

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.13.011

临床研究

五色六味方联合拉米夫定片对慢性乙型肝炎患者外周血 Th17/Treg 平衡的影响

邹楠¹, 杨百京¹, 袁洪文², 边文贵¹, 赵新芳¹, 周云¹, 王新莉¹, 袁今奇^{*}

(1. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路 107 号, 832008; 2. 河南中医学院第一附属医院)

摘要 目的 观察五色六味方治疗慢性乙型肝炎的疗效及可能作用机制。方法 78 例慢性乙型肝炎患者随机分为治疗组和对照组各 39 例。对照组口服拉米夫定片, 每次 100mg, 每日 1 次; 治疗组在对照组基础上加服五色六味方颗粒剂, 每日 1 剂, 两组疗程均为 48 周。于治疗前及治疗 24 周、48 周时检测患者乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 载量观察阴转率, 以及外周血白细胞介素 17 (IL-17)、FOXP3 水平和辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞 (Th17/Treg) 值。结果 治疗组治疗 24 周、48 周时 HBV DNA 阴转率分别为 80.77%、92.30%, 对照组分别为 57.70%、69.23%, 治疗组治疗后各时间点 HBV DNA 阴转率均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。两组治疗 48 周时 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值较本组治疗前均有所下降 ($P < 0.05$); 治疗组治疗 24 周、48 周时 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值均低于同时间点对照组 ($P < 0.05$)。结论 五色六味方联合拉米夫定片可明显减轻慢性乙型肝炎患者肝脏炎症、增强抗病毒效力, 其机理可能与调节 Th17/Treg 平衡有关。

关键词 慢性乙型肝炎; 五色六味方; 拉米夫定片; 辅助性 T 细胞; 调节性 T 细胞; 白细胞介素 17

由于目前对乙型肝炎病毒 (HBV) 无法彻底清除, 其导致的肝硬化、肝细胞癌仍然是全球重大的公共卫生问题。免疫因素在慢性乙型肝炎发病中极其关键, 研究表明, HBV 感染后引起的慢性乙型肝炎与机体免疫功能及状态密切相关, T 细胞在抑制和清除病毒感染中发挥首要作用^[1]。辅助性 T 细胞 17 (Th17) 作为新发现的 CD4⁺ 效应 T 细胞亚群, 其特性及功能已为人们逐步认知^[2]。在传统免疫 Th1/Th2 失衡学说的基础上, Th17 和调节性 T 细胞 (Treg) 的平衡为学者们研究探索病毒性及免疫性疾病开拓了新的思路^[3]。本研究观察中药五色六味方联合拉米夫定片对慢性乙型肝炎患者外周血 Th17、Treg 及 Th17/Treg 平衡的影响, 并观察对 HBV DNA 应答的疗效。本研究经石河子大学医学院第一附属医院伦理委员会批准, 批准文号: 2012 伦审第 (018) 号。

基金项目: 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教发 [2014] 20 号); 国家中医药管理局中医药重点学科建设项目(国中医药人教发 [2012] 32 号)

* 通讯作者: yjq342@163.com, (0993) 2850780

1 临床资料

1.1 诊断标准

西医诊断标准参照《慢性乙型病毒性肝炎防治指南 (2010 版)》^[4] 中慢性乙型肝炎诊断标准。

1.2 纳入标准

符合上述诊断标准; 年龄 21~68 岁; 病程 ≥ 1 年; 乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 阳性; 6 个月内未接受抗病毒药物、免疫调节剂及中药治疗; 患者知情同意。

1.3 排除标准

合并其他类型肝炎病毒感染; 合并脂肪性、酒精性、药物性、遗传代谢性、失代偿期慢性肝病; 合并其他病毒感染以及自身免疫相关的其他疾病。

1.4 一般资料

收集石河子大学医学院第一附属医院 2012 年 8 月至 2015 年 6 月门诊及住院的慢性乙型肝炎患者 78 例, 按照性别分层采用随机数字表法分为治疗组和对照组各 39 例。治疗组中男 25 例, 女 14 例; 年龄 21~62 岁, 平均 (37 ± 11) 岁; 病程 3~

