

HBV 聚合酶活性区变异与临床病情变化及 HBsAg 阳性相关性

夏 红,杨 强*

(重庆市大足区人民医院感染科,重庆 402360)

摘 要: 研究乙型肝炎病毒(HBV)聚合酶活性区变异与临床病情变化及乙肝表面抗原(HBsAg)阳性的相关性。290 例慢性乙型肝炎患者,HBV 聚合酶活性区变异 140 例,其余无变异;分析 HBV 聚合酶活性区变异与肝功能及 HBsAg 阳性表达的关系。变异组患者的天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALB)和总胆红素(TBIL)肝功能指标水平显著高于无变异组($P<0.05$);变异组肝细胞内 HBsAg 阳性率显著低于无变异组($P<0.05$);变异组 HBsAg 以浆核型为主,约占阳性表达患者的 47.25%,无变异组以核型为主,约占阳性表达患者的 46.15%,两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。HBV 聚合酶活性区变异的乙肝患者临床病情更重,HBV 表面抗原阳性表达比例低。

关键词: 乙型肝炎病毒聚合酶; 临床病情; 乙型肝炎病毒表面抗原; 相关性

中图分类号: R512.62

文献标识码: A

我国是乙型肝炎高发国,HBV 反复、持续感染是一系列肝脏疾病的危险因素,包括肝炎性、肝硬化、肝癌等^[1]。目前,抗病毒治疗是防止乙肝发展为肝硬化、肝癌的主要疗法;核苷酸类药物如拉米夫定可以通过抑制 HBV DNA 复制,从而有效治疗 HBV 感染,而且是主要的抗病毒药物^[2]。研究显示,治疗可以显著改善 HBV 感染患者的临床、生化和病毒学等指标,且使肝组织炎性坏死等病理损害明显好转^[3]。但研究显示,拉米夫定络氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine methionine aspartate aspartate, YMDD)变异率随着抗病毒治疗时间延长而逐渐增高^[4],并认为这些变异可能是治疗失败或产生耐药性的原因^[5]。本文研究 HBV 聚合酶 YMDD 变异与乙型肝炎临床病情变化及 HBsAg 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 至 2016 年间在本院就诊的慢性乙型肝炎患者 290 例,均符合 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》慢性乙型肝炎诊断标准^[6]。其中男 196 例,女 94 例,年龄 17~76 岁,平均年龄(47.5 ± 13.7)岁。无症状携带者(asymptomatic carriers,

ASC)56 例,急性肝炎(acute hepatitis, AH)55 例,慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)68 例,肝硬化(cirrhosis of liver, LC)53 例,重型肝炎(severe hepatitis, SH)31 例,原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)27 例。患者接受拉米夫定治疗 12~48 月,平均(31.5 ± 6.5)个月。分别于治疗前及治疗中每 4~6 月抽取患者外周血,分离血清,−70℃ 储存,待测。

1.2 试剂

使用 ABI 7700 荧光 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司)、乙型肝炎病毒核酸扩增(polymerase chain reaction, PCR)荧光定量试剂盒及 YMDD 变异检测试剂盒(广州市达晖生物技术有限公司)测定缬氨酸突变型(tyrosine valine aspartate aspartate, YVDD)对照品、异亮氨酸突变型(tyrosine isoleucine aspartate aspartate, YIDD)突变类型;使用人乙肝表面抗原(HBsAg)Elisa 试剂盒(上海广锐生物科技有限公司)测定 HBsAg。

1.3 实验方法

1.3.1 HBV 变异检测 (1)样本处理:取 50 μL 待测血清标本、阴性血清对照品、强阳性和临界阳性于 1.5 mL 离心管中,分别加入 50 μL 核酸提取液,混匀,2 000 rpm 离心 10 s,100℃ 水浴 10 min,12 000 rpm 离心 10 min,取上清,−20℃ 保存,待测。(2)上样:在 HBV 反应混合液 A 的反应管中分别加入 4 μL 的阴性对照、强阳性对照、临界阳性对照、待检测样品处理上清液、HBV 定量标准品。在 HBV

反应混合液 B 和 C 的反应管中分别加入 4 μ L 的强阳性对照、待检测样品处理上清液、YVDD 对照品、YIDD 对照品。盖紧反应管,转移至检测区。(3) PCR 扩增及荧光检测:反应管置于 PCR 仪上进行扩增,扩增条件:37 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 20 s, 62 $^{\circ}$ C 60 s,循环 40 次,荧光检测。(4) 结果分析:如果样品的反应混合液 B 检测阴性,反应混合液 C 检测阳性,则可判定该样品为 YIDD 突变株。如果样品的反应混合液 B 检测阳性,反应混合液 C 检测阴性,则可判定该样品为 YVDD 突变株。如果样品的反应混合液 B 检测阴性,反应混合液 C 检测阴性,则可判定该样品为野生型株。如果样品的反应混合液 B 检测阳性,反应混合液 C 检测阳性,则判定该样品为 YVDD、YIDD 共生株。

