DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.028
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1765-03

论著

拉米夫定疗程中慢性乙型肝炎患者血清IL-12水平和Th平衡变化及其意义

何登明,毛 青,王宇明,谭朝霞 (第三军医大学西南医院全军传染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗前后血清IL-12水平和辅助性T细胞(Th)平衡变化及其临床意义。方法 根据患者对拉米夫定治疗的应答情况分组进行回顾性研究,利用双抗体夹心ELISA法检测治疗前后不同时相点血清IL-12、γ干扰素(IFNγ)、IL-4水平,以与正常对照校对后的IFNγ/IL-4作为Th平衡指标,取健康献血员作对照。结果 治疗前血清IL-12水平低于健康对照,Th平衡表现为Th2优势应答;治疗后HBeAg阳性完全应答组在治疗的第3个月有明显的血清IL-12水平高峰,Th平衡得以恢复并保持Th_1优势应答,HBeAg阳性部分应答组和HBeAg阴性组Th平衡仍以Th_2为优势应答。结论 拉米夫定治疗应答和血清IL-12水平及Th平衡的恢复程度有关,治疗后慢性乙型肝炎患者抗HBV免疫有所恢复,血清IL-12水平可作为早期预测拉米夫定疗效的免疫学指标,治疗后Th平衡的恢复是完全应答实现的保证。

关键词:慢性乙型肝炎;拉米夫定;白细胞介素12;Th平衡
中图法分类号:R392.1;R512.620.5;R978.7 文献标识码:A

Changes of serum IL-12 level and Th balance of chronic hepatitis B patients and the significance in the course of lamivudine therapy

HE Deng-ming, MAO Qing, WANG Yu-ming, TAN Zhao-xia (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigatethe changes of serum IL-12 level and Th balance of chronic hepatitis B (CHB) patients in the course of lamivudine therapy and the related significance. Methods According to the differ ent responses to lamivudine therapy, patients were divided into three groups: group I (n = 10), HBeAg positive CHB and complete response group; group II (n = 10), HBeAg positive CHB and non-complete response group; group III (n = 5), HBeAg negative CHB group. Sera were collected from patients with chronic hepatitis B before and after lamivudine therapy and healthy blood donors. Then serum IL-12, IFNγ, and IL-4 levels were measured by ELISA method. The ratio of IFNγ/IL-4 was selected as the marker of Th balance after comparison with that of the normal control. Results Before therapy, serum IL-12 level in chronic hepatitis B patients was lower than that of the healthy blood donors, and Th balance tendency was to Th2 direction. After lamivudine therapy, serum IL-12 level was increased. The highest point of IL-12 was observed in complete response group at the third month after therapy. The tendency of Th balance was to Th_1 direction in complete response group and to Th_2 direction in non-complete response group and HBeAg negative group. Conclusion After lamivudine therapy, the immunity response to HBV of chronic hepatitis B patients can be recovered. The response degree to therapy is associated with the level of serum IL-12 and Th balance recovery level after lamivudine therapy. Serum IL-12 level may be an appropriable marker to predict the effect of lamivudine therapy in earlier period of the whole course. The recovery of Th balance is the assurance of complete response.

Key words: Hepatitis B; Chronic; lamivudine; interleukin 12; Th balance

特异性免疫的恢复是慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)感染状态下HBeAg清除的基础。拉米夫定(lamivudine, LAM, 3TC)是三噻胸苷的阴性异构体,是一双脱氧核苷类似物,化学名2′3′双脱氧硫代胞嘧啶,分子式$C_8H_{11}N_3O_3S$,是目前广泛应用的抗HBV药物,通过抑制HBV DNA多聚酶的活性而发挥生物学效应,可迅速抑制HBV DNA复制,降低HBV DNA水平;但HBeAg/HBeAb转换率低、停药后反跳率高是其重要的弱点。目前尚没有就拉米夫定疗程中机体免疫反应性方面的变化作出合理的评价,缺乏可靠的免疫学指标及早期预测拉米夫定疗效的免疫学指标。辅助

作者简介:何登明(1973一),男,河北省邢台市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事病毒性肝炎免疫发病机制方面的研究,现在山东省泰安市解放军第88医院传染科工作,发表论文5篇。电话:(0538)6213002-39310

