论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1668-04

趋化因子与干扰素治疗慢性乙肝病毒学应答的相关性

田小利,秦 波 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院感染科)

[摘要] **目的** 探讨血清趋化因子水平和慢性乙型病毒性肝炎患者聚乙二醇干扰素治疗病毒学应答之间的相关性。**方法** 纳入基因型为B型的慢性乙肝患者36例,于首次干扰素治疗前采血,检测血清CXCL9、CXCL10、CCL3、CCL5浓度。患者均接受聚乙二醇干扰素α-2a 180 μg每周1次治疗,随访治疗3、6个月的疗效。**结果** 二元Logistic回归分析发现,仅治疗前血清CXCL9及AST是早期病毒学应答的独立预测指标。将患者分为血清CXCL9≥39.51 ng/L和血清CXCL9<39.51 ng/L 2组。治疗3个月时,两组的早期病毒学应答率分别为78.95%(15/19)和23.53%(4/17),两组间差异有显著性($P<0.05$);治疗6个月时,维持应答率在两组分别为63.16%(12/19)和11.76%(2/17),两组间差异有显著性($P<0.05$)。**结论** CXCL9表达水平较高的患者经聚乙二醇干扰素治疗后病毒学应答率较高,可能有利于指导慢性乙型肝炎患者的个体化用药。

[关键词] 慢性病毒性肝炎;乙型;聚乙二醇干扰素;趋化因子
[中图法分类号] R512.62;R969;R977 [文献标志码] A

Relationship between chemokine levels and virological response to PegIFNα-2a treatment in patients with chronic hepatitis B

Tian Xiaoli, Qin Bo (Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To elucidate the possible association between serum chemokine levels and virological response to PEGylated interferon (PegIFN) α-2a treatment in patients with chronic hepatitis B. **Methods** Thirty-six patients infected with genotype B hepatitis B virus (HBV) were recruited in this study. The serum levels of CXCL9, CXCL10, CCL3 and CCL5 were measured by ELISA before treatment. All the patients were treated with PegIFNα-2a 180 μg every week and then followed up for 6 months. **Results** The results of binary logistic regression analysis found that the serum levels of CXCL9 and aspartate aminotransferase (AST) before treatment were the independent predictors for early virological response. The patients were then divided into two groups including a high CXCL9 group (serum level of CXCL9≥39.51 ng/L) and a low CXCL9 group (serum level of CXCL9<39.51 ng/L). After the treatment for 3 months, the rates of early virological response were 78.95% (15/19) in the high CXCL9 group and 23.53% (4/17) in the low CXCL9 group, respectively ($P<0.05$). After the treatment for 6 months, the rates of maintained virological response were 63.16% (12/19) in the high CXCL9 group and 11.76% (2/17) in the low CXCL9 group, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Patients with a high level of CXCL9 have a high rate of virological response to PegIFNα-2a treatment, which may help to improve the efficacy of PegIFNα-2a treatment for patients with chronic hepatitis B.

[**Key words**] chronic hepatitis B; PEGylated interferon alpha; chemokines

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5079) and the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-040).
Corresponding author: Qin Bo, Tel: 86-23-89012056, E-mail: cqqinbo@126.com

趋化因子是一类有趋化作用的小分子细胞因子的总称,可以通过和相应受体相互作用趋化白细胞向炎症和感染部位迁移。CXCR3和CCR5是两种主要的Th1型趋化因子受体[1],其对应的配体分别是CXCL9、CXCL10及CCL3、CCL5。大量的证据表明[2],Th1型细胞免疫应答有利于肝炎病毒的清除,并且趋化因子在病毒性肝炎病理过程中可能发挥重要作用。因此,我们推断趋化因子CXCL9、CXCL10、CCL3及CCL5可

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5079);重庆市卫生局重点项目(2011-1-040)
[通信作者] 秦 波,电话:(023)89012056,E-mail:cqqinbo@126.com

