

· 临床论著 ·

阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者血清 ccc DNA 的影响

王岐洁 陈青锋 肖萍 杨彦麟 魏喜生 何强 周萍

【摘要】 目的 探讨阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者血清 HBV ccc DNA 的影响。**方法** 40 例慢性乙型肝炎患者,按 1:1 随机分配接受阿德福韦酯或安慰剂治疗,所有患者均治疗 52 周并在停药后随访 52 周;应用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测慢性乙型肝炎患者 0 周、26 周、52 周、78 周、104 周血清 HBV ccc DNA 及 HBV DNA 含量。**结果** 治疗组 20 例患者治疗前(0 周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平为 8.29×10^6 拷贝/ml(与对照组相比 $P > 0.05$);接受阿德福韦酯治疗半年(26 周)及 1 年(52 周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平分别为 2.61×10^4 拷贝/ml、 7.78×10^3 拷贝/ml(与治疗前相比两者 $P < 0.05$),停药半年(78 周)及 1 年(104 周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平分别为 3.38×10^4 拷贝/ml、 3.60×10^4 拷贝/ml(与治疗前相比两者 $P < 0.05$);接受阿德福韦酯治疗半年及 1 年血清 HBV ccc DNA 分别下降 $2.502 \log_{10}$ 、 $3.028 \log_{10}$ (与对照组相比两者 $P < 0.05$),停药半年及 1 年血清 HBV ccc DNA 较停药时上升 $0.638 \log_{10}$ 、 $0.665 \log_{10}$ (与对照组相比两者 $P < 0.05$)。**结论** 阿德福韦酯对血清 HBV ccc DNA 有明显抑制作用;血清 HBV ccc DNA 可作为阿德福韦酯抗病毒治疗的重要监测指标。

【关键词】 慢性乙型肝炎;实时荧光定量聚合酶链反应;共价闭合环状 DNA

Effect of adefovir dipivoxil on serum covalently closed-circular DNA of patients with chronic hepatitis B WANG Qi-jie, CHEN Qing-feng, XIAO Ping, YANG Yan-lin, WEI Xi-sheng, HE Qiang, ZHOU Ping. Department of Infectious Diseases Research, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: CHEN Qing-feng, Email: wang_qj06@lzu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the impact of adefovir dipivoxil on serum covalently closed-circular DNA (ccc DNA) of patients with chronic hepatitis B. **Methods** Forty patients were randomly assigned to receive adefovir dipivoxil or placebo in a ratio of 1:1. All patients were treated for 52 weeks and followed up by another 52 weeks. Serum HBV ccc DNA and HBV DNA levels were detected with real-time polymerase chain reaction (PCR) at the time of 0, 26, 52, 78 and 104 weeks.

基金项目:兰州大学医学科研基金(LZUYYX200723)

作者单位:730000 兰州市,兰州大学第一医院传染病研究室

通讯作者:陈青锋,Email:wang_qj06@lzu.cn

Results Before the treatment (0 week), the median level of serum HBV ccc DNA of 20 patients in the observing group was 8.29×10^6 copies/ml, which was insignificant compared with the control group ($P > 0.05$); median serum HBV ccc DNA dropped to 2.61×10^4 copies/ml and 7.78×10^3 copies/ml after adefovir dipivoxil treatment for half a year (26 weeks) and one year (52 weeks), respectively, which were significant ($P < 0.05$ for both) compared with the starting point. Half a year (78 weeks) and one year (104 weeks) after stopping receiving adefovir dipivoxil, patients' serum HBV ccc DNA showed an average of 3.38×10^4 copies/ml and 3.60×10^4 copies/ml, which were both significant compared with 0 week treatment ($P < 0.05$ for both). After received adefovir dipivoxil for half a year and one year, patients' serum HBV ccc DNA averagely decreased $2.502 \log_{10}$ and $3.028 \log_{10}$, which were both significant compared with the control group ($P < 0.05$). After stopping receiving adefovir dipivoxil for half a year and one year, patients' serum HBV ccc DNA had an increase which showed $0.638 \log_{10}$ and $0.665 \log_{10}$, which were both significant compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Adefovir dipivoxil has a significant effect on serum HBV ccc DNA which can be used as important monitoring indicators of virus resistance.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Real-time quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR); Covalently closed-circular (ccc) DNA

