

拉米夫定和补肾方联合应用治疗慢性乙型肝炎的疗效及对 YMDD 区域的影响

周 飞 王灵台 陈建杰 张 斌 赵 钢 高月求

摘要 目的:观察拉米夫定和补肾方联合应用治疗慢性乙型肝炎的疗效及对慢性乙型肝炎病毒 P 基因酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(YMDD)区域的影响。方法:收集乙型肝炎病毒(HBV)DNA 阳性的慢性乙型肝炎患者 88 例,分为拉米夫定组、拉米夫定加补肾方 1 组和拉米夫定加补肾方 2 组共 3 组,分别检测血清 HBV DNA、肝脏生化指标和 P 基因 YMDD 区域变异。结果:在治疗 52 周时,拉米夫定加补肾方 2 组无论是 HBV DNA 阳性率(6.45%)还是 YMDD 变异率(3.23%)都比拉米夫定组低。结论:初步表明,拉米夫定与补肾方联合用药能在一定程度上提高治疗慢性乙型肝炎的疗效,并可能减少 YMDD 的变异。

关键词 乙型肝炎病毒 基因变异 拉米夫定 补肾方

Therapeutic Efficacy of Combined Application of Lamivudine and Bushen Recipe in Treating Chronic Hepatitis B and Its Influence on YMDD Motif ZHOU Fei, WANG Ling-tai, CHEN Jian-jie, et al *Affiliated Shuguang Hospital to Shanghai University of TCM, Shanghai (200021)*

Objective: To observe the effect of combined application of Lamivudine and Bushen recipe (BSR) in treating patients with chronic hepatitis B (CHB) and its influence on tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) motif. **Methods:** Eighty-eight patients of CHB with positive HBV-DNA were divided into 3 groups, Group A treated with Lamivudine, Group B treated with Lamivudine plus BSR1 and Group C treated with Lamivudine plus BSR2, the serum HBV-DNA, hepatic biological parameters and YMDD motif mutation were observed. **Results:** The positive rate of HBV-DNA (6.45%) and YMDD motif mutation (3.23%) in Group C were lower than those in Group A respectively, after 52 weeks treatment. **Conclusion:** Combined application of Lamivudine and BSR could enhance the therapeutic effect in treating CHB to certain extent, and could reduce the mutation of YMDD motif.

Key words hepatitis B virus, gene mutation, Lamivudine, Bushen recipe

近年来发现,长期应用治疗乙型肝炎病毒(HBV)感染的核苷类抗病毒药物拉米夫定可引起 HBV 的 P 基因变异^[1],相对集中于酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(YMDD)区域,突变为 YI(异亮氨酸)DD 或 YV(缬氨酸)DD,而且变异后产生耐药性,使疗效下降。中药治疗慢性乙型肝炎也有一定的疗效。补肾方经临床和实验证实有较好的抗病毒效果^[2]。本课题观察联合应用拉米夫定和补肾方治疗慢性乙型肝炎的疗效,同时检测治疗无效的慢性乙型肝炎患者 HBV P 基因(HBVP)的 YMDD 区域,来观察联合用药对 YMDD 区域的影响。

临床资料

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 按 2000 年(西安)中华医学会传染病与寄生虫病学分会联合修订的《病毒性肝炎的诊断标准》中关于 HBV DNA 阳性的慢性乙型肝炎的标准^[3]。

1.2 中医辨证标准 肝肾亏虚兼湿热证(GB 中医证候诊断标准)的慢性乙型肝炎患者。主证(1)头晕眼花(2)腰膝酸软(3)口苦(4)胁肋胀痛。次证:(1)两肋隐痛(2)耳鸣(3)失眠多梦(4)两目干涩,(5)脘腹痞胀(6)纳呆呕恶(7)厌食油腻(8)尿黄,(9)舌质红(10)脉弦滑或弦数。凡具备主证任三项,即属本证;具备主证(2)(3)或(1)(4),即属本证;具备主证(3)(4)中任一项及次证(1)(2)(3)(4)(9)及(10)中任两项,即属本证;具备主证(1)(2)中任一

