

# 树突状细胞治疗42例核苷(酸)类似物和(或)干扰素经治慢性乙型肝炎患者的临床研究

顾生旺<sup>1</sup>, 高凯旋<sup>2</sup>, 刘欢<sup>1</sup>, 周曙<sup>3</sup>, 吴德平<sup>2</sup>, 张金荣<sup>1</sup>, 蒋兆荣<sup>1</sup>, 焦峰<sup>3</sup>, 王建国<sup>3</sup> (1.江苏省淮安市解放军第八二医院 感染内科, 江苏淮安 223001; 2.江苏省淮安市解放军第八二医院 中心实验室, 江苏淮安 223001; 3.江苏省淮安市解放军第八二医院 医务处, 江苏淮安 223001)

**摘要:** 目的 探讨树突状细胞(dendritic cells, DC)治疗核苷(酸)类和(或)干扰素经治慢性乙型肝炎降低HBsAg、HBeAg定量效果。方法 自体血分离培养树突状细胞(DC)回输治疗核苷(酸)类和(或)干扰素经治慢性乙型肝炎(CHB) 42例, 并与348例对照组比较HBsAg、HBeAg定量变化情况。结果 DC治疗组与对照组HBsAg下降显效率分别为28.2%、18.9%; HBeAg定量下降显效率分别为41%和29.6%, 二组HBeAg下降显效率无显著差异( $P = 0.31$ )。结论 自体DC回输可以打破部分慢性乙型肝炎患者的免疫耐受, 诱导一定的免疫应答, 提高乙型肝炎综合抗病毒治疗效果。

**关键词:** 树突状细胞; 肝炎, 乙型, 表面抗原; e抗原; 核苷(酸)类似物

## Dendritic cells treatment on 42 chronic hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide and (or) interferon

GU Sheng-wang<sup>1</sup>, GAO Kai-xuan<sup>2</sup>, LIU Huan<sup>1</sup>, ZHOU Shu<sup>3</sup>, WU De-ping<sup>2</sup>, ZHANG Jin-rong<sup>1</sup>, JIANG Zhao-rong<sup>1</sup>, JIAO Feng<sup>3</sup>, WANG Jian-guo<sup>3</sup> (1.Department of Infection Medicine, The People's Liberation Army 82nd Hospital, Huaian 223001, Jiangsu Province, China; 2.Department of Central Laboratory, The People's Liberation Army 82nd Hospital, Huaian 223001, Jiangsu Province, China; 3.Medical Department, The People's Liberation Army 82nd Hospital, Huaian 223001, Jiangsu Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of dendritic cells (DC) on reducing HBsAg and HBeAg levels of chronic hepatitis B (CHB) patients treated with nucleoside (nucleotide) and (or) interferon. **Methods** Autologous dendritic cells were separated and cultured and re-infused into 42 cases of respective CHB patients who had been treated with nucleos(t)ide and (or) interferon. Their HBsAg and HBeAg levels were compared with those 348 patients in control group. **Results** Markedly effective rates of the reduction of HBsAg levels were 28.2% in treatment group and 18.9% in control group, while those of the reduction of HBeAg levels in both groups were 41% and 29.6%, respectively. No significant difference in markedly effective rate of HBeAg reduction was found between the two groups ( $P = 0.31$ ). **Conclusions** Re-infusion of autologous dendritic cells can break immune tolerance in part of the CHB patients and induce some immune response, and enhance the comprehensive effect of antiviral treatment for hepatitis B.

**Key words:** Dendritic cells; Chronic hepatitis B; Surface antigen; E antigen; Nucleoside analogues

慢性乙型肝炎严重影响人民身体健康, 目前虽然有核苷及核苷酸类似物恩替卡韦及聚乙二醇化干扰素为主的二大类治疗, 但效果仍不理想, 前者有耐药与变异及难以停药的问题, 后者价格昂贵

且有较多不良反应, 树突状细胞治疗乙型肝炎有部分临床研究, 但都是关于恢复肝功能, 促进病毒下降的研究, 对应用树突状细胞治疗后对乙型肝炎病毒表面标志物定量的影响研究较少, 2014年5月~2015年3月, 本院应用树突状细胞(DC)治疗核苷(酸)类和(或)干扰素经治慢性乙型肝炎

