

广州地区丙型肝炎患者肌苷三磷酸酶基因多态性与利巴韦林所致贫血的相关性

邓浩辉 许敏 李晓强 雷春亮

【摘要】目的 探讨慢性丙型肝炎患者肌苷三磷酸酶 (ITPA) 单核苷酸基因多态性 (SNP) 与治疗过程中利巴韦林相关溶血性贫血发生的相关性。**方法** 收集本院2012年3月至2015年9月收治的使用聚乙二醇化干扰素 (PegIFN) 联合利巴韦林抗病毒治疗的慢性丙型肝炎患者的全血标本, 采用直接测序法检测ITPA rs1127354、rs7270101和20号染色体连锁的rs6051702位点的SNP, 并收集患者抗病毒治疗后第4、12、24、36、48周血红蛋白 (Hb) 数据和药物调整情况, 使用独立样本 t 检验、卡方检验、重复测量和多变量方差分析比较不同位点SNP和利巴韦林相关贫血、药物调整的关系。**结果** 本研究共纳入85例丙型肝炎患者, 其中78例患者完成48周抗病毒治疗并有完整的随访资料。85例患者中ITPA rs1127354位点CC型61例 (71.8%), AC型21例 (24.7%), AA型3例 (3.5%); rs7270101位点85例均为AA型 (100%); 20号染色体rs6051702位点CC型2例 (2.3%), AC型22例 (25.9%), AA型61例 (71.8%), 其中7例未完成治疗的患者rs1127354位点均为CC型, rs6051702位点均为AA型。完成48周抗病毒治疗的78例患者中, rs1127354位点AC和AA型有4例 (16.7%) 患者在治疗过程中需调整利巴韦林剂量, 24例 (44.4%) CC型患者需调整利巴韦林剂量, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.571$ 、 $P = 0.018$); rs6051702位点的SNP与药物剂量调整无显著相关性 ($\chi^2 = 1.789$ 、 $P = 0.182$)。rs1127354位点AC型和AA型患者治疗第4周、12周、24周血红蛋白下降水平显著低于CC型患者 (P 均 < 0.05)。**结论** 广州地区ITPA rs7270101位点不存在SNP, rs1127354位点AA型和AC型对利巴韦林相关贫血有保护作用, 对该位点SNP检测有利于指导临床医生个体化用药。

【关键词】 肝炎, 丙型, 慢性; 肌苷三磷酸酶; 利巴韦林; 贫血

Correlation of inosine triphosphate pyrophosphatase single nucleotide polymorphism and ribavirin-related anemia in patients with chronic hepatitis C in Guangzhou Deng Haohui, Xu Min, Li Xiaoliang, Lei Chunliang.
Department of Liver Diseases, Guangzhou the Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China
Corresponding author: Lei Chunliang, Email: gz8hlcl@126.com

【Abstract】Objective To investigate inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) single nucleotide polymorphism (SNP) in patients with hepatitis C in Guangzhou and the correlation of ribavirin-related anemia during 48 weeks antiviral therapy. **Methods** The blood sample of hepatitis C patients treated with polyethylene glycol interferon (PegIFN) and ribavirin (RBV) were collected to detect SNP of ITPA rs1127354, rs7270101 and rs6051702 on chromosome 20 by direct sequencing method, and the data of hemoglobin (Hb) at 4, 12, 24, 36 and 48 weeks during treatment were collected and analyzed by independent-samples t test, χ^2 test, repeated measures and multivariate ANOVA. **Results** Total of 85 patients with hepatitis C were enrolled, including 78 patients with hepatitis C who finished the 48 weeks treatment. Among the 85 patients with hepatitis C, genotyping of ITPA rs1127354 showed that 3 patients (3.5%) were homozygous for AA, 21 patients (24.7%) were heterozygous for AC, 61 patients (71.8%) were homozygous for CC. All the 85 patients were homozygous for AA in ITPA rs7270101. Two patients (2.3%) in rs6051702 on chromosome 20 were homozygous for CC, 22 patients (25.9%) were heterozygous for AC, 61 patients (71.8%) were homozygous for CC. Four patients (16.7%) in rs1127354 AA and AC needed to reduce the dose of ribavirin during the treatment, however, the chance of reducing the dose of ribavirin was much higher in rs1127354 CC genotype ($\chi^2 = 5.571$, $P = 0.018$).

