

• 综 述 •

IFN- $\alpha$  和 PEG-IFN- $\alpha$  治疗慢性乙肝的作用机制\*孙蓓蓓 综述, 管世鹤 $\Delta$  审核

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽 合肥 230601)

关键词: 肝炎, 乙型; 干扰素  $\alpha$ ; 慢性病; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2887-03

慢性乙型肝炎是严重威胁生命的全球性疾病, 导致肝硬化、肝细胞癌的风险非常高, 甚至最终约有 15%~25% 的人死于相关性疾病<sup>[1]</sup>。慢性乙型肝炎在中国相当普遍, 大约有 930 多万的慢性携带者, 根据国内 2006 年的乙肝流行病学调查结果显示 HBsAg 的阳性率在 1~59 岁人群中约占 7.18%, 乙肝抗体阳性率为 50.09%<sup>[2]</sup>, 形势依然十分严峻。抗乙型肝炎病毒 (HBV) 治疗是治疗乙肝最有效的手段, 能有效延缓或阻断病情的进展, 改善愈后<sup>[3]</sup>。目前主要抗病毒药物有干扰素类、核苷类抗病毒药物、免疫调节剂等, 干扰素根据半衰期的不同, 分为普通干扰素、长效干扰素、清蛋白干扰素<sup>[4]</sup>,  $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ ) 是目前国内外公认的治疗病毒性肝炎最常用有效的药物, 而聚乙二醇长效干扰素 (PEG-IFN- $\alpha$ ) 很大程度地弥补了 IFN- $\alpha$  半衰期短的不足, 两者主要通过抗病毒和免疫调节机制抵抗 HBV, 本文就其作用机制作一综述。

1 IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  的概述

干扰素于 1957 年被发现, 是细胞受到病毒或其他干扰素诱导剂作用后产生的具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫等生物学活性的低分子糖蛋白。根据来源、生物学性质及活性, 主要分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 种, 分别由白细胞、成纤维细胞和免疫淋巴细胞产生。干扰素分为 3 型, I 型干扰素目前包括 9 种, IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  均属于 I 型, 它们与相同受体结合, 生物学功能也相似。IFN- $\alpha$  是由单核细胞产生的相对分子量为 18 000 的多肽。II 型干扰素即  $\gamma$ -干扰素, 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生的相对分子量为 21 000~24 000 的单体糖蛋白。III 型干扰素即 IFN- $\lambda$ 1、IFN- $\lambda$ 2、IFN- $\lambda$ 3。

IFN- $\alpha$  半衰期短, 约有 4 h, 需隔 1 d 给药维持血药浓度, 为改善这一问题, 研究出长效干扰素, 如 PEG-IFN- $\alpha$ 、人血清清蛋白融合干扰素、干扰素脂质体等, 最早最常用的是 PEG-IFN- $\alpha$ , 它是将普通干扰素进行聚乙二醇修饰的 1 种易溶于水的惰性物质, 半衰期约 40 h, 可以在血液内达到血药稳态浓度, 对病毒持久抑制。在临床上 PEG-IFN- $\alpha$  每周只需给药 1 次, 减少反复用药的痛苦, 与 IFN- $\alpha$  相比, 毒副作用没有增加, 反而治疗慢性乙型肝炎的应答效果有所提高。多项临床研究证明 PEG-IFN- $\alpha$  对慢性乙型肝炎的疗效显著, Bai 等<sup>[5]</sup>将 PEG-IFN- $\alpha$  2a 用于治疗对拉米夫定抵抗的乙肝患者, 发现疗效明显高于阿德福韦酯且不良反应少、安全性高。Mangano 等<sup>[6]</sup>发现 PEG-IFN- $\alpha$  2a 和拉米夫定联合治疗后 1 年, 疗效比拉米夫定单独治疗时明显提高。在国内李卫等<sup>[7]</sup>应用 PEG-IFN- $\alpha$  2b 治疗慢性乙型肝炎发现疗效显著。

2 IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  治疗慢性乙肝的机制

IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  治疗慢性乙型肝炎的机制相似。主要通过细胞表面受体产生抗病毒蛋白和免疫调节作用来抑制乙肝病毒复制。

