

慢性乙型肝炎患者肝组织HBcAg表达模式与中医证型的关系

梁惠卿¹, 许诗霖², 毛乾国¹, 张嘉挺³, 杨嘉恩¹, 吴春城¹, 钟群燕⁴, 连开伟⁴, 蔡洋⁴, 罗晨⁴, 庄鸿莉⁵, 陈少东²

(¹厦门市中医院肝病中心, 厦门 361009; ²厦门大学医学院, 厦门 361102; ³福建省厦门第一中学医务室, 厦门 361000; ⁴福建中医药大学中医系, 福州 351012; ⁵厦门大学附属第一医院中医科, 厦门 361003)

摘要: 目的: 观察慢性乙型肝炎(CHB)患者肝组织乙型肝炎核心抗原(HBcAg)表达模式与中医证型及肝组织炎症、纤维化等指标的关系并进一步探讨相应的机制。方法: 选择CHB患者556例, 均进行中医辨证分型及肝组织活检, 测定肝组织HBcAg表达模式、炎症、纤维化程度及ALT、AST、HBV DNA水平。结果: ①556例患者按中医辨证标准分为6组: 瘀血阻络证44例、肝肾阴虚证42例、肝郁气滞证48例、肝郁脾虚证282例、湿热蕴结证140例、脾肾阳虚证0例; 按HBcAg表达模式分HBcAg阴性组42例、胞浆型HBcAg组186例、胞浆优势型HBcAg组290例、浆核各半型HBcAg组38例。②经Spearman秩相关分析, 肝组织HBcAg表达模式与肝组织炎症活动度、纤维化程度均呈负相关; 经Fisher确切概率检验, 肝组织HBcAg表达模式与中医证型分布具有相关性。结论: 肝组织HBcAg表达模式与中医证型、肝组织炎症、纤维化程度均有相关性; HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组及肝郁脾虚证、湿热蕴结证多处于慢性乙型肝炎活动期, 正气未伤, 免疫功能较强, 为抗病毒治疗的较佳时机。

关键词: 慢性乙型肝炎; 证型; 乙型肝炎核心抗原; 表达模式

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81503529, No.81673660), 福建省科技计划引导性项目(No.2015D007, No.2016D012), 厦门市科技惠民项目(No.3502Z20174028), 厦门市重要重大疾病联合攻关项目(No.3502Z20179047), 福建中医药大学基金项目(No.XB2016080)

Correlation analysis on expression patterns of HBcAg in hepatocytes and TCM syndrome in chronic hepatitis B patients

LIANG Hui-qing¹, XU Shi-lin², MAO Qian-guo¹, ZHANG Jia-ting³, YANG Jia-en¹, WU Chun-cheng¹, ZHONG Qun-yan⁴, LIAN Kai-wei⁴, CAI Yang⁴, LUO Chen⁴, ZHUANG Hong-li⁵, CHEN Shao-dong²

(¹Liver Disease Center of Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, China; ²Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China; ³Infirmery of Xiamen No.1 High School of Fujian, Xiamen 361000, China; ⁴Department of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 351012, China; ⁵Department of TCM, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract: Objective: To observe the relationship among expression patterns of HBcAg in liver tissue of chronic hepatitis B patients with TCM syndrome, liver inflammation, fibrosis and so on to investigate the mechanism. Methods: A total of 556 cases of patients with chronic hepatitis B were chosen and classified into specific TCM syndrome according to guidelines for traditional Chinese medical diagnosis of chronic hepatitis B, liver biopsy were conducted as well, then determined expression patterns of HBcAg and inflammation, fibrosis in liver tissue. Meanwhile, serum alanine transaminase(ALT), serum aspartate aminotransferase(AST), serum HBV DNA were measured. Results: ①556 patients were classified into syndrome of static blood blocking collaterals (44), syndrome of yin deficiency of liver and kidney (42), syndrome of liver depression and qi stagnation (48), syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency (282), syndrome of accumulation and binding of damp-heat (140) and syndrome of yang deficiency of spleen and kidney (0) based on TCM Syndrome Differentiation Standard. 556 patients were classified into HBcAg-negative group (42), cHBcAg group (186), cdHBcAg group (290) and mHBcAg group (38). ②Spearman

