

干扰素与核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎对病人外周血调节性 T 细胞影响的差异研究

李 伟,何俊楠,李冬冬,赵守松

[摘要] **目的:**探讨干扰素与核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎(CHB)对病人外周血调节性 T 细胞水平影响的差异。**方法:**10 例接受干扰素治疗(干扰素组),13 例接受核苷(酸)类似物治疗(核苷组)的 CHB 病人,治疗前及治疗过程中检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Tregs 比例,并比较其差异性。**结果:**2 组 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞均呈下降趋势,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。2 组治疗开始时、治疗第 3 个月、第 6 个月差异均无统计学意义($P > 0.05$),治疗第 9 个月时,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**干扰素对 CHB 病人外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞水平变化的影响较核苷(酸)类似物更大,提示其可能具有远期免疫调节作用。

[关键词] 乙型肝炎;调节性 T 淋巴细胞;干扰素;核苷(酸)类似物;抗病毒治疗

[中图分类号] R 512.6

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.07.011

Study on the difference of peripheral blood regulatory T lymphocytes in chronic hepatitis B patients treated with antiviral

LI Wei, HE Jun-nan, LI Dong-dong, ZHAO Shou-song

(Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the difference and significance of the expression of regulatory T cells in peripheral blood of chronic hepatitis B (CHB) patients treated with interferon and nucleotide analogue. **Methods:**Ten CHB patients were treated with interferon (IFN group), and 13 CHB patients were treated with nucleoside (acid) analogue (nucleoside group). The ratio of the peripheral blood CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Tregs was detected before and during treatment, and the difference of which was compared.

Results:The CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg cells in two groups showed a downward trend, the difference between two groups was statistically significant ($P < 0.01$). The differences of cells at the beginning of treatment, and at 3 and 6 months of treatment between two groups were not statistically significant ($P > 0.05$), and the difference of which at 9 months of treatment between two groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:**The effect of interferon on the level of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg cells in peripheral blood of patients with CHB is greater than that of nucleoside analogue, which suggests that it may have long-term immunomodulatory effects.

[Key words] hepatitis B; regulatory T lymphocyte; interferon; nucleoside (acid) analogue; antiviral therapy

我国是慢性乙型肝炎(CHB)高发地区,其治疗措施中最关键的是抗病毒治疗,目前我国批准的抗病毒药物主要包括干扰素类和核苷(酸)类药物。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一种诱导机体免疫耐受的 T 细胞亚群,可以抑制机体免疫反应,导致乙型肝炎病毒(HBV)感染慢性化。干扰素除了抗病毒作用外还有免疫调节作用,而核苷(酸)类药物对机体的免疫调节作用目前研究较少。本文就干扰素和核苷(酸)类药物治疗 CHB 过程中外周

血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 表达水平及相关临床指标作一探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 - 2015 年我科收治的 CHB 病人 23 例,其中男 16 例,女 7 例,年龄 25 ~ 45 岁。23 例均符合《2010 年慢性乙型肝炎防治指南》中的 CHB 诊断标准和抗病毒治疗推荐意见,无抗病毒治疗禁忌证。排除同时合并感染人类免疫缺陷病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒等其他病毒性肝炎及自身免疫性肝炎、脂肪肝等疾病。干扰素治疗 10 例(干扰素组),核苷(酸)类似物治疗 13 例(核苷组),2 组一般资料具有可比性。

1.2 治疗方法 干扰素组:给予重组人干扰素-α

[收稿日期] 2017-01-15

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 感染病科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 李 伟(1979 -),男,硕士,主治医师。

[通信作者] 赵守松,硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail: 857776630@139.com

或聚乙二醇干扰素每周 1 支;核苷组:给予拉米夫定和/或阿德福韦酯,或恩替卡韦,或替比夫定,或替诺福韦酯治疗。所有病人均给予保肝治疗(水飞蓟宾葡甲胺片,湖南千金协力药业有限公司)。

1.3 外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞的检测 入院后第 2 天,抽取空腹状态下肘静脉血 2 mL,使用 EDTA-K₂ 抗凝,室温下放置,加入 20 μL PerCP-CD4 抗体、20 μL FITC-CD25 抗体、10 μL PE-CD127 抗体(美国 BD 公司),阴性对照管中加入 CD4、CD25 同型阴性对照剂,振荡混匀,35 ℃ 孵育 15 min;每管加 2 mL 红细胞裂解液,振荡混匀,35 ℃ 孵育 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;每管中加 1 mL PBS 液(福州迈新生物技术开发有限公司)洗涤细胞 2 次,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;每管中加入 0.5 mL 1 × PBS 液制成悬液,流式细胞仪检测(FACSCalibur 流式细胞仪;美国 BD 公司),选出 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞群,CellQuest 软件分析并计算其占 CD4⁺T 细胞的百分

