

以期减轻膝关节 OA 的影像学进展和临床症状。

参考文献

- 1 Dore D, Martens A, Quinn S, *et al.* Bone marrow lesions predict site – specific cartilage defect development and volume loss: a prospective study in older adults[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6):R222
- 2 Wluka AE, Hanna F, Davies – Tuck M, *et al.* Bone marrow lesions predict increase in knee cartilage defects and loss of cartilage volume in middle – aged women without knee pain over 2 years[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(6):850 – 855
- 3 Yusuf E, Kortekaas MC, Watt I, *et al.* Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(1):60 – 67
- 4 Altman R, Asch E, Bloch D, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association[J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29(8):1039 – 1049
- 5 Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo – arthrosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 1957, 16(4):494 – 502
- 6 Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, *et al.* Whole – Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(3):177 – 190
- 7 Brem MH, Schlechtweg PM, Bhagwat J, *et al.* Longitudinal evaluation of the occurrence of MRI – detectable bone marrow edema in osteoarthritis of the knee[J]. *Acta Radiol*, 2008, 49(9):1031 – 1037
- 8 林志春, 翟磊, 徐达传, 等. 膝关节软骨人体标本解剖与磁共振成像的比较研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2011, 13(5):463 – 466
- 9 吴旭, 孙明华, 马常英, 等. 骨髓病变的磁共振应用进展[J]. *医学影像学杂志*, 2010, 20(2):281 – 283
- 10 郭燕梅, 黄鹏, 瓮长水, 等. 膝关节关节炎患者平衡功能下降的影响因素分析[J]. *武警医学*, 2012, 23(1):30 – 35
- 11 Wilson AJ, Murphy WA, Hardy DC, *et al.* Transient osteoporosis: transient bone marrow edema? [J]. *Radiology*, 1988, 167(3):757 – 760
- 12 Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, *et al.* Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology[J]. *Skeletal Radiol*, 2008, 37(5):423 – 431
- 13 Kazakia GJ, Kuo D, Schooler J, *et al.* Bone and cartilage demonstrate changes localized to bone marrow edema – like lesions within osteoarthritic knees[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(1):94 – 101
- 14 Kothari A, Guermazi A, Chmiel JS, *et al.* Within – subregion relationship between bone marrow lesions and subsequent cartilage loss in knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2010, 62(2):198 – 203
- 15 Roemer FW, Guermazi A, Javadi MK, *et al.* Change in MRI – detected subchondral bone marrow lesions is associated with cartilage loss: the MOST Study. A longitudinal multicentre study of knee osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(9):1461 – 1465
- 16 Roemer FW, Neogi T, Nevitt MC, *et al.* Subchondral bone marrow lesions are highly associated with, and predict subchondral bone attrition longitudinally: the MOST study [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1):47 – 53
- 17 Lo GH, McAlindon TE, Niu J, *et al.* Bone marrow lesions and joint effusion are strongly and independently associated with weight – bearing pain in knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(12):1562 – 1569
- 18 Guymer E, Baranyay F, Wluka AE, *et al.* A study of the prevalence and associations of subchondral bone marrow lesions in the knees of healthy, middle – aged women[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(12):1437 – 1442
- 19 Hayashi D, Englund M, Roemer FW, *et al.* Knee malalignment is associated with an increased risk for incident and enlarging bone marrow lesions in the more loaded compartments: the MOST study[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(11):1227 – 1233

(收稿日期:2013 – 06 – 18)

(修回日期:2013 – 07 – 28)

拉米夫定耐药株感染者基因型、HBV DNA 及多聚酶 P 区基因变异的关系

卢丹 吕铁锋 章松平 郭晓凤 武静 吴菲 刘斐

摘要 目的 分析拉米夫定耐药株感染者的基因型、HBV DNA 及多聚酶 P 区基因变异的关系。方法 应用 PCR 扩增和直接测序法检测 83 例拉米夫定耐药患者 HBV 基因型、HBV DNA 及多聚酶 P 区的基因变异。结果 83 例拉米夫定耐药患者 B 基因型 26 例, C 基因型 57 例, B 型 YIDD 变异率 69.2% (18/26)、YVDD 变异率 30.8% (8/26), C 型 YIDD 变异率 63.2% (36/

作者单位:310000 杭州, 浙江中医药大学(卢丹、吴菲、刘斐); 杭州市西溪医院(吕铁锋、章松平、郭晓凤、武静)