通讯作者: 陈少东, 厦门市思明区思明南路422号厦门大学医学院, 邮编: 361102, 电话: 0592-2188683, E-mail: adong@xmu.edu.cn

rank correlation analysis showed the degree of liver inflammation and fibrosis were negatively correlated with the expression pattern of HBcAg. The expression patterns of HBcAg in liver tissue was correlated with the distribution of TCM Syndromes according to Fisher definite probability methods. Conclusion: The expression pattern of HBcAg in liver tissue was correlated with TCM syndrome, liver inflammation and fibrosis degree. HBcAg-negative group, cHBcAg group, syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency group and syndrome of accumulation and binding of damp-heat group were in Chronic hepatitis B active stage with higher vital qi and active immune function, which may be the good timing of antiviral treatment.

Key words: Chronic hepatitis B; TCM syndrome; Core antigen of hepatitis B; Expression pattern

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81503529, No.81673660), Project of Science and Technology Plan of Fujian Province (No.2015D007, No.2016D012), Science and Technology Program for Public Wellbeing of Xiamen (No.3502Z20174028), Joint Research of Major and Serious Disease of Xiamen (No.3502Z20179047), Program of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (No.XB2016080)

中国慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者数量居世界首位, CHB患者每年花费的医疗费用高达1 000亿元人民币, 而间接损失预计是直接损失的1倍以上, 加强本病的防治具有重要意义。抗病毒治疗是CHB治疗的根本方法, 其临床疗效取决于CHB患者机体免疫功能状态^[1]。研究表明, 肝组织乙型肝炎核心抗原(hepatitis B core antigen, HBcAg)的表达模式可代表机体的免疫功能状态^[2]; CHB不同中医证型蕴含着不同免疫功能状态, 抗病毒治疗效果也有所不同^[3]。因此, 本研究在中医辨证论治理论指导下, 观察不同中医证型、HBcAg表达模式与肝脏炎症活动度、纤维化程度的关系, 试图探讨以下几个问题: ①肝组织HBcAg表达模式与中医证型的关系; ②肝组织HBcAg表达模式与肝脏炎症活动度、纤维化程度的关系; 从而寻找抗病毒治疗的最佳时机, 以期为提高中西医结合治疗CHB疗效提供“结合”点。

资料与方法

1. 研究对象 患者来源于厦门市中医院肝病中心2013年1月至2017年1月的CHB住院患者。

2. 诊断标准

2.1 HBeAg阳性CHB诊断标准 参照文献[1]的诊断标准, 即兼备如下4项: ①血清HBsAg、HBeAg持续阳性>6个月; ②血清HBV DNA阳性: 近2个月内至少2次>20 000IU/mL; ③近1个月内血清ALT \geq 2 \times ULN, \leq 10 \times ULN; ④肝组织学检查结果符合CHB。

2.2 中医辨证标准 参照文献[4]的辨证标准, 共包括中医证型6个(湿热蕴结证、肝郁气滞证、肝郁脾虚证、肝肾阴虚证、脾肾阳虚证、瘀血阻络证)。对符合HBeAg阳性CHB诊断标准的患者, 由2名副主任医师以上职称者分别独立进行中医辨证, 若二者辨证结果一致则确定证型, 若结果不一致, 由预先指定的一位主任医师介入讨论, 3位医师现场讨论后确定证型。

3. 纳入标准 ①愿意参加本课题并签署《知情同意书》; ②符合前述HBeAg阳性CHB诊断标准及中医辨证标准; ③年龄在18~65岁; ④入组前半年未接受抗病毒及免疫调节治疗。

4. 排除标准 具备下列任何一项者: ①合并甲肝、戊肝、丙肝等其他病毒感染; ②失代偿期肝硬化; ③合并药物性肝损伤、酒精性肝炎、脂肪肝、自身免疫性疾病等其他肝损原因; ④妊娠期、哺乳期妇女; ⑤中医证候缺如或轻微, 常规四诊检查难以明辨其证。

