

家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异的调查

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王 台, 任迎全

■背景资料

临床上应用核苷类似物(特别是拉米夫定)进行抗HBV治疗之后易出现HBV P基因的YMDD变异,但HBV P基因也可发生未经抗病毒治疗情况下的YMDD自然变异。主要是由于HBV在复制过程中要经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV聚合酶逆转录功能区的指导下完成的,由于HBV聚合酶逆转录功能区不具有校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率。

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王台, 任迎全, 延安大学附属医院感染病科 陕西省延安市 716000

延安市科技计划基金资助项目, No. 2007

作者贡献分布: 屈军校与曾庆磊对此文所作贡献均等; 本文由屈军校、徐光华及任迎全设计; 实验操作由冯继红与曾庆磊完成; 部分病例资料由刘志刚、赵培东、高晓红及王台提供; 数据分析和论文写作由曾庆磊完成。

通讯作者: 徐光华, 教授, 主任医师, 716000, 陕西省延安市, 延安大学附属医院感染病科. yaxugh@yahoo.com.cn

电话: 0911-2881196

收稿日期: 2010-04-25 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-28

Spontaneous HBV YMDD motif mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Zhi-Gang Liu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Pei-Dong Zhao, Xiao-Hong Gao, Tai Wang, Ying-Quan Ren

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Zhi-Gang Liu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Pei-Dong Zhao, Xiao-Hong Gao, Tai Wang, Ying-Quan Ren, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Yan'an, No. 2007

Correspondence to: Professor Guang-Hua Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. yaxugh@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-25 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-28

Abstract

AIM: To survey the spontaneous hepatitis B virus (HBV) YMDD mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection.

METHODS: Ninety-five chronic hepatitis B (CHB) patients, who came from 34 CHB cluster families and did not underwent treatment with any antiviral drugs, and 82 sporadic CHB patients, who did not underwent treatment with any antiviral drugs, were included in this study. YMDD mutations were detected and compared between the two groups of patients.

RESULTS: Of the 95 patients with familial clus-

tering of chronic HBV infection, spontaneous YMDD variants were detected in 51 patients (53.68%). Of the 82 sporadic CHB patients, YMDD variants were detected in 21 patients (25.61%). The detection rate of spontaneous YMDD mutations was significantly higher in CHB patients with familially clustering than in sporadic CHB patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The detection rate of spontaneous YMDD mutations is higher in CHB patients with familially clustering than in those without familially clustering.

Key Words: Chronic hepatitis B; Familial clustering; Spontaneous YMDD motif mutation

Qu JX, Zeng QL, Liu ZG, Xu GH, Feng JH, Zhao PD, Gao XH, Wang T, Ren YQ. Spontaneous HBV YMDD motif mutations in patients with familially clustered chronic HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(24): 2604-2607

摘要

目的: 探讨家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异发生情况以及影响其变异的因素。

方法: 筛选34个共95例有乙型肝炎家庭聚集现象且未经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者作为家庭组, 进行YMDD检测; 随机选择82例无乙型肝炎家庭聚集现象且未接受过抗病毒治疗的CHB患者作为对照组, 进行YMDD检测。

结果: 家庭组95例中有51例(53.68%)检测到YMDD自然变异, 对照组82例中有21例(25.61%)检测到YMDD自然变异; YMDD自然变异检出率有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 有乙型肝炎家族聚集史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家族聚集史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高。

关键词: 慢性乙型肝炎; 家庭聚集性疾病; YMDD自

■同行评议者

陈志辉, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科

自然变异

屈军校, 曾庆磊, 刘志刚, 徐光华, 冯继红, 赵培东, 高晓红, 王台, 任迎全. 家庭聚集性慢性HBV感染者HBV YMDD自然变异的调查. 世界华人消化杂志 2010; 18(24): 2604-2607
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2604.asp>

0 引言

临床上应用核苷类似物(nucleoside analogue, NUC)(特别是拉米夫定)进行抗HBV治疗之后易出现HBV聚合酶(polymerase, P)基因的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异, 但HBV P基因也可发生未经抗病毒治疗情况下的YMDD自然变异. 本研究对34个有乙型肝炎家庭聚集现象的家庭且未经抗病毒治疗的95例HBV感染者和无乙型肝炎家庭聚集现象也未接受过抗病毒治疗的82例患者进行YMDD检测, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 筛选2006-05/2009-10在延安大学附属医院感染病科就诊有乙型肝炎家庭聚集现象的34个家庭中未经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者95例为家庭组; 并随机选择82例无乙型肝炎家庭聚集现象且未接受过抗病毒治疗的CHB患者为对照组. 两组患者的诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南》(2005年版)^[1].

