

感 染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001703

恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎病毒携带者疗效的免疫学观察

龙 玲,姚云清,汪 燕,蒋 影,陈雪霞,龙 琴,张清秀,颜成果

(重庆医科大学附属第一医院感染科,重庆 400016)

【摘要】目的:从免疫学角度观察恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎病毒携带者(chronic hepatitis B virus carriers, CHBc)的疗效,为 CHBc 的治疗提供依据。**方法:**纳入 CHBc 61 例为实验组,慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)30 例为阳性对照组,健康人 30 例为正常对照(normal control, NC)组。CHBc 组和 CHB 组接受恩替卡韦治疗 24 周,NC 组不接受任何治疗。收集初次就诊和恩替卡韦治疗 24 周后的外周血样本,Treg、Th17 细胞频率用流式检测仪进行检测,白细胞介素(interleukin, IL)-10、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 和 IL-17 水平采用酶联免疫吸附法检测。**结果:**治疗前,CHBc 组(18.58 ± 10.79)Treg/Th17 比值较 NC 组(6.26 ± 3.29)、CHB 组(2.68 ± 1.39)高($P=0.000$),NC 组又较 CHB 组更高($P=0.000$)。恩替卡韦治疗 24 周后,CHBc、CHB 组 Treg/Th17 比值均降低($P=0.000$),且 CHBc 组(6.60 ± 5.27)较 NC 组(6.26 ± 3.29)、CHB 组(1.09 ± 0.72)高($P=0.000$),NC 组、CHBc 组之间没有明显差异($P=0.986$)。CHBc 组($r=0.827$; $r=0.353$; $r=0.391$)和 CHB 组($r=0.826$; $r=0.529$; $r=0.580$)Treg/Th17 比值与 HBV-DNA、HBsAg 和 HBeAg 均呈正相关关系($P=0.000$)。**结论:**恩替卡韦可以调节 CHBc 的免疫应答,使 Treg/Th17 比值下降,从而促进乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)及 HBV 标志物的清除,远期可能有助于减缓肝纤维化、肝硬化的进展。本研究证实 CHBc 有必要进行抗病毒治疗,且疗效佳、安全。

【关键词】慢性乙型肝炎病毒携带者;恩替卡韦;抗病毒治疗;Treg/Th17

【中图分类号】R512.6+2

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-14

Immunological observation of the efficacy of entecavir antiviral therapy in chronic hepatitis B virus carriers

Long Ling, Yao Yunqing, Wang Yan, Jiang Ying, Chen Xuexia, Long Qin, Zhang Qingxiu, Yan Chengguo

(Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the efficacy of entecavir in the treatment of chronic hepatitis B virus carriers (CHBc) from the immunological perspective and to provide the basis for the treatment of chronic hepatitis B virus carriers. **Methods:** Sixty-one chronic hepatitis B virus carriers were enrolled as experimental group, thirty chronic hepatitis B (CHB) were enrolled as positive control group, thirty healthy people were enrolled as normal control (NC) in this study. CHBc and CHB groups received entecavir for 24 weeks, while NC group did not receive any treatment. Peripheral blood samples were collected before and after 24 weeks entecavir treatment. The frequencies of Treg, Th17 cells were detected by flow cytometric analysis, and the levels of IL-10, TGF- β 1 and IL-17 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Before treatment, the ratio of Treg/Th17 in CHBc (18.58 ± 10.79) group was higher than that in NC (6.26 ± 3.29), CHB (2.68 ± 1.39) groups ($P=0.000$), and NC group was higher than CHB ($P=0.000$) group. After 24 weeks entecavir treatment, the ratio of Treg/Th17 in CHBc and CHB groups decreased ($P=0.000$), and the CHBc (6.60 ± 5.27) group was higher than that in NC (6.26 ± 3.29), CHB (1.09 ± 0.72) groups ($P=0.000$), and there was no significant difference between the NC and CHBc ($P=0.986$) groups. The ratio of Treg/Th17 in CHBc ($r=0.827$; $r=0.353$; $r=0.391$) and CHB ($r=0.826$; $r=0.529$; $r=0.580$) groups were positively correlated with HBV-DNA, HBsAg and HBeAg ($P=0.000$). **Conclusion:** Entecavir can regulate the immune response of chronic HBV carriers, reduce the ratio of Treg/Th17 and promote the clearance of HBV and HBV markers, forward may slow down the progress of liver fibrosis and cirrhosis. This study confirms that it is necessary for

作者介绍:龙 玲, Email: longlingcarol@163.com,

研究方向:病毒性肝炎及肝硬化的研究和治疗。

通信作者:姚云清, Email: cqyaoyunqing@126.com。

基金项目:重庆市医学科研计划重点资助项目(编号:2015ZDXM008)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180517.1325.012.html>

(2018-05-19)

chronic HBV carriers to receive antiviral therapy, and the efficacy is good and safe.

【Key words】 chronic hepatitis B virus carriers; entecavir; antiviral therapy; Treg/Th17

慢性乙型肝炎病毒携带者(chronic hepatitis B virus carriers, CHBc)是指乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性持续 6 个月以上,乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B envelope antigen, HBeAg)阳性、HBV-DNA 阳性、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)为代表的肝功能生物化学指标持续正常,且无明显临床症状及慢性肝脏疾病的相关体征的一类患者。然而,CHBc 有进展为肝纤维化、肝硬化、肝细胞癌的风险,但因临床症状不明显、疾病进展缓慢,且抗病毒治疗短期效果欠佳,目前针对这类患者是否需要抗病毒治疗仍有争议^[1-3]。CHBc 不能得到及时的抗病毒治疗,可能导致肝脏损伤继续加重。

