

• 临床论著 •

干扰素治疗对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞端粒酶活性表达的影响

王海燕 朱传武 李明 钱峰 罗湘蓉 朱伟 张雪华 胥萍 吴建鸿

【摘要】 目的 探讨干扰素抗病毒治疗对慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血单个核细胞(PBMCs)端粒酶逆转录酶活性表达的影响。方法 用淋巴细胞分离液分离37例干扰素治疗CHB患者(干扰素治疗组),36例CHB对照患者(患者对照组)和10例健康人(健康对照组)的PBMCs,用Real-time RT-PCR方法定量检测各组PBMCs表达的hTERT mRNA及其相应 β -actin mRNA,计算出标化的hTERT mRNA(NhTERT mRNA)。结果 干扰素治疗12个月时,治疗组PBMCs表达NhTERT mRNA的水平与正常对照组之间无统计学差异,但两组均显著高于患者对照组($P<0.001$; $P=0.001$)。hTERT mRNA的水平与研究对象的年龄、患者基线ALT水平、HBV DNA载量及病毒基因型等均未见显著相关性关系(均为 $P>0.05$),但治疗12个月时,其水平与同期检测的 $CD3^+$ T淋巴细胞计数、 $CD4^+/CD8^+$ 比值均呈显著正相关关系($P<0.05$)。并且发现,在干扰素治疗组中NhTERT mRNA的表达随治疗时间的延长而显著增加,在治疗12个月时获得完全应答的患者组NhTERT mRNA水平显著高于无应答组($P<0.05$)。结论 CHB患者PBMCs端粒酶活性表达低下,干扰素抗病毒治疗可以上调患者淋巴细胞端粒酶活性,这可能是干扰素促进患者免疫功能恢复的一种机制。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性; 干扰素 α ; 外周血单个核细胞; 人端粒酶逆转录酶

Impact of interferon- α therapy on expression of telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B WANG Hai-yan, ZHU Chuan-wu, LI Ming, QIAN Feng, LUO Xiang-rong, ZHU Wei, ZHANG Xue-hua, XU Ping, WU Jian-hong. Department of Hepatology, the Fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou 215007, China

Corresponding author: ZHU Chuan-wu, Email: zhuchw@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the impact of interferon alpha (IFN α) antiviral therapy on the expression of telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** PBMCs were obtained from 37 CHB patients treated with IFN α (IFN α treated group), 36 CHB control patients (CHB control group) and 10 healthy individuals (healthy control group). The quantitation of hTERT mRNA and β -actin mRNA in PBMCs was respectively detected by real-time RT-PCR, and the normalized hTERT mRNA (NhTERT mRNA) was calculated for each sample. **Results** NhTERT mRNA level at 12 months of IFN α treatment was similar to that in healthy control group, but all were significantly higher than that in CHB control group ($P<0.001$ and $P=0.001$, respectively). The expression of NhTERT mRNA was not significantly correlated with subject's age, patient's baseline alanine aminotransferase, HBV DNA load and HBV genotypes, respectively (all $P>0.05$), but the level at 12 months of IFN α treatment was significantly correlated with the count of $CD3^+$ T lymphocytes ($P=0.001$) and the ratio of $CD4^+/CD8^+$ lymphocytes ($P=0.009$) detected during the same period in IFN α treated group. In addition, the mean level was found to be significantly increased with treatment time, and the mean level at 12 months of IFN α treatment in complete response subgroup was remarkably higher than that in non-complete response subgroup ($P<0.05$) in IFN α treated group. **Conclusion** A decreased telomerase activity is expressed in PBMCs of CHB patients, and IFN α therapy can up-regulate its expression, which may be a kind of mechanism for IFN α to improve patient's immune function.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.054

基金项目:江苏省卫生厅科技基金(H200149)

作者单位:215007 江苏省,苏州市第五人民医院肝病科(王海燕、朱传武、李明、钱峰、罗湘蓉、朱伟、张雪华),感染免疫重点实验室(胥萍、吴建鸿)

