

四川人群丙肝病毒基因型分布及与抗病毒疗效的相关性

丁柳, 钟慧钰, 宋兴勃, 陆小军, 周娟, 刘显中, 应斌武[△]

四川大学华西医院 实验医学科(成都 610041)

【摘要】 目的 调查四川地区丙肝病毒基因型的分布,探讨其与抗病毒疗效及疾病相关因素之间的关系。方法 对189例就诊于四川大学华西医院的丙肝患者进行基因型调查,并在聚乙二醇干扰素 α -2a联合利巴韦林抗病毒治疗前后的多个时间点对血清病毒载量进行测定,分析抗病毒治疗应答率,同时测定基线血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。结果 四川地区共发现4种HCV基因型,存在9种基因亚型,基因型以HCV-1型为主,占79.89%(151/189),其中1b型占78.84%;非HCV-1型感染者占20.11%(38/189)。HCV-1型感染者的治疗结束时病毒学应答(ETVR)率及早期病毒学应答(EVR)率低于非HCV-1型(分别为65.56% vs. 84.21%, 52.98% vs. 76.32%, $P < 0.05$);不同HCV基因型感染者的基线血清病毒载量及基线肝功能指标水平之间的差异并无统计学意义。结论 四川地区丙肝患者中以HCV-1型感染者最多。证实HCV基因型是四川地区丙肝患者重要的抗病毒治疗疗效的预测因素。

【关键词】 丙肝病毒 基因型 四川人群 治疗学

HCV Genotype Distribution in Southwest China and Its Influence on Patients' Response to Pegylated-interferon α -2a Plus Ribavirin Therapy DING Liu, ZHONG Hui-yu, SONG Xing-bo, LU Xiao-jun, ZHOU Juan, LIU Xian-zhong, YING Bin-wu[△]. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: docbwy@126.com

【Abstract】 Objective To study the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotype in Sichuan population and to investigate the effects of HCV genotypes on the viral response of hepatitis C patients treated with pegylated interferon α -2a plus ribavirin as well as the relationship between HCV genotype and the severity of disease. **Methods** 189 patients with HCV infection were enrolled. The level of serum HCV-RNA at various points during the treatment was measured while HCV genotypes and baseline serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) were detected. **Results** The genotype of HCV in Sichuan population is dominated by genotype-1 (which accounting for 79.89%), while the other genotypes accounting for 20.11%. Patients with genotype-1 infection have lower end-of-treatment virological response (ETVR) rates and early virological response (EVR) compared with non-genotype-1 patients ($P < 0.05$). But the disease-associated indexes between these two groups have no significant differences. **Conclusion** The distribution of the HCV genotypes in Sichuan population has certain regularity, dominated by HCV genotype-1 infection. We confirmed that HCV genotype can be a predictive factor of the virological response of the standard antiviral treatment.

【Key words】 HCV Genotype Sichuan population Therapeutics

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的丙型肝炎呈全球性流行,并逐年增加。根据HCV基因组核苷酸序列差异程度,可将HCV分为6种基因型和多种亚型,在中国流行的HCV亚型以1b(66%)和2a(14%)型为主,1b型最为流行。目前中国西部及西南地区的HCV基因型分布鲜有报道,此前有研究表明中国西南地区(重庆)以HCV 1b型为主(42%),其次为2a型(9.7%),3a、3b、6a型各占12.1%、21.0%、14.0%^[1]。同样处于西南地

区的四川人口众多,丙肝防治形势严峻,故对四川地区丙肝患者的HCV基因型调查尤为重要。

另一方面,HCV感染后50%~85%将发展为慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC),CHC可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化,部分可发展为肝硬化甚至肝细胞癌,严重影响丙肝患者的生活^[2]。目前治疗丙型肝炎的最佳标准方案仍是干扰素和利巴韦林的联合治疗^[3],其疗程相对较长、费用昂贵、副作用大,迫切需要依靠抗病毒疗效预测因素制定个体化治疗方案。大量研究表明HCV基因型是目前抗病毒治疗方案较为确切的预测因素^[4-6],但目

