

· 临床检验研究论著 ·

## 乙型肝炎病毒耐药突变对病毒表面抗原编码区的影响\*

俞 杨<sup>1</sup>, 邬 兰<sup>1</sup>, 焦 杰<sup>1</sup>, 颜 宁<sup>2</sup>, 杜同信<sup>1</sup>, 王自正<sup>1</sup>

(1. 南京医科大学附属南京医院核医学科分子诊断室, 江苏南京 210006;

2. 南京医科大学附属南京医院感染性疾病科, 江苏南京 210006)

**摘要:**目的 在接受核苷(酸)类似物治疗的慢性乙型肝炎患者中,分析乙肝病毒(HBV)耐药突变对乙肝病毒表面抗原的影响,为深入研究这些突变的生物学意义奠定基础。方法 采集用核苷(酸)类似物进行抗病毒治疗的 653 例慢性乙型肝炎患者的血浆标本,提取 HBV 基因组 DNA,对涉及耐药突变位点并且和表面抗原基因在基因组结构中完全重叠的逆转录酶结构域进行 PCR 扩增和 DNA 测序,根据 NCBI 中的乙型肝炎病毒参考序列分析这些耐药突变位点对表面抗原氨基酸突变的影响。结果 653 例标本中,逆转录酶结构域 rtV173L、rtA181T、rtA181V、rtT184G、rtS202I、rtM204V 和 rtM204I 的突变分别可以导致表面抗原氨基酸位点改变: E164D、I172W 突变为终止密码子、L173F、L176V、V194F、I195M 和 W196L 以及 W196L/S 的突变, rtL180M 和 rtS202G 未造成表面抗原的改变。结论 乙型肝炎病毒耐药突变可导致表面抗原多个氨基酸位点的改变。

**关键词:**核苷类似物; 耐药性; 表面抗原; 基因突变; 肝炎病毒,乙型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1518-03

## The effect of hepatitis B virus drug resistant mutation on surface antigen coding region\*

Yu Yang<sup>1</sup>, Wu Lan<sup>1</sup>, Jiao Jie<sup>1</sup>, Yan Ning<sup>2</sup>, Du Tongxin<sup>1</sup>, Wang Zizheng<sup>1</sup>

(1. Molecular Diagnosis Unit, Department of Nuclear Medicine, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China; 2. Department of Infectious Disease, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of hepatitis B virus (HBV) drug resistant variants on surface antigen mutations for further biological function research in the chronic hepatitis B patients who received nucleos(t)ide analogues therapy. **Methods** 653 plasma samples were selected from chronic hepatitis B patients who received nucleos(t)ide analogues therapy, HBV genomic DNA was extracted to carry out PCR-sequencing of reverse transcriptase domain/surface antigen gene overlapping region containing the drug resistance mutation sites. We analyzed the corresponding surface antigen mutations based on the reference sequences from the NCBI database. **Results** The mutations of rtV173L, rtA181T, rtA181V, rtT184G, rtS202I, rtM204V and rtM204I can result in mutations of sE164D, sI172W, sL173F, sL176V, sV194F, sI195M, sW196L and sW196L/S respectively. The mutations of rtL180M and rtS202G can not cause the surface antigen mutations. **Conclusion** HBV drug resistant variants can lead to surface antigen mutations in multiple sites.

**Key words:** nucleoside analogues; drug resistant; surface antigen; gene mutations; hepatitis B virus

慢性乙型病毒性肝炎(慢性乙肝)是严重危害人类健康的疾病,全世界有 3.5 亿至 4 亿的慢性携带者,由此发展而来的终末期肝病和原发性肝癌每年可导致近 100 万患者死亡<sup>[1-3]</sup>。目前,核苷(酸)类似物是慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗的主要手段,在体内该类药物主要通过抑制乙肝病毒(HBV)聚合酶的活性而发挥抗病毒作用<sup>[4]</sup>。但是,HBV 耐药变异株的产生是核苷(酸)类似物使用过程中突出的问题,现已明确 HBV 聚合酶的逆转录酶结构域(RT 结构域)中相关位点的氨基酸突变是产生 HBV 耐药变异株的重要分子基础<sup>[5]</sup>。HBV 是已知动物病毒中基因组最小的病毒,只有大约 3.2 kb,不同开放阅读框之间方向一致、移码翻译和部分重叠是其基因组结构的重要特征,其中编码病毒表面抗原的 S 基因完全被 RT 结构域所包括,两者在同一方向上通过移码的方式各自翻译<sup>[6]</sup>。因此,HBV 耐药变异株中 RT 结构域的氨基酸突变完全有可能引起 S 基因的突变。由于 S 基因所编码的表面抗原在乙肝的免疫预防、诊断和疗效监测中具有十分重要的临床意义,所以有必

