

• 临床检验研究论著 •

沈阳地区 90 例乙型肝炎病毒基因分型及耐药变异分析

江浪进, 李金玲[△]

(中国人民解放军二〇二医院检验科, 辽宁沈阳 110003)

摘要:目的 运用基因芯片技术分析沈阳地区 HBV 基因型分布特征及基因耐药变异情况。方法 随机选择 2012 年 8 月至 2013 年 7 月中国人民解放军二〇二医院乙型肝炎住院患者血清样本 90 例, 应用巢式聚合酶链反应与反向点杂交相结合的基因芯片技术对样本血清中 HBV 基因型及常见 3 类抗病毒药物耐药相关的五个位点进行检测, 并进行数据分析。结果 90 例样本中 HBV 基因型包括: B 型 6.7%(6/90)、C 型 86.6%(78/90)、B 和 C 混合型 6.7%(6/90)。HBV-C 基因型患者相对 B 型及 B、C 混合型患者血清中的 HBV DNA 平均水平偏高。受检样本中有 4 例发生耐药基因变异, 均出现于 C 基因型患者, 其中 3 例为 180M+204V 突变型, 1 例为 180M+204I 突变型。结论 沈阳地区 HBV 基因型分布以 C 型为主, B 型及 B、C 混合基因型较少。HBV-C 基因型患者 HBV DNA 水平相对偏高, 更容易发生对拉米夫定耐药, 且以 180M 混合型突变最易发生。

关键词:乙型肝炎; 基因芯片; 基因分型; 耐药变异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)15-2008-03

Analysis of hepatitis B virus genotyping and variation of drug resistance in 90 cases in Shenyang

Jiang Langjin, Li Jinling[△]

(Department of Clinical Laboratory, 202 Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning, 110003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution characteristics of hepatitis B virus (HBV) genotypes and the variation situation of drug resistance gene in Shenyang area by the gene chip technology. **Methods** Serum samples were randomly collected from 90 inpatients of hepatitis B in 202 Hospital of PLA from August 2012 to July 2013. The HBV genotypes and drug resistance associated 5 sites in common 3 types of antiviral drug were detected by the gene chip technology of nested PCR (NPCR) combined with reverse dot blot (RDB). **Results** Among 90 samples, HBV genotypes included type B 6.7%(6/90), type C 86.6%(78/90), mixed type B and C 6.7%(6/90). The serum HBV DNA level in the patients with HBV-C genotype were significantly higher than that with genotype HBV-B and mixed genotype B and C. There were 4 cases of drug resistance gene mutation in the detected samples, 3 cases of mutation were placed in 180M+204V, 1 case of mutation was placed in 180M+204I. All the drug resistance mutations appeared in the patients with HBV-C genotype. **Conclusion** The main HBV genotype is the genotype C in Shenyang area. Genotype B and genotype mixed B and C are unusual. The HBV DNA level in the patients with the genotype C is relatively high, which is more likely to happen resistance to lamivudine. Moreover the mixed mutation in 180M is more likely to happen.

Key words: hepatitis B; gene chip; genotype; drug resistance mutation

乙型肝炎病毒 (HBV) 的感染是全球性的公共卫生问题^[1]。我国约 9 300 万人呈 HBsAg 阳性, 乙肝患者超 4 000 万, 其中慢性乙型肝炎患者超 2 000 万, 每年约有 30 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌变 (HCC), 占传染病病死率第 1 位。HBV 包括 A~H 共 8 种基因型, HBV 基因型具有明显的地域差异, 不同区域具有不同的基因型分布。HBV 基因型与病毒变异、慢性肝病的严重程度、传播方式、预后判断、疫苗预防及抗病毒治疗选择等都有一定相关性^[2-3]。目前, 拉米夫定, 阿德福韦酯等是临床最常用的抗 HBV 药物, 但长期使用可诱导 HBV 发生耐药基因突变, 降低病毒对药物的敏感性。HBV 基因型及耐药基因的检测有助于评价 HBV 感染者的预后和选择更合适的治疗方案。本实验通过对沈阳地区 90 例 HBV 患者的 HBV 基因型及耐药基因进行分析, 了解其基因型分布特征及基因耐药变异情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择 2012 年 8 月至 2013 年 7 月中国人民解放军二〇二医院住院乙型肝炎患者 90 例, 其中男性 62 例, 女性 28 例, 年龄 15~66 岁。临床分型为急性肝炎 10 例, 慢性肝炎 54 例, 肝癌 4 例, 肝硬化 22 例。所有病例诊断均符

合 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准, 病例血清甲、丙、戊、庚型肝炎病毒均为阴性。

1.2 仪器与试剂 Eppendorf AG 巢式 PCR 仪, YN-H16 恒温分子杂交仪, HBV DNA 基因芯片试剂盒 (上海亚能生物), Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P, PCR-荧光探针法乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒 (上海科华生物)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 空腹采集待测患者静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清于 -20 ℃ 冷冻保存, 避免反复冻融。