[△] 通讯作者, E-mail: docbwy@126.com

前尚未在四川地区丙肝感染人群中验证。

本研究通过对四川地区丙型肝炎患者进行 HCV 基因型调查及抗病毒治疗应答率的分析,探讨四川地区 HCV 基因型的分布及其与聚乙二醇干扰素 α -2a 联合利巴韦林抗病毒治疗应答率之间的相关性,同时测定纳入四川地区丙肝患者的基线血清病毒载量及肝功能指标,分析 HCV 基因型与四川地区丙肝患者疾病相关因素之间是否有联系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

本研究纳入病例为 2007~2013 年间收治于四川大学华西医院的 189 例丙肝患者,其中男 82 例(43.4%),女 107 例(56.6%),平均年龄(43±12.4)岁,其诊断符合 2000 年中华医学会传染病和寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》^[3],所有患者血清 HCV-RNA 均阳性,排除重叠或混合感染甲、乙、戊型肝炎者,并排除 EB 病毒、巨细胞病毒(CMV)等其他病毒的感染。采取患者静脉血标本,采用 EDTA 抗凝,2~6 °C 保存。

1.2 研究方法

1.2.1 抗病毒治疗方案 纳入病例予聚乙二醇干扰素 α -2a(相对分子质量 40 000,罗氏公司,德国)180 μ g 型每周 1 次,皮下注射,联合口服利巴韦林胶囊(上海诚谊天平)1 000 mg/d(体质量<75 kg)或 1 200 mg/d(体质量>75 kg)。丙肝病毒基因 1 型及未分型者疗程为 48 周,病毒基因非 1 型疗程为 24 周。

1.2.2 病毒学应答判定标准 通过治疗前后多个时间点测定的血清病毒载量对丙肝患者抗病毒治疗应答进行判定。病毒学应答是指血清 HCV-RNA 检测即达阴性(或定量小于最低检测限)或血清 HCV-RNA 定量检测较治疗前降低 2 个对数级(lg);快速病毒学应答(rapid virological response, RVR)是指开始治疗 4 周时检测符合上述标准;早期病毒学应答(early virological response, EVR)是指治疗开始 12 周时血清 HCV-RNA 检测结果符合上述标准;治疗结束时病毒学应答(end-of-treatment virological response, ETVR)是指按标准抗病毒方案治疗结束时血清 HCV-RNA 检测结果符合上述标准;持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)是指治疗结束后至少随访 24 周时患者血清 HCV-RNA 检测结果符合上述标准。本研究同时分析了患者进行抗病毒治疗后的

RVR 率、EVR 率及 ETVR 率(以患者总数为基数计算)。

1.2.3 HCV 基因分型检测 采用直接测序法对 HCV 的 5'-UTR 区测序,从而对 HCV 分型。测序仪器为 3500 型 DNA 测序仪(美国 AB 公司),分型试剂盒由上海申友生物技术有限责任公司生产。

1.2.4 HCV-RNA 定量检测 利用荧光定量 PCR 法(RT-PCR)检测患者血清中的 HCV-RNA 载量,所用仪器为罗氏 480 荧光定量 PCR 仪,检测试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司生产。

1.2.5 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测 采用酶比色法测定丙肝患者基线血清 AST、ALT 的值,仪器为 P800 生化分析仪(罗氏公司,上海),检测试剂盒由罗氏公司生产。

1.3 统计学方法

比较不同性别组间 HCV 基因型分布的差异采用 χ^2 检验,比较不同年龄段组间 HCV 基因型分布的差异采用 χ^2 分割检验或 Fisher's 精确检验;HCV-1 型与非 HCV-1 型感染者的抗病毒治疗 ETVR 率及 EVR 率的比较采用 χ^2 检验;4 种 HCV 基因型组的血清病毒载量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间血清病毒载量的比较采用单因素方差分析;4 种 HCV 基因型组丙肝患者的肝功能异常比例间的比较采用 χ^2 检验。所有统计检验均采用双侧检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 四川地区 HCV 基因型分布频率

见图 1。对四川地区丙肝患者病毒基因型的调查发现,四川地区 HCV 基因型分布有一定规律。在纳入的 189 例四川地区丙肝患者中共发现 4 种基因型,即 HCV 基因型 1、2、3、6,其中 HCV-1 型感染者最多,占 79.89%(151/189),1b 型占 78.84%(149/189);非 HCV-1 型感染者占 20.11%(38/189)。