通讯作者:吕铁锋, 电子信箱: tiefenglv@126.com

57)、YVDD 变异率 33.3% (19/57), B、C 基因型发生 YMDD 变异模式无统计学差异 ($P>0.05$); B 型 rtM204I 突变率 53.8% (14/26), 综合变异率 46.2% (12/26), C 型 rtM204I 变异率 26.7% (15/57), 综合变异率 73.7% (42/57), B、C 基因型变异位点类型有统计学差异 ($P<0.05$); 耐药变异时 C 型 HBV DNA 水平 (6.60 ± 1.42) lg 拷贝/毫升高于 B 型 (5.88 ± 1.46) lg 拷贝/毫升, YIDD 变异时 C 型 (6.40 ± 1.48) lg 拷贝/毫升、B 型 (5.68 ± 1.32) lg 拷贝/毫升, YVDD 变异时 C 型 (6.18 ± 1.87) lg 拷贝/毫升、B 型 (6.82 ± 1.45) lg 拷贝/毫升; rtM204I 变异时 B 型 (6.12 ± 1.45) lg 拷贝/毫升、C 型 (5.57 ± 1.45) lg 拷贝/毫升 ($P>0.05$); 综合变异时 C 型 (6.68 ± 1.51) lg 拷贝/毫升, B 型 (5.76 ± 1.57) lg 拷贝/毫升 ($P<0.05$)。结论 C 基因型拉米夫定耐药发生率高于 B 型; 基因型与变异位点类型有关, 与 YMDD 变异模式无关; 耐药变异时 HBV DNA 水平 C 型高于 B 型, 与综合变异有关, 与 YMDD 变异模式无关。

关键词 乙型肝炎病毒 拉米夫定 病毒载量 基因型 耐药变异

Polymerase Region Mutations, Hepatitis B Virus Genotypes and HBV DNA in Chronic Hepatitis B Patients with Lamivudine – resistant HBV Infection Lu Dan, Lü Tiefeng, Zhang Songping, Guo Xiaofeng, Wujing, Wu Fei, Liu Fei. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310000, China

Abstract Objective To analyze the HBV DNA, mutation patterns of Polymerase region and genotype in patients with lamivudine – resistant HBV infection. **Methods** Serum samples were collected from 83 hepatitis B patients resistant to lamivudine. HBV P gene was amplified by PCR. The PCR products were detected for the genotypes, polymerase region mutations sites and viral loads directly. **Results** In 83 cases with lamivudine – resistant HBV infection, 26 (31.33%) were infected with genotype B and 57 (68.67%) with genotype C. 18 patients with HBV genotype B and 36 patients with genotype C developed YIDD mutations (69.2% vs 63.2%). Meanwhile, 8 patients with genotype B and 19 patients with genotype C developed YVDD mutations (30.8% vs 33.3%), therefore, genotype B and C developed YMDD mutations had no significant difference ($P>0.05$). Regard to site mutation, the genotype B developed rtM204I mutation rate (53.8%) was higher than genotype C (26.7%) and genotype C multi – site mutation rate (73.7%) was higher than genotype B (46.2%), and the result was significant difference ($P<0.05$). When HBV have mutated, the levels of HBV DNA in genotype C were higher than those in genotype B [(5.88 ± 1.46) lg copies/ml vs (6.60 ± 1.42) lg copies/ml, respectively, $P<0.05$]. It had no relation to YMDD mutation [YIDD mutation (6.40 ± 1.48) vs (5.68 ± 1.32), $P>0.05$], YVDD mutation [(6.82 ± 1.45) vs (6.18 ± 1.87), $P>0.05$]. But it had relation to site mutation (rtM204I mutation [(6.12 ± 1.45) vs (5.57 ± 1.45), $P>0.05$], multi – site mutation type C [(6.68 ± 1.51) vs (5.76 ± 1.57), $P<0.05$]. **Conclusion** The incidence of lamivudine – resistance in genotype C was higher than in type B. YMDD mutation had no relation to genotypes. Sites mutation was associated with genotypes. The levels of HBV DNA was higher than that in C type. It was related to the multi – site mutation, but had nothing to do with YMDD mutation.

