

慢性乙型肝炎病毒量与 T 细胞亚群的关系及补肾方的免疫调节作用※

□ 孙学华* 高月求 章晓鹰 王灵台

(上海中医药大学附属曙光医院 上海 201203)

摘 要 目的: 观察慢性乙型肝炎患者病毒量与 T 细胞亚群之间的关系及补肾方的免疫调节作用。方法: 采用罗氏荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA, 收集 HBV-DNA 阳性者 60 例, HBV-DNA 阴性者 20 例。流式细胞术检测外周血中 CD8 + CD28 + T、CD8 + CD28 - T 和 CD28 + T 细胞的比例。其中 HBV-DNA 阳性肝功异常者 30 例给与补肾方治疗 6 个月, 治疗 3 个月和 6 个月后分观察 HBV-DNA 和 T 细胞亚群的变化。结果: CD8 + CD28 + T 细胞在 10^7 及 10^8 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著降低。CD8 + CD28 - T 细胞在 10^8 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著增高。CD28 + T 细胞在 10^7 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著降低。有效组治疗 3 个月后, CD8 + CD28 +、CD28 + T 细胞较前明显升高, CD8 + CD28 - T 细胞较前明显降低。治疗 6 个月后, CD8 + CD28 - T 细胞较前明显降低。结论: 病毒量与 T 细胞亚群之间存在相关性, 补肾方的抗病毒作用可能与其免疫调节作用有关。

关键词 慢性乙型肝炎 病毒量 T 细胞亚群 补肾方 免疫调节

HBV 感染宿主后, 机体的免疫应答反应决定了疾病的最终转归, 正常的免疫应答可以清除乙肝病毒, 表现为急性一过性的感染, 如果免疫功能低下或紊乱, 则无法清除乙肝病毒, 成为慢性感染者。T 细胞介导的细胞免疫在病毒的清除中起重要作用。补肾方药对于免疫功能的调节具有独到之处, 几十

年的临床疗效观察证明中药补肾方对治疗慢性乙型肝炎确有疗效, 不但对肝损伤有良好的保护作用, 而且可抑制乙肝病毒复制^[1]。我们观察了慢性乙型肝炎患者病毒量与 T 细胞亚群之间的关系, 及中药补肾方对慢性乙型肝炎患者病毒复制及 T 细胞亚群的影响, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例收集 病例均为曙光医院肝病科的门诊或住院患者, 共 80 例, 所有病例均符合 2000 年 (西安) 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学

※基金项目 上海市教委资助课题 (No: 02CQ22)

* 作者简介 孙学华, 女, 医学博士。研究方向: 中西医结合肝病的临床及基础研究。参与编写著作 2 部, 发表论文十余篇, 承担部局级课题 4 项。

会联合修订的《病毒性肝炎的诊断标准》^[2]中慢性乙肝的诊断标准,且在3个月内未经免疫调节剂及抗病毒治疗的慢性乙肝病毒感染者,并排除肝硬化、肝癌及合并其他病毒性肝炎和免疫性疾病患者。其中HBV-DNA阳性者60例,男42例,女18例,平均年龄 34.36 ± 8.41 岁,平均病程 3.95 ± 1.67 年。HBV-DNA阴性者20例,男13例,女7例,平均年龄 34.15 ± 8.13 岁,平均病程 3.85 ± 1.57 年。其中30例HBV-DNA阳性ALT异常的慢性乙型肝炎,中医辨证属肝肾不足兼湿热型的患者给予补肾方治疗。中医辨证标准参照《中药新药临床指导原则》^[3]。

1.2 治疗用药 中药补肾方,药物组成为:巴戟天15g、甜苁蓉15g、枸杞15g、生地15g、青皮15g、田三七15g、苦参15g,水煎服,每日一剂,分两次服,疗程6个月。

