

• 论 著 •

应用 PCR-LDR 法比较 2 个地区慢性乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型

丁彬彬¹, 段正军²

(1. 上海市虹口区精神卫生中心检验科 200083; 2. 兰州大学第二医院肝病研究所, 兰州 730030)

摘要:目的 探讨上海和兰州 2 个地区的慢性乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型的比较及关系。方法 取上海和兰州地区慢性乙型肝炎患者 194 例和 325 例的血清, 利用聚合酶链反应(PCR)-连接酶反应检测技术(LDR)法对常见的 7 种耐药突变位点和 B 型、C 型两种型别进行检测。使用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析。结果 (1) 2 个地区均以 C 型为主, 上海、兰州分别为 79.3%、81.4%。(2) 上海地区突变比率(48.9%)高于兰州地区(35.3%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 个地区耐药突变均以拉米夫定突变为主, 占 75.7%(153/202, 上海 68/92, 兰州 85/110), 2 个地区导致拉米夫定耐药突变位点上差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 2 个地区的阿德福韦耐药位点均以 rtA181T/V 为主, 地区间差异无统计学意义($P > 0.05$)。(3) 是否耐药突变与基因型无相关性, C 基因中上海地区的突变比率(49.0%)高于兰州地区(35.4%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(4) 4 种耐药比率在与基因型无相关性。结论 上海、兰州 2 个地区在基因型分布上相似, 上海地区发生耐药比率更高, 2 个地区均显示发生耐药与否以及耐药类型与基因无关。

关键词: PCR-连接酶检测反应; 乙型肝炎病毒; 耐药突变; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)13-1814-04

Comparative research on nucleoside drug resistance mutation and genotypes of chronic hepatitis B virus in two areas by PCR-LDR method

DING Binbin¹, DUAN Zhengjun²

(1. Department of Clinical Laboratory, Hongkou District Mental Health Center, Shanghai 200083, China;

2. Research Institute of Liver Disease, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: **Objective** To perform a comparative research on nucleoside drug resistance mutation and genotypes of chronic hepatitis B virus in Shanghai and Lanzhou. **Methods** The serum samples (Shanghai, 194 cases) and (Lanzhou, 325 cases) were collected. The common 7 drug resistant mutation loci, genotype B and C were detected by using the PCR-LDR method. The obtained data were analyzed by using the SPSS17.0 statistical software. **Results** (1) Genotype C was the main genotype in two areas (Shanghai 79.3%, Lanzhou 81.4%). (2) The mutation rate in Shanghai was higher than that in Lanzhou with statistical difference (48.9% vs. 35.3%, $P < 0.01$). Lamivudine resistance mutation was predominant in all the mutations of two areas, accounting for 75.7% (153/202; Shanghai 68/92, Lanzhou 85/110); the difference in lamivudine resistance mutation loci had statistical difference between the two areas; while the adefovir resistance loci was dominated by rtA181T/V, the area difference had no statistical significance ($P > 0.05$). (3) The drug resistance mutation had no correlation with genotype. The C genotype mutation rate in Shanghai was higher than that in Lanzhou, the difference was statistically significant (49.0% vs. 35.4%, $P < 0.05$). (4) 4 kinds of drug resistance rate had no correlation with genotype. **Conclusion** The genotype distributions are similar in two areas; Shanghai has a higher drug resistance rate than Lanzhou; the drug resistance occurrence has no relation with drug resistance type and genotype.

Key words: PCR-LDR; HBV; drug resistance; genotype

据统计, 全球每年大约有 3.5 亿人感染慢性乙型肝炎, 超过 100 万人死于肝硬化和肝癌^[1]。乙型肝炎病毒(HBV)持续感染与肝炎、肝硬化、肝癌的发生密切相关^[1-2]。HBV 根据基因组全序列的差异性是否大于 8% 分为 A~H 8 种基因型^[3]。在中国, 较为常见的是 B 型和 C 型, 其中 B 型和 C 型, 按照中国南北地域分布存在差, 北方以 C 型为主, 南方以 B 型为主, 而 A 型和 D 型则较少发现^[4-5]。一些研究表明不同基因型对抗病毒治疗的药物应答不同, B 型要比 C 型对干扰素的应答好; 另外, C 型通常与 HBV 重度感染、肝硬化、肝癌更加高度相关^[6-7]。目前, 用于乙型肝炎治疗常用的核苷类似物药类存在耐药突变, 主要的突变位点有 7 个, 分别为 rtL180M、rtA181T/V、rtT184G、rtS202I、rtM204I/V、rtN236T、M205V^[8]。准确地对 HBV 进行分型和耐药位点突变检测非常重要, 对乙型肝炎患者的用药、预后有很强的指导意义。聚合酶链反应(PCR)-连接

