

慢性乙型肝炎患者服用拉米夫定耐药 YMDD 变异检测及对 HBV 表面抗原蛋白前 S₂ 影响的研究

张 笠¹, 刘小荣^{1△}, 高 武¹, 王勇平²

(1. 甘肃省第二人民医院, 兰州 730000; 2. 甘肃省肿瘤医院骨科, 兰州 730050)

摘要:目的 探讨口服拉米夫定 1 年的慢性乙型肝炎患者产生耐药后, HBV C 区发生 YMDD 变异的情况及对膜蛋白前 S₂ (HBV S₂) 影响的研究。方法 应用实时荧光定量 PCR, 检测 150 例服用拉米夫定抗乙型肝炎病毒治疗的慢性乙型肝炎 (CHB) 患者产生耐药后, 血清中 HBV C 区 YMDD 变异; 同时, 应用 ELISA 法检测实验组 (产生耐药) 与对照组 (未产生耐药) 患者的血清膜蛋白前 S₂。结果 产生耐药后突变 66 例, 未突变 51 例, 野生株 33 例。突变 66 例中 YIDD 突变 7 例; YVDD 突变 8 例; YMDD/YIDD 突变 12 例; YMDD/YVDD 17 例, YMDD/YIDD/YVDD 22 例。对照组 HBV S₂ 阳性 32 例; 实验组 HBV S₂ 阳性 78 例。结论 产生耐药后, YMDD 突变率为 44%, 以 YMDD/YIDD/YVDD 突变为主, 与其他文献报道有所不同。产生耐药后, HBV S₂ 的表达增加, 说明耐药后 HBV 病毒出现活动性复制, 从而及时指导临床调整治疗方案, 避免延误病情。

关键词: 肝炎, 乙型; 变异 (遗传学); 研究

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.048

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0099-03

乙型肝炎病毒流行于世界各地, 造成严重感染。拉米夫定 (Lamivudine, 又名贺普汀) 是口服胞嘧啶核苷类药物。拉米夫定服用方便, 不良反应少, 易为患者接受, 是目前公认的有效而安全的抑制病毒复制的药物^[1]。拉米夫定作为第一个获批准的口服抗 HBV 药物, 其问世推动了慢性乙型肝炎治疗的进程。但长期使用可诱发 HBV 病毒变异, 引起病毒耐药, 导致拉米夫定失去抑制 HBV 复制作用, 从而逐渐产生临床常见的 HBV 拉米夫定耐药^[2]。随着用药时间的延长, 变异的概率增加。现对近 2 年来在本院应用拉米夫定 1 年治疗乙型肝炎病

毒感染引发 YMDD 变异进行检测, 并且分别在未耐药和耐药后对 HBV 表面抗原蛋白 (Pre-S₂) 进行检测, 探讨耐药后对其影响的表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全部血清标本均为本院 2008 年 1 月至 2009 年 12 月住院口服拉米夫定的慢性乙型肝炎患者共 150 例, 其中男 78 例, 女 72 例, 平均年龄为 (42.3 ± 22.5) 岁, 诊断符合 2000 年西安会议制定的病毒性肝炎防治方案的诊断标准。YMDD 变异检测均在患者服用拉米夫定治疗产生耐药后进

