

替比夫定对慢性乙型肝炎患者 TCR CDR3 谱型的影响

毕少丽 张光文

【摘要】 目的 利用 T 细胞受体谱型分析技术(即 TCR CDR3 谱型分析技术),对替比夫定治疗慢性乙型肝炎患者的细胞免疫状况进行研究。方法 选取新乡医学院第一附属医院 2011 年 8 月至 2012 年 12 月服用替比夫定抗病毒治疗的慢性乙肝患者作为研究对象,采集服药前后外周血,以健康献血员作对照,同期检测治疗前后乙型肝炎病毒(HBV DNA)学指标、血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等肝功能指标;进行乙肝五项定量测定;采用密度梯度离心法分离出外周血单核细胞(PBMC),细胞分离,采用 TRIZOL 试剂提取 RNA,互补 DNA(cDNA)的合成,PCR 扩增, GeneScan 扫描分析 TCR CDR3 谱形。结果 15 例患者 HBV-DNA 定量、乙肝表面抗原(HBsAg)滴度、乙肝 e 抗原(HBeAg)滴度、ALT、AST 指标在治疗 6 个月后均明显下降。抗病毒治疗 6 个月时血清 HBsAg 滴度和 HBeAg 滴度下降幅度与 HBV-DNA 下降水平之间有明显直线相关关系。完成 10 例患者 T 细胞受体 CDR3 谱型分析,替比夫定治疗后 TCR CDR3 出现异常谱型的家族总数显示差异无统计学意义,但具体每例患者,24 个 BV 家族中均有发生谱型改变现象,对于某一 BV 家族在不同患者中也有发现变化的情况,提示细胞免疫可能参与了其病变过程。结论 替比夫定可能影响机体免疫系统。

【关键词】 替比夫定; 肝炎,乙型,慢性; TCR CDR3 谱型; 免疫扫描谱型分析技术

Influence of telbivudine on T cell receptor complementarity determining region 3 spectra type in chronic hepatitis B BI Shao-li,ZHANG Guang-wen. *Infection Section 2 of the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College,Xinxiang 453000, China*

Corresponding author: ZHANG Guang-wen, Email: 524846456@qq.com

【Abstract】 Objective The T cell receptor type spectrum analysis technology(named TCR CDR3 spectrum analysis technology)is used for the study of the treatment of patients with chronic hepatitis B virus, in order to understand the influence of Telbivudine on the mechanism of the immune system. **Methods** 15 cases of patients with chronic hepatitis B(CHB) were selected as research objects,whose peripheral blood of baseline was separately collected, compared with healthy blood donation members.Indicators of HBV DNA and liver function such as alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) were detected during the same period before and after treatment. Five quantitative determination of hepatitis B was carried on to analysis how hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) and hepatitis B virus e antigen(HBeAg)change.The result was used for the study of pertinence analysis with the variation of HBV DNA. Using density gradient centrifugation isolated peripheral blood mononuclear cells(PBMC), cell separation, RNA extracted with the use of TRIZOL reagent, synthesis of complementary DNA(cDNA), PCR amplification, scanning GeneScan analysis the CDR3 spectral shape. **Results** The numbers of HBV-DNA quantitative, HBsAg, HBeAg, ALT and AST were significantly decreased after 6 months by treatment.Drops of HBsAg and HBeAg were liner with the drop of HBV-DNA level. 10 CDR3 spectrum of 15 cases were completed. After six monthes treatment, TCR CDR3 abnormal spectrum type family showed there was no statistically significant difference in the total number of specific each patient, but All 24 BV family had obvious phenomena of spectral type change. To a family of BV in different situation, it was also found changes in patients. **Conclusion** Telbivudine may directly affect the cellular immune function in patients with chronic hepatitis B.

