

• 论 著 •

乙型肝炎病毒基因型与耐药病毒株的相关性研究*

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

(广东省深圳市中医院: 1. 检验科; 2. 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 征集 340 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 16 例(4.7%), B 型 112 例(32.9%), C 型 148 例(43.5%), D 型 44 例(12.9%), B/C 混合型 20 例(5.9%)。其中发生 YMDD 耐药突变的基因型分别是: A 型 4 例(25.0%), B 型 20 例(18.5%), C 型 64 例(42.1%), D 型 8 例(18.2%), B/C 混合型 4 例(20.0%)。结论 HBV 基因型 C 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.1673-4130.2011.14.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)14-1543-03

Study of the correlation between HBV genotypes and the resistance to lamivudine*

Zhang Shunan¹, Yu Wenhui^{1△}, Zhou Daqiao², Zhang Chunlei¹, Feng Yuli¹,
He Jinsong², Zhou Xiaomei¹, Li Weixiong¹, Chen Xuehong¹, Lin Zhuoling¹

(ShenZhen Traditional Chinese Medicine Hospital: 1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Liver Diseases, Shenzhen 518033, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between hepatitis B virus (HBV) genotypes and the drug resistance. **Methods** 340 patients with chronic hepatitis B (CHB), receiving LAM therapy for more than one year, were enrolled and detected for the plasma HBV DNA level, and HBV DNA were extracted and amplified for sequencing and genotyping. **Results** Sequencing and genotyping revealed that there was a different prevalent frequency of HBV infected genotypes. 16(4.7%) cases were with genotype A, 112(32.9%) with genotype B, 148(43.5%) with genotype C, 44(12.9%) with genotype D and 20(5.9%) with mixed genotype B/C. The frequency of mutations in YMDD motif in patients with different genotypes were 4(25.0%) in genotype A, 20(18.5%) in genotype B, 64(42.1%) in genotype C, 8(18.2%) in genotype D and 4(20.0%) in mixed genotype B/C. **Conclusion** The frequency of mutations in YMDD motif in HBV genotypes C were higher than that in the others. There could be a correlation between HBV genotype and mutations in YMDD motif.

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。全球乙型肝炎病毒(HBV)携带者多达 3.6 亿人, 中国约占 1.2 亿人。慢性乙肝(CHB)可进展为肝硬化、肝癌和肝衰竭, 甚至死亡。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(LAM)为目前临床应用最为广泛的抗 HBV 药物。可是, 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。本课题旨在通过揭示 HBV 基因型与 LAM 耐药的关系, 为临床优化 CHB 治疗方案, 阐明 HBV 耐药机制提供科学依据。本研究经医院伦理委员会审查同意, 签署知情同意书。

1 资料与方法

1.1 一般资料 征集 2008 年 1 月至 2010 年 6 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 340 例, 其中男 312 例, 女 28 例, 年龄(48.5±12.3)岁。其中轻度肝炎 116 例、中度肝炎 208 例、重度肝炎 16 例(B、C 基因型各 4、12 例)。诊断均符合 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[1]。采集 340 例患者血样各 10 mL, 4 000 g 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; (2) HBV 携带者、急性肝炎、肝癌患者; (3) HBV DNA < 1.0×10³ copy/L; (4) 用免疫抑制剂治疗者。

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 30 μL 灭菌用水复溶, 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 基序和 2 种标准变异型(YIDD 和 YVDD), 本课题 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(德国 Eppendorf 公司)试剂盒进行

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

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 2 种变异型的标准质控质粒(CUM: DQ351994; CUI: DQ351989; CUV: DQ352026)。

1.2.3 锁核酸(LNA)实时 PCR 定量检测 HBV DNA (1) LNA TaqMan 探针的设计:YMDD 探针[747~731 nt 反义链 5'-(6-Fam) ATC ATC CAT ATA RCT GA (BHQ1)-3']; YVDD 探针[747~731 nt 反义链 5'-(Hex) ATC ATC CAC ATA RCT GA(BHQ1)-3']; YIDD 探针[750~732 nt 反义链 5'-(Cy5)CAC ATC ATC AAT ATA RCT G(BHQ3)-3']。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,1U DNA 聚合酶和 QuantiMix Buffer 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、550、650 nm 测定探针 YMDD、YVDD 和 YIDD 的荧光信号。(2)以前述所鉴定的 YMDD、YIDD、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 OD₂₆₀ 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(10~10¹⁰ 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 利用 QIA quick PCR 纯化试剂盒(德国 QIAGEN 公司),严格按标准操作规程(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、AF1605010),利用 MegAlign 仪(美国 DNASTAR 公司)对所测定的序列进行比对分析。利用 PHYLIP 软件包,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 利用 SPSS18.0 统计软件进行统计处理,多个样本率及 2 个或多个构成比的比较用 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 检验进行分析。定量资料进行 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象的基本特征 见表 1。

