

中医体质和慢性乙型重型肝炎及其与 HLA-DRB1 基因多态性的关系

刘莹¹ 武静² 荀运浩² 过建春² 余王琴³ 郑小伟^{3*}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市第十人民医院, 浙江 杭州 310000;

3. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 观察中医体质类型与浙江地区汉族人群乙型肝炎病毒(HBV)感染不同临床状态及人类白细胞抗原(HLA)-DRB1基因多态性的关系,探讨中医体质因素在慢性乙型重型肝炎发病中的作用。方法 根据诊断标准,临床收集慢性乙型重型肝炎(CSH, 80例)、慢性乙型肝炎(CHB, 60例)、慢性HBV携带者(ASC, 40例)3组患者,后两组诊断均经肝活检证实。以王琦体质分类判定中医体质类型,采用PCR-SSP法检测HLA-DRB1的基因型,比较组间体质类型分布的差异及组间基因频率的分布差异。结果 DRB1*13在慢重肝组的分布频率为37.5%,显著高于慢乙肝组的分布频率(5%)和携带者组的分布频率(2.5%),差异具有显著性($P<0.01$)。DRB1*07在慢重肝组的分布频率为7.5%,显著低于慢乙肝组(40%)和携带者组的分布频率(30%),差异具有显著性($P<0.01$)。结论 中医体质因素与HLA-DRB1基因多态性均可影响慢性乙型重型肝炎的发生,但其间关系仍需进一步研究明确。

关键词:乙型重型肝炎;中医体质;人类白细胞抗原;基因多态性

中图分类号: R 512.6⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-168X(2015)04-0046-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.04.017

The Association of Chronic Severe Hepatitis with TCM Constitution and Gene Polymorphism of HLA-DRB1

LIU Ying¹, WU Jing², XUN Yunhao², GUO Jianchun², YU Wangqin³, ZHENG Xiaowei³

(1. Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2. The Hangzhou Tenth People's Hospital, Hangzhou 310000, China;

3. The Basic Medical College of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract Objective: To explore the role the TCM constitution plays in chronic severe hepatitis (CSH) by clinically observing the relationship of the different states of Zhejiang Han people infected by HBV and their gene polymorphism of HLA-DRB1 with their TCM constitutions. **Methods:** According to the diagnostic standard, 80 CSH cases, 60 CHB cases and 40 ASC cases were collected in clinic, the latter two groups verified by liver biopsy. With patients' TCM constitution types judged by WANG Yi Constitution Classification and HLA-DRB1 genetic types determined by PCR-SSP, the difference of the distributions of constitution types and genetic frequencies were contrasted among the groups. **Results:** The distributions frequency of DRB1-13 in CSH group was 37.5% markedly higher than 5% of CHB group and 2.5% of ASC group, and the difference was significant ($P<0.01$). Meanwhile, the distributions frequency of DRB1-07 in CSH group was 3.5% markedly lower than 40% of CHB group and 30% of ASC group, and the difference was significant ($P<0.01$). **Conclusion:** Both the TCM constitution type and gene polymorphism of HLA-DRB1 can affect the occurrence

* 通讯作者: 郑小伟(1956-), 男, 教授, 主任中医师, 博士研究生导师, 浙江中医药大学基础医学院. E-mail: zhxw2103@163.com

of CSH, but its mechanism needs to further research.

Keywords hepatitis B; severe hepatitis; TCM constitution; HLA; gene polymorphism

慢性乙型重型肝炎以肝功能衰竭为特征,据统计,全球每年死于 HBV 感染引起疾病的人数为 75 万,是乙型病毒性肝炎常见的致死原因之一,病死率高达 80%,临床治疗难度高,并发症多,严重威胁患者的生命及影响患者的生存质量,其发病的根本原因是由于机体的免疫功能严重失调,特异性免疫反应增强,自身免疫反应明显,通过肝内免疫复合物反应和抗体依赖细胞毒作用造成肝细胞大块坏死^[1]。由此可见,机体免疫因素是影响该疾病发生的重要原因,而机体免疫反应的不同主要取决于人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)。HLA 复合体是首次发现的与疾病有明确关系的遗传系统^[2],也是目前已知的最复杂的人类抗原复合体。不同个体的不同免疫特性可能是慢性乙型病毒性肝炎重症化的宿主重要因素^[3]。

