

## 慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前后外周血 CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞的变化

黄 燕, 谭德明, 彭敏源

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**[摘 要]** **目的** 研究慢性乙型肝炎(乙肝)患者经聚乙二醇干扰素和阿德福韦抗病毒治疗前后外周血 CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞(Treg)的变化情况。**方法** 慢性乙肝患者 35 例,其中聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a(40 KD)治疗(干扰素组)18 例,阿德福韦酯治疗(阿德福韦组)17 例;另收集肝炎病毒标志物阴性,肝功能正常的健康志愿者 12 例作对照。采集两治疗组治疗前及治疗 12、24、48 周时的外周血单个核细胞(PBMC),以流式细胞技术检测 CD4 + CD25 + Treg 细胞/PBMCs 的百分比,并分析其与血清丙氨酸转氨酶(ALT)、乙肝病毒(HBV)DNA 的相关性。**结果** Treg/PBMCs 的百分比,干扰素组和阿德福韦组在治疗前分别为  $(3.72 \pm 1.15)\%$  和  $(3.63 \pm 1.02)\%$ ,与正常对照组  $(2.47 \pm 0.90)\%$  相比,差异均有显著性( $t$  分别为 2.51、2.48,均  $P < 0.05$ )。干扰素组经治疗后,CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例逐渐下降,治疗 12、24、48 周时的比率分别为  $(2.87 \pm 0.76)\%$ 、 $(2.75 \pm 0.72)\%$  和  $(2.51 \pm 0.69)\%$ ,与治疗前相比,差异均有显著性( $t$  分别为 2.41、2.58、2.95,  $P$  分别  $< 0.05$ 、 $< 0.05$ 、 $< 0.01$ )。阿德福韦组经治疗后,CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例与治疗前相比,差异无显著性( $P > 0.05$ )。CD4 + CD25 + Treg 细胞与 ALT 的变化呈正相关( $r = 0.52, P < 0.01$ ),而与 HBV DNA 无明显的相关性( $r = 0.25, P > 0.05$ )。**结论** 慢性乙肝患者外周血 CD4 + CD25 + Treg 细胞升高,聚乙二醇干扰素抗病毒治疗能改善患者的免疫功能状态,降低 CD4 + CD25 + Treg 细胞比例;而阿德福韦抗病毒治疗对 CD4 + CD25 + Treg 细胞无影响。

**[关键词]** 肝炎,乙型,慢性;肝炎病毒,乙型;调节性 T 细胞;聚乙二醇干扰素;阿德福韦

**[中图分类号]** R512.6<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)06-0380-05

## Characteristics of circulating CD4 + CD25 + regulatory T cells in chronic hepatitis B patients accepting antiviral therapy

HUANG Yan, TAN De-ming, PENG Min-yuan (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the characteristics of circulating CD4 + CD25 + regulatory T cells (Treg) in chronic hepatitis B (CHB) patients accepting peginterferon alfa-2a and adefovir therapy. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 35 patients with CHB were collected at baseline and week 12, 24 and 48 treatment. Eighteen patients were treated with peginterferon alfa-2a (40 KD) (PEGASYS®) and 17 patients were treated with adefovir dipivoxil (ADV). Twelve healthy volunteers with normal liver function and negative hepatitis virus markers were as controls. The proportion of CD4 + CD25 + Treg/PBMC were analyzed using flow cytometry. The correlation between Treg and serum alanine transaminase(ALT) or HBV DNA was also analyzed. **Results** The proportion of Treg/PBMC in PEGASYS®-treatment group and ADV-treatment group before treatment were  $(3.72 \pm 1.15)\%$  and  $(3.63 \pm 1.02)\%$  respectively, which were significantly higher than that  $(2.47 \pm 0.90)\%$  in healthy controls ( $t = 2.51, 2.48$ ; both  $P < 0.05$ ). In PEGASYS® group, the proportion of CD4 + CD25 + Treg at week 12, 24 and 48 treatment were  $(2.87 \pm 0.76)\%$ ,  $(2.75 \pm 0.72)\%$  and  $(2.51 \pm 0.69)\%$  respectively, which significantly decreased than that of baseline ( $t = 2.41, 2.58, 2.95$ ;  $P < 0.05, < 0.05, < 0.01$ ). No significant changes in CD4 + CD25 + Treg were found in ADV-treatment group before and after treatment ( $P > 0.05$ ). A strong correlation was observed between the change in ALT level and the proportion of CD4 + CD25 + Treg ( $r = 0.52, P < 0.01$ ). No correlation

