

阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响

闫杰, 谢雯, 蔺亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军

■背景资料

HBV特异性CTL应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注。在未经治疗的慢性乙型肝炎患者中, 往往存在T细胞的低反应。新型核苷(酸)类似物是否能够影响机体对HBV的免疫应答, 尚无确切研究结论。

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军, 北京地坛医院 北京市 100015

蔺亚辉, 中国医学科学院基础医学研究所 北京市 100005

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2003-3066

作者贡献分布: 此课题由闫杰与谢雯设计; 蔺亚辉、冯鑫及王蓓蓓完成课题实验室操作工作; 肖江、欧蔚妮及王艳斌完成临床资料收集; 闫杰完成数据分析; 论文写作由闫杰与谢雯完成; 成军在课题设计、论文写作中进行指导。

通讯作者: 谢雯, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院。xiewen6218@163.com

电话: 010-84322816

收稿日期: 2009-04-21 修回日期: 2009-05-22

接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-07-08

Effect of adeforvir dipivoxil on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B

Jie Yan, Wen Xie, Ya-Hui Lin, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yan-Bin Wang, Jun Cheng

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Ya-Hui Lin, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Supported by: the Capital Medical Development and Research Foundation, No. 2003-3066

Correspondence to: Wen Xie, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China. jieyan@bbsn.cn

Received: 2009-04-21 Revised: 2009-05-22

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of adeforvir dipivoxil on HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: The frequency of circulating HBcAg-specific cytotoxic T cells in 11 HLA-A2+ chronic hepatitis B patients were studied longitudinally before and after adeforvir dipivoxil therapy by HLA-A2/peptide tetramer staining.

RESULTS: The frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells ranged from 0.074% to 0.937%. The frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in chronic hepatitis B patients was lower than that in acute hepatitis B patients. No signifi-

cant difference was observed in the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells between before and after adeforvir dipivoxil therapy. Subgroup analysis indicated that, after therapy with adeforvir dipivoxil for 48 hours, HBV DNA or ALT levels had no effect on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells.

CONCLUSION: Adeforvir dipivoxil probably exerts no effect on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with CHB.

Key Words: Adeforvir dipivoxil; Chronic hepatitis B; Cytotoxic T lymphocyte; MHC class I-peptide tetramer

Yan J, Xie W, Lin YH, Feng X, Wang BB, Xiao J, Ou WN, Wang YB, Cheng J. Effect of adeforvir dipivoxil on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1996-1999

摘要

目的: 探讨阿德福韦酯(ADV)对慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血中HBcAg特异性CTL数量的影响。

方法: 选择应用ADV治疗48 wk的HLA-A2阳性CHB患者11例作为研究对象, 应用Tetramer流式细胞技术检测治疗前后PBMC中的HBcAg特异性CTL细胞频率。

结果: HBcAg特异性CTL为0.074%-0.937%。CHB患者体内的特异性CTL频率远低于急性乙型肝炎。经ADV治疗CHB患者48 wk后, 其BcAg特异性CTL较治疗前无明显变化; 亚组分析也表明无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响。

结论: 应用ADV治疗48 wk, 对CHB患者体内HBcAg特异性CTL细胞频率无明显影响。

关键词: 阿德福韦酯; 慢性乙型肝炎; 细胞毒性T淋巴细胞; MHC-I-肽四聚体

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

闫杰, 谢雯, 简亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1996-1999
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1996.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注. 在未经治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者中, 往往存在T细胞的低反应^[1-2], 现有研究结果提示, CHB患者体内的高病毒载量和高抗原量的抑制作用可能是其重要原因之一^[3]. 阿德福韦酯是一种新型核苷酸类似物, 已广泛应用于CHB治疗中. 为了探讨该药物在降低HBV病毒载量的同时是否伴有HBV特异性CTL活性的恢复, 我们采用了MHC-I限制的HLA-A2病毒抗原表位的四聚体技术, 建立了体外直接检测特异性CTL的方法, 并用该方法研究ADV对CHB患者外周血中HBcAg特异性CTL频率的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-2006年北京地坛医院肝炎二科门诊应用阿德福韦酯治疗48 wk的HBeAg阳性CHB患者40例, 其中男33例, 平均年龄 29.91 ± 9.11 , 女7例, 平均年龄 26.5 ± 5.83 , 诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》中病毒性肝炎诊断标准^[4]. 所有病例符合下列条件: (1)HBV DNA(荧光定量) $\geq 10^8$ copies/L; (2)HBV血清标志物(HBVMs)为: HBsAg阳性, HBeAg阳性, 抗-HBe阳性. 抗-HBs阴性, 抗-HBe阴性; (3)ALT ≥ 80 U/L且ALT ≤ 500 U/L血清总胆红素水平(SB) <40 μ mol/L(20 μ mol/L为正常值); (4)排除由药物、酒精和其他因素所致的肝功能异常; (5)女性排除妊娠. 除收集临床资料外, 每例患者均保留治疗前后空腹静脉采集全血标本(肝素抗凝)4 mL用于特异性CTL检测^[5].

