

拉米夫定和阿德福韦酯初始联合及脐血干细胞治疗失代偿期肝硬化临床研究

焦栓林, 欧阳洪, 杜世奇, 秦建增, 李东方, 申德林(解放军第153医院东区 感染科, 郑州 450007)

摘要:目的 探讨脐带血干细胞输注及拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)初始联合治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化的临床效果。方法 选择失代偿期乙型肝炎肝硬化患者56例, 给予ADV 10 mg/d和LAM 100 mg/d口服, 脐带血干细胞细胞悬液[含单个核细胞 $(15\sim35)\times 10^9/L$]100 ml静脉输注, 每周1次, 连续3次。治疗后将患者血常规、肝功能(ALT、AST、ALB、TBil、DBil)、病毒血清学指标进行比较。结果 56例患者的肝功能(如ALT、AST、TB、ALB)等血清学指标, 治疗前后差异有统计学意义($P < 0.05$), 血常规(如WBC、PLT等)、HBV DNA载量比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脐带血干细胞输注及LAM、ADV初始联合治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化可迅速显著地抑制HBV DNA的复制, 降低病毒载量, 有效减轻肝脏的炎症反应, 减少肝细胞坏死损伤, 促进肝细胞再生, 加速肝功能恢复。

关键词: 脐带血干细胞; 拉米夫定; 阿德福韦酯; 肝炎, 乙型; 肝硬化

Umbilical cord blood stem cell combined with adefovir dipivoxil and lamivudine, the de novo combination therapy on decompensated liver cirrhosis

JIAO Shuan-lin, OUYANG Hong, DU Shi-qi, QIN Jian-zeng, LI Dong-fang, SHEN De-lin (Department of Infectious Diseases, Eastern Hospital of 153 PLA, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of umbilical cord blood stem cell transplantation and treatment of adefovir dipivoxil combined with lamivudine in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis.

Methods Total of 56 cases with decompensated hepatitis B cirrhosis received adefovir dipivoxil tablets 10 mg/d and lamivudine tablets 100 mg/d. The 100 ml of suspension liquid of umbilical cord blood stem cell [with single cells $(15\sim35)\times 10^9/L$] by intravenous infusion for once a week with continuous 3 times. After treatment, liver function tests (ALT, AST, ALB, TBil and DBil) and viral serology were compared. **Results** Serum markers of liver function before and after treatment of 56 cases were significantly different ($P < 0.05$), HBV DNA load were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusions** The umbilical cord blood stem cell transplantation and treatment of adefovir dipivoxil combined with lamivudine in decompensated hepatitis B cirrhosis can significantly inhibit the rapid HBV DNA replication, reducing viral load, effectively reducing liver inflammation and liver necrosis injury, also promoting regeneration of liver cells, and accelerating the recovery of liver function.

Key words: Cord blood stem cells; Lamivudine; Adefovir dipivoxil; Hepatitis B; Liver cirrhosis

在失代偿期肝硬化的治疗上, 长期以来仍以抗病毒、保肝、对症及预防并发症为主。可见, 抗病毒治疗是延缓或阻止失代偿期肝硬化进展的关键。有研究显示, 单药、长期治疗势必增

加耐药的几率, 而初始联合治疗则可以降低耐药的发生率。大部分失代偿期肝硬化者的肝细胞再生能力丧失, 致使病程难以逆转。因此, 寻求一种简便、安全有效的替代治疗方案迫在眉睫。近年来, 大量实验及临床资料证明, 脐带血干细胞移植可改善失代偿期肝硬化者的肝功能和免疫功

