

• 临床研究 •

血清细胞因子动态变化对慢性乙型肝炎患者
干扰素治疗应答的早期预测价值分析

刘永萍, 孟樱, 郑燕, 黄伟, 余楷, 吴晓璇, 刘雁

【摘要】目的 探讨血清细胞因子动态变化对慢性乙型肝炎患者(CHB)干扰素治疗应答的早期预测价值。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2022 年 12 月杭州市西溪医院收治的行聚乙二醇干扰素 α (PegIFN α)治疗的 CHB 患者 12 例, 根据治疗情况分为病毒学应答组(VRs 组, $n=6$)和病毒学无应答组(NRs 组, $n=6$); 同时纳入 6 例健康志愿者作为对照组。利用 Luminex 技术检测健康志愿者和 CHB 患者治疗前, 治疗 4、12、24 及 48 周血清细胞因子水平, 筛选对抗病毒疗效有预测价值的细胞因子。**结果** CHB 患者干扰素诱导蛋白-10 和趋化因子配体 9 水平显著高于对照组(均 $P < 0.05$), 白介素 16、转化生长因子- β 2、白介素 8 和肿瘤坏死因子水平显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。PegIFN α 治疗 12 周时, VRs 组和 NRs 组粒细胞集落刺激因子(G-CSF)水平差异均有统计学意义($P < 0.05$)。绘制治疗 12 周时 G-CSF 水平的 ROC 曲线, AUC 为 0.889。**结论** PegIFN α 治疗 12 周时, 血清 G-CSF 的表达水平有望作为抗病毒疗效评估的早期预测指标。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 聚乙二醇干扰素 α ; 细胞因子

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.05.008

【中图分类号】 R512.6² **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)05-0592-04

抗病毒治疗仍然是控制慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的首要措施, 主要采用干扰素和核苷类似物(NAs)^[1]。NAs 直接作用 DNA 聚合酶, 抑制乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)的复制并发挥作用, 但乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)血清学转换率低, 需要长期维持治疗, 抗病毒终点难以到达。聚乙二醇干扰素 α (polyethylene glycol interferon α , PegIFN α)可有效降低肝硬化及肝癌的发病率, HBeAg 血清学转换率及 HBsAg 转阴率相对较高, 但不良反应大, 适应证窄^[2], 在标准的 48 周治疗期间治疗应答也不理想, 部分患者疗效较好, 可达到临床治愈或完全治疗。研究表明, 某些细胞因子如单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP1)或许可以作为预测疗效的指标及反映 CHB 的应答效应^[3-4]。本研究旨在通过 Luminex 技术^[5-6]监测 PegIFN α 单药治疗过程中 CHB 患者多种细胞因子的动态变化, 寻找可早期预测干扰素疗效的相关指标, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 1 月至 2022 年 12 月杭州市西溪医院收治的行 PegIFN α 治疗的 CHB 患者 12 例, 均符合《慢性乙肝防治指南 2019 年版》中 CHB 诊断标准。6 例患者为治疗 48 周时 HBeAg 消失, 且 HBV DNA 低于检测下线(< 50 IU/ml), 设为病毒学应答组(VRs 组); 6 例在治疗 48 周时未达到上述条件, 设为即无应答组(NRs 组)。同时纳入 6 例健康志愿者作为对照组。本研究获得杭州市第六人民医院(杭州市西溪医院)伦理委员会批准, 所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 方法 治疗过程中监测 CHB 患者的 CHB 五项指标[乙型肝炎表面抗原/乙型肝炎表面抗体(HBsAg/HBsAb)、HBeAg/乙型肝炎 E 抗体(HBeAb)、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)]、HBV DNA 和肝功能等[清蛋白(ALB)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)]血液学指标, 并采集治疗前, 治疗 4、12、24 及 48 周血清样本, 离心分离后冻存于 -80°C 冰箱。

1.2.1 细胞因子检测 取人 27 种细胞因子检测试剂盒(美国, Bio-Rad), 平衡至室温, 对采集保存的血清样本, 室温充分融化并涡旋振荡混匀, 经 $2\ 000$ r/min

基金项目: 杭州市医药卫生科技项目(A20220228); 杭州市生物医药和健康产业发展扶持科技专项(2022WJC228); 浙江省医药卫生科技计划项目(2024KY212)

