

HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者恩替卡韦治疗中浆细胞样树突状细胞的功能研究

曹卫华^{1,2} 张璐² 陈琦琪² 陆慧慧² 路遥² 吴淑玲² 郝红晓² 常敏² 刘如玉²
高媛娇² 胡蕾苹² 李明慧² 谢尧²

¹北京大学第一医院密云医院 101500; ²首都医科大学附属北京地坛医院肝病二科, 北京 100015

曹卫华和张璐对本文同等贡献

通信作者: 谢尧, Email: xieyao00120184@sina.com, 电话: 010-84322489; 李明慧, Email: wuhm2000@sina.com, 电话: 010-84322284

【摘要】 目的 探讨 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者接受恩替卡韦 (entecavir, ETV) 治疗早期浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) 频数和功能变化与治疗应答的相关性。方法 入组 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染免疫清除期 (immune clearance, IC) 患者。用 ETV 抗病毒治疗, 治疗前、治疗期间每 3 个月监测病毒血清学指标和肝功能 (HBV DNA 载量, HBsAg/抗-HBs, HBeAg 和抗 HBe 水平以及 ALT 水平); ETV 治疗以 HBV DNA 转阴评估疗效。分别在治疗前、治疗 12 周和 24 周, 采集外周静脉血, 流式细胞仪检测外周血 pDC 频数及表面共刺激分子 CD86 定量表达, 分析基线与治疗早期 (12 周和 24 周) pDC 频数和功能变化。结果 收集 100 例慢性乙型肝炎患者中接受 ETV 治疗 45 例完成治疗 48 周随访。ETV 治疗 48 周内, HBsAg 水平下降 0.53 ± 0.78 log IU/ml; HBeAg 下降 816.61 S/CO, 4 例发生 HBeAg 血清学转换; HBV DNA 含量下降 6.04 ± 1.12 log IU/ml, 33 例 (73%) 达检测下线, 43 例 ALT 连续 3 个月以上复常。ETV 治疗早期, pDC% 显著增加, CD86+ pDC%, CD86MFI 和 CD86ABC 无显著变化。ETV 治疗的 HBV DNA 应答者, pDC% 显著增加, CD86+ pDC%、CD86MFI 和 CD86ABC 无显著变化; HBV DNA 无应答者 pDC% 显著增加, 但 CD86+ pDC% 显著下降, CD86MFI 和 CD86ABC 无显著变化。ETV 治疗 HBsAg 和 HBeAg 水平下降与治疗早期 pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI 和 CD86ABC 变化相关不显著。结论 IT 组结果 pDC% 与 ALT 水平呈负相关。ETV 治疗, 可以直接抑制 HBV DNA 的复制, 但不能增强免疫细胞的功能。

【关键词】 浆细胞样树突状细胞; 慢性乙型肝炎; 恩替卡韦; 乙型肝炎病毒

基金项目: 首都临床特色应用研究专项 (Z151100004015122); 北京市医院管理局临床医学发展专项 (XMLX 201706); 国家科技重大专项 (2017ZX10201201-001-006, 2017ZX10201201-002-006); 北京市科技计划 (D161100002716002); 北京市医院管理中心消化内科学科协同发展中心 (XXZ0302, XXT28)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.06.010

Functional study on plasmacytoid dendritic cells in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with entecavir

Cao Weihua^{1,2}, Zhang Lu², Chen Qiqi², Lu Huihui², Lu Yao², Wu Shuling², Hao Hongxiao², Chang Min², Liu Ruyun², Gao Yuanjiao², Hu Leiping², Li Minghui², Xie Yao²

¹Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital Miyun Hospital, Beijing 101500, China;

²Second Division of Liver Center, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Cao Weihua and Zhang Lu are contributed equally to the article

Corresponding author: Xie Yao, Email: xieyao00120184@sina.com, Tel: 0086-10-84322489; Li Minghui, Email: wuhm2000@sina.com, Tel: 0086-10-84322284

