

补肾方对慢性乙型肝炎自然杀伤细胞免疫效应分子的影响

高月求 姚 嫣 李 曼

摘要 目的 观察补肾方治疗肝肾阴虚兼湿热未尽型慢性乙型肝炎的免疫调控作用机制。方法 收集 HBV DNA 阳性、ALT 异常的肝肾阴虚兼湿热未尽型慢性乙型肝炎患者 35 例,其中治疗组 22 例给予补肾方治疗,对照组 13 例给予 α -2b 干扰素,疗程 6 个月,分别于用药前后检测患者谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)和 HBV DNA 水平,用流式细胞法检测外周血自然杀伤细胞(NK)的免疫效应分子穿孔素(PF)、颗粒酶 B(GrB)、颗粒溶素(GNLY)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)的表达情况。结果 两组治疗后 ALT 及 AST 均低于治疗前($P < 0.05$, $P < 0.01$),治疗后组间比较差异无统计学意义。两组治疗后中医证候总积分都明显下降($P < 0.01$);治疗后治疗组总积分明显低于对照组($P < 0.05$)。治疗组治疗后的中医证候疗效总有效率明显高于对照组($P < 0.05$)。治疗组治疗后 PF(%) 34.86 ± 31.60 和 GNLY(%) 25.72 ± 24.98 均低于治疗前 69.62 ± 27.58 , 64.54 ± 25.96 ($P < 0.05$),与对照组治疗后比较差异无统计学意义。结论 补肾方治疗肝肾阴虚兼湿热未尽型慢性乙型肝炎的免疫调控作用机制在于降低 NK 细胞的相关免疫效应分子的表达,促进受损肝脏的痊愈。

关键词 慢性乙型肝炎;补肾方;自然杀伤细胞;穿孔素;颗粒酶 B;颗粒溶素;肿瘤坏死因子- α ;干扰素- γ

Effect of Bushen Recipe on the Immune Effector Molecules of Natural Killer Cells in Patients with Chronic Hepatitis B GAO Yue-qiu, YAO Yan, and LI Man Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200021)

ABSTRACT **Objective** To investigate the immunoregulation mechanism of Bushen Recipe (BSR) in patients with chronic hepatitis B (CHB) of Gan-Shen yin-deficiency and lingering damp-heat syndrome (GSS). **Methods** Thirty-five patients with positive HBV DNA and abnormal alanine transaminase (ALT) level were assigned to the treatment group (22 patients) and the control group (13 patients), they were treated with BSR and α -2b interferon for 6 months respectively. Blood levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL) and HBV DNA were measured before and after treatment. And the expressions of immune effector molecules of nature killer (NK) cell, including perforin (PF), granzyme B (GrB), granulysin (GNLY), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and γ -interferon (γ -IFN), were detected using flow cytometry. **Results** Levels of ALT and AST declined significantly in both groups after treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), showing insignificant difference between them. And the expressions (%) of PF and GNLY in the treatment group reduced significantly after treatment, from 69.62 ± 27.58 to 34.86 ± 31.60 for PF and from 64.54 ± 25.96 to 25.72 ± 24.98 for GNLY (both $P < 0.05$). In the treatment group and the control group, as compared with before treatment, the total scores of Chinese medicine symptoms were significantly declined after treatment ($P < 0.01$), and the total scores of Chinese medicine symptoms in the treatment group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). As compared with the total effective rate of Chinese medicine syndromes in the control group after treatment, that in the treatment group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of BSR in immunoregulating on patients with CHB of GSS is by way of declining the expressions

基金项目:上海市教育委员会 E 研究院建设计划项目(No.03008);上海市科委引导项目(No.074119608);上海市浦东新区创新项目;上海中医药大学优秀团队培养计划;上海高校创新团队建设项目;上海市教育委员会重点学科(第 5 期)建设资助项目(J50307)

作者单位:上海中医药大学附属曙光医院,上海中医药大学肝肾疾病证教育部重点实验室(上海 200021)

通讯作者:高月求, Tel:18916068288, E-mail:gaoyueqiu@hotmail.com

of relative immune effector molecules to promote the recovery of the damaged liver.

