

慢性乙型肝炎患者DC/CIK体外经HBsAg活化后自体回输的疗效和对机体免疫的影响

韩际奥 杨丽 王志凌 韩莉 王郁杰 马英杰

【摘要】 目的 研究慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血来源的树突状细胞(DC)和细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)自体回输治疗的疗效和对机体免疫的影响。**方法** 95例CHB患者随机分为3组,即A组(33例),行DC/CIK治疗;B组(22例),行核苷酸类抗病毒治疗;C组(20例),未进行抗病毒治疗。用CHB外周血培养和扩增DC和CIK,成熟前给予HBsAg刺激。自体静脉回输(DC/CIK细胞数量 $10^9/100\text{ ml}$),1次/3 d,共3次。各组均于治疗前、治疗后第1、3、6、12个月分别检测肝功能、HBV DNA、IFN- γ 、IL-4和IL-12水平。其中IFN- γ 、IL-4和IL-12均采用双抗体夹心ELISA法进行检测。**结果** 治疗前各组患者病毒载量无显著差异。治疗各阶段B组患者血清HBV DNA水平均低于A组和C组患者(P 均 < 0.001);A组患者治疗后3、6个月时病毒载量显著下降(P 均 < 0.05)。各组患者治疗前后ALT和TBil水平差异无统计学意义。治疗后1个月, A组患者血清IL-12水平显著高于B组和C组($9.32 \pm 2.07\text{ pg/ml}$ vs $6.96 \pm 2.17\text{ pg/ml}$, $9.32 \pm 2.07\text{ pg/ml}$ vs $7.32 \pm 2.36\text{ pg/ml}$, $P < 0.05$),其他时间阶段各组比较, IL-12水平差异无统计学意义。各组患者之间血清IFN- γ 、IL-4水平差异均无统计学意义。**结论** DC/CIK细胞治疗对HBV有一定的抑制作用;推测DC/CIK细胞治疗对辅助T细胞的失衡无显著影响。

【关键词】 肝炎, 乙型, 慢性; 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞

Evaluation of dendritic cells and cytokine-induced killer cells activated by HBsAg efficacy in patients with chronic hepatitis B HAN Ji-ao, YANG Li, WANG Zhi-ling, HAN Li, WANG Yu-jie, MA Ying-jie. Institute of Liver and Gastrointestinal Diseases of Zhengzhou; Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: MA Ying-jie, Email: mayingjie19@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the efficacy and changes of cytokine levels of transfusion of autologous dendritic cells (DC) and cytokine-induced killer cells (CIK), which were activated by HBsAg for patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Total of 95 CHB patients were selected and divided into group A ($n = 33$, treated with DC/CIK), group B ($n = 22$, nucleotide antiviral therapy) and group C ($n = 20$, with no antiviral treatment). DC and CIK cells were cultured and amplified from peripheral blood of CHB patients. DC was stimulated with pure HBsAg in cell culture medium prior to maturation. And 100-150 ml normal saline containing DC/CIK (10^9) and serum albumin (2%) were infused over 50-60 minutes through a forearm vein, once every three days, totally three times. HBV DNA, biochemical indicators of liver (ALT, TBil) and cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-12) levels in patients were measured before and after 1, 3, 6 and 12 months of treatment. ELISA was applied to detect the levels of IFN- γ , IL-4 and IL-12. **Results** After all stages of treatment, the HBV DNA load in group B were significantly lower than those in group A and group C ($P < 0.05$). After treatment for 3 and 6 months, the HBV DNA load in group A significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of ALT and TBil showed no significant difference among group A, B and C before and after treatment. The serum IL-12 level in group A was higher than that of group B and C ($9.32 \pm 2.07\text{ pg/ml}$ vs $6.96 \pm 2.17\text{ pg/ml}$, $9.32 \pm 2.07\text{ pg/ml}$ vs $7.32 \pm 2.36\text{ pg/ml}$; $P < 0.05$) at a month after treatment, which was not statistically significant in other phases. The levels of IFN- γ , IL-4 were not significantly different among group A, B and C at each stage. **Conclusions** Transfusion

of autologous DC/CIK cells activated by HBsAg had some effects of inhibition of viral replication to patients with CHB.

