

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00162

乙型肝炎病毒基因亚型 B2 和 C2 对肝细胞癌形成、疗效及预后的影响

殷建华¹, 周 贇², 何永超¹, 张宏伟¹, 曹广文^{1*}

1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科研究所信号转导实验室, 上海 200438

[摘要] **目的:**探讨乙型肝炎病毒基因亚型 B2 和 C2 在肝细胞癌(HCC)形成、治疗和预后中的作用。**方法:**检测 462 例 HCC 患者和 234 例慢性乙型肝炎(CHB)患者的基因型及亚型,并对其中采取手术切除或经肝动脉插管栓塞化疗(transarterial chemoembolization, TACE)或两者联合治疗的 228 例基因亚型为 B2 或 C2 的 HCC 患者随访观察 1 年。**结果:**C2 亚型 HCC 患者比 B2 亚型手术治疗机会多($P=0.007$);多因素分析发现,男性($P=0.000$)、年龄 ≥ 40 岁($P=0.030$)、病毒载量 $>10\ 000$ copies/ml($P=0.017$)是 HCC 形成的独立危险因素,而亚型 B2 和 C2 对 HCC 形成的危险性无统计学差异;50 岁以下($P=0.044$)、非手术治疗患者($P=0.000$)、HBV 基因亚型 B2($P=0.027$)是复发的独立危险因素;B2、C2 和混合型感染者 HCC 组织病理分型上都以粗梁型为主(85.7%、71.2%、75.0%),各种病理类型的构成比无统计学差异;一些少见病理类型中全部为 C2 亚型,未见 B2 型和混合型。**结论:**HBV C2 和 B2 亚型在促进 HCC 形成的危险性上无统计学差异,但后者形成的 HCC 恶性程度更高、手术机会较少、更易复发。

[关键词] 乙型肝炎病毒;肝细胞癌;基因亚型;预后

[中图分类号] R 373.21; R 512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0162-05

Role of HBV subgenotype C2, B2 in carcinogenesis, treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma

YIN Jian-hua¹, ZHOU Yun², HE Yong-chao¹, ZHANG Hong-wei¹, CAO Guang-wen^{1*}

1. Department of Epidemiology, Faculty of Medical Service, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of HBV subgenotypes B2, C2 in the carcinogenesis, treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** HBV genotypes and subgenotypes were detected in 462 HCC patients and 234 chronic hepatitis B (CHB) patients by a multiplex PCR assay, and HCC patients infected with HBV B2 or C2 were followed up for a year after surgical resection, transarterial chemoembolization(TACE) or a combination of both. **Results:** The HCC patients infected with HBV C2 had a higher chance to receive surgical treatment than those with B2 ($P=0.007$). Age of 40 years or older ($P=0.030$), male gender ($P=0.000$), and viral load ($>10\ 000$ copies/ml) ($P=0.017$) were the independent risk factors for the carcinogenesis of HCC by using multivariate logistic analysis; however, there was no significant difference in the carcinogenesis of HCC between CHB patients with HBV subgenotypes B2 and C2. Age of 50 years or younger ($P=0.044$), infection with HBV B2 ($P=0.027$), and non-surgical treatment ($P=0.000$) were the independent risk factors for the recurrence of HCC. Thick trabecular type was more prevalent in HCC patients infected with HBV B2, C2 and genotype mixture (85.7%, 71.2% and 75.0%, respectively), and the proportions of histopathological types were not significantly different between HCC patients infected with HBV B2, C2 and genotype mixture. HBV subgenotype C2 was found in all HCC patients with rare histopathological type and subgenotype B2 and mixture were no found. **Conclusion:** There is no significant difference in the carcinogenesis of HCC between CHB patients with HBV subgenotypes B2 and C2. The HCC patients infected with HBV B2 have a lower chance to receive surgical treatment and are more severe than those with C2. HBV B2 is also closely associated with recurrence of HCC.

[KEY WORDS] hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; subgenotype; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2):162-166]

[收稿日期] 2007-10-31 **[接受日期]** 2007-12-09

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划(2004BA718B01). Supported by Chinese National “10th 5-Year Plan” for Key Technology R&D Program (2004BA718B01).