能通过趋化Th1型免疫细胞入肝而有利于病毒清除。另外,机体的免疫状态常影响治疗结局,趋化因子作为一种免疫学指标,可能有助于早期判断疗效。因此,本试验分析治疗前患者血浆中的CXCL10、CXCL9、CCL5及CCL3浓度与聚乙二醇干扰素α-2a治疗慢性乙型病毒性肝炎患者病毒学应答之间的相关性,初步探索机体免疫状态与干扰素治疗后病毒学应答的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2010年4月至2011年11月在重庆医科大学附属第一医院感染科门诊就诊并采用聚乙二醇干扰素治疗的慢性乙型肝炎患者。纳入标准:①符合2010年版《慢性乙型肝炎防治指南》[3]的临床诊断标准;②乙型肝炎病史超过6个月,入组时乙肝表面抗原(HBsAg)和(或)HBV-DNA仍为阳性者;③符合使用干扰素抗病毒治疗的标准;④病毒基因型为B型。排除标准:合并人类免疫缺陷病毒、HCV、HDV、巨细胞病毒、人类疱疹病毒感染者,自身抗体阳性者,失代偿期肝病和心、肺、肾等重要脏器损害的患者,糖尿病患者、精神病患者及妊娠期妇女,半年内使用过核苷(酸)类似物或干扰素抗病毒及免疫调节治疗的患者。根据以上标准,总共纳入患者36例。患者均签署知情同意书,该研究经医院伦理委员会批准。

1.2 治疗及随访

治疗方案:聚乙二醇干扰素α-2a 180 μg,皮下注射,每周1次,必要时进行保肝及对症治疗。治疗前检查血常规、肝功能、乙肝两对半定量、HBV-DNA、血糖、甲状腺功能等。开始治疗后每个月复查1次血常规及肝功能,每3个月检查1次乙肝两对半定量及HBV-DNA定量。

1.3 疗效判定

依据2010年版《慢性乙型肝炎防治指南》[3],早期病毒学应答:治疗12周时,血清HBV-DNA检测不到(PCR法)或低于检测下限,或较基线下降≥2Log10。按此标准,达到早期病毒学应答的患者19例,未达到早期病毒学应答的患者17例。维持应答:HBV-DNA检测不到(PCR法)或低于检测下限。治疗6个月时维持应答的患者总计有14例。

1.4 标本采集

首次治疗前取清晨空腹肘静脉血5 ml,室温自然凝固20 min,离心15~20 min(2 000~3 000 r/min)。仔细收集上清并分装保存于-70 ℃待用,保存过程中若出现沉淀,则于使用前再次离心。

1.5 指标检测

乙肝两对半定量、HBV-DNA、肝功能及血常规检查均由重庆医科大学附属第一医院检验科统一完成。病毒基因型送由广州金域医学检验中心检测。血清CXCL9、CXCL10、CCL5、CCL3检测在重庆医科大学感染和寄生虫实验室完成,采用ELISA法,试剂盒购自升博生物有限公司。ELISA步骤严格按照说明书进行。

1.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行处理。计量资料若符合正态分布采用$\bar{x} \pm s$表示;不符合正态分布则采用中位数及4分位数表示。组间均数比较采用两独立样本t检验,组内治疗前后均数比较采用配对样本t检验;率的比较采用两独立样本χ^2检验。运用二元Logistic回归确立与早期病毒学应答相关的因素,敏感度、特异度由SPSS 17.0统计软件计算。

2 结果

2.1 纳入患者的一般情况

共纳入慢性乙型病毒性肝炎患者36例,其中,男性25例,女性11例,年龄(32.31±9.63)岁。ALT中位数为64.5 U/L,HBV-DNA中位数6.92×10^6 copies /ml,HBeAg阳性患者28例,HBeAg阴性患者8例。有25例患者于治疗前做过肝穿刺检查。经过6个月治疗后,14例患者维持应答(HBV-DNA低于检测线水平),4例患者发生血清学转换。

2.2 治疗前趋化因子表达水平及与早期应答的关系

36例患者于首次治疗前检测的趋化因子水平如下:CXCL10(63.90±4.82) ng/L、CXCL9(40.74±10.21) ng/L、CCL5(1031.18±247.18) ng/L、CCL3(58.71±4.73) ng/L。双变量相关性分析发现:仅血清CXCL9与HBV-DNA有显著相关性($r=0.359$, $P=0.05$),各趋化因子与血清转氨酶之间均无显著相关性($P>0.05$)。

