

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.036

HBV 定量检测对拉米夫定停药的指导意义

胡晓凤 陈建杰 朱敏芳 明利平

(上海浦东新区传染病医院检验科 上海 201299)

摘要 目的: 探讨核苷类似物(NAs)拉米夫定(LAM)用药时间与乙型肝炎(CHB)患者体内 HBV 病毒血清 HBV-DNA 载量的关系。**方法:** 选取 214 例 HBeAg 阳性患者,在 LAM(100 mg/d)的 36 个月用药治疗前使用实时荧光定量 PCR 进行血清 HBV-DNA 载量进行测定,并使用特异性引物鉴定 HBV 病毒 DNA 保守位点 YMDD 的抗药性突变以及病毒株的变化情况。**结果:** (1)214 例患者均对 LAM 产生应答,在治疗 12-18 个月后血清 HBV-DNA 载量稳定在较低水平。(2)病毒株在 NAs 治疗前已经出现耐药性突变(18%),用药加速了 HBV 病毒的耐药进化,18 个月后耐药病毒数在 214 例样本中均超过 10%的检测标准。**结论:** LAM 治疗在 9-18 个月获得良好的治疗效果,建议 24 个月后停药更换临床处方防止耐药病毒株的进化。

关键词: 乙型肝炎;实时定量 PCR;拉米夫定;核苷类似物

中图分类号: R512.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3134-04

Significance of Quantitative Testing Hepatitis B virus (HBV) to Avoid Nucleoside Analogues (NAs) Abusing

HU Xiao-feng, CHEN Jian-jie, ZHU Min-fang, MING Li-ping

(Department of Medical Laboratory, The Infection Diseases Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai, 201299)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between intra-hepatic HBV-DNA level and the duration of applying LAM in patients with chronic hepatitis B (CHB), and assess the valuation of lamivudine (LAM) in anti-virus therapy. **Methods:** Two-hundred and fourteen HBeAg positive patients were treated with the LAM (100 mg/d) for 36 months. At the same time, serum HBV-DNA load was detected by real time fluorescence quantitative PCR before every stage of treatment, and the specific primers were used to identify the HBV virus DNA conservative site YMDD resistance mutations and the changes in the virus strains. **Results:** (1) All of the 214 patients were responded to LAM treatment, and the serum HBV-DNA load maintains at low levels after 12-18 months treatment. (2) Drug-resistance mutation strains were found in about 18 % of samples before NAs treatment, LAM accelerated the drug resistance evolution in HBV virus. After 18 months, the anti-drug virus was identified in all of 214 samples. **Conclusions:** LAM treatment has a good therapeutic effect in 9-18 months. However, inhibitory effect on virus decreased gradually after more than 24 months because of the resistant strain accumulation, such as serological indicators meeting the stopping criteria, and we suggest replacing the clinical prescription to prevent the evolution of drug resistant strains.

Key words: HBV; TaqMan RT-PCR; Lamivudine (LAM); Nucleoside analogues

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3134-04

前言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒,也称 Dane 颗粒,简称 HBV。乙型肝炎是我国常见疾病,感染率约 60%-70%,乙肝还可能进一步发展成为肝硬化、原发性肝癌和终末期肝功能衰竭等,全国约有 9300 万人携带乙肝病毒,其中乙肝患者大约有 3000 万^[1]。

HBV 的治疗主要包括抗病毒药物治疗、自身免疫调节、干扰素治疗、抗纤维化和对症治疗,其中抗病毒治疗是关键。就当今医疗水平而言,病毒复制抑制类药物包括干扰素类和核苷类药物 2 类。近年来,由于干扰素疗效有限,副作用过多,限制了

它的应用,应用核苷类药物(NAs)已经成为乙型肝炎治疗主要方法之一^[2-4]。而在 NAs 治疗患者中,最大的问题是由于乙型肝炎病毒发生基因突变而导致病毒本身对核苷类药物产生耐药性。拉米夫定(LAM)是当前乙肝抗病毒药物治疗广泛应用的一类核苷类药物,长期用药后,可能会在 HBV 基因保守区的 YMDD 基序发生突变,YMDD 变异可导致拉米夫定疗效下降^[5],与临床耐药和肝炎复发有相关性。与未发生乙肝病毒耐药的患者相比,HBV 耐药不仅能够导致病情继续发展,还有可能增加肝功能失代偿和肝细胞癌的患病风险^[6];还可能增加后续治疗的困难,增加了长期治疗的医疗成本,因此,想要提高疗效、缩短疗程、改善预后和减少医疗成本,对于乙肝病毒耐药性的预防和管理是必须的^[6]。血清 HBV-DNA 乙肝病毒指标能够确切地反映 HBV 病毒在患者内的增殖情况^[7],客观地评价药物对病毒的抑制程度,是临床监控 HBV 的重要指标。核酸类似物