Key words Hepatitis B virus; Lamivudine; Viral load; Genotype; Mutation

拉米夫定 (lamivudine, LAM) 是一种高效、安全且服药方便的抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 药物, 目前出现的最突出问题是其长期抗病毒过程中, 出现耐药变异。根据 HBV 全基因序列差异 $>8\%$, 或 S 区基因序列差异 $>4\%$, 分为 A ~ J 10 种基因型^[1]。不同基因型可能决定了 HBV 在出现耐药时病毒复制水平^[2]。但其具体原因为何, 目前尚不清楚。本研究通过分析慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者的基因型、HBV DNA 及多聚酶 P 区基因变异的相关性, 试图寻找其原因, 以期对临床抗病毒治疗起到一定的指导作用。

对象与方法

1. 临床资料: 选择 2008 ~ 2011 年在杭州市第六人民医院就诊的 CHB 患者经单用拉米夫定治疗 (100mg/d, 疗程 >6 个月) 后出现临床耐药的 83 例患者, 发生变异时间 6 ~ 96 个月, 中位时间 25.99 ± 17.20 个月。诊断标准符合 2005 年《慢性

乙型肝炎防治指南》^[3]。留取所有患者耐药变异时血清样本, 置 -70°C 冰箱保存。

2. 研究方法: (1) 基因型检测: 采用 Taqman 荧光 PCR 技术结合 HBV S 区 PCR 产物直接测序验证^[4]。由美国 ABI7000 型实时荧光定量检测仪检测, 引物、探针及 Taqman 酶委托上海之江生物技术有限公司购买。(2) HBV DNA 检测: 测血清 HBV DNA 定量采用荧光定量 PCR 方法检测, 试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司 (20111017), 在 PE5700 扩增仪上进行操作。(3) HBV 多聚酶基因区序列检测: 由美安玛西亚公司 MegBACE500 测序仪对 PCR 产物直接测序^[4]。

3. 统计学方法: 所有统计学处理采用 SPSS 19.0 统计软件进行。符合正态分布的计量资料比较采用 t 检验, 否则采用非参数检验, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 临床资料: 83 例拉米夫定耐药变异的 CHB 患

者中基因 C 型占 68.7% (57/83), B 型 31.3% (26/83), 未检测出其他基因型, C 基因型出现频率高于 B 基因型 ($P < 0.05$)。

2. 基因型与 P 区基因变异的关系: (1) 基因型与 YMDD 变异模式: 所有 CHB 患者均发生 YMDD 变异, YIDD 变异率 65.1% (57/83), YVDD 变异率 32.5% (26/83), 其中 B 型 YIDD 变异率 69.2% (18/26), YVDD 变异率 30.8% (8/26)。C 型 YIDD 变异率 63.16% (36/57), YVDD 变异率 33.3% (19/57)。基因型 B 与 C 比较, 两者发生 YMDD 变异模式无统计学差异 ($\chi^2 = 0.290, P > 0.05$), 详见表 1。(2) 基因型与变异位点: 测出 HBV 多聚酶基因区基因变异位点及相关位点氨基酸替代形式: rtM204I $\pm$ V、rtL180M、rtV173L、rtA181V/S、rtT184I/F/S、rtS202T、rtM250L, 主要变异类型有 rtM204I、rtL180M + rtM204I、rtL180M + rtM204V、rtL180M $\pm$ rtM204I/V 联合其他位点。本研究中仅 rtM204I 为单一位点变异, 其他均为两个或两个以上位点变异, 笔者以此分为 rtM204I 变异和综合变异, 并进行统计分析。B 型易发生 rtM204I 变异, C 基因型易发生综合变异 ($\chi^2 = 5.953, P < 0.05$, 表 1)。

表 1 基因型与 P 区基因变异之间的关系 [$n(\%)$]

基因型	频数	变异模式		变异位点	
		YIDD	YVDD	rtM204I	综合变异
B	26	18 (69.2)	8 (30.8)	14 (53.8)	12 (46.2)
C	57	36 (63.2)	19 (33.3)	15 (26.3)	42 (73.7)
合计	83	54 (65.1)	27 (32.5)	29 (34.9)	54 (65.1)

3. 基因型与 HBV DNA 的关系: 将 HBV DNA 取对数值, B 型基线 HBV DNA (6.77 ± 1.58) lg 拷贝/毫升, C 型 (6.85 ± 1.28) lg 拷贝/毫升, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。变异时 B 型 HBV DNA (5.88 ± 1.46) lg 拷贝/毫升, C 型 (6.60 ± 1.42) lg 拷贝/毫升, 两组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$), 变异时 C 基因型 HBV DNA 高于 B 基因型, 详见表 2。