近年兴起的中医体质学说是中医理论体系的重要组成部分,体质在生理状态下,其特征可表现在对自然、社会环境的适应能力;在发病过程中,可表现为对疾病的抵抗能力、对某些致病因素的易感性和病理过程中疾病发展的倾向性等方面^[4]。体质类型决定了中医证候的特征及演变,同时,中医体质具有可调节性。中医体质学是从中医角度揭示宿主个体遗传特征的重要手段^[5],但目前少有与慢性乙型重型肝炎关系的文献报道。基于此,我们观察了中医体质类型与 HBV 感染不同临床状态的关系^[6],同时结合 HLA-DRB1 基因多态性探讨中医体质因素在慢性乙型重型肝炎(Chronic Severe Hepatitis, CSH)发病中的作用,并期望部分揭示这种体质差异存在的分子生物学基础,为调理病理体质防治慢性乙型重型肝炎提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 诊断及排除标准 诊断标准:参考中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会联合制定的 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[7]和 2000 年西安肝病会议相关标准^[8]。排除标准:①年龄小于 18 岁或大于 60 岁;②合并有心、脑、肾、血液系统等脏器功能严重损伤者及精神病患者;③妊娠或哺乳期妇女;④合并自身免疫性肝病、酒精性

肝病或肝豆状核变性等其它特异病因引起的慢性肝病;⑤经组织学或影像检查确认已进展至肝硬化;⑥容易引起“证”“质”混淆而影响体质类型判断的慢性 HBV 携带者(Asymptomatic HBV Carrier, ASC)和慢性乙型肝炎(Chronic Hepatitis B, CHB)患者;CSH 组排除伴 III 期以上肝性脑病者。

1.2 中医体质学分型标准 参考王琦^[9]中医体质最新分类制定。因特禀质主要指先天性疾病,在 HBV 感染疾病中无实际意义,此外,在临床研究中发现气郁质病例数极少,故不纳入这两种体质类型的患者,该实验分平和质、气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、湿热质、瘀血质 7 型进行研究。具体标准详参考文献^[9]。

1.3 临床资料 选择临床诊断为 CSH、CHB 和 ASC 患者作为研究对象,家族聚集获得 HBV 感染,来自杭州地区汉族人群,无血缘关系。其中 CSH 组 80 例,男 54 例,年龄 19~59 岁,平均(39.74±9.77)岁;CHB 组 60 例,男 40 例,年龄 18~59 岁,平均(34.42±8.64)岁;ASC 组 40 例,男 27 例,年龄 18~58 岁,平均(33.4±7.78)岁。三组间年龄及性别构成比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.4 方法

1.4.1 体质类型判断 对每例患者从形体特征、常见表现、心理特征、发病倾向及对外界环境适应能力等 5 个方面进行综合判断,舌脉象由 3 个主治医师以上职称研究人员互看决定,有分歧时以差额原则确定;原则上避免兼挟体质类型的出现,确难判断时报请课题组负责人重新进行辨别,最后归属于其主要表现类型。所有纳入的研究对象均严格根据本人及其家属提供的平日表现对患者体质类型进行综合判断,而非根据发病时的症状或证型判断。

1.4.2 标本收集 所有入组者静脉采血 10 mL,5 mL 分离血清,用于 HBV 标志物及肝功能的检测;另 5 mL EDTA 抗凝-70℃保存全血,集中进行 DNA 提取和 HLA-DRB1 基因型的测定。

1.4.3 主要试剂 (1)琼脂糖(西班牙进口);(2)TaqDNA 聚合酶(上海生物工程技术服务有限公司);(3)PCR-mix(天根生化科技(北京)有限公

司);(4)引物合成(上海英骏生物技术有限公司);(5)DL2000 DNAMarker(大连宝生物工程有限公司)。

1.4.4 PCR-SSP 法检测 HLA-DRB1 基因型 依据参考文献^[10]设计 9 对特异性引物。应用序列特异性引物-聚合酶链反应(polymerase chain reaction sequence specific primer,PCR-SSP)方法鉴定 HLA-DRB1 基因型。为消除假阴性结果,反应体系中加入阳性内对照引物为人生长激素基因(chr17),阳性内对照片段长度为 439bp,上游引物序列:5′-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTA-3′下游引物序列:5′-ATCCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC-3′。

1.5 统计学方法 实验结果采用 SPSS16.0 统计软件进行处理。两组间计量资料的比较用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析;组间频率的比较采用 χ^2 检验,记录 *P* 值、OR 值、95 % CI。当 *P*<0.05 时认为有统计学差异,等位基因分布频率以 Bonferroni 法校正 *P* 值(*P*_c)<0.05 为统计学显