作者简介:胡晓凤(1979),女,医学检验,电话:13621957958,

E-mail:ruby1979@126.com

(收稿日期:2014-01-04 接受日期:2014-01-30)

类药物的停药不仅与治疗效果,而且与HBV的抗药性关系密切^[8]。

本文以不同HBV-DNA载量的患者为研究对象,在其接受拉米夫定(LAM)治疗前后进行肝脏组织学检查,治疗期间监测其肝功能,血清HBV-DNA水平,保守序列YMDD情况,探讨类核苷类药物用药时间与患者体内HBV载量、HBV耐药突变的关系,为改变慢性乙肝患者治疗方案和临床干预提供更有利的证据^[9]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

统计样本均系2009年9月至2013年6月上海浦东新区传染病医院感染科门诊及住院病人。入选患者须均为乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、HBeAg、乙型肝炎病毒核心抗体阳性,诊断符合2000年第十次全国病毒性肝炎学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[6],并排除甲、丙、丁、戊型肝炎和其他原因所致肝损害。样本于抗病毒治疗前均进行单项血清HBV-DNA检测筛选,病毒水平须大于 10^7 mL,且其生化指标、发病程度相似。筛选出男179例,女35例,年龄17-65岁,平均36岁。治疗方案均为LAM(100 mg/d)用药治疗,监测周期为每季度一次^[10],持续跟踪监测36个月。

1.2 检测仪器及试剂来源

实时荧光定量PCR仪(美国BioRad公司)、PCR仪(eppendorf)、低温离心机(eppendorf)、凝胶图像分析系统(bio-rad)、超低温冰箱(SANYO ultralow)、隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-35X40)、电泳仪(Hoefersubmarine, USA)、水浴温箱(北京)、血清用离心柱型病毒基因组DNA/RNA提试剂盒(北京TIANGEN生物工程技术有限公司)、TaqMan实时荧光PCR检验试剂盒(中国,上海科华生物工程股份有限公司试剂)。

1.3 检测方法

HBV DNA定量检测^[11]:采用实时跟踪荧光定量PCR,检测灵敏度为0.1 fg/test,具体操作如下:血清标本100 mL加入50 mL裂解液,96℃ 10 min、12000 g离心10 min、取上清液加入10× PCR扩增系统管中,同时设置阴性对照和阳性对照,放入PCR仪中,按使用说明书的PCR程序(95℃ 2 min,然后95℃ 15 s、52℃ 40 s)进行40个循环,反应结果后,通过电脑分析直接定

量结果,专人操作。

乙肝病毒DNA YMDD突变检测:采用选择性引物,基于TaqMan实时PCR技术,在三个PCR平行反应中分别扩增总HBV、YIDD、YVDD,根据管间Ct值差异计算突变毒株在病毒群体中的比例。

2 结果

2.1 患者血清中HBV-DNA应答情况

对214例慢性乙肝患者案例进行了36个月的跟踪监测:案例在治疗前即0个月时,血清中HBV-DNA载量均大于 10^7 ,保持在较高水平;LAM用药处理后,案例血清中HBV-DNA载量随着用药时间逐渐下降,在第12-18个月保持在较低水平(10^5 - 10^6);连续用药18个月后,样本血清中HBV-DNA逐渐回升,肝炎有复发征兆。

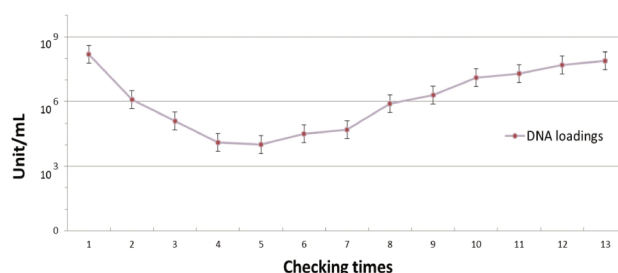


图1 核酸类似物类药物LAM用药时间与血清HBV-DNA载量的关系

Fig. 1 The relationship between intrahepatic HBV-DNA level and LAM usage

2.2 LAM用药时间的延长与疗效的关系

通过对不同时间阶段、不同血清病毒载量的患者进行统计归纳,其中LAM用药前0-6个月中203个案例血清中HBV-DNA载量大于 10^7 ,属于较高水平,乙肝症状明显;用药1-12个月后,仅有4例患者未出明显药物现应答,血清中HBV-DNA载量水平大于 10^7 ;LAM的治疗在12-18个月时,199例均有应答反应,治疗效果达到最佳;18-24个月内208例患者血清HBV-DNA载量低于 10^7 ,药物对病毒的有持续抑制的效果;用药时间延长到30个月后,149例患者血清HBV-DNA载量达到 10^7 ,治疗效果不显著。(P<0.05)

