

恩替卡韦治疗HBeAg阳性慢乙肝患者HBV-DNA与cccDNA变化关系的研究

郭铮 安纪红^(通讯作者) 乔杰 张亚丽 王泽民 姚馨月 倪文 郭换珍 孟江涛
(内蒙古自治区人民医院感染性疾病科 内蒙古呼和浩特 010017)

摘要: 目的: 探讨口服恩替卡韦治疗HBeAg阳性乙肝患者48周对血清HBV-DNA和肝组织中HBV cccDNA含量的影响。方法: 选取30例HBeAg阳性乙肝患者, 所有患者连续48周口服恩替卡韦0.5mg/d, 治疗前后分别静脉取血清分离血清。检测HBV血清标志物、HBV-DNA及HBVcccDNA含量, 并对各指标进行统计学分析。选取治疗48周后血清HBV-DNA未转阴患者, 行肝穿检测HBV cccDNA含量。结果: (1) 治疗后, 血清HBV-DNA、谷丙转氨酶(ALT)水平均显著下降。(2) 接受恩替卡韦治疗48周后, 血清中HBV-DNA检测结果为阴性($< 1.0 \times 10^3$ IU/mL)的患者为25例(阴转率为83.3%), 对HBV-DNA未转阴的5例患者行肝穿, 检测肝细胞中HBV cccDNA含量, 仅有1例患者未检测到HBV cccDNA, 4例患者可检测到的HBV cccDNA(区间: 10^3 - 10^5 IU/mL)。(3) 接受恩替卡韦治疗48周后, HBeAg阴转率33.3%(10例患者发生e抗原转阴), HBeAg/抗HBe转换率23.3%(7例患者发生血清学转换)。结论: 尽管恩替卡韦可明显降低乙肝患者血清HBV-DNA, 但恩替卡韦不能彻底清除肝细胞中的HBV。

关键词: 恩替卡韦; HBeAg; HBV-DNA; HBV cccDNA

慢性乙型肝炎病毒感染仍然是当前世界最为突出的公共卫生问题之一^[1], 据世界卫生组织估计全世界人口中约有 3.5%感染了乙型肝炎病毒, 每年新增感染约 500 万人, 在这些感染人群中每年有 80 万死于乙肝相关肝硬化、肝癌等由乙肝病毒感染引起的肝脏疾病^[2]。

在我国尽管随着乙肝疫苗的广泛接种已经减少了新发乙肝病毒感染数量, 但据估计全国仍有 7000 余万慢性乙肝病毒感染者, 其中慢性乙型肝炎患者约 2000-3000 万, 每年约 50 万人死于乙肝病毒感染^[3, 4]。

目前, 临床常用的治疗慢性乙型肝炎的一线药物主要为长效干扰素、核苷(酸)类似物, 这些药物已被证明可以阻止或延缓疾病进展, 降低肝癌的发生风险^[5-7], 但仍然不能实现高比例的临床治愈。

共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 是造成 HBV 感染长期持续、抗病毒治疗停药后病毒反弹的重要原因, 从肝细胞中消除 cccDNA 被认为是治愈慢性 HBV 感染的关键。HBV 感染肝细胞后, 病毒脱衣壳露出松弛环状 DNA (rcDNA) 进入肝细胞核内修复完整双链并发生构象转变成超螺旋结构的 ccDNA。cccDNA 在肝细胞核内积聚, 形成 cccDNA 池, 然后以 cccDNA 作为模板, 转录出病毒的各种 RNA, 制造病毒蛋白, 完成 DNA 复制并组装形成新的子代病毒^[8]。干扰素及核苷(酸)类似物这两种药物虽能阻止病毒复制, 但并不能有效降低 HBsAg 水平, 更不能直接影响肝内 cccDNA, 导致了多数患者即使在病毒复制被治疗长期控制的状态下, 停药后仍然很快发生病毒学反弹。清除 cccDNA 是慢性乙肝治疗的终极目标, 而如何能够简单、高效、准确的检测到 cccDNA 一直以来也是 HBV 研究领域的热点问题。

1 资料与方法

1.1 研究对象

依据中华医学会肝病学会 2015 年《慢性乙型肝炎防治指南》, 收集 2018 年 9 月 1 日至 2019 年 9 月 1 日期间在我院感染科门诊或感染科病房就诊并确诊为 HBeAg (+) 慢乙肝患者 30 例。病例纳入标准: HBsAg 阳性超过半年, HBeAg 阳性, HBV DNA $> 10^4$ IU/ml, ALT 持续或反复升高或肝组织病理提示肝脏炎症, 口服恩替卡韦抗病毒治疗。病例排除标准: 合并甲、丙、戊型肝炎病毒及 HIV、巨

