

# HBeAg 转阴与 HBV 基因型分布和 YMDD 变异位点的相关性分析

吴艾霖,熊怡淞,王艳艳,曲远青,段小刚,吴丽娟<sup>△</sup>(成都军区总医院临床实验医学研究与保障中心,成都 610083)

**【摘要】 目的** 研究感染乙型肝炎病毒患者的乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)转阴与长期应用拉米夫定诱发的 YMDD 变异和病毒基因型的相关性。**方法** 选取本院确诊的慢性乙型肝炎患者 1 200 例,其中 HBeAg 血清学转阴患者 577 例,未转阴患者 623 例,检测患者 HBeAg、乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA)和 HBV 基因型,并比较和探讨 3 者的关系。**结果** 577 例 HBeAg 阴性患者中有 233 例(40.38%)存在病毒复制(HBV-DNA $\geq 10^3$ );对 233 例基因型显示,A、B、C、D 基因型分别为 163 例(69.96%)、57 例(24.46%)、11 例(4.72%)、2 例(0.86%);YMDD 突变检测发现,233 例患者中 106 例(45.49%)发生 YMDD 突变,其中 V 突变 68.87%,I 突变 22.64%,I/V 共生突变 8.49%。在 106 例 YMDD 突变患者中 A、B、C、D 基因型分别为 0 例(0.00%)、72 例(67.92%),27 例(25.47%),7 例(6.60%)。**结论** 本院所在地区 HBeAg 血清转阴的慢性乙型肝炎患者病毒复制仍保持一定的活力,持续监测病毒拷贝数、YMDD 突变和基因型对于此类患者治疗非常必要。

**【关键词】** e 抗原阴性; 乙型肝炎病毒; YMDD 突变; HBV 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)20-2854-02

**Correlation study between HBeAg-negative and HBV genotype YMDD mutations in patients with hepatitis B virus infection** WU Ai-lin, XIONG Yi-song, WANG Yan-yan, QU Yuan-qing, DUAN Xiao-gang, WU Li-juan<sup>△</sup> (Research and Service Centre of Laboratory Medicine, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**【Abstract】 Objective** To study the correlation between hepatitis B e antigen(HBeAg)-negative and HBV genotype, YMDD mutation induced by long-term use of lamivudine in patients with hepatitis B virus infection. **Methods** 1 200 patients with chronic hepatitis B were recruited in this study, of which 577 patients were HBeAg negative and 623 were HBeAg positive. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Taqman QPCR and linear probe hybridization were used to detect HBeAg, HBV-DNA and HBV genotypes respectively. And the relationships between them were analyzed. **Results** There were 233 patients(40.38%) with HBV-DNA virus replication (HBV-DNA $\geq 10^3$ ) in all the 577 HBeAg-negative patients. Further genotyping results showed that there were 163 (69.96%), 57 (24.46%), 11(4.72%) and 2(0.86%) cases in genotype A, B, C and D respectively. YMDD mutation test found that there was 106 cases in 233 patients(45.49%) with YMDD mutation, composed by V mutation(68.87%), I mutations(22.64%), and I/V symbiotic mutation(8.49%). In the 106 YMDD mutation cases there were 0(0.00%), 72 (67.92%), 27(25.47%), and 7(6.60%) cases for genotype A, B, C and D respectively. **Conclusion** Replication of hepatitis B virus was somewhat exist in patients with HBeAg-negative. Continuous monitoring of HBV viruses copy number, YMDD mutation and genotype is necessary for the treatment of these patients.

**【Key words】** e anti-negative; hepatitis B virus; YMDD mutation; HBV genotype

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈世界性流行,但不同地区 HBV 感染的具体情况差异很大。据相关报道显示,我国有 1 亿以上的 HBV 感染或携带者<sup>[1-2]</sup>。乙型肝炎的实验室检测主要有血清学、病毒学、生物化学试验等,有效治疗策略也主要集中于药物抗病毒治疗,并将乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)血清学转阴作为停药指标。但近年来临床观察发现, HBeAg 血清学转阴患者停药后,也有较高的复发率,所以将血清学转阴作为停药指标并不恰当<sup>[3-4]</sup>。HBeAg 血清学转阴的原因较为复杂,主要涉及患者自身免疫功能缺陷或转换、病毒自身原因等,但由于患者自身的因素较为复杂且个体差异较大<sup>[5]</sup>。所以本研究拟从病毒自身原因的角度探讨 HBeAg 血清学转阴、HBV 基因型和 YMDD 变异位点 3 者的相关性,为

