

HBeAg 阴性慢性乙型肝炎中医证型与 T 淋巴细胞亚群 及 IL-4、IFN- γ 相关性研究 *

罗俊华^{1,2}, 曹秋实²

(1. 广州军区武汉总医院, 湖北武汉 430070; 2. 湖北中医药大学, 湖北武汉 430061)

摘要: 目的 探讨 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎(CHB)中医证型与 T 淋巴细胞亚群及白介素-4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)之间的相关性。方法 对 120 例 HBeAg 阴性 CHB 患者进行辨证分型,选取同期健康人群 30 例作为对照,检测外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及 CD4⁺/CD8⁺)及 IL-4、IFN- γ 水平。结果 HBeAg 阴性 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群与正常对照组比较,CD4⁺下降,CD8⁺上升,CD4⁺/CD8⁺降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-4 水平升高($P<0.01$),IFN- γ 水平降低($P<0.01$);各证型间比较,湿热中阻、瘀血阻络组 T 淋巴细胞亚群与肝肾阴虚、脾肾阳虚组差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。按湿热中阻、肝郁脾虚、瘀血阻络、肝肾阴虚、脾肾阳虚组顺序,IL-4 水平逐渐上升,IFN- γ 水平逐渐下降,相邻两组间差异均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 HBeAg 阴性 CHB 外周血 T 淋巴细胞亚群及 IL-4、IFN- γ 水平变化与中医证型之间有一定相关性,可为 HBeAg 阴性 CHB 中医辨证的客观化提供依据。

关键词: 慢性乙型肝炎; HBeAg; 中医证型; T 淋巴细胞亚群; 白介素-4; γ 干扰素

中图分类号: R256.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)04-0001-03

HBeAg 阴性 CHB 占慢性 HBV 感染中的 70%。它具有与 HBeAg 阳性 CHB 不同的临床特征,这类患者年龄偏大,病程偏长,肝炎持续时间长,易反复发病,抗病毒疗效差,容易进展为肝硬化及终末期肝病^[1]。因此,HBeAg 阴性 CHB 作为 CHB 中的一种独立类型,已成为肝炎研究领域的热点之一。目前,关于 CHB 中医证型与客观指标的相关性研究颇多,而 HBeAg 阴性 CHB 的相关研究却较少。为了进一步提高 HBeAg 阴性 CHB 辨证的客观性及准确性,我们探讨了 HBeAg 阴性 CHB 中医证型与 T 淋巴细胞亚群及 IL-4、IFN- γ 的相关性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2012 年 3 月-2014 年 2 月在湖北省中医院肝病中心门诊就诊的 HBeAg 阴性 CHB 患者 120 例,所有患者诊断均符合 2010 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]。其中,男 80 例,女 40 例;年龄 18~65 岁,平均(37 $\pm$ 13.1)岁。排除同时或重叠感染甲、丙、

丁、戊型肝炎病毒,排除合并人类疱疹病毒、巨细胞病毒、HIV 感染,排除合并药物中毒、乙醇中毒等因素所致的肝炎及脂肪肝、自身免疫性肝炎、心源性肝硬化、代谢性肝病等。另选同期健康人 30 例,其中男 13 例,女 7 例;年龄 18~65 岁,平均(36 $\pm$ 14.2)岁。

1.2 中医辨证分型

中医分型标准参照年全国第十届中医肝胆病专业委员会制定的病毒性肝炎中医辨证分型标准(病毒性肝炎中医辨证标准(修订稿)),全部病例均由专人同时进行辨证分型,无症状者不纳入研究范畴。120 例 HBeAg 阴性 CHB 患者分为肝郁脾虚证 40 例,男 26 例,女 14 例;肝肾阴虚证 32 例,男 21 例,女 11 例;湿热中阻证 26 例,男 18 例,女 8 例;瘀血阻络证 12 例,男 8 例,女 4 例;脾肾阳虚证 10 例,男 7 例,女 3 例。上述各组患者性别、年龄、病程等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

* 基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(JDZX2012052)

收稿日期: 2014-05-30

作者简介: 罗俊华(1976-),女,湖北汉川人,主治医师,在读博士研究生,从事内科临床及科研工作。

E-mail: changjiangnie@sina.com.