根据 2006 年全国乙型肝炎血清学调查的数据,虽然普通人群的乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染率已降至 7.2%,但 CHBc 仍有 9 700 万^[4-5]。据文献报道,CHBc 中有 66.67%以上肝组织炎症、纤维化程度明显,说明 ALT 正常并不代表完全没有炎症活动和纤维化^[6-7]。人体感染 HBV 后,HBV 并不直接引起细胞病变,肝损伤主要是由机体免疫应答介导杀伤肝细胞造成的^[8]。很多证据表明,慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的临床结局受病毒复制和宿主 T 细胞反应动态平衡的影响^[9]。适当的免疫反应可以导致病毒清除和肝损伤恢复^[10]。核苷(酸)类似物[nucleoside(acid) analogues, NA]通过调节机体免疫应答,能有效抑制 HBV 的复制,减少肝脏炎症活动和减缓肝纤维化、肝硬化的发展^[11-12]。因此,与免疫状态密切相关的免疫学指标可以评估 NA 抗病毒疗效。机体对 HBV 的免疫应答有赖于 CD4⁺ T 细胞的活动,Treg 细胞(regulatory T cell, Treg)、Th17 细胞(T helper cell 17, Th17)均是 CD4⁺ T 细胞亚型^[13]。Treg 细胞能调控自身 T 细胞反应,主要分泌抗炎因子白细胞介素(interleukin, IL)-10 和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1 抑制其他免疫细胞,如:CD4⁺、CD8⁺ T 细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞、B 细胞和树突状细胞(dendritic cells, DC),维持自身免疫耐受^[10]。Yang 等^[14]研究显示,CHB 患者外周血 Treg 和 Th17 细胞频率以及血清 TGF- β 1 和 IL-17 水平明显高于健康对照组,治疗 24 周后,Treg 细胞频率和 TGF- β 1 水平

下降,且与 HBV-DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平呈正相关。据文献报道,在 CHB 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mono-nuclear cells, PBMC)和肝组织中 Treg 细胞频率明显增加,并与血清 HBV-DNA 载量呈正相关^[10]。这些研究都说明,Treg 细胞有抑制免疫应答,介导 HBV 感染后的免疫耐受状态,导致 HBV 持续感染的作用。Th17 细胞主要分泌 IL-17,具有促进炎症反应的作用。研究发现,在 CHB 患者中 Th17 细胞频率、IL-17 水平均高于正常对照组,且 Th17 细胞频率、IL-17 水平与血清 ALT 水平呈正相关^[14-15]。这些发现提示 Th17 细胞及其相关细胞因子与肝脏炎症程度呈正相关,并参与肝脏损伤过程和 HBV 清除。Treg、Th17 细胞分别抑制、促进炎症反应,且 Treg 和 Th17 细胞比例失衡与自身免疫性疾病和肿瘤免疫相关^[16]。Liu 等^[17]研究发现,在 CHBc、CHB 患者中 Th17/Treg 值与肝脏损伤程度呈正相关,Th17/Treg 的失衡加重肝脏损伤,修复 Th17/Treg 平衡对 HBV 感染相关肝病可能是一种新的免疫疗法。Yang 等^[14]发现 Treg/Th17 值对于评估抗病毒疗效具有重要临床意义。这些结果表明 Treg/Th17 在介导抗病毒治疗的免疫应答中起重要作用,也因此可用于评估抗病毒疗效。

本课题组进行了 1 项纵向研究,分析恩替卡韦治疗 24 周后 Treg/Th17 值的变化与抗病毒疗效之间的关系,确定恩替卡韦对于 CHBc 免疫应答的调节作用,进而从免疫学角度证实 CHBc 抗病毒疗效。

1 材料与方法

1.1 研究对象及纳入标准

外周血标本收集于 2013 至 2017 年在重庆医科大学附属第一医院就诊的 CHBc 61 例,其中男性 26 例,女性 35 例;平均年龄(33.16 ± 11.45)岁;CHB 患者 30 例,其中男性 17 例,女性 13 例;平均年龄(37.67 ± 11.59)岁。以上诊断符合 2010 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[18],在治疗前均签署知情同意书。同期我院门诊体检健康者(NC 组)为 HBsAg 阴性、肝功能生物化学指标正常、既往无肝炎病史。方差分析 3 组年龄有统计学差异($F=4.134, P=0.018$),两两比较结果显示 CHBc 组与 NC 组、CHB 组之间没有明显差异($P=0.192, P=0.233$),NC 组年龄较 CHB 组小($P=0.006$);卡方检验 3 组性别构成差异无明显统计学意义($\chi^2=1.657, P=0.437$)(表 1)。

表 1 各组研究对象的一般资料

组别	性别(男/女)	年龄(岁)
NC(n=30)	15/15	30.23 ± 3.42
CHBc(n=61)	26/35	33.16 ± 11.45 ^a
CHB(n=30)	17/13	37.67 ± 11.59 ^{b,c}

注:a,与 NC 比较, $P=0.193$;b:与 NC 比较, $P=0.006$;c:与 CHBc 组比较, $P=0.233$

纳入标准:HBsAg 阳性、HBeAg 阳性、抗-HBc 阳性>6 个月,HBV-DNA 阳性,6 个月内未接受过干扰素或 NA 抗病毒等治疗,ALT<40 U/L 为 CHBc 组,ALT≥40 U/L 为 CHB 组。排除甲、丙、丁、戊型病毒感染及合并酒精性、药物性、自身免疫性或代谢性肝病以及原发性肝癌。

1.2 治疗方法和样品收集

CHB 患者抗病毒疗效是国际国内所公认的,故作为本研究的阳性对照组,与 CHBc 组一起接受恩替卡韦(美国 BMS 公司,0.5 mg/d)治疗,疗程 24 周,其中 CHB 组适当加用常规保肝药物。NC 组不接受任何治疗。清晨,空腹 8 h 以上,于肘正中静脉处采血 5 mL,置于肝素钠抗凝真空管中,在室温下放置 30 min 后,离心后取得血清,而后放置于-80 °C 冰箱内保存待 ELISA 检测。

1.3 试剂

CD4 FITC、CD25 APC、Foxp3 PE、CD3 APC、CD8 PerCP-eFluor、IL-17 PE 单克隆抗体及同型对照、佛波酯、离子霉素、布雷菲德菌素 A、莫能霉素、固定剂、破膜剂、固定破膜工作液均购自美国 eBioscience 公司,人细胞因子 IL-10、TGF-β1 和 IL-17 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 eBioscience 公司。RPMI1640 培养液、胎牛血清购自蒙博(Meng-bio)公司。

