

丙型肝炎患者IL28B基因型和HCV基因型对抗病毒治疗的影响

陶剑, 刘俊, 雷华, 普冬

■背景资料

干扰素和利巴韦林联合治疗是慢性丙型肝炎标准的治疗方案, 但是不同个体对于干扰素治疗应答差异性较大, 公认的影响慢性丙型肝炎患者抗病毒治疗疗效的因素主要是机体和病毒两方面。

陶剑, 昆明医学院 云南省昆明市 650214

刘俊, 普冬, 雷华, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650041

昆明学院引进博士专项基金资助项目, No. 昆明学院YTL11005
作者贡献分布: 陶剑组织该课题的实验室研究工作, 完成IL28B SNP基因检测及统计学分析; 刘俊与雷华完成丙肝患者治疗、随访和资料收集; 普冬完成丙肝患者病毒载量及生化检测; 本文写作由陶剑与刘俊完成。

通讯作者: 刘俊, 副主任医师, 650041, 云南省昆明市, 昆明市第三人民医院肝病科, liujun6408100@163.com

收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-19

接受日期: 2011-08-01 在线出版日期: 2011-08-08

Association of IL28B SNP and HCV genotypes with response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C

Jian Tao, Jun Liu, Hua Lei, Dong Pu

Jian Tao, Medical College, Kunming University, Kunming 650214, Yunnan Province, China

Jun Liu, Hua Lei, Dong Pu, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Kunming 650041, Yunnan Province, China

Supported by: the Special Doctoral Fund of Kunming University, No. YTL11005

Corresponding to: Jun Liu, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Kunming, Kunming 650041, Yunnan Province, China. liujun6408100@163.com

Received: 2011-05-09 Revised: 2011-07-19

Accepted: 2011-08-01 Published online: 2011-08-08

Abstract

AIM: To explore the association of IL28B single nucleotide polymorphism (SNP) and hepatitis C virus (HCV) genotypes with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C.

METHODS: Blood samples from patients who were sustained virological responders (SVR) or non-responders (NR) after pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C, were collected and used for genotyping of HCV and IL28B SNP rs12979860.

RESULTS: Of 30 patients with sustained virological response, 3 were infected with HCV-1b, 27 with non-HCV-1b; 29 had a C/C genotype

of rs12979860, 1 had a T/C genotype. Of 30 patients with non-response, 12 were infected with HCV-1b, 18 with non-HCV-1b; 20 had a C/C genotype of rs12979860, 10 had a T/C genotype. Patients who were infected with non-HCV-1b had better SVR rate than those with HCV 1b infection. Patients who had a C/C genotype of rs12979860 had better SVR rate than those with a T/C genotype.

CONCLUSION: IL28B SNP and HCV genotypes could be predictive of response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C.

Key Words: Hepatitis C virus; Genotype; IL28B; Single nucleotide polymorphism

Tao J, Liu J, Lei H, Pu D. Association of IL28B SNP and HCV genotypes with response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(22): 2372-2375

摘要

目的: 研究丙型肝炎患者IL28B基因相关的rs12979860基因型和HCV基因型对聚乙二醇干扰素 α 和利巴韦林联合抗病毒治疗疗效的影响。

方法: 对干扰素 α 联合利巴韦林治疗后获得持续病毒学应答(SVR)和无应答(NR)的各30例丙型肝炎患者的血液样品进行检测, 采用PCR反向斑点杂交法进行HCV基因分型, 采用聚合酶链-连接酶检测反应进行患者IL28B相关的单核苷酸多态性(SNP) rs12979860基因分型。

结果: 抗病毒治疗后SVR的30例丙型肝炎患者中, HCV基因型为1b的有3例, 非HCV-1b基因型的有27例, rs12979860基因型为C/C型(保护性基因型)的有29例, 为T/C型(非保护性基因型)的有1例; 抗病毒治疗后NR的30例丙型肝炎患者中, HCV基因型为1b的有12例, 为非HCV-1b基因型的有18例, rs12979860基因型为C/C型的有20例, 为T/C型的有10例。HCV-1b

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

和非HCV-1b感染者在获得SVR率之间的差异有显著性($P<0.05$), 获得早期病毒学应答的患者都是保护性SNP基因型携带者, 保护性和非保护SNP基因型携带者获得SVR率之间的差异有显著性($P<0.05$).

