

• 论 著 •

慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒耐药基因型研究*

张书楠¹, 余文辉^{1△}, 周大桥², 张春雷¹, 冯玉丽¹, 贺劲松², 周小梅¹, 李伟雄¹, 陈雪红¹, 林卓玲¹

(1. 广东省深圳市中医院; 1. 检验科; 2. 肝病科/国家级肝病重点专科 518033)

摘要:目的 研究乙型肝炎病毒(HBV)基因型与耐药病毒株产生的相关性。方法 收集 85 例接受拉米夫定治疗 1 年以上的慢性乙型肝炎(CHB)患者为研究对象。采集血样经离心分离血浆, 进行 HBV DNA 定量检测, 再进行基因测序和基因分型。结果 基因测序和基因型分析结果为 A 型 4 例(4.7%), B 型 28 例(32.9%), C 型 37 例(43.5%), D 型 11 例(12.9%), B/C 混合型 5 例(5.9%)。其中发生 YMDD 耐药突变的基因型突变率分别是 A 型 1 例(25.0%), B 型 5 例(17.9%), C 型 16 例(43.2%), D 型 2 例(18.2%), B/C 混合型 1 例(20.0%)。结论 HBV 基因型 C 型发生 YMDD 耐药突变的频率较高, HBV 基因型与 YMDD 突变可能存在相关性。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因; 突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1797-03

Research on the drug-resistant genotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B*

Zhang Shunan¹, Yu Wenhui^{1△}, Zhou Daqiao², Zhang Chunlei¹, Feng Yuli¹, He Jinsong²,
Zhou Xiaomei¹, Li Weixiong¹, Chen Xuehong¹, Lin Zhuoling¹(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Hepatology Specialty/National Key Specialty of Hepatology,
Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangdong 518033, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between hepatitis B virus (HBV) genotypes and the resistance to lamivudine (LAM). Methods 85 cases of patients with chronic hepatitis B(CHB), who had received LAM therapy for more than one year, were recruited. HBV DNA in blood samples of the 85 patients were quantitatively detected, sequenced and genotype were analyzed. Results Sequencing and genotyping revealed that 4(4.7%) cases were with genotype A, 28(32.9%) with genotype B, 37(43.5%) with genotype C, 11(12.9%) with genotype D and 5(5.9%) with mixed genotype B/C. The frequency of mutations in YMDD motif in patients with genotype A was 25.0%, with genotype B was 17.9%, with genotype C was 43.2%, with genotype D was 18.2% and with mixed genotype B/C was 20.0%, respectively. Conclusion The frequency of mutations in YMDD motif in HBV genotype C could be higher than that in the other genotypes. It might be deduced that there could be a correlation between HBV genotypes and mutations in YMDD motif of HBV DNA.

Key words: hepatitis B virus; gene; mutation

乙型肝炎(简称“乙肝”)已成为威胁人类健康的全球性公共卫生问题。全球慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)携带者多达 3.6 亿人, 中国占 1.2 亿人。慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)可进展为肝硬化、肝癌和肝衰竭, 从而引发死亡。全球每年约有 100 万人死于与 HBV 相关的肝脏疾病。对 CHB 的治疗及疗效监测是全球肝病科研和临床工作者面临的极大挑战^[1-2]。CHB 治疗的目的是使 HBV 复制得到持续抑制、缓和并减轻肝脏疾病。目前, CHB 的抗病毒治疗主要是使用核苷(酸)类似物。拉米夫定(lamivudine, LAM)为目前临床应用最为广泛的抗 HBV 药物。但是, LAM 的长期使用可能出现 HBV 耐药现象^[3]。

目前, HBV 基因分为 A~G 8 个基因型, 中国主要以 B、C、D 型多见, 而基因型与 LAM 耐药的相关性尚未完全明晰。本研究旨在通过揭示 HBV 基因与 LAM 耐药的关系, 为阐明 HBV 耐药机制提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 1 月至 2009 年 5 月在本院肝病专科住院并接受 LAM(口服 100 mg/d 常规剂量)治疗 1 年以上的 CHB 患者 85 例, 其中男 78 例, 女 7 例, 年龄(48.5±12.3)岁。其中轻度肝炎 29 例、中度肝炎 52 例、重度肝炎 4 例(B、C 基因型各 1、3 例)。诊断均符合 2005 年《慢性乙型肝炎

