

· 临床研究 ·

永川地区慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及耐药性研究*

代红莹¹, 王世伟^{2△}, 朱天金¹, 王科¹

(重庆医科大学附属永川医院: 1. 检验科, 2. 感染科 402160)

摘要:目的 探讨永川地区慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒类型分布、耐药情况及其临床意义。方法 采用基因芯片法对 605 例慢性乙型肝炎患者经核苷(酸)类似物治疗后, 进行耐药情况分析, 并对发生耐药的乙型肝炎 DNA 进行分析。结果 永川地区 605 例慢性乙型肝炎患者的基因分型以 B 型为主 63.1%, 116 例慢性乙型肝炎患者出现不同位点耐药, 耐药率为 19.17%。耐药突变型以 B 型为主, 其中对阿德福韦酯耐药占所有耐药突变的 49.14% 且以 B 型逆转录酶 236T 为主, 为 35.09%; 拉米夫定耐药以 B 型逆转录酶 108 M 为主, 占 34.29%, 荧光定量 PCR 仪检测发现发生耐药患者的病毒复制数与未发生耐药患者病毒复制数存在差异($P < 0.05$)。结论 监测慢性乙型肝炎患者 HBV 耐药基因突变情况, 有助于早发现临床乙型肝炎耐药患者, 指导临床合理应用抗病毒药物治疗乙型肝炎, 提高治疗效果。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因型; 抗药性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4395-02

The study on genotypes and drug resistance-mutations of HBV in chronic hepatitis B patients in Yongchuan area*

Dai Hongying¹, Wang Shiwei^{2△}, Zhu Tianjin¹, Wang ke¹

(1. The Laboratory Department; 2. Department of Infectious Diseases, Yongchuan Hospital

Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship among HBV genotypes, nucleoside analogues drug resistance-mutations and the patients with chronic hepatitis B in Yongchuan area. **Methods** The gene chip was used to detect the nucleoside analogues drug resistance-mutations of 605 cases with chronic hepatitis B, and the HBV-DNA level was analysed after the antiviral therapy. **Results** Among 605 cases, 63.1% genotype were genotype B, 116 cases (19.17%) were found to be resistance mutants. The major drug resistance-mutations was genotype B, 49.14% drug resistance-mutations was Adefovir drug resistance-mutations, and the resistance rate of genotype B with reverse transcriptase 236T mutation was 35.09%. The resistance rate of genotype B Lamivudine drug resistance-mutations with reverse transcriptase 108M mutation was 34.29%, the virus replication between resistance and non-resistant virus were significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** To monitor the hepatitis B patients with HBV resistance gene mutations is beneficial to detect the patients with drug resistance-mutations early, which is important for selecting reasonable treatment methods in clinical practice.

Key words: hepatitis B virus; genotype; drug resistance

乙型病毒性肝炎(简称乙肝), 是由乙型肝炎病毒(HBV)感染机体后所引起的疾病。2010 年版慢性乙型肝炎防治指南指出慢性乙型肝炎治疗的总体目标是: 最大限度地长期抑制 HBV, 减轻肝细胞炎症坏死及肝纤维化, 延缓和减少肝脏失代偿、肝硬化、肝癌及其并发症的发生^[1]。循证医学研究表明长期使用核苷(酸)类似药物可能导致 HBV 基因产生耐药性突变, 从而导致病情反复或反弹^[2-3]。本研究通过分析永川地区乙型肝炎患者治疗过程中的乙型肝炎耐药情况, 对了解该地区乙型肝炎病毒分型, 减少 HBV 变异和耐药的产生, 指导临床合理治疗乙型肝炎具有重要意义^[4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2012 年 12 月间来本院门诊和住院的慢性 HBV 感染者共 605 例, 其中男 379 例, 女 226 例, 年龄 15~65 岁, 诊断按照慢性乙型肝炎诊断(2010 版)^[1]的诊