It is suggested that DC/CIK treatment did not improve Th1/Th2 abnormal status in patients with CHB.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Dendritic cells; Cytokine-induced killer cells; Cytokines

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 疗效欠佳最主要原因是宿主的免疫缺陷及肝细胞核内有稳定的ccc DNA存在。近年来, 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cell, CIK) 的研究进展为乙型肝炎的治疗开辟了广阔的前景, 有望在清除慢性肝炎病毒的治疗中发挥更重要的作用^[1]。本研究通过观察HBsAg活化的DC/CIK自体回输治疗CHB的疗效及患者血清IFN- γ 、IL-4和IL-12水平变化, 探讨DC/CIK细胞过继免疫对机体免疫的影响。

资料与方法

一、研究对象

选取本院消化内科2011年4月至2011年10月住院的CHB患者共95例, 诊断符合依照《慢性乙型肝炎防治指南》(2010版) 诊断标准^[1]。所有患者均排除甲型、丙型、丁型和戊型肝炎等病毒重叠感染以及其他原因 (酒精、药物等) 所引起的肝脏损害, 纳入研究对象前均未接受其他抗病毒药物治疗及免疫调节剂治疗, 签署知情同意书。

随机将入组患者分为3组: A组: 接受DC/CIK细胞过继免疫治疗的患者, 共33例, 其中男性18例, 女性15例, 平均年龄31.2 (20~45) 岁; B组: 接受核苷 (酸) 类药物抗病毒治疗患者, 共22例, 其中男性11例, 女性11例, 平均年龄35.3岁 (31~51); C组: 未进行抗病毒治疗患者, 共20例, 其中男性11例, 女性9例, 平均年龄28.5 (19~56) 岁。

二、主要试剂和检测方法

采用双抗体夹心ELISA法检测血清IL-12、IL-4和IFN- γ 水平。每孔加入100 μ l标准品或待测样品, 用酶标测定仪以波长492 nm测定各孔A值。以标准孔数值绘制标准曲线, 根据待测样品孔所测得的A值, 在标准曲线上查得样品中IL-12、IL-4和IFN- γ 的含量。

IL-12试剂盒为深圳晶美生物工程有限公司产品, IFN- γ 和IL-4试剂盒为长沙科泰科技有限公司产品。HBsAg定量检测采为安图绿科生物工程有限公司LUMO发光仪及相关试剂盒进行。Becton Dickinson流式细胞仪, CKX41型倒置相差显微镜, HBV DNA检测采用Mx3000P型实时荧光定量PCR仪检测。

三、治疗方法

各组患者均给予常规保肝降酶治疗。A组患者接受DC/CIK细胞治疗, 以血细胞分离机分离外周血单个核细胞, 血液流速为50~60 ml, 循环处理总血量约4000~6000 ml, 分类持续时间约2 h, 收集量约100 ml。健康人在无菌条件抽取外周血100 ml。对倍稀释再加入淋巴细胞分离液 (1:1), 2000 r/min、20 min (离心半径 $r = 16$ cm)。离心后吸出位于血浆层与分离液层之间的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 层。洗涤2次, 依次以1800 r/min、1200 r/min, 各离心5 min。离心后弃上清液, 用AIM-V培养液调整细胞浓度为 $(4 \sim 5) \times 10^6$ /ml, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养2 h。

收集非贴壁细胞诱导扩增CIK细胞: 用AIM-V培养基调细胞浓度为 1.5×10^6 /ml并加入干扰素, 置培养箱培养24 h后加入白细胞介素 (IL-2和IL-1)、抗-CD3单克隆抗体, 继续置于培养箱中培养。以后每隔3 d换液1次, 补充IL-2, 调整细胞浓度始终为 1.5×10^6 个/ml。

