

# 微卡对致敏小鼠气道炎症和 Th1/Th2 比例变化的影响

谢强敏 卞如濂 吴康松 郑行

**【摘要】** 目的：观察母牛分枝杆菌菌苗(微卡)对致敏小鼠抗原攻击后气道炎症、Th1 和 Th2 细胞因子的比例变化，评估微卡防治哮喘的药理作用。方法：小鼠分 9 组，每组 7~10 只。采用皮肤划痕、气管滴入、肌肉注射三种给药途径单次给药，观察比较微卡菌苗对致敏小鼠吸入抗原后支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞， $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 4 (IL-4) 水平变化的影响和作用强度。结果：经皮肤划痕 (2.25  $\mu$ g)、气管内滴入 (2.25  $\mu$ g)、肌肉注射 (22.5  $\mu$ g) 后 BALF 中炎症细胞总数分别为  $(6 \pm 6) \times 10^8/L$ 、 $(7 \pm 6) \times 10^8/L$ 、 $(8 \pm 5) \times 10^8/L$ ，与模型组  $(15 \pm 8) \times 10^8/L$  比较 ( $P < 0.05$ )；嗜酸细胞：皮肤划痕组 (2.25  $\mu$ g) 为  $0.7 \pm 0.5$ 、气管内滴入 (2.25  $\mu$ g) 为  $1.6 \pm 1.9$ 、肌肉注射 (7.5  $\mu$ g) 为  $2.6 \pm 1.3$ 、肌肉注射组 (22.5  $\mu$ g) 为  $1.40 \pm 1.20$ ，与模型组  $(4.90 \pm 4.60)$  比较 ( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ )；皮肤划痕组 (2.25  $\mu$ g) BALF 中 IFN- $\gamma$  水平为  $(289 \pm 57)$  pg/ml、气管滴入组 (2.25  $\mu$ g) 为  $(335 \pm 57)$  pg/ml、肌肉注射组 (22.5  $\mu$ g) 为  $(313 \pm 49)$  pg/ml，与模型组  $(216 \pm 42)$  pg/ml 比较 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )；皮肤划痕组 (2.25  $\mu$ g) BALF 中 IL-4 水平为  $(63 \pm 19)$  pg/ml、气管滴入组 (2.25  $\mu$ g) 为  $(8 \pm 5)$  pg/ml、肌肉注射组 (22.5  $\mu$ g) 为  $(13 \pm 6)$  pg/ml，与模型组  $(93 \pm 25)$  pg/ml 比较 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。微卡对嗜酸细胞增多的抑制，皮肤划痕和气管滴入组剂量比肌肉注射小 10 倍，作用强度相同；对 IFN- $\gamma$ /IL-4 平衡的调节，气管滴入作用最强。结论：微卡可通过纠正失调的 Th1/Th2 平衡达到抗气道炎症作用，为防治哮喘提供了实验依据。

**【关键词】** 微卡 母牛分枝杆菌菌苗 炎症细胞 细胞因子 哮喘

## Effects of vaccae on airway inflammation and Th1/Th2 cytokines in sensitized mice

XIE Qiangmin, BIAN Rulian, WU Kangsong, ZHENG Xing. Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of State Drugs Administration of China, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310031, China

**【Abstract】 Objective** To study the inhibitory effect of *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*) on the accumulation of airway inflammatory cells and its regulatory effect on IFN- $\gamma$ /IL-4 balance in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from ovalbumin (OVA)-challenged and sensitized mice, therefore to provide experimental evidence for the application of *M. vaccae* in the treatment of asthma. **Methods** Sensitized mice were given a single dose of *M. vaccae* 3 days before inhaled OVA-challenge by one of the three routes: intramuscularly (i.m.) by intratracheal (i.t) instillation or by cutaneous scarification (c.s). Accumulation of inflammatory cells, IFN- $\gamma$  and IL-4 levels in BALF were determined. **Results** The total numbers of the inflammatory cells in BALF from the *M. vaccae* 2.25  $\mu$ g (per mouse) c.s group  $(6 \pm 6) \times 10^8/L$ , the 2.25  $\mu$ g i.t group  $(7 \pm 6) \times 10^8/L$  and the 22.5  $\mu$ g i.m group  $(8 \pm 5) \times 10^8/L$ , were significantly

