

补肾方对慢性乙型肝炎 T 细胞亚群及其功能的影响

高月求 孙学华 章晓鹰 王灵台

摘要 目的 观察补肾方对慢性乙型肝炎患者免疫功能状态的调节作用。方法 收集 HBeAg 阳性 ALT 异常者 30 例,给予补肾方治疗,用药 6 个月,于用药前、用药 3 个月、6 个月时分别检测下列指标。采用罗氏荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA,外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)加入 HBeAg、HBcAg 与植物血凝素(Phytohemagglutinin, PHA)培养 48 h,检测培养上清液中 IL-10、IFN- γ ,血液中 CD $_4^+$ 、CD $_8^+$ 、CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ 、CD $_8^+$ CD $_{28}^-$ 和 CD $_{28}^+$ T 细胞的比例及加入 HBeAg、HBcAg 与 PHA 培养 48 h 后培养细胞中 CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ 的比例。结果 补肾方治疗有效组在治疗 3 个月后,PBMC 培养中 IFN- γ 较治疗前明显上升,IL-10 明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$) ;CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ T、CD $_{28}^+$ T、培养后 CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ T 细胞较治疗前明显上升,CD $_8^+$ CD $_{28}^-$ T 细胞明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补肾方能明显增强 Th1 型细胞因子的表达,降低 Th2 型细胞因子的表达,促进 CD $_8^+$ (Cytotoxic T lymphocyte, CTL)的表达,这可能是使 HBV DNA 复制得到抑制的机制之一。

关键词 慢性乙型肝炎 ;T 细胞 补肾方

Effect of Bushen Recipe on T-cell Subsets and Their Function in Patients with Chronic Hepatitis B GAO Yue-qiu, SUN Xue-hua, ZHANG Xiao-ying, et al Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200021)

Abstract Objective To observe the regulatory effect of Bushen recipe (BSR) on immune function in patients with chronic hepatitis B. **Methods** Thirty patients with HBeAg $^+$ and abnormal alanine transaminase (ALT) level were treated with BSR for 6 months. The following parameters before treatment, 3 months and 6 months after treatment were tested: (1) HBV DNA by fluorescence quantitative PCR; (2) Levels of interleukin-10 (IL-10) and interferon- γ in supernatant of cultured peripheral blood mononuclear cell (PBMC) after had been cultured with HBeAg, HBcAg and phytohemagglutinin (PHA) for 48 hrs; (3) Blood levels of T-cells, including CD $_4^+$, CD $_8^+$, CD $_8^+$ CD $_{28}^+$, CD $_8^+$ CD $_{28}^-$ and CD $_{28}^+$, and their ratio, as well as the percentage of CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ in the cell culture after being co-cultured with PHA for 48 hrs. **Results** In patients effectively treated by BSR, after 3 months treatment, level of IFN- γ in PBMC culture significantly increased, CD $_8^+$ CD $_{28}^+$, CD $_{28}^+$ T-cells significantly enhanced and IL-10 and CD $_8^+$ CD $_{28}^+$ T-cells significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** BSR could significantly strengthen the expression of Th1 type cytokine, decrease the expression of Th2 type cytokine and promote the expression of CD $_8^+$ cytotoxic T-lymphocyte, which may be one of mechanisms in suppressing HBV DNA replication.

Key words chronic hepatitis B ;T-cell ;Bushen recipe

补肾方系上海中医药大学附属曙光医院治疗慢性乙型肝炎的经验方,由之制成的院内制剂已应用于临床十余年,其抑制乙肝病毒复制和改善肝功能的疗效显著,为探讨其作用机制,笔者进行了补肾方对 T 细胞功能影响的研究。

