

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00005

恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者时调节性 T 细胞和 Th17 细胞比率变化及与 e 抗原消失的关系

宋春辉, 杨斌, 陈黎明, 张纪元*

解放军 302 医院肝病生物治疗研究中心, 北京 100039

[摘要] **目的** 研究恩替卡韦(ETV)治疗慢性乙型肝炎患者过程中调节性 T 细胞(Treg)与 Th17 细胞的比率(Treg/Th17)与血清中乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)消失的关系。**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个核细胞(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)、丙氨酸转氨酶(ALT)、血清特异白细胞介素 17(IL-17)水平以及外周血中的 Treg 细胞与 Th17 细胞的频数。**结果** 与 HBV-DNA 及 Treg 细胞频数的下降相对应,所有患者表现为 Th17 细胞频数的快速增加,以及 HBeAg 特异性刺激条件下 IL-17 分泌的下降。治疗引起的 HBV 复制抑制能够导致 Treg/Th17 比率的明显下降。第 4 周时的 Treg/Th17 比率下降和其后血清 HBeAg 的消失关系密切。**结论** 病毒复制的抑制不仅减轻 Th17 细胞的活动而且能够快速降低 Treg/Th17 比率。第 4 周时的 Treg/Th17 比率有望成为预测 ETV 治疗慢性 HBV 感染患者有效性的标志。

[关键词] 乙型肝炎; 恩替卡韦; 乙型肝炎 e 抗原; 调节性 T 淋巴细胞; Th17 细胞

[中图分类号] R 512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0005-04

Relationship of circulating Th17/Treg ratio with hepatitis B e-antigen loss in chronic HBV infection patients receiving entecarvir(ETV) antiviral treatment

SONG Chun-hui, YANG Bin, CHEN Li-ming, ZHANG Ji-yuan*

Biological Therapy and Research Center of Liver Disease, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relation of Treg/Th17 ratio with HBeAg loss in chronic HBV infection patients during entecarvir antiviral treatment. **Methods** The sera and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from the enrolled chronic HBV infection patients and healthy controls at different time points of entecarvir antiviral treatment. The HBV markers, HBV-DNA, serum alanine transaminase(ALT), the HBV-specific IL-17 levels, and the frequencies of Th17, Treg cells in PBMCs were determined. **Results** HBV-DNA and Treg cell frequencies were decreased and the frequency of Th17 cells was rapidly increased in all patients; the secretion of IL-17 decreased upon specific stimulation with HBcAg. Therapy induced inhibition of HBV replication led to great decrease of Treg/Th17. The decrease of Treg/Th17 ratio was closely related to loss of serum HBeAg at the fourth week. **Conclusion** Inhibition of viral replication can not only reduce the activity of Th17 cells, but also quickly decrease the Treg/Th17 ratio. The Treg/Th17 ratio at the fourth week can serve as a marker for the effect of entecarvir treatment for chronic hepatitis B.

[Key words] hepatitis B; entecarvir; hepatitis B e-antigen; regulatory T-lymphocytes; Th17 cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):5-8]

乙型肝炎病毒(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(entecarvir, 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等特点,适于各种情况的乙型肝炎患者^[1-2]。然而,慢性乙型肝炎

炎患者针对药物治疗经常表现为各种不同的临床结果。因此寻找一种和治疗结果密切相关的变化指标成为慢性乙型肝炎病毒肝炎临床管理中至关重要的问题。本研究探讨了病毒载量和抗原压力的影响与 Treg 细胞及 Th17 细胞之间比率的关系,并评价其临床意义。

[收稿日期] 2010-07-15

[接受日期] 2010-12-23

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2008ZX10002-007)。Supported by Major Project of National Science and Technology(2008ZX10002-007)。

[作者简介] 宋春辉,博士,主治医师。E-mail: shsongch02@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 010-66933129-6026, E-mail: uniquezjy@163.com

1 对象和方法

1.1 研究对象 按照2000年9月修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准诊断为“病毒性肝炎乙型慢性”的患者共9例,其中男6例,女3例,平均年龄(33.33±5.07)岁;所有患者均发现HBsAg(+) > 6个月,血清HBV-DNA > 2×10⁴ IU/ml,血清丙氨酸转氨酶(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名健康人为对照,其中男6人,女3人,平均年龄(28.78±5.76)岁。所有患者及健康对照均无HCV、HDV、HGV、HIV、EBV等感染病史。

1.2 药物治疗 9例患者从基线时间点开始口服ETV 0.5 mg(解放军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。