lower than that of the model control  $(15 \pm 8) \times 10^8/L$  ( $P < 0.05$ ). Eosinophils in the 2.25  $\mu g$  c.s group  $0.7 \pm 0.5$  the 2.25  $\mu g$  i.t group  $1.6 \pm 1.9$ , the 7.5  $\mu g$  i.m group  $2.6 \pm 1.3$  and the 22.5  $\mu g$  i.m group  $1.40 \pm 1.20$ , were significantly lower than those in the model group  $4.90 \pm 4.60$  ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). IFN- $\gamma$  levels in the 2.25  $\mu g$  c.s group  $(289 \pm 57)$  pg/ml, the 2.25  $\mu g$  i.t group  $(335 \pm 57)$  pg/ml and the 22.5  $\mu g$  i.m group  $(313 \pm 49)$  pg/ml, were significantly higher than that in the model group  $(216 \pm 42)$  pg/ml ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ), IL-4 levels in the 2.25  $\mu g$  c.s group  $(63 \pm 19)$  pg/ml, the 2.25  $\mu g$  i.t group  $(8 \pm 5)$  pg/ml and the 22.5  $\mu g$  i.m group  $(13 \pm 6)$  pg/ml, were significantly lower than that in the model group  $(93 \pm 25)$  pg/ml ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). The inhibitory effect on eosinophil accumulation by i.t or c.s *M. vaccae* was 10 times stronger than that by i.m *M. vaccae*. i.t *M. vaccae* was the most effective in regulating the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio. Conclusion *M. vaccae* inhibited airway inflammation via regulating Th1/Th2 balance, suggesting that it may be beneficial in the treatment of asthma.

**【Key words】** *Vaccae* Mycobacterium vaccae Inflammatory cells Cytokine Asthma

目前认为, Th1/Th2 失衡是引起气道炎症的重要机制之一, 调节这一失衡状态已成为寻找支气管哮喘(简称哮喘)免疫治疗药物的热点<sup>[1-3]</sup>。卡介苗对哮喘治疗效果日益受到关注<sup>[3,4]</sup>。母牛分枝杆菌(*M. vaccae*)作为无毒力的分枝杆菌, 近年来已被国内、外用于结核病的免疫治疗<sup>[5-7]</sup>。母牛分枝杆菌菌苗(微卡)是母牛分枝杆菌经生物技术处理冻干而成的注射剂(2001 年经国家药品监督管理局批准上市)主要用于肺结核病化疗的辅助治疗, 给药途径为肌肉深部注射。为了扩大其适应症, 我们的研究评价微卡三种给药途径对致敏小鼠抗原攻击后气道内炎症细胞和 IFN- $\gamma$ /IL-4 失衡的影响, 为微卡防治哮喘提供药理依据。

## 材料与amp;方法

### 一、材料

1. 动物: 昆明种小鼠 73 只, 雌雄各半, 体重 20~28 g, 购于浙江省药品检验所(22-9601017)。

2. 药品与试剂: 微卡(国药准字 S20010003), 每支 22.5  $\mu g$  (安徽龙科马生物制药有限公司, 批号: 010101); ovalbumin (Grade V, 美国 Sigma 公司); 氢氧化铝凝胶(自制), 地塞米松磷酸钠注射液, 每支 5 mg (江苏方强制药厂, 批号: 20001216),  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )和白色细胞介素 4 (IL-4) 酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(美国 Chemicon International 公司, 批号分别为 1227M3, 1227M1)。