资料与方法

1 病例收集 病例为曙光医院肝病科 2002 年 3 月—2003 年 3 月的门诊或住院患者,共 30 例。其中男 19 例,女 11 例,年龄 22~50 岁,平均 36.4 岁。病程 1~8 年。全部病例均符合慢性乙型肝炎的诊断标准(2000 年西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订的《病毒性肝炎的诊断标准》^[1])且 HBV DNA 阳性,中医辨证属肝肾不足兼湿热型,标

基金项目:上海市教委课题(No. 303041809)

作者单位:上海中医药大学附属曙光医院(上海 200021)

通讯作者:高月求, Tel 021-63857984, Fax 021-63857984,

E-mail: gaoyueqiu@hotmail.com

准参照《中药新药临床研究指导原则》^[2]。

2 治疗用药 中药补肾方(药物组成为:巴戟天 15 g 肉苁蓉 15 g 枸杞子 15 g 生地 15 g 苦参 15 g 青皮 9 g 田三七 3 g 等),水煎服,每日 1 剂,分两次服,疗程 6 个月。

3 观察指标及方法

3.1 血清 HBV DNA 检查 HBV-DNA(罗氏荧光定量 PCR 法),治疗前及治疗 3 个月、6 个月各测 1 次,统一由曙光医院检验科检测。

3.2 IFN- γ 、IL-10 检测 无菌采集静脉血 2 ml,以生理盐水 2 ml 稀释,加入 2 ml 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 20 min,分离 PBMC,Hank's 洗液洗涤。分离的 PBMC(活细胞 > 95%,单个核细胞 > 98%)加培养液(1640 液 9 份、灭活小牛血清 1 份)调细胞浓度为 10⁶/ml,置于 24 孔培养皿中,加入 PHA、HBeAg、HBcAg,终浓度分别为 20 μ g/ml、1 μ g/ml、1 μ g/ml,37℃、5% CO₂ 培养 48 h 后,1 500 r/min 离心 10 min,收集上清液 - 20℃ 保存,统一检测 IFN- γ 、IL-10。

3.3 外周血 T 细胞亚群的检测 采集静脉血 1 ml,EDTA 抗凝。取 50 μ l 抗凝全血细胞悬液,分别加入荧光标记单克隆抗体即鼠抗人 CD4-FITC、CD8-FITC、CD28-PE 各 10 μ l,阴性对照管中加入鼠 IgG-FITC 和 IgG-PE 各 10 μ l,混匀置室温 20℃ 避光孵育 25 min,加入溶血素 0.5 ml,放置 15 min,洗涤、离心后检测。标本置流式细胞仪内,做双色荧光流式细胞检测。以不同双荧光素标记组合分析 CD₄⁺、CD₈⁺、CD₈⁺CD₂₈⁺、CD₈⁺CD₂₈⁻、CD₂₈⁺ 的 T 细胞亚群,每次每样本淋巴细胞计数均 > 5 000 个。荧光标记单克隆抗体购自 Coulter 公司,流式细胞仪型号为 EPICS-XL,美国 Coulter 公司产品。治疗前及治疗 3 个月、6 个月各测 1 次。

3.4 体外 PBMC 培养后 T 细胞亚群的检测 无菌采集静脉血 2 ml,以生理盐水 2 ml 稀释,加入 2 ml 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 20 min,分离 PBMC,Hank's 洗液洗涤。分离的 PBMC(活细胞 > 95%,单个核细胞 > 98%)加培养液(1640 液 9 份、灭活小牛血清 1 份)调细胞浓度为 10⁶/ml,置于 24 孔培养皿中,加入 PHA、HBeAg、HBcAg 各 20 μ l,37℃、5% CO₂ 培养 48 h 后,加入荧光标记单克隆抗体即鼠抗人 CD8-FITC 和 CD28-PE 各 10 μ l,阴性对照管中加入鼠 IgG-FITC 和 IgG-PE 各 10 μ l,混匀置室温 20℃ 避光孵育 25 min,鞘液洗涤,离心后检测。标本置流式细胞仪内,做双色荧光流式细胞检测。以不同双荧