制定 HBeAg 血清学转阴的乙型肝炎患者的检测策略提供依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院 2010 年 1 月至 2012 年 12 月就诊的 1 200 例乙型肝炎患者作为研究对象,其中男 798 例,女 402 例;年龄 5~76 岁,平均 39.2 岁。所有患者 HBeAg 血清学检查转阴 577 例,623 例 HBeAg 血清学检查未转阴;排除合并甲、丙、戊、庚肝及自身免疫性肝炎患者。

**1.2 仪器与试剂** CFX96 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪、电泳仪、凝胶成像仪均购于美国 Bio-Rad 公司;ABI3130/3130XL DNA 测序仪购于美国 ABI 公司;HBV YMDD 基因突变诊断试剂购于上海克隆生物技术有限公司;

HBV 基因分型和变异位点检测试剂购于北京鑫诺美迪有限公司;探针引物、Taq DNA 聚合酶、DNA 提取液、DNA 浓缩液、DNA 去离子水等均使用北京鑫诺美迪有限公司提供的试剂盒内的原装试剂。

**1.3 方法** 1 200 例乙型肝炎患者均行乙型肝炎 5 项、乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBV-DNA)、乙型肝炎病毒 A、B、C、D 分型、YMDD 基因突变位点等检测。采用酶联免疫吸附试验法检测乙型肝炎 5 项,PCR 定量 HBV-DNA,线性探针反向杂交法进行 HBV 基因分型,各项检测均完全按照相应试剂盒说明书严格执行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;以  $\alpha=0.05$  为检验水准, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HBV-DNA 病毒定量检测** 对 1 200 例确诊为乙型肝炎的患者进行 PCR 检测,577 份 HBeAg 血清学转阴标本中,HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL 标本共计 233 例,占 40.38%;HBV-DNA  $< 10^3$  copy/mL 标本共计 344 份,占 59.62%。623 份 HBeAg 血清学未转阴标本中,HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL 的标本共计 508 例,占 81.54%;HBV-DNA  $< 10^3$  copy/mL 标本共计 115 份,占 18.46%。

**2.2 HBV-DNA 阳性的 HBeAg 血清学转阴患者和未转阴患者的基因型分布检测** 对 233 例 HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL 的 HBeAg 血清学转阴患者标本进行乙型肝炎病毒基因型检测,分型结果显示 A、B、C、D 基因型所占比例依次为 69.96% (163/233)、24.46% (57/233)、4.72% (11/233)、0.86% (2/233);对未发生 HBeAg 血清学转阴,且 HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL 的 508 例患者基因分型检测,A、B、C、D 基因型所占比例依次为 57.48% (292/508)、36.22% (184/508)、5.71% (29/508)、0.59% (3/508)。HBV-DNA 阳性的 HBeAg 血清学转阴患者和未转阴患者在 A、B、C、D 基因型分布上比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

**2.3 HBV-DNA 阳性的 HBeAg 血清学转阴患者和未转阴患者的 YMDD 突变率检测** 对 HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL 的 HBeAg 血清学转阴患者 233 例和未转阴的 508 例患者的病历资料进行分析发现,所有患者均有拉米夫定 6 个月以上的服用史。YMDD 基因变异检测共发现 YMDD 变异 133 例,其中 HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL、HBeAg 血清转阴患者 106 例,占 HBV-DNA 阳性且血清学转阴患者的 45.49% (106/233);HBV-DNA  $\geq 10^3$  copy/mL、HBeAg 血清未转阴患者 27 例,占 DNA 阳性且血清学未转阴患者的 5.31% (27/508),两组基因突变率比较,前者明显高于后者,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。见表 1。

**表 1 HBeAg 血清学转阴与未转阴患者的 YMDD 突变情况**

类型	n	无变异	YMDD 变异(n)			突变比率(%)
			YIDD	YVDD	YIDD/YVDD	
HBeAg 血清学转阴患者组	233	127	24	73	9	45.49 <sup>a</sup>
HBeAg 血清学未转阴患者组	508	481	2	23	2	5.31

注:与 HBeAg 血清学未转阴患者组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

**2.4 HBeAg 血清学转阴与 YMDD 突变、HBV 基因型之间的**

相关性分析 乙型肝炎患者的 YMDD 突变型多为 B 型和 C 型,明显高于 A 型和 D 型,突变位点多为 V 突变。见表 2。

**表 2 HBeAg 血清学转阴与 YMDD 突变、HBV 基因型的相关性(n)**

类型	A 型	B 型	C 型	D 型	合计
HBeAg 血清学转阴患者	0	72	27	7	106
I 突变	0	16	6	2	24
V 突变	0	50	18	5	73
I/V 突变	0	6	3	0	9
HBeAg 血清学未转阴患者	0	18	6	3	27
I 突变	0	1	1	0	2
V 突变	0	16	5	2	23
I/V 突变	0	1	0	1	2