【Key words】 Telbivudine; Hepatitis B, chronic; TCR CDR3 type spectrum; Spectra type analysis technology of immune scanning

如何进行有效地治疗慢性乙型肝炎, 已经愈来愈引起人们的高度重视及关注。发病机制逐渐清晰, 抗病毒成为治疗的核心。核苷(酸)类似物抗病毒机制主要是通过抑制 HBV 的反转录酶和 HBV 聚合酶, 参与 HBV DNA 链的合成, 阻止其合成和复制。与拉米夫定相比, 左旋核苷类药物替比夫定, 能更有效地达到 ALT 复常率、HBV-DNA 阴转率, 其 HBeAg 血清转换率且明显高于其他核苷类似物^[1]。

为进一步研究替比夫定在免疫方面的作用, 通过入组服用该药的慢性乙型肝炎患者进行实验, 从分子生物学水平实验, 探讨对免疫系统方面的影响。

材料和方法

一、主要仪器及试剂

TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机; 低温离心机; 总 RNA 提取试剂盒反转录系统; 淋巴细胞分离液; 反转录系统; ALT、AST 试剂盒; 乙肝五项定量测定试剂盒、自动分析仪; HBV 核酸定量检测试剂盒; 酶标仪; 电泳仪; 琼脂糖凝胶电泳加样缓冲液。

二、实验对象

依据“2010 版慢性乙型肝炎防治指南”符合条件的慢性乙型肝炎患者, 排除感染性、肿瘤、自身免疫性疾病等^[2]; HBV-DNA 定量 $1.0 \times 10^4 \log_{10}$ copies/ml 以上, ALT 大于正常 2 倍, 或肝穿刺病理大于 G2S1, 未进行抗病毒治疗; 非孕妇、哺乳期妇女。

三、实验方法

服药前、服药 6 个月抽取入组患者外周血 6 ml, 淋巴细胞总 RNA 提取, 反转录合成 cDNA, PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析各 BV 家族表达情况, GenScan 描述分析 TCR CDR3 谱型情况。治疗期间未服用保肝、降酶药物, 定时测定生化、病毒、血清学指标。

1. 入组患者病毒学、生化学、血清学指标测定: 新乡医学院第一附属医院遗传科 PCR 室、生化室完成。

2. TCR CDR3 谱型分析: Ficoll 密度梯度离心法将淋巴细胞分离成四层, 取淋巴细胞层用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。建立反转录体系, 根据文献^[3]设计合成 TCR BV 24 个家族上游引物, 并在 β 链恒定基因区 (BC) 设计一条共用的羧基荧光素 (FAM) 标记下游引物和对照引物^[4]。普通琼脂糖凝胶电泳法 110 V 电压下电泳 35 min, 琼脂糖凝胶成像系统记录结果。聚丙烯酰胺凝胶电泳、GeneScan 扫描分析 TCR CDR3 长度及谱型。

四、统计学分析

SPSS 16.0 分析, 治疗前后 ALT、AST、HBV-DNA (取对数转换后)、HBsAg、HBeAg 滴度比较采用配

对样本 t 检验, HBsAg、HBeAg 滴度与 HBV-DNA 之间采用相关性分析, 数据均使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 替比夫定治疗 6 个月后血清学、病毒学指标变化: 入组患者男 8 例、女 7 例, e 抗原均阳性, 平均年龄 (29.6 ± 6.6) 岁, ALT、AST 平均水平为 (203.15 ± 177.92) U/L、(166.55 ± 156.50) U/L, HBV-DNA 经 \log_{10} 对数转换后平均值 (6.67 ± 0.92) \log_{10} copies/ml。替比夫定片治疗 6 个月时, 3 例发生血清学转换。治疗 6 个月后 HBsAg、HBeAg 滴度较治疗前下降, 配对 t 检验差异具有统计学意义, 见表 1。

表 1 替比夫定治疗 6 个月后 HBsAg、HBeAg 滴度水平的变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

指标	HbsAg (IU/ml)	HbeAg (COI)
治疗前	25181 \pm 9835	736 \pm 422
治疗 6 个月	11917 \pm 6453	456 \pm 346
t 值	4.66	3.25
P 值	0.0004	0.0059

将 HBV-DNA 值做 \log_{10} 对数转换后采用配对 t 检验, 治疗 6 个月时的血清 HBV-DNA 水平较治疗前明显下降, 差异具有统计学意义 ($t=21.348$, $P=0.000$), 见图 1。