剩余贴壁细胞诱导扩增DC: 加入AIM-V培养液及细胞因子 (GM-CSF、IL-4) 置于培养箱培养。第3天半量换液1次并补充细胞因子, 加入HBV表面抗原 (HBsAg, 浓度为1000 ng/ml) 继续培养。第6天收集和CIK按1:5混合, 以含有IL-2的AIM-V培养液继续培养48 h, 将DC-CIK悬液一分为二, 一半DC-CIK悬液以1000 r/min离心5 min, 弃上清, 以5倍体积生理盐水重悬混匀, 再以1000 r/min离心5 min (离心半径 $r = 16$ cm) 弃上清, 再以5倍体积生理盐水漂洗2遍, 弃上清后以含2%人血白蛋白的生理盐水100~150 ml重悬混匀。注入一次性采血袋中, 以封口机封口。另一半添加等量含有2000 U/ml IL-2的AIM-V继续培养, 以备第二、三次DC-CIK回输用。经前臂静脉自体回输, 整个回输过程持续约50~60 min, 共进行3次, 每次间隔2 d, 每次给予细胞数量 $> 1 \times 10^9$ 。

四、临床观察指标

各组均于治疗前、治疗后第1、3、6、12个月采集患者空腹血清, 送医院中心实验室统一检测HBV DNA、HBsAg、肝脏生化指标、IFN- γ 、IL-4和IL-12水平。观察、记录细胞输注后24 h内患者体温等生命体征及随访期间的不良事件。

五、统计学处理

应用SPSS 11.5软件进行统计学分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 率采用百分比表示, 同一患者治疗前后比较采用配对 t 检验。治疗组和对照组计量资料比较采用 t 检验, 三组率的比较采用 χ^2 检验, 三组之间数据比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组患者治疗后HBV DNA水平

各组患者治疗前HBV DNA载量差异无统计学意义($F = 0.571$, $P = 0.567$); 治疗3个月和6个月时, A组患者病毒载量显著下降($t = 3.178$, $P = 0.002$; $t = 4.389$, $P = 0.000$)。以治疗3个月为评估节点、以病毒载量下降 $\geq 2 \log_{10}$ 拷贝/ml发生为病毒学应答, 三组患者应答率分别为54.5% (18/33)、95.4% (21/22)和5% (1/20)。三组患者病毒学应答率差异具有统计学意义($\chi^2 = 34.474$, $P = 0.000$), 见表1。

二、肝功指标变化

三组患者治疗前均存在不同程度肝功能异常, ALT均值分别为(184.2 ± 106.1) U/L、(199.1 ± 118.6) U/L和(176.8 ± 110.5) U/L; TBil均值分别为(39.2 ± 9.5) $\mu\text{mol/L}$ 、(43.7 ± 11.5) $\mu\text{mol/L}$ 和(29.2 ± 4.8) $\mu\text{mol/L}$ 。治疗1个月后复查, 三组患者ALT均值分别为(39.4 ± 6.3) U/L、(34.1 ± 8.3) U/L和(36.8 ± 53.5) U/L; TBil均值分别为(22.5 ± 2.9) $\mu\text{mol/L}$ 、(23.7 ± 1.5) $\mu\text{mol/L}$ 和(22.3 ± 2.8) $\mu\text{mol/L}$; 三组患者治疗前后ALT和TBil水平, 差异均无统计学意义(t 分别为 -0.484 和 1.594 , P 均 > 0.05)。

三、三组患者IFN- γ 、IL-4和IL-12水平的变化

治疗后1个月细胞治疗组患者(A组)血清IL-12水平显著高于核苷(酸)类抗病毒治疗组(B组)和未抗病毒治疗组(C组)($9.32 \pm 2.07 \text{ pg/ml}$ vs $6.96 \pm 2.17 \text{ pg/ml}$, $t = 4.155$, $P = 0.000$; $9.32 \pm 2.07 \text{ pg/ml}$ vs $7.32 \pm 2.36 \text{ pg/ml}$, $t = 3.381$, $P = 0.001$), 治疗后其他阶段各组差异无统计学意义。IFN- γ 和IL-4水平在阶段、各组之间差异均无统计学意义, 见图1~3。

