

# 慢性乙型肝炎中医证型与 HLA-DR13 基因、基本核心启动子突变及 T 细胞亚群变化的相关性研究

杨小蓉<sup>1</sup> 刘茵<sup>2</sup> 欧阳娟<sup>2</sup> 王秀坤<sup>1</sup> 刁蔚欣<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探讨慢性乙型肝炎中医临床各证型与 HLA-DR13 基因、基本核心启动子 (BCP) 突变 (即 A1762T/G1764A) 及 T 细胞亚群变化的相关性。**方法** 102 例乙型肝炎患者按中医辨证分型分为肝胆湿热、肝郁脾虚、肝肾阴虚、瘀血阻络及脾肾阳虚证型 5 种, 设 30 名健康人为正常对照组。实时荧光定量 PCR 检测血液中的乙肝病毒核酸定量 (HBV-DNA) 水平及 HLA-DR13 基因, 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 表达, 测序法检测样本血清 BCP 变异, ELISA 方法检测乙肝病毒 e 抗原, 并分析各证型客观指标的相关性。**结果** HBV-DNA 定量结果各证型之间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); HBeAg 阳性率各组间比较, 肝郁脾虚型 HBeAg 阳性率高于与其他各证型 ( $P < 0.05$ ), 即肝郁脾虚型 > 肝肾阴虚型 > 瘀血阻络型 > 肝胆湿热型 > 脾肾阳虚型。与正常对照组比较, 脾肾阳虚型 CD3<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 值明显降低 ( $P < 0.05$ ), 肝胆湿热型及脾肾阳虚型 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 值亦降低 ( $P < 0.05$ ), 各证型 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 值差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。HLA-DR13 基因定量与正常对照组比较, 肝郁脾虚型和肝肾阴虚型组降低 ( $P < 0.05$ ); BCP 突变以肝肾阴虚型阳性率高于其他各证型, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** HLA-DR13 和 BCP 检测结果可作为临床慢性乙型肝炎中医辨证分型的参考指标。

**关键词** 慢性乙型肝炎; 中医证型; HLA-DR13 基因; T 淋巴细胞免疫; 基本核心启动子

Correlation Study on Chinese Medical Syndrome Types of Chronic Hepatitis B Patients and HLA-DR13 Gene, BCP Mutation, and T-lymphocyte Subsets YANG Xiao-rong<sup>1</sup>, LIU Yin<sup>2</sup>, OUYANG Juan<sup>2</sup>, WANG Xiu-kun<sup>1</sup>, and DIAO Wei-xin<sup>1</sup> 1 Department of Testing, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou (510080), China; 2 Department of Testing, First Hospital, Sun Yat-sen Medical University, Guangzhou (510080), China

**ABSTRACT** **Objective** To explore the correlation between the HLA-DR13, basic core promoter (BCP), changes of T lymphocyte subset and clinical Chinese medical syndromes of chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Totally 102 CHB patients were syndrome typed as Gan depression Pi deficiency syndrome (GDPDS), Pi-Shen yang deficiency syndrome (PSYDS), Gan-gallbladder dampness heat syndrome (GGDHS), Gan-Shen yin deficiency syndrome (GSYDS), and static blood blocking collaterals syndrome (SBBCS). Besides, 30 healthy subjects were recruited as the normal control group. The blood HBV-DNA level and HLA-DR13 gene were detected with real time fluorescent PCR. The expression of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in T lymphocytes was detected using flow cytometry. The mutation of serum A1762T/G1764A was detected using PCR sequencing. Hepatitis Be antigen (HBeAg) was detected with ELISA, and correlation between various Chinese medical syndrome types and objective indicators were analyzed. **Results** There was no statistical difference in HBV-DNA quantitative results among various syndrome types ( $P > 0.05$ ). HBeAg positive rate was higher in GDPDS than in other syndrome types ( $P < 0.05$ ). It was sequenced as GDPDS > GSYDS > SBBCS > GGDHS > PSYDS. Compared with the normal control group, percentages of CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> were lower in PSYDS ( $P < 0.05$ ). The ratio of CD3<sup>+</sup>

