

· 临床 ·

慢性乙型肝炎湿证患者外周血 TCRV 亚家族谱系表达及意义探讨

董霄¹, 林佑武¹, 张诗军^{1*}, 陈泽雄¹, 程永华¹, 项婷¹, 胡斌²

(1. 中山大学附属第一医院中医科, 广州 510080; 2. 中山大学达安基因诊断中心, 广州 510080)

[摘要] 目的: 通过检测慢性乙型肝炎(CHB)湿证患者和健康人外周血 T 淋巴细胞受体 链 V 区(TCRV)亚家族的表达, 从免疫识别的角度探讨湿邪致病“蒙蔽性”的特点。方法: CHB 湿证患者组 3 例, 正常组 1 例。对湿证组采用化湿治疗(藿朴夏苓汤加减)半年, 观察湿证组治疗前与治疗取效后患者症状、体征、肝功能、HBV-DNA 定量、乙肝病毒标志物和 TCRV 亚家族表达水平变化。结果: 3 例 CHB 湿证患者治疗后肝功能恢复到正常水平, HBeAg 均发生血清学转换, HBV-DNA 定量均降低或转阴, 同时, 患者的症状明显改善, 由湿证变为非湿证。3 例治疗前 TCRV 表达偏低, 经治疗后表达升高的亚家族是 TCRV 1, TCRV 6.1, TCRV 7, TCRV 8; 3 例治疗前 TCRV 表达均偏高, 经治疗后表达降低的亚家族是 TCRV 12, TCRV 14。结论: TCRV 的表达异常可能是湿邪的“蒙蔽性”所致, 化湿中药对 CHB 湿证患者可能通过调节 TCRV 的表达, 改善免疫识别, 激活有效免疫反应来清除病毒。同时 TCRV 1, TCRV 6.1, TCRV 7, TCRV 8 可能为识别 HBV 抗原或引发免疫应答的基因片段, 在 CHB 发病中的作用值得进一步研究。

[关键词] 慢性乙型肝炎; 湿证; T 淋巴细胞受体 链 V 区

[中图分类号] R575.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0179-04

Analysis of TCRV Repertoire in Peripheral Blood of Chronic Hepatitis B Patients with Dampness Syndrome

DONG Xiao¹, LIN You-wu¹, ZHANG Shi-jun^{1*}, CHEN Ze-xiong¹, CHENG Yong-hua¹, XIANG Ting¹, HU Bin²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the 'hoodwinks nature' of dampness evil by detecting the expression of TCRV subfamilies in peripheral blood mononuclear cell of chronic hepatitis B (CHB) patients with dampness syndrome and healthy people by F-Q PCR technique. **Method:** Three patients with dampness syndrome and one healthy person were included, Three patients with dampness syndrome were treated by clearing dampness method (modified Huopuxialing decotion). The symptoms, signs and TCRV subfamilies expression were determined before and after being treated. **Result:** The liver function of three CHB patients with dampness syndrome recovered to normal levels after treatment, and the symptoms were improved in the same time. The levels of TCRV 1, TCRV 6.1, TCRV 7, TCRV 8 were increased while the levels of TCRV 12, TCRV 14 were decreased after treatment. **Conclusion:** The expression quantities of TCRV subfamilies of CHB patients with dampness syndrome were disordered, and the expression quantities of these subfamilies could be adjusted to a certain extent after clearing dampness treatment, which hinted that the abnormal expression of TCRV subfamilies' might be the cause of

[收稿日期] 20100403(002)

[基金项目] 教育部留学启动基金(2007第24号); 广东省科技计划项目基金(2007B080701012); 广东省自然科学基金(06300851)

[第一作者] 董霄, 硕士生, Tel: 020-87332200-8381, E-mail: dongxiaovictory@163.com

[通讯作者] * 张诗军, 博士, 教授, 研究方向为乙型肝炎免疫机理研究, Tel: 020-87332200-8385, E-mail: zhsjun1967@yahoo.com.cn

decreased immunity of CHB patients with dampness syndrome.

