

# 健脾解毒方对脾虚肝癌大鼠 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系变化的影响

孙保国 张磊 项婷 陈泽雄 张诗军

**摘要** **目的** 观察健脾解毒方对脾虚肝癌大鼠模型的抗癌作用与 T 细胞受体  $\beta$  链超变区第 3 互补决定区 (the third complementary-determining region of the variable region of T cell receptor  $\beta$ -chain, TCRV $\beta$ CDR3) 基因谱系的关系。**方法** 将大鼠按随机数字法分为空白对照组 (正常组, 灌胃生理盐水, 每日 1 次), 脾虚模型组 (脾虚组), 肝癌模型组 (肝癌组), 脾虚肝癌模型组 (脾虚肝癌组), 健脾解毒方 (中药) 高、中、低剂量 (75.00、37.50、18.75 g/kg 灌胃, 每日 1 次) 组和胸腺五肽 (5 mg/kg, 肌肉注射, 每周 2 次) 组 (西药组), 每组 8 只。采用苦寒泻下法制备脾虚模型, 原位移植法制备肝癌模型。基因扫描检测大鼠胸腺、肝、肝癌 20 个 TCRV $\beta$ CDR3 亚家族基因片段谱系。**结果** 中药中、高剂量健脾解毒方可延缓肝癌的体积增长 ( $P < 0.05$ ), 且其肝指数和胸腺指数与正常组相当 ( $P > 0.05$ )。正常胸腺组织和肝组织 TCRV $\beta$ CDR3 亚家族数量 (20、19)、基因片段数量 (220、113)、谱系准高斯分布比例 (100%、42.1%)、片段荧光峰面积 ( $6\,539 \pm 2\,325$ 、 $1\,238 \pm 439$ ) 在各组中均处于最高水平。中药中、高剂量组胸腺和肝组织 TCRV $\beta$ CDR3 表达接近正常组, 西药组、脾虚组和肝癌组居中, 脾虚肝癌组最差。西药组肝癌组织 TCRV $\beta$ CDR3 表达最佳。**结论** 健脾解毒方对肝癌细胞增殖的抑制作用可能与其增强 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系表达有关。

**关键词** 健脾解毒方; 肝癌; T 细胞受体; 互补决定区

Effects of Jianpi Jiedu Recipe on TCRV $\beta$ CDR3 Spectratyping of Liver Cancer Rats with Pi Deficiency Syndrome SUN Bao-guo, ZHANG Lei, XIANG Ting, CHEN Ze-xiong, and ZHANG Shi-jun  
Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou (510080)

**ABSTRACT** **Objective** To observe anti-cancer effects of Jianpi Jiedu Recipe (JJR) on liver cancer (LC) rats with Pi deficiency syndrome (PDS) and its relation with the third complementary-determining region gene spectratyping of TCRV $\beta$ -chain (TCRV $\beta$ CDR3). **Methods** Rats were divided into 8 groups according to random digit table, i.e., the blank control group (normal), the PDS group, the LC model group, the LC-PDS group, high, middle, and low dose JJR groups (75.00, 37.50, 18.75 g/kg, respectively by gastrogavage, once per day), the thymus pentapeptide group (5 mg/kg, intramuscular injection, twice per week), 8 in each group. Rats in the normal group were administered with physiological saline by gastrogavage once per day. PDS rat model was prepared by bitter-cold purgation. LC model was prepared by orthotopic transplantation method. Twenty gene subfamilies of TCR $\beta$ CDR3 in the thymus, liver, and LC tissues were detected by Gene Scan. **Results** High and middle dose JJR could postpone the growth of LC volume ( $P < 0.05$ ), with equivalent liver index and thymus index to those of the normal group ( $P > 0.05$ ). In thymus and liver tissue of the normal group, the number of clones (20 and 19), gene fragment number (220 and 113), Quasi-Gaussian distribution ratio of TCRV $\beta$ CDR3 gene repertoire (100.0% and 42.1%), and fragment fluorescence peak area ( $6\,539 \pm 2\,325$  and  $1\,238 \pm 439$ ) were at the highest level among the 8 groups. TCRV $\beta$ CDR3 expressions in thymus and liver tissue of high and middle dose JJR groups were approximate to those of the normal group. They were in the middle of the thymus pentapeptide

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 81102581); 广东省中医药管理局立项资助科研课题 (No. 20111161, No. 20141046)

作者单位: 中山大学附属第一医院中医科 (广州 510080)

通讯作者: 陈泽雄, Tel: 020-87755766 转 8385, E-mail: zexiong333@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0735

group, the PDS group, the LC model group, and poorest in the LC-PDS group. TCRV $\beta$ CDR3 in liver tissue expressed the best in the thymus pentapeptide group. Conclusion JJR might inhibit the growth of LC cells, and its mechanism might be related to enhancing TCRV $\beta$ CDR3 spectratype expression.

**KEYWORDS** Jianpi Jiedu Recipe; liver cancer; T cell receptor; complementary-determining region

基于“脾气亏虚、痰瘀毒结”肝癌基本病机构建的健脾解毒方是治疗肝癌的有效方剂<sup>[1]</sup>。研究提示该方治疗肝癌的机制在于增强肝癌动物模型的整体抗癌能力,保持肝癌模型的体重和内脏重量的稳定和增长,延长其生存时间<sup>[2,3]</sup>。从免疫功能的变化来探索中医药治疗疾病的机制符合中医辨证论治、整体观念的思维。免疫识别是免疫功能正常发挥的关键环节,T 细胞受体  $\beta$  链超变区第 3 互补决定区(the third complementary-determining region of the variable region of T cell receptor  $\beta$ -chain, TCRV $\beta$ CDR3) 多态性是免疫识别最主要的蛋白成分<sup>[4,5]</sup>。TCRV $\beta$ CDR3 基因库有着数量极为庞大的潜在多样性<sup>[6]</sup>,用以识别一切内外抗原,TCRV $\beta$ CDR3 各亚家族谱系是 T 细胞经过分化成熟的一次重排和疾病(如恶性肿瘤)诱导的二次重排产生相应 T 细胞克隆形成的基因库<sup>[7]</sup>。

TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系的变化可以反映机体整体免疫功能的状态,以此来探索“健脾解毒方”的抗癌机制符合中医学理论特色。目前关于肝癌机体 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系变化的研究尚少,中医药对肝癌 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系变化的影响未见报道。本实验对上述问题进行了初步研究。

## 材料与方法

**1 细胞株** Walker-256 瘤株购于中山大学实验动物中心细胞库。

**2 动物** SPF 级 4~6 周龄雄性 Lewis 大鼠 120 只,体重(145 $\pm$ 15)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。SPF 级 4~6 周龄 BALB/c 雄性裸鼠 4 只,体重(15 $\pm$ 2)g,购于广东省医学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0002。本研究在中山大学附属第一医院动物实验中心 SPF 级动物实验室[环境设施许可证号:SYXK(粤)2010-0108]和中山大学科技公共平台进行。