1.3.2 HBV DNA 定量检测 应用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 对样本血清进行 HBV DNA 定量检测, 操作流程按照试剂盒说明书。

1.3.3 HBV DNA 提取 在 1.5 mL 离心管中加入 200 μL HBV DNA 提取液 I 及 200 μL 待测血清, 混匀后 13 000 r/min 离心 5 min。去上清, 加入 50 μL HBV DNA 提取液 II 混匀至沉淀完全溶解。2 000 r/min 离心数秒, 沸水浴 10 min, 使 DNA 裂解。加入 5 μL 三氯甲烷混匀对 HBV DNA 进行提纯后, 13 000 r/min 离心 5 min 后保留上清液 (HBV DNA) 以

待用。

1.3.4 巢式 PCR 扩增 在已编号的 PCR 管中加入 DNA 扩增试剂并以 5 000 r/min 离心 2 s,加入 1.5 μ L 待测 HBV DNA 后,再以 5 000 r/min 离心 2 s。扩增程序:50 $^{\circ}$ C 2 min、95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 60 s,68 $^{\circ}$ C 90 s 运行 30 次循环,94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s 运行 30 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 HBV DNA 载量大于或等于 1×10^5 copies/mL 为高载量。

1.3.5 杂交、显色及结果判读 首先将带有基因芯片的膜条编号并依次放入离心管中,然后加入 5~6 mL A 液及对应编号的 HBV DNA 扩增产物,沸水浴 10 min 使 HBV DNA 变性后取出离心管,放入杂交箱 47 $^{\circ}$ C 杂交至少 1.5 h;同时将 B 液(每管 40 mL)放入杂交箱预热,杂交完成后将膜条放入装有 B 液的离心管中,加入 20 μ L POD,置于杂交箱 47 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 20 min 后,将膜条取出放入 A 液,室温浸泡摇洗 2 次,每次间隔 5 min;将摇洗好的膜条放入 C 液中室温漂洗 1~2 min 后放入现配置的 TMB 显色液,避光显色,15~30 min 后清水漂洗 1 次,判读结果。用过的膜条于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,高载量、基因型进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 基因分型检测 按照肝炎临床分型标准,90 例乙型肝炎患者分为急性乙肝(10 例),慢性乙肝(54 例),肝癌(4 例)和肝硬化(22 例)4 组。HBV 基因型为:B 型 6.7%(6/90)、C 型 86.6%(78/90)、B 和 C 混合型 6.7%(6/90),C 型与 B 型相比差异有统计学意义($P<0.05$),C 型与 B、C 混合型比较差异无统计学意义($P>0.05$),未检测出其他基因型。肝癌组均为 C 型,慢性乙肝组 B 型为 4 例(7.4%),C 型为 48 例(88.9%),B、C 混合型 2 例(3.7%)。肝硬化组 C 型 20 例(90.9%)。本实验结果显示沈阳地区 HBV 基因型主要为 C 型,B 基因型和 B、C 混合型较少。

2.2 样本血清 HBV DNA 定量检测结果 见表 1,90 例样本血清中 B 型的 HBV DNA 的最低检测量为 7.831×10^3 copies/mL,最高检测量为 3.041×10^5 copies/mL,平均值为 1.065×10^5 copies/mL;C 型的最低检测量为 1.233×10^3 copies/mL,最高检测量为 1.788×10^8 copies/mL,平均值为 3.245×10^6 copies/mL;B、C 混合型 HBV DNA 的最低检测量为 1.461×10^3 copies/mL,最高检测量为 8.226×10^4 copies/mL,平均值为 2.903×10^4 copies/mL。可见 C 基因型的 HBV DNA 血清水平明显高于 B 型和 B、C 混合型,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 沈阳地区 90 例 HBV 患者各基因型 HBV DNA 定量

HBV 基因型	高载量例数(<i>n</i>)	HBV DNA(copies/mL)			高载量百分比(%)
		最小值	最大值	平均值	
B 型	2	7.831×10^3	3.041×10^5	1.065×10^5	33.3
C 型	38	1.233×10^3	1.788×10^8	3.245×10^6	48.7
B、C 混合型	0	1.461×10^3	8.226×10^4	2.903×10^4	0.0

2.3 HBV 耐药基因检测 本实验主要对临床常用的 L-核苷类似物、无环磷酸酯及环戊烯这三类抗病毒药相关的 rtL180M、rtM204V、rtM204I、rtV/M207I、rtA181V、rtN236T 六种基因变异位点的检测。90 例受检患者,有 4 例 C 基因型

患者出现对拉米夫定的耐药变异,变异均发生于 HBV 基因逆转录酶区第 180 号和第 204 号密码子,其中 3 例为 180M+204V,1 例为 180M+204I,B 型以及 B、C 混合型均未出现耐药变异情况。本实验结果显示 C 基因型患者易对拉米夫定产生耐药且耐药基因突变主要为 180M 混合突变型。

