

乙型肝炎病毒基因型、YMDD 变异与病毒复制水平的关系

马亚平, 曹红, 李俊枫

(湖北省襄阳市中心医院检验科 441000)

摘要:目的 研究拉米夫定治疗慢性乙型肝炎(CHB)期间乙肝病毒(HBV)YMDD 变异的情况及其与 HBV 基因型和病毒复制水平的关系。方法 检测 53 例 CHB 患者在使用拉米夫定治疗后的 YMDD 突变情况,考察其与 HBV 基因型和病毒复制水平的关系。结果 患者在用药 9 个月和 12 个月后发现 YMDD 突变的概率为 1.8%和 9.4%;基因型 B 的治疗有效率明显高于基因型 C($P < 0.05$)。基因型 C 的 YMDD 突变率明显高于基因型 B 的 YMDD 突变率。结论 拉米夫定能迅速抑制 HBV 复制、改善肝功能,但长期用药部分患者会出现耐药,其 YMDD 突变概率随治疗时间的延长而增加。

关键词:拉米夫定; 肝炎,乙型; 基因型; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.058

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)03-0400-02

拉米夫定(lamivudine)是一种核苷(酸)类似物,可有效抑制乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)复制。但在长期使用后,部分患者会出现耐药。因此,寻找能早期预测发生 DNA 多聚酶链反应-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(YMDD)变异的相关因素,做出相应防治措施,对提高慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者的临床疗效,改善预后等具有重要的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2006 年 9 月至 2007 年 10 月就诊于本院肝病科,并采用拉米夫定治疗的 CHB 患者 93 例,其中男性 61 例,年龄 18~71 岁,平均年龄 39.4 岁;女性 32 例,年龄 25~68 岁,平均 38.6 岁。诊断符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》中的标准。分为治疗组(53 例)和对照组(40 例)。治疗组服用拉米夫定(100 mg/d)治疗 1 年,在用药后 6 个月、9 个月、1 年分别进行血清标本 YMDD、HBV DNA 含量和丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平检测。HBV 基因型检测则于第 1 次就诊后 1 个月内进行。对照组的治疗方案为普通保肝治疗。

1.2 疗效标准 治疗 1 年后,ALT 正常,HBsAg 转阴,HBV DNA < 500 copy/mL 为有效,其他为无效。

1.3 方法 (1)标本采集:空腹采集患者静脉血 3 mL,4 °C 过夜,以 8 cm 离心半径 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清置 1.5 mL 离心管中,4 °C 或 -20 °C 储存备用。(2)DNA 提取:DNA 提取采用煮沸法。取血清 100 μL 加入等量 DNA 提取液,混匀后 100 °C 煮沸 10 min,离心取上清 2 μL 用于荧光定量 PCR 反应。(3)HBV DNA 检测:使用 Roche Lightcycler II 型实时荧光定量 PCR 仪,采用达安公司 HBV DNA 定量检测试剂盒,具体操作按说明书。(4)YMDD 突变检测和 HBV 基因分型检测:HBV DNA 分型试剂盒购自广州达安基因公司,YMDD 突变检测试剂盒为深圳匹基生物工程公司产品,具体操作按说明书。(5)肝功能分析:采用美国雅培公司 ABBOTT Ci8200 全自动生化分析仪进行。

1.4 统计学处理 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分率表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,组间均数比较用方差分析和 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 拉米夫定治疗过程中 YMDD 突变发生情况 治疗 12 个月后的 YMDD 突变发生率与治疗 6 个月相比,差异有统计学意义($P < 0.001$)。说明在用药 1 年后发生 YMDD 突变的概率明显增加。

2.2 拉米夫定治疗效果与病毒基因型、YMDD 变异及 HBV

DNA 载量的关系 见表 2。拉米夫定治疗后,随着时间的延长,治疗有效的患者的 HBV DNA 逐渐降低,最终转阴,用药 1 年后共 40 例转阴。基因型 B 的治疗有效率明显高于基因型 C,差异有统计学意义($P < 0.05$)。基因型 C 的 YMDD 突变率明显高于基因型 B,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在 2 种基因型之间,HBV DNA 载量变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 拉米夫定治疗患者 YMDD 突变发生情况表[n(%)]