作者单位: 310023 杭州, 杭州市西溪医院

通信作者: 刘雁, Email: liuyan2068@sina.com

离心后备用。根据试剂盒说明书,梯度稀释标准品,准备质控品,抗体包被编码微珠,荧光检测抗体等。

加入 200 μ l 缓冲液封闭检测板,室温振荡 10 min 后弃去液体扣干,按照实验记录进行标准曲线,对照,样品等布板每孔加入 25 μ l,同时加入 25 μ l 微珠混合液,封膜避光 4 $^{\circ}$ C 振荡孵育过夜。轻轻倒去液体,并洗涤 2 次,每孔加入 25 μ l 检测抗体,避光振荡,室温孵育 1 h 后再加入 25 μ l Streptavidin-PE 溶液,继续避光振荡,室温孵育 30 min,去除孔中液体并洗涤两次,加入 150 μ l 鞘液,振荡 5 min 重选沉在底下的微珠。检测仪器 Luminex 200 (Merck, Millipore),提前预热机器,参照操作步骤上机检测并利用自带软件绘制标准曲线并分析检测结果。检测细胞因子包括白介素 16 (IL-16)、转化生长因子- β 2 (TGF- β 2)、白介素 8 (IL-8)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、干扰素- α 2 (IFN- α 2)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、干扰素 γ (IFN- γ)、白介素 27 (IL-27)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、干扰素诱导蛋白-10 (IP-10) 及趋化因子配体 9 (CXCL9)

1.3 统计方法 数据采用 SPSS 22.0 软件分析,以 GraphPad Prism 8 或 R 软件进行作图。符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验;不符合正态分布的计量数据采用 M (IQR) 表示,采用 Mann-Whitney U 非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

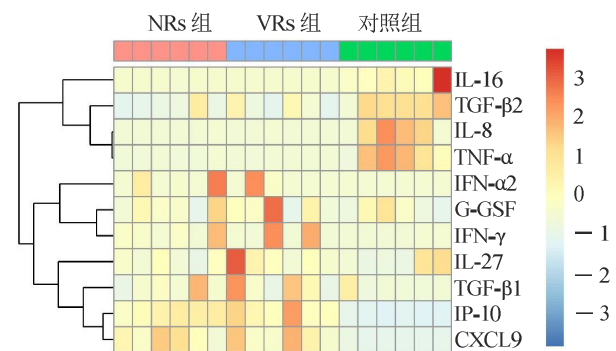
2 结果

2.1 CHB 患者与对照组细胞因子水平比较 CHB 患者 IP-10 和 CXCL9 水平显著高于对照组 ($t \geq 3.37$,

均 $P < 0.05$), IL-16、TGF- β 2、IL-8 和 TNF- α 水平显著低于对照组 ($t \geq 3.37$, 均 $P < 0.05$); 两组 IFN- α 2、G-CSF、IFN- γ 、IL-27 及 TGF- β 1 水平差异均无统计学意义 ($t \leq 0.60$, 均 $P > 0.05$)。其中 VRs 组和 NRs 组在治疗前上述细胞因子水平差异均无统计学意义 ($t \leq 0.08$, 均 $P > 0.05$), 见图 1。

2.2 VRs 组与 NRs 组基线特征比较 VRs 组与 NRs 组性别、年龄,治疗前 ALT、AST、HBsAg、HBeAg、HBV DNA 及基因型差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 1。

2.3 PegIFN α 治疗过程中相关指标的动态变化 VRs 组与 NRs 组 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平随着 PegIFN 治疗时间延长均有明显下降,其中 VRs 组较 NRs 组下降更明显 ($t \geq 2.19$, 均 $P < 0.05$)。随着 PegIFN α 治疗时间的延长,VRs 组肝功能指标 ALT 和 AST 均降至正常,但 NRs 组略有波动,见图 2。



注: IL-16 为白介素 16, TGF- β 2 为转化生长因子- β 2, IL-8 为白介素 8, TNF- α 为肿瘤坏死因子, IFN- α 2 为干扰素- α 2, G-CSF 为粒细胞集落刺激因子, IFN- γ 为干扰素 γ , IL-27 为白介素 27, TGF- β 1 为转化生长因子- β 1, IP-10 为干扰素诱导蛋白-10, CXCL9 为趋化因子配体 9

