

到 M 蛋白,是 MM 的重要诊断指标之一^[5-6]。本文中血清蛋白电泳的检出率 63.3%,免疫固定电泳检出率达 95.91%,免疫固定电泳检出率明显高于血清蛋白电泳,而且通过免疫固定电泳还可以直接判断 M 蛋白类型。不同的免疫球蛋白类型会出现不尽相同的临床结果,如 IgG 型极易诱发感染;IgA 型 MM 易聚集成多聚体而引起高黏滞血症,易引起高钙血症和高胆固醇症;IgM 型 MM 发病年龄相对较年轻,易见髓外浸润,骨质硬化等;轻链型 MM 由于瘤细胞合成的异常免疫球蛋白重链比例失衡,过多的轻链分泌,而轻链分泌又很小,可通过肾小球,沉积于肾小管上皮细胞,使之变性,造成肾功能损害,其中又以 μ 链引起的肾功能损害最为多见。有文献报道 IgA 型和轻链型预后较差^[6],所以免疫固定电泳通过对 M 蛋白的分型,对 MM 的预后治疗具有一定意义,而且简便切实可行,适用于临床常规应用。作者认为近年来本病的发病率确有增加趋势,发病率的增高应与先进医疗技术在临床的应用有很大关系,也是检出病例增多的重要因素。

在临床实践中,凡遇中老年患者血清总蛋白和球蛋白明显增高,清蛋白降低,清蛋白/球蛋白比率严重倒置,尿蛋白阳性或慢性肾炎,肾衰竭,贫血患者,均应考虑 MM 的可能,应建议临床做骨髓检查、血清蛋白电泳、免疫固定电泳等相关检查以求确诊。

参考文献

- [1] Ronald Hoffman, Edward Benz, Sanford Shattil, et al. Hematology-basic principles and practice[M]. 4th ed. New York:Churchill Livingstone, 2005:501-1505.
- [2] 张伯龙,徐君东.血液病误诊误治与防范[M].北京:科学技术文献出版社,2002:111-121.
- [3] 詹其林,许小平.多发性骨髓瘤 102 例临床分析[J].中华新医学,2002,3(7):591-592.
- [4] 王彩云,杨敬芳,田亚平. SEBIA 电泳仪及其配套试剂测定血清蛋白电泳的方法学评价[J].现代检验医学杂志,2003,18(2):6-7.
- [5] 刘金英,翟玉华,孙卫红.免疫固定电泳技术在 M 蛋白免疫分型中的应用[J].现代检验医学杂志,2006,21(5):57.
- [6] 刘汐盈,孙淑艳,宋媛媛.血清免疫固定电泳、蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量对多发性骨髓瘤临床诊断价值探讨[J].中国实验诊断学,2010,14(5):680-681.

(收稿日期:2012-08-09 修回日期:2012-11-05)

• 临床研究 •

40 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV P 基因变异及突变频率检测

赵建华,吴月平(江苏省南通市第三人民医院 226006)

【摘要】 目的 观察核苷(酸)类药物不同时间段慢性 HBV 感染患者血清乙型肝炎病毒聚合酶(HBV P)基因序列变异特点及突变频率。**方法** 运用焦磷酸测序仪器配套的软件 Assay Design SW 在目的区域两端保守区域设计 PCR 引物及测序引物,采用套式 PCR 方法检测血清中 HBV-DNA,按照 PyroMark ID 遗传分析系统用 SNP 模式进行 PCR 产物 HBV 相关位点的焦磷酸测序;40 例慢性 HBV 感染患者进行 P 基因变异、突变频率检测的同时测定 HBV-DNA、HBV M、ALT。**结果** 40 例患者中 18 例发生变异,变异模式以经典突变 L180M、M204V/I、A181V/T、N236T 突变为主,加少量 V173L、S202G 突变;发生变异者耐药突变型在样本中所占比例由 20%到 100%;HBV P 基因变异可以在 HBV-DNA、ALT 发生突破前、中、后检出;HBsAg、HBeAb 阳性者 P 基因变异率分别为 46.2%(12/26)、41.7%(5/12)($P>0.05$),两例 HBeAg、HBeAb 均阴性者中 1 例 P 基因区变异。**结论** 焦磷酸测序可以快速、准确的检测出 HBV P 基因变异;HBV P 基因变异模式、突变频率与核苷类药物敏感性密切相关。

