

聚乙二醇干扰素治疗非活动性 HBsAg 携带者获得 HBsAg 清除者的 CD4⁺ CD25⁺ 调节 T 细胞的研究

于海滨 马丽娜 柳雅立 画 伟 何志敏 鲁俊锋 陈新月

摘要 目的 探讨聚乙二醇干扰素治疗非活动性 HBsAg 携带者过程中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的意义。方法 15 例非活动性 HBsAg 携带者接受聚乙二醇干扰素 - α 2a, 治疗至 48 周全部获得了 HBsAg 清除。每 12 周观察肝功能、乙肝表面抗原效价、CD4⁺ CD25⁺ Treg 变化。结果 HBsAg 清除前节点的 ALT (59.41 ± 35.20 U/L) 较基线 (25.72 ± 12.85 U/L)、48 周 (27.86 ± 10.27 U/L) 升高更明显 ($P < 0.05$); CD4⁺ CD25⁺ Treg 变化与 ALT 同步, HBsAg 清除前节点的 ALT (9.07 ± 3.37) 较基线 (2.72 ± 1.33)、48 周 (3.13 ± 1.18) 升高更明显 ($P < 0.05$); 谷丙转氨酶 (ALT) 与 CD4⁺ CD25⁺ Treg 比率呈正相关 ($R = 0.769, P = 0.008$) 但是 Treg 比率与 HBsAg 效价 (log) 无相关性 ($R = -0.14, P = 0.879$)。结论 聚乙二醇干扰素 - α 2a 治疗过程中, ALT 在 HBsAg 清除前节点明显升高, 可能系机体免疫被激活表现, 而 CD4⁺ CD25⁺ Treg 比率同步升高可使机体维持保护性免疫, 避免激发过度的免疫反应所致的肝脏病理损伤。

关键词 非活动性 HBsAg 携带者 聚乙二醇干扰素 - α 2a 调节性 T 细胞

CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells From Peripheral Blood in Inactive HBsAg Carriers Following Peginterferon Therapy. Yu Haibin, Ma Lina, Liu Yali, Hua Wei, He Zhimin, Lu Junfeng, Chen Xinyue. Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To investigate CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from peripheral blood in inactive HBsAg carriers following PEG - interferon - α 2a treatment. **Methods** Fifteen patients received PEG - interferon - α 2a treatment for 48 weeks and achieved HBsAg clearance. All subjects were assessed for HBsAg titer, presence of anti - HBe, serum alanine aminotransaminase, the proportion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells per 12 weeks. **Results** The ALT level and proportion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells at pre - seroclearance point were higher than those at baseline and weeks 48. ALT was positively correlated with the proportion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. ALT was not related with the proportion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. **Conclusion** The increase of ALT at pre - seroclearance point is a suggestion of the intensive immunity in patients with chronic hepatitis B, which could be related to the hepatocyte damage. While the CD4⁺ CD25⁺ Treg ratio rise accordingly can avoid excessive immune responses those may induce liver pathological injury.

Key words Inactive HBsAg carriers; Peginterferon - α 2a; Treg

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是世界范围内的严重公共卫生问题之一, 全球约有 3.5 亿多 HBV 慢性感染者, 中国占全球的 1/3, 其中约有 20% ~ 30% 发展成肝硬化, 且 2% ~ 5% 的肝硬化患者会发展成肝癌, 这对人们的生命构成了严重的威胁^[1,2]。 α - 干扰素是慢性病毒性肝炎 (CHB) 抗病毒治疗的有效药物之一, 但持续应答率仅约 30%。机体的免疫反应状态可能是影响 α - 干扰素抗病毒疗效的最为重要的因素。既往文献报道表明: 调节性 T 细胞 (Treg) 参与 HBV 持续感染的免疫发病, 慢性 HBV 感染者中

CD4⁺ CD25⁺ Treg 的增高可能对其抗病毒免疫应答产生抑制, 从而促进感染的慢性化^[3,4]。但对于 CHB 患者中免疫抑制功能的研究并不深入, 为了明确 CHB 患者中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的免疫功能及其在抗病毒免疫应答抑制方面的作用, 我们对 15 例非活动性 HBsAg 携带者聚乙二醇干扰素 - α 2a 治疗过程中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 变化进行研究, 并初步讨论了这些变化的临床意义。