(CHB) 42例, 并与对照组348例比较, 现报告如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 390例核苷(酸)类似物和(或)干扰素经治的慢性乙型肝炎患者分为治疗组和对照组, 治疗组42例, 包括男30例, 女12例, 年龄20~65岁, 平均(36.1 ± 10.4)岁, 其中HBeAg阳性慢性乙型肝炎19例, HBeAg阴性慢性乙型肝炎23例; 对照组348例, 包括男242例, 女106例, 年龄18~82岁, 平均(38.8 ± 11.7)岁, 其中HBeAg阳性慢性乙型肝炎148例, HBeAg阴性慢性乙型肝炎200例, 诊断符合慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)<sup>[1]</sup>。治疗组与对照组均签署知情同意书并经医院医学伦理委员会同意。

1.2 DC来源及制备 治疗组采集患者自体外周静脉血50 ml, 收集在含有血液保存液Ⅲ的一次性采血袋中, 混合均匀, 常规密度梯度离心, 重悬下层血细胞, 加入淋巴细胞分离液提取单个核细胞, 洗涤2次, 接种于175 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 贴壁24 h后, 弃去上清, 洗涤1次, 加入20 ml GT-T551培养基、自体血浆, 加入GM-CSF、IL-4、TNF-α、乙肝疫苗行DC诱导培养。

1.3 治疗方法 两组均为核苷(酸)类似物和(或)干扰素经治患者, 对照组应用拉米夫定8例; 应用替比夫定18例; 应用阿德福韦酯202例, 其中18例改服恩替卡韦, 1例改服替比夫定; 应用恩替卡韦94例; 应用核苷类似物和(或)干扰素联合治疗26例。治疗组应用拉米夫定后换用阿德福韦酯13例; 应用替比夫定1例; 应用恩替卡韦7例; 干扰素单独治疗1例, 核苷类似物(或)干扰素联合治疗17例; 白细胞介素2、重组人粒细胞集落刺激因子、

胸腺素α1联合治疗1例; 未进行抗病毒治疗2例; 治疗组在对照组基础上行腹股沟淋巴结DC悬浮液注射。

操作步骤: 常规消毒皮肤, 用左手拇指与食指固定淋巴结, 用5号注射针取DC悬浮液0.5 ml注射入淋巴结, 避免滑动误伤邻近组织和血管, 每2~4周1次, 其中治疗1次的有15例, 治疗2次的有11例, 治疗3次的有9例, 治疗4次的有4例, 治疗5次的有2例, 治疗6次的有1例, 合计96例次; 其中1例治疗后因患者妻子反对, 拒绝并放弃回输治疗, 未纳入统计。

1.4 观察项目及数据分析 治疗前及治疗后检测肝功能、乙型肝炎病毒表面标志物及HBV DNA定量, 然后进行统计学分析。

## 2 结果

2.1 肝功能 治疗组丙氨酸氨基转移酶复常率85%, 对照组73.5%, 两组无显著差异( $P=0.36$ )。

2.2 DC治疗前后两组HBsAg, HBeAg的定量比较 治疗组DC治疗前HBeAg 1~10 CI者治疗后HBeAg阴转3/5例(60%), 1例轻度反弹, 见表1。

2.3 两组治疗前后HBsAg, HBeAg降幅与显效、有效率比较 治疗组与对照组HBsAg降幅>80%者分别占7.69%、7.47%; HBeAg降幅>80%者分别占20.5%、14.9%; 显效率(HBsAg降幅>50%)分别为28.2%、18.9%; HBeAg降幅>50%分别41.0%、29.6%,  $P>0.05$ , 可能与治疗组样本量小, 治疗次数与观察时间较短有关, 见表2。

2.4 反弹情况 DC组HBeAg共反弹3例次; HBsAg反弹1次者, 16例; HBsAg反弹2次者, 5例; HBsAg反弹3次者, 1例; HBsAg, HBeAg同时反弹11例; 对照组HBeAg反弹13例次; HBsAg反弹1次者, 87