光素标记组合分析 CD₈⁺CD₂₈⁺T 细胞亚群,每次每样本淋巴细胞计数均 > 5 000 个。

4 统计学分析 将所有数据输入电子计算机系统,采用美国 SPSS 11.0 软件进行统计处理。统计学方法采用配对资料 *t* 检验。

结 果

1 有效组及无效组治疗前后 Th 细胞因子的变化 见表 1。按治疗前后的 HBV DNA 的变化分为有效组(治疗 6 个月后,HBV DNA 阴转及滴度下降 $\geq 10^2$ 者)、无效组(指治疗 6 个月后,HBV DNA 滴度下降 $\leq 10^2$ 者)。补肾方治疗有效组在治疗 3 个月后,PBMC 培养中 IFN- γ 较治疗前明显上升,IL-10 明显下降,治疗无效组均无明显变化。

表 1 有效组及无效组 Th 细胞因子的变化 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	IFN- γ	IL-10
有效	治疗前	13	299.47 $\pm$ 59.73	127.23 $\pm$ 21.33
	治疗 3 个月	13	321.40 $\pm$ 40.24 *	117.78 $\pm$ 17.37 **
	治疗 6 个月	13	309.73 $\pm$ 20.43	116.63 $\pm$ 13.83 **
无效	治疗前	17	270.27 $\pm$ 24.02	126.33 $\pm$ 14.36
	治疗 3 个月	17	278.20 $\pm$ 22.25	121.64 $\pm$ 15.21
	治疗 6 个月	17	279.53 $\pm$ 23.37	122.58 $\pm$ 14.87

注 与本组治疗前比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2 有效组及无效组治疗前后 T 细胞亚群的变化 见表 2。补肾方治疗有效组的 CD₈⁺CD₂₈⁺T 细胞、CD₂₈⁺T 细胞较治疗前明显上升,CD₈⁺CD₂₈⁻T 细胞明显下降(*P* < 0.05),治疗无效组均无明显变化。

表 2 有效组及无效组 T 细胞亚群的变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺	CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁻	CD ₂₈ ⁺
有效	治疗前	13	11.92 $\pm$ 3.15	22.21 $\pm$ 8.10	44.09 $\pm$ 4.84
	治疗 3 个月	13	13.57 $\pm$ 3.00 *	19.10 $\pm$ 6.70 *	46.48 $\pm$ 4.92 *
	治疗 6 个月	13	12.57 $\pm$ 2.06	19.58 $\pm$ 7.30 *	45.42 $\pm$ 3.79
无效	治疗前	17	11.74 $\pm$ 2.81	22.28 $\pm$ 5.90	46.58 $\pm$ 10.39
	治疗 3 个月	17	12.19 $\pm$ 2.16	21.77 $\pm$ 5.65	46.31 $\pm$ 8.24
	治疗 6 个月	17	11.99 $\pm$ 2.22	22.20 $\pm$ 5.57	46.88 $\pm$ 6.12

注 与本组治疗前比较, * *P* < 0.05

3 有效组及无效组治疗前后 PBMC 培养后 CD₈⁺CD₂₈⁺T 细胞亚群的变化 见表 3。补肾方治疗有效组 PBMC 培养后 CD₈⁺CD₂₈⁺T 细胞治疗 3 个月后较治疗前明显上升,治疗无效组均无明显变化。

表 3 有效组及无效组 PBMC 培养后 CD₈⁺CD₂₈⁺T 细胞亚群的变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺
有效	治疗前	13	21.63 $\pm$ 9.14
	治疗 3 个月	13	25.86 $\pm$ 7.72 *
	治疗 6 个月	13	22.13 $\pm$ 6.61
无效	治疗前	17	21.47 $\pm$ 10.70
	治疗 3 个月	17	19.85 $\pm$ 8.04
	治疗 6 个月	17	19.73 $\pm$ 7.74