表1 各血清病毒载量人数与随延长用药时间的关系

Table 1 The relationship between patients of different level of HBV-DNA level and the durance of applying LAM

	M0-M6	M6-M12	M12-M18	M18-M24	M24-M30	M30-M36
10^7	203	16	4	6	14	149
10^7 - 10^5	8	177	11	185	166	45
10^5 - 10^3	3	21	199	23	34	20

P<0.05, $\chi^2=12.932$

2.3 LAM的耐药性与用药时间的关系

根据样本体内HBV-DNA的YYDD变异数来判定病毒的耐药突变株在患者体内的变化趋势。随携带一定水平的病毒数的患者数的增加,携带YMDD耐药变异病毒株在患者在统计

的样本中的比例也在逐渐增加,由6个月前的39(18.2%)在24个月后增加到214(100%)例,患者乙肝的复发与YMDD耐药株的出现有一定联系。

表 2 耐药病毒株的进化与用药时间的关系

Table 2 The relationship between anti-drugHBV strain and the durance of applying LAM

Treatment Time	HBV-DNA>10 ⁴ copies/ml	YMDD Mutations
< 6 months	20	39(18.2 %)
16-12 months	146	115(53.7 %)
12-24 months	214	145(67.7 %)
24-36 months	214	214(100 %)

$P<0.05$, $\chi^2=8.655$

3 讨论

现在临床抗病毒治疗过程中,病人和医生最关注的是药物的疗程长短及停药指导, NAs 的用药时间与停药与多方面有关系, 其中 HBV 的血清学指标通常作为一项重要的临床依据^[12, 13]。

2008 年亚太肝脏研究协会年会(APASL)指出治疗终点标准是 HBeAg 阳性患者发生 HBeAg 血清学转换且每 6 个月检测 1 次;连续 2 次 HBV-DNA 达到不可测水平;HBeAg 阴性患者每 6 个月检测 1 次;连续 3 次 HBV-DNA 达到不可测水平^[5, 14]。2009 年 AASLD 指南提出 HBeAg 阳性患者 HBeAg 血清学转换后后续巩固治疗应大于 6 个月;HBeAg 阴性患者应当持续用药至 HBSAg 达到检测线以下。2009 年 EASL 指南^[15]提出 HBeAg 阳性患者 HBeAg 血清学转换后应持续治疗 24-48 周;HBeAg 阴性患者;疗程不确定;应持续治疗直至 HBSAg 清除。2010 年中国慢性乙肝防治指南^[16]指出治疗终点标准是 HBeAg 阳性患者在达到 HBV-DNA 低于检测下限 104;ALT 复常;HBeAg 血清学转换后;再巩固至少 1 年(经过至少两次复查;每次间隔 6 个月)仍保持不变,且总疗程至少已达 2 年者;可考虑停药^[17]。HBeAg 阴性患者在达到 HBV-DNA 低于检测下限, ALT 正常后,至少再巩固 1 年半(经过至少 3 次复查;每次间隔 6 个月)仍保持不变,且总疗程至少已达到 2 年半者;可考虑停药^[2]。本研究中 HBeAg 阳性患者 NAs 治疗时间为 36 个月,均达到或超过了美国肝病研究学会(AASLD)、欧洲肝病研究学会年会(EASL)、亚太肝脏研究协会年会(APASL)、中国指南的治疗终点标准。血清 HBV-DNA 的实时荧光定量 PCR 能够确切地反映患者体内 HBV 病毒的繁殖情况,提供更加确切的临床证据,在国外有着广泛的临床应用^[18]。214 例 LAM 治疗的乙肝重度患者的监测数据表明,HBV 在 NAs 药物 LAM 的抗病毒治疗下,6 个月左右血清 HBV-DNA 拷贝数即可出现明显下降,以后随用药时间增加逐渐降低,12-15 个月可以达到最低水平,此后继续用药,可以保持在较低的拷贝数上。持续用药大于 18 个月后,病毒拷贝数逐渐上升到较高水平,疗效降低。此时, NAs 药物对 HBV 抗病毒效果不明显,继续使用可能导致耐药病毒积累,进而引起严重的肝炎复发。