防治指南》^[4]。采集 85 例患者血样各 10 mL, 4 000 r/min 离心 10 min 后取血浆进行检验。患者剔除标准: (1)合并有抗 HCV、抗 HDV、抗 HIV 阳性者; (2)HBV 携带者和急性肝炎、肝癌患者; (3)HBV DNA<1.0×10³ copy/L 者; (4)用免疫抑制剂治疗者。本研究经医院伦理委员会审查同意, 签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA 提取 取 100 μL 血清与蛋白酶 K 混合后, 裂解缓冲液 100 °C 孵育 10 min, 通过酚/氯仿抽提、乙醇沉淀, 沉淀物置于 30 μL 灭菌用水中复溶, 置于 -20 °C 条件下保存待测。

1.2.2 阳性标准质粒的构建 为获得 HBV YMDD 基因序列和两种标准变异型(YIDD 和 YVDD), PCR 扩增拟使用引物 F1 和 R1。PCR 扩增产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行判定, 应用 Gel Extraction Kit (Eppendorf)试剂盒进行纯化, 按操作规程将纯化产物插入 pGEM-T Easy 载体(美国 Promega 公司)。利用直接测序法鉴定野生型和两种变异型的标准质控质粒(CUM; DQ351994; CUI; DQ351989; CUV; DQ352026)。

1.2.3 锁核酸(locked nucleic acid, LNA)实时 PCR 定量检测 HBV DNA (1)LNA TaqMan 探针的设计 YMDD 探针[nt. 747-731; 反义链, 5'-(6-Fam) ATCATCCATATARCTGA

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(201003194)。△ 通讯作者, E-mail: whyuchina@hotmail.com。

(BHQ1)-3′]; YVDD 探针 [nt. 747-731; 反义链, 5′-(Hex) AT-CATCCACATARCTGA (BHQ1)-3′]; YIDD 探针 [nt. 750-732; 反义链, 5′-(Cy5) CACATCATCAATATARCTG (BHQ3)-3′]。下划线核苷酸代表 LNA 碱基。1 μL DNA 与 Biotools QuantiMix KIT (西班牙 Biotools 公司) 含 (2 μL QuantiMix 缓冲液 A, 4 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 μmol/L F4, 0.5 μmol/L R4, 0.4 μmol/L 各种探针, 1 U DNA 聚合酶和 QuantiMix 缓冲液 B) 的反应混合物结合, 最后反应体积为 20 μL。LNA TaqMan 探针分析条件: Taq DNA 聚合酶热启动 95 °C 10 min, 接着 95 °C 15 s 和 66 °C 20 s, 共 45 次循环。在每次循环的延伸阶段, 分别在 520 nm、550 nm 和 650 nm 测定探针 YMDD、YVDD 和 YIDD 的荧光信号。

(2) 所鉴定的 YMDD, YIDD 和 YVDD 为 LNA 捕获 TaqMan 探针实时 PCR 检测 HBV DNA 变异的质控。HBV 野生型核苷酸区为 685~1015, 两变异型通过 T-A 克隆插入 pGEM-T Easy 载体。通过测定吸光度 A₂₆₀ 确定重组质粒的浓度, 再应用琼脂糖凝胶电泳和直接测序法进行判定。应用实时 PCR 所测得的 10 倍稀释重组质粒 (10¹~10¹⁰ IU/mL) 制作 HBV DNA 定量标准曲线。(3) 利用 F1 和 R1 为引物在 Rotor-Gene 3000 (澳洲 Corbett Research 公司) 上进行扩增。反应体系总体积为 20 μL, 包括 DNA 模板 1 μL, 10×QuantiMix 缓冲液 A 2 μL, 4 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 μmol/L F1, 0.5 μmol/L R1, 2 μL SYBR Green, 1 U DNA 聚合酶, 加入 QuantiMix 缓冲液 B 至总体积 20 μL。反应条件: Taq DNA 聚合酶 95 °C 预热 10 min, 95 °C 15 s, 55 °C 15 s 和 72 °C 30 s,