**2.1 IFN- $\alpha$  的信号转导途径** IFN- $\alpha$  发挥作用主要是通过 JAK-STAT 信号通路<sup>[8]</sup>。干扰素受体 (IFNR) 分为结合 I 型干扰素的 I 型干扰素受体 (IFNAR-1) 和结合 IFN- $\gamma$  的 II 型干扰素受体 (IFNAR-2)。IFN- $\alpha/\beta$  通过吸附 IFN 受体发挥作用。IFN- $\alpha$  与受体结合后, 胞浆中的 STAT 蛋白 P91 和 P113, 进行酪氨酸 (Tyr) 磷酸化, 并与胞浆中的 48KD 蛋白 (p48) 结合, 形成复杂的 IFN- $\alpha$  激活基因因子 (ISGF3) 复合体, ISGF3 迅速异位于细胞核内, 它与顺式-激活干扰素刺激反应元件结合来促进 IFN 激活基因的转录, 激发它们的翻译<sup>[9]</sup>; 进入核内的 ISGF3 还能诱导宿主编码合成抗病毒蛋白。Zhang 等<sup>[10]</sup>通过实验证实了 ISGF3 是介导干扰素抗 HBV 效应的关键因子。

一些病毒通过减少 ISGF3 的形成来降低干扰素的抗病毒效果。IFN- $\alpha$  下调机制的严格性对于确保并控制细胞反应是极为重要的<sup>[11]</sup>。在其中的蛋白酪氨酸激酶、活化的 STATs 的蛋白抑制剂和细胞因子信号的抑制剂可以直接定向的抑制细胞因子信号转导。此外, 一些病毒通过下调或阻碍通路中不同阶段的 I 型干扰素信号等策略来在宿主体内进行复制<sup>[12]</sup>, 逃脱宿主免疫反应而建立持续感染的状态。

**2.2 直接抗病毒机制** IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  与靶细胞表面的 I 型干扰素受体结合, 诱导合成抗病毒蛋白如抗黏液病毒 A (MxA) 蛋白, 2', 5'-寡腺苷酸合成酶、蛋白激酶等来抑制病毒信息传递, 抑制病毒复制。

**2.2.1 MxA 蛋白** IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  诱导产生的 MxA 是 1 个 76KDa 的鸟苷三磷酸酶, 属于大的鸟苷三磷酸酶的动力蛋白的超家族。它拥有很多传统动力蛋白的生物学特性, 如参与细胞膜上的转运和维持细胞器的内平衡<sup>[13]</sup>, 而区别在于具有自组装并形成更多稳定复合物和在 GTP 水解中有协同作用的特性。根据病毒种类和细胞类型的不同, MxA 可以在病毒复制周期的不同环节发挥作用。不少研究证明 MxA 可以抑制 HBV 的复制, 国外学者将感染 HBV 的雌性转基因小鼠分为两组, 一组减少 IFN $\alpha/\beta$  受体的功能与对照组比较, 结果表明 MxA 可以单独的抵抗 HBV<sup>[14]</sup>。潘颖等<sup>[15]</sup>分别用 IFN- $\alpha$ 、MxA 蛋白和两者联合来处理肝胚瘤细胞 HepG2. 2. 15 细胞发现 MxA 蛋白能够抑制 HBV 抗原的分泌。MxA 启动子-88G/T 位点多态性与 HBV 感染后的结局有关, 其中 TT 基因型或

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81171662); 安徽省卫生厅科学基金资助项目 (2010C057)。  $\Delta$  通讯作者, Email: shihéguan@126.com。

T 等位基因的存在可能有利于 HBV 感染后的清除<sup>[16]</sup>。

有人提出 MxA 蛋白在干扰素治疗 HBV 的机制中所起的作用很小, Yu 等<sup>[17]</sup>发现 GTP 酶缺失的突变体能下调细胞外的 HBsAg 和 HBeAg, 认为 GTP 酶的活性在 MxA 蛋白抑制 HBV 复制过程中不是重要因素, 而 MxA 在细胞核内 HBV 的复制周期中只起到很小的作用。

**2.2.2 PKR 蛋白** PKR 是依赖双链 RNA 自身磷酸化来使病毒蛋白复制的起始阶段受阻从而抑制病毒合成复制的丝氨酸苏氨酸激酶。正常时没有活性, 被激活的 PKR 促进翻译起始因子 eIF-2a 的磷酸化, 这普遍被认为是抑制病毒蛋白质合成和阻止病毒复制的关键因素。之前国外有报道被转染的人肝癌 Huh-7 细胞的 HBV 复制被 IFN- $\alpha$  严格抑制, 而 Park 等<sup>[18]</sup>证实了这一点。尽管 PKR 被证实可以抵抗多种病毒, 但 PKR 在 IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  治疗 HBV 的抗病毒效应中可能扮演的角色还没有全面的被发现。

