

HBsAg冲击致敏的自体DCs诱导的CIK细胞对慢性乙型肝炎的治疗作用

刘树人, 张雁, 谢庆, 李灼亮, 余宙耀, 孔祥平

刘树人, 张雁, 谢庆, 李灼亮, 余宙耀, 孔祥平, 中国人民解放军第四五八医院全军肝病中心 广东省广州市 510600
广东省第五批重点科技项目, No. 99MO4811G
通讯作者: 刘树人, 510600, 广东省广州市东风东路801号, 中国人民解放军第四五八医院. liushuren588@126.com
电话: 020-61639814 传真: 020-87376765
收稿日期: 2005-06-16 接受日期: 2005-08-20

摘要

目的: 探讨HBsAg冲击致敏的自体DCs及其诱导的HBsAg特异性CIK细胞对慢性乙型肝炎(CHB)的治疗作用。

方法: 研究对象分为HBsAg特异性CIK细胞治疗组(特异性CIK组, 23例), 拉米夫定组(LAM组, 17例)和干扰素组(IFN α 2b组, 13例), 所有病例均按标准诊断为慢性乙型肝炎(CHB), 轻度。常规分离外周血单个核细胞, 进一步培养诱导成为HBsAg冲击致敏的DCs及HBsAg特异性CIK细胞, 分别经皮下和静脉回输。另选LAM和IFN α 2b常规治疗作为对照。观察HBV标记物、肝功能的变化和毒副作用, 治疗结束后随访。

结果: 自体HBsAg冲击致敏的DCs及其诱导的HBsAg特异性CIK细胞可促进CHB患者HBeAg和HBV DNA阴转, HBeAg/HBeAb的血清转换, 肝功能的恢复, 疗效高于拉米夫定治疗组($P < 0.05$), 与干扰素治疗组比, 无显著差异($P > 0.05$)。

结论: HBsAg冲击致敏的DCs及其诱导的HBsAg特异性CIK细胞对CHB有治疗作用, 有临床应用前景。

刘树人, 张雁, 谢庆, 李灼亮, 余宙耀, 孔祥平. HBsAg冲击致敏的自体DCs诱导的CIK细胞对慢性乙型肝炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2005;13(7):897-899
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/897.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为机体免疫反应的起动机, 其摄取外源性抗原并通过MHC II类途径递呈给CD4⁺T细胞, 也通过MHC I类途径递呈内化的外源性抗原。DCs能打破机体对多种抗原的免疫耐受, 也在机体对某些抗原免疫耐受的建立过程中发挥重要的作用。此外DCs的作用还与其细胞亚群, 成熟程度有关^[1-2]。有研究显示, 慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染中, DCs表达共刺激分子及MHC II类分子明显低于正常, 同时DCs刺激T淋巴细胞增生和细胞因子分泌的能力亦低于正常, 因此, HBV感染的慢性化与DCs功能缺陷有关^[3-4]。由于DCs功能的缺陷, 进一步造成CTL功能不足, 因而, 形成HBV慢性持续性感染状态。

细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞具有非MHC限制性, 高增生活性, 高细胞毒力以及来源丰富, 回输后副反应少等优点, 在对肿瘤的治疗中已取得了明显的疗效^[5]。为终止HBV的慢性持续性感染状态, 本研究旨在观察HBsAg冲击致敏的DCs所诱导的特异性CIK细胞对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 我科2002-01/2003-12门诊或住院患者, 共23例, 其中男性17例, 女性6例, 平均15 \pm 8.3岁, 按照《病毒性肝炎防治方案》^[6], 诊断为慢性CHB, 患者的平均年龄26.7 \pm 4.3岁, 病程5-21 a。入选前6 mo内未接受免疫调节或抗病毒治疗, 并排除其他肝炎病毒的混合感染或重叠感染, HBsAg, HBeAg, HBV DNA定量检测均为阳性, HBV DNA水平在10⁴copies/mL以上, 肝脏影像学证实为慢性炎症, 少部分病例同时被肝穿刺活检证实。ALT全部异常, 在正常值上限1.5-5.0倍之间;另选同期拉米夫定治疗的患者17例和干扰素治疗的13例作为对照, 三组患者的临床资料(包括治疗前基本情况, 肝功能, 病毒学指标等)均具有可比性($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗 拉米夫定治疗组: lamivudin(LAM, 拉米夫定, 由葛兰素史克公司提供), 0.1 g/d, 口服, 共12 mo。IFN α 2b组: IFN α 2b(商品名, 英特龙, 由中国深圳海王英特龙生物技术股份有限公司提供), 每次500 mU, 隔日肌肉注射, 6 mo。HBsAg冲击致敏的DC所诱导的特异性CIK细胞治疗组: 患者共抽取外周血6次, 每周回输1次, 共12次, 疗程3 mo。