**3 药物** 健脾解毒方(组成:党参 30 g 茯苓 15 g 白术 15 g 炙甘草 6 g 柴胡 12 g 莪术 15 g 半枝莲 30 g,成人 1 日剂量)颗粒饮片购自深圳三九药业有限公司,70 $^{\circ}$ C 生理盐水充分溶化定容(4 g 生药/mL),现配现用;玄明粉购于广州市药材公

司,紫外线消毒后生理盐水溶化定容(3 g 生药/mL);注射用胸腺五肽,10 mg/支,北京双鹭药业股份有限公司,批号:20130806。

**4 试剂及仪器** 主要 PCR 试剂:Trizol(美国 Life Technologies 公司,货号:15596-026),氯仿、异丙醇、无水乙醇、逆转录试剂(广州吉坤生物技术有限公司),PCR 扩增试剂盒(日本 TaKaRa Bio 株式会社,货号:DR011)。主要 TCRVBCDR3 谱型分析试剂购自美国 Life Technologies 公司;Hi-Di Formamide,批号:1305031,序列号:4404307,主要成分:甲酰胺;GeneScan 600 LIZ,批号:1206023,序列号:4408399,主要成分:LIZ 染料标记的单链 DNA。Matrx VIP-3000 小动物麻醉机(美国 Midmark 公司)。普通 PCR 仪(C1000 Thermal cycler,美国 Bio-Rad 公司),基因测序仪(3500XL,美国 Life Technologies 公司),Genemarker V2.2 基因片段分析软件(美国 SoftGenetics 公司)。TCRVBCDR3 引物序列<sup>[8]</sup>如下,V $\beta$ 1:5'-CTGAATGCCAGAAAAGT-3', V $\beta$ 2: 5'-TGGCCACACGGGTCACTGATAC-3', V $\beta$ 3: 5'-GACAGTATAGACTTGGTCAAG-3', V $\beta$ 4: 5'-ATCAAAAACCTTATGGACAACAG-3', V $\beta$ 5: 5'-GATTCTCAGTCCAGCAGTTC-3', V $\beta$ 6: 5'-CTCTCACTGTGAAATCTGCCC-3', V $\beta$ 7: 5'-TACAAGGTCTCTCGGAAGAAA-3', V $\beta$ 8: 5'-GGGTACAAGGTCTCCAGACC-3', V $\beta$ 9: 5'-TTAACATCACCTCTGCAGGC-3', V $\beta$ 10: 5'-ATCAAGTCTGTAGAGC-CGGGTGA-3', V $\beta$ 11: 5'-CAGCTCAGATGCCCAATCAG-3', V $\beta$ 12: 5'-ATGCAGGGGCACTCAAGGAT-3', V $\beta$ 13: 5'-ACTGAAGGAGTCAACTCCACT-3', V $\beta$ 14: 5'-TGAACAGTTCATCCTGAGCAC-3', V $\beta$ 15: 5'-TCCATCAGTCATCCAAATTTATCC-3', V $\beta$ 16: 5'-TTAGTTGATAGGCAACACGGT-3', V $\beta$ 17: 5'-AGTGTGTCAGACTTACAC-3', V $\beta$ 18: 5'-AGCCGCCAAACCTAACATTC-3', V $\beta$ 19: 5'-TCACTAACAAAACATGTACCA-3', V $\beta$ 20: 5'-CTGTGCATCAAATAGACATGGT-3';C $\beta$ :5'-CACATGGTCAGGGAAGAAGCC-3', C $\beta$ -labeled primer: 5'-FAM-CTTGGGTGGAGTCACCGTTTTTC-3'。引物由 Invitrogen 公司 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪合成。

**5 动物分组、模型制备及干预方法** 将 120 只大鼠按随机数字法分为 8 组:正常组、脾虚组、肝癌组、脾虚肝癌组、西药组及健脾解毒方(中药)低、中、高剂量组,每组 15 只。研究分为 2 个阶段,第 1 阶段正常组、肝癌组独立同步饲养,脾虚组、脾虚肝癌组、中药各剂量组及西药组制备脾虚模型(21 日),第 2 阶段肝癌、脾虚肝癌、中药各剂量组及西药组制作肝癌模型,脾虚组采集标本,进入干预研究阶段,2 个阶段间隔 1 日。第 2 阶段药物干预 2 周,正常组:灌胃生理盐水(1 mL/100 g),1 次/日,至实验结束。脾虚组:脾虚模型制备参照参考文献[9],动物分笼饲养,每笼 5 只大鼠,垫料加湿至滴水,自由饮水,隔日禁食(进食/禁食 24 h 交替),灌胃玄明粉溶液(0.1 g/1 mL,1 mL/100 g),1 次/日,持续 21 日后恢复正常饲养。肝癌组:灌胃生理盐水(1 mL/100 g),1 次/日,3 周后制备原位移植性肝癌模型,肝癌模型制备参照参考文献[9],用 Walker-256 瘤株以 100 万个细胞/mL 浓度接种于 BALB/c 雄性裸鼠颈部皮下,待皮下移植瘤长至直径约 1 cm 时,大鼠吸入麻醉,局部常规消毒行左上腹横切口,暴露肝脏,切取肿瘤,在 Hank's 液中,去除坏死组织后切成 1 mm<sup>3</sup> 小块,取上述瘤组织 1 块,在离体 40 min 内用粗针头植入大鼠肝叶深部实质内,压迫止血后全层关腹。造模成功率为 100%。造模后灌胃生理盐水(1 mL/100 g),1 次/日,持续 2 周。脾虚肝癌组:脾虚模型成模后制备原位移植肝癌模型,成模后灌胃生理盐水(1 mL/100 g),1 次/日,连续 2 周。中药低、中、高剂量组分别灌胃(分别相当于 60 kg 成人剂量 10、20、40 倍)健脾解毒方 18.75、37.50、75.00 g/kg (1 mL/100 g),1 次/日,连续 2 周。西药组肌肉注射胸腺五肽注射液 5 mg(相当于 60 kg 成人剂量 75 倍),每周 2 次,持续 2 周。

**6 检测指标及方法** 实验过程中每天观察动物体重、脏尾、扎堆情况,记录脾虚造模期间及肝癌造模期间各时间点的平均体重。停药后第 3 天深度麻醉动物,取肝、胸腺、肝癌组织,低温冷冻,测量脏器质量、肝癌体积,计算肿瘤体积指数。肿瘤体积 = 最大直径(mm) × 最小直径(mm)<sup>2</sup>/2,肿瘤体积指数 = 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)/终末体重(g),计算胸腺、肝脏、胰腺指数,脏器指数 = 脏器重量(g) × 100/终末体重(g),脾虚造模结束时参照参考文献[10]计算脾虚积分检测造模成功情况。检测大鼠胸腺、肝脏、癌组织 TCRVβCDR3 各亚家族表达水平(各亚家族荧光图谱下峰总面积、单个亚家族最大峰下面积及占所在亚家族峰图下总面积的比例)、TCRVβCDR3 各亚家族多