【关键词】 乙型肝炎病毒; P 基因; 准种; 变异

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)05-0579-03

拉米夫定(LAM)在临床应用过程中耐药发生率较高,治疗 1 年,其基因型耐药率为 14%~32%,治疗 5 年后,此耐药率达到 60%~70%。阿德福韦酯(ADV)对 HBV 野生株和 LAM 耐药株均有明显抑制作用。恩替卡韦(ETV)对 HBV 复制有较强的抑制能力,其治疗 5 年的基因型耐药率为 1.2%,临床耐药率为 0.8%。多个核苷类抗病毒药物联合或序贯治疗可导致对多个核苷类似物耐药的 HBV 毒株产生。HBV 以称为“准种(quasispecies)”的遗传学上紧密联系而又互不相同的变异群体的形式存在于任一宿主体内,在环境压力和自身适应力的共同选择下不断进化。本试验对接受核苷(酸)类药物治疗的慢性乙型肝炎患者的血清、病毒学标志物及体内 HBV 准种的演变进行了初步研究,以探讨乙型肝炎病毒聚合酶(HBV P)基因变异特点、突变频率及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2008 年 12 月至 2011 年 6 月南通市第三人民医院感染科送检的 40 例慢性乙型肝炎患者血清标本进行 HBV P 基因分析,其中男性患者 34 例,女性患者 6 例。年龄 22~63 岁。患者分别处于接受核苷(酸)类药物治疗前、中、后,有完整的核苷(酸)类治疗病史记录,单用拉米夫定(LAM)3 例、阿德福韦酯(ADV)3 例、恩替卡韦(ETV)3 例、替比夫定(L-dT)3 例,28 例序贯治疗或联合治疗均在临床治疗欠佳或出现病毒学甚至生物化学突破时使用。

1.2 方法

1.2.1 HBV 血清标志物检测 HBsAg、HBeAg、HBeAb、HBcAb 采用微粒酶免疫法检测(MEIA 法,Abbott 试剂),血清中 HBV-DNA 含量检测采用荧光 PCR 法(上海科华

试剂)。

1.2.2 血清 HBV-DNA 的抽提 血清标本复融后,取 50 μ L,加入 50 μ L 浓缩液,13 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,往沉淀中加入 50 μ L 裂解液,煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,上清液作为 PCR 模板用于检测。

1.3 仪器及设备 定性 PCR 扩增仪:PE9700;焦磷酸测序仪:Qiagen 公司 PyroMarkTM ID 遗传分析系统;ABI7500 荧光 PCR 仪;雅培 AXSYM 免疫分析仪;奥林巴斯 AU2700 生化仪;WD-9413A 凝胶成像仪。

1.4 引物设计和合成、PCR 产物检查、PCR 产物的焦磷酸测序委托南京迪安医学检验所完成。测序:按照 PyroMark ID 遗传分析系统和配套试剂盒说明书,用 SNP 模式进行 PCR 产物 HBV 相关位点的焦磷酸测序。结果分析:根据检测序列的碱基序列判断突变类型,特有的基因频率分析,可准确获得病毒突变株的比例。

