

复方 861 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化与早期肝硬化的临床研究

尹珊珊 王宝恩 王泰龄 贾继东 钱林学

【摘要】 目的 观察复方 861 对慢性乙型肝炎肝纤维化、早期肝硬化患者的抗肝纤维化效果。**方法** 采用随机、双盲、安慰剂对照的方法,以治疗前后肝穿病理组织学为评价指标,对 6 家医院的慢性乙型肝炎肝纤维化患者 136 例,按照随机编码分别服用复方 861 胶囊或安慰剂胶囊共 24 周,观察治疗前后患者症状、体征、肝功能、肝纤维化指标 [IV 胶原 (C IV)、层黏连蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原 N 端肽 (PⅢP)、透明质酸 (HA)]、基质金属蛋白酶 1、2、9 (MMP1、2、9) 及金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMP1、2) 水平以及肝病组织学的变化。**结果** 52 例治疗组、50 例安慰剂组的患者完成治疗前后肝穿刺。治疗组患者治疗前、后血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 分别为 (68.2 ± 68.6) U/L 和 (45.9 ± 26.1) U/L、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 分别为 (60.4 ± 62.6) U/L 和 (46.7 ± 39.0) U/L, 安慰剂组患者治疗前、后血清 ALT 分别为 (65.3 ± 48.3) U/L 和 (85.4 ± 115.5) U/L, AST 分别为 (60.4 ± 44.6) U/L 和 (77.6 ± 89.6) U/L, 两组比较差异均有显著性, $t = 2.315$ 和 $t = 2.168$, $P < 0.05$ 。治疗组血清 HA、PⅢP、C IV、LN 水平均较治疗前有所下降,但与安慰剂组相比,差异无显著性。治疗组治疗前、后血清 TIMP1 分别为 (172.0 ± 79.6) ng/ml 和 (133.5 ± 66.8) ng/ml, MMP9 分别为 (116.1 ± 88.2) ng/ml 和 (80.4 ± 79.0) ng/ml, 较治疗前均明显下降, $t = 2.723$ 和 $t = 2.433$, $P < 0.05$ 。复方 861 治疗前、后血清 TIMP1/MMP1 比值分别为 48.3 ± 96.3 和 19.9 ± 28.0 , 较治疗前下降,而对照组则较治疗前升高,治疗前后差值相比,两组差异有显著性, $t = 2.248$, $P < 0.05$ 。治疗组治疗前、后肝组织炎症计分分别为 14.0 ± 6.0 和 10.2 ± 6.1 、纤维化计分分别为 11.9 ± 6.5 和 8.2 ± 4.5 , 病理图像分析胶原相对含量分别为 $18.9\% \pm 9.5\%$ 和 $14.9\% \pm 8.4\%$, t 值为 $3.354 \sim 2.202$, P 值均 < 0.05 ; S₂ 期逆转率为 38.9%, S₃ 期为 53.3%, S₄ 期为 78.6%, 总逆转率 52.0%; 安慰剂组分别为 14.3%、25.0%、41.7%、20.0%, 两组差异有显著性, χ^2 值为 $9.766 \sim 4.478$, P 值均 < 0.05 。复方 861 治疗组未见明显不良反应。**结论** 复方 861 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化、早期肝硬化是可以逆转的。

【关键词】 肝纤维化; 肝硬化; 肝炎, 乙型, 慢性; 复方 861

The effect of Cpd 861 on chronic hepatitis B related fibrosis and early cirrhosis: a randomized, double blind, placebo controlled clinical trial YIN Shan-shan*, WANG Bao-en, WANG Tai-ling, JIA Ji-dong, QIAN Lin-xue. *Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China
Corresponding author: WANG Bao-en.

【Abstract】 Objective To further assess the clinical antifibrotic efficacy of Cpd 861 on chronic hepatitis B related fibrosis and early cirrhosis using a randomized, double blind, and placebo controlled clinical trial. **Methods** Total 136 patients with HBV-related fibrosis and early cirrhosis were allocated randomly into Cpd 861 treatment group and placebo group for 24 weeks treatment. Serum fibrosis markers including hyaluronic acid (HA), IV collagen (IV-C), amino terminal propeptide of type III procollagen (PIIIP), and laminin (LN) and serum MMP1, 2, 9, TIMP1, 2 level were determined before and after 24 weeks treatment. Liver biopsies before and after 24 weeks of treatment were assessed according to modified Scheuer and Chevallier's scoring system. **Results** Total 52 patients in Cpd 861 treatment group and 50 patients in placebo-controlled group completed the 6 months. ALT level decreased from $68.2 \text{ U/L} \pm 68.6 \text{ U/L}$ to

