

乙型肝炎病毒 YMDD 变异研究进展

张照华 孟红

核苷(酸)类似物拉米夫定作用于乙型肝炎病毒(HBV)多聚酶活性部位YMDD基序(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸),抑制HBV DNA复制,抗病毒效果显著。但临床上部分患者可表现为无应答或随着用药时间的延长,HBV会发生突变并导致对拉米夫定耐药,影响拉米夫定的疗效,最常见的突变位点在YMDD基序的第204位上,即蛋氨酸被缬氨酸或异亮氨酸取代(rtM204V或rtM204I),分别称为YVDD和YIDD突变。目前对YMDD变异的研究是一个热点,本文就近年来该方面的研究进展作一综述。

一、YMDD 变异检测方法

目前YMDD变异的检测技术主要有核苷酸序列测定法、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(RFLP)、基因芯片技术、聚合酶链反应微板核酸杂交-酶联免疫吸附法等,这些方法各有利弊,并且有些弊端暂时还没有较好的解决方法,在临床应用中应根据实际条件选择敏感、特异、快捷的YMDD变异的检测方法,对服药前及服药期间进行监测。

1. 核苷酸序列测定法:测序法是检测HBV DNA多聚酶基因(P)YMDD突变的金标准,包括聚合酶链反应(PCR)产物直接测序和重组克隆测序检测。有研究^[1,2]分别采用PCR及限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)进行PCR产物直接测序和重组克隆测序检测P基因YMDD变异,结果表明克隆后测序的结果最精确。目前,国外报道的HBV拉米夫定耐药株的检测多采用DNA测序法,可检测出多位点的变异,但此法虽然可靠,只能检测血清中的一种优势株,对于混合型感染通常不能识别,而且由于技术难度及实验成本等诸多因素,限制了其临床应用,不适合开展大规模标本的临床检测。

2. 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法:错配聚合酶链反应(PCR)和限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术检测HBV YMDD变异株的结果均显示,错配PCR结合RFLP分析技术能有效地鉴别HBV YMDD野生株和变异株,与测序具有同样的灵敏性和特异性^[3,4],但该法简便、快速且无需特殊仪器,适合于一般实验室及大规模临床检验应用。

3. 基因芯片技术:基因芯片(gene chip)的原理是将大量特定的基因片段或寡核苷酸片段作为探针有序且高密度地排列固定于玻璃或硅等载体上,然后与待测的有荧光标记的样品核酸按碱基配对的原则进行杂交,通过激光共聚焦系统检测杂交信号强度,经计算机分析处理数据资料,获取样品分子的数量和序列信息,从

作者单位:250002 济南市,山东省医学科学院基础研究所

通讯作者:张照华 Email: huazz68@126.com

而可对核酸序列进行大规模、高通量的研究。有学者^[5,6]将基因芯片法用于YMDD变异的检测,结果表明该法检测YMDD变异,快速、准确且重复率高,不仅能同时检测出多个位点的变异,而且能检测出野生株和变异株共存即混合感染,与其他检测方法相比有明显优势,在临床上是一种可应用的方法。

4. 聚合酶链反应微板核酸杂交-酶联免疫吸附法:聚合酶链反应微板核酸杂交-酶联免疫黏附法(PCRmh-ELISA)是一种将基因扩增、核酸杂交和酶联显色3种诊断技术为一体的检测技术,既解决了PCR产物的特异性检测,又通过酶系统的放大作用提高了检测的灵敏度。有学者^[7]采用该法检测慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗前及治疗过程中HBV YMDD变异,结果显示YMDD变异检测率与DNA测序法检测结果一致。胡盈莹等^[8]研究显示该法虽敏感性高,但特异性较低,以该法检测的13例突变株,经测序证实仅一例为突变株,其余均为野生株。因此,PCRmh-ELISA法在检测YMDD变异中的应用价值值得进一步评价。

5. 实时荧光聚合酶链反应:实时荧光定量PCR(real time quantitative PCR)是把酶动力学、核酸扩增与杂交、光谱分析和实时检测技术巧妙结合的一项技术,广泛应用于病毒学、遗传性疾病、肿瘤和癌症的诊断。有学者^[9]采用该法结合light-cycler技术分析了拉米夫定治疗中的YMDD突变,结果与PCR直接测序完全符合,认为该法简便、快速、灵敏、经济,有推广应用价值。