样性变化(克隆型表达与无表达变化、各亚家族片段表达与无表达变化)、各亚家族辛普森多样性指数(Simpson's diversity index, Ds)。

**6.1 RNA 提取和 PCR 反应** RNA 提取:取冷冻胸腺组织、肝组织、肝癌组织,微量天平称量 0.1 g,置 1.5 mL EP 管中,剪刀剪碎组织并用玻璃棒研磨,加入 1 mL Trizol 振荡 15 s,室温静置 5 min;在细胞沉淀中加入 1 mL Trizol 振荡 15 s,室温静置 5 min;再加入 200 μL 氯仿,振荡 15 s,4 ℃ 12 000 r/min,离心 15 min。取上清液于 1.5 mL 离心管中,加入等体积异丙醇,轻摇混匀,−20 ℃ 沉淀 30 min;4 ℃ 12 000 r/min,离心 15 min。弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇(DEPC 水配制)洗涤 RNA 沉淀,混匀,4 ℃ 12 000 r/min,离心 5 min,吸去乙醇。空气或真空干燥 5~10 min(不完全干燥),加 DEPC 处理水溶解 RNA,−80 ℃ 保存备用。

**逆转录 PCR 反应:**取 4 μL RNA 模板做逆转录反应,反应体系如下:DEPC · H<sub>2</sub>O 11.5 μL,5 × RT Buffer 4 μL,dNTP 0.5 μL,mMLV 0.5 μL,Primer RTCβ (10 pmol/μL) 0.5 μL,RNA 4 μL,总体积 20 μL。反应条件:37 ℃ 45 min,95 ℃ 3 min。

**定性 PCR 反应:**待测样本按以下反应体系进行,H<sub>2</sub>O 27.2 μL,10 × PCR Buffer 12.5 μL,dNTP Mixture 4 μL,TaKaRa Taq 0.3 μL,VβPrimer (10 pmol/μL) 1 μL,Cβ-labeled primer (10 pmol/μL) 1 μL,cDNA 4 μL,总体积 50 μL。反应条件:第一阶段 95 ℃ 15 min;第二阶段(共 40 循环)93 ℃ 40 s,55 ℃ 50 s,72 ℃ 60 s;第三阶段 72 ℃ 5 min。

**6.2 TCRVβCDR3 谱型检测** 准备片段分析体系:在 PCR 反应管中加入 13.5 μL Hi-di Formamide 和 0.5 μL 600 Liz,再加入 PCR 产物 1 μL,短时振荡混合均匀,进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底。混合后的样品在定性 PCR 仪上 95 ℃ 变性 5 min,迅速置冰水中冷却 4 min 后,吸取 10 μL 变性后的产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板,盖好,上机进行片段分析(按照 ABI 3500XL 基因测序仪操作手册进行操作)。

### 6.3 TCRVβCDR3 谱型分析

**6.3.1 Genemarker 数据分析** 导入 ABI 3500 基因测序仪获得的 TCRVβCDR3 片段分析据,设置参数为:Template name:ABI-5-Color,Panel:NONE,Size Standard:GS600,Standard color:Orange,analysis type: AFLP,其余内置参数默认,运行软件获得 20 个 TCRVβCDR3 亚家族的基因片段

谱型图谱和相应数据。

6.3.2 TCRVβCDR3 谱型数据分析 参照参考文献[11,12]。肝组织和癌组织中 TCRVβCDR3 各亚家族的克隆型和相应位点均以正常胸腺组织为标准,删除与正常胸腺组织 TCRVβCDR3 各亚家族位点不一致位点的荧光峰及其数据,删除相差 1 bp 或 2 bp 的非框架内重排数据,以保持组间可比性。每组检测 3 个样本(3 只)。Vβ1 ~ Vβ20 简写为 V1 ~ V20。数据分析时 TCRVβCDR3 各亚家族表达与不表达的亚家族为原始数据,各亚家族的荧光峰数、克隆型(准高斯分布、偏峰、单克隆)计数为 3 个样本的中位数,Ds 值、荧光峰的面积和各峰的相对荧光强度为 3 个样本中中等大小的均数。荧光峰下面积按原始数据/1 000 计算,Ds 值为原始数据×100 表示,由于这些数据只有 3 个样本,不满足统计假设检验分析的样本量,所以不进行统计学检验。

克隆型的分析采用视觉评估法,相对荧光强度[RI(%)=片段峰的面积/所在家族所有峰的面积×100%]评价克隆的变异;TCRVβCDR3 各亚家族谱系荧光峰下面积评价相应基因片段的克隆水平;Ds 评价 TCRVβCDR3 各亚家族谱系的复杂性。

$$Ds = 1 - \frac{\sum_i n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件分析数据,连续计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态计量资料采用方差分析,非正态资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脾虚造模后各组脾虚积分比较 正常组和肝癌组脾虚积分分别为(5±3)和(6±3)分,低于其余各组[脾虚组:(17±6)分,脾虚肝癌组:(18±5)分,中药低剂量组:(17±5)分,中药中剂量组:(17±4)分,中药高剂量组:(17±7)分,西药组:(17±7)分],

差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2 各组大鼠脏器指数及平均体重比较(表 1) 与正常组比较,脾虚组脾虚平均体重降低( $P < 0.01$ ),肝癌组肝癌平均体重降低( $P < 0.01$ ),脾虚肝癌组脾虚平均体重及肝癌平均体重降低( $P < 0.01$ )。与脾虚组比较,肝癌组脾虚平均体重、肝癌平均体重升高,脾虚肝癌组、中药中、高剂量组肝指数及胸腺指数降低( $P < 0.01$ )。与肝癌组比较,脾虚肝癌组、中药低剂量组及西药组脾虚平均体重及肝癌平均体重降低( $P < 0.01$ ),中药中、高剂量组肝癌体积指数、胸腺指数、脾虚平均体重及肝癌平均体重降低( $P < 0.01$ )。与脾虚肝癌组比较,中药中、高剂量组肝癌体积指数、肝指数、胸腺指数降低( $P < 0.01$ )。与中药低剂量组比较,中药中、高剂量组肝癌体积指数、肝指数降低( $P < 0.05$ )。与中药中剂量组比较,西药组肝癌体积指数、肝指数升高( $P < 0.05$ )。与中药高剂量组比较,西药组肝癌体积指数、肝指数升高( $P < 0.05$ )。

3 TCRVβCDR3 亚家族谱系多样性研究结果概况(表 2) 在正常胸腺组织中获得 20 个 TCRVβCDR3 亚家族图谱,正常肝组织获得 19 个 TCRVβCDR3 亚家族图谱,片段大小为 100 ~ 250 bp,且图谱均呈准高斯分布(正态分布)。随着脾虚、肝癌、脾虚肝癌造模的进行,各亚家族表达图谱形态、克隆数量及各片段表达量发生了明显改变,如:脾虚、肝癌、脾虚肝癌因素可以造成亚家族克隆型的减少、片段表达量的下降、TCRVβCDR3 多样性的下降、高斯分布的减少、偏峰寡克隆和单克隆型的增加等,健脾解毒方对此均有不同程度的改善作用。胸腺组织中,脾虚肝癌组和中药低剂量组无表达的亚家族分别为 3 个和 5 个,除 V7 外无共同无表达的亚家族。除正常组外其余各组均表现为 V7 共同无表达,各组无表达亚家族共 13 个。肝组织中,脾虚组无表达亚家族 3 个,肝癌组无表达亚家族 5 个,脾虚肝癌组无表达亚家族 4 个,且 3 组间除 V7 外无共同无表达亚家族;脾