随着 LAM 的长周期用药, 患者体内 HBV 拷贝数的总体呈上升, 疗效的降低可能与 HBV 的保守位点发生耐药突变有关^[19]。利用 TaqMan 实时荧光 PCR, 设计特异性引物对 HBV-DNA 中变异位点进行扩增,对不同体系中的 C 值差异进行处理比较。进而计算出突变病毒株在体内的比例与繁殖情况。其中 $\Delta Ct<3.5$ 即突变病毒株比例大于 10%被认为出现耐

药病毒突变株。在 214 个样本中发现在 6 个月时 39 位样本患者(18.2 %)体内已经积累了 YMDD 位点的突变病毒,基本符合关于病毒株在患者体内突变比例(17%, $P<0.05$)的文献报道。随着 LAM 的用药对病毒的耐药突变选择,YMDD 突变频率激增,在 6-12 个月间的检测中 54 %患者体内均检测出耐药突变株,而患者体内 HBV-DNA 呈下降趋势,疗效受突变病毒株的影响不明显。18 个月,214 个临床样本患者中 HBV 均出现耐药突变株,HBV-DNA 指标上升比较明显,说明患者体内病毒繁殖数增加,导致病情恶化。而且随用药时间的延长,HBV-DNA 指标回复到治疗前,病情有复发的征兆。此时,LAM 作为抗病毒药物已经不能抑制耐药突变的致病株,应该停药并更换治疗方案。

尽管核酸类似物药物在国内外普遍用于治疗 HBV 病毒引发的慢性肝炎^[20],在抗病毒的各个方面体现了其相对其他药物的优越性^[21]。然而,长期使用 NAs 所引发的病毒抗药性,进而引发的乙肝病情复发使乙肝的治疗更加困难,严重影响乙肝患者的生活质量。因而,研究 NAs 药物对乙肝治疗周期长短与病毒耐药性进化之间的关系,能够提前预测乙肝患者体内 HBV 与药物作用的情况,进而能够提前改变临床治疗策略,避免耐药性病毒引起的炎症。由于临床样本在统计上的局限性,暂时还停留在血清学 HBV-DNA 的研究中,如果能够建立一套能够方便地深入调查患者肝脏组织 HBV 的繁殖情况的系统,结合血清学各项指标,就能更加透彻地研究 NAs 药物的用药疗程与乙肝病毒数量降低、耐药病毒株的进化三者的关系,进而指导临床治疗方案的进行。

参 考 文 献(References)

- [1] Chen CH, Lee CM, Tung WC, et al. Evolution of full-length HBV sequences in chronic hepatitis B patients with sequential lamivudine and adefovir dipivoxil resistance [J]. J Hepatol, 2010, 52(4): 478-485
- [2] Liu YC, Zhang WL, Hu Y, et al. Detection of HBV resistant mutations related to lamivudine, adefovir and entecavir by reverse hybridization technique[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2010, 18(6):414-418
- [3] Fasano M, Lampertico P, Marzano A, et al. HBV DNA suppression and HBsAg clearance in HBeAg negative chronic hepatitis B patients on lamivudine therapy for over 5 years [J]. J Hepatol, 2012, 56(6): 1254-1258
- [4] Zhou Y, Zhang Y, Yang X, et al. Novel nucleoside analogue FNC is effective against both wild-type and lamivudine-resistant HBV clinical isolates[J]. Antivir Ther, 2012, 17(8):1593-1599
- [5] Kouanfack C, Aghokeng AF, Mondain AM, et al. Lamivudine-resistant HBV infection in HIV-positive patients receiving antiretroviral therapy in a public routine clinic in Cameroon [J].

