

• 临床检验研究论著 •

某地区维吾尔族与汉族 HBV 天然耐药变异研究

何 超¹, 韩小梅², 张朝霞^{1△}

(1. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 乌鲁木齐 830054;
2. 甘肃省建筑职工医院检验科, 兰州 730030)

摘 要:目的 探讨某地区维吾尔族与汉族 HBV 对拉米夫定和阿德福韦天然耐药情况及基因型分布。方法 采用基因芯片对来自某地区的维吾尔族、汉族初次感染未使用核苷(酸)类似物抗病毒治疗的 HBV 患者 101 例血清标本进行与 HBV 耐药相关的 rtL180M、rtM204I/V、rtA181T/V 和 rtN236T 的耐药突变检测和基因型分析。结果 某地区 HBV 对拉米夫定和阿德福韦的天然耐药率为 9.9%, 其中维吾尔族耐药率 2.17%, 汉族 16.36%, 维吾尔族人群 HBV 天然耐药率明显低于汉族, 差异有统计学意义($\chi^2=5.653\ 9, P<0.05$); 在维吾尔族突变的 1 例中只检出 rtM204I/V 突变, 而在汉族检测突变的 9 例中 4 个常见位点的 6 种突变都有检出。结论 该地区维吾尔族 HBV 对拉米夫定和阿德福韦的天然耐药发生率较汉族低, 且对拉米夫定耐药者多见, 而汉族 HBV 对这两种药物耐药都可检出。

关键词:肝炎病毒, 乙型; 基因突变; 天然耐药; 维吾尔族
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.013 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)14-1694-03

Research on the natural resistance variation of HBV in Uyghur and Han Nationality in certain area

He Chao¹, Han Xiaomei², Zhang Zhaoxia^{1△}

(1. Medical Laboratory Center, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China;
2. Clinical Laboratory, Construction Worker's Hospital, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: **Objective** To analyze the resistant genotype distribution and the natural resistance mutation of hepatitis B virus (HBV) in Uyghur and Han Nationality in certain area. **Methods** 101 serum samples were collected from patients of Uyghur and Han Nationality with primary infection of HBV and didn't receiving nucleoside(nucleotide) analogs for antiviral treatment, and all of the samples were detected by gene chips for rtL180M, rtM204I/V, rtA181T/V and rtN236T mutations. **Results** The natural resistance mutation rate of HBV in Uyghur Nationality was 2.17%, significantly lower than 16.36% of Han Nationality($\chi^2=5.653\ 9, P<0.05$). Only one case in Uyghur Nationality was detected with resistance mutation of rtM204I/V, and the 4 common sites of 6 kinds of mutations were detected in Han Nationality. **Conclusion** The natural resistance mutation rate of HBV to lamivudine and adefovir dipivoxil in Uyghur Nationality might be much lower than that in Han Nationality, and the more are lamivudine resistance. But in Han Nationality, the two kinds of drugs resistance to nucleoside(nucleotide) analogs both could be detected.

Key words: hepatitis B virus; gene mutation; natural resistance; Uyghur

乙型肝炎病毒(HBV)是一种呈世界性分布、危害严重的传染病^[1]。如今全球约有 20 亿人曾感染过 HBV, 其中慢性感染者 3.5~4 亿, 占全球人口的 6%^[2-3]。中国约有 1.5 亿 HBV 携带者, 其中慢性 HBV 患者高达 2 600 多万^[4]。随着拉米夫定和阿德福韦作为临床治疗 HBV 感染的一线核苷(酸)类似物, HBV 对这两种药物耐药的报道也越来越多。如果 HBV 新发病例就存在对这两种常规一线药物耐药, 即天然耐药, 那么临床再使用这两种药物不仅不会对患者体内的 HBV 进行有效的抑制, 延缓肝功能损伤, 反而还会加重患者的病情。因此, 对使用拉米夫定和阿德福韦治疗前就对其常见耐药变异进行检测是必要的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 8 月至 2011 年 8 月在本院就诊的初次感染 HBV 的患者 101 例, 诊断标准符合 2000 年第 10 次全国病毒性肝炎与肝病学术会议制定的诊断标准^[5], 其中汉族 55 例, 维吾尔族 46 例; 男性患者 63 例, 女性患者 38 例; 年龄 13~53 岁, 平均年龄(30±7)岁。均为初次感染患者, 乙肝三系统显示, HBsAg(+), HBeAg(+), 抗-HBs(+), 伴有 ALT

