

补肾解毒方与健脾解毒方对慢性乙肝患者不同阶段的 T 淋巴细胞功能影响的研究

唐开斌 夏仁兴

(四川省广安市人民医院感染科, 广安, 638000)

摘要 目的:比较补肾解毒方和健脾解毒方对乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)慢性感染患者在不同免疫状态下外周血 T 淋巴细胞(Ts)功能影响。方法:选取本院感染科 2013 年 9 月至 2014 年 5 月门诊慢性 HBV 感染患者 40 例,据患者不同免疫状态分为清除组和耐受组,另选本院健康职工 10 例作为对照组。采用大鼠补肾解毒药物血浆和健脾解毒药物血浆进行干预。以 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 分子的表达及干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)的水平作为研究指标,判断干预对外周血 T 淋巴细胞(Ts)功能影响情况。结果:各组健脾组和补肾组血浆在干预后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 的表达均显著升高,耐受组中 $P < 0.05$,补肾组血浆干预后 CD28⁺ 及 CD8⁺ 分子显著高于健脾组, $P < 0.05$;两种药物血浆分别干预后,CD28⁺ 分子表达均显著高于清除组同期, $P < 0.05$ 。结论:健脾解毒法和补肾解毒法均能促进慢性 HBV 感染患者 T 细胞功能的恢复,免疫耐受期可能是中医药治疗的一个重要时期,补肾解毒药物效果优于健脾毒药物,需要分子实验和临床实验提供更多循证依据。

关键词 补肾解毒方;健脾解毒方;慢性乙肝病毒感染;T 细胞

Effect of Bushen Jiedu Decoction and Jianpi Jiedu Fang on the Function of T Lymphocytes in Different Stages of Chronic Hepatitis B Patients

Tang Kaibin, Xia Renxing

(Department of infection of Guangan People's Hospital, Guangan 638000, China)

Abstract Objective: To compare the effect of Bushen Jiedu Decoction and Jianpi Jiedu Fang on the function of T lymphocytes (Ts) in different immune status of chronic hepatitis B (HBV) patients. **Methods:** A total of 40 cases of patients with chronic HBV infection who were enrolled in September 2013 to May 2014 in the department of outpatients of our hospital were selected and randomly divided into immune clearance group ($n = 20$) and immune tolerance group ($n = 20$) according to different immune status. Another 10 cases of healthy workers in our hospital were selected as healthy group. Select the venous blood anticoagulated peripheral to separate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), making a further separation and extraction of cultured T lymphocytes and use the rat kidney detoxification plasma and spleen detoxification drug plasma to make intervention. To detect the expression of T lymphocyte subsets and CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺ molecules and observe T cell culture supernatant of IFN-gamma level. **Results:** CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD28⁺ expression in the Bushen Jiedu group and spleen detoxification group decreased at a greater level than that of the normal group. When compared with before intervention, the expression levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺ after intervention with the kidney and spleen detoxification plasma drug were increased, and the levels of CD28⁺ and CD8⁺ in the immune tolerance group of spleen detoxification intervention group was significantly lower than that of Bushen Jiedu group ($P < 0.05$) and expression of CD28⁺ after two kinds of plasma drugs intervention was significantly higher than that of immune clearance group ($P < 0.05$) at the same period. **Conclusion:** Kidney detoxification method and spleen detoxification method can promote the recovery of T cell function in patients with chronic HBV infection, which have a significant effect of two kinds of drug containing plasma on T cell function in patients with chronic HBV infection during the immune tolerant phase.

Key Words Bushen Jiedu Decoction; Jianpi Jiedu Fang; Chronic hepatitis B virus infection; T cell