**3 讨 论**

长期以来人们普遍认为“小三阳”比“大三阳”轻,甚至更有人认为“小三阳”无需治疗。然而,越来越多的研究表明这种观点是不科学的<sup>[6-7]</sup>。本研究证实不少乙型肝炎患者经拉米夫定治疗一段时间后,虽然乙型肝炎病毒 e 抗原已转阴,即成为“小三阳”,但其 HBV-DNA 拷贝数仍然大于或等于  $10^3$ ,即仍然有病毒复制。倘若此时没有继续检测病毒复制的情况,仅以 HBeAg 转阴为停药指标,则患者病情复发迅速且复发率高,甚至出现病情加重或耐药现象,后期治疗难度较大。

抗病毒治疗是慢性 HBV 感染的一项基本治疗措施。核苷酸类似物拉米夫定作用于 HBV 多聚酶活性部位 YMDD 基因序列,从而抑制 HBV-DNA 复制,抗病毒效果明显<sup>[8-10]</sup>。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 发生突变并导致对拉米夫定耐药,影响拉米夫定的疗效。本研究通过使用 YMDD 诊断试剂盒,对收集的 1 200 份乙型肝炎患者血清标本检测基因突变位点,结果表明 HBeAg 血清学转阴的患者仍然存在基因位点变异,并且这部分患者的突变率明显高于 HBeAg 血清学未转阴的患者。因此,笔者分析 HBeAg 血清学转阴,可能只是因为 YMDD 位点发生了突变,实际上其病毒仍然处于不断复制中。杨彦麟等<sup>[11]</sup>对 HBeAg 阳性患者中 HBV 基因型分布及 YMDD 变异位点的分析,显示 HBeAg 阳性患者的基因型突变率达到 35.34%,但笔者的研究发现 HBeAg 阴性患者的基因型也会发生突变,并且突变率高达 45.49%。因此,对 HBeAg 阴性患者不能放松警惕,应持续或定期监测 HBV-DNA 拷贝数。

本研究结果显示,乙型肝炎患者的 YMDD 突变型多为 B 型和 C 型,明显高于 A 型和 D 型,突变位点多为 V 型,这与相关研究结果一致<sup>[11]</sup>。说明长期服用拉米夫定易使患者发生 YMDD 突变,尤其是 B 型和 C 型的突变,从而出现 HBV 对拉米夫定耐药,进而在临床检查上出现 HBeAg 阴性,但乙型肝炎病毒拷贝数仍走高的情况,不利于患者后期的抗病毒治疗。本研究提示 HBeAg 血清学转阴、HBV 基因型、YMDD 基因突变 3 者具有一定的关联,在临床抗病毒治疗上不能只考虑其中 1 个因素,而应该综合考虑以上因素,优化乙型肝炎抗病毒治疗方案,达到最佳效果。

综上所述,乙型肝炎患者的 HBeAg 血清学转阴、HBV 基因型、YMDD 基因突变 3 者具有一定的关联,应予以密切关注。

### 3 讨论

腕关节是人体结构最复杂、功能最精细的关节之一，外伤后易造成骨折和脱位<sup>[3-4]</sup>。腕部骨折以舟状骨最多见，约占 80%，而其中的绝大多数骨折位于舟状骨腰部，其次为三角骨骨折，其中又以近排腕骨背侧的撕脱小骨块最多见<sup>[5]</sup>。此外，腕关节外伤后，还易造成诸骨的失稳或脱位，以月骨脱位最常见。从解剖结构与毗邻关系上看，腕关节骨结构不规则，重叠太多，X 线片对一些细微的骨折诊断存在困难。有相关文献报道显示，在 X 线片检查中有 30% 的腕部骨折不能被确诊，这些骨折类型包括细微的骨小梁断裂、嵌插重叠等，再加上周围软组织肿胀后的重叠干扰等，常出现假阴性及假阳性<sup>[6-7]</sup>。本研究结果也显示，X 线片诊断腕部骨折的漏诊及误诊较多，在 98 处骨折中仅能发现 81 处，漏诊 15 处，误诊 2 处。