1.3 观察指标

T 淋巴细胞亚群的检测采用美国 BD 公司生产的 BD FACScalibur 流式细胞仪。采集静脉血 1mL, 肝素钠抗凝, 取流氏管分别加入静脉抗凝全血 100 μ L 及三色标记的单克隆抗体 (鼠抗人 CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE, 试剂均购自美国 BD 公司) 20 μ L, 混匀室温避光 30 min 后加含 2.5% FBS 的 PBS 2.5mL, 离心洗去多余抗体, 破红, 再次离心洗涤, 弃上清, 细胞以 10 g/L 多聚甲醛重悬, 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺ T 细胞亚群。IL-4、IFN- γ 的检测采用 ELISA 法, 试剂盒购自武汉博士得生物工程公司, 按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件包进行统计分析, 计量

资料满足正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。单因素组间差异比较采用单因素方差分析, 若差异有统计学意义采用 LSD-t 检验进一步两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T 淋巴细胞亚群比较

由表 1 可见, HBeAg 阴性 CHB 各证型组外周血 T 淋巴细胞亚群与正常对照组比较, CD4⁺下降, CD8⁺上升, CD4⁺/CD8⁺降低(P<0.05 或 P<0.01); 各证型组间比较, 按湿热中阻、瘀血阻络、肝郁脾虚、肝肾阴虚、脾肾阳虚顺序, CD4⁺逐渐下降, CD8⁺渐次上升, CD4⁺/CD8⁺依次降低, 其中湿热中阻、瘀血阻络组 T 淋巴细胞亚群改变与肝肾阴虚、脾肾阳虚组比较, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。

表 1 HBeAg 阴性 CHB 中医证型与 T 淋巴细胞亚群的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照组	30	63.51 $\pm$ 8.62	43.80 $\pm$ 7.43	26.31 $\pm$ 4.52	2.01 $\pm$ 0.22
肝郁脾虚组	40	64.82 $\pm$ 9.41	33.92 $\pm$ 7.61**	32.40 $\pm$ 7.85**	1.01 $\pm$ 0.10**
肝肾阴虚组	32	66.13 $\pm$ 9.74	30.34 $\pm$ 6.25**	34.93 $\pm$ 8.14**	0.82 $\pm$ 0.14**
湿热中阻组	26	65.40 $\pm$ 8.25	38.71 $\pm$ 6.68 Δ	26.82 $\pm$ 5.94 $\Delta\Delta$	1.75 $\pm$ 0.18* $\Delta\Delta$
瘀血阻络组	12	62.91 $\pm$ 7.68	36.15 $\pm$ 8.43* Δ	27.62 $\pm$ 6.64 $\Delta\Delta$	1.31 $\pm$ 0.42** Δ
脾肾阳虚组	10	64.2 $\pm$ 9.1	28.2 $\pm$ 5.95**	37.79 $\pm$ 9.26**	0.69 $\pm$ 0.13**

注: 与正常对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与肝肾阴虚组、脾肾阳虚组比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

2.2 IL-4、IFN- γ 的比较

由表 2 可见, HBeAg 阴性 CHB 各证型组与正常对照组比较, IL-4 水平明显升高(P<0.01), IFN- γ 水平显著降低(P<0.01); 各证型组间比较, 按湿热中阻、肝郁脾虚、瘀血阻络、肝肾阴虚、脾肾阳虚顺序, IL-4 水平逐渐上升, IFN- γ 水平逐渐下降, 相邻两

