

# 化湿中药对慢性乙型肝炎(湿证)患者 TCRV $\beta$ 7 基因表达的影响

张诗军<sup>1</sup> 陈泽雄<sup>1</sup> 黄必军<sup>2</sup>

**摘要** 目的:探讨化湿中药对慢性乙型肝炎(湿证)患者 T 细胞受体(TCR)V $\beta$ 7 基因表达的影响。方法:随机选取慢性乙型肝炎患者 30 例为治疗组,观察化湿中药治疗后 TCRV $\beta$ 7 基因表达变化,另以健康人 10 例为对照组。结果:经 6 个月治疗,治疗组丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)水平显著下降( $P < 0.01$ ),5 例测出 TCRV $\beta$ 7 基因表达,这 5 例患者均出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转,肝功能恢复正常。结论:化湿中药对慢性乙型肝炎(湿证)患者 TCRV $\beta$ 7 基因表达有调节作用,可能是清除病毒的重要途径。

**主题词** 肝炎,乙型,慢性/中医药疗法 基因表达 祛湿利水药/药理学

湿证患者易患病的机理一方面是潮湿环境中湿邪(包括细菌、病毒等微生物)的致病性增强,另一方面是湿为阴邪,易损伤人体阳气,导致机体免疫功能降低,易受病毒、细菌感染,并且感染之后难于恢复,即缠绵难愈,那么湿证机体免疫功能降低的原因是什么呢?免疫系统的核心问题是识别,也是当今医学研究领域的热点之一。T 细胞在抗病毒感染中起着重要作用,T 细胞中起识别作用的蛋白分子是 T 细胞受体(TCR),它识别抗原的多样性与特异性的功能在 T 细胞发挥免疫作用过程中起着关键作用。那么湿证机体免疫功能降低的机理是否与 TCR 障碍有关呢?化湿中药是临床治疗慢性乙型肝炎(慢乙肝)湿证患者的有效方法,我们于 1999 年 6 月~2001 年 7 月应用化湿中药治疗乙肝湿证患者,观察其临床疗效与 TCRV $\beta$ 7 基因表达特征及病毒复制的关系,现报告如下。

## 1 临床资料

随机选取中山大学附属第一医院肝炎专科门诊辨证为湿证的慢乙肝患者 30 例作为治疗组,其中男 17 例,女 13 例,年龄 20~60 岁,平均 40.6 $\pm$ 8.2 岁,病程 1~12.5 年。诊断标准参照 1990 年上海全国肝病会议制定的标准。病例入选标准:(1)年龄 18~60 岁,入选前血清 HBsAg 和 HBeAg 持续阳性 6 个月以上,入选时血清 HBV-DNA 阳性(斑点杂交法);(2)入选前 3

个月内血清丙氨酸转氨酶(ALT)在正常值上限 $>1$ 倍而 $<5$ 倍。排除标准:血清 HAV、HCV、HDV、HEV、HIV 阳性,失代偿肝病,骨髓抑制,有明显的心、脑、肾、神经、精神病和不稳定糖尿病患者,酗酒和吸毒史者。湿证的诊断标准参照《中医诊断学》<sup>[1]</sup>拟定:(1)脘闷腹胀;(2)困倦乏力;(3)口淡或口渴不饮;(4)舌苔白厚腻;(5)脉濡滑;(6)大便溏。具备(4)加另外两项即可诊断为湿证。对照组 10 例,来源于中山大学附属第一医院体检正常的健康人,男 6 例,女 4 例,非湿证。

## 2 治疗及观察方法

2.1 治疗方法:治疗组用化湿中药治疗。化湿中药组成:柴胡 12g,黄芩 12g,法半夏 15g,藿香 10g,茯苓 20g,龙胆草 6g,虎杖 30g,厚朴 15g,白花蛇舌草 30g。每日 1 剂,口服维生素 E 50mg,复合维生素 B<sub>2</sub> 片,均每日 3 次。疗程为 6 个月。

2.2 观察指标:进行乙肝病毒感染标志物及肝功能测定。HBsAg、HBeAg、HBeAb、HBcAb 等检测采用酶联免疫吸附分析法,HBV-DNA 检测采用斑点杂交法,肝功能检测用美国实验仪器公司的 Manual 自动检测仪检测,所需试剂由该公司提供。于治疗前后各抽血检测 1 次上述指标。