1.3.2 生化指标检测 使用全自动生化检测仪检测血清 AST、ALT、ALP 和 TBIL 表达水平。

1.3.3 HBsAg 检测 抽取患者静脉血,收集血清。设置空白孔和待测样品孔。待测样品孔中依次加入 40 μ L 样品稀释液、10 μ L 待测样品,轻摇混匀,37 $^{\circ}$ C $\times$ 30 min,洗板 5 次;加入 50 μ L 酶标试剂,37 $^{\circ}$ C $\times$ 30 min,洗板 5 次;依次加入显色剂 A 和 B 各 50 μ L,轻摇混匀,避光 37 $^{\circ}$ C $\times$ 15 min,终止反应;以空白孔调零,依序测量各孔吸光度(450 nm);绘制标准曲线,代入样品 OD 值计算出浓度,再乘以稀释倍数,即实际浓度。空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同。

肝穿刺:患者取仰卧位,穿刺点位于右侧腋中线第 8 和第 9 肋间、肝实音处穿刺,局部皮肤消毒,肝被膜用 2% 利多卡因局部麻醉,三棱针刺孔,由刺孔刺入穿刺针,注射器推出 0.5 ~ 1.0 cm 防止针头堵塞,注射器抽成负压并保持,叮嘱患者吸气,深呼吸末屏住呼吸,将穿刺针刺入肝内并抽出,生理盐水冲出肝组织条,10% 甲醛固定送检。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验,计数资料以例(%)表示,两两比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般情况分布特征

病毒变异组和无变异组的性别、年龄、病程、乙肝疫苗接种史和 HBV 家族感染史等一般临床资料相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 患者一般情况特征分布

	病毒变异组 ($n=140$)	病毒无变异组 ($n=150$)	χ^2	P
性别(男/女)	100/40	101/49	0.571	0.450
平均年龄(岁)	47.1 $\pm$ 13.2	48.3 $\pm$ 14.8	0.727	0.468
乙肝疫苗接种史 (有/无)	37/103	43/107	0.182	0.670
HBV 家族感染史 (有/无)	13/127	18/132	0.559	0.455

2.2 病毒变异与患者病情分布的关联

病毒变异组与无变异组的病情分布差异有统计学意义($P < 0.05$);病毒变异组患者的肝功能指标表达水平与无变异组差异有统计学意义($P < 0.05$),病毒变异组 AST、ALT、ALB 和 TBIL 水平显著高于无变异组。见表 2。

表 2 两组患者病情分布特征

	病毒变异组 ($n=140$)	病毒无变异组 ($n=150$)	t/χ^2	P
病情(例,%)				
ASC	35(25.00)	21(14.00)	5.623	0.018
AH	31(22.14)	24(16.00)	1.778	0.182
CHB	30(21.43)	38(25.33)	0.615	0.433
LC	23(16.43)	30(20.00)	0.618	0.432
SH	12(8.57)	19(12.67)	1.272	0.259
PHC	9(6.43)	18(12.00)	2.662	0.103
肝功能				
AST(U/L)	117.38 $\pm$ 39.63	76.68 $\pm$ 54.37	7.242	0.000
ALT(U/L)	51.45 $\pm$ 42.71	40.16 $\pm$ 16.51	4.006	0.000
ALB(g/L)	72.58 $\pm$ 6.37	65.53 $\pm$ 5.26	10.304	0.000
TBIL(μ mol/L)	53.18 $\pm$ 7.95	41.62 $\pm$ 7.18	13.010	0.000

2.3 病毒变异与无变异患者 HBsAg 阳性率及表达方式对比

变异组 140 例患者中,肝细胞内 HBsAg 表达阳性 104 例,阳性率为 74.29%,无变异组 150 例患者中,肝细胞内 HBsAg 表达阳性 91 例,阳性率为 60.67%,变异组显著高于无变异组($\chi^2 = 4.541$, $P = 0.033$)。变异组的 HBsAg 表达方式主要以浆核型为主,约占阳性表达患者的 47.25%,无变异组的表达方式主要以核型为主,约占阳性表达患者的 46.15%,两组表达方式差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 病毒变异与患者 HBsAg 阳性率及表达方式

	病毒变异组 (n=140)	病毒无变异组 (n=150)	χ^2	P
HBsAg(+)	91(65.00)	79(52.67)	4.541	0.033
表达方式			17.21	0.000
浆型	28(20.00)	33(22.00)		
核型	20(14.29)	48(32.00)		
浆核型	43(30.71)	23(15.33)		

