

YMDD 变异与 ALT、HBeAg 及 HBV DNA 的相关性分析

李建国 王璐莎 柴艳云 王先英

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒 P 基因突变在乙型肝炎患者治疗中的临床意义,为其诊断和治疗提供依据。**方法** 选择接受拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎(CHB)患者,进行血清 YMDD 检测且出现病毒学反弹的 68 例 CHB 患者为研究对象,将治疗前 HBV DNA 载量、ALT 水平、免疫标志物和变异后 HBV DNA 载量、ALT 的情况分别进行比较分析。**结果** 68 例患者中, YMDD 变异者 42 例,其中 YIDD 变异者 30 例, YVDD 变异者 8 例, YIDD 和 YVDD 混合变异者 4 例, YMDD 变异的检出率为 61.8%。YMDD 变异组治疗前的 ALT 水平显著低于 YMDD 野生组 ($P < 0.05$); YMDD 变异组与 YMDD 野生组治疗前的 HBV DNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); YMDD 变异组与 YMDD 野生组治疗前 HBeAg 阳性率比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); YIDD 变异组患者治疗后的 HBV DNA 水平显著低于治疗前 ($P < 0.05$), YVDD 变异组患者治疗后的 HBV DNA 水平与治疗前比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), YIDD 变异组与 YVDD 变异组治疗后的 HBV DNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); YMDD 变异组的患者治疗后与治疗前 ALT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** CHB 患者接受拉米夫定治疗期间应定期监测肝功能和 HBV DNA 水平以及及时发现是否存在 YMDD 变异,采取补救措施,提高疗效。

【关键词】 拉米夫定; 肝炎病毒, 乙型; DNA; 丙氨酸氨基转氨酶; 肝炎, e 抗原, 乙型; YMDD 变异

Analysis on the relationship between YMDD mutation and the levels of ALT, HBV DNA and HBeAg
LI Jian-guo, WANG Lu-sha, CHAI Yan-yun, WANG Xian-ying. General Hospital of Jincheng Coal Group in Shanxi, Jincheng 048006, China

Corresponding author: LI Jian-guo, Email: ljg2964@163.com

【Abstract】 Objective To study the clinical significance of HBV DNA P gene mutation and provide basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Sixty-eight patients with chronic hepatitis B in lamivudine monotherapy were detected and the information about the HBV DNA load, the level of ALT, immune markers before the treatment and HBV DNA load, the level of ALT after YMDD mutation were analyzed. **Results** The rates of HBV YMDD mutation was 61.8% (among 42 patients, there were 30 patients with YIDD mutation, 8 patients with YVDD mutation and 4 patients with mixed mutation). Before lamivudine treatment, ALT level was lower in mutation type than wild type group ($P < 0.05$). There were significant difference between mutation type and wild type for HBeAg level before lamivudine treatment ($P < 0.05$), however, the difference of mutation type and wild type for HBV DNA level before lamivudine treatment was not significant ($P > 0.05$). HBV DNA level in YIDD mutation patients was significantly lower than pre-therapy ($P < 0.05$), which was not significant in YVDD mutation patients ($P > 0.05$). There were no difference in HBV DNA level between YIDD and YVDD mutation patients after therapy ($P > 0.05$). The difference of ALT level in YMDD mutation patients was not statistically significant before and after treatment ($P > 0.05$). **Conclusions** YMDD mutant should be detected routinely in patients with chronic hepatitis B in lamivudine treatment. If YMDD mutation occurred, anti-virus drug should be aptimised.

【Key words】 Lamivudine; Hepatitis B virus; DNA; Alanine transaminase; Hepatitis B virus, e antigen; YMDD mutation

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.013

作者单位:048006 晋城市,山西省晋城煤业集团总医院(李建国、柴艳云、王先英);浙江大学研究生院(王璐莎)

通讯作者:李建国,Email:ljg2964@163.com

拉米夫定(lamivudine, LAM)自1998年上市以来,目前作为临床最早上市的抗HBV药物,有抑制HBV迅速、不良反应少等优点,但随着治疗时间的延长,部分患者可出现HBV P基因YMDD密码子的变异^[1-3],从而导致病毒对药物的敏感性下降,出现病毒学反弹、生化学改变,进而出现耐药及肝功能衰竭^[4-5],使治疗效果受到严重影响。为及时监测YMDD变异,减少耐药的发生,本文对接受拉米夫定治疗并且出现病毒学反弹的慢性乙型肝炎患者进行生化学及免疫标志物检测,探讨拉米夫定治疗过程中YMDD变异的相关因素,以期及时判定耐药情况,采取措施并提高疗效。

