

干扰素治疗后病毒性肝炎病人 干扰素中和抗体的检测及意义

徐启桓^① 彭文伟 陆玮伦

(中山医科大学附属第三医院传染内科; 广州 510630)

摘要 使用4种 α -干扰素的98例病毒性肝炎病人, 在治疗前、治疗期间及治疗后定期检测抗干扰素中和抗体, 结果发现阳性率为34.7%, 该抗体的产生与病人的性别、年龄、治疗前ALT水平、肝炎病毒感染类型, 以及肝炎的临床类型均无显著相关。低剂量干扰素较易产生中和抗体, 使用不同干扰素制剂产生中和抗体存在差异, 其中以rIFN- α 2a最高, IFN- α N₁最低; 但中和抗体的出现对干扰素的抗病毒疗效影响不大, 由于病例数较少, 干扰素治疗期间出现的肝炎再活动现象与抗干扰素中和抗体产生的关系未能下结论。

主题词 肝炎, 病毒性 / 治疗; 肝炎, 病毒性 / 免疫学; 干扰素 α / 免疫学; 抗体

中图分类号 R 512.6

随着干扰素广泛应用, 一些病人在接受干扰素治疗后, 产生针对干扰素的抗体引起了人们的关注。目前已知干扰素中和抗体, 在体外具有中和相应干扰素抗病毒活性的作用, 而在体内这些抗体的临床意义尚未能肯定。为此, 我们通过定期检测使用 α -干扰素治疗的病毒性肝炎病人的抗干扰素中和抗体, 以探讨该抗体的产生情况和临床意义。

1 材料和方法

1.1 病人资料

98例病人均选自1994年7月~1996年4月在本院住院或门诊使用 α -干扰素的病毒性肝炎患者, 其中男性83例, 女性15例, 年龄为5~66岁(平均30.6岁)。在98例病人中, 慢性乙型肝炎59例, 慢性丙型肝炎24例, 急性丙型肝炎9例, 慢性乙型肝炎重叠丙型肝炎4例, 慢性乙型肝炎重叠丁型肝炎2例。上述病例均符合1990年全国第6次病毒性肝炎会议(上海)诊断标准。

1.2 干扰素治疗情况

患者均选用 α -干扰素治疗。其中rIFN- α 2a 66例(瑞士罗氏药厂生产的罗扰素29例, 中外合资沈阳三生药业有限公司生产的因特芬37例), rIFN- α N₁(惠福仁、英国葛兰素威康制药集团生产)15例, rIFN- α 2b(干扰能, 美国先灵葆雅公司生产)9例和rIFN- α 1a(干扰

灵, 卫生部上海生物制品研究所生产)8例。剂量为3~6MU, 隔日一次, 经肌肉注射, 疗程为4~6个月。

1.3 干扰素治疗反应的评价标准

对于慢性乙型肝炎病人, 若ALT复常及HBeAg和HBV-DNA阴转在干扰素停药后半年仍长期阴转, 或对于丙型肝炎病人, 若ALT复常及HCV-RNA在干扰素停药后半年仍长期阴转, 都判断为完全应答。若ALT水平较治疗前3次以上的ALT平均值下降超过一半以上或少于正常ALT上限的1.5倍, 则判断为部分应答; 若ALT水平及病毒复制指标无明显改变, 则判断为无应答。若在干扰素治疗期间ALT已经完全复常后, ALT再次上升超过正常上限两倍以上者, 则判断为肝炎再活动。如疗程结束但未满半年, 则视为即时完全应答、部分应答和无应答。

1.4 试剂和方法

采用生物方法测定中和抗体^[1]。

1.4.1 检测的标本、试剂 ①血清标本 取自上述病人, 分别于干扰素治疗前和治疗后1、2、3、4、5、6个月收集血清, 采血时间均至少在注射干扰素20h后进行, 将血清分装放-20℃冰箱保存。②试剂 A 549细胞和水泡性口腔炎病毒(VSV)(由广州医学院微生物学教研室提供, 来源于中国医科院病毒研究所); 无菌小牛血清(由广州畜牧场提供); 1640营养剂(由美国L T公司提供); 胰蛋白酶(由Merck公司提供); Hepes缓冲剂(由日本Nacalai Tesque公司提供)。

^① 第一作者, 1963年出生, 男, 临床医学博士, 主治医师。

1.4.2 检测步骤 分别应用临床使用的上述5种干扰素检测相应病人的血清中和抗体。先将干扰素稀释成浓度为20 U/mL的样品,吸取50 μ L加入96孔微量细胞培养板,然后加入经等倍稀释的待测血清样本,充分作用后再加A549细胞悬液100 μ L,经CO₂孵箱培养18~24 h后加入1:2000的VSV悬液200 μ L,继续培养20~24 h,记录每孔细胞病变出现情况。

1.4.3 干扰素中和抗体的计算 按Reed-Muench法计算干扰素效价的原理来计算中和抗体滴度^[1]。

1.5 其他检测项目

病人在接受 α -干扰素治疗前及治疗后每个月检测外周血象、肝功能(包括ALT、AST、T BIL,等)、乙肝病人检测HBsAg、anti-HBs、HBeAg、anti-HBe、anti-HBc及HBV-DNA,丙肝病人检测anti-HCV和HCV-RNA,在治疗前后作肾功能检查。

