

• 基础实验研究论著 •

## 耐核苷类药物的乙型肝炎病毒 P 区逆转录酶基因序列分析的研究\*

戴小波, 唐文志, 彭 瑟, 曾朱君, 黄小燕, 尹晓卓  
(广东省中医院珠海医院检验科, 广东珠海 519015)

**摘要:**目的 探讨慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒(HBV) P 区逆转录酶(RT)基因突变发生的频率和类型。方法 采用聚合酶链反应(PCR)方法对 38 例 HBV RT 基因进行扩增后测序, 分析 rt80、rt84、rt85、rt169、rt173、rt180、rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、rt207、rt213、rt214、rt215、rt229、rt233、rt236、rt237、rt238、rt250 位点的变异情况。结果 HBV RT 基因突变主要集中在 rt204、rt238、rt180、rt229, 突变类型以 M204I、N/H238T、L180M、M204V 为主。结论 对 HBV RT 基因的序列分析有利于临床选择有效的抗病毒药物进行治疗。

**关键词:**点突变; 肝炎病毒, 乙型; 核苷类; 抗药性, 病毒; 序列分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1063-02

## Analysis of reverse transcriptase gene sequences in P region of nucleoside analogs-resistant hepatitis B virus\*

Dai Xiaobo, Tang Wenzhi, Peng Se, Zeng Zhujun, Huang Xiaoyan, Yin Xiaozhuo

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Hospital, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong 519015, China)

**Abstract:** Objective To investigate the mutation frequencies and types of reverse transcriptase(RT) gene in P region of hepatitis B virus (HBV) from patients with chronic hepatitis B. **Methods** RT gene of HBV from 38 patients were amplified by polymerase chain reaction(PCR) and then sequenced. Point mutations of rt80, rt84, rt85, rt169, rt173, rt180, rt181, rt184, rt194, rt202, rt204, rt207, rt213, rt214, rt215, rt229, rt233, rt236, rt237, rt238, rt250 were analyzed. **Results** HBV RT gene mutations were mainly located on rt204, rt238, rt180, rt229. M204I, N/H238T, L180M, M204V were the major mutation types. **Conclusion** Sequence analysis of HBV RT gene is contribute to selecting effective antiviral drugs for clinical treatment.

**Key words:** point mutation; hepatitis B virus; nucleosides; drug resistance, viral; sequence analysis

目前,国内、外慢性乙型肝炎抗病毒治疗的主要药物为核苷类似物,但其长期使用可引起乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)P 区逆转录酶(reverse transcriptase, RT)基因突变而产生耐药现象,甚至在抗病毒治疗前,由于 RT 基因的自然突变而导致对核苷类药物敏感性降低<sup>[1]</sup>,因此,对 HBV RT 基因的序列分析对指导临床抗病毒治疗有重要意义。为此笔者对 38 例乙型肝炎患者的 HBV P 区 RT 基因进行了序列分析,以研究 HBV RT 基因突变与耐药情况,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2012 年 6 月至 2013 年 1 月于本院门诊、住院部就治的慢性乙型肝炎患者共 38 例,诊断符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》标准<sup>[2]</sup>,患者抗病毒治疗前 HBV DNA > 10<sup>3</sup> copies/mL,服拉米夫定等核苷类抗病毒药物后出现 HBV DNA 或丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)反跳或治疗中 HBV DNA 未降至 10<sup>4</sup> copies/mL 以下<sup>[3]</sup>。

**1.2 检测方法** (1)DNA 提取:DNA 提取试剂由天根生化科技(北京)有限公司提供,操作严格按照说明书进行。(2)HBV RT 基因扩增和序列测定:基因扩增采用美国 Thermo 公司生产的即用型聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒,用 BioRad-PTC200-PTC-200 梯度 PCR 仪进行基因扩增。PCR 产物利用 BioRad 电泳仪及凝胶成像系统进行电泳以确定扩增片段的正确性,再使用 ABI 3500 基因测序仪(美国 ABI 公司)对扩增的 PCR 产物进行测序。(3)HBV RT 基因序列的分析:使用综合序列分析软件 BioEdit 将测序序列与美国

国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)发布的参考序列进行比对,确定各个耐药位点在测序图谱上的位置,进而分析耐药位点是否发生突变,当同一位点存在 1 种以上序列峰型且每种均达到总峰值的 10% 以上时,报告为突变/未突变或 2 种突变序列共存。基因测序及分析由广州金域医学检验中心有限公司完成。

**1.3 耐药位点** 共检测 21 个耐药位点:rt80、rt84、rt85、rt169、rt173、rt180、rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、rt207、rt213、rt214、rt215、rt229、rt233、rt236、rt237、rt238、rt250。

**1.4 统计学处理** 采用 CHISS 软件进行统计学分析,组间率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $\alpha=0.05$  为检验水准,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 突变情况** 在 38 例病例中共发现 18 例存在 RT 基因突变,其中 2 例为突变株与野生株共存。