### 2.3 TCRV $\beta$ 7 基因表达的检测

2.3.1 细胞培养:来源于慢乙肝患者的外周血,从 8ml 血中用 Ficoll 密度梯度离心单个核细胞,18 C 400g/min 离心 10 min,收集细胞洗 3 次,用 RPMI-1640 培养,2~2.5ml 管,在 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 4~6 天,收集细胞保存备用。

2.3.2 提取 RNA:总 RNA 提取采用异氯羟胍-氯仿法。RNAgen 购自 Promega 公司(CAT. Z5110)。

2.3.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):按 RT-PCR 试剂盒中方法操作,设  $\beta$  肌动蛋白的基因( $\beta$ -actin)为内参基因。RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司(CAT. A3500)。

TCRV $\beta$ 7 基因引物参考文献[2]:(5'-3')序列: CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC 扩增长度:235。由上海生工生物工程公司合成(sangon 编号:54306、54307)。

2.3.4 图像分析:把胶片扫描而成的图像按 V $\beta$ / $\beta$ -

基金项目:广东省中医药管理局资助课题(98374)

1 中山大学附属第一医院中医科,广州市中山二路 74 号(510080)

2 中山大学肿瘤研究所

收稿日期:2001 06 21;修回日期:2002 06 10

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

| 组别  | 例数  | ALT(U/L)         | AST(U/L)           | TBIL( $\mu\text{mol/L}$ ) |                   |
|-----|-----|------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| 治疗组 | 治疗前 | 30               | 103.56 $\pm$ 10.76 | 69.90 $\pm$ 4.60          | 30.80 $\pm$ 3.85  |
|     | 治疗后 | 30               | 31.45 $\pm$ 7.95*  | 25.60 $\pm$ 4.45*         | 18.50 $\pm$ 3.20* |
| 对照组 | 10  | 26.45 $\pm$ 8.05 | 21.45 $\pm$ 6.60   | 15.50 $\pm$ 4.05          |                   |

与本组治疗前比较, \*  $P < 0.01$

actin 比值进行半定量分析, 得出结果。

2.3.5 统计学方法: 两组样本均数的比较用  $t$  检验。

### 3 治疗结果

慢乙肝湿证患者血 TCRV $\beta$ 7 基因表达水平 HBV-DNA、HBeAg、ALT、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)水平治疗前后变化比较: 附表示, 治疗后 ALT、AST、TBIL 较治疗前均显著降低( $P$  均  $< 0.01$ )。5 例测出 TCRV $\beta$ 7 基因表达, 这 5 例患者均出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转, 肝功能恢复正常。HBeAg 未阴转的患者, 虽肝功能恢复正常, 但无一例测出 TCRV $\beta$ 7 基因表达。

### 4 讨论

临床所见, 湿证贯穿一些疾病发展的始终<sup>[3]</sup>, 湿证患者机体免疫功能紊乱, T 淋巴细胞亚群 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub> 降低, CD<sub>8</sub> 升高<sup>[4]</sup>。慢性乙型肝炎等具有病程长、反复发作的特点, 在发病的过程中出现湿证的表现, 出现缠绵难愈的特点, 患者机体免疫功能紊乱, T 淋巴细胞亚群 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub> 降低, CD<sub>8</sub> 升高<sup>[5]</sup>。一般说来, 补气、补阳是提高免疫功能的有效途径, 但此法对湿证患者却未必能奏效, 湿邪易阻遏气机, 蒙蔽阳气, 我们可以设想, 可能是湿证患者免疫识别 TCR 功能障碍影响了有效免疫功能的发挥, 那么可能通过化湿提高 TCR 识别功能, 从而激活 T 细胞免疫功能, 来达到提高免疫功能的目的。

TCR 是 T 淋巴细胞表面识别外来抗原与自身组织相容性复合体(MHC) I 类抗原复合物的受体, 在识别抗原时基因重排, 其两条链基因重排时形成的特异性不同的 TCR 数目极为庞大, 以识别众多外来的抗原。TCRV $\beta$ 7 基因在乙肝特异性免疫反应发生发展中的作用已经明确, TCRV $\beta$ 7 基因的优先表达和使用与乙肝特异性免疫反应有关<sup>[6]</sup>。