水平升高或肝功能受损, 未服用拉米夫定或阿德福韦等核苷酸类抗病毒药物治疗。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 试剂 HBV-DNA 定量检测试剂使用 HBV 核酸定量检测试剂盒(PCR 荧光探针法), 试剂盒包括 DNA 提取试剂和 PCR 扩增试剂两部分, 由达安基因生物有限公司提供。耐药基因突变检测的 DNA 提取试剂使用 Nucleospin® Blood, 扩增和杂交试剂使用晶芯® HBV 耐药检测试剂盒(芯片法), 由博奥生物科技有限公司提供。

1.2.2 仪器 HBV-DNA 的提取使用的仪器有 NUAIR Class II Type 2 生物安全柜、Qilinbeier XW-80A 漩涡混合仪、中佳 HC-2516 高速离心机、干浴恒温器、Capsulefuge TOMY PMC-060 瞬时离心机、MLX-6K 迷你型离心机等。PCR 扩增使用 ABI7300 扩增仪和 iCycler 扩增仪。基因芯片杂交使用的仪器有晶芯® BioMixer™ 芯片杂交仪、晶芯® Slidwasher™ 芯片洗干仪、晶芯® LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与保存 用一次性无菌真空采血管采集患者

△ 通讯作者, E-mail: xia0513@yahoo. com. cn.

静脉血 2 mL, 室温放置至少 30 min, 待血液自发完全凝固, 3 000 r/min 离心 5 min, 转移至 1.5 mL 的灭菌离心管。对于不能及时完成检测的标本于 -20 ℃ 冷冻保存。

1.3.2 HBV-DNA 的检测 实时荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 含量, 用试剂盒中的 DNA 提取部分 HBV-DNA, 取 2 μL 加入 PCR 反应体系中, 在 ABI7300 扩增仪上扩增 30 个循环后, 利用实时荧光定量 PCR 分析系统对结果进行分析。该方法的检测范围在 $1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^8$ copy/mL, 一般结果小于 5.00×10^2 copy/mL 就判为阴性。

1.3.3 HBV 耐药基因变异的检测 基因芯片上通过设置各种质控探针, 包括表面化学质控探针、杂交阳性外对照探针、内对照探针、空白对照和阴性对照探针等进行检测的质量控制。检测探针包括 rt180、rt204、rt181 和 rt236 的四个位点的野生型和 6 种突变型, 它们覆盖了中国拉米夫定和阿德福韦耐药的常见变异。质控和检测反应的探针均重复 5 次, 以保证结果的重复性。根据荧光信号的强度与位置, 由晶芯® HBV 耐药基因芯片检测分析系统软件自动判读结果并生成检测报告。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理, 定量资料用 *t* 检验, 不同组间率的比较及构成比的比较用 Pearson χ^2 检验和 Fisher 确切概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 新疆维吾尔族与汉族 HBV 天然耐药 HBV-DNA 定量结果 101 例初次感染 HBV 的患者 HBV-DNA 定量检测结果均大于 5.00×10^2 copy/mL, 其中最高检测量为 9.27×10^7 copy/mL, 最低检测量为 4.81×10^4 copy/mL, 平均 5.69×10^6 copy/mL。维吾尔族患者中 HBV-DNA 的最高检测量为 4.18×10^7 copy/mL, 最低检测量为 4.81×10^4 copy/mL; 汉族患者中 HBV-DNA 的最高检测量为 9.27×10^7 copy/mL, 最低检测量为 6.81×10^4 copy/mL。两组比较见表 1。