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.02.013

基金项目: 广州市医药卫生科技项目 (No. 20141A010033)

作者单位: 510060 广州市, 广东省广州市第八人民医院肝病科

通信作者: 雷春亮, Email: gz8hlcl@126.com

and rs6051702 genotypes were not significantly related to dose reduction of ribavirin ($\chi^2 = 1.789$, $P = 0.182$). Anemia in rs1127354 CC genotype was more frequent than AA and AC genotypes at 4, 12 and 24 weeks during treatment (P all < 0.05). **Conclusions** ITPA rs7270101 SNP doesn't among hepatitis C patients in Guangzhou. The rs1127354 AC/AA genotypes were protective factor for ribavirin related anemia.

【Key words】 Hepatitis C; Inosine triphosphate pyrophosphatase; Ribavirin; Anemia

聚乙二醇化干扰素 (polyethylene glycol interferon, PegIFN) 联合利巴韦林仍是我国丙型肝炎患者抗病毒治疗的基本方案, 既往研究表明, ITPA基因多态性和利巴韦林相关溶血性贫血有关, 利巴韦林相关溶血性贫血给临床用药带来一定的困扰, 故对其研究具有重要的临床意义; 我国南方地区特别是广州地区尚少见相关研究, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

前瞻性收集2012年3月至2015年9月于广州市第八人民医院门诊使用PegIFN联合利巴韦林抗病毒治疗前的符合入选和排除标准的慢性丙型肝炎患者全血标本和患者治疗过程中的相关临床资料进行研究。所有患者已签署知情同意书, 由本院医学伦理部门审核通过并同意。

1. 入选条件: 所有入选患者诊断符合中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会2015年发布的《丙型肝炎防治指南》^[1]。慢性丙型肝炎患者抗病毒治疗方案: PegIFN- α -2a 180 μ g、1次/周皮下注射或PegIFN- α -2b (1.5 μ g/kg) 联合利巴韦林800~1 200 (根据体重决定)。

2. 排除标准: 排除合并肝硬化、其他病毒性肝炎、酒精性肝病、脂肪肝、药物性肝炎和自身免疫性肝炎, 既往曾使用抗病毒治疗的丙型肝炎患者。

二、方法

1. ITPA rs1127354、rs7270101和20号染色体rs6051702位点SNP检测: 丙型肝炎患者基因组DNA的提取: 采用QIAGEN mini DNA kit提取试剂盒法进行提取, 具体步骤按试剂盒说明书进行。使用PCR扩增包含目的位点的基因片段, Primer

Premier 6.0设计引物, 所使用的PCR引物见表1, PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 55 $^{\circ}$ C、25 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸2 min。PCR扩增产物经琼脂糖电泳验证产物后送广州睿博兴科公司进行测序。使用Bioedit软件, 进行序列峰图分析, 并根据序列测序图确定患者rs1127354、rs7270101、rs6051702位点的SNP, 每个样本均采用双端测序。

2. 收集使用PegIFN联合利巴韦林抗病毒治疗患者第4、8、12、24、36和48周血红蛋白的检测数据。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。患者年龄、血红蛋白下降量为计量资料, 呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组别的比较采用独立样本 t 检验, 重复测量数据和多变量方差分析; 计数资料以例数和百分比表示, 采用 χ^2 检验、Fisher确切概率检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、研究对象的一般资料

本研究共纳入丙型肝炎患者85例, 其中男性58例, 女性27例, 平均年龄(41.1 ± 6.4)岁, 其中78例患者完成48周抗病毒治疗并有完整的随访记录。6例因中性粒细胞减少或血小板减少停药, 1例因精神症状停药。

二、ITPA rs1127354、rs7270101和20号染色体rs6051702位点基因多态性

85例丙型肝炎患者各位点的SNP如下: ITPA rs1127354位点CC型患者61例 (71.8%), AC型患者21例 (24.7%), AA型患者3例 (3.5%), 最小等位基因频率 (MAF) 15.8%; 85例患者的