将所有纳入病例分别按性别和年龄分组,各 HCV 亚型在不同性别组及不同年龄段组中的分布见图 2。观察在四川地区占绝对优势的 HCV-1b 型在不同性别组中的分布,发现男性中 HCV-1b 型感染者所占比例略高于女性,经卡方检验得出其差异无统计学意义($\chi^2=0.237, P=0.720$);在不同年龄段组中观察 HCV-1b 型的分布,发现 30~40 岁年龄段中 HCV-1b 型分布频率低于其他年龄段,经过 χ^2 检验得出 6 个年龄段中 HCV-1b 型的分布频率

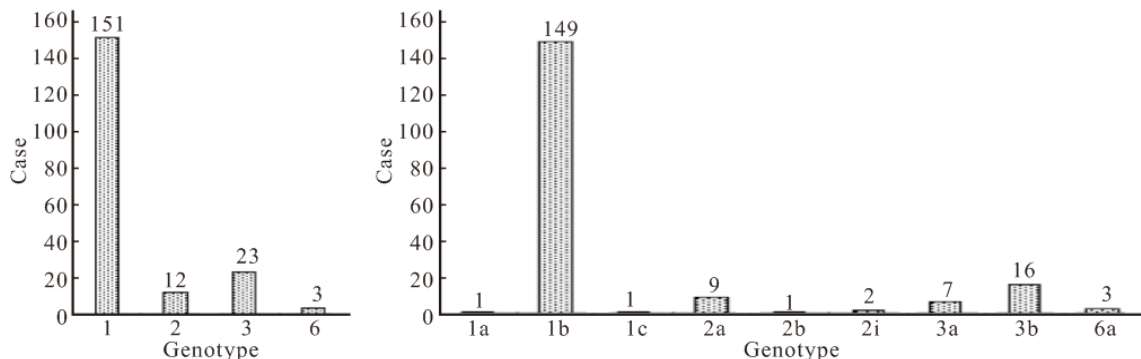


图 1 四川地区 HCV 基因型分布

Fig 1 HCV genotype distribution in Sichuan region

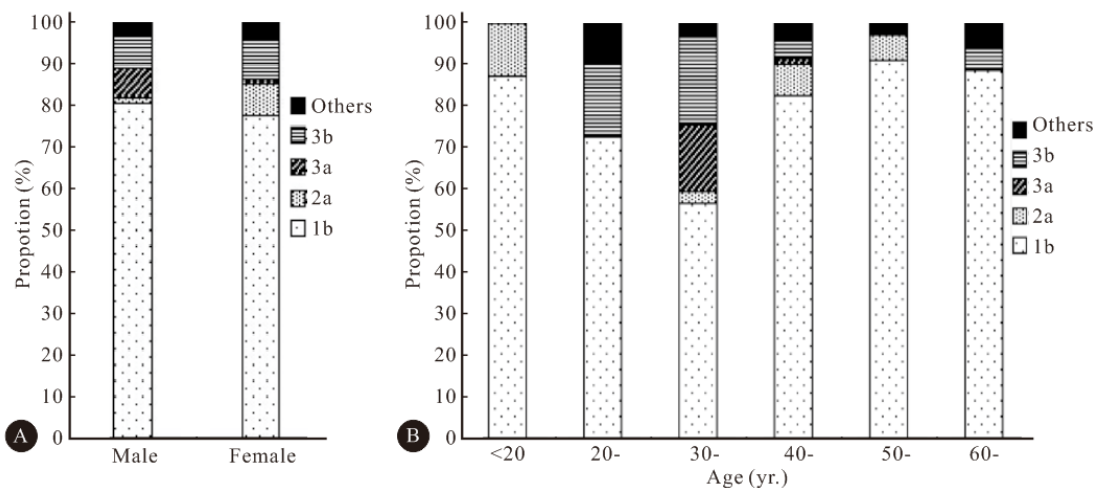


图 2 HCV 基因型在性别(A)与年龄(B)中的分布

Fig 2 HCV genotype distribution by gender (A) and age (B)