酶反应检测技术(LDR)是目前研究较多, 灵敏度高、特异性强, 且性价比高的检测方法, 可以用于临床检测基因分型和多耐药位点检测^[8-10]。

对于 HBV 的分型和耐药的研究以一个地区较多, 而对 2 个地区比较的研究较少, 尤其是对中国东西 2 个城市比较。本文对地理位置分别在东部和西北部的上海和兰州进行了分型和耐药的比较研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究所用的血清标本收集于上海市虹口区精神卫生中心和兰州大学第二医院, 共计 519 例, 其中上海市虹口区精神卫生中心 194 例(2013 年 1 月至 2015 年 10 月), 男 119 例, 女 75 例, 年龄 26~67 岁, 平均 43.72 岁; 兰州大学第二医院 325 例(2013 年 8 月至 2015 年 5 月), 男 213 例, 女 112 例, 年龄 24~72 岁, 平均 45.23 岁; 上述患者血清标本采

集均符合 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》中的有关标准。

1.2 仪器与试剂 仪器使用美国伯乐公司 MJ-90 PCR 仪, ABI 公司 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪和美国 ABI 公司 ABI3130 DNA 测序仪。乙型肝炎 DNA 提取试剂为上海星耀医学科技发展公司(简称上海星耀)乙型肝炎 DNA 磁珠提取试剂盒,乙型肝炎 DNA 定量检测使用 HBV 核酸扩增荧光定量试剂盒,耐药位点扩增、LDR 反应和测序使用上海星耀生产的 HBV 多耐药基因位点分型试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 血清乙型肝炎 DNA 提取 按照上海星耀生产的 DNA 提取试剂盒进行。

1.3.2 PCR 扩增、电泳检测、LDR 反应和毛细管电泳 均按照上海星耀生产的 HBV 多耐药基因位点分型试剂盒的说明书进行。

1.4 统计学处理 电泳结束后结果判定通过 GeneMapper4.0 软件进行分析,数据统计使用 SPSS 17.0 进行,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 特异性检测、检测下限和重复性 随机挑选经 LDR 法检测突变位点为 rtL180M、rtA181T/V、rtT184G、rtS202I、

rtM204I、rtM204V、rtN236T、M205V 以及野生型各 3 例进行测序检测,LDR 法检测结果和测序结果均一致。

按照试剂盒说明书的最低检测下限 10^3 copies/mL,挑选含不同突变位点的 rtL180M、rtA181T/V、rtT184G、rtS202I、rtM204I、rtM204V、rtN236T、M205V 和野生型标本 1~3 例,进行乙型肝炎 DNA 不同病毒载量检测,根据定量结果将这些标本稀释至 $10^3\sim10^4$ copies/mL,每个标本重复检测 3 次,均能检测出相应突变。

本实验共测试 519 例标本,19 例标本未检测出,其中上海地区 13 例,兰州地区 6 例。对 19 例标本进行 DNA 定量检测结果低于试剂盒检测下限,符合试剂盒性能。

2.2 HBV 基因型结果 本次 PCR-LDR 法对标本进行了 B 型和 C 型检测,其他型别未进行检测。2 个地区的 B、C 分型的结果统计见表 1。500 例测试标本中 C 型为主,共 403 例(80.6%),B 型 74 例(14.8%)、非 B 非 C 18 例(3.6%),B/C 混合型 5 例(1%),同样上海地区(79.3%,149/188)和兰州地区(81.4%,254/312)的均以 C 型为主。2 个地区间的 B、C、非 B 非 C 型、B/C 混合型所占比率差异无统计学意义($P=0.329$),排除非 B 非 C 型和 B/C 混合型不考虑,2 个地区的 B、C 型分布之间差异无统计学意义($P=0.215$)。

表 1 2 个地区 HBV 基因型及耐药统计情况[n(%)]

基因型	上海市虹口区精神卫生中心			兰州大学第二医院			合计
	耐药突变	无耐药突变	合计	耐药突变	无耐药突变	合计	
B	16(48.5)	17(51.5)	33(17.6)	13(31.7)	28(68.3)	41(13.1)	74(15.8)
C	73(49.0)	76(51.0)	149(79.3)	90(35.4)	164(64.6)	254(81.4)	403(80.6)
非 B 非 C	3(75.0)	1(25.0)	4(2.1)	5(35.7)	9(64.3)	14(4.5)	18(3.6)
B/C	0(0.0)	2(100.0)	2(1.1)	2(66.7)	1(33.3)	3(1.0)	5(1.0)
合计	92(48.9)	96(51.1)	188(37.6)	110(35.3)	202(64.7)	312(62.4)	500(100.0)

