

【临床研究】

通信作者:张光文(1964-),男,河南辉县人,博士,教授,主任医师,主要从事传染病的基础与临床研究工作。

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染呈世界性流行, 全球约超过 3.5 亿人为慢性感染者, 慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者病情进展情况为: 肝炎、肝硬化、肝癌, 进展为终末期肝病后病死率高, 严重危害人类健康^[1-2]。CHB 发病机制目前普遍认为与免疫损伤有关, T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 互补决定区 3 (complementarity determining region 3, CDR3) 谱型分析技术可以很好地反应 T 淋巴细胞的功能, 反映机体的细胞免疫功能状态, 目前已广泛应用于感染性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤的研究中。干扰素是第 1 个用于临床治疗 CHB 的药物, 临床有效率约 50%, 有效的抗病毒治疗可延缓 CHB 病情进展, 减少肝硬化、肝癌等严重肝病的发生^[3]。本研究利用 TCR CDR3 谱型分析技术, 了解 CHB 患者基线状态的细胞免疫功能, 并探讨其与干扰素- α 抗病毒治疗早期病毒学应答的关系, 为评估干扰素抗病毒治疗过程中的近期疗效提供依据, 指导临床抗病毒治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 4~9 月新乡医学院第一附属医院感染内科接受干扰素- α 抗病毒治疗的 CHB 患者 19 例, 男 13 例, 女 6 例; 年龄 (31.42 ± 10.81) 岁。乙型肝炎核心相关抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg) 阳性 14 例, 血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 为 $135 (87) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, HBV 脱氧核糖核酸 (HBV-deoxyribonucleic acid, HBV-DNA) 定量 (对数转换后) 为 $(6.18 \pm 1.29) \text{ Lg copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。诊断均符合 2010 年版 CHB 防治指南标准^[2], 并除外其他病毒感染, 近 6 个月内未使用抗病毒及免疫调节剂, 无自身免疫病、血液病及恶性肿瘤等。

1.2 主要试剂和仪器 肝功能检测采用日本 Himch 公司自动生物化学分析仪, 血清 HBV-DNA 检测采用中山大学达安基因公司荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测系统及试剂盒, 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 反转录试剂盒、Real time PCR Master Mix 购自日本 Takara 公司, 荧光定量 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司, 琼脂糖粉购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 方法

1.3.1 抗病毒治疗及观察指标 抗病毒治疗应用干扰素 α -2b (天津华立达生物工程有限公司, 生产

批号: S20000020, 每支 500 万 U), 每次 500 万 U, 隔日 1 次, 皮下注射, 疗程为 24 周。同时观察治疗前和治疗 3 个月的肝功能和 HBV-DNA 水平。根据抗病毒治疗 3 个月 HBV-DNA 较治疗前下降情况, 分为早期病毒学应答组 (PCR 法血清 HBV-DNA 检测不到或低于检测下限或较治疗前下降 $\geq 2 \log_{10}$) 和无应答组。

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 所有入选对象抗病毒治疗前用肝素抗凝管采集外周静脉血 5 mL, 采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 取 1×10^6 以上的 PBMC, RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录试剂盒以 Oligo dT Primer 为引物合成 $30 \mu\text{L}$ cDNA, 具体操作按试剂盒说明进行。

1.3.3 荧光定量 PCR 扩增及溶解曲线分析 参照文献 [4-5], 设计并合成 24 条 TCR BV 家族 CDR3 基因上游引物及共同的下游引物 (BC) 1 条, 并合成对照的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 上、下游引物, 引物均由 Invitrogen 公司合成。依据荧光定量 PCR 试剂盒说明书, 在超净工作台中, 按比例建立反应体系 $20 \mu\text{L}$ 。每例样本做 26 个 PCR 反应管, 第 1~24 管分别加入上游 BV 引物 (BV 1~24) $0.8 \mu\text{L}$, 各引物浓度均为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 下游 BC 引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$, 第 25 管加正义 GAPDH ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$, 反义 GAPDH ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$, 第 26 管为无引物阴性对照管, 每个 PCR 反应管分别加模板 cDNA $1.0 \mu\text{L}$, SYBR Premix Ex Taq II (2X) $10.0 \mu\text{L}$, dH_2O $7.4 \mu\text{L}$, 总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 50 s, 45 个循环; 延伸 72°C 10 min。溶解曲线分析: $75 \sim 95^\circ\text{C}$, 以 $0.2^\circ\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$ 读取荧光值, 100 个循环。获得扩增曲线及溶解曲线峰型图, 计算 TRBV 家族克隆增生异常率, 方法: (单峰数 + 寡峰数 + 偏峰数) / 24 个总家族数 $\times 100\%$ 。TRBV 家族 CDR3 区溶解曲线谱型图单峰、寡峰、偏峰及缺失或极低水平判定参照标准: 单峰: 在溶解曲线谱型图中只出现显著的单个峰, 峰跨度同对照 (GAPDH); 寡峰: 在溶解曲线谱型图中出现 2 条异常峰, 其中 1 条为较显著异常峰, 每个峰跨度同 GAPDH; 偏峰: 在溶解曲线谱型图中出现 3 条或 3 条以上异常峰, 其中 1 条为较显著的异常峰, 每个峰跨度同 GAPDH。缺失或极低水平: 无峰图或峰形图同阴性对照, 或略高于对照不易区分。溶解后的 PCR 产物按上述反应条件, 45 个循环改为 5 个循环再次进行普通 PCR, 产物 $7 \mu\text{L}$ 在

