

• 论 著 •

乙型肝炎病毒 YMDD 变异株的检测及其临床意义

方 莉¹, 雷 娇², 赵维皎¹, 陈 莹¹

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系 2009 级, 四川南充 637000)

摘 要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者 HBV YMDD 变异的情况、相关影响因素及临床意义, 为临床诊断和治疗提供依据。方法 对 100 例慢性乙型肝炎患者采用实时荧光 PCR 法检测血清中 HBV YMDD 变异及 HBV DNA 载量。结果 100 例乙肝患者中检出 HBV YMDD 变异共 13 例(阳性率 13%), 其中 YIDD 变异 7 例, YVDD 变异 5 例, YIDD/YVDD 共生变异 1 例。13 例 YMDD 变异患者 HBV DNA 在 $(1.77 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8)$ IU/mL, 丙氨酸转氨酶(ALT)水平 18.1~273.5 U/L。结论 未发现慢性乙型肝炎患者的性别、年龄、乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)状态、HBV DNA 载量及 ALT 水平与 HBV YMDD 变异检出率之间存在相关性, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

关键词:聚合酶链反应; 慢性乙型肝炎; 变异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2197-03

Detection of YMDD mutations in hepatitis B virus and analysis of its clinical significance

Fang Li¹, Lei Jiao², Zhao Weijiao¹, Cheng Ying¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China 2. Department of Medical Laboratory, North Sichuan Medical College in 2009, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To discuss YMDD mutation, related factors and clinical significance in chronic hepatitis B patients, providing the basis for clinical diagnosis and treatment. Methods YMDD mutations and DNA load of hepatitis B virus in 100 chronic hepatitis B patients were detected by real-time fluorescence PCR. Results YMDD mutations of hepatitis B virus were found in 13 out of 100 patients(positive rate 13%). Including YIDD mutations in 7, YVDD mutations in 5 and YIDD/YVDD symbiotic mutation in 1. In the 13 patients, HBV DNA load and ALT level were at $(1.77 \times 10^5 - 1 \times 10^8)$ IU/mL and 18.1-273.5 U/L. Conclusion Do not find the detection rate of YMDD mutation in chronic hepatitis B patients is related with gender, age, HBeAg status, HBV DNA load and ALT level, the difference has no statistical significance($P > 0.05$).

Key words: polymerase chain reaction; chronic hepatitis B; mutation

慢性乙型肝炎是由 HBV 引起的传染性疾病, 我国是乙肝的高流行区, 每年约有 50~120 万人死于慢性乙型肝炎及肝纤维化、肝细胞癌等并发症, 因此乙肝已成为严重危害人类生命的一大杀手。拉米夫定是当前常见的乙肝核苷类治疗药物, 对 HBV DNA 复制具有较强的抑制作用, 但长期服用易出现耐药, 最常见为拉米夫定导致乙肝病毒 DNA 多聚酶 P 基因区的酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)序列发生变异^[1]。现通过对本院 100 例乙肝患者进行 HBV YMDD 变异的检测, 了解乙肝患者 YMDD 变异的存在状况, 并对 HBV YMDD 变异与患者性别、年龄、HBV DNA 载量、乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)状态及丙氨酸转氨酶(ALT)水平等因素进行相关性的探讨, 从而为抗病毒药物的选择及疾病的预后提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2013 年 9 月至 2014 年 4 月期间来本院就诊的慢性乙型肝炎患者 100 例, 其中男性 71 例, 女性 29 例, 年龄 14~68 岁。所有患者均空腹采集外周静脉血于不加任何抗凝剂的真空采血管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 血清保存于 -80 ℃ 条件下。

1.2 仪器与试剂 Roche-LightCycler 480 II 实时荧光 PCR 仪; 雅培 i-2000 全自动化学发光分析仪; 日立 7600 全自动生化分析仪。HBV YMDD 变异检测试剂购于厦门安普利生物有限公司; HBV DNA 定量试剂购于上海科华生物工程有限公

司; HBV 血清标志物检测试剂购于雅培贸易(上海)有限公司; ALT 检测试剂购于中生北控生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 载量的检测 按照上海科华有限公司提供的说明书提取模板 DNA、配制 PCR 反应液, 于 Roche-Light-Cycler 480 II 实时荧光 PCR 仪设置好反应条件后进行上机检测。

1.3.2 HBV YMDD 的检测

1.3.2.1 模板 DNA 的提取 按照厦门安普利生物有限公司提供的说明书提取模板 DNA, 取得测血清样本 50 μ L 与裂解液 100 μ L 于 0.5 mL 离心管中, 振荡混匀, 室温静置 10 min, 13 000 r/min 离心 1 min, 吸弃上清; 加入 150 μ L 洗涤液, 振荡混匀, 13 000 r/min 离心 1 min, 吸弃上清; 加入 150 μ L 重复洗涤液, 振荡混匀, 13 000 r/min 离心 1 min, 吸弃上清, 沉淀备用。