**2.3 免疫调节作用** 慢性乙型肝炎的发病机理是免疫介导的, 干扰素和机体免疫细胞相互作用, 可以增强细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK)的免疫活性, 使 HBV 感染的靶细胞更易识别和清除。NK 细胞在防御病毒感染中起着重要作用, 杀伤病毒不需要通过抗原刺激, 可以促进其他免疫细胞的启动和活化, IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  作用于机体, 使 NK 细胞增殖, 并且可以上调穿孔素的水平来使清除 HBV 的能力增强<sup>[19]</sup>。林绮文和吴长有<sup>[20]</sup>分离健康人 PBMC 再分别与培养液、IFN- $\alpha$  和 IL-12 培养发现 IFN- $\alpha$  通过磷酸化 STAT1 和 STAT4 增加 NK 细胞 IFN- $\gamma$  分泌和增强杀伤功能。

### 3 影响作用机制的因素

台湾有学者使用水动力注射 HBV DNA 复制子引入到肝脏的三种不同品系小鼠: BALB/c, C57BL/6, FVB/N。发现 FVB/N 小鼠经 HBV 复制的肝脏持续复制长达 50 周, 而 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠的肝脏炎症和病毒被清除。分析表明, DNA 注射后 FVB/N 小鼠肝内激活细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)很少, 而且丙氨酸氨基转移酶(ALT)、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、CXCL9 和 CXCL10 趋化因子的水平都很低。结果显示宿主的异构因素和病毒序列的不同可能会影响到对 HBV 的免疫反应, 而一个不充分的免疫激活或炎症反应会导致体内长期的 HBV 的复制<sup>[21]</sup>。因此, 宿主和病毒是影响 IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  治疗慢性乙型肝炎最重要的两个因素。不同宿主肝脏的生化指标、病理状态、炎症程度、CTL 数量及功能、免疫系统和遗传背景等 IFN- $\alpha$  及 PEG-IFN- $\alpha$  的应答率是不同的, ALT 指数高、机体固有的免疫系统和适应性免疫系统良好、肝脏纤维化程度低、淋巴细胞计数高等于干扰素治疗的应答率高。此外, 临床用药患者会出现不同反应。IFN- $\alpha$  会出现发热、胃肠道反应等不良反应, PEG-IFN- $\alpha$  延长了半衰期, 却没有增加明显的不良反应, 患者一般耐受, 但仍有一些严重的不良反应如皮肤过敏、溃疡、肺毒性、白细胞和血小板减少、焦虑幻觉等, 这些不良的生理和心理反应也会影响治疗效果。

另外还与细胞与病毒基因谱的变化、HBV 基因型、HBV DNA 水平等有关, 8 种 HBV 基因型对慢性乙型肝炎感染的自然进程、抗病毒治疗、临床结局等有影响<sup>[22]</sup>。临床上对两个经 PEG-IFN- $\alpha$  抗 HBV 治疗后 HBsAg 转阴的患者进行 HBV 全序列基因组扩增、克隆来对比两者 HBV 序列的异同, 结论是

HBsAg 转阴可能与病毒本身相关<sup>[23]</sup>。顾锡炳等<sup>[24]</sup>认为慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与 HBV 特异性 CTL 和 Th1 水平有关, HBV DNA 水平影响抗病毒疗效的机制可能与 HBV 特异性 CTL 和 Th1 水平有关。

### 4 小结及展望

IFN- $\alpha$  不易引起耐药和病毒变异, 是临床抗病毒治疗的首选药物之一。PEG-IFN- $\alpha$  弥补了 IFN- $\alpha$  半衰期短的缺点, 并逐渐有取代之势, 对普通和长效干扰素的抗 HBV 作用机制的研究给临床应用提供了更有力的理论依据。而临床资料显示只有 1/3 的慢性乙型肝炎患者对于干扰素治疗有反应<sup>[25]</sup>, 可能与 HBV 抵抗干扰素有关, 但相关机制还不清楚, 对其深入研究可以改善干扰素的临床治疗效果。