表 1 两民族初次感染 HBV 患者 HBV-DNA 定量结果比较			
民族	例数(<i>n</i>)	$\bar{x}$ (copy/mL)	<i>s</i> (copy/mL)
维吾尔族	46	2.44×10^6 *	0.89×10^6
汉族	55	5.69×10^6	1.17×10^6

* : $t = 15.462$ 1, $P < 0.05$, 与汉族比较。

2.2 维吾尔族与汉族 HBV 天然耐药突变率的比较结果 101 例初次感染 HBV 的患者血清通过基因芯片法检出耐药者 10 例, 耐药率为 9.9% (10/101); 其中维吾尔族 1 例, 耐药率 2.17% (1/46); 汉族 9 例, 耐药率 16.36% (9/55)。维吾尔族明显低于汉族, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.653$ 9, $P < 0.05$)。

2.3 维吾尔族与汉族 HBV 天然耐药基因类型分布结果 10 例对 HBV 天然耐药的耐药基因类型结果, 见表 2。46 例维吾尔族初次感染 HBV 的患者中检出 1 例天然耐药 HBV 株, 该毒株对拉米夫定天然耐药, 耐药突变为基因型 rtM204I/V, 拉米夫定和阿德福韦耐药相关的其他 3 个位点均未检出突变基因; 55 例汉族患者中检出 9 例天然耐药者, 对两种一线抗病毒药物均产生耐药的耐药者有 3 例, 其中有 2 例患者为 4 个常见位点都发生突变; 对拉米夫定产生耐药者共 4 例, 其中 2 个位点都发生突变者有 3 例, 其中有 1 例患者的 rt236N 无任何杂交信号, 只有 rt204M 位点发生变异者 1 例; 对阿德福韦产生

耐药者 2 例。其中 1 例为 2 个位点均突变, 1 例只有 rt236N 发生突变。

表 2 新疆地区 HBV 天然耐药基因类型分布表					
序号	民族	拉米夫定耐药		阿德福韦耐药	
		rt180	rt204	rt181	rt236
1	维吾尔族	—	rtM204I/V	—	—
2	汉族	rtL180M	rtM204V	—	—
3	汉族	rtL180M	—	rtA181T/V	rtN236T
4	汉族	—	—	rtA181V	rtN236T
5	汉族	rtL180M	rtM204I	—	未检出
6	汉族	—	rtM204I/V	—	—
7	汉族	rtL180M	rtM204I/V	rtA181T/V	rtN236T
8	汉族	—	—	—	rtN236T
9	汉族	rtL180M	rtM204I/V	rtA181T/V	rtN236T
10	汉族	rtL180M	rtM204I/V	—	—

—: 野生型。

3 讨 论

新疆是一个以汉族和维吾尔族为主的多民族地区, 维吾尔族在民俗、饮食习惯及生存环境上和汉族有很大差异, 其 HBV 的感染率和基因型等也存在差异。血清流行病学调查表明, 新疆地区属于中等 HBV 地方性流行地区, HBsAg 携带率低于全国水平, 且维吾尔族 HBsAg 携带率低于汉族 (维吾尔族为 3.07%, 汉族为 8.04%)^[6]。

关于 HBV 对核苷酸类似物的天然耐药的报道并不多见, 并且大多数此方面的研究也只是针对于拉米夫定耐药变异的 rtM204I/V, 即 YMDD 变异。有学者采用不同的 YMDD 变异检测方法对其自然变异毒株的流行状况进行了调查, 认为 YMDD 自然变异毒株的检出率在 10%~30%^[7-8]。

在利用 DNA 微阵列基因芯片检测两个民族 HBV 耐药基因突变时, 经过统计, 新疆乌鲁木齐地区的 HBV 天然耐药率为 9.9%, 和 10%~30% 的范围较为接近。在 101 例患者中, rt204M 位点发生突变 (即 YMDD 变异) 的患者有 7 例, 突变率为 6.93%, 较其他学者的报道低, 这可能与维吾尔族人群中天然耐药变异检出率低有关。在 10 例发生天然耐药的耐药者中, 汉族占 9 例, 耐药率为 16.36%; 维吾尔族占 1 例, 耐药率为 2.17%。维吾尔族的 HBV 天然耐药率明显低于汉族人群。这表明, 维吾尔族较汉族更不易产生自然变异, 这与维吾尔族人群的生活特点是分不开的, HBV 是经消化道和血液途径传播的, 维吾尔族人在饮食和生活习惯上的独有特点, 使得 HBV 在维吾尔族人群中的传播较为局限, 从而减小了感染上已经产生耐药变异的 HBV 的可能性。而汉族生活方式使其感染上已经产生耐药变异的 HBV 的概率大大增加。当然, 产生维吾尔族与汉族人群在 HBV 天然耐药变异检出率上的差异的确切原因, 还有待于进一步的研究确定。