图 1 CHB 患者 (VRs 组和 NRs 组) 与对照组细胞因子水平比较

表 1 VRs 组与 NRs 组基线特征比较

指标	NRs 组 (n=6)	VRs 组 (n=6)	t 值	P 值
性别 (男/女, 例)	6/0	6/0	—	—
年龄 (岁)	28.7 $\pm$ 4.8	29.3 $\pm$ 9.2	0.15	> 0.05
ALT (U/L)	252.7 $\pm$ 144.8	189.2 $\pm$ 88.4	0.91	> 0.05
AST (U/L)	87.8 $\pm$ 44.4	127.2 $\pm$ 75.8	1.09	> 0.05
ALB (g/L)	46.8 $\pm$ 3.6	45.5 $\pm$ 2.7	0.75	> 0.05
HBsAg (log IU/ml)	4.5 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.6	0.47	> 0.05
HBeAg (S/CO)	783.0 $\pm$ 425.1	459.3 $\pm$ 304.0	1.51	> 0.05
HBV DNA (log IU/ml)	7.4 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.7	1.22	> 0.05
基因型 (例)			—	—
B 型	3	3		
C 型	3	3		

注: ALT 为丙氨酸氨基转移酶, AST 为天冬氨酸氨基转移酶, ALB 为清蛋白, HBsAg 为乙型肝炎表面抗原, HBeAg 为乙型肝炎 E 抗原, HBV DNA 为乙肝病病毒脱氧核糖核酸, — 表示未进行统计学分析