表1 DC治疗前后两组HBsAg、HBeAg定量情况

HBsAg (IU/ml)	治疗组 (例)		对照组 (例)		HBeAg (CI)	治疗组 (例)		对照组 (例)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
< 0.2	1	2	1	5	< 1	19	22	202	233
0.2 ~ 500	8	8	74	87	1 ~ 500	16	13	118	92
500 ~ 1000	2	6	38	31	500 ~ 2000	1	3	10	12
> 1000	31	23	235	225	> 2000	6	1	18	11
合计	42	39	348	348		42	39	348	348
$\chi^2$ 值	3.41		4.64			4.99		7.29	
P 值	0.33		0.199			0.17		0.06	

注: 3例治疗后未复查 HBsAg、HBeAg 定量

表2 两组治疗前后HBsAg, HBeAg降幅显效与有效率比较[例(%)]

	HBsAg		HBeAg	
	治疗组	对照组	治疗组	对照组
显效 (降幅 > 50%)	11 (28.2)	66 (18.9)	16 (41.0)	103 (29.6)
有效 (降幅 > 30%)	7 (17.9)	69 (19.8)	4 (10.2)	52 (14.9)
无效 (降幅 < 30%)	21 (53.8)	213 (61.2)	19 (48.7)	193 (55.5)
合计	39 (100.0)	348 (100.0)	39 (100.0)	348 (100.0)

注: 两组 HBsAg 降幅显效率比较,  $\chi^2=1.88$ ,  $P=0.39$ ; HBeAg 降幅显效率比较,  $\chi^2=2.31$ ,  $P=0.31$

例; HBsAg反弹2次者, 39例; HBsAg反弹3次者, 6例; HBsAg反弹4次者, 7例; HBsAg反弹5次者, 1例; HBsAg, HBeAg同时反弹34例次; 停药反弹2例次; DC组HBeAg反弹率为7.69%, 对照组HBeAg反弹率为3.7%; DC组HBsAg反弹1~2次占53.8%, 对照组HBsAg反弹1~2次占36.2%; DC组无HBsAg反弹3次及以上者, 对照组HBsAg反弹3次以上占4%; DC组HBsAg、HBeAg同时反弹占28.2%, 对照组HBsAg、HBeAg同时反弹占9.8%。

2.5 不良反应 治疗组初次注射后局部有轻微疼痛, 淋巴结轻度肿大, 注射2~3次后即消失。个别出现低热疲劳、注射部位疼痛, 均自行缓解。

### 3 讨论

核苷(酸)类似物联合或序贯干扰素可能提高乙型肝炎抗病毒疗效, 但效果无明显突破。DC<sup>[2,3]</sup>可活化初始型T细胞, 诱导初级免疫反应打破转基因小鼠对HBsAg的免疫耐受。许多研究<sup>[4-16]</sup>表明, 慢性乙型肝炎患者外周血PBMC经粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF和白细胞介素4混合细胞因子培养体系能诱导一定量DCS产生, HBsAg可以促进DC和CIK细胞成熟; 不论对于健康人还是乙型肝炎患者, HBsAg致敏的DC-CIK对HepG 2.2.1.5的杀伤率均高于对照组。韩亚萍等研究<sup>[17]</sup>发现联合用IFN- $\alpha$ 和TNF- $\alpha$ 诱导培养的DC, 不仅表型成熟, 且有很强的刺激自体淋巴细胞表达IFN- $\gamma$ 的功能, 可诱导出强的Th1、Tc1反应; 张静等研究<sup>[18]</sup>发现DC联合IL-18可增强CHB患者Th1类细胞因子的表达, 并增强CTL的杀伤活性。