比。分别于治疗基线、第 3 个月、第 6 个月、第 9 个月随访空腹状态下抽取肘静脉血重复上述检测。

1.4 统计学方法 采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2 组组内各时间点 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞水平差异均有统计学意义($P < 0.01$)。第 3 个月与基线比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),第 6 个月、第 9 个月均较基线明显降低($P < 0.01$)。干扰素组第 9 个月低于第 6 个月($P < 0.05$),而核苷组第 6 个月明显低于第 3 个月($P < 0.05$)。2 组第 3、6 个月 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),而第 9 个月差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

3 讨论

HBV 感染目前仍然是一个显著的全球性健康

表 1 2 组各时间点 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞水平变化($\bar{x} \pm s$;%)

分组	<i>n</i>	基线	3 个月	6 个月	9 个月	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
干扰素组	10	5.83 ± 0.67	5.65 ± 1.07	3.83 ± 0.88* * Δ	3.29 ± 1.01* * #	19.35	<0.01	0.96
核苷组	13	5.96 ± 1.23	5.74 ± 1.48	4.67 ± 1.08* * Δ	4.45 ± 0.96* * #	6.69	<0.01	3.11
<i>t</i>	—	0.29	1.51	3.82	8.03	—	—	—
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	—	—	—

q 检验:与基线比较* * $P < 0.01$;与 3 个月时比较 Δ $P < 0.05$;与 6 个月时比较 # $P < 0.05$

问题。尽管乙型肝炎疫苗已应用了 30 年,但是慢性 HBV 感染的全球患病率只从 1990 年的 4.2% 下降到 2005 年的 3.7%^[1],慢性感染者的绝对数量已经从 1990 年的 2.23 亿增加到 2005 年的 2.4 亿。长期抗病毒治疗,使 HBV 复制持续抑制,炎症得以控制,可减少肝炎的进展,并最终提高病人整体存活率。目前,已经有 7 种药物被批准用于治疗慢性 HBV 感染:干扰素两种剂型(IFN)(包括标准和聚乙二醇化)和 5 个核苷(酸)类似物(包括拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦、阿德福韦和替诺福韦)。干扰素的治疗机制包括抗病毒、抗肝脏纤维化、抗细胞增殖以及免疫调节作用。其治疗时程有限,而且乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)血清转换发生率较高,因发热、掉发、骨髓抑制等不良反应和应用不方便等原因,病人多不愿接受。核苷(酸)类似物可抑制 HBV-DNA 聚合酶活性,通过靶向 HBV 编码的逆转录酶抑制 DNA 复制,它比干扰素治疗更方便,不良反应较少,并且更迅速地降低 HBV-DNA 水平。但是核苷(酸)类似物疗法需要服用多年,甚至是终身,而且长时间

的药物治疗会有增加耐药性、降低依从性等相关风险,且伴有成本增加。目前,抗病毒治疗满意的终点是丙氨酸氨基转移酶复常,HBV-DNA 转阴,HBeAg 转阴和/或 HBeAg/抗-HBe 血清学转换^[2-3]。这些结果代表着临床指标朝着最终目标改善。

作为一组异质性 T 细胞,Treg 积极参与各种免疫反应,通过调节先天性^[4]和适应性免疫系统,在维持外周免疫耐受并在调节感染疾病,移植、自身免疫性疾病的免疫力和通过抑制细胞增殖和效应功能抑制癌症方面发挥着核心作用^[5]。GUO 等^[6]报道 CD4⁺CD25⁺Treg 在 CHB 病人中较健康对照组明显增高。Treg 在 CHB 中起着双重作用,一方面可以抑制过度的免疫应答造成的肝组织损伤;另一方面,也会抑制宿主对病毒的免疫应答,不利于宿主对病毒的清除,使感染慢性化。Treg 细胞水平可能与 CHB 的慢性化病程有关。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的 PD-1 可通过与 CD8⁺T 细胞上表达的 PD-L1 相互作用,对 CD8⁺T 细胞免疫应答表达产生抑制作用^[7]。最近有报道^[8]显示,Tregs 上固有的白细胞介素-2 表达减

