

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.016

胸腺五肽显著增强干扰素在抗病毒治疗中的特异性 CTL 效应 *

田 洲 渠亚超 鲍旭丽 谢 云 郭 佳 阎 军[△]

(首都医科大学附属北京佑安医院肝病与肿瘤生物治疗科 北京 100069)

摘要 目的:探究在 e 抗原(HBeAg)阳性的慢性乙型肝炎患者采用聚乙二醇干扰素-2a(peg-2a)联合核苷类药物治疗过程中,加用胸腺五肽对细胞免疫应答的影响。**方法:**选择采用聚乙二醇干扰素 α -2a 联合核苷类药物(拉米夫定+阿德福韦酯)治疗 48 周, HBeAg 仍为阳性,且 HLA-A2 阳性的慢性乙型肝炎患者 18 例,分为两组。一组原方案延长联合治疗作为对照,另一组在原方案基础上再加用胸腺五肽治疗(10 mg/次,2 次/周,共 24 周)治疗,所有病入均治疗至 96 周。并做体外 HBV 特异性细胞毒 T 淋巴细胞(HBV specific CTL)培养增殖,通过 Elispot 技术分析其分泌细胞因子(肿瘤坏死因子- α , 干扰素- γ , 白介素-10)的功能。**结果:** HBeAg 转阴率, 治疗 96 周时联合胸腺五肽组为 44.4%(4/9), 原方案对照组为 22.2%(2/9)。HBsAg 滴度,48 周时,HBsAg 为 4571 ± 3772 IU/mL;96 周时,联合胸腺五肽组为 1962 ± 2869 IU/mL, 转阴 1 人,原方案对照组为 3490 ± 3124 IU/mL, $P=0.093$ 。HBV 特异性 CTL 培养增殖,96 周时联合胸腺五肽组高于原方案对照组, 且联合胸腺五肽组 TNF- α 的分泌也高于原方案对照组, $P<0.05$ 。**结论:**胸腺五肽显著增强干扰素抗病毒治疗过程中的特异性 CTL 效应。

关键词:慢性乙型肝炎;胸腺五肽;细胞毒性 T 淋巴细胞

中图分类号:R512.62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)07-1259-04

Thymopentin 5 Significantly Enhanced the HBV-specific CTL Reactivity in Interferon Antiviral Therapy*

TIAN Zhou, QU Ya-chao, BAO Xu-li, XIE Yun, GUO Jia, LV Jun[△]

(Department of Hepatopathy and Cancer Biotherapy, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether Thymopentin 5 (TP5) affects cellular immune during interferon antiviral therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. **Methods:** 18 patients didn't achieve HBeAg seroconversion after peginterferon α -2a combined with lamivudine and adefovir dipivoxil for 48 weeks. They were randomly divided into two groups including continuing interferon based combination therapy with (n=9) or without (n=9) TP5 (10 mg, twice a week for 24 weeks) till 96 weeks. We conduct in vitro HBV specific CTL cultures and proliferation assays, HBeAg-induced cytokine secretion (INF- γ , TNF- α , IL-10). **Results:** In TP5 administrated group, the rate of HBeAg seroconversion was 44.4 % (4/9), mean HBsAg level was 1962 ± 2869 IU/mL. In control group, the rate of HBeAg seroconversion was 22.2 % (2/9), mean HBsAg level was 3490 ± 3124 IU/mL. Proliferative response of HBV specific CTL in TP5 administrated group was relatively strong at week 96. TNF- α production also increased at week 96 in TP5 administrated group, as compared to control group. **Conclusions:** Thymopentin 5 significantly enhanced the HBV-specific CTL reactivity in interferon antiviral therapy.