要评价耐药变异株中 RT 结构域的氨基酸突变如何影响表面抗原的编码。本研究采用 PCR 测序的方法,选择 653 例接受核苷(酸)类似物治疗的慢性乙型肝炎患者,对与 S 基因完全重叠的 RT domain 中的各耐药相关位点 rt169、rt173、rt180、rt181、rt184、rt202 和 rt204 的突变情况进行总结,并分析了各种耐药相关位点突变对 HBV 表面抗原氨基酸位点的影响。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2011 年 1 月至 2012 年 10 月间使用核苷(酸)类似物(拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯或恩替卡韦中的一种或多种)进行抗病毒治疗的 653 例慢性乙肝患者作为研究人群,抗病毒治疗严格参照中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会 2010 年版《慢性乙型肝炎防治指南》进行<sup>[7]</sup>。对所有患者静脉采集 2 mL 全血 EDTA 抗凝,采集 2 h 内分离血浆,−80 ℃ 保存备用。本研究符合南京医科大学伦理委员会伦理审查标准并取得患者的知情同意。

**1.2 仪器与试剂** HBV 基因组提取试剂盒 E. Z. N. A. Viral

\* 基金项目:南京市医学科技发展资金卫生青年人才培养项目(NJH201132)。 作者简介:俞扬,男,检验主管技师,主要从事 HBV 分子生物学研究。

DNA Kit 和切胶纯化试剂盒 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 来自 Omega Bio-Tek 公司; Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶来自 Invitrogen 公司; DNA 测序试剂盒 GenomeLab DTCS Quick Start Kit 来自 Beckman 公司; S1000 PCR 仪和 Gel Doc EZ Imager 凝胶成像系统来自 Bio-rad 公司; CEQ8000 遗传分析仪来自 Beckman 公司。

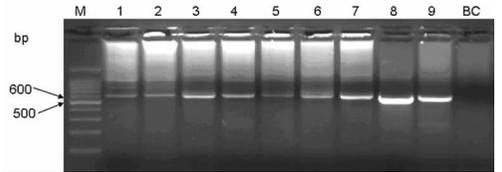
**1.3 方法** 根据 E. Z. N. A. Viral DNA Kit 的说明书提取 653 例血浆标本的 HBV 基因组 DNA, 最终用 50 μL 洗脱液洗脱, -20 °C 保存备用。用引物 HBV-F (5'-GCT ATC GCT GGA TGT GTC TG-3', 366 ~ 385 bp) 和 HBV-R (5'-GTA CAA TAT GTT CCT GCG GTA-3', 908 ~ 928 bp) 对包含 rt169, rt173, rt180, rt181, rt184, rt202 和 rt204 的 HBV 聚合酶的 RT 结构域进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μL, 其中: 10×高保真 PCR 缓冲液 5 μL, MgSO<sub>4</sub> 2 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.2 μmol/L, Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶 1 U, 模板 5 μL; 扩增条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 循环 35 次。用 1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 并根据 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的说明书对 563 bp 处的目的条带进行切胶纯化。将切胶纯化的产物按照 GenomeLab DTCS Quick Start Kit 的说明书进行测序 PCR 和纯化, 并在 CEQ8000 遗传分析仪上进行检测。

**1.4 序列分析** 结果用仪器自带的 9.0 版软件的 Sequencing 模块导出。将导出的测序结果在 BioEdit7.1.3.0 软件上分析, 筛选出 rt169, rt173, rt180, rt181, rt184, rt202 和 rt204 中任意位点存在核苷(酸)类似物耐药相关氨基酸突变的标本, 并分析其相应的核酸突变对 HBV 表面抗原氨基酸突变的影响。本研究中, 与 S 基因完全重叠的 RT 结构域各个耐药相关突变位点和氨基酸的选择以 2012 年版欧洲肝病研究协会的慢性乙肝管理临床指南为准<sup>[8]</sup>, 分别为 rtI169T、rtV173L、rtL180M、rtA181T/V、rtT184G、rtS202I/G 和 rtM204V/I。本研究所涉及的 653 例 HBV 均为 B 基因型或 C 基因型, 在分析表面抗原突变时与 NCBI Virus Genotyping 中 HBV 相应基因型的 3 个