### 二、仪器

雾化吸入器(BARI, MASTER; Germany), 冷冻离心机(Eppendorf Centrifug 5048R, Germany), 显微镜(Olympus BX51, Japan), 酶标仪(BIO-TEK, ELX800, USA)。

### 三、小鼠气道炎症模型

致敏小鼠: 将 ovalbumin (Grade V) 溶于 10% AL(OH)<sub>3</sub> 凝胶中, 配制成 0.2% ovalbumin 浓度。每只小鼠两后足、掌各注射 0.05ml, 前足掌各注射 0.01ml, 两后腿皮下注射各 0.03ml, 两侧腹股沟皮下注射各 0.03ml, 每只小鼠共 0.18ml。抗原攻击: 致敏第 23 天, 将致敏小鼠(除致敏不攻击组)置于 4L 玻璃钟罩内, 用雾化吸入器雾化 1% ovalbumin (用生理盐水配制) 30min, 每天 1 次, 共 7 天。

### 四、支气管肺泡灌洗(BAL)

致敏第 30 天脱臼处死动物, 气管插管, 用 1% 牛血清-生理盐水溶液 1ml 灌洗支气管肺

泡，来回冲洗3次，收集支气管肺灌洗液（BALF）。BALF炎症细胞计数和分类计数：混匀收集的BALF，取0.1ml与白细胞稀释液1:1稀释，用细胞计数板计数炎症细胞，涂片用嗜酸细胞特殊染色后在显微镜下作白细胞分类计数<sup>[8]</sup>。

#### 五、IFN- $\gamma$ 、IL-4测定

将获得的BALF在4℃，3000 r/min离心10min。收集无细胞的BALF上清液冷藏于-80℃，用于测定采用双抗体夹心ELISA法。100 $\mu$ l BALF或重组IFN- $\gamma$ 、IL-4标准品加入用抗小鼠IFN- $\gamma$ 、IL-4抗体包被过的96-孔板上，室温培养2h（使两抗体与标准品或标本中的IFN- $\gamma$ 或IL-4形成“抗体-小鼠IFN- $\gamma$ 抗体或IL-4抗体复合物”），洗4次（洗去游离成分），然后加辣根过氧化物标记的亲合素，室温（20~25℃）孵育60min后（使亲和素与生物素特异性结合），洗板4次（将未结合的部分洗去），加显色液，室温（20~25℃）孵育15min，加入50 $\mu$ l终止液。样品置酶标仪（BIO-TEK，ELX800，USA）在波长490nm测定吸光度（A）值。

#### 六、实验设计与分组

空白组：正常小鼠，不经任何处理；致敏不攻击组：致敏方式同模型组，致敏后不经抗原攻击；模型组：每只肌肉注射生理盐水0.2ml；皮肤划痕组：致敏20天，用乌拉坦腹腔注射麻醉小鼠，背部剃毛，用针头划破皮肤0.5cm，痕迹3~4道，划痕部位每只滴入微卡0.02ml（2.25 $\mu$ g）；肌肉注射组：致敏20天，每只分别用微卡0.2ml（2.5 $\mu$ g），微卡0.2ml（7.5 $\mu$ g），微卡0.2ml（2.5 $\mu$ g）肌肉注射；气管内给药组：致敏第20天，用乌拉坦腹腔注射麻醉小鼠，颈下皮肤消毒后，手术暴露气管，每只气管内注入微卡0.02ml（2.25 $\mu$ g），手术部位用青霉素抗感染，缝合。微卡不同给药途径均为单次。地塞米松（DXM）组：致敏第20天，腹腔注射DXM0.5mg/kg，每天1次共6天。每组动物数7~10只不等（表1）。

#### 七、统计方法

用Sigma Stat统计软件（Sigmastat 1.01 for Windows95，1992，Jandel corporation，USA）统计实验数据。半数有效剂量LD<sub>50</sub>和95%可信区间用上海科学技术出版社POMS 2.0版软件计算。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 结 果

