

SOD 是机体氧化及抗氧化平衡的重要因素,MDA 则反映机体内脂质过氧化程度。SOD 活性降低,MDA 含量增高,间接反映了氧自由基的形成及对心肌损伤,前者反映机体清除氧自由基的能力,后者则反应机体细胞受自由基攻击的严重程度。研究^[5]表明,氧自由基清除剂对心肌缺血再灌注损伤有确切的保护作用。

本研究采用实验性大鼠心肌缺血再灌注模型观察华佗再造丸的药理作用。结果表明,心肌缺血再灌注损伤可导致心肌梗死发生,心肌梗死区面积占心室及心脏总面积的 30.5 %和 26.0 %;同时,血清 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高,说明大鼠心肌缺血再灌注模型复制成功。华佗再造丸高、中、低剂量组均能明显减轻心肌梗死程度,缩小梗死面积,减轻梗死区质量,梗死区占心室及心脏百分比明显降低,同时,血清 SOD 活性明显升高,MDA 含量明显降低,说明华佗再造丸对心肌缺血再灌注所

致心肌梗死有确切的保护作用。提示华佗再造丸抗心肌缺血再灌注损伤作用可能与其能提高血清 SOD 活性、降低 MDA 含量,以增加机体清除氧自由基的能力有关。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 692-693.
- [2] 王付伟. 华佗再造丸治疗冠心病心绞痛的临床研究[J]. 河北中医, 2005, 27(9): 698-670.
- [3] 刘克英, 秦培森, 卜现春, 等. 华佗再造丸治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛疗效观察[J]. 中药材, 1999, 22(6): 320-322.
- [4] 方素钦. 华佗再造丸治疗冠心病心绞痛患者 63 例的临床观察[J]. 福建中医药, 1990, 21(1): 2-3.
- [5] 曲丽霞. 益气化痰汤对急性心肌梗死再灌注后心肌微血管保护作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(5): 303-305.

(编辑: 梁进权)

补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠 HBV-DNA、IFN- γ 、IL-17A 的影响

刘亚敏, 徐秋英, 沈 强, 陈俊贤, 冯志瑀, 彭皓均, 曾征伦(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠外周血乙肝病毒 DNA(HBV-DNA)、干扰素- γ (IFN- γ)及白介素-17A(IL-17A)的影响。**方法** 将 50 只 HBV 转基因小鼠随机分为模型组, 补肾清毒方高、中、低剂量组, 拉米夫定组, 另取 10 只非 HBV 转基因小鼠为正常对照组。采用荧光定量 PCR 方法检测药物干预前后小鼠外周血 HBV-DNA 水平; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测药物干预前后小鼠血清 IL-17A 及 IFN- γ 的水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组 IL-17A 显著升高($P < 0.01$), IFN- γ 也明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 各药物干预组小鼠血清 IL-17A 水平不同程度降低($P < 0.01$), 其中以补肾清毒方高剂量组和中剂量组降幅最为明显($P < 0.01$), 并且随用药时间的延长 IL-17A 水平进一步降低; 各药物干预组血清 IFN- γ 水平升高($P < 0.05$), 其中以补肾清毒方高、中剂量组升高最为显著($P < 0.01$), 且随用药时间延长有所提高。与模型组比较, 各药物干预组小鼠外周血 HBV-DNA 变化不大($P > 0.05$)。**结论** 补肾清毒方对乙肝有一定的治疗作用, 其作用机理可能与升高 IFN- γ 水平、降低 IL-17A 表达有关。

关键词: 补肾清毒方; HBV 转基因小鼠; 慢性乙型肝炎; 外周血乙肝病毒 DNA; 干扰素- γ ; 白介素-17A

中图分类号: 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0538-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.005

收稿日期: 2014-05-08

作者简介: 刘亚敏, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治病毒性疾病。Email: 787474027@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173255); 广州中医药大学中医临床基础学科国家特色重点学科项目。

Effect of *Bushen Qingdu* Decoction on HBV-DNA and Serum IFN- γ and IL-17A Levels of HBV Transgenic Mice

LIU Yamin, XU Qiuying, SHEN Qiang, CHEN Junxian, FENG Zhiyu, PENG Haojun, ZENG zhenglun(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effect of *Bushen Qingdu* decoction(BQD) on peripheral blood hepatitis B virus DNA(HBV-DNA) and serum interferon gamma(IFN- γ) and interleukin 17A(IL-17A) of HBV transgenic mice.