Key words: Chronic Hepatitis B; Thymopentin 5; Cytotoxic Lymphocyte

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1259-04

前言

乙型肝炎病毒(HBV, Hepatitis B Virus)是非细胞毒性病毒,慢性乙型肝炎(Chronic Hepatitis B, CHB)的发病机理主要是机体清除乙肝病毒而引发的细胞免疫反应,受机体和病毒两方面影响。机体产生的针对 HBV 抗原的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic Lymphocyte, CTL)在清除病毒和引起肝细胞损伤的过程中发挥主要作用,其数量和功能状况与乙肝的转归及抗病毒疗效密切相关^[1-4]。HBV 特异性 CTL 主要通过分泌细胞因子等发挥非溶细胞性作用清除 HBV, 也通过溶细胞性作

用导致肝细胞损伤和病毒清除,但都会不同程度地引起非特异性免疫活性细胞在肝内浸润而导致肝细胞受损^[1,2,4]。

干扰素 α (IFN- α)、核苷(酸)类似物(NUC)单药治疗是目前 CHB 抗病毒治疗的标准治疗方法,且 CHB 患者在抗病毒治疗后,远期预后获得了显著改善^[5-7]。但干扰素单药治疗适用人群和应答率均有限,停药后持续应答率不高;核苷(酸)类似物单药治疗多数患者需要长期甚至终身用药,但长期治疗中,病毒耐药变异率较高,病毒耐药后疾病进展加快,这些因素均限制了 CHB 患者单药治疗的临床应用。随着抗病毒治疗经验的积累,将不同作用机制的 IFN- α 和 NUC 药物联合应用进行抗

* 基金项目:"215" 高层次卫生技术人才队伍建设工程培养计划学科带头人(2011-J.L.);首都医学发展科研基金(2009-3156)

作者简介:田洲(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝脏疾病,电话:13810963971, E-mail:1999tm@sina.com

[△] 通讯作者:阎军, E-mail: lujun98@gmail.com

(收稿日期:2014-10-11 接受日期:2014-11-02)

病毒治疗已经成为此领域专家们的共识^[8]。

既往研究发现,在急性乙型肝炎中,可产生强烈的多克隆的 CTL 反应,但在慢性感染的患者中,CTL 反应低下,甚至无反应^[9]。研究显示,在接受抗病毒治疗的乙肝早期患者中,HBV 特异性 T 细胞的免疫应答反应可以被部分恢复^[2,9],这提示在 CHB 过程中 T 细胞功能不良并非是不可逆的。目前治疗慢乙肝的干扰素具有部分免疫调节剂作用,临床经验也显示部分患者可以通过干扰素治疗获得 CHB 的免疫控制。胸腺五肽保留了胸腺生成素 II 的生物活性,具有诱导 T 细胞分化,促进 T 淋巴细胞亚群发育、成熟及活化和诱导干扰素的生成等功能,参与机体的免疫调节,与干扰素具有理论上的协同作用。既往研究也显示,胸腺肽治疗慢乙肝能够提高慢乙肝患者的长期预后^[10,11]。

我们在临床上发现干扰素联合核苷类似物治疗的慢乙肝患者,在加用胸腺五肽后,相比不加用者,HBsAg 转阴率和 HBsAg 滴度下降明显。本研究对于已经采用干扰素治疗 2 年的慢乙肝患者加用胸腺五肽治疗,观测患者加用胸腺五肽后自身细胞免疫应答发生的变化。

1 材料与方法

表 1 基线患者资料

Table 1 Baseline characteristics of patients

	TP5 administrated group(n=9)	Control group(n=9)
Sex (male/female)	6 / 3	7 / 2
Mean age (year)	35.4± 10.9	33.7± 8.3
(The range of age)	(20-53)	(23-54)
HBV genotype		
B	4	4
C	5	5
Serum ALT (U/L)	144± 83	150± 101
HBV DNA (lg copies/ml)	6.99± 1.04	7.05± 1.43
Serum HBsAg (IU/ml)	6579± 4216	6307± 4942
Serum HBsAg at 48 weeks (IU/ml)	4412± 3985	4673± 3697