材料与方法

1. 材料: (1) 研究对象: 15 例诊断为非活动性 HBsAg 携带者均为 2009 年 1 月 ~ 2011 年 6 月在北京佑安医院接受抗病毒治疗且定期随诊者。本研究经北京佑安医院伦理委员会同意, 每位受试者均签署知情同意书。15 例病人接受聚乙二醇 - 干扰素治疗, 48 周评估疗效均获得 HBsAg 转阴或血清学转换。非活动性 HBsAg 携带者诊断符合 2010 年中华医学会肝

基金项目: 国家“十一五”科技重大专项课题基金资助项目 (2008ZX10002 - 004)

作者单位: 100069 首都医科大学附属北京佑安医院

通讯作者: 陈新月, 电子信箱: chenxy63050639@ yahoo. com. cn

病学及感染病学分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》,即:HBsAg 阳性,HBsAg 阴性、抗 - HBe 阳性,HBV DNA 低于检测下限。1 年内连续随访 3 次以上,ALT 均在正常范围。肝组织学检查显示 Knodell 肝炎活动指数(HAI) < 4 或根据其他的半定量计分系统判定病变轻微。除上述条件外,入组本研究中者要求 HBsAg < 1000U/ml,HBV DNA < 500 拷贝/毫升,年龄 24 ~ 65 岁。HBsAg 转阴前节点:入组的非活动性 HBsAg 携带者每 12 周检测 HBsAg 定量,检测到 HBsAg 转阴的前 12 周为 HBsAg 转阴前节点。(2)试剂与仪器:抗 - CD4 - FITC(人),抗 - CD25 - PE(人),抗 - IgG1 - FITC/PE(鼠),抗 - Foxp3 - PE(人),抗 - IgG2a - PE(鼠)购于美国 BD 公司;流式细胞仪为美国 BD 公司(FACScalibur, BD)。以 OLM-PUS - AU5400 生化检测仪检测肝功能。HBV DNA 定量:采用荧光定量聚合酶链反应法(FQ - PCR),应用 Applied Biosystems 5700 荧光定量扩增仪及相关试剂盒进行检测。检测下限为低于 500 拷贝/毫升。HBV - M 定量:应用罗氏 Elecsys® HBsAg II 定量检测。

2. 实验方法:(1)Treg 细胞的抗体标记:每个样品管加入 100 μ l PBMC(大约 1×10^6 个细胞),每份标本设同型对照管;加 20 μ l 抗 - CD4 - FITC(人),5 μ l 抗 - CD25 - PE(人)至试验管[抗 - IgG1 - FITC/PE(鼠)各 20 μ l 至同型对照管],4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min;用 2ml PBS 冲洗细胞;2000r/min,5min 离心后弃上清;用涡旋振荡器悬浮细胞后,加入 1ml 固定液,涡旋振荡混匀;4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 ~ 60min;加 2ml Buffer 洗细胞,1600r/min,5min 离心,弃上清;再次悬浮细胞后;加入 2 μ l 的正常鼠血清至 100 μ l 上述细胞悬液中(终浓度为 2%),4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min,进行封闭;封闭后无需冲洗,在终体积 100 μ l 中分别加入抗 - Foxp3 - PE(人)和同型对照,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min;加 2ml Buffer 洗细胞,1600r/min,5min 离心,弃上清;重悬细胞,上机进行流式分析。不能立即上流式检测的应加 1% 多聚甲醛固定液重悬细胞待检测。(2)流式细胞仪检测 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ 细胞的表达比率:用流式细胞仪检测,Cellquest 软件分析数据。以前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)射门选取淋巴细胞群,以 CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞设门(二级设门),分析 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ 的 Treg 细胞占 CD4 $^{+}$ 细胞的百分比。

3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件对实验结果进行分析,符合正态分布两组样本比较用 *t* 检验,不符合正态分布样本比较用秩和检验。相关性分析用 Pearson 相关检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 非活动性 HBsAg 携带者基线资料:应答组与健康对照组在性别、年龄、基线谷丙转氨酶(ALT)、白细胞无统计学差异,具有可比性,基线时,应答组 Treg 与健康对照组相比无统计学差异,应答组 HBsAg 效价高于健康对照组($P = 0.000$),结果见表 1。

