

乙肝相关性慢加急性肝衰竭“阳黄-阴阳黄-阴黄” 不同证候分型患者 Treg/Th17 的表达

谭年花¹, 陈斌^{2*}, 彭杰², 朱文芳², 张涛², 周意², 王若宇²

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的：检测乙肝相关性慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)“阳黄-阴阳黄-阴黄”不同证候分型患者外周血调节性 T 细胞(Treg)/辅助性 T 细胞 17(Th17)及其相关细胞因子表达水平,探讨肝衰竭不同中医证候分型的细胞免疫学特征。**方法：**选择早期、中期、晚期各 32 例 HBV-ACLF 并符合“阳黄-阴阳黄-阴黄”中医证候分型的患者,采用流式细胞术检测外周血 Treg/Th17 细胞频数表达,流式细胞微球芯片捕获技术(CBA)检测白细胞介素-10(IL-10),转化生长因子- β (TGF- β),白细胞介素-17A(IL-17A),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-23(IL-23)表达水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测叉状头(或)翅膀状螺旋转录因子(FoxP3),维甲酸相关核受体 γ t(ROR- γ t)mRNA 表达;采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计处理,分析不同中医证候分型 HBV-ACLF 患者的 Treg/Th17 细胞及相关细胞因子的表达特点。**结果：**HBV-ACLF 阳黄证患者主要分布在肝衰竭病程的早期,阴阳黄证主要分布于中期,阴黄证主要分布于晚期;从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证 Treg, Th17 细胞频数逐渐升高,且各组间比较差异性均具有统计学意义($P < 0.05$);从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证, Treg 型细胞因子 IL-10, TGF- β 逐渐升高,各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), Th17 型细胞因子 IL-17A, TNF- α , IL-23 逐渐升高,其中 IL-17A 阳黄组与阴黄组、阴阳黄组与阴黄组比较均有差异性($P < 0.05$);从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证, FoxP3 表达逐渐下降, ROR- γ t 表达逐渐升高,二者组间比较其差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论：**HBV-ACLF 患者早、中、晚期不同病程与中医证型的分布存在一定相关性, Treg, Th17 细胞频数及 IL-17A, TGF- β , IL-10 与中医辨证分型存在相关性,提示 Treg, Th17 细胞对 HBV-ACLF 患者所处病期及中医证候分型辨证有一定参考价值。

【关键词】 乙肝相关性慢加急性肝衰竭 (HBV-ACLF); Treg 细胞; Th17 细胞; 中医证型

【中图分类号】 R22; R242; R2-031; R287 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2020)02-0033-06

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20200223

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191008.1803.008.html>

【网络出版时间】 2019-10-09 08:50

Expression of Treg/Th17 Cells in Patients with HBV-ACLF in Different Traditional Chinese Medicine Syndrome "Yanghuang-Yinyanghuang-Yinhuang"

TAN Nian-hua¹, CHEN Bin^{2*}, PENG Jie², ZHU Wen-fang², ZHANG Tao², ZHOU Yi², WANG Ruo-yu²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Objective: To detect the expression levels of peripheral blood Treg/Th17 cells and related cytokines in patients with Hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF) with different traditional Chinese medicine (TCM) syndrome "Yanghuang-Yinyanghuang-Yinhuang", in order to explore the cellular immunological characteristics of different TCM syndromes of liver failure. **Method:** The 32 cases of patients with HBV-ACLF in early, middle and late stages in line with the "Yanghuang-Yinyanghuang-Yinhuang" TCM syndrome grouping were selected. Flow cytometry was used to detect the frequency expression of Treg/Th17

【收稿日期】 20190620(022)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81673959);湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目