Methods Fifty HBV transgenic mice were randomly divided into normal control group, model group, lamivudine group, and high-, middle-, and low-dosage BQD groups. Before and after drug intervention, the level of HBV-DNA was detected by fluorescence quantitative PCR, and serum IFN- γ and IL-17A levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the normal control group, the levels of IL-17A and IFN- γ were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in the model group. IL-17A was decreased and IFN- γ was increased to various degrees in the medication groups ($P < 0.01$ compared with the model group) in time-dependent manner, and the decrease of IL-17A in high-dosage BQD group and the increase of IFN- γ in high- and middle-dosage BQD groups were more obvious ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There was no significant changes in the expression of HBV-DNA between medication groups and model group. **Conclusion** BQD is effective for the treatment of chronic hepatitis B, and its mechanism is probably related with the increase of IFN- γ and with the decrease of IL-17A expression.

Keywords: *Bushen Qingdu* decoction; HBV transgenic mice; Chronic hepatitis B; Peripheral blood hepatitis B virus DNA; Interferon gamma(IFN- γ); Interleukin 17A(IL-17A)

慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)发病机制十分复杂, 宿主免疫调节的紊乱是导致病毒不能有效清除、病情迁延不愈、引起慢性炎症、造成肝脏病变的重要原因。Th17 细胞是最近发现的一种新的效应性 CD4⁺T 细胞亚群, 其在防御感染、介导慢性炎症以及自身免疫病等方面发挥重要作用。该细胞与 Th1、Th2 细胞一起广泛参与了机体的免疫防御及免疫调节过程^[1-2]。中医药治疗 CHB 不容易产生耐药性, 且起效后作用较稳定和长久, “反跳”现象少。我们前期研究发现 CHB 免疫逃逸与中医“肾虚邪伏”病机密切相关, 补肾清毒法可通过调节人体免疫系统发挥其抗病毒作用^[3-4]。本实验通过观察补肾清毒方(*Bushen Qingdu* decoction, BQD)对 HBV 转基因小鼠(HBV transgenic mice)外周血乙肝病毒 DNA(HBV-DNA)、Th1 和 Th17 细胞分泌的特征性细胞因子、干扰素- γ (IFN- γ)及白介素-17A(IL-17A)表达的影响, 探讨补肾清毒法治疗 CHB 可能的作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物 8~20 周龄 BALB/c 品系 HBV 转基因小鼠(HBV transgenic mice)50 只, 雌雄各半, 体质量 20~30 g, 中国人民解放军第四五八医院全军肝病中心, 合格证号: SYXK(军)2007-035; 正常小鼠 10 只, 为与 HBV 转基因小鼠同窝的非转基因正常小鼠,

作为对照组。所有小鼠饲养在广州空军医院 SPF 级动物中心, 许可证号: SYXK(军)2007-014。饲养条件: 温度(24±2)℃, 湿度 60%~70%, 环境噪音: 小于 40 分贝, 每周称体质量 1 次。

1.2 药物及试剂 补肾清毒方: 桑寄生 20 g、菟丝子 20 g、杜仲 10 g、小叶凤尾草 20 g、丹参 20 g、山栀子 20 g、叶下珠 30 g、五指毛桃 20 g、山萸肉 10 g。中药饮片购自广州中医药大学第一附属医院, 并经药剂科鉴定。中药浓缩液制备: 取上述药物加蒸馏水 1200 mL, 加热浓缩至 300 mL, 过滤药液备用, 再注入蒸馏水 1200 mL, 加热浓缩至 300 mL, 将 2 次水提液合并, 浓缩成 80 mL, 此为高剂量组(2 g·mL⁻¹生药)。另取中药 2 剂, 以同样方法分别配制成中剂量中药浓缩液 160 mL(1 g·mL⁻¹生药)和低剂量中药浓缩液 320 mL(0.5 g·mL⁻¹生药), 4℃保存。拉米呋定, 英国葛兰素史克公司, 批号: 2011031240; 生理盐水, 四川科伦药业股份有限公司, 批号: 2011031267。HBV-DNA 检测试剂盒, 凯杰生物工程(深圳)有限公司, 批号: 20120903/1; 小鼠 IFN- γ 细胞因子 ELISA 检测试剂盒, 批号: 20120603; 小鼠 IL-17A 细胞因子 ELISA 检测试剂盒, 上海巧伊生物科技有限公司, 批号: 20120602。