1.3.2.2 PCR 反应液的配置 取干净离心管, 按照每人 29.5 μ L 反应缓冲液 + 0.5 μ L 酶混合液配制反应体系, 充分混匀后, 稍微离心后移至标本处理区, 取 30 μ L 配制好的 PCR 反应液于备用沉淀中, 充分混匀后, 取 25 μ L 于 PCR 反应管中, 盖紧反应管盖, 稍微离心后, 置于 Roche-LightCycler 480 II 实时荧光 PCR 仪内进行检测。

1.3.2.3 PCR 反应条件 引物探针浓度和反应条件均按照

每个试剂盒优化后的最佳条件进行。反应条件如下:38 ℃ 5 min;95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s,62 ℃ 50 s,循环 40 次。仪器通道选择 FAM 通道,荧光信号分别在 62 ℃ 收集,收集方式为 SINGLE。

1.3.2.4 HBV YMDD 阳性判断标准 在增长曲线呈 S 型的情况下,Ct<36,判断为阳性;Ct≥36 且 Ct 0(或 40),进行样本重检后 YVDD、YIDD(G-C)、YIDD(G-T)Ct≤38,判断为阳性。

1.3.2.5 HBV YMDD 结果判断 乙肝病毒 DNA 多聚酶 P 基因区的酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)序列发生变异,突变为酪氨酸-异亮氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YIDD)或酪氨酸-缬氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YVDD),即由 YMDD 突变为 YIDD 或 YVDD。

1.3.3 HBV 标志物的检测 按照雅培贸易(上海)有限公司提供的说明书采用微粒子化学发光法进行检测。

1.3.4 ALT 水平的检测 按照中生北控生物科技有限公司提供的说明书采用速率法进行检测。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 应用统计软件处理。计数资料采用百分率表示,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。率的比较采用 χ^2 统计学分析,组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(F 检验); $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV YMDD 突变检测结果分析 100 例标本发生 YMDD 突变共 13 例,突变率为 13%,其中 YIDD 突变 7%、YVDD 突变 5%、YIDD/YVDD 共生突变 1%。YMDD 野生型 87 例,野生型比例为 87%。

2.2 HBV YMDD 变异与患者性别和年龄的关系分析 YMDD 未变异患者中男性 61 例,女性 26 例,YMDD 变异患者中男性 10 例,女性 3 例,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);YMDD 未变异患者平均(34.07±13.48)岁,YMDD 变异患者平均(35.77±13.67)岁,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 HBV YMDD 变异与患者性别、年龄的关系				
组别	<i>n</i>	性别(%)		年龄($\bar{x} \pm s$,岁)
		男	女	
YMDD 野生组	87	85.9	89.7	34.07±13.48
YMDD 变异组	13	14.1	10.3	35.77±13.67

2.3 HBV YMDD 变异与患者 HBV DNA 载量及 ALT 水平的关系分析 YMDD 未变异患者 HBV DNA 载量的对数值为 6.45±1.27,YMDD 变异患者 HBV DNA 载量的对数值为 6.77±0.88,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);YMDD 未变异患者 ALT 平均水平为(86.19±132.51)U/L,YMDD 变异患者 ALT 平均水平为(106.08±84.56)U/L,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 HBV DNA 载量、ALT 水平对 HBV YMDD 变异检出率的影响($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	HBV DNA 载量 对数值(log10)	ALT(U/L)
YMDD 野生组	87	6.45±1.27*	86.19±132.51*
YMDD 变异组	13	6.77±0.88	106.08±84.56
<i>t</i>		0.867	0.524

*: $P > 0.05$,与 YMDD 变异组比较。

2.4 HBV YMDD 变异与患者 HBeAg 状态的关系 62 例 YMDD 野生组中 HBeAg 阳性患者 44 例,13 例 YMDD 变异组中 HBeAg 阳性患者 10 例,两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.189, P > 0.05$)。

2.5 HBV YMDD 突变模式影响因素的分析 采用单因素方差分析,结果显示 YIDD 变异组、YVDD 变异组及 YMDD 未突变组这 3 组在年龄组成、HBV DNA 平均载量及 ALT 平均水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 HBV YMDD 突变模式影响因素分析($\bar{x} \pm s$)			
YMDD 突变模式	年龄(岁)	HBV DNA 载量 对数值(log10)	ALT(U/L)
YIDD	34.14±16.72	6.88±0.94	121.63±69.65
YVDD	38.40±11.0	6.92±0.62	99.28±110.89
YMDD 野生型	34.06±13.48	6.52±1.26	86.19±132.51
<i>F</i>	0.239	0.805	0.242