1.2.2 HBsAg冲击致敏的DC及其所诱导的特异性CIK细胞的制备 无菌条件下抽取患者外周静脉血20 mL, 肝素抗凝, 常规分离外周血单个核细胞, 用无血清培养液悬浮, 计数, 调细胞浓度为2 \times 10⁹/L, 将其加入到6孔培养板中, 每孔3 mL, 于37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂, 饱和湿度下孵育2 h, 吸出细胞培养液, 用AIM-V无血清培养液(Gibco Co.)洗涤三次, 将所收信的细胞悬液用作CIK细胞培养。在剩余的黏附贴壁细胞中加入新鲜含1 000 kU/L rhGM-CSF, 500 kU/L rhIL-4(购自美国Peprotech Co.), 1 000 kU/L rhIL-2(美国Pharmingen Co.)的无血清培养液3 mL, 隔日半量换液并添加上述细胞因子, 培养至第7 d时加入HBsAg 20 mg/L(中国深圳康泰生物制品有限公司提供), 12 h后加入TNF α 500 μ g/L, 再培养12 h收集细胞, 将部分细胞用生理盐水洗涤重悬

后, SC^[7], 剩下的细胞用作刺激细胞. 同时, 将前述未贴壁的单核细胞悬液混合, 调细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$, 再加入到培养瓶中, 每瓶 3 mL, 于第 1 d 加入 rhIFN γ 1 000 U/ 10^6 个细胞(美国 Pharmingen Co.), 24 h 后加入 rhIL-2 500 U/ 10^6 个细胞, rhIL-1 100 U/ 10^6 个细胞(美国 Pharmingen Co.), CD3McAb 500 ng/ 10^6 个细胞(中国广州广兴生物工程有限公司), PHA 20 $\mu g/10^6$ 个细胞, 每 2-3 d 扩 1 次瓶, 扩瓶时添加半量培养液, rhIL-2 400 kU/L, PHA10 mg/L, 第 7 d 时收集细胞, 即为 CIK 细胞. 将前述剩余的 HBsAg 冲击致敏的 DC 和 CIK 细胞按 1:10 比例混合, 再加入 HBsAg, rhIL-1, rhIL-2, CD3McAb, PHA (剂量同前), 继续培养, 每 2-3 d 扩瓶 1 次, 至第 7 d 时收集细胞, 即为 HBsAg 冲击致敏的 DC 所诱导的特异性 CIK 细胞. 洗涤后, 生理盐水重悬, 12 h 内静脉输入^[8]. 所有的操作步骤均在百级超净间中进行, 严格无菌操作, 回输时保留细胞洗涤液行无菌试验.

1.2.3 观察项目及随访 (1) 肝、肾功能: 采用美国 Beckman 全自动生化仪及其配套试剂检测; (2) HBsAg, 抗 HBs, HBeAg, 抗 HBe 定量检测采用微粒子酶联免疫法 (MEIA) 检测, 仪器及试剂均由美国 Abbott Co. 提供; (3) HBVDNA 定量检测: 采用 AG-9600 荧光 DNA 分析检测仪, 试剂为美国 Biotronis Co. 提供的荧光标记法 HBV DNA 定量检测试剂盒, 灵敏度为 10^6 copies/L, 检测范围为 10^7-10^8 copies/L. 所有的病例均于治疗前后, 疗程结束后每 2 mo 检查上述项目.

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件, 组间比较用非配对 t 检验, 率的比较用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 HBV 血清标记物的变化 2003-12 随访结束时, 特异性 CIK 治疗组中 15 例 HBeAg 阴转, 7 例出现抗 HBe, 其中 2 例分别于治疗后 3 mo, 7 mo 出现抗 HBs, 再其中有 1 例 HBsAg 和 HBsAb 至今同时阳性; LAM 组 3 例 HBeAg 阴转, 2 例出现 HBeAg/HBeAb 血清转换, 无 1 例出现 HBsAg/HBsAb 血清转换; IFN α 2b 组 5 例 HBeAg 阴转, 3 例出现 HBeAg/HBeAb 血清转换, 1 例出现 HBsAg/HBsAb 血清转换. 特异性 CIK 组与 LAM 组相比, HBeAg 阴转的差别有显著性 ($P < 0.05$), 和 IFN α 2b 组相比, 则无统计学意义 ($P > 0.05$).

