

拉米夫定在慢性乙型肝炎患儿外周血 Th17 细胞变化的研究

陈 端(湖北省黄石市临床检验中心 435000)

【摘要】目的 研究拉米夫定在慢性乙型肝炎(下称慢性乙肝)患儿外周血 Th17 细胞变化的特征及意义。**方法** 选取该院慢性乙肝患儿 45 例作为慢性乙肝组,另选取 23 例健康儿童作为健康对照组。慢性乙肝组患儿给予拉米夫定治疗 1 年。抽取健康对照组、慢性乙肝组治疗前及治疗 1 年后外周静脉血,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)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及外周血中 Th17 细胞特征。**结果** 经拉米夫定治疗,慢性乙肝患儿 ALT、HBV-DNA 载量明显降低,其中 26 例患儿出现 HBV-DNA 转阴,4 例出现 HBeAg 转阴。慢性乙肝组治疗前 Th17 细胞频率明显高于健康对照组($P < 0.05$),经拉米夫定治疗 1 年后外周血 Th17 细胞频率较治疗前显著降低,但仍高于健康对照组($P < 0.05$)。治疗后 HBV-DNA 转阴患儿较未转阴患儿的 Th17 细胞频率明显降低。**结论** 拉米夫定治疗儿童慢性乙肝能有效抑制病毒复制,且可降低患儿外周血中 Th17 细胞的频数。

【关键词】 拉米夫定; 慢性乙型肝炎; 儿童; Th17 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)09-1220-02

Characteristics of Th17 Cells in peripheral blood in paediatric patients with chronic hepatitis B after lamivudine treatment CHEN Duan (Department of the Clinical Laboratory Center of Huangshi City, Huangshi, Hubei 435000, China)

【Abstract】Objective To study the characteristics of Th17 Cells in peripheral blood in paediatric patients with chronic hepatitis B after the treatment of lamivudine. **Methods** Forty five paediatric patients with chronic hepatitis B were enrolled in our study, and twenty-three age-matched healthy children were enrolled as control group. The paediatric patients with chronic hepatitis B were treated with lamivudine for 1 year. HBV markers (HBV-M), HBV DNA loads and ALT levels in serum were detected in the patients before and after lamivudine therapy. The frequencies of Th17 cells in peripheral blood were measured by flow cytometry. **Results** After the treatment of lamivudine, there was a significant decrease in ALT and HBV-DNA levels in aediatric patients with chronic hepatitis B, and in 26 of 45 patients the level of HBV-DNA became negative, in 4 of 45 patients HBeAg became negative. Compared with the control group, the Th17 cells frequencies in peripheral blood were significantly increased in paediatric patients before the treatment of lamivudine ($P < 0.05$). After one year treatment, the Th17 cells frequencies were significantly decreased, but they were still higher than the control group ($P < 0.05$). Besides, the frequencies of Th17 cells were significantly decreased in the patients whose HBV-DNA became negative. **Conclusion** Lamivudine could efficiently suppress HBV replication in paediatric patients, which may have a correlation with the decrease of th17 cells frequencies in peripheral blood.

【Key words】 lamivudine; chronic hepatitis B; paediatric patients; Th17 cells

慢性乙型肝炎(下称慢性乙肝)严重威胁人类健康,是全球性卫生问题。我国每年约有 100 万儿童感染乙型肝炎病毒(HBV),大多转变为慢性感染,并在以后可能发展为肝硬化或肝癌^[1]。儿童时期感染 HBV 较成人更易转变为慢性感染^[2],慢性乙肝已成为儿童时期最主要的慢性肝脏疾病之一^[3],严重影响儿童的身心健康。Th17 细胞是 1 种新型炎性细胞,与体内多种炎性反应密切相关^[4]。因此,本研究通过观察慢性乙肝患儿经拉米夫定治疗前、后及健康对照组的外周血 Th17 细胞频率变化特征,了解拉米夫定治疗期间的炎性反应,为拉米夫定治疗患儿慢性乙肝提供一定的免疫学基础。现将相关情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 9 月至 2013 年 9 月于黄石市中心医院诊断为慢性乙肝患儿 45 例,其中男 24 例,女 21 例;年龄(8.2±2.9)岁。诊断符合 2000 年 9 月修订的病毒性肝炎防治方案标准^[5],所有患儿 HBeAg 阳性。另选择 23 例健康儿童