【第一作者】 谭年花,在读博士,医师,从事中医药防治肝病研究, E-mail: 1726018427@qq.com

【通信作者】 * 陈斌,博士,主任医师,从事中医药防治肝病研究, E-mail: chenbin0410@126.com

cells in peripheral blood. The expression levels of interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-17A (IL-17A), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-23 (IL-23) were detected by cytometric bead array (CBA). The expressions of transcription factor forkhead box P3 (FoxP3) and retinoid-related orphan nuclear receptor- γ t (ROR- γ t) mRNA were detected by Real-time PCR. The SPSS 20.0 software was applied in data statistics and processing to analyze the expression characteristics of Treg/Th17 cells and related cytokines in patients with different TCM syndrome types of HBV-ACLF. **Result:** The patients with HBV-ACLF Yanghuang syndrome were mainly distributed in the early stage of liver failure, those with Yinyanghuang syndrome were mainly distributed in the middle stage, and those with Yinhuang syndrome were distributed in the late stage. From Yanghuang syndrome, Yinyanghuang syndrome to Yinhuang syndrome, the frequency of Treg and Th17 cells gradually increased, and the differences among the groups were statistically significant ($P < 0.05$). From Yanghuang syndrome, Yinyanghuang syndrome to Yinhuang syndrome, Treg cytokines IL-10, TGF- β gradually increased, and the differences among the groups were statistically significant ($P < 0.05$). Th17 cytokines IL-17A, TNF- α , IL-23 gradually increased, of which IL-17A were differences between Yanghuang syndrome and the Yinyanghuang syndrome, as well as Yanghuang syndrome and Yinhuang syndrome ($P < 0.05$). From Yanghuang syndrome, Yinyanghuang syndrome to Yinhuang syndrome, the expression of FoxP3 was gradually decreased, while that of ROR- γ t was gradually increased, and the differences among the groups were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** There is a certain correlation between the different course of early, middle and late stages of HBV-ACLF and the distribution of TCM syndromes. The frequency of Treg and Th17 cells and the correlation of IL-17A, TGF- β and IL-10 with TCM syndrome differentiation are related, suggesting that Treg and Th17 cells have a certain reference value for the diagnosis of patients with HBV-ACLF and the syndrome differentiation of TCM syndromes.

[**Key words**] Hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure (HBV-ACLF); Treg cells; Th17 cells; traditional Chinese medicine syndromes

我国是一个乙肝大国,由慢性乙型肝炎进展所形成的乙肝相关性慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)是肝衰竭的主要病因,而由免疫介导炎症反应所引起的肝功能损伤则是肝衰竭的主要发病机制。近年越来越多的研究发现,效应 CD4⁺T 淋巴细胞作为肝衰竭特异性免疫细胞免疫应答中的重要部分则更是发挥着其关键作用^[1],其新亚群调节性 T 细胞(Treg)/辅助性 T 细胞 17(Th17)在目前炎症反应调控相关研究中是热点^[2-5],与 HBV-ACLF 的发生进展关系密切。

依据肝衰竭自发病起以身目黄染为其主要症状,中医常把其归入“黄疸”,湖南中医药大学第一附属医院肝病研究所课题组在前瞻性病例研究中通过观察肝衰竭患者不同黄疸证的临床特点,提出了肝衰竭“阳黄-阴阳黄-阴黄”辨证论治模式,并逐渐优化形成以“阳黄-阴阳黄-阴黄”辨证论治模式为基本中医治疗肝衰竭的中西医结合治疗方案,且进一步证实其疗效^[6-9]。但在 HBV-ACLF 背景下,关于黄疸不同证型的现代免疫学特点研究较少,主要集中在辅助性 T 细胞 1(Th1)/辅助性 T 细胞 2(Th2),

树突状细胞(DC)及相关细胞因子,最新研究发现 Treg 细胞/Th17 细胞失衡在 HBV-ACLF 病变过程中发挥着免疫炎症调控的重要作用,与疾病进展及短期预后有很大关系,相关研究及本课题组前期研究均证实其机制^[10-11]。因此本研究基于 HBV-ACLF 患者 Treg/Th17 细胞失衡,通过检测 HBV-ACLF“阳黄-阴阳黄-阴黄”不同证候分型患者 Treg/Th17 细胞及其相关细胞因子表达,探讨肝衰竭不同中医证候分型的细胞免疫学特征,评价其对病情严重程度及中医辨证分型判断的临床意义,使中医辨证更加客观化,从而提高辨证准确率,以指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 3 月至 2019 年 3 月于湖南中医药大学第一附属医院肝病中心住院,入院西医诊断符合早期、中期、晚期 HBV-ACLF 患者各 32 例,共 96 例,男性 72 例,女性 24 例,平均年龄(47 ± 19.87)岁。其中符合阳黄证 33 例(早期 18 例,中期 12 例,晚期 3 例),阴阳黄证 37 例(早期 14 例,中期 19 例,晚期 4 例),阴黄证 26 例(早期 0 例,中期 1 例,晚期 25 例)。各组在性别、年龄、民族、职

业、饮酒、乙型肝炎病毒 (HBV) 感染史等临床基线特征差异无统计学意义,具有可比性。本研究经湖南中医药大学第一附属医院医学伦理委员会批准,批号伦审[2017]0720。入组患者签署知情同意书。