组别	时间(m)	野生型	YIDD	YVDD	YMDD
治疗组	6	53(100.0)	—	—	—
	9	50(94.3)	1(1.8)	1(1.8)	1(1.8)
	12	43(81.1)	4(7.5)	1(1.8)	5(9.4)
对照组	12	40(100)	—	—	—

注:“—”表示无值。

表 2 HBV 感染者临床指标

组别	基因型	n	HBV DNA 载量 (log copy/mL)	有效率 [n(%)]	YMDD 变异率 [n(%)]
治疗组	B	23	6.73±1.45	20(87.0)	3(13.0)
	C	30	7.24±1.41	20(66.7)	10(33.3)
对照组	B	17	7.12±1.60	4(23.5)	0(0.0)
	C	23	6.98±1.29	3(13.0)	0(0.0)

3 讨论

全世界已有近 4 亿人为慢性 HBV 携带者,其中 75% 的感染发生在亚洲,并为慢性肝炎、肝硬化、肝癌的主要原因。拉米夫定作为一种有效抗病毒药物,其长期用药对部分患者可导致 HBV P 基因区 YMDD 变异,使 P 基因区进行逆转录的活性部位中的 552 位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代,生成 YVDD 或 YIDD 等,产生耐药突变,出现病毒突破(viral breakthrough),从而导致患者病情反复,甚至病情恶化。因此研究拉米夫定治疗 YMDD 变异产生的相关因素,找到能早期预测 YMDD 变异产生的有效指标,意义重大。

HBV 的基因分型概念在 1988 年由 Okamoto 等^[1]提出,现在已将 HBV 分成 A~H 8 个基因型。国内外学者已经对 HBV 分型的地理分布、与基因变异的关系、与临床疾病的关系以及与抗病毒治疗耐药性产生的关系等多方面进行了大量的研究工作^[2-7],其与抗病毒耐药变异的关系尤其值得深入研究。

本研究在对 YMDD 突变发生时间的观察中发现,在连续用药 6 个月内,无 YMDD 突变发生;9 个月后,已经有 1.8% 的患者发生了 YMDD 突变,而到了 12 个月后,则有 9.4% 的患者发生了 YMDD 突变,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。说明在用药 12 个月后发生 YMDD 突变的概率明显增加。这个结论与国外多项试验的结论相吻合^[3-7],但突变比例稍低,推测可能与样本量较少有关。试验中发现,B 基因型中 YMDD 突变发生概率低于 C 基因型,而拉米夫定对基因型 B 的治疗有效率明显高于基因型 C。

总之,本研究对 HBV 基因型、YMDD 变异与病毒复制水平的关系进行了初步的研究和探讨。由于 HBV 感染过程的复杂性,如何利用现代分子诊断技术,指导和帮助临床医生制定有效的治疗方案,将是下一步研究的目标。

参考文献

[1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence; comparison of surface antigen

subtypes[J]. J Gen Virol, 1988, 69: 2575-2583.

[2] 张红,施鑫鹤,杨海珍,等.实时荧光定量 PCR 监测乙肝抗病毒治疗后部分肝功指标的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 952-954.

[3] 王海滨,姜平,马洪滨,等.乙型肝炎病毒 YMDD 变异与肝功能损伤程度的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(9): 922-924.

[4] 胡咏梅.前 S1 抗原与乙型肝炎诊断、HBV DNA 及肝功能的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 697, 699.

[5] 陈尚军,金生源,陆金鑫,等.拉米夫定重治疗既往 YMDD 变异慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(1): 57, 60.

[6] Yang DH, Liang WF, Xie YJ, et al. PCR restriction fragment length polymorphism in detection of YMDD variants of viral polymerase in hepatitis B virus patients treated with lamivudine[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002, 1(2): 232-237.

[7] 李玲,毛青,黄燕萍,等.慢性乙型肝炎患者 HBV DNA YMDD 变异的检测及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 167-169.