二、YMDD变异株与拉米夫定治疗的关系

P基因编码末端蛋白、反转录酶和RNA酶H,不同的HBV毒株P基因的末端蛋白和间隔区在不同基因型中长度不一致,而所有HBV毒株的逆转录酶(RT)区长度均为344个氨基酸,并起始于一个保守序列EDWGPCDEHG。基于这样一个特点,对RT区进行单独命名,YMDD基序中的M位于该区的第204个氨基酸,是拉米夫定的作用靶点,蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代,即发生所谓YVDD和YIDD突变,二者统称YMDD变异。由前基因组RNA反转录为负链DNA以及由负链DNA合成正链DNA都由DNA聚合酶催化完成。一般认为,YMDD变异多继发于拉米夫定治疗后,但近几年文献报道未经拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎病毒感染者血清中也可检测到YMDD变异株,即存在自然YMDD变异株。

1. 继发于拉米夫定治疗后的YMDD变异株:这种变异一般发生于拉米夫定治疗6个月后,最短可发生在4个月,平均为9个月,并随治疗时间的延长发生率逐渐增高。通常先出现血清HBV DNA水平升高,继之出现ALT/AST的异常,但需排除患者的顺应性因素以及服用假药的可能。在亚洲的多中心试验中,治疗1年、2年、3年和4年后,YMDD变异发生率分别为14%、38%、49%和66%^[10]。齐青松等^[11]随机选择32例慢性乙型肝炎患者给予拉米夫定100 mg/d并随访1年,于治疗后第3、6、9、12个月检测肝功能、HBV标志物(HBV-M)、HBV-DNA及YMDD变异。结果在治疗前未发现YMDD变异,治疗6个月发现2例YMDD变异,变异率为6.25%,治疗12个月发现5例YMDD变异,变异率为15.63%。

2. YMDD 变异自然变异株: 试验证明, 部分 HBV 感染者在未经抗病毒治疗情况下也存在 HBV YMDD 变异, 其中以 YVDD 变异为多, 且变异株均与野生株共存并在药物作用下逐渐成为优势株。颜明鹤等^[12]在未经抗病毒治疗的 110 例慢性乙型肝炎患者中检测到 19 例(17.27%) YMDD 基因变异, 证明 YMDD 变异株和野生株一样自然存在, 发现 YMDD 自发变异的发生率与性别、年龄、临床表现、病毒感染类型及 HBeAg 阳性或抗-HBe 阳性等无关。但用拉米夫定治疗后, 野生株受到抑制, 变异株成为优势株, 从而影响核苷(酸)类药物的抗病毒效果, 所以抗病毒治疗前及治疗中监测 HBV 基因序列共同变异, 具有重要的临床参考价值。张新华等^[13]对未经抗病毒治疗的 150 份 HBV DNA 阳性血清, 用基因芯片法检出阳性标本(包括 YMDD 野生型和变异型)共 122 例, 占 81.3%, 阴性标本 28 例, 占 18.7%; 在 122 例阳性标本中, 单纯 YMDD 野生型(即无变异标本)有 90 例, 占 73.8%; YVDD 变异 28 例, 占 22.9%; YIDD 变异 2 例, 占 1.6%; YVDD 和 YIDD 混合变异 2 例, 占 1.6%, 变异株检出率为 26.2%, 而且变异株均与野生株共存。其中 8 份阳性标本经测序证实与基因芯片检测结果完全一致。