乙型肝炎病毒感染是一个严重的公共卫生问题,全球感染者约 3.5 亿^[1,2]。虽然已有众多抗病毒药物出现,但药物疗效难以令人满意^[3,4]。目前研究认为 HBV ccc DNA 是乙型肝炎病毒前基因组 RNA 复制的原始模板,对乙型肝炎病毒复制以及感染状态的建立具有十分重要意义,是乙型肝炎病毒持续存在的关键因素^[4,5],也是评价感染状态及药物疗效的最重要指标^[6-11]。阿德福韦酯是核苷酸类逆转录酶抑制剂,具有广谱抗病毒活性,经口服吸收后在体内迅速转化为活性结构阿德福韦而发挥药效^[14]。本研究通过对慢性乙型肝炎患者阿德福韦酯治疗一年血清 HBV ccc DNA 的监测来反映该药物是否对 HBV ccc DNA 有影响及其临床意义。

资料与方法

一、病例选择

2005 年 8 月~2007 年 12 月来我院门诊就诊的慢性乙型肝炎患者,符合以下条件:(1)诊断均符合 2000 年 9 月西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的全国《病毒性肝炎防治方案》所制定的诊断标准^[12];(2)所有患者接受阿德福韦酯抗病毒治疗前均未接受过抗病毒治疗,并排除合并甲型、丙型、丁型、戊型等病毒性肝炎;(3)治疗符合 2005 年慢性乙型肝炎防治指南(ALT 大于正常值 2 倍)有关病毒性肝炎的治疗标准^[13]。治疗组(服用阿德福韦酯)共纳入符合以上

条件患者20例,其中男性16例,女性4例,平均年龄(29 ± 12)岁;对照组(服用安慰剂)共纳入符合以上条件患者20例,其中男性17例,女性3例,平均年龄(29.5 ± 9)岁。试验过程均采取随机双盲设计。

二、标本采集及保存

对患者临床概况和肝脏生化指标进行监测,收集患者服药前(0周)、服药半年(26周)、服药一年(52周)、停药半年(78周)、停药一年(104周)空腹静脉血10 ml,血清于 -70°C 保存,最后解冻并测定总HBV DNA和ccc DNA水平。

三、试剂来源、仪器及方法

1. 血清HBV ccc DNA检测方法:采用美国PE荧光定量PCR检测仪,采用Taqman荧光探针聚合酶链式反应技术,对HBV ccc DNA进行特异性扩增和检测。试剂由上海复星医学科技发展有限公司提供。

2. HBV DNA定量检测:采用美国PE荧光定量PCR检测仪,依据荧光素标记引物在扩增中能量转换原理对模板DNA进行实时定量检测。试剂由深圳匹基生物工程公司提供。

四、本研究从研究设计到具体实施过程均符合《赫尔辛基宣言》,所有试验均得到兰州大学伦理委员会批准和兰州大学第一临床医学院的管理。

五、统计学处理

应用SPSS 10.0医学处理软件,治疗组与对照组的比较采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、病例基本情况

接受阿德福韦酯治疗(治疗组)和安慰剂治疗(对照组)男女比例分别为16:4和17:3,年龄分别为(29 ± 12)岁和(29.5 ± 9)岁,AST值分别为(69.45 ± 34.51) U/L和(69.50 ± 9.23) U/L,ALT平均值分别为(113.6 ± 72.04) U/L和(110.17 ± 20.84) U/L,上述指标在治疗组与对照组之间均无统计学差异($P > 0.05$)。

