

• 临床检验研究论著 •

慢性乙型肝炎患者 YMDD 突变与 HBV DNA 定量水平相关性研究

张 笠, 高 武, 刘小荣

(甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730000)

摘 要:目的 探讨 HBV DNA 复制水平与 HBV YMDD 突变的相关性。方法 运用实时荧光定量 PCR 核酸检测技术, 检测 150 例慢性乙型肝炎(CHB)患者未服用拉米夫定治疗前血清 HBV DNA 水平以及服用拉米夫定治疗 12 个月血清中 YMDD 突变情况。结果 治疗前患者血清 HBV DNA 载量较低者 YMDD 突变率较低, 治疗前病毒载量较高者 YMDD 突变率也较高($P < 0.05$)。结论 HBV YMDD 突变与治疗前 HBV DNA 水平呈正相关, 治疗前患者血清 HBV DNA 定量水平检测可作为发生 YMDD 突变的早期观察指标之一。

关键词:肝炎, 乙型, 慢性; 拉米夫定; DNA, 病毒; 变异(遗传学)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)22-2724-02

Studies of the correlation between the incidence of YMDD mutation in patients with chronic hepatitis B and the HBV DNA quantitative level

Zhang Li, Gao Wu, Liu Xiaorong

(Inspection Division of the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the level of HBV DNA replication and HBV YMDD mutation. Methods Using real-time PCR nucleic acid detection technology to detect the serum HBV DNA levels of 150 cases of chronic hepatitis B (CHB) patients before taking lamivudine treatment and after taking lamivudine treatment for 12 months. Results The YMDD mutation occurrence rate before treatment patients in patients with low serum HBV DNA load was lower, and the YMDD mutation occurrence rate of the pre-treatment patients with high serum HBV DNA viral load was higher ($P < 0.05$). Conclusion The YMDD mutation of HBV could be positively related to pre-treatment HBV DNA levels, and the detection of the pre-treatment serum HBV DNA quantitative levels could be used as one of the early indicators of YMDD mutations.

Key words: hepatitis B, chronic; lamivudine; DNA, viral; variation (genetics)

HBV 感染是一个全球性的健康问题, 目前全球大约有 3.5 亿慢性感染者。中国作为乙型肝炎的高流行区, HBV 感染者达到 1.2 亿, 其中 2 000~3 000 万人为慢性乙型肝炎(CHB)患者^[1]。甘肃省是乙型肝炎的高发地区, 1990 年以来, 甘肃省乙型肝炎发病率呈上升趋势, 近年发病率维持在 133/100 000 左右, 是全国平均发病率的 3 倍^[2]。拉米夫定是目前公认的 CHB 治疗药物之一, 在短期内可使 HBV DNA 水平下降, 肝功能恢复正常, 肝纤维化程度得到改善。然而, 随着用药时间的延长, 拉米夫定治疗 CHB 的主要缺陷之一是 HBV 易对其产生耐药性, 其产生耐药的分子基础主要是 YMDD 突变为 YIDD 或 YVDD^[3-4]。作者对 150 例服用拉米夫定治疗 12 月后的 CHB 患者进行回顾性分析, 检测血清中 YMDD 突变情况, 与治疗前血清 HBV DNA 水平、HBV 基因型进行相关性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全部血清标本均来自就诊于本院的兰州地区 CHB 住院患者, 共 150 例, 其中男 78 例, 女 72 例。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。

1.2 方法 检测患者未服用拉米夫定治疗前血清 HBV DNA 水平、HBV 基因型以及患者服用拉米夫定治疗 12 月后血清中 YMDD 突变情况。HBV DNA 定量、HBV 基因分型以及 YMDD 突变检测均采用实时荧光定量 PCR 法。HBV DNA 定量试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供, HBV 基因分型试剂由上海克隆生物技术有限公司提供, YMDD 突变检测试剂由上海克隆生物技术有限公司提供, 具体操作步骤严格按照说明书进行。PCR 体外扩增仪为 ABI7500 型。