资料与方法

一、一般资料

选择本科室2008年1月至2011年6月门诊及住院接受拉米夫定治疗并且出现病毒学反弹的68例CHB患者的临床资料进行回顾性分析,均符合1995年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准,所有患者均无其他病毒性感染,无明显心、肾、脑疾病及自身免疫性、药物性、酒精性和非酒精性肝病,其中男性40例,女性28例,年龄21~68岁,平均年龄(42 ± 11)岁。

二、治疗及随访情况

所有患者接受LAM 100 mg/d治疗,均签署知情同意书,治疗开始前常规检查肝功能、HBV DNA及HBV表面标志物(HBV M)水平,治疗开始后每1个月复查肝功能,每3个月复查HBV DNA及HBV M水平,出现HBV DNA反弹的患者需进行血清YMDD变异检测。

三、检测方法

ALT水平采用速率法检测,参考值为<40 U/L;HBV DNA定量采用实时定量PCR检测,检测灵敏度为 5×10^2 拷贝/ml。免疫标志物采用酶联免疫吸附试验测定。YMDD变异检测采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法。

四、统计学处理

采用SPSS 13.0软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、YMDD变异检测结果

在68例血清标本中,发生YMDD变异株42例,其中YIDD变异、YVDD变异、YIDD和YVDD混合变异分别为30、8和4例。

二、YMDD变异与治疗前HBV DNA、ALT相关性分析

42例YMDD变异组患者治疗前HBV DNA基础水平为 $(108 \pm 103) \times 10^6$ 拷贝/ml,平均水平为 2.16×10^7 拷贝/ml,26例YMDD野生组患者治疗前HBV DNA基础水平为 $(112 \pm 106) \times 10^6$ 拷贝/ml,平均水平为 2.12×10^7 拷贝/ml,两组患者治疗前HBV DNA水平比较差异无统计学意义($t = 1.296, P > 0.05$),见表1。

YMDD变异组的42例患者中治疗前有24例患者ALT水平正常,18例患者ALT水平轻度异常,治疗后即恢复正常,发生变异后又出现反弹,此组患者治疗前ALT平均水平为 (36 ± 17) U/L;26例YMDD野生组患者治疗前有24例ALT水平异常,接受治疗后即恢复正常,且一直维持在正常水平,此组患者治疗前ALT平均水平为 (81 ± 43) U/L,两组患者治疗前ALT水平差异具有统计学意义($t = 3.460, P < 0.05$)。提示治疗前ALT水平低的乙型肝炎患者发生YMDD变异的可能性大于高水平ALT患者。

表1 YMDD野生组和变异组治疗前HBV DNA和ALT水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HBV DNA($\times 10^6$ 拷贝/ml)	ALT(U/L)
YMDD野生组	26	112 ± 106	81 ± 43
YMDD变异组	42	108 ± 103	36 ± 17

三、YMDD变异与血清标志物关系

26例YMDD野生组患者中HBeAg(+)者10例,HBeAg阳性率为38%,42例YMDD变异组患者中HBeAg(+)者32人,HBeAg阳性率为77%,YMDD变异组与YMDD野生组相比,两组患者HBeAg阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 96.42, P < 0.05$)。

四、YMDD变异后HBV DNA水平变化

30例患者发生YIDD变异,治疗后HBV DNA水平较治疗前显著下降,治疗前后HBV DNA水平差别有统计学意义($t = 3.396, P < 0.05$);8例患者发生YVDD变异,治疗后HBV DNA水平较治疗前差别无显著性($t = 1.218, P > 0.05$);YIDD变异组和YVDD变异组治疗后HBV DNA水平差异无统计学意义($t = 0.602, P > 0.05$),见表2。

表2 YMDD变异后HBV DNA水平变化(拷贝/ml)

组别	例数	治疗前	治疗后
YIDD变异组	30	1.62×10^7	5.66×10^5
YVDD变异组	8	1.92×10^7	1.81×10^6

五、YMDD 变异后与变异前 ALT 水平变化

42 例 YMDD 变异组患者治疗前 ALT 平均水平为 (36 ± 17) U/L, 治疗后 ALT 平均水平为 (41 ± 12) U/L, 治疗前后两组 ALT 水平差异无统计学意义 ($t = 0.682, P > 0.05$)。