42 年, 平均 (11 ± 11) 年。对照组中男 23 例, 女 16 例; 年龄 24 ~ 68 岁, 平均 (39 ± 7) 岁; 病程 1 ~ 47 年, 平均 (13 ± 9) 年。两组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

2 方法

2.1 治疗方法

对照组给予拉米夫定片 (贺普丁, 葛兰素史克公司, 国药准字 H20030581), 每次 1 片 (100 mg), 每日 1 次。治疗组在对照组基础上给予五色六味方颗粒剂口服, 组成: 青蒿 10 g, 黄芪 20 g, 赤芍 10 g, 白术 10 g, 乌梅 10 g, 淫羊藿 15 g 等, 颗粒剂由江苏天江药业有限公司提供, 每日 1 剂, 分两次用温开水冲服。两组疗程均为 48 周。

2.2 观察指标及方法

所有患者于治疗前及治疗 24 周、48 周时检测 HBV DNA 载量及外周血 Th17 效应因子白细胞介素 17 (IL-17)、Treg 细胞的特异性转录因子 FOXP3 水平。HBV DNA 定量采用伯乐 S1000 梯度 PCR 荧光定量仪 (美国 Bio-Rad 公司) 测定; IL-17 细胞因子用 ELISA 方法检测, PE 标记鼠抗体人 IL-17A 单克隆抗体 (批号: CW0286) 购自上海拜力生物科技有限公司; FOXP3 水平及 Th17/Treg 值采用流式细胞仪 (德国 PARTEC 公司, 型号 CyFlow-PASIII) 检测。以上测定均由石河子大学医学院第一附属医院中心实验室完成。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间采用多因素方差分析, 相关性比较采用 Spearman 相关性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两组患者治疗前后不同时间外周血 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值比较

表 1 示, 两组患者治疗前 IL-17、FOXP3 水平

及 Th17/Treg 值比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗组治疗 24 周时 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值较本组治疗前有所下降, 两组治疗 48 周时 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值较本组治疗前均有所下降 ($P < 0.05$)。治疗组治疗 24 周、48 周时 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值均低于同时间对照组 ($P < 0.05$)。

3.2 两组患者治疗 24、48 周时 HBV DNA 阴转率比较

两组治疗前均有 26 例患者 HBV DNA 阳性。治疗组治疗 24 周时阴转 21 例, 阴转率为 80.77%, 治疗 48 周时阴转 24 例, 阴转率为 92.30%; 对照组治疗 24 周阴转 15 例, 阴转率为 57.70%, 治疗 48 周时阴转 18 例, 阴转率为 69.23%。治疗组治疗 48 周时阴转率明显高于本组治疗 24 周时 ($P < 0.05$), 且治疗组治疗 24、48 周时阴转率均明显高于同时间对照组 ($P < 0.05$)。

4 讨论

慢性乙型肝炎可归属于中医学“胁痛”“疫毒”“黄疸”“积聚”及“虚劳”等范畴。有研究者基于循证医学的研究证据, 根据“慢性乙型肝炎从肾论治”, 提出“补肾为主, 清化为辅”^[8]的治法。叶永安等^[6-7]对慢性乙型肝炎证候标准和证候要素进行研究, 结果显示, 肝郁脾虚和湿热内阻是慢性乙型肝炎最主要的证型。本研究运用的五色六味方由青蒿、黄芪、赤芍、白术、乌梅、淫羊藿等药物组成, 全方共奏益气、健脾、补肾、解毒、化瘀之功。现代药理研究证实, 青蒿素可使巨噬细胞的吞噬功能增强, 淋巴细胞转化率提高, 阻止白细胞介素及各种炎症介质的释放, 从而起到免疫调节作用^[9]。黄芪中的某些成分通过 T 细胞介导又具有免疫抑制作用, 并可促进抗体生成^[10]。赤芍具有保肝、降酶、退黄、抗肝纤维化、降低门静脉血压的作用^[11]。白术益气健脾, 其所含多糖能调