中图分类号: R256.4; R259 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.014

慢性乙型肝炎(Chronic Hepatitis B, CHB)患者的外周血免疫细胞多存在不同程度的免疫功能低下,以 T 淋巴细胞功能低下为中心的细胞免疫功能

障碍导致的免疫耐受是导致 HBV 持续感染和慢性乙型肝炎难以治愈的主要原因^[1]。以往多个研究表明,中药可有效的改善机体的免疫状态,提高和恢复

免疫细胞功能^[2],因而中药治疗慢性乙型肝炎成为研究热点。中医理论认为,HBV 慢性感染是由于湿热疫毒内侵,脾肾亏虚^[3]。与西医治疗慢性乙型肝炎重在抑制病毒复制的机制不同,中医治疗 CHB 重在免疫功能的恢复^[3]。本研究拟通过提取在不同免疫状态下 HBV 慢性感染患者外周血 T 细胞,进行体外培养和干预,了解补肾解毒方与健脾解毒方对 T 细胞功能的作用及影响,探究中医药治疗慢性乙型肝炎的疗效,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象及实验样本采集 纳入 2013 年 9 月至 2014 年 5 月来我院感染科门诊按照《慢性乙型肝炎防治指南》^[6]被确诊为慢性 HBV 感染患者 40 例,排除标准:1) 未满 18 周岁患者;2) 未签署知情同意书或者不同意参与本次实验,或因其他原因不适宜参与本次实验或完成本次实验的患者。根据免疫状态的不同,将患者分为清除组和耐受组,每组各 20 例,其中,耐受组中,男 13 例,女 7 例,平均年龄为 (29.2 ± 5.14) 岁,病程范围 6 ~ 23 年,平均病程为 (12.5 ± 5.2) 年;清除组中,男 12 例,女 8 例,平均年龄为 (29.6 ± 3.35) 岁,病程 7 ~ 24 年,平均病程为 (12.3 ± 5.4) 年。在本院选取健康职工 10 例,作为健康对照组,其中,男 6 例,女 4 例,平均年龄为 (25.7 ± 3.5) 岁。各组基线资料比较,差异不具有统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。抽取研究对象外周血,稀释并抗凝处理后,使用淋巴细胞分离液来分离单核细胞(Peripheral Bloodmononuclear Cells, PBMCs),于培养箱中孵育。最后用胎牛血清 RPMI-1640 培养基悬浮细胞,并调整外周血 PBMCs 的终浓度,再次于培养箱中进一步培养。

1.2 干预措施

1.2.1 药物 补肾解毒方:六味地黄丸^[4] 24 g,泽泻 9 g,白薏仁 10 g,山药 12 g,茵陈 15 g,茯苓 9 g,藿香 10 g,山茱萸 12 g,牡丹皮 9 g,石菖蒲 10 g,滑石 30 g,黄芩 10 g,薄荷 6 g,川贝母 10 g,连翘 10 g,射干 10 g;健脾解毒方:四君子汤^[5]:炙甘草、人参、茯苓、白术各 9 g,石菖蒲、白薏仁、川贝母、黄芩、藿香、连翘、射干各 10 g,茵陈 15 g,滑石 30 g,薄荷 6 g。饮片均采用地道药材,由长沙九芝堂股份有限公司提供,由本院制备,补肾解毒小、中剂量组分别含生药 1.94 g/mL 和 9.71 g/mL;健脾解毒小、中剂量组分别含生药 1.58 g/mL 和 7.92 g/mL。

1.2.2 干预血清实验动物材料 动物 SD 大鼠 48 只,SPF 级,39 日龄,雌雄各 24 只,体重 146.3 ~

170.2 g,平均 159 g,川北医学院动物中心提供。所有纳入实验的大鼠 2014 年 8 月 6 日至 9 月 14 日在川北医学院动物中心 SPF 级动物饲养房饲养。

1.2.3 大鼠干预血浆制备 采用随机数表法将 48 只 SD 大鼠随机分为 5 组,正常对照组 16 只,补肾解毒方和健脾解毒方各分两个组,补肾解毒方小剂量组 8 只,注射剂量 1.94 g/mL,补肾解毒方中剂量组 8 只,注射剂量 9.71 g/mL;健脾解毒方小剂量组 8 只,注射剂量 1.58 g/mL,健脾解毒方中剂量组 8 只,注射剂量 7.92 g/mL。统一按照大鼠的体表面积换算灌胃量,参照贺石林^[7]等文献中标准,小剂量制定为成人临床用药量的 6.562 倍,中剂量则为小剂量的 5 倍。参考文献^[8]进行灌胃操作及含药血浆制备工作。正常对照组进行常规生理盐水灌胃。灌胃时间为每天 8:00 和下午 17:00 各 1 次,灌胃量为 1 mL,连续 3 d;第 4 天在 8:00 灌胃结束后 2 h 内取血。采血前大鼠禁食 12 h,腹腔注射 1% 戊巴比妥(45 mg/kg)进行麻醉,开腹,分离主动脉并用采血针采血约 10 mL/只于肝素抗凝管,2 500 r/min 离心 20 min,收集上层血浆并用 0.22 μ m 滤膜滤掉细菌,分装于 1.5 mL EP 管中, - 20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。参考文献^[11-12]结合本院实验结果,以 T 细胞生存率最高的血浆浓度组作为正式实验的干预浓度,分别为补肾解毒中剂量组和健脾解毒小剂量组。

