

· 临床研究 ·

## 拉米夫定治疗 53 例 HBV 基因型对乙型肝炎患者 P 基因突变的影响\*

陈应华, 邱隆敏<sup>△</sup>, 陈 宇, 李 佳, 罗亚文, 林世德

(遵义医学院附属医院感染科, 贵州 563003)

**摘要:**目的 探讨 HBV 基因型与拉米夫定耐药者 P 基因突变的关系。方法 53 例慢性乙型肝炎(CHB)患者经拉米夫定治疗每天 100 mg,并于治疗前及治疗后 3、6、12、15、18、24 个月监测肝功能、HBV M、HBV DNA、HBV 基因型及 YMDD 变异。结果 (1)B 基因型占 56.60%(30/53),C 基因型占 41.51%(22/53);(2)在 CHB 重度及肝硬化病例中 C 基因型的检出率高于 B 基因型( $P < 0.05$ );(3)拉米夫定治疗后 C 基因型较 B 基因型更易发生 YMDD 变异( $P > 0.05$ );(4)B 基因型主要发生 rtM204I 位点突变(62.5%,5/8),而 C 基因型则主要发生 rtL180M/M204V 突变(77.78%,7/9)。结论 (1)遵义地区的 HBV 基因型主要由 B、C 基因型构成;(2)拉米夫定治疗后 C 基因型更易发生 YMDD 变异。

**关键词:**慢性乙型肝炎;拉米夫定;HBV 基因型;YMDD 变异

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.037

中图分类号:R512.62;R978.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3236-02

## Effect of Lamivudine therapy on P gene mutations in 53 patients with chronic hepatitis B

CHEN Ying-hua, QIU Long-min, CHEN Yu, et al.

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou 563003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the association between genotypes of HBV and gene P mutation in patients with resistance to Lamivudine. **Methods** 53 patients diagnosed as Chronic Hepatitis B(CHB) were treated by 100mg Lamivudin everyday, Liver function, HBV M, HBV DNA, HBV genotypes and YMDD variation were detected in prior treatment and the 3th, 6th, 12th, 15th, 18th, 24th month of post-treatment. **Results** (1) Genotype B was 56.6%(30/53), genotype C was 41.51%(22/53);(2) Detection rate of genotype C was higher than genotype B in severe Chronic Hepatitis B and hepatic cirrhosis cases( $P < 0.05$ );(3) YMDD variation was easier to find in genotype C than genotype B in patients treated by Lamivudin( $P > 0.05$ );(4) The main mutable site of genotype B was rtM204I(62.5%,5/8), and the mutation of genotype C was rtL180M/ M204V mainly(77.8%,7/9). **Conclusion** (1) HBV genotypes in Zunyi area are mainly composed by genotype B, C; (2) genotype C is easier to show YMDD variation after treatment by Lamivudin.

**Key words:** chronic hepatitis B; lamivudine; HBV genotype; YMDD mutation

拉米夫定(lamivudine)是一种核苷类似物,已广泛应用于慢性乙型肝炎(CHB)患者的抗病毒治疗,它作用于 HBV 多聚酶逆转录酶的活性部位酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)基序,抑制 HBV DNA 复制,显著降低 HBV DNA 载量,抗病毒效果显著。但长期使用会引起 YMDD 变异,从而导致临床耐药。YMDD 变异的检出率随拉米夫定用药时间的延长而增加,治疗 1、2、3、4 年的耐药率分别为 14%、38%、49%和 66%<sup>[1-2]</sup>。根据核苷酸全序列异源性大于 8%或 S 基因区序列差异大于 4%,可将 HBV 分为 A~H8 种基因型<sup>[3-4]</sup>,HBV 基因型的分布具有一定的地理特征,且与 HBV 感染后的临床表现、预后及抗病毒治疗应答均有密切联系。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2004 年 10 月至 2007 年 4 月本院就诊或住院的 53 例 CHB 患者,其中男 51 例,女 2 例;年龄 17~59 岁,汉族 49 例,仡佬族 3 例,土家族 1 例。全部病例均符合 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准<sup>[5]</sup>。所有患者均接受拉米夫定治疗 12~24 个月,并排除重叠感染 HAV、HCV、HDV、HEV、HIV 及妊娠、脂肪肝。血清采集时间为 2006~2007 年。

**1.2 血清 HBV DNA 检测** 53 例患者分别在口服拉米夫定

治疗前及治疗后 3、6、12、15、18、24 个月进行血清 HBV DNA 定量测定。仪器为罗氏荧光定量 PCR 仪(Lightcycler),试剂由深圳匹基公司提供,小于  $1 \times 10^3$  copy/mL 为阴性。操作方法严格按试剂说明书进行。