**[收稿日期]** 2009-08-06

**[作者简介]** 黄燕(1973-),女(汉族),江苏省张家港市人,副主任医师,主要从事感染与免疫学研究。

**[通讯作者]** 谭德明 E-mail: dmt2008@yahoo.com.cn

was found between the change in HBV DNA and CD4 + CD25 + Treg ( $r = 0.25, P > 0.05$ ). **Conclusion** The level of peripheral blood CD4 + CD25 + Treg in CHB patients is higher than that in healthy controls. PEGASYS® antiviral treatment can decrease the proportion of CD4 + CD25 + Treg, while ADV antiviral treatment has no influence on CD4 + CD25 + Treg.

[**Key words**] chronic hepatitis B; hepatitis B virus; regulatory T cells, peginterferon alfa-2a, adefovir dipivoxil

[Chin Infect Control, 2009, 8(6): 380-383, 412]

CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是近年来发现的一种新型免疫抑制性调节细胞,也是目前所发现的最重要的专职免疫抑制性调节细胞,与多种疾病的发生密切相关。慢性乙型肝炎(乙肝)患者存在免疫功能紊乱,Stoop 等<sup>[1]</sup>报道慢性乙肝患者外周血 Treg 细胞数量较正常人增多,认为 Treg 细胞可引起免疫反应下降,造成慢性感染。但亦有不同的报道<sup>[2-3]</sup>。本研究将通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和流式细胞技术检测慢性乙肝患者外周血 Treg 细胞数量和抗病毒治疗后的变化情况,以进一步阐述抗病毒治疗对患者免疫功能状态的影响。

## 1 材料与方法

表 1 治疗组和对照组的一般情况及临床资料(平均值)

Table 1 The general condition and clinical data of treatment and control group (average value)

组别	例数	性别(男/女,例)	年龄(岁)	白细胞( $\times 10^9/L$ )	血小板( $\times 10^9/L$ )	ALT(U/L)	HBV DNA(拷贝/mL)
干扰素组	18	13/5	30	5.20	181	124	$2.47 \times 10^8$
阿德福韦组	17	13/4	31	5.40	174	145	$3.92 \times 10^8$
对照组	12	9/3	33	5.50	179	31	-

1.2 主要试剂与仪器 溶血素、鞘液购自美国 BD 公司,荧光标记鼠抗人单抗(CD4-PE、CD25-FITC)购自美国 BioLegend 公司;流式细胞仪(FACSCalibur),为美国 BD 公司产品。

1.3 免疫荧光标记和流式细胞分析 采集乙肝患者和对照组肝素抗凝血 2 mL,淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC),PBS 洗涤 2 次,取约  $1 \times 10^5$  个细胞加入 CD4-PE、CD25-FITC 各 10  $\mu$ L,室温避光孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次,10 g/L 多聚甲醛每管 200  $\mu$ L 固定重悬,同时设立同型对照。以 FACSCalibur 流式细胞仪检测标本,CELLQuest 软件分析结果。结果以 CD4 + CD25 + Treg 细胞/PBMCs 来评价。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间定性资料对比采用  $\chi^2$

1.1 一般资料 慢性乙肝患者 35 例,为本院感染病科 2007 年 5—10 月的门诊患者。其中男性 26 例,女性 9 例;年龄 18~42 岁,平均 31 岁。所有患者诊断均符合 2000 年 9 月西安全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的“病毒性肝炎防治方案”标准。阿德福韦治疗组(阿德福韦组)17 例,每天口服阿德福韦酯 10 mg;聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a 治疗组(干扰素组)18 例,肌内注射派罗欣 180  $\mu$ g,每周 1 次。检测治疗前及治疗 12、24、48 周时患者的血清丙氨酸转氨酶(ALT)、乙肝病毒(HBV)DNA、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(抗 HBe)和 Treg 细胞水平。两治疗组患者均为 HBeAg 阳性,起始 ALT 水平和 HBV DNA 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。另收集肝炎病毒标志物阴性,肝功能正常的健康志愿者 12 例作对照。