1.3 仪器 AB7500 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; i-Mark 全自动酶标仪, 美国 Bio-RAD 公司; 台

式高速离心机及微量加样器,德国 Eppendorf 公司; -80℃超低温冰箱,美国 Thermo 公司。

1.4 分组及给药方法 取非转基因小鼠作为正常对照组,再将 HBV 转基因小鼠 50 只按随机数字表法分为 5 组,即模型组,拉米呋定组(200 mg·kg⁻¹ 生理盐水溶液),补肾清毒方(BQD)高、中、低剂量组(含补肾清毒方生药量 20, 10, 5 g·kg⁻¹),灌胃体积为 10 mL·kg⁻¹,每天给药 1 次,连续 60 d,正常对照组及模型组给予等容积的生理盐水。

1.5 标本采集及检测方法 治疗第 30 天及第 60 天,眼球后采血,肝素抗凝,用于 HBV-DNA、IL-17A 及 IFN-γ 细胞因子检测。采用实时荧光定量 PCR 方法检测小鼠外周血 HBV-DNA,操作按试剂盒说明进行,根据标准曲线法计算 HBV-DNA 含量;采用 ELISA 方法检测小鼠外周血细胞因子 IL-17A 及 IFN-γ,操作按试剂盒说明进行,在酶标仪 450nm 处读吸光度值,根据标准曲线计算细胞因子浓度。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠 HBV-DNA 的影响 见表 1。与正常对照组比较,模型组小鼠血清 HBV-DNA 含量升高($P<0.01$);与模型组比较,用药前各药物干预组小鼠血清 HBV-DNA 含量接近,差异无统计学意义($P>0.05$);用药 60 d,与用药前比较,各药物干预组小鼠血清 HBV-DNA 有下降趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠 HBV-DNA 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of BQD on HBV-DNA expression of HBV transgenic mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	HBV-DNA(log10)	
			用药前	用药 60 d
正常对照组	-	10	0	0
模型组	-	8	4.50±0.22 [*]	4.54±0.18
拉 米 夫 定 组	0.2	9	4.59±0.19 [*]	4.38±0.66
BQD 低剂量组	5	10	4.51±0.15 [*]	4.42±0.42
BQD 中剂量组	10	10	4.59±0.18 [*]	4.27±0.38
BQD 高剂量组	20	10	4.52±0.13 [*]	4.18±0.48

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$ 。

2.2 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠血清 IL-17A 的影响 见表 2。与正常对照组比较,模型组小鼠血清促炎性因子 IL-17A 表达水平升高($P<0.01$)。用药

30 d,与模型组比较,各药物干预组小鼠血清 IL-17A 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.01$),其中,BQD 高剂量组降幅最大,中剂量组次之。BQD 高中剂量组 IL-17A 表达水平均低于与拉米呋定组,差异有统计学意义($P<0.01$)。用药 60 d 与用药 30 d 比较,补肾清毒方高剂量组小鼠 IL-17A 表达水平进一步降低,差异有统计学意义($P<0.05$);中剂量组和低剂量组变化不大,差异无统计学意义($P>0.05$);拉米呋定组和模型组均明显升高,但拉米呋定组低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。用药 60 d,各中药组 IL-17A 表达水平均低于拉米呋定组,差异有统计学意义($P<0.01$),提示补肾清毒方作用优于拉米呋定组。