### 一、对BALF中炎症细胞的影响

表1 微卡对致敏小鼠抗原攻击后气道内炎症细胞的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	剂量			炎症细胞总数 ( $1 \times 10^8/L$ )	嗜酸细胞 ( $1 \times 10^8/L$ )
		(只)	(天数)	(方式)		
空白组	8				$6 \pm 4^*$	$0.30 \pm 0.10^{**}$
致敏不攻击组	8				$8 \pm 5^*$	$0.10 \pm 0.10^{**}$
模型组	10	0.2ml	1	im	$15 \pm 8$	$4.90 \pm 4.60$

10±5	微卡皮肤划痕组	8	2.25ug	1	6 ± 6	0.70±0.50**
5 ± 6	微卡肌肉注射组	8	2.5ug	1	13±7	3.80±2.50
9 ± 5	微卡肌肉注射组	8	7.5ug	1	10±3	2.60±1.30
8 ± 4	微卡肌肉注射组	8	22.5ug	1	8 ± 5 *	1.40±1.20*
7±5	微卡气管内给药组	7	2.25ug	1	7 ± 6 *	1.60±1.90*
5 ± 5 *	DXM 型腔注射组	8	0.5mg/kg	7	11 ± 10	1.10±1.10*
10±6						

注：统计方法：Student-Newman-Keuls test；与模型组比较\*P<0.05，\*\*P<0.01

表 2 微卡对致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平的影响(x±s)

组 别	鼠 数	剂 量			IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4(pg/ml)
		(只)	(天数)	(方式)		
IFN- $\gamma$ /IL-4						
空白组	5				63 ± 64*	63 ± 12* <sup>#</sup>
5.8						
致敏不攻击组	5				350 ± 88*	62 ± 20* <sup>#</sup>
5.6						
模型组	7	0.2ml	1	im	216 ± 42	93 ± 25
2.3						
微卡皮肤划痕组	6	2.25ug	1		289 ± 57*	63 ± 19* <sup>#</sup>
4.6						
微卡肌肉注射组	6	22.5ug	1		313 ± 49**	13 ± 6**
24.1						
微卡气管内给药组	6	22.5ug	1		335 ± 57**	8 ± 5**
42.1						
DXM 型腔注射组	6	0.5mg/kg	7		272 ± 36*	6 ± 5**
48.7						

注：统计方法：Student-Newman-Keuls test；与模型组比较\*P<0.05，\*\*P<0.01，与肌肉注射组、气管内给药组或 DXM 组比较<sup>#</sup>p<0.05

微卡皮肤划痕、肌肉注射、气管内给药均能明显抑制致敏小鼠抗原攻击后引起的炎症细胞总数和嗜酸细胞增多。皮肤划痕和气管内给药组剂量比肌肉注射小 10 倍，作用强度相同。微卡（7.5  $\mu$ g/只、22.5  $\mu$ g/只）肌肉注射抑制致敏小鼠抗原攻击后嗜酸细胞增加，与模型组比较差异有显著性（P<0.05，表 1），但微卡剂量在 2.5  $\mu$ g/只时与模型组比较差异无显著性（P>0.05）。表明其对嗜酸细胞增加的抑制作用呈量效关系（ $\gamma=0.961$ ，图 1）。ID<sub>50</sub>95%可信限（ID<sub>50</sub>）=0.71（95%可信区间为 0.14~0.22  $\mu$ g/kg），以每只小鼠 20g 体重计算。微卡皮