治疗3个月后,以患者血清HBV-DNA检测不到(PCR法)或低于检测下限,或较基线下降≥2Log10为早期病毒学应答,总共19例达到早期病毒学应答。以治疗基线时的性别、年龄、ALT、AST、HBeAg、HBV-DNA、病程及治疗前血清趋化因子水平纳入二元Logistic回归分析,结果发现治疗前CXCL9和AST是早期病毒学应答的独立预测因素。做ROC曲线,CXCL9和AST的曲线下面积分别为0.776及0.692。同时,按照敏感度+特异度最大的原则,确定CXCL9的临界值为39.51 ng/L。

2.3 不同趋化因子表达水平患者的应答情况

按照治疗前血清CXCL9的水平以39.51 ng/L为界将患者分为2组,比较2组之间的生化及病毒学各项指标(表1)。ALT、HBV-DNA、性别、年龄、病程、家族史及组织病理在2组间均无显著差别($P>0.05$)。

表1 治疗前两组之间的生化及病毒学指标

指标	CXCL9<39.51 ng/L ($n=17$)	CXCL9≥39.51 ng/L ($n=19$)	P
男性	11	14	>0.05
年龄(岁)	30.82±9.61	33.63±9.44	>0.05
病程(年)	9.35±6.91	10.27±9.15	>0.05
ALT (U/L)	63(47.5,127)	66(40,233)	>0.05
HBV-DNA (copies/ml)	1.02×10^7 (5.12×10^6, 2.12×10^7)	2.29×10^6 (7.02×10^5, 1.34×10^7)	>0.05
组织病理 G_1S_0/G_1S_1	8/8	3/5	>0.05
家族史	6	9	>0.05
HBeAg(+)	17	11	<0.05

表2 两组治疗后不同时间的生化及病毒学指标比较

组别	治疗后时间	n	ALT(U/L)[a]	AST(U/L)[a]	HBVDNA(copies/ml)[a]	HBVDNA下降≥2log10(例)	HBeAg转换(例)
CXCL9<39.51 ng/L组	3个月	17	104(36.5~150)	70(37.5~85.5)	3.49×10^6(6.22×10^5~1.61×10^7)	4	1
	6个月		82(46~97)	51(38~74)	5.77×10^6(2.38×10^5~1.89×10^7)	2	1
CXCL9≥39.51 ng/L组	3个月	19	49.5(34.75~72)[b]	39(29.5~45.75)	7.02×10^3(1 000~3.84×10^5)[b]	15[b]	3
	6个月		45(32~69)	38(29~43)	1 000(1 000~2.47×10^5)[b]	12[b]	3

a:括号内数据为范围;b:$P<0.05$,与CXCL9<39.51 ng/L组相同治疗后时间比较

治疗3个月后,基线血清CXCL9≥39.51 ng/L组有15例达到早期病毒学应答,血清CXCL9<39.51 ng/L组有4例达到早期病毒学应答,2组间比较有统计学差异($P<0.05$)。治疗6个月时,基线血清CXCL9≥39.51 ng/L组有12例患者维持应答,血清CXCL9<39.51 ng/L组有2例患者维持应答,2组间比较有统计学差异($P<0.05$)。治疗6个月时,前者有3例发生血清学转换,后者1例发生血清学转换(表2)。

3 讨论

干扰素作为两大主要的抗病毒药物之一,具有疗效持久、血清学转换率高及HBsAg清除等优点。但是,由于其持续应答率不高同时副作用较明显,因此,如果能够在治疗前有效预测疗效,将有利于个体化用药。目前,对于干扰素治疗无应答的分子机制尚不完全清楚,临床研究发现可能是病毒和宿主等多方面因素作用的结果。目前已经报道的能够预测干扰素疗效的指标包括:ALT、HBV-DNA、HbeAg、HbsAg、性别、年龄及基因型[4-6]。其中,尚无免疫学的相关指标。因此,我们选择Th1型趋化因子,探索其与干扰素治疗后病毒学应答之间的相关性。