## 1.3 HBV 基因型及 YMDD 变异株的基因检测

**1.3.1 标本采集** 所有患者均在接受拉米夫定治疗前空腹采集肘静脉血 3 mL,4 h 内以 2 000 r/m 离心 15 min,吸取血清放于  $-20^\circ\text{C}$  保存待测,用于检测 HBV 基因型及 YMDD 变异株;经拉米夫定治疗 12~24 个月后,HBV DNA 定量下降后又反弹,且血清 HBV DNA 大于  $1 \times 10^4$  copy/mL,进行 YMDD 变异检测。

**1.3.2 引物设计** 上游引物:5'-CTA CTG TCT CAS CCA TAT CG-3',下游引物:5'-CCC AAT ACC ACA TCA TCC-3';YMDD 变异引物:5-CTC CAA TCA CTC ACC AAC-3';下游引物:5'GGG TTT AAA TGT ATA CCC A-3';由上海生物工程公司合成。

**1.3.3 聚合酶链反应(PCR)** HBV DNA 模板采用常规的碱裂解法提取。PCR 反应体系  $X_1$ 、 $X_2$  各 1  $\mu\text{L}$ (25 pmol/L),10 mmol 脱氧三磷酸核苷(dNTP)1  $\mu\text{L}$ ,25 mmol  $\text{MgCl}_2$  4  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,Taq 酶 2~2.5 u,加无菌去离子水至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:94  $^\circ\text{C}$  5 min,94  $^\circ\text{C}$  45 s,55  $^\circ\text{C}$  45 s,72  $^\circ\text{C}$  1 min,

\* 基金项目:贵州省卫生厅资助项目(D-235)。

35 个循环,72 °C 延伸 5 min。

**1.3.4 PCR 产物纯化** 按 Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒(QIA GEN 公司产品)说明书进行。

**1.3.5 ET 末端荧光标记测序** ET 末端标记测序试剂盒购自 Amersham Bioscience 公司,测序反应按试剂说明书进行,在 MegaBACETM 500 测序仪上测序,测序反应结束后,所得产物的 DNA 序列 DNASTART 序列分析软件分析,确定其基因型及 YMDD 变异情况。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析,率的比较用  $\chi^2$  检验及精确概率法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 HBV 基因型与其致病性的关系** 从表 1 可以看出,遵义地区的 HBV 基因型由 B、C 及 B+C 基因型构成,B 基因型占 56.60%(30/53),C 基因型占 41.51%(22/53),B+C 基因型 1.88%(1/53),未发现 A、D、E、F、G、H 基因型;HBV 基因型与其致病性的关系见表 1

表 1 HBV 基因型与其致病性的关系[n(%)]

项目	CHB 轻度	CHB 中度	CHB 重度	肝硬化
B 基因型	3/3(100)	20/29(68.96)	4/11(36.36)	3/10(30.00)
C 基因型	0(0)	8/29(27.58%)	7/11(63.63)	7/10(70.00)
P		<0.05	>0.05	>0.05

**2.2 拉米夫定治疗后 HBV 基因型与 YMDD 变异率的关系** 53 例 CHB 患者在拉咪夫定治疗 1~2 年后,在 HBV DNA 下降后又反弹的患者中经基因测序检出 YMDD 变异株 18 例(33.9%)。在 30 例 B 基因型患者中有 8 例(26.67%)发生 YMDD 变异,在 22 例 C 基因型患者中有 9 例(40.90%)发生 YMDD 变异。

**2.3 拉米夫定治疗后 HBV 基因型与 P 基因变异类型** 在 18 例经拉米夫定治疗后发生 YMDD 变异的患者中,P 基因突变形式有以下 4 种:rtL180 M/M204V 占 50%(9/18),rtL180M/M204I 占 22.22%(4/18),rtM204I 占 27.78%(5/18),rtL180M 占 5.5%(1/18)。rtM204V 联合 rtL180 M 变异发生率为 100%(9/9),rtM204I 变异联合 rtL180M 位点变异的发生率为 37.5%(3/8)。在拉米夫定治疗前有 1 例患者发生 P 基因变异,变异位点为 M204I。

**3 讨论**

HBV 基因型成一定地理区域性分布,我国北方以 C 型为主,南方以 B 型为主,D 型一般见于西藏、新疆、宁夏等少数民族地区<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,遵义地区的 HBV 基因型主要由 B、C 基因型构成,这与丁静娟等<sup>[7]</sup>报道的贵州地区的 HBV 基因型分布相似。