项及次证(5)~(10)中任两项,即属本证。

2 资料 HBV DNA 阳性的慢性乙型肝炎患者 88 例均为曙光医院肝病科自 2000 年 7 月—2002 年 4 月的门诊或住院患者,其中男 46 例,女 42 例,年龄 15~49 岁,平均 38.5 岁,病程 1~10 年,平均 4.4 年。所有病例随机分为 3 组。拉米夫定组 28 例,男 16 例,女 12 例,年龄 16~42 岁,平均(28.4±4.83)岁,病程(5.24±0.53)年;拉米夫定加补肾方 1 组 29 例,男 15 例,女 14 例,年龄 16~49 岁,平均(33.7±5.41)岁,病程(6.01±0.39)年。拉米夫定加补肾方 2 组 31 例,男 15 例,女 16 例,年龄 15~45 岁,平均(31.1±3.17)岁,病程(5.93±0.38)年。3 组在病程、性别、年龄等一般情况基本相同,经统计学处理差异无显著性,具有可比性。

方 法

1 治疗方法 拉米夫定组:拉米夫定(英国葛兰素药业公司产品,批号 B046510)100mg,每天 1 次口服,疗程为 52 周。拉米夫定加补肾方 1 组:拉米夫定 100mg,每天 1 次口服,疗程为 52 周,同时冲服补肾冲剂,由黄芪、巴戟天、枸杞子、何首乌、虎杖、丹参、青皮等组成,由曙光医院中药制剂室制备成补肾冲剂,每包 10g 20g,每天 2 次,疗程为 26 周。拉米夫定加补肾方 2 组:拉米夫定 100mg,每天 1 次口服,疗程为 52 周,同时冲服补肾冲剂 20g,每天 2 次,疗程为 52 周。

2 观察指标

2.1 血清 HBV DNA 的检测 采用核酸扩增(PCR)荧光定量检测,试剂购自上海复星实业股份有限公司。用 FX-990 荧光检测仪。

2.2 肝脏血清生化指标的检测 丙氨酸氨基转移酶(ALT)和门冬氨酸氨基转移酶(AST)采用酶动力学法;总胆红素(TB)采用硫酸法;白蛋白(A)采用溴甲酚绿法;球蛋白(G)采用双缩脲法。另外还检测 γ -球蛋白(GG)及凝血酶原时间(PT)。

2.3 血清 HBVp YMDD 区域变异的检测 方法参考文献^[4]。分别选择 3 组治疗 52 周时血清 HBV DNA 测定为阳性的 19 例患者的血清进行检测。试剂购自第一军医大学基础部生物医学诊断研究中心。550 型酶标仪及基因扩增仪。

3 统计学方法 采用美国 SPSS 软件进行统计处理。计数资料采用 χ^2 检验,各组间的两两比较时检验水准采用 $\alpha' = 2\alpha / (K - 1)$,其中 $\alpha = 0.05$,K 为样本率的个数,计量资料采用 t 检验。其中,HBV DNA PCR 结果进行对数转换。

结 果

1 YMDD 基因变异类型 在所有患者治疗前血清标本中,均未发现 YMDD 变异。治疗 52 周时,3 组 HBV DNA 阳性患者 YMDD 基因变异检测结果见表 1。3 组 HBV DNA 转阴率比较,拉米夫定组转阴率为 67.86%(19/28);拉米夫定加补肾方 1 组转阴率为 72.41%(21/29);拉米夫定加补肾方 2 组转阴率为 93.55%(29/31),且与拉米夫定组比较差异有显著性($P < 0.05$)。拉米夫定加补肾方 2 组无论是 HBV DNA 阳性率,还是 YMDD 变异率,都比拉米夫定组低,而拉米夫定加补肾方 2 组 HBV DNA 转阴率比拉米夫定组高。

表 1 3 组 HBV DNA 阳性患者 YMDD 基因变异检测结果

组别	例数	HBV DNA 阳性 (例 %)	YMDD	YMDD 变异		
			未变异 (例)	YVDD (例)	YIDD (例)	变异合计 (例 %)
拉米夫定	28	9(32.14)	2	4	3	7(25.00)
拉米夫定加补肾方 1	29	8(27.59)	1	3	4	7(24.14)
拉米夫定加补肾方 2	31	2(6.45)*	1	0	1	1(3.23)*