二、治疗组HBV ccc DNA和HBV DNA情况

治疗组患者治疗前(0周)血清HBV ccc DNA中位数水平为 8.29×10^6 拷贝/ml,接受阿德福韦酯治疗半年(26周)及1年(52周)血清HBV ccc DNA中位数水平分别为 2.61×10^4 拷贝/ml和 7.78×10^3 拷贝/ml,与治疗前相比差异有统计学意义(P 分别为0.000和0.002);停药半年(78周)及1年(104周),血清HBV ccc DNA中位数水平分别为 3.38×10^4 拷贝/ml和 3.60×10^4 拷贝/ml,与治疗前相比差异有统计学意义(P 分别为0.005和0.044)。

治疗组治疗前血清HBV DNA中位数水平为 1.16×10^8 拷贝/ml,接受阿德福韦酯治疗半年(26周)及1年(52周)血清HBV DNA中位数水平分别为 1.16×10^6 拷贝/ml和 4.39×10^5 拷贝/ml,与治疗前相比差异有统计学意义(P 均为0.000);停药半年(78周)及1年(104周),血清HBV DNA中位数水平分别为 2.49×10^5 拷贝/ml和 8.74×10^5 拷贝/ml,与治疗前相比差异有统计学意义(P 均

为0.000),如表1、表2。

表1 治疗组与对照组 HBV ccc DNA 动态观察水平比较 [中位数(区间), 拷贝/ml]

组别	服药前(0周)	服药半年(26周)	服药1年(52周)
治疗组	8.29×10^6 ($6.39 \times 10^4 \sim 2.42 \times 10^7$)	2.61×10^4 ($<10^3 \sim 1.29 \times 10^5$)	7.78×10^3 ($<10^3 \sim 5.29 \times 10^4$)
对照组	9.03×10^6 ($<10^3 \sim 2.24 \times 10^7$)	6.56×10^6 ($<10^3 \sim 1.98 \times 10^7$)	7.38×10^6 ($<10^3 \sim 2.01 \times 10^7$)

组别	停药半年(78周)	停药1年(104周)
治疗组	3.38×10^4 ($<10^3 \sim 2.23 \times 10^5$)	3.60×10^4 ($<10^3 \sim 2.01 \times 10^5$)
对照组	7.79×10^6 ($<10^3 \sim 2.16 \times 10^7$)	8.52×10^6 ($<10^3 \sim 3.24 \times 10^7$)

表2 治疗组与对照组 HBV DNA 动态观察水平比较[中位数(区间), 拷贝/ml]

组别	服药前(0周)	服药半年(26周)	服药1年(52周)
治疗组	1.16×10 ⁸ (2.05×10 ⁷ ~6.11×10 ⁹)	1.16×10 ⁶ (4.47×10 ³ ~9.62×10 ⁷)	4.39×10 ⁵ (1.10×10 ³ ~1.1×10 ⁷)
对照组	1.20×10 ⁸ (1.35×10 ⁷ ~6.11×10 ⁹)	9.92×10 ⁷ (7.8×10 ⁶ ~5.01×10 ⁹)	1.06×10 ⁸ (1.19×10 ⁶ ~4.89×10 ⁹)

组别	停药半年(78周)	停药1年(104周)
治疗组	2.49×10 ⁵ (8.25×10 ³ ~6.27×10 ⁷)	8.74×10 ⁵ (5.17×10 ³ ~9.86×10 ⁷)
对照组	1.13×10 ⁸ (1.45×10 ⁶ ~6.12×10 ⁹)	1.16×10 ⁸ (1.35×10 ⁶ ~6.78×10 ⁹)