KEYWORDS chronic hepatitis B; Bushen Recipe; natural killer cell; perforin; granzyme B; granulysin; tumor necrosis factor- α ; interferon- γ

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 (chronic hepatitis B, CHB) 的经验方, 长期临床研究证实有很好的保肝降酶抗病毒作用^[1], 为进一步阐释其作用机制, 通过临床研究, 观察补肾方对 CHB 患者外周血 NK 细胞表达的免疫效应分子的影响, 探讨其治疗 CHB 的免疫调控机制。

资料与方法

1 病例选择 诊断标准参照 2005 年中华医学会肝病学会、感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[2], CHB 患者辨证参照《中华人民共和国国家标准·中医临床诊疗术语》、2002 年版《中药新药临床研究指导原则》^[3]。2006 年 9 月—2007 年 12 月收集曙光医院肝病门诊肝肾阴虚兼湿热未尽型 CHB 患者 43 例, 年龄 18~60 岁。根据随机数字表将入组病例分为两组, 治疗组为 22 例, 对照组为 21 例, 对照组治疗过程中有 8 例因故脱落, 最终入组 13 例。两组一般资料比较差异无统计学意义 (表 1)。另选 11 名健康体检者, 年龄 20~55, 男性 8 名, 女性 3 名, 作为正常对照组。

2 治疗方法 治疗组给予补肾方 (主要组成: 女贞子、旱莲草、仙灵脾、猫人参、猫爪草、仙茅、紫草、丹皮等, 由曙光医院统一制成汤剂, 200 mL/袋), 1 日 2 袋早晚分服, 疗程为 6 个月。对照组给予 α -2b 干扰素 (安福隆, 每支 500 万 U, 天津华立达生产), 隔日 1 次肌肉注射 1 支, 疗程为 6 个月。两组均未用其他疗法 (入组病例均在入组前签订了知情同意书, 每 2 周随访 1 次)。

3 中医证候疗效判定标准 参照 2002 年《中药新药临床研究指导原则》^[3]。(1) 临床痊愈: 中医临床症状、体征消失或基本消失, 证候积分减少 $\geq 90\%$; (2) 显效: 中医临床症状、体征明显改善, 证候积分减少 70%~89%; (3) 有效: 中医临床症状、体征均有好转, 证候积分减少 30%~69%; (4) 无效: 中医临床症状、体征均无明显改善, 甚或加重, 证候积分减少 $< 30\%$ 。注: 计算公式, 尼莫地平法为 [(治疗前积分 -

治疗后积分)/治疗前积分] $\times 100\%$

4 肝功能和 HBV DNA 检测 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、血清门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、血清总胆红素 (TBIL) 和 HBV DNA 水平由上海曙光医院检验科检测, HBV DNA $< 10^3$ 拷贝/mL 为阴性。

5 主要仪器及试剂 流式细胞仪购自美国 Coulter 公司; CD3-Tc、CD16-FITC、CD56-FITC、颗粒酶 B-PE (GrB-PE)、颗粒溶素-PE (GNLY-PE)、固定破膜剂试剂盒、红细胞裂解液均购自 caltag laboratories; 穿孔素-PE (PF-PE)、肿瘤坏死因子- α -PE (TNF- α -PE)、干扰素- γ -PE (IFN- γ -PE)、布雷非德菌素 A (BFA) 均购自 eBioscience 公司; 豆蔻酰佛波醇乙酯 (PMA)、离子霉素购自 Sigma 公司。

