



## 拉米夫定对慢性乙型肝炎患者PBMC分泌IFN- $\gamma$ 和IL-10的影响

HBV持续感染的机制很复杂,高病毒量所致的外周免疫耐受可能为其原因之一。拉米夫定是近年在国内上市的一种核苷类抗病毒药,在体内或体外均能显著抑制HBV复制。为了探讨拉米夫定治疗在快速降低HBV DNA量的同时是否会引慢性乙型肝炎(CHB)患者某些免疫指标的改变,我们动态监测了26例接受拉米夫定治疗的CHB患者外周血单核细胞(PBMC)在体外经rHBcAg刺激诱导培养后其上清中IFN- $\gamma$ 、IL-10的含量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病例选择

本研究26例乙型肝炎(乙肝)标志物呈“大三阳”的CHB患者均为第一军医大学南方医院感染内科2000年2~3月间住院或门诊病例,其中男15例、女11例,年龄16~45岁,诊断符合2000年西安全国第10届病毒性肝炎会议所修订的《病毒性肝炎防治方案(试行)》的标准,并经肝脏穿刺活检证实。受检之前均未行抗病毒治疗和免疫调节治疗,并排除药物、酒精中毒等引起的肝损害。12例正常对照为健康志愿者,年龄为(28 $\pm$ 9)岁。所有受检者抗-HCV、抗-HD、抗-HEV、抗-HIV阴性。

#### 1.2 疗效判断标准

完全应答:PCR法检测HBV DNA阴性,肝功能ALT恢复正常,HBeAg阴转,抗-HBe阳转;部分应答:部分指标达到完全应答标准;无应答:没有一项指标达到上述标准。

#### 1.3 标本的收集

无菌采集肝素抗凝血3 ml,常规分离PBMC,粘附法去除之,用含10%小牛血清的RPMI-1640配成 $1\times 10^6$ /ml培养,锥虫蓝染色,细胞活力>95%。接种于24孔培养板,加入终浓度为5  $\mu$ g/ml的特异性刺激剂rHBcAg(购于R&D公司),置37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱72 h,离心后收集上清,-20  $^{\circ}$ C保存,待测。

#### 1.4 细胞因子检测

采用双抗体夹心法,IFN- $\gamma$ 和IL-10试剂盒购自美国Genzyme公司,严格按试剂盒说明书操作,依标准品D( $\lambda$ )值做标准曲线,再计算待测样品中细胞因子含量,每份样本均设三复孔。

#### 1.5 统计学处理

实验资料用SPSS8.0统计软件进行统计分析,采用方差分析及SNK检验。

### 2 结果

#### 2.1 慢性乙肝患者和对照PBMC培养上清中IFN- $\gamma$ 和IL-10含量比较

与正常对照比较,CHB患者IL-10水平高( $P<0.01$ ),而IFN- $\gamma$ 水平差异不显著( $P>0.05$ )。接受拉米夫定治疗后,IFN- $\gamma$ 水平在各时间点均升高( $P<0.05$ );IL-10水平降低,但仅第一月与治疗前比较有明显差异( $P<0.05$ ,表1)。

#### 2.2 对拉米夫定治疗患者产生不同应答与PBMC培养上清中细胞因子水平关系

随访26例CHB患者,其中对拉米夫定治疗完全应答5例,部分应答15例,无应答6例,各组PBMC培养上清液中细胞因子水平见表2。与治疗前比较,完全应答和部分应答组IFN- $\gamma$ 水平较治疗前升高( $P<0.05$ );完全应答组IL-10水平在治疗后1、3、9个月较治疗前低,差异有显著意义( $P<0.05$ ,表2)。

表 1 接受拉米夫定治疗的 CHB 患者及正常对照组 PBMC 培养上清液中 IFN- $\gamma$  和 IL-10 含量(pg/ml,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab.1 The levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 in the culture supernatants of PBMC from patients with CHB and healthy controls (pg/ml, *Mean* $\pm$ *SD*)

Group	n	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-10(pg/ml)
Control	12	522.7 $\pm$ 98.6	329.4 $\pm$ 73.6
Before therapy	26	513.9 $\pm$ 123.5	436.0 $\pm$ 110.0**
1 month after therapy	26	616.7 $\pm$ 121.0**	436.0 $\pm$ 110.0*
3 month after therapy	26	638.81 $\pm$ 137.6**	384.2 $\pm$ 74.3*
6 month after therapy	26	645.91 $\pm$ 189.6**	401.7 $\pm$ 111.7*
9 month after therapy	26	613.91 $\pm$ 136.9**	386.6 $\pm$ 98.5

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs the levels before therapy

表 2 对拉米夫定治疗不同应答与细胞因子水平的关系( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Relations between the cytokines levels and different responses to lamivudine treatment(*Mean* $\pm$ *SD*)