2. 替比夫定治疗后病毒学应答与血清学变化指标相关性分析: 由散点图 (图 2, 3) 示: 治疗 6 个月时 HBsAg 滴度下降幅度与 HBV-DNA 下降水平之间有明显直线相关关系 (Pearson 相关性检验: $r=0.910$, $P=0.000$); 治疗 6 月 HBeAg 滴度下降幅度与 HBV-DNA 水平下降幅度正相关关系 (HBeAg 数据呈非正态分布, Spearman 相关分析: $r=0.636$, $P=0.011$)。

3. 替比夫定抗病毒治疗前后 TCR β 链 V 区 CDR3 谱型变化: 使用公式“ $100 \times$ 每个峰下面积/该家族总峰面积”计算每个家族各峰的相对荧光密度 (RI) [%]。既往已有学者得出正常人 TCR β 链 V 区 CDR3 各家族谱型图符合正态分布。10 例患者治疗前后外周血 TCR β 链 V 区 CDR3 谱型均或多或少出现了异常谱型。在替比夫定治疗前、后 TCR CDR3 24 个家族中出现异常谱型的家族总数平均值分别为 5.40 ± 1.96 、 5.50 ± 1.58 , 配对 t 检验分析差异无统计学意义 ($t=0.176$, $P=0.864$)。

虽大部分家族谱型在治疗前后无明显变化, 但可见到一些原有单克隆增生的家族治疗后恢复正常, 另

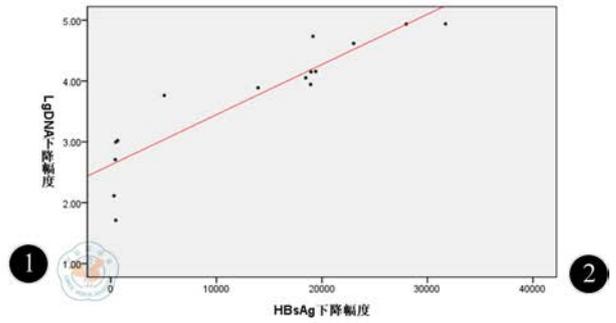
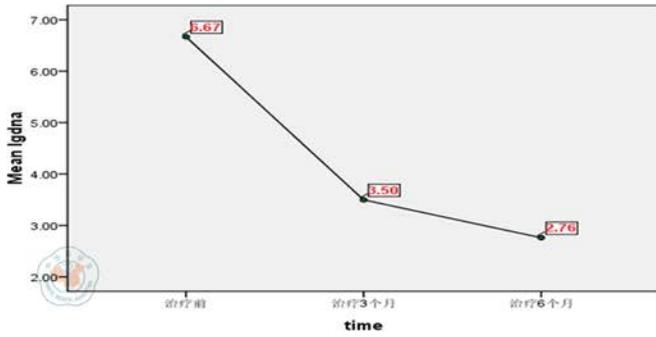