(收稿日期:2010-05-13)

• 经验交流 •

某地区儿童血红蛋白电泳结果分析

邹团标¹,姚莉琴¹,杨发斌¹,浦 剑²

(1. 云南省妇幼保健院检验科,昆明 650051; 2. 西双版纳州妇幼保健院检验科,云南景洪 666100)

摘要:目的 分析西双版纳地区学龄前儿童血红蛋白病的发病情况。方法 对该地区 3 个县的 2 634 例学龄前儿童进行筛查,Hb 的测定采用醋酸纤维素膜电泳(pH8.6)。结果 该地区主要是以 α -地中海贫血和 β -地中海贫血检出为主;由于地域和民族的差异,在不同的县,血红蛋白病检出率存在差异。结论 血红蛋白电泳技术应用于该地区儿童血红蛋白病筛查,对控制该病、提高少数民族人口素质有重要意义。

关键词:儿童; 血红蛋白类; 电泳; 血红蛋白病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.059

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)03-0401-02

血红蛋白病是一组由于珠蛋白肽链的结构异常而引起血红蛋白功能异常所致的疾病。西双版纳聚居着多种少数民族,调查显示该地区血红蛋白病发病率为 13.9%^[1]。为探讨该地区少数民族儿童群体的发病情况,本组于 2009 年 6~8 月对少数民族 0~7 岁儿童进行筛查,报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 采用分层多阶段整群随机抽样和典型调查相结合的方法,选取西双版纳州勐腊、勐海和景洪 3 县少数民族 0~7 岁儿童,共 2 634 例。

1.2 仪器与试剂 DY-600 电泳仪,美国 Helena 公司配套试剂和扫描分析系统。

1.3 方法 采用醋酸纤维素膜电泳(pH8.6)测定异常 Hb,严格按照操作说明操作。诊断标准:正常成年男、女 HbA₂ 含量为 2.5%~3.5%,且不出异常 Hb 区带;如 HbA₂ \leq 2.5%,或出现异常 Hb 区带(HbH, HbBart¹),判为 α -地中海贫血表型阳性;轻型 β -地中海贫血, HbA₂ 3.5%~8%, HbF 正常或轻度增加(不超过 5%);中间型 β -地中海贫血, HbF 5%~30%;重型 β -地中海贫血, HbF 30%~90%^[2]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析。

2 结果

少数民族 0~7 岁儿童血红蛋白病检出情况见表 1,主要是以 α -地中海贫血和 β -地中海贫血为主。有 136 例儿童血红蛋白电泳呈现 HbA₂ 高值,居 8%~68%之间,疑属 HbE/ β -地

中海贫血。

表 1 西双版纳州各县的血红蛋白病检出情况[n(%)]

疾病	勐腊 (n=896)	勐海 (n=1 218)	景洪 (n=520)	合计 (n=2 634)
α -地中海贫血	143(16.0)	166(13.6)	9(1.7)	318(12.1)
β -地中海贫血	149(16.6)	102(8.4)	85(16.3)	336(12.8)
血红蛋白病	41(4.6)	51(4.2)	57(11.0)	149(5.6)

3 讨论

因各种 Hb 的等电点不同,在 pH8.6 的缓冲液中所带电荷不同,故通过电泳,可以将正常和异常的 Hb 分开为不同的区带,并能够定量检测 HbA、HbF、HbA₂,能够同时检测 HbH、HbE、HbD 等异常 Hb^[3-4],是研究和分析异常 Hb 的有效方法,是诊断血红蛋白病不可缺少的手段^[5]。

本组筛查结果显示,血红蛋白病在西双版纳州儿童中检出率较高,主要以 α -地中海贫血和 β -地中海贫血为主。同时还有 136 例血红蛋白电泳呈现 HbA₂ 高值,由于人类的 δ 基因表达有限, HbA₂ 值一般不超过 6%~8%,因此,该 HbA₂ 值应考虑为 HbE 的量,进而推测这 136 例儿童疑属 HbE/ β -地中海贫血,需进一步做基因分析以确诊。另外还发现 4 例疑属 HbG 和 1 例 HbK,其血红蛋白电泳呈现 2 条异常区带,还有 1 例为 HbA 缺失,均是由于珠蛋白基因发生点突变, Hb 的性质和功