T 细胞在抗病毒感染中起重要作用, 研究表明, T 细胞受体功能障碍导致 T 细胞功能障碍<sup>[7]</sup>, 从而致使乙肝病毒逃避免疫应答, 导致持续稳定的 HBV 感染。在目前对慢乙肝治疗中存在治愈率低、复发率高的情况下, 从临床中筛选出经验方, 通过提高 T 细胞受体识别功能, 以激活细胞毒性 T 细胞, 提高杀伤乙肝病毒或诱导病毒感染细胞凋亡的能力, 是清除病毒的重

要途径。化湿法是临床治疗湿证肝病的有效方法, 具化湿透邪之功, 在以前的研究中发现化湿法具有明显改善患者肝功能、抗病毒、增强慢乙肝患者自然杀伤细胞免疫功能等多方免疫调节作用<sup>[8,9]</sup>。化湿中药由柴胡、黄芩、法半夏、藿香、茯苓、龙胆草、虎杖、白花蛇舌草等组成, 其中黄芩、龙胆草、虎杖、厚朴、白花蛇舌草有清热利湿的作用, 法半夏、藿香、茯苓、厚朴具有燥湿或渗湿的作用, 柴胡为引经药, 有透邪外出作用, 全方合用, 共奏化湿透邪之效。药理研究证实, 上述中药对乙肝病毒有不同程度抑制或杀灭作用, 增强机体免疫功能, 促进肝炎病毒的抑制和排除<sup>[10]</sup>。研究中我们发现, 化湿法治疗后湿证不同程度减轻, TCRV $\beta$ 7 基因表达增强, HBV-DNA、HBeAg 阴转率提高, 症状及肝功能得到不同程度改善, 提示化湿法治疗慢乙肝的疗效, 特别是清除病毒的疗效, 可能与其提高 T 细胞受体识别功能有关, 通过祛湿以提高 TCRV $\beta$ 7 基因表达水平, 从而达到治愈疾病的目的。

### 参考文献

- 1 邓铁涛主编. 中医诊断学. 上海: 上海科技出版社, 1984: 115.
- 2 Dou HY, Wu JC, Peng WL, et al. Analysis of T cell receptor Vbeta gene usage during the course of disease in patients with chronic hepatitis B. J Biomed Sci. 1998; 5(6): 428-434.
- 3 崔树兴, 崔东辉, 冯建军, 等. 除湿法治疗病毒性肝病探讨. 中国中医基础医学杂志, 1999; 5(3): 59-60.
- 4 严旭, 高敏, 吴丽丽, 等. 湿阻证患者免疫调节功能的临床观察及其机理探讨. 中国中医基础医学杂志, 1998; 4(6): 38-39.
- 5 张诗军, 陈泽雄, 黄必军, 等. 和解汤治疗慢性乙型肝炎的疗效分析及对 T 淋巴细胞的影响. 实用中医药杂志, 1998; 14(增刊): 7.
- 6 Chen XH, Gookesley G, Sing G. Distinct patterns of T cell receptor distribution of peripheral blood CD<sub>4</sub><sup>+</sup> cells during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. Hum Immunol. 1998; 59(4): 199-211.
- 7 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 北京: 世界图书出版社, 1995: 291-292.
- 8 张诗军, 马翠玉, 陈泽雄, 等. 清热利湿法对慢乙肝湿热证患者 NK、自由基水平的影响. 中国中西医结合杂志, 1997; 17(5): 304-305.
- 9 张诗军, 陈泽雄. 黄芩苷与自由基的关系及中药对其影响的研究. 实用中医药杂志, 1995; 45(5): 29-30.
- 10 王伯祥主编. 中医肝胆病学. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 63, 77-78, 108-109, 123-124, 139.

### • 本刊征稿启事 •

本刊“临证心得”栏目 2003 年征稿如下:

(1) 各地名老中医临床经验; (2) 对某病或证在治疗上的独特经验; (3) 在临床中有某一方面(如诊断辨证、方药应用、针灸运用等)有别于教科书的心得和体会; (4) 有价值的医话或医案。欢迎踊跃投稿。

来稿请寄至北京东直门内北新仓 18 号中医杂志社收, 邮编: 100700。