检验,两组间比较采用配对  $t$  检验,相关分析采用 Pearson 相关检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 抗病毒治疗后干扰素组和阿德福韦组临床指标变化 两组患者均完成 1 年的治疗,干扰素组 ALT 复常率 77.78% (14/18),HBeAg 血清学转换率 33.33% (6/18),有 3 例(16.67%)HBV DNA 完全转阴,平均 HBV DNA 下降 3.23 lg;阿德福韦组 ALT 复常率 82.35% (14/17),1 例(5.88%)发生 HBeAg 血清学转换,6 例(35.29%)HBV DNA 转阴,平均 HBV DNA 下降 3.91 lg。两组 ALT 复常率和 HBV DNA 下降的 lg 数相比,差异均无显著性( $P > 0.05$ ),但干扰素组的 HBeAg 血清学转换率较

阿德福韦组显著增高( $P < 0.001$ )。

2.2 慢性乙肝患者抗病毒治疗前后外周血 Treg 细胞的数量和比率 干扰素组和阿德福韦组在治疗前 CD4 + CD25 + Treg 细胞/PBMCs 的百分比分别为(3.72 ± 1.15)%和(3.63 ± 1.02)%，与正常对照组(2.47 ± 0.90)%相比，差异均有显著性(均  $P < 0.05$ )。干扰素组治疗后 CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例逐渐下降，12、24、48 周时的比率分别为(2.87 ± 0.76)%、(2.75 ± 0.72)%和(2.51 ± 0.69)%，与治疗前相比，差异均有显著性(分别  $P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$ )；但治疗 12 周和治疗 24 周相比，差异无显著性( $P > 0.05$ )，见表 2 与图 1。阿德福韦组治疗后 CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例有所下降，12、24、48 周时的比率分别为(3.29 ±

1.01)%、(3.15 ± 0.65)%、(3.11 ± 0.86)%，但与治疗前的差异无显著性(均  $P > 0.05$ )，见表 2。

表 2 抗病毒治疗前后 CD4 + CD25 + Treg 细胞/PBMCs 的比率变化(%)

Table 2 The proportion of peripheral blood CD4 + CD25 + Treg/PBMCs before and after antiviral treatment(%)

组别	治疗前	治疗 12 周	治疗 24 周	治疗 48 周
干扰素组	3.72 ± 1.15 <sup>1)</sup>	2.87 ± 0.76 <sup>2)</sup>	2.75 ± 0.72 <sup>3)</sup>	2.51 ± 0.69 <sup>4)</sup>
阿德福韦组	3.63 ± 1.02 <sup>5)</sup>	3.29 ± 1.01 <sup>7)</sup>	3.15 ± 0.65 <sup>8)</sup>	3.11 ± 0.86 <sup>9)</sup>
对照组	2.47 ± 0.90 <sup>6)</sup>	-	-	-

1)与6)比较,  $t = 2.51, P = 0.02$ ; 5)与6)比较,  $t = 2.48, P = 0.02$   
 1)与2)比较,  $t = 2.41, P = 0.03$ ; 1)与3)比较,  $t = 2.58, P = 0.02$ ;  
 1)与4)比较,  $t = 2.95, P = 0.009$ ; 2)与3)比较,  $t = 0.89, P = 0.4$   
 7)与5)比较,  $t = 1.29, P = 0.21$ ; 8)与5)比较,  $t = 1.53, P = 0.15$ ;  
 9)与5)比较,  $t = 1.78, P = 0.10$