1.3 观察指标

1.3.1 血清HBV-DNA的检测 HBV-DNA(罗氏荧光定量PCR法),统一由曙光医院检验科检测。

1.3.2 外周血T细胞亚群的检测 采集静脉血1ml,EDTA抗凝。取50ul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CD8-FITC和CD28-PE各10ul,阴性对照管中加入鼠IgG-FITC和IgG-PE各10ul,混匀置室温20℃避光孵育25min,加入溶血素0.5ml,放置15min,鞘液洗涤、离心后检测。标本置流式细胞仪内,设门,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+、CD8+CD28-、CD28+的T细胞亚群,每次每样本淋巴细胞计数均>5000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。

1.4 统计学分析 将所有数据输入电子计算机系统,采用SPSS11.0软件进行统计处理。多组间均数比较采用方差分析,两组间采用q检验。

2 结果

2.1 病毒量与T细胞亚群的相关性 结果见表1。

表1 病毒量与外周血CD8+CD28+、CD8+CD28-和CD28+T细胞的关系($\bar{x} \pm s$)

组别		CD8+CD28+	CD8+CD28-	CD28+
$\leq 10^3$	20	13.38 ± 2.55	20.30 ± 5.51	49.35 ± 8.66
10^4-6	17	12.67 ± 3.80	21.25 ± 6.31	44.51 ± 6.54
10^7	26	$11.82 \pm 2.56^*$	23.99 ± 6.76	$44.11 \pm 7.38^*$
10^8	17	$10.32 \pm 3.19^{**}$	$25.86 \pm 8.61^*$	43.57 ± 10.12

注:与 $\leq 10^3$ 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

由上表可知,CD8+CD28+T细胞在 10^7 及 10^8 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著降低。CD8+CD28-T细胞在 10^8 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著增高。CD28+T细胞在 10^7 组中的含量较 $\leq 10^3$ 组显著降低。

2.2 补肾方治疗3个月和6个月后HBV-DNA的变化 结果见表2。

表2 治疗3个月及6个月后病毒指标的变化(n)

		HBV-DNA					
		10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	$\leq 10^3$
治疗前	30	3	14	6	5	2	0
治疗3个月	30	2	10	5	5	2	6
治疗6个月	30	0	10	3	7	0	10

2.3 补肾方对T细胞亚群的影响 结果见表3。

有效组:指治疗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

表3 有效组及无效组T细胞亚群的变化($\bar{x} \pm s$)

			CD8+CD28+	CD8+CD28-	CD28+
有效组	治疗前	15	11.92 ± 3.15	22.21 ± 8.10	44.09 ± 4.84
	3个月	15	$13.57 \pm 3.0^*$	$19.10 \pm 6.7^*$	$46.48 \pm 4.92^{**}$
	6个月	15	12.57 ± 2.06	$19.58 \pm 7.3^*$	45.42 ± 3.79
无效组	治疗前	15	11.74 ± 2.81	22.28 ± 5.9	46.58 ± 10.39
	3个月	15	12.19 ± 2.16	21.77 ± 5.65	46.31 ± 8.24
	6个月	15	11.99 ± 2.22	22.20 ± 5.57	46.88 ± 6.12

注:与本组治疗前相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

由上表可知,有效组治疗 3 个月后,CD8 + CD28 +、CD28 + T 细胞较前明显升高,CD8 + CD28 - T 细胞较前明显降低。治疗 6 个月后,CD8 + CD28 - T 细胞较前明显降低。

