

慢性乙型肝炎 peg 干扰素疗效与 TP 区和 RT 区核酸研究

齐天林 王星月 冉崇平 曹卫华 张璐 路遥 郝红晓 吴淑玲 刘如玉 常敏
胡蕾苹 李明慧 谢尧

首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心肝病二科, 北京 100015

通信作者: 谢尧, Email: xieyao00120184@sina.com, 电话: 010-84322284; 李明慧, Email: wuhm2000@sina.com, 电话: 010-84322386

【摘要】 目的 探讨慢乙肝聚乙二醇干扰素治疗疗效与 TP 区和 RT 区复杂程度的相关性。**方法** 入组 HBeAg 阳性, HBV DNA 阳性的慢乙肝患者, 给予聚乙二醇干扰素 180 μg 每周 1 次皮下注射治疗, 收集基线患者血清和患者基线与治疗 12 周临床信息。对基线 HBV DNA 的 TP 区和 RT 区片段进行扩增、建库、高通量测序, 计算香农商和平均遗传距离。**结果** 对 108 例患者进行 logistic 回归分析。RT 区片段马氏距离和 TP 区片段的香农商有利于 HBV DNA 应答, ALT 有利于 HBeAg 应答, HBsAg 不利于 HBsAg 应答。**结论** 基线 TP 区和 RT 区核酸可能与慢乙肝聚乙二醇干扰素治疗疗效有关。

【关键词】 TP 区; RT 区; 聚乙二醇干扰素; 乙型肝炎病毒

基金项目: 首都临床特色应用研究专项资助课题 (Z151100004015122); 北京市医院管理局临床医学发展专项经费资助 (XMLX 201706); 国家科技重大专项 (2017ZX10201201-001-006); 北京市科技计划子课题 (D161100002716002); 北京市医院管理局消化内科学科协同发展中心 (中文简称: 消化协同发展中心) 资助课题 (XXZ0302)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 01. 017

Study on the association between the efficacy of peg-IFN and the complexity of TP and RT in chronic hepatitis B Qi Tianlin, Wang Xingyue, Ran Chongping, Cao Weihua, Zhang Lu, Lu Yao, Hao Hongxiao, Wu Shuling, Liu Ruyu, Chang Min, Hu Leiping, Li Minghui, Xie Yao
Dept. of Hepatology Division 2, Liver Diseases Center, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Xie Yao, Email: xieyao00120184@sina.com, Tel: 0086-10-84322284; Li Minghui, Email: wuhm2000@sina.com, Tel: 0086-10-84322386

【Abstract】 Objective To explore the association between the efficacy of peg-IFN and the complexity of TP and RT regions of hepatitis B virus (HBV) in chronic hepatitis B. **Methods** Patients with HBeAg positive, HBV DNA positive chronic hepatitis B were given peg-interferon 180 μg once a week for subcutaneous injection, and baseline information was collected from baseline and after 12 weeks' treatment. The baseline HBV DNA TP and RT fragments were amplified, database, high-throughput sequencing, and the average genetic distance calculation. **Results** Data of 108 patients were analyzed by logistic regression. RT area fragment Markov distance and TP area fragment Shannon quotient for HBV DNA response were calculated. ALT level is good for HBeAg response. HBsAg level is bad for HBsAg response. **Conclusions** The complexity of the baseline TP and RT regions may be associated with the efficacy of peg-interferon therapy for CHB.

【Key words】 TP region; RT region; Peg-interferon a; Hepatitis B

Fund programs: Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z151100004015122); Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of Special Funding Support (XMLX 201706); National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10201201-001-006); Project Supported by Beijing Science and Technology Commission (D161100002716002); The Digestive Medical Coordinated Development Center of Beijing Municipal Administration of Hospitals (DMCDC XXZ0302)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 01. 017

