

慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中 HBV cccDNA 预测拉米夫定的治疗效果

郭皓宇, 谭德明, 徐旭雯

郭皓宇, 谭德明, 徐旭雯, 中南大学湘雅医院感染病科
湖南省长沙市 410008
郭皓宇, 男, 1972-10-22, 湖南省沅江市人, 2002 年中南大学湘雅医学院
博士, 主要从事病毒性肝炎的研究。
通讯作者: 谭德明, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院
感染科, guohaoyudf@tom.com
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-16

Predictive value of HBV cccDNA in PBMC of response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B

Hao-Yu Guo, De-Ming Tan, Xu-Wen Xu

Hao-Yu Guo, De-Ming Tan, Xu-Wen Xu, Department of Infectious
Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008,
Hunan Province, China
Correspondence to: Dr De-Ming Tan, Department of Infectious
Diseases, Xiangya Hospital, 87 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan
Province, China. guohaoyudf@tom.com
Received: 2005-03-01 Accepted: 2005-03-16

Abstract

AIM: To assess the value of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circle DNA (cccDNA) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for the prediction of the sustained response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B.

METHODS: Seventeen chronic hepatitis B patients with complete or partial response (serum HBV DNA turned negative, and ALT was normalized with or without HBeAg/anti-HBe seroconversion) were selected. HBV cccDNA in PBMC was detected at the end of lamivudine treatment, and 1 year after treatment.

RESULTS: Nine out of 17 patients were positive for HBV cccDNA in their PBMC at the end of lamivudine treatment. Virological relapse were found during 1-year follow-up in all of these 9 patients; whereas only 1 relapse was observed among the 8 patients without HBV cccDNA.

CONCLUSION: HBV cccDNA in PBMC at the end of treatment is of good predictive value for the sustained response to lamivudine treatment in chronic hepatitis B patients.

Key Words: Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; cccDNA; Peripheral blood mononuclear cells; Lamivudine

Guo HY, Tan DM, Xu XW. Predictive value of HBV cccDNA in PBMC of response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(10):1202-1205

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎拉米夫定治疗结束时, 外周血单个核细胞(PBMC)中HBV cccDNA(乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA)检测对拉米夫定持续应答的预测作用。

方法: 对慢性乙型肝炎患者 17 例进行拉米夫定治疗 48 wk, 获得完全或部分疗效(血清 HBV DNA 转阴, ALT 复常, 伴或不伴 HBeAg 血清转换), 48 wk 治疗结束时检测 PBMC 中 HBV cccDNA, 并对患者进行 1 a 的血清 HBVDNA 监测。

结果: 治疗结束时 PBMC 中 HBV cccDNA 为阳性 9 例, 阴性 8 例。在 PBMC 中 HBV cccDNA 阳性者, 停止治疗的 1 a 内所有患者的血清 HBVDNA 阳转。而 PBMC 中 HBV cccDNA 阴性者, 1 例血清 HBVDNA 阳转。

结论: 拉米夫定治疗结束时 PBMC 中 HBV cccDNA 的检测可能对拉米夫定治疗能否获得持续应答具有预测价值。

关键词: 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 共价闭合环状 DNA; 外周血单个核细胞; 拉米夫定

郭皓宇, 谭德明, 徐旭雯. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中 HBV cccDNA 预测拉米夫定的治疗效果. *世界华人消化杂志* 2005;13(10):1202-1205
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1202.asp>

0 引言

拉米夫定是目前治疗慢性乙型肝炎的最常用的药物之一。拉米夫定具有很强的抑制乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus; HBV) 作用, 临床应用后大多数患者血清 HBV DNA 滴度明显下降或阴转, 但中止治疗后易出现复发, 特别是在未取得完全应答疗效的患者^[1-3]。如何减少拉米夫定停药后复发的机会, 提高持续应答率一直是临床研究者关注的问题。尽管目前对拉米夫定治疗应答相关因素进行了较多的研究, 但尚未发现能确切

预测患者能否获得持续应答的指标. 拉米夫定对细胞内 HBV cccDNA 无直接的抑制作用, 细胞内 HBV cccDNA 存在被认为是拉米夫定停药后复发的主要原因^[4-6]. 因此, 拉米夫定治疗结束时 PBMC 中 HBVcccDNA 的检测可能对拉米夫定的治疗后的持续应答效果有预测价值.