本研究检测36例患者接受聚乙二醇干扰素治疗前血清趋化因子水平,并分别与ALT、HBV-DNA做双变量相关性分析发现:仅CXCL9与HBVDNA有显著相关性($r=0.359$,$P<0.05$)。同样,王健等[7]发现IFN-α联合利巴韦林治疗的慢性丙肝患者外周血单核细胞内CXCL9、CXCL10 mRNA表达水平与体内HCV-RNA复制水平有关。然而,Chen等[8]发现慢性乙肝患者血清CXCL9和CXCL10均与ALT及HBV-DNA显著相关。一方面,我们认为可能是由于本研究中所纳入的患者是将接受干扰素治疗的患者,其血浆转氨酶位于中低水平,不具有很好的代表性。另一方面,血清CXCL9可能很好的反映了机体的免疫状态,免疫反应包括细胞毒性和非细胞毒性,无论哪一类免疫反应均有利于控制病毒,然而只有肝细胞损伤才会引起转氨酶升高,故CXCL9仅与HBV-DNA相关。本组患者经过3个月治疗后,血清ALT水平在两组间有显著差异,可能是由于病毒复制被控制导致的病情缓解,也不排除是保肝治疗所导致的差异。

经过Logistic回归分析发现,只有基线血清CXCL9和AST是早期病毒学应答的独立预测因素。与以往的报道不同,本研究发现AST而非ALT是聚乙二醇干扰素治疗后病毒学应答的预测因素,可能是由于部分患者在治疗前进行过保肝治疗,ALT对保肝治疗的反应迅速,故我们所检测到的ALT未能反映其真实水平,而AST对治疗反应相对迟缓,故检测结果更加可靠。分别做CXCL9及AST的ROC曲线,CXCL9的曲线下面积大于AST的曲线下面积,这表明CXCL9的预测效率比AST好。将患者以血清CXCL9 39.51 ng/L为界分为2组,血清CXCL9≥39.51 ng/L组患者治疗3个月及6个月的病毒学应答率均显著高于CXCL9<39.51 ng/L组患者。这与本课题组之前的发现相似[9],我们采用基因芯片检测慢性乙肝患者接受干扰素治疗前应答组与无应答组的基因表达差异发现,持续应答组治疗前肝组织CXCL9 mRNA表达水平显著高于无应答组。通过比较两组患者的生化及病毒学指标发现,两组在性别、年龄、病程、ALT、HBV-DNA、肝脏组织病理及家族史方面没有显著差异。虽然CXCL9高表达组中HBeAg阳性患者数较CXCL9低表达组中少,但是经过Logistic回归分析,HBeAg对早期病毒学应答并无独立影响。CXCL9表达较高者其早期病毒学应答率较高,因此我们推测CXCL9可能通过趋化炎症细胞进入肝脏参加免疫应答而有利于抗病毒治疗。一些动物实验结果能够支持这一推论:Kakimi等[10]向HBV复制活跃的转基因小鼠注入HBsAg特异的CTL细胞,能够使肝细胞活化并分泌CXCL10和CXCL9,如果加用抗体阻断这些细胞因子的作用,能够减少循环中淋巴细胞对肝脏的浸润、减缓肝脏炎症程度;Liu等[11]使用CXCL9抗体治疗鼠肝炎病毒感染的小鼠,能够减少T细胞的浸润,推迟病毒清除,增加致死性。