能,修复肝损伤。为了在短期内迅速抑制病毒、防止病毒变异导致的肝功能严重受损甚至衰竭,同时尽快促进肝细胞再生,恢复肝脏功能,延长生存时间,提高生活质量。自2009年2月起,本院开展了拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)初始联合及脐带血干细胞输注治疗失代偿期肝硬化,并对该治疗方法的可行性及临床疗效进行探讨和尝试,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2009年2月至2011年3月本院收治的失代偿期乙型肝炎肝硬化患者56例,其中男性30例,女性26例,年龄25~55岁,平均年龄 45.5 ± 7.3 岁,病程1~4年,平均病程2.7年。疾病诊断标准参照中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会制订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[1]。所有病例为HBV DNA阳性,肾功能正常,肝功能Child-Pugh评分均为C级,近期并发急性出血及严重脾功能亢进,严重凝血机制障碍,顽固性腹水怀疑有癌变者慎做移植对象。所有病例常规检查肝功能、肾功能、血、尿、便常规、凝血四项、甲胎蛋白以及肝脏影像学检查,同时综合基础治疗,签订知情同意书。

1.2 脐带血干细胞制备方法

1.2.1 脐带血的选择与采集 选择身体健康且无各种急、慢性疾病及传染病、家族遗传性疾病,妊娠期内无严重并发症,35岁以下分娩过程顺利的产妇采集,经本人同意。采用密闭式采集法,每份脐带血采集的量为60~120 ml,其中单个核细胞约为 $(15 \sim 35) \times 10^9/L$ 。

1.2.2 脐带血的分离及鉴定 采集好的脐带血在4小时内送至百级层流实验室,按照SOP制备程序,采取负收集混合法应用人类骨髓、脐带血干细胞/祖细胞体外分离纯化试剂盒制备分离纯化脐带血

干/祖细胞,制备完成后留取细胞样本进行实验检测。①母体血标本的病原微生物检测:术前应用常规方法对母体血样标本进行病原微生物检测,包括HIV、HBsAg、HCV、TP等病原微生物的检测;②细菌学检查:应用全自动细菌培养仪和配套标准的血培养瓶进行真菌和细菌检测;③细胞存活率检测,使用溴芬蓝染色法计数活细胞数目;④单个核细胞计数;⑤干细胞标志物CD105⁺、CD34⁺和CD44⁺检测。

1.3 方法 所有患者根据病情给予门冬氨酸钾镁、复方甘草酸制剂、利尿剂、人血白蛋白、冰冻血浆等对症、支持和防治各种并发症等基础治疗。在患者知情同意下进行抗病毒治疗:ADV 10 mg/d口服, LAM 100 mg/d口服,均以48周为1个疗程。

将本院检验科采集、分离的单个核细胞配制成 $(15 \sim 35) \times 10^9/L$ 的细胞悬液100 ml,静脉输注,每周1次,连续3次。

1.4 观察指标 每治疗4周复查1次肝功能及血常规,每12周复查HBV DNA、PT、肾功能及腹部超声,并进行Child-Pugh评分,同时观察记录患者不良事件。

1.5 统计学处理 数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 随访结果 56例患者全部完成6个月随访,中途无脱落,按意向性分析处理。治疗前后患者肝功能和血象等指标有明显好转,见表1。治疗第4周,大多数患者临床症状、体征开始明显改善。治疗后第12周,腹水减少及下肢水肿减轻35例(62.5%);食欲改善、体力好转37例(66.1%),腹胀减轻33例(58.9%)。

2.2 患者治疗前后血清学指标变化比较 56例患者中,治疗12周HBV DNA低于检测下限($< 1.0 \times$

表 1 56例患者治疗前后肝功能及血常规比较 ($\bar{x} \pm s$)

| | ALT (U/L) | AST (U/L) | TBil (mmol/L) | ALB (g/L) | 血氨 ($\mu\text{mol/L}$) | WBC ($\times 10^9/L$) | PLT ($\times 10^9/L$) |
|-----|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 治疗前 | 199.47 \pm 18.57 | 178.17 \pm 13.12 | 141.33 \pm 14.32 | 29.19 \pm 4.87 | 194.00 \pm 63.00 | 2.30 \pm 1.10 | 67.00 \pm 17.00 |
| 治疗后 | 57.15 \pm 10.23 ^a | 50.00 \pm 15.63 ^a | 79.43 \pm 9.76 ^a | 36.66 \pm 5.33 ^b | 57.00 \pm 12.10 ^a | 4.10 \pm 0.75 ^a | 113.00 \pm 21.00 ^a |