2 结 果

40 例慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗时间 0~80 个月不等;5 例患者基线时进行变异株检测结果呈阴性;40 例患者中 18 例发生变异占较高比例,其中单点变异 M204V/I 2 例、A181V/T 1 例、V173L 1 例,两点或三点变异分别为 L180M+M204V/I 7 例、V173L+M204V/I 1 例、L180M+N236T 1 例、A181V/T+N236T 1 例、V173L+L180M+M204V/I 2 例、A181V/T+N236T+M204V/I 1 例, L180M+M204V/I+S202G 1 例,未检出 I169T、T184G、A194T、M250V 等突变;突变频率 20%~100%;变异株中 M204V/I 突变频率高(14 例患者中 12 例为 100%),未见单独 L180M 变异;HBV P 基因区变异株可以在 HBV-DNA、ALT 发生突破前、中、后检出;HBeAg、HBeAb 阳性者 P 基因变异率分别为 46.2%(12/26)、41.7%(5/12)($P>0.05$),2 例 HBeAg、HBeAb 均阴性者中 1 例 P 基因区变异。详细信息见表 1。

表 1 40 例慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗与基因变异模式的关系

治疗药物与方案	n	变异模式	变异例数
单用 LAM 治疗	3	M204V/I	1
		L180M+M204V/I	1
LAM 治疗后序贯、联合治疗	15	V173L+M204V/I	1
		V173L	1
		V173L+L180M+M204V/I	2
		L180M+M204V/I+S202G	1
		M204/I	1
		A181V/T+N236T	1
		L180M+N236T	1
单用 ADV 治疗	3	未检出	0
ADV 治疗后序贯、联合治疗	4	A181V/T	1
		L180M+M204V/I	2
单用 L-dT 治疗	3	L180M+M204V/I	1
L-dT 治疗后序贯、联合治疗	3	L180M+M204V/I	2
单用 ETV 治疗	3	L180M+M204V/I	1
ETV 治疗后序贯、联合治疗	2	未检出	0
单用 IFN 治疗	1	未检出	0
IFN 治疗后序贯、联合治疗	3	A181V/T+N236T+M204V/I	1

注:LAM 为拉米夫定,ADV 为阿德福韦酯,L-dT 为替比夫定,ETV 为恩替卡韦;国际通用命名格式(以 RT 区第一个氨基酸为第 1 位,野生型的氨基酸写在其前,若发生氨基酸替换写在其后)。

3 讨 论

本文资料显示,抗病毒治疗基线时未检出变异株,Zhang

等^[1]用基因克隆的方法研究了 5 例拉米夫定治疗 48 周血清 HBV-DNA 仍为阳性的慢性乙型肝炎患者,分别对治疗前和治疗 48 周的血清进行 RT 区基因克隆,每个样本挑取 20~24 个克隆,发现在治疗前 3 例患者血清中已存在 YMDD 变异株,比例分别为 9.5%、4.5%和 5.6%,治疗 48 周时有 2 例 YMDD 变异株成为优势株并发生病毒学和生化学突破,这可能与实验方法不同、选择病例有关,作者以往研究亦发现治疗前血清中 YMDD 变异株的存在^[2]。本研究 40 例患者中 18 例发生变异占较高比例,其中单点变异 M204V/I 2 例、A181V/T 1 例、V173L 1 例,两点或三点变异分别为 L180M+M204V/I 7 例、V173L+M204V/I 1 例、L180M+N236T 1 例、A181V/T+N236T 1 例、V173L+L180M+M204V/I 2 例、A181V/T+N236T+M204V/I 1 例, L180M+M204V/I+S202G 1 例,未检出 I169T、T184G、A194T、M250V 等突变;而邓俊等^[3]报道发现了 V207I、S256C、A222T、L229V 等耐药相关变异,这与治疗时间长短、多种药物序贯联合治疗有关。变异株中 M204V/I 突变频率高(14 例患者中 12 例为 100%),未见单独 L180M 变异。这是由于 M204V/I(YMDD 变异)被称为主要耐药突变,它的出现可大大降低病毒对拉米夫定的敏感性,而其余的变异则被称为代偿变异,常常与 YMDD 变异同时出现,一定程度上能够恢复 YMDD 变异病毒的复制能力^[4]。本研究从 40 例患者临床用药种类与变异模式的关系发现,L180M、M204V/I 变异与拉米夫定、替比夫定和恩替卡韦耐药相关,V173L 突变与拉米夫定耐药相关,S202G 与阿德福韦耐药相关;A181V/T、N236T 突变与阿德福韦耐药相关。HBeAg、HBeAb 阳性者 P 基因变异率分别为 46.2%(12/26)、41.7%(5/12)($P>0.05$),2 例 HBeAg、HBeAb 均阴性者中 1 例 P 基因区变异。而 Lim 等^[5]在研究 HBV 前 C/C 基因区准种演变与 IFN 治疗后 HBeAg 血清转换的关系,发现发生 HBeAg 血清转换的患者在转换前的准种多样性和变异频率明显高于未发生 HBeAg 血清转换者,且在发生转换后,准种多样性明显高于转换前,认为 HBeAg 血清转换前准种多样性增高可能与打破免疫耐受有关,随着免疫应答的增强,反过来促进 HBV 免疫逃逸,使准种多样性增加,作者准备扩大临床样本进一步研究。HBV P 基因区变异株可以在 HBV-DNA、ALT 发生突破前、中、后检出,结合 HBV P 基因区变异模式和突变频率来看:核苷(酸)类药抗病毒治疗过程中 HBV P 基因准种大体变化为野生株为优势株—野生株与变异株共存—变异株转化为优势株,HBV P 基因区变异和突变频率动态检测有利于临床疗效判断。

