

• 临床检验研究论著 •

恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者 HBV cccDNA 水平的影响*

张宝¹,李世龙²,朱敏³,秦莉¹,李小林¹,田珊红¹,张翠华¹,张燕¹

(1. 河北省唐山市传染病医院检验科,河北唐山 063000; 2. 河北省唐山市人民医院检验科,河北唐山 063000;

3. 国家安全生产监督管理总局职业安全卫生研究所石龙医院,北京 102300)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者经恩替卡韦治疗 24 个月后,血清及肝细胞中的乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状 DNA(cccDNA)表达水平的变化情况。方法 对 126 例慢性乙型肝炎患者给予恩替卡韦治疗 24 个月,采用荧光定量 PCR 法检测治疗前、后血清中的 HBV DNA,血清及肝细胞中的 HBV cccDNA 水平。结果 126 例慢性乙型肝炎患者经恩替卡韦治疗 24 个月,有 81.75%(103/126)的患者血清中 HBV DNA $<10^3$ copy/mL。16 例慢性乙型肝炎患者在肝细胞中检测到 HBV cccDNA,并且其水平在治疗前、后无变化。结论 经恩替卡韦治疗的慢性乙型肝炎患者,HBV DNA 复制虽然被有效抑制,但肝细胞内的 HBV cccDNA 并未被彻底清除。

关键词:肝炎,乙型; 病毒性肝炎; 恩替卡韦; 共价闭合环状 DNA; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1564-02

Influence of entecavir on HBV cccDNA levels in patients with chronic hepatitis B*

Zhang Bao¹, Li Shilong², Zhu Min³, Qin Li¹, Li Xiaolin¹, Tian Shanhong¹, Zhang Cuihua¹, Zhang Yan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Tangshan Hospital for Infectious Diseases, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China;

3. Shilong Hospital, National Security State Administration of Work Safety

Institute for Occupational Safety and Health, Beijing 102300, China)

Abstract: Objective To explore the changes of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) levels in chronic hepatitis B patients after 24 months of treatment with entecavir. **Methods** Serum levels of HBV cccDNA and HBV DNA, and liver cell levels of HBV cccDNA were detected in 126 patients with chronic hepatitis B before treatment and after treatment of entecavir for 24 months by using quantitative polymerase chain reaction. **Results** After treatment of entecavir for 24 months, there were 103 patients (81.75%) were with HBV DNA levels less than 10^3 copies/mL. HBV cccDNA could be detected in liver cells of 16 patients, but the levels were not with significant difference before and after treatment. **Conclusion** Although replication of HBV DNA could be effectively suppressed by treatment of entecavir, but HBV cccDNA in liver cells could not be completely removed.

Key words: hepatitis B; viral hepatitis; entecavir; covalently closed circular DNA; polymerase chain reaction

乙型肝炎病毒(HBV)是一种高度变异的病毒,因在逆转录复制过程中其 RNA 聚合酶和逆转录酶缺乏校正功能,导致 HBV 在慢性持续性感染过程中发生自然变异,或受人体疫苗接种和免疫应答影响发生变异,或是因各种抗病毒药物治疗诱导变异,发生变异的 HBV 经常发生生物学特性的改变,给临床治疗带来一系列问题。慢性乙型肝炎治疗主要包括抗病毒、抗炎保肝、抗纤维化、免疫调节和对症治疗 5 个方面^[1],其中抗病毒治疗主要采用核苷类药物。核苷类药物具有显著的抑制 HBV 复制的作用,它的出现为抗病毒治疗提供了新的、有效的方法。然而肝细胞中共价闭合环状 DNA(cccDNA)的持续存在,决定了慢性乙型肝炎患者需长期接受治疗,而随着用药时间的延长,HBV 可能会发生核苷类药物相关的耐药突变,从而导致肝炎发作,甚至导致肝衰竭和死亡^[2]。作为一个理想的核苷类抗病毒药物,恩替卡韦(ETV)是环氧羟碳脱氧鸟苷,它起效快,抑制病毒作用强,诱导变异率低^[3],但因肝细胞内 HBV cccDNA 的存在,HBV 会因为抗病毒药物的停用而大量复制。本研究通过分析恩替卡韦治疗前后血清及肝细胞内 HBV cccDNA 变化情况,为慢性乙型肝炎的治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008~2011 年河北省唐山市传染病医