注 与本组治疗前比较, * *P* < 0.05

讨 论

慢性乙型肝炎属于中医学“黄疸”“胁痛”“腹胀”“积聚”等范畴,其外因为湿热疫毒之邪侵袭,内因则多由先天禀赋不足。就其病机来讲,湿热疫毒之邪羁留不去,病久及肾,或因湿热郁久化火,灼伤肝阴,久则子病及母,肾精亏虚,或因肝病传脾,由脾及肾,损及肾阳。临床常见头晕耳鸣、腰膝酸软、两胁隐痛、两目干涩、月经不调、阳痿遗精等肝肾不足的表现及口干口苦、舌苔黄腻等湿热内蕴症状。故确立滋补肝肾兼以清热化湿的治疗方法。

补肾方由巴戟天、肉苁蓉、枸杞子、生地、苦参、青皮、田三七等多味中药组成。巴戟天辛甘微温,专入肾经,性属柔润,温而不燥,补而不滞,补肾助阳;肉苁蓉甘咸而温,能入肾经,滋腻柔润,补而不峻,既补肾阳,又益精血;枸杞子味甘性平,柔润多液,入肝肾经,既补精血,又益肝肾;生地甘寒质润,能入肝肾经,滋肝肾之阴。四药配合,阴阳互求,肝肾同治,共达滋补肝肾之效,为方中君药。苦参性味苦寒,清热燥湿,为方中臣药;久病必瘀,佐以田三七活血散瘀,青皮独入肝经,疏肝理气,为方中使药。全方配伍精当,相辅相成,既针对病因病机,又可改善患者的症状和体征。

补肾方治疗有效组在治疗 3 个月后, PBMC 培养中 IFN- γ 较治疗前明显上升, IL-10 较治疗前明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); $CD_8^+ CD_{28}^+$ T 细胞、 CD_{28}^+ T 细胞、培养后 $CD_8^+ CD_{28}^+$ T 细胞较治疗前明显上升, $CD_8^+ CD_{28}^-$ T 细胞较治疗前明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肾方治疗有效组在治疗 6 个月后, PBMC 培养中 IL-10、 $CD_8^+ CD_{28}^-$ T 细胞较治疗前明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 补肾方治疗有效组中 IFN- γ 、 $CD_8^+ CD_{28}^+$ T 细胞、 CD_{28}^+ T 细胞、培养后 $CD_8^+ CD_{28}^+$ T 细胞在治疗 6 个月与治疗前比较变化不明显。补肾方治疗无效组各项指标与治疗前比较无明显变化。

补肾方治疗有效组在治疗 3 个月时能明显增强 Th1 型细胞因子的表达,降低 Th2 型细胞因子的表达,改善 Th1/Th2 细胞失衡状态,使 Th1 型细胞占优势,促进 CD_8^+ CTL 的表达,明显增强 T 细胞表面 CD28 分子的表达,降低体内抑制性 T 淋巴细胞,改善 T 细胞免疫无能状态。补肾方在治疗 3 个月时, Th1 型细胞因子及 CD_8^+ CTL 的表达达到高峰,在 6 个月时有所降低,虽与治疗前比较差异无显著性,但仍然维持了较高的水平,可能与病毒量下降,病毒抗原刺激作用减弱有关。补肾方在治疗 3 个月时,上述细胞免疫功能已经明显改善,而 HBV DNA 的降低主要出现在

6 个月时,提示正是由于补肾方增强了 Th1 型细胞及 CD_8^+ CTL 在体内的表达,从而使 HBV DNA 得到了抑制。

一切免疫活性细胞都来源于骨髓干细胞,中医学认为肾主骨生髓,故而采用补肾法调节患者的免疫功能。许多研究表明肾虚的患者存在细胞免疫功能低下,补肾方药有增强细胞免疫的功能^[3]。曾有研究表明中药补肾方在体外对慢乙肝患者外周血淋巴细胞亚群具有影响,能促进 CD_4^+ 细胞的增殖,提高 CD_4^+ / CD_8^+ 比值,调整乙肝患者细胞免疫功能,有利于提高乙肝治疗的疗效^[4]。