肤划痕、肌肉注射、气管内给药与 DXM 腹腔注射 (0.5mg/kg) 比较差异无显著性 ( $P>0.05$ )。

## 二、对 BALF 中 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 含量以及 IFN- $\gamma$ /IL-4 比例的影响

致敏小鼠抗原攻击后引起的 BALF 中 IFN- $\gamma$  降低和 IL-4 水平的升高, 与空白和致敏不攻击组比较 ( $P<0.05$ ); 微卡皮肤划痕 (2.25  $\mu\text{g}$ /只) 与模型组比较可明显抑制 IFN- $\gamma$  的降低或 IL-4 水平的上升 ( $P<0.05$ ), 相同剂量 (2.25  $\mu\text{g}$ /只) 气管内给药或 10 倍剂量 (22.5  $\mu\text{g}$ /只) 肌肉注射作用更为明显。微卡 (2.25  $\mu\text{g}$ /只) 气管内给药对 IL-4 水平的上升的抑制作用明显强于皮肤划痕组 ( $P<0.05$ ), 与 10 倍剂量 (22.5  $\mu\text{g}$ /只) 肌肉注射组和 DXM 组比较差异无显著性 ( $P>0.05$ , 表 2)。

## 讨 论

最近对卡介苗一系列的深入研究表明, 卡介苗的 DNA 提取物 (MY-1) 能抑制人的淋巴细胞产生 IgE。MY-1 是从卡介苗中纯化得到的 DNA 片段, 能诱导人外周血单核细胞产生 IFN- $\gamma$  和 IL-12, 而 IFN- $\gamma$  能抑制 IgE 的产生。此外, 受 MY-1 刺激的人外周血细胞表面物质中可以检测到高水平的 IL-8, 而 IL-8 能拮抗 IL-4 对 IgE 的诱导<sup>[9,10]</sup>。

在本组实验中, 我们选择了代表 Th1 水平的细胞因子 IFN- $\gamma$  和代表 Th2 水平的细胞因子 IL-4 观察微卡三种给药途径对 Th1/Th2 平衡的调节作用。结果表明, 致敏小鼠抗原攻击后 BALF 中 IFN- $\gamma$  水平下降, IL-4 水平上升, 显示明显的 Th1/Th2 平衡失调。微卡气管内给药、皮肤划痕和肌肉注射三种途径给药均能纠正失调的 Th1/Th2 平衡, 其中以气管内给药途径对 IL-4 的抑制作用最强。我们推测一方面与微卡系统给药(皮肤划痕和肌肉注射)在气道局部药物浓度不及局部给药(气管内滴注)高有关, 另一方面与肺局部巨噬细胞和树突状细胞数量较多有关。在小鼠气道炎症实验中已经证实, 微卡肌肉注射呈量效关系抑制抗原攻击引起的 BALF 嗜酸细胞增加。这一结果与 Erb 等<sup>[11]</sup>对 *M.vaccae*-BCG 研究所取得的结果是一致的, 他们的结果证明: 鼻腔内给药对致敏小鼠抗原攻击引起的 BALF 嗜酸细胞增加的抑制作用最强, 优于腹腔注射和皮内注射。在我们的实验中还发现, 微卡对 IL-4 水平的抑制作用明显强于它对 IFN- $\gamma$  水平的升高作用, 这一结果与张立群等<sup>[12]</sup>报道的微卡对结核病小鼠模型小鼠 Th1 / Th2 细胞动力学研究结果相一致, 表明微卡对 Th2 细胞具有选择性。IL-4 可以诱发 T 细胞增殖, 使未定型 T 细胞分化为 Th2 细胞, 促进 B 细胞增殖生长并诱导 B 细胞分化为浆细胞, 进而产生 IgE、IgG4, 参与哮喘变态反应性炎症的发生和发展。

以上结果表明, 微卡可通过纠正失调的 Th1/Th2 平衡达到抗炎作用, 有望成为哮喘防治药物, 建议进行临床试验。

## 参 考 文 献

1 Stirling RG, Chung KF. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. *Eur Respir J*, 2000, 16: 1158-1174.

2 Cohn L, Ray A. T-helper type 2 cell-directed Therapy for asthma. *Pharmacol Ther*, 2000, 88: 187-196.

3 Walker C. New trends in immunotherapy to prevent atopic diseases. *TIPS*, 2001, 22: 84-90.

4 Shirliff PM, Easthope SE, Cheng S, et al. The effect of delipidated deglycolipidated (DDMV) and heat-killed *Mycobacterium vaccae* in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163: 1410-1414.