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

2 结 果

2.1 拉米夫定治疗前 HBV DNA 水平与治疗前 HBV YMDD 突变发生率的相关性 150 例 CHB 患者服用拉米夫定治疗前按血清 HBV DNA 水平分为 DNA $< 10^5$ copy/mL 和 DNA $\geq 10^5$ copy/mL 两个组, 其中前者占 53.3% (77/150), 后者占 46.7% (73/150)。治疗前 HBV DNA $\geq 10^5$ copy/mL 患者组经拉米夫定治疗 12 个月后发生 YMDD 突变的占 61.6% (45/73), 未发生 YMDD 突变的占 38.4% (28/73); 治疗前 HBV DNA $< 10^5$ copy/mL 患者组经同样治疗后发生 YMDD 突变的占 38.4% (28/77), 未发生 YMDD 突变的占 63.6% (49/77)。经 χ^2 检验, 两组 YMDD 突变发生率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.586, P < 0.05$), 与治疗前 HBV DNA 水平有关。

2.2 HBV YMDD 突变的检测 150 例 CHB 患者服用拉米夫定治疗 12 个月后血清中检出 YMDD 野生型占 56.0% (84/150), YMDD 突变占 4.0% (66/150)。发生突变的 66 例患者中, 男 36 例, 女 30 例, 不同性别之间的 YMDD 突变率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。突变病例中, YIDD 突变占 10.6% (7/66), YVDD 突变占 12.1% (8/66), YMDD/YIDD 突变占 18.2% (12/66), YMDD/YVDD 突变占 25.6% (17/66), YMDD/YIDD/YVDD 突变占 33.3% (22/66)。

3 讨 论

HBV 为嗜肝双链 DNA 病毒, 由一个不完整的双链组成, 为部分双链和可变长度的单链。HBV 基因组又称 HBV DNA, 约由 3 200 个碱基对组成, 在所有已知能感染人体、具有独立复制能力的双链 DNA 病毒中, HBV 基因组最小, 但复制效率最高。HBV 具有病毒复制产量高 ($10^{12} \sim 10^{13}$ 病毒粒/天)、突变率高 ($10^{10} \sim 10^{11}$ 点突变/天) 的特征, HBV DNA 聚合酶缺乏校正功能, 容易发生碱基配对错误, 导致 HBV 基因突

变十分频繁^[1]。

以拉米夫定为代表的核苷类抗 HBV 药物,能够有效抑制 HBV 的复制,迅速降低病毒载量,改善肝脏组织炎性坏死病变,延缓肝纤维化进程,具有良好的耐受性、安全性及服用方便等特点,已广泛应用于 CHB 患者治疗。但长期服用该药会诱导病毒突变而造成严重的耐药。据国内学者观察,服用拉米夫定 1、2、3 年 YMDD 突变发生率分别为 14.67%、49.7%、70.5%。目前兰州地区服用拉米夫定治疗的 CHB 患者 YMDD 突变发生率达到 44%,高于国内其他地区研究者的相关报道。袁美琴等^[5]报道,1 000 例患者服用拉米夫定半年, YMDD 突变发生率为 13.8%;宋世会等^[6]报道,拉米夫定治疗 1 年, YMDD 突变发生率为 18.9%。造成这一差异的原因可能是由于兰州地区部分患者对疾病的重视程度不高,未能及时就诊,在检测初期就已经具有了较高的 HBV DNA 复制水平,因此在治疗后易发生 YMDD 突变。

相关研究结果表明, YMDD 是干扰 HBV DNA 复制的药物结合点,其作用机制是拉米夫定的三磷酸盐竞争性抑制 HBV DNA 聚合酶的活性,引起 HBV DNA 链合成的终止,产生对 CHB 的治疗作用。拉米夫定治疗时间的延长,会导致 HBV P 基因区 YMDD 突变,使 P 基因区逆转录活性部位中的 552 位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代, YMDD 发生 YVDD/YIDD 突变,导致 HBV 对拉米夫定产生耐药性。近年来,众多学者致力于研究 YMDD 突变与 HBV DNA 定量的相关性,以探讨血清 HBV DNA 水平能否作为拉米夫定诱导 YMDD 突变的早期观察指标。HBV YMDD 突变与治疗前 HBV DNA 病毒载量呈正相关。治疗前患者血清 HBV DNA 病毒载量较低者 YMDD 突变率较低,治疗前病毒载量较高者 YMDD 突变率也较高。本研究的这一结果与其他研究者的研究结果一致^[7]。谢松刚等^[8]研究了 128 例患者,按照治疗前 HBV DNA 水平分为 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^8$ copy/mL 共 3 个组,经拉米夫定治疗后发生 YMDD 突变共 17 例(13.3%),3 个组的突变率分别为 4.7%、17.8%和 31.6%,3 组间突变率比较差异有统计学意义。罗志雄等^[9]也研究报道