**2.2 突变基因类型** 在 18 例存在 RT 基因突变的 HBV 中,共检出 18 种 RT 基因突变类型,其中 9 例(50.00%)有 2 种或 2 种以上突变类型,并发现 N/H238A、I169M 这 2 种少见突变类型,突变类型发生频率见表 1。突变类型主要为 M204I(8/18)、N/H238T(5/18)、L180M(4/18)、M204V(3/18),其中 M204I(8/18)与 L180I(2/18)、N/H238D(1/18)等的突变类型比较,出现频数的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 突变基因位点** 在 18 例存在 RT 基因突变的 HBV 中共发现 12 个突变位点,其中 9 例(50%)HBV 存在 2 个或 2 个以

\* 基金项目:珠海市卫生局立项项目(2013091)。 作者简介:戴小波(1979~),男,硕士,主管技师,主要从事感染与免疫学的工作。

上突变位点,并发现 1 个少见突变位点(rt169),突变位点发生频率见表 2。突变位点主要为 rt204(10/18)、rt238(6/18)、rt180(5/18)、229(4/18),其中 rt204(10/18)与 rt229(4/18)、rt181(1/18)等突变位点的出现频数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),rt238(6/18)与 rt181(1/18)等突变位点的出现频数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 RT 基因突变类型频数表

突变类型	出现频数(n)	突变类型	出现频数(n)
M204I	8	A181V	1
N/H238T	5	L229W	1
L180M	4	L229M	1
M204V	3	L229V	1
L180I	2	L229F	1
N/H238D	1	T184L	1
V207L	1	S213T	1
M250L	1	L80I	1
V84M	1	N236T	1

2.4 联合突变 在 18 例出现 RT 基因突变的 HBV 中,共有 9 例存在 2 个或 2 个以上突变位点,其中有 3 例存在 3 个突变

位点,1 例存在 4 个突变位点,联合突变位点分布见表 3。在已发生 rt204 位点突变的 HBV 中,90%伴有其他位点的突变,其中 50%伴有 rt180 位点突变,其他常见的联合突变位点为 rt283(30%)、rt229(30%);在已发生 rt180 位点突变的 HBV 中,100%伴有其他位点的突变,其中 100%伴有 rt204 位点突变,其他常见的联合突变位点为 rt229(40%)、rt283(20%);在已发生 rt238 位点突变的 HBV 中,有 50%伴有其他位点的突变,其中有 50%同时伴有 rt204 位点突变,其他常见的联合突变位点为 rt180(20%);在已发生 rt229 位点突变的 HBV 中,有 75%伴有其他位点的突变,其中 75%伴有 rt204 位点突变,其他常见的联合突变位点为 rt180(50%)。

表 2 RT 基因突变位点频数表

突变位点	出现频数(n)	突变位点	出现频数(n)
rt204	10	rt84	1
rt238	6	rt184	1
rt180	5	rt207	1
rt229	4	rt250	1
rt181	1	rt80	1
rt213	1	rt236	1

表 3 联合突变位点分布表

主突变位点	联合突变位点(n)											
	rt204	rt238	rt180	rt229	rt207	rt80	rt250	rt84	rt236	rt181	rt184	rt213
rt204	10	3	5	3	1	1	1	1	0	0	1	0
rt238	3	6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
rt180	5	1	5	2	0	1	0	0	0	0	1	0
rt229	3	0	2	4	0	0	1	0	0	0	1	0
rt207	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rt80	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
rt250	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
rt84	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
rt236	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
rt181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
rt184	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
rt213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

3 讨 论

拉米夫定等核苷类似药物在体内磷酸化后形成三磷酸形式,竞争性结合至 HBV 延长中的 DNA 链上,由于其缺乏 3'-OH,不能形成正常的 3',5'-磷酸二酯键,导致 HBV 复制的终止。但长期使用会引起 HBV 多聚酶基因(P)RT 基因发生点突变,HBV P 区 RT 基因突变会导致 HBV DNA 复制过程中核苷类似物掺入新生链的功能下降,链终止作用减弱,从而产生耐药。目前研究认为,HBV P 区 RT 基因突变导致其对核苷类药物耐药的突变位点分为 3 类<sup>[4]</sup>:(1)rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、rt236、rt250 为核苷类药物的主要耐药位点。rt204 突变能导致拉米夫定、替比夫定、恩曲他滨耐药,rt181、

rt236 突变能导致阿德韦福耐药,rt194 突变能导致替诺福韦耐药,rt204 单独突变还能引起恩替卡韦敏感性降低,但 rt204 与 rt202、rt184、rt250 三者任意位点同时突变都能导致恩替卡韦耐药。(2)rt80、rt169、rt173、rt180 为次要耐药位点。(3)rt84、rt85、rt207、rt213、rt214、rt215、rt229、rt233、rt237、rt238 为尚未论证的耐药位点。

本研究发现,最常见的突变位点为 rt204。在所有发生突变的 HBV 中其发生率为 55.56%(10/18),与曹亦菲等<sup>[5]</sup>的报导一致。其他次要位点 rt180,未经证实的耐药位点 rt238、rt229 等的突变对临床用药的影响值得进一步探讨。本研究发现 1 例 rt181、1 例 rt204 联合 rt184 突变,未(下转第 1068 页)

Cancer, 2008, 18(5): 976-984.