5 全国微卡菌苗临床研究协作组. 母牛分枝杆菌菌苗在初治肺结核治疗中的作用, *中华呼吸和结核杂志*, 2001, 24: 43-47.

6 Durban Immunotherapy Trial Group. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis: a randomised controlled trial. *Lancet*, 1999,354: 116-119.

7 Stanford JL, Stanford CA, Grange JM, et al. Does immunotherapy with heat-killed *Mycobacterium vaccae* offer hope for the treatment of multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis? *Respir Med*, 2001,95: 435-436.

8 叶世泰.嗜酸性粒细胞与变态反应.见:叶世泰,主编.变态反应学.第1版.北京:人民卫生出版社,1999.601-610.

9 Fujieda S, Iho S, Kinura Y, et al. DNA from *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin (MY-1) inhibits immunoglobulin production by human lymphocytes. *Am J Respir Crit Care Med*,1999,160: 2056-2061.

10 Fulton SA, Martin TD, Redline RW, et al. Pulmonary immuneresponses during primary *Mycobacterium bovis*-calmette-guerin bacillus infection in C57BI/6 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2000,22: 333-343.

11 Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, et al. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-bacillus calmette-guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med*, 1998,187: 561-569.

12 张立群,马伟路,笄冀平,等.母牛分枝杆菌菌苗对结核病小鼠 Th1/Th2 细胞动力学及诱导型一氧化氮合酶表达影响的研究.中华呼吸和结核杂志,2000,23: 43-46



# 干扰素联合微卡治疗慢性乙型肝炎

文彬, 杨桂林, 胡毅文

(深圳市东湖医院, 广东深圳 518020)

**【摘要】**目的: 探讨干扰素联合微卡治疗慢性乙型肝炎的作用机制及疗效。方法: 按诊断标准选择慢性乙型肝炎患者 80 例, 随机分为干扰素联合微卡为治疗组 (40 例) 和干扰素为对照组 (40 例), 观察比较两组患者肝功能、HBeAg 及 HBVDNA 的变化。结果: 治疗组的肝功复常率、HBeAg 及 HBVDNA 阴转率均明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。结论: 干扰素联合微卡治疗慢性乙型肝炎有协同作用, 它能提高细胞免疫应答能力, 促进 HBeAg 及 HBVDNA 的阴转, 减少病毒的变异, 延迟耐药性的发生。

**【关键词】**干扰素; 微卡; 乙型肝炎

文章编号: 1009-5519 (2003) 05-0670-02 中图分类号: R5 文献标识码: A

Interferon combined with M.vaccae in the treatment of chronic hepatitis B.WEN Bin,YANG Gui-ing,HU Yi-wen. Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518020,China

**【Abstract】** Objective: To study the effects of interferon combined with M.vaccae in the treatment of chronic hepatitis B. These cases were divided into two groups randomly,treatment group of 40 cases received interferon combined with M.vaccae and control group of 40 cases received interferon.We observed of transaminase、HBeAg and HBVDNA. Results: The recovery rate of transaminase of treatment group was higher than that of control group .The negative rate of HBeAg and HBVDNA was also higher than that of control group, and differences were significant between two groups ( $P<0.05$ ). Conclusion: There is a cooperative effect with interferon combined with M.Vaccae to treat chronic hepatitis B.It can improve cellular immune function, make HBeAg and HBVDNA change negative, decrease mutation of virus genotype, delay resistance of drugs.