基金项目:广东省中医药局科研课题资助项目 (No.20122106)

作者单位:1. 广东药学院附属第一医院检验科 (广州 510080); 2. 中山大学附属第一医院检验科 (广州 510080)

通讯作者:杨小蓉, Tel:020-61335132, E-mail:xiaorongy3196@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1315

CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> was lower in GGDHS and PSYDS than in the normal control group ( $P < 0.05$ ). There was no statistical difference in the CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> percentage among various syndrome types ( $P > 0.05$ ). The quantitation of HLA-DR13 gene was lower in GDPDS and GSYDS than in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The positive rate of BCP mutation was higher in GSYDS than in other syndrome types ( $P < 0.05$ ). Conclusion Co-detection results of HLA-DR13 and BCP could be used as reference indices of Chinese medical syndrome typing of CHB.

**KEYWORDS** chronic hepatitis B; Chinese medical syndrome type; HLA-DR13 gene; T lymphocyte immunity; basal core promoter

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是一种发病率高,危害性大的疾病,严重威胁着人类的健康。研究表明,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的免疫损伤受很多综合因素的影响,如宿主年龄、性别、环境因素(如酒精)以及宿主的遗传多样性等。众多基因参与 HBV 特异性免疫应答,其中最为重要和复杂的就是 HLA 位点<sup>[1]</sup>, HLA-DR13 基因、免疫细胞尤其是淋巴细胞亚群变化及 HBV 前 C 区突变与慢性乙型肝炎病情及预后密切相关<sup>[2,3]</sup>,但其在乙型肝炎中医各证型中相关性研究,目前还尚不清楚。本研究拟检测慢性乙型肝炎患者肝胆湿热、肝郁脾虚、肝肾阴虚、瘀血阻络及脾肾阳虚 5 种证型的 HBV-DNA、HLA-DR13 基因定量, T 淋巴细胞 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 表达, HBV 基本核心启动子(BCP, A1762T/G1764A)突变及乙型肝炎病毒 e 抗原的变化,并分析各因素与中医证型的相关性。

## 资料与方法

**1 诊断标准** CHB 诊断标准参照《病毒性肝炎防治指南》标准<sup>[4]</sup>。中医辨证分型诊断标准参照 1991 年中国中医药学会肝病专业委员会制定的辨证标准(试行)<sup>[5]</sup>。

**2 纳入标准** (1) HBsAg 阳性,持续的时间 > 6 个月,ALT 水平升高 > 正常值 2 倍;(2) 年龄 19 ~ 77 岁;(3) 签署知情同意书,此研究方案经本院伦理委员会批准。

**3 排除标准** (1) 甲、丙、丁、戊型肝炎的重叠感染;(2) EB (Epstein-Barr, EB) 病毒、巨细胞病毒(CMV)感染;(3) 自身免疫性肝病、酒精性肝病及脂肪肝,无干扰素治疗史。

**4 一般资料** 200 例患者均为 2011 年 4 月 - 2012 年 4 月在广东药学院附属第一医院感染科就诊慢性乙型肝炎患者。经筛选后 102 例符合纳入标准,以瘀血阻络型及肝胆湿热型最为多见,其次为肝郁脾虚型、肝肾阴虚型,脾肾阳虚型最少。中医证型

肝郁脾虚病例较少,可能与广州多变的湿热气候有关。其中男 92 例,女 10 例,年龄 19 ~ 77 岁,平均(51.4 ± 13.0)岁;肝胆湿热型 25 例(25%),肝郁脾虚型 15 例(15%),肝肾阴虚型 18 例(18%),瘀血阻络型 34 例(32%),脾肾阳虚型 10 例(10%)。病程:6 个月 ~ 1 年 75 例,1 ~ 3 年 27 例。各组性别、年龄、病程差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。另设正常对照组 30 名,来源于本院健康体检者,其中男 12 名,女 18 名,年龄 17 ~ 81 岁,平均(49.2 ± 20.3)岁。

