

和解汤对慢性乙型肝炎 T 细胞受体 $V\beta_7$ 基因表达的影响^{*}

张诗军^{1△} 陈泽雄¹ 黄必军² 劳绍贤^{3△△} 秦 鉴¹

内容提要 目的 探讨和解汤对慢性乙型肝炎(简称慢乙肝)临床疗效与 T 细胞受体 $V\beta_7$ (TCRV β_7) 基因表达特征的相关性。方法 将慢乙肝患者 45 例随机分为两组,治疗组(30 例)采用和解汤治疗,对照组(15 例)采用常规西药治疗,观察治疗后 TCRV β_7 基因表达变化。结果 经过 6 个月治疗,两组 ALT 水平均显著下降($P<0.01$)。治疗组 5 例测出 TCRV β_7 基因表达,并均出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转,对照组无一例测出 TCRV β_7 基因表达,无一例出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转。HBV-DNA、HBeAg 未阴转的患者,虽肝功能恢复正常,但无一例测出 TCRV β_7 基因表达。两组总有效率比较差异无显著性,但两组显效率比较差异有显著性($P<0.01$)。结论 和解汤对 TCRV β_7 基因表达有调节作用,可能是抑制病毒复制、清除病毒的重要途径。

关键词 和解汤 慢性乙型肝炎 T 细胞受体 $V\beta_7$ 基因表达

Effect of Hejie Decoction on T-Cell Receptor $V\beta_7$ Gene Expression in Patients of Chronic Hepatitis B ZHANG Shi-jun, CHEN Ze-xiong, HUANG Bi-jun, et al *The First Affiliated Hospital to Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou (510080)*

Objective: To explore the therapeutic effect of Hejie Decoction (HJD) in treating chronic hepatitis B and its relationship with T-cell receptor $V\beta_7$ (TCRV β_7) gene expression. **Methods:** Forty-five patients of chronic hepatitis B were randomly divided into two groups. The 30 patients in the treated group were treated by HJD, and the 15 patients in the control group were treated by conventional western medicine. The therapeutic effect and changes of TCRV β_7 gene expression after treatment were observed. **Results:** After 6 months treatment, the ALT level in the two groups were obviously decreased ($P<0.01$). No significant difference was shown in comparison of the total effective rate between the two groups but it did show in comparison of markedly effective rate between them. TCRV β_7 expression was detected in 5 patients of the treated group, and HBV-DNA and HBeAg in the 5 patients were all negatively converted. While in the control group, no one had TCRV β_7 expression detected, either no one with negative conversion of HBV-DNA and HBeAg. TCRV β_7 could not be detected in all the patients whose HBV-DNA and HBeAg hasn't negatively converted, though their liver function could be normalized. **Conclusion:** HJD might have the effect of regulation on TCRV β_7 expression, it possibly is the important way for HBV replication inhibition and virucidal action of HJD.

Key words Hejie Decoction, chronic hepatitis B, T-cell receptor $V\beta_7$, gene expression

免疫系统的“敌我”识别能力是当今医学和生物学研究领域的热点之一,免疫系统中的 T 细胞负责识别并消灭被细菌和病毒感染的细胞以及癌变细胞,T 细胞中存在一种称为 T 细胞受体(TCR)的蛋白分子,

它在 T 细胞发挥免疫作用过程中起着关键作用。和解汤是临床治疗慢性乙型肝炎(简称慢乙肝)的经验方,我们自 1999 年 6 月~2001 年 3 月应用和解汤治疗慢乙肝患者,观察其临床疗效与 T 细胞受体 $V\beta_7$ (TCRV β_7) 基因表达特征和关系,现报告如下。

