

## · 临床论著 ·

抗HBV-树突状细胞联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎  
疗效观察

刘理冠 魏开鹏 赖小欢 杨环文 许正锯 杨红 潘兴南

**【摘要】目的** 观察HBsAg致敏自体外周血单个核细胞(PBMC)来源的树突状细胞(抗HBV-DCs)联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎(CHB)的治疗效果。**方法** 104例CHB患者随机分成治疗组(抗HBV-DCs联合恩替卡韦治疗, 51例)和对照组(恩替卡韦治疗, 53例), 比较患者肝功能、HBV DNA、HBeAg的变化。**结果** 治疗组HBV DNA低于检测下限的比率与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但治疗组HBeAg阴转率(35.3%)、HBeAg血清学转换率(31.4%)以及ALT复常率(84.3%)均显著高于对照组(分别为22.6%、17.0%及71.7%), 治疗组治疗6个月时, 其HBV DNA低于检测下限的比率(66.7%)、HBeAg转阴率(35.3%)、HBeAg血清学转换率(31.4%)以及ALT复常率(84.3%)均显著高于治疗3个月时(分别为35.3%、19.6%、11.8%及68.6%), 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 抗HBV-DCs联合恩替卡韦治疗CHB较单用恩替卡韦疗效更佳。

**【关键词】** 树突细胞; 恩替卡韦; 肝炎, 乙型, 慢性

**Clinical observation on the effects of combined treatment of dendritic cells activated by HBsAg and entecavir on patients with chronic hepatitis B** LIU Li-guan, WEI Kai-peng, LAI Xiao-huan, YANG Huan-wen, XU Zheng-ju, YANG Hong, PAN Xing-nan. The 180th Hospital of PLA, Quanzhou, Fujian 362000, China  
Corresponding author: PAN Xing-nan, Email: xnpnancn@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the therapeutic effects of the combination of dendritic cells (DCs) sensitized by HBsAg and entecavir (ETV) in the treatment of patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Total of 104 CHB patients were randomly divided into treatment group (51 cases) and control group (53 cases). Patients in treatment group were treated with oral ETV administration and dendritic cells sensitized by HBsAg injection, while those in control group were treated only with ETV. During the treatment, liver function, HBV DNA level and HBV markers were compared between the two groups, respectively. **Results** The HBV DNA undetectable rate was not significantly different between the treatment group and control group ( $P > 0.05$ ). But the rates of HBeAg negative (35.3%), HBeAg seroconversion (31.4%) and ALT normalization (84.3%) of patients in treatment group were significantly higher than those in control group (22.6%, 17.0% and 71.7%, respectively) ( $P < 0.05$ ). The above indexes in treatment group at the end of 6th month were also significantly higher than those at the end of 3rd month (66.7% vs 35.3%, 35.3% vs 19.6%, 31.4% vs 11.8%, 84.3% vs 68.6%, respectively) ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Combined treatment of DCs sensitized by HBsAg and ETV had better curative effects on CHB patients compared with ETV monotherapy.

**【Key words】** Dendritic cell; Entecavir; Hepatitis B, chronic

HBV感染后机体要通过多种抗病毒免疫反应来清除肝内HBV, 其中HBV特异性的细胞免疫发挥关键作用<sup>[1]</sup>。但慢性HBV感染者体内的DCs功能低

下, 导致不能将HBV抗原信息递呈给T细胞, 不能引发有效的HBV特异性T细胞免疫反应, 从而导致慢性持续感染<sup>[2]</sup>。在体外通过HBsAg肽段冲击负载DCs的过继免疫治疗对慢性HBV感染者能发挥一定疗效<sup>[3]</sup>, 可以激发患者体内的HBV特异性细胞免疫反应, 引起溶细胞型和非溶细胞型的HBV清除效

应,促进HBeAg向HBeAb的血清学转换,但其在抑制HBV复制和降低HBV载量方面效果相对不明显。与之相反的是,核苷(酸)类似物抑制HBV复制作用明显,但在清除HBV方面疗效不理想。恩替卡韦是目前临床上常用的抗HBV感染药物,具有直接抑制病毒作用。本院采取抗HBV-DCs联合恩替卡韦分散片治疗慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者51例,初步得到较好的临床效果。