1.6 统计学方法

干扰素中和抗体阳转率的比较用卡方检验,干扰素平均使用剂量的比较用 t 检验。

2.1 抗干扰素中和抗体产生情况

全部患者治疗前均无抗干扰素中和抗体。在使用干扰素1~6个月后,有34例产生可测定水平的中和抗体与64例中和抗体阴性病人比较,两组病人无论在性别、年龄、ALT水平、肝炎病毒感染类型及临床类型上均无显著的统计学差异。

在中和抗体出现时间方面,34例抗体阳转的病人中,在干扰素治疗1个月和2个月后的抗体阳转率分别为53%和88%,至第3、4个月后分别达94%和100%。抗体滴度峰值(单位KU/L)最低为5,最高为79,平均为30.4。17例病人抗体滴度峰值 ≥ 32 。在治疗后第3、6个月达到峰值者分别为29%和85%。14.7%的病人在治疗第6个月后抗体滴度有所下降。

2.2 抗干扰素中和抗体与治疗反应

在干扰素治疗4~6个月以及治疗结束后6个月时,中和抗体阳性和阴性两组病人对干扰素疗效比较,经统计学处理均无显著性差异(表1、表2)。

2 结果

表1 干扰素治疗4~6个月时疗效比较

临床疗效	病例	抗干扰素中和抗体		P
		阳性	阴性	
即时应答	44	14(41.2%)	30(46.9%)	> 0.5
部分应答	10	3(8.8%)	7(10.9%)	> 0.5
无应答	32	11(32.4%)	21(32.8%)	> 0.5
肝炎再活动	12	6(17.6%)	6(9.4%)	< 0.5
合计	98	34	64	

表2 干扰素治疗结束6个月后疗效比较

临床疗效	病例	抗干扰素中和抗体		P ¹⁾
		阳性(7例)	阴性(26例)	
完全应答	10	2(28.6%)	8(30.8%)	1.0
部分应答	10	1(14.2%)	9(34.6%)	0.294
无应答	7	2(28.6%)	5(19.2%)	0.469
肝炎再活动	6	2(28.6%)	4(15.4%)	0.376
合计	33	7	26	

1) Fisher 精确检验法

另一方面,抗体滴度 ≥ 32 的17例病人与抗体滴度 < 32 的17例病人对干扰素疗效比较,两者无统计学上显著性差异($P > 0.5$)。

2.3 抗干扰素中和抗体产生的影响因素

2.3.1 不同病种病人的抗干扰素中和抗体的阳性率

59例乙型肝炎病人在干扰素治疗后,有21例产生抗

体而33例丙型肝炎患者中有12例产生抗体,两组无显著性差异($P > 0.75$)。

2.3.2 使用不同干扰素剂型的抗干扰素中和抗体的阳性率 本组病人共使用了5种不同厂家的 α -干扰素制剂,中和抗体产生情况见表3。rIFN- α 2a与其他剂型

干扰素比较,中和抗体阳性率分别为45.5%和12.5%。两组有显著性差异($P < 0.005$)。而国产和进口rIFN- α 2a比较,其中和抗体阳性率也有显著性差异($P < 0.005$)。

表3 不同剂型干扰素的中和抗体阳性率

干扰素剂型	病例数	抗干扰素中和抗体		阳性率(%)
		阳性	阴性	
rIFN- α 2a(进口) ¹⁾	29	6	23	20.7
rIFN- α 2a(国产) ¹⁾	37	24	13	64.9
rIFN- α 2b(干扰能) ²⁾	9	1	8	11.1
rIFN- α 1a(干扰灵) ²⁾	8	2	6	25
rIFN- α N1(惠福仁) ²⁾	15	1	14	6.3
合计	98	34	64	34.7

1)两项合并后阳性率为45.5%; 2)3项合并后阳性率为12.5%

2.3.3 干扰素的使用剂量及疗程与抗干扰素中和抗体的产生 中和抗体阳性和阴性两组病人中,平均每次使用剂量分别为3.118 MU和3.586 MU,两者经统计学处理有显著性差异($P < 0.01$)。在干扰素治疗头4个月,随着疗程的延长而中和抗体阳转率增加,至4个月后可检测到全部阳性者。

2.3.4 干扰素的不良反应和抗干扰素中和抗体的相关性 不良反应主要表现为发热、胃纳减退、白细胞减少等,多在1~4周内消失。个别病人出现脱发、皮疹等。中和抗体阳性组与阴性组比较,两组的不良反应出现情况相似。

3 讨论

一些学者报道^[2~5]病毒性肝炎病人在 α -干扰素治疗后中和抗体的阳转率相差很大,由0~39%。在本组病例中,治疗前均未检测到中和抗体,在治疗期间有34.7%的患者产生该抗体。有研究显示^[3,4],中和抗体的阳性率与病人所患的疾病、使用的干扰素剂型、剂量及疗程、以及检测的敏感性等有关。本组研究显示乙型肝炎和丙型肝炎患者在干扰素治疗后的中和抗体产生情况基本相同。本组使用的四种干扰素制剂中,中和抗体阳转率以rIFN- α 2a最高,IFN- α N1最低,差异有显著性意义($P < 0.005$),结果与Antonelli G等^[4]报道基本相一致。上述现象可能与不同的干扰素亚型的免