表 1 各组大鼠脏器指数及平均体重比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n  | 肝癌体积指数     | 肝指数        | 胸腺指数           | 脾虚平均体重(g) | 肝癌平均体重(g) |
|-------|----|------------|------------|----------------|-----------|-----------|
| 正常    | 15 | —          | 3.6±0.3    | 0.093±0.031    | 205±10*▲  | 250±16▲   |
| 脾虚    | 15 | —          | 4.4±0.3▲○  | 0.142±0.044▲○  | 139±11    | —         |
| 肝癌    | 15 | 2.9±0.4    | 3.9±0.3    | 0.133±0.033▲   | 202±7*    | 231±9*    |
| 脾虚肝癌  | 15 | 2.2±1.0    | 4.3±0.4*   | 0.112±0.039*   | 142±10△   | 162±11△   |
| 中药低剂量 | 15 | 2.3±0.5    | 4.2±0.8*   | 0.103±0.018    | 148±11△   | 167±13△   |
| 中药中剂量 | 15 | 1.8±0.6▲▽  | 3.9±0.3*▲▽ | 0.089±0.019*▲▲ | 146±8△    | 167±6△    |
| 中药高剂量 | 15 | 1.8±1.5▲▲▽ | 3.7±0.3*▲▽ | 0.091±0.022*▲▲ | 145±5△    | 168±4△    |
| 西药    | 15 | 2.2±0.6○▽  | 4.2±0.5▽   | 0.105±0.023    | 143±7△    | 162±6△    |

注:“脾虚平均体重”和“肝癌平均体重”分别指脾虚和肝癌造模期间大鼠平均体重;与脾虚组比较,\* $P < 0.01$ ;与肝癌组比较,▲ $P < 0.01$ ;与脾虚肝癌组比较,▲ $P < 0.01$ ;与中药低剂量组比较,▽ $P < 0.05$ ;与中药中剂量组比较,▼ $P < 0.05$ ;与中药高剂量组比较,○ $P < 0.05$

虚肝癌组、中药低、高剂量组和西药组无表达亚家族分别为 4、3、3、4 个,其中 V16 为共同无表达亚家族;而中药中剂量组无表达亚家族 2 个,其中 V3 是其与肝癌组、中药高剂量组和西药组共同无表达亚家族;各组共无表达亚家族 25 个。肝癌组织中,肝癌组和西药组各无表达 2 个亚家族,V16 是脾虚肝癌组(无表达 4 个亚家族)、3 个中药组(分别无表达 6、5、5 个亚家族)和西药组共同无表达的亚家族,V3 是脾虚肝癌组、中药低、中剂、高量组共同无表达亚家族,各组共同无表达 24 个亚家族。

脾虚组和肝癌组 2 种组织中并无共同无表达的亚家族(除 V7),脾虚肝癌组 3 种组织共同无表达的亚家族为 V1 和 V16,中药组低剂量组肝和癌组织共同

无表达 V5 和 V16,中药中剂量组和西药组肝和癌组织共同无表达 V3,中药高剂量组肝和癌组织共同无表达 V16。其中 V4、V6、V14、V15、V17、V18 共 6 个亚家族在各干预组各组织中无表达。

4 胸腺组织、肝组织、肝癌组织各 TCRVβCDR3 亚家族表达的片段数目(表 3~5) 胸腺组织、肝组织、肝癌组织总峰数分别为 1 032、504、367。正常组胸腺组织 TRCVβCDR3 各亚家族总的峰数最多达 220 个,以正常组胸腺组织为参照,脾虚组为其 48.2%,肝癌组为其 63.6%,脾虚肝癌组为其 37.7%,中药低、中、高剂量组分别为其 23.6%、70.0%、65.5%,西药组为其 60.5%。正常组肝组织总 TRCVβCDR3 各亚家族的总峰数为 113 个,其余各

表 2 各组无表达 TCRVβCDR3 亚家族

| 组别    | n | 胸腺组织               | 肝组织                | 肝癌组织                  |
|-------|---|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 正常    | 3 | 无                  | V7                 | —                     |
| 脾虚    | 3 | V7                 | V7,V2,V19          | —                     |
| 肝癌    | 3 | V7                 | V3*,V7,V11,V12,V13 | V5,V7                 |
| 脾虚肝癌  | 3 | V1,V7,V16          | V1*,V7,V8,V16*     | V1*,V3*,V7,V16*       |
| 中药低剂量 | 3 | V7,V12,V14,V19,V20 | V5,V7,V16*         | V3*,V5,V7,V9,V10,V16* |
| 中药中剂量 | 3 | V7                 | V3*,V7             | V3*,V7,V10,V12,V16*   |
| 中药高剂量 | 3 | V7                 | V3*,V7,V16*        | V7,V9,V10,V16*,V20    |
| 西药    | 3 | V7                 | V3*,V7,V12,V16*    | V3*,V7                |

注: \* 为主要的共同无表达 TCRVβCDR3 亚家族

表 3 各组胸腺组织各亚家族荧光峰数 (个)

| 组别    | n  | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | V8 | V9 | V10 | V11 | V12 | V13 | V14 | V15 | V16 | V17 | V18 | V19 | V20 | 合计    |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 正常    | 3  | 12 | 11 | 11 | 11 | 11 | 9  | 8  | 12 | 11 | 13  | 13  | 11  | 10  | 10  | 13  | 10  | 11  | 11  | 9   | 13  | 220   |
| 脾虚    | 3  | 5  | 9  | 6  | 6  | 5  | 5  | 0  | 7  | 7  | 6   | 4   | 5   | 6   | 7   | 5   | 1   | 5   | 7   | 7   | 3   | 106   |
| 肝癌    | 3  | 5  | 7  | 7  | 9  | 6  | 6  | 0  | 8  | 9  | 7   | 7   | 7   | 6   | 9   | 7   | 6   | 6   | 10  | 8   | 10  | 140   |
| 脾虚肝癌  | 3  | 0  | 6  | 5  | 3  | 5  | 6  | 0  | 5  | 5  | 5   | 2   | 4   | 5   | 6   | 5   | 0   | 3   | 6   | 7   | 5   | 83    |
| 中药低剂量 | 3  | 2  | 7  | 3  | 5  | 6  | 8  | 0  | 7  | 5  | 1   | 3   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 52    |
| 中药中剂量 | 3  | 9  | 8  | 9  | 8  | 9  | 8  | 0  | 9  | 9  | 7   | 7   | 7   | 7   | 9   | 8   | 7   | 8   | 9   | 8   | 8   | 154   |
| 中药高剂量 | 3  | 7  | 10 | 6  | 7  | 8  | 9  | 0  | 9  | 9  | 7   | 7   | 7   | 8   | 7   | 7   | 7   | 7   | 8   | 7   | 7   | 144   |
| 西药    | 3  | 7  | 8  | 4  | 8  | 8  | 7  | 0  | 8  | 9  | 7   | 8   | 1   | 8   | 7   | 7   | 6   | 5   | 9   | 8   | 8   | 133   |
| 合计    | 24 | 47 | 66 | 51 | 57 | 58 | 58 | 8  | 65 | 64 | 53  | 51  | 42  | 51  | 55  | 53  | 38  | 46  | 61  | 54  | 54  | 1 032 |