1.4 检测方法和疗效评价

1.4.1 外周血 Th17 细胞频率的检测 Ficoll 密度梯度离心法分离得到 PBMC,用含 10%标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬细胞到 2×10^6 个/mL。向 PBMC 悬液加入佛波酯/离子霉素混合物(4 μL/mL)、布雷菲德菌素/莫能霉素混合物(4 μL/mL)后于 37.0 °C、5% CO₂ 浓度培养箱中放置并培养 4~6 h。取培养后的细胞悬液,加入 CD3 APC 抗体 5 μL 和 CD8 PerCP-eFluor 抗体 5 μL 进行细胞表面染色,于 4 °C 避光孵育 30 min。然后加入 100 μL 固定液(A 液),室温避光孵育 15 min,接着加入 3 mL PBS,混匀洗涤离心去上清,再加入 100 μL 破膜剂(B 液)进行破膜,接着加入 IL-17 PE 抗体 5 μL 进行细胞内染色,室温避光孵育 20 min 后,加入 3 mL PBS 洗涤,离心去上清,最后加入流式染色缓冲液 300 μL 重悬细胞。于 24 h 内用流式细胞仪(BD influx 4 根荧光管)进行检测,根据 CD3、CD8 设门圈定 T 淋巴细胞群,对 CD3+CD8-IL-17+T 细胞进行检测。

1.4.2 外周血 Treg 细胞频率的检测 向 PBMC 悬液加入 CD4 FITC 抗体 5 μL 和 CD25 APC 抗体 5 μL,于 4 °C 避光孵育 30 min 后,加 3 mL PBS 洗涤,离心去上清,离心后加 1 mL

固定破膜工作液,于 4 °C 避光孵育 30~60 min 后,直接再加入 2 mL 破膜缓冲工作液洗涤,离心去上清,然后加入 PBS 100 μL 重悬,再加入 2%鼠血清 2 μL 封闭,于室温避光放置 30 min 后,加入 Foxp3 PE 抗体 5 μL,于 4 °C 避光孵育≥30 min,再加入 2 mL 破膜缓冲工作液,离心去上清 2 次,最后加入流式染色缓冲液 300 μL 重悬细胞。于 24 h 内用流式细胞仪进行检测,根据 CD4、CD25 设门圈定 T 淋巴细胞群,对 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞进行检测。

1.4.3 血清 IL-10、TGF-β1 和 IL-17 的检测 取冻存好的血清,通过 ELISA 试剂盒检测,详细操作步骤均严格按照说明书进行,在酶标仪(iMark,美国 BIO-RAD)450 nm 处读取数据。

1.4.4 疗效评价 治疗前和治疗 24 周后进行检测和评价,相关评价指标和标准如下:①病毒学应答率:a.完全应答率:血清 HBV-DNA 定量低于检测值低限($<1 \times 10^3$ IU/mL);b.部分应答率:血清 HBV-DNA 较基线值下降 $\geq 2\log_{10}$ IU/mL 的患者所占比例。②血清学应答率:HBeAg 血清学转换率;HBsAg 阴转率。③肝硬化或 HCC 发生率:治疗 24 周时检测肝纤维化相关指标、甲胎蛋白、上腹部彩色超声,必要时行腹部 CT 检查,观测有无肝硬化、原发性肝细胞性肝癌的发生。HBV-DNA 定量检测用罗氏实时 PCR 法,检测低限为 1×10^3 IU/mL;血清 HBV 标志物用微粒子免疫荧光检测(AxSYM 系统,购自美国 Abbott 公司)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 医学统计软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较用单因素方差分析,非正态分布的计量资料采用秩和检验。治疗前后的计量资料采用配对检验。计数资料组间比较采用卡方检验。相关性用 Spearman 相关系数分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病毒学、血清学结果

2.1.1 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 的变化 初次就诊和恩替卡韦治疗 24 周后,分别检测 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 水平,结果见表 2。

初次就诊时 CHBc 组、CHB 组 HBV-DNA(log₁₀ IU/mL)分别是 6.40 ± 1.79 、 5.48 ± 1.98 ,秩和检验 2 组 HBV-DNA 差异具有统计学意义($U=628.000$, $P=0.015$)。初次就诊时 CHBc 组、CHB 组 HBsAg(log₁₀ IU/mL)分别是 4.07 ± 0.62 、 3.31 ± 1.14 ,秩和检验 2 组 HBsAg 差异具有统计学意义($U=515.500$, $P=0.000$)。初次就诊时 CHBc 组、CHB 组 HBeAg(log₁₀ IU/mL)分别是 4.07 ± 0.62 、 3.31 ± 1.14 ,秩和检验 2 组 HBeAg 差异具有统计学意义($U=489.500$, $P=0.000$)。

恩替卡韦治疗 24 周后,接受治疗的 2 组 HBV-DNA(log₁₀ IU/mL)均发生下降,CHBc 组、CHB 组 HBV-DNA 分别是 3.92 ± 1.33 、 3.40 ± 1.19 ,秩和检验 2 组 HBV-DNA 没有

明显差异 ($U=745.000, P=0.095$)。恩替卡韦治疗 24 周后,接受治疗的 2 组 HBsAg ($\log_{10}$ IU/mL) 均发生下降, CHBc 组、CHB 组 HBsAg 分别是 3.92 ± 0.73 、 2.98 ± 1.06 , 秩和检验 2 组 HBsAg 差异具有统计学意义 ($U=355.500, P=0.000$)。恩替卡韦治疗 24 周后,接受治疗的 2 组 HBeAg ($\log_{10}$ IU/mL) 均发生下降, CHBc 组、CHB 组 HBeAg 分别是 2.29 ± 1.09 、 0.70 ± 1.45 , 秩和检验 2 组 HBeAg 差异具有统计学意义 ($U=292.500, P=0.000$)。

2.1.2 HBV-DNA 应答率、HBeAg 血清学转换率 恩替卡韦治疗 24 周后分别计算 CHBc 组和 CHB 组 HBV-DNA 应答率(%)、HBeAg 血清学转换率(%), 结果见表 2。CHBc 组和 CHB 组 HBV-DNA 完全应答率分别是 60.66%、73.33%, 卡方检验 2 组无明显差异 ($\chi^2=1.418, P=0.234$)。CHBc 组和 CHB 组 HBV-DNA 部分应答率分别是 93.44%、93.33%, 卡方检验 2 组无明显差异 ($\chi^2=0.000, P=1.000$)。CHBc 组和 CHB 组 HBeAg 血清学转换率分别是 11.48%、16.67%, 卡方检验 2 组无明显差异 ($\chi^2=0.129, P=0.720$); 2 组 HBsAg 阴转率均为 0%。