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离: 将临床采集的全血标本在4 h内用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 于-80℃保存, 待测.

1.2.2 HLA-A2型别鉴定: 应用顺序特异引物聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction-sequence special primer, PCR-SSP)^[6]对全部病例进行筛选, 将鉴定获得的HLA-A2阳性患者治疗前后PBMC

用于特异性CTL检测.

1.2.3 Tetramer流式细胞技术检测HBcAg特异性CTL: HBcAg特异性HLA-肽四聚体(Tetramer)购自美国Sanquin生物技术有限公司, 其特异性肽段为HBVcore18-27短肽(氨基酸序列为FLPSDFFPSV), 以藻红蛋白(PE)标记, 用于流式细胞术检测. 将每份PBMC标本融化复苏后, 用PE标记的Tetramer和APC标记的CD8抗体(BD公司产品)双染色后应用流式细胞仪进行检测, 以淋巴细胞设门, 计数50 000个CD8⁺阳性细胞, 同时计数CD8⁺和Tetramer双阳性细胞为特异性CD8⁺细胞, 并以占总计数CD8⁺细胞的百分比表示.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 治疗前后均数比较采用独立样本 t 检验, 使用SPSS10.0软件进行统计学分析.

2 结果

2.1 流式细胞术检测效果 本次实验共检测11例CHB患者治疗前后PBMC标本22份, 测得HBcAg特异性CTL为0.074%-0.937%. CHB患者体内的特异性CTL频率远低于急性乙型肝炎, 本实验数据与以往研究数据相符(图1).

2.2 基本资料 40例患者中鉴定获得HLA-A2型11例, 其中男7例, 女4例, 治疗后血清HBV DNA、ALT、AST及白蛋白水平较治疗前出现明显改善(表1), 其中2例出现HBV DNA阴转($<5 \times 10^5$ copies/L), 6例出现ALT复常.

2.3 治疗前后特异性CTL的变化 纳入研究的11例CHB患者经ADV治疗48 wk后的HBcAg特异性CTL较治疗前无明显变化. 随后进行的亚组分析也表明: 无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响(表2).

3 讨论

对于HBV感染者而言, 特异性CTL应答是机体清除肝细胞内HBV的主要途径, 但是不充分的特异性CTL应答不仅不能清除病毒, 反而却通过介导非特异性T细胞应答引起肝脏损害. 因此, 检测CHB患者特异性CTL水平对于阐明乙型肝炎慢性化的免疫病理机制以及研发更为有效的治疗药物均有重大意义. 但是由于CHB患者外周血中特异性CTL水平极低, 应用传统免疫学研究技术难以进行准确检测. 1992年Garboczi *et al*^[7]建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可

■ 相关报道

1992年Garboczi *et al*建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可能.

■创新亮点

本文应用MHC-抗原肽四聚体技术检测CHB患者外周血中的特异性CTL, 克服了传统免疫学技术对极低水平的特异性CTL难以精确计量的方法学难题, 从而保证了结果的准确可信。

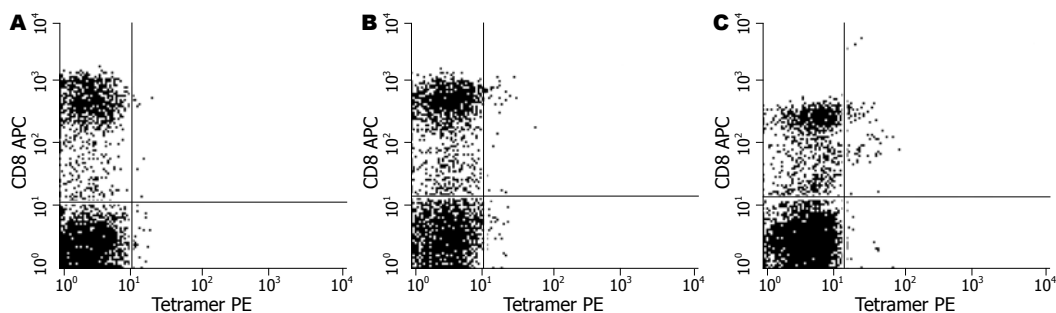


图1 Tetramer流式细胞技术检测HBcAg特异性CTL. A: 正常人PBMC所做的阴性对照(Tetramer/CD8 = 0.003%); B: 特异性CTL频率较低的标本(Tetramer/CD8 = 0.074%); C: 特异性CTL频率较高的标本(Tetramer/CD8 = 0.937%).