表 4 各组肝组织各亚家族荧光峰数 (个)

| 组别    | n  | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | V8 | V9 | V10 | V11 | V12 | V13 | V14 | V15 | V16 | V17 | V18 | V19 | V20 | 合计  |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 0   |     |
| 正常    | 3  | 3  | 7  | 5  | 7  | 7  | 5  | 0  | 9  | 5  | 8   | 6   | 3   | 5   | 6   | 6   | 8   | 5   | 6   | 7   | 5   | 113 |
| 脾虚    | 3  | 6  | 6  | 4  | 3  | 5  | 3  | 0  | 7  | 4  | 6   | 6   | 3   | 5   | 4   | 5   | 2   | 5   | 7   | 0   | 4   | 85  |
| 肝癌    | 3  | 1  | 5  | 0  | 3  | 4  | 5  | 0  | 5  | 6  | 0   | 0   | 5   | 3   | 4   | 6   | 1   | 2   | 3   | 3   | 2   | 58  |
| 脾虚肝癌  | 3  | 0  | 1  | 1  | 4  | 1  | 4  | 0  | 2  | 4  | 5   | 3   | 1   | 3   | 4   | 6   | 0   | 4   | 2   | 2   | 4   | 51  |
| 中药低剂量 | 3  | 1  | 2  | 2  | 4  | 0  | 1  | 0  | 6  | 1  | 3   | 1   | 1   | 1   | 5   | 5   | 0   | 5   | 4   | 1   | 1   | 44  |
| 中药中剂量 | 3  | 2  | 3  | 0  | 1  | 3  | 4  | 0  | 5  | 4  | 2   | 1   | 3   | 3   | 5   | 3   | 1   | 5   | 3   | 1   | 1   | 50  |
| 中药高剂量 | 3  | 1  | 4  | 0  | 3  | 4  | 4  | 0  | 4  | 2  | 3   | 3   | 2   | 2   | 4   | 6   | 0   | 4   | 5   | 4   | 3   | 58  |
| 西药    | 3  | 2  | 5  | 0  | 5  | 2  | 3  | 0  | 3  | 1  | 3   | 1   | 0   | 2   | 2   | 4   | 0   | 5   | 2   | 2   | 3   | 45  |
| 合计    | 24 | 16 | 33 | 12 | 30 | 26 | 29 | 0  | 41 | 27 | 30  | 21  | 18  | 24  | 34  | 41  | 12  | 35  | 32  | 20  | 23  | 504 |

表 5 各组癌组织各亚家族荧光峰数 (个)

| 组别    | n  | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | V8 | V9 | V10 | V11 | V12 | V13 | V14 | V15 | V16 | V17 | V18 | V19 | V20 | 合计  |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 0   |     |
| 肝癌    | 3  | 2  | 3  | 4  | 7  | 0  | 4  | 0  | 6  | 5  | 4   | 2   | 2   | 3   | 5   | 5   | 2   | 4   | 3   | 6   | 4   | 71  |
| 脾虚肝癌  | 3  | 0  | 3  | 0  | 2  | 3  | 4  | 0  | 3  | 3  | 2   | 2   | 1   | 3   | 5   | 5   | 0   | 4   | 2   | 5   | 3   | 50  |
| 中药低剂量 | 3  | 1  | 3  | 0  | 4  | 0  | 3  | 0  | 3  | 0  | 0   | 1   | 1   | 2   | 2   | 8   | 0   | 3   | 4   | 2   | 3   | 40  |
| 中药中剂量 | 3  | 1  | 5  | 0  | 4  | 3  | 5  | 0  | 3  | 1  | 0   | 2   | 0   | 2   | 5   | 5   | 0   | 3   | 3   | 2   | 2   | 46  |
| 中药高剂量 | 3  | 2  | 6  | 4  | 4  | 5  | 5  | 0  | 6  | 0  | 0   | 3   | 3   | 5   | 4   | 5   | 0   | 4   | 6   | 1   | 0   | 63  |
| 西药    | 3  | 6  | 6  | 0  | 6  | 7  | 7  | 0  | 6  | 3  | 5   | 3   | 5   | 6   | 7   | 4   | 4   | 4   | 6   | 6   | 6   | 97  |
| 合计    | 18 | 12 | 26 | 8  | 27 | 18 | 28 | 0  | 27 | 12 | 11  | 13  | 12  | 21  | 28  | 32  | 6   | 22  | 24  | 22  | 18  | 367 |

组明显下降,以正常组肝组织为参照,脾虚组为其 75.2%,肝癌组为其 51.3%,脾虚肝癌组为其 45.1%,中药低、中、高剂量组分别为其 38.9%、44.3%、51.3%,西药组为其 39.8%。癌组织中,TRCVβCDR3 各亚家族的总峰数脾虚肝癌组为 50,以此为参照,肝癌组为其 142.0%,中药低、中、高剂量组分别为其 80.0%、92.0%、126.0%,西药组为其 194.0%。

5 各组胸腺、肝、肝癌组织 TCRVβCDR3 谱型 Ds 比较(表 6) 各组胸腺组织 TCRVβCDR3 谱型 Ds 由高到低依次为:正常组 > 中药中剂量组 = 中药高剂量组 > 肝癌组 > 脾虚组 = 西药组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;肝组织:正常组 > 脾虚组 > 中药高剂量组 > 中药中剂量组 > 西药组 > 脾虚肝癌组 > 肝癌组 > 中药低剂量组;癌组织:西药组 > 肝癌组 > 脾虚肝

癌组 > 中药高剂量组 > 中药中剂量组 > 中药低剂量组。

6 各组胸腺、肝、肝癌组织中 TCRVβCDR3 谱型克隆型比较(表 7) 各组胸腺组织“准高斯分布克隆比例”由高到低依次为:正常组 > 中药中剂量组 = 中药高剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 脾虚组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;肝组织:正常组 > 西药组 > 脾虚组 = 中药高剂量组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 中药低剂量组 > 脾虚肝癌组;癌组织:中药高剂量组 > 西药组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 中药低剂量组 > 脾虚肝癌组。

各组胸腺组织“偏峰分布克隆比例”由高到低依次为:脾虚肝癌组 > 脾虚组 > 中药低剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 中药中剂量组 = 中药高剂量组 = 正常组;肝组织:脾虚组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 > 肝癌组 > 西药组 > 正常组 > 中药中剂量组 > 中药低剂量组;癌组织:脾虚肝癌组 > 肝癌组 > 中药低剂量组 > 西药组 > 中药高剂量组 = 中药中剂量组。

各组胸腺组织“单克隆分布克隆比例”由高到低依次为:中药低剂量组 > 西药组 = 脾虚组 > 中药中剂量组 = 中药高剂量组 = 肝癌组 = 脾虚肝癌组 = 正常组;肝组织:中药低剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 中药高剂量组 > 正常组 = 脾虚组;癌组织:中药低剂量组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药高剂量组 > 肝癌组 = 西药组。