参考文献

[1] Zhang X,Liu C,Gong Q,et al. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy[J]. J Gastroenterol Hepatol,2003,18(12):1353-1357.

[2] 王陆军. 拉米夫定治疗过程中乙型肝炎病毒变异的分析[J]. 交通医学,2001,15(5):503-504.

[3] 邓俊,张东华,于德敏,等. 核苷(酸)类耐药患者中乙型肝炎病毒逆转录酶区基因变异类型及其特点[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(5):342-345.

[4] Ono SK,Kato N,Shiratori Y,et al. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance

[J]. J Clin Invest, 2001, 107(4): 449-455.

Gastroenterology, 2007, 133(3): 951-958.

[5] Lim SG, Cheng Y, Guindon S, et al. Viral quasi-species e-
volution during hepatitis Be antigen serocon version[J].

(收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-11-09)

• 临床研究 •

酒精依赖患者血流变学指标观察与分析

庄华琴, 吴琦珀, 薛启云, 黄肖峰(福建省泉州市第三医院检验科 362000)

【摘要】 目的 观察酒精依赖患者血液流变学指标的变化。**方法** 采用血液流变仪分别对男性酒精依赖患者
和男性健康体检者进行血流变学指标全血黏度(高、中、低切)及血浆黏度检测。**结果** 酒精依赖患者血流变学指标
中全血黏度、血浆黏度均有不同程度的改变, 与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 酒精依赖患
者血流变学各项检测均高于健康体检者, 对酒精依赖的患者治疗与预防具有重要意义。

【关键词】 酒精依赖; 全血黏度; 血浆黏度
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 05. 035 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)05-0581-01

近年来, 越来越多的资料表明, 长期大量饮酒会造成酒
精依赖, 酒精依赖除诱发严重精神障碍、心脑血管及肝肾等严
重疾病外, 还引起家庭和社会的经济、安全等问题^[1]。有文献
报道对住院酒精依赖患者进行血液流变学和血脂的检测, 发现
患者的全血高、中、低切黏度、血浆黏度比健康人显著增高^[2]。
本文选择了 80 例酒精依赖患者组和 80 例健康对照者进行血
流变学指标的检测, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 1 月至 2010 年 12 月在本院住
院的 80 例酒精依赖患者, 均符合《中国精神障碍与诊断标准》
第 3 版诊断标准, 均为男性, 年龄 35~70 岁, 平均(39.5±2.2)
岁, 平均体质量(68±6.1)kg。同时随机抽取相近 80 例健康男
性体检人员作为健康对照组, 年龄 28~65 岁, 平均(33.5±
2.5)岁, 平均体质量(64±5.6)kg。两组在年龄和体质量上差
异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 仪器与方法 采用重庆天海 MVIS-2015 全自动血液流
变分析系统, 测定全血黏度高切、全血黏度中切、全血黏度低切
和血浆黏度。重庆天海厂家提供正常参考范围: 全血黏度高切
200/s 参考值范围 5.12~6.16(mPa·s), 全血黏度中切 30/s
参考值范围 5.67~6.90(mPa·s), 全血黏度低切 3/s 参考值
范围 9.48~12.23(mPa·s), 血浆黏度参考值范围 1.41~
1.63(mPa·s)。抽取肘静脉血 4.5 mL 加入肝素抗凝试管内
摇匀, 进行血流变学指标的检测。