作者单位: 100050 北京, 首都医科大学附属北京友谊医院 (尹珊珊、王宝恩、贾继东、钱林学); 北京, 中日友好医院 (王泰龄)

尹珊珊 女, 33 岁, 博士, 现在北京大学临床肿瘤医院超声科, 100036。

通信作者: 王宝恩

45.9 U/L \pm 26.1 U/L, AST level decreased from 60.4 U/L \pm 62.6 U/L to 46.7 U/L \pm 39.0 U/L ($P < 0.05$) after 24 weeks treatment, whereas there was no significant change in placebo group (ALT: 65.3 U/L \pm 48.3 U/L to 85.4 U/L \pm 115.5 U/L; AST: 60.4 U/L \pm 44.6 U/L to 77.6 U/L \pm 89.6 U/L, $P > 0.05$). Serum fibrosis markers, including HA, IV-C, PIIIIP, and LN were decreased after treatment, but there is no statistically significant compared with placebo group. Compared with placebo group, serum TIMP1 and MMP9 level decreased significantly (TIMP1 172.0 ng/ml \pm 79.6 ng/ml vs 133.5 ng/ml \pm 66.8 ng/ml; MMP9 116.1 ng/ml \pm 88.2 ng/ml vs 80.4 ng/ml \pm 79.0 ng/ml), and the ratio of TIMP1/MMP1 (48.3 \pm 96.3 vs 19.9 \pm 28.0) were also decreased after 861 treatment. In patients treated with Cpd 861, hepatic inflammatory score (from 14.0 \pm 6.0 to 10.2 \pm 6.1), fibrosis score (from 11.9 \pm 6.5 to 8.2 \pm 4.5), and relative content of collagen (from 18.9% \pm 9.5% to 14.9% \pm 8.4%) decreased significantly. In contrast, there was no significant change in placebo group. The reversal (fibrosis score decrease ≥ 2) rate of fibrosis in Cpd 861 group was 38.9% in S2, 53.3% in S3 (precirrhotic) and 78.6% in S4 (cirrhosis), significantly higher than those in placebo group (14.3%, 25.0%, and 41.7%, respectively). The overall reversal rate was 52.0% in Cpd 861 group, and 20.0% in placebo group ($P < 0.05$). No serious adverse effects were observed during Cpd 861 treatment. **Conclusions** Liver fibrosis and early cirrhosis due to HBV infection in man could be definitely reversed by herbal remedy Cpd 861.

【Key words】 Liver fibrosis; Cirrhosis; Chronic Hepatitis B; Cpd 861

复方 861 具有阻断和逆转大鼠及人类肝纤维化、早期肝硬化的作用, 其机制在于恢复了细胞外基质合成和降解的平衡^[1]。为进一步验证复方 861 的临床疗效, 研究采用随机、双盲、安慰剂对照的方法, 观察复方 861 在慢性乙型肝炎患者中的抗肝纤维化效果, 并测定血清基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 及金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 的水平, 以观察其治疗机制。

资料与方法

1. 病例的选择: 1999 年 9 月~2001 年 9 月在河北省沧州传染病院、山东省立医院、山东潍坊人民医院、解放军第 89 医院、湖北十堰市东风公司总医院、湖北十堰市中医医院就诊的慢性乙型肝炎患者依据入选标准入选本研究。诊断符合 2000 年病毒性肝炎防治方案的标准^[2]。共入选 136 例患者, 102 例患者完成 24 周的服药过程及治疗前后两次肝穿刺, 其中治疗组 52 例, 安慰剂组 50 例, 两组患者的平均年龄、性别比例以及平均病程等差异均无显著性。34 例 (治疗组 15 例, 安慰剂对照组 19 例) 患者在服药过程中失访, 其中有 20 例患者的失访原因为不愿作第二次肝穿刺检查。

2. 入选标准: 年龄 16~70 岁, 乙型肝炎病史半年以上, III 型前胶原 N 端肽 (aminoterminal propeptide of type III procollagen, P III P)、透明质酸 (HA)、IV 型胶原、层黏连蛋白 (LN) 至少有 2 项以上升高, 且肝穿刺证实有 S₂~S₄ 期肝纤维化的患者。患者志愿参

