

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.01.011

实验研究

补肾健脾方含药血清对乙型肝炎病毒感染后树突状细胞亚群的影响

刘影¹, 张春蕾¹, 单亚维², 陈旭东¹, 王磊[✉]

1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市宛平南路 725 号, 200032; 2. 上海中医药大学护理学院

[摘要] **目的** 探讨补肾健脾方对不同载量乙型肝炎病毒 (HBV) 感染后树突状细胞 (DC) 亚群抑制状态的影响。**方法** 分离健康人外周血单个核细胞 (PBMC), 采用 SD 大鼠制备空白及补肾健脾方含药血清, 采用 HepG 2.2.15 细胞株制备 HBV 病毒液。分为低病毒刺激 (病毒浓度为 1×10^5 IU/孔) 和高病毒刺激 (病毒浓度为 1×10^7 IU/孔) 实验。低病毒刺激实验每组设 6 个复孔, 每孔细胞为 1×10^6 , 分为正常组一、低病毒组 (病毒浓缩液 1 μ l)、空白血清组一 (病毒浓缩液 1 μ l+10% 空白血清 200 μ l)、补肾健脾方含药血清组一 (病毒浓缩液 1 μ l+10% 补肾健脾方含药血清 200 μ l); 高病毒刺激实验每组设 6 个复孔, 每孔细胞为 1×10^6 , 分为正常组二、高病毒组 (病毒浓缩液 100 μ l)、空白血清组二 (病毒浓缩液 100 μ l+10% 空白血清 200 μ l)、补肾健脾方含药血清组二 (病毒浓缩液 100 μ l+10% 补肾健脾方含药血清 200 μ l)。两个实验均在干预 12、24、36、48 h 时采用流式细胞仪检测各组 DC 亚群髓样树突状细胞 (mDC) 和浆细胞样树突状细胞 (pDC) 含量。**结果** 低病毒刺激实验中, 补肾健脾方含药血清组一各时间 mDC、pDC 含量均高于同时间点空白血清组一、低病毒组 ($P < 0.05$); 补肾健脾方含药血清组一 mDC 含量本组各时间点比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), pDC 含量 12 h、24 h 时较本组 36 h、48 h 低 ($P < 0.05$)。高病毒刺激实验中, 补肾健脾方含药血清组二各时间 mDC、pDC 含量均高于同时间点空白血清组二和高病毒组 ($P < 0.05$); 补肾健脾方含药血清组二 pDC 含量 12 h、24 h 时较本组 36 h、48 h 低 ($P < 0.05$), mDC 含量 36 h 时较 12 h、24 h 低, 48 h 时较 12 h 低 ($P < 0.05$)。不同载量 HBV 刺激 12、24、36、48 h 时, 高病毒组及低病毒组 mDC、pDC 含量均随干预时间延长而降低 ($P < 0.05$); 高病毒组各时间 mDC 含量均低于同时间点低病毒组 ($P < 0.05$), pDC 含量仅 12 h 时低于低病毒组 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾健脾方含药血清可改善 HBV 对 DC 亚群的抑制, 提高 mDC、pDC 含量进而增强机体对 HBV 的免疫应答。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 髓样树突状细胞; 浆细胞样树突状细胞; 外周血单个核细胞; 补肾健脾方

乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病, 据统计, 截至 2017 年我国乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染者约有 7000 万例, 其中慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者约 2000 万 ~ 3000 万例^[1]。研究显示, 非特异性免疫应答不足是 HBV 感染的重要因素^[2], CHB 患者常表现为外周血髓样树突状细胞 (myeloid DC, mDC) 和浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid DC, pDC) 数量减少, 且 mDC 成熟障碍, pDC 产生干扰素 α 的能力明

显降低, 从而导致机体直接清除病毒和诱导 HBV 特异性 T 细胞的能力下降^[3]。中医学认为, 正气不足是 CHB 发病的内在原因, 中医学“正气”所包含的抵御病邪的功能与现代医学免疫系统功能极为相似^[4], 而免疫耐受期 CHB 患者均有不同程度的正虚表现^[5]。前期研究^[6-9]表明, 补肾健脾中药可提高 CHB 患者淋巴细胞功能、促进树突状细胞 (dendritic cell, DC) 成熟并降低 HBV-DNA 载量。补肾健脾方由六味地黄丸合四君子汤加黄芪、淫羊藿而成, 方中四君子汤为治疗脾气不足的基础方, 六味地黄丸为治疗肾阴亏虚的基础方, 全方具有健