1.2 西医诊断标准 参照《肝衰竭诊治指南(2012 年版)》^[12] 的诊断标准,在 HBV 感染相关的慢性肝病基础上,短期内发生急性或亚急性肝功能失代偿的临床症候群。早期,①有极度乏力,伴明显厌食、呕吐和腹胀等严重消化道症状;②黄疸进行性加深(血清总胆红素 $\geq 171 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或每日上升 $\geq 17.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);③有出血倾向,30% < 凝血酶原活动度 (PTA) $\leq 40\%$;④尚未出现肝性脑病或其他并发症。中期,病情在早期基础上,出现以下两条之一者,①出现 II 度以下肝性脑病和(或)明显腹水、感染;②出血倾向明显(出血点或瘀斑),20% < PTA $\leq 30\%$ 。晚期,病情在中期基础上进一步加重,有严重出血倾向,PTA $\leq 20\%$,并出现以下 4 条之一者:肝肾综合征,上消化道大出血,严重感染,II 度以上肝性脑病。

1.3 中医诊断标准 参照《中医内科学》^[13] 中关于黄疸的辨证标准,并结合“十一五”“十二五”传染病重大专项研究部分成果,对辨证标准进行适当调整,形成优化后的“阳黄-阴阳黄-阴黄”辨证论治标准。阳黄证主证为①身目黄色鲜明;②舌质红,或红绛,或兼见瘀斑瘀点;舌苔黄腻;③脉实有力或滑数。次证为①口干口苦,恶心呕吐;②大便秘结;③皮肤瘀斑,鼻齿衄血;④小便短少黄赤。阴阳黄证主证为①身目黄色晦暗或鲜明;②舌质淡红,或稍红,或兼见瘀斑瘀点,或伴舌边齿痕;舌苔白腻或厚腻或淡黄;③脉弦、或弦滑,或沉迟。次证为①腹胀便溏,恶心呕吐;②口不干,或口干不欲饮;③乏力,纳差。阴黄证主证为①身目黄色晦暗,或如烟熏;②舌质淡、苔白腻。次证为①痞闷腹胀,纳少乏力;②神疲畏寒;③口淡不渴;④脉沉迟或细缓。辨证要求为符合主证 3 项,或主证 2 项加次证 2 项。

1.4 排除标准 ①乙肝相关性慢性肝病基础上合并其他病因如甲型肝炎病毒 (HAV),戊型肝炎病毒 (HEV),丙型肝炎病毒 (HCV),巨细胞病毒,及自身免疫性肝病,药物性肝损伤等导致的肝衰竭者;②合并有某些致死性并发症如脑水肿、食管静脉曲张破裂大出血等患者;③部分晚期患者已经实施肝移植术者;④妊娠或哺乳期妇女;⑤合并原发性肝癌或其他肿瘤患者;⑥近 3 个月服用免疫抑制剂、激素的患者。

1.5 试剂 白细胞介素-17A (IL-17A),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),转化生长因子- β (TGF- β),白细胞介素-10 (IL-10),白细胞介素-23 (IL-23),CD4,CD25,CD3,IL-17A,叉状头(或)翅膀状螺旋转录因子 (FoxP3) 试剂盒(美国 BD 公司,货号分别为 560383,560112,560429,558274,558245,555346,555432,560835,560486,560045);trizol (Invitrogen 公司,货号 15596-026);First Stand cDNA Synthesis Kit,SYBR Green PCR master mix (Promega 公司,货号分别为 K1612,TQ2300-02);DNA Marker (MBI 公司,货号 E845-100RXN);琼脂糖 (Biowest 公司,货号 212272)。

1.6 仪器 C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);DHP-9052 型 37 °C 恒温培养箱(中国上海齐欣公司);51119000 M MLTISKAN FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司);MB-530 型多功能酶标分析仪,PW-812 型全自动酶标洗板机(中国汇松公司);Sigma3-18K 型冰冻变速离心机(美国 Sigma 公司);UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司);ABI-7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);480 型 DNA 热循环仪(美国 Perkin Elmer 公司);DYCP-31C 型电泳仪及转膜仪(中国北京六一仪器厂)。

