文章编号:1000-5404(2010)22-2417-03

论著

恩替卡韦抗病毒治疗对慢性乙型肝炎患者外周血Th17细胞变化的影响

宋春辉,杨 斌,陈黎明,张纪元,王陆军 (100039 北京,解放军第302医院肝病生物治疗研究中心)

【摘要】 **目的** 研究恩替卡韦(entekavir,ETV)治疗慢性乙型肝炎患者过程中Th17细胞的变化。**方法** 在应用ETV治疗的不同时间点抽取HBV感染患者及健康对照者静脉血,分离血清及外周血单核细胞(PMBC),检测血清中乙型肝炎病毒表面标志物(HBV-M)、乙型肝炎病毒核酸定量(HBV DNA)、丙氨酸转移酶(ALT)以及外周血中的Th17细胞的频数。**结果** 应用ETV治疗后患者ALT及HBV DNA从4周开始出现明显下降,IL-17$^+$及IL-17$^+$IFN-γ$^-$ T细胞的频数在第4周时明显升高[IL-17$^+$(6.32±2.26)%,IL-17$^+$IFN-γ$^-$ T(4.68±1.73)%],其后逐渐下降至24周,在48周时接近于基线点,在所有时间点均高于健康对照($P<0.05$)。IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T细胞的频数第4周时明显升高,在36周时达到峰值[IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T(1.92±0.97)%],在48周时明显下降,但在所有时间点明显高于健康对照($P<0.05$)。**结论** ETV在有效抑制病毒复制的同时,能够降低体内Th17细胞的频数,意味着体内炎症反应的减轻,同时也可能削弱机体清除病毒的能力。

【关键词】 恩替卡韦;乙肝病毒;Th17细胞
【中图法分类号】 R512.62;R446.61;R978.7 【文献标志码】 A

Profiles of circulating Th17 cells in chronic HBV patients after enticarvir antiviral treatment

Song Chunhui, Yang Bin, Chen Liming, Zhang Jiyua, Wang Lujun (Liver Disease Research Center for Biological Therapy, No. 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the profiles of Th17 cells in chronically HBV-infected patients with enticarvir (ETV) treatment. **Methods** Serum and peripheral blood monouclear cells (PBMCs) were obtained from 9 enrolled CHB patients who admitted in our center in December 2008 and 9 matched health controls. The patients were administered 0.5 mg ETV, once per day for 48 weeks. Their ALT, HBV DNA, HBV markers as well as the frequency of Th17 cells were measured and monitored in 4, 12, 24, 36 and 48 weeks after the treatment. **Results** There was a significant decrease in ALT and HBV DNA levels in patients after 4 weeks' ETV treatment, but the percentage of peripheral IL-17$^+$ and IL-17$^+$IFN-γ$^-$ T cells were significantly increased from the 4th week [(6.32±2.26)% and (4.68±1.73)% respectively] and then gradually decreased later till 24 weeks, even almost closed to the baselines at the end of 48 weeks' treatment, but they still higher than the counterparts in healthy controls at any time point. The percentage of peripheral IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T cells was increased significantly at the 36th week [(1.92±0.97)%], and then decreased significantly after 48 weeks' treatment, though much higher than that of healthy controls at any time point. **Conclusion** ETV efficiently suppresses HBV replication, which may be correlated with the decrease of Th17 cells and thus might attenuate hepatic inflammation in the disease.