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between the frequency and function of early plasmacytoid dendritic cells (pDC) and the treatment response in patients with HBeAg-positive chronic

hepatitis B receiving entecavir (ETV). **Methods** Patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B were enrolled. Antiviral therapy with ETV, serum serological markers of hepatitis B virus (HBV) infection and liver function (HBV DNA load, HBsAg/anti-HBs, HBeAg and anti-HBe levels, and ALT levels) were monitored every three months before and during treatment; the efficacy of ETV was assessed by changes in the level of HBV DNA. Peripheral venous blood was collected before treatment, at 12 weeks and 24 weeks, respectively. Flow cytometry was used to detect the frequency of peripheral blood pDC and the surface co-stimulatory molecule CD86. The baseline and early treatment (12 weeks and 24 weeks) pDC frequency and functional changes were analyzed. **Results** Of the 100 patients with chronic hepatitis B, 45 patients received ETV treatment and 48 weeks of follow-up. Within 48 weeks of ETV treatment, HBsAg levels decreased by 0.53 ± 0.78 log IU/mL; HBeAg decreased by 816.61S/CO, and HBeAg seroconversion occurred in 4 cases; HBV DNA content decreased by 6.04 ± 1.12 log IU/mL, in 33 cases (73%) the HBV DNA became undetectable, in 43 cases ALT kept normal continuously for more than 3 months. In the early stage of ETV treatment, pDC% increased significantly, CD86+ pDC%, CD86MFI and CD86ABC showed no significant changes. In ETV-treated HBV DNA responders, pDC% increased significantly, CD86+ pDC%, CD86MFI and CD86ABC showed no significant changes; HBV DNA non-responders had a significant increase in pDC%, but CD86+ pDC% decreased significantly, and CD86MFI and CD86ABC showed no significant changes. The decrease in HBsAg and HBeAg levels in ETV treated patients was not significantly associated with early pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI and CD86ABC changes. **Conclusions** ETV treatment can directly inhibit the replication of HBV DNA, but does not enhance the function of immune cells.

[Key words] Plasmacytoid dendritic cells; Chronic hepatitis B; Entecavir; Hepatitis B virus

Fund programs: Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z151100004015122); Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of special funding support (No.XMLX201706); National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10201201-001-006 and 2017ZX10201201-002-006); Project of Beijing Science and Technology Commission (D161100002716002); The Digestive Medical Coordinated Development Center of Beijing Hospitals (XXZ0302 and XXT28)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.06.010

HBV 感染机体后,宿主免疫、肝细胞和病毒之间相互作用是一个动态过程,宿主免疫应答介导的病毒清除和肝脏炎症损伤在临床结局中发挥重要作用;在慢性乙型肝炎中,宿主的免疫反应是以炎症反应为特点,长期炎症的存在导致肝纤维化和肝硬化的发生。pDC 作为固有免疫的重要组成部分,在慢性乙型病毒感染、慢性乙型肝炎的发生、病毒的清除和感染的恢复中起着至关重要的作用。核苷类似物治疗慢性 HBV 感染时,核苷(酸)类似物通过其直接抑制病毒复制的作用,通过与内源性底物的竞争性结合或通过掺入病毒 DNA 中起链终止剂的作用,发挥强效抗病毒作用,仅直接抑制病毒复制,并不能够增强免疫细胞的功能^[1-2]。该研究为了观察患者接受恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗早期 pDC 频数和功能变化与治疗应答的相关性。

1 材料与方法

1.1 患者 自 2014 年 10 月份至 2017 年 2 月份共连续入组来自首都医科大学附属北京地坛医院的 100 例 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者。所有患者诊断标准符合病毒性肝炎防治方案^[3]。慢乙肝免疫清除期(IC):HBsAg 阳性和 HBeAg 阳性至少 6 个

月,HBV DNA(+),ALT \geq 190U/L,且至少有 3 个月以上的 ALT 异常史,或肝脏组织病理学检查显示有明显的炎症坏死。排除标准:梅毒、艾滋抗体阳性者,合并 HCV、HDV 等其他病毒感染者,伴有其他肝脏疾病者(脂肪肝,自身免疫性肝病,酒精性肝病,肝脏代谢性疾病,肝纤维化,肝硬化以及肝癌)。该研究已通过首都医科大学附属北京地坛医院伦理委员会审核;每位患者均已获得知情同意。

1.2 细胞表型染色及流式细胞仪分析 用 Lineage1-FITC, HLA-DR-PerCP, CD123-APC 和 CD86-PE 四种抗体检测 pDC、CD86 + pDC,并用 FlowJo7.6 计算 CD86MFI。