干扰素 α (Interferon alpha, IFN- α) 因其有比核苷(酸)类似物(Nucleoside (acid) analogues, NAs) 治疗更高的 HBeAg 血清学转换率, 甚至得到 HBsAg 消失(临床治愈), 因此被各指南均推荐为慢性乙型肝炎抗病毒治疗的一线药物^[1]。作为免疫调节药物, 在慢性乙型肝炎治疗中, 除可提高各种免疫细胞功能。达到清除病毒感染的干细胞作用外。干扰素刺激基因产物 20(interferon stimulate gene, ISG20) 作用于前基因组 RNA(pre-gene RNA, pgRNA) 的颈环结构上, 阻止转录, 促进其分解, 达到直接抗病毒作用^[2]。IFN- α 可以上调 myd88 表达, 加速病毒 pgRNA 分解的作用^[3]。催化多肽样载脂蛋白 B mRNA 编辑酶 3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G, APOBEC3G) 包含在细胞质 HBV 核衣壳内, 利用非脱氨的方法抑制病毒 DNA 复制^[4]。从而阻止病毒 cccDNA 形成^[5]。PKR 磷酸化翻译起始因子 eIF2, 阻止病毒 mRNA 的翻译^[6]。此外, 干扰素还可以促进组蛋白高度乙酰化, 包括 HDAC1 和 hSirt1 等, 抑制 cccDNA 转录成 pgRNA 和 preS/S RNA^[7], 干扰素的抗病毒作用促进血清 HBeAg 和 HBsAg 的清除, 使部分患者达到临床治愈和停药目标。

干扰素抗病毒疗效受病毒基因型的影响, 其中对 HBeAg 阳性 A 基因型患者效果较好^[8], 而 C 基因型疗效较差^[9], 提示核酸的序列可能对干扰素抗病毒疗效产生影响。P 区编码病毒基因组的聚合酶, 位于 nt2307-1623, 其中 RT 区内包含典型干扰素刺激反应元件 (typical IFN-stimulated response element, ISRE), 位于 HBV 增强子 I (nt1080-1234)^[10]。有研究认为末端蛋白酶和核糖核酸酶 H 抑制细胞对干扰素 α 应答^[9]。因此本研究旨在进一步探讨该区域复杂性与干扰素 α 疗效的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

患者入组标准: ① HBsAg 阳性, HBeAg 阳性大于 6 个月, HBV DNA 阳性; ② ALT 升高大于 3 个月或肝脏组织病理学显示明显炎症且抗病毒初治患者; ③ 排除 HCV、HDV 和 HIV 等其他病毒感染。入组患者给予聚乙二醇干扰素 α -2a 180 μ g 每周皮下注射 1 次治疗, 治疗 48 周。

1.2 研究方法

1.2.1 样本收集:

监测患者于治疗前, 治疗期间 12、24、36 和 48 周检测血清 HBV DNA 含量(实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 下限为 100 IU/ml)、

HBeAg/抗 HBe 含量和 HBsAg/抗 HBs 水平(采用美国雅培 Abbott Architect i2000 试剂检测), 每 1~3 个月检测血常规和临床生化指标。

1.2.2 基线 HBV 核酸提取、扩增、建库与测序:

收集患者基线血清, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。用 QIAmp DNA Blood Mini kit(德国 Qiagen 公司)提取基线血清 HBV DNA, 以正向引物 5' TCAARCAATGTT TTMGAAACT 3' 和反向引物 5' TAGGAGTCC GCAGTATGGATC 3', 正向引物 5' GGATARAACCT AGCAGGCAT 3' 和反向引物 5' CACTCCTCCYGCTT ACAGAC 3' 为引物 PCR 扩增。采用 illumina Hiseq2500, 对 RT 区的 350 bp 和 TP 区的 377 bp 高通量测序。

1.3 生物信息分析

将测序结果应用 perl 软件分析, 将原始数据中 < 250 bp 的 reads 去除, 以 EU916240.1 Hepatitis B virus isolate SWT3.2 为标准序列进行比对(mapping), 得到可读(cleanreads) RT 区 350 bp 和可读(cleanreads) TP 区 377 bp。根据 $S_n = -\sum_i (P_i \ln P_i) / \ln N$ (N = 所有克隆的总数, P = 病毒群体中每一种变异株序列出现的频率), 应用 perl 实现每个样本 TP 区片段和 RT 区片段香农商和平均遗传距离的计算。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。对各组香农商和平均遗传距离采用秩和检验。分别以 HBV DNA, HBsAg, HBeAg 治疗后是否应答作为结果, 分析两个片段香农商和平均遗传距离与疗效的相关性。以 $P < 0.05$ 为统计学差异检验水准。

2 结果

2.1 患者临床资料比较

共入组患者 108 例, 男性 64 例、女性 44 例, 年龄 15~84 岁。以治疗 12 周 HBV DNA 是否达到检测下线以下为标准, HBV DNA 应答 42 例, 非应答 66 例; 以治疗 12 周 HBeAg 是否较基线下降 90% 为标准, HBeAg 应答组 54 例, HBeAg 非应答组 49 例; 以治疗 12 周 HBsAg 是否较基线下降 90% 为标准, HBsAg 应答组 23 例, HBsAg 非应答组 72 例。患者年龄在各指标的应答与非应答组之间差异无统计学意义。性别在 HBeAg 应答与非应答组间患者性别差异有统计学意义 ($P = 0.023$), 但在 HBV DNA 应答与非应答、HBsAg 应答与非应答组间差异无统计学意义。HBV DNA 应答与非应答组间的 ALT 水平、HBV DNA 含量和 HBeAg 含量(分别为 $P = 0.038$, $P = 0.003$ 和 $P =$