3 讨 论

HBV DNA 复制起始于蛋白启动的逆转录机制, HBV 聚合酶蛋白在其中发挥关键作用^[7];但由于 HBV 聚合酶缺乏 3'~5'校对能力,发生核苷酸替代变异后难以修正,所以 HBV 是一个高度变异的病毒,而这些突变以准种的形式存在于体内,病毒准种的进化依赖于抗病毒药物、免疫应答、复制适用性等为更强适用性的变异株提供复制空间^[8];与野生株相比,HBV 突变株在没有药物压力下复制能力较低,但抗病毒药物治疗可以改变宿主机体内环境,使变异株的复制适用性超过野生株。一段时间后,野生株感染的肝细胞以细胞更新的方式被清除,并取代以未感染的细胞,而未被感染的细胞很容易被变异株感染^[9]。研究显示,HBV 的变异与 HBV P 蛋白 YMDD 基因序列突变有关^[10]。

本文研究发现,与未变异组相比,病毒变异组的病情分布差异有统计学意义。变异组患者的肝功能指标,如 AST、ALT、ALB 和 TBIL 的表达水平显著升高。ALT 和 AST 主要存在于肝细胞线粒体中,是肝脏损伤的重要血清标志物。变异组升高更加明显,其原因可能与 YMDD 变异后,治疗药物对变异的 HBV 失去原有的治疗作用有关,从而使变异株病毒滴度升高,更多的病毒颗粒作用于肝细胞,肝细胞病理状态进一步恶化,病情加重^[11]。同时,本文研究还发现,病毒变异组患者 HBsAg 表达阳性率显著低于无变异组。HBsAg 是 HBV 病毒复制过程中产生的重要病毒蛋白,其在病毒对宿主的黏附及 HBV 持续感染和发病机制方面均有重要作用^[12]。研究表明,HBsAg 是机体特异性细胞毒性 T 淋巴细胞攻击的主要靶抗原,其在肝组织内的表达水平,反应 HBV 患者机体免疫水平和 HBV 复制之间的平衡,临床上通常把 HBsAg 的表达作为 HBV 复制的重要标志,能反映肝脏的炎症活动度和纤维化程

度,而非活动性病毒复制阶段多表现为阴性^[13]。研究表明,机体免疫应答增强并启动对 HBV 清除,继而攻击并大量破坏被 HBV 感染的肝细胞,肝组织发生纤维化及坏死等,正常肝细胞不断减少,肝细胞内 HBV 病毒颗粒不断减少,导致 HBsAg 水平不断降低^[14]。研究发现,肝细胞内 HBsAg 的表达形式有胞浆型、胞核型、浆核型 3 种,其表达方式与 HBV 感染的不同时期有关^[15]。慢性 HBV 感染的自然史分为免疫耐受期、免疫清除期、非活动携带状态机再活动期 4 个阶段^[16]。早期免疫耐受期 HBsAg 在肝细胞内的表达以核型为主,此时肝脏很少或没有炎症活动,多见于儿童和青年人;而在免疫清除阶段,HBsAg 在肝细胞内的表达以浆型和/或浆核型为主,多见于活动型肝炎患者^[17]。本文研究显示,变异组的 HBsAg 表达形式主要是浆核型,约占阳性表达患者的 47.25%,而无变异组的 HBsAg 表达方式主要以核型为主,约占阳性表达患者的 46.15%,两组 HBsAg 表达方式差异有统计学意义。

本文研究结果提示,HBV 聚合酶 YMDD 变异的乙肝患者临床病情更重,HBV 表面抗原阳性表达比例低。

致谢:感谢我院、感染科的相关医护人员及入院患者对本研究的支持。

参考文献:

- [1] 刘丽,何露,孔凡虹,等.应用快速孵育法优化酶联免疫吸附实验过程探讨——以乙型肝炎病毒表面抗原检测为例[J].标记免疫分析与临床,2016,23(9):1073-6.
- [2] 许春,李佰君,张明香,等.拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者的 HBV 逆转录酶区突变模式[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2014,8(4):473-6.
- [3] 杨国灿,茅国峰,沈少卿,等.耐拉米夫定乙型肝炎病毒聚合酶 P 区突变与基因分型[J].浙江预防医学,2014,26(6):544-7.
- [4] 徐建辉,孙承龙,王惠民,等.芯片检测 HBV DNA 聚合酶区基因突变及其临床应用[J].现代检验医学与临床,2004,19(5):79.
- [5] 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(3):469-75.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华内科杂志,2001,40(1):62-9.
- [7] CANE PA, MUTIMER D, RATCLIFFE D, et al. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation [J]. Antivir Ther, 1999, 4(1):7-14.