1.3 临床指标 (ALT、HBeAg、HBsAg 和 HBV DNA) 检测 患者每 3~6 个月检测病毒学指标及生化指标,血常规等,这些指标均由首都医科大学附属北京地坛医院检验科提供,采用日立全自动生化分析仪检测肝功能;HBsAg、HBeAg 采用 Abbott 微粒化学发光试剂检测;采用实时荧光 PCR(试剂购自上海复兴公司)或罗氏 CobasAmpliPrep/CobasTaq Man96 全自动实时荧光定量 PCR 检测试剂检测血清 HBV DNA 含量。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计

分析,所有数据均以均数±标准差(mean±SEM)或中位数、四分位数间距(median(Q1, Q3))或 box-and-whisker plots 呈现,利用 GraphPad Prism 5 分析。组内比较用 Wilcoxon 检验,多组间两两比较用 Mann-Whitney U 检验。变量的相关性分析采用线性回归分析。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性乙型病毒性肝炎患者各指标基线特征

本研究共入组慢乙肝清除期患者 100 例,平均年龄 31(20~53),男性所占比例 63%,女性所占比例 37%。根据患者对治疗方案的优先级选择,其中有 45 例患者接受 ETV 治疗并完成 48 周治疗随访,其中男性占 63%(59/93),女性占 37%(34/93),平均年龄 31 岁(20~53 岁)。ETV 治疗 48 周,HBsAg 下降幅度(0.53 ± 0.78),HBeAg 下降幅度(816.61),其中 4 例患者发生 HBeAg 血清学转换,HBV DNA 载量下降幅度(5.94 ± 1.12),33 例(73%)患者获得 HBV DNA 应答(HBV DNA 转阴),43 例(96%)患者的 ALT 连续 3 个月以上处于正常水平。

2.2 ETV 抗病毒治疗前 pDC 各项参数与 HBV 病毒学特征的相关性分析

在治疗前,对 pDC 频数及表面共刺激分子 CD86 表达和 HBV 病毒学特征进行相关性分析,研究结果显示 pDC 频数与 HBV DNA 载量,HBsAg 以及 HBeAg 水平无相关性。另

外,本研究还发现 CD86+ pDC 频数与 HBV DNA 载量,HBsAg 和 HBeAg 水平之间,CD86MFI 与 HBV DNA 载量,HBsAg 和 HBeAg 水平,以及 CD86ABC 与 HBV DNA 载量,HBsAg 和 HBeAg 水平均没有相关性,如图 1 所示。

2.3 ETV 治疗早期 pDC 频数和功能的变化

在 ETV 治疗组,本研究发现,虽然与治疗前相比较,治疗 12 周和 24 周 pDC 频数显著升高,而治疗 12 周与 24 周相比较,pDC 频数并没有显著性增加(见图 2 A);但是,CD86+ pDC 频数在治疗前后无显著变化(见图 2B);CD86MFI 治疗前、治疗 12 周和 24 周相比较均差异无统计学意义在治疗前后无显著变化(见图 2C);CD86ABC 在治疗前后差异无统计学意义(见图 2D)。

2.4 ETV 治疗期间的 pDC 功能和治疗应答

在 ETV 治疗早期,HBsAg 和 HBeAg 水平的变化与 pDC 频数和功能的变化没有相关性。本研究结果显示,在 HBV DNA 应答组,与治疗前相比较,pDC 频数在治疗 12 周($P<0.001$)和 24 周($P<0.001$)均显著地增加(见图 3 A);CD86+ pDC 频数在治疗 12 周和 24 周与治疗前比较无显著性差异,如图 3B 所示;CD86MFI 在治疗前后相比较亦没有显著性变化(见图 3C);CD86ABC 在治疗前后亦无显著性变化(见图 3D)。然而,本研究探讨 ETV 治疗疗效与 pDC 细胞的关系,以 ETV 治疗 48 周时 HBV DNA 转阴情况