HBV 基因型是影响 HBV 感染者预后的重要因素之一,不同基因型,甚至同一基因型的不同亚型在毒力和临床表现上也有区别,是影响病情进展、预后及对治疗反应的重要因素。本研究结果显示,在 CHB 轻、中度患者中 B 基因型的检出率显著高于 C 基因型( $P < 0.05$ );而在 CHB 重度和肝硬化组中 C 基因型的检出率高于 B 基因型( $P > 0.05$ ,可能与病例数太少有关),提示 B、C 基因型在致病性方面存在差异,即 B 基因型较常见于轻型慢性肝病,而 C 基因型则较常见于较重的慢性肝病,以往有过相似报道<sup>[8-9]</sup>,究其原因可能是由于 C 基因型较 B 基因型更易发生基本核心启动子(basiccore promo-

tor,BCP)的突变(nt1762A→T 和 nt1764 G→A)。多元回归分析显示,BCP 变异与基因型、年龄( $\geq 35$ )和晚期肝病相关,更易发生肝功能失代偿,并与肝脏的炎症和纤维化有关<sup>[10-12]</sup>。不同基因型对肝损伤严重程度的差异可能与基因本身的序列特异性有关<sup>[11]</sup>。

随着拉米夫定在临床的广泛使用,其耐药问题日益受到关注,而且耐药率随着用药时间的延长逐渐升高。目前认为,HBV 对拉米夫定耐药性的产生与 HBV P 基因变异有关,并且 HBV P 基因变异是多位点的,以 C 区 YMDD 基序的变异最为重要。YMDD 变异的发生与许多因素有关,病毒基因型可能是影响因素之一。本研究结果显示,C 基因型 YMDD 变异的发生率高于 B 基因型(差异无统计学意义,有待于扩大样本进一步研究),进一步证明基因型可能与 YMDD 变异的发生有关。通过对遵义地区 53 例拉米夫定耐药的 CHB 患者血清 HBV P 基因 RT 区基因序列的分析,发现变异类型有 4 种,提示在拉米夫定耐药者体内存在 P 基因区不同位点的变异,且联合变异率较高。本研究还显示,HBV 基因型还与 P 基因突变类型有关,B 基因型主要发生 YIDD 变异占 62.5%(5/8),而 C 基因型则主要发生 YVDD 变异为 77.78%(7/9)。

通过对 53 例患者在拉米夫定治疗前进行 P 基因测序发现有 1 例患者发生 P 基因变异,变异位点为 M204I,提示在拉米夫定使用以前,YMDD 变异株可能是自然存在的。一般认为,YMDD 变异株毒力较野生株弱,致病力不强,体外研究表明变异株的复制能力大大低于野生株。在患者服用拉米夫定后,一种情况是药物诱导野生株产生变异;另一种是野生株的复制被药物抑制,而少量与野生株共生的具有耐药能力的 YMDD 变异株就逐渐成为了优势株,甚至完全取代野生株,从而造成患者对拉米夫定的耐受,治疗无效。因此,拉米夫定治疗有可能是起到一定的选择作用,经过治疗选择作用后变异株成为优势株,表明抗病毒药物压力不是导致 YMDD 变异的惟一因素。这种自然存在的 YMDD 变异株的流行病学、与野生株的比例关系、致病性等均有待进一步的研究。

**参考文献:**

[1] 刘庄.乙型肝炎病毒变异与耐药[J].继续医学教育,2006,20(7):22.  
 [2] Lok AS,McMahon BJ. Chronic hepatitis B; Update of recommendations[J]. Hepatology,2004,39(3):857.  
 [3] Stuyver L,De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol,2000,81:67.  
 [4] Aragz-Ruy P, Narder H, Robertson BH, et al. A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in central America1[J]. J Gen Virol,2002,83:2059.  
 [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56.  
 [6] Xia G, Omana VN, Jia Z, et al. Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China[J]. Chin J Epidemiol, 2001, 22(5): 348.  
 [7] 丁静娟,彭亮,张权,等.贵州侗族、苗族和汉族人群乙型肝炎病毒基因型分布[J].中华实验和临床病毒学杂志,2004,18(3):230.  
 (下转第 3239 页)

每组根管数目不同, A 组 62 个, B 组 71 个。两组间患者的性别、年龄差异无统计学意义。

**2.2 检测结果** A、B 两组患者每个根管充填时间见表 1, 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。A、B 两组患者根管充填情况见表 2, 两组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。A、B 两组患者充填后 3、6 个月及 1 年复诊, 从远期效果来看, 见表 3, A 组与 B 组患者的 3、6 个月及 1 年的治愈率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**表 1 A、B 两组患者根管充填时间比较**