表 6 各组胸腺、肝、肝癌组织 TCRVβCDR3 谱型 Ds 比较

| 组别    | n | 胸腺组织       | 肝组织        | 肝癌组织       |
|-------|---|------------|------------|------------|
| 正常    | 3 | 95.4 ± 1.3 | 95.2 ± 0.6 | —          |
| 脾虚    | 3 | 95.1 ± 1.3 | 95.1 ± 0.6 | —          |
| 肝癌    | 3 | 95.2 ± 1.2 | 94.2 ± 0.6 | 95.0 ± 1.0 |
| 脾虚肝癌  | 3 | 94.9 ± 1.3 | 94.5 ± 0.6 | 94.8 ± 0.9 |
| 中药低剂量 | 3 | 91.6 ± 1.3 | 93.5 ± 0.7 | 92.6 ± 1.0 |
| 中药中剂量 | 3 | 95.3 ± 1.3 | 94.9 ± 0.6 | 94.0 ± 0.9 |
| 中药高剂量 | 3 | 95.3 ± 1.3 | 95.0 ± 0.6 | 94.1 ± 0.9 |
| 西药    | 3 | 95.1 ± 1.3 | 94.6 ± 0.6 | 95.1 ± 1.0 |

表 7 各组 TCRVβCDR3 亚家族克隆型比例比较 [例(%)]

| 组别    | 准高斯分布克隆比例 |         |         | 偏峰克隆比例   |          |          | 单克隆比例   |         |         |
|-------|-----------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
|       | 胸腺组织      | 肝组织     | 癌组织     | 胸腺组织     | 肝组织      | 癌组织      | 胸腺组织    | 肝组织     | 癌组织     |
| 正常    | 20(100.0) | 8(42.1) | —       | 0(0.0)   | 11(57.9) | —        | 0(0.0)  | 0(0.0)  | —       |
| 脾虚    | 8(42.1)   | 3(17.7) | —       | 9(47.4)  | 14(82.4) | —        | 1(5.3)  | 0(0.0)  | —       |
| 肝癌    | 16(84.2)  | 2(13.3) | 5(27.8) | 3(15.8)  | 11(73.3) | 13(72.2) | 0(0.0)  | 2(13.3) | 0(0.0)  |
| 脾虚肝癌  | 6(35.3)   | 0(0.0)  | 2(12.5) | 11(64.7) | 12(75.0) | 13(81.3) | 0(0.0)  | 4(25.0) | 1(6.3)  |
| 中药低剂量 | 5(33.3)   | 2(11.8) | 2(14.3) | 4(26.7)  | 7(41.2)  | 9(64.3)  | 6(40.0) | 8(47.1) | 3(21.4) |
| 中药中剂量 | 19(100.0) | 3(16.7) | 6(40.0) | 0(0.0)   | 11(61.1) | 7(46.7)  | 0(0.0)  | 4(22.2) | 2(13.3) |
| 中药高剂量 | 19(100.0) | 3(17.7) | 7(46.7) | 0(0.0)   | 13(76.5) | 7(46.7)  | 0(0.0)  | 1(5.9)  | 1(5.6)  |
| 西药    | 15(79.0)  | 3(18.8) | 8(44.4) | 3(15.8)  | 11(68.8) | 10(55.6) | 1(5.3)  | 2(12.5) | 0(0.0)  |

注:比例基数为各组各组织表达的亚家族数,不计无表达的亚家族数

7 各组胸腺、肝、肝癌组织中 TCRVβCDR3 谱型荧光峰下面积分析(表 8、9) 各组胸腺组织“公共表达 TCRVβCDR3 亚家族荧光峰下总面积”由高到低依次为:正常组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 脾虚组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;肝组织:正常组 > 脾虚组 > 肝癌组 > 中药高剂量组 > 西药组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;癌组织:西药组 > 肝癌组 > 中药高剂量组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组。

各组胸腺组织“TCRVβCDR3 亚家族荧光峰下总面积”由高到低依次为:正常组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 脾虚组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;肝组织:正常组 > 脾虚组 > 中药高剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;癌组织:西药组 > 肝癌组 > 中药高剂量组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组。

| 表 8 各组公共表达 TCRVβCDR3 亚家族<br>荧光峰下总面积比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) |   |               |             |          |
|-----------------------------------------------------------|---|---------------|-------------|----------|
| 组别                                                        | n | 胸腺组织          | 肝组织         | 癌组织      |
| 正常                                                        | 3 | 6 539 ± 2 325 | 1 238 ± 439 | —        |
| 脾虚                                                        | 3 | 378 ± 176     | 670 ± 433   | —        |
| 肝癌                                                        | 3 | 552 ± 350     | 76 ± 26     | 84 ± 42  |
| 脾虚肝癌                                                      | 3 | 89 ± 52       | 41 ± 16     | 46 ± 22  |
| 中药低剂量                                                     | 3 | 38 ± 29       | 33 ± 30     | 35 ± 29  |
| 中药中剂量                                                     | 3 | 818 ± 155     | 48 ± 19     | 56 ± 22  |
| 中药高剂量                                                     | 3 | 332 ± 99      | 67 ± 32     | 73 ± 33  |
| 西药                                                        | 3 | 479 ± 199     | 57 ± 39     | 105 ± 62 |

| 表 9 各组 TCRVβCDR3 亚家族荧光峰下总面积 ( $\bar{x} \pm s$ ) |   |               |           |          |
|-------------------------------------------------|---|---------------|-----------|----------|
| 组别                                              | n | 胸腺组织          | 肝组织       | 癌组织      |
| 正常                                              | 3 | 9 206 ± 1 125 | 824 ± 323 | —        |
| 脾虚                                              | 3 | 452 ± 226     | 688 ± 413 | —        |
| 肝癌                                              | 3 | 693 ± 362     | 75 ± 48   | 107 ± 73 |
| 脾虚肝癌                                            | 3 | 101 ± 62      | 49 ± 29   | 51 ± 36  |
| 中药低剂量                                           | 3 | 40 ± 29       | 41 ± 32   | 38 ± 22  |
| 中药中剂量                                           | 3 | 10 92 ± 336   | 53 ± 20   | 72 ± 37  |
| 中药高剂量                                           | 3 | 383 ± 127     | 76 ± 36   | 94 ± 51  |
| 西药                                              | 3 | 587 ± 310     | 63 ± 39   | 140 ± 82 |