组间 IL-4、IFN- γ 水平差异均具有统计学意义(P<0.01 或 P<0.05)。

3 讨论

中医证型是祖国医学的精髓, 对诊断治疗疾病具有重要价值。在 CHB 中医证型研究方面, 寻找客观指标与证型之间的关系, 已成为中医证型客观化的可行方法之一。许多学者对此做了多方面的研究, 其中包括: ①与 T 淋巴细胞亚群、T 淋巴细胞表面标志物的关系^[3]; ②与各种细胞因子的关系, 如 IL-6、IL-12、IL-10、IL-4、IFN- γ 等^[4]; ③与免疫球蛋白的关系, 如 IgG、IgA、IgM 等; ④与红细胞免疫功能的关系; ⑤与肝脏病理改变的关系^[5]; ⑥与肝功能和生化的关系等^[6]。以上研究的各种客观指标, 与 CHB 中医证型都有一定的相关性, 但都是集中在 CHB 这个大范围内, 对于单独将 HBeAg 阴性 CHB 的中医证型与免疫指标等关系的研究则少见。因此, 本研究以 HBeAg 阴性 CHB 患者为研究对象, 探讨其中医证型与 T 淋巴细胞亚群及 IL-4、IFN- γ 的

表 2 HBeAg 阴性 CHB 中医证型与 IL-4、IFN- γ 的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-4/(μ g/L)	IFN- γ /(ng/L)
正常对照组	30	214.25 $\pm$ 33.46	61.46 $\pm$ 23.21
湿热中阻组	26	289.41 $\pm$ 36.54*	38.20 $\pm$ 11.05*
肝郁脾虚组	40	364.22 $\pm$ 41.26* Δ	28.81 $\pm$ 8.02* Δ
瘀血阻络组	12	427.15 $\pm$ 55.43* Δ	22.51 $\pm$ 7.82* Δ
肝肾阴虚组	32	461.58 $\pm$ 62.18* Δ	18.22 $\pm$ 4.15* $\Delta\Delta$
脾肾阳虚组	10	551.43 $\pm$ 62.31* Δ	14.53 $\pm$ 6.21* $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, *P<0.01; 与上一相邻证型组比较, Δ P<0.05; $\Delta\Delta$ P<0.01

相关性,为 HBsAg 阴性 CHB 中医辨证的客观化提供一定依据。

HBsAg 阴性 CHB 属于中医“胁痛”“臌胀”“郁证”“虚劳”等范畴。总的病因病机为湿毒外侵,伏邪发病;正气内乏,邪气留恋;肝失疏泄,久病及肾。“正气存内,邪不可干”,正气不足是发病的基础;“邪”之所凑,肝肾必虚,肝肾相互影响,病情迁延难愈。研究表明,机体的正气与现代医学的免疫系统功能有密切的联系,正气不足的患者相应表现为免疫功能低下或失常^[7]。CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 在机体免疫应答中起着十分重要的作用,CD4⁺/CD8⁺可以作为评估机体免疫状态的一个重要依据^[8]。CD4⁺/CD8⁺比值高于正常,表明免疫状态亢进;低于正常,则表明免疫状态低下。因此,细胞免疫功能状态有可能对 HBsAg 阴性 CHB 的临床辨证分型有一定的指导意义。本研究表明,HBsAg 阴性 CHB 患者外周血 T 淋巴细胞亚群与正常人比较,CD4⁺下降,CD8⁺上升,CD4⁺/CD8⁺降低,说明患者存在免疫功能低下或失常,这与正气不足是 CHB 发病基础的观点相符合,也表明正虚与 HBsAg 阴性 CHB 的发展及转归有着密切的联系。各证型间比较,按湿热中阻、瘀血阻络、肝郁脾虚、肝肾阴虚、脾肾阳虚顺序,CD4⁺逐渐下降,CD8⁺渐次上升,CD4⁺/CD8⁺依次降低,其中湿热中阻、瘀血阻络组与肝肾阴虚、脾肾阳虚组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示 HBsAg 阴性 CHB,属肝肾阴虚、脾肾阳虚者细胞免疫功能相对更加低下,治疗时宜重用补脾益肝肾药物,以提高机体免疫功能,促进疾病的恢复。