[作者简介] 殷建华, 硕士. E-mail: hawkyjh163@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070420, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

乙型肝炎病毒(HBV)是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素之一,每年因HBV感染引起的各种疾病而死亡的大约有100万人,其中相当一部分为HBV相关HCC患者^[1]。目前HBV依据核苷酸序列异质性 $\geq 8\%$ 可分成A~H共8种基因型^[2-4],其中A、B、C基因型又可进一步分为各基因亚型:A_a/A₁(亚洲/非洲亚型)、A_e/A₂(欧洲亚型)、B₁/B₁(日本亚型)、B_a/B₂(亚洲亚型)、C_s/C₁(南亚亚型)、C_e/C₂(东亚亚型)。

我们前期研究^[5]发现上海及周边地区HBV感染者主要以基因亚型B2、C2为主,混合型感染易导致HCC的形成。但伴有HBV感染的HCC的形成、疗效及预后是否与病毒的基因型及基因亚型相关,目前仍不清楚。因此,本研究通过分析HBV相关的HCC患者及慢性乙型肝炎(CHB)患者基因亚型B2和C2的分布情况,探讨二者对HCC形成、疗效及预后的影响。

1 材料和方法

1.1 研究对象及处理 选取2005年6月至2006年5月在第二军医大学东方肝胆外科医院和长海医院门诊及住院的HBsAg阳性且血清HBV DNA ≥ 500 copies/ml的CHB患者234例;经B超、CT、MRI确诊的伴有HBsAg阳性且血清HBV DNA ≥ 500 copies/ml的原发性HCC患者462例。采集研究对象静脉血5 ml,3 000 $\times g$ 离心10 min,收集血清-80 $^{\circ}C$ 保存。取手术切除的肿瘤标本进行组织病理分型,并对其中采取手术切除或经肝动脉插管栓塞化疗(transarterial chemoembolization, TACE)或二者联合治疗的228例HCC患者随访观察1年。所有研究对象经血清学检查均无甲型肝炎、丙型肝炎和人免疫缺陷病毒(HIV)抗体阳性。所有患者均知情同意。

1.2 HBV标志物及HBV DNA含量的检测 采用化学发光法(Abbott Architect-i2000仪器及其配套试剂,Abbott Labs,USA)检测HBV标志物。采用TaqMan探针技术检测HBV DNA含量,应用Roche公司LightCycler仪器(德国)及深圳匹基生物有限公司试剂,检测限为500 copies/ml。

1.3 HBV基因型及亚型鉴定 采用本科室建立的型特异性引物多重PCR方法^[6]。结果鉴定:2%琼脂糖凝胶电泳,紫外线照射下根据扩增产物片段大小判断基因型结果(A型644 bp, B型331 bp, C型242 bp, D型189 bp, E型130 bp, F型487 bp)。根据已获得的基因型再进行基因亚型鉴定(C1亚型

554 bp, C2亚型653 bp; B2亚型278 bp, B1亚型237 bp)。

1.4 甲胎蛋白(AFP)及其他生化指标的测定 采用化学发光法测定血清AFP, Bayer ACS-180仪器及其配套试剂(Bayer公司, 德国), 正常参考值 < 20 $\mu g/L$ 。采用Hitachi7600及配套试剂(Hitachi, 日本)测定丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、前白蛋白(PAB)、血清总蛋白(TP)及血清白蛋白(ALB)。正常参考值: ALT 4~44 IU/L; TBIL 5.1~18.8 $\mu mol/L$; PAB 170~420 mg/L; TP 66~87 g/L; ALB 35~55 g/L。

1.5 统计学处理 应用SPSS 12.0软件进行统计分析。分类资料采用 χ^2 检验,如HBeAg阳性率、抗HBe阳性率、各基因型及基因亚型的百分比等;定量资料首先对其进行正态性检验,对不符合正态分布的资料进行对数转换后再通过 t 检验或方差分析。多因素分析采用多因素Logistic回归(multivariate logistic regression)和协方差分析(analysis of covariance)。