疫原性的差异有关。我们发现接受国产和进口rIFN- α 2a治疗者中,中和抗体阳性率分别为64.9%和20.7%,差异有显著性意义($P < 0.005$),其原因尚未明确。在本研究中,我们观察到使用小剂量干扰素更容易产生中和抗体这一现象。Gisler等^[6]认为IFN- α 主要影响B细胞的早期分化,当干扰素剂量增大时,抑制作用明显。使用小剂量干扰素容易产生中和抗体可能与此有关。

关于出现抗干扰素中和抗体的临床意义目前仍不清楚。本研究结果表明在使用干扰素治疗期间出现中和抗体并不影响干扰素疗效。虽然在肝炎再活动率方面中和抗体阳性组高于阴性组,但可能由于病例数较少,两者在统计学上也无显著性差异。虽然有多个学者的临床研究结果显示中和抗体的出现可导致干扰素治疗的无效^[3,7],但在这些研究的病例中也存在着一些难以解释的现象,如在该抗体阳性的病人中也有一定比例的完全应答者。虽然在体外证实了干扰素中和抗体具有中和干扰素保护细胞免受病毒损害的作用,事实上干扰素在体内的作用要比体外复杂得多。在体内,当干扰素受体对干扰素的亲和力比中和抗体对干扰素的亲和力更大时,中和抗体可能对干扰素的活性影响不大。此外,已经证实除了抗病毒活性之外,干扰素还具有一系列的细胞免疫调节功能^[8]。推测干扰素可能通过其免疫调节作用,增强细胞免疫和体液免疫功能而达到治疗的目的。至于中和抗体的出现对干扰素长期疗效的影响,还有待于进一步的观察。

(本课题得到广州医学院梁希若教授、马桂璋教授和李叔田老师的热心帮助,在此表示衷心感谢)

参 考 文 献

- 1 杜平. 医用干扰素学. 北京: 解放军出版社, 1985. 283~284
- 2 Galon J, Bedford P, Scott J E, *et al.* Antibodies to lymphoblastoid interferon. *Lancet*. 1989, 2:572
- 3 Lok S F, Lai C L, Leung K Y, *et al.* Interferon antibodies may negate the antiviral effects of recombinant alpha-interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1990, 12:1266
- 4 Antonelli G, Currenti M, Tuniziani O, *et al.* Neutralizing antibodies to interferon A: relative frequency in patients treated with different interferon preparations. *J Infect Dis*. 1991, 163:882
- 5 Porres J C, Carreno V, Ruiz M, *et al.* Interferon antibodies in patients with recombinant interferon. *J Hepatol*. 1989, 8:351
- 6 Gisler R H, Lindahl P, Gresser I, *et al.* Effects of interferon on antibody synthesis in vitro. *J Immunol*. 1974, 113:438
- 7 Brand C M, Leadbeater L, Bellati G, *et al.* Antibodies developing against a single recombinant interferon protein may neutralize many other interferon-alpha subtypes. *J Interferon Res*. 1993, 13(2):121
- 8 卢锦汉. 医学生物制品学. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 884~888

(1996-11-27 收稿 1997-06-25 修回)

DETECTION OF ANTI-INTERFERON NEUTRALIZING ANTIBODY FROM VIRAL HEPATITIS PATIENTS RECEIVING INTERFERON TREATMENT

Xu Qihuan Peng Wenwei Lu Weilun

(Department of Infectious diseases, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510630)

The authors tested for the presence of anti-IFN neutralizing antibody by means of biological neutralization assay technique in 98 cases of viral hepatitis before, during and after treatment with different subtypes of IFN-alpha. Thirty four patients (34.7%) developed such kind of antibody 1~6 months after the start of treatment. No significant differences were observed on the distribution for sex, age, pretreatment ALT level, type of hepatitis viruses and clinical types of hepatitis between the group of cases who developed neutralizing antibody and the group who did not. But the average dose of IFN in the former group was significantly lower than the latter group ($P < 0.01$). In cases treated with different preparations of IFN-alpha, the seroconversion rates of neutralizing antibody were 45.5%, 11.1%, 25%, and 6.3% for rIFN-alpha 2a, rIFN-alpha 2b, rIFN-alpha 1a and IFN-alpha N1 respectively ($P < 0.005$). On the other hand, in the evaluation of clinical response after IFN-alpha treatment, no significant differences were found between the group of cases who developed neutralizing antibody and the group who did not, in respect to complete response, partial response and no response. These results suggested that the presence of neutralizing antibody in patients treated with IFN-alpha might not interfere with the antiviral response to IFN.

Subject headings hepatitis, viral, human/ therapy; hepatitis, viral, human/ immunology; interferon-alpha/ therapeutic use; interferon-alpha/ immunology; antibodies