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

10^3 拷贝/ml)为37例。治疗24周后,56例患者HBV DNA均 $< 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ml。

2.3 不良反应 治疗期间未发现与使用药物有关的肾功能损害及其他不良事件,患者均耐受性良好,无死亡病例。

3 讨论

乙型肝炎肝硬化进入失代偿期后,随着病情逐渐发展,最终可导致肝功能衰竭,而HBV感染则是导致肝硬化失代偿期病情进展的主要原因。有学者指出,高病毒复制的失代偿期肝硬化患者病死率明显高于无病毒或低病毒复制者^[2]。在肝硬化失代偿期阶段,病因治疗不仅是必要的,而且是有效的。目前,用于抑制病毒复制的药物主要是核苷(酸)类似物,但随着用药时间的延长,基因变异会逐年增加,进而导致病情加重,再加上通常失代偿期肝硬化患者的5年生存率仅为14%^[3],一旦发生变异,常发生致命性的肝功能衰竭。而联合用药方案可使体内有乙型肝炎病毒复制的终末期肝病患者的乙型肝炎复发率明显降低^[4]。

多项研究证实,LAM、ADV联合抗病毒治疗可以延缓肝硬化患者病情进展^[5-7]。他们可通过竞争性抑制乙型肝炎病毒的反转录过程,从而减低病毒和抗原数量,同时还可促进长期处于对乙型肝炎病毒低反应状态的T淋巴细胞功能的恢复,从而加强机体对乙型肝炎病毒的清除。LAM是治疗乙型肝炎和肝移植后防治乙型肝炎复发的最常用的一线药物,但是LAM治疗时间越长,其出现聚合酶反转录酶区YMDD基因变异耐药的几率就会越高。ADV是一种单磷酸腺苷的无环核苷类抗乙型肝炎病毒药物,是目前公认的耐LAM患者的首选药物,现在已经证实LAM治疗后出现HBV DNA P区rM204I/V位点的变异,而ADV的变异位点是rtA181V和rtN236T,故ADV和LAM并无交叉耐药的现象,对YMDD变异的乙型肝炎病毒有抑制作用。失代偿期肝硬化患者5年生存率相对较低,一旦用药不当,疗效常不佳,尤其发生基因变异时常会导致严重的肝功能衰竭,加重患者的经济负担^[8]。基于中国的国情,在药物选择上,既要考虑

疗效,又要兼顾患者的经济状况。在目前的核苷(酸)类抗病毒药物中,LAM和ADV价格相对便宜。理论上,采用LAM和ADV联合治疗可以通过减低耐药性,提高疗效^[9]。初始治疗时,直接选择两者同时服用,更适合中国国情。本文研究资料显示,56例患者在治疗过程中或治疗结束时无一例出现基因变异。

在肝硬化患者的肝组织中,由于假小叶的形成改变了肝内管道结构,阻碍了肝细胞和血浆的交换,致使细胞治疗很困难。多数动物实验证实,干细胞移植能减轻肝纤维化、改善肝生物化学指标及不同程度地转化为肝细胞^[10]。此外,脐带血取材方便,来源广泛,所含干细胞的增殖与分化能力强(在特定环境下可以分化为肝细胞并能促进肝细胞修复和重构)、易在体外扩增,移植后较少发生排斥反应,可避免伦理问题等优点。

近期,本科室采用干细胞静脉输入、多次(3次以上)输入法治疗失代偿期肝硬化,取得了明显效果,究其原因:肝干细胞具有归巢到受损肝脏并持续传递营养信号的潜能^[11];通过静脉输注易于控制剂量;因通过肝动脉移植,可能导致肾病和肝肾综合征,且肝动脉移植具有一定的创伤性,价格偏高,故肝动脉并非干细胞移植治疗终末期肝病合适途径^[12]。另外,失代偿期肝硬化患者除凝血机制较差外,组织结构也发生了改变,故不宜多次重复介入。许多动物实验及临床研究表明,干细胞移植疗效与归巢的数量呈正相关。实验显示^[13],干细胞移植到实验小鼠后第4周,其增殖数量仅占受体肝细胞的1%~3%。可见,仅靠1次移植,是不能解决大量肝细胞再生问题。如何提高干细胞向损伤肝组织特异性归巢的效率,使其增殖、分化为更多的肝细胞,替代损伤肝细胞,从而促进肝功能修复和肝细胞再生,进而恢复肝脏的功能,本研究采取的方法是多次静脉输入法。