基金项目: 国家自然科学基金 (81973725)

✉ 通讯作者: ET1978@163.com, (021) 64385700 转 4308

脾益气、滋肾阴温肾阳之效。本实验在前期研究基础上动态观察不同载量 HBV 对 DC 亚群的影响, 以及补肾健脾方是否可改善 HBV 对 DC 各亚群的抑制作用, 以为临床补肾健脾方药治疗乙型肝炎提供实验依据。本研究实验过程符合实验动物福利及伦理相关规范, 所用实验动物已经过上海中医药大学动物伦理委员会批准, 伦理编号: PZHSUTCM211129019; 涉及人生物样本医学研究部分已获得上海中医药大学附属龙华医院伦理委员会批准, 批件号: 2019LCSY103。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物

外周血单个核细胞 (PBMC) 来自上海中医药大学附属龙华医院招募的 6 名健康志愿者外周血。HepG 2.2.15 细胞株购自上海匹拓生物有限公司 (批号: GDC0141)。

6 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 10 只, 200 ~ 250 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 (合格证编号: 20170005054512), 饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 温度: 20 ~ 26 °C, 湿度: 40% ~ 70%, 空气洁净度: 7 级。

1.2 药物

补肾健脾方组成: 熟地黄 24 g, 山药 12 g, 山萸肉 12 g, 牡丹皮 9 g, 泽泻 9 g, 茯苓 9 g, 党参 9 g, 白术 9 g, 炙甘草 6 g, 黄芪 15 g, 淫羊藿 9 g。饮片均来自上海中医药大学附属龙华医院药剂科。水煎 2 次, 取汁过滤浓缩为 100 ml, 其生药浓度为 1.23 g/ml。

1.3 主要试剂与仪器

淋巴细胞分离液 (货号: LTS1077), 天津灏洋华科生物科技有限公司; 1640 培养基 (货号: 11875093)、DMEM 培养基 (货号: 11965092), 美国赛默飞公司; Hyclone 胎牛血清 (货号: SH30084), 美国 Hyclone 公司; FITC 标记的 Lin-1 (货号: 340546)、PE 标记的 CD123 (货号: 554529)、PerCP 标记的 HLA-DR (货号: 560652)、APC 标记的 CD11c 流式抗体 (货号: 340544), 美国 BD Pharmingen 公司。

Millipore Amicon Ultra-15 (100.000 MWCO) 超滤离心管, 德国默克公司; BD FACSVerse™ 流式细胞仪, 美国 BD 公司; Eppendorf 5804 离心机 (本实验涉及的离心半径均为 14 cm), 德国 Eppendorf 公司。

1.4 PBMC 细胞的制备

无菌条件下采集健康志愿者外周血 40 ml, PBS 等倍稀释, 混匀。取 50 ml 的离心管, 加入 2 倍血液的淋巴细胞分离液, 再将混匀的血液缓慢加入, 室温 1800 r/min 离心 20 min。离心后离心管内分为三层, 上层为血清和 PBS 液, 下层主要为红细胞, 中层为淋巴细胞分离液。在上层、中层界面处以单个核细胞为主的灰白色云雾带抽取细胞, 加 2 倍 PBS 重悬, 室温 1500 r/min 离心 10 min 取沉淀, 2 倍 PBS 重悬, 1300 r/min 离心 5 min 取沉淀, 1640 全培养基重悬备用。

1.5 含药血清的制备

10 只 SD 大鼠按顺序编号, Excel 2010 rand 函数生成随机数与之对应, 将随机数字从小到大排序, 前 5 个为空白组、后 5 个为补肾健脾方组。补肾健脾方组大鼠予补肾健脾方 24.6 g/(kg·d) 灌胃, 为人临床等效剂量^[10]的 2 倍; 空白组给予等体积生理盐水 2 ml/(100 g·d) 灌胃。各组大鼠均每日灌胃 2 次, 连续 3 天。第 3 天灌胃结束后禁食 12 h, 次日晨再灌胃 1 次, 补肾健脾方组予补肾健脾方 12.3 g/kg 灌胃, 空白组予 1 ml/100 g 生理盐水灌胃。末次灌胃后 2 h, 无菌条件下腹主动脉取血, 室温静置 2 h 后, 4 °C、2500 r/min 离心 20 min, 超净台分离血清。将分离的血清于 56 °C 水浴 30 min 灭活, 灭活后过 0.22 μm 滤膜, -80 °C 冷冻备用。

