

干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效与HBV基因型的关系

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悻

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悻, 中国人民解放军第四五四医院消化科 江苏省南京市 210002
南京军区医学卫生科研课题资助项目, No. 07M047
作者贡献分布: 实验路线设计由黄重发操作完成; 实验技术由施斌斌操作完成, 统计学分析由朱清完成, 临床资料由武凌, 裴小红, 朴全慧及周悻负责收集整理; 论文写作由施斌斌完成.
通讯作者: 施斌斌, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军第四五四医院消化科. shibinbin1974@sina.com
电话: 025-80865270
收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-19
接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Relationship between therapeutic efficacy of interferon in treating chronic hepatitis B and HBV genotypes

Chong-Fa Huang, Bin-Bin Shi, Qing Zhu, Ling Wu, Xiao-Hong Pei, Quan-Hui Pu, Yi Zhou

Chong-Fa Huang, Bin-Bin Shi, Qing Zhu, Ling Wu, Xiao-Hong Pei, Quan-Hui Pu, Yi Zhou, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, China

Supported by: the Nanjing Military Area Command of Chinese PLA Scientific Research Foundation, No. 07M047
Correspondence to: Bin-Bin Shi, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, China. shibinbin1974@sina.com

Received: 2008-11-19 Revised: 2008-12-19

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To study the effects of HBV genotypes on anti-virus-therapeutic efficacy of interferon in chronic HBV-infected patients.

METHODS: Thirty HBV-infected patients were treated with interferon for anti-virus. HBV genotypes were detected using PCR-RFLP and the response levels of interferon in different genotypes were observed.

RESULTS: For the 30 patients, the HBV genotypes were mainly type B (40.0%) and type C (56.67%). Level of HBV DNA was significantly higher in patients with type C than with type B (6.03 ± 1.35 vs 5.45 ± 1.21 , $P < 0.05$), and the interferon response rate was higher in patients with type B than with type C. Among those with no response, 1 case with type B and another case

with type C changed into type D.

CONCLUSION: It is suggested that HBV genotypes is correlated with the serum levels of HBV DNA and therapeutic efficacy of interferon. The genotype could be changed during the process of therapy.

Key Words: Hepatitis B Virus; Genotype; Genotype changes; Anti-virus therapy

Huang CF, Shi BB, Zhu Q, Wu L, Pei XH, Pu QH, Zhou Y. Relationship between therapeutic efficacy of interferon in treating chronic hepatitis B and HBV genotypes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 329-332

摘要

目的: 探讨HBV不同基因型对干扰素抗病毒治疗的影响。

方法: 对30名HBV患者进行干扰素抗病毒治疗, PCR-RFLP检测HBV基因型, 观察不同基因型HBV对干扰素的应答水平。

结果: 30例患者HBV基因型以B型(40.0%)和C型(56.67%)为主, C型患者HBV DNA水平显著高于B型患者(6.03 ± 1.35 vs 5.45 ± 1.21 , $P < 0.05$), B型患者对干扰素应答率显著高于C型患者, 在无应答患者中分别有1名B型和C型转变为D型。

结论: HBV基因型与HBV DNA复制水平、抗病毒疗效均有一定的相关性, 在治疗过程中可发生基因型改变。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因型改变; 抗病毒治疗

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悻. 干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效与HBV基因型的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 329-332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/329.asp>

0 引言

根据乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)全基

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染具有很高的发病率, 是引起肝硬化和肝癌的最常见的原因之一. 不同HBV基因型病毒复制水平不同, 影响干扰素抗病毒治疗疗效, 在治疗过程中可能会出现基因型的转变, 其分子病毒学机制尚未明确。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心; 李定国, 教授, 上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)附属新华医院消化内科

■ 研发前沿

目前对HBV基因型的研究受到越来越多的关注,不同HBV基因型对抗病毒治疗应答率有显著的差异,基因型的转变可能是影响疗效的因素之一。

表 1 PCR引物及核苷酸序列

引物	序列	位置
BS1 sense	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCC-3'	56-76
Pol2 antisense	5'-CGGGCAACGGGGTAAAGGTTTC-3'	1158-1138
YS1 sense	5'-GCGGGGTTTTCTTGTGA-3'	203-221
YS2 antisense	5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3'	787-767