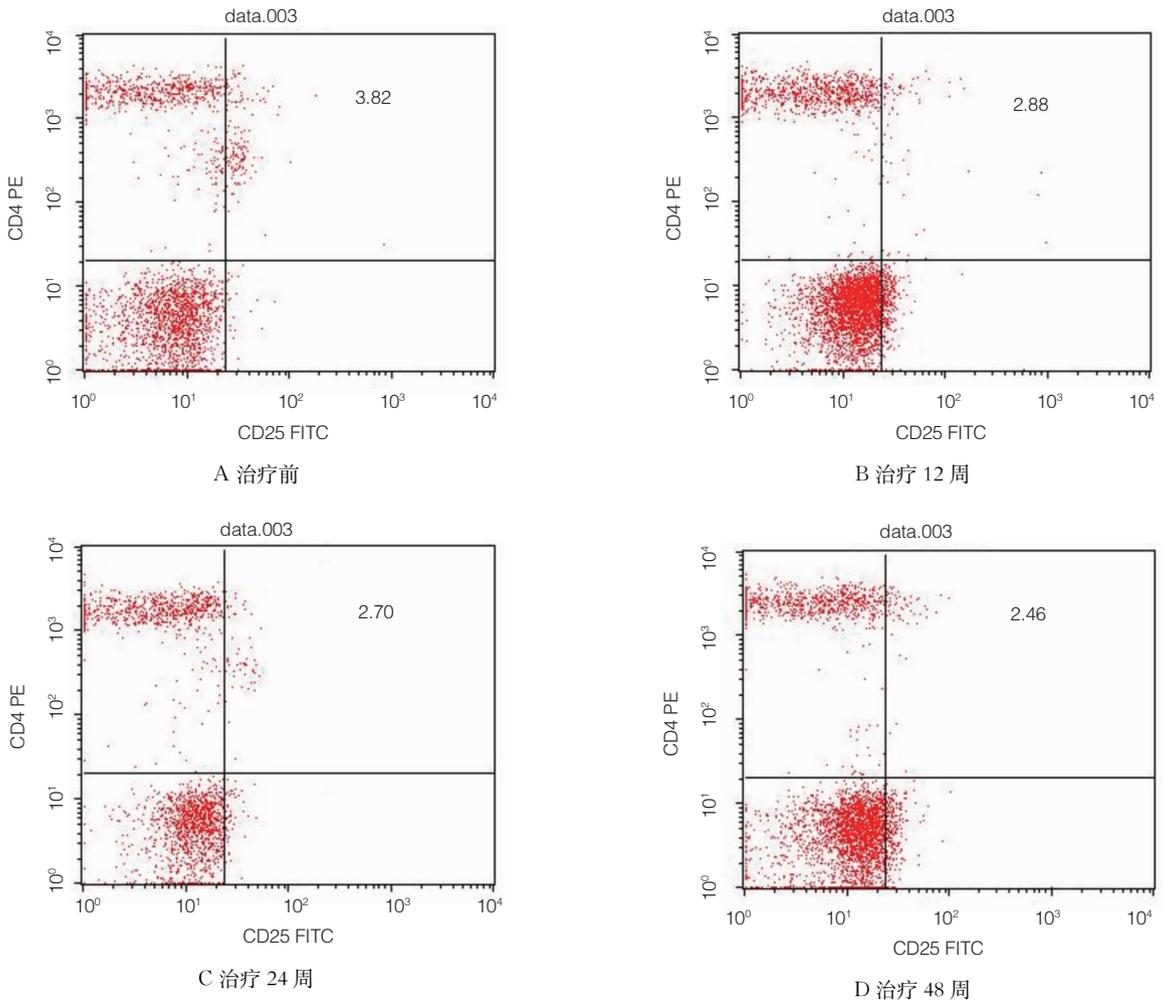


图 1 慢性乙肝患者干扰素治疗前后 CD4 + CD25 + Treg 细胞变化情况

Figure 1 The proportion of peripheral blood CD4 + CD25 + Treg in PEGASYS®-treatment group

2.3 干扰素治疗组 Treg 细胞数量与 ALT 和 HBV DNA 的关系 CD4 + CD25 + Treg 细胞占 PBMCs 的百分比与 ALT 的变化呈正相关( $r =$

0.52,  $P < 0.01$ )，而与 HBV DNA 水平的变化，未发现明显的相关性( $r = 0.25, P > 0.05$ )。

### 3 讨论

慢性乙肝发病机制复杂,为多种因素的综合作用,其中异常的免疫反应起了重要作用。已经证实 HBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和 CD4 + 辅助性 T 淋巴细胞是 HBV 感染控制的基础,但慢性 HBV 感染者不能对病毒产生足够的细胞免疫。近年来,CD4 + CD25 + Treg 细胞在 HBV 感染慢性化中的作用受到广泛关注,对于慢性乙肝患者中 CD4 + CD25 + Treg 细胞数量是否增加以及和 HBV 复制之间的关系仍存在争议。Stoop<sup>[1]</sup> 研究小组发现慢性 HBV 感染者外周血 CD4 + CD25 + Treg 细胞频率较正常增高,且 HBeAg 阳性患者的 CD4 + CD25 + Treg 细胞频率明显高于 HBeAg 阴性患者。而 Franzese 等<sup>[2]</sup> 检测后发现,免疫耐受患者、慢性活动性乙肝患者及无症状 HBV 携带者的 CD4 + CD25 + Treg 细胞数量与健康对照之间无明显统计学差异。国内学者亦有类似的报道<sup>[3]</sup>。本研究小组发现 CD4 + CD25 + Treg 细胞在慢性乙肝患者中的频率较健康对照组增高,并且频率与血清病毒载量呈正相关,这与 Stoop 等的报道<sup>[1]</sup> 相一致。病毒复制越活跃的患者,其体内 CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例越高,说明机体可能通过 CD4 + CD25 + Treg 细胞的免疫抑制效应促进了病毒的复制。提示 CD4 + CD25 + Treg 细胞水平可能是导致乙肝患者免疫耐受的原因之一,使得 HBV 不能有效清除,导致感染慢性化。