5. 观察指标

5.1 肝穿刺活检 所有患者均在入组前2周内行肝活检术。应用活检枪(baibmagun biopsy instrument, 美国)行经皮肝组织细针穿刺, 肝组织石蜡包埋, 连续切片, 分别行HE和浸银染色^[5], 肝组织炎症、纤维化分级参照文献[1]。分组标准^[6]: ①HBcAg阴性组: 免疫组化染色显示胞浆、胞核均未见HBcAg染色; ②胞浆型HBcAg组: 免疫组化染色显示胞浆HBcAg染色, 胞核未见HBcAg染色; ③胞浆优势型HBcAg组: 免疫组化染色显示胞浆型HBcAg染色占被检测肝细胞HBcAg阳性显色总数的2/3及以上; ④浆核HBcAg各半型: 免疫组化染色显示胞浆型、胞核型HBcAg染色各占被检测肝细胞中HBcAg阳性显色总数的1/2。

5.2 血清ALT、AST活性 采用贝克曼库尔特公司的Unicel DXC 800全自动生化分析系统测定血清ALT、AST活性, ALT正常值上限(upper limit of normal, ULN)为50IU/mL, 试剂批号(Lot No.2010801557)、AST(Lot No.2010712206), 试剂购于贝克曼库尔特实验系统有限公司。

5.3 血清HBV DNA定量 采用Roche公司的Lightcycler荧光定量PCR系统测定血清HBV DNA定量, 血清HBV DNA检测下限为<500IU/mL。血清HBV DNA试剂采购于德国罗氏诊断有限公司, 采用

罗氏Elecsys2010电化学发光仪检测; HBV DNA (Lot No.32017563)。

6. 统计学方法 数据分析采用统计软件SPSS 15.0, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布用中位数(四分位间距)表示, 对于计数资料, 各组比较采用卡方检验, 对于计量资料, 各组比较采用独立wilcoxon秩和检验, 分组与结果的相关性采用Spearman秩相关分析及Fisher确切概率检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 不同肝组织HBcAg表达模式组基线情况比较 见表1。最终入选556例患者, 瘀血阻络证44例, 肝肾阴虚证42例, 肝郁气滞证48例, 肝郁脾虚证282例, 湿热蕴结证140例。按HBcAg表达模式分HBcAg阴性组42例, 胞浆型HBcAg组186例, 胞浆优势型

HBcAg组290例, 浆核各半型HBcAg组38例。各组性别经Fisher确切概率检验, 年龄、病程、血清ALT、AST经方差检验, 比较无统计学意义, 具有可比性。HBcAg阴性组HBV DNA较之其他3组, 经方差检验差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 不同肝组织HBcAg表达模式与肝组织炎症活动度、纤维化程度的相关性比较 见表2。经Spearman秩相关分析, HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组、胞浆优势型HBcAg组、浆核各半型HBcAg组表达模式与肝组织炎症活动度、纤维化程度呈负相关。

3. 不同肝组织HBcAg表达模式与中医证型相关性的比较 见表3。经Fisher确切概率检验, 肝组织HBcAg表达模式与中医证型具有相关性, HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组、胞浆优势型HBcAg组的中医证

表1 不同肝组织HBcAg表达模式组基线情况比较

项目	HBcAg阴性组 (42例)	胞浆型HBcAg组 (186例)	胞浆优势型HBcAg 组(290例)	浆核各半型HBcAg 组(38例)	P值
男性[例(%)]	28 (66.67)	116 (62.37)	184 (63.45)	24 (63.16)	0.092
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	31.22 ± 5.10	29.53 ± 6.87	29.03 ± 6.47	29.86 ± 5.03	0.169
病程($\bar{x} \pm s$, 年)	8.68 ± 5.46	9.97 ± 5.75	9.39 ± 5.08	11.29 ± 6.24	0.324
ALT水平[中位数(四分位间距), IU/L]	157.20 (169.51)	183.12 (186.32)	197.13 (168.76)	222.45 (388.31)	0.463
AST水平[中位数(四分位间距), IU/L]	59.85 (36.12)	116.43 (107.26)	101.34 (75.45)	97.46 (128.28)	0.050
HBV DNA[中位数(四分位间距), log10 IU/mL]	5.40 (1.48)	7.15 (1.08)	7.15 (1.08)	7.14 (0.54)	0.000