收稿日期:2003-07-02;修回日期:2004-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性T细胞(Th)在对HBV的免疫应答中起核心作用。拉米夫定治疗后,同样的HBV DNA转阴或下降后,却有着不同的应答程度,反映了治疗前免疫水平的差别和治疗后免疫水平变化的不同。本研究通过检测拉米夫定治疗前后血清IL-12水平和Th平衡的变化,探讨拉米夫定治疗与机体抗HBV免疫变化的联系;旨在寻找简便实用的免疫学指标,便于临床应用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本院门诊及住院慢性乙型肝炎患者25例(男19例,女6例,18~41岁),诊断符合2000年修定的病毒性肝炎防治方案[1],荧光定量PCR检测证实HBV DNA阳性,排除其它肝炎病毒重叠感染。给予拉米夫定100 mg/d,按治疗1年后应答程度进行分组,综合疗效评价参照文献[2]。研究对象分为3组:Ⅰ组($n=10$)HBeAg阳性生化学、病毒学、血清免疫学均完全应答者;Ⅱ组($n=10$)HBeAg阳性生化学和病毒学完全应答、血清免疫学部分应答者;Ⅲ组($n=5$)HBeAg阴性生化学和病毒学完全应答者;健康献血员5例(男4例,女1例,22~30岁)作对照,并对1例未用拉米夫定治疗的急性乙型肝炎患者进行了研究。

1.2 血清

采集拉米夫定治疗前,治疗3、6、9、12个月患者血清,并采集健康献血员及1例急性乙型肝炎患者病程各时相点的血清,-80 ℃冻存。

1.3 血清IL-12、IFNγ、IL-4水平检测

采用双抗体夹心ELISA法检测血清IL-12、IFNγ、IL-4水平,ELISA试剂盒是美国Genzyme公司产品,晶美生物有限公司分装;检测结果以pg/ml为单位。

1.4 Th平衡检测

测得血清IFNγ、IL-4水平;计算与健康对照校对后的IFNγ/IL-4比值,以此作为Th平衡指标(健康对照为1)。

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件进行组内比较单向方差分析,组间比较t检验。

2 结果

2.1 治疗前血清IL-12水平及Th平衡检测结果

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组血清IL-12水平分别为(18.81±5.29)、(13.81±2.94)、(16.24±9.14),低于健康对照(52.22±11.8)($P<0.05$);IL-4水平分别为(56.43±12.80)、(50.05±9.00)、(62.24±16.51),高于健康对照(3.18±1.93)($P<0.05$);Ⅰ组IFNγ水平(39.86±22.03)较健康对照(7.01±6.19)升高幅度最明显;IFNγ/IL-4<1表现为明显的Th_2优势应答,其中Ⅰ组(0.32)又明显高于Ⅱ组(0.06)。

2.2 HBeAg阳性完全应答者(Ⅰ组)治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果

治疗后血清IL-12水平较治疗前普遍升高,在治疗的第3个月出现高峰(达基础水平的30倍左右);治疗3个月可见血清IFNγ水平升高、IL-4水平下降,IFNγ/IL-4接近对照;治疗6~12个月,IFNγ/IL-4一直高于对照(表1)。

表1 HBeAg阳性完全应答者治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Serum IL-12 and Th balance level of HBeAg positive and complete response patients before and after therapy($\bar{x}\pm s$)

Marker	Before therapy	Time after therapy			
		3 months	6 months	9 months	12 months
IL-12	18.81±5.29*	516.22±101.26*#	108.91±68.91	42.72±11.75	39.99±11.65
IFNγ	39.86±22.03	67.18±19.44*#	37.19±4.78	29.83±5.02	22.89±7.13
IL-4	56.43±12.80*	33.13±12.55	12.21±10.03	7.95±4.87	6.48±4.21
IFNγ/IL-4	0.32	0.92	1.38	1.70	1.60

*: $P<0.05$, *vs* after therapy; #: $P<0.05$, *vs* other time points

2.3 HBeAg阳性部分应答者(Ⅱ组)治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果

治疗后血清IL-12水平较治疗前有升高,但未出现明显的高峰点(最高水平仅为基础水平的2~3倍);治疗后IFNγ水平稍升高、IL-4水平无下降,IFNγ/IL-4虽有升高,但各时相点均未达到对照水平(表2)。