CD4⁺ T 细胞根据产生细胞因子不同分为 Th1、Th2 类细胞,其中 Th1 类细胞主要产生 IL-2、IFN- γ 等,诱导机体细胞免疫反应;Th2 类细胞主要产生 IL-4、IL-10 等,主要诱导体液免疫反应。在 CHB 患者中存在明显的 Th1/Th2 类细胞失衡,Th2 类细胞优势表达是 HBV 持续感染的主要机制^[9]。本研究以细胞因子 IL-4、IFN- γ 来间接反应 Th1、Th2 类细胞功能,结果表明与正常人比较,HBsAg 阴性 CHB 患者 IL-4 明显升高 ($P<0.01$),IFN- γ 显著降低 ($P<0.01$),提示 Th1 类细胞受抑制,Th2 类细胞活性相对增强,机体清除病毒能力减弱,疾病反复难愈。各证型间比较,按湿热中阻、肝郁脾虚、瘀血阻络、肝肾阴虚、脾肾阳虚顺序,IL-4 水平逐渐上升,IFN- γ 水平逐渐下降,相邻两组间 IL-4、IFN- γ 水平差异

均具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。“有诸内,必行诸外”,通过本研究,我们认为 HBsAg 阴性 CHB 各辨证分型所依据的临床表现,与内在的免疫水平变化有关。湿热中阻型 IFN- γ 水平高于其他组,提示该型免疫应答相对较为剧烈,清除病毒的可能性较大,但同时造成免疫损伤的危险亦较大。肝郁脾虚型 IL-4 水平高于湿热中阻型,而 IFN- γ 水平低于湿热中阻型,提示肝郁脾虚型细胞免疫弱于湿热中阻型,故该型临床症状较轻,属于中医“正虚邪恋”类。肝肾阴虚、脾肾阳虚型 IL-4 水平明显高于其他型,而 IFN- γ 水平明显低于其他型,提高这 2 型细胞免疫应答明显低下,属于“久病必虚”一类。总之,HBsAg 阴性 CHB 中医证型与 IL-4、IFN- γ 水平有一定相关性,在某种程度上反应了 CHB 免疫失调的趋势。

由于本研究时间有限,样本量偏少,所得出的结论难免有些局限。为了使中医诊治 HBsAg 阴性 CHB 更加标准化、客观化,尚需要在今后开展大样本、多中心的临床研究。

参考文献:

- [1] 陈育霞,施雅利. e 抗原阴性的慢性乙型肝炎研究进展[J]. 医药论坛杂志,2010,31(15):205-207.
- [2] 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(2010 年版)[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(1): I-XI.
- [3] 王振常,毛德文,黄彬,等. 慢性乙型肝炎免疫状态与中医证型的相关性研究[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(7):1058-1059.
- [4] 蔡林宏,谢晶日. 不同中医证型慢性乙型肝炎患者血清 INF- γ 和 HBV DNA 水平变化 [J]. 实用肝脏病杂志,2013,16(3):265-266.
- [5] 高风琴,徐慧媛,李筠. 慢性乙型肝炎病理诊断与中医证型关系初探[J]. 北京中医药,2010,29(7):525-526.
- [6] 古伟明,杨以琳,吕永慧,等. 慢性乙型肝炎中医证型与相关性实验指标关系[J]. 广州医药,2012,43(1):42-45.
- [7] 李红山,朱德东,傅琪琳,等. 慢性乙型肝炎不同中医证候机体免疫功能的动态变化 [J]. 中华中医药学刊,2013,31(11):2391-2393.
- [8] 张玉佩,杨钦河,李娜,等. 从中医免疫观防治慢性乙型肝炎探析[J]. 新中医,2009,40(10):1-2.
- [9] 刘宁,徐杰,刘金花,等. 慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎患者 Th1/Th2 型细胞因子水平变化研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志,2014,23(2):158-161.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 8 页)

- junction Proteins connexin43 and connexin40[J].Biol Cell, 2002, 94(7-8):409.
- [12] Lemer D L, Yamada K A, Schuessler R B, et al. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmia included by ischemia in Cx-43 deficient mice[J]. Circulation, 2000, 101(5):547.
- [13] 李奎生. 谈益气活血法治疗心律失常的临床体会[J]. 医药世界, 2007(2):102-102.
- [14] 王硕仁, 倪量, 赵明镜, 等. 川芎嗪、人参皂苷对心室重构大鼠离体心脏电生理作用研究 [J]. 美国临床心脏学杂志, 2007, 30(S):310.
- [15] 储载农, 张早华, 刘建勋, 等. 红景天注射液对动物血小板聚集、体外血栓形成及血液黏度的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6):56-57.
- [16] 刘建勋, 韩笑, 马晓斌, 等. 双参通冠方对急性心肌缺血再灌注模型核因子- κ B 信号途径及细胞间隙连接通讯的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3):228.
- [17] 陈一清. 缓慢性心律失常证治规律若干问题探讨[J]. 新中医, 1998, 30(4):3-5.
- [18] 马清钧, 王淑玲. 临床实用中药学[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 2001:488.