免疫调节剂胸腺肽可使慢性乙肝的 CD_4^+ 细胞增多, CD_8^+ 细胞下降, CD_4^+ / CD_8^+ 比例升高,调节 Th1 和 Th2 细胞的数量及其比例,增强细胞免疫应答^[5]。

干扰素 α 能够调节 Th1/Th2 细胞因子的表达水平,从而发挥其治疗作用。赵彩彦^[6] 研究发现干扰素治疗前,慢性病毒性肝炎患者 CD_4^+ / CD_8^+ 比值、血清 IL-2、IFN- γ 水平降低,而 IL-10 水平明显升高。治疗后,有效组 CD_4^+ / CD_8^+ 比值、血清 IL-2、IFN- γ 水平较治疗前显著升高, IL-10 明显下降,提示用于干扰素治疗慢性病毒性肝炎可以明显提高 CD_4^+ / CD_8^+ 比值,使 T 细胞活化,促进 Th1 因子的产生,抑制 Th2 细胞因子表达。

补肾方能增强 Th1 型细胞因子的表达,降低 Th2 型细胞因子的表达,改善 Th1/Th2 细胞失衡状态,促进 CD_8^+ CTL 的表达,与胸腺肽及干扰素具有相似的作用。

参 考 文 献

- 1 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000 ;8(6):324—329.
Program for prevention and treatment of viral hepatitis. Chin J Hepatol 2000 ;8(6):324—329.
- 2 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京: 中国医药科技出版社, 2002:123—125.
Zheng XY editor. Guiding principle of clinical research on new drug of TCM. Beijing: China Medical-pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2002:123—125.
- 3 高月求,王灵台,陈建杰. 补肾冲剂治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 上海中医药大学学报 2001 ;15(1):34—36.
Gao YQ, Wang LT, Chen JJ. Clinical study on chronic hepatitis B treated with “kidney-tonifying Granules”. Acta Univ Tradit Med Sinensis Pharmacol Shanghai 2001 ;15(1):34—36.
- 4 吴建成,范宗滂,朱翔,等. 中药补肾方在体外对慢乙肝患者外周血淋巴细胞亚群的影响. 苏州医学院学报 2001 ;21

(3):301—302.

Wu JC, Fan ZP, Zhu X, et al. The effect of Renal Tonal prescription (Traditional Chinese Medicine) on subgroup of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis B in vivo. Acta Acad Med Suzhou 2001 21(3):301—302.

- 5 刘树人,李灼亮,张宜俊,等.大剂量胸腺肽对慢性乙型肝炎的疗效及与免疫调节的关系.中国新药杂志 2002 11(4):308—310.

Liu SR, Li ZL, Zhang YJ, et al. Efficacy of thmus peptides in the treatment of chronic hepatitis B and immunological mecha-

nism. Chin New Drug J 2002 11(4):308—310.

- 6 赵彩彦,刘金星,李跃林,等. α -干扰素治疗慢性病毒性肝炎前后细胞因子的变化.中国免疫学杂志 2001 17(6):327—329.

Zhao CY, Liu JX, Li YL, et al. Changes of immunoregulatory cytokines in patients with chronic viral hepatitis pre- and post-treatment with interferon-alpha. Chin J Immunol 2001 17(6):327—329.