表 1 两组慢性乙型肝炎患者治疗前后不同时间外周血 IL-17、FOXP3 水平及 Th17/Treg 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	IL-17 (pg/ml)	FOXP3 (个/ml)	Th17/Treg (%)
对照组	治疗前	39	14.68 ± 15.26	7.50 ± 3.90	13.89 ± 4.57
	治疗 24 周	39	14.25 ± 13.72	7.38 ± 4.63	12.88 ± 3.11
	治疗 48 周	39	12.96 ± 13.05*	5.89 ± 2.66*	7.89 ± 2.76*
治疗组	治疗前	39	14.85 ± 15.42	7.52 ± 4.87	13.55 ± 4.46
	治疗 24 周	39	13.52 ± 12.61*△	6.66 ± 3.74*△	11.42 ± 3.33*△
	治疗 48 周	39	11.48 ± 9.37*△	4.32 ± 2.35*△	7.46 ± 2.55*△

注: IL-17, 白细胞介素 17; Th17, 辅助性 T 细胞 17; Treg, 调节性 T 细胞; 与本组治疗前比较, * $P < 0.05$; 与对照组同时间点比较, △ $P < 0.05$

节免疫功能,使免疫抑制 Th 细胞频数增加^[1]。乌梅可保护肝细胞膜和纠正对线粒体的损伤,具有调节和增强机体免疫功能的作用^[188]。淫羊藿温肾壮阳,补而不腻,温而不燥,其主要有效成分淫羊藿多糖、淫羊藿苷、淫羊藿总黄酮对机体免疫功能具有抗氧化、抗炎等作用,通过调节体内多种免疫细胞、免疫因子起到增强和调节机体免疫功能的作用^[12]。

本研究结果显示,治疗组 HBV DNA 阴转率高于同时间对照组,表明五色六味方联合拉米夫定片治疗可促进 HBV 的清除。天然 T 细胞前体在不同条件下分化形成不同的 T 淋巴细胞亚型, Th17 与 Treg 细胞是两种新型 CD4⁺ 效应 T 细胞亚型,已有研究表明, Th17 介导的免疫反应与慢性乙型肝炎患者肝细胞损伤及肝脏炎症的程度有关^[13]。 Th17 细胞最重要的效应因子 IL-17 是一种重要的炎性介质,可促进炎性细胞浸润及组织损伤,可作为慢性乙型肝炎患者预后判定的指标之一^[14]。 FOXP3 是 Treg 细胞的特异性转录因子,且特异性高表达,在调控 Treg 细胞发育和功能效应发挥方面起关键作用, FOXP3 水平表达可精确反映 Treg 细胞的活性^[15-16]。有研究显示, Th17/Treg 失衡可引起全身或局部免疫应答异常,因此 Th17/Treg 值可作为判定慢性乙型肝炎患者病情轻重、治疗效果和预后的指标^[17-18]。本研究结果显示,治疗组患者治疗 24、48 周后的外周血 IL-17、 FOXP3 水平及 Th17/Treg 值下降,并且明显低于同时间点对照组,提示五色六味方联合拉米夫定片治疗较单纯拉米夫定片治疗更能减轻肝细胞损伤和肝脏炎症,调节 Th17/Treg 平衡,更有利于打破慢性乙型肝炎患者的免疫耐受及调控免疫网络平衡,从而增强机体清除 HBV 的能力并提高 HBV DNA 阴转率。

参考文献

- [1] ZHANG Z, ZOU ZS, FU JL, et al. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of a-cute-on-chronic hepatitis B liver failure [J]. J Hepatol, 2008, 49(3): 396-406.
- [2] AWASTHI A, KUCHROO VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection [J]. Int Immunol, 2009, 21(5): 489-498.