1.2 方法 采集患者外周血, 检测HBV血清学标志物定量、HBV YMDD变异. HBV血清学标志物定量检测采用美国PE公司1235全自动时间分辨荧光免疫分析系统进行, 乙型肝炎五项时间分辨荧光诊断试剂盒购自苏州新波生物技术有限公司; YMDD变异检测采用美国PE公司GeneAmp5700型荧光PCR检测仪进行, HBV YMDD基因突变诊断试剂盒(PCR荧光法)购自上海克隆生物高技术有限公司.

其中HBV YMDD变异检测的基础是核酸序列分析, 这种直接测序是HBV测序的经典方法. 大部分测序的基本原理均采用Sanger发明的双脱氧DNA链末端终止法. 其基本原理为: DNA链在进行复制时, 在DNA P作用下以互补单链DNA为模板, 以带有3'-OH末端的单链寡核苷酸为引物, 不断地将4种dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)加到新生链的3'-OH末端, dNTP为单脱氧核糖核酸, 即脱去了第二位C原子上的氧原子, 而第三位C原子上的氧原子能够与另一

表 1 34个家庭亲子两代HBV感染情况 (n)

	家庭数	子女感染	合计
仅母亲感染	21	38	59
仅父亲感染	4	10	14
父母未感染	9	22	22
合计	34	70	95

dNTP第五位C原子上的磷酸基团形成3'、5'磷酸二酯键, ddNTP的第三位C原子上的氧原子也被脱去, 这样在DNA合成过程中, 他能够与正常核苷酸形成磷酸二酯键, 但由于其3'-OH中氧原子的脱去而不能与下一个核苷酸形成3'、5'磷酸二酯键, 延伸中的DNA链被终止. 所以在进行DNA延伸时当dNTP掺入时, 链能够继续延伸, 而当ddNTP掺入时, 链被终止, 由于ddNTP的掺入是随机的, 能够发生在链延伸的任何一点, 这样便形成相差仅一个碱基的大小不等的一系列DNA片段, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影后即可读出所测DNA的序列.

统计学处理 采用t检测和卡方检验, 并采用SPSS17.0统计软件包进行分析.

2 结果

2.1 34个家庭亲子两代HBV感染 家庭组的34个家庭共95人感染HBV, 21个家庭仅母亲感染HBV而父亲没感染HBV, 有子女38人感染HBV. 4个家庭仅父亲感染HBV而母亲没感染, 有子女10人感染HBV. 9个家庭父母双方都没感染HBV, 有子女22人感染HBV. 家庭组的平均年龄为34岁±5.78岁, 对照组的平均年龄为36.5岁±6.84岁(表1).

2.2 34个家庭亲子两代HBV感染者YMDD阳性分布 21例仅母亲为慢性HBV感染者中有12例母亲为YMDD阳性, 这12例母亲为YMDD阳性的23例HBV感染的子女中有20例为YMDD阳性; 其他9例YMDD阴性母亲的15例子女中有4例为YMDD阳性. 4例仅父亲为慢性HBV感染者中有2例父亲为YMDD阳性, 2例父亲为YMDD阳性的4例慢性HBV感染子女中2例为YMDD阳性; 其他2例为YMDD阴性. 2例父亲为YMDD阴性的6例子女中有2例为YMDD阳性, 此2例YMDD阳性患者处于一个家庭. 父母均未感染HBV的9个家庭22例患者中9例患者为YMDD阳性, 其中有3个家庭有2例及其以上YMDD阳性患者(2家有YMDD阳性患者各2例, 1家有YMDD阳性

■研发前沿

YMDD的变异和自然变异与血清病毒载量等有一定的关系. HBV自然变异可能会对抗病毒治疗有一定的影响, 在应用NUC抗病毒治疗前检测YMDD变异有重要意义, 但目前检测YMDD自然变异尚没有一个公认统一的标准.