[Key words] chronic hepatitis B; dampness syndrome; TCRV subfamilies

湿证是慢性乙型肝炎(CHB)发生发展过程中常见的证候之一。作为致病因素,湿邪黏滞重着,易壅滞郁遏闭阻,易损伤人体阳气,或伤脾导致脾的免疫功能下降,最终导致机体免疫功能降低^[1]。在湿证证候的病因病机的研究中,一些学者虽然发现湿证患者细胞免疫功能降低,但对湿证患者免疫识别功能是否障碍这个核心问题未作进一步研究,即湿邪是否具有“蒙蔽性”,湿邪致病是否通过影响免疫识别功能来影响细胞免疫功能^[2-3]。

我们通过采用 FQ-PCR 技术检测 CHB 湿证患者外周血 T 淋巴细胞受体 链 V 区(TCRV)基因亚家族的表达,以及采用化湿法治疗后的变化,以 TCRV 亚家族的表达为切入点从免疫识别的角度来探讨湿证病机的“蒙蔽性”特点,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 3 例 CHB 湿证患者均来自中山大学附属第一医院中医科门诊,男性 2 例,女性 1 例,年龄分别为 25 岁,36 岁,29 岁,正常对照组 1 例,为男性,29 岁。

1.2 样本收集标准

1.2.1 诊断标准 湿证的诊断标准参照《中医证候规范》一书中的湿证相关诊断标准^[4]; CHB 的临床诊断标准参照年 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[5]。

1.2.2 健康对照者 来自健康体检者,无特殊不适,检查三大常规、肝肾功能、肿瘤标志物检测、病毒标志物检测均正常。

1.3 方法 对 CHB 湿证患者进行化湿治疗(藿朴夏苓汤加减),疗程半年,治疗前后抽血备检,同时对健康对照组抽血备检。组成:白蔻仁 10 g,厚朴 12 g,茯苓 15 g,猪苓 15 g,泽泻 9 g,杏仁 9 g,薏苡仁 9 g,藿香 12 g,法半夏 15 g,白花蛇舌草 15 g,鸡骨草 15 g。水煎服,每次 100 mL,3 次/d。

1.4 观察指标

1.4.1 症状、体征改善情况 主要观察乏力、胸闷腹胀、纳差、胁痛等主要症状和舌苔白厚腻、肝区压痛、肝区扣痛等体征变化,根据主要症状、体征轻重程度—轻(+)、中(++)、重(+++)评估。

1.4.2 TCRV 基因表达的检测 采用荧光定量

PCR 方法检测 TCRV 基因表达,TCRV 24 个亚家族基因引物参照文献[6]。基因取用表达率:每例患者 V 的取用表达率等于该亚家族的表达量除以每个亚家族表达量的和,例 $V_1 = V_1 / (V_1 + V_2 + \dots + V_{24})$ 。

1.5 统计学方法 计量资料采用配对资料 t 检验。肝功能采用美国实验仪器公司的 Manual 自动检测仪检测,乙肝病毒标志物的检测采用酶联免疫吸附分析法,HBV-DNA 检测采用荧光定量 PCR 法。

2 结果

2.1 症状、体征变化情况 3 例 CHB 湿证患者治疗前后症状、体征变化比较,治疗后主症全部消失,主舌、主脉、或见症都有明显改善。3 例 CHB 湿证患者治疗后,按照湿证诊断标准均为非湿证者。见表 1。

表 1 3 例患者治疗前后症状、体征变化

症状/体征	A1	A2	B1	B2	C1	C2
胸闷腹胀	++	-	++	-	++	-
头身困重	++	-	+	-	++	-
口黏或腻	++	-	++	-	++	-
饮食减少	++	-	++	-	++	+
胁痛	++	-	+	-	++	-
气	+	+	+	-	++	-
肠鸣	+	+	+	-	+	-
倦怠乏力	++	+	++	-	+	-
大便溏泄	+	-	+	-	+	+
舌淡红润苔白腻	++	-	+	-	++	-
脉缓无力	+	-	+	-	+	-
面色灰暗或不华	++	+	++	+	++	-
肝区叩痛或压痛	++	-	+	-	++	-