1.7 观察指标

1.7.1 流式细胞仪检测外周血 Treg, Th17 细胞频数表达 Th17 细胞检测,①取样,用肝素抗凝采血管采取入组患者外周血约 2 mL,温室放置。②分离,人单核淋巴细胞分离液分离细胞,留细胞层 250 μL 。③细胞刺激活化,取 100 μL 以上制备的细胞层液体,加入 RPMI 1640 150 μL 和 Cell Stimulation Cocktail 0.5 μL ,混匀,37 °C 水浴箱中培养 6 h。④细胞表面标记染色,向样品管中加入 CD4 抗体 5 μL (其他抗体同步骤),常温避光孵育 20 min。⑤制备固定破膜剂和 1 \times Perm/Wash Buffer。⑥固定破膜,重悬细胞,终体积在 100 μL 以内,每管加入固定破膜剂 750 μL ,常温避光孵育 30 min。⑦胞内染色,每管加 IL-17A 抗体 5 μL ,混匀,室温避光孵育 30 min;洗涤后留管底细胞层 100 μL 左右上机检测。Treg 细胞检测,细胞表面标记染色,在上述步骤制备的 100 μL 细胞层样本于离心管中,加入表面染色的抗体 CD4 和 CD25 各 5 μL ,室温避光 20 min。进行固定破膜。加 FoxP3 抗体 5 μL 胞内染色。洗涤后留管底细胞层 100 μL 左右上机检测。

1.7.2 流式细胞微球芯片捕获技术 (CBA) 检测 IL-6, IL-10, TGF- β , IL-17A, IL-23 水平 ①用 Assay

Diluent 4 mL 稀释对照品。②确定实验样本量,vertex 充分涡旋每种捕获微球 5 ~ 15 s,按照 1 μL/样本确定实验所需稀释的捕获微球总量,将每种捕获微球混匀于离心管中,加入检测因子稀释液 3 920 μL,混匀,标记“混合捕获微球”,重悬微球,将混合好的捕获微球室温 200 ×g 离心 5 min,取上清,加入“混合微球”相同体积容量的血清增强液,涡旋混匀,室温避光孵育 30 min。③按照 1 μL/样本确定试验所需稀释的检测抗体总量,将每种检测混匀于离心管中,加入检测因子稀释液 3 920 μL,混合均匀。④充分涡旋混匀已经重悬好的“混合微球”,每个实验管加入 50 μL。避光室温孵育 1 h。加入 PE 标记的细胞因子检测抗体 50 μL 到所有实验管中室温避光孵育 2 h。洗涤样本,去上清,重悬细胞。上机检测。

1.7.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测外周血 Treg/Th17 细胞转录因子 FoxP3, ROR-γt mRNA 表达 ①总 RNA 提取,采用 trizol 试剂提取总 RNA。②cDNA 合成,0.2 mL 离心管中加入 1 mg·L⁻¹总 RNA 2 μL,按照试剂盒说明进行逆转录反应。③引物设计与合成,引物由上海 Sangon 公司合成,见表 1。④进行 Real-time PCR 反应,配置 Real-time PCR 反应体系:SYBR Green PCR Master Mix 12.0μL,上下游引物各 1.0 μL, cDNA 1.0 μL。⑤加无菌去离子水补至 20 μL,7500 型荧光定量 PCR 仪进行 PCR 循环检测。以 94 ℃,58 ℃,72 ℃,83 ℃各 1 min (40 个循环) 进行扩增。数据采用仪器自带软件分析。以 2^{-ΔΔC_t}表示 mRNA 相对表达。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
FoxP3	上游 5'-AAGAACGCCATCCGCCACAAC-3'	92
	下游 5'-TCCAGCTCATCCACGGTCCAC-3'	
ROR-γt	上游 5'-AGCGGCAACAGCAGCAACAG-3'	132
	下游 5'-CAGGCAGGTCAGGCGAGGAG-3'	
β-actin	上游 5'-GCACCTCTCCAGCCTTCTCTCC-3'	93
	下游 5'-GCGGATGTCCACGTCACACTTC-3'	

1.8 统计学方法 所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计处理,计数资料以率或构成比表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD 多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV-ACLF 患者不同分期中医证型分布特点 阳黄证主要分布在肝衰竭病程的早期 (56%) 和中期 (37.5%),以早期为主,阴阳黄证主要分布于早期 (44%) 和中期 (59.37%),以中期为主,阴黄证主要分布于晚期 (78.12%),见表 2。

表 2 HBV-ACLF 患者不同分期中医证型分布特点 (n = 32)
Table 2 Distribution characteristics of traditional Chinese medicine (TCM) syndromes in different stages of HBV-ACLF (n = 32)

例 (%)			
组别	阳黄证	阴阳黄证	阴黄证
早期	18 (56.23)	14 (43.75)	0
中期	12 (37.5)	19 (59.38)	1 (3.13)
晚期	3 (9.38)	4 (12.5)	25 (78.13)