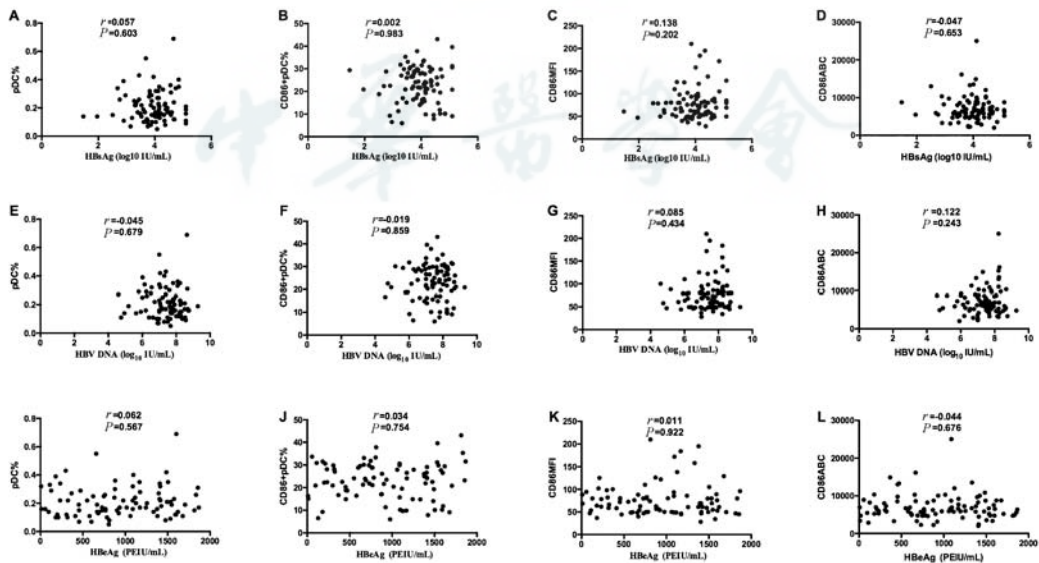
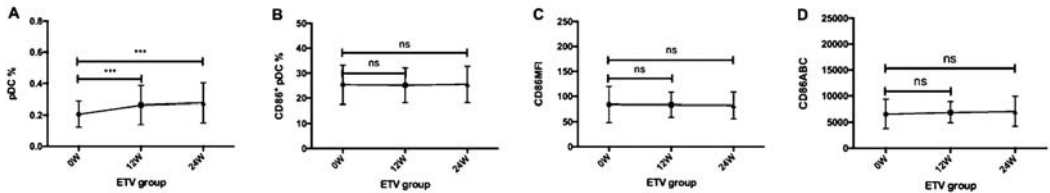


图 1 pDC 频数及表面共刺激分子 CD86 表达(pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI 和 CD86ABC)与病毒学指标(HBsAg, HBeAg 和 HBV DNA)之间的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis between pDC frequency and surface costimulatory molecule CD86 expression (pDC%, CD86+ pDC%, CD86 MFI and CD86 ABC) and virological indicators (HBsAg, HBeAg and HBV DNA)

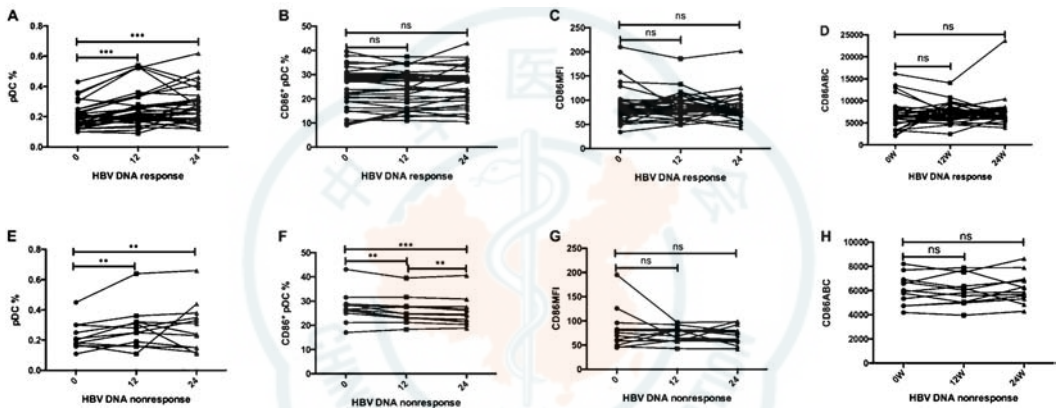


注:pDC 频数及功能包含 pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI 和 CD86ABC。*** $P < 0.001$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, ns: 差异无统计学意义