表1 ITPA和20号染色体连锁的SNP位点的引物序列

SNP位点	上游引物 (F)	下游引物 (R)
rs1127354	5'-AAGAGATAGAGAAGCAAGGA-3'	5'-CTGGACAAGAAGAGCAAGT-3'
rs7270101	5'-GAAGAGATAGAGAAGCAAGGA-3'	5'-CTGGACAAGAAGAGCAAGT-3'
rs6051702	5'-GGTATCTAGCTGATACTTGG-3'	5'-CCTGTGAATTTACTTCTGT-3'

rs7270101位点均为AA型(100%); 20号染色体rs6051702位点CC型2例(2.3%), AC型22例(25.9%), AA型61例(71.8%), 最小等位基因频率(MAF) 14.1%。rs1127354和rs6051702位点符合Hardy-Weinberg遗传定律, 见表2。

三、ITAP基因多态性与利巴韦林减量的关系

因rs1127354位点AA型和rs6051702位点的CC型患者例数较少, 参考相关文献^[2], 与上述位点的AC型合并进行分析。7例未完成48周疗程的患者rs1127354均为CC型, rs6051702位点均为AA型, 其中6例(85.7%)因中性粒细胞或血小板减少停药, 1例(14.3%)患者因精神症状停药。完成48周抗病毒治疗的78例患者中, 4例(16.7%)患者rs1127354位点AC型和AA型患者在治疗过程中需减少利巴韦林剂量, 24例(44.4%) CC型患者需减少药物剂量, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.571$ 、 $P = 0.018$); 6例(25%) rs6051702位点AC型和CC型患者在治疗过程中需减少利巴韦林剂量, 22例(40.7%) AA型患者需减少利巴韦林剂量, 差异无统计学意义($\chi^2 = 1.789$ 、 $P = 0.182$)。

四、ITPA基因多态性与利巴韦林相关贫血的相关性

ITPA rs1127354位点CC型患者基线血红蛋白为(14.47 ± 1.58) g/dl, AC型患者基线血红蛋白为(13.92 ± 1.62) g/dl, AA型患者基线血红蛋白为(13.1 ± 3.4) g/dl, 三组患者基线血红蛋白差异无统计学意义($F = 1.331$ 、 $P = 0.271$)。各时间点相对基线的Hb下降水平见表2。其中治疗后第4、12和24周AC和AA型血红蛋白下降水平显著低于

CC型患者(P 均 < 0.05), 第36周和48周无显著差别。rs6051702位点AA型、AC型和CC型患者基线血红蛋白差异无统计学意义($F = 1.421$ 、 $P = 0.253$), 各时间点相对基线的Hb下降水平见表3, 差异无统计学意义。

讨 论

本研究结果提示, 广州地区丙型肝炎患者ITPA rs7270101位点不存在SNP, rs1127354位点的AA型和AC型对利巴韦林相关贫血有保护作用, 20号染色体连锁的rs6051702位点的SNP和利巴韦林相关贫血无显著相关性。

有研究显示, rs1127354、rs6051702和rs7270101位点基因多态性和贫血相关, 单因素和多因素分析均提示上述位点与是否出现严重溶血性贫血有关(定义为治疗4周时Hb下降3 g/dl或Hb < 10 g/dl)^[3-5]。但亚洲学者研究表明, rs7270101位点在亚洲人群不存在基因多态性, 且20号染色体连锁的rs6051702位点与利巴韦林贫血弱相关或不相关^[5-7], 此种差异可能因不同人种基因连锁不平衡所致。国内学者的研究也支持该结果, 认为仅有rs1127354位点和利巴韦林贫血相关, 而rs6051702位点与其不相关^[2]。本研究结果表明, rs1127354位点最小等位基因频率和亚洲地区的研究相仿, 但较西方国家高^[3, 5, 8], 该位点的基因多态性与治疗后4、12和24周利巴韦林贫血相关, 另外, 本研究也分析了该位点与利巴韦林剂量减少的关系, 发现该位点为CC型患者利巴韦林剂量减少的机率更高, 因此, 治疗36周、48周后血红蛋白下降量与该位点的基