3 讨 论

YMDD 是 HBV DNA 多聚酶结构域 P 区中的一个高度保守的序列,拉米夫定能够与该序列特异性结合,竞争抑制多聚酶活性,从而终止 DNA 链延伸而有效地抑制 HBV DNA 复制^[2]。长期应用拉米夫定易导致 YMDD 基序发生碱基替代,主要是蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)替代后,YMDD 突变为 YIDD/YVDD^[3],变异的产生可导致病毒的再次活跃,从而导致机体对抗病毒药物的耐药、肝炎症状复发、病情加重甚至死亡的严重后果^[4]。因此对慢性乙型肝炎患者进行 YMDD 突变的监测对临床及时调整治疗方案、改善病情十分有必要。

目前国内对 HBV YMDD 变异阳性率尚未有较统一的数据^[5-6],在本研究测得 YMDD 变异阳性率为 13%,13 例 YMDD 变异患者 HBV DNA 在(1.77×10⁵~1×10⁸)IU/mL,表明 YMDD 变异株 HBV DNA 复制活跃;13 例 YMDD 变异患者 ALT 水平在 18.1~273.5 U/L,显示 YMDD 变异株导致肝功能损伤的相关性较弱。本次研究提示 YIDD 突变和 YVDD 突变检出率不一,YIDD 位点变异率比 YVDD 位点变异率高,与郑瑞英等^[7]的结果相符。分析其原因可能是 YIDD 突变株耐药性较 YVDD 突变株强,在拉米夫定治疗过程中,更易成为优势株^[7]。此次研究未发现慢性乙肝患者年龄、性别、HBeAg 状态、HBV DNA 载量及 ALT 水平对 YMDD 变异检出率和 YMDD 突变模式产生显著影响,与文献^[8-10]的研究结果不符合,可能与选取的慢性乙肝患者样本总体量及 YMDD 阳性突变数较少有关,有待后续研究。

分析本研究的不足之处在于未对 HBV YMDD 变异动态变化过程进行监测,只是在血清 HBV DNA 载量发生明显波动时研究 YMDD 突变及其与临床表现的关系,不能准确预测 YMDD 发生突变的时间,故不排除血清 HBV DNA 载量、ALT 水平与 YMDD 突变检测时间不同步、YMDD 自然变异的存在及 YMDD 突变模式转化的可能性^[11]。

此外,本研究中存在 HBV DNA 载量明显波动但 HBV YMDD 未突变的样本,推测可能与实时荧光 PCR 法仅能检测单一突变位点的局限,无法检测临床联合应用多种核苷类药物可能出现的多个耐药位点的情况有关,可予以进一步研究。有报道表明,拉米夫定治疗时间、HBV DNA 基(下转第 2201 页)

与妊娠结局直接相关^[7],对妊娠期甲状腺功能异常的孕妇进行早期治疗,可以降低胎儿脑部发育的损伤^[8]。本地区碘缺乏、碘充足、碘过量孕妇甲状腺功能异常发生率分别为 38.41%、10.29%、38.79%,结果显示碘营养水平异常引起甲状腺疾病的概率远远高于碘营养水平正常个体,尿碘水平异常与碘适量水平个体的甲状腺功能异常患病率分别为 23.30% 和 10.29%,差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,妊娠妇女碘营养水平与甲状腺疾病的发生存在紧密联系。本地区孕妇甲状腺功能紊乱以亚临床甲减、亚临床甲亢为主,这有可能与本地区较高水平的碘水平异常有关系。曾有报道^[9]国内孕妇甲减发病率为 1%,本次实验发现佛山地区孕妇发生甲减、亚临床甲减发病率为 3.17%、6.33%,应当引起医生及孕妇的高度重视。国内外研究表明^[10],妊娠期间甲减不仅增加了妊娠不良结局的风险,同时对胎儿神经智力发育也可能造成不良影响。薛海波等^[11]曾报道孕妇 TSH 升高的程度与其后代智力发育损伤相关, Benhadi 等^[12]研究发现高 TSH 水平增加孕妇流产的风险。孕妇在妊娠期间发生甲亢,如果控制不良,会导致流产、妊娠高血压、早产及孕妇充血性心衰等疾病相关^[13]。因此,对尿碘水平异常个体的孕妇进行甲状腺功能监测和科学干预是很有必要的。

综上所述,加强妊娠期妇女宣传教育,产检时建立尿碘监测,对于尿碘水平异常的患者进行甲状腺功筛查。发现不足针对性的给予补充和干预治疗,避免给孕妇和胎儿带来不良后果。

参考文献

- [1] Blumenthal N, Byth K, Eastman CJ. Iodine intake and thyroid function in pregnant women in a private clinical practice in north-western sydney before mandatory fortification of bread with iodised salt[J]. J Thyroid Res, 2012, 798(963):1-6.
- [2] Glinioer D. The importance of iodine nutrition during pregnancy[J]. Public Health Nutr, 2007, 10(1):1542-1546.
- [3] Patel J, Landers K, Li H, et al. Thyroid hormones and fetal neurological development[J]. J Endocrinol, 2011, 209(1):1-8.