1 材料和方法

1.1 材料 接受拉米夫定治疗 48 wk 时取得完全或部分应答(即血清 HBVDNA 转阴、ALT 复常、伴或不伴 HBeAg/抗 HBe 血清转换)的慢性乙型肝炎患者 17 例, 男 14 例, 女 3 例, 年龄 22-35 岁, 诊断均符合 2000 年西安会议“病毒性肝炎诊断标准”^[7], 以及符合拉米夫定的用药指征^[8]. 治疗 48 wk 后患者因用药有效而要求停止服药. 停药后随访 1 a, 随访方案参照《2001 年拉米夫定临床应用专家共识》^[8]: 停药后的前 3 mo 每月 1 次, 以后每 3-6 mo 1 次, 随访时检验肝功能、HBV 血清标志物和血 HBVDNA、以及 PBMC 中的 HBVcccDNA.

1.2 方法 取肝素抗凝全血, 以 Ficoll 密度梯度离心法获取 PBMC; 加入裂解液 (50 μ L/10⁶ cells, 上海申友公司提供), 煮沸 10 min, 14 000 g 离心 10 min, 取上清 2 μ L; 采用实时荧光 PCR 法检测 HBVcccDNA. 实时荧光 PCR 法由邵俊斌 *et al* 建立的巢式 PCR 方法进行^[9]. 第 1 次 PCR 以嵌合引物 (含 HBV 非特异和特异性序列), 以 HBV DNA 正链为模板通过常规 PCR (PCR 条件: 15 cycles 94 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s) 合成特异性的单链产物; 第 2 次 PCR 以单链产物为模板, 利用设计的特异性引物及探针通过荧光定量 PCR (PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min, 35 cycles 93 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s.) 扩增 HBVcccDNA, 定量结果从荧光定量 PCR

仪 (Bio-red PCR 仪) 上直接读出.

统计学处理 数据利用 SPSS 软件进行统计学处理, 应用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 PBMC 中 HBV cccDNA 检测的结果 HBVDNA 阳性 (HBVDNA < 10¹² copies/L 时) 的血清标本检测呈阴性, 而含 HBV 全基因双链 DNA 的质粒 DNA 检测呈阳性 (图 1). 说明成熟的基因组 HBV DNA 在本 PCR 反应体系中不能被扩增, 证明了本 HBV cccDNA 扩增体系具有较高的特异性. 拉米夫定治疗 48 wk 结束时, 均已取得了完全或部分应答的 17 例慢性乙型肝炎患者的 PBMC, 经检测 HBV cccDNA 阳性 9 例, 阴性 8 例 (图 2).

2.2 PBMC 中 HBVcccDNA 与拉米夫定停药后复发的关系 PBMC 中检出了 HBVcccDNA 阳性患者 9 例, 随访中有全部复发, 其中 3 mo 时复发 3 例; 6 mo 时复发 8 例; 随访 1 a 时, 全部患者的血清 HBVDNA 阳转, 伴有 ALT 升高 7 例. 8 例 PBMC 中未检出 HBVcccDNA 者, 1 例患者于停药后 6 mo 血清 HBVDNA 阳转, 但 ALT 正常 ($P < 0.01$).

2.3 PBMC 中 HBVcccDNA 与 HBeAg/抗 HBe 血清变化的关系 拉米夫定治疗 48 wk 时, HBeAg 阳性者 6 例, PBMC 中 HBV cccDNA 阳性 5 例; 而 7 例抗 HBe 阳性患者的 PBMC 中 HBV cccDNA 仅 1 例; PBMC 中 HBV cccDNA 与血清 HBeAg 阳性有伴随关系 ($P < 0.05$).

3 讨论

治疗慢性乙型肝炎的关键措施是抗病毒治疗. 目前已批准使用的抗病毒药物中最常用的是干扰素与拉米夫定. 拉米夫定抑制 HBV 复制的作用迅速而确切, 但过早停药, 或未取得 HBeAg/抗 HBe 血清转换的情况下