不全相同,对各个年龄段进行两两之间 χ^2 分割检验或 Fisher's 精确检验,发现 30~40 岁年龄段中 HCV-1b 型分布频率与 40~50 岁年龄段、50~60 岁年龄段及 >60 岁年龄段之间的差异有统计学意义(校正 χ^2 值分别为 7.237、9.026、4.313, $P < 0.05$),而其余各年龄段之间的 HCV-1b 型分布频率差异无统计学意义。

2.2 HCV 基因型与四川地区丙肝患者抗病毒治疗应答率的关系

在纳入的丙肝患者中,不同 HCV 基因型感染者在抗病毒治疗后产生 ETVR、EVR 及 RVR 的人数见表 1。抗病毒治疗应答率的计算采用 ETVR 作为应答标准。纳入丙肝病例的总体抗病毒治疗应答率为 69.31% (131/189),HCV-1 型患者的治疗应答率为 65.56% (99/151),其中 1b 型最低,为 65.10% (97/149)。非 HCV-1 型患者的治疗应答率为 84.21% (32/38),其中 2a 型最高,为 88.89% (8/9)。经过 χ^2 检验得出 HCV-1 型感染者抗病毒治疗应答率与非 HCV-1 型感染者相比差异有统计

学意义 ($\chi^2 = 4.963, P < 0.05$)。同时可以观察到,在抗病毒治疗后达到 ETVR 的丙肝患者中,有部分产生了 EVR,以抗病毒治疗后达到 ETVR 的同时产生 EVR 的患者在所有患者中所占的百分比为其 EVR 率,得出纳入病例总体抗病毒治疗后的 EVR 率为 57.67% (109/189),其中 HCV-1 型感染者的 EVR 率为 52.98% (80/151),非 HCV-1 型感染者的 EVR 率为 76.32% (29/38),经过 χ^2 检验得出两者之间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.772, P < 0.05$)。

表 1 不同 HCV 基因型患者抗病毒治疗应答率[例数(%)]

Table 1 Patients' response rate to antiviral treatment in different HCV genotypes [case (%)]

HCV genotype	ETVR [#]	EVR	RVR
Genotype 1	99 (76.2)	80 (73.4)	23 (74.2)
Non-genotype 1	32 (24.4)	29 (26.6)	8 (25.8)
Total	131 (100)	109 (100)	31 (100)

at 48 weeks for genotype 1, at 24 weeks for non-genotype 1

2.3 HCV 基因型与四川地区丙肝患者基线实验室指标水平的关系

我们分别分析在四川地区占优势的 HCV-1 型及 HCV-2、3、6 型感染者的基线血清病毒载量及基线肝功能指标异常者所占比例,4 种 HCV 基因型感染者的基线血清病毒载量及基线肝功能指标异常(男性为 ALT>55 IU/L 和/或 AST>46 IU/L,女性为 ALT>38 IU/L 和/或 AST>37 IU/L)人数见表 2、表 3。

观察 HCV-1、2、3、6 型感染者的基线血清病毒载量,发现 HCV-2 型感染者基线载量较低,而 HCV-3 型感染者基线载量较高,经单因素方差分析得出 4 种基因型感染者基线血清病毒载量之间的差异并无统计学意义($F=1.547, P=0.204$)。

根据 4 种 HCV 基因型感染者中基线肝功能指标异常人数计算得到其肝功能异常者所占比例分别为 54.97%、50.00%、73.91%、66.67%,差异无统计学意义($\chi^2=4.876, P=0.181$)。

表 2 HCV 基因型与四川地区丙肝患者基线血清病毒载量的关系

Table 2 Patients' baseline viral load in different HCV genotypes

HCV genotype	<i>n</i>	HCV-RNA (lg copies/mL)
Genotype 1	151	6.155 3±0.974 4
Genotype 2	12	5.753 3±0.679 0
Genotype 3	23	6.427 4±0.574 8
Genotype 6	3	6.115 4±0.881 7

表 3 HCV 基因型与四川地区丙肝患者基线肝功能指标异常的关系

Table 3 Number of patients with abnormal baseline liver function indexes in different HCV genotypes