表2 85例丙型肝炎患者ITPA rs1127354、rs7270101和20号染色体连锁rs6051702位点的基因多态性[例(%)]

SNP位点	CC型	AC型	AA型	Hardy-Weinberg检验(χ^2 值)	P值
rs1127354	61 (71.8)	21 (24.7)	3 (3.5)	0.4828	0.4871
rs6051702	2 (2.3)	22 (25.9)	61 (71.8)	0.0001	0.9921
rs7270101	0 (0.0)	0 (0.0)	85 (100.0)	—	—

表3 78例患者48周治疗过程中rs1127354和rs6051702位点各时间点血红蛋白下降水平($\bar{x} \pm s$, g/dl)

治疗时间	rs1127354				rs6051702			
	CC型 (n=54)	AC/AA型 (n=24)	F值	P值	AA型 (n=54)	AC/CC型 (n=24)	F值	P值
4周	1.81 \pm 1.60	0.56 \pm 1.02	11.401	0.001	1.56 \pm 1.80	1.45 \pm 1.19	0.047	0.830
12周	3.30 \pm 1.68	2.43 \pm 1.41	4.395	0.040	3.21 \pm 1.68	2.79 \pm 1.81	0.674	0.415
24周	3.68 \pm 1.75	2.76 \pm 1.54	4.459	0.038	3.67 \pm 1.70	2.72 \pm 2.06	3.136	0.082
36周	3.38 \pm 1.87	3.14 \pm 1.96	0.241	0.625	3.27 \pm 1.67	4.53 \pm 4.24	2.612	0.112
48周	1.68 \pm 2.24	2.58 \pm 2.20	2.423	0.124	2.67 \pm 2.97	2.76 \pm 3.40	0.008	0.930