著性的检验水准(*P*_c 值为 *P* 值乘以 HLA-DQA1 实际检出等位基因数的个数)。

2 结果

2.1 体质类型在病例收集过程中发现气郁质患者很少(仅 CHB 组 5 例),为便于统计学处理,我们剔除了气郁质,并按时间顺序入组 5 例其他体质患者,分别是平和质、阳虚质、气虚质、痰湿质和瘀血质。

2.2 不同体质类型患者 HLA-DRB1 基因型的分布频率比较 受样本量限制,对 3 组患者体质类型及 HLA-DRB1 基因型分布频率的关联及其差异不能进行有意义的比较,仅对不同体质类型患者 HLA-DRB1 基因型的分布频率行统计描述。本研究中阴虚质人群 HLA-DRB1 * 13 的分布频率(24.5 %)显著高于其他等位基因,湿热质人群 HLA-DRB1 * 04、* 13 的分布频率(28.2 %、21.1 %)显著增高,平和质人群和阳虚质人群中 HLA-DRB1 * 07 分布频率(29.0 %、37.8 %)明显高于其他等位基因。见表 1。

表 1 不同体质类型患者 HLA-DRB1 基因型的分布频率

HLA 基因型	HLA-DRB1 * 03	HLA-DRB1 * 04	HLA-DRB1 * 07	HLA-DRB1 * 09	HLA-DRB1 * 11	HLA-DRB1 * 12	HLA-DRB1 * 13	HLA-DRB1 * 15	HLA-DRB1 * 53
平和质(28 例)	1(3.2)	4(12.9)	9(29.0)	3(9.7)	2(6.5)	5(16.1)	1(3.2)	2(6.5)	4(12.9)
湿热质(57 例)	1(1.4)	20(28.2)	3(4.2)	11(15.5)	1(1.4)	2(2.8)	15(21.1)	5(7.0)	13(18.3)
阴虚质(32 例)	2(3.8)	10(18.9)	7(13.2)	8(15.1)	0(0.0)	1(1.9)	13(24.5)	4(7.5)	8(15.1)
阳虚质(11 例)	1(2.7)	9(24.3)	14(37.8)	4(10.8)	1(2.7)	3(8.1)	1(2.7)	1(2.7)	3(8.1)
痰湿质(15 例)	0(0.0)	9(37.5)	2(8.3)	4(16.7)	1(4.2)	0(0.0)	2(8.3)	2(8.3)	4(16.7)
气虚质(14 例)	0(0.0)	4(23.5)	3(17.6)	5(29.4)	0(0.0)	1(5.9)	1(5.9)	2(11.8)	1(5.9)
瘀血质(23 例)	1(4.0)	11(44.0)	4(16.0)	3(12.0)	1(4.0)	0(0.0)	1(4.0)	2(8.0)	2(8.0)

3 讨论

中医体质学说认为,体质可以决定是否发病,决定对某种致病因素或病邪的易感性和从化性,决定病证的形成、传变与转归,甚至能决定论治原则。慢性乙型重型肝炎证候变化多端、病情错综复杂,除了和中医的毒邪致病相关,可能还与患者的体质因素在某种程度上有密切关联。

现代中医领域中体质分类较有代表性的有王琦的九分法,匡调元的六分法,何裕民的六分法等。我们认为王琦体质最新分类系统涵盖人群范围广、代表性好,并在前期研究中确认其分类系统的科学性和可操作性^[11-12],因此采用该标准作为体质分类依据。研究结果表明 7 种基本体质类型在 CSH、CHB 和 ASC 三组人群均有出现,组间年龄、性别构成无统计学差异,反映人群代表性和可

比性好。我们的研究科学的设置了对照组,并对研究病例进行严格的筛选,很大程度上保证了统计结果的科学性和可靠性,我们的前期研究结果^[13]显示湿热和阴虚质慢性 HBV 携带者可能更易进展为 CSH,这些结果可为我们从中医体质学角度研究慢性乙型重型肝炎的发病和转归提供一定依据。

近年来,有研究表明,宿主免疫应答高低也是重症肝炎发生的重要因素之一^[14]。梁红霞^[1]等采用 PCR-SSP 对 23 例慢性乙型重型肝炎和 30 例慢性乙型肝炎患者进行 HLA-DRB1 * 1301、1302 的检测,结果发现 HLA-DRB1 * 1301、1302 在慢性乙型重型肝炎组的分布频率显著高于慢性乙型肝炎组的分布频率,得出 HLA-DRB1 * 1301、1302 基因与慢性乙型重型肝炎的发生有关的结论。国内外