三、对照组 HBV ccc DNA 和 HBV DNA 情况

对照组患者治疗前(0周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平为 9.03×10^6 拷贝/ml,接受阿德福韦酯治疗半年(26周)及1年(52周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平分别为 6.56×10^6 拷贝/ml、 7.38×10^6 拷贝/ml,与治疗前相比差异无统计学意义($P = 0.185$ 、 $P = 0.185$);停药半年(78周)及1年(104周)血清 HBV ccc DNA 中位数水平分别为 7.79×10^6 拷贝/ml、 8.52×10^6 拷贝/ml,与治疗前相比差异无统计学意义($P = 0.457$ 、 $P = 0.245$)。

对照组治疗前血清 HBV DNA 中位数水平为 1.20×10^8 拷贝/ml,接受阿德福韦酯治疗半年(26周)及1年(52周)血清 HBV DNA 中位数水平分别为 9.92×10^7 拷贝/ml、 1.06×10^8 拷贝/ml,与治疗前相比差异无统计学意义($P = 0.745$ 、 $P = 0.866$);停药半年(78周)及1年(104周)血清 HBV DNA 中位数水平分别为 1.13×10^8 拷贝/ml、 1.16×10^8 拷贝/ml,与治疗前相比差异无统计学意义($P = 0.499$ 、 $P = 0.808$),如表1、表2。

四、治疗组与对照组血清 HBV ccc DNA 及 HBV DNA 比较

治疗前,治疗组与对照组血清 HBV ccc DNA 及 HBV DNA 水平相比差异均无统计学意义($P = 0.911$ 、 $P = 0.433$);接受阿德福韦酯治疗半年及1年血清 HBV ccc DNA 分别平均下降 $2.502 \log_{10}$ 、 $3.028 \log_{10}$,与对照组相比差异有统计学意义($P = 0.000$ 、 $P = 0.020$);停药半年及1年血清 HBV ccc DNA 较停药时平均上升 $0.638 \log_{10}$ 、 $0.665 \log_{10}$,与对照组相比差异有统计学意义($P = 0.010$ 、 $P = 0.019$);接受阿德福韦酯治疗半年及1年血清 HBV DNA 分别平均下降 $2.007 \log_{10}$ 、 $2.427 \log_{10}$,与对照组相比差异有统计学意义($P = 0.001$ 、 $P = 0.000$);停药半年及1年血清 HBV DNA 较停药时平均上升 $-0.246 \log_{10}$ 、 0.299

\log_{10} ,与对照组相比有统计学意义($P = 0.000$ 、 $P = 0.000$),如图1。

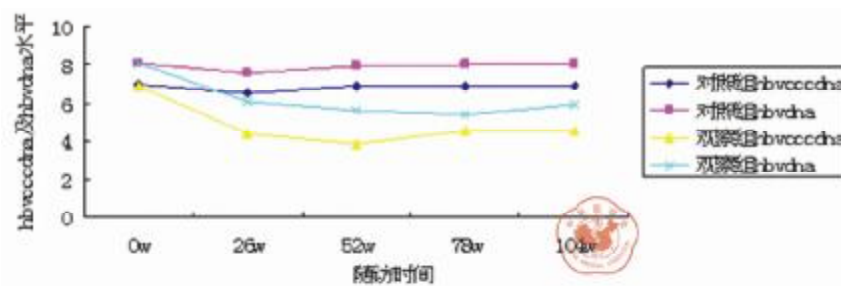


图1 观察组与对照组动态观察曲线图

讨 论

从理论上讲,既然存在于肝细胞胞质和线粒体中的氨基转移酶类在肝细胞破坏时能释放到血液中,那么存在于肝细胞核内的 HBV ccc DNA 分子在肝细胞变性、坏死时应该也可以释放到血液中^[20],而已经研究证实 ALT 与 HBV ccc DNA 呈明显正相关^[6]。

相关研究已证实核苷(酸)类似物能够有效的抑制肝外感染细胞的病毒复制^[16]。研究表明,拉米夫定能使 HBV ccc DNA 水平明显下降,并认为这是拉米夫定抑制乙型肝炎病毒复制并进一步阻止肝细胞死亡的结果^[17-19]。Bettina 等^[15]研究表明阿德福韦酯对肝内 HBV ccc DNA 有抑制作用,并认为长期进行阿德福韦酯治疗,HBV ccc DNA 水平显著降低是通过非细胞溶解机制实现的。