【**Key words**】 enticarvir; hepatitis B virus; Th17 cells

Corresponding author: Wang Lujun, E-mail: wanglujun302yy@sina.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是全球性的卫生问题,目前认为核苷类药物能够有效地控制HBV的复制,缓解及控制乙型肝炎的进展。其中具有代表性的药物恩替卡韦(entekavir,ETV)是一种强有力的抗病毒药物,具有高效性及良好的耐受性的特

【通信作者】 王陆军,E-mail:wanglujun302yy@sina.com

点,适于各种情况的乙型肝炎患者[1,2]。本研究选择在慢性乙型肝炎的病程中表型为 IL-17$^+$ IFN-γ$^+$ 及 IL-17$^+$ IFN-γ$^-$ 的 Th17 细胞,研究其在 ETV 治疗过程中频数的变化情况,希望能够了解在 ETV 治疗过程中炎症反应及清除病毒能力变化的一些侧面,为新的联合治疗探索方向。

1 对象与方法

1.1 对象

选取本科 2008 年 12 月收治的 9 例诊断为病毒性肝炎乙型慢性的患者,按照 2000 年 9 月修订的病毒性肝炎防治方案中的标准诊断[3]。其中男性 6 例,女性 3 例,年龄为(33.33 ± 5.07)岁;所有患者发现 HBsAg(+)>6 个月,血清 HBV DNA > 2×10^4 IU/ml。血清 ALT 水平持续或间断性升高大于正常值上限 2 倍以上。选择 9 例健康人为对照,其中男性 6 例,女性 3 例,年龄为(28.78 ± 5.76)岁。所有患者及健康对照无丙肝病毒、丁肝病毒、庚肝病毒、HIV 等感染病史。

1.2 药物治疗及临床指标检测

9 例患者从基线时间点开始口服 ETV 0.5 mg(解放军第 302 医院制剂室与杭州盛友医药技术开发有限公司联合开发的分散片),每日 1 次进行抗病毒治疗持续 48 周(其后继续服用药物治疗),健康对照组不服用药物。HBV 感染患者在基线点,治疗的第 4、12、24、36、48 周当天检测乙型肝炎病毒表面标志物(HBV-M)、乙型肝炎病毒核酸定量(HBV DNA)、丙氨酸转移酶(ALT)。ALT、HBV-M 均采用酶联免疫吸附法检测,HBV DNA 检测采用 RT-PCR 法检测。

1.3 分离外周血单核细胞(PBMC)及血清 HBV

感染者在每个时间点晨起抽血 20 ml,肝素抗凝。离心分离出血清后,应用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离出 PBMC。

1.4 细胞培养

首先根据反应所需孔数,对 PBMC 应用配置好的完全培养液进行稀释。然后加入到每个孔中,保证体积为 500 μl,细胞数不少于 1×10^6/孔。加入 40 ng/ml 的豆蔻酸佛波醇乙酸酯(PMA)和 500 ng/ml 伊屋诺霉素。放入 37 ℃,5% CO_2 孵育箱内培养 8 h,培养 1 h 后每孔加入莫能霉素 0.5 μl 后继续培养。

1.5 细胞表型染色

将培养后的细胞离心弃上清后加入 anti-CD3-PerCP、anti-CD4-APC 10 μl(圈门),充分振荡避光保存 20 min。洗涤后离心弃上清待用。

1.6 细胞内因子染色

离心后细胞加入破膜液 300 μl,充分振荡后,避光保存 25 min。将破膜洗液用去离子水 10 倍稀释,每管内加入 1 ml,充分振荡离心弃上清。按实验分组分别加入 anti-IFN-γ-FITC、anti-IL-17-PE 抗体。充分振荡,避光保存 20 min。洗涤后应用 FACSCalibur 流式细胞仪进行检测,应用 FACSCalibur 软件进行分析,其中 CD3$^+$ CD4$^+$ IL-17$^+$ IFN-γ$^+$ 及 CD3$^+$ CD4$^+$ IL-17$^+$ IFN-γ$^-$ T 细胞即为待检测细胞。MouseIgG1、k/PE 为同型抗体。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件,行配对 t 检验判断组间差异。