注:耐药突变统计按照发生拉米夫定、恩替卡韦、替比夫定、阿德福韦耐药突变计算,若有相关位点突变但未导致耐药突变未列为耐药突变。

2.3 2 个地区 HBV 耐药突变结果 本次 500 例标本中共有 208 例标本发生 rtL180M、rtLA181T/V、rtT184G、rtS202I、rtM204、rtM204V、rtM204I/V、rtN236T、rtM250V 当中的某个位点或多个位点突变,共检测出 32 种突变位点组合,其中 6 例标本未发生耐药突变。耐药突变比率为 41.6%,其中上海地区为 48.9%(92/188),兰州地区 35.3%(110/312),2 个地区突变比率差异有统计学意义($P=0.0025$)。202 例耐药突变标本中拉米夫定突变 153 例,占总耐药突变比率的 75.7%(上海 68 例,兰州 85 例);各种耐药突变比率差异有统计学意义($P<0.05$)。2 个地区拉米夫定突变不同:上海地区 rtM204I、rtM204V 突变为主,其他形式突变少数;而兰州地区以 rtM204V 为主;对 2 个地区 rtM204I、rtM204V 进行统计学分析,差异有统计学意义($P=0.0075$)。对阿德福韦耐药的耐药位点进行类似分析发现,2 个地区均以 rtA181T/V 为主,地区间差异无统计学意义($P=0.9940$)。恩替卡韦的突变例数较少未进行位点统计学分析。所有突变标本中,发生 2 种或 2 种以上耐药突变共 109 例,占总耐药突变比率的 54.0%,其中上海 46.7%(43/92),兰州 60.0%(66/110),2 个地区多耐药情况差异无统计学意义($P=0.0597$),发生 3 种药物耐药突变 7 例(上海 3 例,兰州 4 例),无 4 种药物共同耐药突变,其中 2 种耐药以拉米夫定和替比夫定同时耐药为主,占 84.4%(92/109,上海 33/43,兰州 59/66)。

2.4 HBV 基因型与耐药突变关系 对 2 个地区的 BC 分型

及耐药突变的分布统计见表 1。由于 B/C 混合型和非 B 非 C 型在总数中所占比例较小,结果分析剔除了这些标本。对所有耐药突变按照 B 型和 C 型的进行分类如下:B 型 39.2%(29/74),C 型 40.4%(163/403),B、C 型耐药突变比率差异无统计学意义($P=0.839$)。对 2 个地区 B、C 型的突变比例分开进行统计得到类似结果,差异无统计学意义($P>0.05$),其中上海地区($P=0.956$)、兰州地区($P=0.642$)。对 B 或 C 型突变在上海和兰州地区的所占比率分别进行地区间比较:两个地区间 B 型耐药突变情况(上海 48.5%,兰州 31.7%)差异无统计学意义($P=0.14$),2 个地区间 C 型耐药突变(上海 49.0%,兰州 35.3%)差异有统计学意义($P=0.0074$)。

2.5 耐药突变与 HBV 基因型比较 对发生耐药突变的标本按 4 种药物类型与基因型进行分类见表 2,所有 B 和 C 型中 4 种耐药突比率差异无统计学意义($P<0.68$),对上海地区和兰州地区单独进行分析差异无统计学意义($P>0.05$)。对耐药突变位点的基因分析,发现 rtL180M 绝大部分发生在 C 型中(34,1B33C),2 个地区间差异无统计学意义($P>0.05$)。其他几个位点基因型的分析见表 3。关于耐药位点的与基因分型关系,发现了一些位点差异有统计学意义($P<0.05$),如 rtL180M、rtT184G、rtM250V;但同时也有位点差异无统计学意义($P>0.05$),如 rtLA181T/V、rtS202I、rtM204I、rtM204V、rtN236T。

表 2 2 个地区的耐药类型与基因型统计比较[n(%)]

基因型	上海市虹口区精神卫生中心				兰州大学第二医院			
	LAM	LDT	ETV	ADV	LAM	LDT	ETV	ADV
B	11(68.8)	5(31.3)	0(0.0)	6(37.5)	11(84.6)	6(46.2)	0(0.0)	3(23.1)
C	55(75.3)	28(35.4)	5(6.8)	22(30.1)	69(76.7)	50(55.6)	1(1.1)	27(30.0)
非 B 非 C	2(66.7)	1(33.3)	0(0.0)	1(33.3)	4(80.0)	4(80.0)	0(0.0)	1(20.0)
B/C	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	1(50.0)
合计	68	34	5	29	85	61	1	32

表 3 2 个地区的突变位点与基因型统计比较(n)

