

· 论 著 ·

核苷类似物干预下慢性乙型病毒性肝炎患者 HBV 多聚酶区基因突变检测分析

谭朝霞, 汤影子[△], 况雪梅, 范 熠, 丁世涛

(第三军医大学西南医院全军感染病研究所, 重庆 400038)

摘要:目的 研究重庆地区慢性乙型病毒性肝炎(慢乙肝)患者核苷类似物治疗过程中 HBV 多聚酶区(P)基因变异情况。方法 选取 350 例接受核苷类似物治疗后出现病毒学突破的慢乙肝患者作为研究对象, 采用 PCR 产物直接测序法, 分析 HBV P 区基因变异发生情况。结果 350 例患者中有 124 例检测出基因型耐药, C 基因型在基因型耐药患者中所占比例显著高于无基因型耐药患者的比例($P < 0.001$)。突变类型共计 23 种, 其中以 rtM204I 突变最多见(41, 33.1%), 其次为 rtL180M/rtM204V 联合突变(25, 20.1%)。主要核苷类似物耐药所占比例最高为拉米夫定(60.5%), 其次为阿德福韦(21.8%)及替比夫定(16.1%)。结论 HBV P 区基因耐药的氨基酸突变复杂多变, rtM204V/I 突变最为常见。基因 C 型患者更易出现基因型耐药。

关键词:肝炎; 乙型; 基因型; 药物耐受性; 乙型肝炎多聚酶区基因突变; 核苷类似物

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)13-1254-03

Mutation patterns in polymerase gene for chronic hepatitis B patients with nucleotide analogue therapy

Tan Zhaoxia, Tang Yingzi[△], Kuang Xuemei, Fan Yi, Ding Shitao

(Institute for Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mutation patterns in the polymerase gene for chronic hepatitis B patients with nucleotide analogue therapy in Chongqing area. **Methods** Serum samples from 350 chronic hepatitis B patients with virologic breakthrough during nucleotide analogue therapy were studied. Using the PCR-sequencing method, the resistant mutation patterns in the polymerase gene of hepatitis B virus (HBV) were analyzed. **Results** Resistant mutations were detected in 124 patients. The proportion of HBV genotype C in the patients with resistant mutation was significantly higher than that in the patients without resistant mutation ($P < 0.001$, $\chi^2 = 25.385$). 23 types of resistant mutations were detected, in which the ratio of rtM204I mutation was the highest ($n = 41, 33.1\%$), and rtL180M/rtM204V combined mutation came to be the next ($n = 25, 20.1\%$). For all the patients with genotype resistance, 60.5% patients showed lamivudine-resistant mutations, while 21.8% and 16.1% showed adefovir and telbivudine-resistance respectively. **Conclusion** There are many types of mutation patterns in the polymerase gene for chronic hepatitis B patients receiving nucleotide analogue therapy. The patients with HBV genotype C may be more susceptible to develop resistant mutations.

Key words: hepatitis B; genotype; drug tolerance; mutation; nucleotide analogue

乙型肝炎病毒(HBV)可在慢性持续性感染、机体免疫压力或抗病毒药物治疗过程中发生变异,近年来随着越来越多的核苷(酸)类似物如拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LDT)等在临床上的广泛运用,HBV 耐药问题日益突出,已成为慢性乙型病毒性肝炎(慢乙肝)患者长期抗病毒治疗的主要障碍。本文探讨重庆地区核苷类似物治疗后 HBV 多聚酶(P 区)基因突变的主要类型、发生频率及其与 HBV 基因型的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 350 例患者均为 2008 年在西南医院门诊就诊的患者,诊断符合 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》标准^[1],其中男 264 例,女 86 例,平均年龄 34.6 岁;所有患者服用核苷类似物的时间均超过 1 年以上,且治疗过程中出现病毒学突破(HBV DNA 较最低值升高超过 2 log₁₀ copies/mL)。

1.2 方法

1.2.1 血清 HBV DNA 提取 采用上海复兴公司生产的核酸提取试剂提取 HBV DNA,100 μ L 血清中加入 100 μ L 核酸提取液 A,震荡混匀 10 s,12 000 r/min 离心 10 min,负压抽干上清液;向沉淀内分别加入 25 μ L 核酸提取液 B,震荡混匀

10 s,100 $^{\circ}$ C 保温 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,上清液作模板。