表2 HBeAg阳性部分应答者治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Serum IL-12 and Th balance level of HBeAg positive and non-complete response patients before and after therapy($\bar{x}\pm s$)

Marker	Before therapy	Time after therapy			
		3 months	6 months	9 months	12 months
IL-12	13.81±2.94*	34.91±10.25*	41.47±11.67*	42.56±12.29*	45.04±12.61*
IFNγ	6.25±2.75*	22.49±3.15*	21.21±9.44*	17.93±6.73*	22.65±10.71*
IL-4	50.05±9.00	53.02±16.25	44.97±46.43	44.98±21.17	57.46±30.93
IFNγ/IL-4	0.06	0.19	0.21	0.18	0.12

*: $P<0.05$, *vs* before therapy

2.4 HBeAg阴性者(Ⅲ组)治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果

血清IL-12水平治疗后仅3、12个月两个时相点较治疗前升高,且升高幅度较低,最高水平仅为基础水平的2~3倍,其余各时相点较治疗前无差异;治疗后IFNγ有升高,IL-4有下降,IFNγ/IL-4虽有升高,但各时相点均未达到健康对照水平,总体上仍以Th_2优势应答为主(表3)。

表3 HBeAg阴性者治疗前后血清IL-12水平及Th平衡检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Serum IL-12 and Th balance level of HBeAg negative patients before and after therapy($\bar{x}\pm s$)

Marker	Before therapy	Time after therapy			
		3 months	6 months	9 months	12 months
IL-12	16.24±9.14	33.81±10.06*	22.79±11.96	24.17±8.86	39.74±13.01*
IFNγ	27.49±20.27	31.11±17.24	41.54±26.25*	42.11±23.19*	27.46±22.68
IL-4	62.24±16.51	32.29±17.43	24.21±17.22	23.90±14.91	28.65±16.66
IFNγ/IL-4	0.20	0.44	0.78	0.80	0.43

*: $P<0.05$, *vs* other time points

2.5 急性乙型肝炎患者血清IL-12水平及Th平衡检测结果

检测1例未应用拉米夫定治疗的急性乙型肝炎患者疾病

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不同时相点的血清 IL-12 水平变化情况，发现发病初期的水平极低，第 2 周达到高峰，随后出现了 HBeAg 血清转换和 HBV DNA 的阴转，峰值达基础水平的 30 倍；Th 平衡由发病时的 Th_2 优势应答转变为 Th_1 优势应答，并在恢复期（病程第 8 周）时达到平衡状态；类似于 HBeAg 阳性完全应答者的变化情况。

3　讨论

抗 HBV 特异性免疫能否恢复是病毒学应答后血清免疫学应答的前提。Boni 等[3]发现拉米夫定治疗可以重建 HBV 特异性细胞免疫。既往认为拉米夫定不能恢复受损的 HBV 特异性 T 细胞反应。目前看来，这一有争议的结论可能缘于病例选择的不同。

HBV 抗原特异的 Th_1/Th_2 细胞亚群失衡可能是感染慢性化发生和持续的原因。以 IFNγ 作为 Th_1 型鉴别指标；IL-4 作为 Th_2 型鉴别指标[4]。IL-12 能特异性促进 Th_1 细胞发育；IL-12 通过诱导 T 细胞和 NK 细胞产生的 IFNγ 而发挥抗病毒作用。IL-12 抑制 HBV 复制是通过“非溶细胞性清除”，即干扰 HBcAg 的产生或引发 HBcAg 蛋白降解而实现的，而并非通过破坏肝细胞。

本研究表明健康对照血清 IFNγ、IL-4 水平均极低，慢性乙型肝炎患者中，无论 HBeAg 阳性与否，其基础血清 IL-12 水平均低于健康对照；Th 平衡倾向于 Th_2 优势应答；提示慢性乙型肝炎患者 HBV 感染状态的持续与免疫细胞分泌 IL-12 能力低下，不能促进 Th_1 细胞发育有关。