△ 通讯作者, E-mail: liuxr610@163.com。

行。HBV S₂ 的检测分为未产生耐药(服药前)和产生耐药(服药后)。

1.2 方法 (1)FYMDD 变异检测:采用实时荧光定量 PCR 法。试剂盒购自上海克隆生物科技有限公司。操作过程按照试剂盒说明步骤进行。循环结束后,用 LightCycler 软件对结果进行分析。以刚好能区分各曲线为最低标准,得到循环阈值(CT 值),根据 CT 值判断阴、阳性。CT-C=40 HBV 阴性;CT-C<36 且 CT-I=40,CT-V=40, YMDD 野生型;CT-C<36 且 CT-I<36,CT-V=40, YIDD 突变;CT-C<36 且 CT-I=40, CT-V<36, YVDD 突变;CT-C<36 且 CT-I<36,CT-V<36, YIDD/YVDD 共生突变。(2)HBV 膜蛋白前 S₂ 测定:采用 ELISA 法,试剂由上海科华生物工程有限公司提供。未产生耐药的检测:收集 HBsAg 阳性患者入院时的血清,采用双抗体夹心法的原理,操作过程按照试剂盒说明步骤进行。Cut Off 值大于 0.12 为阳性。产生耐药的检测:收集同一 HBsAg 阳性患者入院服用拉米夫定 12 个月的血清。检测方法同前。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析。率的比较 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 YMDD 检测结果 150 例标本中检出突变 66 例,未突变 51 例,野生株 33 例。66 例突变病例中 YIDD 突变 7 例;YVDD 突变 8 例;YMDD/YIDD 突变 12 例;YMDD/YVDD 突变 17 例, YMDD/YIDD/YVDD 22 例。

2.2 未耐药与耐药后 HBV 膜蛋白前 S₂ 水平 未耐药 HBV S₂ 阳性率为 32%;耐药后 HBV S₂ 阳性率为 78% ($\chi^2=64.12$, $P<0.05$),见表 1。

表 1 未耐药与耐药 HBV 前 S₂ 水平比较

项目	S ₂ 阴性	S ₂ 阳性	合计	阳性率(%)
未耐药(用药前)	102	48	150	32
耐药(用药后)	33	117	150	78
合计	135	165	300	55

注: $\chi^2=64.12$, $P<0.05$ 。

3 讨 论

拉米夫定是核苷类抗病毒药物,它与乙型肝炎病毒多聚酶结合后,竞争性地抑制多聚酶活性,使 HBV DNA 的链合成终止,从而有效地抑制 HBV DNA 的复制,同时伴有 ALT 恢复,肝组织病理改善^[3]。长期应用拉米夫定,一般疗程超过 6 个月以上开始产生病毒变异,并可产生耐药,导致病毒复制重新活跃,甚至病情的加重或死亡,其产生耐药的分子基础主要为 YMDD 突变为 YVDD 或 YIDD。YMDD 是 HBV DNA P 基因 C 区内的高度保守序列,编码着 HBV 多聚酶基因 YMDD 氨基酸序列(酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸),因此也是拉米夫定治疗 HBV 的作用靶点^[4]。随着拉米夫定疗程的延长,HBV DNA 发生了变异,即高度保守区的 YM204DD 模序,其中的 M204 被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代(M204V/M204I,曾称为 M552V/M552I),变为 YVDD 或 YIDD。蛋氨酸的密码为 AUG,当其中的腺苷酸被鸟苷酸替代后,就成了缬氨酸的密码(GUG);当 AUG 中的鸟苷酸被胞苷酸替代后,就成了异亮氨酸的密码(AUC)。这种突变只是单个核苷酸的置换,因而在理论上是较易发生的。病毒的变异随疗程的延长而升高。有文献报道,16%~32% 的患者在用拉米夫定治疗 1 年后,发现 YMDD 突变,并伴随 HBV DNA 和 ALT 水平上升。本研

究发现,拉米夫定治疗满 48 周的慢性乙型肝炎患者 YMDD 的变异率为 44%,与文献报道基本一致。但是本组检测以 YM-DD/YIDD/YVDD 变异为主,与国内相关文献报道的不同。