3. YMDD 变异的预测因素: YMDD 变异多发生在基础 HBV DNA 水平高、长期用药、治疗期间 ALT 增高的患者, 回顾分析 4 项研究的数据资料, 发现非亚洲种族、治疗前血清 HBV DNA 水平高、男性和体重指数高为拉米夫定抵抗的相关因素^[14]。王磊等^[15]对采用拉米夫定治疗的 249 例慢性乙型肝炎和 64 例乙型肝炎肝硬化患者采用错配 PCR-RFLP 法检测了 HBV 多聚酶 YMDD 变异, 并应用 SPSS 统计软件对变异发生率和影响变异的发生因素进行统计学分析, 结果发现在拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者中, 未联合干扰素治疗、基线 ALT 水平较低、HBV DNA 水平较高和乙型肝炎肝硬化是发生 YMDD 变异的预测因子。宋世会等^[16]采用多对特异性引物对 238 例经拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者进行 HBV 基因分型并直接测序分析, 采用基因芯片检测 YMDD 变异。结果 B 基因型占 79.8%, C 基因型占 17.2%, BC 混合型占 3.0%; 发生 YMDD 变异 44 例, 变异率为 18.5%, 其中 B 基因型 33 例, 变异率为 17.4%, C 基因型 8 例, 变异率为 19.5%, BC 混合型 3 例, 变异率为 42.4%, C 基因型 YMDD 变异的发生率与 B 基因型相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。王雪刚等^[17]对 211 例服用拉米夫定后发生 YMDD 耐药变异的患者 HBV 进行基因型、基因亚型检测, B 基因型占 50.7% (107/211), C 基因型占 49.3% (104/211), 无统计学差异。进一步亚型分析发现, 107 份 B 基因型全部为 Ba 亚型; C 基因型有 C1 和 C2 两种亚型, 其中 C1 亚型占 64.4%, C2 亚型占 35.6%, 差异无统计学意义, 由此得出结论 HBV 基因型及其亚型并不影响 YMDD 变异的发生。

4. YMDD 变异的临床意义: 发生 YMDD 变异后 1~4 个月内虽都有血清 HBV DNA 的再现, 但患者的临床表现有很大差异。约半数患者只是血清 HBV DNA 再现, 但血清转氨酶持续正常。这可能是因为 YMDD 变异株的复制能力及致病性都较野生株弱, 当停用拉米夫定后患者体内的变异株常常很快被野生株取代, 临

床上表现肝为炎复发。马明等^[18]观察 17 例服用拉米夫定过程中出现 YMDD 变异而肝功能异常及 9 例出现变异后停用拉米夫定出现肝功能异常而入院患者的临床过程。结果前组患者经过 0.5~4 个月治疗后,17 例患者均肝功能正常或接近正常出院,虽然 1 例曾发展为慢性重型肝炎。后组患者经过 1~7 个月治疗,6 例患者肝功能正常或接近正常出院,其间 6 例发展为慢性重型肝炎,其中 3 例死亡。由此得出 YMDD 变异后继续服用拉米夫定,虽有部分患者出现严重肝功能损害,但整体治疗难度远较停药患者容易、预后也较好,特别是治疗前肝功能失代偿的肝硬化患者,一旦出现拉米夫定耐药,发生严重肝脏损害的可能性将大大增加。另外,发生免疫抑制的患者耐药性的发生率比免疫正常患者高,肝移植后应用多种大剂量免疫抑制剂者,对拉米夫定耐药性的发生较早、发生率较高。

5. YMDD 变异的预防和处理:(1)严格拉米夫定治疗的适应证:拉米夫定不能滥用,必须选择适应证。目前认可的拉米夫定治疗的适应证为:①ALT $\geq 2 \times$ 正常值上限(ULN),并持续增高至少 1 个月或 6 个月以内反复增高者;②ALT 水平在 $1 \sim 2 \times$ ULN 之间,建议根据患者具体情况(如肝活检结果),权衡利弊,决定是否实施治疗;③可以应用于失代偿期肝硬化合并 HBV DNA 阳性和/或 HBeAg 阳性的患者。一般发现耐药变异后需加用或换用其它抗病毒药物,如阿德福韦酯(ADV)和恩替卡韦(ETV)等。发现 YMDD 变异后停药的患者,需密切观察,警惕停药后病情急性加重。3 个月后开始检测,如发生野生株转换,可再用拉米夫定治疗,但可能再次变异,且发生较早。野生株转换后重新用拉米夫定,最好与其它药物如 ADV、泛昔洛韦(FCV)、胸腺肽(T α 1)、IL-12 或集落刺激因子(CSF)联合治疗^[19]。研究已经证实,某些核苷(酸)类似物如 ADV 和 ETV 等对 YMDD 变异株有抑制作用,我国已批准这两种药物治疗拉米夫定耐药的慢性乙型肝炎;(2)拉米夫定联合用药的问题:现有抗病毒制剂如干扰素和拉米夫定都尚不足以清除病毒或在大部分慢性乙型肝炎患者中达不到持续的病毒抑制作用,因此联合治疗有互补的作用机制,可能优于单种药物治疗。很多学者都认为今后的发展方向为联合治疗。目前较多报道为干扰素和拉米夫定的联合应用,大多认为联合治疗的疗效尚未获得肯定结论,但可减少或延缓 YMDD 变异的发生^[20]。拉米夫定联合其他作用位点不同的核苷(酸)类似物的治疗方案尚在探索之中。理论上联合用药可降低耐药性发生,有更高的反应率,但将来是否能引起多重耐药问题值得关注。