1.2 观察指标

观察患者在 48、72 和 96 周的 HBV DNA 定量,乙肝五项和 ALT,并在 48、96 周留取血样。血清 HBV DNA 定量检测使用 Applied Biosystems 5700 荧光定量 PCR 仪;乙肝五项检测使用罗氏 E601 型全自动电化学发光分析仪;ALT 测定使用 Beckman 5400 模块式生化分析仪。

1.3 HLA 分型检测

由于我们应用 HLA-A2 限制性表位肽 / 四聚体复合物 (tetramer complex) 即四聚体技术结合多色流式分析 CTL 的数量,因此在 48 周抽取病人血样,加入抗凝剂,按 Morgan HLA SSP A Typing Kit 和 EZhigh DNA extraction kit (均为 TBG 产品)说明书操作,筛选 HLA-A2 阳性患者入组。

1.4 分离人外周血单核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)

按上述时间点,抽取入组患者的血样,按 Lymphoprep (Axis-shield) 所述方法分离外周血单核细胞,加入 1640 冻存液后,

1.1 对象

选择 2009 年 1 月至 2012 年 6 月期间在我院门诊治疗的 HBsAg 抗原阳性的慢性乙型肝炎患者 18 例。所选患者均符合 2010 年版《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准,治疗标准符合干扰素治疗适应症,HLA-A2 阳性,均已接受干扰素联合核苷类似物治疗 48 周。排除标准:合并其他病毒感染 (HCV, HDV, EBV, CMV, HIV 等);其他原因引起的肝病:包括酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎、药物性肝炎、自身免疫性肝炎等。18 例患者均已接受聚乙二醇干扰素 α -2a (PEG-IFN, 派罗欣, Roche 公司, 180 μ g) 180 μ g $\cdot$ w⁻¹ 阿德福韦酯 (ADV, 贺维力, GSK 公司, 10 mg) 10 mg $\cdot$ d⁻¹ 拉米夫定 (LAM, 贺普丁, GSK 公司, 100 mg) 100 mg $\cdot$ d⁻¹ 联合抗病毒治疗 48 周,且第 48 周末出现 HBsAg 血清学转换。将 18 例患者随机分为两组,一组 (9 人) 继续上述治疗至 96 周,另一组 (9 人) 在延长上述治疗至 96 周基础上,于 48 周加用胸腺五肽 (Thymopentin 5, TP-5, 欧宁, 双鹭公司, 10 mg) 10 mg, 每周两次连用 24 周。治疗前两组患者的性别、年龄、基因型、ALT 水平、HBV DNA 定量及 HBsAg 定量见表 1, 其各项身体条件无统计学差异。

置于 -80℃, 24 小时后转入液氮保存。

1.5 体外 HBV 特异性 CTL 培养增殖

复苏冻存的 PBMC, 用 PBS 洗涤两次, 六孔板中每孔加入 2×10^6 细胞, 用含有 5% 人 AB 血清的 RMPI-1640 (HyClone) 重悬。在第一天加入 1 μ g/mL HBsAg (Virostat) 和 1 μ g/mL HBV core 18-27 peptides (序列为 FLPSDFFPSV)。第二天加入 40 U/mL IL-2 (Peprotech)。隔天换液, 每次抽出 0.4 mL, 加入 0.5 mL 含有 1 μ g/mL HBsAg, 1 μ g/mL HBV core 18-27 peptides, 40 U/mL IL-2 和 5% 人 AB 血清的 RMPI-1640。37℃、5% CO₂ 条件下孵育 9 天。将 HLA-A2 阳性患者刺激增殖后的 PBMC 和刺激增殖之前的 PBMC 用抗 CD3-PCy5, CD8-PE (BD Biosciences) 和 tetramer-PCy7 (旷博) 染色, 进行流式细胞仪检测, 每份样品细胞数大于 10^5 。