因序列异质性 $\geq 8\%$ 的界线, HBV基因型可以分为8型(A-H)^[1]. HBV的不同基因型的结构差异可影响慢性乙型肝炎患者的病情发展、转归、HBV标志物的表达, 以及对抗病毒药物治疗的疗效. 本研究旨在探讨干扰素抗病毒治疗应答与HBV基因型及基因型转换之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究30例HBeAg阳性慢性乙型肝炎(CHB)患者为我院门诊于2007-08/2008-05就诊的慢性乙型肝炎患者, 诊断符合2000年西安全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[2]. 其中男20例, 女10例, 年龄17-53(平均年龄 33.6 ± 8.6)岁. 所有受检者排除HAV、HCV、HDV、HEV、HIV感染, 排除近3 mo应用抗病毒或影响免疫功能的药物. PCR扩增所用Taq酶、dNTP等是北京鼎国生物产品, 限制性内切酶是Promega公司产品. PCR扩增仪是美国ABI公司PE GeneAmp PCR System 9700, 引物由上海英骏公司提供. HBV DNA定量检测仪为Roche Lightcycler(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis), 检测灵敏度为 10^3 copies/mL, 引物及探针为深圳匹基公司产品.

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 干扰素治疗 $\alpha 2b$ 5 MU/d肌注1 mo后改为隔日1次, 疗程6 mo. 治疗效果分为完全应答、部分应答、无应答. 完全应答: 血清HBV DNA $<10^3$ 拷贝/mL, HBeAg阴转(或HBeAg/抗Hbe血清转换), ALT复常; 部分应答: HBV DNA $<10^3$ copies/mL, 肝功能正常, 无HBeAg血清转换; 无应答: 未达到以上应答者. 完全应答和部分应答者为有效, 无应答者为无效. 观察项目: 患者治疗前、治疗后1、3、6 mo各复查一次血常规、肝功能、乙型肝炎血清标志物、HBV DNA(Roche荧光PCR定量). 治疗前及治疗结束后分别行基因型测定.

1.2.2 聚合酶链式反应联合限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测HBV基因型: 用巢式PCR

表 2 HBV基因型与HBV DNA之间的关系

基因型(n)	ALT(U/L)	HBV DNA(Log)
B(12)	86.24 ± 17.45	5.45 ± 1.21
C(17)	93.99 ± 23.81	6.03 ± 1.35^a

^a $P < 0.05$ vs B基因型.

扩增S基因: 第一轮引物为BS1/POL2, 20 μ L体系, 反应参数 94°C 1 min, 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 40 s, 72°C 5 min, 35个循环; 第二轮引物为YS1/YS2, 30 μ L体系, 反应参数 94°C 1 min, 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 25 s, 72°C 3 min, 32个循环. 得到S基因nt48-633之间片段长度为585 bp. 将PCR产物于琼脂糖凝胶电泳, 所有阳性产物以限制性内切酶Bsr I 和Sly I 平行酶切于 37°C 水浴4 h, 酶切体系15 μ L, 底物为10 μ L. 之后于琼脂糖凝胶电泳. 结果显示: 若单以Bsr I 切开者为B型, 若单以Sly I 切开者为C型, 若两酶同时切开者为A型, 若两酶同时切不开者为D型. PCR所用引物见表1.

统计学处理 用SPSS12.0统计软件进行分析, 计数资料用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 基因分型 干扰素治疗前, 30例患者中HBV基因型40.0%(12/30)B型, C型56.67%(17/30), D型3.33%(1/30). 干扰素治疗后, 30例患者中HBV基因型B型36.67%(11/30)B型, C型53.3%(16/30), D型10.0%(3/30), 其中1名B基因型和1名C基因型治疗无应答者治疗结束后均转换为D基因型. 酶切图谱见图1.