表2 不同肝组织HBcAg表达模式组与肝组织炎症活动度、纤维化程度的相关性比较 [例(%)]

项目	HBcAg阴性组 (42例)	胞浆型HBcAg组 (186例)	胞浆优势型HBcAg 组(290例)	浆核各半型HBcAg 组(38例)	Spearman秩 相关分析	列联系数	
肝组织 炎症 活动度	G1	6 (14.28)	4 (2.15)	6 (2.08)	3 (7.89)	0.0332	-0.1499
	G2	14 (33.33)	106 (56.99)	202 (69.66)	32 (84.21)		
	G3	18 (42.86)	68 (36.56)	74 (25.52)	3 (7.89)		
	G4	4 (9.25)	8 (4.30)	8 (2.76)	0 (0)		
肝组织 纤维化 程度	S1	14 (33.33)	82 (44.09)	190 (65.51)	32 (84.21)	0.0009	-0.2285
	S2	20 (47.62)	80 (43.01)	88 (30.34)	4 (10.53)		
	S3	6 (14.29)	14 (7.53)	10 (3.45)	2 (5.26)		
	S4	2 (4.76)	10 (5.38)	2 (0.69)	0 (0)		

表3 不同中医证型在不同肝组织HBcAg表达模式组分布情况比较 [例(%)]

组别	例数	肝郁脾虚证(282例)	湿热蕴结证(140例)	肝郁气滞证(48例)	肝肾阴虚证(42例)	瘀血阻络证(44例)
HBcAg阴性组	42	16 (38.10)*	12 (28.57)*	4 (9.52)	6 (14.29)*	4 (9.52)*
胞浆型HBcAg组	186	100 (53.76)*	58 (30.18)*	14 (7.53)	8 (4.30)*	6 (3.23)*
胞浆优势型HBcAg组	290	164 (56.55)*	66 (22.76)*	26 (8.97)	16 (5.52)*	18 (6.21)*
浆核各半型HBcAg组	38	2 (5.26)	4 (10.53)	4 (10.53)	12 (31.58)	16 (42.11)

注: 与浆核各半型HBcAg组比较, * $P < 0.05$ 。

型分布以湿热蕴结证、肝郁脾虚证为主,而浆核各半型HBcAg表达模式以瘀血阻络证、肝肾阴虚证为主。

讨论

中医证型是疾病发展过程中某一个阶段病理属性的概括,研究显示:各中医证型的内在物质基础不同,不同证型蕴含了不同的免疫功能状态^[7-9]。而不同的免疫功能状态影响着HBV自然史、肝脏病变程度以及抗病毒治疗的疗效^[10-11],研究表明免疫功能状态活跃者抗病毒疗效较高,因此,寻找中医证型和免疫功能状态的“结合点”,根据病机的变化、邪正消长、机体反应性的差异,因时、因地、因人运用不同的治法,体现了中医学“辨证论治”的治则。