结论: HCV-1b型病毒感染者治疗后获得SVR的几率低于非HCV-1b型的患者, rs12979860为C/C基因型的患者治疗后获得SVR的几率高于T/C基因型的患者; 将HCV的病毒基因型与宿主rs12979860基因型检测相结合, 可作为丙型肝炎患者干扰素联合利巴韦林治疗疗效预测评价的重要指标.

关键词: 丙型肝炎病毒; 基因型; 白介素28B; 单核苷酸多态性

陶剑, 刘俊, 雷华, 普冬. 丙型肝炎患者IL28B基因型和HCV基因型对抗病毒治疗的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(22): 2372-2375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2372.asp>

0 引言

通过干扰素 α 为主的持续的免疫诱导治疗, 可以清除丙型肝炎患者体内的病毒, 但由于病毒基因亚型的不同和丙型肝炎患者的个体差异, 许多患者还达不到预期疗效^[1-5]. 2009年以来, 学者们研究了不同种族的大量丙型肝炎患者, 包括不同丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)基因型的慢性感染者和自发清除病毒者, 以及对药物治疗的不同反应者的宿主遗传因素, 与HCV持续感染和治疗应答的关系. 发现, 当患者是难治性的HCV病毒(如1型和4型)感染或者携带对干扰素治疗不敏感的白介素28B(interleukin 28B, IL28B)相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)基因型时, 在48 wk的抗病毒治疗后获得持续性病毒学应答(sustained virologic response, SVR)的可能性非常低^[6-8]; 为此, 学者将不同的IL28B相关的SNP基因型称为保护性和非保护性基因型(如对于rs12979860来说, C/C为保护性, T/C或者T/T为非保护性基因型). 2010年以来, 我们对昆明地区聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗后, 获得SVR和无NR的60位丙型肝炎患者的血液样品进行病毒基因型和宿主IL28B相关的rs12979860的SNP基因型检测, 分析HCV基因型和患者IL28B基因变异对干扰素联合利巴韦林治疗丙型肝炎的影响, 以期建立丙型肝炎患者抗病毒治疗药物效应预测的评

价方法.

1 材料和方法

1.1 材料 60例慢性丙型肝炎患者均符合丙型肝炎诊断标准, 采用聚乙二醇干扰素(α -2a 180 μ g皮下注射, 上海罗氏公司生产)和利巴韦林治疗(900-1 200 mg/d, 口服), 疗程为48 wk. 参照《丙型肝炎防治指南》判定标准^[9]. 在征得受检者知情同意后, 抗病毒治疗前采集静脉血, 分离血浆用于病毒载量和病毒基因型检测, 治疗结束后随访中, 采集静脉血, 分离血细胞进行IL28B基因型检测.

1.2 方法

1.2.1 HCV病毒基因分型: 根据GenBank中已发表的HCV的基因序列, 采用选择HCV 5'非编码区(nt 299-1), 设计特异性引物和分型探针. 提取血浆标本中的HCV RNA后, 经过RT-PCR反应与巢式PCR基因扩增, 将扩增产物进行斑点杂交, 根据酶联显色反应结果进行HCV基因分型^[10].

1.2.2 SNP rs12979860基因分型: 设计特异性引物和荧光探针(表1), 抽提血细胞DNA后, PCR扩增目的SNP rs12979860位点所在片段; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性15 min, PCR共35个循环(变性94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火56 $^{\circ}$ C 90 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min). PCR扩增产物进行多重连接酶检测反应(反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性2 min, 35个循环, 每个循环有2个温度: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 2 min). LDR产物通过测序胶电泳检测, 应用Genemapper软件进行数据分析和基因分型^[11].