四、不良反应

细胞治疗组(A组)中有2例患者输注DC-CIK后出现发热, 分别为 37.9°C 和 38.4°C , 予以对症治

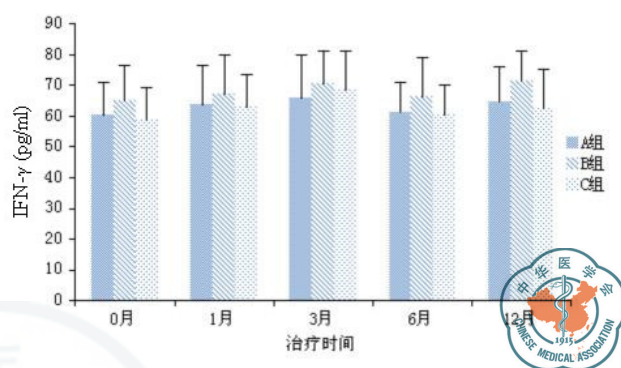


图1 各组患者治疗前后血清中IFN- γ 水平

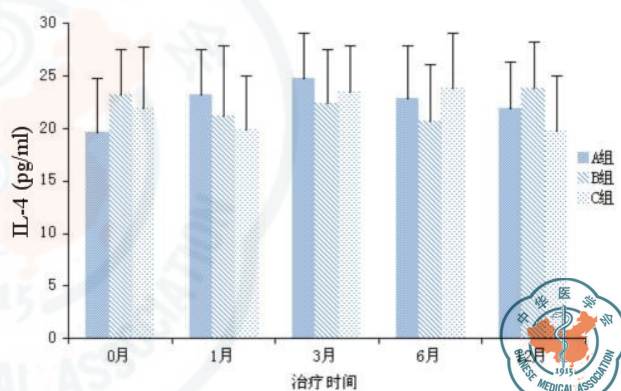


图2 各组患者治疗前后血清中IL-4水平变化情况

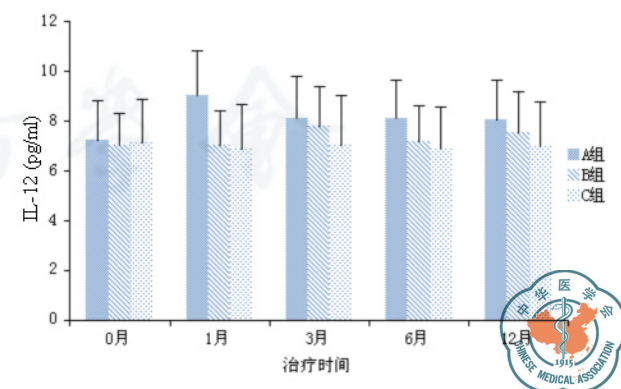


图3 三组患者治疗前后外周血IL-12的含量

表1 各组患者治疗前后HBV DNA的水平 (\log_{10} 拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前 ^a	治疗1个月	治疗3个月 ^b	治疗6个月 ^c	治疗12个月
A组	33	6.84 ± 1.36	6.52 ± 2.29	5.79 ± 2.04	5.29 ± 1.77	5.23 ± 2.15
B组	22	6.95 ± 2.68	4.52 ± 1.95	3.45 ± 1.35	3.52 ± 2.95	2.55 ± 1.62
C组	20	6.54 ± 2.41	6.55 ± 2.56	6.32 ± 2.85	6.48 ± 3.25	6.50 ± 3.12

注: A组: 细胞治疗组; B组: 核苷(酸)类抗病毒治疗组; C组: 未抗病毒治疗组; ^a: 三组患者相比, $F = 0.571$, $P = 0.567$; ^b: 三组患者相比, $t = 3.178$, $P = 0.002$; ^c: 三组患者相比, $t = 4.389$, $P = 0.000$