2 组患者均未发生肝硬化、HCC。患者依从性良好, 未出现肾毒性、骨髓抑制、横纹肌溶解或其他药物相关性不良事件。判定 2 组均无药物相关性不良事件发生。

2.2 免疫学结果

2.2.1 Treg、Th17 细胞频率、Treg/Th17 比值的变化 初次就诊和恩替卡韦治疗 24 周后, 分别检测 Treg、Th17 细胞频率、Treg/Th17 值, 结果见表 3。

Treg、Th17 细胞具有代表性的流式细胞分析图如图 1 所示。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 Treg 细胞频率分别是 $(1.64 \pm 0.61)\%$ 、 $(6.16 \pm 1.20)\%$ 、 $(2.70 \pm 1.16)\%$, 方差分析 3 组 Treg 细胞频率差异具有统计学意义 ($F=216.591, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 Treg 细胞频率高于 NC 组、CHB 组 ($P=0.000, P=0.000$), CHB 组高于 NC 组 ($P=0.000$)。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 Th17 细胞频率分别是 $(0.30 \pm 0.10)\%$ 、 $(0.40 \pm 0.13)\%$ 、 $(1.07 \pm 0.14)\%$, 方差分析 3 组 Th17 细胞频率差异具有统计学意义 ($F=343.551, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHB 组的 Th17 细胞频率高于 NC 组、CHBc 组 ($P=0.000, P=0.000$), CHBc 组高于 NC 组 ($P=0.000$)。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 Treg/Th17 值分别是 6.26 ± 3.29 、 18.58 ± 10.79 、 2.68 ± 1.39 , 方差分析 3 组 Treg/Th17 值差异具有统计学意义 ($F=49.833, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 Treg/Th17 值高于 NC、CHB 组 ($P=0.000, P=0.000$), NC 组高于 CHB 组 ($P=0.000$)。

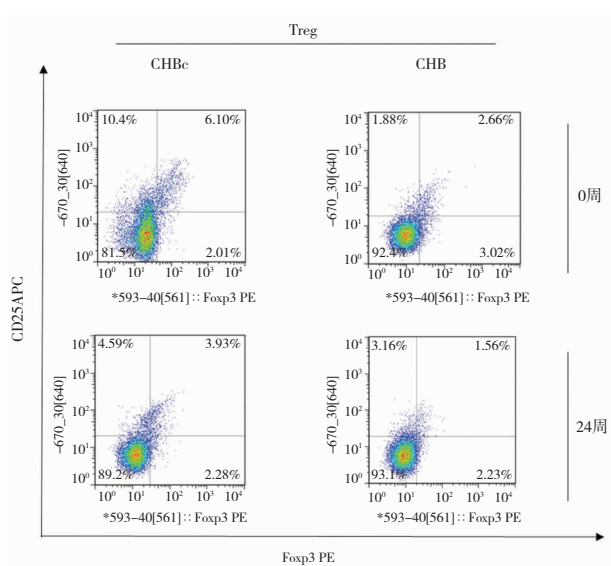
表 2 恩替卡韦治疗 24 周前后各组病毒学、血清学应答指标

组别	HBV-DNA	HBsAg	HBeAg	HBV-DNA 完全应答率(%, n)	HBV-DNA 部分应答率(%, n)	HBeAg血清学转 换率(%, n)	HBsAg 阴转率(%)
CHBc组 (n=61)							
治疗前	6.40 ± 1.79	4.07 ± 0.62	2.48 ± 1.14	—	—	—	—
治疗后	3.92 ± 1.33	3.92 ± 0.73	2.29 ± 1.09	60.66 (37)	93.44 (57)	11.48 (7)	0
CHB组 (n=30)							
治疗前	5.38 ± 1.98	3.31 ± 1.14	1.21 ± 1.58	—	—	—	—
治疗后	3.40 ± 1.19	2.98 ± 1.06	0.70 ± 1.45	73.33 (22)	93.33 (28)	16.67 (5)	0