1.3 结局判断标准及方法 通过检测 T 细胞表面分子检测及 IFN- γ 的水平作为外周血 T 淋巴细胞(Ts)功能的检测。检测方法如下:1) T 细胞表面分子检测:制备 T 细胞悬液 6 管,先加入 200 μ L 细胞悬液,后分别加入荧光标记鼠抗人 CD3-Percp(多甲藻叶绿素蛋白),CD8-PE(藻红蛋白荧光素),CD4-FITC(异硫氰酸荧光素),CD28-FITC 各 20 μ L,混匀,孵育,清洗细胞后固定,用 Percp、FITC、PE 标记鼠抗人 IgG 作为对照。使用流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 的表达水平。2) IFN- γ 的水平检测:采用 ELISA 法检测。

1.4 统计分析 采用 SPSS 13.0 版本统计软件进行统计分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验进行比较;多组间比较用方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组各时间点 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD28⁺ 表达情况比较 补肾组和健脾组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD28⁺ 的表达,与对照组相比均显著下降,与干预前相比均显著升高,差异具有统计学意义

表 1 各组各时间点 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 的表达情况比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	剂量(g/mL)	时间	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD28 ⁺
耐受	20		干预前	58.04±4.36 ^{*△}	34.44±2.60 ^{*△}	29.66±3.21 [△]	44.33±3.47 [△]
空白	20	—	干预后	57.21±3.31	32.70±3.55	29.37±4.22	44.52±3.49
补肾	20	9.71	干预后	64.36±2.39 [▲]	39.35±3.48 [▲]	34.22±2.20 ^{*▲□}	52.41±2.41 ^{*▲□}
健脾	20	1.58	干预后	63.58±3.21 [▲]	38.57±2.33 [▲]	32.09±1.27 [▲]	49.38±2.95 ^{*▲}
清除	20		干预前	62.33±3.61 [△]	37.41±4.23 [△]	30.88±1.98 [△]	45.77±4.38 [△]
空白	20	—	干预后	61.62±2.77	36.07±3.55	29.55±4.41	45.87±3.91
补肾	20	9.71	干预后	64.33±2.64 [▲]	40.19±2.54 [▲]	33.10±3.62 [▲]	48.31±2.40 [▲]
健脾	20	1.58	干预后	64.29±2.41 [▲]	39.42±2.36 [▲]	32.81±4.26 [▲]	47.33±3.33 [▲]
对照	10	—	干预前	67.13±2.31	44.83±3.09	35.12±2.36	55.74±2.34

注:与清除组同期比较,* $P<0.05$;对照组比较,[△] $P<0.05$;与相同免疫状态健脾组比较,[▲] $P<0.05$;与本组干预同期比较,[□] $P<0.05$ 。

($P<0.05$);耐受组中,健脾组血浆干预后 CD28⁺ 及 CD8⁺ 分子显著低于补肾组,差异具有统计学意义, $P<0.05$;2 种药物血浆分别干预后,CD28⁺ 分子表达均显著高于清除组同期,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。见表 1。

2.2 含药血浆干预前后 IFN- γ 水平的比较 与对照组相比,2 组 IFN- γ 水平在含药血浆干预前均显著偏低,差异有统计学意义, $P<0.05$;在药物血浆干预后,T 细胞 IFN- γ 水平和干预前相比均有明显升高,差异有统计学意义, $P<0.05$,补肾组和健脾组 2 组之间比较差异无统计学意义, $P>0.05$ 。具体结果见表 2。