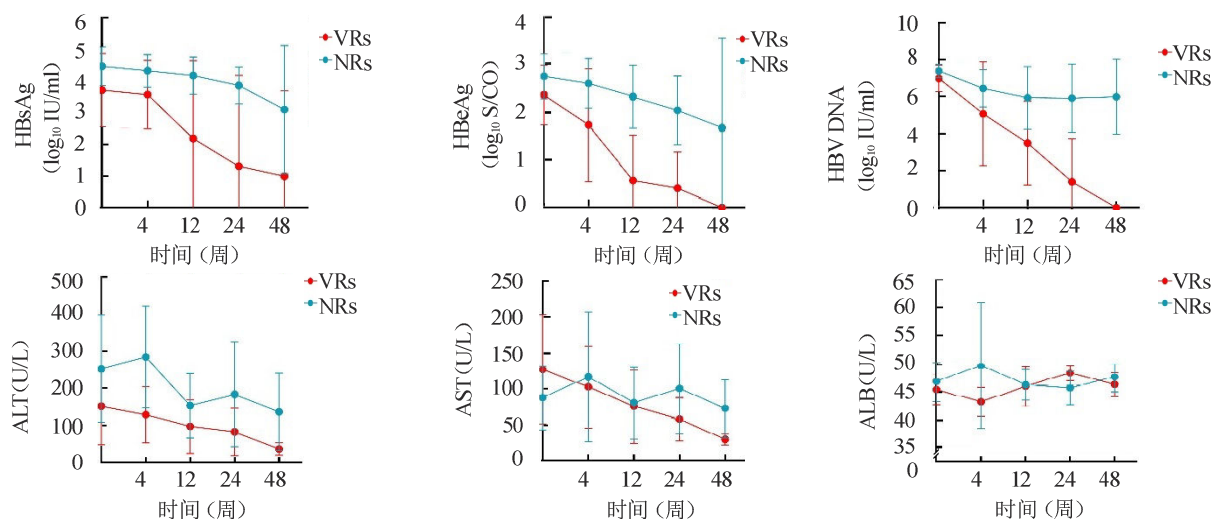


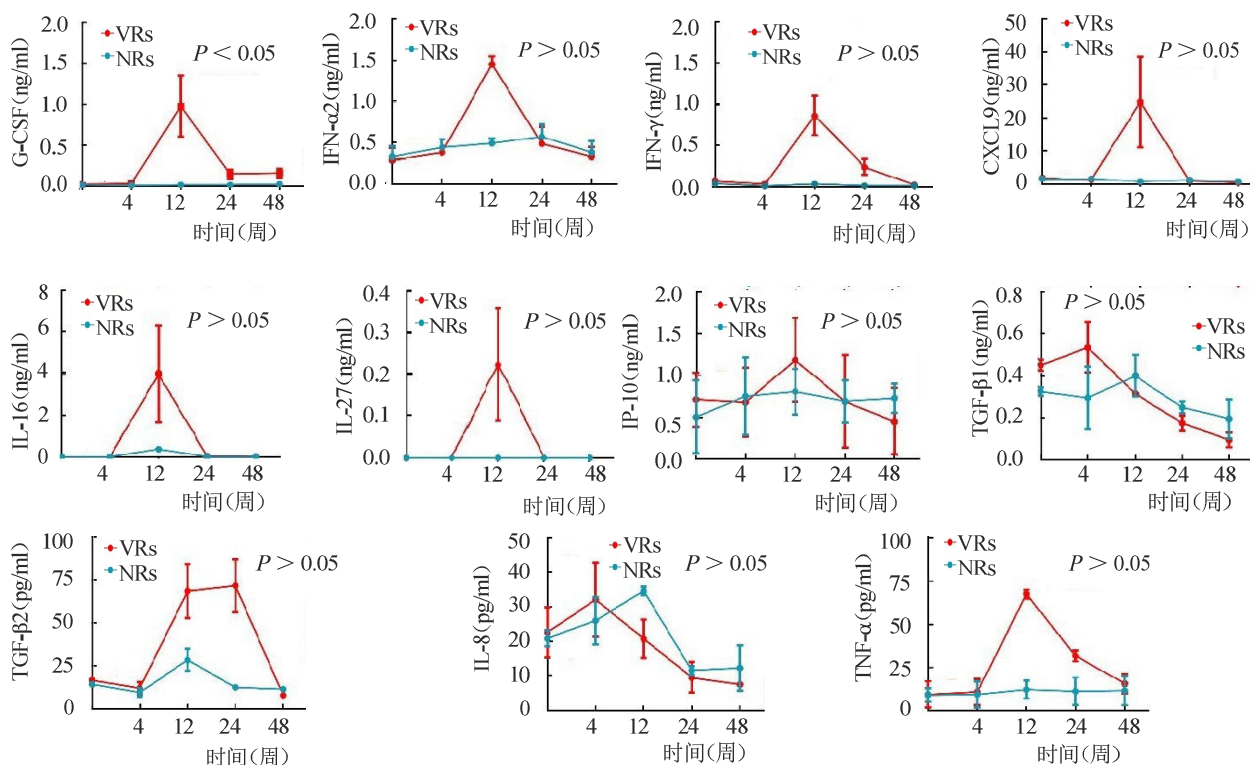
图2 VRs组和NRs组治疗过程中病毒学和肝功能指标动态变化

2.4 PegIFN α 治疗过程中各细胞因子水平变化 治疗12周时, 两组G-CSF水平差异均有统计学意义($t=2.24, P < 0.05$)。IL-8、TGF- β 1和TGF- β 2细胞因子水平, VRs组治疗开始至4周升高, 然后持续降低, 而NRs组升高较慢且滞后, 至治疗12周后明显降低, 见图3。治疗12周时, VRs组血清中G-CSF水平显著高于NRs组($t=2.24, P < 0.05$)和对照组($t=2.40, P < 0.05$), NRs组与对照组差异无统计学意义($t=0.08, P > 0.05$); 绘制治疗12周时G-CSF水平的ROC曲线, AUC为0.889, 95%CI为0.697 ~

1.000, $P < 0.05$, 见图4。

3 讨论

NAs作为直接作用于病毒复制周期不同靶点的直接抗病毒药物, 是目前CHB防治策略的基石, 但因现阶段因NAs尚不能清除HBV环状DNA(cccDNA)和整合的HBVDNA, 同时也面临着停药困难和耐药等挑战, 大多数患者需要长期甚至终身治疗, 然而部分患者仍不能避免进展至肝硬化及肝癌的结局。PegIFN α 作为广谱抗病毒药物, 有抑制病

图3 CHB患者在PegIFN α 治疗过程中细胞因子的动态变化(P 值均为12周比较)

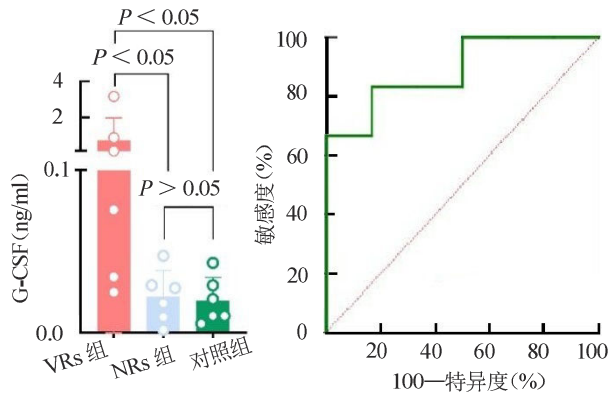


图4 干扰素治疗12周时患者G-CSF的表达水平差异及ROC曲线分析

毒复制和激活免疫应答的双重能力,它可以通过有限的治疗策略诱导免疫控制,提升HBsAg清除率。有研究结果显示,PegIFN α 治疗疗程和基线HBsAg水平可以有效预测干扰素治疗慢性HBV感染者治疗结束时和治疗结束后24周的HBsAg清除,而HBeAg状态仅可预测治疗结束后24周的HBsAg清除^[7]。