少可以维持免疫耐受,预防自身免疫反应。有研究^[9]认为叉头状/翅状螺旋转录因子(Foxp3)是CD4⁺CD25⁺Treg细胞的特异性标志,其在Treg的发育、诱导及功能发挥上起着举足轻重的作用,能反映Treg的表达水平和细胞活性。LIU等^[10]认为也可以把CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}作为表面标志来界定Treg细胞,这种标志办法产生的Treg与通过FoxP3标志的Treg基本无差异。

Treg细胞可能参与抗病毒治疗的过程及其预后,MA等^[14]在研究干扰素治疗CHB时发现,出现HBeAg血清转换的应答者中,CD4⁺CD25⁺Treg在治疗期间相对频率降低,在应答者随访期间仍保持低位。在无应答者体内,治疗期间轻度下降,但终止后有反弹。本研究发现CHB病人在接受干扰素抗病毒治疗过程中,外周血CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg细胞水平总体也呈下降趋势,干扰素治疗组内各时间点之间CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg细胞水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中第3个月CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg细胞水平与基线时差异无统计学意义($P > 0.05$),第6个月、第9个月较基线明显降低($P < 0.01$),第9个月低于第6个月($P < 0.05$)。干扰素治疗时CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg细胞水平处于下降趋势,其中在第9个月时明显下降,由此推测相对于核苷(酸)类药物,干扰素药物在CHB治疗后期,因其免疫调节功能,可使得细胞免疫功能修复得更佳。YU等^[12]在研究CHB接受核苷类似物治疗后Treg细胞数和白细胞介素-10、转化生长因子- β (TGF- β)和白细胞介素-23水平明显减少,潘修成等^[13]报道CHB病人接受替比夫定抗病毒治疗过程中,治疗早期Treg水平开始下降者发生HBeAg血清转换发生率更高。有研究^[14]报道,阿德福韦诱导病毒载量下降的同时循环Treg也随之下降,并伴有免疫应答的部分恢复,并且核苷类药物治疗过程中,因病毒载量和抗原滴度的减少,导致Treg细胞生成减少,可诱导免疫应答的恢复。此外,YAN等^[15]发现CHB病人接受核苷类药物治疗后肝功能复常与CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg的细胞水平无关。

综上所述,有效的抗病毒治疗能够持续抑制病毒复制和抗原产生,导致Treg细胞诱导生成减少,从而导致免疫应答的恢复。

[参 考 文 献]

[1] OTT JJ, STEVENS GA, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection; new estimates of age-specific HBsAg

seroprevalence and endemicity [J]. *Vaccine*, 2012, 30(12): 2212.

- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines; management of chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(1): 167.
- [3] LIAW YF, KAO JH, PIRATVISUTH T, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update [J]. *Hepatol Intern*, 2012, 6(3): 531.
- [4] DURANTELL D, ZOULIM F. Innate response to hepatitis B virus infection; observations challenging the concept of a stealth virus [J]. *Hepatology*, 2009, 50(6): 1692.
- [5] RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, et al. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 144.
- [6] GUO PP, LI SP, WU W, et al. Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection [J]. *Immunology*, 2008, 123(1): 57.
- [7] PARK HJ, PARK JS, JEONG YH, et al. PD-1 Upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8⁺T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8⁺T cells [J]. *J Immunol*, 2015, 194(12): 5801.
- [8] JONES A, OPEJIN A, HENDERSON JG, et al. Peripherally induced tolerance depends on peripheral regulatory T cells that require hopx to inhibit intrinsic IL-2 expression [J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1489.
- [9] SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4): 345.
- [10] LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺Treg cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1701.
- [11] MA H, ZHANG HH, WEI L. Frequency of T-cell FoxP3(+) Treg and CD4(+)/CD8(+) PD-1 expression is related to HBeAg seroconversion in hepatitis B patients on pegylated interferon [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(2): 267.
- [12] YU XP, GUO RY, SU ML, et al. Dynamic changes of Treg and Th17 cells and related cytokines closely correlate with the virological and biochemical response in chronic hepatitis B patients undergoing nucleos(t)ide analogues treatment [J]. *Hepat Mon*, 2013, 13(12): e15332.
- [13] 潘修成, 杨帆, 陈明, 等. 替比夫定对慢性乙型肝炎患者外周血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞动态变化的影响及其临床意义 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2008, 16(12): 885.
- [14] STOOP JN, VANDER MOLEN RG, KUIPERS EJ, et al. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B [J]. *Virology*, 2007, 361(1): 141.
- [15] YAN Z, ZHOU J, ZHANG M, et al. Telbivudine decreases proportion of peripheral blood CD4⁺CD25⁺CD127^{low}T cells in parallel with inhibiting hepatitis B virus DNA [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 2024.