2.2 HBV-ACLF 患者不同中医证候分型 Treg, Th17 细胞频数表达比较 从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证 Treg, Th17 细胞频数逐渐升高,各组间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 HBV-ACLF 患者不同证候分型 Treg, Th17 细胞频数表达与比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression and comparison of frequency of Treg and Th17 cells with different TCM syndromes of HBV-ACLF ($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	Treg	Th17
阳黄	33	32.72 ± 21.13	55.14 ± 19.80
阴阳黄	37	46.72 ± 20.23 ¹⁾	60.98 ± 19.07 ¹⁾
阴黄	26	57.56 ± 17.52 ^{1,2)}	73.33 ± 10.09 ^{1,2)}

注:与阳黄组比较¹⁾ $P < 0.05$;与阴阳黄组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 ~ 6 同)。

2.3 HBV-ACLF 患者不同中医证候分型 IL-17A, IL-23, TNF-α, TGF-β, IL-10 表达比较 从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证, Treg 型细胞因子 IL-10, TGF-β 逐渐升高,各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), Th17 型细胞因子 IL-17A, TNF-α, IL-23 逐渐升高,其中 IL-17A 阳黄组与阴黄组,阴阳黄组与阴黄组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), TNF-α, IL-23 差异无统计学意义,见表 4, 5。

2.4 HBV-ACLF 患者不同中医证候分型 FoxP3 和 ROR-γt mRNA 表达与比较 从阳黄证、阴阳黄证到阴黄证, FoxP3 表达逐渐下降, ROR-γt 表达逐渐升高, FoxP3 阳黄组与阴阳黄组比较, 阳黄组与阴黄组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ROR-γt 各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 6。

表 4 HBV-ACLF 患者不同证候分型 Treg 细胞型因子 TGF-β, IL-10 表达与比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression and comparison of Treg cell type factors TGF-β and IL-10 in different TCM syndromes of HBV-ACLF($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-10	TGF-β
阳黄	33	18. 38 ± 18. 38	55. 49 ± 28. 02
阴阳黄	37	29. 45 ± 21. 03 ¹⁾	76. 47 ± 49. 45 ¹⁾
阴黄	26	53. 24 ± 76. 64 ^{1,2)}	106. 54 ± 69. 49 ^{1,2)}

表 5 HBV-ACLF 患者不同证候分型 Th17 细胞型因子 TNF-α, IL-17A, IL-23 表达与比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Expression and comparison of Th17 cell type factors TNF-α, IL-17A and IL-23 in different TCM syndromes of HBV-ACLF($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α	IL-17A	IL-23
阳黄	33	2. 59 ± 0. 91	2. 43 ± 1. 06	3. 46 ± 1. 59
阴阳黄	37	2. 64 ± 0. 89	2. 94 ± 1. 41	4. 88 ± 3. 07
阴黄	26	3. 19 ± 1. 28	5. 15 ± 3. 89 ^{1,2)}	7. 51 ± 12. 1

表 6 HBV-ACLF 患者不同证候分型 FoxP3, ROR-γt mRNA 表达与比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Expression and comparison of FoxP3 and ROR-γt mRNA in different TCM syndromes of HBV-ACLF($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FoxP3	ROR-γt
阳黄	33	26. 78 ± 2. 21	20. 43 ± 1. 69
阴阳黄	37	23. 24 ± 1. 98 ¹⁾	23. 97 ± 2. 02 ¹⁾
阴黄	26	22. 58 ± 2. 58 ¹⁾	28. 75 ± 1. 08 ^{1,2)}

3 讨论

人体免疫功能强弱与中医正气盛衰、辨证分型存在相关性^[14],一方面表明免疫细胞表达水平及功能与中医“正气”有着密切关系,另一方面也说明了免疫调控是个基于免疫细胞、细胞因子、核转录因子等一体的复杂的网络,需要不断深入研究。《黄帝内经》曰:“阳气者,卫外而为固也”,免疫调节功能与中医“阳气”间的关系则更为相关,正常情况下,机体的免疫状态通过免疫调节机制而保持自身稳定,可认为是人体的“阳气”对人体起到了保护作用^[15]。目前各个疾病关于中医证型的现代免疫学特点研究层出不穷,CD4⁺ T 淋巴细胞新亚群 Treg/Th17 细胞与中医证候分型的相关性研究在近几年也是研究热点。但在基于特异性细胞免疫学机制与中医证型的研究方面,关于肝脏相关性疾病尤其是肝衰竭阴、阳黄证的报道甚少。众多学者研究证实,阳黄证多处于疾病初期,病情较急,机体免疫功能亢