注:与拉米夫定组比较,* $P < 0.05$

2 YMDD 基因变异与 HBV DNA 水平 在治疗 52 周时,3 组的 HBV DNA 阳性患者的 HBV DNA 水平比较见表 2。3 组治疗前后 HBV DNA 水平差异无显著性($P > 0.05$)。15 例 YMDD 变异者中,13 例血清 HBV DNA 水平低于其治疗前水平。4 例无 YMDD 变异者中,2 例血清 HBV DNA 水平低于其治疗前水平。上述结果提示,HBVp YMDD 变异可导致疾病复发或对药物不完全应答,是病毒耐药的重要原因。

表 2 3 组治疗前后 HBV DNA 阳性患者的 HBV DNA 水平比较 (1g copy/ml $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HBV DNA	
		治疗前	治疗 52 周
拉米夫定	28	6.50±1.78	5.79±1.46
拉米夫定加补肾方 1	29	6.62±1.59	5.76±1.34
拉米夫定加补肾方 2	31	6.60±1.54	5.78±1.29

3 3 组治疗前后 ALT 含量比较 见表 3。在治疗 52 周时,3 组的 HBV DNA 阳性患者的 ALT 水平均明显高于 HBV DNA 阴性患者;3 组 HBV DNA 阴性患者的 ALT 水平 52 周时显著低于治疗前。

15 例 YMDD 变异者中,有 12 例出现 ALT 异常,并且高于治疗前水平。4 例无 YMDD 变异者中,有 2 例出现 ALT 异常。

表 3 3 组治疗前后 ALT 含量比较 (IU/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HBV DNA(-)		例数	HBV DNA(+)	
		治疗前	治疗 52 周		治疗前	治疗 52 周
拉米夫定	19	79.86 ± 25.34	25.17 ± 9.17 [△]	9	75.87 ± 24.75	90.34 ± 30.96*
拉米夫定加补肾方 1	21	76.17 ± 24.18	26.35 ± 8.97 [△]	8	77.26 ± 23.47	87.34 ± 25.69*
拉米夫定加补肾方 2	29	80.17 ± 22.78	22.15 ± 7.59 [△]	2	77.24 ± 21.28	88.76 ± 20.02*

注:与 HBV DNA(-) 治疗 52 周时比较, * $P < 0.01$; 与 HBV DNA(-) 治疗前比较, [△] $P < 0.01$

讨 论

1 拉米夫定与 YMDD 变异 拉米夫定治疗 HBV 时,其作用靶位是 HBV 的 RNA 指导的 DNAP。DNAP 的催化中心存在高度保守的酪氨酸(Y)、蛋氨酸(M)、天冬氨酸(D)、天冬氨酸(D)特殊功能性序列,即 YMDD 基序(YMDD Motif)。YMDD 是 DNAP 结合底物 dNTP、合成 DNA 所必需的最重要的序列,也是拉米夫定抗病毒治疗时常出现变异的区域^[5]。

P 基因可分为 5 个区(A-E),拉米夫定耐药株的 P 基因变异多位于 B 区和 C 区,其中以 C 区 YMDD (一般位于 C 区第 549-552 位氨基酸,即 Y₅₄₉M₅₅₀D₅₅₁D₅₅₂)^[6]变异最为常见。YIDD 和 YVDD 这两种变异虽然使病毒复制水平有所下降,但是对药物产生耐受力,仍然持续复制并致病。拉米夫定治疗 HBV 时,临床上最早于第 28 周左右出现耐药变异。治疗第 52 周时变异发生率大约为 13%~32%,其中 YIDD 和 YVDD 变异几乎各占一半^[7]。本课题拉米夫定(52 周)组 YMDD 变异发生率为 25%(7/28),其中 4 例为 YVDD 3 例为 YIDD。拉米夫定耐药株出现后 1~2 周内,HBV DNA 水平明显升高,可升高 3 个数量级以上,但多数患者 HBV DNA 水平仍低于其治疗前水平。本课题拉米夫定(52 周)组中,治疗 52 周时 HBV DNA 水平略低于治疗前水平,差异无显著性($P > 0.05$)。这是因为,虽然 YMDD 变异株较无变异株对拉米夫定敏感性下降,但病毒本身的复制能力也明显下降。随后 2~4 周出现转氨酶和胆红素的升高,即肝功能损害的表现。本课题拉米夫定组治疗 52 周时 HBV DNA 阳性的患者 ALT 值为(90.34 ± 30.96)IU/L,与治疗前比较无显著性差异($P > 0.05$)。