循环 35 次。每次循环完成时都进行荧光信号测定。

1.2.4 基因测序 采用 QIA quick PCR 纯化试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 严格按 SOP 文件执行。通过使用 ABI3100 自动测序仪 (Applied Biosystems 公司) 进行基因测序。20 μL 反应物包括 2 μL BigDye 试剂, 20 ng 纯化 PCR DNA, 3.2 pmol 引物和去离子水。热循环条件为 96 °C 10 s 变性, 50 °C 30 s 退火, 60 °C 4 min 延伸, 共 35 个循环。

1.2.5 基因分型 使用 Seqman 程序 (美国 Dnastar 公司) 进行核苷酸序列分析。从基因库获取的 20 种参考序列, 包括 A~G 8 种基因型 (基因型 A: Z35717、X51970、M57663, 基因型 B: D50521、X97851、M54923, 基因型 C: D23682、D50517、X75665。基因型 D: M32138、X97849、X65257, 基因型 E: X75664、X75667, 基因型 F: AB036910、X75663、X69798, 基因型 G: AB056515、AB064313、AF160501), 利用 MegAlign 仪 (美国 Dnastar 公司) 对所测定的序列进行比对编辑。利用 Phylip 软件包 (包括 Dnadist、Neighbor-joining、Seqboot、Treeview 等), 以从基因库获取的基因型 A~G 为参考序列, 与患者 HBV 多聚酶基因序列进行比对分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计处理, 多个样本率及两个或多个构成比的比较用 R×C 表资料的 χ^2 检验, 否则采用非参数检验; 计数资料分别采用 χ^2 检验, Mann-Whitney U 检验采用分析。定量资料采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象的基本特征 见表 1。

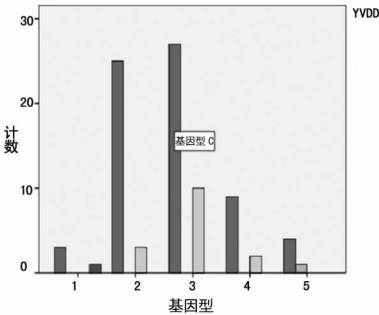
表 1 患者基本特征

项目	A 型	B 型	C 型	D 型	B/C 混合型	χ^2	P
性别(男/女)	4/0	26/2	34/3	9/2	5/0	2.29	0.682
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	38.0 $\pm$ 14.2	42.0 $\pm$ 15.5	45.0 $\pm$ 17.4	39.0 $\pm$ 12.7	35.0 $\pm$ 18.2	1.49	0.828
HBV DNA* ($\bar{x}\pm s$)	2.3 $\pm$ 1.4	7.6 $\pm$ 4.2	6.3 $\pm$ 3.8	1.8 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.5	14.30	0.006

* 表示 HBV DNA 为 85 例 CHB 患者的 HBV DNA 水平, 单位为 log₁₀ IU/mL。

表 2 YMDD 基因突变与基因型的关系

基因型	例数	YMDD 突变[n(%)]		
		YVDD 突变	YIDD 突变	合计
A	4	1(25.0)	0(0.0)	1(25.0)
B	28	3(11.1)	2(7.4)	5(17.9)
C	37	10(26.3)	6(15.8)	16(43.2)
D	11	2(18.2)	0(0.0)	2(18.2)
B/C	5	1(20.0)	0(0.0)	1(20.0)
合计	85	17(20.0)	8(9.4)	25(29.4)