15 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳,取得凝胶电泳图,余 -20 ℃ 冷存备用。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数/四分位数间距 (M/QR) 表示,对数据进行两样本 *t* 检验、配对样本比较 Wilcoxon 符号秩检验、Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

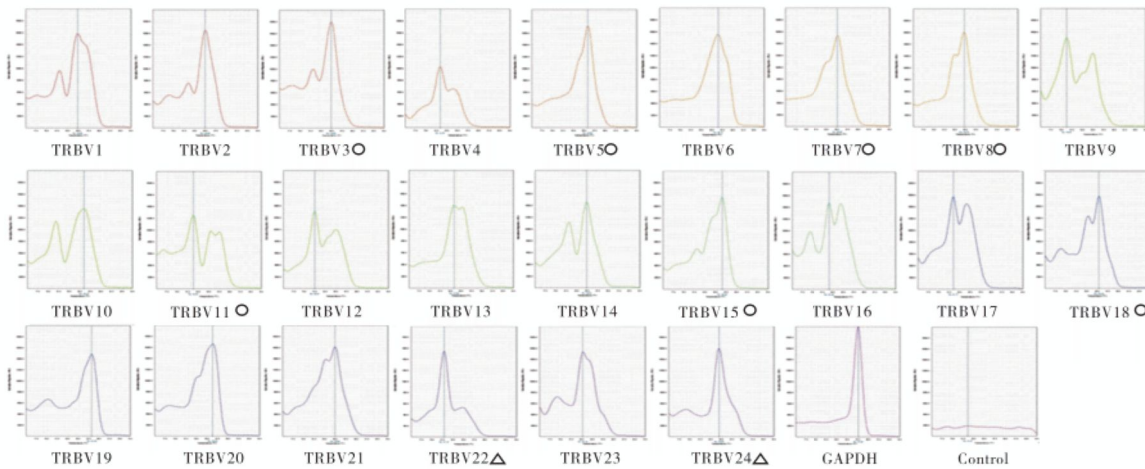
2 结果

2.1 基线 TCR BV 家族 CDR3 谱型的表现 根据谱型判定标准,分析结果显示,每例 CHB 患者均表现不同程度的谱型偏移,出现数量不等的单峰、寡峰、偏峰图,多数家族表现为多峰图,小部分家族表达频率极低或缺失表现为无峰图。对照的 GAPDH 表现为明显的单峰图形,阴性对照无溶解曲线峰。既往研究表明,正常人外周血 TCR 24 个 BV 家族 CDR3 谱型均表现为多峰图形,无谱型偏移(图 1 为 CHB 患者-2 PBMC TRBV 家族 CDR3 的溶解曲线谱型图,其余患者结果未列出)。

2.2 琼脂糖凝胶电泳 19 例 CHB 患者外周血 24 个 TRBV 家族结果显示多数 BV 家族均有表达,在预测位置处显示 1 条模糊的条带,部分家族表达增强或缺失,显示 1 条清晰条带或条带缺失。GAPDH 对照呈现单条带,阴性对照无条带。各 BV 家族扩增片段大小在 200 ~ 350 bp(图 2 和图 3 为 CHB 患者-2 的电泳结果,其余患者结果未列出)。