无效组治疗 3 个月及 6 个月后,CD8 + CD28 +、CD28 +、CD8 + CD28 - T 细胞较治疗前无明显变化。

3 讨 论

杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的细胞免疫在肝炎病毒清除中起着至关重要的作用。对 HBV 感染的正常免疫应答,引起急性乙型肝炎 (AHB)。AHB 时细胞免疫与抗体协作以清除病毒,发挥抗病毒的防护效应。CTL 识别几个 HBV 表位,表现是多克隆、多特异性的,具有很强的应答性,接种乙肝疫苗的健康者体内亦能诱导出良好的 CTL 反应,而 HBV 慢性感染者体内 CTL 应答往往是低下或缺如的。CD8 + T 细胞可以分为抑制性 T 淋巴细胞 (Ts) 和杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL)。CD28 分子是免疫球蛋白超家族成员,正常表达于 95% 的 CD4 + 和 50% 的 CD8 + T 细胞表面,CD28 分子的表达对细胞的激活至关重要。T 细胞的活化除 T 细胞受体识别抗原 - MHC 复合物的第一信号外,尚需协同刺激信号即第二信号的作用。在协同刺激因子中,T 细胞表面的 CD28 分子与 B 细胞或其他抗原提呈细胞上的配体 B7 - 1 (CD80)、B7 - 2 (CD86) 的相互作用,对抗原特异性免疫反应的产生发挥了重要作用,缺乏 CD28 - B7 的相互作用,则会导致 T 细胞无能^[4]。CD8 + CD28 + T 细胞被认为是 T 亚群中的 CD8 + CTL^[5-7]。本课题研究结果表明,CD8 + CD28 + T 细胞数量在 HBV-DNA 为 10^{7-8} copy/ml 组较 HBV-DNA $\leq 10^3$ copy/ml 组及 HBV-DNA 为 10^{4-6} copy/ml 组明显降低,说明病毒高度复制与 CD8 + CD28 + T 细胞数量低下有关。

慢乙肝的形成就其病因来看,外因为湿热疫毒之邪侵袭,内因则多由先天禀赋不足。胎、婴、幼儿期肾气不足,正气之元不足,难以驱邪外出,多发展成为慢乙肝。故补肾方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。其中多味药物现代药理学研究证实有调节免疫作用,如巴戟天能促

进 ConA 诱导的免疫模型动物脾淋巴细胞的转化增殖,并能明显的提高小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 及 IFN-r 的水平^[8];肉苁蓉多糖可促进小鼠胸腺淋巴细胞内钙释放,使胞内钙离子浓度升高而促进了 IL - 2 基因的表达,导致 T 细胞增殖^[9];枸杞能增强小鼠 T 淋巴细胞转化率^[10]。

补肾方治疗有效组在治疗 3 个月后,CD8 + CD28 + T、CD28 + T 细胞较治疗前明显上升,说明补肾方治疗有效组在治疗 3 个月时能明显增强 CD8 + CTL 的表达,增强 T 细胞表面 CD28 分子的表达,改善 T 细胞免疫无能状态。补肾方在治疗 3 个月时,CD8 + CTL 的表达较高,在 6 个月时稍有降低,但仍然维持了较高的水平。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 CD8 + CTL 在体内的表达,从而使 HBV-DNA 得到了抑制。

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.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8 (6): 324 - 329.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002. 144.
- [4] 钱 峰. CD28 协同刺激信号传导的研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24 (5): 273 - 276.
- [5] Koide J, Engleman EG. Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen - specific CD8 + cytotoxic and suppressor T cell clones [J]. immunol, 1990, 144: 32 - 40.
- [6] Crucian B, Dunne P, Friedman H, et al. Alterations in levels of CD28 - /CD8 + suppressor cell precursor and CD45RO + /CD4 + memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1995, 2: 249 - 252.
- [7] Maruyama T, Schodel F, Lino S, et al. Distinguishing between acute and asymptomatic chronic hepatitis B infection [J]. Gastroenterology, 1994, 106: 1006 - 1015.
- [8] 吕世静,黄槐莲. 巴戟天对淋巴细胞增殖及产生细胞因子的调节作用 [J]. 中医药研究, 1997, 13 (5): 46 - 48.
- [9] 曾群力,郑一凡,吕志良. 肉苁蓉多糖的免疫活性作用及机制 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2002, 31 (4): 284 - 287.
- [10] 苗智慧,刘京生,余素清,等. 枸杞酒对小鼠免疫功能的影响 [J]. 河北中医, 2001, 23 (9): 716 - 717.