■相关报道

HBV变异主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD, 即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V), 在抗病毒药物的压力下变异率可能更高, 从而影响抗病毒的疗效. HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战.

■创新盘点

本研究对有乙型肝炎家庭聚集现象且未经抗病毒治疗的HBV感染者和无乙型肝炎家庭聚集现象也未接受过抗病毒治疗的HBV感染者进行YMDD检测,结果经统计学处理,得出了部分阳性结论。

表 2 34个家庭亲子两代HBV感染者YMDD(+)分布状况 (n)

	n	HBV感染 子女	子代中 YMDD(+)	亲代中 YMDD(+)
母亲YMDD阳性	12	23	20	12
母亲YMDD阴性	9	15	4	0
父亲YMDD阳性	2	4	2	2
父亲YMDD阴性	2	6	2	0
父母未感染家庭	9	22	9	0
合计	34	70	37	14

患者3例),有2个家庭各有1例YMDD阳性患者(表2)。

2.3 两组YMDD变异分布状况 本研究中家庭组95例共有51例(53.68%)检测到YMDD自然变异,对照组82例共有21例(25.61%)检测到YMDD自然变异(表3);YMDD自然变异检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。家庭组95例研究对象中有女性42例,YMDD阳性患者23例(54.76%);53例男性中有28例(52.83%)YMDD变异阳性;男女比例差异无统计学意义($P>0.05$)。95例家庭组研究对象中有HBeAg阳性患者64例,其中YMDD阳性患者35例(54.69%);另外31例HBeAg阴性患者有16例(51.61%)YMDD阳性;HBeAg的状态对YMDD的自然变异检出率无显著影响($P>0.05$)。家庭组95例研究对象中有HBV携带者36例,其中19例(52.78%)YMDD阳性;有CHB 32例,其中17例(53.12%)YMDD阳性;有乙型肝炎肝硬化27例,其中15例(55.56%)YMDD阳性;CHB的进展状态对YMDD的自然变异检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。

12例母亲为YMDD阳性的23例HBV感染的子女中有20例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为86.96%;其他9例YMDD阴性母亲的15例子女中有4例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为26.67%;两组比较YMDD的自然变异检出率有统计学差异($P<0.05$)。2例父亲为YMDD阳性的4例慢性HBV感染子女中2例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为50%;其他2例为YMDD阴性父亲的6例子女中有2例为YMDD阳性,子代的YMDD自然变异率为33.33%;两组比较YMDD的自然变异检出率有统计学差异($P<0.05$)。

3 讨论

本研究家庭组的样本是来自有CHB家庭背景的患者,之所以没把样本收集扩大到有家族背景

表 3 家庭组 and 对照组YMDD变异分布状况 (n)

分组	n	变异	YMDD(V)	YMDD(I)	YMDD(V+I)
家庭组	95	51	16	7	28
对照组	82	21	5	4	12

的患者,主要考虑到病史追溯较为困难、范围较大、不便操作等原因。

由上述结果可见有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家聚史的慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高($P<0.05$),我们还发现亲代已有YMDD自然变异的患者其子女的YMDD自然变异率要高于亲代没有YMDD自然变异的患者($P<0.05$),这方面国内鲜有报道。患者性别、HBeAg状态、CHB的进展状态对YMDD自然变异检出率无显著影响(均 $P>0.05$),本结论与国内相关报道一致^[2,3]。