1.6 HBsAg 诱导的细胞因子分泌 (肿瘤坏死因子 α , 干扰素 γ , 白介素 -10)

我们使用酶联免疫斑点法 (Elispot) 来检测 HBsAg 特异性

T 淋巴细胞活性。将复苏的 PBMC 按 2×10^5 细胞 / 孔在 96 孔板 (Mabtech) 中 37°C , 5 % CO_2 孵育 48 小时, 每孔加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HBcAg。阳性对照孔加入植物血凝素 (PHA), 阴性对照孔用 RPMI-1640 代替 HBcAg, 反应孔做 3 个复孔。严格按试剂盒说明书操作 (Mabtech), 培养板在读板机统一条件下读板。以每 1×10^6 PBMC 受 HBcAg 刺激后形成的斑点数 (Spot-forming Cells, SFC) 为反应强度判定单位, 结果表示为 SFC / 10^6 PBMC。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数比较用 t 检验, 计数资料的比较用卡方检验, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

在治疗 48 周时, 18 人 HBV DNA 均小于 500 copies/ml (100%)。在 HBeAg 指标方面, 治疗 96 周时联合胸腺五肽组的 HBeAg 转阴率为 44.4 % (4/9), 原方案对照组为 22.2 % (2/9)。在 HBsAg 指标方面, 48 周时, HBsAg 为 4571 ± 3772 IU/ml; 96

周时, 联合胸腺五肽组为 1962 ± 2869 IU/mL, 转阴 1 人, 原方案对照组为 3490 ± 3124 IU/mL, $P = 0.093$, 见图 1。我们可以观察到, 随着治疗的继续, HBeAg 和 HBsAg 都在持续下降。

2.2 HBV 特异性 CTL 增殖

48 周刺激前为 0.13 % (0.01-0.33 %), 刺激后为 0.25 % (0.02-0.58 %)。96 周联合胸腺五肽组刺激前为 0.12 % (0.01-0.34 %), 刺激后为 0.46 % (0.07-1.40 %); 原方案对照组刺激前为 0.09 % (0.01-0.29 %), 刺激后为 0.23 % (0.05-0.49 %), 见表 2。

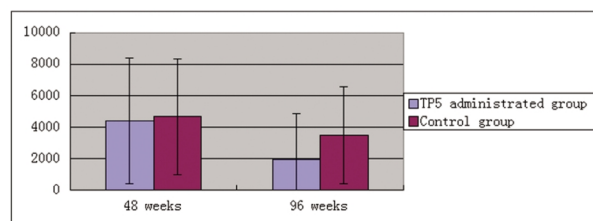


图 1 两组病人治疗期间 HBsAg 水平的变化

Fig. 1 Mean levels of HBsAg of two groups

表 2 HBV 特异性 CTL 增殖

Table 2 HBV specific CTL cultures and proliferation assays

Group	Pre-stimulation		Post-stimulation	
	48 weeks	96 weeks	48 weeks	96 weeks
All patients	0.13% (0.01-0.33%)		0.25% (0.02-0.58%)	
TP5 administrated group		0.12% (0.01-0.34%)		0.46% (0.07-1.40%)
Control group		0.09% (0.01-0.29%)		0.23% (0.05-0.49%)

2.3 HBcAg 诱导的细胞因子分泌

肿瘤坏死因子 $-\alpha$ (TNF- α), 干扰素 $-\gamma$ (IFN- γ), 白介素 -10 (IL-10) 的分泌见下图。在 96 周时, 联合胸腺五肽组 TNF- α 的

分泌 (692 ± 272) 要高于原方案对照组 (347 ± 328), $P = 0.049$, 而 IFN- γ ($P = 0.59$), IL-10 ($P = 0.92$) 的差异均无明显统计学意义, 见表 3。

表 3 Elispot 检测 HBcAg 特异性 T 淋巴细胞表达 TNF- α , IFN- γ , IL-10 水平

Table 3 HBcAg-induced cytokine secretion (INF- γ , TNF- α , IL-10) (units SFC/ 10^6 PBMC)

	48 weeks		96 weeks	
			TP5 administrated group	Control group
INF- γ	152 $\pm$ 125 (35-361)		157 $\pm$ 143 (67-322)	116 $\pm$ 119 (47-263)
TNF- α	506 $\pm$ 371 (44-831)		692 $\pm$ 272 (59-965)	347 $\pm$ 328 (0-712)
IL-10	239 $\pm$ 124 (21-366)		246 $\pm$ 119 (0-385)	231 $\pm$ 145 (22-359)