加临床研究, 并签署知情同意书。剔除标准: 失代偿期慢性肝炎, 合并其它严重疾病者, 孕妇或哺乳期妇女, 试验前 6 个月内使用过或合并使用糖皮质激素、免疫调节剂、抗病毒药物及抗肝纤维化药物者。

3. 研究药物: 应用孙瑞元教授与卫生部新药审评中心合作建立的 NDST 软件产生的随机表。治疗用药系以丹参等 10 味中药组成的复方胶囊剂型 (简称复方 861), 由天江药业有限公司提供, 患者按照随机编码分别服用复方 861 胶囊或安慰剂胶囊, 两种药物在外观及包装上完全相同, 服用方法为 3 次/d, 每次 7 粒。服用 24 周后揭盲, 安慰剂组患者再给予复方 861 治疗半年。

4. 观察指标: 观察治疗前后患者的症状、体征、肝功能、血清肝纤维化指标、MMP1、2、9 和 TIMP1、2 水平的变化; 服药 24 周后进行第二次肝穿刺检查, 根据中华医学会肝病学会肝纤维化学组确定, 由王泰龄等修订的慢性肝炎炎症活动度 (Scheuer^[3]) 及纤维化程度半定量计分 (Chevallier^[4]) 方案, 由三位医师盲法进行病理组织的半定量计分^[5, 6]; 应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统对网织加 Masson 染色肝组织进行图像处理; 肝组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 免疫组织化学染色。

5. 统计处理: 采用 SPSS10.0 及 Medcalc 软件进行分析, 自身比较: 行配对 t 检验; 两组比较: 定量资料采用 t 检验或方差分析, 半定量积分采用非参数统计方法分析。药物对病理组织学的疗效采用 Per Proto-

col (PP) 和 Intention to treat (ITT) 两种分析方法。

结 果

1. 临床表现: 症状及体征, 治疗组改善者 55.5%, 安慰剂组为 51.0%, 两组差异无显著性。

2. 血清肝功能、肝纤维化指标的变化: 治疗组丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 复常率为 54.5% (12/22), 天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 复常率为 44.4% (8/18); 安慰剂组 ALT 复常率为 34.5% (10/29), AST 复常率为 20% (6/30), 两组差异无显著性。复方 861 治疗后血清纤维化指标均有所下降, 但与安慰剂组比较, 除血清 P III P 外, 差异无显著性, 见表 1。

3. 血清胶原酶检测结果: 对 43 例患者 (治疗组 25 例, 安慰剂组 18 例) 进行了 MMP2 治疗前后的检测, 对 88 例患者 (治疗组 46 例, 安慰剂组 42 例) 进行了其它血清胶原酶的检测。与对照组相比, 复方 861 治疗后可明显降低血清 TIMP1、MMP9 的水平, 降低 TIMP1 与 MMP1 的比值, 见表 2。

4. 肝脏病理学变化: 102 例患者完成治疗前后肝穿刺 (治疗组 52 例, 安慰剂组 50 例), 而治疗组有 50 例治疗前后标本进入病理组织学分析, 有 2 例因肝穿组织较小, 无法进行病理计分而被剔除。与安慰剂对照组相比, 经过复方 861 治疗 6 个月后, 影响预后的三项关键病变即汇管区周围炎症及碎屑坏死 (piecemeal necrosis, PN)、桥接坏死 (bridging necrosis, BN)、纤维间隔均显著好转, 治疗后 PN 大部分减轻或消退,

BN 减轻, 大范围疏松宽隔消退或仅留细隔。同时肝细胞再生明显, 假小叶结构变得不典型甚至消失。

应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统, 对经过网织 + Masson 染色的病理标本进行了图像分析, 计算出胶原所占总面积的相对百分比。两组治疗前后病理半定量计分及胶原相对含量见表 3。

表 3 两组患者治疗前后病理半定量计分及胶原相对含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	炎症计分	纤维化计分	胶原相对含量 (%)
治疗组	50			
治疗前		14.0 ± 6.0	11.9 ± 6.5	18.9 ± 9.5
治疗后		10.2 ± 6.1*	8.2 ± 4.5 [#]	14.9 ± 8.4**
安慰剂组	50			
治疗前		11.4 ± 6.8	9.1 ± 5.4	15.6 ± 10.1
治疗后		14.5 ± 6.6	10.7 ± 5.5	17.5 ± 9.3

与治疗前比较: * $t = 3.223$, [#] $t = 3.354$, ** $t = 2.202$, P 值均 < 0.05

如果纤维化半定量计分增加 2 分以上 (包括 2 分), 则认为病理组织学恶化, 如果计分降低 2 分以上 (包括 2 分), 则认为病理组织学逆转, 变化小于 2 分者认为病理组织学不变。由此判定的各期逆转率见表 4。