表 2 基因型与 HBV DNA 的关系 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	频数	基线 lgVL (拷贝/毫升)	变异时 lgVL (拷贝/毫升)
B 型	26	6.77 ± 1.58	5.88 ± 1.46
C 型	57	6.85 ± 1.28	6.60 ± 1.42
t		-0.128	-2.092
P		0.898	0.034

4. 耐药变异时基因型、HBV DNA 与 YMDD 变异

模式、变异位点的关系: (1) 基因型、HBV DNA 与 YMDD 变异模式关系: YIDD 变异时, B 型 HBV DNA (5.68 ± 1.32) lg 拷贝/毫升, C 型 (6.40 ± 1.48) lg 拷贝/毫升, C 型高于 B 型, 但两者比较差异无统计学意义 ($t = -1.789, P > 0.05$)。YVDD 变异, B 型 HBV DNA (6.18 ± 1.87) lg 拷贝/毫升, C 型 (6.82 ± 1.45) lg 拷贝/毫升, C 型高于 B 型, 但两者比较差异亦无统计学意义 ($t = -0.903, P > 0.05$), 详见表 3。(2) 基因型、HBV DNA 与不同变异位点关系: rtM204I 变异时, B 型 HBV DNA (5.57 ± 1.45) lg 拷贝/毫升, C 型 (6.12 ± 1.45) lg 拷贝/毫升, C 型高于 B 型, 两者差异无统计学意义 ($t = -0.786, P > 0.05$)。综合变异时, B 型 (5.76 ± 1.57) lg 拷贝/毫升, C 型为 (6.68 ± 1.51) lg 拷贝/毫升, C 型高于 B 型, 两者比较差异有统计学意义 ($t = -2.081, P < 0.05$, 表 3)。

表 3 耐药变异时基因型、HBV DNA 与 YMDD 变异模式、变异位点的关系

基因型	lgVL (拷贝/毫升)			
	YIDD	YVDD	rtM204I 变异	综合变异
B 型	5.68 ± 1.32	6.18 ± 1.87	5.57 ± 1.45	5.76 ± 1.57
C 型	6.40 ± 1.48	6.82 ± 1.45	6.12 ± 1.45	6.68 ± 1.51
t	-1.789	-0.903	-0.786	-2.081
P	0.074	0.367	0.432	0.037

讨 论

拉米夫定是 L-核苷酸类似物, 它竞争作用于 HBVP 基因反转录酶的催化中心发挥抗病毒作用, 当患者体内的 HBVP 区基因发生变异, 就出现 LAM 耐药。HBV B 型和 C 型是我国最为常见的两种基因型^[5]。本研究中拉米夫定耐药的乙型肝炎病毒基因型与此一致, 其中 C 型耐药发生率 (69.23%) 高于 B 型 (29.67%), 与张书楠等^[6]报道的 C 型发生的耐药变异频率高于其他基因型的结果一致, 提示 HBV 基因型与耐药变异可能存在相关性。

LAM 耐药最常见的是 HBVP 基因区发生 YMDD (酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸) 变异, 主要变异模式为 YI (异亮氨酸) DD 或 YV (缬氨酸) DD。本研究中 YIDD 变异率 (65.06%) 高于 YVDD 变异率 (32.53%), 可能与在拉米夫定治疗过程中, YMDD 变异模式可能会发生改变, YIDD 可能是最终的变异模式有关^[7]。本实验发现基因 B 型和 C 型发生 YMDD 变异模式无统计学差异, 这与 Tan 等^[8]一项临床荟萃分析报道基因型 B 和 C 与 YMDD

变异模式没有相关性的结果一致。本研究发现 B 基因型易发生 rtM204I 变异 (53.8%), C 基因型易发生综合变异 (73.7%), 可能与 rtM204V 比, rtM204I 不易与 rtL180M 发生联合变异有关^[9]。