1.2.2 引物设计 根据 HBV P 区基因的保守序列,目的片段扩增采用巢式 PCR。用 Primer Premier 5.0 软件包设计引物序列,引物由上海生工生物技术公司合成,序列为:外侧正向引物 ESP:5'-AGG CCT TAT AAG TTG GCG A-3',反向引物 EAP:5'-TCC TGC TCA AGG AAC CTC TA-3';内侧正向引物 ISP:5'-CY(T/C)T GTA TTC CCA TCC CAT C-3',反向引物 IAP:5'-TGA CAT ACT TTC CAA TCA ATA GG-3'。目的片段共 370 bp,涵盖了目前已知的主要 HBV 核苷类抗病毒药物耐药突变位点。

1.2.3 PCR 反应体系 第 1 轮扩增体系:10 \times PCR buffer 2.5 μ L,25mM MgCl₂ 1.5 μ L,10 μ M dNTP 2 μ L,ESP、EAP 各 1 μ mol/L,Taq 酶 1 U,DNA 模板 2 μ L,灭菌水加至 25 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第 2 轮扩增体系:10 \times PCR buffer 5 μ L,25mM MgCl₂ 3 μ L,10 μ M dNTP 4 μ L,ISP、IAP 各 1 μ mol/L,Taq 酶 2 U,第 1 轮产物 1 μ L,灭菌水加至 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,72

[△] 通讯作者, Tel:15023099161; E-mail:tangyingzi@sina.com。

℃ 50 s 扩增 30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物进行电泳鉴定,其余产物送上海生工测序,测序仪采用 ABI 3730。

1.2.4 试剂和仪器 25 mM MgCl₂, 10 μM dNTP, Taq 酶、10×PCR Buffer、DL2000 DNA Marker 均购自 TakaRa 宝生物科技有限公司,PTC-225 Peltier Thermal Cycler 热循环仪购自 MJ RESEARCH 公司。

1.2.5 HBV 基因型、P 区基因的序列及编码氨基酸的分析方法 以 NCBI 基因型中 23 株基因型为 A~H 型的 HBV 全基因组标准序列为参照来确定基因型;采用 BIOEDIT 软件包(版本 7.0.9)进行核酸和氨基酸序列的比对,分析氨基酸的变异,用于比对的参考序列包括:A 型(M57663 和 X02763)、B 型(D00331 和 D00329)、C 型(AY123041 和 X75656)及 D 型(X02496 和 X97848)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理,组间率的比较采用 Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因型分布 350 例患者中,有 124 例(36%)患者检测出基因型耐药,124 例基因型耐药患者中 B 基因型 23 例(18.5%),C 基因型 101 例(81.5%);226 例无基因型耐药患者中 B 基因型 103 例(45.6%),C 基因型 123 例(54.4%),C 基因型在基因型耐药患者中所占比例显著高于无基因型耐药患者的比例($\chi^2 = 25.385, P < 0.001$)。

2.2 耐药突变类型 单纯 rtM204I 突变 41 例(33.1%),单纯 rtM204V 突变 1 例(0.8%),单纯 rtS213T 突变 2 例(1.6%),单纯 rtV207M 突变 4 例(3.2%),单纯 rtA181T 突变 6 例(4.8%),单纯 rtA181V 突变 7 例(5.6%),单纯 rtN236T 突变 4 例(3.2%),单纯 rtM250I 突变 1 例(0.8%),出现 rtM204V/rtL180M 突变 25 例(20.2%),rtM204I/rtV207L 突变 3 例(2.4%),rtM204V/rtS213T 突变 1 例(0.8%)。rtM204V/rtL180M/rtV207L/rtS213T 突变 1 例(0.8%),rtM204I/rtM250L 突变 1 例(0.8%),rtM204I/rtL180M 突变 8 例(6.5%),rtM204V/rtL180M/rtV173L 突变 6 例(4.8%),rtM204I/rtS213T 突变 3 例(2.4%),rtM204V/rtL180M/rtA181T/rtN236T 突变 1 例(0.8%),rtA181T/rtN236T 突变 1 例(0.8%),rtA181V/rtQ215H 突变 1 例(0.8%),rtA181S/rtN236T 突变 1 例(0.8%),rtA181V/rtN236T 突变 1 例(0.8%),rtA181T/rtN236T 突变 4 例(3.2%),rtS213T/rtN236T 突变 1 例(0.8%),合计 23 种突变类型。