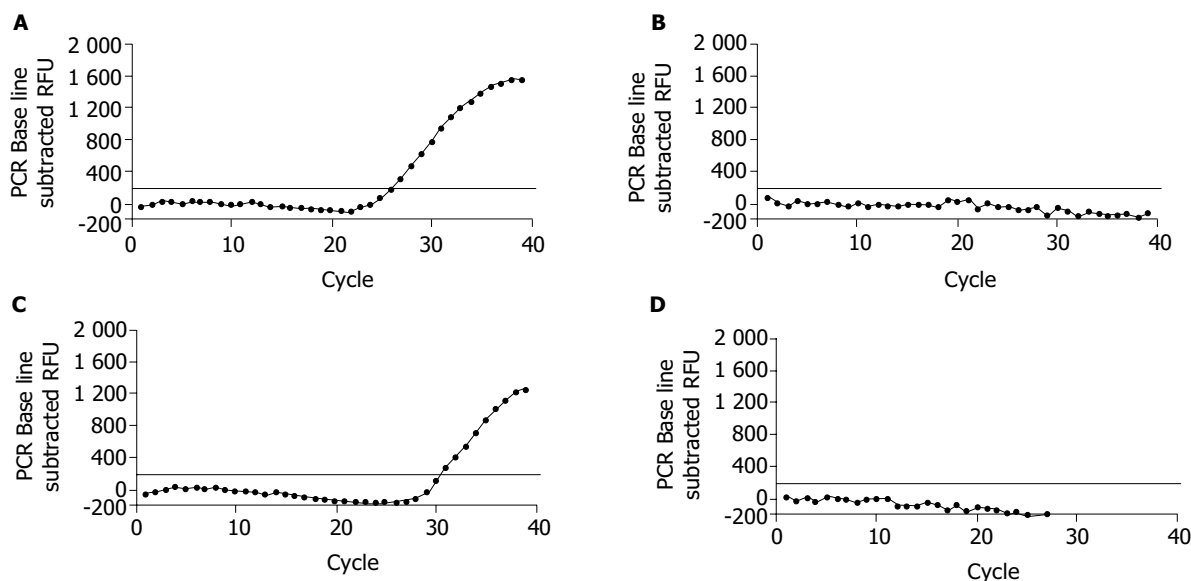


图 1 应用实时荧光定量 PCR 检测 HBV cccDNA 结果 (阳性: 曲线超过桔红色基线以上; 阴性: 曲线未达到桔红色基线). A: 质粒 DNA (阳性对照); B: 阴性对照; C: 血清 HBV DNA 阳性患者 PBMC DNA; D: HBV DNA 阳性血清.

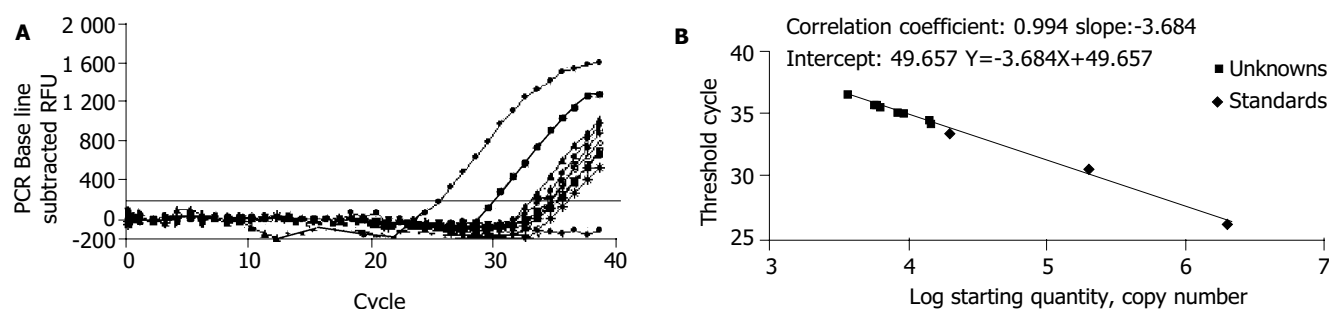


图2 17例慢性乙型肝炎患者PBMC中HBV cccDNA检测情况.A: 实时荧光定量PCR扩增曲线示意图:共22条曲线, 分别为:3份阳性标准定量标本(质粒DNA, 分别为 2×10^6 , 10^5 , 10^4 copies), 17份PBMC标本, 1份HBV DNA阳性血清标本, 1份阴性对照;其中曲线在基线之上者12条(阳性), 在基线之下者10条(阴性).B: 实时荧光定量PCR标准曲线示意图:此曲线显示了所有阳性产物的Ct值(线上的点即代表Ct值, Ct值对应着一个产物的copy数;蓝点为已知标本;红点为待测标本.如图所示, PBMC中HBV cccDNA阳性的标本, 其滴度基本上集中在 10^{-3} copies/cell左右.