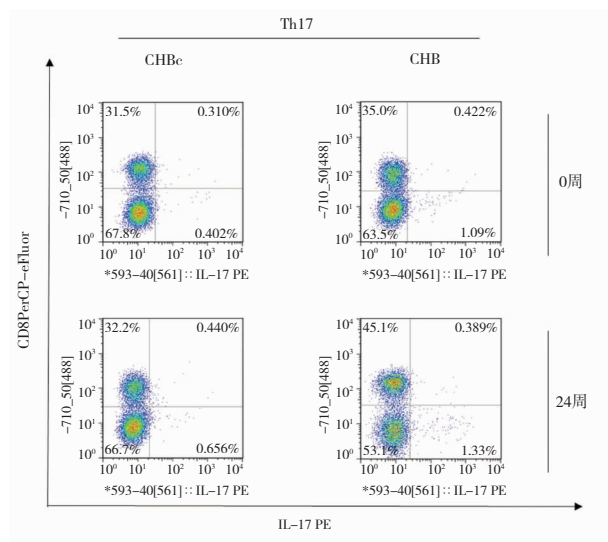
表 3 恩替卡韦治疗 24 周前后各组免疫学指标水平

组别	Treg	Th17	Treg/Th17	IL-10	TGF- β 1	IL-17
NC组	1.64 ± 0.61	0.30 ± 0.10	6.26 ± 3.29	25.86 ± 11.17	50.56 ± 9.85	49.43 ± 14.09
CHBc组 (n=61)						
治疗前	6.16 ± 1.20^{a1}	0.40 ± 0.13^{a1}	18.58 ± 10.79^{a1}	78.72 ± 22.65^{a1}	80.18 ± 12.86^{a1}	60.06 ± 14.13^{a1}
治疗后	3.94 ± 1.55^{a2}	0.69 ± 0.16^{a2}	6.60 ± 5.27^{a2}	56.85 ± 17.63^{a2}	53.45 ± 18.02^{a2}	71.1 ± 13.21^{a2}
CHB组 (n=30)						
治疗前	2.70 ± 1.16^{b1c1}	1.07 ± 0.14^{b1c1}	2.68 ± 1.39^{b1c1}	49.96 ± 13.61^{b1c1}	109.4 ± 13.83^{b1c1}	37.86 ± 13.21^{b1c1}
治疗后	1.58 ± 0.86^{b2c2}	1.57 ± 0.27^{b2c2}	1.09 ± 0.72^{b2c2}	35.43 ± 13.25^{b2c2}	85.19 ± 17.16^{b2c2}	58.75 ± 16.28^{b2c2}
F_1 值	216.591	343.551	49.833	87.629	167.811	26.292
P_1 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F_2 值	54.980	405.400	19.470	47.759	46.478	24.813
P_2 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: F_1, P_1 为治疗前组间 F, P 值, F_2, P_2 为治疗后组间 F, P 值。a: 与正常组比较; b: 与正常组比较; c: 与慢性乙型肝炎携带者组比较; 治疗前: a₁、b₁、c₁, 治疗后: a₂、b₂、c₂; Treg (a₁、b₁、c₁, $P=0.000$, a₂、c₂, $P=0.000$, b₂, $P=0.986$); Th17 (a₁、b₁、c₁, $P=0.000$, a₂、b₂、c₂, $P=0.000$); Treg/Th17 (a₁、b₁、c₁, $P=0.000$, a₂, $P=0.976$, b₂、c₂, $P=0.000$); IL-10 (a₁、b₁、c₁, $P=0.000$, a₂、c₂, $P=0.000$, b₂, $P=0.011$); TGF- β 1 (a₁、b₁、c₁, $P=0.000$; a₂, $P=0.692$, b₂、c₂, $P=0.000$); IL-17 (a₁, $P=0.004$, b₁, $P=0.005$, c₁, $P=0.000$, a₂、c₂, $P=0.000$, b₂, $P=0.062$)



A. 恩替卡韦治疗前后, Treg 细胞水平的变化



B. 恩替卡韦治疗前后, Th17 细胞水平的变化

图 1 恩替卡韦治疗前后, Treg、Th17 细胞水平的变化

恩替卡韦治疗 24 周后, 配对 t 检验结果提示接受治疗的 CHBc 组 ($t=16.573, P=0.000$)、CHB 组 ($t=8.885, P=0.000$) Treg 细胞频率均下降, 分别是 $(3.94 \pm 1.55)\%$ 、 $(1.58 \pm 0.86)\%$, 方差分析 3 组 Treg 细胞频率差异具有统计学意义 ($F=54.980, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 Treg 细胞频率高于 NC 组、CHB 组 ($P=0.000, P=0.000$), NC 组、CHB 组之间没有明显差异 ($P=0.986$)。恩替卡韦治疗 24 周后, 接受治疗的 CHBc 组 ($t=-17.320, P=0.000$)、CHB 组 ($t=-12.288, P=0.000$) Th17 细胞频率均上升, 分别是 $(0.69 \pm 0.16)\%$ 、 $(1.57 \pm 0.27)\%$, 方差分析 3 组 Th17 细胞频率差异具有统计学意义 ($F=405.400, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHB 组的 Th17 细胞频率高于 NC 组、CHBc 组 ($P=0.000, P=0.000$), CHBc 组高于 NC 组 ($P=0.000$)。恩替卡韦治疗 24 周后, 接受治疗的 CHBc 组 ($t=9.307, P=0.000$)、CHB 组 ($t=10.872, P=0.000$) Treg/Th17 值均下降,

分别是 6.60 ± 5.27 、 1.09 ± 0.72 , 方差分析 3 组 Treg/Th17 值差异具有统计学意义 ($F=19.470, P=0.000$)。两两比较结果显示, NC 组、CHBc 组的 Treg/Th17 值均高于 CHB 组 ($P=0.000$), NC 组和 CHBc 组之间没有明显差异 ($P=0.976$)。见图 2。