3 讨论

目前, 对慢性乙型肝炎的治疗策略是长期最大限度地抑制 HBV, 减轻肝细胞炎症坏死及纤维化, 延缓及减少并发症的发生。HBV 感染的控制及清除最终需要机体的免疫系统发挥作用。胸腺肽具有诱导 T 淋巴细胞分化, 促进 T 淋巴细胞亚群的发育、成熟及活化, 诱导干扰素的生成, 增强单核细胞的趋化及吞噬作用等功能, 从而起到调节机体免疫、抑制病毒复制的作

用。近年来已有文献报道在抗病毒治疗中大剂量胸腺肽制剂显示出比小剂量胸腺肽制剂更好的疗效^[12,13]。本研究观察所用胸腺五肽在治疗 CHB 的机制上与干扰素存在互补协同作用, 且其良好的安全性已经得到了长期临床验证, 这为胸腺五肽与抗病毒药物联合应用治疗 CHB 奠定了基础^[8]。本实验中, 胸腺五肽用量为 10 mg/ 次, 每周两次, 为较大剂量, 效果也比较明显, 相比于干扰素联合 NUC 组, HBeAg 阴转率和 HBsAg 的降低都比较明显。有文献报道, 干扰素联合胸腺五肽治疗在 HBV

DNA 转阴和 HBeAg 血清学转换上均优于干扰素单药治疗^[14,15]。HBV cccDNA(HBV 共价闭环状 DNA)存在于肝细胞核内,是病毒复制的模板,是反映肝细胞感染数量和胞内病毒复制水平最直接的指标。HBV cccDNA 很难从肝细胞内根除,是病毒持续感染及肝炎复发的根源。常规监测体内的 HBV cccDNA 水平在临床上并不可行,研究发现相对于血清 HBV DNA,HBsAg 水平更能反映肝内 HBV cccDNA 水平,HBsAg 的清除使病人更接近治愈状态^[16,17]。本实验中,联合胸腺五肽组 HBsAg 下降程度大于原方案对照组($p=0.093$),有待增大样本量进一步验证。

在 CHB 病人体内,HBV 特异性 CTL 反应非常微弱,甚至检测不到,可能是由于 HBV 特异性 CTL 优先"聚集"在肝内,导致外周血中特异性 CTL 相对减少^[18,19];慢性肝炎病程长,清除病毒过程中大量的 HBV 特异性 CTL 被消耗^[18,19]。但在体外特异性抗原刺激下,CTL 增殖能力迅速增加、IFN- γ 增多、细胞毒活性增强^[2,19,20]。我们通过体外 HBeAg 刺激培养发现联合胸腺五肽组 96 周的刺激后 HBV 特异性 CTL 相对于干扰素组增殖明显,96 周时 TNF- α 的分泌也明显高于干扰素组($P<0.05$),可能由于在抗病毒的基础上,五肽进一步恢复了部分 HBV 特异性 T 细胞反应,从而获得了比较好的临床效果,这也需要扩大样本量来进一步验证。

综上所述,对于干扰素联合核苷类似物治疗的慢乙肝患者,加用胸腺五肽能显著增强抗病毒治疗过程中的特异性 CTL 效应,从而获得更好的疗效。

参考文献(References)