2 结果

2.1 应用 ETV 后患者临床指标的变化

应用 ETV 治疗后,所有患者血清中的 HBV DNA 在第 4 周开始出现明显下降,在第 12 周时已接近检测低限值,至 36 周时已达到检测低限值(<100 IU/ml);相应的 ALT 在第 4 周开始出现明显下降,在第 12 周时已接近正常值的高限(40 U/L),至第 36 周和正常值比较已无明显差异;在血清学转换方面,所有患者在治疗前为 HBeAg 阳性,在第 12 周时出现有 5 例患者出现 HBeAg 消失,其中 1 例出现 HBeAb 转换,在第 48 周 8 例患者出现 HBeAg 消失,其中 4 例出现 HBeAb 转换。见表 1。

2.2 ETV 治疗过程中外周血 Th17 细胞频数的变化

HBV 感染患者 PBMCs 中 IL-17$^+$ 及 IL-17$^+$ IFN-γ$^-$ T 细胞的频数在第 4 周时和基线点相比出现一个明显的升高,其后逐渐下降至 24 周,在 48 周时接近低于基线点,但在所有时间点高于健康对照($P<0.05$)。IL-17$^+$ IFN-γ$^+$ T 细胞的频数在第 4 周时和基线点相比出现明显升高($P<0.05$),在 36 周时达到峰值,在 48 周时明显下降,但在所有时间点明显高于健康对照($P<0.05$)。见表 2。

表 1 应用 ETV 治疗各时间点临床指标

检测指标	基线点	4 周	12 周	24 周	36 周	48 周
ALT(U/L)	188.11 ± 104.87	73.78 ± 93.34[a]	33.32 ± 24.20[b]	27.67 ± 14.54	23.67 ± 12.40	19.56 ± 8.31
HBeAg(+)/HBeAb(+)	9/0	8/0	4/1	3/3	1/3	1/4
lg(HBV DNA)	7.20 ± 0.93	3.98 ± 0.75[a]	2.37 ± 0.26[b]	2.25 ± 0.76	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00

a:$P<0.05$,与基线点比较;b:$P<0.05$,与第 4 周比较

表 2 外周血单核细胞中 IL-17$^+$ IFN-γ$^+$ 及 IL-17$^+$ IFN-γ$^-$ 细胞频数的变化(%,$\bar{x}\pm s$)

T 细胞	基线点	4 周	12 周	24 周	36 周	48 周	对照
IL-17$^+$	4.00 ± 2.42[b]	6.32 ± 2.26[a]	5.28 ± 1.12[b]	5.25 ± 1.85[b]	5.86 ± 2.74[b]	4.47 ± 2.14[b]	1.56 ± 0.68
IL-17$^+$IFN-γ$^+$	0.86 ± 1.15[b]	1.63 ± 0.99[a]	1.58 ± 0.60[b]	1.57 ± 0.88[b]	1.92 ± 0.97[b]	1.39 ± 0.96[b]	0.21 ± 0.10
IL-17$^+$IFN-γ$^-$	3.14 ± 1.45[b]	4.68 ± 1.73[a]	3.69 ± 0.69[b]	3.68 ± 1.23[b]	3.93 ± 2.20[b]	3.08 ± 1.48[b]	1.34 ± 0.58

a:$P<0.05$,与基线点比较;b:$P<0.05$,与对照比较

3 讨论

ETV是一种强效选择性鸟嘌呤核苷类似物,具有显著的抗HBV的活性[4],具有高效性及良好的耐受性的特点,适于各种情况的乙型肝炎患者。48周的实验结果表明,无论是在组织学、生化学还是病毒学的改善方面,ETV均明显优于拉米夫定,且很少出现耐药的情况[5]。但ETV在有效抑制病毒过程中,是否能够影响患者体内的免疫状态,目前尚无更多的研究。因此我们选择了在慢性乙型肝炎的病程中表型为IL-17$^+$ IFN-γ$^+$及IL-17$^+$ IFN-γ$^-$的Th17细胞进行研究。