断标准, 所有病例其他类型的肝炎病毒(甲、丙、丁、戊、庚)均为阴性, 所有样本收集均征得患者同意, 并与患者签订了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 静脉采集慢性乙型肝炎患者不抗凝血 3 mL, 2 000 r/min, 离心 5 min, 分离血清置 1.5 mL EP 管中, -20 °C 储存备用。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 循环参数设定: 尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG 酶)反应 50 °C, 2 min; Taq 酶活化 94 °C, 2 min; 变性 94 °C, 10 s; 退火; 延伸及荧光采集 60 °C, 30 s; PCR 仪冷却 35 °C, 10 s; 详细操作按荧光定量试剂盒说明书。HBV DNA 定试剂盒量(上海科华生物工程股份有限公司), 荧光定量 PCR 仪(上海宏石有限公司)。

1.2.3 基因芯片反向斑点杂交检测 HBV DNA 耐药基因芯

* 基金项目: 重庆医科大学附属永川医院院内课题资助项目(201016); 永川区科委课题资助项目(Ycstc, 2013nc801)。作者简介: 代红莹(1961~), 本科, 副主任技师, 主要从事优生优育、分子诊断方面研究。△ 通讯作者, Tel: 13500303958; E-mail: wsw1955@sina.com。

片试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司),FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂),PCR 扩增仪(中国杭州博日有限公司),HBV DNA 提取及扩增、杂交条件的具体操作按说明书。根据显色(蓝色斑点)出现的阵列位点直接判读 HBV 的基因型和耐药突变类型。

1.2.4 血清标志物检测 乙型肝炎病毒血清标志物和甲、丙、戊、庚型肝炎病毒抗体检测试剂盒由厦门新创公司提供,具体操作按照说明书。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行单因素统计学分析,率的比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性乙型肝炎患者 HBV 基因分型情况 605 例慢性乙型肝炎患者中,B 型基因型 382 例(63.1%),C 型基因型 189 例(31.2%),B、C 混合基因型 18 例(3.0%),D 基因型 9 例(1.5%),B、C、D 以外的其他基因型 7 例(1.2%)。B 型慢性乙型肝炎患者所占百分比明显高于 C 型,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 慢性乙型肝炎患者 HBV B、C、D 基因型耐药情况 605 例慢性乙型肝炎患者中,516 例对拉米夫定敏感,35 例对拉米夫定耐药,57 例对阿德福韦酯耐药,23 例表现为多重耐药性。57 例对阿德福韦酯耐药的突变基因型中,耐药基因型表现为 B 型基因型和 C 型基因型为主,B、C 混合型与其他型未见耐药,其突变基因型以 236T 为主,且多见于 B 基因型,B 型 236T 基因突变型为 35.09%,B 型基因型和 C 型基因型的 236T 基因突变型为 50.80%,见表 1。35 例对拉米夫定耐药,耐药以 B、C 型基因型为主,其他型未见耐药。其突变基因型以 rt108M 为主,且多见于 B 基因型。B 型 rt108M 基因突变型为 34.29%。B 型基因型和 C 型基因型的 rt108M 基因突变型为 48.57%,见表 2。

表 1 HBV B、C 基因型与阿德福韦酯耐药变异类型的关系[n(%)]

HBV 基因型	rtA181V	rt236T	rt181V+rt236T
B	15(26.32)	20(35.09)	4(7.01)
C	6(10.53)	9(15.79)	3(5.26)
合计	21(36.85)	29(50.88)	7(12.27)

表 2 HBV B、C 基因型与拉米夫定耐药变异类型的关系[n(%)]

HBV 基因型	rt108M	rt204V	rt204I	rt108M+rt204V
B	12(34.29)	7(20.00)	2(5.71)	2(5.71)
C	5(14.29)	6(17.14)	0(0.00)	1(2.85)
合计	17(48.58)	13(37.14)	2(5.71)	3(8.57)

2.3 HBV 耐药患者乙型肝炎 DNA 复制数与未发生 HBV 耐药 DNA 复制数关系 临床上应用核苷(酸)类药物治疗出现耐药的 116 例患者,常见耐药位点为:rtA181V、rt236T、rt204V、rt180M,患者发生乙型肝炎耐药后 HBV 病毒(7.08 ± 4.12) $\times 10^6$ copy/mL,而未发生乙型肝炎耐药后 HBV 病毒

