

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2013. 02. 003

· 论 著 ·

聚乙二醇干扰素治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者外周血 NKT 细胞的变化及疗效预测

黄芳¹, 龚环宇¹, 鲁猛厚²

(1 中南大学湘雅三医院, 湖南长沙 410013; 2 中南大学湘雅医院感染病科 病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008)

[摘要] **目的** 研究聚乙二醇干扰素 α -2a (Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$) 治疗乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 阳性慢性乙型肝炎 (CHB) 患者, 其外周血 NKT 细胞表达率和疗效预测相关性。 **方法** 选取 2010 年 1—12 月在中南大学湘雅三医院住院和门诊接受治疗的 HBeAg 阳性 CHB 患者 63 例, 予 Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$ 18 MIU 肌内注射, 1 次/周, 共 48 周。检测各时段外周血 NKT 数量占外周血 T 淋巴细胞的百分比、血清乙型肝炎 5 项定量及乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 载量。 **结果** Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$ 治疗 HBeAg 阳性 CHB 患者 48 周后, 显效 (完全病毒学应答) 26 例, 有效 (部分病毒学应答) 21 例, 无效 (无病毒学应答) 16 例。外周血 NKT 细胞占 T 淋巴细胞百分比: 显效组治疗前及治疗后 4、8、12、16、24 周, 较有效组和无效组均明显升高 (均 $P < 0.01$); 在治疗 48 周和停药 24 周, 显效组较有效组 NKT 表达水平明显升高 (分别 $t = 32.0, P < 0.01; t = 27.6, P < 0.01$)。显效组治疗后前 4 周, NKT 表达水平上升速度最快, 12 周时达最高峰, 其后逐渐下降, 到 24 周比治疗前水平稍高, 一直维持到 48 周; 有效组 12 周时 NKT 表达水平达最高峰, 较治疗前显著增高 ($t = 12.83, P < 0.05$)。显效组患者肝功能基本在 12 周左右完全恢复正常, 且持续维持在正常水平, 其 HBV DNA 载量亦逐步下降; 而有效组和无效组患者的肝功能波动在 $(1 \sim 2) \times \text{ULN}$ 。监测至停药 24 周后, 共有 27 例患者出现 HBeAg 血清学转换。 **结论** Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$ 治疗 HBeAg 阳性 CHB 患者, 其外周血中 NKT 的表达对疗效有一定预测作用。

[关键词] 肝炎, 乙型, 慢性; 肝炎病毒, 乙型; HBeAg; 聚乙二醇干扰素 α -2a; 病毒学应答; NKT 细胞

[中图分类号] R512.6⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)02-0088-04

Correlation between natural killer T cell expression and virological response to treatment with peg-interferon alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B

HUANG Fang¹, GONG Huan-yu¹, LU Meng-hou² (1 The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China; 2 Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To study the correlation between expression of natural killer T (NKT) cells and virological response to treatment with peg-interferon alfa-2a (Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$) in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB). **Methods** A cohort of 63 HBeAg-positive CHB inpatients and outpatients in a hospital between January and December 2010 were treated with 18MIU Peg- $\text{INF}_{\alpha-2a}$ once a week for 48 weeks. The percentage of NKT cells in T lymphocytes, five serological markers of hepatitis B and HBV DNA load were assessed by flow cytometry and quantitative real time PCR. **Results** At the end of 48-week treatment, 26 cases achieved complete virological response, 21 achieved partial response, and 16 didn't achieve response. The percentage of NKT cells in T lymphocytes in complete virological response group before treatment and after 4, 8, 12, 16 and 24 weeks of treatment all increased