图1 患者抗病毒治疗过程中血清HBV-DNA水平的变化 (经对数转换后) 图2 治疗6个月后HBV-DNA下降幅度与血清HBsAg滴度下降幅度的关系

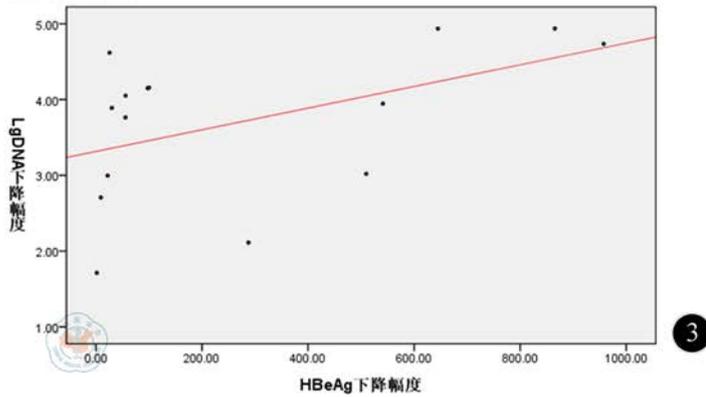


图3 治疗6个月后HBV-DNA下降幅度与血清HbeAg滴度下降幅度的关系

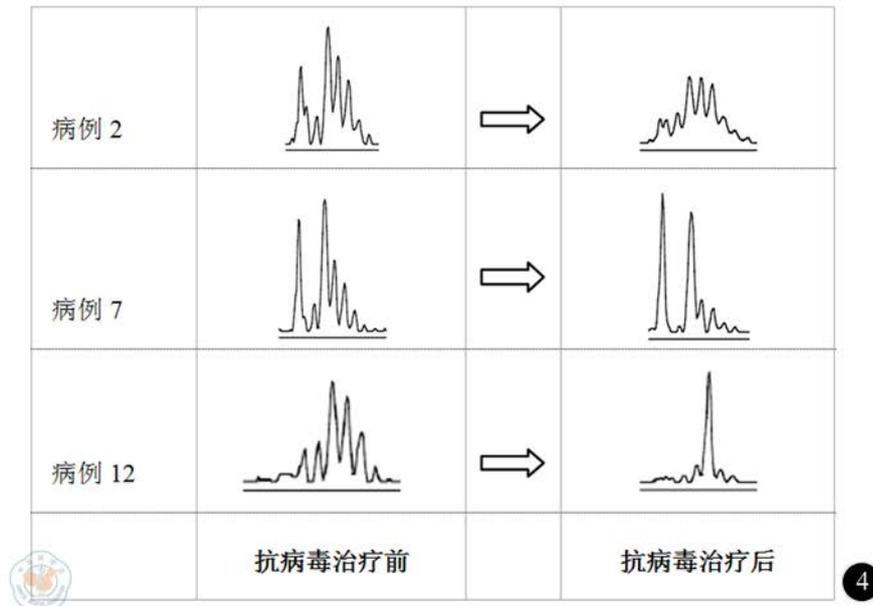


图4 BV20家族在不同病例抗病毒治疗前后的CDR3谱型变化情况

一些在治疗前正常谱型的家族, 治疗后出现了异常谱型。10例患者中, BV9、BV18、BV21、BV22未发现治疗前后谱型分布变化, BV5在病例4、14、15均见到治疗前后变化, BV6在病例2、5、12均见到治疗前后变化, BV14在病例1、12、15均见到治疗前后

变化, BV20在病例2、7、12均见到治疗前后变化。但由于纳入病例数目较少, 本次研究未观察到BV6、BV20在抗病毒治疗前后谱型变化的明显规律。

图4列出了BV20家族分别在病例2、7、12治疗前后的谱型分布变化。

表 2 10 例患者替比夫定治疗前后 TCR CDR3 出现异常谱型的家族比较 (n=10)

病例编号	异常家族分布		异常家族数目	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
1	1,4,5,7,14,19,20	1,4,5,7,20	7	5
2	6,11,14,15,18,19,20,24	1,11,12,14,15,18,19,24	8	8
3	3,8,9,21	3,9,13,15,21	4	5
4	2,3,5,12,21,23	2,3,5,21,23	6	5
14	2,5,9,12,24	1,2,9,10,12,17,20,24	5	8
7	2,8,11,20	2,8,11,20,23	4	5
9	2,4,6,9,11,16,17,22	2,4,6,9,17,22	8	6
12	2,6,7,21	3,8,14,15, 20,21	4	6
5	21,24	6,21,24	2	3
15	5,6,9,13,14,23	6,9,14,23	6	4