疗后体温恢复正常。

讨 论

特异性细胞免疫是清除机体内病毒的重要机制,针对HBV各类抗原表位的CTL及DC参与的细胞毒效应在清除HBV过程中起着主要作用^[3-4]。DC是机体内最重要、功能最强的抗原递呈细胞,DC捕获HBV后,处理加工成抗原多肽,递呈给CD4⁺T、CD8⁺T细胞。CD8⁺T活化、识别感染HBV的肝细胞表达的抗原肽并结合、溶解肝细胞而引起肝细胞溶解或凋亡^[5];CD4⁺T细胞活化及增殖分化,分泌细胞因子(IFN- γ 、TNF- α 和IL-12等),促进Th0向Th1发展,Th1细胞产生的Th1因子具有中和HBV的作用,并在T细胞的增殖活化尤其是在促进CTL的杀伤活性、介导细胞免疫应答及机体抗病毒效应中发挥重要作用。DC亦活化NK、抗体依赖性细胞毒性细胞(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)对HBV感染的肝细胞起破坏作用^[6]。CHB患者存在DC数量和功能缺陷、T细胞无能状态、辅助T细胞(Th)1和Th2细胞失衡,以及细胞因子IFN- γ (主要是Th1细胞分泌)、IL-4(主要由Th2细胞分泌)和IL-12(主要由ABC细胞分泌)的异常。这些缺陷导致HBV持续慢性感染并与病毒复制有关^[7-8]。但在乙型肝炎的免疫调节网络中,T淋巴细胞亚群、DC异常的因果关系和受损机制并不甚清楚^[9]。

CHB外周循环中的HBsAg不能引起完全的免疫应答。有研究报道在体外用病毒相关抗原冲击致敏DC后再注入自体,部分病例能有效抑制HBV复制并降低血清病毒量,清除HBeAg及促进HBeAg/抗-HBe血清学转换^[10]。从CHB外周血中分离出来的病毒特异性T淋巴细胞大部分已经失去了增殖和产生细胞因子的能力。体外诱导特异性杀伤细胞对清除HBV具有一定作用。CIK细胞是单个核细胞在体外用多种细胞因子共培养而获得的一群异质细胞,兼有T淋巴细胞强大的抗癌、抗病毒活性。苏海滨等^[11]研究报道,应用CIK细胞治疗14例慢性乙型肝炎患者并随访52周后结果显示,HBV DNA低于检测下限的比率为42.86%(6/14);HBeAg阴转和(或)抗-HBe阳转率为42.86%(6/14);治疗前ALT > 100 U/L者11例,HBeAg血清学转换率为54.55%(6/11),未发现严重不良反应。Marten等^[12]将外周血来源的CIK细胞和同源DC细胞共培养一段时间后,发现DC和CIK细胞的增殖能力明显增强。

慢性HBV感染的细胞免疫治疗是一种很有前

途的治疗策略。但慢性HBV感染者DC本身存在的缺陷是否能通过体外培养和刺激而得到修饰,恢复正常功能,目前尚存在很大争议^[13-14]。本课题组前期研究发现健康人DC表面标志CD1a、CD80及CD83显著高于CHB患者,但HLA-DR阳性率CHB患者与健康人无显著差异^[15]。健康人DC、CIK的表面标志阳性率、共培养上清液中的IL-12浓度、对HepG2.2.15细胞的杀伤率均显著高于CHB。在健康人HBsAg致敏的DC、CIK细胞标志阳性率、共培养上清液中的IL-12浓度、对HepG2.2.15细胞的杀伤率均明显提高,而在CHB仅见DC、CIK对HepG2.2.15细胞的杀伤活性显著高于未经HBsAg致敏。提示CHB来源的DC、CIK免疫活性低于健康者,并且其缺陷难以通过体外修饰而得到完全纠正。