^{*} 广东省中医药管理局基金(No. 98374)及中山医科大学基金(No. 98019)资助课题

1. 中山医科大学附属第一医院(广州 510080);2. 中山医科大学肿瘤研究所;3. 广州中医药大学脾胃研究所

△博士生,△△导师

临床资料

1 病例选择 45 例病例均来源于我院肝炎专科门诊。诊断标准参照有关文献〔中华传染病杂志 1999;9(1):52〕标准。入选标准:(1)年龄 18~

65 岁,入选前血清 HBsAg 和 HBeAg 持续阳性 6 个月以上,入选时血清 HBV-DNA 阳性(斑点杂交法);(2)入选前 3 个月内血清 ALT > 正常值 1 倍 ~ < 5 倍。排除标准:血清 HAV、HCV、HDV、HEV、HIV 阳性,失代偿性肝病,骨髓抑制,有明显的心、脑、肾、神经、精神病和不稳定糖尿病患者,有酗酒和吸毒史者。

2 一般资料 按就诊顺序随机将患者分为两组,治疗组 30 例,男 17 例,女 13 例,年龄 20~60 岁,平均(40.6±9.2)岁,病程 0.6~12.5 年,平均(3.7±2.3)年。对照组 15 例,男 9 例,女 6 例,年龄 20~58 岁,平均(39.2±8.8)岁,病程 0.6~11.7 年,平均(2.8±2.1)年。两组患者在性别、年龄、病程等方面比较差异无显著性,具有可比性。

方 法

1 治疗方法 治疗组用和解汤(柴胡 9g 黄芩 12g 法半夏 9g 党参 30g 炙甘草 6g 大枣 9g 虎杖 30g 巴戟天 8g 白花蛇舌草 30g)治疗,每天 1 剂,水煎分早、中、晚 3 次服,疗程为 6 个月。对照组采用常规西药治疗(复合维生素 B(广州市桥制药厂生产)2 片,每天 3 次;维生素 C(每片 0.1g,由广州光华药业股份有限公司生产)0.1g,每天 3 次;维生素 E(每片 50mg,由中山市三才医药集团有限公司生产)50mg,每天 3 次;联苯双酯(每丸含联苯双酯 1.5mg,由北京协和药厂生产)5 丸,每天 3 次,或五酯胶囊(每粒含五味子甲素 11.25mg,由四川禾正制药有限公司生产)2 粒,每天 3 次,疗程同治疗组。两组在治疗期间不用其他治疗方法。

2 测定指标及方法

2.1 乙肝病毒感染标志物及肝功能测定 HBsAg、HBeAg、HBeAb、HBcAb 等检测采用酶联免疫吸附分析法;HBV-DNA 检测采用斑点杂交法;肝功能检测用美国实验仪器公司的 Manual 自动检测仪检测,所需试剂由该公司提供。于治疗前后各抽血检测 1 次上述指标。

2.2 TCRV β_7 基因表达的检测 于治疗前后各抽取外周血检测 1 次,方法如下。(1)细胞培养:取患者的外周血 8ml,用 Ficoll 密度梯度离心单个核细胞,18℃ 400g/min 离心 10min,收集细胞洗 3 次,用 RPMI-1640 培养 2~2.5ml 管,在 CO₂ 孵箱中培养 4~6 天,收集细胞保存备用。(2)提取 RNA:总 RNA 提取采用异氰胍-氯仿法,RNAGEN 购自 Promega 公司 CAT no. 25110。(3)逆转录—聚合酶链反应(RT-

PCR)按 RT-PCR 试剂盒中方法操作,设 β 肌动蛋白的基因(β -actin)为内参基因。RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司,CAT no. A3500。

TCRV β_7 基因引物参照文献^[1](5'-3')序列:CCTGAATGCCCAACAGCTCTC,扩增长度:235,由上海生工生物工程公司合成(sangon 编号:54306,54307)。图像分析:把胶片扫描而成的图像按 V β / β -actin 比值进行半定量分析,得出结果。