| 表 10 各组 TCRVβCDR3 亚家族最大峰下面积均数及其 RI 值均数比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) |   |              |         |             |         |           |         |
|--------------------------------------------------------------|---|--------------|---------|-------------|---------|-----------|---------|
| 组别                                                           | n | 胸腺组织         |         | 肝组织         |         | 癌组织       |         |
|                                                              |   | 面积           | RI      | 面积          | RI      | 面积        | RI      |
| 正常                                                           | 3 | 117.7 ± 47.5 | 26 ± 3  | 15.5 ± 14.1 | 37 ± 11 | —         | —       |
| 脾虚                                                           | 3 | 8.1 ± 6.3    | 40 ± 17 | 15.3 ± 14.8 | 44 ± 18 | —         | —       |
| 肝癌                                                           | 3 | 10.5 ± 1.0   | 28 ± 5  | 2.3 ± 2.6   | 58 ± 24 | 3.0 ± 2.6 | 51 ± 17 |
| 脾虚肝癌                                                         | 3 | 2.3 ± 2.1    | 42 ± 13 | 1.8 ± 1.9   | 60 ± 27 | 1.5 ± 1.4 | 51 ± 19 |
| 中药低剂量                                                        | 3 | 0.9 ± 1.6    | 62 ± 34 | 1.3 ± 1.3   | 69 ± 31 | 1.4 ± 1.3 | 64 ± 25 |
| 中药中剂量                                                        | 3 | 15.7 ± 13.0  | 28 ± 4  | 1.3 ± 1.2   | 62 ± 26 | 2.6 ± 3.0 | 56 ± 23 |
| 中药高剂量                                                        | 3 | 5.4 ± 6.1    | 28 ± 5  | 1.9 ± 2.1   | 51 ± 20 | 3.1 ± 3.3 | 54 ± 21 |
| 西药                                                           | 3 | 9.3 ± 7.2    | 35 ± 17 | 2.3 ± 2.8   | 56 ± 23 | 2.7 ± 2.5 | 38 ± 12 |

8 各组 TCRVβCDR3 亚家族最大峰下面积均数及其 RI 值均数(表 10) 各组胸腺组织 TCRVβCDR3 亚家族最大峰下面积由高到低依次为:正常组 > 中药中剂量组 > 肝癌组 > 西药组 > 脾虚组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组;肝组织:正常组 > 脾虚组 > 肝癌组 = 西药组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药中剂量组 = 中药低剂量组;癌组织:肝癌组 > 中药高剂量组 > 西药组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 中药低剂量组。

各组胸腺组织 TCRVβCDR3 亚家族最大峰下面积 RI 值由高到低依次为:中药低剂量组 > 脾虚肝癌组 > 脾虚组 > 西药组 > 中药中剂量组 = 肝癌组 = 中药高剂量组 > 正常组;肝组织:中药低剂量组 > 中药中剂量组 > 脾虚肝癌组 > 肝癌组 > 西药组 > 中药高剂量组 > 脾虚组 > 正常组;癌组织:中药低剂量组 > 中药中剂量组 > 中药高剂量组 > 脾虚肝癌组 = 肝癌组 > 西药组。

讨 论

脾虚造模后,脾虚模型的脾虚积分明显高于非脾虚模型组,脾虚模型各组均达到中重度脾虚状态,说明脾虚模型制作较为理想。脾虚造模期间,脾虚大鼠的平均体重均明显降低,各组间差别不大;肝癌模型制作后由于停止脾虚造模大鼠体重得到明显增加,但是仍然低于肝癌组和正常组,而肝癌组也低于正常组。说明肝癌造模不利于大鼠体重的维持,脾虚因素不仅在造模期间有致脾虚作用,停止造模后可能仍有一定影响。

解剖数据的结果说明脾虚模型的肝指数和胸腺指数较正常大鼠高,由于脾虚对大鼠体重增长的削弱明显,可能提示脾虚造模过程对脏器相对重量的提高具有维持作用。肝癌模型也有类似脾虚模型的作用,但肝癌模型的肝癌体积指数在各组中最高,说明肝癌模型一方面可能刺激肝脏和胸腺的增殖,一方面可能降低大鼠的体重增加,提示肝癌对机体产生了不利的影响。

脾虚肝癌模型(和低浓度健脾解毒方)和胸腺五肽组肝癌体积指数、肝指数和胸腺指数相当,虽然肝癌体积指数和肝指数低于肝癌组,但均高于中浓度和高浓度健脾解毒方,尤其是肝指数与脾虚组相当,胸腺指数也高于中浓度和高浓度健脾解毒方,说明脾虚肝癌模型肝癌、肝脏、胸腺均处于较高水平,可能的机制是内脏因不良因素的刺激而形成结构和功能的代偿。中、高剂量健脾解毒方对肝癌的体积增殖具有抑制作用,并且恢复其内脏指数(肝指数和胸腺指数与正常组接近)的正常比例,胸腺五肽则没有类似作用。

根据 TCR 多肽链的异质性可将 T 细胞分为  $\alpha\beta$ T 细胞和  $\gamma\delta$ T 细胞,前者占 T 细胞的 95% 以上<sup>[13]</sup>。TCR $\beta$  链的基因序列和晶体结构研究较为清楚<sup>[14]</sup>, TCR $\beta$  链与 MHC 及其递呈的抗原结合是通过 3 个互补决定区完成的,其中 CDR3 位于超变区直接识别 MHC 递呈的抗原并与其结合,最终通过细胞内信号通路(CD3)引起相应 T 细胞克隆增殖<sup>[15]</sup>。TCRV $\beta$ CDR3 多肽链基因的多样性极为复杂<sup>[16]</sup>,几乎可以形成对应于内外源性抗原结构的镜像,它产生于 T 细胞的成熟分化过程和免疫反应过程,直接反映 T 细胞免疫识别的潜能。TCRV $\beta$ CDR3 基因片段的谱型表达的多样性和表达水平则反映一定生理病理条件下相应 T 细胞克隆增殖的状况。基于 TCRV $\beta$ CDR3 基因片段的谱型分析可以了解生理病理情况下不同组织局部 TCRV $\beta$ CDR3 谱系的特征,进而了解相应 T 细胞克隆增殖的情况和机体免疫识别功能的状态。

本研究对于脾虚、脾虚肝癌以及健脾解毒方和胸腺五肽干预的脾虚肝癌大鼠模型 TCRV $\beta$ CDR3 的 20 个亚家族基因谱系的分析从克隆型完整性(克隆型数量)、基因谱系的复杂性、谱系非正态分布的程度、谱系及片段表达水平、各克隆中片段的表达与不表达等方面进行了多角度分析。结果提示正常胸腺组织各 TCRV $\beta$ CDR3 亚家族保持良好的增值状态,正常肝组织中 TCRV $\beta$ CDR3 谱型分布是高斯分布与偏峰分布相混合的。正常或病理情况下胸腺组织 TCRV $\beta$ CDR3 谱系多样性高于肝组织和肝癌组织,说明脾虚、移植性肝癌、脾虚肝癌情况下外周免疫是免疫反应的主要场所。而胸腺、肝脏、肝癌组织中 TCRV $\beta$ CDR3 谱系多样性和表达水平在脾虚、移植性肝癌、脾虚肝癌模型中出现明显下降,提示相应情况下机体免疫功能出现异常。高、中剂量中药干预后脾虚肝癌模型准高斯分布比例得到改善,结合中药的抑癌作用,提示中药的抑癌作用与其提高抗肝癌 T 细胞克隆数量有关。对于中药低剂量组

TCR 多样性在 3 种组织中均处于最低水平的情况,根据其数据与单纯脾虚肝癌模型接近,初步推测可能与给药浓度未达到治疗有效浓度有关。而胸腺五肽组肝癌组织中 TCRV $\beta$ CDR3 亚家族谱系的高表达,根据其抑癌作用不明显,推测胸腺五肽动员的 T 细胞克隆的抗癌作用不明显。这些结果提示免疫识别能力在脾虚和(或)肝癌机体中具有重要的临床意义,值得深入探索。