(下转第 317 页)

- [2] 刘鸣江, 罗勇健. 游离股前外侧(肌)皮瓣修复手背部软组织缺损的疗效分析[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(2): 51-3.
- [3] 刘昌雄, 黄雄杰, 黄新峰, 等. 多普勒超声在股前外侧穿支皮瓣术前评估中的应用[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(2): 198-9.
- [4] ZHAO W, LI Z, WU L, et al. Medial sural artery perforator flap aided by ultrasonic perforator localization for reconstruction after oral carcinoma resection[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2016, 74(5): 1063-71.
- [5] 傅尚俊, 杨晓东, 杨锦, 等. 游离股前外皮瓣移植术后静脉危象的病因探讨[J]. 中华手外科杂志, 2015, 31(4): 313-4.
- [6] GAG L, TAMBURINO S, TARICO MS, et al. Reverse flow shunt restricted arterialized venous free flap[J]. J Hand Surg Am, 2018, 43(5): 492. e1-492. e5.
- [7] PAN X, WANG G, LUI TH. Transplantation treatment of extensive soft-tissue defects in lower extremities with a combination of cross-bridge flap and combined free-tissue flap covered by vacuum sealing drainage: one case report[J]. Open Orthop J, 2017, 11: 704-13.
- [8] HE XQ, ZHU YL, DUAN JZ, et al. Reconstruction of moderate-sized hand defects using a superficial lateral sural artery perforator flap[J]. Ann Plast Surg, 2017, 78(4): 412-6.
- [9] SUN GW, LU MX, WU WM, et al. [Clinical application of free thin anterolateral thigh flap in the reconstruction of intraoral defects][J]. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2013, 29(5): 321-4.
- [10] JIA YC, CHEN HH, KANG QL, et al. Combined anterolateral thigh and anteromedial thigh flap for extensive extremity reconstruction: vascular anatomy and clinical application[J]. J Reconstr Microsurg, 2015, 31(9): 674-80.
- [11] YANG X, ZHANG G, LIU Y, et al. Vascular anatomy and clinical application of anterolateral leg perforator flaps[J]. Plastic & Reconstructive Surgery, 2013, 131(4): 534E-43E.
- [12] C? MERT A, ALTUN S, UNL? RE, et al. Perforating arteries of the anteromedial aspect of the thigh: an anatomical study regarding anteromedial thigh flap[J]. Surg Radiol Anat, 2011, 33(3): 241-7.
- [13] 以旋股外侧动脉降支为蒂的穿支嵌合皮瓣治疗跟骨慢性骨髓炎 11 例[J]. 中华显微外科杂志, 2015, 38(5): 476-8.
- [14] WONG CH, GOH T, TAN BK, et al. The anterolateral thigh perforator flap for reconstruction of knee defects[J]. Ann Plast Surg, 2013, 70(3): 337-42.
- [15] 张艳茂, 刘会仁, 曹磊, 等. 游离分叶股前外侧肌皮瓣修复前臂软组织缺损与功能重建[J]. 中华创伤杂志, 2011, 27(5): 463-5.
- [16] 李海, 邓呈亮, 魏在荣, 等. 分叶股前外侧穿支皮瓣在血管蒂保护中的作用研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2017(10): 1245-9.

(本文编辑: 蒋湘莲)

(上接第 293 页)

- [8] 赫晓林, 黄建炜, 许瑞安, 等. HBV 病毒复制机制及慢性乙型肝炎药物靶点[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 152-6.
- [9] 张欣欣. 乙型肝炎病毒聚合酶变异与其耐药的产生和监测[J]. 内科理论与实践, 2007, 2(4): 237-40.
- [10] 陈星, 秦红波, 黄钰君, 等. 拉米夫定耐药的 HBV 反转录酶区基因突变模式分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2): 157-9.
- [11] 王丽娜, 李晓斐. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异与原发肝癌相关性研究[J]. 检验医学, 2012, 27(12): 1047-9.
- [12] 刘祖平. 慢性乙型肝炎肝细胞 HBsAg、HBcAg 表达与肝组织病理学分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1591-3.
- [13] 吴家箴, 王丽春. 肝组织内 HBsAg、HBcAg 表达阴性与阳性的慢性乙型肝炎患者临床及肝脏病理的比较[J]. 四川医学, 2017, 38(1): 32-5.
- [14] 鲍腾, 胡庆刚, 叶璐, 等. HBsAg 水平在慢性 HBV 感染者疾病进展中的动态监测价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(8): 1475-8.
- [15] 王怡, 赵桂鸣, 张万增. 乙肝病毒抗原在肝组织的表达及意义[J]. 天津医药, 31(7): 420-1.
- [16] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31: 1941-4.
- [17] 吴家箴, 黄仁刚, 杨兴祥. 慢性乙型肝炎患者免疫耐受和活跃状态肝组织内 HBsAg 和 HBcAg 表达差异[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(7): 620-6.

(本文编辑: 秦旭平)