1.6 HBV 病毒液的制备

DMEM 全培养基常规培养 HepG 2.2.15 细胞株, 隔日换液, 收集培养上清 50 ml, 置于 Millipore Amicon Ultra-15 超滤离心管, 4 °C、2500 r/min 离心 20 min, 收取离心病毒浓缩液, 检测病毒浓缩液 HBV 载量, 调整病毒浓度为 1×10^8 IU/ml。

1.7 分组及给药

1.7.1 低病毒刺激实验 低病毒浓度为 1×10^5 IU/孔。将外周血分离的 PBMC 分为正常组一 (1640 全培养基 2 ml)、低病毒组 (1640 全培养基 2 ml+病毒浓缩液 1 μl)、空白血清组一 (1640 全培养基 1.8 ml+病毒浓缩液 1 μl+10% 空白血清 200 μl)、补肾健脾方含药血清组一 (1640 全培养基 1.8 ml+病毒浓缩液 1 μl+10% 补肾健脾方含药血清 200 μl), 培养于 6 孔板, 每孔细胞为 1×10^6 , 每组 6 个复孔。

1.7.2 高病毒刺激实验 高病毒浓度为 1×10^7 IU/孔。将外周血分离的 PBMC 分为正常组二 (1640 全培养基 2 ml)、高病毒组 (1640 全培养基 1.9 ml+病毒浓缩液 100 μl)、空白血清组二 (1640 全培养基 1.7 ml+病毒浓缩液 100 μl+10% 空白血清 200 μl)、

补肾健脾方含药血清组二(1640 全培养基 1.7 ml+病毒浓缩液 100 μ l+10% 补肾健脾方含药血清 200 μ l), 培养于 6 孔板, 每孔细胞为 1×10^6 , 每组 6 个复孔。

1.8 DC 亚群的检测

干预 12、24、36、48 h 时检测各组样本中 mDC 和 pDC 含量。各组取 50 μ l 加入 EP 管中调整细胞量为 5×10^5 个, 分别加入 FITC 标记的 Lin-1 抗体 5 μ l, PE 标记的 CD123 2.5 μ l, Percp 标记的 HLA-DR、APC 标记的 CD11c 抗体 2 μ l, 避光孵育 30 min。30 min 后流式仪细胞检测, 圈门逻辑为: 排除碎片和细胞; 圈定 Lin 弱阳性和阴性细胞; mDC 为 Lin-, CD11c+, HLA-DR+; pDC 为 Lin-, CD123+, HLA-DR+。收集细胞后流式细胞仪检测各组 mDC 和 pDC 含量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件。计量资料均呈正态分布, 采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间及组内不同时间点样本比较采用双因素重复测量方差分析, 组间两两比较方差齐者采用 LSD 法, 方差不齐者采用 Games-Howell 法, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 低病毒刺激实验各组细胞不同时间 mDC 含量比较

表 1 示, 与正常组一同时间比较, 低病毒组一

2 h 时 mDC 含量升高、48 h 时 mDC 含量降低 ($P<0.05$), 空白血清组一 36、48 h 时 mDC 含量降低 ($P<0.05$), 补肾健脾方含药血清组一各时间点 mDC 含量均升高 ($P<0.05$); 与低病毒组同时间比较, 空白血清组一 12 h 时 mDC 含量降低 ($P<0.05$), 补肾健脾方含药血清组一各时间点 mDC 含量均升高 ($P<0.05$); 与空白血清组一同时间比较, 补肾健脾方含药血清组一各时间点 mDC 含量均升高 ($P<0.05$)。各组 mDC 的含量 24 h 与 12 h、48 h 与 36 h 比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 补肾健脾方含药血清组一各时间点之间 mDC 含量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 其余各组与本组 12 h、24 h 比较, 36 h、48 h 两时间点 mDC 含量降低 ($P<0.05$)。