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行数据分析. HCV-1b和非HCV-1b感染者获得SVR率之间的差异比较, 和不同SNP基因型携带者获得SVR率之间的差异比较均采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 HCV基因分型结果 60例丙型肝炎患者共检测到5种HCV基因亚型, 包括1b, 2a, 3a, 3b和6a, 无混合感染. 获得SVR的30位丙型肝炎患者, HCV基因型为1b的有3例, 非HCV-1b基因型的有27例, NR的30例丙型肝炎患者中, HCV基因型为1b的有12例, 非HCV-1b基因型的有18例. HCV-1b型感染的丙型肝炎患者治疗后获得SVR的几率低于非HCV-1b型的丙型肝炎患者, 两者获得SVR之间的差异有显著性($P<0.05$, 表2).

2.2 rs12979860的SNP基因分型 60例丙型肝炎患

■相关报道

研究发现, 在人19号染色体上, 编码干扰素- λ 3的白介素(IL)28B基因的单核苷酸多态性HCV感染者的自发病清除、慢性感染发生率与干扰素联合利巴韦林治疗的效果有十分密切的关联, 该研究进展为丙型肝炎患者的个体化治疗提供了重要依据.

■应用要点

HCV-1b型病毒感染者治疗后获得SVR的几率低于非HCV-1b型的患者, rs12979860为C/C基因型的患者治疗后获得SVR的几率高于T/C基因型的患者; 将HCV的病毒基因型与宿主rs12979860基因型检测相结合, 可作为丙型肝炎患者干扰素联合利巴韦林治疗疗效预测评价的重要指标。

表 1 rs12979860的SNP基因型检测的引物和探针

引物和探针	序列5'-3'	产物(bp)
PCR引物	Primer Fw	GCGCTTATCGCATACGGCTAG
	Primer Re	GCAGGCTCAGGGTCAATCACAG
荧光探针序列	rs12979860_modify	P-CGCCTTCGGGGAGCTCCCTGGTTCATTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM
	rs12979860_C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGAGTGCAATTCAACCCTGGTTCG
	rs12979860_T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGAGTGCAATTCAACCCTGGTTCA

表 2 HCV基因亚型和患者IL28B的SNP基因型与丙型肝炎治疗转归 n(%)

治疗转归	HCV基因亚型		宿主SNP基因型		HCV基因亚型和宿主IL28B基因型	
	HCV-1b	非HCV-1b	C/C型	T/C型	非HCV-1b+C/C型	HCV-1b+T/C型
RVR	3(20)	27(60)	30(61.2)	0(0.0)	27(81.8)	0(0.0)
SVR	3(20)	27(60)	29(59.2)	1(9.0)	27(81.8)	0(0.0)
NR	12(80)	18(40)	20(40.8)	10(91.0)	6(18.2)	5(100.0)
合计	15	45	49	11	33	5

者rs12979860位点检测到C/C和C/T两种基因型。其中C/C型的有49例, C/T的有11例。在获得SVR的30例丙型肝炎患者中, SNP rs12979860基因型为C/C型(保护性基因型)的有29例, SNP为T/C型(非保护性基因型)的有1例; NR的30位丙型肝炎患者中, SNP rs12979860基因型为C/C型的有20例, SNP为非保护性基因型(T/C型)的有10例。获得早期病毒学应答的患者都是保护性SNP基因型携带者, 保护性SNP基因型携带者治疗后获得SVR的几率高于非保护性基因携带者, 两种SNP基因型患者获得SVR率之间的差异有显著性($P<0.05$, 表2)。