**【Key words】** Interferon; M.Vaccae; Hepatitis B

我们应用干扰素联合微卡治疗慢性乙型肝炎, 以探讨其作用机制、疗效以及安全性, 现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 病例选择: 2000 年 1 月~2002 年 10 月我院收治的慢性乙型肝炎患者 80 例, 其中男 50 例, 女 30 例。年龄 16~50 岁, 平均年龄 32 岁。病程 1~33 年, 平均病程 13.2 年。诊断符合 2000 年 9 月中华医学会第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议 (西安) 修订的病毒性肝炎诊断标准。病例符合以下条件: (1) 血清 HBsAg、HBeAg 持续阳性 (ELISA 法和雅培法) 1 年以上; (2) 血清 HBVDNA 持续 2 次阳性 (斑点杂交法及 PCR 法); (3) 血清 ALT

超过正常值上限 2 倍，但增高幅度不超过正常上限值的 10 倍；（4）无 HAV、HCV、HEV 重叠感染；（5）不伴有失代偿性肝硬化；（6）无明显的心、脑、肾病史，无精神病、糖尿病和吸毒史；（7）非妊娠或哺乳期妇女；（8）近 1 年来没有使用过抗病毒药物和免疫调节药物治疗。

全部患者随机分为治疗组 40 例和对照组 40 例。两组患者在性别、年龄、病程、肝功能及 HBVDNA 水平等方面经统计学处理均无明显差异，具有可比性。

1.2 药物：选用深圳市海王英特龙生物技术有限公司生产的注射用重组人干扰素 a-2b，产品通过 GMP 认证。微卡（冻干治疗用母牛分枝杆菌菌苗）是安徽龙科马生物制药有限责任公司生产，产品通过 GMP 认证。

1.3 治疗方法：治疗组患者用干扰素 a-2b300 万 U 肌肉注射每天 1 次，用 3 天后改为 500 万 U 肌肉注射每天 1 次，连用 12 天，然后改为 500 万 U 隔日肌肉注射 1 次；微卡 22.5 μg 溶解于 1ml 注射用水作臀部肌肉深部注射，每周 1 次，疗程 3 个月，同时配合一般保肝药物（甘利欣、肝泰乐、鳖肝醇、维生素 B4 等）。对照组患者除不应用微卡外，其余用药及疗程同治疗组患者。

1.4 观察方法：两组患者治疗结束后均随访 3 个月。治疗期间及随访期间每 2 周检测肝功能及血常规 1 次，每月检测 HBeAg 和 HBVDNA1 次，检测项目用同一批号试剂并由同一人操作。观察临床症状、体征及不良反应。

1.5 统计学处理：用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 治疗及随访期间血清 ALT 复常情况：见表 1。

表 1 两组患者各时段 ALT 复常比较 (n, %)

组别	例数	治疗后 ALT 复常率		随访时段 ALT 复常率	
		8 周	12 周	8 周	12 周
治疗组	40	23 (57.5)	30 (75.0)	29 (72.5)	27 (67.5)
对照组	40	15 (37.5)	20 (50.0)	19 (47.5)	18 (45.0)

注：P<0.05

2.2 两组患者治疗结束及随访结束时血清 HBeAg、HBVDNA 阴转情况：见表 2。



表 2 两组患者治疗及随访结束时 HBeAg 及 HBVDNA 转阴比较 (n, %)

组别	例数	治疗结束时		随访结束时	
		HBeAg	HBVDNA	HBeAg	HBVDNA
治疗组	40	23 (57.5)	24 (60.0)	22 (55.0)	23 (57.5)
对照组	40	12 (30.0)	13 (32.5)	11 (27.5)	12 (30.0)

注:  $P < 0.05$

2.3 副作用: 治疗组及对照组患者均有不同程度的发热、头痛、乏力、食欲不振、睡眠欠佳, 以前 3 天明显, 随时间推移逐渐减轻, 差异无显著性。治疗组患者偶见微卡肌肉注射部位出现疼痛、硬结。