慢性乙肝患者治疗前, 肝组织 HBV cccDNA 与血清 HBV-DNA 含量呈正相关^[9]。因此, 检测血清中 HBV-DNA 含量有助于了解肝组织中 HBV cccDNA 含量的变化, 可作为抗病毒治疗适应证和选择临床疗效判断的依据。本研究 HBV-DNA 定量结果比较显示, 两民族之间 HBV 病毒载量差异有统计学意义, 且维吾尔族较汉族低, 这和何洁静等^[10]报道

的病毒含量和耐药相关的结论一致。

从两个民族 HBV 天然耐药基因类型分布上看,46 例维吾尔族初次感染 HBV 的患者中检出 1 例天然耐药 HBV 株,该毒株对拉米夫定天然耐药,其耐药基因型为 rtM204I/V;其他 3 个相关位点均未发生突变,该患者只对拉米夫定耐药,使用阿德福韦治疗仍然有效;55 例汉族 HBV 患者中检出的 9 例天然耐药者,对两种一线抗病毒药物均产生耐药的患者有 3 例,其中有 2 例患者为 4 个常见位点都发生突变;对拉米夫定产生耐药者共 4 例,其中 2 个位点都发生突变者有 3 例,其中有 1 例患者的 rt236 位点无任何杂交信号,只有 rt204 位点发生变异者 1 例;对阿德福韦产生耐药者 2 例。其中 1 例为两个位点均突变,1 例只有 rt236 发生突变。这 1 例维吾尔族 HBV 天然耐药变异患者的变异发生在 rt204 位点上,其突变方式是 rtM204I/V,也就是 YMDD 突变为 YIDD 和 YVDD,这种突变方式在国内外 HBV 耐药突变中均较为常见,并且,该患者针对拉米夫定耐药变异的协同位点 rt180 并没有发生变异,在治疗时,使用拉米夫定联合阿德福韦或单用阿德福韦治疗均有效。在检出天然耐药变异的 9 例汉族 HBV 患者中,对拉米夫定和阿德福韦同时产生耐药的患者有 3 例,占检出者的 1/3,并且有 2 例患者是 4 个常见位点均发生了突变,那么,对 3 例患者而言,在治疗上采用拉米夫定或阿德福韦都是无效的,可以考虑使用长效干扰素或是恩替卡韦治疗。由于替比夫定和拉米夫定的耐药位点相同,且 95% 以上对拉米夫定和替比夫定耐药的突变位点都发生在 rtM204V/I 位点上,一小部分患者的耐药突变发生在 rtA181T/V 位点上^[11]。所以,该患者使用替比夫定治疗的效果也不理想。

综上所述,对于使用拉米夫定或阿德福韦,不管是单用还是联合用药,不仅在使用过程中要随时检测 HBV 耐药基因突变情况,在使用这两种药物之前,对其耐药基因检测也是十分必要的。这样,不仅可以提高核苷(酸)对 HBV 的治疗效果,减轻乙型肝炎患者的经济压力,还可以有效地降低 HBV 的耐

药率。

参考文献

[1] 苏成豪,许龙善.乙型肝炎流行病学研究进展[J].旅行医学科学,2008,14(1):5-7.

[2] Lok AS,Mc Mahon BJ. Chronic hepatitis B:update of recommendations. AASLD practice guideline[J]. Hepatology,2004,39(3):857-861.