通讯作者:朱传武, Email: zhuchw@126.com

【Key words】 Hepatitis B, chronic; Interferon alpha; Peripheral blood mononuclear cell; Human telomerase reverse transcriptase

端粒 (Telomere) 是真核细胞染色体末端的重复序列, 随细胞分裂而不断缩短, 与细胞的分裂能力和细胞衰老密切相关^[1]。端粒酶 (Telomerase) 是一种 RNA 依赖性 DNA 聚合酶, 其功能是维持端粒长度, 使细胞获得持久的分裂能力。端粒酶包含两个亚单位, 即: 功能性 RNA 成分 (human telomerase RNA, hTR) 和人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT), hTR 是端粒酶合成端粒的模板, 在端粒酶阴性的细胞中也可表达, 其水平与端粒酶活性无关, 而 hTERT 是端粒酶的催化亚单位, 其表达与端粒酶活性一致^[2], 因此, 检测 hTERT mRNA 的水平可以反映端粒酶的活性。生殖细胞和肿瘤细胞通常具有较高水平的端粒酶活性, 而正常体细胞大多数无端粒酶活性表达^[3-4], 说明端粒酶活性与细胞的分化和发育有密切关系。但在正常体细胞中, 淋巴细胞是少数可以产生较高水平端粒酶活性的细胞^[5], 这对维持端粒长度, 使淋巴细胞保持较高的分化能力具有重要作用, 并可能影响到宿主的免疫功能。如果淋巴细胞端粒酶活性低下, 端粒长度则随着细胞分裂而不断缩短, 导致淋巴细胞衰老, 引起免疫功能低下, 这在人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的研究中已经达到证实^[6-7]。干扰素是免疫促进剂, 可以上调机体的免疫功能, 为探讨干扰素抗病毒治疗与慢性乙型肝炎 (CHB) 患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 端粒酶活性表达的关系, 我们探讨了接受干扰素治疗的患者、未接受治疗的患者以及健康人 PBMCs 端粒酶活性的表达, 以对此进行初步的探讨。

对象与方法

一、对象

研究患者来自于苏州市第五人民医院 2009~2010 年住院的 CHB 患者, 诊断符合 2005 年中国 CHB 防治指南的临床诊断标准^[8]。研究分为 3 组, 即: CHB 干扰素治疗组 (干扰素治疗组), CHB 对照组 (患者对照组) 和健康对照组。干扰素治疗组 37 例, 其中 HBeAg 阳性 CHB 31 例, HBeAg 阴性 CHB 6 例; 患者对照组 36 例, 其中 HBeAg 阳性 CHB 25 例, HBeAg 阴性 CHB 11 例; 健康对照组 10 例, 来自本院肝病科的健康志愿医护人员。干扰素治疗组在治疗前 6 个月内和治疗期间未接受其他免疫调节剂 (包括免疫促进剂或免疫抑制剂) 治疗, 治疗期间也未联合核苷 (酸) 类似物治疗; 患者对照组在标本采集前 6 个月内也未接受任何

免疫调节剂或者核苷 (酸) 类似物治疗。所有患者均排除了甲型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎等病毒重叠感染, 并排除了自身免疫性肝病、药物性肝病、非酒精性脂肪肝和酒精性肝病等肝脏疾病。研究经医院伦理委员会批准, 标本采集时获得所有参与对象的知情同意。

二、实验方法

1. 实验室检测与干扰素治疗: 所有患者入院时均接受了肝功能、肾功能、甲状腺功能、血糖、血细胞、尿液等常规检测, 以及 HBV 血清学标志物、HBV DNA 载量和 HBV 基因型等检测; 干扰素治疗组所有患者在疗程开始和治疗 12 个月时均检测了 T 淋巴细胞亚群。干扰素治疗的方案为: 常规干扰素- $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) 5 MU 肌肉注射, 每日一次, 连续 2 周后改为 5 MU 隔日一次, 疗程 1 年。在治疗期间, 每月检测肝功能和血细胞分析一次, 每 3 个月复测 HBV 血清学标志物和 HBV DNA 载量。