0.001), 但 HBsAg 水平差异无统计学意义; HBeAg 应答与非应答组间 ALT 水平差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 但 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 含量差异无统计学意义; HBsAg 应答与非应答组间的 HBsAg 水平差异有统计学意义 ($P = 0.022$), 而 ALT、HBV DNA 和 HBeAg 水平差异无统计学意义, 患者临床资料见表 1。

2.2 RT 区片段和 TP 区片段复杂性和离散度 获得可读 (cleanreads) RT 区 350 片段共 4 977 385 条, TP 区可读 (cleanreads) 377 片段 8 562 198 条。每个样本平均获得 TP 区片段约 60 000 条序列和 RT 区片段 30 000 条序列。经测序获得的 reads 进行分析, 获得香农商 (比特) 和平均遗传距离 (厘米)。在所有患者, RT 区片段的香农商和平均遗传距离为 0.66 和 0.019, TP 区片段的香农商和平均遗传距离为 0.69 和 0.014, 见表 2。治疗前, TP 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平的均无统计学相关性 (图 1), RT 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平的均具有统计学相关性 (香农商 $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$, 平均遗传距离 $P = 0.002, P = 0.000, P = 0.006$)。

2.3 TP 区和 RT 区香农商, 遗传距离与治疗应答

HBV DNA 应答组 TP 区香农商和平均遗传距离高于非应答组, 应答组 RT 区香农商和平均遗传距

离低于非应答组, 而仅 RT 平均遗传距离在两组间差异有统计学意义 ($P < 0.000$)。HBeAg 应答组与非应答组间 TP 区香农商和平均遗传距离及 RT 区的香农商相似, 虽然应答组 RT 区的遗传距离低于非应答组, 但无统计学意义。HBsAg 应答组 RT 区的香农商显著高于非应答组 ($P = 0.022$), 但应答组和非应答组间的 RT 遗传距离、TP 区的香农商和 TP 区的遗传距离差异无统计学意义, 见表 2。

2.4 临床指标、TP 区和 RT 区香农商、遗传距离与治疗应答 患者年龄、性别、治疗基线 ALT、HBeAg 含量、HBsAg 水平、HBV DNA 含量、TP 区和 RT 区的香农商及平均遗传距离等因素 (变量) 进行 logistic 分析, 结果显示, HBV DNA 应答与 RT 区片段平均遗传距离 ($P = 0.000, OR = 0.000$) 及 TP 区片段的香农商 ($P = 0.003, OR = 0.000$) 显著性独立相关。HBeAg 应答与 ALT ($P = 0.007, OR = 1.005$) 显著性独立相关。HBsAg 应答与 HBsAg ($P = 0.034, OR = 1.000$) 显著性独立相关。

3 讨论

干扰素治疗, 效果受多因素的影响, 如患者性别^[11]、年龄^[12]、ALT 水平^[13]、HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平, HBV 核酸的变异。干扰素的起效时间是 12 周且研究表明, 治疗 12 周 HBsAg 水平的变化可预测患者治疗 48 周的疗效^[14], 支持本研究 12 周 HBsAg 应答可以预示最终 HBsAg 是否转阴。