- [3] 王健,冯全生,范昕建,等. 中医药对拉米夫定所致乙型肝炎病毒变异的影响评述 [J]. 中医杂志, 2013, 54(7): 617-619.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
- [5] 聂红明,董慧琳,高月求,等. 从“伏邪学说”论述慢性乙型肝炎从肾论治的理论渊源 [J]. 中医杂志, 2012, 53(7): 541-543.
- [6] 叶永安,江锋,赵志敏,等. 慢性乙型肝炎中医证型分布规律研究 [J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 256-258.
- [7] 世界中医药学会联合会肝病专业委员会. 慢性乙型肝炎(ALT $\geq 2 \times$ ULN)中医证素诊断标准 [J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1799-1800.
- [8] 王浴生,邓文龙,薛春生. 中药药理与应用 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [9] 杨育林. 施维群治疗慢性乙型肝炎经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52(3): 247-248.
- [10] 袁今奇. 慢性乙型肝炎中医药治疗中的有关问题 [J]. 世界中医药, 2007, 2(1): 8-9.
- [11] 顾纭. 中药免疫调节剂治疗病毒性乙型肝炎的研究近况 [J]. 中医药临床杂志, 2005, 17(3): 311-312.
- [12] 陆乐,徐洋,蔡辉. 淫羊藿总黄酮研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(2): 167-170.
- [13] 王兰,杨帆,杨瑞宁,等. Th17 细胞及相关细胞因子在乙型病毒性肝炎中的作用机制 [J]. 肝脏, 2015, 20(5): 410-412.
- [14] WANG L, CHEN S, XU K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B related liver diseases and fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(3): 385-392.
- [15] SAKAGUCHI S, MIYARA M, COSTANTINO CM, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7): 490-500.
- [16] ZENG H, YANG K, CLOER C, et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T (reg)-cell function [J]. Nature, 2013, 499(7459): 485-490.
- [17] 胡月明,马莉,李虹. HBV 感染者外周血 Th17 细胞和 Treg 细胞的监测及意义 [J]. 检验医学, 2014, 29(1): 21-25.
- [18] 倪伟,施维群,唐翠兰,等. 中药芪灵合剂对拉米夫定片治疗慢性乙型肝炎患者 Th17 细胞及 Treg 细胞的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(10): 1170-1171.

Impact of *Wuse Liuwei Decoction* (五色六味方) Combined with Lamivudine Tablet on T Helper Cell 17 / Regulatory T Cell (Th17/Treg) Balance of Peripheral Blood of Patients with Chronic Hepatitis B

ZOU Nan¹, YANG Baijing¹, YUAN Hongwen², BIAN Wengui¹, ZHAO Xinfang¹, ZHOU Yun¹, WANG Xinli¹, YUAN Jinqi¹

(1. The First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Xinjiang, 832008; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To examine the effect and possible mechanism of *Wuse Liuwei Decoction* (五色六味方) treating chronic hepatitis B. **Methods** Seventy-eight patients with chronic hepatitis B were randomized into treatment group and control group, 39 cases in each group. The control group was given lamivudine tablet 100 mg orally each time, once every day. In addition to the treatment of the control group, *Wuse Liuwei Decoction* granule was given to the treatment group, 1 dose every day. Both groups were treated for 48 weeks. Hepatitis B Virus deoxyribonucleic acid (HBV DNA) load and negative conversion rate, the level of peripheral blood interleukin 17 (IL-17) and fork-head box P3 (FOXP3), as well as Th17/Treg of patients was detected before treatment, at the 24th and 48th week of treatment. **Results** In the treatment group, HBV DNA negative conversion rate at the 24th and 48th week of treatment was 80.77% and 92.30% respectively, while that was 57.70% and 69.23% respectively in the control group. HBV DNA negative conversion rate in the treatment group at all time of treatment was higher than that in the control group ($P < 0.05$). At the 48th week of treatment, the level of IL-17 and FOXP3, as well as Th17/Treg in both groups decreased compared with those before treatment ($P < 0.05$). At the 24th and 48th week of treatment, the level of IL-17 and FOXP3, as well as Th17/Treg in the treatment group were lower than those in the control group at the same time ($P < 0.05$). **Conclusion** *Wuse Liuwei Decoction* combined with lamivudine tablet might reduce the liver inflammation of patients with chronic hepatitis B and enhance the antiviral effect. The mechanism might relate to regulating Th17/Treg balance.

Keywords chronic hepatitis B; *Wuse Liuwei Decoction* (五色六味方); lamivudine tablet; T helper cell; regulatory T cell; interleukin 17

(收稿日期: 2015 - 07 - 13; 修回日期: 2016 - 03 - 20)

编辑: 邓 媛