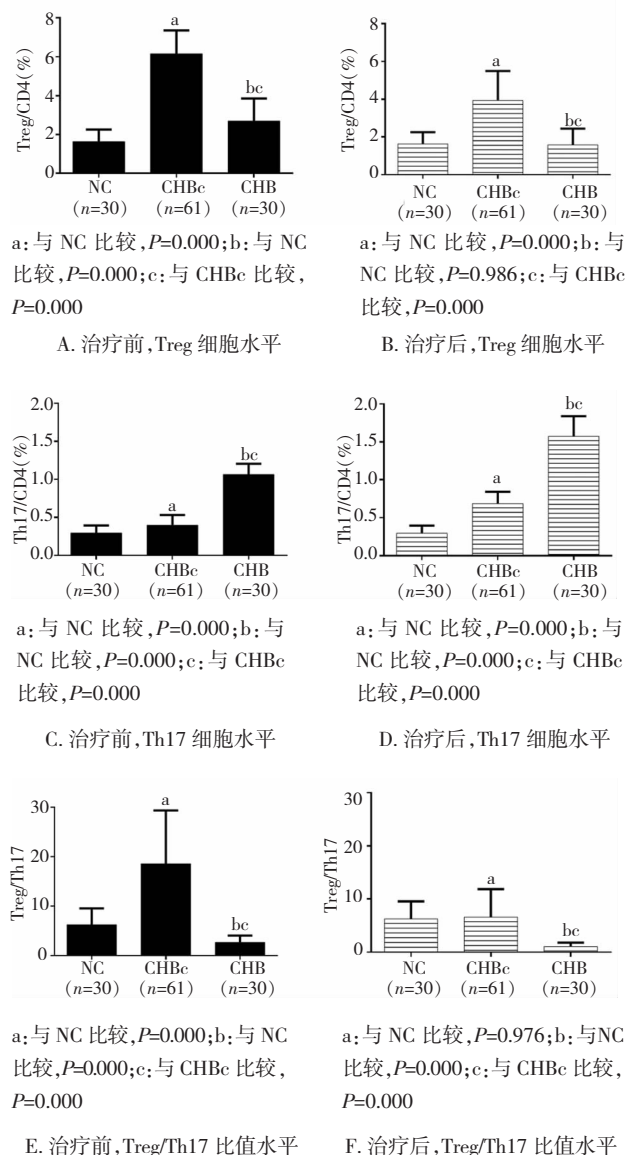


图 2 恩替卡韦治疗前后, Treg、Th17 细胞频率、Treg/Th17 比值变化

2.2.2 IL-10、TGF- β 1、IL-17 水平的变化 初次就诊和恩替卡韦治疗 24 周后, 分别收集患者血清样本, 统一进行 ELISA 检测 (表 3, 图 3)。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 IL-10 (pg/mL) 水平分别是 25.86 ± 11.17 、 78.72 ± 22.65 、 49.96 ± 13.61 , 方差分析 3 组 IL-10 水平差异具有统计学意义 ($F=87.629, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 IL-10 水平高于 NC 组、CHB 组 ($P=0.000, P=0.000$), CHB 组高于 NC 组 ($P=0.000$)。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 TGF- β 1 (pg/mL) 水平分别是 50.56 ± 9.85 、 80.18 ± 12.86 、 109.43 ± 13.83 ,

方差分析 3 组差异具有统计学意义 ($F=167.811, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHB 组的 TGF- $\beta 1$ 水平高于 NC、CHBc 组 ($P=0.000, P=0.000$), CHBc 组高于 NC 组 ($P=0.000$)。初次就诊时 NC 组、CHBc 组和 CHB 组 IL-17 (pg/mL) 水平分别是 $49.43 \pm 14.09, 60.06 \pm 14.13, 37.86 \pm 13.21$, 方差分析 3 组差异具有统计学意义 ($F=26.292, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 IL-17 水平高于 NC、CHB 组 ($P=0.004, P=0.000$), NC 组高于 CHB 组 ($P=0.005$)。

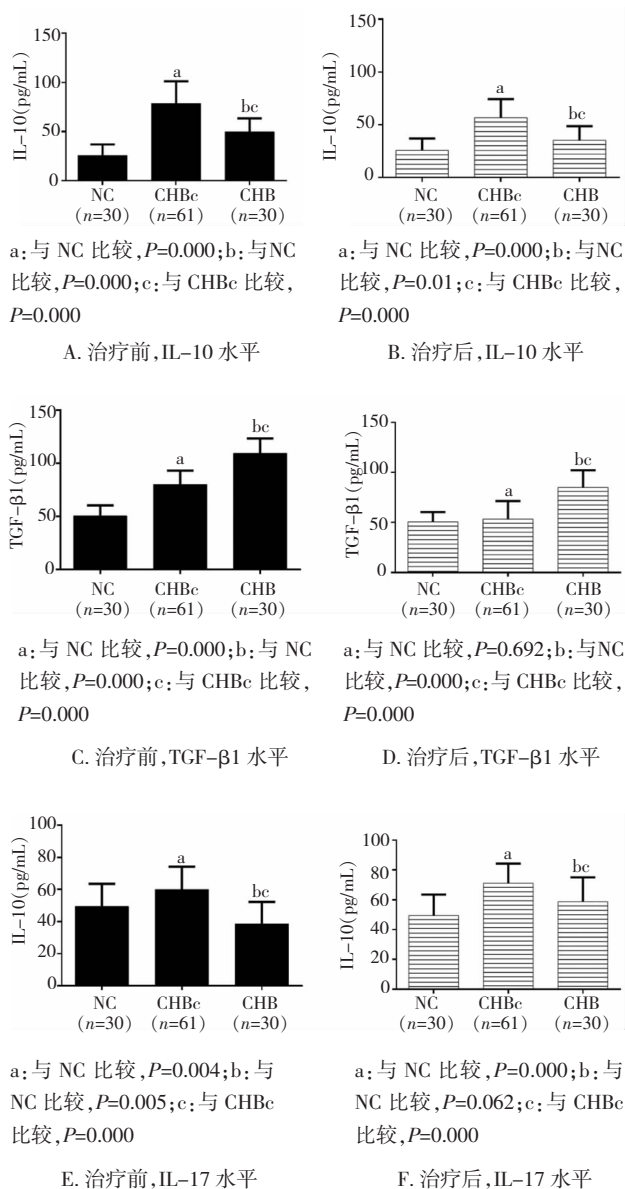


图 3 恩替卡韦治疗前后, IL-10、IL-17、TGF- $\beta 1$ 水平变化

恩替卡韦治疗 24 周后, 配对 t 检验结果提示接受治疗的 CHBc 组 ($t=11.997, P=0.000$)、CHB 组 ($t=5.726, P=0.000$) IL-10 水平均下降, 分别是 $56.85 \pm 17.63, 35.43 \pm 13.25$, 方差分析 3 组 IL-10 水平差异具有统计学意义 ($F=47.759, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 IL-10 水平高于 NC 组、CHB

组 ($P=0.000, P=0.000$), CHB 组高于 NC 组 ($P=0.011$)。恩替卡韦治疗 24 周后接受治疗的 CHBc 组 ($t=15.335, P=0.000$)、CHB 组 ($t=6.856, P=0.000$) TGF- $\beta 1$ 水平均下降, 分别是 $53.45 \pm 18.02, 85.19 \pm 17.16$, 方差分析 3 组差异具有统计学意义 ($F=46.478, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHB 组的 TGF- $\beta 1$ 水平高于 NC 组、CHBc 组 ($P=0.000, P=0.000$), NC 组和 CHBc 组之间没有明显差异 ($P=0.692$)。恩替卡韦治疗 24 周后接受治疗的 CHBc 组 ($t=-9.685, P=0.000$)、CHB 组 ($t=-10.893, P=0.000$) IL-17 水平均上升, 分别是 $71.1 \pm 13.21, 58.75 \pm 16.28$, 方差分析 3 组差异具有统计学意义 ($F=24.813, P=0.000$)。两两比较结果显示, CHBc 组的 IL-17 水平高于 NC、CHB 组 ($P=0.000, P=0.002$), NC 组和 CHB 组之间没有明显差异 ($P=0.062$)。

由以上结果可知, 恩替卡韦可通过调节免疫应答, 抑制 Treg 细胞及其细胞因子表达, 促进 Th17 细胞及其细胞因子表达, 从而有助于打破免疫耐受状态, 增强病毒清除功能。