## 5 观察指标及方法

**5.1 血清 HBeAg 抗原及 HBV DNA 定量检测** 采用 ELISA 检测方法。慢性乙型肝炎患者血清中的 HBeAg;实时荧光定量 PCR 法检测血清 HBV DNA 定量,仪器为 DA-7600,试剂由中山大学达安基因公司提供(批号:2012001),检测下限为 500 U/mL。

**5.2 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞绝对值检测** 流式细胞仪和免疫荧光标记试剂均为美国 BD 公司产品(试剂批号:00920)。用 Na<sub>2</sub>EDTA 抗凝管收集外周静脉血 4 mL,混匀,其中 2 mL 做血常规检查;2 mL 用于流式细胞检测。于 BD 公司专用流式细胞标本检测管(FACS 专用管)中加入如下单克隆抗体 CD4-FITC/CDS-PE/CD3-PE-Cys 2 μL。在上述每管中加入 25 μL 全血,振荡混匀,避光孵育 30 min。每管中加入 500 μL 溶血素,振荡混匀,室温避光溶血 15 min。每管中加入 2 mL PBS 洗液,振荡混匀,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清,重复 1 次。每管中加入 500 μL PBS 洗液,振荡混匀,避光放置,2 h 内完成上机检测。

**5.3 HLA-DR13 基因定量** 实时荧光定量 PCR 检测方法。根据已知片段 CDS 区域设计两个引物:上游:5'-CCTGGACAGATACTTCCATAACCA-3';下游:3'-TCGTCTCCAGGATGTCCTTCT-3',扩增出 135 bp 的片段,连接,转化,测序,酶切鉴定后,将 PMD20/DR13 按照 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>7</sup> copies/mL 稀释倍数稀

释,并将各稀释倍数的质粒进行实时荧光定量检测,反应条件:95 ℃ 变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 退火 30 s,循环 30 次,制作标准曲线。检测各中医证型样本 HLA-DR13 基因含量。

5.4 等位基因 PCR 扩增 BCP 突变 根据 BCP1762/1764 突变位点设计 3 个引物:上游:5'-AATGGTCTTTGTACTAGGAG-3' 和 5'-AAAGATCTTTGTACTAGGAG-3';下游:5'-ATGTTCCGGAGA CTCTAAG-3',扩增出 312 bp 的片段,2% 琼脂糖凝胶电泳检测,测序。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较用 LSD 检验,相关性分析采用线性相关分析法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各证型 HBV-DNA 定量及 HBeAg 定性结果比较(表 1) HBV-DNA 定量结果以肝胆湿热型 > 肝郁脾虚型 > 瘀血阻络证型 > 脾肾阳虚型 > 肝肾阴虚型,各组间差异均无统计学意义( $P = 0.918$ ); HBeAg 阳性率各组间比较,肝郁脾虚型的 HBeAg 阳性率高于与其他各证型( $P < 0.05$ ),即肝郁脾虚型 > 肝肾阴虚型 > 瘀血阻络型 > 肝胆湿热型 > 脾肾阳虚型。

表 1 各证型 HBV-DNA 定量及 HBeAg 阳性率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

证型	例数	HBV-DNA 定量 ( $\log_{10}$ IU/mL)	HBeAg 阳性率 (%)
肝胆湿热型	25	2.13 ± 2.70	12*
肝郁脾虚型	15	2.03 ± 2.66	33
肝肾阴虚型	18	1.64 ± 2.78	17*
瘀血阻络型	34	1.72 ± 2.46	15*
脾肾阳虚型	10	1.70 ± 1.95	0*

注:与肝郁脾虚证组比较,\* $P < 0.05$

表 2 各证型 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

证型	例数	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
正常对照	30	63.17 ± 12.79	36.29 ± 9.74	23.79 ± 8.63	1.78 ± 1.09
肝胆湿热型	25	59.90 ± 14.34	29.90 ± 7.78	27.60 ± 10.09	1.22 ± 0.67*
肝郁脾虚型	15	62.09 ± 8.08	32.70 ± 5.56	24.59 ± 6.90	1.50 ± 0.67
肝肾阴虚型	18	58.20 ± 7.68	33.98 ± 6.61	21.83 ± 4.61	1.60 ± 0.50
瘀血阻络型	34	60.25 ± 9.21	32.36 ± 6.73	24.26 ± 9.69	1.80 ± 0.95
脾肾阳虚型	10	50.09 ± 18.16*	24.91 ± 11.85*	23.45 ± 15.56	1.39 ± 0.75*