1.3 统计学方法 数据处理采用 SPSS11.0 软件分析, 计量
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有
统计学意义。

2 结果

80 例酒精依赖患者的全血黏度(高、中、低切)及血浆黏度
均高于健康对照组($P<0.01$), 见表 1。

表 1 两组血液黏度的比较(mPa·s)					
组别	n	全血黏度			血浆黏度
		高切(200/s)	中切(30/s)	低切(3/s)	
酒精依赖组	80	6.75±0.58*	8.65±0.89*	12.79±1.66*	1.89±0.32*
健康对照组	80	5.55±0.40	7.73±0.54	11.14±1.40	1.49±0.11

注: 与健康对照组比较, * $P<0.01$ 。

3 讨 论

正常饮酒后 1~1.5 h 血液浓度达到高峰, 乙醇在体内分

解很快, 肝脏每小时能通过化使 7~8 g 乙醇分解, 并产生毒性
较强的中间产物乙醛, 过量饮酒可导致肝脏、脑、心脏的损害,
国内外均有报道^[3-4]。而红细胞变形指标显著降低。酒精依赖
患者长期大量饮酒, 造成肝脏酒精中毒, 影响了肝脏的代谢功
能, 导致纤维蛋白原升高。由于肝脏的损害, 降解胆固醇和三
酰甘油的酶系统减弱, 导致两者在血中的浓度增高又使血浆黏
度增加, 从而增加全血黏度^[5]。另外血液中大量的乙醇也会影
响红细胞的流变性, 可使红细胞的聚集性增强, 凝血功能增强,
红细胞内黏度增大, 刚性增强^[6]。血液中胆固醇和三酰甘油的
增高, 会导致红细胞膜发生变异, 流动性下降, 变形能力降低,
全血还原黏度增高, 也就增强了红细胞的刚性^[7], 导致脑及全
身器官微循环灌注障碍, 血栓栓塞性疾病的发生率也会显著
增高。

因此, 对住院的酒精依赖患者应进行常规的血液流变检
测, 在治疗过程中注意血液的高黏滞现象, 防止并发症的发生。
本文研究发现, 酒精依赖患者组的血流变学指标, 其中全血黏
度(高、中、低切)及血浆黏度等均高于健康对照组($P<0.01$)。
综上所述, 血液流变学指标检测对酒精依赖的诊断、治疗与预
防具有十分重要的意义。

参考文献

[1] 郝伟, 曹栋, 于欣. 我国饮酒现状及相关问题[J]. 中国药
物依赖性杂志, 2007, 16(3): 193-197.

[2] [澳]L. 丁坦法思. 血液流变学在诊断及预防医学中的应
用[M]. 北京: 科学出版社, 1981.

[3] 武汉医学院. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出
版社, 1985: 58-90.

[4] [德]W. 亥克尔. 食品化学与营养学[M]. 北京: 人民卫生
出版社, 1981: 17-124.

[5] 张新生, 郭小春, 朱宇椿, 等. 高脂血症与血液流变学相关
性研究报告[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(3): 345-346.

[6] 秦任甲. 临床血液流变学[M]. 北京: 北京大学医学出版
社, 2003: 6.

[7] 邵宪林. 胆固醇、甘油三酯与血流变的关系探讨[J]. 泰山
医学院学报, 2006, 27(4): 353-354.

(收稿日期: 2012-08-20 修回日期: 2012-12-07)