表 1 临床资料的组间比较

Tab.1 The comparison of clinical data between groups

组别	总患者 (n=108)	DNA			HBeAg			HBsAg		
		应答组 n=42	非应答组 n=66	P	应答组 n=54	非应答组 n=49	P	应答组 n=23	非应答组 n=72	P
年龄(岁)	30(25.25~36)	30(25.75~36)	28.5(24~34)	0.419	31(26~34)	28.5(24~34.5)	0.367	29.5(26~36)	30(24~34)	0.563
性别(女/男)	19/23	25/41	0.288	28/26	15/34	0.023	6/17	32/40	0.092	
ALT(U/L)	179.1(77.95~288.425)	128.0(71.1~270.48)	216.6(117.23~342.88)	0.038	114.2(62.7~180.3)	240.25(130.75~346.78)	0.000	168.7(78.65~275.2)	209.5(71.7~273.5)	0.993
HBeAg(IU/ml)	570.615(77.3075~1013.555)	893.89(289.9~1250.72)	277.35(27.18~799.79)	0.001	907.05(56.95~1253.13)	647.15(168.18~981.75)	0.398	531.45(64.55~1055.89)	847.19(102.48~1088.86)	0.434
Log10 HBsAg(IU/ml)	3.7094±0.686	3.55±0.679	3.82±0.676	0.062	3.71±0.629	3.72±0.794	0.974	4.02±0.546	3.65±0.677	0.022
Log10 HBV DNA(IU/ml)	6.5655±1.24917	6.12±1.297	6.88±1.122	0.003	6.74±1.037	6.47±1.382	0.314	6.72±1.436	6.56±1.202	0.605

表 2 治疗应答不同组间 RT 区和 PT 区的香农商、平均遗传距离比较

Tab.2 The comparison of average genetic distance and Shannon quotient of RT area and PT area between different response groups

组别	总患者 (n=108)	DNA			HBeAg			HBsAg		
		应答组 n=42	非应答组 n=66	P	应答组 n=54	非应答组 n=49	P	应答组 n=23	非应答组 n=72	P
RT 香农商(H)	0.66±0.10	0.62±0.091	0.69±0.085	0.443	0.65±0.10	0.66±0.077	0.270	0.68±0.14	0.66±0.077	0.022
RT 平均遗传距离(CM)	0.019(0.015~0.023)	0.015(0.013~0.018)	0.021(0.019~0.034)	0.000	0.017(0.013~0.021)	0.019(0.016~0.025)	0.062	0.020(0.016~0.035)	0.019(0.015~0.022)	0.264
TP 香农商(H)	0.69±0.05	0.70±0.042	0.67±0.053	0.736	0.68±0.38	0.68±0.57	0.108	0.67±0.055	0.69±0.050	0.805
TP 平均遗传距离(CM)	0.014(0.013~0.017)	0.015(0.013~0.018)	0.014(0.013~0.018)	0.070	0.014(0.013~0.017)	0.014(0.013~0.017)	0.251	0.014(0.013~0.018)	0.014(0.013~0.017)	0.520

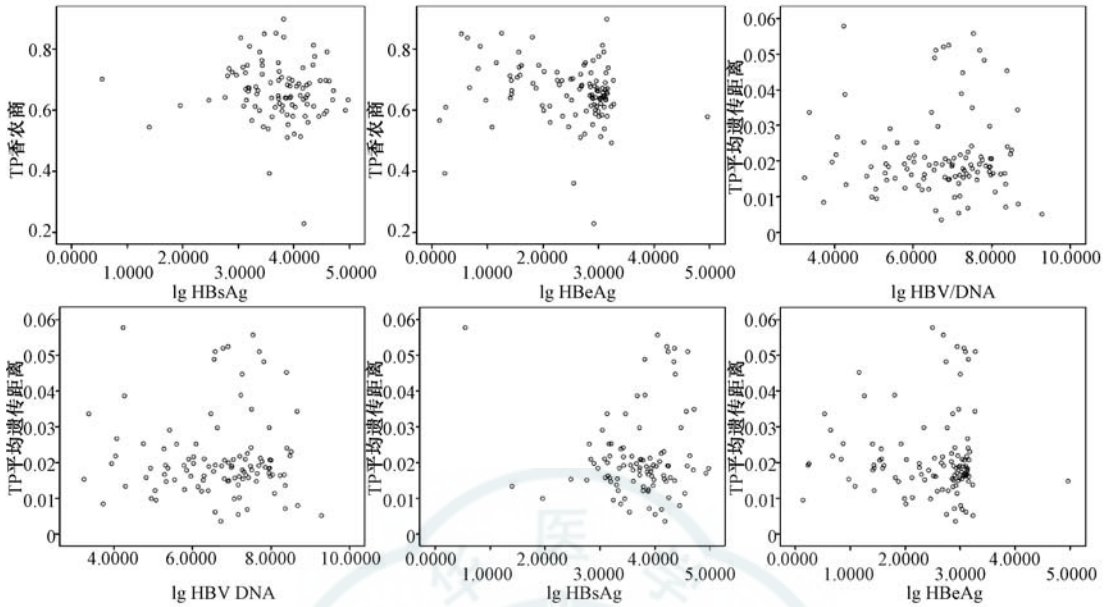


图 1 TP 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA, HBsAg, HBeAg 水平分布

Fig.1 Distribution of Shannon quotient and average genetic distance of TP fragment and HBV DNA, HBsAg, HBeAg level