讨 论

乙型肝炎根本的治疗措施是抗病毒治疗, 拉米夫定主要是通过抑制 HBV DNA 多聚酶而发挥抗病毒作用, 但随着治疗时间的延长, HBV DNA 在拉米夫定药物的诱导下, 其多聚酶 C 区的基因序列可发生变异, 即酪氨酸 (Y)-蛋氨酸 (M)-天门冬氨酸 (D)-天门冬氨酸 (D), 第 552 位的蛋氨酸 (M) 被缬氨酸 (V) 或异亮氨酸 (I) 取代, 生成 YVDD 或 YIDD 导致氨基酸的空间结构发生变化, 拉米夫定无法与之结合, 从而导致耐药, 失去抑制病毒复制的作用^[6]。

近年来, 许多临床与科研工作者都在努力探寻 HBV YMDD 变异发生的相关因素及预测因子。有报道认为, 治疗前 HBV 高水平复制、HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗-HBc(+)、男性和肥胖患者更易发生 YMDD 变异^[7-8]; 而对于治疗前 ALT 水平和 YMDD 变异发生的相关性尚有不同报道^[7]。本研究发现, YMDD 变异与治疗前 HBV DNA 基础复制水平无相关性, 但与基线 ALT 水平显著相关, 说明 ALT 基础水平低可能是 YMDD 突变的易发因素, 因此, 低水平 ALT 患者不宜行抗病毒治疗, 与王磊等^[9]研究结果一致; 张红河等^[10]研究认为治疗前 ALT 高水平患者更易发生 YMDD 变异, 与本研究结果不符, 对于这一点本研究尚需要扩大病例数进一步研究。同时, 本研究发现治疗前 HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗-HBc(+) 患者较 HBsAg(+)、抗-HBe(+)、抗-HBc(+) 患者更易发生 YMDD 变异, 这主要是因为 HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗-HBc(+) 患者体内病毒复制更活跃, 出现碱基错配的几率也较高, 也更易出现 YMDD 变异。因此, 本研究应选择 HBsAg(+)、抗-HBe(+)、抗-HBc(+) 且 ALT 水平较高的患者进行拉米夫定抗病毒治疗。

病毒发生突破变异后的补救措施是加用或改用阿德福韦酯或恩替卡韦治疗, 病毒发生变异后应较早开始补救治疗, 抗病毒治疗的效果较好, 而待病毒载量出现反跳性上升后再进行治疗的效果会很

差^[11]。因此, CHB 患者在拉米夫定治疗过程中, 应密切监测 HBV DNA、ALT 和 YMDD 变异, 以及时了解变异状况, 尽早实施补救治疗, 进而提高疗效。HBV DNA 水平动态变化是早期发现耐药的重要指标^[12-13]。

参 考 文 献

- 1 Stuyver IJ, Locarnini SA, Lok A, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 2001, 33(3):751-757.
- 2 Delaney WE 4th, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother*, 2001, 12(1):1-35.
- 3 Ogata N, Fujii K, Takigawa S, et al. Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 1999, 59(3):270-276.
- 4 Nafa S, Ahmed S, Tavan D, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2000, 32(5):1078-1088.
- 5 Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, et al. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2000, 32(4 Pt 1):847-851.
- 6 许茵. 乙型肝炎病毒 YMDD 的检测与分析. 现代医药卫生杂志, 2009, 25(10):1557-1558.
- 7 Atkins M, Hunt CM, Brown N, et al. Clinical significance of YMDD mutant hepatitis B virus in a large cohort of lamivudine-treated hepatitis B patients (abstract). *Hepatology*, 1998, 28:319A.
- 8 Lok AS, Lai CL, Leung N, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2003, 125(6):1714-1722.
- 9 王磊, 闫杰, 张照华, 等. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者 YMDD 变异及影响因素的研究. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(10):585-590.
- 10 张红河, 张卫英, 陈岳明, 等. 多种方法研究乙型肝炎病毒多聚酶变异. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(7):442-443.
- 11 韩悦, 陆志檬. 乙型肝炎病毒的耐药机制与临床处理. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2007, 1(4):193-196.
- 12 成军. 加强 HBV 耐药的认识和监测. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8):849.
- 13 成军. 重视慢性乙型肝炎核苷(酸)类似物抗病毒治疗的耐药. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2007, 1(2):65-68.

(收稿日期:2012-01-10)

(本文编辑:孙荣华)