表 2 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠 IL-17A 含量的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Effect of BQD on IL-17A level of HBV transgenic mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	IL-17A /pg·mL ⁻¹	
			用药 30 d	用药 60 d
正常对照组	-	8	19.82±3.33	20.57±3.02
模型组	-	6	64.55±15.26 [*]	129.73±37.16 ^{*△}
拉米夫定组	0.2	7	35.57±4.12 [*]	55.06±6.89 ^{*△}
BQD 低剂量组	5	9	35.30±9.03 [*]	33.63±4.56 ^{*#}
BQD 中剂量组	10	8	25.04±2.20 ^{*#}	25.54±1.27 ^{*#}
BQD 高剂量组	20	8	18.30±2.80 ^{*#}	11.69±6.50 ^{*#△}

注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与拉米呋定组比较,[#] $P<0.01$;与用药 30 d 比较,[△] $P<0.05$ 。

2.3 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠血清 IFN-γ 的影响 见表 3。与正常对照组比较,模型组小鼠血清 IFN-γ 表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$);用药 30 d,与模型组比较,BQD 各组 IFN-γ 升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与拉米呋定组比较,BQD 各组 IFN-γ 升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。用药 60 d 与用药 30 d 比较,BQD 各组 IFN-γ 进一步升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),其中,高剂量组升幅最大,与低剂量组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);拉米呋定组 IFN-γ 变化不大,差异无统计学意义($P>0.05$)。用药 60 d,BQD 各组 IFN-γ 水平均高于拉米呋定组,差异有统计学意义($P<0.01$),提示各中药组作用优于拉米呋定组。

3 讨论

近年来,一类在分化、生物学作用等方面都不同于 Th1 和 Th2 的 Th 细胞被发现,它以分泌 IL-17A 为主要特征,被命名为 Th17^[2],IL-17A 属于促炎因子,与许多炎症反应和自身免疫性疾病的发生和发展有关。正常情况下,机体在病原体的刺激下,首先发生具有强烈组织损伤能力的 Th17 细胞应答,产

表 3 补肾清毒方对 HBV 转基因小鼠 IFN- γ 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of BQD on IFN- γ level of HBV transgenic mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	IFN- γ /pg·mL ⁻¹	
			用药 30 d	用药 60 d
正常对照组	-	8	14.98 ± 1.35	14.92 ± 1.35
模型组	-	6	16.49 ± 4.25*	16.23 ± 4.25*
拉米夫定组	0.2	7	16.62 ± 1.86	16.82 ± 1.86
BQD 低剂量组	5	9	18.77 ± 2.83**	19.12 ± 2.83** [△]
BQD 中剂量组	10	8	20.25 ± 1.44**	22.60 ± 1.44** [△]
BQD 高剂量组	20	8	24.74 ± 4.86** [▲]	26.86 ± 4.86** ^{▲△}

注：与正常对照组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$ ；与拉米夫定组比较，[△] $P < 0.01$ ；与用药 30 d 比较，[▲] $P < 0.01$ ；与低剂量组比较，[▲] $P < 0.01$ 。

生以 IL-17A 引起的中性粒细胞浸润为特征的急性炎症，以快速清除组织间隙中的病原体；随着炎症进展，转变为具有较轻组织损伤能力的 Th1 细胞应答，以 IFN- γ 引起的单个核细胞浸润为特征^[5]。

IFN- γ 是由 Th1 细胞分泌的特征性细胞因子，具有激活巨噬细胞、抗病毒和抑制 Th2 细胞作用^[6]。研究^[7]表明，CHB 急性发作较为严重时，CD8⁺ 细胞上升，Th1 型的细胞因子升高明显，此为急性炎症时免疫反应的表现特征，上升的 Th1 型细胞因子 IFN- γ 可促进 CD8⁺ 的 CTL 参与乙肝病毒的清除^[8]。

Th17 和 Th1 与肝病有密切的关系，研究^[9]发现在慢性肝炎急变期的患者外周血中 Th17 细胞的比例明显升高，且慢性肝炎急变期的患者 Th17 细胞的数量与 Th1 细胞的数量负相关，提示在慢性肝炎急变期 Th17 和 Th1 细胞失衡在疾病过程中发挥重要的作用。