6 试验方法

6.1 取正常对照组及治疗前后患者外周血 3 mL 注入肝素钠抗凝管中, 分出 800 μ L 刺激, 另 2.2 mL 室温保存待测。

6.2 具体刺激过程 PMA 工作液浓度为 1 μ g/mL, 每 100 μ L 抗凝血加 2.5 μ L 工作液; 离子霉素工作液浓度 50 μ g/mL, 每 100 μ L 抗凝血加 2 μ L 工作液 BFA, 1:1 000 稀释为工作液, 每 1 000 μ L 抗凝血加 1 μ L; 加入上述 3 种试剂后混匀, 封口, 刺孔, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后上机检测。

6.3 流式检测 每管加入 100 μ L 抗凝全血, 将 CD3-Tc/CD16-FITc/CD56-FITc 标记的单克隆抗体加到 5 个流式管; 室温避光孵育 15 min; 加固定破膜剂中的试剂 A 100 μ L, 室温孵育 15 min, PBS 洗涤 1 次; 弃上清, 加固定破膜剂中的试剂 B 100 μ L, 每组中分别加入 PF-PE、GrB-PE、TNF- α -PE、IFN- γ -PE、GNLY-PE; 室温避光孵育 15 min, PBS 洗涤 1 次; 加入 1 mL PBS, 上流式细胞仪检测; 分析结果。

7 统计学方法 细胞表型的比例用 Cell Quest Version 3.1 软件分析, 其他应用 SPSS 13.0 统计软件整理分析数据。根据数据变量特征, 计量资料两组间用配对 t 检验。两组间样本率的比较应用 χ^2 检验。

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别		年龄 (岁)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (μ mol/L)	HBV DNA (log)
		男	女					
治疗	22	13	9	41.13 $\pm$ 7.50	80.50 $\pm$ 35.17	56.09 $\pm$ 18.64	17.81 $\pm$ 6.41	5.83 $\pm$ 1.46
对照	13	9	4	36.54 $\pm$ 10.88	87.62 $\pm$ 67.38	65.38 $\pm$ 46.21	17.32 $\pm$ 7.53	6.04 $\pm$ 1.33

结 果

1 治疗结束时对照组有 8 例在治疗过程中脱落: 1 例因经济原因, 2 例主观不能耐受, 2 例失访, 3 例因出现不良反应, 治疗结束时对照组为 13 例, 但不影响统计学处理。

2 两组治疗前后 ALT、AST 和 TBIL 变化比较 (表 2) 两组 ALT 及 AST 治疗后均降低, 与治疗前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 治疗后组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 两组治疗前后 ALT、AST 和 TBIL 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
治疗	22	治疗前	80.50 $\pm$ 35.17	56.09 $\pm$ 18.64	17.81 $\pm$ 6.41
		治疗后	38.45 $\pm$ 15.94**	31.14 $\pm$ 7.43**	17.51 $\pm$ 5.07
对照	13	治疗前	87.62 $\pm$ 67.38	65.38 $\pm$ 46.21	17.32 $\pm$ 7.53
		治疗后	39.08 $\pm$ 19.19*	33.38 $\pm$ 12.33*	14.25 $\pm$ 3.73

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

3 治疗后两组 HBV DNA 的转阴率比较 治疗 24 周时, 治疗组 HBV DNA 的转阴率为 31.8% (7/22), 对照组为 38.5% (5/13), 经 χ^2 检验差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.726$, $P = 0.483$)。

4 两组治疗前后中医证候总积分变化情况 (表 3) 两组在治疗 24 周后总积分均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 治疗后治疗组总积分明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3 两组治疗前后中医证候总积分变化比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后
治疗	22	12.73 $\pm$ 3.71	5.50 $\pm$ 2.63 [△]
对照	13	12.62 $\pm$ 3.31	8.23 $\pm$ 3.54*

注: 与本组治疗前比较, * $P < 0.01$; 与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

5 两组治疗前后中医证候疗效评定情况 治疗组 22 例在治疗 24 周时临床痊愈 1 例, 显效 7 例, 有效 13 例, 无效 1 例, 总有效率 95.5%; 对照组 13 例分别为 0、0、8、5 例及 61.5%; 治疗组明显优于对照组 ($P < 0.05$)。