2.2 基因型与HBV DNA的关系 C基因型HBV DNA对数值 6.03 ± 1.35 , B基因型HBV DNA对数值为 5.45 ± 1.21 , C基因型显著高于B基因型($P < 0.05$, 表2).

2.3 基因型与干扰素疗效的关系 干扰素治疗有效率40%, 其中B基因型58.33%, C基因型29.41%, D基因型1例治疗无应答(表3).

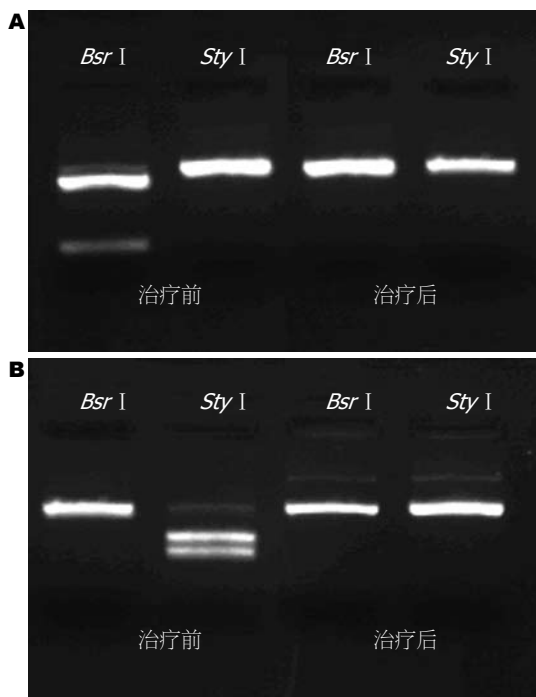


图1 干扰素治疗后基因型的转变. A: 基因型B→基因型D; B: 基因型C→基因型D.

3 讨论

HBV具有病毒复制产量高和突变率高的特征, 长期点突变累积形成了不同的基因型. 随着近年来新的HBV基因型的发现, 国内外学者从病毒学、流行病学和临床医学等方面对HBV基因型进行了大量的研究^[3-4]. HBV基因型分布呈现一定的地域性, A分布于全球, B和C型主要在亚洲, D型分布于南欧, E型分布于非洲, F型分布于美国, G型分布于美国和法国, H型分布于中美洲^[5]. 经继生 *et al*^[6]报道江苏地区HBV基因型主要是B型(33.5%)和C型(61.4%), 其中南京地区B型(50.0%)和C型(45.0%), 未检出A和D基因型. 我们研究发现南京地区HBV基因型B型(40.0%)和C型(56.67%), 未报道有D基因型, 而我们检测出1例患者为D基因型HBV, 追问病史, 此患者为西藏地区人, 大学毕业后来南京工作. 本次研究结果与上述报道结果相似.

日本学者^[7]报道C型HBV感染与乙型病毒性肝炎的慢性化相关, C型的HBeAg阳性率及血清HBVDNA水平较B型高. 国内学者也有类似报道^[8]. 本次研究也进一步证实上述结果, 而B型和C型两组间ALT无显著性差异. 这可能是C型对干扰素治疗应答率较B型低的原因. 提示C型HBV可通过本身活跃的复制能力和变异能力, 逃避宿主免疫和药物的双重压力, 而维持较高的病毒血症.

表3 不同HBV基因型与干扰素疗效的关系

治疗前HBV基因型	有效率	治疗后HBV基因型
B 40%(12/30)	58.33%(7/12)	B(11)
C 56.7%(17/30)	29.41%(5/17) ^a	C(16)
D 3.33%(1/30)	0%	D(3)

^a $P<0.05$ vs B基因型.