3 讨论

为了避免丙型肝炎患者接受无效的抗病毒治疗, 而又无辜的承受药物的不良反应, 在治疗前进行抗病毒药物效应预测非常重要^[1]。

通过对昆明地区聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗后获得SVR的和NR丙型肝炎患者的血液样品, 进行HCV病毒基因和IL28B相关的rs12979860的SNP基因型检测。研究发现, HCV-1b型病毒感染者干扰素 α 为主的治疗后获得SVR的几率低于非HCV-1b型病毒感染者; 获得早期病毒学应答的患者都是C/C型(保护性SNP基因型)携带者; rs12979860基因型为保护性基因型的患者, 治疗后获得SVR的几率高于T/C基因型(非保护性基因型)的丙型肝炎患者; HCV病毒基因型和宿主rs12979860基因型在获得SVR

率的差异都有统计学意义。进一步研究还发现, 如果患者是非HCV-1b型病毒感染同时又携带rs12979860保护性基因型, 其获得SVR可高达81.8%, 而患者是HCV-1b型病毒感染同时又携带非保护性基因型, 则没有获得SVR。

个体化治疗是慢性丙型肝炎患者的治疗发展方向, 将HCV的病毒基因型与宿主rs12979860基因型检测相结合, 可作为丙型肝炎患者干扰素利巴韦林治疗疗效预测的重要指标。学者认为^[12], 对于非保护性基因型携带的HCV-1b感染者, 如果没有出现肝脏组织损害, 可考虑延长聚乙二醇干扰素 α 联合利巴韦林的治疗周期, 或者推迟干扰素和利巴韦林抗病毒治疗, 以及等待新的特异性抗HCV病毒药物上市后再进行治疗; 如果患者肝脏已经严重受损, 则应该推荐患者进行肝脏移植; 对于IL28B保护性基因携带的非HCV-1b感染的丙型肝炎患者则可根据治疗中是否获得快速应答, 而调整相应(缩短)治疗周期。这种新的治疗策略在减少患者由于药物不良反应引起的痛苦和节省不必要的医疗开支都具有重要意义^[12-15]。

4 参考文献

- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-1374
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188
- Germer JJ, Majewski DW, Yung B, Mitchell PS, Yao

- JD. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 318-323
- 4 Zeuzem S, Yoshida EM, Benhamou Y, Pianko S, Bain VG, Shouval D, Flisiak R, Rehak V, Grigorescu M, Kaita K, Cronin PW, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG. Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48: 407-417
- 5 Mangia A, Minerva N, Bacca D, Cozzolongo R, Ricci GL, Carretta V, Vinelli F, Scotto G, Montalto G, Romano M, Cristofaro G, Mottola L, Spirito F, Andriulli A. Individualized treatment duration for hepatitis C genotype 1 patients: A randomized controlled trial. *Hepatology* 2008; 47: 43-50
- 6 Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-1104
- 7 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109
- 8 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401
- 9 中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2004; 22: 131-136
- 10 唐文志, 杨永强, 黄小燕, 戴小波, 李宇雄, 谭星蓉. HCV反向点杂交基因分型方法的建立. 热带医学杂志 2009; 9: 533-536
- 11 Xiao Z, Xiao J, Jiang Y, Zhang S, Yu M, Zhao J, Wei D, Cao H. A novel method based on ligase detection reaction for low abundant YIDD mutants detection in hepatitis B virus. *Hepatol Res* 2006; 34: 150-155
- 12 Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol* 2010; 45: 903-910
- 13 McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, Terrault NA, Jacobson IM, Afdhal NH, Heathcote EJ, Zeuzem S, Reesink HW, Garg J, Bsharat M, George S, Kauffman RS, Adda N, Di Bisceglie AM. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1292-1303
- 14 Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2011 Mar 25. [Epub ahead of print]
- 15 Iadonato SP, Katze MG. Genomics: Hepatitis C virus gets personal. *Nature* 2009; 461: 357-358

■同行评价
本文选题新颖, 创新性较好, 具有一定的实用价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力. *WJG* 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次. 另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, *WJG* 位于第 174 名. (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)