基因型	上海市虹口区精神卫生中心					兰州大学第二医院					合计
	B	C	非 B 非 C	B/C	合计	B	C	非 B 非 C	B/C	合计	
rtL180M	0	17	0	0	17	1	16	0	0	17	34
rtLA181T/V	3	19	1	0	23	2	24	1	1	28	51
rtT184G	0	3	0		3	0	4	0	0	4	7
rtS202I	2	10	0	1	13	0	3	0	0	3	16
rtM204I	5	28	1	0	34	6	50	4	1	61	95
rtM204V	4	25	1	0	30	5	16	0	0	21	51
rtM204I/V	2	0	0	0	2	0	2	0	0	2	4
rtN236T	3	6	0	0	9	2	9	0	0	11	20
rtM250V	0	1	0	0	1	0	2	0	0	2	3
合计	19	109	3	1	132	16	126	5	2	149	281

3 讨 论

3.1 PCR-LDR 法性能分析 PCR-LDR 法是利用 PCR 法首先对目的 DNA 片段进行扩增,然后对扩增产物进行 LDR 反应即连接酶反应。LDR 的原理是利用具有极强的突变识别能力的连接酶,当上下游探针跟目标产物杂交时,探针和目标完全互补才能进行连接酶反应,如果上下游引物发生错配则连接反应不能进行;对于 PCR-LDR 法的性能相关研究已有数据显示:该方法在检测乙型肝炎的耐药型和基因型具有 PCR 高灵敏度、高特异性和测序法的高精准度特点,且相对测序法性价比更高^[8-10]。本文没有过多对这些性能进行大数据验证,就章节 2.1 中涉及的验证均与先前研究符合^[8-10],表明该检测方法的可靠性。

3.2 2 个地区乙型肝炎类型的关系 由于中国地区主要乙型肝炎类型为 B 型和 C 型,本试剂盒只对 B 型和 C 型进行检测。经统计发现,上海地区和兰州地区的基因型均以 C 型为主,本研究中 2 个地区的各基因分布情况差异无统计学意义($P>0.05$),兰州地区略高于上海地区,这些结果符合先前研究,北方地区以 C 型为主^[3-5],上海地区的 C 型比先前的研究要略高^[11],这可能与标本基数不够大和上海地区流动人口比较多有关系。值得一提的是,本文研究中检测出的非 B 非 C 型主要集中在兰州地区,可能与该地区的少数民族的比率高于上海地区有关系,对于 HBV 的基因分型的研究也显示中国地区的 A 型和 D 型主要存在于少数民族^[5]。

3.3 耐药位点突变分析 本文耐药位点突变的判读基于先前的已有研究^[8]。本研究发现,在所有 208 例发生位点突变患者中,有 6 例没有产生耐药,这可能在服用核苷类似物之前发生先天性的突变,但具体突变机理需要进一步研究。对 2 个地区耐药突变情况进行比较,2 个地区的发生耐药突变的比率差异有统计学意义($P<0.05$),这可能与 2 个地区的经济水平有

关,上海地区的患者可能接受治疗概率比兰州地区高,由于没有患者的详细诊疗资料,具体原因需要进一步探究。研究发现 2 个地区均以拉米夫定突变为主,这与拉米夫定突变的单位点突变相关,rtM204I/V 或 rtL180M 某一位点发生突变便产生耐药。恩替卡韦的耐药突变率最低,这与其耐药为多位点突变有关系,其中恩替卡韦的 6 例突变 5 例存在于上海地区,也侧面说明上海地区患者可能接受治疗的比率更高,且更改过治疗方案。2 个地区的多耐药情况,均以拉米夫定和替比夫定为主,这与替比夫定与拉米夫定的其中一个耐药位点相同相关。

3.4 是否耐药突变与基因型关系分析 对于 2 个地区的 BC 分型和是否耐药突变分析,未发现是否耐药突变在 2 种基因的存在偏好性。本研究显示与先前部分的研究结果相似,突变与否与基因型无关^[12-14],本研究也与部分研究结果有所出入,这些研究认为 C 型较 B 型更容易发生耐药突变^[14-15]。对 2 个地区的 B 型和 C 型的耐药与否进行比较发现,C 型中上海地区发生耐药比率明显高于兰州地区,差异有统计学意义($P<0.05$),就此结果未找到相关文献,是偶然性还是其他因素,有待进一步研究。

3.5 耐药突变位点及耐药药物种类与 HBV 基因型分析 通过统计发现,结果同 3.4,耐药的药物种类与 HBV 基因型无相关性,从统计学上看未发现某种药物耐药突变倾向于某种基因型,这与先前研究基本一致^[12-13]。值得一提的是,6 例发生恩替卡韦突变标本均为 C 型,这一现象可以作为进一步研究对象。对于耐药突变位点与基因型的关系本研究发现部分位点与基因型有关,如 rtL180M、rtT184G、rtM250V 更偏好 C 型,但由于实验基数不大的原因,这一结论需要进一步研究证实。

参考文献

[1] 许建平,钟国权.乙型肝炎病毒核苷类(下转第 1819 页)