1.3 临床指标检测 HBV感染患者在基线点及治疗的第4、12、24、36、48周晨起抽血20 ml,肝素抗凝,离心分离出血清,检测乙型肝炎病毒表面标志物(HBV-M)、HBV-DNA、ALT。HBV-M、ALT均采用酶联免疫吸附法检测,HBV-DNA采用RT-PCR法检测。

1.4 外周血单个核细胞(PBMC)的分离及培养 应用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离PBMC。根据反应所需孔数,对PBMC应用配制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1×10⁶/孔。加入40 ng/ml的PMA和500 ng/ml伊屋诺霉素。放入37℃、5%CO₂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。另外取24孔板进行细胞培养检测特异性IL-17,每孔内加入细胞1 000 μl(细胞数不少于1×10⁶/孔)。每孔再加入HBeAg 0.5 μl(终反应浓度为10 μg/ml);放入37℃、5%CO₂孵育箱内培养,培养72 h后收取上清检测特异性IL-17水平。

1.5 外周血Th17与Treg细胞频数的检测 (1)细

胞表型染色:将培养后的细胞离心弃上清后加入anti-CD3、anti-CD4(BD Biosciences) 10 μl,充分震荡避光保存20 min。洗涤后离心弃上清待用。(2)细胞内因子染色:离心后细胞加入破膜液300 μl,充分震荡后,避光保存25 min。将破膜液用去离子水10倍稀释,每管内加入1 ml,充分震荡离心弃上清。按实验分组分别加入FoxP3、IL-17抗体(eBioscience)。充分震荡,避光保存20 min。洗涤后应用FACSCalibur流式细胞仪(BD Biosciences)进行检测,并应用FACSCalibur软件进行分析。

1.6 血清IL-17的检测 设标准孔8孔,待测品孔中每孔各加入血清100 μl。将反应板置37℃ 120 min,充分洗涤后印干。每孔中加入第一抗体工作液50 μl,充分混匀后置37℃ 60 min,充分洗涤后印干。每孔加酶标抗体工作液100 μl,将反应板置37℃ 60 min后洗板。每孔加入底物工作液100 μl,置37℃暗处反应5~10 min。每孔加入50 μl终止液混匀。在492 nm处测光密度(D)值,建立标准曲线后,根据样品D值在该曲线图上查出相应人IL-17含量。

1.7 统计学处理 采用SPSS 14.0统计软件,配对t检验判断组间差异,相关性检验应用Spearman随机相关性分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 ETV治疗后患者临床指标的变化 由图1可见,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周已经和正常值无明显差异;在血清学消失方面,所有患者在治疗前均为HBeAg阳性,在第12周时有5例患者HBeAg消失,其中1例出现HBeAb,在第48周8例患者出现HBeAg消失,其中4例出现HBeAb。

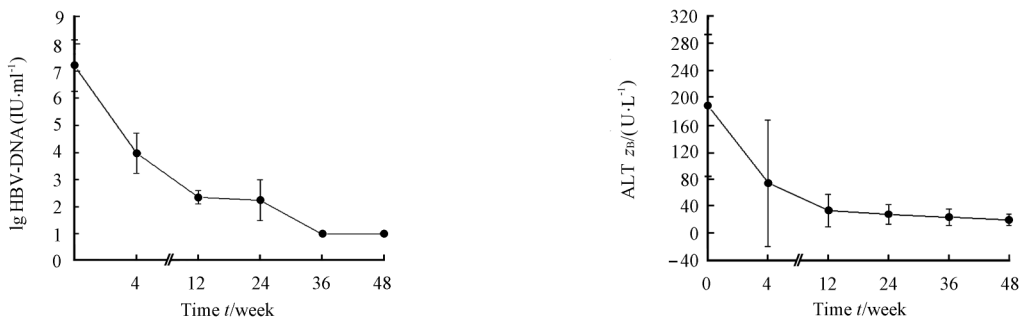


图1 ETV治疗后CHB患者血清HBV-DNA和ALT的变化

Fig 1 Changes of serum HBV-DNA and ALT in chronic hepatitis B (CHB) patients with entecarvir (ETV) antiviral treatment

n=9, x̄±s

2.2 ETV 治疗过程中外周血 Th17 与 Treg 细胞频数的变化 由表 1 可见, HBV 感染患者 PBMCs 中代表 Th17 细胞的 IL-17⁺ 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, 在 48 周时接近基线点; 而代表 Treg 细胞的 FoxP3⁺ T 细胞频数在第 12 周时和基线点相比出现一个明显的下降, 其后逐渐升高, 在第 48 周时接近健康对照水平。