6 各组治疗前后免疫效应蛋白表达及细胞因子变化比较 (表 4) 与正常对照组比较, 治疗前治疗组的 GrB 和 GNLY 升高, 治疗前对照组的 GNLY 升高

($P < 0.05$)。治疗组治疗后与治疗前比较, NK 分泌的 PF 及 GNLY 明显降低 ($P < 0.05$)。两组治疗后各项指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

7 药物不良反应 对照组 α -2b 干扰素主要的不良反应有发热、寒颤、乏力、头痛、肌肉酸痛、厌食等类似流感样症状, 常见的血液学指标异常有白细胞、血小板减少和转氨酶增高。治疗组补肾方的不良反应为偶有恶心、胃部轻微不适, 不影响继续治疗。本研究中对对照组有 3 例出现不良反应, 并因此脱落; 治疗组有 1 例出现不良反应。

讨 论

CHB 的发病机制尚未完全阐明, 一般认为乙肝病毒感染慢性化与病毒变异及机体免疫应答失衡有关。中医学认为慢性乙肝的外因为湿热疫毒之邪, 内因为正气不足, 肾为先天之本, 因而正气不足与肾虚密切相关。临床所见慢性乙肝患者多有乏力、神疲、畏寒、腰酸、肢软、足跟痛、头晕、耳鸣、遗精等肾虚症状, 也证实肾虚为其病机之一。故无论是肾阳亏损或肾阴虚耗为主, 或两者兼有, 均可从补肾法着手治疗。

补肾方由仙灵脾、旱莲草、女贞子、仙茅、猫人参、猫爪草、紫草、丹皮 8 味药组成。其中仙茅辛热性猛, 善补命门之火, 且能温煦脾土, 仙灵脾温肾壮阳, 两药合用更增强温阳功效; 旱莲草、女贞子即为二至丸, 始见于《医方集解》, 具有强腰膝, 壮筋骨, 补肾阴, 乌髭发作用, 4 药合用, 肾阴肾阳充足, 正气得补。猫人参、猫爪草、皆入肝经, 清肝泻火解毒, 丹皮、紫草凉血活血解毒。纵观本方, 共起滋阴补阳, 清热解毒的作用。

NK 细胞是主要以非主要组织相容性抗原复合物限制性方式杀伤肿瘤或病毒感染的细胞^[4], 在天然和获得性免疫中发挥重要作用。NK 细胞不仅可通过释放毒性颗粒如 GrB 和 PF 直接杀伤病毒感染的靶细胞, 而且可分泌大量的炎症细胞因子和免疫调节效应细胞因子发挥抗病毒作用, 活化和募集其他细胞共同参与抗病毒反应。Sitia 等^[5]在 HBV 转基因小鼠重症肝炎模型中发现, 宿主来源的大量抗原非特异性炎症细胞包括 NK 细胞、巨噬细胞等在肝脏的募集是造成

表 4 各组 NK 的免疫效应蛋白表达及细胞因子变化比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	PF	GrB	GNLY	TNF- α	IFN- γ
正常对照	11	—	56.77 $\pm$ 33.85	62.35 $\pm$ 32.63	31.50 $\pm$ 27.64	30.80 $\pm$ 22.23	57.38 $\pm$ 23.69
治疗	22	治疗前	69.62 $\pm$ 27.58	83.20 $\pm$ 17.90*	64.54 $\pm$ 25.96*	37.47 $\pm$ 14.13	44.61 $\pm$ 17.22
		治疗后	34.86 $\pm$ 31.60 [△]	76.03 $\pm$ 15.58	25.72 $\pm$ 24.98 [△]	34.34 $\pm$ 32.34	34.78 $\pm$ 30.20
对照	13	治疗前	51.38 $\pm$ 33.61	78.47 $\pm$ 21.18	64.18 $\pm$ 33.26*	28.40 $\pm$ 14.68	40.91 $\pm$ 19.45
		治疗后	29.08 $\pm$ 24.87	69.23 $\pm$ 18.47	47.12 $\pm$ 33.48	18.76 $\pm$ 10.71	28.73 $\pm$ 19.71