目前对基因型与 HBV 在出现耐药变异时 HBV DNA, 及 P 区基因变异关系进行系统报道的文献少见, 本研究发现 B、C 基因型基线 HBV DNA 无明显差异, 但在出现耐药后 C 基因型 HBV DNA 高于 B 基因型, 证实了“不同基因型可能决定了 HBV 在出现耐药变异时病毒复制水平”这一观点^[2]。本研究进一步分析发现不同基因型在出现耐药变异时病毒复制水平与 YMDD 变异模式无关, 而与耐药位点综合变异有关, 其原因可能是 rtM204V/I 变异株的复制能力显著低于野生株, 伴随变异通常可以加强变异株的复制能力, 当伴有 rtL180I 变异时, 变异株的复制能力得到部分代偿, rtV173L 变异可以显著增强 HBV 的复制能力。本研究结果显示 B 基因型主要变异形式为单位点 rtM204I 变异, 而 C 基因型主为综合变异, 且以 rtM204I/V 联合 rtL180I 为主, 并且 C 基因型不论在 173、181、184、202、205 等变异位点上, 还是在相同变异位点氨基酸替代的形式上均较 B 基因型复杂, 这些可能是 C 基因型在发生耐药变异时 HBV DNA 高于 B 基因型的原因之一, 同时, 还说明 C 基因型对 HBV 耐药株适应性更强, 可能也是 C 基因比 B 基因较难治的原因之一。

近年来核苷类似物抗病毒治疗在我国普遍使用, HBV 耐药变异的情况也日趋突出, 所以加强对 HBV 变异特征的研究, 有助于我们更深刻地认识变异对病毒复制能力的影响, 从而采取有效的防治措施, 防止

疾病进一步进展。

参考文献

- 1 Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype [J]. *J Viral*, 2009, 83(10): 538-547
- 2 Pan XP, Li LJ, Du WB, *et al.* Differences of YMDD mutational patterns, precore/core promoter mutations, serum HBV DNA levels in lamivudine-resistant hepatitis B genotypes B and C [J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14: 767-774
- 3 倪勤, 刘克洲. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗若干热点 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(3): 172-175
- 4 吴菲, 吕铁锋, 郭晓凤, 等. 阿德福韦酯耐药株感染者乙型肝炎病毒基因型和多聚酶区基因变异分析 [J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(1): 122-124
- 5 Li SY, Qin L, Zhang L. Molecular epidemiological characteristics of Lamivudine-resistance mutations of HBV in southern China [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(10): 75-80
- 6 张书楠, 余文辉, 周大桥, 等. 慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒耐药基因型研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(16): 1543-1545
- 7 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
- 8 Tan Y, Ding K, Su J, *et al.* The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32789
- 9 汤佳良, 周建康. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者 HBV P 区基因突变模式与基因型的关系 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011, 25(5): 342-344
- 10 陈立, 张欣欣. 核苷(酸)类似物耐药变异对乙型肝炎病毒生物学特性的影响 [J]. *中国实用内科学杂志*, 2007, 27(15): 1230-1203

(收稿日期: 2013-06-26)

(修回日期: 2013-07-24)

阿托伐他汀钙序贯治疗在 ACS 患者应用的安全性研究

王欣欣 陈金国 刘俊 张军 沈童童

摘要 目的 探讨阿托伐他汀钙序贯治疗(患者均在经皮冠状动脉介入治疗术(PCI)前 24h 内给予阿托伐他汀钙 80mg, 再以每日 40mg, 维持 1 个月)在急性冠脉综合征(ACS)患者应用的安全性研究。**方法** 选择滁州市第一人民医院收治的 ACS 患者 120 例, 随机分为阿托伐他汀钙常规治疗组 A 组(20mg/d)和阿托伐他汀钙序贯组 B 组, 收集两组临床资料, 并监测入院用药前、用药后 1、4、7、14、21、30 天肝肾功能、肌酶指标。记录 PCI 术后 30 天内两组主要心血管不良事件(MACE)。**结果** 两组用药后比较: ALT 升高 <3 倍正常值上限(ULN), A 组 12.50% 和 B 组 29.63%, 差异有统计学意义($P=0.03$), 并且均发生在 1 周内; ALT ≥ 3 ULN, A 组 3.57% 和 B 组 5.56%, 差异无统计学意义($P=0.97$); 碱性磷酸酶 >1ULN、总胆红素 >1ULN、肌酸激酶 >

作者单位: 239000 安徽医科大学滁州临床学院心血管内科

通讯作者: 陈金国, 电子信箱: chenjinguo2011@126.com