2.3 治疗前和治疗 3 个月肝功能及 HBV-DNA 的变化 结果见表 1。先行正态性检验,因数据不服从正态分布,采用配对样本比较 Wilcoxon 符号秩检验。与治疗前比较,治疗 3 个月时 HBV-DNA、ALT、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平均显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 应答组与无应答组患者 TRBV CDR3 克隆增生异常率、HBV-DNA 及肝功能水平比较 结果见表 2。应答组与无应答组患者 TRBV CDR3 克隆增生异常率、HBV-DNA (对数转换后)、ALT 水平比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);应答组患者 AST 水平高于无应答组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



△: 单峰; ○: 寡峰及偏峰; X 轴代表温度变化, Y 轴代表荧光信号强度变化的负一次倒数。

图 1 CHB 患者 PBMC 中 24 个 TRBV 家族 CDR3 区的溶解曲线谱型图

Fig.1 GMSP of TCR BV gene families in the PBMC of CHB patient

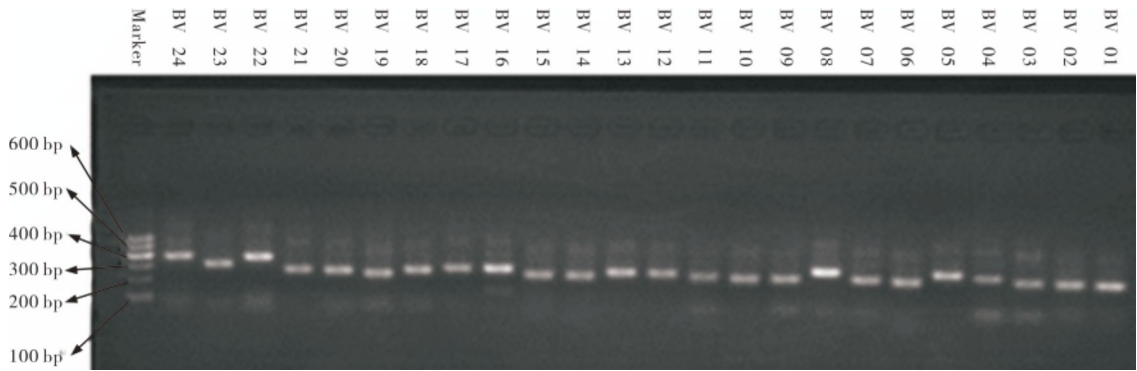


图 2 CHB 患者 PBMC 中 24 个 TRBV 家族 CDR3 荧光定量 PCR 产物的电泳图

Fig.2 Electrophotogram of FQ-PCR products of 24 TRBV CDR3 families in the PBMC of CHB patients

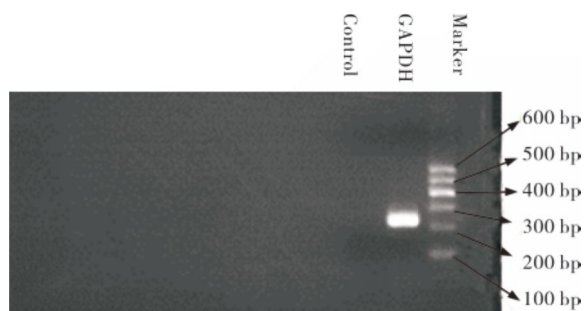


图3 CHB 患者 PBMC 中 GAPDH、阴性对照荧光定量 PCR 产物的电泳图

Fig.3 Electrophotogram of FQ-PCR products of GAPDH and control of CHB patients

表1 CHB 患者治疗前后 HBV-DNA 及肝功能水平变化

Tab.1 Comparison of HBV-DNA and hepatic function of CHB patients before treatment and 3 months after antiviral treatment ($\bar{x} \pm s$) or $M(QR)$

时间	<i>n</i>	IgHBV-DNA/ (Ig copies · mL ⁻¹)	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)
治疗前	19	6.180 ± 1.291	135 (87)	73 (79)
治疗 3 个月	19	3.829 (2.757)	60 (64)	47 (23)
<i>Z</i>		-3.582	-3.179	-3.219
<i>P</i>		0.000	0.001	0.001

表2 2 组患者 TRBV CDR3 克隆增生异常率、HBV-DNA 及肝功能水平比较

Tab.2 Comparison of clonal proliferation abnormal rate of TRBV CDR3, HBV-DNA and hepatic function between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TRBV CDR3 克隆 增生异常率/%	IgHBV-DNA/ (Ig copies · mL ⁻¹)	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)
应答组	13	30.125 ± 8.700	6.220 ± 1.101	184.780 ± 99.244	106.600 ± 57.952
无应答组	6	23.625 ± 6.804	6.110 ± 1.756	125.100 ± 33.207	67.070 ± 11.354
<i>t</i>		1.613	0.166	1.418	2.363
<i>P</i>		0.125	0.870	0.174	0.033