作为健康对照组,其中男 13 例,女 10 例;年龄(7.7±3.1)岁。所有患儿及健康对照者均无合并其他病毒感染及疾病。

1.2 方法

1.2.1 药物治疗及临床指标检测 慢性乙肝组给予口服拉米夫定 3 mg/kg(最大剂量 100 mg),每天 1 次,治疗时间为 1 年。健康对照组不服用药物。运用酶联免疫吸附法测定慢性乙肝组治疗前、治疗 1 年后 HBV 表面标志物(HBV-M)及丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。并采用 RT-PCR 法检测相应 HBV 核酸定量(HBV-DNA),HBV-DNA 阴性定义为 HBV-DNA < 300 copy/mL。

1.2.2 外周血 Th17 细胞频数检测 采用荧光活化细胞分类法(FACS)检测外周血 Th17 细胞水平。采集慢性乙肝组、健康对照组清晨空腹静脉血,肝素锂抗凝。随后取全血 250 μ L,依次加入 RPMI-1640(含 10% 胎牛血清)、终水平为 300 ng/mL 的 PMA、终水平为 1 μ L/mL 的离子霉素,终体积 1 mL,

37 ℃, 5%CO₂ 细胞培养箱内孵育 6 h。孵育 1 h 后, 添加 1 μL GolgiStop 阻断蛋白质分泌。孵育完毕后 PBS 洗涤去上清液, 依次加入荧光抗体: CD3-APC 3 μL、CD8-Percep 6 μL, 避光孵育 20 min 后加入 10 倍稀释的溶血素 BD FACS Lysing Solution 2 mL, 室温避光 5 min, PBS 洗涤后加入 300 μL BD Fixation/Permeabilization, 4 ℃ 避光孵育 40 min, 随后加入 1 mL 1×BD Perm/Wash Buffer 洗涤, 然后加入 IL17-PE 5 μL 和 IFN-γ-FITC 8 μL, 避光 20 min, 再用 1 mL 1×BD Perm/Wash Buffer 洗涤后用 150 μL 4% 多聚甲醛固定, 4 ℃ 保存, 24 h 内上机检测。应用 FACS Calibur 软件进行分析。

1.3 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。健康对照组与慢性乙肝组间差异比较、治疗后 HBV-DNA 转阴患儿组与 HBV-DNA 仍阳性患儿组间差异比较均采用 Mann-Whitney U 检验; 慢性乙肝组治疗前后差异比较采用 Wilcoxon Signed-Rank 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

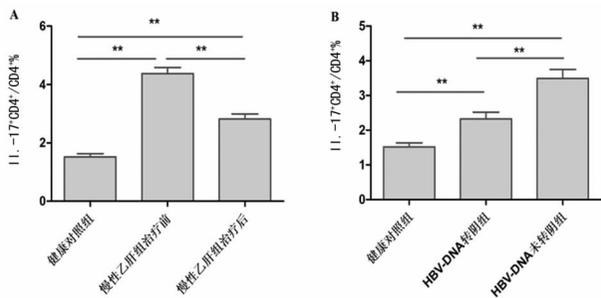
2 结果

2.1 拉米夫定治疗后患儿临床指标变化 应用拉米夫定治疗 1 年后, 所有患儿血清中 HBV-DNA 明显降低, 其中 26 例患儿转阴。患儿 ALT 水平由治疗前 (163.9 ± 78.4) U/L 降至 (65.7 ± 52.9) U/L。在血清学转换方面, 所有患儿在治疗前均为 HBeAg 阳性, 治疗 1 年后 4 例 HBeAg 转阴。见表 1。

表 1 慢性乙肝组治疗前后临床指标变化

组别	ALT (U/L)	HBV-DNA (Ig)	HBV-DNA 转阴(n)	HBeAg 转阴(n)
治疗前(n=45)	163.9±78.4	7.89±0.84	0	0
治疗后(n=45)	65.7±52.9	2.00±0.00	26	4