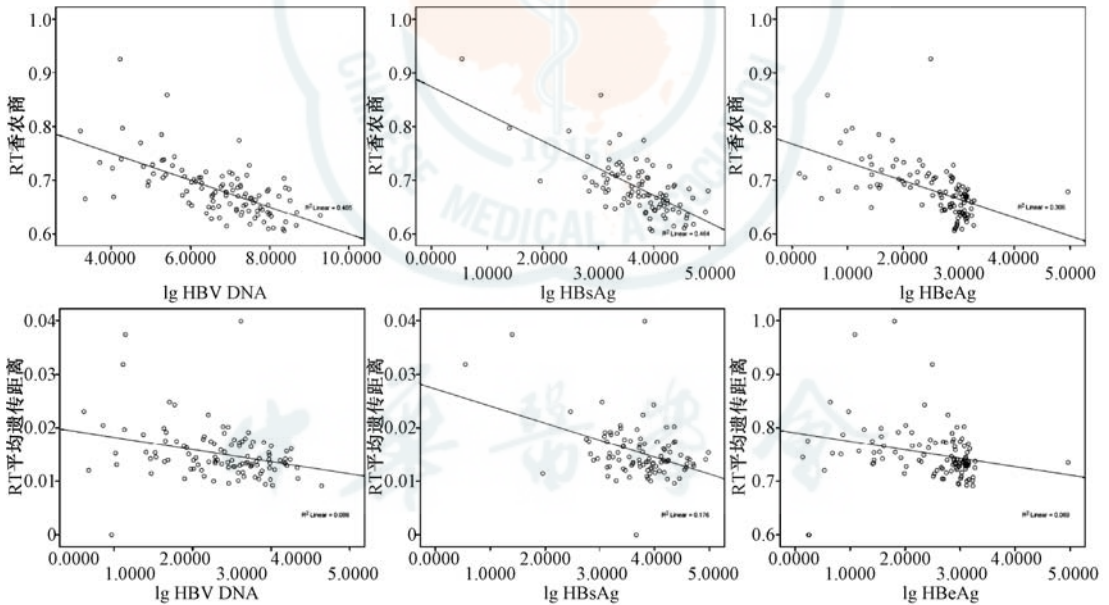


图 2 RT 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA, HBsAg, HBeAg 水平分布

Fig.2 Distribution of Shannon quotient and average genetic distance of RT fragment and HBV DNA, HBsAg, HBeAg level

本研究以治疗 12 周 HBV DNA、HBeAg 和 HBsAg 含量的变化,探讨了基线因素与治疗应答的相关性。研究结果显示,治疗 12 周病毒阴转与基线 ALT 水平、HBV DNA 含量和 HBeAg 含量相关,而与基线 HBsAg 水平相关不显著。而 HBeAg 应答仅与 ALT 水平,HBsAg 应答与 HBsAg 基线水平相关,研究结果与其他研究不一致的原因可能与不同研究评价时间的不同相关。然而,本研究的病毒和血清学

应答判断时间点仅取在 12 周。

HBV 核酸的变异可以影响 HBV 的复制、血清 HBsAg 水平和 HBeAg 含量,一些研究结果显示 HBV 核酸可影响干扰素疗效^[8-9]。我们以往的研究显示,HBV 核酸的 RT 区核酸位点与慢性乙型肝炎干扰素疗效相关。香农用信息熵的概念来描述信源的不确定度,而遗传距离是衡量遗传差异大小的指标,二者常作为描述微生物准种复杂程度的指标。

本研究对 RT 区片段和 PT 区片段核苷酸序列的准种越复杂性与 HBV DNA、HBeAg 和 HBsAg 含量的分布及与干扰素疗效的相关性进行了研究。结果显示, TP 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平的均无统计学相关性, 但 RT 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平的均具有统计学相关性, 提示 RT 区核苷酸序列可能对 HBV DNA 复制和 HBeAg 及 HBsAg 的产生影响。

在 TP 区和 RT 区核苷酸复杂性与 IFN 疗效的分析中, 结果显示, 治疗 12 周 HBV DNA 应答与 RT 区片遗传距离和 TP 区的香农商独立相关, 本研究所测 TP 区片段包含大部分末端蛋白区, 结果显示其平均遗传距离对 HBV DNA 的应答有一定作用 ($OR=0.000$), 即该段越复杂, 其和 HBV DNA 的应答越好。较复杂的准种可能导致 TP 蛋白的不稳定, 在干扰素的压力下, 更易清除。本研究 RT 区其不稳定可能会导致干扰素抗病毒作用无效^[7]。