2 结果

2.1 不同HBV基因亚型的HCC患者治疗方式的分析 462例HCC患者中,168例(36.4%)采取手术切除方式治疗,105例(22.7%)采取TACE方式治疗,其余的采取一些局部治疗及非手术治疗,有部分患者放弃治疗(表1)。在适用手术切除治疗的机会方面,基因亚型B2与C2间有统计学差异($P=0.007$),在接受TACE治疗方面,二者无统计学差异($P=0.477$)。234例CHB患者中,B型45例(19.2%),C型151例(64.5%),D型6例(2.6%),混合型36例(15.3%);其中B型均为B2亚型,C型均为C2亚型,未检测到B1和C1亚型。

表1 HCC的治疗方式与HBV基因亚型
Tab 1 Treatment of HCC and HBV subgenotypes

Treatment	B2 [n(%)]	C2 [n(%)]	Other genotypes [n(%)]	Total
Surgical resection	14(22.6)	137(40.7)	17(27.0)	168
TACE	13(21.0)	58(17.2)	34(54.0)	105
Others	35(56.4)	142(42.1)	12(19.0)	189
Total	62(100)	337(100)	63(100)	462

TACE: Transarterial chemoembolization

2.2 不同基因亚型HCC患者肿瘤组织病理类型分析 收集137例手术切除肿瘤组织进行组织学病理分型(表2),B2、C2和混合型在组织病理分型上都

以粗梁型为主(85.7%,71.2%,75.0%),在一些少见病理型如透明细胞型、硬化型、假腺管型、富脂型、梭形细胞型中全部为C2亚型,未见B2型和混合型。B2、C2及混合型HCC患者病理组织类型的构成比无统计学差异($P=0.968$)。

表2 基因亚型与肿瘤组织病理分型

Tab 2 HBV subgenotypes and histopathological types of hepatocellular carcinoma tissues

Histopathological type	Subgenotype B2	Subgenotype C2	Genotype mixture
Thick trabecular type	12	79	9
Thin trabecular type	1	12	1
Compact type	1	6	2
Clear cell type	0	4	0
Sclerosing type	0	3	0
Pseudoglandular type	0	3	0
Fatty-rich type	0	3	0
Spindle cell type	0	1	0
Total	14	111	12

2.3 HCC患者HBV基因亚型与复发及转移的关系 168例手术切除患者术中可见转移灶16例,均为肺部,其中B2型2例(14.3%),C2型14例(10.2%),两组间无统计学差异($P=0.988$)。

对222例手术切除治疗和TACE治疗以及6例手术切除+TACE联合治疗的B2、C2型患者随访1年,观察HCC的复发。对于单纯手术切除患者

以在肝脏的任何位置新生1个病灶为复发的判断标准;对于TACE治疗和手术切除+TACE联合治疗患者复发的判断标准:经TACE治疗后在肝脏的任何位置新生1个病灶或原本肿瘤直径明显减小且AFP下降的患者肿瘤又重新开始生长。共获得221例调查(失访7例),B2型24例(10.9%),17例复发(70.8%);C2型197例(89.1%),96例复发(48.7%)。其中手术切除HCC患者133例,B2型14例中9例复发,C2型119例中40例复发,两组复发率有统计学差异($P=0.024$)。

2.4 HBV相关HCC形成及复发的多因素分析 以234例CHB患者为对照,462例HCC患者为病例建立HCC形成危险因素的多因素Logistic回归模型;以221例调查的HCC患者中108例未复发患者为对照,113例复发患者为病例建立HCC复发危险因素的多因素Logistic回归模型。结果(表3)发现:男性患者、年龄超过40岁、病毒载量大于10000 copies/ml是HCC形成的独立危险性因素,而HBV基因亚型B2和C2对HCC的形成的危险性无统计学差异($P=0.527$)。但HBV基因亚型B2比C2的HCC患者更容易复发($P=0.027$, $OR=3.918$, 95%CI 1.169~13.132);非手术治疗的患者比手术治疗患者更容易复发($P=0.000$, $OR=3.366$, 95%CI 1.720~6.587)。

表3 HCC形成及复发的多因素Logistic回归分析

Tab 3 Multivariate regression analysis for factors independently associated with carcinogenesis and recurrence of HCC