(6.08 ± 3.52) copy/mL,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

目前,HBV 可分为 A~I 基因型。HBV 基因型分布有明显地域性,文献报道国内 HBV 基因型以 B 型、C 型和 D 型为主。HBV 基因型分布在中国存在明显地区和民族差异。北方以 C 型为主,南方以 B 型为主,汉族以 B、C 为主,D 型少见。经对永川地区乙型肝炎患者的 HBV 基因型分析发现,在 605 例慢性乙型肝炎患者中,B 基因型 382 例(63.1%);C 基因型 189 例(31.2%);B、C 混合基因型 18 例(3.0%);D 基因型 9 例(1.5%);B、C、D 以外的其他基因型 7 例(1.2%)。结果表明:HBV 基因型以 B 型为主,C 型较少,与目前文献报道比较一致^[5-6]。本研究在对乙型肝炎耐药性研究的同时采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测其他肝炎病毒血清学指标,有效保证患者为单纯乙型肝炎病毒感染引起慢性乙型肝炎,只有其他类型的肝炎病毒(甲、乙、丙、丁、戊、庚)均为阴性的患者才能作为研究纳入研究对象,这样可防止临床并发其他病毒感染患者对实验的干扰。

拉米夫定是最早被用于乙型肝炎抗病毒治疗药物^[7],其主要是通过抑制乙型肝炎 DNA 的合成发挥作用,拉米夫定的耐药突变位点主要集中在逆转录酶 C 区上的 YMDD 基因序列与保守 B 区(主要包括 rt108M、rt204V、rt204I 3 个突变位点),由于拉米夫定使用早,易发生突变,临床已不常使用^[8-10]。本研究发现永川地区乙型肝炎耐药主要表现为对阿德福韦酯耐药,这可能与临床医生广泛使用阿德福韦酯治疗乙型肝炎有关。阿德福韦酯作为一种腺苷酸的类似物,具有广谱抗病毒特点,其主要通过竞争性的抑制 dATP 结合到病毒 DNA 上,从而阻止病毒 DNA 的合成。阿德福韦酯耐药突变主要表现为 HBV 逆转录酶 B 区的 rtA181V 和 D 区的 rt236T^[11]。57 例对阿德福韦酯耐药的突变基因型中,表现为 B 和 C 基因型出现耐药(38 例为 B 型,19 例为 C 型),B、C 混合型与其他型未见耐药。突变基因型以 236T 为主,未检测出 207I 突变基因型。研究还表明:永川地区 B 型较 C 型更容易对阿德福韦酯产生耐药,临床乙型肝炎患者一旦发生 HBV 耐药后病毒复制数相对较高,而未发生耐药患者,病毒复制数普遍偏低,提示:慢性乙型肝炎患者治疗过程要重视 HBV 耐药性发生,加强对乙型肝炎治疗效果的评估,建议临床医生在乙型肝炎治疗过程中密切关注病毒复制和耐药情况。一但发生耐药要及时调整治疗方案,如对于拉米夫定、恩替卡韦发生耐药者,可加用阿德福韦酯联合治疗。对于阿德福韦酯耐药者,可加拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦联合治疗,以提高治疗效果^[12-13]。

HBV 耐药基因检测方法主要有质谱分析法、限制性片段长度多态法、线性探针分析法、荧光定量 PCR 溶解曲线分析法、基因芯片技术等^[14]。本研究采用 PCR 扩增法和 DNA 反向斑点杂交相结合的基因芯片技术,可一次性检测 HBV 3 种常见基因型(B、C、D 型)及对临床上所用药物拉米夫定、阿德福韦酯、替比夫定、恩替卡韦等常见耐药相关点的突变检测。该法准确度高、灵敏高和特异性好、检测速度快,值得在临床广泛推广使用^[15]。