本研究结果发现,PegIFN α 治疗12周时血清G-CSF的表达水平可早期有效预测干扰素治疗的应答效果。血清G-CSF来源于活化的单核细胞和巨噬细胞,刺激粒、单核巨噬细胞成熟,促进成熟细胞向外周血释放,并能促进巨噬细胞的多种功能,已用于临床。有研究结果显示,与核苷单药治疗相比,联合PegIFN α 治疗,和应用乙肝疫苗和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)能够进一步提高HBsAg清除率至40%以上^[8]。

有研究结果显示,相比NAs治疗,PegIFN α 治疗可显著提高CHB患者自然杀伤细胞(NK细胞)的频率和功能,且基线和12周的NKp46bright NK细胞频率与治疗48周时HBsAg下降显著相关^[9]。干扰素在体内外均能诱导TRIM38的表达,TRIM38高表达可抑制HBV的复制及基因表达,并通过上调抗病毒蛋白的表达从而增强干扰素的抗病毒作用,PegIFN α 治疗第12及24周时所有CHB患者的TRIM38表达均有所增加,而早期应答者PBMCs中的TRIM38表达水平高于早期无应答者,特别是在治疗24周时。即治疗早期外周血中较高的TRIM38水平可能预示着PegIFN α 治疗应答更佳,治疗过程中较高的TRIM38水平是预测PegIFN α 治疗应答的有效生物标志物^[10]。此外,一项多中心的研究显示,经NAs及PegIFN α 联合治愈的CHB患者IL-5水平显

著升高,且IL-5与HBsAg清除率呈正相关,认为IL-5水平可以预测HBsAg的清除率^[11]。

综上所述,在HBeAg阳性CHB患者中第12周血清细胞因子G-CSF的高表达可以预测PegIFN单药治疗过程中应答较好。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 刘永萍、郑燕、余楷:实验操作、论文撰写;孟樱、黄伟:数据整理、统计学分析;吴晓瑛、刘雁:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2022年版)[J].中华传染病杂志,2023,41(1):3-28.
- [2] ZOULIM F, LEBOSSE F, LEVRERO M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections[J]. Curr Opin Virol, 2016, 18: 109-116.
- [3] PARK Y, PARK J Y, HAN K H, et al. Serum cytokine levels in chronic hepatitis B patients receiving peginterferon alpha-2a therapy[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012, 11(5): 499-506.
- [4] 朱艳芳,鲁晓肇.慢乙肝患者经聚乙二醇干扰素治疗前后细胞因子变化的研究现状[J].世界最新医学信息文摘,2020,20(8): 166-167.
- [5] GU Y R, CHEN L B, LIAN Y F, et al. Serum HBV pregenomic RNA is correlated with Th1/Th2 immunity in treatment-naïve chronic hepatitis B patients[J]. J Med Virol, 2020, 92(3): 317-328.
- [6] LI M H, LU Y, ZHANG L, et al. Association of cytokines with alanine aminotransferase, hepatitis B virus surface antigen and hepatitis B envelope antigen levels in chronic hepatitis B[J]. Chin Med J, 2018, 131(15): 1813-1818.
- [7] HANAN N, ZIERHUT M L, NADER A, et al. Model-based meta-analysis of pegylated IFN-alpha induced HBsAg loss at end of treatment and 24 weeks post treatment in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2023, 78: S1141-S1142.
- [8] JIA H Y, YU G D, YU J, et al. Immunomodulatory and antiviral therapy improved functional cure rate in CHB patients with high HBsAg level experienced NA[J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(5): 1003-1010.
- [9] CAO W H, LI M H, ZHANG L, et al. The characteristics of natural killer cells in chronic hepatitis B patients who received PEGylated-interferon versus entecavir therapy[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 2178143.
- [10] LUO H Y, HU X X, LI Y D, et al. The antiviral activity of tripartite motif protein 38 in hepatitis B virus replication and gene expression and its association with treatment responses during PEG-IFN- α antiviral therapy[J]. Virology, 2023, 579: 84-93.
- [11] WANG P P, MO Z S, ZHANG Y, et al. Serum IL-5 levels predict HBsAg seroclearance in patients treated with Nucleos(t)ide analogues combined with pegylated interferon[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1104329.

收稿日期:2024-01-29

(本文编辑:钟美春)