停药, HBV再次复制活跃, 血清HBV DNA再次阳性, 以及由此导致的肝炎复发率较高. 拉米夫定停药后易复发的原因可能与药物对HBV复制的关键中间体HBV cccDNA无直接的抑制作用, 因此, 拉米夫定治疗后血清HBV DNA阴转, 但感染的细胞内HBV cccDNA很可能仍然阳性, 成为拉米夫定停药后HBV再次复制活跃的来源. HBV cccDNA存在于HBV感染的人体细胞内, 主要是肝细胞, 其次是外周血单个核细胞(PBMC)^[10-11]. 我们应用实时荧光PCR检测慢性乙型肝炎患者PBMC中HBVcccDNA, 取得了较好的效果. 在拉米夫定治疗48 wk后, 17例患者尽管血清HBV DNA均阴性, 但有9例患者PBMC中可以检出低水平的HBV cccDNA. 似乎表明拉米夫定对HBV cccDNA抑制作用较差, 血清HBV DNA阴转不能代表细胞内HBV DNA被清除. 一些体外试验的结果表明拉米夫定对HBV cccDNA无抑制作用^[4, 12-13], 但我们发现17例患者治疗后有8例PBMC中HBVcccDNA呈阴性, 9例阳性者其HBVcccDNA滴度也不高, 这有可能是拉米夫定的长期应用, 通过间接的作用, 减少和消耗了细胞中的HBVcccDNA, 使其滴度下降和阴转, 这提示经过长期的抗病毒治疗是有可能清除体内的HBV.

对17例经拉米夫定治疗取得初步疗效而停药的患者进行1 a的随访研究(拉米夫定治疗后肝炎复发绝大部分发生在停药后的1 a中^[8]). 有10例患者血清HBV DNA再次阳性, 复发率58.8%. 在复发的10例患者中, 停药时PBMC中有9例检出HBVcccDNA. 由此可见, HBVcccDNA确与拉米夫定停药后病毒再次复制活跃有关, 甚至可能即为复发的来源. 从另一个角度讲, 对停药时PBMC中HBVcccDNA的检测也可能有助于医师对停药后复发可能性的预测. 在拉米夫定临床应用专家指导意见中^[8], 强调了HBeAg/抗HBe血清转换对持续应答的重要性. 从本结果来看, 确实是发生了HBeAg/抗HBe血清转换的患者其停药后复发率(1/7, 14.3%)明显地低于未发生HBeAg/抗HBe血清转换患者的复发

率(6/7, 85.7%);PBMC中HBVcccDNA的检出率(1/9, 11.1%)明显地低于未发生HBeAg/抗HBe血清转换患者的检出率(8/9, 88.9%). 此外, 尽管HBeAg/抗HBe血清转换对抗病毒停药后的复发能起到较好的预见作用, 但仍有一些已发生HBeAg/抗HBe血清转换者停药后复发的例子^[14]. 我们也观察到, 发生了HBeAg/抗HBe血清转换者中, 有1例PBMC中检出了HBV cccDNA, 这例患者在停药1 a内复发. 因此, 在观察HBeAg/抗HBe血清转换的同时, 监测PBMC中HBV cccDNA, 可能更好地帮助临床医师预测拉米夫定停药后复发地可能性, 指导医师更合理地应用拉米夫定及其他抗病毒药物治疗.

4 参考文献

- Mazur W, Krol F, Cianciara J, Nazzari K, Gladysz A, Juszczak J, Bolewska B, Adamek J, Czajka B, Swietek K, Kryczka W, Gonciarz Z. A multi-center open study to determine the effect of lamivudine on HBV DNA clearance and to assess the safety of the regimen in patients with chronic hepatitis B infection. *Med Sci Monit* 2002;8:CR257-262
- Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condeelis LD, Chien RN; On behalf of the Asia hepatitis lamivudine study group. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis Be antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532
- Dienstag JL, Schiff ER, Mitchell M, Casey DE Jr, Gitlin N, Lissos T, Gelb LD, Condeelis L, Crowther L, Rubin M, Brown N. Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. *Hepatology* 1999;30:1082-1087
- Abdelhamed AM, Kelley CM, Miller TG, Furman PA, Isom HC. Rebound of hepatitis B virus replication in HepG2 cells after cessation of antiviral treatment. *J Virol* 2002;76:8148-8160
- Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414
- Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo RP. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 1998;27:1736-1742
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝脏学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000;8:324-329
- 拉米夫定临床应用专家. 2003年拉米夫定临床应用专家共识. *中华肝脏病杂志* 2003;11:497-499

- 9 Shao JB, Chen Z, Ni WQ, Fan J. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003;112:45-52
- 10 Cabrerizo M, Bartolom inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-123
- 11 Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich WH. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J Virol* 1997;71:5399-5407
- 12 Dandri M, Burda MR, Will H, Petersen J. Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology* 2000;32:139-146
- 13 Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 1997;71:9392-9399
- 14 张晓红, 林国莉, 朱建芸, 陈黎, 杨绍基, 肖杰生. 拉米夫定停药后慢性乙型肝炎复发的临床特点及相关因素. *中华肝脏病杂志* 2004;12:601-604

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. *世界华人消化杂志* 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的 ICU 全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. *世界华人消化杂志* 2004年 5月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)