注:A, B, C 代表 3 个患者, D 代表正常人, 1 代表治疗前, 2 代表治疗后(表 2 ~3 同)。

2.2 ALT, AST, HBV-DNA, 病毒标志物变化 3 例 CHB 湿证患者治疗后肝功能均由中度升高恢复到正常水平, HBeAg 均发生血清学转换, HBV-DNA 定量均降低或转阴, 但 HBsAg 仍为阳性。见表 2。

2.3 TCRV 亚家族表达水平变化情况 3 例治疗前 TCRV 表达偏低, 经治疗后表达升高的亚家族是 TCRV 1 ($t = 7.00, P < 0.05$), TCRV 6.1 ($t = 25.39,$

$P < 0.01$), TCRV 7 ($t = 12.64, P < 0.01$)、TCRV 8 ($t = 5.36, P < 0.05$); 3 例治疗前 TCRV 表达均偏高, 经治疗后表达降低的亚家族是 TCRV 12 ($t = 5.87, P < 0.05$), TCRV 14 ($t = 5.40, P < 0.05$)。见表 3。

表 2 患者 ALT, AST, HBV-DNA, 病毒标志物

患者	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹	HBV-DNA/Copies · mL ⁻¹	HBsAg	HBeAg	Anti-HBe
A1	204.8	110.6	1.29E+09	+	+	-
B1	303.7	192.3	3.25E+08	+	+	-
C1	276.1	129.1	9.36E+07	+	+	-
A2	26.3	28.1	1.05E+03	+	-	+
B2	32.5	32.8	< 1 000	+	-	+
C2	20.3	25.0	< 1 000	+	-	+