2.2 低病毒刺激实验各组细胞不同时间 pDC 含量比较

表 2 示, 与正常组一同时间比较, 低病毒组各时间点 pDC 含量降低 ($P<0.05$), 空白血清组一 12、24、48 h 时 pDC 含量降低 ($P<0.05$), 补肾健脾方含药血清组一各时间点 pDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与低病毒组同时间比较, 空白血清组一各时间点 pDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 补肾健脾方含药血清组一各时间点 pDC 含量均升高 ($P<0.05$); 与空白血清组一同时间比较, 补肾健脾方含药血清组一各时间点 pDC 含量均升高 ($P<0.05$)。各组 pDC 含量 24 h

表 1 低病毒刺激实验各组 PBMC 细胞不同时间 mDC 含量比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
正常组一	6	0.33 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.07 ^{d) e)}	0.28 $\pm$ 0.07 ^{d) e)}
低病毒组	6	0.40 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.38 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.04 ^{d) e)}	0.17 $\pm$ 0.04 ^{a) d) e)}
空白血清组一	6	0.30 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.31 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.04 ^{a) d) e)}	0.16 $\pm$ 0.06 ^{a) d) e)}
补肾健脾方含药血清组一	6	0.50 $\pm$ 0.04 ^{a) b) c)}	0.51 $\pm$ 0.07 ^{a) b) c)}	0.49 $\pm$ 0.07 ^{a) b) c)}	0.46 $\pm$ 0.05 ^{a) b) c)}

注: PBMC, 外周血单个核细胞; mDC, 髓样树突状细胞。

a) 与正常组一比较, $P<0.05$; b) 与低病毒组比较, $P<0.05$; c) 与空白血清组一比较, $P<0.05$; d) 与本组 12 h 比较, $P<0.05$; e) 与本组 24 h 比较, $P<0.05$ 。

表 2 低病毒刺激实验各组 PBMC 细胞不同时间 pDC 含量比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
正常组一	6	0.34 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.08 ^{d) e)}	0.20 $\pm$ 0.05 ^{d) e)}
低病毒组	6	0.24 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.20 $\pm$ 0.05 ^{a)}	0.14 $\pm$ 0.02 ^{a) d)}	0.10 $\pm$ 0.03 ^{a) d) e)}
空白血清组一	6	0.21 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.19 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.15 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.03 ^{a) d) e)}
补肾健脾方含药血清组一	6	0.33 $\pm$ 0.07 ^{b) c)}	0.32 $\pm$ 0.06 ^{b) c)}	0.25 $\pm$ 0.08 ^{b) c) d) e)}	0.21 $\pm$ 0.06 ^{b) c) d) e)}

注: PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞。

a) 与正常组一比较, $P<0.05$; b) 与低病毒组比较, $P<0.05$; c) 与空白血清组一比较, $P<0.05$; d) 与本组 12 h 比较, $P<0.05$; e) 与本组 24 h 比较, $P<0.05$ 。

与 12 h、48 h 与 36 h 比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；与本组 12 h、24 h 比较，正常组一、补肾健脾方含药血清组一 36 h、48 h 时 pDC 含量降低 ($P<0.05$)；与本组 12 h、24 h 比较，低病毒组、空白血清组一 48 h 时 pDC 含量降低 ($P<0.05$)；与本组 12 h 比较，低病毒组 36 h 时 pDC 含量降低 ($P<0.05$)。

2.3 高病毒刺激实验各组细胞不同时间 mDC 含量比较

表 3 示，与正常组二同时间比较，高病毒组、空白血清组二各时间点 mDC 含量均降低 ($P<0.05$)，补肾健脾方含药血清组二各时间点 mDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与高病毒组同时间比较，空白血清组二各时间点 mDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，补肾健脾方含药血清组二各时间点 mDC 含量均升高 ($P<0.05$)；与空白血清组二同时间比较，补肾健脾方含药血清组二各时间点 mDC 含量均升高 ($P<0.05$)。各组 mDC 含量 24 h 与 12 h、48 h 与 36 h 比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；与本组 24 h 比较，正常组二 36、48 h 时 mDC 含量降低 ($P<0.05$)；与本组 12、24 h 比较，高病毒组 36、48 h 时 mDC 含量降低 ($P<0.05$)；空白血清组二 48 h 时 mDC 含量较本组 12、24 h 降低，36 h 时较 24 h 降低 ($P<0.05$)；补肾健脾方含药血清组二 36 h 时 mDC 含量较本组 12、24 h 降低，48 h 时较 12 h