肝细胞的HBcAg是宿主细胞毒性T细胞攻击的主要靶抗原,在CHB免疫损伤中起重要作用。在免疫耐受期,HBcAg主要分布在肝细胞核,在免疫清除期,HBcAg由胞核向胞浆迁移,在胞浆表达增加^[12]。肝组织中胞浆型HBcAg的表达强度随肝组织病变炎症程度的增高而增强^[13]。本研究显示:CHB患者肝组织HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组肝脏炎症活动度、纤维化程度均较高,炎症分级多为G3级及以上而纤维化分期多为S2级及以上,证实HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组为免疫激活期、炎症坏死及纤维化病变均较明显。在免疫清除过程中,HBcAg从胞核向胞浆迁移激发免疫应答,随着免疫进一步激活,机体对胞浆型HBcAg和HBV DNA具有更加强烈的免疫反应,将肝内活跃复制的HBV DNA和靶抗原HBcAg表达的肝细胞溶解破坏以清除病毒,故出现HBcAg表达阴性的HBeAg阳性慢性乙型肝炎,HBcAg阴性组HBVDNA定量较低亦证明这点,然而机体激发的免疫不足以把HBV DNA完全清除,此时若使用Peg-IFN α -2a可取得免疫增强及抗病毒治疗协同疗效,可进一步促进病毒的清除,增加治疗有效率。

本研究显示,中医证型与肝组织HBcAg表达模式具有相关性,HBcAg阴性组、胞浆型HBcAg组、胞浆优势型HBcAg组的中医证型分布以肝郁脾虚、湿热蕴结证为主,而浆核各半型HBcAg表达模式以瘀血阻络证、肝肾阴虚证为主;分析其原因:湿热蕴结证、肝郁脾虚证患者,以湿热、肝郁为主,相对病程较短、病情较轻、病位较浅,正气未伤,属中医理论中“邪盛而正未虚”或“正气已虚,但邪正相争仍剧”之类,故免疫功能较活跃,而肝肾阴虚证和瘀血阻络证属于中医病机理论中“正虚邪恋”和“久病必

瘀”之类,其病程长,免疫功能下降较明显,不利于病毒的清除。

本研究的创新点在于首次探讨了肝组织HBcAg表达模式与中医证型的关系,并进一步得出HBcAg阴性表达、胞浆型HBcAg表达及肝郁脾虚证、湿热蕴结证CHB患者处于免疫激活期,抗病毒治疗的时机比较好,抗病毒的紧迫性也较强,适合尽快抗病毒治疗。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版).中华肝病杂志,2011,19(1):13-24
- [2] Huiqing Liang, Jinmo Tang, Jiaen Yang, et al. Hepatitis B core antigen expression in hepatocytes reflects viral response to Peg-IFN α -2a in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(3):3563-3570
- [3] 王国亮.慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞产生HBcAg特异性Y干扰素水平与中医证型关系.福州:福建中医药大学,2014
- [4] 高月求,王灵台.慢性乙型肝炎中医诊疗专家共识(2012年1月).临床肝胆病杂志,2012,28(3):164-168
- [5] Sharma R R, Dhiman R K, Chawla Y, et al. Immunohistochemistry for core and surface antigens in chronic hepatitis. *Trop Gastroenterol*, 2002, 23:16-19
- [6] Yun-Fan Liaw, Jia-Hong Kao, Teerha Piratvisuth, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: A2012 update. *J Hepatol Int*, 2012, 6(3):531-561
- [7] 李友白,薛博瑜,华忠,等.慢乙肝中医辨证分型和细胞免疫功能关系的临床研究.江苏中医药,2012(1):21-22
- [8] 王政.1260例慢性乙型肝炎常见中医证型与实验室指标的相关性研究.成都:成都中医药大学,2011
- [9] 苏悦,罗雪梅,彭杨芒,等.慢性乙型肝炎脾虚湿热证潜在microRNA表达谱研究.中华中医药杂志,2017,32(5):2001-2004
- [10] Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3):215-229
- [11] 赵亮,冯全生,温川飙.767例慢性乙型肝炎症状与实验室指标相关性研究.中华中医药杂志,2017,32(4):1761-1764
- [12] Tang T J, de Man R A, Kusters J G, et al. Intrahepatic CD8 T-lymphocytes and HBV core expression in relation to response to antiviral for chronic hepatitis B patients. *J Med Virol*, 2004, 72(2):215-222
- [13] W K Seto, D K Wong, J Fung, et al. Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B. *J Clinical Microbiology & Infection*, 2015, 20(11):1173-1180

(收稿日期:2017年11月10日)