研究亦在不同人种中证实 HLA-DRB1 * 13 与保护机体免受 HBV 慢性持续感染相关^[15]。目前有关 HLA 等位基因多态性与慢性乙型重型肝炎的相关研究尚不多见,有待进一步深入。

由于 HLA-DRB1 等位基因型数量较多,因此我们选择了相关文献中出现频率较高的九种等位基因型进行研究。结果显示,携带 DRB1 * 13 与慢性重型肝炎的发生有关,浙江地区汉族人群中携带 DRB1 * 13 基因位点的慢性乙型肝炎个体可能易发生重症肝炎,该基因位点可能是一个对判断病情和估计预后有价值的指标,这与梁红霞^[1] 研究报道的观点相似。此外,浙江汉族人群中 DRB1 * 07 基因位点携带者感染病毒后少数发展为慢性重型肝炎。国内外关于 DRB1 * 07 的报道多与慢性乙型肝炎相关。综合相关研究结果,我们认为,HLA-DRB1 * 13 与慢性乙型重型肝炎易感性密切相关,HLA-DRB1 * 13 可能是浙江地区慢性乙型重型肝炎的易感基因,HLA-DRB1 * 13 基因携带者,有可能因该等位基因的存在,免疫应答过强导致肝组织细胞的大量坏死和凋亡,出现肝功能衰竭;HLA-DRB1 * 07 与慢性乙型重型肝炎抗性相关,有可能是浙江地区慢性乙型重型肝炎的抗性基因。

为揭示体质差异的分子生物学基础,我们对本研究人群的体质类型与 HLA-DRB1 基因型的关系进行了初步分析。结合前述体质类型、HLA-DRB1 基因型分别与 HBV 感染后不同结局的关联,统计描述显示的差异趋势表明,易发展为 CSH 的阴虚质人群、湿热质人群中 DRB1 * 13 分布频率增高,易出现相对良性结局的平和质、阳虚质人群中 DRB1 * 07 的分布频率增高。基因多态性是个体体质差异的分子学基础,多个基因产物间相互作用的结果是体质特征的根本反映。中医体质学说和 HLA 基因多态性的研究无疑会为慢性乙型重型肝炎的发病机制提供线索,为开辟新的治疗途径奠定理论基础,具有一定研究前景,值得在扩大样本量的基础上进行研究。

参考文献

[1] 梁红霞,江河清,余祖江,等.慢性重型乙型肝炎与 HLA-DRB1 * 1301,1302 等位基因的相关性研究[J].临床医学,2004,24(2):1-3.
[2] Du YP, Deng CS, Lu DY, et al. The relation between

HLA-DQA1 genes and genetic susceptibility to duodenal ulcer in Wuhan Hans[J]. World J Gastroenterol,2000,6(1):107-110.
[3] 蒋业贵,王宇明.人类白细胞抗原-DRB1 * 1001 与慢性乙型肝炎重型化密切关联[J].中华肝脏病杂志,2003,11(4):256.
[4] 阮剑虹,沈晓红,高成璐,等.浅谈中医体质学说[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(6):18-20.
[5] 李剑松,俞剑虹,李博,等.阴虚体质系统性红斑狼疮患者 HSP70 基因多态性研究[J].湖北中医杂志,2007,29(7):20-21.
[6] 荀运浩,施军平,过建春,等.中医体质和 HBV 感染结局的关联及其与 HLA-DQA1 基因多态性的关系[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):141-145.
[7] 中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华内科杂志,2006,45(2):162-170.
[8] 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,2000,21(8):324-329.
[9] 王琦.9 种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据[J].北京中医药大学学报,2005,28(4):1-8.
[10] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSR) in 2 hours;an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation[J]. Tissue Antigen, 1992, 39(1):225-235.
[11] 荀运浩,施军平,过建春,等.中医体质和 HBV 感染结局的关联及其与 HLA-DQA1 基因多态性的关系[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):141-145.
[12] 荀运浩,过建春,施军平,等.中医体质与慢性 HBV 感染者肝纤维化的相关性探讨[J].中国中医药科技,2009,16(4):249-250.
[13] 荀运浩,过建春,陈芝芸,等.湿热及阴虚体质与慢性乙型重型肝炎发病的关系[J].中华中医药杂志,2011,26(7):1492-1495.
[14] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology[J]. Springer Semin Immunopathol,1995,17(2):261.
[15] Motta PM, Cech N, Fontan C, et al. Role of HLA-DR and HLA-DQ alleles in multibacillary leprosy and paucibacillary leprosy in the province of Chaco (Argentina)[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2007,25(10):627-631.