组别	根管数目(个)	充填时间( $\bar{x} \pm s$ )
A 组	62	145.9 ± 14.3
B 组	71	95.6 ± 17.8*

\*:  $P < 0.05$ , 与 A 组比较。

**表 2 A、B 两组患者根管充填情况比较(个)**

组别	根管数	超填	适填	欠填
A 组	62	2	58	2
B 组	71	1	68	2*

\*:  $P > 0.05$ , 与 A 组比较。

**表 3 A、B 两组患者根管充填治疗情况比较**

组别	3 个月		6 个月		1 年	
	正常	不适治愈率(%)	正常	不适治愈率(%)	正常	不适治愈率(%)
A 组	33	97.1	33	97.1	32	94.1
B 组	37	100.0*	36	97.3*	36	97.3*

\*:  $P > 0.05$ , 与 A 组比较。

### 3 讨论

根管治疗的重要条件之一是恰当的根管充填, 为根周组织的康复提供良好的生物环境。现在已经公认的根管充填的主要目标是封闭根管系统, 防止细菌进入根管系统造成根管再感染和组织液进入根管成为残余细菌的培养基, 为根管的感染和再感染提供一个防护屏障。根管充填不恰当可导致根管治疗失败, 据报道根管治疗失败率约为 58%, 而根管充填的恰当与否又直接受根管充填材料和方法的影响<sup>[5]</sup>。0.02 锥度与 0.06 锥度牙胶尖在充填材料上有着相同的杀菌、填充作用, 根据临床实验统计, 二者对同一锥度根管的充填差异主要体现在充填时间上, 在 1 年后的治愈率上差别不明显。临床效果一般应至少追踪观察 2 年, 或更长时间, 1 年以内的疗效, 只能作为初步观察的结果, 不足以确定真正疗效。

对根管进行充填时, 2 名患者陈述有钝性胀痛感, 这种胀痛在进行侧方加压时明显, 当拔出侧方加压器时, 钝性胀痛消失, 这可能与进行侧方加压时根管内气压的变化有关。超填和欠填影响牙髓病和根尖周病变的愈合, 这在临床上是应极力避免和挽回的。

Hembrough 等<sup>[6]</sup>用 0.06 ProFile 预备单根管后用不同锥度的主牙胶尖充填根管, 比较侧方加压充填的质量和效率, 结果显示, 0.06 锥度牙胶尖充填根管比 0.02 锥度的牙胶尖所需的副牙胶尖少, 效率高, 但充填质量没有差异。根管充填的封闭性是根管治疗成功的关键之一, 王戎机和高承志<sup>[7]</sup>用透明标本法配合染料渗透技术测量离体双尖牙根尖染料的线性渗漏长度, 实验证明冷牙胶侧方加压充填时大锥度牙胶尖能取得较好的根尖封闭性能。

本实验所观察牙距有单根牙, 又有多根牙, 不同牙位根管充填时间不同, 在病例的选择上如果挑选直根管、单根管或同位牙进行实验, 可以提高实验结果的可比性。

### 参考文献:

- [1] Wilson BL, Baumgartner JC. Comparison of spreader penetration during lateral compaction of 0.04 and 0.02 tapered gutta-percha[J]. J Endod, 2003, 29(12): 828.
- [2] 赵莉琳, 向学熔. Root ZX 根管测量仪与三联法对根管充填质量的比较研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(4): 406.
- [3] Imfeld TN. Prevalence and quality of Endodontic treatment elderly urban population of Swithland[J]. J Endod, 1991, 17(12): 604.
- [4] Wollard RR, Brounch SO, Maggio J, et al. Scanning electron microscopic examination of root canal filling materials[J]. J Endod, 1976, 2: 98
- [5] 樊文明. 牙体牙髓病学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 264.
- [6] Hembrough MW, Steiman HR, Belanger KK. Lateral condensation in canals prepared with nickel titanium rotary instruments: an evaluation of the use of three different master cones[J]. J Endod, 2002, 28(7): 516.
- [7] 王戎机, 高承志. 不同锥度牙胶尖冷侧方加压对根尖封闭性能的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(25): 4879.

(收稿日期: 2010-06-20 修回日期: 2010-07-29)

(上接第 3237 页)

- [8] 秦波, 陈秋云, 黄爱龙, 等. 慢性重型肝炎患者乙型肝炎病毒 C 基因变异的初步研究[J]. 重庆医学, 2004, 33(5): 729.
- [9] 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): 250.
- [10] 陈林, 盛吉芳. 乙型肝炎病毒基因型与临床病情进展的关系[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005(32): 6: 359.

- [11] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2000, 118: 554.
- [12] Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance[J]. J Hepatol, 2000, 33: 469.

(收稿日期: 2010-07-06 修回日期: 2010-08-05)