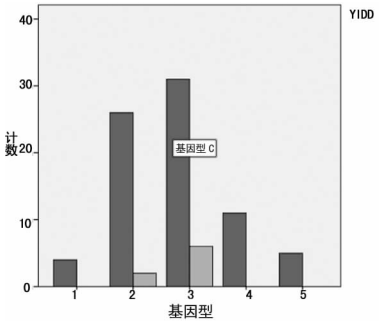


X 轴上的 1、2、3、4、5: 基因型 A、B、C、D、B/C; 每组的左侧条图代表野生株, 右侧条图代表变异株

图 1 各基因组 YVDD 变异频数分布图条形图

2.2 YMDD 基因突变与基因型的关系 由表 2 和图 1~2 可见

基因型 C 组的 YMDD(YVDD, YIDD) 突变率最高, 与其他基因型组比较, YVDD 变异频率的差异有统计学意义 ($\chi^2=40.99, P=0.001$), 而 YIDD 变异频率的差异无统计学意义 ($P=0.372$)。研究总体中, 虽然 YVDD 变异率比 YIDD 的高, 但两者变异率的差异无统计学意义 ($\chi^2=2.25, P=0.690$)。此外, YVDD 变异常伴发 L180M 变异 (基因型 A、B、C、D、B/C 发生 YVDD 突变的例数分别为 1、3、10、2、1; 其相应 L180M 变异例数为 1、3、4、1、0)。



X 轴上 1、2、3、4、5: 基因型 A、B、C、D、B/C; 绿色条图代表野生株, 蓝色条图代表变异株

图 2 各基因组 YVDD 变异频数分布图条形图

2.3 基因分型 利用 Phylip 软件包对所测定序列进行分析。基因型 A 4 例 (4.7%), 基因型 B 28 例 (32.9%), 基因型 C 47 例 (43.5%), 基因型 D 11 例 (12.9%), 基因型 B/C 5 例 (5.9%)。

2.4 YMDD 突变 测序分析显示 YMDD 基因突变率分别为: 基因型 A 25.0%, 基因型 B 17.9%, 基因型 C 43.2%, 基因型 D 18.2%, 基因型 B/C 20.0%。

3 讨 论

LAM 为目前临床应用最为广泛的抗 HBV 药。该药通过干扰 HBV 多聚酶的逆转录活性而达到抑制 HBV 复制的作用, 其有效应答表现为 HBV DNA 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平明显降低, HBeAg 发生血清转换, 肝脏组织病理得到改善^[5]。但是, LAM 的长期使用可能出现 HBV 耐药现象^[6]。在 LAM 治疗发生耐药后, 突变主要产生在逆转录酶 C 区的 rtM204 I/V/S 和 B 区的 rtL180M。rtM204 I/V/S 突变株对 LAM 高度耐药, 但其复制能力却较野生株弱^[6]。其中最常见的表现为 YMDD 基序 204 位的甲硫氨酸被缬氨酸或异亮氨酸所替代, 分别生成 YVDD (M204V) 或 YIDD (M204I), 且 YVDD 突变常伴发 180 位氨基酸的亮氨酸-甲硫氨酸替代突变成 L180M。

余文辉等^[7]报道, LAM 治疗期间 HBV 重叠基因突变可致 HBsAg 假阴性, 隐匿性慢性乙型肝炎与 HBV 重叠基因突变相关。药物的空间结构、基因屏障、药代动力学屏障可以影响耐药率。LAM、ADV、替比夫定 (telbivudine, LdT) 只需 1 个位点突变就能产生耐药, 而恩替卡韦 (entecavir, ETV) 需要在 LAM 耐药的基础上出现 3 个位点之一的联合突变才能产生耐药^[8]。YMDD 突变不仅发生在长期 LAM 治疗的患者中, 未经抗病毒治疗的 HBV 携带者中也可检测到较高的自发 YMDD 突变率^[9]。