表 2 各组干预前后 IFN- γ 表达水平的比较

组别	例数	干预前	干预后	
			补肾	健脾
耐受	20	275.58±47.36 ^{*▲}	294.21±45.41 [△]	291.45±45.32 [△]
清除	20	287.61±43.62 [*]	294.33±42.38 [△]	294.32±44.28 [△]
对照	10	336.56±43.31	334.23±43.26	334.25±42.31

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与干预前比较,[△] $P<0.05$;与清除组比较,[▲] $P<0.05$ 。

3 讨论

近年来国内外诸多研究证实,激活机体自身特异性的细胞免疫反应是解决免疫耐受,清除病毒的关键所在,而机体自身的免疫细胞功能状态则与机体特异性的细胞免疫的强弱密切相关。HBV 感染人体后,机体主要发挥 T 淋巴细胞参与的细胞毒效应免疫来清除 HBV 病毒。机体特异性的细胞免疫主要参与细胞为 CD4⁺ 辅助性 T 淋巴细胞和 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞,其中 CD4⁺ T 细胞在机体抗病毒的免疫应答中发挥着至关重要的中心作用,其数量的下降会对机体的细胞免疫和体液免疫的功能缺陷产生作用。进而导致慢性乙型肝炎迁延不愈,HBV 难以清除。CD8⁺ T 淋巴细胞可被 HBV 感染的干细胞

直接激活,进而作为免疫应答损伤被感染的肝脏细胞,在这个过程中同时,HBV 也被清除,因此,CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞是衡量 HBV 感染者机体免疫功能和免疫状态的重要指标。CD28⁺ 是 T 淋巴细胞表面重要共刺激分子,参与 T 淋巴细胞的信号转导过程,在 T 淋巴细胞的活化、增殖、启动和维持免疫应答的过程中发挥重要的作用^[9-10]。

在中医学理论中,慢性 HBV 感染属于黄疸、胁痛、腹胀、积聚等范畴,认为“湿热毒邪”是 HBV 慢性感染的主要致病因素,外因为“湿热毒邪”内侵,内因为“脾肾两亏”,病理基础为本虚标实,机体免疫功能紊乱异常^[11-12]。中医治疗慢性 HBV 感染大多数在补肾和(或)健脾基础上,配伍解毒化湿或疏肝行气,或活血化瘀的药物,因此,标本兼治符合 HBV 慢性感染的中医病理机制。本实验在此基础上采用补肾解毒方和健脾解毒方对慢性 HBV 感染者外周血 T 淋巴细胞进行干预,并对两种不同药物对慢性 HBV 感染者不同状态下 T 淋巴细胞的功能状态的影响进行探讨,以期对慢性 HBV 感染的中医病理机制的深入研究提供依据,为中医临床治疗慢性 HBV 感染提供实验基础和理论依据。

本研究中,与对照组相比,HBV 慢性感染患者 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD28⁺ 表达均显著下降,在 IFN- γ 水平方面,与对照组相比,2 组在干预前均显著偏低,提示免疫功能可能在 HBV 感染影响下,功能受到抑制。干预后,以上四种分子表达均显著升高。其中,值得注意的是在耐受组中,在补肾解毒药物的干预下,各组的 CD8⁺ 及 CD28⁺ 分子表达均高于健脾毒药物的干预,另外,两种药物血浆分别干预后,CD28⁺ 分子表达同期均高于清除组;提示,免疫耐受期可能是进行中医治疗的一个重要时期,补肾解毒药物对促进 T 细胞部分表面分析的表

达效果优于健脾毒药物,但是临床疗效有待临床进一步实践提供临床实践依据。干预后,T 细胞 IFN- γ 水平较干预前显著升高。这提示两种药物血浆干预都提高 T 淋巴细胞表面分子表达水平,也就是说补肾解毒方和健脾解毒方能在不同程度上改善机体的免疫功能和状态。这与部分学者的研究结果基本一致^[10],具体机制有待进一步研究,临床疗效需要进一步的循证依据,但是结果能够为进一步探究其机制以及临床应用提供启示和线索。本研究的不足之处在于只对部分指标进行了观察和研究,且样本量有限,未能对患者机体的免疫状态作全面反映,拟在以后的研究中改进和完善,以期更好的提高实验的科学性和可信度。