HCV genotype	<i>n</i>	AST abnormal (case)	ALT abnormal (case)
Genotype 1	151	81	83
Genotype 2	12	6	6
Genotype 3	23	14	17
Genotype 6	3	1	2

3 讨论

本研究主要探讨了四川地区 HCV 基因型的分布及其与聚乙二醇干扰素 α -2a 联合利巴韦林抗病毒治疗应答率之间的关系。HCV 基因型及亚型有不同的传播与流行特点,基因型 1 型、2 型在世界范围内广泛分布,而一些“地方流行性”基因型(如 HCV3、4、5 型等)则只在特定区域流行^[7]。中国地区流行的有 1、2、3、6 型 4 种 HCV 基因型,亚型以 1b 型为主,部分地区有 2a、3a 等亚型报道,地区间差异较大^[8]。Zhang 等^[9]调查发现我国江苏地区已有 7 种 HCV 基因亚型,主要流行的 HCV 基因亚型为 3a 型(6.15%)和 1b 型(75.00%)。刘丽君等^[10]

调查发现,位于中国南部和西南的广州和重庆的 HCV 基因型分布均以 1b 型为主(72.53%),并首次在广州检出 HCV-6a 型感染(5.88%);而重庆则存在 2a、3a、3b 和 6a 型等多种 HCV 基因型分布。刘剑荣等^[11]对江西地区 102 例 HCV 感染标本进行基因型调查,共发现 7 种 HCV 基因亚型,其中 1b 型为主(72.6%),其次为 6 型(8.8%)和 2a 型(7.8%)。Ling 等^[12]调研发现,昆明地区 HCV 基因 3 型所占比例接近 40%,基因 1b 型、2 型、6v 型各占约 20%。我们本次研究纳入的 189 例四川地区丙肝患者中,HCV-1 型感染者占 79.89%,其中 1b 型占 78.84%,略高于南方地区中江苏、江西、广州及重庆等地的报道,明显高于昆明地区;非 HCV-1 型感染者占 20.11%,其中 3b 型最多(8.47%),其次为 2a 型(4.76%),HCV-3 型分布频率(12.17%)高于江苏、重庆等地区,明显低于昆明地区,这可能是由于昆明等边境地区吸毒人员比例较高导致其 HCV-3 型的高分布频率。同时我们分析了 HCV-1b 型在不同年龄段及不同性别组中的分布,发现 30~40 岁年龄段中 HCV-1b 型分布频率低于 40~50 岁年龄段、50~60 岁年龄段及 >60 岁年龄段($P<0.05$),其余各年龄段及男、女性别组的 HCV-1b 型分布频率之间差异无统计学意义。

我们对四川地区丙肝患者抗病毒治疗疗效的分析发现,HCV-1 型感染者抗病毒治疗应答率低于非 HCV-1 型感染者(65.56% vs. 84.21%, $P<0.05$),HCV-1 型中以 1b 型治疗应答率最低(65.10%),而非 HCV-1 型中以 2a 型治疗应答率最高(88.89%);此外我们发现 HCV-1 型感染者在抗病毒治疗后的 EVR 率也低于非 HCV-1 型感染者(52.98% vs. 76.32%, $P<0.05$)。此前报道指出 HCV 病毒基因型与抗病毒治疗的疗效密切相关^[13、14],且丙肝患者对抗病毒治疗是否产生 EVR 对治疗效果的评价及疗程长短的选择具有指导意义^[15],本研究发现所纳入病例中 HCV-1b 型抗病毒治疗应答率最低,HCV-2a 型治疗应答率最高,且 HCV-1 型与非 HCV-1 型感染者抗病毒治疗应答率之间的差异具有统计学意义,在四川人群中证实了 HCV 病毒基因型是预测聚乙二醇干扰素 α -2a 联合利巴韦林抗病毒治疗应答率较为确切的因素。

此外,丙肝患者的基线血清病毒载量及肝功能指标(ALT、AST)与疾病的发展、转归及抗病毒治疗应答均相关,且血清病毒高载量可能增加传播的危险性,研究表明,HCV-1 型感染者体内的病毒复