螺旋 CT 因其强大的图像后处理功能，在许多疾病诊断的灵敏度与特异性都优于 X 线片<sup>[8]</sup>。腕部 CT 扫描常规采用横断位，大多数情况下能清晰显示腕部诸骨非横行细微骨折，以及横向关节关系等，但部分容积效应可能会将掌腕骨上的突起误诊为撕脱的小碎片。此外，对于舟骨横行骨折，由于骨折线为水平方向走行，横断位图像上缺乏与上下结构的联系及整体观，易出现对舟骨横行骨折的漏诊<sup>[9]</sup>。再加上扫描视野局限，对于合并尺桡骨远端及掌骨近端等处的骨折，往往出现漏诊，对于纵行的腕关节失稳或脱位判断，往往因只行横断位图像观察而导致诊断不准确。矢状位及冠状位图像的优越性如下：(1)对腕部的横行骨折，如舟骨骨折，由于 CT 扫描平面和骨折线垂直，对于细微的横行骨折线也容易显示出来；(2)能明确显示撕脱性骨折及骨碎片的来源；(3)扫描视野相比横断位图像大，在相同的扫描层数内，便于更直观地显示出更多的腕部组成骨。扫描野甚至可将尺桡骨远端、掌骨近端等结构包括在内，显示出腕骨间以及桡腕、掌腕关节的关系，具有一举多得的意义；(4)直观立体显示关节脱位情况，符合临床医师观察的视觉习惯<sup>[1]</sup>。

目前，大多数基层医院使用的单排螺旋 CT 扫描层较厚，缺乏相应的重建软件，达不到作为常规图像重建需要的三轴分

辨率各向同性要求，密度分辨率差，即使勉强做图像重建，得到的图像容易出现马赛克状伪影，造成诊断困难。因此，CT 检查时，在横断面扫描成像的基础上，适当补充 CT 矢状位或冠状位扫描，从多方位、多角度展示腕部诸骨的解剖关系，在图像显示中相互补充，能提高细微骨折及失稳或脱位等的检出率，为病变的诊断提供更确切的影像资料。

### 参考文献

- [1] 王向东,柳曦,刘永华,等. MSCT 在腕关节外伤中的应用[J]. 医学影像学杂志, 2010, 20(10): 1508-1510.
- [2] 文康彦,陈忠,叶文钦,等. 螺旋 CT 多平面三维重建在腕舟状骨骨折及脱位中的应用[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2011, 9(4): 67-69.
- [3] 高迁,朱玉春,王建良. 64 层螺旋 CT 图像后处理技术对隐匿性骨折的诊断价值[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2012, 10(2): 115-117.
- [4] 李秀忠,蔡锦方,张元信,等. 近侧列腕骨间关节及韧带的解剖学观察[J]. 中国临床解剖学杂志, 2012, 30(1): 22-25.
- [5] Welling RD, Jacobson JA, Jamadar DA, et al. MDCT and radiography of wrist fractures: Radiographic sensitivity and fracture patterns[J]. Am J Roentgen, 2008, 190(1): 10-16.
- [6] 吕冬亮,劳华新,谷水君,等. 多层螺旋 CT 在腕关节隐性骨折诊断中的应用[J]. 中医正骨, 2011, 23(3): 38-40.
- [7] 李涛. X 线、MSCT 诊断腕三角骨骨折[J]. 中国医药导报, 2012, 9(15): 132-133.
- [8] 周占文,耿昶. 腕关节外伤骨折患者 DR 与 MSCT 检查的合理应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(11): 238.
- [9] 任大旺. 16 层螺旋 CT 重建技术在骨关节外伤中的诊断价值[J]. 中外医疗, 2013, 32(36): 170-171.

(收稿日期:2014-02-12 修回日期:2014-05-25)

(上接第 2855 页)

### 参考文献

- [1] 陈先礼,况雪梅,杨红. 慢性 HBV 感染者性别及 HBeAg 模式与血清 HBV DNA 水平的关系[J]. 传染病信息, 2013, 26(1): 42-44.
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2009, 27(47): 6550-6557.
- [3] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [4] 杨艳秋. 366 例疑似乙型肝炎患者 HBV-DNA 检测与乙肝 5 项指标结果分析[J]. 大理学院学报, 2007, 6(1): 276-278.
- [5] 荣海燕,张朝霞. 乙型肝炎病毒耐药突变与 HBV-DNA 量和 HBeAg 之间的相关性研究[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(3): 404-406.

- [6] 陈健康,肖敏敏,黄升海. 乙型肝炎 YMDD 变异与丙氨酸转氨酶乙型肝炎病毒 e 抗原及乙型肝炎病毒 DNA 的关系探讨[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 301-303.
- [7] 柳文菊,江培学,朱汝祥. 3 种检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异方法的比较[J]. 检验医学, 2012, 27(7): 557-560.
- [8] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. N Engl J Med, 2004, 351(15): 1521-1531.
- [9] Di Marco V, Marzano A, Lampertico P, et al. Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine[J]. Hepatology, 2004, 40(4): 883-891.
- [10] 张照华,孟红. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异研究进展[J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 88-92.
- [11] 杨彦麟,肖萍,高鹏,等. HBeAg 阳性患者中乙型肝炎病毒基因型分布及 YMDD 变异位点分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(6): 428-430.

(收稿日期:2014-03-12 修回日期:2014-06-17)