参考文献

- [1] Walter RW, Merle AS. Diagnosis Treatment in infectious diseases [J]. Hepatology, 2005, 48(6): 439-440, 442-447.
- [2] 王爱萍,徐今宁. 中药免疫调节研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(3): 75-77.
- [3] 欧松,孙克伟,彭建平. 补肾解毒方与健脾解毒方含药血浆对慢性乙型肝炎病毒感染不同免疫状态患者外周血 T 细胞功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(1): 108-112.
- [4] 钱乙. 小儿药证直诀·卷下[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006;

6.

- [5] 宋·太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007; 7.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005; 3-7.
- [7] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2003; 36.
- [8] 刘武, 夏雄智, 胡敏, 等. 制作六味地黄丸含药血清有关问题的思考[J]. 中国中医急症, 2007, 16(7): 854-855.
- [9] 孙国东. 甲泼尼龙和拉米夫定联合中药治疗慢性乙肝合并肾损伤的疗效[J]. 中国医刊, 2013, 48(6): 44.
- [10] 万柏松, 马宝贵, 张晓文, 等. 血清腺苷脱氢酶对慢性乙肝病毒携带者病情评估及中药干预治疗[J]. 中国医药, 2012, 7(6): 770.
- [11] 胡珊珊, 孙克伟, 张茜茜, 等. HBV 慢性感染不同免疫状态患者树突状细胞体外刺激后介导的细胞功能影响的研究[A]. 朱文锋学术思想研讨会暨中医诊断师资班 30 周年纪念大会[C]. 2012.
- [12] 欧松, 孙克伟, 彭建平, 等. 补肾解毒方与健脾解毒方含药血浆对慢性乙型肝炎病毒感染不同免疫状态患者外周血树突状细胞功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 208-213.

(2015-03-23 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 1189 页)

疗效与对照组相近,在中医证候改善方面更具有有一定优势,能显著改善临床症候。我们认为其与该药组方全面,切合疾病机制而致。芪连片对非特异性溃疡性结肠炎是一种整体性、多靶点综合治疗方案,临床疗效确切,使用经济、安全、方便,患者依从性良好,体现了中医药的优势,值得进一步推广使用和研究探讨。

参考文献

- [1] 张东铭. 盆底与肛门病学[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 2000; 481.
- [2] 阿娜尔古丽, 阿布都热合曼, 迪丽努尔. 溃疡性结肠炎及克罗恩病的病理形态学特点对比研究[J]. 中国医学装备, 2014, 11(11): 72-74.
- [3] 赵继亭, 迟丽莉, 黄兰花. 中西医结合治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎的思路与方法[J]. 河北中医, 2014, 36(3): 369-371.
- [4] 彭双凤, 冯念涛. 海蛰紫丁清肠汤结合西医治疗慢性非特异性结肠炎的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(13): 140-141.
- [5] 陈治水, 危北海, 张万岱, 等. 中国中西医结合学会第十届消化系

统疾病学术会议纪要[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(8): 509-510.

- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002; 129-134.
- [7] 刘锦龙, 郑丽华, 白松. 中西医结合治疗慢性非特异性结肠炎对微生态平衡观察[J]. 中国民族民间医药杂志, 2010, 19(16): 88.
- [8] 张伟彬. 腹痛灵汤治疗慢性非特异性结肠炎 96 例临床观察[J]. 中国医药导报, 2009, 6(17): 132-133.
- [9] 余晓, 杨俊. 呋喃唑酮片、锡类散联合蒙脱石散剂保留灌肠对溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. 中国医刊, 2013, 48(5): 46.
- [10] 聂欣宁. 中药灌肠加内服治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 中国医药, 2012, 7(11): 1467.
- [11] 刘朝霞. 谢晶日教授治疗溃疡性结肠炎经验初探[J]. 中医学报, 2010, 38(3): 65-66.
- [12] 陈晓杨. 芍药汤治疗溃疡性结肠炎 36 例临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(5): 39-40.
- [13] 黄芸, 董蕾. 马齿苋对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2727.

(2015-05-12 收稿 责任编辑: 王明)