- Antivir Ther, 2012, 17(2):321-326
- [6] Li SY, Qin L, Zhang L, et al. Molecular epidemiological characteristics of Lamivudine resistance mutations of HBV in southern China [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(10):75-80
- [7] Stewart B, Jobarteh ML, Sarge-Njie R, et al. Emergence of HBV resistance to lamivudine (3TC) in HIV/HBV co-infected patients in The Gambia, West Africa[J]. BMC Res Notes, 2011, 23(4):561
- [8] Cortez KJ, Proschan MA, Barrett L, et al. Baseline CD4+ T-cell counts predict HBV viral kinetics to adefovir treatment in lamivudine-resistant HBV-infected patients with or without HIV infection[J]. HIV Clin Trials, 2013, 14(4):149-159
- [9] Mello, F.C., C.A. Fernandes, A. Gomes Sde. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012, 107(3):317-325
- [10] Li X, Wang L, Zhong Y, et al. Hepatitis B virus (HBV) subgenotypes C2 and B2 differ in lamivudine- and adefovir-resistance-associated mutational patterns in HBV-infected Chinese patients [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12):4363-4369
- [11] Chen CH, Wang JH, Lu SN, et al. Treatment response and evolution of HBV resistance during lamivudine plus adefovir or entecavir therapy in patients with adefovir-resistant mutants [J]. Antivir Ther, 2012, 17(4):701-709
- [12] Flink HJ, Hansen BE, Heathcote EJ, et al. Successful treatment with peginterferon alfa-2b of HBeAg-positive HBV non-responders to standard interferon or lamivudine[J]. American Journal of Gastroenterology, 2006, 101(11):2523-2529
- [13] Van Nunen AB, Hansen BE, Suh DJ, et al. Durability of HBeAg seroconversion following antiviral therapy for chronic hepatitis B: relation to type of therapy and pretreatment serum hepatitis B virus DNA and alanine aminotransferase[J]. Gut, 2003, 52(3):420-424
- [14] Afshar, R.M. H.R. Mollaie. Detection of HBV resistance to lamivudine in patients with chronic hepatitis B using Zip nucleic acid probes in Kerman, southeast of Iran [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8):3657-3661
- [15] Kim HN, Scott J, Cent A, et al. HBV lamivudine resistance among hepatitis B and HIV coinfecting patients starting lamivudine, stavudine and nevirapine in Kenya[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(10):447-452
- [16] Kosi L, Reiberger T, Payer BA, et al. Five-year on-treatment efficacy of lamivudine-, tenofovir- and tenofovir emtricitabine-based HAART in HBV-HIV-coinfecting patients [J]. J Viral Hepat, 2012, 19(11):801-810
- [17] Khamduang W, Gaudy-Graffin C, Ngo-Giang-Huong N, et al. Long-term hepatitis B virus (HBV) response to lamivudine-containing highly active antiretroviral therapy in HIV-HBV co-infected patients in Thailand[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e42184
- [18] Lee HC, Suh DJ, Ryu SH, et al. Quantitative polymerase chain reaction assay for serum hepatitis B virus DNA as a predictive factor for post-treatment relapse after lamivudine induced hepatitis B e antigen loss or seroconversion[J]. Gut, 2003, 52(12):1779-1783
- [19] Liu Y, Wang C, Zhong Y, et al. Evolution and suppression of HBV strains with multidrug resistance to lamivudine, adefovir dipivoxil and entecavir in a patient with chronic hepatitis B [J]. Antivir Ther, 2010, 15(8):1185-1190
- [20] Matthews GV, Seaberg E, Dore GJ, et al. Combination HBV therapy is linked to greater HBV DNA suppression in a cohort of lamivudine-experienced HIV/HBV coinfecting individuals [J]. AIDS, 2009, 23(13):1707-1715
- [21] Kose S, Turken M, Devrim I, et al. Efficacy and safety of lamivudine treatment in late pregnancy with high HBV DNA: a perspective for mother and infants[J]. J Infect Dev Ctries, 2011, 5(4):303-306

(上接第 3133 页)

- [10] Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 15(8):1983-1992
- [11] Izzard AS, Rizzoni D, Agabiti-Rosei E, et al. Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage [J]. J Hypertens, 2005, 23(2):247-250
- [12] Abramo A. Open reduction and internal fixation compared to closed reduction and fixation in distal radius fractures: a randomized study of 50 patients [J]. Acta Orthop, 2009, (4): 478-485
- [13] Nicolls MR, Haskins K, Flores SC. Oxidant stress, immune dysregulation, and vascular function in type I diabetes [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 9(7):879-889
- [14] Gokce N, Vita JA, McDonnell M, et al. Effect of medical and surgical weightloss on endothelial vasomotor function in obese patients [J]. Am J Cardiol, 2011, 95(2):266-268
- [15] Lteif AA, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks[J]. Circulation, 2010, 112(1):32-38
- [16] Harred JF, Knight AR, McIntyre JS. Inventors. Dow chemical company, assignee Xpo Xidation process [J]. US Patent, 2011, 4(7): 1927-1904
- [17] Zhang Y, Li W, Yan T, et al. Early detection of lesions of dorsalartery of foot in patients with type 2 diabetes mellitus by high-frequency ultrasonography[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 29(3):387-390
- [18] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 9(12): 16-23
- [19] Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(19):1412-1420
- [20] Izumi S, Muano T, Mori A, et al. Common carotid artery stiffness, cardiovascular function and lipid metabolism after menopause[J]. Life Sci, 2011, 78(15):1696-1701