[3] Van Damme P, Van Herck K. A review of the efficacy immunogenicity and tolerability of a combined hepatitis A and B vaccines [J]. Expert Rev Vaccines,2004,3(3):249-267.

[4] 谢南,李金明,熊德琴,等.基因芯片法检测 HBV 多位点变异和基因分型的临床价值[J].热带医学杂志,2010,10(4):437-438.

[5] 中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):562.

[6] 金喜梅,董红军,孙世英,等.新疆一般人群病毒性肝炎血清流行病学调查研究[J].上海预防医学杂志,1995,10(7):445-450.

[7] Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers[J]. Hepatology,2001,34(4):574-586.

[8] 颜鸣鹤,张长,凌乔,等.未经拉米夫定治疗的乙型肝炎病毒 YMDD 变异检测[J].中华肝脏病杂志,2003,11(7):430-432.

[9] 张文杰,毛维武,田淑菊,等.乙型肝炎病毒标志物定量检测及肝组织病理学检测应用于慢性乙型肝炎病毒性肝炎患者的临床意义[J].国际检验医学杂志,2011,32(13):1507-1509.

[10] 何洁静,曾兰兰,杨永泉,等.慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗后出现 YMDD 变异的相关因素分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(13):1434-1435.

[11] 何超,张朝霞.乙型肝炎病毒耐药基因研究进展[J].现代检验医学杂志,2011,26(3):4-7.

(收稿日期:2012-01-10)

(上接第 1693 页)

ALT、AST 及 TBIL 升高^[9]。糖尿病患者多伴有高血压、高血脂和脂质代谢紊乱,2 型糖尿病患者组织脂肪分解亢进,进入肝脏的游离脂肪酸增多,超出了肝脏的清除能力,脂类在肝脏中堆积,形成脂肪肝,也造成肝功能损害^[10]。2 型糖尿病肝损伤造成的肝功能异常在临床上较为常见,应引起足够的重视。糖尿病肝损伤的临床症状较轻,多不典型,肝功能改变多数为轻度异常,少数明显异常。肝损伤的发生与血糖长期控制不良有密切关系,早期发现并准确监测血糖异常,较好地控制血糖是改善 2 型糖尿病患者肝损伤的主要措施。

参考文献

[1] 陈淑云,采云.糖尿病患者 HbA1c 与 C 肽关系分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):81.

[2] 吴月琴.2 型糖尿病相关性肝损生化指标的变化及意义[J].常州实用医学,2010,26(3):179.

[3] 李岚岚,涂干卿,但加容.糖化血红蛋白对糖尿病的诊断价值分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1326.

[4] 张萍,苏本利,孙崑,等.糖化血红蛋白与全天不同时间血糖水平的关系[J].中华糖尿病杂志,2005,13(4):275.

[5] 黄晓莲,王琼康.C 肽胰岛素在糖尿病诊治中的作用[J].中外医学研究,2009,7(10):25.

[6] 钟志强.糖化血红蛋白与 C 肽关系分析[J].实用医技杂志,2006,13(18):3198.

[7] 李金生.老年 2 型糖尿病 292 例 C 肽释放反应类型临床分析[J].医学信息:内·外科版,2009,22(11):1001.

[8] 李进.血清 C 肽浓度对糖尿病患者临床用药的参考意义[J].中国乡村医药,2009,16(9):53.

[9] 据枫,符茂雄.胰岛素强化治疗对老年隐匿性自身免疫性糖尿病胰岛 B 细胞功能影响研究[J].实用老年医学,2011,25(5):420-422,426.

[10] 冯晓云,石勇铨,邹俊杰,等.胰岛素对新诊断 2 型糖尿病患者胰岛 B 细胞的保护作用研究[J].中国药房,2011,22(24):2233-2235.

[11] 吴春霞.胰岛素强化治疗初诊 2 型糖尿病的临床观察[J].医学理论与实践,2010,23(12):1460-1461.

[12] 姚红,李小艳.胰岛素泵短期强化治疗初诊 2 型糖尿病的临床观察[J].中外医学研究,2011,9(24):3-4.

(收稿日期:2012-01-20)