本研究显示DC是一种安全、有效的治疗方法<sup>[19-20]</sup>, DC治疗对HBsAg, HBeAg降幅有积极作用, 尤其对HBeAg降幅更明显, 但反弹机会也明显增加, 这与乙型肝炎难治性、顽固性有关。笔者推测: ①DC治疗与干扰素可能有协同作用, 可明显减轻部分患者IFN不良反应; ②DC许多表面分子的表达与同期外周血HBV载量呈显著负相关, 抗病毒药物降低乙型肝炎病毒可能更有利于发挥DC疗效; ③HBV DNA一直控制在检测线以下者, DC疗效更好, DC治疗不应单独作为乙型肝炎抗病毒的基础治疗。张芸等<sup>[12]</sup>研究发现核苷(酸)类似物抗病毒治疗CHB可增强DC功能。本组大部分病例为核苷类似物经治患者, 治疗前HBV DNA正常26例, 治疗后1例服ADV者HBV DNA从< 500 IU/ml反弹到4840 IU/ml, HBsAg从4230 IU/ml反弹到7440 IU/ml, HBeAg从0.8 CI反弹到1.3 CI, 后降到1 CI; 改服恩替卡韦半

年后HBV DNA恢复正常, 乙型肝炎病毒表面标志物定量HBsAg为3940 IU/ml, HBeAg为1 CI; 治疗前HBV DNA 565~1270 IU/ml共5例, 治疗后4例HBV DNA < 500 IU/ml, 仅1例HBV DNA为1240 IU/ml, HBsAg从2257 IU/ml反弹到4100 IU/ml, HBeAg由1512 CI反弹到2140 CI; 治疗前HBV DNA  $1.680 \times 10^3$  IU/ml~ $1.46 \times 10^6$  IU/ml, 共10例, 治疗后2例HBV DNA < 500 IU/ml, 8例HBV DNA仍异常, 其中1例HBeAb(+)患者HBsAg由2710 IU/ml反弹到3580 IU/ml, 6例HBeAg(+)患者HBsAg, HBeAg同步反弹, 1例尚未复查; 治疗前HBV DNA  $8.86 \times 10^6$  IU/ml, 1例, 治疗后尚未复查。④重视治疗前HBsAg、HBeAg、HBV DNA基础水平与治疗下降速度, 不断优化调整实施个体化治疗, 可望取得最好效果。如用核苷类似物治疗后HBV DNA一直阴性, 可加用干扰素和(或)DC细胞治疗, 促进HBsAg下降, HBeAg转阴。⑤乙型肝炎难治与任何一种治疗方法的疗效有限性即平台效应和治疗过程中频发的反弹现象<sup>[21]</sup>密切相关。本研究显示恩替卡韦等核苷类药物同样能降低HBsAg和HBeAg, 可作为长期基础治疗, 平台期加用干扰素可进一步提高效果, 不应夸大DC治疗效果, 更不应把HBsAg转阴作为主要或唯一治疗目标。本组2例持续口服阿德福韦酯的HBeAb(+)患者, HBsAg分别为1.3 IU/ml和1.7 IU/ml, 前者DC治疗1次, 满10个月时HBsAg < 0.2 IU/ml, 后者DC治疗2次, 满1年时HBsAg为0.9 IU/ml, HBsAg比初始水平低, DC疗效并不显著; 1例25岁女性HBeAg(+)患者, 持续服恩替卡韦治疗后HBV DNA一直低于检测下限, 连续3次DC治疗, HBsAg由16000 IU/ml反弹到17800 IU/ml, 最后降到16901.9 IU/ml, HBeAg由5.7 CI下降到1.9 CI后又反弹到4.8 CI, 最后降到0.4 CI, 终于转为小三阳。⑥晚睡、思想负担、夫妻不和、过度劳累、随便停药都会影响疗效, 引起各指标反弹, 加强医患沟通, 注意督促患者加强保养与治疗复查依从性以保证疗效<sup>[21]</sup>。

总之, 自体DC回输可以打破部分慢性乙型肝炎患者的免疫耐受, 诱导一定的免疫应答, 但尚不能使所有接受治疗者都出现对HBV的完全应答。乙型肝炎综合抗病毒治疗是方向, 对核苷类药物HBV DNA应答不理想者, DC疗效如何? 干扰素与DC治疗究竟有多大协同作用? DC疗法的标准化与质控, 疗效如何提高? 临床最佳DC疗法(如间隔时