## 资料与方法

### 一、一般资料

纳入CHB患者104例,为2010年7月至2011年6月在本院住院治疗者,其中男性78例,女性26例;年龄14~55岁,平均年龄(30 ± 12)岁。入组CHB患者的HBsAg、HBeAg及HBV DNA均同时阳性。诊断均符合2005年12月制定的《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[4]</sup>中诊断标准。所有患者随机分为2组,抗HBV-DCs联合恩替卡韦治疗组51例,其中男性32例,女性19例;抗HBV-DCs治疗同时,给予恩替卡韦分散片(江苏正大天晴药业股份有限公司产品)0.5 mg口服,1次/d,治疗6个月。对照组53例,其中男性35例,女性18例,仅给予恩替卡韦分散片0.5 mg口服,1次/d,治疗6个月。治疗组及对照组停药后均随访观察6个月以上,并在治疗和随访过程中定期检测肝功能、HBV表面标志物(HBVM)、HBV DNA等。

### 二、方法

1. 抗HBV-DCs细胞疗法:取CHB患者外周静脉血20 ml,以低分子肝素抗凝,以密度梯度离心法获得单个核细胞。用RPMI 1640培养液培养,在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下孵育,加入IL-4和GM-CSF等细胞因子诱导单个核细胞分化成不成熟DCs。于培养第6天加入HBsAg蛋白短时间刺激使DCs负载HBV相关抗原,并加入CD40L、TNF-α、IL-1b和PGE2混合细胞因子以促进DCs成熟。培养第7天收

获DCs,数量为(1~10)×10<sup>6</sup>个,用20 ml生理盐水混悬待用。将上述抗HBV-DCs悬液通过外周静脉回输到患者体内,每个月1次,共6次。

2. 观察项目及随访:①血清HBV标志物检测:采用电化学发光法,试剂盒购自Roche公司。②血清HBV DNA定量检测:采用荧光实时定量PCR检测,试剂购自上海申友生物技术公司。③丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测:采用贝克曼全自动生化分析仪检测,试剂购自贝克曼公司。④两组患者在治疗结束后每隔3个月随访1次,并检测上述指标。

### 三、统计学处理

采用SPSS 16.0软件对数据进行分析,组间比较采用t检验和χ<sup>2</sup>检验,以P < 0.05为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、治疗结束6个月时,治疗组和对照组各项指标的比较

在疗程结束6个月时,治疗组(抗HBV-DC联合恩替卡韦分散片)血清HBeAg转阴率、HBeAg血清学转换率以及丙氨酸氨基转移酶(ALT)复常率均较对照组显著升高(P < 0.05),见表1。

二、治疗组在疗程结束3个月和6个月时各项指标比较

治疗组疗程结束后3个月时,血清HBV DNA、HBeAg转阴率、HBeAg血清学转换率及ALT复常率均显著低于疗程结束6个月时相关指标(P < 0.05),见表2。

### 三、不良反应

对照组和治疗组患者均无明显不良反应发生。

## 讨 论

树突状细胞(dendritic cells, DCs)于1973年由Steinman和Cohn首先发现<sup>[5]</sup>,是一类具有最强抗原提呈功能的专职抗原提呈细胞(antigen presenting

表1 治疗组和对照组观察指标比较 [例(%)]

组别	例数	HBV DNA低于检测下限	HBeAg转阴	HBeAg血清学转换	ALT复常
治疗组	51	34 (66.7)	18 (35.3) <sup>a</sup>	16 (31.4) <sup>b</sup>	43 (84.3) <sup>b</sup>
对照组	53	35 (66.0)	12 (22.6)	9 (17.0)	38 (71.7)

注:与对照组比较,<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01

表2 治疗组治疗结束后3个月和6个月指标观察比较 [例(%)]

治疗结束时间	HBV DNA低于检测下限	HBeAg转阴	HBeAg血清学转换	ALT复常
3个月	18 (35.3) <sup>a</sup>	10 (19.6) <sup>a</sup>	6 (11.8) <sup>b</sup>	35 (68.6) <sup>b</sup>
6个月	34 (66.7)	18 (35.3)	16 (31.4)	43 (84.3)