对于慢性乙肝发病机理，我们提出“肾虚疫毒内伏肝血”，肾虚疫毒内伏肝血是造成乙肝慢性感染的原因，中医治疗当采用补肾清毒为法。根据清代温病医家柳宝诒的肾虚邪伏学说，即邪盛侵入机体，是因肾虚，肾虚邪伏于至虚之处，暗耗正气所致。通过临床研究发现补肾清毒法能较好改善症状，恢复肝功能，升高 Th1/Th2 比值以及一定程度上抑制 HBV^[10-11]。补肾清毒方中桑寄生、菟丝子、杜仲、山萸肉均入肝经，有很好的补肝肾、益精血的作用，治其本虚，为君药。小叶凤尾草、山栀子、叶下珠乃苦寒清热解暑之品，清其标实。丹参归心、肝经，活血通经，祛瘀止痛，能祛肝病日久之无形瘀阻，均为臣药；五指毛桃健脾化湿，行气化痰，为佐使药。

HBV 转基因小鼠由于能支持 HBV 的复制而被用于针对反转录酶的抗病毒药物及免疫调节类药物研究^[12]。本研究中，各药物干预组小鼠血清 HBV-DNA

有下降趋势，但无统计学意义。HBV 转基因模型组小鼠血清促炎因子 IL-17A 水平较正常小鼠表达水平升高。补肾清毒方能降低 HBV 小鼠血清炎性因子 IL-17A 浓度，疗效呈量效关系，BQD 高剂量组降幅最大，并且随用药时间的延长 IL-17A 浓度进一步降低。HBV 转基因模型组小鼠 IFN- γ 亦出现轻度升高。我们认为与乙肝病人相似，由于病毒刺激免疫系统，早期 IFN- γ 可轻度升高，但这种升高是短暂的。而补肾清毒方能提高 IFN- γ 浓度，疗效呈量效关系，高剂量组升幅最大，且随用药时间延长有所升高。本研究表明，补肾清毒方对转基因小鼠的 HBV-DNA 直接抑制作用不明显，但对免疫炎症因子 IL-17A 以及 IFN- γ 的水平有影响，故其对乙肝的作用可能通过调节人体免疫，降低 IL-17A 以及升高 IFN- γ 而发挥抗病毒作用的。因此，我们认为中药治疗慢性乙肝主要是通过调节机体免疫功能而发挥作用，这也是中医治疗该病的优势之一。

参考文献：

- [1] Zhang JY, Zhang Z, Lin F, et al. Interleukin-17-producing CD4⁺T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 81-91.
- [2] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6): 652-657.
- [3] 彭皓均, 沈强, 刘亚敏, 等. 补肾清毒法对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞表型和功能的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012, 22(6): 348-351.
- [4] 徐秋英, 刘亚敏, 沈强, 等. 以“伏邪学说”为指导用补肾清毒法治疗慢性乙型肝炎初探[J]. 湖南中医杂志, 2009, 25(2): 92-93.
- [5] 杨丽娟, 单保. Th17 细胞与 Th1、Treg 细胞关系的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(4): 53-55.
- [6] Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 1022-1027.
- [7] 章晓鹰, 陈建杰, 卓蕴慧, 等. 乙型肝炎患者细胞因子和 T 细胞亚群的变化[J]. 福建医药杂志, 2001, 23(5): 5-6.
- [8] Locarnini S. A virological perspective on the need for vaccination [J]. Viral Hepat, 2000, 5(7): 5-6.
- [9] Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, et al. IL-1 acts directly on CD4⁺T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(17): 7119-7124.
- [10] 童光东, 刘亚敏. 补肾清透法治疗慢性乙型肝炎 62 例[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(4): 20-22.
- [11] 童光东, 周大桥, 彭胜权, 等. 清透法对 33 例慢性乙型肝炎患者 Th1/Th2 状态的影响[J]. 中国医药学报, 2002, 7(12): 737-738.
- [12] 孔祥平, 刘光泽, 易学瑞. 复制型 HBV 转基因小鼠的建立与应用[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(9): 954-958.

(编辑：邓响潮)