用 ITT 分析, 即将失访患者的资料也纳入统计分析中, 病理组织学不变或恶化认为无效, 逆转为有效。治疗组有效 26/67 (38.8%), 安慰剂组有效 10/69 (1.5%), 治疗组无效 41/67 (61.2%), 安慰剂组无效 59/69 (85.5%)。与安慰剂组比, $\chi^2 = 9.705$, $P < 0.05$ 。

5. 免疫组织化学结果: 慢性乙型肝炎患者在复方

表 1 两组患者治疗前后血清生化及肝纤维化指标的变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT (U/L)	AST (U/L)	P III P (ng/ml)	C IV (ng/ml)	HA (ng/ml)	LN (ng/ml)
治疗组	52						
治疗前		68.2 ± 68.6*	60.4 ± 62.6*	1.3 ± 0.8*	199.9 ± 139.5	157.7 ± 87.9	215.7 ± 36.2
治疗后		45.9 ± 26.1	46.7 ± 39.0	1.1 ± 0.5	168.4 ± 120.5	139.3 ± 86.2	205.5 ± 41.7
安慰剂组	50						
治疗前		65.3 ± 48.3	60.4 ± 44.6	1.0 ± 0.6	173.6 ± 141.9	135.0 ± 85.6	205.2 ± 36.1
治疗后		85.4 ± 115.5	77.6 ± 89.6	1.2 ± 0.8	165.3 ± 101.6	145.4 ± 107.5	198.6 ± 44.7

ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; P III P: III 型前胶原 N 端肽; C IV: IV 型胶原; HA: 透明质酸; LN: 层黏连蛋白; 与安慰剂组相比, * t 值分别为 2.315、2.168、3.173, P 值均 < 0.05

表 2 两组患者治疗前后血清胶原酶的变化 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP1	MMP2	MMP9	TIMP1	TIMP2	TIMP1/MMP1
治疗组	25						
治疗前		9.3 ± 4.7	621.1 ± 165.8	116.1 ± 88.2	172.0 ± 79.6	15.0 ± 17.9	48.3 ± 96.3
治疗后		10.1 ± 4.5	641.8 ± 224.6	80.4 ± 79.0*	133.5 ± 66.8 [#]	30.5 ± 78.9	19.9 ± 28.0**
安慰剂组	18						
治疗前		9.4 ± 5.2	640.1 ± 199.0	87.9 ± 52.6	157.5 ± 80.5	12.2 ± 7.1	32.9 ± 41.7
治疗后		8.9 ± 4.7	606.8 ± 186.1	126.3 ± 98.7	165.5 ± 78.2	19.4 ± 33.9	48.1 ± 112.3

MMP: 基质金属蛋白酶; TIMP: 金属蛋白酶组织抑制因子; 与安慰剂组相比, * $t = 2.723$, [#] $t = 2.433$, ** $t = 2.248$, P 值均 < 0.05

表 4 两组患者纤维化各期逆转率比较 (例)

组别	例数	恶化	不变	逆转	逆转率(%)
治疗组	50	6	18	26 [#]	52.0
S ₁	3	0	3	0	
S ₂	18	5	6	7	38.9
S ₃	15	1	6	8	53.3
S ₄	14	0	3	11	78.6
S ₃ +S ₄	29	1	9	19 [*]	
安慰剂组	50	13	27	10	20.0
S ₁	12	2	10	0	
S ₂	14	8	4	2	14.3
S ₃	12	1	8	3	25.0
S ₄	12	2	5	5	41.7
S ₃ +S ₄	24	3	13	8	

与安慰剂组比较: * $\chi^2 = 4.478$, # $\chi^2 = 9.766$, P 值均 < 0.05

861 治疗前星状细胞增生活化, 胞浆内肌动蛋白微丝增多。α-SMA 免疫组织化学染色阳性的细胞比正常肝脏显著增加, 主要见于纤维隔和炎性血窦周围, 且纤维化程度越重, α-SMA 染色阳性的细胞数量越多。经复方 861 治疗后, α-SMA 免疫组织化学染色显示活化增生的星状细胞数量明显减少, 血窦周围减少的更加明显。