Group	n	Time	IFN- $\gamma$	IL-10
Full response	5	Before therapy	542.8 $\pm$ 75.7	467.8 $\pm$ 78.5
		1 month after therapy	693.0 $\pm$ 98.0*	331.2 $\pm$ 99.9*
		3 month after therapy	674.0 $\pm$ 102.6*	348.6 $\pm$ 75.9*
		6 month after therapy	675.8 $\pm$ 99.7*	372.0 $\pm$ 89.0
		9 month after therapy	680.6 $\pm$ 88.4*	338.0 $\pm$ 53.9*
Parial response	15	Before therapy	499.5 $\pm$ 121.2	436.2 $\pm$ 124.3
		1 month after therapy	618.9 $\pm$ 91.7**	342.4 $\pm$ 78.1*
		3 month after therapy	670.0 $\pm$ 102.5*	375.8 $\pm$ 56.1
		6 month after therapy	679.0 $\pm$ 219.9**	412.4 $\pm$ 122.8
		9 month after therapy	606.2 $\pm$ 140.9*	400.6 $\pm$ 118.1
No response	6	Before therapy	525.8 $\pm$ 170.0	425.5 $\pm$ 103.5
		1 month after therapy	547.3 $\pm$ 174.3	399.5 $\pm$ 112.9
		3 month after therapy	531.5 $\pm$ 178.8	435.5 $\pm$ 97.3
		6 month after therapy	491.2 $\pm$ 153.4	399.8 $\pm$ 442.2
		9 month after therapy	578.0 $\pm$ 191.6	392.0 $\pm$ 64.4

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs the levels before therapy

### 3 讨论

慢性HBV感染患者往往以HBV抗原特异性Th2细胞应答占优势。IL-10是具有代表性的Th2类细胞因子之一，可通过抑制Th1类细胞反应而利于HBV的持续感染。本实验表明，未经治疗的CHB患者PBMC培养上清中IL-10含量明显高于正常对照组，与此观点一致。

目前对慢性乙肝患者存在T细胞低反应的机制仍知之甚少。普遍认为，病人体内的高病毒量和高抗原量与之有关。拉米夫定是逆转录酶的高效抑制剂，其快速抑制HBV复制、改善肝功能和肝组织病理改变及副作用小等特征已为大量的临床实验证实，但拉米夫定对免疫系统无直接作用，通过快速降低HBV DNA量是否能恢复CHB患者的细胞免疫功能尚见不同的报道。Marinos等[1]比较干扰素单一治疗和拉米夫定、IFN- $\alpha$ 联合治疗的CHB患者HLA II限制性Th1细胞对HBcAg的增生反应表明，无论是IFN- $\alpha$ 单一治疗还是联合治疗，CD4+细胞的增生反应并无明显差异。但因为他们所选择的实验对象均为IFN- $\alpha$ 治疗无效的病例，故应谨慎分析其实验意义。Boni等[2]动态检测拉米夫定治疗前后CHB患者PBMC在rHBcAg或非特异性刺激剂如PHA、破伤风毒素蛋白刺激下增生反应情况，结果显示，拉米夫定单一治疗能恢复CHB患者T细胞反应。本研究结果显示，拉米夫定治疗后PBMC培养上清IFN- $\gamma$ (粗略代表Th1类细胞因子)量较正常对照组明显升高，而IL-10(粗略代表Th2类细胞因子)量降低，提示拉米夫定治疗似能增强CHB患者Th1类细胞因子反应。但进一步分析表明，在拉米夫定治疗无应答组，IFN- $\gamma$ 和IL-10含量在治疗

前后并无明显变化,说明仅部分接受拉米夫定治疗的CHB患者Th1类细胞因子反应增强。

拉米夫定不能作用于已与人体染色体整合的HBV DNA和游离基因模板,故停药后会出现肝炎症状复发。拉米夫定与其他类型的药物联合应用治疗CHB已成为目前研究的热点之一。IFN- $\alpha$ 治疗CHB患者无效的原因是多方面的,其中,患者血清存在的大量病毒和高水平IL-10的抑制作用为其主要原因之一[3]。从理论上讲,通过拉米夫定治疗降低HBV DNA量和IL-10水平有可能增强效应。Schalm等[4]报道,拉米夫定同IFN- $\alpha$ 联合应用治疗CHB,可提高HBeAg的阴转率,尤其对存在中等程度谷丙转氨酶水平增高的患者,其效果更为明显。但也有与此相反的报道[5],故拉米夫定的联合治疗问题仍需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Marinos G, Noumov NV, Williams R. Impact of inhibition of viral replication on the cellular immune response in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 1996,24(5):1991-5.
- [2] Boni C, Bertoletti A, Penna A, et al. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B[J]. J Clin Investig, 1998,102(5):968-5.
- [3] Schlaak JF, Tully G, Lohf HF, et al. The presence of HBV-DNA in serum is associated with suppressed costimulatory effects of interleukin 12 on HBV-induced immune response[J]. J Hepat, 1999,30(3):353-8.
- [4] Schalm SW, Heathcote J, Farrell G, et al. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomized trial[J]. Gut, 2000,46(4):562-8.
- [5] Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, et al. Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study[J]. J Hepatol, 1998, 28(6):923-9.

#### 参考文献:

- [1] Marinos G, Noumov NV, Williams R. Impact of inhibition of viral replication on the cellular immune response in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 1996,24(5):1991-5.
- [2] Boni C, Bertoletti A, Penna A, et al. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B[J]. J Clin Investig, 1998,102(5):968-5.
- [3] Schlaak JF, Tully G, Lohf HF, et al. The presence of HBV-DNA in serum is associated with suppressed costimulatory effects of interleukin 12 on HBV-induced immune response[J]. J Hepat, 1999,30(3):353-8.
- [4] Schalm SW, Heathcote J, Farrell G, et al. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomized trial[J]. Gut, 2000,46(4):562-8.
- [5] Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, et al. Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study[J]. J Hepatol, 1998, 28(6):923-9.