HBV DNA 基因组呈环状,由一个不完整的双链组成,为部分双链和可变量度的单链。目前,发现至少有 6 个可被转录的开放式阅读框架,即 S、P、C、X 以及 ORF5 和 ORF6。S 基因编码外膜蛋白,即乙型肝炎表面抗原。S 基因区又分为 S 区、前 S₂ 区和前 S₁ 区。由 3 个位相相同的起始密码 ATG 开始分别编码 226 个氨基酸的 S 蛋白、55 个氨基酸的前 S₂ 蛋白和 108~119 个氨基酸的前 S₁ 蛋白^[5]。前 S₂ 的 C 端与 HBsAg 的 N 端相连,由 55 个氨基酸组成。前 S₂ 暴露于 HBV 囊膜外层,具有多聚人血清清蛋白 (polymerized human serum albumin, PHSA) 的受体 (PHSA-R),能与 PHSA 结合^[6]。由于肝细胞表面也有 PHSA-R, HBV 能通过血液循环中存在 PHSA 的介导,吸附到肝细胞表面,最后经胞饮作用进入肝细胞内。前 S₂ 蛋白作为 HBV 的包膜蛋白之一,在 HBV 侵入肝细胞中起着非常重要的作用。早在 1984 年 Machida 就发现 HBV 前 S₂ 区域编码的 55 个氨基酸中存在 PHSA 受体^[7]。作为 HBsAg 糖蛋白的一部分和具有 PHSA 受体的作用,前 S₂ 在 HBV 附着和侵入肝细胞的机制中起着重要作用,可作为反映 HBV 复制的指标之一。另据多篇报道,前 S₂ 抗原与 HBsAg 滴度呈正相关,与 HBeAg、PHSAR 和 HBV DNA 有良好的伴随关系^[8-9]。另外,前 S₂ 抗原阳性患者 ALT 升高的比例明显高于前 S₂ 阴性的患者,两者差异有统计学意义。所以,HBV 前 S₂ 抗原与病毒感染、活动性复制、转归有密切关系。临床上只检测“乙型肝炎五项”是不够的,它可以弥补因病毒变异和其他原因造成的 HBeAg 阴性的“误寻”^[10]。

综上所述,前 S₂ 是判断 HBV 感染病毒是否活动和较大传染性的新的标志,是乙型肝炎早期诊断、疗效观察、预后评估的一个可靠标志。本组检测的耐药后前 S₂ 抗原阳性数远大于耐药前,说明耐药后 HBV 病毒又出现活动性复制,这样可以及时指导临床重新用药,调整治疗方案,避免延误病情,所以慢性乙型肝炎患者在长时期服用拉米夫定后检测 HBV 前 S₂ 有很重要的临床意义。

参考文献

[1] 邱源旺,黄利华,蒋祥虎.慢性乙型肝炎 YMDD 变异后的治疗[J].世界华人消化杂志,2009,17(29):3034-3037.

[2] 商庆华,于建国,王永清.拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 YMDD 耐药变异的相关因素分析[J].实用医药杂志,2009,26(03):22-23.

[3] 肖敏敏,黄升海.3 种方法检测乙型肝炎 YMDD 变异的比较研究及临床结果分析[J].检验医学,2009,24(3):173-176.

[4] 武昌,任立英,李强.慢性乙型肝炎 YMDD 变异基因的检测及分析[J].医学检验与临床,2007,18(4):46-47.

[5] 余库民.乙型肝炎病毒前 C 区、C 启动子区、前 S₂ 区基因突变与慢性肝病的相关性[J].中华传染病杂志,2006,6(24):196-199.

[6] 唐永明,许为民,邢精红.慢性乙型病毒性肝炎中 HBV-DNA 含量与 IL-17/IL-18 及前 S₂ 抗原、前 S₂ 抗体水平的关系[J].现代检验医学杂志,2006,21(6):13-15.

[7] 陈兴文.前 S₂ 抗原、HBV 血清标志物与 HBV DNA 检测结果的相关性探讨[J].检验医学与临床,2009,6(12):

959-960.

- [8] 许世琼,叶恩兰,冉海敬. 血清中乙型肝炎病毒前 S₂ 蛋白检测的临床价值[J]. 重庆医学, 2007, 32(17): 1189-1190.
- [9] 陈莺. 乙型肝炎病毒前 S₂ 抗原的检测及其临床意义[J]. 福建医药杂志, 2007, 29(1): 129-130.

- [10] 赖梅梅,郑建. HBV 前 S₂ 蛋白的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2008, 11(2): 127-129.

(收稿日期: 2010-09-11)