- [1] Hileman M. Critical overview and outlook: Pathogenesis, Prevention and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus[J]. Vaccine, 2003, 21(32): 4626-4649
- [2] Yu Chen, Xuefen Li, Bo Ye, et al. Effect of telbivudine therapy on the cellular immune response in chronic hepatitis B[J]. Antiviral Research, 2011, 91(1): 23-31
- [3] Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, et al. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen[J]. J Exp Med, 1991, 174(6): 1565-1570
- [4] 陈瑜. 乙肝病毒感染的特异性 CTL 应答机制研究[D]. 浙江: 浙江大学医学院, 2001: 1-40
Chen Yu. Study on mechanism of specific CTL response to HBV infections [D]. Zhejiang: Zhejiang university school of medicine, 2001: 1-40
- [5] Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term followup of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 1996, 334(22): 1422-1427
- [6] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease [J]. N Engl J Med, 2004, 351(15): 1521-1531
- [7] Di MV, Marzano A, Lampertico P, et al. Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine[J]. Hepatology, 2004, 40(4): 883-891
- [8] 慢性乙型肝炎联合治疗专家委员会. 慢性乙型肝炎联合治疗专家共识[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2012, 4(1): 39-46
Expert Committee of Combined Treatment in Chronic Hepatitis B. Expert consensus on Combined Treatment in Chronic Hepatitis B[J]. Chinese Journal of Hepatology (Electronic Edition), 2012, 4 (1): 39-46
- [9] C Boni, A Bertolotti, A Penna, et al. Lamivudine Treatment Can Restore T Cell Responsiveness in Chronic Hepatitis B [J]. J Clin Invest, 1998, 102(5): 968-975
- [10] Baumann CA, Badamchian M, Goldstein AL. Thymosin alpha 1 antagonizes dexamethasone and CD3-induced apoptosis of CD4+ CD8+ thymocytes through the activation of cAMP and protein kinase C dependent second messenger pathways [J]. Mech Ageing Dev, 1997, 94 (1-3): 85-101
- [11] Loggi E, Gramenzi A, Margotti M, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with e Ag-negative chronic hepatitis B [J]. J Viral Hepat, 2008, 15(6): 442-448
- [12] 武宗导, 许洁, 王功大, 等. 不同剂量胸腺肽治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 交通医学, 2002, 16(4): 321-323
Wu Zong-dao, Xu Jie, Wang Gong-da, et al. The Therapeutic Efficacy of Different Dose of Thymoxin for the Treatment of Chronic Hepatitis B[J]. Medical Journal of Communications, 2002, 16(4): 321-323
- [13] 周荣乐, 孙鑫, 李攀, 等. 胸腺肽 a1 治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎疗效与安全性的随机对照试验的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2006, 6(3): 189-194
Zhou Rong-le, Sun Xin, Li Pan, et al. Efficacy and Safety of Thymosin-a1 for Chronic Hepatitis B: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Chin J Evid-based Med, 2006, 6(3): 189-194
- [14] 苏华科, 马英梅. 胸腺五肽联合干扰素治疗慢性乙型肝炎临床分析[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(11): 3253-3254
Su Hua-ke, Ma Ying-mei. Analysis of thymopentin 5 combined with interferon in chronic hepatitis B[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2005, 12(11): 3253-3254
- [15] 李长安, 庞盼姣. 胸腺五肽协同 a-2b 干扰素治疗慢性乙型肝炎临床体会[J]. 药物与临床, 2010, 17(33): 68-69
Li Chang-an, Pang Pan-jiao. Thymopentin 5 combined with interferon a-2b in treating chronic hepatitis B[J]. China Modern Medicine, 2010, 17(33): 68-69
- [16] Sonneveld MJ, Zoutendijk R, Janssen HL. Hepatitis B surface antigen monitoring and management of chronic hepatitis B [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(7): 449-457
- [17] 于乐成, 何长伦, 汪茂荣. HBsAg 定量与抗病毒治疗关系的研究进展[J]. 传染病信息, 2013, 26(4): 253-258
Yu Yue-cheng, He Chang-lun, Wang Mao-rong. Research progress of correlation between HBsAg quantification and antiviral treatment in patients with chronic hepatitis B [J]. Infect Dis Info, 2013, 26 (4): 253-258
- [18] Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection [J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1): 43-50
- [19] Boni C, Penna A, Ogg GS, et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 963-971
- [20] C Boni, A Penna, A Bertolotti, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B[J]. Journal of Hepatology, 2003, 39(4): 595-605