进,肝组织炎症反应明显;阴黄证处于疾病后期,免疫功能进一步紊乱,免疫抵抗功能低下,但其机制及实质并未完全清楚。基于免疫调控进一步研究阴黄、阳黄实质,在肝衰竭辨证论治过程中从免疫指标水平的高低及 Th17/Treg 失衡偏移的方向初步判断患者的所处疾病的某一阶段,可以大致了解患者的中医分型倾向。

本课题组基于前期研究成果,研究 HBV-ACLF 患者外周血 Treg/Th17 细胞及其相关细胞因子动态表达,同时基于“阳黄-阴阳黄-阴黄”辨证论治模式,进一步研究其不同中医证候分型的细胞免疫学特征,发现 HBV-ACLF 早、中、晚期不同病程与中医证型的分布存在一定相关性,阳黄证主要分布在肝衰竭病程的早期,阴阳黄证主要分布于中期,阴黄证基本分布于晚期。免疫细胞 Treg/Th17 细胞及其部分相关细胞因子、特异性转录因子与肝衰竭中医辨证分型之间存在着相关性,肝衰竭发病后,病机以湿热与瘀热为主,证型主要分布在阳黄、阴阳黄,此时机体处于免疫亢进状态,免疫细胞激活分化亢进,同时存在 Treg 细胞相关因子 IL-10, TGF-β 上升,及 Th17 细胞相关因子 IL-17A, TNF-α, IL-23 上升,随着病程进展,正气消耗,脾虚失其健运,机体免疫逐渐下降,以阴黄为主证, Treg 细胞特异性转录因子 FoxP3 mRNA 表达逐渐下降,而 Th17 细胞特异性转录因子 ROR-γt mRNA 表达逐渐升高,炎症因子过度释放,抗炎调节作用减弱,说明在肝衰竭辨证论治过程中依据 Th17/Treg 失衡偏移的方向及相关细胞因子的表达变化可初步判断患者的病期,大致了解患者的中医分型倾向,为中医黄疸辨证提供一个客观化实验指标提出了新思路,揭示中医药干预黄疸发挥免疫调节优势作用提供新靶点。

[参考文献]

[1] Moreau R, Arroyo V. Acute-on-chronic liver failure: a new clinical entity [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(5): 836-841.

[2] Raphael I, Nalawade S, Eagar T N, et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases [J]. Cytokine, 2014, 74(1): 5-17.

[3] 甘霞,赵新芳,林红,等. 清营活血汤对原发性胆汁性肝硬化肝胆湿热型的疗效以及对外周血 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 161-164.

[4] 张业清,苏克雷,庞中化,等. 宣肺平喘方对哮喘小鼠

气道炎症及 Th17/Treg 平衡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 119-123.

[5] 刘端勇, 徐荣, 黄敏芳, 等. 四神丸调节结肠炎大鼠 PP 结 T 细胞亚群及 Treg/Th17 间平衡的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 107-111.

[6] 朱文芳, 湛宁生. 湛宁生教授治疗重型肝炎的经验[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(6): 362-363.

[7] 毛德文. 肝衰竭毒邪病因学说辨析[J]. 中医药导报, 2007, 13(1): 8-11.

[8] 马国俊, 张雪. 肝病内毒素血症及中医治则探讨[J]. 新中医, 2011, 43(11): 127-128.

[9] 桑培敏, 达呼巴雅尔, 王乐三, 等. 阳黄-阴阳黄-阴黄辨证论治联合西药治疗乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者生存分析[J]. 中医杂志, 2019, 60(7): 582-586.

[10] 陈斌, 张涛, 朱文芳, 等. 清温并用法对慢加急性肝衰竭大鼠调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 表达的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(12): 2642-2647.

[11] 宋征福, 彭杰, 陈斌, 等. 清温并用法对 HBV-ACLF 非阳黄证患者 Treg/Th17 型细胞因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5687-5691.

[12] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(3): 210-216.

[13] 王永炎, 鲁兆麟. 中医内科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 515-529.

[14] 杨宏志, 王凤林, 王拥泽, 等. 中医四步免疫化纤疗法治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. 中药材, 2006(7): 748-752.

[15] 孙成力, 王怡, 高建东. 500 例慢性肾小球肾炎患者少阳病流行病学调查[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(9): 21-24.

[责任编辑 张丰丰]