2. 标本采集和 PBMCs 分离: 分别采集 5 ml 研究对象的抗凝外周静脉血, 其中干扰素治疗组的血样采集于干扰素治疗期间的第 6、9 和 12 个月; 患者对照组的血样采集于患者入院后次日。用淋巴细胞分离液分离 PBMCs, 以 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞, 离心后收集细胞储存于 -80°C 冰箱中。

3. 主要试剂: 乙型肝炎病毒血清学检测试剂为 Abbott 公司产品; HBV DNA Taqman 荧光定量 PCR 试剂为上海申友生物技术有限责任公司产品 (最低检测限为 5.0×10^{-2} 拷贝/ml); Real-time PCR-荧光探针 HBV 基因分型试剂为上海之江生物科技有限公司产品; CD3、CD4 和 CD8 荧光标记单克隆抗体为美国 BD 公司产品。BIOZOL 总 RNA 抽提试剂和 hTERT mRNA 荧光定量 RT-PCR 试剂为杭州博日科技有限公司产品; 内对照 β -actin mRNA 荧光定量 RT-PCR 试剂为上海吉玛制药技术有限公司产品。

4. 总 RNA 提取: 按 BIOZOL 试剂说明书操作, 即通过沉淀细胞, 裂解细胞, 分离、沉淀、洗涤和溶解 RNA, 并测定 RNA 的完整性, 最后将抽提好的 RNA 样品储存于 -80°C 冰箱中待检。

5. hTERT mRNA 和 β -actin mRNA 检测: 用 Real-Time PCR 定量检测, 操作按产品说明书进行, 40 个循环反应结束后从 PCR 检测系统中自动获得定量检测数据。根据说明书, hTERT mRNA 的单位为拷贝/ml, β -actin mRNA 的单位为拷贝/ μl 。对 hTERT mRNA 和

β -actin mRNA 的定量值取常用对数, 将每一份样本的 hTERT mRNA 定量检测结果分别进行标准化处理, 获得标化的 hTERT mRNA (normalized hTERT mRNA, NhTERT mRNA), 计算公式为 NhTERT mRNA = (hTERT mRNA 拷贝/ β -actin mRNA 拷贝) $\times 10^{-3}$ 。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 相关性分析用 Spearman 等级相关分析法, 组间均数的比较用独立样本 *t* 检验, 计数资料的比较用卡方检验, 单因素方差分析用 One-Way ANOVA 检验, 以双侧 $P < 0.05$ 作为检验具有统计学差异标准。

结 果

1. 干扰素抗病毒治疗状况: 干扰素治疗组患者均完成了至少 12 个月疗程的抗病毒治疗, 治疗开始阶段均出现程度不等的类流感样症状, 治疗期间患者发生程度不等的白细胞和血小板下降, 少数患者出现 ALT 升高达正常值上限 10 倍以上, 经过适当护肝治疗及干扰素减量处理, 未导致发生干扰素治疗中断的情况。37 例接受干扰素治疗的患者在治疗 12 个月时, 获得的生化学、HBV 血清学和病毒学应答情况是: ALT 恢复正常 (< 40 IU/ml) 者为 28 例, 未恢复正常者 9 例; 31 例 HBeAg 阳性患者中有 19 例出现 HBeAg 转阴, 其中 15 例发生血清学转换 (HBeAg 消失, 抗 HBeAg 转阳); HBV DNA $< 3 \log_{10}$ 拷贝/ml 患者 24 例, $\geq 3 \log_{10}$ 拷贝/ml 患者 13 例。