图 2 恩替卡韦治疗组,治疗前和治疗 12 周和 24 周的 pDC 频率和功能的变化趋势图

Notes: pDC frequency and function included pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI and CD86ABC. *** $P < 0.001$, $P < 0.05$ indicates statistically significant difference, ns: no statistically significant difference

Fig.2 Tendency in the frequency and function of pDC before treatment and at 12 and 24 weeks of treatment in the ETV treatment group



注:pDC 频数及功能包含 pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI 和 CD86ABC。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义, ns: 差异无统计学意义

图 3 恩替卡韦治疗中,治疗前和治疗 12 周、24 周,HBV DNA 应答组和 HBV DNA 无应答组的 pDC 频数和功能的变化趋势的分析图

Notes: pDC frequency and function included pDC%, CD86+ pDC%, CD86MFI and CD86ABC. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $P < 0.05$ indicates statistically significant difference, ns: no statistically significant difference

Fig.3 Tendency in pDC frequency and function in HBV DNA response and HBV DNA non-response groups before and at 12 and 24 weeks of treatment with ETV

为依据分组^[3],在 HBV DNA 无应答组,pDC 频数在治疗 12 周和 24 周较治疗前显著增加(12 周 vs 基线, $P = 0.025$; 24 周 vs 基线, $P = 0.03$),如图 3E 所示;CD86+ pDC 频数在治疗 12 周($P = 0.026$)和 24 周($P = 0.005$)与基线相比较均显著下降,治疗 24 周较 12 周显著降低($P = 0.036$)(见图 3F);CD86MFI 在治疗前后无显著性变化(12 周 vs 基线, $P = 0.353$; 24 周 vs 基线, $P = 0.355$),如图 3G 所示;CD86ABC 在治疗前后无显著性变化(12 周 vs 基线, $P = 0.747$; 24 周 vs 基线, $P = 0.606$)(见图 3H)。

3 讨论

宿主对病毒及其蛋白的免疫应答在决定 HBV 感染的临床转归中起至关重要的作用。多项研究报道,在慢性 HBV 感染中,pDC、NK 以及 CD4+ T 细胞

和 CTL 这些效应细胞的功能受损^[4],HBV 特异性 T 细胞功能缺陷不足以清除 HBV,致使 HBV 长期存在,进展为慢性化^[5]。pDC 不仅是固有免疫应答的触发点,而且也是适应性免疫反应的激活因子,作为天然免疫应答与获得性免疫应答之间的桥梁^[6]。多项研究表明,pDC 是人体抗病毒免疫的主要效应细胞^[7]。树突状细胞识别并递呈病毒抗原给 T 细胞,活化 NK 细胞及 T 细胞同时产生 TNF- α , IL-8 和 pro IL-10 等大量促炎性细胞因子,促进炎症反应发生,DC 分泌的 IL-12 诱导 T 细胞分化为 HBV 特异性 Th1 细胞,促进 CTL、NK 细胞的活化,发挥细胞毒作用,肝细胞受损,炎症的发生^[8]。

目前,核苷(酸)类似物被广泛用于慢性乙型肝炎的抗病毒治疗。本研究显示,ETV 治疗中仅 HBV DNA 载量下降显著并且 HBeAg 血清学转换率低,

这是因为 ETV 仅通过抑制 HBV 逆转录酶活性从而抑制病毒逆转录,达到抑制病毒复制的目的,表现为外周血 HBV DNA 含量下降,ETV 对抑制 HBV cccDNA 的转录,因此,不能引起病毒抗原的下降,而只能抑制 HBV 的复制^[9]。