完全应答组治疗前血清 IFNγ 水平明显高于部分应答组，而 IL-4 水平无明显差异，提示治疗前血清 Th_1 型细胞因子水平与应答程度有一定的相关性，与李玲等[5]研究相符。临床资料显示基础丙氨酸转移酶（ALT）水平升高幅度超过 5 ULN（正常上限值）者，其 HBeAg/HBeAb 转换率显著高于 ALT 轻度升高者，其免疫学基础可能在于有较高的基础 Th_1 型细胞因子水平。

尽管应答程度不同，所有病例在治疗后均可检测到血清 IL-12、IFNγ 水平升高，提示拉米夫定治疗可以间接促进 Th_1 细胞发育，进而促进 IFNγ 等 Th_1 型细胞因子分泌，以促进机体抗 HBV 免疫的增强或恢复，为清除病毒创造有利条件。

HBeAg 阳性完全应答组在治疗第 3 个月可以观察到血清 IL-12 水平高峰，提示高水平的 IL-12 对于机体发挥免疫清除作用，促使 HBeAg/HBeAb 转换是有益的；同时观察到血清 IFNγ 水平的相对高峰点；IL-4 则由治疗前的高水平渐降至低水平；IFNγ/IL-4 比值已经接近健康对照水平，治疗 6～12 个月，IFNγ/IL-4 比值均高于健康对照水平，得以保持 Th_1 优势反应，进而促使 HBeAg/HBeAb 转换。这种 Th_1 优势反应的持续保持应该是完全应答组 HBeAg/HBeAb 转换的免疫基础。而血清 IL-12、IFNγ 水平高峰出现时 ALT 均已正常，在此前提下，HBeAg 被清除的机制可能主要是依靠非溶细胞性清除。

急性乙型肝炎的资料显示机体对 HBV 的免疫清除与血清 IL-12 水平有一定的相关性。提示血清 IL-12 水平高峰对 HBeAg 血清转换的实现是必要的。

与完全应答组相比，部分应答组治疗后血清 IL-12、IFNγ 水平有升高，但升高幅度较小，IL-4 水平无明显变化；因此，治疗后 IFNγ/IL-4 比值虽有升高，但各时相点均提示 Th 平衡仍倾向于 Th_2 优势应答；如此，细胞免疫功能低下，机体清除 HBV 抗原能力低下，因此血清免疫学应答无应答或应答不完全。因此，治疗后 Th 平衡的恢复与持久对于完全应答的实现应该是关键的。

对于 HBeAg 阴性患者而言，血清免疫学应答指标无法评价。治疗后血清 IL-12、IFNγ 水平有升高，IL-4 水平有降低，Th 平衡总体上仍是倾向于 Th_2 优势应答。此类患者因为缺乏 HBeAg 的免疫调控作用，无 HBeAg/HBeAb 转换，从 Th 平衡角度看，单纯抑制 HBV DNA 的复制似乎较难恢复机体对 HBV 的免疫清除能力，可能是此类患者拉米夫定治疗更长疗程、疗效不满意及反跳率高的一个原因。

以 Th 平衡作为衡量 HBeAg 阴性患者血清免疫学应答程度的指标，则可以避免 HBeAg 阴性者拉米夫定治疗血清免疫学应答指标无法评价的情况。而以血清 IFNγ/IL-4 比值反应 Th 平衡比较简便，在方法上是可行的；Th 平衡在急性乙型肝炎和完全应答者中的变化提示其恢复对于 HBeAg 血清转换是必需的，因此，在理论上是有依据的。

血清 IL-12 水平在拉米夫定疗程中的变化提示它可以作为一个早期疗效预测指标，Th 平衡在拉米夫定疗程中的变化提示它可以作为拉米夫定疗效评价指标，间接反映机体抗 HBV 免疫功能恢复情况，在肝功能和病毒学指标外增加实用的免疫学指标，对于更好的评价患者对拉米夫定治疗的反应性是有益的。

参考文献：

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(6)：324－329.

[2] 拉米夫定临床应用专家指导小组. 2001 年拉米夫定临床应用专家共识[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(2)：157－158.

[3] Boni C, Penna A, Ogg G S, *et al*. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 963－971.

[4] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，2001. 136.

[5] 李　玲，顾长海，王宇明，等. 乙型肝炎患者血清和 PBMC 培养上清 IL-2 与 IL-10 的检测及意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(11)：1324－1326.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net