6. 不良反应: 无论治疗组还是安慰剂组均有部分患者出现咽干、恶心、胃部胀满不适以及便秘等不良反应, 但两组的不良反应发生率无明显差别。

讨 论

既往开放试验表明, 107 例患者应用复方 861 治疗前后肝穿刺病理检查, 发现无论炎症或纤维化均有明显好转, 证明肝纤维化及早期肝硬化可以逆转, 逆转率为 S₂ 期 78%, S₃ 期 (肝硬化前期) 82%, S₄ 期 (早期肝硬化) 75%^[1, 7, 8]。本结果再次证实了复方 861 阻断和逆转慢性乙型肝炎肝纤维化的作用。主要表现在: (1) 血清 P-III-P 水平较治疗前降低; (2) 炎症计分、纤维化计分、病理图像分析胶原相对含量均较治疗前明显下降; (3) 复方 861 治疗后, S₂ 期逆转率为 38.9%, S₃ 期为 53.3%, S₄ 期为 78.6%, 总逆转率为 52.0%; 安慰剂组分别为 14.3%、25.0%、41.7%、20.0%, 两组差异有显著性; 且 S₃ (肝硬化前期), S₄ 期 (早期肝硬化) 的逆转更为明显; (4) 细胞变性坏死、PN、BN 减少, 肝细胞出现明显再生。纤维间隔由宽变窄、由致密变疏松、由连续变间断, 天狼猩红染色可见纤维间隔的主要组成 I 型胶原可减少甚至消散。再次从病理学证实了复方 861 对慢性乙型肝炎患者的肝纤维化, 甚至早期肝硬化的逆转作用。

复方 861 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的机制有以

下几个方面: (1) 减轻肝脏炎症: 治疗后血清 ALT、AST 下降水平较对照组显著; 治疗后无论小叶内的炎症还是汇管区的碎屑坏死、桥接坏死均有减轻, 甚至消失, 汇管区界板整齐, 汇管区及肝实质内炎性细胞浸润减轻, 细胞变性坏死缓解。(2) 抑制星状细胞的分化、增殖, 从而抑制胶原的合成: 肝脏内 α-SMA 阳性细胞 (即活化的 HSC) 显著减少, 提示抑制了 HSC 的活化。肝脏内天狼猩红染色可见不仅 III 型胶原明显减少, 更有意义的是纤维间隔的主要组成 I 型胶原也可减少甚至消散; 病理图像分析显示总胶原相对含量显著减少。(3) 提高胶原酶的活性, 促进胶原降解: MMP1 的水平提高, 提示逆转肝纤维化的作用可能是通过提高 MMP1 水平, 从而降解纤维隔中难以被其它胶原酶降解的 I 型胶原实现的。(4) 抑制 TIMP1 的水平: 显著抑制慢性乙型肝炎患者血清 TIMP1 的水平, 提示复方 861 可能解除了 TIMP1 对胶原酶降解活性的抑制作用, 抑制血清 TIMP1/MMP1 的比值, 而安慰剂组反而使 TIMP1 水平及 TIMP1/MMP1 的比值升高, 提示在纤维化的逆转过程中, 抑制 TIMP1 的水平, 尤其是抑制 TIMP1/MMP1 的比值更为重要。

志谢 感谢河北省沧州传染病院张风潮主任, 山东省立医院赵洪涛、任万华主任, 潍坊市人民医院梁秀玲主任, 解放军第 89 医院杨伟主任, 湖北省十堰市东风公司总医院朱江、郭西萍主任, 杜亚平医师, 湖北十堰市中医医院雷陵所长

参 考 文 献

- 1 Wang BE, Wang TL, Jia JD, et al. Inhibition and reversion of liver fibrosis with Integrated Chinese and Western Medicine- Experimental and clinical research. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1999, 5: 6-11.
- 2 中华医学会传染病寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志, 2000, 8: 324-329.
- 3 Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. J Hepatol, 1991, 13: 372-374.
- 4 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, et al. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. Hepatology, 1994, 20: 349-355.
- 5 王泰龄, 刘霞, 周元平, 等. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝病杂志, 1998, 6: 195-197.
- 6 中华医学会肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. 中华肝病杂志, 2002, 10: 327-328.
- 7 王宝恩, 赵洪涛, 王泰龄, 等. 复方 861 对肝炎肝纤维化疗效的病理组织学分析. 中华肝病杂志, 1997, 5: 77-78.
- 8 段钟平, 王宝恩, 王泰龄, 等. 复方中药 861 冲剂治疗乙型肝炎肝纤维化. 中华肝病杂志, 1999, 7: 38.

(收稿日期: 2003-11-07)

(本文编辑: 袁平戈)