表 1 ETV 治疗过程中外周血单个核细胞中 Th17 细胞及 Treg 细胞频数的变化

Tab 1 Frequencies of Th17 and Treg cells of PBMCs of CHB patients with entecarvir(ETV) antiviral treatment

(n=9, $\bar{x}\pm s$, %)

Cell	Baseline	Time after ETV treatment t/week					Control
		4	12	24	36	48	
IL-17 ⁺	4.00±2.42*	6.32±2.26 [△]	5.28±1.12	5.25±1.85	5.86±2.74	4.47±2.14	1.56±0.68
FoxP3 ⁺	5.56±1.48	5.38±1.53	4.30±1.95 [△]	4.50±1.11	4.91±2.06	5.06±1.31	5.02±1.15

PBMCs; Peripheral blood mononuclear cells; CHB; Chronic hepatitis B. * P<0.05 vs control; [△]P<0.05 vs baseline

2.3 ETV 治疗过程中特异性 IL-17 及血清 IL-17 分泌变化 患者血清中 IL-17 在第 4 周时和基线点相比出现明显升高, 其后逐渐下降, 在第 48 周时已低于基

线点。应用 HBeAg 刺激的 PBMCs 分泌的 IL-17 表现为和基线点相比, 在第 4 周出现明显升高, 其后逐渐下降, 在第 48 周时和基线点无明显差异(图 2)。

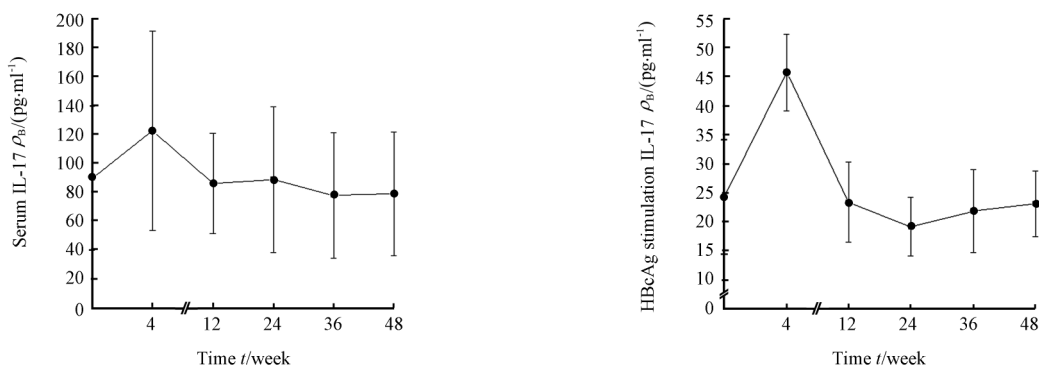


图 2 ETV 治疗过程中血清 IL-17 及 HBeAg 刺激的 PBMCs 分泌的 IL-17 的变化

Fig 2 Changes of serum IL-17 and supernatant IL-17 upon HBeAg stimulation in CHB patients with entecarvir(ETV) antiviral treatment

PBMC; Peripheral blood mononuclear cells; CHB; Chronic hepatitis B. n=9, $\bar{x}\pm s$