Factor	Carcinogenesis of HCC			Recurrence of HCC		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Age(years)						
<40(50) ^a	1			2.065	1.109-4.188	0.044
≥40(50) ^a	1.915	1.065-3.445	0.030	1		
Gender						
M	1			1		
F	0.301	0.154-0.589	0.000	0.368	0.133-1.018	0.054
HBV DNA(Ig copies/ml)						
<4.00	1			1		
≥4.00	2.179	1.148-4.134	0.017	0.987	0.477-2.040	0.972
HBeAg positivity						
Negative	1			1		
Positive	0.409	0.166-1.011	0.053	0.431	0.134-1.382	0.157
Anti-HBe positivity						
Negative	1			1		
Positive	0.981	0.421-2.285	0.964	0.622	0.200-1.935	0.413
* ALT $z_B/(IU \cdot L^{-1})$						
<87	1			1		
≥87	0.775	0.347-1.735	0.536	0.902	0.394-2.067	0.808

(续下表)

(接上表)

Factor	Carcinogenesis of HCC			Recurrence of HCC		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
* TBIL $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$						
<25	1			1		
≥ 25	1.001	0.485-2.066	0.998	0.666	0.288-1.545	0.344
* TP $\rho_B/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$						
<75	1			1		
≥ 75	0.774	0.394-1.405	0.362	1.805	0.892-3.653	0.101
* ALB $\rho_B/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$						
<42	1			1		
≥ 42	0.323	0.155-0.676	0.003	0.557	0.246-1.260	0.160
* PAB $\rho_B/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$						
<200	1			1		
≥ 200	0.377	0.204-0.697	0.002	0.726	0.325-1.619	0.434
Subgenotype						
C2	1			1		
B2	0.778	0.357-1.695	0.527	3.918	1.169-13.132	0.027
AFP $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$						
<300				1		
≥ 300				0.992	0.516-1.911	0.982
Treatment						
Surgical treatment				1		
Non-surgical treatment				3.366	1.720-6.587	0.000

^a: 50 years (recurrence of HCC); * : Median values; Carcinogenesis of HCC: CHB patients as controls; Recurrence of HCC: HCC patients without recurrence as controls

3 讨论

慢性 HBV 感染后具有较为广泛的肝脏疾病谱,从几无临床表现的轻症患者到肝硬化甚至肝细胞癌^[7],基因型及基因亚型在伴有乙肝的原发性肝细胞癌的发生、发展和转移过程中起到了重要的作用。不同的 HBV 基因亚型形成 HCC 的危险性不同。在越南的一项研究显示,与其他基因型的感染者相比,A 型 HBV 感染者不容易形成 HCC;在亚洲地区,C 型比 B 型更容易形成 HCC^[8-10]。Ding 和 Orito 等^[11-12]都认为在中国上海和日本,HBV 基因型 C 与 HCC 的发生密切相关;然而中国台湾 Kao 等^[13]则发现超过 50% 的 HBV 相关的 HCC 患者感染 HBV B 基因型。台湾 Yu 等^[14]在一项对男性的前瞻性研究中发现,C 型 HBV 患者是 B 型患者形成 HCC 危险性的 5.11 倍(95%CI 3.20~8.18),HBV DNA 的含量 $> 5.90 \text{ lg copies/ml}$ 的 C 型 HBV 患者形成 HCC 的危险性是 HBV DNA 含量 $< 4.23 \text{ lg copies/ml}$ 的非 C 型患者(包括混合型)的 26.5 倍(95%CI 10.41~67.42)。在不同区域的众多研究得出了不同的结论,这可能与当地的优势基因型有一定的关系。多因素 Logistic 回归分析结果发现,男性患者、年龄超过 40 岁、病毒载量大于 $10\,000 \text{ copies/ml}$ 是 HCC 形成的独立危险性因素,