### 参考文献

- [1] Liaw YF. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: opportunities and challenges in Asia[J]. *J Hepatol*, 2009, 51(2): 403-410.
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550-6557.
- [3] Planas R, Morillas RM. Treatment of hepatitis B virus infection: present and future[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008, 31(6): 349-355.
- [4] Rustgi VK. Albinterferon alfa-2b, a novel fusion protein of human albumin and human interferon alfa-2b, for chronic hepatitis C[J]. *Curr Med Res Opin*, 2009, 25(4): 991-1002.
- [5] Bai HL, Luo HT, Ye YN, et al. Observaion on effect of peg interferon lphaa-2a treating lamivudine resistant chronic hepatitis B [J]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2010, 24(3): 230-231.
- [6] Mangano C, Squadrito G, Cacciola I, et al. Effectiveness of add-on Pegylated interferon alfa-2a therapy in a lamivudine-treated patient with chronic hepatitis B[J]. *Ann Hepatol*, 2011, 10(1): 84-87.
- [7] 李卫, 李铭, 李永华, 等. 聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a 治疗慢性乙型肝炎的疗效分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(6): 409-410.
- [8] Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 651-662.
- [9] Garcia-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente[J]. *Science*, 2006, 312(5775): 879-882.
- [10] Zhang Q, Wang Y, Wei L, et al. Role of ISGF3 in modulating the anti-hepatitis B virus activity of interferon-alpha in vitro[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(11): 1747-1761.
- [11] Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(6): 713-721.
- [12] Katze MG, He Y, Gale M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(9): 675-687.
- [13] Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity[J]. *Traffic*, 2002, 3(10): 710-717.
- [14] Peltekian C, Gordien E, Garreau F, et al. Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(6): 965-972.
- [15] 潘颖, 管世鹤, 陆应玉, 等. MxA 蛋白对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 复制的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(3): 213-215.

- [16] 魏新素,张平安,李艳,等. MxA 启动子和 eIF-2a 调节区 2 基因多态性对 HBV 感染自然转归的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 536-537.
- [17] Yu Z, Wang Z, Chen J, et al. GTPase activity is not essential for the interferon-inducible MxA protein to inhibit the replication of hepatitis B virus[J]. Arch Virol, 2008, 153(9): 1677-1684.
- [18] Park IH, Baek KW, Cho EY, et al. PKR-dependent mechanisms of interferon- $\alpha$  for inhibiting hepatitis B virus replication[J]. Mol Cells, 2011, 32(2): 167-172.
- [19] Samuel CE. Antiviral actions of interferons[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809.
- [20] 林绮文, 吴长有. IFN- $\alpha$  磷酸化 STAT1 和 STAT4 诱导人 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  并增强其杀伤活性[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 752-755.
- [21] Chen SH, Wu HL, Kao JH, et al. Persistent hepatitis B viral repli-
- cation in a FVB/N mouse model: impact of host and viral factors [J]. PloS One, 2012, 7(5): e36984.
- [22] 刘汉屈, 秦波. 干扰素治疗慢性乙型肝炎的分子机制研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(18): 1803-1808.
- [23] 闫涛, 李克, 王慧芬, 等. 长效干扰素治疗慢性乙型肝炎表面抗原转阴可能与 HBV 序列本身相关[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(4): 269-271.
- [24] 顾锡炳, 杨小娟, 王栋, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL、Th1、Th2 的关系[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(8): 1424-1426.
- [25] 杨凯, 徐元宏, 管世鹤. 乙型肝炎病毒抵抗  $\alpha$ -干扰素治疗研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 142-143.

(收稿日期: 2012-06-09)

• 综 述 •

## 人类布鲁氏菌病实验室诊断和临床治疗研究进展\*

乔秀强<sup>1</sup>, 张海娟<sup>2</sup>综述, 朱德全<sup>1△</sup>, 冯尚彩<sup>2</sup>审校

(1. 临沂市人民医院临床检验中心微生物检验科, 山东临沂 276003; 2. 临沂大学山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心, 山东临沂 276000)

