thermo,产地美国),电热恒温培养箱(DH4000A,天津泰斯特),MINI shaker(MH-1, kylin-Bell Lab Instruments QILINBEIER),HBeAg 及 IFN- $\gamma$ ELISA 试剂盒(批号 20170715,均购自联科生物试剂公司)。

### 1.4 检测指标

取血清后,全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST 水平;RT-PCR 法检测 HBV DNA 滴度;采用罗氏(LightCycler 480)实时荧光定量扩增仪,加处理液 a,离心,弃上清后提取蛋白,加处理液 b 震荡混匀,高温解链,离心提取核酸,取细管加酶 18  $\mu$ L,提取液 2  $\mu$ L,离心后,上机扩增,读取荧光标记物含量;ELISA 测 HBeAg 及细胞因子 IFN- $\gamma$  表达:按试剂盒说明书包被,加样,加酶标抗体,底物液显色,根据颜色反应来判定 HBsAg、HBeAg 以及 IFN- $\gamma$  的含量。

### 1.5 观察时点

分别于患者入组第 1 天、用药后第 12 周末空腹采血。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,定量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,安全性指标采用单样本  $t$  检验;定量资料采用  $t$  检验和方差分析,方差不齐选用非参数检验(Wilcoxon), $P<0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 扶正祛毒方对慢性 HBV 携带者疗效判定指标的影响

由于差值不符合正态分布,选用非参数检验(Wilcoxon),结果显示,扶正祛毒方治疗 12 周后,患者 HBV DNA 复制水平较治疗前下降,差异显著( $P<0.05$ ),见表 1。与此同时,患者血清 HBeAg 亦较前下降,差异显著( $P<0.05$ ),见表 2。

### 2.2 扶正祛毒方对慢性 HBV 携带者血清细胞因子 IFN- $\gamma$ 表达的影响

结果显示,扶正祛毒方治疗 12 周后,慢性 HBV 携带者血清细胞因子 IFN- $\gamma$  表达较治疗前上升,差

异显著( $P<0.05$ ),见表 3。

表 1 扶正祛毒方治疗前后血清 HBV DNA 复制的变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	HBV DNA(log10 copies/L)
治疗前	26	$1.104\times 10^8\pm 1.718\times 10^8$
治疗后	26	$3.326\times 10^7\pm 2.900\times 10^7$

表 2 扶正祛毒方治疗前后血清 HBeAg 的变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	HBeAg
治疗前	26	$1213.1885\pm 312.9416$
治疗后	26	$988.7840\pm 337.3269$

表 3 扶正祛毒方治疗前后血清 IFN- $\gamma$  表达的变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
治疗前	26	$10.0288\pm 6.0350$
治疗后	26	$21.1846\pm 8.8064$

### 3 讨论

慢性 HBV 携带者指 HBV 慢性感染后肝脏无明显炎症活动的携带状态,多为处于免疫耐受期的 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 阳性者,血清 ALT、AST 在正常范围,肝组织学检查无明显异常,常隐匿进展为肝硬化或肝癌,被称为“高危结局 HBV 携带者”<sup>[3]</sup>。虽然早期干预慢性 HBV 携带者已经成为业内共识<sup>[4]</sup>,但由于本期免疫无应答,此期治疗一般无疗效,因此目前指南只建议做定期随访。近年来中医药在临床尤其是个案中取得良好成效,主要体现在对病毒复制的抑制作用,维持转氨酶正常水平,对肝纤维化逆转作用等<sup>[5]</sup>。