表1 ADV治疗前后CHB患者肝功能及HBV DNA的变化

	治疗前	治疗48 wk后	P值
ALT(U/L)	183.00 ± 98.45	74.45 ± 73.15	0.024
AST(U/L)	90.46 ± 50.37	46.36 ± 43.07	0.027
TBIL(μmol/L)	27.63 ± 33.73	16.56 ± 7.26	0.331
ALB(g/L)	44.22 ± 3.87	46.96 ± 1.87	0.043
IgHBV DNA(Ig10)	7.04 ± 1.26	4.59 ± 1.84	0.001

表2 ADV治疗前后HBcAg特异性CTL的变化 (%)

	n	治疗前	治疗48 wk后	P值
全部患者	11	0.276 ± 0.206	0.238 ± 0.254	0.695
HBV DNA转阴者	2	0.332 ± 0.160	0.189 ± 0.013	0.402
HBV DNA未转阴者	9	0.263 ± 0.222	0.249 ± 0.282	0.900
ALT复常者	6	0.225 ± 0.142	0.279 ± 0.335	0.878
ALT未复常者	5	0.337 ± 0.270	0.189 ± 0.122	0.725

能。我们选用已经证实为MHC I类分子关键结合序列的HBcAg18-27肽段^[8]与HLA-A2构建四聚体, 用于CHB患者PBMC中特异性CTL细胞频率的检测。结果显示, 该方法可检测到细胞频率低至0.074%的HBcAg特异性CTL, 而阴性对照(未受HBV感染的健康人PBMC标本)结果仅为0.003%, 表明四聚体技术联合流式细胞术检测CHB患者特异性CTL的灵敏度和特异度均较高, 适于低水平细胞频率的检测。

既往认为核苷(酸)类似物仅仅通过抑制HBV DNA多聚酶的活性达到抗病毒治疗目的, 对CHB患者的免疫状态不产生直接或间接的影响。2001年Boni *et al*^[9]报道, 经过拉米夫定(LAM)治疗后, CHB患者外周血中的HBV特异性CD4⁺细胞和HBV特异性CD8⁺细胞频率明显升高, 表明LAM能够使CHB患者的HBV特异性CTL功能得到一定程度的恢复。后续研究显示, LAM仅在最初治疗的1-2 wk可增加CD4⁺ T淋巴细胞反应,

而在治疗6 mo时, CD4⁺ T淋巴细胞反应又恢复到治疗前水平; 表明经LAM治疗恢复的HBV特异性CTL反应无法长期维持^[10]。Wu *et al*^[11]通过检测3型鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus type 3, MHV-3)诱导的小鼠肝炎模型血清细胞因子水平, 以评价替比夫定(telbivudine, LdT)对机体免疫的影响, 结果显示: 在LdT治疗组中TNF-α、IL-12、IL-18和IFN-γ等Th1细胞因子水平明显升高, 而Th2细胞因子(IL-10、IL-4)则明显受到抑制, 提示LdT对于慢性肝炎患者可能具有免疫调节作用, 但尚需进一步研究证实。为研究ADV对CHB患者外周血中HBV特异性CTL水平的影响, 我们采用四聚体技术检测11例经ADV治疗48 wk的CHB患者治疗前后的PBMC, 结果显示, ADV治疗48 wk后的HBcAg特异性CTL较治疗前无明显变化; 亚组分析也表明无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响。这一结果同既往研究中

LAM对CHB患者特异性CTL的影响基本一致, 说明ADV治疗对CHB患者特异性CTL的恢复也无明显影响。

4 参考文献

- 1 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- 2 Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- 3 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 4 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. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 5 王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮. 阿德福韦酯对HBeAg(+)慢性乙型肝炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2666-2668
- 6 谭建明, 唐孝达, 谢桐, 徐琴君, 丁言德. 人类白细胞抗原-I类抗原的DNA分型与临床应用. 中华医学杂志 1998; 78: 763-767
- 7 Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and

- complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3429-3433
- 8 Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570
- 9 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-971
- 10 Boni C, Penna A, Bertoletti A, Lamonaca V, Rapti I, Missale G, Pilli M, Urbani S, Cavalli A, Cerioni S, Panebianco R, Jenkins J, Ferrari C. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 595-605
- 11 Wu Z, Yan W, Guo W, Zou Y, Wang H, Ning Q. Telbivudine preserves Th1 cytokine and inhibits Th2 cytokine production in MHV-3 induced viral hepatitis model. The 59th Annual Meeting of AASLD, Moscone West Convention Center, San Francisco, Oct 31-Nov 4, 2008: Abstract 18

■同行评价

本研究选题为热点问题, 对临床医师有较好的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等。基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。(常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)