- min and echocardiography in patients with acute chest pain[J]. *Exp Clin Cardiol*, 2013, 18(2):98-100.
- [2] Sokhanvar S, Mellati AO, Mousavinasab SN, et al. Ischemia-modified albumin (IMA) in differential diagnosis of transient myocardial ischemia from non ischemic chest pain[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2012, 113(10):612-615.
- [3] Kountana E, Tziomalos K, Semertzidis P, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of ischemia-modified albumin and echocardiography in patients with acute chest pain[J]. *Exp Clin Cardiol*, 2013, 18(2):98-100.
- [4] Chawla R, Goyal N, Calton R, et al. Ischemia modified albumin: A novel marker for acute coronary syndrome[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2006, 21(1):77-82.
- [5] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. Ischemia-modified albumin: we are ready for use in the emergency room? [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 151(2):247.
- [6] 王吉耀. 内科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 273-317.
- [7] Peacock F, Morris DL, Anwaruddin S, et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department[J]. *Am Heart J*, 2006, 152(2):253-262.
- [8] Talwalkar SS, Bon HM, Miller JJ, et al. Ischemia modified albumin, a marker of acute ischemic events; a pilot study [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(2):132-137.
- [9] Zhong Y, Wang N, Xu H, et al. Ischemia-modified albumin in stable coronary atherosclerotic heart disease: clinical diagnosis and risk stratification [J]. *Coron Artery Dis*, 2012, 23(8):538-541.
- [10] Manini AF, Ilgen J, Noble VE, et al. Derivation and validation of a sensitive IMA cutpoint to predict cardiac events in patients with chest pain[J]. *Emerg Med J*, 2009, 26(11):791-796.
- [11] Van Belle E, Dallongeville J, Vicaut E, et al. Ischemia-modified albumin levels predict long-term outcome in patients with acute myocardial infarction. The French Nationwide OPERA study[J]. *Am Heart J*, 2010, 159(4):570-576.
- [12] Su X, Zhang K, Guo F, et al. Ischemia-modified albumin, a predictive marker of major adverse cardiovascular events in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15):1410-1413.
- [13] 付鑫, 戴显松, 吴桂平, 等. 急性冠脉综合征患者血清缺血修饰清蛋白水平与冠脉造影结果对比分析[J]. *中国医药导报*, 2009, 34(16):16-17.
- [14] 崔波, 孙尧, 徐伟, 等. 缺血修饰白蛋白与冠状动脉病变的关系[J]. *山东医药*, 2008, 48(9):54-55.
- [15] 许光银, 王志玉. 缺血修饰白蛋白在急性脑血管病早期的诊断价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(6):1353-1355.

(收稿日期:2013-07-21 修回日期:2013-10-12)

(上接第 4396 页)

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(1):1-16.
- [2] 方芳, 冯钢, 浦春, 等. 慢性乙型肝炎患者乙肝病毒 B、C 基因型和阿德福韦酯耐药基因的相关性[J]. *皖南医学院学报*, 2012, 31(4):291-294.
- [3] Li XD, Wang L, Liu Y, et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in 1 301 patients with chronic hepatitis B in North China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(24):4178-4183.
- [4] 张智, 张珍, 李楠, 等. 185 例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测[J]. *广东医学*, 2008, 29(1):97-98.
- [5] Mirandola S, Campagnolo D, Bortoletto G, et al. Large-scale survey of naturally occurring HBV polymerase mutations associated with anti-HBV drug resistance in untreated patients with chronic hepatitis B[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(7):e212-216.
- [6] 蒋孝华, 李小芬, 蔡亚平, 等. HBV 基因型与耐药变异的关系[J]. *中国感染控制杂志*, 2009, 8(3):160-163.
- [7] 韩刚, 陈琳, 吴月平. 荧光 PCR 法检测 HBV 感染者 HBV 基因型及其临床应用[J]. *南通大学学报:医学版*, 2012, 32(1):61-62.
- [8] Peng CY, Chien RN, Liaw YF. Hepatitis B virus-related decompensated liver cirrhosis; benefits of antiviral therapy [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2):442-450.
- [9] Vivekanandan P, Singh OV. Molecular methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(7):921-935.
- [10] 苏义, 王文庆. 乙肝病毒拉米夫定耐药基因变异情况分析[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2010, 13(7):986.
- [11] 戴晨阳, 刘丽, 梁树人, 等. 658 例乙型肝炎患者 HBV 多位点耐药基因检测结果分析[J]. *山东医药*, 2012, 52(7):56-58.
- [12] Sayan M, Akhan SC, Senturk O. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies[J]. *Hepat Mon*, 2011, 11(10):835-842.
- [13] Song BC. How to overcome antiviral-resistant hepatitis B virus? [J]. *Intervirology*, 2010, 53(1):29-38.
- [14] Lapiński TW, Pogorzelska J, Flisiak R. HBV mutations and their clinical significance[J]. *Adv Med Sci*, 2012, 57(1):18-22.
- [15] Damerow H, Yuen L, Wiegand JW, et al. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes; hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(11):1850-1858.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-10)