2.2 HBV DNA 的变化 三种治疗方法, 均能促进 HBV DNA 阴转, 三组之间无明显不同 ($P > 0.05$), 治疗后 HBV DNA 反跳 (再度阳性) 的例数也无明显差别 ($P > 0.05$). (表 1) 提示三种治疗方法对 HBV 的复制均有抑制作用.

表 1 三种治疗方法对 HBV DNA 的影响

组别	n	HBV DNA(-)(n)	HBV DNA(-)时间(d)	反跳(n)
特异性 CIK 组	23	12	167.5 \pm 56.8	5
LAM 组	17	14	146.8 \pm 29.8	6
IFN α 2b 组	13	5	153.2 \pm 65.2	2

2.3 血清 ALT 的变化 治疗前血清的 ALT 水平, 组间差别无显著意义 ($P > 0.05$), 治疗后, 特异性 CIK 治疗组与 LAM 治疗组比, ALT 复常的差别有显著性 ($P < 0.05$), 但与干扰素组比, 则无显著性. (表 2)

表 2 三种治疗方法对血清 ALT 水平的影响

组别	n	治疗前(正常上限倍数)	治疗后复常(n)	反跳(n)
特异性 CIK 组	23	1.2 \pm 1.7	20 ^a	2
LAM 组	17	1.5 \pm 1.3	8	3
IFN α 2b 组	13	1.6 \pm 1.9	10	2

^a $P < 0.05$ vs LAM 组.

2.4 不良反应 特异性 CIK 细胞治疗组与 IFN α 2b 组相似, 主要为治疗初期出现流感样症状, 脱发, 外周血白细胞轻度减少, 未经特殊处理, 继续治疗过程中均可消失, 未发现过敏、自身免疫性疾病、抑郁和内分泌系统的疾病, 所有患者对治疗的耐受性和依从性良好.

3 讨论

许多研究表明, HBV 感染后慢性化的原因主要与体内 DCs 的成熟障碍和功能缺陷有关^[9]. HBV 感染后, 静止期 DCs 的表型正常, 但其加工、处理和递呈抗原的过程发生障碍, 不能有效诱导 HBsAg 特异性 CTL 反应, 反而产生免疫耐受, 而不是 T 淋巴细胞的耗竭或缺失. 当输入体外激活的 DCs 后, 不仅能产生抗 HBs, 而且能产生 HBsAg 特异性 CTL 反应^[10], 而体外多种细胞因子诱导的杀伤细胞 (CIK 细胞), 具有非 MHC 限制性. 高增生性细胞毒性能力强和来源丰富等特点, 将他与 HBsAg 冲击致敏的 DCs 共同培养, 可以诱导出 HBsAg 特异性 CIK 细胞, 以增强各自的疗效.

根据免疫应答的原理, 我们先将体外 HBsAg 冲击致敏的 DCs 通过皮下注入体内, 使其起到抗原递呈作用, 诱导机体的免疫识别功能, 再将剩余的 DCs 与 CIK 细胞共同培养, 制备 HBsAg 特异性 CIK 细胞, 一方面增强 DCs 的抗原递呈作用, T 淋巴细胞对 DCs 的功能有促进作用; 另一方面增强 CIK 细胞的特异性杀伤功能. 将其回输体内后, 结果表明, HBsAg 冲击致敏的 DCs 联合 HBsAg 特异性 CIK 细胞治疗 CHB, 其疗效比单用 LAM 或干扰素好, HBeAg 阴转率、HBeAg/HBeAb 的血清转换率、HBV DNA 阴转率和血清 ALT 的复常率均高于 LAM 组, 疗效略优于干扰素治疗组 (无统计学意义), 但对 HBsAg 无作用, 同时只有一小部分病例无效或反跳, 显示出较好的临床应用前景.

总之, 我们发现, HBsAg 冲击致敏的 DCs 及其所诱导的 HBsAg 特异性 CIK 细胞疗法能抑制 HBV 的复制, 提高 HBeAg 阴转率和 HBeAg/HBeAb 的血清转换率, 促进肝功能的恢复, 疗效较好. 若能严格控制无菌操作, 则无毒副作用, 不良反应少, 具有临床应用前景, 如若能与其他抗病毒药物联合应用, 则可能进一步提高疗效.