表 1 340 例 CHB 患者基本特征($\bar{x} \pm s$)

项目	A 型	B 型	C 型	D 型	B/C 混合型	χ^2	P
性别(男/女)	16/0	104/8	136/12	36/8	20/0	2.29	0.682
年龄(岁)	38.0±14.2	42.0±15.5	45.0±17.4	39.0±12.7	35.0±18.2	1.49	0.828
HBV DNA 水平(Ig IU/mL)	2.3±1.4	7.6±4.2	6.3±3.8	1.8±1.0	0.8±0.5	14.30	0.006

2.2 基因分型结果 基因型 A 16 例(4.7%),基因型 B 112 例(32.9%),基因型 C 148 例(43.5%),基因型 D 44 例(12.9%),基因型 B/C 20 例(5.9%)。

2.3 YMDD 突变 测序分析显示,YMDD 基因突变率分别为:基因型 A 25.0%(4/16);基因型 B 17.8%(20/112);基因型 C 43.2%(64/148);基因型 D 18.2%(8/44);基因型 B/C 20.0%(4/20)。见表 2。各基因型之间 YVDD 变异频率的差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.703, P = 0.005$),各基因 YIDD 变异频率的差异也具有统计学意义($\chi^2 = 21.276, P = 0.001$)。基因型 C 的 YMDD(YVDD、YIDD)突变率最高,与其他基因型比较,YVDD 和 YIDD 变异频率的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。研究总体中,虽然 YVDD 变异率(20.0%)比 YIDD(9.4%)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 4、12、40、8、4;其相应 L180M 变异例数为 4、12、16、4、0)。

表 2 YMDD 基因突变与基因型的关系

基因型	n	YMDD 突变[n(%)]		
		YVDD 突变	YIDD 突变	合计
A	16	4(25.0)	0(0.0)	4(25.0)
B	112	12(11.1)	8(7.4)	20(17.8)
C	148	40(26.3)	24(15.8)	64(43.2)
D	44	8(18.2)	0(0.0)	8(18.2)
B/C	20	4(20.0)	0(0.0)	4(20.0)
合计	340	68(20.0)	32(9.4)	100(29.4)

3 讨 论

LAM 为目前临床应用最广泛的抗 HBV 药物。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

(ALT)水平明显降低,HBsAg 发生血清转换,肝脏组织病理得到改善^[4]。可是,LAM 的长期使用可能出现 HBV 耐药现象。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^[5]。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^[6]报道,LAM 治疗期间 HBV 重叠基因突变可导致 HBsAg 假阴性,隐匿性 CHB 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 与三磷酸脱氧胞苷(dCTP)存在显著差异,而阿德福韦酯(ADV)与自然底物 dCTP 只存在微小差异,因此,LAM 耐药发生率高,ADV 耐药发生率低,这是药物空间结构对耐药率的影响。LAM、ADV、替比夫定(LDT)只需 1 个位点突变就能产生耐药,而恩替卡韦(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^[7],ETV 可作为治疗 LAM 耐药的一种选择^[8]。除药物因素之外,患者治疗前 HBV DNA 高水平、多次治疗病毒抑制不彻底、有耐药史、顺应性差、治疗方案和药物组合不合理、年龄较轻、有肝硬化病史等均为耐药突变株产生的高危因素。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 100 例 YMDD 突变,其中 A 基因型 4 例,B 基因型 20 例,C 基因型 64 例,D 基因型 8 例,B/C 基因型 4 例。YVDD 变异 68 例(20.0%),YIDD 变异 32 例(9.4%),可见 YVDD 变异率较 YIDD 变异率高,且前者常伴有 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 高,而参考文献^[4]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 2 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 的耐药率明显高于基因型 D。参考文献^[12]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 HBV 的患者比感染 B 基因型 HBV 的更易发展为进展性肝脏疾病,并且病情更为严重,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^[13]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%(100/340),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(148 例中有 12 例重症肝炎患者)有关。但研究对象中不排除存在患者没有按医嘱用药的情况,这将影响结果的可信性。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^[14]报道,感染 C 基因型 HBV 后易发展成 CHB、肝硬化和肝细胞癌,HBV 基因型还与抗病毒的疗效有关,这与本研究结论相符合。

综上所述,HBV 基因型与耐药病毒株的产生存在相关性。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 的致病机理和耐药机制。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881-891.
- [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] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 金怡, 于红卫, 李娟, 等. 恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化 48 周疗效分析[J]. 中国全科医学, 2008, 11(12B): 2252-2253.
- [9] Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, et al. YMDD motif variants in in-active 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] 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.
- [13] 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.
- [14] 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: 2011-02-15)