[收稿日期] 2012-09-03

[作者简介] 黄芳(1977-), 女(汉族), 湖南省长沙市人, 主治医师, 主要从事慢性肝病和感染性疾病研究。

[通讯作者] 鲁猛厚 E-mail: lumenghou@126.com

markedly compared with partial and non-response group(all $P < 0.01$); At the end of 48-week treatment and 24 weeks after withdrawing from the treatment, the expression level of NKT cells of complete response group was also higher than partial response group($t = 32.0, P < 0.01; t = 27.6, P < 0.01$). Within 4 weeks after the start of treatment, the expression level of NKT cells in complete response group increased fastest and reached highest at week 12, then decreased slowly, and at week 24-48 was slightly higher than pre-treatment; the expression level of NKT cells in partial response group reached highest at week 12, which was much higher than that before treatment ($t = 12.83, P < 0.05$). Liver function in complete response group returned to normal at week 12, and continued to remain normal, HBV DNA level also decreased gradually, but in partial and non-response groups, the liver function fluctuated at $(1-2) \times \text{ULN}$. Follow-up to 24 weeks after stopping treatment, 27 cases appeared HBeAg seroconversion.

Conclusion The expression of NKT cells in HBeAg-positive CHB patients' peripheral blood can help predict response to Peg-IFN α -2a therapy.

[Key words] hepatitis B, chronic; hepatitis B, virus; HBeAg; peg-interferon alfa-2a; virological response; natural killer T

[Chin Infect Control, 2013, 12(2): 88-91]

慢性乙型肝炎(CHB)是由乙型肝炎病毒(HBV)引发的免疫清除导致肝细胞损害的慢性、传染性疾病。免疫清除不彻底,是CHB治疗的困难所在^[1]。治疗CHB的关键是免疫调控和直接抗病毒联合治疗。聚乙二醇干扰素(pegylated interferon, Peg-IFN)是目前国际上公认的疗效肯定的治疗CHB的一线抗病毒药物,既具有直接抗病毒作用,还可通过调节免疫细胞使免疫系统活化,清除病毒^[2]。但目前,仍无很好的早期疗效预测方法,不能尽早确定后继治疗方案。NKT细胞是近几年新发现的第4种淋巴细胞,肝脏内存在大量具有高效率调控机体免疫反应的NKT细胞,其在HBV感染中的抗病毒作用已得到肯定^[3]。我们前期研究发现,免疫活跃期患者外周血NKT表达水平明显高于免疫耐受期患者。因此,进一步观察Peg-IFN治疗后是否可通过调节机体免疫细胞而激活体内NK/NKT细胞的表达,提高机体抗病毒作用。研究Peg-IFN在治疗CHB过程中,患者体内NKT细胞的表达情况,了解其免疫活性和抗病毒治疗疗效的相关性,进一步探讨NKT细胞与CHB免疫耐受间的相关性,分析NKT的变化对干扰素抗病毒治疗的疗效预测。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2010年1—12月在中南大学湘雅三医院住院和门诊接受治疗的乙型肝炎e抗原(HBeAg)阳性CHB患者63例,其中男性41例,女性22例;年龄18~55岁,平均39岁;病程 (8.12 ± 3.68) 年。自愿选择接受Peg-IFN抗病毒治疗,且

符合下列条件者:(1) HBeAg(+), 2×10^4 IU/mL \leq HBV DNA $< 2 \times 10^7$ IU/mL; (2) $2 \times$ 正常上限(ULN) \leq ALT $< 10 \times$ ULN, 血清总胆红素 $< 2 \times$ ULN, 凝血酶原活动度基本正常; (3) 治疗前半年未用过抗病毒药物及免疫调节剂,排除其他病毒性肝炎及全身系统疾病; (4) 无干扰素治疗的绝对和相对禁忌证; (5) 治疗过程中出现中性粒细胞计数 $< 0.5 \times 10^9$ /L 和(或)血小板计数 $< 30 \times 10^9$ /L, 总胆红素 > 51 mmol/L(特别是以间接胆红素为主者),将停药对症处理; (6) 定期来本院复查,治疗有效者,坚持治疗到48周,且停药后随访24周。用药24周无效者,停药或改用核苷类药物,此部分患者不在监测范围内。所有患者诊断均符合2010版《病毒性肝炎防治指南》中诊断标准。研究符合《赫尔辛基宣言》,经医院伦理委员会及患者同意。