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$

2 各证型 T 细胞亚群值比较(表 2) 与正常对照组比较,脾肾阳虚型 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值明显降低( $P < 0.05$ ),肝胆湿热型 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 比值亦降低( $P < 0.05$ ),而其他各证型与正常对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。各证型之间差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3 各证型 HLA-DR13 基因值及 BCP 百分率比较(表 3) 各证型 HLA-DR13 基因表达以瘀血阻络证 > 脾肾阳虚型 > 肝胆湿热型 > 肝肾阴虚型 > 肝郁脾虚型。与正常对照组比较,肝郁脾虚型和肝肾阴虚型 HLA-DR13 值均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他组与正常对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ); BCP 突变以肝肾阴虚型阳性率(11%)明显高于其他各证型,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而其他各组之间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 3 各证型 HLA-DR13 定量及 BCP 百分率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

证型	例数	HLA-DR13 ( $\log_{10}$ IU/mL)	BCP 百分率 (%)
正常对照	30	2.30 ± 1.81	—
肝胆湿热型	25	2.11 ± 1.61	4 <sup>△</sup>
肝郁脾虚型	15	1.70 ± 1.88*	0 <sup>△</sup>
肝肾阴虚型	18	1.80 ± 1.95*	11
瘀血阻络型	34	2.17 ± 1.71	3 <sup>△</sup>
脾肾阳虚型	10	2.13 ± 1.91	0 <sup>△</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与肝肾阴虚证比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

### 讨 论

中医学认为乙型肝炎病毒属湿热疫毒之邪,正气不足是乙型肝炎慢性化的内因,而人体的正气与现代医学的免疫功能之间有密切的联系,正气不足导致免疫功能紊乱<sup>[6]</sup>。T 淋巴细胞的数量和各亚群比例是反映机体免疫水平的主要标志(CD3<sup>+</sup>代表总 T 细胞),CD4<sup>+</sup>细胞主要包括辅助性 T 细胞(TH),它能促进 B 细胞、细胞毒 T 细胞(CTL)及其他免疫细胞的增值和

分化。CD4 细胞具有免疫诱导功能, CD8 细胞群有抑制杀伤功能, 两者相互影响、相互作用, 可以平衡机体的免疫状态。人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 是由一组具有高度多态性和连锁不平衡的基因群体构成的人类主要组织相容性复合体, 是调控人体特异性免疫应答和决定疾病易感性个体差异的主要基因系统。有研究表明, HLA-DR13 对于乙型肝炎感染者清除病毒有着较强的保护作用, HLA 与 T 淋巴细胞共同构成了宿主的内因<sup>[7]</sup>。湿热疫毒之邪 (包括 HBV 标志物、HBV-DNA 及 BCP 等) 是乙型肝炎慢性化的外因。内因与外因相互作用, 即邪正交争, 彼此消长盛衰的变化, 导致了病毒感染宿主后不同的发展和转归。