细胞病毒、EB 病毒感染以及酒精性、药物性、遗传代谢性及自身免疫性肝病等其他原因引起导致的肝损伤、肝脏恶性肿瘤、妊娠期或哺乳期妇女。

1.2 研究方法

患者均空腹口服恩替卡韦, 每天 0.5mg, 在治疗前和治疗 24 周、48 周时对患者进行肝功、乙肝标志物、血清 HBV-DNA 检测, 对治疗 24 周后 HBV-DNA 未转阴患者进行肝脏穿刺, 对肝组织中 HBV cccDNA 进行检测。

1.3 实验室检测

(1) 外周血标本检测

肝脏生化学: HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc: 化学发光法测定; HBV DNA: 采用实时荧光定量 PCR 检测。

(2) 肝组织病理学、肝内 cccDNA 检测

①肝组织标本留取: 在床旁超声引导下肝穿活体活检术(16G 肝穿刺针), 留取肝组织长度 1.5-2.2cm, 液氮快速冷冻后-80℃冰箱保存备用。

②肝组织病理学: 4%甲醛立即固定, 组织脱水, 石蜡包埋, 常规切片, 行 HE 及 Masson 染色, 肝组织切片至少包含 6 个汇管区, 由 2 位以上病理医师独立阅片, 光学显微镜下观察, 依据 Metavir 评分系统对肝脏组织进行肝脏炎症及肝纤维化评分。

③肝内 cccDNA 检测: 从肝组织中提取 DNA, 经 PSAD 酶切得到 cccDNA 的检测模板, 设计特异性引物和探针, 以 β -actin 作为内参。配备反应体系, 分布按照反应条件进行滚环扩增及实时荧光定量 PCR 检测。

材料及仪器:

引物、探针: 上海生工生物有限公司合成。

DNA 提取试剂盒: QIAamp DNA Micro Kit, 德国 Qiagen 公司产品。

不降解质粒 ATP 依赖的 DNA 酶 (PSAD), 美国 Epioentre 公司生产。

HBV cccDNA PCR 检测试剂盒 (invitrogen 公司)

Genelight2400 实时荧光定量 PCR 仪, 厦门安普利生物工程有限

公司。

操作方法:

肝组织 HBV DNA 提取: 肝组织 DNA 提取的具体操作参照试剂盒说明书, 样品最后溶于 160ml 洗脱液中, DNA 经紫外分光光度计定量, -20°C 保存。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学分析软件进行数据分析。计数资料采取率 (%) 表示, 计量资料采取 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间对比进行 χ^2 检验和 t 值检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的基本信息

选取符合入选标准的患者共 30 例, 其中男性 18 例, 女性 12 例, 年龄 16-47 岁。进行恩替卡韦治疗前检测 HBV-DNA 水平, 其含量在 $8 \times 10^7 - 1.5 \times 10^9 \text{IU/mL}$, 所有患者的 ALT 均高于正常上限值的两倍, HBeAg 均阳性。

2.2 恩替卡韦治疗前后血清中 HBV-DNA 和 ALT 的变化

接受恩替卡韦治疗 24 周后的 30 例患者, 血清中 HBV-DNA 含量明显降低 ($P < 0.01$), 治疗前为 $2.9 \times 10^8 \text{IU/mL}$ (区间: $8.5 \times 10^7 - 1.7 \times 10^9 \text{IU/mL}$), 治疗 24 周后为 $1.7 \times 10 \text{IU/mL}$ (区间: $5.3 \times 10^4 - 1.1 \times 10^6 \text{IU/mL}$, HBV-DNA $< 1.0 \times 10 \text{IU/mL}$ 时为阴性), 有 5 例患者治疗 24 周 HBV-DNA 未转阴 (区间: $2.3 \times 10^3 - 1.4 \times 10^9 \text{IU/mL}$), 随访至恩替卡韦治疗 48 周。

在接受恩替卡韦治疗 24 周后患者的 ALT 水平显著下降。

2.3 血清 HBV-DNA 转阴患者肝组织中 HBV cccDNA 检测

接受恩替卡韦治疗 48 周后, 血清中 HBV-DNA 检测结果为阴性 ($< 1.0 \times 10 \text{IU/mL}$) 的患者为 25 例 (阴转率为 83.3%), 对 HBV-DNA 未转阴的 5 例患者行肝穿, 检测肝细胞中 HBV cccDNA 含量, 仅有 1 例患者未检测到 HBV cccDNA, 4 例患者可检测到的 HBV cccDNA (区间: $10^3 - 10^9 \text{IU/mL}$)。

2.4 HBeAg 阴转率

接受恩替卡韦治疗 48 周后, HBeAg 阴转率 33.3% (10 例患者发生 e 抗原转阴), HBeAg/抗 HBe 转换率 23.3% (7 例患者发生血清学转换)。