参 考 文 献

- 1 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. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2002;1:232-237.
- 2 孙剑, 侯金林, 王战会, 等. 耐拉米夫定乙型肝炎病毒变异株的人工构建及其限制性片段长度多态性分析. 第一军医大学学报, 1999, 16:489-492.
- 3 Zhou ZY, Sun J, Chen JJ, et al. Detection of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21:885-887.

- 4 Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods*, 1999, 83:181-187.
- 5 张新华, 张跃新, 孙立茹, 等. 基因芯片技术在检测乙型肝炎病毒 P 区 YMDD 变异中的研究. *中华医学杂志*, 2003, 83: 459- 462.
- 6 赵伟, 刘全俊, 刘伟, 等. 基因芯片检测拉米夫定治疗慢性乙型肝炎后引起的 HBV YMDD 变异. *江苏医药杂志*, 2003, 29:406-409.
- 7 Zhou DY, Cao YJ, Lin LY, et al. HBV resistant to lamivudine: experimental and clinical studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1:519-522.
- 8 胡盈莹, 江家骥, 李丹, 等. 不同实验方法在监测拉米夫丁耐药突变中的应用价值. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11:427- 430.
- 9 Whalley SA, Brown D, Teo CG, et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 1456-1459.
- 10 Liaw YF, Leung NW, Chang TT, et al. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. Gastroenterology*, 2000, 119:172-180.
- 11 齐青松, 陈仕彬, 杨茜, 等. 拉米夫定治疗慢性乙肝的疗效及乙肝病毒 YMDD 变异的研究. *江西医学院学报*, 2005, 5:42-49.
- 12 颜明鹤, 张长, 凌乔, 等. 未经拉米夫定治疗的乙型肝炎病毒 YMDD 变异检测. *中华肝病杂志*, 2003, 7:430- 431.
- 13 张新华, 张跃新, 孙立茹, 等. 基因芯片技术在检测乙型肝炎病毒 P 区 YMDD 变异中的研究. *中华医学杂志*, 2003, 83: 459- 462.
- 14 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. *Hepatology*, 1998, 28:319A.
- 15 王磊, 闫杰, 张照华, 等. 血清 HBV-DNA 定量水平与拉米夫定抗 HBV 感染中 YMDD 变异的相关性研究. *中华肝脏病杂志*, 2004, 10:9-12.
- 16 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. *中西医结合病杂志*, 2005, 15:199-201.
- 17 王雪刚, 王战会, 马世武, 等. 乙型肝炎病毒基因型及亚型与 YMDD、前 C 和 C 基因启动子变异的关系. *肝脏*, 2007, 12: 95-98.
- 18 马明, 刘新钰, 张汉荣, 等. 慢性乙型肝炎患者在 YMDD 变异后停用及继续使用拉米夫定的临床后果分析. *实用肝脏病杂志*, 2004, 7:129-131.
- 19 Shaw T, Bowden S, Locarnini S. Rescue therapy for drug resistant hepatitis B: another argument for combination chemotherapy? *Gastroenterology*, 2004, 126:343-347.
- 20 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, et al. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut*, 2000, 46:562-568 .

(收稿日期:2007-11-06)

(本文编辑:温少芳)

张照华, 孟红. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(2):88-92.