与之前的一些研究^[14-17]结果相符合,但没有发现基因亚型 B2 和 C2 对 HCC 形成有统计学差异。

不同基因型 HBV 感染者对治疗的反应也存在差异。一项台湾的研究报道指出,干扰素治疗后,B 基因型的 HBeAg 血清转换率为 41%,而同组中 C 基因型的转换率仅为 15%^[18]。在伴有基因亚型 B2 和 C2 的 HCC 治疗过程中,可以施行手术切除的 HCC 患者基因亚型间有统计学差异,与之前的一些研究结论^[19]有差异。本研究的多因素 Logistic 回归分析发现,亚型 B2 引起的 HCC 更严重,且治疗后复发率与 C 型相比也有统计学差异,是 HCC 复发的一个独立危险因素。其原因可能为:(1)B 型患者形成 HCC 的年龄较小,体内的病毒载量较高,容易复发。日本的一项研究也认为体内的病毒载量与预后有关^[20]。(2)HBV DNA 可与肝细胞基因组进行随机整合,不同的基因型或基因亚型的特异性序列整合进肝细胞基因组后,引起基因组 DNA 的不稳定性,激发了不同的癌基因的信号通路^[21-22],B2 型特异性序列经整合后可能激活了基因组内的一些复发和转移相关基因,使得个体更加易于复发。非手术治疗也比手术治疗患者复发的危险高,因为一般情况下,手术治疗患者比非手术治疗患者病情轻,发现时间早,而非手术患者发现时往往已在晚期,失去了手术时机。

目前,HBV基因型与HCC肿瘤组织病理类型的相关性研究较少。本次研究结果虽不明显,但仍可发现C2亚型在一些少见病理类型中出现,如透明细胞型、硬化型、假腺管型、富脂型、梭形细胞型,但未见B2型和混合型。其具体原因可能还需要进一步的研究。

本研究结果表明,在HCC形成过程中,没有发现基因亚型B2和C2对HCC形成有统计学差异;在HCC的治疗和预后方面,与C2亚型相比,B2亚型引起的HCC恶性程度高,发现晚,手术机会少,更容易复发。

(志谢 本研究得到第二军医大学东方肝胆外科医院检验科高春芳主任、王华梁研究员以及第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室顾春英副教授、常文军博士、张鹏、徐敏老师等的无私帮助和技术支持,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Lee W M. Hepatitis B virus infection[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337:1733-1745.
- [2] Norder H, Courouce A M, Magnius L O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes[J]. *Virology*, 1994, 198:489-503.
- [3] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi R F, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 1):67-74.
- [4] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson B H, Magnius L O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 8): 2059-2073.
- [5] 殷建华, 何永超, 李成忠, 周 赞, 张宏伟, 曹广文. 乙型肝炎病毒感染相关疾病中病毒基因型和亚型的分布及其与临床指标的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29:1-5.
- [6] Chen J, Yin J, Tan X, Zhang H, Zhang H, Chen B, et al. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2[J]. *J Clin Virol*, 2007, 38:238-243.
- [7] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1118-1129.
- [8] Chan H L, Hui A Y, Wong M L, Tse A M, Hung L C, Wong V W, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2004, 53:1494-1498.
- [9] Chan H L, Wong M L, Hui A Y, Hung L C, Chan F K, Sung J J. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:1277-1279.
- [10] Toan N L, Song Le H, Kremser P G, Duy D N, Binh V Q, Koeberlein B, et al. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam[J]. *Hepatology*, 2006, 43:1375-1384.
- [11] Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China[J]. *Intervirology*, 2001, 44: 43-47.
- [12] Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan[J]. *Hepatology*, 2001, 34:590-594.
- [13] Kao J H, Chen P J, Lai M Y, Chen D S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B[J]. *Gastroenterology*, 2000, 118:554-559.
- [14] Yu M W, Yeh S H, Chen P J, Liaw Y F, Lin C L, Liu C J, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97:265-272.
- [15] Chen C J, Yang H I, Su J, Jen C L, You S L, Lu S N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. *JAMA*, 2006, 295:65-73.
- [16] Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje U H, London W T, Evans A A. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101:1797-1803.
- [17] Liu C J, Chen B F, Chen P J, Lai M Y, Huang W L, Kao J H, et al. Role of hepatitis B virus precore/core promoter mutations and serum viral load on noncirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194:594-599.
- [18] Kao J H, Wu N H, Chen P J, Lai M Y, Chen D S. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy[J]. *J Hepatol*, 2000, 33:998-1002.
- [19] Yuen M F, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen J C, Wong D K, Yuan H J, et al. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25:1593-1598.
- [20] Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, et al. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94:2663-2668.
- [21] Cougot D, Neuveut C, Buendia M A. HBV induced carcinogenesis[J]. *J Clin Virol*, 2005, 34 (Suppl 1):S75-S78.
- [22] Wang Y, Lau S H, Sham J S, Wu M C, Wang T, Guan X Y. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23:142-148.

[本文编辑] 尹 茶