讨 论

T 细胞活化及克隆性增生是在 T 细胞表面的识别受体 (TCR) 识别抗原后发生的^[5]。TCRβ 链 CDR3 谱型能很好地反映 T 细胞的功能, 通过一系列方法获得 TCRβ 链 CDR3 谱型可用来研究克隆性和寡克隆性增生 T 细胞, 进而了解 T 细胞免疫与疾病发生、发展的关系, 最终指导疾病的诊断及免疫治疗^[6]。T 细胞克隆具有多样性, 测定每一个 T 细胞的 CDR3 区异常困难, 有人提出“CDR3 谱型分析技术”。依据组成 CDR3 的 V 基因片段核苷酸的同源性, 将 β 链 CDR3 分成 24 个基因家族 (又称为 BV 家族), 根据 24 个 BV 家族设计 24 条上游引物, 在共同的恒定区设计 1 条下游引物, 对同一个体的标本进行 24 管的 PCR 扩增。扩增的产物在变性胶上电泳, 电泳的过程中应用“基因扫描技术”收集不同家族 CDR3 的信息, 此信息以峰形图的形式呈现出来。峰形图进行分析以了解 T 细胞克隆增生情况^[7]。正常人 24 个 BV 家族 CDR3 谱型呈正态分布。如果机体外有抗原驱使 T 细胞克隆增生, 则谱型呈非正态分布 (偏态, 单峰双峰)^[8]。近年来, T 细胞受体互补决定区 3 (TCR CDR3) 与机体的生理、病理之间关系的研究取得了很大的进展^[9], 尤其是在超抗原作用的感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等疾病状态下^[10]。

替比夫定抗病毒治疗后, 生化学、血清学、病毒

学指标明显改变, 该药物的确具有较强的抗乙肝病毒作用; 由于细胞免疫和体液免疫的作用, 乙肝表面抗原某种意义上控制病毒复制和病毒生命周期, HBsAg 可能成为免疫治疗中一个有吸引力的目标。本实验检测 HBsAg、HBeAg 滴度下降明显, HBsAg 滴度下降幅度与 HBV-DNA 下降水平之间有明显直线相关关系, HBeAg 滴度下降幅度与血清 HBV-DNA 水平下降幅度呈正相关关系。15 例患者中 3 例出现了 e 抗原学转换。提示替比夫定对患者抗乙肝的免疫状况造成了影响; “免疫扫描谱型分析技术”, 又称“免疫指纹技术或者 CDR3 分析技术”, 其原理的核心是基于 TCR 的多样性和 CDR3 的特异性。10 例患者服用替比夫定治疗前后外周血 T 淋巴细胞 TCR CDR3 24 个家族中异常谱型的分析, 进一步提示替比夫定在抑制 HBV 的同时, 直接影响了慢性乙型肝炎患者的细胞免疫功能。

参 考 文 献

- [1] Kate McKeage, Susan J. Telbivudine : A Review of its use in compensated chronic hepatitis B. *Drugs*, 2010, 70: 1857-1883.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). *肝脏*, 2011, 3: 40-56.
- [3] Hart M, Harrison L, Kehn P, et al. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double negative(CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻) and CD8⁺ T cells. *Immunol*, 1999, 163: 301-311.
- [4] Puisieux I, Even J, Pannetier C, et al. Oligoclonality of tumordraining lymphocytes from human melanomas. *Immunol*, 1994, 153: 2807-2818.
- [5] Hong J, Zang YC, Tejada-Simon MV, et al. A common TCR V-D-J sequence in Vbeta 13. 1 T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in multiple sclerosis. *Immunol*, 1999, 163: 35-38.
- [6] Roers A, Montesinos-Rongen M, Hansmann ML, et al. Amplification of TC beta gene rearrangements from micromanipulated single cells: T cell resetting around Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease are polyclonal. *Eur J Immunol*, 1998, 28: 24-31.
- [7] Garderet L, Dulphy N, Douay C, et al. The umbilical cord blood αβ T-cell repertoire: characteristics of apolyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood*, 1998, 91: 340-346.
- [8] 胡云良, 杨介钻, 倪莉, 等. 正常人外周血 αβ T 细胞 TCRβ 链 CDR3 多态性和长度分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23: 492-498.
- [9] 黄永塔, 罗微, 马骊. CDR3 谱型分析在肿瘤研究中的应用进展. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, 29: 863-866.
- [10] 耿素霞, 李扬秋, 陈少华, 等. CML 患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的 TCR Vβ 基因谱系和克隆性分析. *中国免疫学杂志*, 2007, 23: 157-160.

(收稿日期: 2013-04-15)

(本文编辑: 马超)