本研究共发现 25 例 YMDD 突变, 其中基因型 A 1 例, 基因型 B 5 例, 基因型 C 16 例, 基因型 D 2 例, 基因型 B/C 1 例。YVDD 变异 17 例 (20.0%), YIDD 变异 8 例 (9.4%), 可见 YVDD 变异率较 YIDD 变异率高, 且前者常相伴 L180M 变异。实验数据表明单独发生 M204V 替代突变的 HBV 的耐药性较 M204I 突变的 HBV 耐药性弱, 这或许从一个侧面说明 M204V 为何常与 L180M 伴发而存。这些突变常在 LAM 治疗 6 个月后开始出现, 且随着治疗时间的延长, 突变率可能升高^[3]。参考文献^[10]报道, 基因型 B 的 HBV 发生 YVDD 变异的频率较基因型 C 者高, 而参考文献^[5]报道, 基因型 A、B 和 C 与 LAM 耐药没有相关性。但在基因型 B 的两种亚型即 Ba 和 Bj 患者中, 发现 Ba 亚型的 HBV 耐药突变率明显高于 Bj 亚型者。参考文献^[11]报道, 在 HBV 的 LAM 耐药突变研究中发现基因型 A 者的耐药率明显高于基因型 D 者。参考文献^[12-13]报道, 不同的基因型与 HBV 感染的致病性有一定的相关性。C 基因型在重症乙型肝炎患者中为优势基因型, 感染 C 基因型患者比感染 B 基因型更易发展为进展性肝脏疾病, 并且感染 C 基因型患者比感染 B 基因型的患者病情更为严重, B 型对 LAM 和干扰素的应答比 C 型好, 也提示基因型与临床病情进展密切相关。黄海燕等^[14]报道, 肝癌、肝硬化与 C 基因型 HBV 的相关性最大, 与本研究结果相符。本研究发现 YMDD 耐药突变率为 29.4%, 其中基因型 C 的突变率明显高于其他基因型, 这可能与该组患者病情相对较重 (37 例中有 3 例重症肝炎患者) 有关。此外, 也可能存在患者在使用 LAM 治疗前已发生 YMDD 基因突变。庄辉^[15]报道, 感染 C 基因型 HBV 后易发展成慢性乙肝、肝硬化和

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), HBV 基因型还与抗病毒的疗效有关, 这与本研究结论相符合。

总之, HBV 耐药基因型的研究将有助于 HBV 感染者的诊断、治疗和预后评估, 也有助于研究 HBV 的致病机制和耐药机制。这对指导抗病毒药物的选择、启动新的联合治疗方案、研究新靶标药物等具有重要作用。

参考文献

- [1] 马亦林, 万漠彬, 王豪, 等. 2004 年拉米夫定临床应用专家共识[J]. 中华肝病杂志, 2004, 12(7): 425-428.
- [2] 余文辉, 周小梅, 周大桥, 等. 锁核酸捕获 TaqMan 探针实时 PCR 和 PCR-RFLP 检测乙型肝炎病毒基因变异的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(11): 977-982.
- [3] Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, et al. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan[J]. Intervirology, 2003, 46(3): 182-189.
- [4] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝病杂志, 2005, 13(12): 881-891.
- [5] Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, et al. The influence of hepatitis B genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment[J]. J Hepatol, 2003, 38(3): 315-321.
- [6] 吴淑玲, 成军. 乙型肝炎病毒耐药的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008, 17(9): 771-773.
- [7] 余文辉, 周小梅, 周大桥, 等. 隐匿性慢性乙型肝炎与乙型肝炎病毒重叠基因突变相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 701-704.
- [8] Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(3): 902-911.
- [9] Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, et al. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(12): 1783-1788.
- [10] 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(11): 767-774.
- [11] Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C[J]. J Med Virol, 2006, 78(10): 1276-1283.
- [12] 吴诗品, 于杰, 周建良, 等. 乙型肝炎病毒基因型与拉米夫定治疗疗效关系的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 973.
- [13] 冯相伟, 孟繁平, 汪杨, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV 基因分型[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 27-29.
- [14] 黄海燕, 孟祥伟, 张玲玲, 等. 长春地区乙型肝炎病毒基因分型与肝病发病关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1057-1060.
- [15] 庄辉. 我国乙型肝炎病毒感染与挑战[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(S1): 2-6.

(收稿日期: 2011-05-09)