注:与治疗结束6个月比较,<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01

cell, APC)<sup>[6]</sup>, 其细胞膜表面高表达MHC I 和 MHC II 分子, 能有效传递抗原信息给T淋巴细胞并活化特异性的T细胞克隆, 介导特异性的细胞免疫<sup>[7]</sup>。目前众多基础研究表明, 人体的免疫系统对HBV发生免疫耐受与乙型肝炎慢性化密切相关<sup>[8-9]</sup>, 而发生免疫耐受的主要原因为CHB患者DCs功能缺陷, 表面缺乏完整的免疫第二信号, 不能有效地活化T细胞克隆, HBV抗原特异性T细胞(包括HBV抗原特异性CTL与CD4<sup>+</sup>T细胞)呈无反应性状态, 体内HBV得不到有效清除, 从而导致乙型肝炎的慢性化<sup>[10-11]</sup>。故恢复DCs功能的免疫治疗成为治疗HBV持续感染的热点, 而抗HBV-DCs是目前最具潜能的治疗性疫苗。本研究从患者自体外周血分离单个核细胞, 在体外诱导培养分化成DCs, 并在成熟过程中冲击负载HBsAg肽段, 回输到患者体内使机体免疫系统重新恢复对HBV的免疫识别, 从而打破免疫耐受, 抗HBV的特异性免疫反应得到重新启动。恩替卡韦分散片(ETV)为环戊基鸟嘌呤核苷类似物, 具有快速、高效、低耐药的特点, 是目前国内公认比较理想的核苷类似物。有研究表明, 经ETV治疗的CHB患者的外周血DCs数量和功能均优于未治疗组, 这提示ETV可能对树突状细胞的成熟、增殖有一定作用<sup>[12]</sup>。抗HBV-DCs与ETV联合应用可以全面调节CHB患者体内的免疫细胞及细胞因子, 达到提高抗病毒治疗的效果。本研究结果表明, 治疗组(抗HBV-DC联合恩替卡韦分散片)患者在疗程结束后6个月, 患者ALT复常率为84.3%、HBV DNA低于检测下限的比率为66.7%、HBeAg转阴率为35.3%及HBeAg血清学转换率31.4%, 而对照组(单用恩替卡韦分散片)患者以上指标分别为71.7%、66.0%、22.6%和17.0%, 均明显低于治疗组, 除HBV DNA低于检测下限的比率外, 两组其他3项指标差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。本研究还提示治疗组疗程结束6个月时的各项指标均高于疗程结束后3个月时( $P < 0.05$ ), 考虑可能是因该疗法在ETV快速、高效抑制病毒的同时, 回输HBV特异性的DCs打破了机体对HBV的免疫耐受, 产生大量HBV特异性的克隆样T细胞, 从而引发针对HBV的特异性细胞免疫。随着时间的延长,

患者机体针对HBV的特异性免疫应答也随之逐渐增强<sup>[13]</sup>。

因此, 抗HBV-DCs联合恩替卡韦治疗CHB患者整合了免疫治疗和核苷类抗病毒药的优势, 具有确切疗效并有良好的伦理适应性和安全性, 可作为当前CHB治疗辅助手段。

## 参 考 文 献

- 1 Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, et al. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(1): 61-70.
- 2 den Brouw ML O, Binda RS, van Roosmalen MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*, 2009, 126(2): 280-289.
- 3 Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, et al. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carrier. *Int J Mol Med*, 2004, 14(2): 295-299.
- 4 中华医学会肝病学分会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010版). *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(1): 1-16.
- 5 Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol*, 2007, 37(Suppl 1): S53-S60.
- 6 邢利和, 张丽欣, 张丽丽. 树突状细胞与肝脏疾病的研究进展. *中国全科医学*, 2010, 13(32): 3701-3703.
- 7 龚非力. 医学免疫学. 3版. 北京: 科学出版社, 2009: 111.
- 8 拉青. 乙肝五项测定对乙型肝炎诊断意义的探讨. *中国医药科学*, 2011, 1(18): 50-51.
- 9 李俊卿, 周俊英. 免疫细胞在慢性乙型肝炎免疫耐受机制中的作用. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(4): 437-440.
- 10 Cui GY, Diao HY. Recognition of HBV antigens and HBV DNA by dendritic cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(6): 584-592.
- 11 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.
- 12 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology*, 2003, 109(4): 487-495.
- 13 卢高峰, 唐芙爱, 郑鹏远, 等. 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响. *世界华人消化杂志*, 2007, 11(1): 1292-1296.
- 14 司方明, 姜海山, 郑鹏远, 等. 树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(2): 3746-3748.

(收稿日期: 2012-10-29)

(本文编辑: 温少芳)