CHB 在早期阶段多表现为湿热蕴结或肝郁脾虚证, 程度尚轻, 但随着病情的反复多次的发作, 肝络受损, 使病变逐渐加重, 逐渐演变为瘀血阻络及脾肾阳虚证。本研究中, 病毒因素方面, HBV-DNA 定量及 HBeAg 阳性率以肝郁脾虚证和肝胆湿热证为最高, 与蔡林宏等<sup>[8]</sup> 研究结果略有差异 (HBV-DNA 结果以湿热中阻和肝肾阴虚为最高), 提示其病毒的复制活动处于比较活跃的状态, 而其余 3 组的 HBV-DNA 定量较低, 且 HBeAg 阳性率低, 表明其病毒处于低复制或无复制状态, 这与毛宇湘等<sup>[9]</sup> 的研究结果相同。俞伟等<sup>[10]</sup> 发现慢乙肝湿热中阻型、肝肾阴虚型和瘀血阻络型 HBsAg 平均滴度明显高于肝郁脾虚型和脾肾阳虚型, 肝肾阴虚型的 HBeAg 值明显高于其他证型。而随着病情的发展到了以虚证为主的后期, HBV-DNA 复制呈下降趋势, 因此, 本研究可以将 HBV-DNA, HBeAg 作为慢性乙型肝炎湿热中阻、肝郁脾虚证型患者辨证的一个重要参考指标。BCP 突变率以肝肾阴虚证型最高 (DR13 基因表达量最低)、肝胆湿热及瘀血阻络证型次之, 肝郁脾虚和脾肾阳虚最低, 三者比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 DR13 基因对于前 C 区变异阳性的 CHB 患者进行针对性治疗, 可避免患者病情进一步加重。内因即宿主方面, 首先以 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值来看, 所有证型的 CD3<sup>+</sup> 值偏低, 即淋巴细胞总数偏低, 提示慢性乙型肝炎病毒感染均存在不同程度的免疫功能低下, CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值以脾肾阳虚及肝胆湿热为最低, 与其他组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 即正气不足的虚证患者相应表现为免疫功能低下或失常<sup>[11]</sup>。HLA-DR13 荧光定量结果亦相似: 所选病例的 HLA-DR13 结果与正

常对照组比较均偏低, 而尤以肝郁脾虚和肝肾阴虚为最低, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肝郁脾虚、肝胆湿热正气不足, 引起邪气侵入, 即此两阶段自身免疫功能与病毒处于正邪相交的阶段, 可能此时治疗应该也是比较合适的时机。而肝肾阴虚、瘀血阻络及脾肾阳虚证型处于宿主自身免疫功能较低下的后期阶段, 此时治疗难度较大一些。所以临床上应宏观辨证与微观辨证相结合, 充分利用现代医学检测手段, 可更准确把握患者病情<sup>[12]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Guo X, Zhang Y, Li J, et al. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population [J]. *Hepatology*, 2011, 53(2): 422-428.
- [2] 梁军, 张永萍, 仲英娜. 人类白细胞抗原复合体与 HBV 感染的相关性研究进展 [J]. *国际病毒学杂志*, 2013, 4(20): 93-96.
- [3] 李小芬. 乙型肝炎病毒前 C 区及 BCP 区变异与临床关系的研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2010.
- [4] 中华医学会肝病学会、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.
- [5] 陈立华主编. 病毒性肝炎中医防治 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 124-127.
- [6] 董振华. 中医有关免疫学思想的探讨 [J]. *陕西中医*, 1986, 2(1): 40.
- [7] Kummee P, Tangkjanich P, Poovorawan Y, et al. Association of HLA-DRB1 \* 13 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms with clearance of chronic hepatitis B infection and risk of hepatocellular carcinoma in Thai population [J]. *Viral Hepatitis*, 2007, 14(12): 841-848.
- [8] 蔡林宏, 谢晶日. 不同中医证型慢性乙型肝炎患者血清 IFN- $\gamma$  和 HBV DNA 水平变化 [J]. *实用肝病杂志*, 2013, 16(3): 265-266.
- [9] 毛宇湘, 杨玉新, 王远, 等. 慢乙肝中医证型与血清病毒标志物的相关性研究 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2005, 15: 504-505.
- [10] 俞伟, 聂广, 盛国光, 等. 慢性乙型肝炎患者辨证分型与实验室检测指标的相关性研究及多元线性诊断方程的建立 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 1997, 7(4): 204-207.
- [11] 刘羽. 慢性乙型肝炎中医证候分布特点及相关因素的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.
- [12] 戴敏, 王拥泽, 关卫兵, 等. 慢性乙型肝炎前 C 区基因突变危险因素相关性分析及与中医证型的关系 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(6): 336-338.

(收稿: 2013-10-20 修回: 2014-07-26)