3 讨论

乙型肝炎的发病机制目前普遍认为与机体的免疫应答状态有关,HBV 抗原诱导的 T 细胞应答参与了肝脏的炎症损害过程^[6-7]。相关研究表明,HBV 感染的清除和病理损伤主要取决于机体的免疫应答状态,急性乙型肝炎患者的细胞免疫功能接近正常,可有效清除 HBV 达到治愈,而 CHB 患者细胞免疫功能多低下,导致不能有效清除病毒而引起持续的慢性感染。在人类外周血成熟 T 细胞中,α/β T 细胞约占 90% ~ 95%,其 TCR 分子为 α、β 链。研究发现外周血 TCR β 链可变区有 3 个互补决定区,与抗原结合的中心位点是 CDR3,抗原的多样性使 CDR3 同样具有多样性,1 种 CDR3 序列代表 1 个 T 细胞克隆,测定特定 CDR3 序列出现的

频率可以反映特定 T 细胞克隆扩增的程度和功能状态^[8]。

TCR CDR3 谱型分析技术是一种评价细胞免疫功能敏感且有效的方法,荧光定量 PCR 溶解曲线分析技术是利用荧光定量 PCR 和溶解曲线来分析 TCR CDR3 谱型的方法。本研究发现,每例 CHB 患者基线外周血 T 淋巴细胞均存在不同程度的克隆性增生,这与张光文等^[9-10]对慢性 HBV 无症状携带者及 CHB 患者外周血 TCR BV 家族均存在不同程度的 T 细胞克隆增生结果一致。肝功能及 HBV-DNA 定量是临床常用的评估患者肝脏炎症损伤及病毒复制水平的指标,定期检测可了解病情变化并为抗病毒治疗提供依据。入选的 19 例 CHB 患者,抗病毒治疗 3 个月时 ALT、AST 水平及 HBV-DNA 定量与治疗前比较均明显下降,提示干扰素-α 可明显抑制 HBV DNA 复制,减轻肝脏炎症。干扰素是人体内一种具有多种生物学活性的细胞因子,抗 HBV 治疗的临床有效率约 50%,抗病毒机制可直接抑制 HBV,也可调节机体的免疫功能,增强抑制 HBV 复制及清除 HBV 的能力。干扰素抗病毒治疗前,患者的细胞免疫功能状态不同,干扰素抗病毒治疗的早期病毒学应答效果也可能不同。本研究结果显示,病毒学应答组与无应答组 TRBV CDR3 克隆增生异常率、HBV-DNA 及 ALT 水平比较差异均无统计学意义,未提示 2 组间细胞免疫功能状态存在明显不同,可能与样本量偏小有关。急性 HBV 感染时,肝功能以 ALT 升高为主,CHB 时,ALT 轻至中度升高或反复异常,以 AST 升高为主,AST/ALT 常 > 1,AST 水平与肝病严重程度呈正相关。本研究结果表明,应答组患者 AST 水平显著高于无应答组,提示病毒学应答组患者肝细胞的损伤程度高于无应答组,间接提示病毒学应答组患者细胞免疫功能可能较无应答组增强。

总之,本研究未发现 CHB 患者基线细胞免疫功能状态与干扰素-α 抗病毒治疗早期病毒学应答间存在相关关系,扩大样本量后有待于进一步研究确定是否能用于干扰素抗病毒近期疗效的预测。

参考文献:

- [1] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (11): 1118-1129.
- [2] 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:2010 年版 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19 (1): 13-24.

于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 不良反应 观察组1例患者治疗2 d后出现轻微面部发红、瘙痒感,后症状自行缓解,未予处理;1例治疗3 d时出现轻微胸闷感,调慢LA滴速后症状缓解。