院接受恩替卡韦抗 HBV 治疗的 126 例慢性乙型肝炎患者,其中男 98 例,女 28 例,年龄 26~67 岁,平均(44.00±12.75)岁。采集患者治疗前及治疗 24 个月后的血清标本,并从中选取 16 例患者实行肝组织病理学检查。

1.2 方法 丙氨酸氨基转移酶(ALT)采用日立 7080 全自动生化分析仪检测。HBV 血清标志物检测采用 ELISA 法,试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供并按照试剂说明书严格操作。血清 HBV DNA 检测采用实时荧光定量 PCR 方法,试剂由深圳匹基公司生产,仪器是美国 ABI 公司提供的 7700 型荧光定量基因扩增仪。肝细胞 HBV cccDNA 检测采用上海复星试剂盒,严格按照说明书操作。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计学软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

慢性乙型肝炎患者治疗前和经恩替卡韦治疗 24 个月后的各指标比较 经过 24 个月的治疗,有 81.75%(103/126)的慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA $<10^3$ copy/mL。接受肝组织病理学检查的 16 例患者,治疗前后肝细胞中 HBV cccDNA 水平比较差异无统计学意义($P=0.19$),见表 1。

* 基金项目:河北省科技厅课题资助项目(20131041)。 作者简介:张宝,女,主管检验师,主要从事基因检测研究。

表 1 慢性乙型肝炎患者治疗前后各指标比较

| 治疗时间 | ALT (IU/L, $\bar{x} \pm s$) | HBV DNA ($\bar{x} \pm s$) [*] | HBeAg 阳性率 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)] | 血清 HBV cccDNA ($\bar{x} \pm s$) [*] | 血清 HBV cccDNA 阳性率[%(<i>n</i> / <i>n</i>)] | 肝细胞 HBV cccDNA($\bar{x} \pm s$) [*] |
|----------|---------------------------------|---|---|---|--|---|
| 治疗前 | 261.13 ± 291.62 | 7.10 ± 0.95 | 61.90(78/126) | 4.92 ± 1.10 | 84.13(106/126) | 5.70 ± 1.02 |
| 治疗 24 个月 | 43.21 ± 16.30 | 2.6 ± 1.40 | 47.62(60/126) | 2.50 ± 0.91 | 0(0/126) | 5.19 ± 0.89 |

* : HBV DNA、血清 HBV cccDNA、肝细胞 HBV cccDNA 定量结果均取对数值。

3 讨 论

慢性乙型肝炎治疗的主要目的是长期最大化地消除和抑制 HBV,降低肝细胞的炎症坏死及肝脏纤维化程度,阻止和延缓疾病的进展,防止和延缓肝脏功能的失代偿、肝硬化、肝细胞癌及其肝性脑病等并发症的发生^[4],从而改善患者的生活质量,延长其存活时间。目前,恩替卡韦在治疗乙型肝炎方面具有起效快、抑制病毒作用强、诱导变异率低等优点。虽然三磷酸形式的恩替卡韦可抑制耐拉米夫定病毒株的复制^[5],但其抗病毒活性也相应减低。恩替卡韦对拉米夫定耐药患者会出现表型耐药,其价格较高,适用于经济条件好、病毒滴度较高、急需骤减 HBV 缓解肝脏炎症的重症患者。经体外试验表明,恩替卡韦对野毒株的敏感性高于拉米夫定耐药株^[2],通过限制 HBV 多聚酶与恩替卡韦的结合而导致抗 HBV 药物耐药突变的发生,变异位点主要为 rt184、rt202、rt205。有研究表明,对恩替卡韦治疗超过 6 个月达到临床疗效的慢性乙型肝炎患者换用拉米夫定继续治疗后,24% 的慢性乙型肝炎患者会出现 HBV DNA 反跳^[6],表明乙型肝炎患者换用拉米夫定治疗后并不能延续恩替卡韦的治疗效果。前期有国外文献报道,恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者 12 个月后其 HBV 应答比例超 67%,治疗 24 个月后的免疫学、生物化学和病毒学的应答比例分别为 31%、87% 和 80%^[7-8]。慢性乙型肝炎患者肝细胞内的 HBV cccDNA 是 HBV 持续复制的中间体,如不能去除,一旦终止使用抗 HBV 药物,HBV 会加剧复制,甚至引起重症肝炎。因此,检测肝细胞内 HBV cccDNA 对抗 HBV 治疗效果的评价有重要意义。经 24 个月恩替卡韦的治疗,慢性乙型肝炎患者血清中无 HBV cccDNA 复制。肝细胞内 HBV cccDNA 水平与治疗前比较有所减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$),证明恩替卡韦治疗并不能有效清除肝细胞内的 HBV cccDNA,停药后 HBV 复制反弹。特别对于经拉米夫定、恩替卡韦治疗后换用阿德福韦酯治疗的患者,应重叠用药 1~3 个月^[9],避免因 HBV 反跳而导致病情加重。目前,对于达到临床所定义的治疗终点的乙型肝炎患者进行肝细胞内 HBV cccDNA 的检测,可对停用抗病毒药后的病毒反跳作出预测,同时也为患者是否需要继续接受抗 HBV 药物的治疗提供参考依据。