1.2 药物与试剂 Peg-IFN α -2a(派罗欣),由上海罗氏制药有限公司提供,治疗剂量为18 MIU,1次/周,皮下注射,共48周,研究期间不用降酶药。PE-Cy5 anti-human CD3与FITC anti-human NKG2D,均为美国BD公司产品,于深圳达科为生物技术有限公司分装。

1.3 观察项目 于治疗前和治疗第4、8、12、16、24、48周,各检测1次外周血NKT数量占外周血T淋巴细胞百分比。于治疗第4、12、16、24、48周,各检测1次血清乙型肝炎5项定量及HBV DNA载量。按2010年乙型肝炎防治指南,监测患者血常规、肝功能、血糖、甲亢全套、尿常规,定期评估患者精神状态。

1.4 检测方法 采用免疫荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)法检测HBV DNA,检测下限为500

IU/mL。NKT 细胞检测：100 μ L EDTA 抗凝静脉全血，加入 20 μ L FITC anti-human NKG2D 和 10 μ L PE-Cy5 anti-human CD3，振荡混匀，室温避光静置 30 min；加入 2 mL 红细胞裂解液，振荡混匀，静置，弃上清液；用 PBS 液洗涤，1% 多聚甲醛固定液 220 μ L 振荡混匀后，避光送流式细胞仪检测。

1.5 疗效判定标准 完全病毒学应答(显效)：HBV DNA 阴转，外周血 HBV DNA < 500 IU/mL，伴 HBeAg 阴转或血清转换，ALT 正常；部分病毒学应答(有效)：HBV DNA 抑制，血清 HBV DNA 较基线下降 > 2 lg IU/mL，有或无 HBeAg 血清转换，ALT 可正常；无病毒学应答(无效)：血清 HBV DNA 较基线下降 < 2 lg IU/mL，无 HBeAg 血清转换。

1.6 统计方法 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。流式细胞计数结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。0—24 周各时间点显效、有效、无效 3 组间 NKT 的均数比较，采用方差分析 SNK-q 检验；48 周和停药后 24 周两组间 NKT 的均数比较，采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Peg-IFN α -2a 治疗效果 Peg-IFN α -2a 治疗

63 例 HBeAg 阳性 CHB 患者 48 周后，显效 26 例，有效 21 例，无效 16 例。

2.2 Peg-IFN α -2a 治疗对 NKT 细胞的影响 通过流式细胞仪检测患者外周血 NKT 细胞占外周血 T 淋巴细胞百分比，见表 1。显效组治疗前及治疗后 4、8、12、16、24 周 NKT 表达水平较有效组和无效组均明显升高，差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)；在用药 48 周和停药 24 周，显效组较有效组 NKT 表达水平明显升高(分别为 $t = 32.0, P < 0.01$ ； $t = 27.6, P < 0.01$)。显效组治疗后前 4 周，NKT 表达水平上升速度最快，12 周时达最高峰，其后逐渐下降，至 24 周比治疗前水平稍高，一直维持到 48 周；有效组 12 周时 NKT 表达水平达最高峰，较治疗前显著增高($t = 12.83, P < 0.05$)。

2.3 Peg-IFN α -2a 治疗对患者肝功能和 HBV DNA 的影响 观察所有患者各时间点监测的肝功能数据，发现显效组患者肝功能基本在 12 周左右完全恢复正常，且持续维持在正常水平，其 HBV DNA 载量亦逐步下降，至 24 周时，显效组中有 22 例患者出现 HBeAg 血清学转换；而有效和无效组患者的肝功能波动在 (1~2) \times ULN，至 48 周时，有效组中有 3 例出现 HBeAg 血清学转换。监测至停药 24 周后，共有 27 例出现 HBeAg 血清学转换。见表 2。

表 1 显效、有效、无效 3 组患者外周血单核细胞中 NKT 细胞的表达率比较(%)