然而,近来 Kobayashi 等^[8]报道,在保持 ALT 正常达 1 年以上的无症状乙肝病病毒携带者 18 例中,有 5 例检测到 YMDD 基序变异。该 5 例患者均为抗 HBe 阳性,而且有年龄相对较老的趋势。现在认为,自然存在于未经拉米夫定治疗的无症状携带者中的 YMDD 病毒的复制能力较低,且可能不增加肝炎的活动程度。Atkins 等^[9]认为, YMDD 变异株容易出现在携带大量病毒的患者中。因此,年龄相对较老的患者体内存在

自年轻以来的大量病毒,可能会由于宿主长期的免疫压力而导致变异株的产生。

2 补肾方治疗慢性乙型肝炎 慢性乙型肝炎,中医学并无此病名。但中医对其临床表现的症状、体征都有较为详细的描述,分别归属于“胁痛”、“黄疸”、“积聚”等范畴。临床上,慢性乙型肝炎的中医辨证一般认为其发生与湿热疫毒之邪有关,其病机复杂。由于湿热疫毒之邪蕴蒸肝胆而致疏泄失司,脾胃阻遏而运化失常,病势缠绵,久病及肾。因此确立补肾为主、清化为辅的治疗方法。

近 20 余年,我们曙光医院肝科对补肾方治疗慢性乙型肝炎约 200 多例患者进行了系统的临床和实验研究,已证明其在临床症状、体征、血清生化、免疫学及病毒学方面都有一定的作用。同时,也有一定的抗炎、抗纤维化作用^[2]。

3 拉米夫定与补肾方联合用药治疗慢性乙型肝炎 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎有较好的疗效。但耐药株出现时,停药一段时间后病毒又可回复到以野生型占优势,如果再次应用相同药物治疗,其效果更是短暂和有限^[10]。目前,尚未有理想的药物能预防或治疗拉米夫定 YMDD 变异株的产生。补肾方治疗慢性乙型肝炎也有一定的疗效。我们联合应用拉米夫定与补肾方治疗慢性乙型肝炎,初步观察表明,拉米夫定加补肾方 2 组治疗慢性乙型肝炎的 HBV DNA 转阴率高于拉米夫定组,且拉米夫定加补肾方 2 组的 YMDD 变异发生率低于拉米夫定组。以上结果初步表明,拉米夫定与补肾方联合用药能在一定程度上提高治疗慢性乙型肝炎的疗效,并可能减少 YMDD 的变异。这可能为临床上提高治疗慢性乙型肝炎的疗效以及推迟和预防拉米夫定耐药株的发生提供了一种较为有效的方法。两种药物联合应用时,补肾方可能增强了拉米夫定与 DNAP 上位点的结合能力,从而抑制病毒的逆转录和复制过程;同时补肾方可能有稳定 P 基因 B 区和 C 区(YMDD)的作用,或阻止拉米夫定对两个区域的影响,从而减少了变异的发生。此外,拉米夫定与补肾方联合用药,对于调节异常的细胞免疫功能(自然杀伤细胞(NK)、细胞毒性 T 细胞(CTL)和抗体依赖淋巴细胞)以及稳定肝细胞膜可能有一定的作用。因此,深入研

究其疗效机理对于提高中西医结合防治慢性乙型肝炎的水平具有现实的意义和临床应用价值。

参 考 文 献

- 1 孙 剑,侯金林.慢性乙型肝炎核苷类似物治疗过程中耐药性的产生及防治.国外医学内科学分册 1998 ;25(10): 422—425.
- 2 高月求,王灵台,陈建杰.补肾冲剂治疗慢性乙型肝炎的临床研究.上海中医药大学学报 2001 ;15(1):34—36.
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会.病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000 ;8(6):324—329.
- 4 王 虹,万成松,王省良,等.采用 PCR 微板核酸杂交—ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究.中华微生物学和免疫学杂志 2001 ;21(2):234—236.
- 5 Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, et al. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral

- DNA transfection. Hepatology 1999 ;29:939—945.
- 6 Locarnini SA. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. Hepatology 1998 ;27:294—297.
- 7 Dusheiko-G. Lamivudine therapy for hepatitis B infection. Scand J Gastroenterol 1999 ;230(Suppl):76—81.
- 8 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. J Hepatol 2001 ;34(4):584—586.
- 9 Atkins M, Hunt CM, Brown N, et al. Clinical significance of YMDD mutant hepatitis B virus (HBV) in a large cohort of lamivudine-treated hepatitis B patients. Hepatology 1998 ;28:319A.
- 10 Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and take over of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. Hepatology 1998 ;27:1711—1716.

(收稿 2002-11-27 修回 2003-03-10)

中西医结合治疗急性乳腺炎 19 例

卢振花

1992 年以来,我们采用中西医结合治疗急性乳腺炎 19 例,取得较好疗效,并与常规西医治疗 25 例对照,现报告于下。

临床资料 全部病例均符合《黄家驷外科学》(第 5 版.北京:人民卫生出版社,1994:890)的急性乳腺炎的诊断标准。44 例均为健康初产妇,年龄 24~34 岁,体温 38.0~39.5℃。分为两组,治疗组 19 例,平均年龄 28.4 岁,乳腺管堵塞 6 例,乳腺导管堵塞 6 例,乳腺皲裂 3 例,乳头凹陷 5 例,乳汁过多 2 例,乳头过大 3 例,病程 2~5 天 14 例,>6 天 5 例。对照组 25 例,乳腺管堵塞 10 例,乳腺皲裂 7 例,乳头凹陷 6 例,乳头过小 2 例,病程 2~5 天 18 例,>6 天 7 例。两组资料比较,差异无显著性。

治疗方法 治疗组:热敷患侧乳房数分钟后,涂以少许润滑油,医者用五指由乳房四周向乳头方向梳理,沿乳络方向施以正压,将淤积的乳汁逐步推出;按摩的同时,可轻揪乳头数次,以扩张乳头部的乳络,每天 2~3 次。同时服用中药:赤芍 15g,穿山甲 20g,当归 15g,陈皮 10g,连翘 15g,金银花 30g,生甘草 6g,蒲公英 25g,路路通 10g,乳香 5g,没药 5g,每天 1 剂水煎服。必要时加服抗生素。对照组:头孢曲松

钠 3g 加入 10% 的葡萄糖注射液 500ml 中静脉滴注,每天 1 次。发展为脓肿期者局部麻醉下行切开引流排脓。两组治疗 7 天评定疗效。统计学方法:采用 χ^2 检验。

结果 (1)疗效评定标准:治愈:症状、体征消失,血常规正常;好转:症状、体征较治疗前好转,血常规正常或明显改善;无效:症状、体征及血常规均无改善而转手术。(2)疗效:治疗组 19 例治愈 14 例(73.7%),好转 5 例(26.3%);母乳喂养率 100%。对照组 25 例治愈 10 例(40.0%),好转 15 例(60.0%);母乳喂养率 40.3%。两组治愈率比较,差异有显著性($\chi^2 = 4.94, P < 0.05$);治疗组疗效优于对照组。

讨论 急性乳腺炎为产褥期多发病,多由乳头皲裂、畸形、凹陷,影响乳汁排出,导致乳汁淤积、乳络不畅、乳管堵塞而成脓肿。治疗宜解毒散结,理气通络为主。乳房按摩可通乳络。中药方中蒲公英、连翘、金银花消痈散结,赤芍、路路通散瘀、通络而止痛;乳香、没药活血化瘀、消肿止痛;穿山甲活血通经下乳、搜风通络、消肿溃痈、托毒排脓;陈皮疏肝健脾和胃;诸药合用共奏清热解毒、利气散结、消肿止痛之功效。

(收稿 2003-01-20)

北京市复兴医院(北京 100038)