

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中精簡報告

**B 型肝炎病毒基因型差異、HLA 抗原和肝細胞癌危險性：縱
斷研究(1/3)**

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-002-086-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學公共衛生學院公共衛生學系

計畫主持人：于明暉

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 12 日

**計劃名稱：B 型肝炎病毒基因型差異、HLA 抗原和肝細胞癌危險性-
縱斷研究**

計劃編號：NSC 91-2320-B-002-086 (91/08/01~92/07/31)

主持人：于明暉

前言

許多流行病學研究顯示，肝細胞癌的起源和多重內生和外生性因子有關，可能包括病毒、化學致癌物（例如：黃麴毒素、抽菸、和喝酒）、類固醇性荷爾蒙、和遺傳基因 (1-11)。但大部份肝細胞癌的發生皆和 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 或 C 型肝炎病毒的慢性感染有關，HBV 慢性感染是中國人肝細胞癌好發的主因，根據以往的估計，台灣地區至少有 65% 的肝細胞癌病例發生和 HBV 慢性感染有關，HBV 帶原者和非帶原者比較，罹患肝細胞癌的相對危險性大約是 20 倍 (1, 2)，至 70 歲，具一等親肝癌家族史的 HBV 帶原者，其罹患肝細胞癌的累積危險性約 25%，而無一等親家族史的 HBV 帶原者，其累積危險性約 9% (12)。雖然台灣地區從 1984 年開始實施全面新生兒 HBV 疫苗預防注射計劃，對 15 歲以下的小孩預防肝細胞癌的發生已見功效 (13)，但本地仍存有 300 萬名 HBV 慢性帶原者，而且接受 HBV 疫苗預防注射的族群，有 3% 左右不能產生抗體 (14)。

利用直接對 HBV DNA 進行定序或 PCR-RFLP 分析，已有許多研究結果顯示，病毒基因的變異（包括亞型和突變），可能會影響病毒的複製、逃脫免疫系統的偵測、和增加活化基因的作用 (transactivating effect)，導致不同的臨床徵狀發生，以及不同的治療結果 (15)。目前依 HBV S 抗原基因可以分成 A 至 G 7 種基因亞型，A 和 D 亞型主要盛行地區是在歐美國家，B (即 adw) 和 C (即 adr) 盛行於亞洲，E 基因型只有在非洲被發現，F 盛行於中美洲，而 G 亞型剛被鑑定出來，其地理分佈有待進一步調查 (16-21)。最近的研究發現，除了 E 和 G 亞型以外，其他亞型均可在台灣的族群被偵測到，對無症狀 HBV 帶原者而言，B 亞型佔 52%，C 亞型佔 23% (17)。

利用病例對照和病例系列的研究 (case series study) 設計，台灣的研究發現，C 亞型和 HBV 帶原者發展為比較嚴重的慢性肝病有關 (17, 22)，而帶 B 基因型有較高的危險性罹患早發的肝細胞癌 (17)。但一個在日本對 26 名肝硬化病例的長期追蹤研究，發現在追蹤平均 14 年以後，帶 C 亞型和帶 B 亞型的 HBV 帶原者比較，罹患肝細胞癌的危險性較高，且罹患肝細胞癌以後的預後較差，但因病例數稀少，基因亞型和肝細胞癌危險性的關係僅有邊緣性統計相關 ($P=0.058$) (23)。另外；也有研究報告基因亞型和 HBV 帶原者治療的預後有關，和帶 B 亞型者比較，帶 C 亞型者被發現干擾素治療的反應率較低 (24)，一個最近在歐美地區對 26 名慢性肝炎病例的研究，病毒基因亞型是利用血清型分析，發現 adw 和 ayw 基因型比較，產生對 lamivudine 治療抗性 (resistance) 的相對危險性是

20 倍 (25)。

以往 HBV 基因型和罹患肝細胞癌危險性的研究稀少，且大多數有病例數不足的問題，因此本研究利用一龐大的 HBV 帶原者世代研究所凍存的血液檢體，再進行 HBV 亞型和肝細胞癌的重疊病例對照研究。同時本研究測量 HBV DNA 濃度，分析病毒濃度和亞型的交互作用。

研究個案和方法

本研究是採重疊病例對照研究設計。研究個案來自一對 4841 HBsAg 帶原者之世代研究所凍存的血液檢體。肝細胞癌的診斷是採以下兩個標準之一：1) 病理組織切片或細胞學檢查確診；或 2) α -胎兒蛋白 400 ng/ml 且合併至少一項影像檢查(包括：血管攝影、超音波、電腦斷層掃瞄和磁振造影) 陽性。截至 2002 年底，已有 150 名 HBsAg 帶原的世代成員確診為肝細胞癌。對每名病例，選取 2 名追蹤期間未罹患肝細胞癌、至少接受兩次血液檢體採集，且符合配對條件的無症狀帶原者為對照個案，配對條件為出生年代相差 5 歲以內、同年進入研究、及出生地理區域(長江以南和以北的大陸省份；台灣分成北-新竹以北、中、南-嘉義以南、東-宜蘭、花蓮、台東) 和籍貫(閩南、客家、大陸省份) 相同。對於病毒標記的分析，是以研究個案基線血液檢體進行分析。血清 HBV DNA 是以 QIAamp blood kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 進行萃取，HBV 亞型和 DNA titer 是以台大肝炎中心陳培哲教授實驗室發展的方法進行測定。單變項和多變項控制後相對危險性是利用 unconditional logistic regression model 估計，所有的統計檢定均為雙尾檢定。