表 3 患者 TCRV 亚家族表达水平

V	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D
V 1	3.3×10^{-3}	6.2×10^{-2}	2.9×10^{-3}	5.3×10^{-2}	4.2×10^{-3}	7.1×10^{-2}	4.9×10^{-2}
V 2	8.2×10^{-2}	7.7×10^{-2}	6.2×10^{-2}	6.8×10^{-2}	5.8×10^{-2}	6.3×10^{-2}	4.1×10^{-3}
V 3	7.2×10^{-2}	6.9×10^{-3}	3.2×10^{-2}	8.2×10^{-3}	6.0×10^{-2}	9.1×10^{-3}	3.1×10^{-4}
V 4	1.78×10^{-3}	2.4×10^{-3}	4.2×10^{-3}	6.6×10^{-3}	6.9×10^{-3}	6.2×10^{-3}	8.4×10^{-2}
V 5.1	3.2×10^{-3}	6.2×10^{-3}	5.2×10^{-3}	9.0×10^{-3}	1.9×10^{-3}	7.2×10^{-3}	6.9×10^{-2}
V 5.2	2.2×10^{-1}	9.3×10^{-3}	6.1×10^{-1}	4.2×10^{-2}	6.2×10^{-1}	4.2×10^{-2}	1.10×10^{-2}
V 6	3.0×10^{-3}	5.0×10^{-2}	4.8×10^{-3}	6.3×10^{-2}	1.2×10^{-3}	6.2×10^{-2}	7.42×10^{-2}
V 7	1.9×10^{-3}	3.1×10^{-2}	2.5×10^{-3}	5.4×10^{-2}	4.2×10^{-3}	5.9×10^{-2}	6.27×10^{-2}
V 8	4.5×10^{-3}	6.9×10^{-2}	4.2×10^{-3}	5.9×10^{-2}	3.7×10^{-3}	5.8×10^{-2}	8.52×10^{-2}
V 9	8.8×10^{-3}	9.6×10^{-3}	6.7×10^{-3}	8.2×10^{-3}	8.7×10^{-2}	9.0×10^{-3}	1.14×10^{-2}
V 10	5.2×10^{-3}	4.4×10^{-3}	3.2×10^{-3}	3.9×10^{-3}	2.3×10^{-3}	2.2×10^{-3}	6.7×10^{-3}
V 11	1.2×10^{-2}	2.2×10^{-2}	3.2×10^{-2}	3.9×10^{-2}	2.2×10^{-2}	3.5×10^{-2}	5.3×10^{-2}
V 13.1	2.5×10^{-4}	3.2×10^{-4}	4.0×10^{-4}	3.8×10^{-4}	2.4×10^{-4}	1.9×10^{-4}	5.5×10^{-4}
V 13.2	8.2×10^{-4}	9.1×10^{-4}	7.2×10^{-4}	8.2×10^{-4}	1.9×10^{-3}	2.2×10^{-3}	2.5×10^{-3}
V 14	8.1×10^{-2}	6.4×10^{-3}	7.3×10^{-2}	4.6×10^{-3}	9.2×10^{-2}	3.9×10^{-3}	2.6×10^{-3}
V 15	4.5×10^{-2}	3.7×10^{-2}	4.9×10^{-2}	5.2×10^{-2}	6.7×10^{-2}	5.0×10^{-2}	7.3×10^{-2}
V 16	5.2×10^{-5}	2.0×10^{-5}	4.9×10^{-5}	3.8×10^{-5}	4.2×10^{-5}	5.2×10^{-5}	5.6×10^{-5}
V 17	4.4×10^{-6}	5.2×10^{-6}	6.3×10^{-6}	5.7×10^{-6}	6.0×10^{-6}	6.8×10^{-6}	9.9×10^{-6}
V 18	1.2×10^{-6}	3.2×10^{-6}	5.3×10^{-6}	3.9×10^{-6}	6.2×10^{-6}	5.0×10^{-6}	4.3×10^{-6}
V 19	5.1×10^{-5}	6.7×10^{-5}	9.2×10^{-5}	1.2×10^{-4}	1.2×10^{-5}	4.2×10^{-5}	1.7×10^{-5}
V 20	7.2×10^{-5}	8.4×10^{-4}	6.9×10^{-4}	6.3×10^{-4}	9.2×10^{-5}	2.2×10^{-2}	3.1×10^{-4}
V 21.1	8.2×10^{-4}	9.9×10^{-4}	7.2×10^{-4}	8.7×10^{-4}	6.2×10^{-4}	8.6×10^{-4}	4.1×10^{-4}
V 21.2	3.7×10^{-5}	4.2×10^{-5}	1.9×10^{-5}	2.2×10^{-5}	3.0×10^{-5}	4.2×10^{-5}	5.5×10^{-5}
V 21.3	9.3×10^{-3}	5.2×10^{-4}	8.7×10^{-3}	3.2×10^{-4}	1.2×10^{-2}	9.2×10^{-4}	2.7×10^{-4}
V 22	5.2×10^{-6}	6.0×10^6	1.2×10^{-6}	5.5×10^{-6}	9.2×10^{-7}	1.1×10^{-6}	7.5×10^{-6}
V 23	8.5×10^{-3}	9.3×10^{-3}	7.7×10^{-2}	9.1×10^{-2}	9.2×10^{-2}	8.2×10^{-2}	3.0×10^{-1}
V 24	9.2×10^{-3}	8.9×10^{-4}	1.0×10^{-2}	8.9×10^{-4}	8.2×10^{-3}	4.2×10^{-4}	1.9×10^{-4}

3 讨论

湿证是 CHB 发生发展过程中常见的证候之一。作为致病因素,湿邪黏滞重着,易壅滞郁遏闭阻,易损伤人体阳气,或伤脾导致脾的免疫功能下降,最终导致机体免疫功能降低,因此研究 CHB 湿证机体免疫功能的变化具有重要的意义。

T 淋巴细胞受体(TCR)在 T 淋巴细胞抗病毒感染中发挥着至关重要的作用。TCR 是 T 淋巴细胞表面识别外来抗原与自身 MHC 类抗原复合物的受体,其识别抗原的多样性与特异性的功能在 T 细胞发挥免疫作用过程起着关键作用^[7]。T 细胞受体可变区(TCRV)至少有 24 个亚家族,在受到特异性抗原刺激时会引起某一个或某几个亚家族的 TCR 重排,形成外周多样性的 T 细胞库,以识别众多外来的抗原,因此 TCRV 基因谱系的选择性表达代表了 T 淋巴细胞对抗原产生特异性免疫应答的潜能,分析 TCRV 基因谱系的选择性表达可了解免疫系统的识别状态,是日益受到高度重视的研究领域^[8-9]。