2.2.3 Treg/Th17 值与病毒学、血清学指标的相关性 恩替卡韦治疗 24 周后, 为了进一步明确抗病毒疗效对免疫应答的调节作用, 本课题组分析了治疗前后 Treg/Th17 值与 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 的相关性, 结果如图 4 所示。在 CHBc 组和 CHB 组, Treg/Th17 值与 HBV-DNA ($r_s=0.827, r_s=0.826$)、HBsAg ($r_s=0.353, r_s=0.529$)、HBeAg ($r_s=0.391, r_s=0.580$) 均呈正相关 ($P<0.001$)。

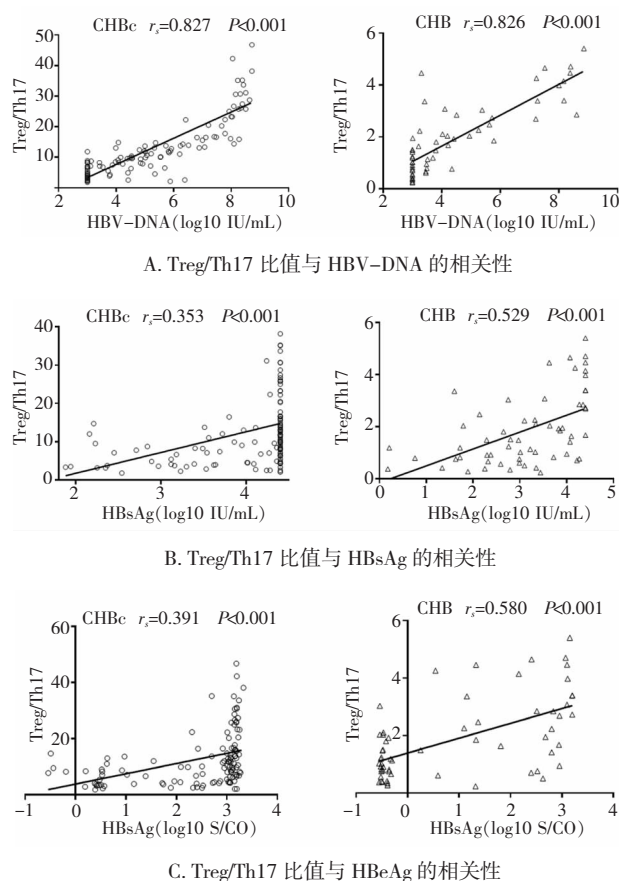


图 4 免疫学与病毒学、血清学应答的相关性

3 讨论

Treg 细胞有维持机体免疫耐受、控制炎症反应的作用^[10,19]。Stross 等^[20]通过创建急性 HBV 感染小鼠模型,研究 Treg 细胞在 HBV 感染中的作用,结果显示 HBV 复制开始后,肝脏中的 Treg 细胞频率迅速增加,并通过抑制促炎细胞因子的产生下调效应 T 细胞的抗病毒活性,减轻免疫介导的肝损伤,但也加大了病毒清除的难度。Sun 等^[21]对 91 例肝硬化、慢性乙肝患者外周血和肝内 Th17 细胞频率和 IL-17 水平进行检测,结果显示 Th17 细胞频率与肝纤维化程度和临床进展呈正相关,Th17 细胞通过诱导星形细胞活化加重肝纤维化和炎症反应。Niu 等^[22]检测 26 位慢性 HBV 相关肝衰竭患者和 31 位慢加急性 HBV 相关肝衰竭患者肝脏中 Treg、Th17 细胞频率,结果显示,与慢性 HBV 相关肝衰竭患者的肝脏相比,慢加急性 HBV 相关肝衰竭患者的肝脏中的 Th17/Treg 值更高,推测肝内 Th17 细胞在肝脏炎症反应中起重要促进作用,并且肝脏中 Th17/Treg 细胞之间的失衡可加重疾病的进展。这些研究表明适当的 Treg 和 Th17 细胞水平有利于 HBV 的清除,减轻肝脏炎症反应,所以 Treg/Th17 值的平衡在维持 HBV 感染相关肝病患者的临床进展和远期结局中起重要作用。

如今,核苷(酸)类似物(NA)的抗病毒作用已经很明确,然而对于中国 9 700 万慢性乙肝病毒携带者^[4-5],抗病毒治疗指征仍不明确,抗病毒疗效仍不确切。Zhang 等^[23]采用恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者 12 个月,伴随 Th17 细胞迅速增加,Treg 细胞减少,Treg/Th17 细胞比值明显降低,HBV 复制受到抑制,且 Treg/Th17 与 HBV-DNA 呈正相关,表明 Treg 细胞和 Th17 细胞之间的不平衡可能在 HBV 持续感染中起重要作用。Yu 等^[24]用核苷(酸)类似物治疗 44 例慢性乙肝患者(14.42 ± 13.08)周,结果显示 Treg 细胞频率、IL-10、TGF-β1 水平和 Treg/Th17 值均下降,Th17 细胞频率和 IL-17 水平略微上升,HBV-DNA 下降,且 Treg、Treg/Th17 与 HBV-DNA 均呈正相关。Wang 等^[10]采用替比夫定治疗 28 例 HBeAg 阳性的慢性乙肝患者,并分别于 0、12、24、36、48 和 96 周时检测 Treg 和 Th17 细胞及其相关细胞因子水

平,研究表明抗病毒药物具有免疫调节功能,可以改善 Treg/Th17 细胞比例,促进病毒及其标志物的清除,延缓疾病进展和改善临床结局。

以往的研究中,证实了 Treg 和 Th17 细胞之间的平衡可以介导炎症反应,并可能促进 HBV 感染相关疾病的进展^[10,20-21,23-24]。然而,上述研究并未针对 CHBc 抗病毒治疗进行纵向研究。本研究检测 CHBc 恩替卡韦治疗 24 周前后,Treg 和 Th17 细胞频率及其相关细胞因子水平,分析 Treg/Th17 细胞比值变化与抗病毒疗效之间的关系,确定恩替卡韦对于 CHBc 免疫应答的调节作用,进而从免疫学角度证实 CHBc 抗病毒治疗的有效性。