Table 1 Expression rate of peripheral blood NKT cells among three groups(%)

Time	Complete virological response group(n=26)	Partial virological response group(n=21)	Non-virological response group(n=16)	F/t	P
Week 0	26.26 \pm 2.90	20.22 \pm 1.73	13.17 \pm 0.94	133.13	<0.01
Week 4	39.19 \pm 3.28	25.22 \pm 2.88	15.71 \pm 1.02	264.55	<0.01
Week 8	42.45 \pm 3.11	26.58 \pm 3.12	16.18 \pm 1.72	409.15	<0.01
Week 12	43.11 \pm 5.75	27.16 \pm 0.94	16.93 \pm 2.01	436.24	<0.01
Week 16	35.15 \pm 5.36	25.35 \pm 1.25	14.69 \pm 2.05	295.87	<0.01
Week 24	29.98 \pm 8.78	21.02 \pm 3.21	13.12 \pm 1.32	111.80	<0.01
Week 48	30.12 \pm 4.43	22.53 \pm 4.15	-	32.00	<0.01
24 weeks after withdrawal	27.08 \pm 1.25	21.36 \pm 2.31	-	27.60	<0.01

表 2 所有患者的肝功能、外周血 HBV DNA 载量及各时间点出现 HBeAg 转换情况

Table 2 All patients' liver function, HBV DNA load and HBeAg conversion in each stage

Time	ALT(U/L)	HBV DNA(IU/mL)	HBeAg conversion(n=63)
Week 0	146 \pm 42	(8.58 \pm 2.42) $\times 10^6$	0
Week 4	58 \pm 23	(5.93 \pm 2.54) $\times 10^5$	18
Week 8	43 \pm 28	(6.22 \pm 2.75) $\times 10^4$	22
Week 12	35 \pm 12	(1.53 \pm 0.56) $\times 10^4$	23
Week 16	44 \pm 8	(2.61 \pm 0.89) $\times 10^3$	23
Week 24	34 \pm 12	(2.51 \pm 1.32) $\times 10^3$	23
Week 48	31 \pm 15	(1.84 \pm 1.03) $\times 10^3$	25
24 weeks after withdrawal	28 \pm 17	(2.57 \pm 2.64) $\times 10^3$	27

3 讨论

NKT 细胞在外周血或脾脏中约占 T 细胞的 5% 左右,在骨髓和肝脏中可占 50% 以上^[4]。NKT 细胞通过识别 CD1d 抗原复合物而活化,发挥固有免疫作用,进而引起适应性免疫应答^[5]。NKT 细胞分泌的细胞因子,如 IFN- γ 及由此活化的 NK 细胞、CD8 + T 细胞,对病毒的复制起到了抑制作用。当 HBV 感染时,肝脏内存在的大量 NKT 细胞接受 CD1 + 细胞提呈的脂类抗原而活化^[6]。这些脂类抗原来源于 HBV 及亚病毒颗粒中的糖脂和磷脂。在病毒诱导产生的细胞因子作用下,NKT 细胞间接地被活化^[7]。NKT 细胞发挥抗 HBV 的作用通过两个方面来进行:一方面,通过其分泌的细胞因子;另一方面,通过活化其他淋巴细胞^[8]。干扰素,一方面通过以病毒标记物(抗原)表达,使其更容易被机体免疫系统所识别;另一方面,还可以直接促进自然杀伤细胞(NKs)、巨噬细胞和 T 细胞的活力,增强其杀伤功能^[9-10]。NKT 细胞分泌的 IFN- γ 可协同增强抗病毒作用。本研究发现,63 例符合干扰素抗病毒治疗的 CHB 患者,NKT 表达水平有明显差别,出现完全病毒学应答者(显效组)NKT 表达水平明显高于无病毒学应答者(无效组)($P < 0.01$),也高于部分病毒学应答者(有效组)。而且在抗病毒治疗过程中,NKT 表达水平逐步增加。在前 4 周上升速度非常快,至 12 周时达高峰,其后逐渐下降,至 24 周时稍高于治疗前水平,至 48 周时一直维持在此水平,停药随访 24 周时仍高于治疗前水平,但差异无统计学意义。出现部分病毒学应答的患者外周血 NKT 表达水平在治疗前及治疗后均明显高于治疗无效者($P < 0.05$),其治疗 24 周时肝功能基本都正常。随访至停药 24 周,共 27 例患者出现 HBeAg 向 HBeAb 血清转换,且维持持续病毒学应答,与 NKT 高水平表达相一致。