本研究显示,随访2年时间里,接受和停用安慰剂各1年患者的血清 HBV DNA 及 HBV ccc DNA 无显著变化,在一定程度上保持一个平衡状态,即安慰剂对患者血清 HBV DNA 及 HBV ccc DNA 无明显抑制作用;接受和停用阿德福韦酯治疗各1年患者的血清 HBV DNA 及 HBV ccc DNA 差异具有显著统计学意义,这表明阿德福韦酯在抑制血清 HBV DNA 的同时对血清 HBV ccc DNA 也具有明显抑制作用。服用阿德福韦酯治疗组与安慰剂组在治疗前血清 HBV DNA 及 HBV ccc DNA 的差异无显著统计学意义,而在用药及停药后都有显著差异,这进一步说明了阿德福韦酯对 HBV ccc DNA 的抑制作用。

总而言之,阿德福韦酯治疗1年后血清 HBV ccc DNA 及 HBV DNA 分别下降了 $3.028 \log_{10}$ 和 $2.427 \log_{10}$,阿德福韦酯在对血清 HBV DNA 抑制的同时对血清 HBV ccc DNA 也有一个明显抑制作用,可以将血清 HBV ccc DNA 作为阿德福韦酯抗病毒治疗疗效的重要参考或监测指标。

参 考 文 献

- 1 Chiaromonte M, Stroffolini T, Vian A, et al. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*, 1999, 85: 2132-2137.
- 2 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 395-403.
- 3 Stevens CE, Toy PT, Tong MJ, et al. Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States. Prevention by passive-active immunization. *JAMA*, 1985, 253: 1740-1745.

- 4 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64:51-68.
- 5 Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*, 2006, 44:S71-76.
- 6 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology*, 2004, 40:727-737.
- 7 Chen Y, Sze J, He ML. HBV ccc DNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol*, 2004, 10:82-85.
- 8 姚赓. 乙型肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:中国医药科技出版社, 1998. 1-9.
- 9 陈智. 乙型肝炎病毒 ccc DNA 研究现状. *中华传染病杂志*, 2003, 21:8-10.
- 10 赵克开, 缪晓辉. 乙型肝炎病毒 ccc DNA 检测的方法与临床意义. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13:315-317.
- 11 Kock J, Theilmann L, Galle P, et al. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology*, 1996, 23:405-413.
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8:324-329.
- 13 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志*, 2005, 12:881-891.
- 14 Kolosha V, Anoaia E, de Cespedes C, et al. Novel mutations in 13 probands with galactokinase deficiency. *Hum Mutat*, 2000, 15:447-453.
- 15 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locamini S, et al. Persistence of ccc DNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, 2004, 126:1750-1758.
- 16 Tsiquaye KN, Slomka MJ, Maung M. Oral famciclovir against duck hepatitis B virus replication in hepatic and nonhepatic tissues of ducklings infected in ovo. *J Med Virol*, 1994, 42:306-310.
- 17 Zhou T, Guo JT, Nunes FA, et al. Combination therapy with lamivudine and adenovirus causes transient suppression of chronic woodchuck hepatitis virus infections. *J Virol*, 2000, 74:11754-11763.
- 18 Addison WR, Walters KA, Wong WW, et al. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication. *J Virol*, 2002, 76:6356-6363.
- 19 Yuen MF, Wong DK, Sum SS, et al. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100:1099-1103.
- 20 杨培, 秦波. HBV ccc DNA 检测方法及其研究意义. *世界华人消化杂志*, 2006, 14:1999-2002.

(收稿日期:2008-12-02)

(本文编辑:温少芳)

王岐洁, 陈青锋, 肖萍, 等. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者血清 ccc DNA 的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(3):311-316.