2. NhTERT mRNA 与年龄、基线 ALT 水平、HBV DNA 载量、T 淋巴细胞亚群和 HBV 基因型的关系: 三组研究对象的基线临床特征见表 1。Spearman 等级相关分析表明, NhTERT mRNA 与所有研究对象年龄的相关系数为 $r = -0.046$, $P = 0.679$, $n = 83$; 与所有患者基线 ALT 的相关系数为 $r = -0.019$, $P = 0.876$, $n = 73$; 与基线 HBV DNA 载量的相关系数为 $r = -0.173$, $P = 0.142$, $n = 73$ 。在所有患者中, 不同 HBV 基因型组别之间 NhTERT mRNA 均值无统计学差异 ($F = 0.183$, $P = 0.142$)。干扰素治疗组 NhTERT mRNA 与治疗 12 个月时 $CD3^+$ T 淋巴细胞的相关系数为 $r =$

0.542 , $P = 0.001$, $n = 37$; 与 $CD4^+/CD8^+$ 比值的相关系数为 $r = 0.424$, $P = 0.009$, $n = 37$ 。

3. 各组 NhTERT mRNA 均值的比较: 我们主要对干扰素治疗组在抗病毒治疗 12 个月时 NhTERT mRNA 的均值与患者对照组和健康对照组进行了比较, 经 One-Way ANOVA 检验分析, $F = 25.113$, $P < 0.001$, 三组之间存在统计学差异。两两分析表明, 干扰素治疗组 NhTERT mRNA 均值与健康对照组相当, 但以上两组均显著高于患者对照组 (表 2)。同时, 我们也比较了干扰素治疗组在治疗 6 个月、9 个月和 12 个月时 NhTERT mRNA 表达的动态变化, 其均值分别为 $(0.969 \pm 0.131) \times 10^{-3}$, $(0.981 \pm 0.124) \times 10^{-3}$ 和 $(1.046 \pm 0.088) \times 10^{-3}$, 发现随干扰素治疗时间的延长 NhTERT mRNA 的表达水平显著增加 ($F = 4.680$, $P < 0.05$, 图 1)。

表 2 各组研究对象 PBMCs 表达 NhTERT mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NhTERT mRNA 均值 ($\times 10^{-3}$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
健康对照组	10	1.042 \pm 0.118		
患者对照组	36	0.857 \pm 0.131	3.688	0.001 ^a
干扰素治疗组	37	1.046 \pm 0.088	0.110	0.913 ^a
			6.723	$< 0.001^b$

注: ^a: 与健康对照组比较; ^b: 与患者对照组比较

4. 干扰素疗效与 NhTERT mRNA 水平的关系: 在干扰素治疗组中, 对 HBeAg 阳性患者, 以获得 ALT 复常、HBV DNA 载量低于 $3 \log_{10}$ 拷贝/ml 和 HBeAg 发生血清学转换作为完全应答标准; 对 HBeAg 阴性患者, 只以获得 ALT 复常和 HBV DNA 载量低于 $3 \log_{10}$ 拷贝/ml 作为完全应答标准, 而将未达到上述标准者作为无应答标准, 据此将患者再分为完全应答组和无应答组, 以进一步探讨干扰素疗效与患者 PBMCs 表达 NhTERT mRNA 的关系。37 例患者中有 18 例获得完全应答, 19 例为无应答者, 其中完全应答组 NhTERT mRNA 的均值为 $(1.013 \pm 0.084) \times 10^{-3}$, 而无应答组为 $(0.948 \pm 0.104) \times 10^{-3}$, 两组间比较存在显著性统计学差异 ($t = 2.090$, $P < 0.05$)。

表 1 三组研究对象的基线临床特征

组别	例数	男	年龄(岁)	HBeAg 阳性	ALT(IU/L)	HBV DNA	HBV 基因型(例)			CD3 细胞($\times 10^9/L$)	CD4/CD8 比值
		[例,(%)]	$\bar{x} \pm s$	[例,(%)]	$\bar{x} \pm s$	(拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)	B 型	C 型	其他	$\bar{x} \pm s$	($\bar{x} \pm s$)
干扰素治疗组	37	25(67.6)	27.3 \pm 6.5	31(83.8)	148.3 \pm 56.5	7.6 \pm 0.81	11	23	3	1.14 \pm 0.283	1.72 \pm 0.478
患者对照组	36	28(77.8)	28.6 \pm 7.0	25(69.4)	132.8 \pm 59.6	7.2 \pm 0.86	8	25	3	1.28 \pm 0.364	1.58 \pm 0.537
健康对照组	10	6(60)	30.6 \pm 5.7								
统计值		$\chi^2 = 1.735$	$F = 1.591$	$\chi^2 = 2.100$	$t = 1.140$	$t = 1.543$	$\chi^2 = 0.633$			$t = 0.982$	$t = 1.097$
<i>P</i> 值		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05			> 0.05	> 0.05