結果

病例的 HBV 亞型分佈為：1.4% A 型；0.0% A 和 B 型； 49.7% B 型；0.7% B 和 C 型；及 48.3% C 型。對照組的 HBV 亞型分佈為：0.7% A 型；0.4% A 和 B 型； 82.9% B 型；0.4% B 和 C 型；及 15.7% C 型。病例和對照組之 HBV 亞型的分佈具有顯著統計差異 ($P=0.001$)。兩組各有 2.0% 和 4.7% 之 DNA titer 在偵測敏感度以下(<1000 copies)。以對照組 HBV DNA titer 的四分位數分佈進行分組，發現病例組 HBV DNA titer 顯著高於對照組 (趨勢檢定 $P=0.001$)。

以多變項邏輯斯複迴歸模式控制年齡、抽煙和喝酒習慣，HBV 亞型 (C 和非 C 亞型) 和 HBV DNA titer (以對照組的四分位數分佈分組和最低四分位數以下作為參考組，放入三個虛擬變項) 均放入複迴歸模式作為共變項。發現和非 C 亞型比較，帶 HBV C 型亞型者發生肝細胞癌的相對危險性為 4.63 倍(95% 信賴區間：2.84-7.55)。和 HBV DNA titer 屬於最低四分位數者比較，隨 HBV DNA titer 增高，肝細胞癌相對危險性顯著上升(趨勢檢定 $P=0.0001$)，第二至第四四分位數的相對

危險性分別為：1.29 (95%信賴區間：0.60-2.74)、1.83 (95%信賴區間：0.87-3.84)、和 4.42 (95%信賴區間：2.29-8.55)。

病毒亞型和 DNA 濃度再以累加式交互作用模式進行分析，結果發現和帶非 C 亞型、DNA 濃度位在最低四分位數以下者比較，帶 C 亞型且 DNA 濃度位在最高四分位數以上者的相對危險性高達 26.24 倍 (95%信賴區間：9.93-69.37)。

討論

HBV 慢性感染的自然史進展，可能和病毒的複製及基因的變異、免疫因素、和/或病毒基因-免疫因素的交互作用緊密相關 (26)。本研究發現 HBV C 亞型帶有顯著較高的肝細胞癌危險性，和台灣地區以往的研究一致 (25)。HBeAg 反映病毒複製的活性，一個以社區族群為基礎的世代研究，已經報告 HBeAg 陽性狀態和肝細胞癌危險性有關，HBeAg 陽性的 HBV 帶原者發病的危險性約是 HBeAg 陰性的帶原者的 6 倍 (27)，本研究直接對 HBV DNA 濃度進行測量，進一步發現病毒濃度對發展肝細胞癌危險性有劑量效應的作用，同時本研究在多變項複迴歸分析時，將病毒亞型和 HBV DNA 濃度同時放入做為共變項，發現兩者各有顯著的獨立作用。若以累加模式進行交互作用分析，最高病毒 DNA 濃度且具有 C 亞型的 HBV 帶原者，罹患肝細胞癌的相對危險性可達帶非 C 亞型且具較低 DNA 濃度的 26 倍以上。

依照本研究初步分析結果，病毒 DNA 濃度和亞型是鑑定高危險性的 HBV 帶原者的重要因子，既然目前對於肝細胞癌的臨床治療尚相當有限，對如此的高危險群，利用已知或發展新的壓抑病毒複製或調控免疫的藥物進行治療，以降低罹患肝細胞癌的危險性，將有其值得一試社區介入性研究的必要性。

參考資料

1. Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;17:71-91.
2. Yu MW, You SL, Chang AS, Lu SN, Liaw YF, Chen CJ. Association between hepatitis C virus antibodies and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1991;51:5621-25.
3. Yu MW, Lien JP, Chiu YH, Santella RM, Liaw YF, Chen CJ. Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J Hepatol* 1997;27:320-30.
4. Yu MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S, Santella RM, Liaw YF, Chen CJ. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;109:1266-73.

5. Yu MW, Chiu YH, Chiang YC, Chen CH, Lee TH, Santella RM, et al. Plasma carotenoids, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, and risk of hepatocellular carcinoma: independent and interactive effects. *Am J Epidemiol* 1999;149:621-9.
6. Yu MW, Chiu YH, Yang SY, Santella RM, Chern HD, Liaw YF, et al. Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers. *Br J Cancer* 1999;80:598-603.
7. Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999;29:697-702.
8. Yu MW, Pai CI, Yang SY, Hsiao TJ, Chang HC, Lin SM, et al. Role of N-acetyltransferase polymorphisms in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: Impact of smoking on risk. *GUT* 2000;47:703-9.
9. Yu MW, Chen CJ. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:790-4.
10. Yu MW, Cheng SW, Lin MW, Yang SY, Liaw YF, Chang HC, et al. Androgen-receptor gene CAG repeats, plasma testosterone levels, and risk of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:2023-8.
11. Yu MW, Yang YC, Yang SY, Cheng SW, Liaw YF, Lin SM, et al. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1644-51.
12. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1159-64.
13. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in Children. *N Engl J Med* 1997;336:1855-9.
14. Carman WF, Trautwein C, Van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre F, et al. Hepatitis B virus envelop variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996;24:489-93.
15. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-44.
16. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and polygenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 1): 67-74.
17. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-9.
18. Ding X, Mizokami M, Yao GB, Xu B, Orito E, Ueda R, et al. Hepatitis B virus

genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-7.

19. 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. *Hepatology* 2001;34:590-4.
20. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-93.
21. Magnus LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S gene. *Intervirology* 1995;38:24-34.
22. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology* 2001;34:817-23.
23. Tsubota A, Arase Y, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H, et al. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001;65:257-65.
24. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.
25. Zollner B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 357;2001:934-5.
26. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993;342:1335-40.
27. Yang H-I, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-74.