近年来,一类在分化、生物学作用等方面都不同于Th1和Th2的Th细胞被发现:它以分泌IL-17为主要特征,被命名为Th17[6]。Th17在防御胞外细菌感染、介导慢性炎症以及自身免疫病等方面发挥重要作用[7]。有研究表明,Th17细胞在在慢性乙型肝炎患者体内明显增高,这被认为是引起肝脏损害的一个重要的因素[8]。结果表明,在ETV治疗过程中IL-17$^+$T细胞频数在第4周时明显的升高,其后逐渐下降,而且在所有时间点高于健康对照。

有研究认为,过高的HBV病毒载量可能会抑制患者机体的免疫反应,引起免疫耐受,而一旦这种平衡被打破,往往会引起机体强烈的免疫反应[8-10]。应用ETV治疗后,IL-17$^+$T细胞频数在第4周时的升高,可能意味着患者体内免疫平衡被打破,出现了强烈的炎症反应。这种升高可能有助于清除病毒,但也可能由于促进炎症发展而引起肝脏的损害。而在后期出现的下降则可能是由于ETV对病毒复制的持续抑制,使体内清除病毒的免疫反应的靶向消失,从而降低体内的炎症反应,减轻肝脏的纤维化反应,延缓疾病的进程。

我们检测出的IL-17$^+$T细胞由IL-17$^+$IFN-γ$^+$及IL-17$^+$ IFN-γ$^-$ T细胞两部分组成。其中IL-17$^+$IFN-γ$^-$ T细胞是Th17细胞的主要的组成部分,可能主要涉及炎症反应,而目前有研究表明IL-17$^+$IFN-γ$^+$可能在抗病毒过程中起保护性作用[11,12]。因此这一部分细胞的频数在ETV治疗过程中的升高值得进一步研究。

同时我们也注意到在所有时间点Th17类细胞的频数明显高于健康对照,这表明即使当应用ETV有效地抑制了病毒复制,体内仍可能存在较强的炎症类反应,同时ETV是一种抑制病毒复制的药物,并不能清除病毒,当停止用药或出现耐药时随着病毒载量的升高,Th17细胞的频数就有可能会重新升高,加重肝脏炎症坏死。

总之,我们认为,ETV治疗能够有效抑制HBV的复制,同时有可能部分抑制体内过强的免疫反应,避免肝脏进一步损害,但可能削弱机体清除病毒的能力,需要和其他免疫治疗联合清除病毒,保护肝脏组织。

参考文献:

[1] Chang T T, Gish R G, de-Man R, *et al*. A comparison of entecavir and lamivudine for HbeAg-positive chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2006, 354(10):1001-1010.

[2] Lai C L, Shouval D, Lok A S, *et al*. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2006, 354(10):1011-1020.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1):56-62.

[4] Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, *et al*. Interferon-gamma:an overview of signals, mechanisms and functions[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2):163-189.

[5] Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J, *et al*. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2006, 130(7):2039-2049.

[6] Bettelli E, Korn T, Kuchroo V K. Th17:the third member of the effector T cell trilogy[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6):652-657.

[7] Zhang J Y, Zhang Z, Lin F, *et al*. Interleukin-17-producing CD4$^+$ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2010, 51(1):81-91.

[8] Sprengers D, Stoop J N, Binda R S, *et al*. Induction of regulatory T-cells and interleukin-10-producing cells in non-responders to pegylated interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B[J]. Antivir Ther, 2007, 12(2):1087-1096.

[9] 刘潇聪,陈耀凯,李晖,等. 复方甘草酸苷对重型肝炎的治疗作用及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18):1806-1808.

[10] 顾长海,王宇明. 肝功能衰竭[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:570-579.

[11] Steinman L. A rush to judgment on Th17[J]. J Exp Med, 2008, 205(7):1517-1522.

[12] 晁康,龚晓蓉,陈旻湖,等. Th17细胞在肝脏疾病中的免疫病理作用[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(3):224-227.

(收稿:2010-07-15 修回:2010-09-07)
(编辑 王小宴)