### 3 讨论

慢性乙型肝炎的治疗原则为抗病毒、免疫调控, 改善肝功能, 抗纤维化, 最主要最关键的是抗病毒治疗, 有效的抗病毒治疗可以减少病毒复制, 减轻肝脏炎症, 减少复发, 减缓或阻断肝纤维化和恶变。目前抗 HBV 用干扰素和核苷类药物, 只能抑制 HBV 复制, 而不能在人体内彻底清除 HBV, 因此, 停药后复发率较高。大量的研究证明, 慢性乙型肝炎患者存在免疫功能低下, 尤其是对 HBV 的特异性免疫功能降低和免疫耐受, 以及免疫调节功能异常, 是人体不能清除 HBV<sup>[1]</sup>。因此寻找安全有效的抗病毒治疗方案是目前治疗慢性乙型肝炎的方向。干扰素用于慢性乙型肝炎抗病毒治疗 20 年, 是目前治疗慢性乙型肝炎疗效最确切的首选药物, 但单独应用干扰素治疗慢性乙型肝炎, HBeAg 及 HBVDNA 转阴率亦仅有 30%~40%<sup>[2]</sup>, 而且可诱发 HBV 发生前 C 区基因突变。核苷类似物 (以拉米夫丁为代表) 是慢性乙型肝炎抗病毒治疗的一项重大进展, 它抑制病毒快, 适应症广, 副作用少, 但疗程长, 容易发生耐药变异, 停药后病情可能加重。因此这两种药物远不能满足慢性乙型肝炎抗病毒治疗的需要。慢性乙型肝炎的发生、发展与 HBV 在体内持续复制及机体免疫功能紊乱, 尤其是细胞免疫功能缺陷有关。因此, 免疫调节是治疗慢性乙型肝炎的一种新的清除病毒的治疗方法。为了提高效应率及减少耐药性发生, 近年来人们采用干扰素与免疫调节剂联合抗病毒治疗慢性乙型肝炎, 并取得较好疗效。

微卡是冻干治疗用母牛分枝杆菌菌苗, 是 90 年代 WHO 在其“结核病研究与发展战略规划”中新推荐的唯一免疫治疗剂, 它可促进外周血 T 淋巴细胞增殖反应, 使 CD<sub>3</sub> 值与 CD<sub>4</sub> 值明显升高, CD<sub>8</sub> 值明显降低, 改善细胞免疫功能, 是一种双向免疫调节剂。

应用干扰素联合微卡抗病毒治疗慢性乙型肝炎 40 例, 结果显示, 治疗组患者的转氨酶复常率显著高于对照组 (两组比较  $P < 0.05$ ), HBeAg 及 HBVDNA 阴转率亦显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。停药后随访结果亦显示治疗组患者的转氨酶复常率和 HBeAg、HBVDNA 阴转率亦显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。提示干扰素联合微卡抗病毒治疗慢性乙型肝炎有协同作用, 疗效比单用干扰素明显提高。

单用干扰素治疗慢性乙型肝炎,除效应率不高外,还易诱发 HBV 发生前 C 区基因突变,逃避免疫反应<sup>[3]</sup>。而拉米夫丁治疗慢性乙型肝炎更易发生耐药变异,其耐药变异率以 14%~20%逐年递增,部分患者停药后病情可明显加重。本组资料显示患者在干扰素联合微卡治疗过程中,HBV 发生前 C 区基因突变率明显低于单用干扰素,且未发现停药后有病情加重现象。微卡没有明显的毒副作用,患者容易耐受且使用方便,可以肌肉注射。所以干扰素联合微卡治疗慢性乙型肝炎不但可以提高效应率,还可以减少病毒变异,延迟耐药性发生。

## 参 考 文 献

[1]骆抗先主编.乙型肝炎基础和临床[M].北京人民出版社,1997.207.

[2]张定风.乙型肝炎抗病毒治疗的新进展[J].中华肝脏病杂志,1997,(1):1.

[3]盛国光,张建军.乙型肝炎病毒前 C 区基因变异的特点及其临床意义 (J).中西医结合肝病杂志,1995,5(3):48.

收稿日期:2003-02-24

(转自现代医药卫生 2003 年第 19 卷第 6 期 670-671)