参考序列进行比对, 若同一核苷酸位点上出现不同的碱基, 则以 3 个参考序列中的一致性序列为准。

**2 结果**

**2.1 PCR 扩增** 653 例标本中的部分 PCR 扩增结果如图 1 所示, 包含 rt169, rt173, rt180, rt181, rt184, rt202 和 rt204 的 HBV 聚合酶 RT 结构域的片段大小为 563 bp, 所有标本在目的片段大小处都有特异性的扩增条带。



M: 100 bp DNA 分子标记物; 1~9: 包含 rt169, rt173, rt180, rt181, rt184, rt202 和 rt204 的 HBV 聚合酶 RT 结构域的 PCR 扩增片段; BC: 空白对照。

**图 1 653 例标本中的部分 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果**

**2.2 耐药位点的突变及其对 HBV 表面抗原突变的影响** 核苷(酸)类似物耐药变异株可以在多个位点上导致 HBV 表面抗原的突变, 见表 1。653 例使用核苷(酸)类似物治疗的慢性乙肝患者标本中, 未见 rtI169T 的突变; rtV173L 突变 24 例, 导致表面抗原 E164D 的突变; rtL180M 突变 80 例, 未导致表面抗原 171S 突变; rtA181T/V 突变 66 例, 其中 rtA181T 突变导致表面抗原 172W 突变为终止密码子, 从而造成表面抗原的截短, 而 rtA181V 突变导致表面抗原 L173F 的突变; rtT184G 突变 1 例, 未导致表面抗原 175L 突变, 但是可致表面抗原 L176V 的突变; rtS202I/G 突变 11 例, 其中 rtS202I 突变导致表面抗原 V194F 的突变, 而 rtS202G 突变未导致表面抗原 193S 突变; rtM204V/I 突变 143 例, 其中 rtM204V 突变可导致表面抗原 I195M 和 W196L 的突变, 而 rtM204I 突变可导致表面抗原 W196L/S 的突变。

**表 1 HBV 耐药变异株相关突变位点的突变情况及其对表面抗原突变的影响**

HBV 耐药变异株的相关突变位点	对应 RT domain 的核酸突变	对应表面抗原编码区的核酸突变	对应表面抗原的氨基酸突变
rtI169T	—	—	—
rtV173L	GTG→TTG	GAG→GAT	E164D
	GTG→CTG	GAG→GAC	E164D
rtL180M	CTG→ATG	TCC→TCA	不导致 171S 突变
rtA181T	GCT→ACT	TGG→TGA	172W 突变为终止密码子
rtA181V	GCT→GTT	CTC→TTC	L173F
rtT184G	ACT→GGT	TTA→TTG 和 CTA→GTA	不导致 175L 突变, L176V
rtS202I	AGT→ATT	GTT→TTT	V194F
rtS202G	AGT→GGT	TCA→TCG	不导致 193S 突变
rtM204V	ATG→GTG	ATA→ATG	I195M
	ATG→GTT	ATA→ATG 和 TGG→TTG	I195M 和 W196L
rtM204I	ATG→ATT	TGG→TTG	W196L
	ATG→ATC	TGG→TCG	W196S

—: 本研究中未发现此种突变。

**3 讨论**

HBV 具有相当紧凑的基因组结构, 其中编码聚合酶的 P

基因的逆转录酶结构域(RT 结构域)完全包括了编码表面抗原的 S 基因序列<sup>[9]</sup>, 而 RT 结构域基因片段易在核苷(酸)类似

物选择压力的作用下发生突变<sup>[10]</sup>。基于上述依据,本研究利用 653 例接受核苷(酸)类似物治疗的慢性乙肝患者的血浆标本,证实 RT 结构域突变所产生的 HBV 耐药突变的确可以导致编码表面抗原的多个位点发生突变。

在本研究中,HBV 耐药变异株相关突变位点和氨基酸的选择参考 2012 年版的欧洲肝病研究协会的慢性乙肝管理临床指南<sup>[8]</sup>,对指南中未列出而在以往研究中报道过的其他潜在的耐药突变位点未予选择。值得注意的是,rt169、rt173、rt180、rt181、rt184、rt202 和 rt204 位点上出现的其他氨基酸突变也可能造成 S 基因的突变,不过现有的循证医学证据尚不支持这些突变和核苷(酸)类似物耐药之间的联系,所以本研究未选择这些突变进行分析。