降低 ($P<0.05$)。

2.4 高病毒刺激实验各组细胞不同时间 pDC 含量比较

表 4 示，与正常组二同时间比较，高病毒组、空白血清组二各时间点 pDC 含量均降低 ($P<0.05$)，补肾健脾方含药血清组二各时间点 pDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与高病毒组同时间比较，空白血清组二各时间点 pDC 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，补肾健脾方含药血清组二各时间点 pDC 含量均升高 ($P<0.05$)；与空白血清组二同时间比较，补肾健脾方含药血清组二各时间点 pDC 含量均升高 ($P<0.05$)。各组 pDC 含量 24 h 与 12 h、48 h 与 36 h 比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；与本组 12、24 h 比较，正常组二、补肾健脾方含药血清组二 36、48 h 时 pDC 含量均降低 ($P<0.05$)；与本组 12 h 比较，高病毒组、空白血清组二 48 h 时 pDC 含量均降低 ($P<0.05$)。

2.5 不同载量 HBV 刺激 PBMC 细胞后 DC 亚群含量比较

表 5、表 6 示，高病毒组及低病毒组 mDC、pDC 含量均随刺激时间的延长呈降低趋势；高病毒组各时间 mDC 含量均低于同时间点低病毒组 ($P<0.05$)，pDC 含量仅 12 h 时低于低病毒组 ($P<0.05$)。高病毒组 36、48 h 时 mDC 含量低于本组 12 h、24 h，48 h 时 pDC 含量低于本组 12 h、24 h

表 3 高病毒刺激实验各组 PBMC 细胞不同时间 mDC 含量比较 (%， $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
正常组二	6	0.33±0.07	0.36±0.05	0.28±0.07 ^{e)}	0.28±0.07 ^{e)}
高病毒组	6	0.25±0.04 ^{a)}	0.22±0.04 ^{a)}	0.15±0.04 ^{a) d) e)}	0.12±0.03 ^{a) d) e)}
空白血清组二	6	0.22±0.03 ^{a)}	0.23±0.05 ^{a)}	0.16±0.05 ^{a) e)}	0.13±0.04 ^{a) d) e)}
补肾健脾方含药血清组二	6	0.35±0.07 ^{b) c)}	0.32±0.06 ^{b) c)}	0.25±0.06 ^{b) c) d) e)}	0.27±0.05 ^{b) c) d)}

注：PBMC，外周血单个核细胞；mDC，髓样树突状细胞。

a) 与正常组二比较， $P<0.05$ ；b) 与高病毒组比较， $P<0.05$ ；c) 与空白血清组二比较， $P<0.05$ ；d) 与本组 12 h 比较， $P<0.05$ ；e) 与本组 24 h 比较， $P<0.05$ 。

表 4 高病毒刺激实验各组 PBMC 细胞不同时间 pDC 含量比较 (%， $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
正常组二	6	0.34±0.08	0.35±0.09	0.23±0.08 ^{d) e)}	0.20±0.05 ^{d) e)}
高病毒组	6	0.16±0.05 ^{a)}	0.14±0.05 ^{a)}	0.12±0.03 ^{a)}	0.09±0.03 ^{a) d)}
空白血清组二	6	0.17±0.04 ^{a)}	0.13±0.04 ^{a)}	0.13±0.05 ^{a)}	0.10±0.03 ^{a) d)}
补肾健脾方含药血清组二	6	0.30±0.05 ^{b) c)}	0.30±0.06 ^{b) c)}	0.20±0.06 ^{b) c) d) e)}	0.18±0.04 ^{b) c) d) e)}

注：PBMC，外周血单个核细胞；pDC，浆细胞样树突状细胞。

a) 与正常组二比较， $P<0.05$ ；b) 与高病毒组比较， $P<0.05$ ；c) 与空白血清组二比较， $P<0.05$ ；d) 与本组 12 h 比较， $P<0.05$ ；e) 与本组 24 h 比较， $P<0.05$ 。