CHB是我国最主要的慢性肝炎类型,其主要的治疗方法是抗病毒治疗。目前抗HBV的药物主要有两大类,一类是干扰素(interferon, IFN),另一类是NUC。IFN的疗效相对确定,但不良反应相对多见,且一般不用于某些特殊病情(如失代偿期肝硬化)。NUC使用方便、价格相对低廉、疗效相对确切且耐受性较好,其中拉米夫定目前在临床上应用最广。但长期使用NUC可导致HBV变异并对其产生耐药性。主要是由于HBV在复制过程中要经过一个逆转录过程,经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV P的指导下完成的,由于HBV P缺乏校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率^[4],且每24 h可以产生 $3.2 \times (10^{10} - 10^{11})$ 含有单位点突变的HBV DNA^[5]。最常见的是HBV P基因的YMDD区域发生变异,主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD,即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V),在抗病毒药物的压力下变异率可能更高^[6],从而会影响抗病毒的疗效。HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战。近年来HBV基因诊断技术不断进步,目前已有多种较为敏感的YMDD变异检测试剂盒,使得对CHB患者YMDD自然变异毒株的检测成为可能^[7,8]。

在应用NUC(特别是拉米夫定)之后易出现HBV P基因的YMDD变异,实际上有些患者体内HBV变异株与野生株共存,只是野生株占优势,不易被一般检测方法检测,长期的药物作用抑制了野生株的复制,此时耐药的变异株成了

■应用要点

本研究发现有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率较没有乙型肝炎家聚史慢性HBV感染者的YMDD自然变异率高,对临床乙型肝炎抗病毒治疗药物的选择有实际指导意义。

优势株, 临床上就会表现出耐药^[9]. 近年日本学者检测18例未经拉米夫定和其他抗病毒药物治疗的HBV无症状携带者, 且ALT保持正常范围1年以上, 结果发现有5例发生了YMDD变异, 证明了HBV无症状携带者YMDD变异是自然存在的^[10,11]. 韩国学者^[12]报道40例未经拉米夫定治疗的乙型肝炎患者中发现有3例患者出现YMDD基因序列变异, 变异率为7.5%. 研究还发现肝硬化患者中也存在YMDD自然变异的现象, 变异率为26.41%^[3]. 以上主要是东亚的报道, 而伊朗学者发现没有接受拉米夫定治疗的CHB患者YMDD变异率为0%^[13].

研究发现YMDD自然变异毒株的检出率为10%-30%^[10,14], 本研究中对对照组的检出率为25.61%, 与该结论相符. 需要指出的是我们测出的YMDD基序自然变异的病例, 是变异株占总病毒量9%以上的病例, 这主要是受该试剂盒对变异株检出效能的限制. 有报道显示变异株占总病毒量5%以上者可出现表型耐药^[15], 由此可以推测本研究中检出的YMDD自然变异病例均有可能对拉米夫定产生表型耐药. 在抗病毒治疗前检测是否存在YMDD自然变异, 对于合理制定抗HBV治疗方案具有重要参考价值.

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431
- 2 霍红, 赵书民, 蔡雄, 缪晓辉. YMDD自然变异毒株流行病学调查. 肝脏 2006; 11: 232-234
- 3 屈军校, 刘蓉, 任迎全, 冯继红. 乙型肝炎肝硬化发生HBV YMDD自然变异的探讨. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 116-117
- 4 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 5 Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, Dény P, Zoulim F. In vitro characterization of viral fitness of therapy-resistant hepatitis B variants. *Gastroenterology* 2009; 136: 168-176.e2
- 6 Conzelmann I, Wintermeyer P, Wirth S, Radke R, Gerner P. Complete hepatitis B virus genome analysis in chronically infected children before and during lamivudine treatment. *J Med Virol* 2005; 77: 194-202
- 7 Sablon E, Shapiro F. Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *Int J Med Sci* 2005; 2: 8-16
- 8 Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, Wang Y. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1353-1357
- 9 Kobayashi S. Clinical characteristics of asymptomatic hepatitis B virus carriers with YMDD mutant not treated with lamivudine. *Kurume Med J* 2003; 50: 87-90
- 10 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 11 Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, Sayiner AA, Topalak O, Akpinar H, Abacioglu YH. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1783-1788
- 12 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. [Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients] *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 13 Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, Aghakhani A. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 252-255
- 14 颜鸣鹤, 张长, 凌乔, 周仁芳. 未经拉米夫定治疗的乙型肝炎病毒YMDD变异检测. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 430-432
- 15 拉米夫定临床应用专家组. 2004年拉米夫定临床应用专家共识. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 425-428

■同行评价

本文选题具有一定创新性, 研究方法恰当, 具有较显著的临床流行病学意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才