本研究中,细胞治疗组(A组)患者3、6个月时病毒载量显著下降。核苷(酸)类抗病毒治疗组患者(B组)各阶段血清HBV DNA下降幅度均高于细胞治疗组(A组)和未抗病毒治疗组(C组);各组患者ALT水平比较无显著性差异。治疗后1个月细胞治疗组(A组)血清IL-12水平高于未抗病毒治疗组(C组)和核苷(酸)类抗病毒治疗组(B组),其他阶段各组差异无显著性。IFN- γ 、IL-4在各阶段、各组患者之间差异有统计学意义。提示细胞治疗对HBV有一定的抑制作用。细胞治疗组(A组)血清IL-12水平在治疗1个月时高于未抗病毒治疗组(C组)和核苷(酸)类抗病毒治疗组(B组),短期的血清IL-12水平升高可能与输注体外诱导单个核细胞分泌的细胞因子有关。未发现细胞治疗对患者血清IFN- γ 和IL-4水平有影响。推测短期的DC-CIK自体静脉回输治疗对机体的免疫系统失衡状态无明显改善,此结果与既往文献中报道HBsAg负载DC细胞治疗慢性乙型肝炎患者血清Th1/Th2失衡可得到改善不同^[16],故DC-CIK细胞治疗的临床疗效尚需进一步观察。

参 考 文 献

- 1 Michel ML, Deng Q, Mancini-Bourgine M. Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges. *J Hepatol*, 2011, 54(6):1286-1296.
- 2 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2010年版更新版. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(1):50-60.
- 3 Lu XY. Pathogenesis of Hepatitis B virus (HBV) mediated liver injury. *N Am J Med Sci*, 2011, 4(1):1-6.
- 4 Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4):258-266.

- 5 徐公民. 慢性乙型肝炎患者免疫状态变化规律研究. 中华医院感染学杂志,2012,22(2):280-282.
- 6 Zhang Z, Zhang JY, Wang LF. Immunopathogenesis and prognostic immune markers of chronic hepatitis B virus infection. J Gastroenterol Hepatol,2012,27(2):223-230.
- 7 欧阳录明, 陈福春, 胡永轩, 等. HBV感染者免疫调节细胞因子表达变化的研究. 中国医药导报,2012,9(18):69-70.
- 8 范公忍, 赵满仓, 魏文清, 等. 乙型肝炎病毒感染者外周血T淋巴细胞亚群表达与其血清HBV-DNA水平的相关性分析. 标记免疫分析与临床,2011,18(5):294-297.
- 9 Yukihiro S. Immunopathogenesis and immunotherapy for viral hepatitis.//Mukomolov S. Viral Hepatitis-Selected Issues of Pathogenesis and Diagnostics. Russia: St. Petersburg Pasteur Institute. 2011:65-82.
- 10 Horiike N, Akbar SMF, Ninomiya T, et al. Activation and maturation of antigen-presenting dendritic cells during vaccine therapy in patients with chronic hepatitis due to hepatitis B virus. Hepatol Res,2002,23(1):38-47.
- 11 苏海滨, 李捍卫, 赵洪兰等. 自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗HBV感染肝硬化患者的临床疗效分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007,21(1):64-66.
- 12 Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. J Immunother,2001,24(5):502-510.
- 13 van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, et al. Functional Impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. Hepatology,2004,40(3):738-746.
- 14 Shi M, Fu JL, Shi F, et al. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. J Clin Immunol,2009,132(1):43-54.
- 15 马英杰, 韩际奥, 杨丽, 等. 慢性HBV感染者、健康人树突状细胞经HBsAg活化后的免疫效应差异. 世界华人消化杂志,2012,20(4):341-345.
- 16 马文波, 张明辉, 王海舫, 等. HBsAg负载DC细胞治疗慢性乙型肝炎临床效应及血清Th1/Th2水平的研究. 中国老年学杂志, 2008,28(14):1393-1395.

(收稿日期: 2013-01-25)

(本文编辑: 孙荣华)

韩际奥, 杨丽, 王志凌, 等. 慢性乙型肝炎患者DC/CIK体外经HBsAg活化后自体回输的疗效和对机体免疫的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 386-390.

中华医学会