[13] Baykal C, Demirtas E, Al A, et al. Comparison of hepatocyte growth factor levels of epithelial ovarian Cancer cyst fluids with benign ovarian cysts[J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 14(1): 152-156.

[14] Zhou HY, Wong AS. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells[J]. Endocrinology, 2006, 147(5): 2557-2566.

[15] Sowter HM, Corps AN, Smith SK. Hepatocyte growth factor (HGF) in ovarian epithelial tumour fluids stimulates the migration of ovarian carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 1999, 83(4): 476-480.

[16] Matsumoto K, Nakamura T. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in Cancer biology and therapeutics[J]. Cancer Sci, 2003, 94(4): 321-327.

[17] Zillhardt M, Christensen JG, Lengyel E. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, reduces tumor burden and metastasis in a preclinical model of ovarian Cancer metastasis [J]. Neoplasia, 2010, 12(1): 1-10.

[18] Zhou HY, Pon YL, Wong AS. HGF/MET signaling in ovarian cancer[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(6): 469-480.

[19] Pan BS, Chan GK, Chenard M, et al. MK-2461, a novel multitargeted kinase inhibitor, preferentially inhibits the activated c-Met receptor[J]. Cancer Res, 2010, 70(4): 1524-1533.

[20] Yap TA, Olmos D, Brunetto AT, et al. Phase I trial of a selective

c-MET inhibitor ARQ 197 incorporating proof of mechanism pharmacodynamic studies[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(10): 1271-1279.

[21] Wakelee HA, Gettinger SN, Engelman JA, et al. A phase Ib/II study of XL184 (BMS 907351) with and without erlotinib (E) in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15 Suppl): S3017.

[22] Eder JP, Shapiro GI, Appleman LJ, et al. A phase I study of foretinib, a multi-targeted inhibitor of c-Met and vascular endothelial growth factor receptor 2 [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(13): 3507-3516.

[23] Ou SH, Kwak EL, Siwak-Tapp C, et al. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (Met) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo Met amplification [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(5): 942-946.

[24] Giordano S. Rilotumumab, a mAb against human hepatocyte growth factor for the treatment of cancer [J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(4): 448-455.

[25] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735-742.

(收稿日期: 2012-12-07)

(上接第 1064 页)

发现 rt194 的突变,说明本院 HBV 耐药主要针对拉米夫定、替比夫定、恩曲他滨,而对其他核苷类药物的耐药比较少见。在联合突变方面,在已发生 rt204 位点突变的 HBV 中有 50% 伴 rt180 位点的突变,而 rt180 位点突变均伴随 rt204 位点突变,这种 rt180 联合 rt204 突变的 HBV,与 rt204 单独突变相比,其对恩替卡韦及替比夫定敏感性显著降低<sup>[6-7]</sup>;而存在 2 个以上位点突变的 HBV 中,主要是 rt204 和(或)rt180 联合其他位点突变,这种多位点的联合突变不但增加了 HBV 耐药的复杂性及疾病的难治性,对 HBV 的其他生物学特性的影响也值得进一步探讨。在本研究中,rt181 位点突变率较低,这与曹亦菲等<sup>[5]</sup>、李敏伟等<sup>[8]</sup>的研究结果有差异,可能与本研究病例较少有关,但是否存在地区差异等原因还值得进一步研究。在突变类型方面,以 rtM204I 最为常见,其次是 rtN/H238T 与 rtL180M,本研究还在 2 例 HBV 中发现阿德福韦相关的少见突变类型 N/H238A,在 1 例 HBV 中发现恩替卡韦相关的少见突变类型 I169M,这种少见突变类型的临床意义有待进一步研究。

在应用核苷类似物治疗慢性乙型肝炎的过程中,随着用药时间的延长,RT 基因耐药相关性变异是难以避免的,因此,采用核苷类药物治疗的慢性乙型肝炎患者,有必要在选用核苷类药物治疗前或治疗过程中定期进行 HBV RT 基因序列分析,从而选择更有效的抗病毒药物,以提高抗病毒治疗的疗效。

参考文献

[1] 汪莉萍,韩方正,李春杨,等. 慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前

HBV P 区基因序列测定的意义[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(5): 303-305.

[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.

[3] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy [J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl): S174-184.

[4] 徐东平,刘妍,成军,等. 340 例慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒多位点耐药相关突变分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(10): 735-738.

[5] 曹亦菲,何平,谭晓华. 1012 例乙型肝炎患者 HBV P 区基因位点变异分析[J]. 健康研究, 2011, 31(1): 17-20.

[6] Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3498-3507.

[7] Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(8): 2525-2532.

[8] 李敏伟,陈智,邵晓斌,等. 拉米夫定耐药者 HBV P 基因 rtL180M 和 rtM204V/I 突变分析[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(3): 176-177.

(收稿日期: 2013-01-27)