表 5 不同载量病毒刺激 PBMC 细胞不同时间 mDC 含量比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
低病毒组	6	0.40±0.04	0.38±0.11	0.22±0.04 ^{b) c)}	0.17±0.04 ^{b) c)}
高病毒组	6	0.25±0.04 ^{a)}	0.22±0.04 ^{a)}	0.15±0.04 ^{a) b) c)}	0.12±0.03 ^{a) b) c)}

注: PBMC, 外周血单个核细胞; mDC, 髓样树突状细胞。
a) 与低病毒组比较, $P<0.05$; b) 与本组 12 h 比较, $P<0.05$; c) 与本组 24 h 比较 $P<0.05$ 。

表 6 不同载量病毒刺激 PBMC 细胞不同时间 pDC 含量比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	36 h	48 h
低病毒组	6	0.24±0.05	0.20±0.05	0.14±0.02 ^{b) c)}	0.10±0.03 ^{b) c) d)}
高病毒组	6	0.16±0.05 ^{a)}	0.14±0.05	0.12±0.03	0.09±0.03 ^{b) c)}

注: PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞。
a) 与低病毒组比较, $P<0.05$; b) 与本组 12 h 比较, $P<0.05$; c) 与本组 24 h 比较, $P<0.05$; d) 与本组 36 h 比较, $P<0.05$ 。

($P<0.05$); 低病毒组 36、48 h 时 mDC、pDC 含量均低于本组 12 h、24 h, 且 48 h 时 pDC 含量低于本组 36 h ($P<0.05$)。

3 讨论

CHB 是我国的常见病、多发病, 中医学将其归为“黄疸”“胁痛”等病症范畴论治。中医学认为, CHB 的病因为湿热疫毒之邪侵袭, 当人体正气不足无力抗邪时发病, 病位在肝, 涉及脾、肾; 其病机特点为湿热疫毒为标、正气不足为本, 属本虚标实、虚实夹杂之证^[11]。由于 CHB 迁延难愈, 日久伤正, 故治疗时应扶正与祛邪兼顾, 调整阴阳、气血、脏腑功能平衡。补肾健脾方中四君子汤加黄芪, 健脾益气补益后天之本; 六味地黄丸加淫羊藿, 滋肾阴温肾阳, 养先天之精, 全方扶正固本, 正切合 CHB 病机之本。

HBV 感染的发病机制较为复杂, 迄今尚未完全阐明, 其中共价闭合环状 DNA (cccDNA) 的存在可能是其机制之一。cccDNA 是 HBV 前基因组 RNA 复制的原始模板, 是 HBV 侵入细胞后在细胞内进行复制的起始步骤, 由于 cccDNA 半衰期较长, 难以从体内彻底清除, 成为 CHB 迁延难愈的关键^[12]。此外, 细胞免疫缺陷也是造成乙型肝炎慢性化的重要原因。DC 是人体内功能最强的抗原提呈细胞, 在 HBV 感染者体内的天然免疫和适应性免疫中均发挥着重要的作用^[1]。人体外周血 DC 主要有两个亚群, 即 mDC 和 pDC。pDC 又称 I 型干扰素 (IFN-I) 产生细胞, 在病毒感染时, pDC 产生 IFN-I 的能力是其他白细胞的 100 ~ 1000 倍, 可分泌大量 α 干扰素 (IFN- α) 等细胞因子发挥直接杀伤作用^[13-15], 并通过 IFN-I 活化自然杀伤细胞、巨噬细胞等激活天然免疫^[16]。mDC 相对 pDC 有更

强的抗原呈递能力, 能直接激活初始 T 细胞和 B 细胞, 通过体液和细胞免疫使细胞溶解^[17]。HBV 及其抗原可造成 DC 数量异常, HBV 感染可阻止 DC 成熟^[18], 抑制 DC 表面 CD4、CD80、CD86 的表达及成熟 DC 生成白细胞介素 12 (IL-12) 和 DC 对 HBV 特异性 T 细胞的活化^[19-20], 且高载量 HBV 可以直接导致 HBV 特异性细胞毒 T 淋巴细胞呈免疫耐受状态^[21]。研究发现, CHB 患者外周血 DC 各亚群存在明显的成熟障碍和功能缺陷, 而 HBV 感染是诱发 DC 各亚群异常的关键^[22-23]。