(收稿 2004-06-25 修回 2004-09-25)

小剂量善宁与黄鹤汤合并治疗肝硬化食道—胃静脉曲张破裂出血的对比观察

王炎焱[△] 路 辉

善宁对肝硬化引起的食道—胃静脉曲张破裂出血的疗效已经得到公认,为了进一步提高其止血疗效,我们设计了单纯小剂量善宁与小剂量善宁合并黄鹤汤中西医结合治疗方案进行比较,以期在保持较低医疗费用前提下,提高止血疗效。现报道如下。

临床资料 51例肝硬化食道—胃静脉曲张破裂出血患者,经胃镜排除了其他原因出血,随机分为两组:A组(小剂量善宁组)和B组(小剂量善宁合并黄鹤汤组)。A组26例,男18例,女8例,年龄30~75岁,平均46.5岁;B组25例,男17例,女8例,年龄32~71岁,平均47.8岁,两组在性别、年龄、原发病各方面均具有可比性。

治疗方法 A组:善宁(成分奥曲肽 octreotide 注射液 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,诺华中国制药公司生产,批号 0200365)首剂 0.1 mg 静脉注射后,以 12.5 $\mu\text{g}/\text{h}$ 静脉滴注持续 72 h;B组:善宁首剂 0.1 mg 静脉注射后,以 12.5 $\mu\text{g}/\text{h}$ 静脉滴注持续 72 h,同时口服黄鹤汤 25~30 ml,4~6 次/日(黄鹤汤组成:大黄炭 20 g 仙鹤草 40 g 炙甘草 30 g,煎汤 100 ml)两组同时辅以补液、输血、抑酸等治疗,观察 72 h 及出血停止后 1 周内再出血情况。统计学方法采用 χ^2 检验。

结 果

1 疗效判定 出血停止标准:(1)呕血、黑便停止,血红蛋白无进行性下降;(2)胃管抽吸液体澄清;(3)胃镜证实无活动性出血。疗效判定标准:有效:72 h 内出血停止,1 周内无再出血;无效:72 h 未达到出血停止标准。再出血:经治疗出血停止

后 1 周内又出血。

2 疗效 A 组止血成功 19 例,无效 4 例,再出血 3 例,有效率 73.1%,再出血率 15.7%。B 组止血成功 21 例,无效 2 例,再出血 2 例,有效率 84.0%,再出血率 9.5%。两组有效率和 1 周内再出血率比较差异有显著性($P<0.05$)。

讨 论 天然生长抑素为 14-氨基酸肽,在肝内代谢,能抑制包括胰高血糖素、血管活性肽、降钙素、基因相关肽及 P 物质等胃肠扩血管多肽的释放,具有选择性收缩内脏血管的作用。但生长抑素的半衰期太短(2~3 min),善宁半衰期为 70~90 min,克服了生长抑素的缺点,同时具有生长抑素的作用。研究证实,善宁治疗食道—胃静脉曲张破裂出血取得较好疗效。近年又有学者研究认为,小剂量生长抑素能明显降低门脉压力及门脉内的血流量,对门脉高压血流动力学影响与常规量相当,小剂量善宁与常规量控制食道静脉曲张破裂出血的疗效相当。这是本方案设计小剂量方案的主要理论依据和基础。

黄鹤汤方中大黄苦寒,归脾、胃、大肠、肝、心经,具有凉血解毒、逐瘀通经的作用,大黄炭具有明显的化瘀止血作用。现代药理研究表明,大黄具有抗感染作用,对多种细菌具有不同程度的抑制作用,抗菌的主要有效成分是蒽醌衍生物;有显著的止血作用,可以缩短凝血时间,降低毛细血管的通透性,改善血管脆性,能使纤维蛋白原增加,使血管的收缩活动增加,能促进骨髓制造血小板,因此促进血液凝固,止血成分主要是大黄酚,同时对正常人的凝血功能无明显影响。仙鹤草苦、涩、平,归肺、肝、脾经;具有明显收敛止血作用,现代药理研究表明,仙鹤草可明显延长出血时间和促进凝血。炙甘草调和诸药。本方与善宁合用提高了止血疗效。

(收稿 2004-04-09 修回 2004-06-29)

作者单位 解放军 211 医院(哈尔滨 150080)

[△]现在解放军总医院(北京 100853)