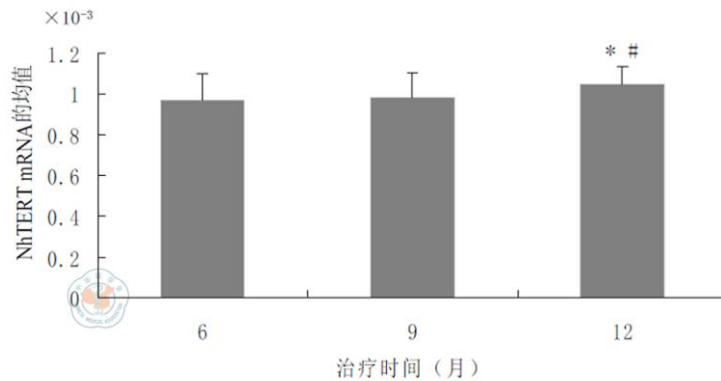


图1 干扰素治疗组在不同治疗时间NhTERT mRNA表达水平的比较。与6个月比较, * $P < 0.05$; 与9个月比较, # $P < 0.05$

讨 论

淋巴细胞是免疫应答中不可或缺的成分, 机体保持足够的淋巴细胞数量对维持正常的免疫功能是非常重要的。在免疫应答期间, 淋巴细胞的增殖水平是正常状况的 $10^5 \sim 10^6$ 倍。正常的体细胞分裂能力有限, 但是, 淋巴细胞是少数可以获得相对持久分裂能力的细胞, 这与细胞端粒的长度有关, 端粒决定了细胞的分裂能力。细胞中端粒的长度在 $5 \sim 15$ kb 之间, 随细胞的分裂而逐渐缩短, 当端粒缩短到一定限度, 将导致染色体不稳定, 引起细胞衰老。淋巴细胞端粒的逐渐缩短是“免疫衰老”的象征^[9]。端粒酶可以合成端粒末端的重复序列 TTAGGG, 因此, 淋巴细胞可通过端粒酶的作用而抵御端粒长度的缩短, 使细胞获得更为持久的分裂和增殖能力。研究证实, 在端粒酶活性高的情况下, 抗原特异性 T 淋巴细胞端粒的长度得以维持^[10]。HIV 感染者 $CD4^+$ T 淋巴细胞 hTERT mRNA 的表达明显下降^[11], 因此导致端粒酶活性不足, 淋巴细胞寿命缩短, $CD4^+$ T 淋巴细胞克隆增殖受限。因此, 从淋巴细胞的研究水平上看, 端粒酶活性与宿主的免疫功能存在着一定的关系。在本研究中, 发现 CHB 患者 PBMCs 表达 NhTERT mRNA 与 $CD3^+$ T 淋巴细胞和 $CD4^+/CD8^+$ 比值呈显著的正相关关系, 而与研究对象的年龄、患者 ALT 水平、HBV DNA 载量及 HBV 基因型未见显著相关性关系。研究结果表明, CHB 患者淋巴细胞端粒酶活性与 T 细胞数量及其免疫调节功能之间存在着密切的关系。

体外研究发现, 用有丝分裂原如植物血凝素 (PHA)、佛波醇乙酯 (PMA)、抗 CD3 抗体或细胞因子 IL-2 等刺激外周血 T 淋巴细胞可以使细胞的端粒酶活性显著增加, 而用氢化可的松刺激 PBMCs, 细胞端粒酶活性则显著下降^[2,12-13]。干扰素是一种重要的免疫调节剂, 可以上调免疫应答, 是目前 CHB 重要的抗