2.2 拉米夫定治疗后外周血 Th17 细胞变化 治疗前, 外周血中 Th17 细胞频率, 慢性乙肝组 (4.38 ± 1.35)% 高于健康对照组 (1.52 ± 0.55)%。经 1 年拉米夫定治疗, 慢性乙肝组 Th17 细胞频率降低 (2.81 ± 1.91)%, 但仍高于健康对照组 (1.52 ± 0.55)%。治疗后 HBV-DNA 转阴组 (2.32 ± 0.99)% 低于 HBV-DNA 未转阴组 (3.49 ± 1.13)%, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 1。



注: ** P < 0.05。

图 1 外周血 Th17 细胞频率特征

3 讨论

当前用于治疗慢性乙肝的药物有两类: 一类是干扰素 (IFN), 包括普通 IFN 和聚乙二醇干扰素; 另一类是核苷 (酸) 类似物, 包括拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦等。美国食品药品监督管理局已批准拉米夫定用于 3 岁以上患儿的抗病毒治疗^[6], 而我国对 12 岁以下慢性乙肝患儿尚限制使用拉米夫定。近年, 国内已开展大量临床试验观察拉米夫定治疗慢性乙肝患儿临床疗效^[7], 显示效果良好。但关于拉米夫定在有效抑制病毒的过程中是否影响患儿体内的免

疫状态, 目前研究较少。因此, 本研究探讨了慢性乙肝患儿经拉米夫定治疗后外周血 Th17 细胞频率的变化。

此前, 研究人员发现新型 CD4⁺T 细胞亚群, 在分化及功能上与 Th1 和 Th2 细胞明显不同, 以分泌 IL-17 分子为特征, 故命名为 Th17 细胞^[8]。Th17 细胞是炎性细胞, 在介导慢性炎症反应及自身免疫性疾病等方面发挥重要作用。有研究显示, 慢性乙肝患儿体内 Th17 细胞明显增高, 认为是引起肝脏损害的重要因素^[9]。

本研究对 45 例慢性乙肝患儿进行拉米夫定抗病毒治疗, 治疗 1 年后患儿 ALT 水平明显降低, 基本趋于健康值, HBV-DNA 阴转率为 56.78% (26/45), HBeAg 阴转率为 8.89% (4/45), 无明显不良反应, 表明拉米夫定治疗慢性乙肝患儿具有良好效果。本研究显示, 与健康对照组相比, 慢性乙肝组 Th17 细胞明显增高。经 1 年拉米夫定抗病毒治疗后, Th17 细胞频率明显降低, 但仍比健康对照组高; 经治疗出现 HBV-DNA 转阴患儿外周血 Th17 细胞频率较未转阴者明显降低, 以上结果可能是由于拉米夫定抑制病毒复制, 使体内病毒量降低, 从而使体内清除病毒的靶向免疫反应减轻, 从而使治疗后患儿 Th17 细胞降低, 且 HBV-DNA 转阴组 Th17 细胞更低。由于拉米夫定仅能抑制病毒复制, 并不能完全清除病毒 (其对 cccDNA 无作用), 经治疗后患儿体内可能仍存在炎症反应, 因此, 治疗后患儿体内 Th17 细胞频数仍高于健康儿童。

综上所述, 本研究结果显示, 拉米夫定治疗慢性乙肝患儿有效, 在抑制病毒复制的同时, 亦可降低患儿外周血中 Th17 细胞频数, 说明患儿体内炎症反应减轻, 但也可可能削弱机体清除病毒的能力, 远期疗效尚待进一步研究。此外, 提示儿童慢性乙肝的长期治疗可能需要联合其他免疫方法清除病毒。

参考文献

- [1] Chang MH, Chen TH, Hsu HM, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma by universal vaccination against hepatitis B virus: the effect and problems[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(21): 7953-7957.
- [2] Elisofon SA, Jonas MM. Hepatitis B and C in children: current treatment and future strategies[J]. Clinical Liver Disease, 2006, 10(1): 133-148.
- [3] Arora NK, Arora S, Ahuja A, et al. Alpha 1 antitrypsin deficiency in children with chronic liver disease in North India[J]. Indian Pediatrics, 2010, 47(12): 1015-1023.
- [4] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 485-517.
- [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [6] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. Hepatology, 2009, 50(3): 661-662.
- [7] 王化猛, 杨林. 拉米夫定治疗儿童慢性乙型肝炎新进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(1): 77-80.
- [8] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. Current Opinion in Immunology, 2007, 19(6): 652-657.
- [9] 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.