3 讨论

DNB是糖尿病的常见慢性并发症之一,发病率为40%~85%^[5],即使血糖控制良好仍有约25%的发病率。目前认为其发病机制是糖尿病患者长期高血糖的毒性作用及微血管病变引起神经缺血、缺氧,神经组织缺血、缺氧可引起氧化应激增强,自由基生成过多,最终使终末糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs)形成过多^[6],而AGEs过多又可进一步加重氧化应激,最终导致支配膀胱的交感、副交感神经出现神经膜细胞变性、节段性脱髓鞘和轴突变性等损害引起神经传导障碍及膀胱功能障碍。副交感神经受损时引起膀胱收缩力减弱,交感神经受损时增加排尿阻力导致尿潴留^[7]。目前DNB尚缺乏有效的治疗方法。抗氧化剂在糖尿病神经病变治疗中的作用日益受到重视^[8]。LA作为一种强氧化剂,能清除氧自由基,再生抗氧化物质,减弱氧化应激,加快神经传导速率,修正神经肽缺陷,使神经肽Y、神经生长因子及P物质恢复正常。有研究表明,LA可纠正高血糖引起的内皮衍生性超极化因子和一氧化氮的异常,降低糖尿病对心脏一氧化氮合酶的表达及活性的影响,调节一氧化氮介导的内皮细胞依赖性血管扩张,增加神经营养血管的血流量;同时可通过增加 Na^+/K^+ -三磷酸腺苷酶的活性,使得周围神经能量消耗的主要通路恢复,这对于小神经纤维的神经传导尤为重要。通过上述机制,LA可以改善支配膀胱的交感及副交感神经的神经传导,从而减轻神经功能损害,对神经源性膀胱有治疗作用^[9]。目前,在动物及临床试验中尚无关于LA严重不良反应的报道^[10]。本试验结果表明,在

血糖控制基本达标的基础上,应用LA治疗DNB,可明显改善患者的尿频、尿急、尿不尽等症状,总有效率达97.5%;可明显改善膀胱的顺应性,从而降低VMBC,提高其PQmax和MFR,减少残余尿量。本研究结果显示,经LA治疗21 d后,DNB患者SOD水平显著升高,提示LA可以改善DNB患者体内的氧化应激状态,提高DNB患者抗氧化应激的能力。这为LA在临床的应用提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] Goldman H B, Appell R A. Voiding dysfunction in women with diabetes mellitus[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 1999, 10 (2): 130-133.
- [2] 钱荣立. 关于糖尿病的新诊断标准及分型[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8 (1): 5-6.
- [3] Schafer W, Abrams P, Liao L, et al. Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry, and pressure-flow studies [J]. *Neurourol Urodyn*, 2002, 21 (3): 261-274.
- [4] 邓国忠, 潘爱明. 莫沙比利联合胰激肽原酶治疗糖尿病神经源性膀胱疗效观察[J]. 山东医药, 2011, 51 (35): 81-82.
- [5] 翼明, 史本康. 糖尿病神经源性膀胱尿道功能障碍的发病机制及治疗进展[J]. 山东医药, 2010, 50 (46): 112-113.
- [6] 谢小冷, 陈娟. 黄芪与丹参注射液联合甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[J]. 新乡医学院学报, 2008, 25 (4): 383-385.
- [7] 代雪梅, 刘丹, 谢琼, 等. 硫辛酸、依帕斯他联合治疗糖尿病神经源性膀胱疗效观察[J]. 中国美容医学, 2012, 21 (2): 305.
- [8] Finzi O, Miri R, Tavakkoli M, et al. Antioxidant therapy: current status and future prospects [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18 (25): 3871-3888.
- [9] 郑恂, 镇奋, 段跃. α -硫辛酸联合莫沙比利治疗糖尿病神经源性膀胱的临床研究[J]. 中国基础医药, 2013, 20 (11): 1620-1621.
- [10] Ziegler D, Low P A, Litchy W J, et al. Efficacy and safety of antioxidant treatment with α -lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: the NATHAN 1 trial [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34 (9): 2054-2060.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)

(上接第198页)

- [3] 朱启镛, 王建设. 慢性乙型肝炎的治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21 (10): 578-580.
- [4] 姚新生, 马骊, 温茜, 等. 监测TCR CDR3漂移的免疫扫描谱型分析技术的建立与鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26 (6): 571-573.
- [5] 胡云良, 杨介钻, 倪莉, 等. 正常人外周血 $\alpha\beta$ T细胞TCR β 链CDR3多态性和长度分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23 (6): 492-498.
- [6] Liaw Y F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment [J]. *Liver Int*, 2009, 29 (1): 100-107.

- [7] Wei L. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what determines prognosis after cirrhotic decompensation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23 (11): 1631-1632.
- [8] 伍绍强. CHB患者外周血及肝组织中T淋巴细胞受体 β 链互补决定区3谱系分析[D]. 遵义: 遵义医学院, 2010.
- [9] 张光文, 姚新生, 马世武, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞受体谱系分析及互补决定区3序列测定[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14 (1): 23-28.
- [10] 张光文, 姚新生, 马世武, 等. 慢性无症状乙型肝炎病毒携带者外周血T细胞受体谱型分析[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31 (3): 246-249.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)