恩替卡韦对不同的 HBV 变异株的抗病毒活性有差异,临床治疗显示,对于恩替卡韦抗病毒治疗的携带 HBV YMDD 变异株的患者,需要将药物剂量增加到 1 mg/d,才能有效抑制 HBV DNA 的复制^[10],而且对已经发生 HBV YMDD 变异的患者,治疗 12 个月后 HBV 的耐药率为 5.8%^[11],目前研究显示,乙型肝炎患者恩替卡韦耐药表型的出现只发生在已经存在拉米夫定耐药变异株的前提下。显然,深入了解乙型肝炎患者的病情及其个体差异,对不同的乙型肝炎患者或是在乙型肝炎患者感染 HBV 的不同时期,均需采取不同的治疗方案,才能

使患者得到最合理、最经济的治疗。目前,一个理想的抗 HBV 药物,需要满足以下几个条件:有持久强大的抗 HBV 效应,可以使免疫学、生物化学、病毒学及组织学应答改善^[12];安全、方便、有效、无耐药性产生;拥有较好的成本效益比。显然,到目前为止,还没有哪一个抗病毒药能够达到这样的要求,这就要求临床医生在现有的抗病毒药物中选择最适合的药物,弥补这些抗病毒药物的缺点,达到有效抗 HBV 的目的。

参 考 文 献

- [1] 郭枫,段文杰. 乙肝抗病毒治疗研究进展[J]. 医学信息: 上旬刊, 2010,23(3):710-711.
- [2] 杨芳. 核苷(酸)类似物相关 HBV 逆转录酶耐药突变的焦磷酸测序及个体化治疗[D]. 济南:山东大学,2011.
- [3] Lu L, Zhang HY, Yueng YH, et al. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients[J]. J Viral Hepat, 2009, 16(2):104-112.
- [4] 朱宇佳. 恩替卡韦对拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者的治疗效果[J]. 实用医学杂志, 2009,25(11):1882-1883.
- [5] 徐京杭,于岩岩,斯崇文,等. 马来酸恩替卡韦片治疗 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎的随机、双盲、双模拟对照、多中心临床研究 48 周结果[J]. 中华肝脏病杂志, 2012,20(7):512-516.
- [6] 赵攀,王希,祁京,等. 拉米夫定耐药株两种治疗策略的效果比较(拉米夫定和阿德福韦酯联用与恩替卡韦单用)[J]. 临床军医杂志, 2011,39(1):11-13.
- [7] Matsumoto K, Miyake Y, Miyatake H, et al. A combination treatment of entecavir and early-phase corticosteroid in severe exacerbation of chronic hepatitis B[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(13):1650-1652.
- [8] Fung J, Lai CL, Yuen J, et al. Randomized trial of lamivudine versus entecavir in entecavir-treated patients with undetectable hepatitis B virus DNA: outcome at 2 years[J]. Hepatology, 2011, 53(4):1148-1153.
- [9] 田珊红,胡金华,张宝,等. 阿德福韦酯联合拉米夫定治疗 HBV YMDD 变异慢性乙型肝炎疗效分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013,16(1):7-8.
- [10] 吴超飞. 拉米夫定耐药的临床与病毒学研究[D]. 广州:南方医科大学,2010.
- [11] 姚光弼,王宝恩,崔振宇,等. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎三年疗效观察[J]. 中华内科杂志, 2003,42(6):382-387.
- [12] Nguyen MH, Keeffe EB. Chronic hepatitis B: early viral suppression and long-term outcomes of therapy with oral nucleos(t) ides[J]. J Viral Hepat, 2009, 16(3):149-155.