病毒药物之一。在本研究中, 我们发现 CHB 患者对照组 NhTERT mRNA 的水平显著低于健康对照组, 这与 Satra 等^[7]的研究结果是一致的。并且干扰素治疗组 PBMCs 表达 NhTERT mRNA 的水平显著高于患者对照组, 与健康对照组之间未见显著差异。同时发现, PBMCs 表达的 NhTERT mRNA 随干扰素治疗时间的延长而显著增加。根据干扰素治疗 12 个月时的生化学、HBV 血清学和病毒学应答状态分层分析, 发现取得完全应答的患者, NhTERT mRNA 的水平显著高于无应答组, 说明在获得抗病毒治疗应答的患者中, 干扰素促进了机体免疫功能的恢复, 其机制可能与干扰素通过增加淋巴细胞端粒酶活性的表达而上调了宿主的免疫功能有关。

总之, 本研究发现 CHB 患者 PBMCs 端粒酶活性与 T 淋巴细胞数量和免疫调节功能之间存在密切的关系; 患者 PBMCs 表达的端粒酶活性显著低于健康人, 干扰素治疗可以改善, 至少部分恢复 CHB 患者淋巴细胞端粒酶活性表达不足。说明在 CHB 的抗病毒治疗中, 干扰素除通过已知的免疫细胞和免疫分子发挥调节作用以外, 还可以通过上调淋巴细胞端粒酶活性的表达, 使其保持持久的分裂和增殖, 以促进患者获得免疫功能的恢复, 这可能是干扰素上调机体免疫功能的一种尚未被认识的机制。

参 考 文 献

- [1] Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Micr Mol Biol Rev*, 2002, 66: 407-425.
- [2] Matsumura-Arioka Y, Ohtani K, Hara T, et al. Identification of two distinct elements mediating activation of telomerase (hTERT) gene expression in association with cell growth in human T cells. *Int Immunol*, 2005, 17: 207-215.
- [3] Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, et al. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2006, 43: 1284-1294.
- [4] Saini N, Srinivasan R, Chawla Y, et al. Telomerase activity, telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression in hepatocellular carcinoma is independent of hepatitis virus status. *Liver Int*,

2009, 29: 1162-1670.

- [5] Effros RB. Telomerase induction in T cells: a cure for aging and disease? *Exp Gerontol*, 2007, 42: 416-420.
- [6] Reynoso R, Mincos L, Salomon H, et al. HIV-1 infection downregulates nuclear telomerase activity on lymphoblastoid cells without affecting the enzymatic components at the transcriptional level. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, 22: 425-429.
- [7] Satra M, Dalekos GN, Kollia P, et al. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression in peripheral lymphocytes of patients with chronic HBV and HCV infections. *Journal of Viral Hepatitis*, 2005, 12: 488-493.
- [8] 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. *中华肝病杂志*, 2005, 13: 881-891.
- [9] Satyanarayana A, Wiemann SU, Buer J, et al. Telomeres shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J*, 2003, 22: 4003-4013.
- [10] Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M. Telomerase in T lymphocytes: use it and lose it? *J Immunol*, 2007, 178: 6689-6694.
- [11] Franzese O, Adamo R, Pollicita M, et al. Telomerase activity, hTERT expression, and phosphorylation are downregulated in CD4(+) T lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J Med Virol*, 2007, 79: 639-646.
- [12] Haruta Y, Hiyama K, Ishioka S, et al. Activation of telomerase is induced by a natural antigen in allergen-specific memory T lymphocytes in bronchial asthma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259: 617-623.
- [13] Choi J, Fauce SR, Effros RB. Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain Behav Immun*, 2008, 22: 600-605.

(收稿日期: 2013-11-18)

(本文编辑: 马超)

王海燕, 朱传武, 李明, 等. 干扰素治疗对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞端粒酶活性表达的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10619-10623.