(编辑: 杨阳)

Study the Effect of Fumai Decoction on the Incidence of Arrhythmia in Rat Myocardial Ischemia Model and the Expression of Cx43

GONG Yi-ping, CHENG zhen

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect and possible mechanism of pretreatment of Fumai decoction on the incidence of arrhythmia in rat myocardial ischemia model and the expression of Cx43. **Methods** SD male rats of myocardial ischemia model were induced by left anterior descending ligation. The continuous electrocardiographic was monitored for one hour to observe the effect of pretreatment of Fumai decoction and the arrhythmia score. The Cx43 expression was characterized by Western blot. **Results** (1) Evaluation of arrhythmia: after myocardial ischemia models were induced, all the groups responded in arrhythmia, but with different degrees. The incidence of arrhythmia in model group was 87.5%. The incidence of arrhythmia in low dose, middle dose and high dose groups of Fumai decoction were 62.5%, 50.0%, 62.5%, respectively. Compared the arrhythmia score, all the three groups of Fumai decoction was lower than the model group ($P < 0.05$). (2) Expression of Cx43: ham operation group showed the highest relative expression of Cx43/GAPDH and higher than the model group ($P < 0.01$). High dose groups of Fumai decoction was significantly higher than model group ($P < 0.01$), which was similar to tartaric acid metoprolol group. Low dose and middle dose of Fumai decoction were higher than model group ($P < 0.05$), while the three groups of Fumai decoction showed no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Pretreatment of Fumai decoction can reduce the incidence of arrhythmia in myocardial ischemia model induced by left anterior descending ligation and increase the relative expression of Cx43/GAPDH. This might be the result of improving the myocardial tissue blood flow and oxygen supply to improve the expression of Cx43, reduce the occurrence of arrhythmia.

KEY WORDS: myocardial ischemia model; arrhythmia; Fumai decoction; Cx43

(原文见第 1 页)

Study on Correlation between TCM Dialectical Type and T Lymphocyte Subsets, IL-4, IFN- γ in Patients with HBeAg-negative Chronic Hepatitis B

LUO Jun-hua^{1,2}, CAO Qiu-shi²

(1. Wuhan General Hospital of PLA Guang-zhou Military Command, Wuhan 430070, China;

2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the correlation between TCM dialectical type and T lymphocyte subsets, IL-4, IFN- γ in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. **Methods** 120 patients with HBeAg-negative CHB were diagnosed with differential Chinese medicine syndrome, and their peripheral blood T lymphocyte subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺), IL-4 and IFN- γ level were determined. **Results** Compared with those in the normal control group, CD4⁺ was lower, CD8⁺ was higher, CD4⁺/CD8⁺ was decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), IL-4 was significantly elevated ($P < 0.01$) and IFN- γ was significantly lower ($P < 0.01$) in the HBeAg-negative CHB patients. Comparison among the different syndrome types revealed that in damp heat resistance and blood-stasis in meridian, T lymphocyte subsets was statistically different with liver-kidney yin deficiency, spleen-kidney yang deficiency ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the damp heat resistance, liver stagnation and spleen deficiency, blood-stasis in meridian, liver-kidney yin deficiency, spleen-kidney yang deficiency sequence, IL-4 rose gradually and IFN- γ decreased gradually, with significant differences between groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** It is related that the peripheral blood T lymphocyte subsets, IL-4, IFN- γ levels and TCM dialectical type in patients with HBeAg-negative CHB.

KEY WORDS: chronic hepatitis B; HBeAg; TCM dialectical type; T lymphocyte subsets; IL-4; IFN- γ