本研究发现,患者自治疗后第2周实验室指标开始出现变化,至治疗后第4周,56例患

者血清白蛋白水平明显升高, 35例 (2.5%) 腹水减少及下肢水肿减轻, 患者ALT逐渐降低者22例 (57.1%), 患者TBil逐渐下降者21例 (55.3%)。治疗后, 全部患者白蛋白、凝血酶原活动度、白细胞有不同程度的改善。上述结果表明, 脐带血干细胞治疗后, 患者肝脏功能明显改善, 尤其以肝脏合成及修复功能改善较为显著。这些变化特别是血清白蛋白的升高是一般护肝治疗不可能达到的。另外, 笔者还观察到, 治疗后大多数患者的临床症状明显改善, 而且治疗后未发现严重不良反应及并发症。脐带血干细胞能够促进终末期肝病患者肝功能恢复, 治疗安全有效, 在当今原位肝移植供肝紧缺的情况下, 为肝衰竭患者开辟新的治疗途径, 具有较好的应用前景, 值得临床进一步治疗研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 13: 881-891.
- [2] 臧红, 陈国凤, 纪冬, 等. 乙型肝炎肝硬化患者HBV血清学模式与病毒载量关系的研究[J]. 传染病信息, 2008, 21: 97-99.
- [3] 周学斌, 肖绍树. 拉米夫定治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化的研究进展[J]. 实用肝病杂志, 2009, 12: 150-152.
- [4] 王宇明, 陈耀凯, 张大志, 等. 阿德福韦酯治疗拉米夫定耐药慢性乙型肝炎的临床研究[J]. 中华肝病杂志, 2006, 14: 803-880.
- [5] 邹桂舟, 叶珏, 邵玉峰, 等. 拉米夫定联合阿德福韦酯治疗活动性乙型肝炎肝硬化[J]. 实用肝病杂志, 2011, 14: 195-196.
- [6] 刘旭玲, 杨林虹, 刘长凯. 阿德福韦酯联合拉米夫定治疗乙型肝炎肝硬化失代偿期的疗效及安全性研究[J]. 药物与临床, 2011, 18: 66-67.
- [7] 王华雨, 谢群, 吴小飞, 等. 核苷类似物治疗失代偿期肝硬化76例远期疗效观察[J]. 南通医学院学报, 2009, 29: 278-279.
- [8] 肖扬, 郑金莉, 周岳进, 等. 拉米夫定或阿德福韦酯选择性治疗失代偿性乙型肝炎肝硬化3年临床观察[J]. 肝脏, 2010, 15: 1-4.
- [9] 庄辉. 我国乙型肝炎病毒感染挑战[J]. 中华肝病杂志, 2005, 23(增刊): 2-6.
- [10] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury[J]. Stem Cells, 2008, 26: 2705-2712.
- [11] Poll VD, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo[J]. Hepatology, 2008, 47: 1634-1643.
- [12] Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al. Phase I human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 3359-3363.
- [13] 林沪, 陈黎明, 施明, 等. 干细胞治疗肝脏疾病的新进展[J]. 肝脏, 2010, 15: 49-51.

收稿日期: 2012-03-31

• 消息 •

《中国肝脏病杂志（电子版）》网上查询途径

1. 中华人民共和国新闻出版总署: <http://www.gapp.gov.cn/cms/html/21/index.html> → “在线查询” → “新闻机构查询服务” → 媒体类别选择 “电子期刊”
2. 北京市新闻出版（版权）局: <http://www.bjppb.gov.cn> → “行业资讯” → “北京地区连续型电子出版物”
3. 人民卫生出版社: <http://www.pmph.com/> → “报刊”
4. 中国国家图书馆•中国国家数字图书馆: <http://www.nlc.gov.cn>