制速度高于其他 HCV 基因型, HCV-1b 型感染者肝脏组织学分级及病程进展速度也高于 HCV-2 型^[16]。但对于 HCV 基因型与患者基线病毒载量及肝功能指标水平之间的关系尚无较为确切的结论, 关于丙肝患者基线实验室指标与抗病毒疗效间关系的研究亦未得出较为一致的结果^[17,18], 这可能受到丙肝患者感染 HCV 病程长短及自身免疫状态等影响。我们对纳入病例进行的血清 HCV-RNA 定量检测及肝功能指标的检测及分析显示, 4 种 HCV 基因型感染者的基线血清病毒载量之间差异无统计学意义($P=0.204$), 基线肝功能指标异常者在 4 种 HCV 基因型中所占比例之间的差异亦无统计学意义($P=0.181$)。但由于本次试验纳入病例数较少, 非 HCV-1 型感染者资料不足, 加之不同病毒基因型感染者的年龄、性别及基础条件之间存在一定差异, 故对于不同 HCV 基因型的基线病毒载量及基线肝功能指标水平之间是否存在差异无法得出肯定的结果。

通过对本次纳入的 189 例四川地区丙肝患者进行基因型调查及疗效观测, 我们已初步证实 HCV 基因型可作为四川地区丙肝患者抗病毒疗效预测因素, 为完善目前标准抗病毒治疗的疗效预测因素方面的研究, 我们将考虑进一步扩大样本量, 纳入更多非 HCV-1 型感染者进行调研, 并结合多方面实验室数据判定抗病毒疗效及治疗的不良反应, 得出更为确切的结论, 为临床的丙肝抗病毒治疗方案选择和疗效预测提供帮助。

参 考 文 献

- 1 Zhou YQ, Wang XH. Changes in modes of hepatitis C infection acquisition and genotypes in southwest China. *J Clin Virol*, 2009;46(3):231-232.
- 2 中华医学会肝病学会和传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南. *中华传染病杂志*, 2004;22(2):131-136.
- 3 中华医学会传染病和寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华内科杂志*, 2001;40(1):62-68.
- 4 Sarrazin C, Hezode C, Zeuzem S, *et al*. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 2012; 56 (Suppl 1): S88-S100.
- 5 Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*, 2008;49(4):634-651.
- 6 McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, *et al*. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med*, 2009;361(6):580-593.
- 7 Pybus OG, Markov PV, Wu A, *et al*. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *Int J Parasitol*, 2007;37(8-9):839-849.
- 8 赵璐, 冯悦. HCV 基因型的差异性流行与进化. *Hereditas*, 2012;34(6):666-672.
- 9 Zhang CY, Wu NN, Liu J, *et al*. HCV subtype characterization among injection drug users; implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China. *PLoS One*, 2011; 6(2):e16817. doi:10.1371/journal.pone.0016817.
- 10 刘丽君, 张瑞. 中国南部和西南地区 HCV 感染的基因型分布特征. *中国现代医学杂志*, 2007;17(19):2337-2340.
- 11 刘剑荣, 黄永建. 丙型肝炎基因型分布特点及流行分析. *国际检验学杂志*, 2010;31(12):1347-1348.
- 12 Ling L, Tatsimpro M. Hepatitis virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J Med Virol*, 2005; 75(4):540-542.
- 13 焦健, 王江滨. 丙型肝炎病毒基因型及患者人类白细胞抗原对其抗病毒疗效的影响. *中华肝脏病杂志*, 2003;11(10):620-622.
- 14 Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, *et al*. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology*, 2006;43(5):954-960.
- 15 Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J, *et al*. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J Viral Hepat*, 2005; 12(5):465-472.
- 16 Kryczka W, Brojer E, Zarebska-Michaluk D, *et al*. Factors influencing natural history of chronic hepatitis C. *Med Sci Monit*, 2001;(Suppl 1):212-216.
- 17 周友乾, 尹凤鸣. 丙型肝炎病毒载量与基因型和抗病毒疗效的关系研究. *实用肝脏病杂志*, 2011;14(5):340-343.
- 18 封波, 李小波. 丙型肝炎肝硬化患者抗病毒疗效的影响因素分析. *传染病信息*, 2012;25(2):104-106.

(2014-11-14 收稿, 2015-03-19 修回)

编辑 吕熙