在研究中, 虽然 RT 区片段的香农商和平均遗传距离与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 水平的均具有统计学相关性, 提示 RT 区核苷酸序列可能对 HBV DNA 复制和 HBeAg 及 HBsAg 的产生影响。但多因素分析显示, HBeAg 应答仅与 ALT、HBsAg 应答仅与 HBsAg 水平独立相关, 提示, HBsAg 和 HBeAg 应答可能主要与 IFN 提高患者的免疫相关, 因此, HBeAg 阳性慢性乙型肝炎通过干扰素治疗发生 HBeAg 血清学转换可获得持久免疫控制, 而 HBsAg 消失, 不论在 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎还是 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎均被认为临床治愈。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 齐天林: 论文撰写; 王星月、冉崇平、曹卫华: 实验操作; 张璐、路遥、郝红晓、吴淑玲、刘如玉、常敏、胡蕾苹: 病例收集; 李明慧、谢尧: 研究设计、指导、论文修改、经费支持

参考文献

[1] 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 肝脏, 2015, 20(12): 915-932. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2015.12.001.

- [2] Lu X, Qin B, Ma Q, et al. Differential expression of ISG20 in chronic hepatitis B patients and relation to interferon-alpha therapy response[J]. J Medical Virol, 2013, 85(9): 1506-1512. DOI: 10.1002/jmv.23610.
- [3] Li J, Lin S, Chen Q, et al. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by MyD88 Involves Accelerated Degradation of Pregenomic RNA and Nuclear Retention of Pre-S/S RNAs[J]. J Virol, 2010, 84(13): 6387-6399. DOI: 10.1128/JVI.00236-10.
- [4] Nguyen DH, Gummuluru S, Hu J. Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G[J]. J Virol, 2007, 81(9): 4465-4472. DOI: 10.1128/JVI.02510-06.
- [5] Mullan PB1, Hosey AM, Buckley NE. The 2, 5 oligoadenylate synthetase/RNaseL pathway is a novel effector of BRCA1- and interferon-gamma-mediated apoptosis[J]. Oncogene, 2005, 24(35): 5492-501. DOI: 10.1038/sj.onc.1208698.
- [6] Dey M, Mann BR, Anshu A, et al. Activation of Protein Kinase PKR Requires Dimerization-induced cis-Phosphorylation within the Activation Loop[J]. J Biol Chem, 2014, 289(9): 5747-5757. DOI: 10.1074/jbc.M113.527796.
- [7] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. J Clin Invest, 2012, 122(2): 529-537. DOI: 10.1172/JCI58847.
- [8] Buster E, Hansen B, Lau G, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa[J]. Gastroenterology, 2009, 137(6): 2002-2009. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.061.
- [9] Seto W, Tanaka Y, Wong D, et al. Longitudinal profiles of highly sensitive hepatitis B surface antigen levels: re-evaluation of HBsAg seroclearance[J]. Liver Int, 2016, 36(5): 642-650. DOI: 10.1111/liv.12980.
- [10] Tur-Kaspa R1, Teicher L, Laub O, et al. Alpha Interferon Suppresses Hepatitis B Virus Enhancer Activity and Reduces Viral Gene Transcription[J]. J Virol, 1990, 64(4): 1821-1824. PMID: 2157063 PMCID: PMC249322.
- [11] Buster EH, Hansen BE, Lau GK, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. Gastroenterology, 2009, 137(6): 2002-2009. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.061.
- [12] 李明慧, 谢尧, 吴云忠, 等. 干扰素治疗慢性乙型肝炎时 e 抗原血清学转换的相关因素[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(7): 481-484. DOI: 10.3760/j.issn.1007-3418.2007.07.001.
- [13] Li MH, Zhang L, Qu XJ, et al. Kinetics of Hepatitis B Surface Antigen Level in Chronic Hepatitis B Patients who Achieved Hepatitis B Surface Antigen Loss during Pegylated Interferon Alpha-2a Treatment[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(5): 559-565. DOI: 10.4103/0366-6999.200554.
- [14] Marcellin P, Bonino F, Yurdaydin C, et al. Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients[J]. Hepatol Int, 2013, 7(1): 88-97. DOI: 10.1007/s12072-012-9343-x.

(收稿日期: 2017-11-21)

(本文编辑: 陈培莉)