本研究结果显示, 在低病毒刺激实验中, 空白血清组一除 12 h 时 mDC 含量低于低病毒组外, 其余各时间点两组比较差异均无统计学意义, 两组各时间点 pDC 含量比较差异亦无统计学意义, 说明空白血清对 HBV 的刺激无明显作用。与低病毒组及空白血清组一同时间比较, 补肾健脾方含药血清组一各时间点 mDC、pDC 含量均升高, 说明补肾健脾方含药血清可有效改善低载量 HBV 感染对 DC 亚群的抑制作用。在高病毒刺激实验中, 与高病毒组及空白血清组二同时间比较, 补肾健脾方含药血清组二各时间点 mDC、pDC 含量均升高, 而高病毒组与空白血清组二各时间点 mDC、pDC 含量比较差异均无统计学意义, 提示补肾健脾方含药血清亦可有效改善高载量 HBV 感染对 DC 亚群的抑制作用。同时组内各时间点 mDC、pDC 含量比较发现, 除补肾健脾方含药血清组一 mDC 含量各时间点无差异外, 其余各组 36 h、48 h 较 12 h、24 h 均有不同程度降低, 提示高、低 HBV 载量对 DC 亚群的抑制作用均随时间延长而增强, 而补肾健脾方含药血清可有效改善不同载量 HBV 感染对 DC 亚群的抑制作用, 提高 PBMC 细胞中 mDC、pDC 含量, 进而增强机体的抗原提呈和干扰素分泌能力, 其中以改善低 HBV

载量对 mDC 的抑制作用更为明显。

本研究初步验证了补肾健脾方对 HBV 感染的免疫调节作用,不足之处在于仅探讨了补肾健脾方对 DC 亚群数量上的影响,而缺乏对 mDC、pDC 功能以及激活机制的研究,拟于下一步实验中继续进行探索。

参考文献

- [1] LIU J, LIANG W, JING W, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China [J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.
- [2] SHI Y, ZHENG M. Hepatitis B virus persistence and reactivation [J]. BMJ, 2020, 370: m2200. doi: 10.1136/bmj.m2200.
- [3] ZHANG Z, ZHANG JY, WANG LF, et al. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(2): 223-230.
- [4] 陈腾飞, 刘清泉. 浅述中医“正气”理论 [J]. 环球中医药, 2016, 9(11): 1332-1335.
- [5] 王玉红, 刘先勇. 扶正祛邪思想在慢性乙型病毒性肝炎治疗中的应用 [J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(10): 155-157.
- [6] DANDRI M, LOCARNINI S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection [J]. Gut, 2012, 61(Suppl 1): 16-17.
- [7] 彭建平, 陈晨, 何芳, 等. 补肾法与健脾法对乙肝病毒感染免疫耐受期患者外周血树突状细胞功能的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(4): 221-224.
- [8] 王磊, 杨丽丽, 冯晓霞, 等. 健脾为主辨证治疗对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞表型功能的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(1): 25-29, 68.
- [9] 高月求, 郑亚江, 王灵台. 健脾方对脾虚型慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(4): 300-302.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 38.
- [11] 中华中医药学会肝胆病专业委员会, 中国民族医药学会肝病专业委员会. 慢性乙型肝炎中医诊疗指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 32(12): 2520-2525.
- [12] XIA Y, GUO H. Hepatitis B virus cccDNA: Formation, regulation and therapeutic potential [J]. Antiviral Res, 2020, 180: 104824. doi: 10.1016/j.antiviral. 2020.104824.
- [13] CAO W. Molecular Characterization of human plasmacytoid dendritic cells [J]. J Clin Immunol, 2009, 29(3): 257-264.
- [14] TANG F, DU QM, LIU YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity [J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(2): 172-182.
- [15] JU XS, CLARK G, HART DN, et al. Review of human DC subtypes [J]. Methods Mol Biol, 2010, 595: 3-20. doi: 10.1007/978-1-60761-421-01.
- [16] REIZIS B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function [J]. Immunity, 2019, 50(1): 37-50.
- [17] DEN BROUW MLOP, BINDA RS, VAN ROOSMALEN MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus [J]. Immunology, 2009, 126(2): 280-289.
- [18] ARIMA S, AKBAR SM, MICHITAKA K, et al. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization [J]. Int J Mol Med, 2003, 11(2): 169-174.
- [19] VAN DER MOLEN RG, SPRENGERS D, BINDA RS, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2004, 40(3): 738-746.
- [20] WOLTMAN AM, DEN BROUW MLOP, BIESTA PJ, et al. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15324. doi: 10.1371/journal.pone.0015324.
- [21] ZHENG BJ, ZHOU J, QU D, et al. Selective functional deficit in dendritic cell-T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(3): 217-224.
- [22] LUO J, LI J, CHEN RL, et al. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: A pilot, open label, clinical trial in human volunteers [J]. Vaccine, 2010, 28(13): 2497-2504.
- [23] BOONSTRA A, WOLTMAN AM, JANSSEN HL. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008, 22(6): 1049-1061.