2.4 Treg/Th17 比率的下降和血清 HBeAg 消失的相关性 由图 3 可见, Treg/Th17 比率在第 12 周时最低, 与 Treg 细胞的下降相符合; 另外, Treg/

Th17 比率和 HBV-DNA 水平在基线点到第 12 周之间表现为正相关, 第 4 周时 Treg/Th17 比率和 HBeAg 的消失成正相关。

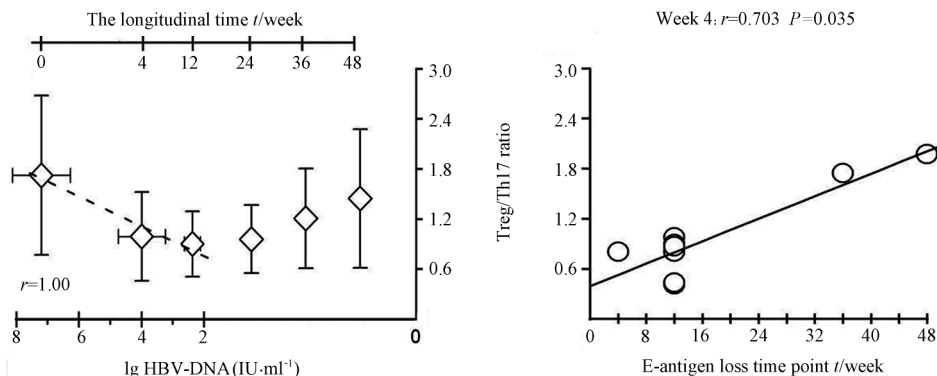


图 3 Treg/Th17 比率和 HBV-DNA 水平以及 HBeAg 消失的相关性

Fig 3 Correlations of Treg/Th17 ratio with HBV-DNA level and HBeAg loss

n=9, $\bar{x}\pm s$

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 活性^[3]及高效性和良好的耐受性等特点,适于各种情况的乙型肝炎患者^[1-2]。本研究希望了解在应用 ETV 的情况下,通过病毒载量和 Treg/Th17 比率之间的关系纵向地监测患者的免疫功能变化。结果表明 ETV 能够有效地抑制病毒复制,患者应用 ETV 后血清 HBV-DNA 水平明显下降,并且 Treg/Th17 比率明显下降。另外,我们的结果显示,在第 4 周时发生的 Treg/Th17 比率下降和随后发生的血清 HBeAg 消失有密切联系。

研究表明慢性乙型肝炎患者宿主的免疫反应会影响抗病毒治疗的效果。在抗病毒治疗过程中 HBV 特异性 T 细胞反应的恢复和 CD4⁺ T 细胞的活动密切相关。Tregs 细胞是一种潜在的发挥抑制作用的免疫监视细胞,以往研究表明阿德福韦治疗能够减少外周血中 Tregs 细胞的频数^[4],本研究中,我们发现 ETV 治疗在 24 周内能够减少外周血 Tregs 细胞的频数。Th17 细胞已经被证明和许多慢性炎症性疾病的免疫病理反应相关,可能与肝脏的慢性炎症具有相关性^[5-7],因此,我们推测在抗病毒治疗过程中可能存在着 Th17 细胞的减少。然而我们发现,Th17 细胞的总数在第 4 周升高,持续高于基线水平至第 36 周,然后在治疗的第 48 周回落到基线水平,考虑到 ETV 的抗病毒机制是直接抑制病毒的复制,使 HBV-DNA 水平回落,进而改善细胞因子的环境,结果导致在第 4 周时有利于 Th17 细胞的增多及 HBV 特异性 IL-17 分泌的增多。然而这种治疗从第 4 周起逐渐下降,而且这个结果被血清中 IL-17 的结果所支持。结合我们最近的研究结果,表明 Th17 细胞的反应能够被炎性环境所影响^[5]。

近期研究表明 Treg/Th17 比率可以作为一个评估疾病严重程度的指标^[8-9]。然而,这种比率在慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗过程中的变化尚未阐明。本研究中,我们发现 Treg/Th17 的比率在治疗的最初 24 周处于较低水平,在第 4 周时的 Treg/Th17 比率和血清的 HBeAg 消失有密切联系,并且

Treg/Th17 比率在 HBeAg 消失后逐渐出现升高,提示 Treg/Th17 的比率变化与 HBeAg 的消失关系密切。

总之,本研究阐明了在慢性乙型肝炎抗病毒治疗的过程中,病毒载量能够影响 Treg/Th17 的比率,ETV 治疗抑制病毒复制能够引起 Treg/Th17 比率下降;而第 4 周时的 Treg/Th17 比率和血清的 HBeAg 消失有密切联系,鉴于本研究病例数较少,其能否成为预测疗效的指标尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Chang T T, Gish R G, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao Y C, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg positive chronic hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354:1001-1010.
- [2] Lai C L, Shouval D, Lok A S, Chang T T, Cheinquer H, Goodman Z, et al. Entecavir versus lamivudine orpatients with HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354:1863.
- [3] Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, Hume D A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75:163-189.
- [4] Stoop J N, van der Molen R G, Kuipers E J, Kusters J G, Janssen H L. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B[J]. *Virology*, 2007, 361:141-148.
- [5] Zhang J Y, Zhang Z, Lin F, Zou Z S, Xu R N, Jin L, et al. Interleukin-17-producing CD4⁺ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 51:81-91.
- [6] Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury[J]. *Hepatology Res*, 2007, 37:248-254.
- [7] Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demeetter P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2008, 49:646-657.
- [8] Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells[J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(Suppl 3):iii87-iii90.
- [9] Weaver C T, Hatton R D. Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9:883-889.

[本文编辑] 孙 岩