因多态性不相关可能与不同基因型间利巴韦林剂量调整差异有关。本研究提示rs1127354与利巴韦林相关贫血有关,与亚洲地区的研究结论基本一致^[3,5,7,9]。

聚乙二醇化干扰素联合利巴韦林仍是我国治疗丙型肝炎的标准治疗方案^[1],虽然目前国外指南已推荐DAA作为丙型肝炎治疗的首选^[10-14],但部分DAA仍需联合利巴韦林进行治疗^[15-18],国外学者研究表明,ITPA基因多态性与DAA联合利巴韦林抗病毒治疗所致的溶血性贫血有关^[19-20]。利巴韦林主要不良反应为溶血性贫血,常导致患者不能耐受,需减少药物剂量,为临床医生和患者用药带来困扰,因此,对利巴韦林相关贫血的研究具有重要临床意义。近年来,国内外学者通过GWAS方法发现特定SNP位点和疗效有关,如IL-28B基因多态性对干扰素抗HCV疗效有预测作用^[21-24],ITPA基因多态性和利巴韦林相关贫血和药物减量有关^[4,25],但SNP位点在各地区和不同人种的差异很大,国内对ITPA基因多态性与利巴韦林相关贫血的研究较少,且缺乏对广州地区丙型肝炎患者人群ITPA多态性的研究,因此,本研究探讨ITPA基因多态性在本地区人群的分布,尤其对rs1127354位点的检测,能对患者个体化治疗提供参考依据。本研究对本地区丙型肝炎患者进行ITPA位点SNP的检测,但例数相对较少,应继续扩大样本量,进一步了解本地区ITPA基因多态性和其与利巴韦林相关贫血的相关性。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015,7(3):19-35.
- [2] 王茉莉,潘煜,姜晶,等. ITPA基因变异与干扰素联合利巴韦林治疗过程中发生贫血的相关性[J]. 中国老年学杂志,2013,33(12):2759-2761.
- [3] Thompson AJ, Fellay J, Patel K, et al. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction[J]. Gastroenterology,2010,139(4):1181-1189.
- [4] Fellay J, Thompson AJ, Ge D, et al. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C[J]. Nature,2010,464(7287):405-408.
- [5] Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, et al. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin[J]. Antiviral Therapy,2011,16(5):685-694.
- [6] Ochi H, Maekawa T, Abe H, et al. ITPA Polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients[J]. Gastroenterology,2010,139(4):1190-1197.
- [7] Kim JS, Ahn SM, Jung YK, et al. The impact of inosine triphosphatase variants on hemoglobin level and sustained virologic response of chronic hepatitis C in Korean[J]. J Korean Med Sci,2013,28(8):1213-1219.
- [8] Zhang X, Cai Q, Hong C, et al. Prevalence of IL-28B and ITPA genotypes in Chinese Han population infected persistently with hepatitis C virus genotype 6 or HCV-1[J]. J Med Virol,2013,85(7):1163-1169.
- [9] Wu LS, Jimmerson LC, Macbrayne CE, et al. Modeling ribavirin-induced anemia in patients with chronic hepatitis C virus[J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol,2016,5(2):65-73.
- [10] 闫改勤, 庞婷, 邢卉春, 等. 2014年EASL丙型肝炎治疗推荐意见解读[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(3):299-304.
- [11] 成军. 慢性丙型肝炎治疗的过去, 现在和未来[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(1):4-5.
- [12] EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection[J]. J Hepatol,2014,60(2):392-420.
- [13] Hepatitis C guidance: AASLD-IDS recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus[J]. Hepatology,2015,62(3):932-954.
- [14] Lim SG, Dan YY. A 2015 roadmap for the management of hepatitis C virus infections in Asia[J]. Korean J Intern Med,2015,30(4):423-433.
- [15] Mensing S, Polepally AR, Konig D, et al. Population pharmacokinetics of paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir, ritonavir, and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: combined analysis from 9 phase 1b/2 studies[J]. AAPS J,2016,18(1):270-280.
- [16] Suwanthawornkul T, Anothaisintawee T, Sobhonslidsuk A, et al. Efficacy of second generation direct-acting antiviral agents for treatment naive hepatitis C genotype 1: a systematic review and network Meta-analysis[J]. PLoS One,2015,10(12):e145953.
- [17] 谢尧. 中国慢性丙型肝炎抗病毒治疗DAA时代与PegIFN/RBV标准治疗[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015,7(3):40-41.
- [18] Tahata Y, Hiramatsu N, Oze T, et al. The impact of ribavirin dosage in chronic hepatitis C patients treated with simeprevir, pegylated interferon plus ribavirin combination therapy[J]. J Med Virol,2016,88(10):1776-1784.
- [19] Asselah T, Zeuzem S, Soriano V, et al. ITPA Genotypes predict anemia but do not affect virological response with interferon-free faldaprevir, deleobuvir, and ribavirin for HCV infection[J]. PLoS One,2015,10(12):e144004.
- [20] About F, Oudot-Mellakh T, Niay J, et al. Impact of IL-28B, APOH and ITPA polymorphisms on efficacy and safety of TVR- or BOC-based triple therapy in treatment-experienced HCV-1 patients with compensated cirrhosis from the ANRS CO20-CUPIC study[J]. PLoS One,2015,10(12):e145105.
- [21] 魏阳, 史昌河, 闫杰. IL-28B基因多态性在丙型病毒性肝炎中的临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2014,8(6):856-859.
- [22] Zhang YY, Chen HB, Xu Y, et al. Interferon-λ-related genes and therapeutic response in Chinese hepatitis C patients[J]. World J Gastroenterol,2015,21(13):4006-4013.
- [23] El-Bendary M, Neamatallah M A, Abd E M, et al. Interleukin 28B polymorphism predicts treatment outcome among Egyptian patients infected with HCV genotype 4[J]. Hepatogastroenterology,2015,62(140):947-950.
- [24] Honda M, Kaneko S. IL-28B genetic variation and hepatic ISGs expression predict treatment efficacy of IFN-based anti-viral therapy for chronic hepatitis C[J]. Nihon Rinsho,2015,73(Suppl 9):178-183.
- [25] Maan R, van der Meer AJ, Brouwer WP, et al. ITPA polymorphisms are associated with hematological side effects during antiviral therapy for chronic HCV infection[J]. PLoS One,2015,10(10):e139317.

(收稿日期: 2016-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

邓浩辉, 许敏, 李晓强, 等. 广州地区丙型肝炎患者肌苷三磷酸酶基因多态性与利巴韦林所致贫血的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2017,11(2):168-171.