不同基因型HBV感染对抗病毒的反应不同. 干扰素治疗HBV感染的分子病毒学机制仍有许多是未知的. 欧美学者研究发现, 干扰素治疗后的疗效, HBV基因型C型较B型差, 基因型A型要比D型要好, HBeAg血清转换后有较高的HBV清除率, 且可获得较高的持续应答, 并有较好的组织学炎症改善^[9-10]. 亚洲学者^[11]报道, 对于亚洲患者来说, 相比感染了C基因型HBV的患者, 感染了HBV B基因型患者可以在较早的年龄发生HBeAg血清转换, 较少发生严重肝脏疾病, 且对干扰素治疗有更好的反应. 我们本次实验中发现, B基因型患者相较C基因型患者对干扰素有更高的应答率, 两者间具有显著性差异($P<0.05$), 进一步证实此观点. 而本次实验中1例D基因型患者干扰素治疗无效, 因例数少, 尚有待进一步观察. 提示HBV DNA基因型是预测乙型肝炎患者干扰素疗效及预后的重要指标之一.

国外学者研究发现在干扰素治疗复发的部分CHB患者中发生了HBV基因型的漂移, 主要有基因型C转变为基因型A^[12]. 在另一研究中发现, 急性乙型肝炎在HBeAg血清转换过程中, 出现C基因型转变为B基因型^[13]. 在我们此次研究中, 在干扰素治疗无应答者中, 初始为B基因型和C基因型的患者各有1名, 治疗结束后改变为D基因型, 而在治疗完全应答和部分应答者未检出D基因型. 在HBeAg血清转换者中未发现有C基因型转变为B基因型.

部分患者HBV可能为两种基因型的HBV混合感染, 但用目前标准基因型检测方法可能只能检测出其中主要的基因型, 但次要基因型尚不能检测出来, 且主要基因型和次要基因型各自所占比例不能准确测定. 不同基因型的混合感染在欧洲多表现为A型和D型之间, 在东亚可以发生于B和C基因型之间^[14]. 本实验中2名无应答者发生基因型漂移, 可能此2名患者原为HBV混合感染, 但因检测技术问题, 次要基因型未能检测出来. 在同一个患者身上发生基因型漂移

■ 相关报道

国内外研究显示, C型的HBeAg阳性率及血清HBVDNA水平较B型高, 对干扰素抗病毒疗效, HBV基因型C型较B型差, 基因型D型要比A型要差. 国外学者研究发现抗病毒治疗过程中发现有基因型C转变为基因型A.

■同行评价

本研究选题和研究内容符合当前研究热点,有一定应用和研究参考价值,但不够新颖。

的原因尚未明确,干扰素治疗后基因型的漂移可能是免疫选择的结果,由于机体免疫压力改变的作用影响,推测这种免疫压力的改变可能更主要对不同基因型HBV混合感染中的主要基因型产生作用,而次要基因型可以获得替代从而成为主要基因型。

不同基因型存在着生物学特性和临床特点差异,对抗病毒治疗疗效存在一定的影响,抗病毒治疗可致HBV基因型的发生改变,并对疗效产生影响,其具体机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Kato H, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Usuda S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *J Med Virol* 2004; 73: 516-521
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 3 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- 4 Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-1280
- 5 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76: 5985-5992
- 6 经继生, 黄培, 阮成荣, 马洁, 汪顺才, 吴国强, 谢志萍, 朱传武, 章幼棠, 王开林, 张燕, 李林根, 丁琦, 赵文海, 梅存金, 庄洪润, 赵伟. 江苏省乙型肝炎病毒基因型分布与临床相关性. 江苏大学学报(医学版) 2006; 16: 123-126
- 7 Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y, Jyoko K, Yamamoto K, Miyaoka H, Yamashita Y, Ohno N, Onji M. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004; 72: 551-557
- 8 陈进宇, 王鲁文, 龚作炯. HBV基因型与干扰素抗病毒疗效的关系. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 68-71
- 9 Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Pénaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006; 13: 329-335
- 10 Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009-1013
- 11 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756-1762
- 12 Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2002; 186: 752-759
- 13 Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. Evolution of Hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C. *J Gen Virol* 2006; 87: 39-49
- 14 Bowyer SM, Sim JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virol* 2000; 81: 379-392

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 荣获 2007 年“中国百种杰出学术期刊” 和 2008 年中国国际化精品科技期刊

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开,世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会.本会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统,中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选,百篇最具影响学术论文评选,世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果.根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果,WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号,同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊,中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊.(编辑:程剑侠 2009-01-28)