3 统计学方法 两组样本均数的比较用 *t* 检验,疗效比较用 χ^2 检验。

结 果

1 疗效标准 显效:主要症状消失,HBV-DNA、HBeAg 阴转,血清胆红素(SB)、ALT 降至正常,血清白蛋白(A)与球蛋白(G)比值 ≥ 1.5 。有效:主要症状好转,HBV-DNA、HBeAg 无阴转,SB、ALT 降至治疗前的 1/2 以下,A/G 比值为 ≥ 1 。无效:症状及体征无变化,HBV-DNA、HBeAg 无阴转,SB、ALT 下降不明显或升高者,A/G 值 < 1 。

2 疗效 治疗组 30 例,显效 5 例(16.7%),有效 24 例(80.0%),无效 1 例(3.3%),总有效率 96.7%。对照组 15 例,显效 0 例,有效 14 例(93.3%),无效 1 例(6.7%),总有效率 93.3%。两组总有效率比较差异无显著性,但显效率比较差异有显著性($P < 0.01$)。

3 两组患者治疗前后血 TCRV β_7 基因表达水平、ALT、HBV-DNA、HBeAg 测定结果 经 6 个月治疗,治疗组 ALT 由(103.56±10.76)U/L 降至(33.45±6.95)U/L($P < 0.05$)5 例测出 TCRV β_7 基因表达,该 5 例患者均出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转,肝功能恢复正常。对照组 ALT 由(100.56±9.36)U/L 降至(31.45±7.25)U/L($P < 0.01$),但无 1 例测出 TCRV β_7 基因表达,无 1 例出现 HBV-DNA、HBeAg 阴转。HBeAg 未阴转的患者,虽肝功能恢复正常,但无 1 例测出 TCRV β_7 基因表达。

4 治疗后两组的 TCRV β_7 的 PCR 产物凝胶电泳图谱 见图 1。经 6 个月治疗,治疗组中 HBV-DNA 和 HBeAg 阴转、肝功能恢复正常患者的 TCRV β_7 基因表达明显增强,肝功能恢复正常、HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转患者的 TCRV β_7 基因表达不明显。对照组中肝功能恢复正常、HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转患者的 TCRV β_7 基因表达不明显,肝功能未恢复正常、HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转患者的 TCRV β_7 基因表达不明显。

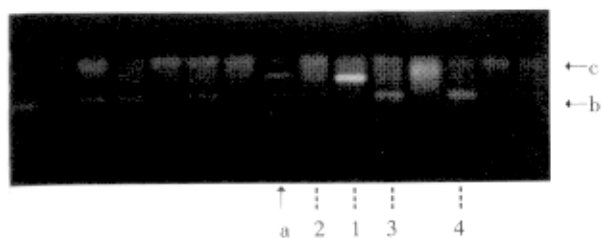


图 1 TCRV β_7 的 PCR 产物凝胶电泳图谱

注 a 为 DNA markers b 为内参基因 β -actin 表达水平 c 为 TCRV β_7 基因表达水平 ;1 为治疗组中 HBV-DNA 和 HBeAg 阴转、肝功能恢复正常患者 ;2 为治疗组中 HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转、肝功能恢复正常患者 ;3 为对照组中 HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转、肝功能恢复正常患者 ;4 为对照组中 HBV-DNA 和 HBeAg 未阴转、肝功能未恢复正常患者。

讨 论

TCR 是 T 淋巴细胞表面识别外来抗原与自身主要组织相容性复合体 (MHC I) 类抗原复合物的受体, 是 T 细胞的专有标志。TCR 由两条肽链组合而成为异源二聚体, 构成 TCR $\alpha\beta$ 的 α 链和 β 链分别由 V、J、C 基因和 V、D、J、C 基因编码的肽链, 在识别抗原时基因重排, 其两条链基因重排时形成的特异性不同的 TCR 数目极为庞大, 以识别众多外来的抗原。TCR 在细胞表面与 CD 密切结合在一起形成 TCR CD $_3$ 复合物, TCR 识别抗原后刺激信号通过 CD $_3$ 分子传递到细胞内, 激活 T 淋巴细胞。TCRV β_7 在乙肝特异性免疫反应发生发展中的作用已经明确, TCRV β_7 基因的优先表达和使用与乙肝特异性免疫反应有关^(2,3)。