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与本组治疗前比较, $\Delta P < 0.05$

肝损伤的重要因素。因此, NK 细胞在 HBV 感染中起到双重作用, 一方面是抗病毒的重要机制, 另一方面是肝脏受到损害的主要原因。

CHB 治疗的理想方案应是既能有效控制病毒复制, 又能调节宿主免疫应答以免防止肝损伤产生^[6]。前期的临床研究表明补肾方可改善 CHB 患者临床症状、体征、肝功能, 并可抑制病毒复制^[1]。本研究首先观察了补肾方的临床疗效, 结果表明, 两组 ALT 与 AST 治疗后均降低, 有统计学意义 ($P < 0.01$); 说明补肾方和 α -2b 干扰素在降低 ALT 和 AST 方面具有同样的疗效。

在临床疗效的基础上, 本研究通过观察该方对 NK 细胞表达的免疫效应分子的调节作用探讨其免疫调控机制。结果表明, 与正常对照组相比, 治疗前治疗组的 GrB 和 GNLY 升高, 治疗前对照组的 GNLY 升高 ($P < 0.05$)。与治疗前比较, 治疗后治疗组 PF、GNLY 明显降低 ($P < 0.05$)。提示补肾方可能在降低 NK 细胞表达的 GNLY 水平方面较优, 补肾方可能通过降低 NK 细胞表达的免疫效应分子 GNLY, 减少对肝细胞的细胞毒作用, 达到保护肝脏的治疗效果。

综上所述, 补肾方对 CHB 患者的肝脏保护作用机制之一, 是通过减少 NK 细胞表达的免疫效应分子, 减少其对肝脏的细胞杀伤作用。因为 NK 细胞在 CHB 患者的病毒复制和肝脏受损两方面发挥了重要的作用, 那么补肾方在保护肝脏的同时要通过其他机制达到抑制病毒复制的作用, 这还有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 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[J]. 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" [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharm Shanghai, 2001, 15(1): 34-36.

[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[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881-891.

Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B. Chin J Hepatol, 2005, 13: 881-891.

[3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 143-149.

Zheng XY, editor. Guiding principle for clinical research on new drugs of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 2002: 143-149.

[4] Liunggren HC, Karre K. In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition[J]. Immunol Today, 1990, 11(7): 237-244.

[5] 杨爱龙, 李芳秋. 颗粒溶素[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(1): 81-83.

Yang AL, Li FQ. Granulysin[J]. J Med Postgrad, 2005, 18(1): 81-83.

[6] 李功奇, 李庆德, 胡永荷. 评价抗 HBV 药物[J]. 中国药师, 2000, 3(4): 229-231.

Li GQ, Li QD, Hu YG. Evaluation of anti-HBV drugs [J]. Chin Pharm, 2000, 3(4): 229-231.

(收稿: 2009-03-06 修回: 2010-04-30)

中国中医科学院西医学习中医班(西苑班)招生

中国中医科学院西医学习中医班自 1956 年开班以来, 为国内外培养了大批中医、中西医结合骨干人材, 成为国内重要的中西医结合教育基地之一。现受国家中医药管理局委托, 中国中医科学院第 15 期西医学习中医班(西苑班)开始招生(2010 年 9 月开学), 本班学制 2 年, 由长期从事临床工作并具有丰富教学经验的专家系统讲授 15 门中医课程, 在本院进行临床实习。课程考试和实习合格者颁发中国中医科学院西医学习中医班毕业证书。西医院校毕业的医务人员及中医药工作者均可报名参加。欲报名者请向中国中医科学院西苑医院教育处函索招生简章, 也可通过中国中医科学院西苑医院网站(www.xyhospital.com)下载招生简章和报名表。通讯处: 北京海淀区中国中医科学院西苑医院教育处, 邮编: 100091; 电话: (010)62887973, 62835037; 联系人: 薛庆山。