165 例 CHB 患者应用拉米夫定治疗 12~24 个月,共检测 YMDD 突变 38 例(23.3%),其中 35 例(89.4%)用药前 HBV DNA 载量均大于 6.3×10^7 copy/mL。因此,治疗前患者血清 HBV DNA 定量水平检测可作为 YMDD 突变发生的早期观察指标之一。

本研究结果说明, HBV DNA 复制水平与 YMDD 突变具有相关性,可作为早期监测 HBV YMDD 突变的观察指标,在 CHB 患者疗效监测、病情预测和转归判断方面具有临床意义,为临床及时调整患者治疗方案提供基础依据。

参考文献

- [1] 游晶,庄林,陈红英,等.乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J].世界华人消化杂志,2007,15(9):921-928.
- [2] 孟蕾,李慧,刘建地,等.甘肃省乙型肝炎流行病学特征和控制策略[J].中国计划免疫,2003,9(6):326-328.
- [3] 邱源旺,黄利华,蒋祥虎,等.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.
- [4] 姚光弼,王宝恩,崔振宇,等.拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 3 年疗效观察[J].中华内科杂志,2003,42(6):382-387.
- [5] 袁美琴,邹奇奇,吴自锋.1 000 例慢性乙型肝炎应用拉米夫定治疗 YMDD 变异的综合分析[J].实验与检验医学,2009,27(4):347-349.
- [6] 宋世会,齐俊英,杨道锋,等.乙型肝炎病毒基因型与 YMDD 变异的关系[J].中西医结合肝病杂志,2005,15(4):199-201.
- [7] 商庆华,于建国,肖德明,等.拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 YMDD 变异的产生与病毒载量的关系[J].中华检验医学杂志,2005,28(9):928-931.
- [8] 谢松刚,张素华,张玲.乙型肝炎患者 HBV-DNA 载量及基因型与 YMDD 变异的相关性研究[J].实用临床医药杂志,2008,12(5):119-121.
- [9] 罗志雄,刘映霞,彭忠田,等. HBV 准种变异预测核苷(酸)类似物治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎持续疗效的初步研究[J].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2009,3(2):16-20.

(收稿日期:2012-06-30)

(上接第 2723 页)

测定时应注意,PRP 需置 37℃预温,否则测定结果 CV% 增大,如增设样本预温模块可提高 NJ4A 精密度的(改进机型已解决),或研发一次性比色杯替代现采用的比色皿清洗比色系统。抗凝全血 2 mL 可提取 PRP 约 0.7~1.2 mL,如需复测样本量不能保证,如用多份混合血浆替代 PPP,结果会产生偏差,应进一步研发使样本微量化,或尝试批量测试以软件拓扑替代 PPP 空白对照,而溶血、黄疸和血脂样本特殊样本必须以 PPP 为空白对照。诱导剂需置-20℃冻存和运输,勿反复冻融。

综上所述,普利生 LBY-NJ4A 全自动血小板聚集仪精密、正确度和准确度符合规范;不同通道结果具有一致性;固定误差、比例误差较小,与现用仪器测定结果相关良好;不同医学决定水平检测结果的不确定度在可接受范围;检测限可满足临床分析;携带污染率 2.82%;Hb 150 mg/L、TBIL 246 g/L、TG 3.80 g/L 对结果无干扰;参考范围与公认的参考范围无明显差异,可在临床应用。

参考文献

- [1] Harrison P, Frelinger III AL, Furman MI, et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory[J]. Thromb Res, 2007, 120(3):323-336.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:2003)[M]. 北京:中国计量出版社,2006.

- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:47-81.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5A-2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods-approved guideline[S]. 2nd ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP-9A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. 2nd ed. USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [6] 郑铁生,鄢盛恺.临床生物化学检验[M]. 2 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:75-87.
- [7] 姜旭金.临床生物化学检验实验指导[M]. 2 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:121-126.
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach, approved guideline[S]. USA: NCCLS, 2003.
- [9] 王学锋,王鸿利.血栓与止血的检测及应用[M]. 上海:世界图书出版公司,2002:43-69,137-140.
- [10] Michelson AD, Frelinger III AL, Furman MI. Current options in platelet function testing[J]. Am J Cardiol, 2006, 98(10):4-10.

(收稿日期:2012-05-26)