我们以前的研究发现 CHB 湿证患者 TCRV 7 表达低下与 T 细胞免疫功能障碍密切相关,导致了病情的迁延发展,经化湿法治疗后部分 HBV-DNA、HBeAg 阴转且肝功能水平正常的患者 TCRV 7 基因表达明显增强,提示优势克隆参与 HBV 的清除及细胞毒作用,有必要从免疫识别角度深入开展湿邪致病机理的研究。^[10]

本研究发现,CHB 湿证患者治疗前 TCRV 表达偏低,经治疗后表达均升高的亚家族是 TCRV 1, TCRV 6.1, TCRV 7, TCRV 8,提示在 TCR 有效识别 HBV 病毒的过程中,V 1, V 6.1, V 7, V 8 亚家族基因优势扩增,其 V 区识别 V 病毒后基因发生了重排,激活相应的 V T 细胞,来产生有效的免疫反应。

同时还发现随着化湿治疗后的 TCRV 表达表达变化,CHB 湿证患者的自觉症状和体征均得到明显好转,肝功能恢复到正常,HBV-DNA 转阴,HBeAg 发生血清学转换,提示化湿中药对 CHB 湿证患者可能通过调节 TCRV 的表达,改善免疫识别,激活有效免疫反应来清除外来邪气。

治疗前表达升高,经治疗后表达下调的亚家族是 V 12、V 14、V 21.3,其机制尚未清楚,也可能由于 V 家族在 Ag 识别过程中很少参与有关。

综上所述,CHB 湿证患者同时多个 TCRV 亚家

族表达改变,说明 T 细胞对抗原刺激的应答是复杂的;尽管有复杂性,治疗前后 TCRV 1, V 6.1, V 7, V 8 亚家族的一致性变化,这一点可能是 CHB 湿证患者免疫异常研究的切入点,以此为切入点的深层次研究将可能丰富并推动湿证病机“蒙蔽性”的研究,同时也将为 HBV 所致 CHB 免疫功能异常,继而导致病情迁延不愈提供了一条新的治疗思路。

[参考文献]

- [1] 李艳,严灿.湿的实质探讨[J].云南中医学院学报,2000,23(3):32.
- [2] 王斌,严灿.湿阻证患者免疫调节功能改变的临床研究[J].新中医,2005,37(8):15.
- [3] 蒋文凤.茵陈五苓散对妊娠肝内胆汁淤积症患者妊娠结局的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):124.
- [4] 邓铁涛,邓中炎,罗益宽.中医证候规范[M].广州:广东科技出版社,1990:145.
- [5] 中华医学会肝病学分会,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.
- [6] Abbott W C H, Fraser J D, Geursen A, et al. The influence of a recombinant-HBsAg vaccine on the repertoire of transcribed T-cell receptor beta chain variable region genes in peripheral blood in humans[J]. Vaccine,1996,14(4):301.
- [7] Cohn M. On a key postulate of T-cell receptor restrictive function: the V-gene loci act as a single pool encoding recognition of the polymorphic alleles of the species major histocompatibility complex[J]. Immunology,2007,120(1):140.
- [8] Nishimura Y, Miura Y, Maeda M, et al. Expression of the T cell receptor Vbeta repertoire in a human T cell resistant to asbestos-induced apoptosis and peripheral blood T cells from patients with silica and asbestos-related diseases[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2006,19(4):795.
- [9] Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, et al. Comparison of CDR3 length among thymocyte subpopulations: Impacts of MHC and BV segment on the CDR3 shortening[J]. Mol Immunol,2007,44(9):2378.
- [10] 张诗军,陈泽雄,黄必军.化湿中药对慢性乙型肝炎(湿证)患者 TCRV 7 基因表达的影响[J].中医杂志,2002,43(10):780.

[责任编辑 邹晓翠]