表 1 非活动性 HBsAg 携带者一般资料

参数	应答组($n = 15$)	健康对照组($n = 12$)
性别(男性/女性)	8/7	6/6
年龄(岁)	33.3 $\pm$ 9.7	35.0 $\pm$ 10.7
ALT(U/L)	25.72 $\pm$ 12.85	28.25 $\pm$ 6.85
AST(U/L)	27.8 $\pm$ 10.2	18.8 $\pm$ 3.1
TBIL(μ mol/L)	17.7 $\pm$ 10.9	13.5 $\pm$ 5.3
WBC(10^9 /L)	5.4 $\pm$ 2.0	5.9 $\pm$ 2.8
HBV DNA	低于最低检测值	低于最低检测值
HBsAg(U/ml)	86.63 $\pm$ 120.46 [*]	UD
Treg	2.72 $\pm$ 1.33	3.25 $\pm$ 1.22

与健康对照组比较,^{*} $P < 0.05$;UD:未检测到

2. Treg 与 ALT、HBsAg 效价(log)动态变化:治疗过程中 Treg 与 ALT、HBsAg 效价(log)动态变化见表 2,治疗过程中,ALT 在 HBsAg 清除前节点较基线有升高趋势,且 HBsAg 清除前节点 ALT 与基线、48 周比较有统计学差异($P = 0.000$, $P = 0.000$);基线与 48 周相比较 ALT 无统计学差异(表 2)。与 ALT 同步变化的为 Treg 的比率,Treg 在 HBsAg 清除前节点较基线有升高趋势,且 HBsAg 清除前节点的 Treg 比率与基线、48 周比较有统计学差异($P = 0.002$, $P = 0.003$);基线与 48 周相比较 ALT 无统计学差异(图 1,图 2)。

表 2 Treg 与 ALT、HBsAg 效价(log)动态变化

项目	Treg	ALT	HBsAg 效价(log)
基线	2.72 $\pm$ 1.33	25.72 $\pm$ 12.85	1.33 $\pm$ 0.96
HBsAg 清除前节点	9.07 $\pm$ 3.37	59.41 $\pm$ 35.20	0.54 $\pm$ 1.29
48 周	3.13 $\pm$ 1.18	27.86 $\pm$ 10.27	-1.3 $\pm$ 0.00

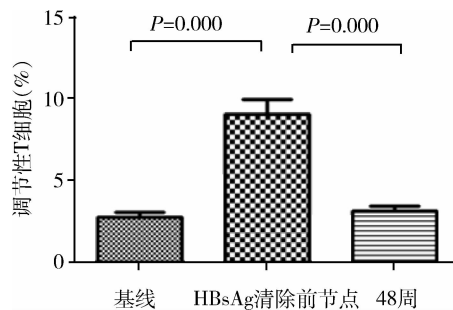


图 1 不同节点 Treg 比较

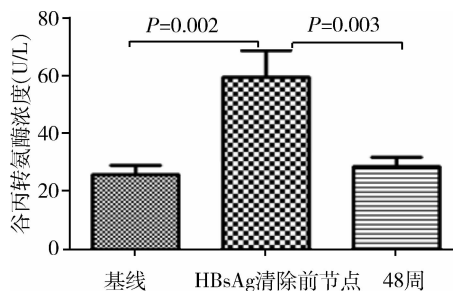


图 2 不同节点 ALT 比较

3. Treg 与 ALT、HBsAg 效价(log)的相关性检验: 在 HBsAg 清除前节点 ALT 升高,且 Treg 比率与 ALT 呈正相关($R = 0.769, P = 0.008$),如图 3 所示,但是 Treg 比率与 HBsAg 效价(log)无相关性($R = -0.14, P = 0.879$),如图 4。