近年来国内已有研究综述关注 HBV 耐药突变所诱发的表面抗原突变<sup>[11]</sup>,与之相比,本研究还发现了 rtM204V 可以同时导致表面抗原 I195M 和 W196L 的突变,但是未发现 rtM204I 可致 196W 突变为终止密码子。尽管 HBV 耐药变异导致的表面抗原突变多位于表面抗原的主要亲水区之外,但是其潜在的生物学意义也值得研究,因为以往的研究发现主要亲水区之外的氨基酸突变会导致表面抗原的功能改变,例如 F183C 的突变可以造成 HBV 的免疫逃逸<sup>[12]</sup>。实际上,已有初步的研究报道了其中某些表面抗原突变所导致的生物学功能变化<sup>[13]</sup>,近年来表面抗原 172W 突变为终止密码子的研究尤其被关注;现有的研究结果提示,不论在体外实验还是在体内实验中该突变均可导致分泌到细胞外的表面抗原减少<sup>[14-15]</sup>,过多的表面抗原聚集在细胞内可能增加某些患者发生原发性肝癌的风险<sup>[16]</sup>。

随着核苷(酸)类似物在慢性乙型肝炎临床治疗中的不断使用,HBV 耐药变异株的产生已成为临床迫切需要面对的问题,而分析耐药突变对表面抗原的影响,将为未来深入研究耐药变异株中 HBV 表面抗原的生物学功能奠定基础,从而有助于对表面抗原检测做出更加全面合理的评价。

参考文献

[1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection - natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.

[2] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2007, 45(2): 507-539.

[3] J. J Rheumatol, 1994, 21(12): 2281-2285.

[5] Karakoc M, Altindag O, Keles H, et al. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis[J]. Rheumatol Int, 2007, 27(12): 1131-1134.

[6] Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, et al. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases[J]. Neuroimmunomodulation, 2008, 15(2): 93-101.

[7] Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP, et al. The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma[J]. J Pineal Res, 2007, 42(1): 1-11.

[8] Agez L, Laurent V, Guerrero HY, et al. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat[J]. J Pineal Res, 2009, 46(1): 95-105.

[9] Yu HS, Reiter RJ. Melatonin: Biosynthesis, physiological effects,

[3] McMahon BJ. Natural history of chronic hepatitis B[J]. Clin Liver Dis, 2010, 14(3): 381-396.

[4] Fung J, Lai CL, Seto WK, et al. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(12): 2715-2725.

[5] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1593-1608.

[6] Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection[J]. Antivir Ther, 2010, 15(Suppl 3): 3-14.

[7] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.

[8] European Association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-185.

[9] Mauss S, Berg T, Rockstroh J, et al. Hepatology 2012: a clinical Textbook[M]. Germany: Flying Publisher, 2012: 66-70.

[10] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.

[11] 杨松, 成军. 核苷(酸)类似物耐药与乙型肝炎病毒表面抗原变异[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(5): 318-320.

[12] Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution[J]. Virus Res, 2007, 127(2): 164-176.

[13] Sloan RD, Ijaz S, Moore PL, et al. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant[J]. Antivir Ther, 2008, 13(3): 439-447.

[14] Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172 \* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound[J]. Hepatology, 2008, 48(1): 88-98.

[15] Dai J, Chen EQ, Bai L, et al. Biological characteristics of the rtA181T/sW172 \* mutant strain of Hepatitis B virus in animal model[J]. Virol J, 2012, 9: 280.

[16] Yeh CT, Chen T, Hsu CW, et al. Emergence of the rtA181T/sW172 \* mutant increased the risk of hepatoma occurrence in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 398.

(收稿日期: 2012-11-08)

(上接第 1517 页)

[5] Karakoc M, Altindag O, Keles H, et al. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis[J]. Rheumatol Int, 2007, 27(12): 1131-1134.

[6] Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, et al. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases[J]. Neuroimmunomodulation, 2008, 15(2): 93-101.

[7] Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP, et al. The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma[J]. J Pineal Res, 2007, 42(1): 1-11.

[8] Agez L, Laurent V, Guerrero HY, et al. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat[J]. J Pineal Res, 2009, 46(1): 95-105.

[9] Yu HS, Reiter RJ. Melatonin: Biosynthesis, physiological effects,

and clinical applications[M]. Boca Raton: CRC Press, 1992: 1-17.

[10] Cutolo M, Masi AT. Circadian rhythms and arthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2005, 31(1): 115-129.

[11] Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(3): 493-507.

[12] Cutolo M. Night-time glucocorticoid-A paradigm shift in glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis? [J]. Eur Musculoskelet Rev, 2009, 4(2): 41-43.

[13] Senel K, Baykal T, Melikoglu MA, et al. Serum melatonin levels in ankylosing spondylitis: correlation with disease activity[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(1): 61-63.

(收稿日期: 2013-01-12)