3 讨论

恩替卡韦作为抗乙肝病毒的一线药物在慢性乙型肝炎的临床应用中显示出了出色的疗效和优点^[9], 恩替卡韦能够强有力地抑制 HBV 的复制, 渐渐耗竭 HBV cccDNA 池, 使得肝炎病情得到明显改善^[10]。而临床上目前主要通过生化指标、乙肝标志物和核酸定量来判断恩替卡韦的疗效并指导用药。因血清中 HBV-DNA 标本容易采集, 已成为判断疗效的主要指标。但是有研究表明, 在经过恩替卡韦治疗后, 即使血清中的 HBV-DNA 已经达到检测下限, 但是肝组织的 HBV cccDNA 含量与血清中相比仍然具有较高水平^[11]。

本研究选取了 30 例患者, 对其进行为期 48 周的随访, 并在治疗后对血清 HBV-DNA 阴性的患者进行肝穿以获取肝组织标本。肝组织经核酸提取后进行荧光实时定量 PCR 检测 HBV cccDNA 的含量, 血清标本检测 HBV-DNA 含量, 还进行乙肝标志物检测。我们观察到, 在经过恩替卡韦治疗 48 周之后, HBeAg 的阴转率达到了 33.3%, 表明恩替卡韦在治疗乙型肝炎中对于患者症状的改善确实具

有显著效果。经过 48 周的治疗, 血清总 HBV-DNA 由 10^8 数量级下降为 10 数量级, 在患者没有做肝穿的情况下, 血清 HBV-DNA 含量的定量检测在一定程度上可以间接反映肝组织的病毒复制情况。

但是, 30 例患者在经过恩替卡韦治疗 48 周后, 有 25 例患者血清中 HBV-DNA 转阴。对治疗 48 周后 HBV-DNA 未转阴的 5 例患者进行肝穿, 只有 1 例患者肝组织中 HBV cccDNA 为阴性, 其余 4 例患者的 HBV cccDNA 水平均为 $10^3 - 10^9 \text{IU/mL}$, 尽管也有降低但是依然为阳性。这提示: (1) 恩替卡韦对 HBV 复制有抑制作用, 但难以彻底清除肝组织中的 HBV; (2) 肝细胞中的 HBV cccDNA 含量水平并不完全与血清中 HBV-DNA 含量水平相平行。

4 结论

恩替卡韦治疗 48 周可使乙肝患者血清 HBV-DNA 水平降低, 恩替卡韦对于 HBV 复制有抑制作用。但是治疗 48 周以后, 即使在血清中 HBV-DNA 为阴性时, 肝组织中 HBV cccDNA 仍可为阳性, 表明了恩替卡韦不能彻底清除患者体内尤其是肝细胞中的 HBV。因此, 在慢性乙型肝炎的临床治疗中, 最好结合血清 HBV-DNA 和肝组织中的 HBV cccDNA 定量来判断病情并确定用药疗程。

参考文献

- [1]Razavi H.Global Epidemiology of Viral Hepatitis[J].Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49 (2): 179-189.
 - [2]Global HR.New hepatitis data highlight need for urgent global response.[J].Saudi Med J, 2017, 38: 672-675.
 - [3]Zhang S, Ma Q, Liang S, et al. Annual economic burden of hepatitis B virus-related diseases among hospitalized patients in twelve cities in China.[J].J Viral Hepat, 2016, 23: 202-210.
 - [4]Zhang GM, Miao N, Zheng H, et al. Incidence by age and region of hepatitis B reported in China from 2005 to 2016 (in Chinese).[J].Chin J Vaccin Immun, 2018, 24: 121-126.
 - [5]Varbobitis I, Papatheodoridis GV. The assessment of hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B under antiviral therapy.[J].Clin Mol Hepatol, 2016, 22: 319-326.
 - [6]Hoang JK, Yang HI, Le A, et al. Lower liver cancer risk with antiviral therapy in chronic hepatitis B patients with normal to minimally elevated ALT and no cirrhosis.[J].Medicine, 2016, 95: e4433.
 - [7]Papatheodoridis GV, Chan HLY, Hansen BE, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: Assessment and modification with current antiviral therapy.[J].J Hepatol, 2015, 62: 956-967.
 - [8]Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection.[J].J Hepatol, 2009, 51: 581-592.
 - [9]姚光弼, 张定凤, 王宝恩, 等. 恩替卡韦抗乙型肝炎病毒剂量和疗效研究[J]. 中华肝病杂志, 2005, 13 (7): 484-487.
 - [10]Kock J, Baumert TF, Delaney Wet, et al. Inhibitory effect of adfo- vir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes[J].Hepatology, 2003, 38 (6): 1401-1418.
 - [11]陈崑, 吴峰, 窦晓光, 等. 慢性 HBV 感染者肝脏 HBV cccDNA 含量相关因素分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29 (6): 434-437.
- 注: 内蒙古自治区自然科学基金项目, 项目编号 2019LH08004。