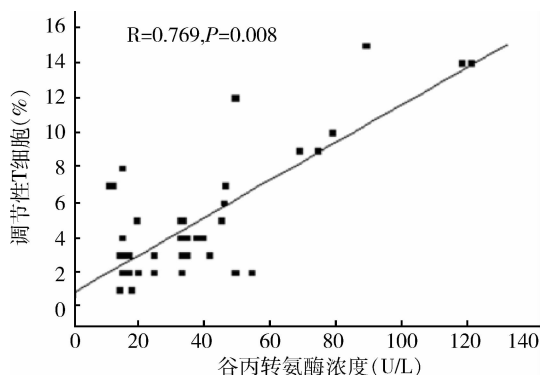


图 3 Treg 比率与 ALT 相关性比较

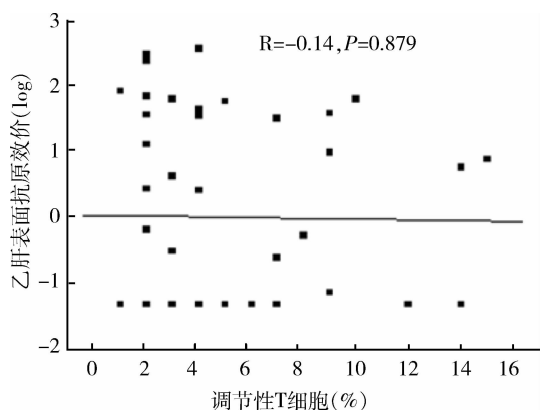


图 4 Treg 比率与 HBsAg 效价(log)相关性比较

讨 论

HBV 感染慢性化的机制很复杂,其中机体免疫对于清除病毒发挥极为重要的作用,它可以影响病毒的复制和清除,使机体产生保护。又可以因为机体抗病毒免疫功能低下导致了感染慢性化。既往研究表明,HBV 的清除是依赖 CTL 介导的病毒特异性的肝细胞溶解和(或)细胞因子如 $IFN-\gamma$ 等的抗病毒效应^[5]。

Treg 最基本的分子表达特征为持续稳定表达 CD25,而 Foxp3 是 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞分化发育和功能维持的重要调控基因,故本研究将 $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ 为 Treg 细胞的特异性标志。本研究结果显示非活动性 HBsAg 携带者接受聚乙二醇干扰素治疗,在 HBsAg 清除前节点,ALT 较基线升高明显。研究结果与既往研究相符。有研究结果显示干扰素治疗过程中如 ALT 明显升高,则 HBV DNA 持续阴转率提高,ALT 明显升高可作为慢性乙型肝炎患者抗病

毒治疗的预测因素。这可能是因为该群患者应用干扰素治疗过程中,机体免疫应答被激活,从而有效清除肝内 HBV^[6]。另外,本研究结果提示 ALT 及 Treg 比例呈正相关,二者均在 HBsAg 清除前节点升高,而 HBsAg 清除后恢复正常。程瑗等^[7]发现外周血中 $CD4^+CD25^+$ Treg 水平慢乙肝患者 ALT、AST 水平的相关性,提示在慢性 HBV 感染中,Treg 可能发挥了维持免疫稳态的作用,Treg 的数量增加使得机体维持保护性免疫,避免了过度的免疫反应,而导致过度的免疫反应会造成炎症激活和肝脏损伤。

同时本研究显示 Treg 比率与 HBsAg 清除无直接相关性。目前国内外关于 HBV 感染与 Treg 的研究大多结果表明:Treg 在慢性活动性乙型肝炎患者外周血中的数量较正常人升高。然而研究中大都选择了未经抗病毒治疗的急慢性乙型病毒性肝炎患者为研究对象,关于接受抗病毒治疗后的慢性乙肝患者,尤其是关于非活动性 HBsAg 携带者接受聚乙二醇干扰素治疗其外周血中 Treg 的数量和功能研究不多,更缺乏 Treg 与抗病毒疗效的研究,关于 Treg 跟 HBV 感染者各临床参数之间的相关性的结果仍存在较大争议^[8,9]。本研究系小样本研究,Treg 是否影响 HBsAg 清除? 还需要更大样本、更深一步的研究证实。

参考文献

- 1 晏泽辉,邓国宏,王宇明,等. 乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究进展及前景[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(8): 1002-1007
- 2 曹志成. 肝癌的病因与诊疗研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(18): 1755-1761
- 3 Stoop JN, Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2005, 41(4): 771-778
- 4 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, *et al.* Modulation of the $CD8^+$ - T - cell response by $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection[J]. *J Virol*, 2005, 79(6): 3322-3328
- 5 Maini MK, Boni C, Lee CK, *et al.* The role of virus - specific $CD8^+$ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(8): 1269-1280
- 6 邱莲女,朱永泽,周永列,等. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞 $CD8^+CD38^+$ 的检测意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2004, 4(2): 97-98
- 7 程瑗,金晓芝,叶超,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞数量与肝脏疾病慢性化进展关系的研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 8(40): 50-55
- 8 Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, *et al.* $CD4^+CD25^+$ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine - dependent mechanisms[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(1): 111-119
- 9 Xue - Song L, Cheng - Zhong L, Ying Z, *et al.* Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12(1): 43

(收稿:2012-05-04)

(修回:2012-06-18)