干扰素(IFN)- $\alpha$  是目前治疗慢性乙肝的主要药物之一,具有广谱抗病毒和免疫调节两方面的作用。其可抑制病毒 DNA 复制和 RNA 合成,促进病毒 RNA 降解,抑制病毒蛋白的合成、转运及病毒颗粒的成熟和分泌,能促进人类白细胞抗原 I、II 类分子的表达及增强 CTL、抗原提呈细胞(APC)和自然杀伤(NK)细胞等的活性。有关干扰素与 T 调节细胞的研究,目前报道较少。本研究发现干扰素治疗组患者的 CD4 + CD25 + Treg 细胞比例和绝对计数均随治疗时间的延长而下降。这可能与干扰素治疗增强 CD8 + 细胞毒性 T 细胞反应,上调 CTL 细胞的产生并增强 Th1 反应有关<sup>[4]</sup>。在抗肿瘤免疫中,IFN- $\gamma$  具有抑制 CD4 + CD25 + Treg 细胞的产生和活化作用<sup>[5]</sup>,而 IFN- $\alpha$  能促进 T 细胞和 DC2 细胞表达 IFN- $\gamma$ 。CD25(interleukin-2 receptor  $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ ) 是 Treg 细胞区别于其他 T 细胞的表面标志,白细胞介素(IL)-2 在 Treg 细胞保持免疫耐受过程中起

到关键性作用,CD4 + CD25 - T 细胞活化转录产生 IL-2 基因并分泌 IL-2 蛋白,通过 IL-2 的负反馈保持免疫应答的动态平衡<sup>[6]</sup>。IL-2 是 Th1 细胞因子,干扰素治疗后增强的 Th1 反应可能反馈抑制了 Treg 细胞的数量和功能。有关其确切的作用机制有待进一步研究。

在阿德福韦治疗组,治疗后 CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例虽有所下降,但无统计学差异,这与阿德福韦的抗病毒作用主要是直接抑制病毒复制,而无免疫调节作用有关。但 Stoop 等报道<sup>[7]</sup>,阿德福韦抗病毒治疗能降低乙肝患者外周血中 CD4 + CD25 + Treg 细胞的比例,恢复其部分免疫应答。这可能与选择的病例不同有关。本研究阿德福韦治疗组病毒载量较高,抗病毒效果欠佳,而 Stoop 研究组病毒载量相对低,抗病毒治疗效果较好。但阿德福韦的用药疗程一般在 2 年以上,继续追踪阿德福韦组患者的外周血 CD4 + CD25 + Treg 细胞数量变化,可能会得出有意义的结论。

总之,本研究显示,慢性乙肝患者存在 CD4 + CD25 + Treg 细胞异常,而干扰素治疗能改善患者的免疫功能状态,其抗病毒作用部分与抑制 CD4 + CD25 + Treg 细胞的功能和数量有关;阿德福韦的抗病毒作用与 CD4 + CD25 + Treg 细胞无关。对于慢性 HBV 感染者,通过减少或抑制 CD4 + CD25 + Treg 细胞来诱导病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应,进而控制其病毒感染可能是一种重要的免疫治疗策略<sup>[8]</sup>。

### [参考文献]

- [1] Stoop J N, van der Molen R G, Baan C C, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Hepatology*, 2005, 41(4):771-778.
- [2] Franzese O, Kennedy P T, Gehring A J, *et al.* Modulation of the CD8 + T cell response by CD4 + CD25 + regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection [J]. *J Virol*, 2005, 79(6):3322-3328.
- [3] 福军亮,徐东平,赵平,等. 急慢性乙型肝炎患者外周血调节性 T 细胞鉴定与临床意义分析[J]. *中华内科杂志*, 2006, 86(22):1522-1525.
- [4] Tang T J, Kwekkeboom J, Mancham S, *et al.* Intrahepatic CD8 + T lymphocyte response is important for therapy induced viral clearance in chronic hepatitis B infection [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1):45-52.