目前相关研究主要立足于寻求特定疾病情况下 TCRV $\beta$ CDR3 特定亚家族的特异性改变,进而设计相应的方法来进行干预<sup>[17]</sup>,有研究提示 TCRV $\beta$ 15、TCRV $\beta$ 8.4 和 TCRV $\beta$ 7.1 基因修饰可明显增强 T 淋巴细胞对肝癌 Bel-7402 细胞的杀伤效应<sup>[18-21]</sup>。由于恶性肿瘤的抗原性较弱,这一研究思路对于恶性肿瘤的过继免疫治疗有重要意义。实际的恶性肿瘤或疾病情况,往往提示 TCRV $\beta$ CDR3 多表现为局部的非特异性改变和整体的特异性改变<sup>[22,23]</sup>,反映的是机体免疫失调的整体情况,非常复杂,TCRV $\beta$ CDR3 数 10 个亚家族基因的无限变化就说明了这一点。因此,本研究结果提示现脾虚、移植性肝癌、脾虚肝癌等情况下 TCRV $\beta$ CDR3 表现为多个亚家族的表达改变,药物干预的结果也是如此。这些变化的总特点是在病理情况下胸腺组织和肝组织中 TCRV $\beta$ CDR3 的基因谱系的复杂性和表达水平明显下降,健脾解毒方的干预可以改善这种异常改变,提示健脾解毒方对改善脾虚肝癌模型免疫识别功能的积极作用。这也一定程度解释了健脾解毒方治疗肝癌的有效性,本研究结果对进一步在临床工作中探索本方治疗肝癌的作用机制奠定了基础。

高、中剂量健脾解毒方对脾虚肝癌模型肝癌的生长有一定抑制作用,其机制与本方改善大鼠胸腺和肝脏组织 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系的表达有关,但具体的作用环节有待进一步研究探索。胸腺五肽作为一种刺激 T 细胞成熟和分化的药物对大鼠胸腺和肝脏组织 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系表达作用不明显<sup>[24,25]</sup>,而可改善肝癌组织中 TCRV $\beta$ CDR3 基因谱系的表达,其机制和临床意义也值得深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 陈泽雄,张诗军,胡洪涛,等.扶正解毒法对肝癌患者 TACE 术后临床作用的研究[J].中国中药杂志,2007,32(11):1057-1060.
- [2] Sun B, Meng J, Xiang T, et al. Jianpi Jiedu Recipe improves survival of hepatocarcinoma mice by affecting phosphatase and tensin homolog, phos-

- phoinositide 3-kinase, and focal adhesion kinase [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(4): 479–485.
- [3] 孙保国,周厚明,邓宜材,等. 健脾解毒复方中药对裸鼠肝癌模型 PTEN/ERK1 的影响[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(9): 1144–1148.
  - [4] Wang JH, Reinherz EL. Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules [J]. *Mol Immunol*, 2002, 38(14): 1039–1049.
  - [5] Li H, Lera A, Mariuzza RA. Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions[J]. *Immunol Rev*, 1998, 163: 177–186.
  - [6] Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor  $\beta$ -chain diversity in alphabeta T cells [J]. *Blood*, 2009, 114(19): 4099–4107.
  - [7] Sherwood AM, Emerson RO, Scherer D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(9): 1453–1461.
  - [8] Douillard P, Pannetier C, Josien R, et al. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-V beta rearrangement in heart allografts [J]. *J Immunol*, 1996, 157(3): 1250–1260.
  - [9] 孙保国,项婷,李玉龙,等. 大小承气汤制作大鼠脾虚肝癌模型的比较[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(2): 20–25.
  - [10] 李勇敏,韩育明,朱克俭. 饮食失节法脾虚模型小鼠症状的综合评价及缺陷研究[J]. *湖南中医杂志*, 2011, 27(4): 126–127.
  - [11] Lu J, Basu A, Melenhorst JJ, et al. Analysis of T-cell repertoire in hepatitis-associated aplastic anemia [J]. *Blood*, 2004, 103(12): 4588–4593.
  - [12] Venturi V, Kedzierska K, Turner SJ, et al. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire [J]. *J Immun Methods*, 2007, 321(1–2): 182–195.
  - [13] Kreslavsky T, Gleimer M, Garbe AI, et al.  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point [J]. *Immunol Rev*, 2010, 238(1): 169–181.
  - [14] Zoete V, Irving M, Ferber M, et al. Structure-based, rational design of T cell receptors [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 268.
  - [15] Bridgeman JS, Sewell AK, Miles JJ, et al. Structural and biophysical determinants of  $\alpha\beta$  T-cell antigen recognition [J]. *Immunology*, 2012, 135(1): 9–18.
  - [16] Zarnitsyna VI, Evavold BD, Schoettle LN, et al. Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 485.
  - [17] Dössinger G, Bunse M, Bet J, et al. MHC multimer-guided and cell culture-independent isolation of functional T cell receptors from single cells facilitates TCR identification for immunotherapy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61384.
  - [18] 姚佳红. T 细胞受体 V $\beta$ 15 基因对肝癌细胞识别和杀伤作用的研究 [D]. 湖北: 三峡大学, 2004.
  - [19] 肖兰凤, 胡丽彩, 林月霞, 等. TCRV $\beta$ 8.4 基因转染人 PBMC 对肝癌细胞杀伤活性的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(6): 404–408.
  - [20] 黄树林, 周继斌, 陈维春, 等. TCRV $\beta$  基因亚家族的优势取用和 PTK 信号传导途径的激活及体外对肝癌细胞凋亡的诱导 [J]. *中国免疫学杂志*, 2001, 17(5): 245–248.
  - [21] 吕丽珊, 王全金, 邵红伟, 等. TCRV $\beta$ 7.1 基因修饰的 T 细胞对肝癌细胞体外杀伤及体内靶向识别作用的研究 [J]. *中国医药生物技术*, 2007, 2(6): 416–423.
  - [22] Sandberg Y, Kallemeijn MJ, Dik WA, et al. Lack of common TCRA and TCRB clonotypes in CD8 (+)/TCR $\alpha\beta$  (+) T-cell large granular lymphocyte leukemia: a review on the role of antigenic selection in the immunopathogenesis of CD8 (+) T-LGL [J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4: e172.
  - [23] Van der Fits L, Sandberg Y, Darzentas N, et al. A restricted clonal T-cell receptor  $\alpha\beta$  repertoire in Sézary syndrome is indicative of superantigenic stimulation [J]. *Br J Dermatol*, 2011, 165(1): 78–84.
  - [24] Recchia F, De Filippis S, Ginaldi L, et al. Phase I–II study of dose intensified chemotherapy with filgrastim and thymopentin in patients with advanced cancer [J]. *Clin Ter*, 1997, 148(5–6): 201–207.
  - [25] Lunin SM, Novoselova TV, Khrenov MO, et al. Immunomodulatory effects of thymopentin under acute and chronic inflammations in mice [J]. *Biofizika*, 2009, 54(2): 260–266.

(收稿: 2014–04–08 修回: 2016–03–29)