**关键词:** 布鲁氏菌病; 实验室技术和方法; 诊断; 综述

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.034

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)23-2889-03

人类布鲁氏菌病难以早期诊断, 主要是由于本病早期常常表现为不明原因的发热, 缺乏特异性的临床症状和体征。布鲁氏菌的生长对营养和环境都有较高的要求, 所以临床普通血培养对本菌的检出率并不高, 实验室诊断大部分还是依靠血清学和分子生物学检测。然而, 也有研究发现部分患者体内血清布鲁氏菌抗体呈阴性, 具有诊断学意义的血清布鲁氏菌抗体滴度尚未确定。目前, 国内外对于应用分子生物学技术检测出体内存在布鲁氏菌 DNA 的患者是否应采用长期抗菌药物治疗仍然存在争议。本文就实验室检测结果对本病诊断与治疗的临床意义作一综述。

### 1 布鲁氏菌病

据报道, 全球每年大约五十万布鲁氏菌新增病例, 然而由于许多本病患者易被误诊为其他疾病, 或被诊断为“发热待查”进行治疗, 据世界卫生组织(WHO)估计, 真实的发病率要比报告的数字高 10~25 倍。本病可通过与动物直接接触感染, 但主要还是通过食用受污染的动物源性食品以及未经消毒处理的奶制品而感染。此外, 还有不少关于细菌实验室获得性感染本病的报道<sup>[1]</sup>。

### 2 布鲁氏菌特征

布鲁氏菌革兰氏阴性, 需氧, 兼性细胞内寄生的球杆菌或短杆菌。该菌氧化酶、过氧化氢酶、硝酸还原酶和脲酶均为阳性。1985 年 WHO 布鲁氏菌病专家委员会按首选动物宿主、致病性以及某些特定的表型将本菌分外 6 个种 19 个生物型: 羊种(生物型: 1-3)主要寄生于绵羊和山羊体内; 牛种(生物型: 1-7 和 9)主要寄生于牛和其他牛科体内; 猪种(生物型: 1-5)主要寄生于猪体内; 绵羊型副睾种、沙林鼠种、犬种。最近有研究

发现了两个海洋动物源型的新物种: 海豹种和海豚种<sup>[2]</sup>, 以及普通的田鼠种<sup>[3]</sup>、赤狐种<sup>[4]</sup>。临床上以羊、牛、猪三种意义最大, 羊种致病力最强。

除猪种 3 型只有 1 条 3.1Mb 染色体外, 其余生物型均有 2.1Mb 和 1.5Mb 两条环状染色体。机体感染本菌后可引起体液免疫和细胞免疫, 以细胞免疫为主。

### 3 布鲁氏菌病临床表现和治疗

本病潜伏期从几个星期到几个月不等, 急性期感染的表现颇似重度感冒, 典型病例热型呈波浪状, 初起体温逐日升高, 达高峰后缓慢下降, 热程约 2~3 周, 间歇数日至 2 周, 发热再起, 反复数次, 称“波状热”。感染初期, 患者常表现为头痛, 关节痛和肌肉痛, 疲劳, 乏力, 消瘦, 寒战, 大汗淋漓等。急性期通常伴有菌血症, 布鲁氏菌随血液蔓延到合身各个器官系统, 主要侵犯网状内皮组织, 例如肝、脾、骨骼和造血系统。因此, 主要临床表现为肝肿大, 脾肿大<sup>[4]</sup>。由于布鲁氏菌可在单核吞噬细胞中生存和繁殖, 急性期可继续发展为慢性期, 本期以骨关节病变最为常见, 例如脊柱炎, 骶髂关节炎等<sup>[5]</sup>。神经布鲁氏菌病和心内膜炎是本病致命性的慢性期并发症<sup>[6]</sup>, 虽然部分并发症可危及生命, 但人类布鲁氏菌病患者病死率比较低(<1%)。

布鲁氏菌病是可以预防和治愈的传染性疾病。适当的抗菌药物治疗的主要目的是缩短疾病的自然病程, 减少并发症的发生率和预防复发。然而, 本病患者临床表现的多样性, 常导致误诊或延误诊断, 使并发症和病死率增高<sup>[7-8]</sup>。

虽然布鲁氏菌对抗菌药物的耐药性尚未研究明确, 但是研究认为应用单一抗菌药物或者短期应用抗菌药物对人类布鲁氏菌病的治疗都是不恰当的<sup>[9]</sup>。

\* 基金项目: 山东省科技发展计划资助项目(2010GSF10285)。△ 通讯作者, E-mail: zhudequan886@126.com。