间、DC-CIK与DC谁更好)等仍需要长期、大样本临床观察并探讨与其他治疗方法的联合以提高和维持抗病毒疗效。

### 参考文献

- [1] 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)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 1: 13-24.
- [2] 赵文双, 郭兰英, 额尔敦. 树突状细胞治疗慢性乙型肝炎研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 1: 65-67.
- [3] 陈立荣, 王海燕, 李文娟, 等. 临床护理路径在自体树突状细胞治疗慢性乙型肝炎中的应用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 16: 1798-1799.
- [4] 谢中侠, 王兵. 树突状细胞治疗慢性乙型肝炎60例临床观察[J]. 山东医药, 2005, 31: 25-26.
- [5] 司方明, 娄海山, 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[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 35: 3746-3748.
- [6] 康鹏, 吕淑兰, 李树臣, 等. HBsAg、HBeAg活化树突状细胞治疗慢性乙型肝炎的体外研究[J]. 肝脏, 2006, 5: 327-329.
- [7] 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[J]. 中国老年学杂志, 2008, 14: 1393-1395.
- [8] 孔练花, 李军, 韩亚萍, 等. 基因修饰的树突状细胞体外免疫功能的初步研究[J]. 东南国防医药, 2011, 6: 481-484.
- [9] 韩际奥, 马应杰, 王志凌, 等. DC-CIK治疗慢性乙型肝炎患者疗效观察[J]. 肝脏, 2013, 10: 677-679.
- [10] 张群, 庞国进, 谌双君, 等. 慢性乙肝患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞对外周血树突状细胞成熟的作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 8: 601-607.

- [11] 刘勇, 吴邦富, 胡媛媛. 抗HBV-DC联合药物治疗e抗原阳性的临床研究[J]. 中国现代医生, 2012, 1: 77-79.
- [12] 张芸, 李瑞娟, 邢媛, 等. 核苷(酸)类似物对不同疗效乙肝患者DC功能影响[J]. 长治医学院学报, 2010, 5: 326-329.
- [13] 焦桂林, 卢留斌, 刘毅. 树突状细胞疫苗注射治疗慢性乙型肝炎后外周血T细胞亚群的变化[J]. 实用医药杂志, 2009, 3: 11-12.
- [14] 牛春燕, 任天顺, 陈旭, 等. HBV抗原肽冲击的DC对慢性乙型肝炎及HBV携带者的免疫治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 25: 2635-2639.
- [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[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20: 341-345.
- [16] 郭小英, 李军, 韩亚萍, 等. 脂质体介导HBcAg基因转染人树突状细胞的实验研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 1: 23-25.
- [17] 韩亚萍, 李军, 刘源, 等. 外周血树突状细胞免疫治疗体外培养条件的优化[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 852-854.
- [18] 张静, 李青春, 卜岚. DC联合IL-18对慢性乙型肝炎患者外周血Th1细胞分泌的细胞因子及CTL的影响[J]. 吉林医学, 2011, 33: 7017-7018.
- [19] 吴邦富, 杨江英, 周赞, 等. 抗HBV-DC治疗慢性HBV携带者的初步临床研究[J]. 中国医药导报, 2008, 6: 55-57.
- [20] 冯晓霞, 王磊, 邢练军. 树突状细胞在慢性乙型肝炎发病中的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12: 144-147.
- [21] 顾生旺, 张金荣, 赵兵, 等. 552例乙型肝炎患者HBsAg与HBeAg定量反弹情况分析[J]. 肝脏, 2015, 6: 513-515.
- [22] 陈立荣, 周靖, 王赏, 等. 护理干预对自体树突状细胞治疗慢性乙型肝炎遵医行为的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 18: 2038-2039.

投稿日期 2015-03-19

### · 消息 ·

### 声 明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊已被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》、《美国化学文摘数据库(Chemical Abstracts Service)》、《美国乌利希期刊指南》、《中国学术期刊网络出版总库》、《中国核心期刊遴选数据库》(万方数据——数字化期刊群)、《中文生物医学期刊文献数据库——CMCC》及CNKI中国知网数据库收录, 其作者论文著作权使用费及相关稿酬一次性给付(已在收取发表费时折减和换算为杂志赠阅)。凡作者向本刊提交文章发表之行为即视为同意本刊上述声明。

本刊编辑部