这4种趋化因子中,本研究发现基线CXCL9与慢

性乙肝干扰素治疗的早期病毒学应答有独立相关性。Romero 等[12]发现,治疗前血浆 CXCL10 水平能够预测慢性丙型肝炎患者接受聚乙二醇干扰素加利巴韦林治疗的持续应答。但少见报道 CCL5 及 CCL3 水平与病毒性肝炎干扰素治疗有相关性,并且 Duan 等[13]报道 CCL5 的单核苷酸多态性不会影响慢性乙肝的结局及干扰素治疗 HBeAg 阳性患者的疗效。有趣的是,CXCL9 和 CXCL10 作用于相同的炎症趋化因子受体 CXCR3,因此我们推测趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 可能通过与 CXCR3 相互作用而影响干扰素治疗病毒性肝炎的疗效。CXCR3 主要表达于(Th1)-$CD4^+$ T、效应 $CD8^+$ T、NK、NKT 及 Treg(调节性 T 淋巴细胞)。研究发现,这些细胞能够通过各种途径控制病毒,同时 Treg 能够调节免疫反应使其不至于过于强烈而导致严重的肝损害。Oo 等[14]发现,CXCR3 及其相应配体在促进免疫细胞通过肝血窦内皮细胞时至关重要。另外,Xia 等[15]发现乙肝 HBx 蛋白能够诱导肝细胞产生 CXCL9,并呈剂量依赖的模式。综上,我们推测乙肝病毒蛋白诱导肝细胞产生趋化因子,趋化因子则通过与其受体 CXCR3 相互作用促进表达 CXCR3 的免疫细胞入肝参与免疫应答从而有利于控制病毒复制和稳定病情。另外,干扰素 α 通过促进 $CD4^+$ T 细胞向 Th1 型细胞分化进一步推动这一过程。

总之,本研究发现治疗前趋化因子 CXCL9 表达水平较高的患者经聚乙二醇干扰素治疗后病毒学应答率较高,可能是 CXCL9 反映了机体的免疫状态,这一结果可能有利于指导临床的个体化用药。

参考文献:

[1] Sallusto F, Lenig D, Mackay C R, *et al*. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes[J]. J Exp Med, 1998, 187(6): 875 – 883.

[2] Penna A, Del-Prete G, Cavalli A, *et al*. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 1022 – 1027.

[3] 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 – 21.

[4] Buster E H, Hansen B E, Lau G K, *et al*. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa[J]. Gastroenterology, 2009, 137(6): 2002 – 2009.

[5] Bonino F, Marcellin P, Lau G K, *et al*. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. Gut, 2007, 56(5): 699 – 705.

[6] Tangkijvanich P, Komolmit P, Mahachai V, *et al*. Comparison between quantitative hepatitis B surface antigen, hepatitis B e-antigen and hepatitis B virus DNA levels for predicting virological response to pegylated interferon-alpha-2b therapy in hepatitis B e-antigen-positive chronic hepatitis B[J]. Hepatol Res, 2010, 40(4): 269 – 277.

[7] 王健, 赵金红, 江水清, 等. 丙型肝炎病毒慢性感染与 IL-8、IP-10、Mig 表达相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1420 – 1423.

[8] Chen J, Wang Y, Wu X J, *et al*. Pegylated interferon α-2b up-regulates specific $CD8^+$ T cells in patients with chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(48): 6145 – 6150.

[9] Xiao C, Qin B, Chen L, *et al*. Preactivation of the interferon signaling in liver is correlated with nonresponse to interferon alpha therapy in patients chronically infected with hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(2): e1 – e10.

[10] Kakimi K, Lane T E, Wieland S, *et al*. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity *in vivo* reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. J Exp Med, 2001,194(12): 1755 – 1766.

[11] Liu M T, Armstrong D, Hamilton T A, *et al*. Expression of Mig (monokine induced by interferon-gamma) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of the central nervous system[J]. J Immunol, 2001,166(3): 1790 – 1795.

[12] Romero A I, Lagging M, Westin J, *et al*. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection[J]. J Infect Dis, 2006, 194(7): 895 – 903.

[13] Duan Z P, Zhao X Y, Huang D Z, *et al*. RANTES gene single nucleotide polymorphisms and expression in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(11): 909 – 914.

[14] Oo Y H, Weston C J, Lalor P F, *et al*. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver[J]. J Immunol, 2010, 184(6): 2886 – 2898.

[15] Xia L M, Huang W J, Wu J G, *et al*. HBX protein induces expression of MIG and increases migration of leukocytes through activation of NF-kappaB[J]. Virology, 2009, 385(2): 335 – 342.

(**收稿**:2012-01-10;**修回**:2012-03-02)

(编辑 王 红)