理论上讲,有效的抗病毒治疗应该可以诱导 pDC 功能的增强^[3-5]。本研究结果显示,在接受 ETV 治疗的患者中,pDC 细胞频数增加,而 CD86+ pDC 频数、CD86MFI 和 CD86ABC 没有显著增加,因为 ETV 具有直接抑制病毒复制作用^[9],HBV 复制被 ETV 有效抑制后,炎症反应得到有效控制,参与炎症反应的免疫细胞减少,则血液中 pDC 频数相对增加;还可能是 ETV 有效抑制病毒复制,肝脏中病毒载量减少,由于趋化作用进入肝脏的 pDC 减少,因此外周血检测到 pDC 频数增加;ETV 治疗中,HBsAg 和 HBeAg 下降并不明显,HBsAg 和 HBeAg 仍然处于高水平,有研究表明高水平的 HBsAg 和 HBeAg 对 pDC 功能具有抑制作用^[10-11],另外 ETV 仅具有抑制病毒复制的作用,并不能增强免疫细胞的功能^[9],因此 CD86+ pDC 频数、CD86MFI 和 CD86ABC 没有显著增加。

本研究还发现,在 ETV 治疗的患者中,HBV DNA 应答组 CD86+ pDC 频数、CD86MFI 和 CD86ABC 均无显著改变,但在 HBV DNA 无应答组,CD86+ pDC 频数在治疗后显著下降,表明可能 HBV DNA 未转阴与 pDC 功能的下降相关,ETV 仅抑制病毒复制,HBV DNA 无应答组 CD86+ pDC 频数显著下降,则说明 pDC 功能不如应答组 pDC 功能,所以 HBV DNA 转阴的患者少;本研究结果还表明 HBV 病毒抗原水平与 pDC 功能没有相关性,因为 ETV 抗病毒治疗仅抑制病毒复制,不能提升免疫,也不能诱导干扰素的产生,核苷类似物对 HBsAg 和 HBeAg 没有直接作用,因此 pDC 功能不会发生显著变化。本研究仍存在一定局限性,病例数有限,将来会增加病例数进一步研究。以上数据表明仅仅抑制 HBV 复制可能不足以恢复免疫细胞的活性,因此需要干扰素和核苷(酸)类似物的联合治疗^[12]。

作者贡献声明 曹卫华、张璐:论文撰写;陈琦琪、陆慧慧、路遥、吴淑玲、郝红晓、常敏、刘如玉、高媛娇、胡蕾苹:病例收集、数据分析;李明慧、谢尧:研究设计、指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] Polaris Observatory C. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. *The Lancet. Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(6): 383-403. DOI: 10.1016/S2468-1253(18)30056-6.
- [2] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1560-1599. DOI: 10.1002/hep.29800.
- [3] 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版). 中华肝病杂志 [J]. 2015, 23(12): 888-905. DOI: 10.3760/cna.j.issn.1007-3418.2015.12.002.
- [4] Woltman AM, Den Brouw MLO, Biesta PJ, et al. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15324. DOI: 10.1371/journal.pone.0015324.
- [5] Zhang Z, Zhang H, Chen D, et al. Response to interferon- α treatment correlates with recovery of blood plasmacytoid dendritic cells in children with chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(6): 751-759. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.07.019.
- [6] Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 1183(1): 89-103. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x.
- [7] Lan S, Wang X, Wu L, et al. Hepatitis B virus e antigen (HBeAg) may have a negative effect on dendritic cells maturation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(2): 742-749. www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0018918.
- [8] Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 311: 17-58. DOI: 10.1007/3-540-32636-7_2.
- [9] Chang TT, Gish RG, de Man R, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(10): 1001-1010. DOI: 10.1056/NEJMoa051285.
- [10] Faure-Dupuy S, Lucifora J, and Durantel D. Interplay between the hepatitis B virus and innate immunity: From an understanding to the development of therapeutic concepts [J]. *Viruses*, 2017, 9(5): E95. DOI: 10.3390/v9050095.
- [11] Li MH, Zhang L, Zhang D, et al. Plasmacytoid Dendritic Cell Function and Cytokine Network Profiles in Patients with Acute or Chronic Hepatitis B Virus Infection [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(1): 43. DOI: 10.4103/0366-6999.221275.
- [12] Viganò M, Invernizzi F, Grossi G, and Lampertico P. The potential of interferon and nucleos(t)ide analogue combination therapy in chronic hepatitis B infection [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44(7): 653-661. DOI: 10.1111/apt.13751.

(收稿日期:2019-07-02)

(本文编辑:陈培莉)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突