Effect of *Bushen Jianpi Formula* (补肾健脾方) Drug Containing Serum on Dendritic Cell Subsets after Hepatitis B Virus Infection

LIU Ying¹, ZHANG Chunlei¹, SHAN Yawei², CHEN Xudong¹, WANG Lei¹

1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032; 2. School of Nursing, Shanghai University of Traditional Chinese medicine

ABSTRACT Objective To investigate the regulatory effect of *Bushen Jianpi Formula* (补肾健脾方, BJF) on the inhibition of dendritic cells (DC) subsets after infection with different hepatitis B virus (HBV) loads. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy individuals. SD rats were used to prepare blank and BJP-containing serum, and HepG 2. 2. 15 cell line was used to prepare HBV virus liquid. The experiments were divided into low virus stimulation experiment (concentration of 1×10^5 IU/well) and high virus stimulation experiment (concentration of 1×10^7 IU/well). In the low virus stimulation experiments, 6 replicate wells each with 1×10^6 cells were set in the normal group I, low virus group (1 μ l of concentrated virus fluid), blank serum group I (1 μ l of concentrated virus fluid plus 200 μ l of 10% blank serum), and BJF-containing serum group I (1 μ l of concentrated virus fluid plus 200 μ l of 10% BJF-containing serum). In the high virus stimulation experiments, 6 replicate wells each with 1×10^6 cells were set in the normal group II, high virus group (100 μ l of concentrated virus fluid), blank serum group II (100 μ l of concentrated virus fluid plus 200 μ l of 10% blank serum), and BJF-containing serum group II (100 μ l of concentrated virus fluid plus 200 μ l of 10% BJF-containing serum). The content of myeloid dendritic cells (mDC) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) of DC subsets in each group in the two experiments were detected by flow cytometry at 12 h, 24 h, 36 h and 48 h. **Results** In the low virus stimulation experiment, the contents of mDC and pDC in the BJF-containing group I were significantly higher than those in the blank serum group I and low virus stimulation group measured at the same timepoint ($P < 0.05$), and were not significantly different in mDC content when compared between different timepoints in the BJF-containing group I ($P > 0.05$); lower pDC measurements were found at 12 h and 24 h than at 36 h and 48 h in the other two groups ($P < 0.05$). In the high virus stimulation experiment, the proportions of mDC and pDC in BJF-containing serum group II were higher than those in blank serum group II and high virus stimulation group measured at the same timepoint ($P < 0.05$), and lower contents of pDC were found when measured at 12 h and 24 h than at 36 h and 48 h, and lower mDC contents at 36 h than at 12 h and 24 h, as well as at 48 h than at 12 h in the BJF-containing serum group II ($P < 0.05$). The proportions of mDC and pDC in both high and low virus stimulation groups decreased with the increasing intervention time of HBV stimulation at different loadings at 12 h, 24 h, 36 h and 48 h ($P < 0.05$). The proportion of mDC in the high virus stimulation group was lower than that in the low virus stimulation group at all timepoints ($P < 0.05$), and pDC was lower than that in the low virus stimulation group only at 12 h ($P < 0.05$). **Conclusion** BJF-containing serum can improve the inhibition of DC subsets by HBV and can increase the ratio of mDC and pDC, thus enhancing the body's immune response to HBV.

Keywords hepatitis B virus; myeloid dendritic cells; plasmacytoid dendritic cells; peripheral blood mononuclear cell; *Bushen Jianpi Formula* (补肾健脾方)

(收稿日期: 2022-04-04; 修回日期: 2022-10-01)

[编辑: 王利芬]