课题组认识到慢性 HBV 携带者“正虚毒伏”的病机关键,从正虚毒伏与免疫耐受病理基础的相通性出发,扶正祛毒,以期打破免疫耐受,抑制病毒复制的同时避免肝脏炎症损伤。本研究结果显示,扶正祛毒方治疗 12 周后,HBV DNA 的复制、HBeAg 的表达均明显下降。HBV DNA 是反应 HBV 复制与否最直接的指标,也是临床诊断、疗效判定的关键;HBeAg 表达的强弱则提示病毒复制的程度和传染性强弱,结合试验结果,提示扶正祛毒方抑制 HBV 复制的作用是肯定的,与此同时,患者血清转氨酶水平在正常范围,转氨酶是反映肝脏功能的重要指标,也是肝脏炎症活动最灵敏的指标之一,结果显示,扶正祛毒方对慢性 HBV 携带者肝功能无不良作用。

IFN- $\gamma$  是活化细胞免疫,清除病毒的效应细胞因子。研究表明,IFN- $\gamma$  可以通过多个环节抑制 HBV DNA 的复制。包括阻止 HBV 核衣壳的形成,

促进其在肝细胞浆中降解、清除 HBV 核衣壳颗粒及其包装的 HBV 复制中间体,影响 RNA 的正常转录和翻译。IFN- $\gamma$  还可以通过与靶细胞表面的相应受体结合,诱导靶细胞合成抗病毒蛋白(antiviral protein, AVP)如蛋白激酶(protein kinase resource, PKR),抑制 HBV 复制而不损伤肝靶细胞,介导非肝细胞损伤的抗病毒作用,IFN- $\gamma$  清除 HBV 的过程被认为可以完全独立于肝脏损伤的过程<sup>[6-7]</sup>。因此,IFN- $\gamma$  表达的升高,有助于清除病毒,抑制其复制。本研究结果显示,扶正祛毒方治疗 12 周后,血清 IFN- $\gamma$  表达上升,相应的,HBV DNA 的复制明显下降,这意味着扶正祛毒方可能是通过上调 IFN- $\gamma$ ,活化免疫,从而抑制病毒复制的。

值得思考的是,虽然本研究显示扶正祛毒方可以抑制慢性 HBV 携带者病毒复制,但治疗前较治疗后下降约 1log 值,这与指南所界定的抗病毒药物的有效标准仍有距离,可能是由于如下原因:(1)治疗时间较短,未达到指南判定疗效的时间节点 24 周;(2)扶正祛毒方以扶正祛毒为立法,旨在调节免疫耐受状态,这与核苷(酸)类抗病毒药物的作用机理是不同的。从长远来看,扶正祛毒方从慢性 HBV 携带者免疫耐受的核心机制出发,安全、有效,其远期疗效值得期待,其作用机制更具深入探讨的价值。

### 参 考 文 献

- [1] Sherman M. Management of chronic hepatitis B: consensus guidelines[J]. Can J Gastroenterol, 2007, 21 (S1): 5.
- [2] 张茜茜,孙克伟.扶正与祛邪法对 HBV 慢性感染患者外周血 DCs 介导的 T 淋巴细胞的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(1): 124-127.
- [3] Han-Min Li, Xiang Gao, Mu-Lan Yang, et al. Effects of Zuogui Wan on neurocyte apoptosis and down-regulation TGF- $\beta$ 1 expression in nuclei of arcuate hypothalamus of monosodium glutamate-liver regeneration rates [J]. World Journal of Gastroenterology, 2004, 10(19): 2823-2826.
- [4] 郭子宁,张立平,黄象安.扶正祛毒法在慢性乙型肝炎病毒携带者中的应用及展望[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2017, 44(3): 206-209.
- [5] 孔祥廉,林慧,盖丽丽,等.中医药治疗乙型病毒性肝炎研究进展[J]. 时珍国医药, 2009, 20(3): 615-617.
- [6] Suri D, Schilling R, Lopes AR, et al. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes [J]. Hepatol, 2001, 35(6): 790-797.
- [7] Sitia G, Isogawa M, Iannacone M, et al. MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs [J]. J Clin Invest, 2004, 113(8): 1158-1167.

(收稿日期: 2017-09-27)

(本文编辑: 王馨瑶)