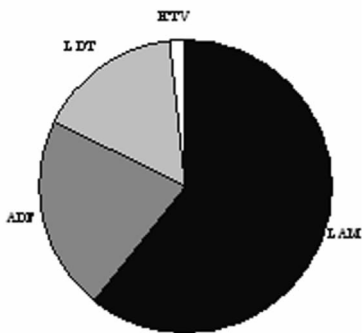


图 1 主要核苷类似物耐药所占比例

2.3 核苷类似物耐药所占比例及其突变类型 主要核苷类似物耐药所占比例见图 1。LAM 耐药率为 60.5%(75/124),204

位点变异率为 92%(69/75),其中 rtM204V 占 45%(34/75),rtM204I 占 46.7%(35/75);rtL180M 位点变异率为 53.3%(40/75),全部合并有 rtM204V/I 变异;207 位点变异率为 9.3%(7/75);213 位点变异率为 9.3%(7/75)。ADV 耐药率为 21.8%(27/124),其中 181 位点单独变异占 48.1%(13/27),236 位点单独变异占 14.8%(4/27),181/236 联合变异占 25.9%(7/27),rtS213T/rtN236T 变异率为 3.7%(1/27),rtA181V/rtQ215H 变异率 3.7%(1/27),rtM204V/rtA180M/rtA181T/rtN236T 变异 1 例 3.7%(1/27),为 LAM 及 ADV 序贯治疗中出现的变异。ETV 耐药率为 1.6%(2/124),rtM250I 单独变异 1 例,rtM250I 联合 rtM204I 变异 1 例。LDT 变异率为 16.1%(20/124),全部为 rtM204I 变异。

3 讨 论

我国是慢乙肝的高发区,抗病毒治疗是慢乙肝治疗的一个重要方面。核苷类似物由于血清 HBV DNA 短期转阴率高、不良反应少、服用简便等特点,在临床上已得到广泛应用。现已发现,有些病例在长期用药过程中发生了耐药,形成耐药性的机制是由于长期用药后诱导了 HBV P 区基因突变^[2]。核苷类药物中 LAM 耐药率最高,亚洲一项多中心研究显示 LAM 治疗 1、2、3、4、5 年 YMDD(酪氨酸-甲硫氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸)变异发生率分别为 15%、38%、55%、67%、69%,提示 LAM 疗程越长,HBV P 区变异发生率越高^[3]。有资料显示,未用药也有可能发生 HBV P 区基因原发耐药变异,变异率达 3.0%左右^[4]。因此首次选择核苷药物治疗,最好进行基因耐药变异检测,以排除原发耐药。

本研究显示对核苷类似物耐药的患者的比例依次为 LAM > ADV > LDT > ETV。HBV P 区基因变异位点及类型较为复杂,rtM204 为 LAM 主要突变位点与以往报道一致^[5]。其中以 rtM204I 突变最常见,为 41 例(33.1%),其次 rtM204V 联合 rtL180M 突变为 25 例(20.1%),rtM204I 联合 rtL180M 突变 8 例(6.5%),单纯 rtA181V/T 突变 13 例(10.5%),单纯 rtN236T 突变 5 例(4%),rtA181 联合 rtN236T 突变 7 例(5.6%)。L180M 变异均在 M204I/V 变异基础上发生,无 1 例单独发生,这与尹波等^[6]的观点一致。

LAM 耐药毒株对 ADV 均敏感,而 ADV 耐药毒株对 LAM 也是敏感的^[7]。ETV 是 2006 年上市的最新口服核苷类药物,其抑制病毒作用强于 LAM,ETV 耐药率低且具有高耐药基因屏障,其治疗耐药 HBV 的疗效比 ADV 强 50 倍,ADV 耐药毒株仍对 ETV 敏感^[8]。因此,如果经济条件允许,核苷类似物初治患者应首选 ETV。相关研究表明,治疗过程中,不同的变异会先后出现,而且新的变异有可能代替先前的变异,联合变异(如 rt173、rt180 等)可使病毒的复制能力明显上升^[9]。因此,检测 HBV P 区基因变异发生率对于抗病毒疗效具有十分重要的意义。

目前发现的 HBV 基因型可以分为 A~H 共 8 种^[10-12],在中国大陆地区,主要为 B 和 C 基因型,其中南方以 B 基因型为主,北方以 C 基因型为主^[13]。作者采用 2 次 PCR 扩增后测序,在 NCBI 软件上直接分型。结果显示本研究纳入的 300 多例患者均为基因 B、C 型,未检测出 D、E、F、G 基因型,C 型患者所占比例大于 B 型患者^[14]。本研究 124 例 P 区基因耐药变异的患者中 C 基因型占 81.5%,其比例显著高于有病毒学突破而未检测出耐药变异的患者($P < 0.001$),由此可见 HBV C 基因型的患者更容易出现耐药,基因型的检测结果还可以为医生提供判断预后的依据,从而制订个体化治疗方案^[15]。

本研究中有 226 例患者出现病毒学突破,但在 HBV P 区基因 180、204、215、213、181、236、250 等位点均未检测出变异,分析其原因可能为患者服药不规则出现漏服,或药品保管不善,近期有劳累或饮酒情况,或检测方法不够敏感而导致漏检^[16]。

参考文献:

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329.
- [2] Natsuzaka M, Hige S, Ono Y. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region[J]. J Viral Hepat, 2005, 12(2): 154-159.
- [3] Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-wide epidemiology of 531 Chinese HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants[J]. J Viral, 2002, 9: 52-61.
- [4] 孙海平, 王磊, 杨芳. 核苷(酸)类似物相关 HBV P 基因耐药变异焦磷酸测序[J]. 山东大学医学报: 医学版, 2010, 48(5): 85-88.
- [5] 赵卫峰, 邵幼林, 甘建和, 等. 拉米夫定耐药 HBV 毒株 RT 区变异分析[J]. 中国实用内科杂志, 2008, 28(2): 119-121.
- [6] 尹波, 安萍, 曹艳雪, 等. P 基因区耐药检测在核苷类药物治疗乙型肝炎中的价值[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 13(2): 134-136.
- [7] Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase[J]. Gastroenterology, 2003, 125: 292-297.
- [8] Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated

interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial [J]. Lancet, 2005, 365: 123-129.

- [9] Li MW, Hou W, Wo JE, et al. Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6(7): 664-667.
- [10] Norder H, Courouce AM, Magius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes[J]. Virology, 1994, 198(2): 489-503.
- [11] Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene[J]. Intervirology, 1995, 38(1): 24-34.
- [12] Stuyver L, Ddgent S, Van Gety C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. Gen Virol, 2000, 81(1): 67-74.
- [13] 吕志武, 许军, 殷积美, 等. 我国南北两城市乙型肝炎病毒血清型和基因型的调查研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(2): 95-96.
- [14] 王其亮, 李旭. HBV 基因型分布与慢性乙肝临床关系的研究[J]. 安徽医学, 2010, 14(7): 781-783.
- [15] 邓少丽, 黄恒柳, 陈伟, 等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 249-251.
- [16] 何煦, 江南. 拉米夫定耐药者乙肝病毒 P 基因区的突变分析[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 38(5): 895-896.

(收稿日期: 2010-05-18 修回日期: 2010-10-12)

(上接第 1253 页)

- 1996, 19(10): 417-422.
- [3] 刘道宽. 帕金森治疗的研究现状[J]. 临床神经病学杂志, 2003, 16(2): 65-68.
- [4] 张宇清, 李勇杰. 神经核团毁损术治疗帕金森病[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2004, 17(3): 178-182.
- [5] 吴琦, 杨天明, 钱志余, 等. 近红外光谱技术在帕金森病大鼠脑组织射频毁损术中的应用[J]. 现代医学, 2008, 36(4): 225-229.
- [6] Rinder RS, Niemer WT. A stereotactic atlas of the cat brain[M]. The university of Chicago Press, 1996. 25-30.
- [7] 林祥涛, 刘树伟, 侯中煜, 等. 猫脑内出血模型的建立及 MRI 评价[J]. 解剖学杂志, 2004, 27, 3.
- [8] Stherland GR, Perron JT, Kozlowski P, et al. AR-R 15896AR reduces cerebral infarction volumes after focal ischemia in cats [J]. Neurosurgery, 2000, 46: 710-719.
- [9] Adriana M, Eugene C, Josep H, et al. Five-year follow-up of unilateral posteroventral pallidotomy in Parkinson's disease[J]. Surg Neurol, 2009, 71(5): 551-558.
- [10] Vinas FC, Zamorano L, Dujovny M, et al. In vivo and in vitro study of the lesions produced with a computerized

radiofrequency[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 1992, 58(1): 1211.

- [11] Cosman ER, Nashold BS, Bedenbaugh P. Stereotactic radio2 frequency lesion making [J]. App Neuropsychol, 1993, 46(2): 1601.
- [12] Alberts WW, Wright EW, Feinstein B, et al. Experimental radio2 frequency brain lesion size as a function of physical parameters[J]. J Neurosurg, 1966, 25(4): 4211.
- [13] Favre J, Burchiel KJ, Taha JM, et al. Outcome of unilateral and bilateral Pallidotomy for Parkinson's disease: patient assessment[J]. Neurosurgery, 2000, 46(3): 344.
- [14] 陶振玉, 杨天明, 钱志余, 等. 体内外射频热凝毁损灶体积的相关性分析[J]. 江苏医药, 2010, 36(9): 1058-1061.
- [15] Higurki Y, Iacono RP. Surgical complications in patients with Parkinson's disease after posteroventral pallidotomy [J]. Neurosurgery, 2003, 52(3): 558.
- [16] 王启弘, 杨富明, 杨世春, 等. 定向射频毁损脑组织的生物学研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 1995, 8(4): 19-21.

(收稿日期: 2010-11-10)