NKT 细胞分泌的 IFN- γ ,在整个抗 HBV 感染过程中发挥最主要的作用。NK 细胞以 IFN- γ 依赖的方式被 NKT 细胞激活,完成抗病毒的重任。激活 NK/NKT 细胞可能是打破免疫耐受、清除 HBV 的重要方法之一^[11]。在研究中,我们发现检测 NKT 表达水平可预测干扰素抗病毒治疗效果,以及预测出现病毒学应答或血清学转换的概率。用药至 24 周时,NKT 表达水平达最高,其后逐渐下降,至 48 周及停药后 24 周仍保持较高水平。因此,我们

可以进一步对更多病例进行观察和加用 NKT 激活剂,研究是否可明显增加抗病毒疗效,且在保证 NKT 细胞分泌 IFN- γ 抗 HBV 的同时,阻断其后续的炎症过程(如阻断 CXCL9 和 CXCL10 的功能),这可能成为一种治疗病毒性肝炎的新途径^[12]。另外,DC 分泌的白细胞介素(IL)-12 可以活化 NKT 细胞,进而选择性地激活 T 辅助细胞的 I 型免疫应答。因此,NKT 系统可以作为抗感染疫苗的有效目标。通过疫苗对 NKT 细胞的活化作用来激活病原体特异的免疫应答,也可能成为一个新的抗病毒方案。

[参考文献]

- [1] Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. Nat Rev Immunol, 2005,5(3):215-229.
- [2] Lok A S, McMahon B J. Chronic hepatitis B: Update 2009 [J]. Hepatology, 2009,50(3):661-662.
- [3] Kakimi K, Guidotti L G, Koezuka Y, et al. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo [J]. J Exp Med, 2000,192(7):921-930.
- [4] Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases [J]. J Leukoc Biol, 2009,86(3):513-528.
- [5] Bendelac A, Savage P B, Teyton L. The biology of NKT cells [J]. Annu Rev Immunol, 2007,25:297-336.
- [6] Zimmer M I, Colmone A, Felio K, et al. A cell-type specific CD1d expression program modulates invariant NKT cell development and function [J]. J Immunol, 2006,176(3):1421-1430.
- [7] Emoto M, Kaufmann S H. Liver NKT cells: an account of heterogeneity [J]. Trends Immunol, 2003,24(7):364-369.
- [8] Baron J L, Gardiner L, Nishimura S, et al. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection [J]. Immunity, 2002, 16(4):583-594.
- [9] Senturk H, Baysal B, Tahan V, et al. Long-term effect of interferon therapy in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B infection [J]. Dig Dis Sci, 2011,56(1):208-212.
- [10] Bingfa X, Qinglin F, Hui H, et al. Anti-hepatitis B virus activity and mechanisms of recombinant human serum albumin-interferon-alpha-2b fusion protein in vitro and in vivo [J]. Pharmacology, 2009,83(6):323-332.
- [11] 陈大为,张鸿飞,王福生. NK/NKT 细胞亚群研究进展及其在乙型肝炎中的作用 [J]. 肝脏, 2005,10(3):249-250.
- [12] Kakimi K, Lane T E, Chisari F V, et al. Cutting edge: inhibition of hepatitis B virus replication by activated NKT cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver [J]. J Immunol, 2001, 167(12): 6701-6705.