T 细胞在抗病毒感染中起重要作用, 以前的研究表明慢乙肝患者 T 细胞受体功能障碍, 但近年有学者用 CD $_3$ 复合物或 CD $_2$ 分子刺激 T 细胞, 表明慢乙肝患者外周血 T 细胞功能是正常的, 从而提示 T 细胞受体功能障碍可能是 T 细胞功能障碍的重要原因⁽⁴⁾。T 细胞受体功能障碍导致 T 细胞功能障碍, 从而致使乙肝病毒逃避免疫应答, 导致持续稳定的 HBV 感染。在目前对慢乙肝治疗中存在治愈率低、复发率高的情况下, 从临床中筛选出经验方, 通过提高 T 细胞受体识别功能, 以激活细胞毒性 T 细胞, 提高杀伤乙肝病毒或诱导病毒感染细胞凋亡的能力, 是清除病毒、减少肝癌发生的重要途径。本研究发现, 在疾病发作期, TCRV β_7 呈低表达, 部分缓解期 TCRV β_7 也呈低表达, HBV-DNA、HBeAg 阴转且肝功能水平正常的患者的

TCRV β_7 呈高表达, 提示乙肝的发病可能与 TCRV β_7 呈低表达有关, 优势克隆参与 HBV 的清除及细胞毒作用。

和解汤是临床治疗肝病的经验方, 该方寒温并用, 攻补兼施, 共奏和解透邪之功, 在以前的研究中发现和解汤具有明显改善患者肝功能、抗病毒、增强慢乙肝患者 T 细胞免疫功能等多方免疫调节作用⁽⁵⁻⁸⁾。本研究中我们发现和解汤具有调节 TCRV β_7 基因表达的作用, 提示和解汤治疗慢乙肝的疗效, 特别是清除病毒的疗效, 可能与其提高 T 细胞受体识别功能有关, 提示 TCRV β_7 基因表达的升高可能是激活 T 细胞功能的前提, 与有效免疫反应有关, 与清除病毒关系密切, 研究和解汤调节 TCRV β_7 基因表达及 TCRV β_7 基因表达水平与清除病毒关系有助于提高临床疗效。和解汤并非对所有的乙肝患者都有效, 那么和解汤对哪种类型的乙肝患者有效, 是否还有其他方药的这种作用优于和解汤呢? 值得进一步研究。

参 考 文 献

1. Abbott WGH, Fraser JD, 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. *Vaccine* 1996 ;14(4):301—306.
2. Dou HY, Wu JC, Peng C, et al. Analysis of T cell receptor Vbeta gene usage during the course of disease in patients with chronic hepatitis B. *J Biomed Sci* 1998 ;6(6):428—434.
3. Xiaohua Chen, Graham Cooksley, Garwin Sing. Distinct patterns of T cell receptor distribution of peripheral blood CD $_3^+$ cells during different stages of chronic infection with hepatitis B virus. *Human Immunology* 1998 ;59:199—211.
4. 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 北京: 世界图书出版社, 1995: 291—292.
5. 张诗军, 陈泽雄, 黄必军, 等. 和解汤对慢性乙型肝炎患者 HBeAg 阴转后阴转状态的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2001 ;2(2):92—93.
6. 张诗军, 陈泽雄, 黄必军, 等. 和解汤治疗慢性乙型肝炎 HBeAg 阳性 37 例. *实用中医药杂志* 1999 ;15(10):16—17.
7. 张诗军, 陈泽雄, 黄必军, 等. 和解汤对慢性乙型肝炎 IL-8 水平的影响. *实用中医药杂志* 2000 ;16(2):4—5.
8. 张诗军, 陈泽雄, 黄必军, 等. 和解汤治疗慢性乙型肝炎的疗效分析及对 T 淋巴细胞的影响. *实用中医药杂志* 1998 ;14(增刊):7.

(收稿 2001-06-25 修回 2002-03-01)