(上接第 2198 页)

因型及临床联合用药对 HBV YMDD 变异的检出概率可产生显著影响,值得进一步研究,以便更好地指导临床^[12-14]。

参考文献

- [1] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2007: 201.
- [2] Masaadeh HA, Hayajneh WA, Alqudah EA. Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in Jordan[J]. World J Gastroenterol, 2008, 7(14):7231-7234.
- [3] 尚丽红,武小桐,李娟,等. 乙型肝炎病毒 YMDD 突变检测方法学比较[J]. 中国药物与临床杂志, 2013, 13(12):1568-1570.
- [4] 王瑜敏,陶志华,朱燕英,等. 慢性乙肝 YMDD 变异患者肝纤维化指标、血清标志物的检测及意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(3):174-175.
- [5] 向田,刘昊,张廉生,等. 恩施地区乙型肝炎患者 HBV DNA YMDD 变异的检测[J]. 湖北民族学院学报, 2010, 27(3):47-49.
- [6] 秦辉,程险峰,滕旭,等. 黑龙江省乙型肝炎病毒拉米夫定耐药株 YMDD 变异与基因型、BCP 区变异的相关性研究[J]. 国际病毒学杂志, 2012, 19(1):15-18.

- [4] Vermiglio F, Lo Presti VP, Moleti M, et al. Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12):6054-6060.
- [5] 苏会璇,连冬梅,韦慈. 妊娠妇女尿碘与甲状腺激素水平的检测及分析[J]. 邵阳医学院学报, 2010, 29(3):217-219.
- [6] Fuse Y, Ohashi T, Yamaguchi S, et al. Iodine status of pregnant and postpartum Japanese women: effect of iodine intake on maternal and neonatal thyroid function in an iodine-sufficient area [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(12):3846-3854.
- [7] Pependieck P, Chiesa A, Prieto L, et al. Thyroid disorders of neonates born to mothers with Graves disease [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2009, 22(1):547-553.
- [8] Behrooz HG, Tohidi M, Mehrabi Y, et al. Subclinical hypothyroidism in pregnancy: intellectual development of offspring [J]. Thyroid, 2011, 21(10):1143-1147.
- [9] Shan ZY, Chen YY, Teng WP, et al. A study for maternal thyroid hormone deficiency during the first half of pregnancy in China [J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(1):37-42.
- [10] Haddow JE, Palmanki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child [J]. N Engl J Med, 1999, 341(1):549-555.
- [11] 薛海波,李元宾,滕卫平,等. 妊娠早期母亲亚临床甲状腺功能减退症对其后代脑发育影响的前瞻性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(1):916-920.
- [12] Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsma JB. et al. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death [J]. Eur J Endocrinol, 2009, 160(1):985-991.
- [13] Sheffield JS, Cunningham FG. Thyrotoxicosis and heart failure that complicate pregnancy [J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 190(2):211-217.

(收稿日期:2015-01-08)

- [7] 郑瑞英,万漠彬,孝成忠,等. 拉米夫定耐药患者乙型肝炎病毒的基因突变[J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(7):412-415.
- [8] 赵建强,李世荣,王振明,等. 慢性乙型肝炎患者应用拉米夫定治疗发生 HBV YMDD 变异的研究[J]. 医学临床与检验, 2010, 9(21):15-16.
- [9] 谢秀芹,许家璋,郗玉峰,等. 拉米夫定治疗后发生 YMDD 变异的相关因素分析[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(5):314-317.
- [10] 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.
- [11] 邓少丽,黄恒柳,陈伟,等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3):249-251.
- [12] Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options[J]. Intervirology, 2013, 46(6):413.
- [13] 戴晨阳,梁树人,徐健,等. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异株的检测及临床意义[J]. 天津医药, 2007, 35(3):161-163.
- [14] 徐智勇,陈捷,肖荣,等. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异与病毒数量和药物治疗时间的关系[J]. 微循环学杂志, 2012, 22(4):52-53.

(收稿日期:2015-03-22)