在本研究结果中,初次就诊时 Treg 细胞频率在 CHBc 组中明显高于 CHB 组和 NC 组。这间接证明 CHBc 对 HBV 的免疫应答受损,即持续保持在病毒高复制、病毒产物高水平的情况下,肝功能指标持续正常,且无明显临床症状及慢性肝脏疾病的相关体征。Th17 细胞频率在 CHB 组最高,CHBc 组次之,NC 组最低,说明 CHB 组、CHBc 组均有炎症活动,且 CHB 组比 CHBc 组更强。Treg/Th17 值在 CHBc 组高于 NC、CHB 组。恩替卡韦治疗 24 周后,CHBc 组和 CHB 组 Treg 细胞频率及其分泌的抗炎因子 IL-10、TGF-β1 水平均下降,Th17 细胞频率及其分泌的促炎因子 IL-17 均上升,病毒学、血清学指标 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 均下降。Treg 细胞频率下降,Th17 细胞频率升高,导致 Treg/Th17 值下降,且在 CHBc 组和 CHB 组,Treg/Th17 值与 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 均呈正相关。由以上结果可知,恩替卡韦可通过调节免疫应答,抑制 Treg 细胞及其分泌的抗炎因子表达,促进 Th17 细胞及其分泌的促炎因子表达,从而有助于打破免疫耐受状态,抑制病毒复制,增强病毒产物清除功能。基于以上病毒学、血清学与免疫学结果,提示 ALT 正常也能取得良好的抗病毒疗效,加上 CHBc 是存在病毒复制和肝脏细胞炎症活动的,所以 ALT 正常与否也并不能成为是否进行抗病毒治疗的决定因素。这与颜成果等^[25]研究结果基本一致,即 CHBc 有进行抗病毒治疗的必要,且疗效佳、安全。

综上所述,恩替卡韦可以下调 CHBc 的 Treg 细胞频率及其细胞因子的水平,上调 Th17 细胞频率和 Th17 细胞相关细胞因子的水平,导致 Treg/Th17 值

下降,打破免疫耐受状态,使炎症活动增强,促进 HBV 及其标志物清除。病毒低复制和标志物低水平远期有助于减缓肝纤维化、肝硬化的发展进程,从免疫学角度证实了 CHBc 抗病毒治疗疗效佳、安全。且恩替卡韦治疗未发生肾功能、肝功能、甲状腺功能等损害,骨髓抑制,横纹肌溶解等药物相关性不良事件。但是本研究纳入的病例数较少,观察时间较短,有待扩大样本量、延长随访时间,从多角度进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wang H, Xue L, Yan R, et al. Comparison of histologic characteristics of Chinese chronic hepatitis B patients with persistently normal or mildly elevated ALT[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80585.
- [2] Liao B, Wang Z, Lin S, et al. Significant fibrosis is not rare in Chinese chronic hepatitis B patients with persistent normal ALT[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78672.
- [3] Chao DT, Lim JK, Ayoub WS, et al. Systematic review with meta-analysis: the proportion of chronic hepatitis B patients with normal alanine transaminase ≤ 40 IU/L and significant hepatic fibrosis[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 39(4): 349–358.
- [4] Cui Y, Jia J. Update on epidemiology of hepatitis B and C in China[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013, 28(s1): 7–10.
- [5] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550–6557.
- [6] 桂红莲, 谢青, 王晖, 等. 丙氨酸氨基转移酶持续正常的慢性乙型肝炎病毒感染者的肝脏组织学改变[J]. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15(12): 881–885.
- [7] 马丽娜, 何智敏, 曹振环, 等. 乙型肝炎病毒携带者的肝脏病理学与临床特征[J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(6): 433–436.
- [8] Niu YH, Yin DL, Liu HL, et al. Restoring the Treg cell to Th17 cell ratio may alleviate HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(26): 4146–4154.
- [9] Balmasova IP, Yushchuk ND, Mynbaev OA, et al. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(39): 14156–14171.
- [10] Wang ML, Zhou QL, Chen EQ, et al. Low ratio of Treg to Th17 cells after 36 weeks of telbivudine therapy predict HBeAg seroconversion[J]. *Viral immunology*, 2016, 29(6): 332–342.
- [11] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection[M]. Geneva: World Health Organization, 2015 Mar.
- [12] Huang YW, Chayama K, Tsuge M, et al. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B[J]. *Antiviral Therapy*, 2010, 15(2): 177–184.
- [13] Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Immune effectors required for hepatitis B virus clearance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(2): 798–802.
- [14] Yang X, Li J, Liu J, et al. Relationship of Treg/Th17 balance with HBeAg change in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients receiving telbivudine antiviral treatment: a longitudinal observational study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(23): e7064.
- [15] Zhang JY, 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.
- [16] Chen Y, Fang J, Chen X, et al. Effects of the Treg/Th17 cell balance and their associated cytokines in patients with hepatitis B infection[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 9(2): 573–578.
- [17] Liu B, Gao W, Zhang L, et al. Th17/Treg imbalance and increased interleukin-21 are associated with liver injury in patients with chronic severe hepatitis B[J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 46: 48–55.
- [18] 中华医学会肝病学会, 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): 13–24.
- [19] Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(4): 376–384.
- [20] Stross L, Gunther J, Gasteiger G, et al. Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental hepatitis B virus infection in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 873–883.
- [21] Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, et al. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis[J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2012, 19(6): 396–403.
- [22] Niu Y, Liu H, Yin D, et al. The balance between intrahepatic IL-17(+) T cells and Foxp3(+) regulatory T cells plays an important role in HBV-related end-stage liver disease[J]. *BMC Immunol*, 2011, 12: 47.
- [23] Zhang JY, Song CH, Shi F, et al. Decreased ratio of Treg cells to Th17 cells correlates with HBV DNA suppression in chronic hepatitis B patients undergoing entecavir treatment[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13869.
- [24] Yu XP, Guo RY, Su ML, et al. Dynamic changes of Treg and Th17 cells and related cytokines closely correlate with the virological and biochemical response in chronic hepatitis B patients undergoing nucleos(t)ide analogues treatment[J]. *Hepat Mon*, 2013, 13(12): e15332.
- [25] 颜成果, 姚云清, 毛晓琴. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎病毒携带者近期疗效观察[J]. *中华肝脏病杂志*, 2014, 22(12): 900–903.

(责任编辑: 张辉洁)