显著。尤其值得注意的是,护士组对职业暴露预防措施得分率,无论在活动前(71.15%)还是活动后(77.71%)均远远超过医生组(23.26%、41.72%)。说明护士在临床工作中,已具有较强的预防职业暴露的意识,并能正确掌握和运用相关预防措施,防止职业暴露的发生。而医生组在活动后对职业防护知识类的其他 2 项“正确使用防护用品”及“职业暴露后处置”的认知率与活动前相比均无明显变化。可见,职业不同,对医院感染控制知识关注点也不同。医院感染知识培训应根据不同人群及其薄弱环节,有针对性地进行。

手卫生作为预防医院感染最简便、有效的方法,正在全世界范围内引起广泛重视。但目前我国医务人员手卫生依从性仍不高。有调查显示,80.34%的医务人员在连续诊疗操作时,既不洗手也不使用手消毒剂<sup>[2]</sup>。本调查中,我院医务人员对“手卫生指征”的认知率在活动前后均是所有项目中最高的,这与国内其他报道<sup>[3]</sup>相近;而“手卫生基础知识”的认知率则在所有项目中最低,尤其对手部病原体传播特点及手卫生原理知晓甚少,但活动后认知率增高程度则最为显著。对于世界卫生组织(WHO)“手卫生指南”推荐使用速干手消毒剂进行手消毒<sup>[4]</sup>知晓者亦较少。这可能是由于我们手卫生培训时较多关注于手卫生指征和具体操作,忽略了对手卫生原理等相关基础知识的宣教。当医务人员深入理解了手卫生与医院感染的关系时,必将对进一步提高手卫生依从性产生促进作用。

在本次“感控周”活动中,针对志愿者将在活动中承担的工作,在活动前专门对志愿者就活动主题相关的医院感染知识进行了培训。活动期间,志愿者轮流在现场服务,促使他们的医院感染知识得到

不断强化。问卷调查结果显示,尽管培训前志愿者组的医院感染知识认知率明显低于其他科室医务人员,但活动后其认知率提高幅度最大,且明显高于其他科室组。而其他科室医务人员由于参与程度不一,收效则不同。如内科组活动前后比较,认知率无明显变化。由此可见,即使开展了“感控周”活动,也应采取多种方法,确保尽可能多的医务人员参与,否则难以达到预期效果。

本次调查还发现,“感控周”活动对于不同年资的医务人员医院感染知识认知率影响是不同的。工作年限 $\geq 11$ 年组虽然活动前认知率最低,但活动后其认知率最高,提高最为显著。说明高年资医务人员虽未经系统培训,但由于在长期工作中具有丰富的医院感染控制感性认识,从“感控周”活动中获得大量信息后,能迅速正确地掌握医院感染知识,其认知程度大大提升。这提示我们,在加强对新职工医院感染知识岗前培训的同时,也应高度重视对在职职工持续进行多种形式医院感染预防与控制知识教育,使其及时更新医院感染控制知识,适应医疗新技术发展的需要。

#### [参考文献]

- [1] Zhang M, Wang H, Miao J, *et al.* Occupational exposure to blood and body fluids among health care workers in a general hospital, China[J]. *Am J Ind Med*, 2009, 52(2):89-98.
- [2] 陈萍,刘丁,成瑶,等. 医务人员医院感染控制知识调查分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2008, 7(3):210-211.
- [3] 左改珍,虞德才,陈义芬,等. 实习护士医院感染知晓率调查分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2005, 4(4):381-382.
- [4] WHO. Guidelines on hand hygiene in health care[R]. 2005.
- [5] Nishikawa H, Kato T, Tawara I, *et al.* IFN-gamma controls the generation and activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in antitumor immune response [J]. *J Immunol*, 2005, 175(7): 4433-4440.
- [6] Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, *et al.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin(IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5):723-735.
- [7] Stoop J N, van der Molen R G, Kuipers E J, *et al.* Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B [J]. *Virology*, 2007, 361(1):141-148.
- [8] Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, *et al.* Depletion of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells(Tregs) enhances the HBV-specific CD8<sup>+</sup>T cell response primed by DNA immunization [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(24): 3772-3777.

(上接第 383 页)