3 讨 论

HBV 是嗜肝 DNA 病毒,是引起急慢性肝炎的病原体。HBV 在复制的过程中易发生核苷酸的错误配对,导致同一种病毒基因碱基序出现不同,使 HBV 具有不同的基因型^[4]。1988 年有研究者对 18 株不同亚型的 HBV 基因序列两两比较后,根据核苷酸序列的差异将 18 株 HBV 基因序列分为 A、B、C、D 四个基因型,从而提出了 HBV 基因型的概念^[5]。迄今为止,根据 HBV 全基因核苷酸序列的异质性大于或等于 8%或 S 区基因序列差异大于或等于 4%将 HBV 分为 A~H 8 种基因型^[6],我国主要以 B 基因型和 C 基因型为主且呈现一定的地域差异。我国北方以 C 基因型为主,地域由北向南 C 基因型比例逐渐减少而 B 基因型比例逐渐增高,故南方以 B 基因型为主^[7]。本实验研究的 90 例沈阳地区乙型肝炎患者中,检测出 B 型占 6.7%(6/90)、C 型占 86.6%(78/90)、B 和 C 混合型占 6.7%(6/90),且未检测出其他基因型。结果显示了沈阳地区 HBV 基因型以 C 型为主,B 型及 B、C 混合型较少,符合北方基因型分布特点。

HBV 基因型与 HBV 感染者的临床特征及病程转归都有一定的相关性。有研究认为 C 基因型感染者肝病病情比其他基因型严重,C 基因型的患者患有重型肝炎和原发性肝癌的占有率比其他基因型高^[8]。从本实验的数据中也可以看出 C 基因型的慢性肝炎、肝癌、肝硬化等重症肝病患者要相对多于 B 基因型。目前认为血清中高水平 HBV DNA 是乙肝发病的危险因素之一,研究发现 C 基因型患者的 HBV DNA 水平明显高于 B 基因型患者^[9]。本实验也显示了 HBV 患者中 C 型的 HBV DNA 水平明显高于 B 型及 B、C 混合型,说明 HBV 基因型和 HBV DNA 的水平密切相关,这对于患者的治疗和预后具有重要参考价值。

目前治疗乙型肝炎的药物主要有拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯、替诺福韦和恩替卡韦。在治疗过程中,由于抗病毒药物的长期使用,HBV 会发生耐药基因变异,从而导致药物治疗的敏感性降低^[10-11]。所以通过耐药基因的检测,可以判断乙型肝炎患者体内 HBV 是否发生对拉米夫定、阿德福韦酯等抗病毒药的耐药突变。指导临床合理选择抗病毒药物,检测抗病毒药物的药效,及时调整治疗方案,实现个体化诊治。有研究表明 B 和 C 基因型患者更易产生对拉米夫定的耐药突变,且 C 型较 B 型更易发生,提示 C 型可能对拉米夫定治疗反应性不如 B 型^[12]。本实验主要对临床常用的三类抗病毒药相关的 rtL180M、rtM204V、rtM204I、rtV/M207I、rtA181V、rtN236T 这 6 种耐药基因进行检测。90 例样本中 4 例产生了耐药基因变异,分别为 3 例 180M+204V 型和 1 例 180M+204I 型,是拉米夫定耐药的常见基因型,4 例患者的基因型都为 C 型。由于沈阳地区 C 基因型患者多于其他基因型,所以大多数沈阳乙肝患者容易对拉米夫定产生耐药变异,变异类型 180M 混合型较多。

HBV 基因分型的测定方法有基因序列测定法、PCR-限制性片段长度多态性分析法、基因型特异性引物 PCR 法、基因型特异性表位的 ELISA 法、基因型特异性探针杂交法及利用基因芯片技术分型等^[13]。本研究采用 PCR 结合基因芯片反向

点杂交技术可以同时区分 HBV-B、C 和 D 三种常见基因型并检测 3 类常见药物 5 个位点的 6 种突变。实验仪器设备简单,耐药位点均设置正常对照探针,能高效地检测混合感染样本^[14]。研究报道 HBV 耐药变异基因诊断芯片的准确率可达 100%,同时具有灵敏度高($\geq 1.0 \times 10^3$ IU/mL),特异性强等特点。

综上所述,本研究通过对沈阳地区 90 例 HBV 感染患者 HBV 基因型及耐药基因的分析,得出沈阳地区 HBV 感染患者基因型分布以 C 型为主,B 型及 B、C 混合基因型较少。HBV-C 基因型患者 HBV DNA 水平相对偏高,更容易发生对拉米夫定耐药。

参考文献

[1] 黄象艳,沈茜.乙型肝炎病毒基因突变研究进展[J].国际检验医学杂志,2009,30(5):472-473.
[2] 刘爱平,徐洪涛,邢同京,等.乙肝病毒基因分型与慢性乙型肝炎患者临床和病理的相关性研究[J].中西医结合肝病杂志,2010,20(3):175-177.
[3] 廖朗,肖志权,赵炜. HBV 基因分型的临床意义[J].中国医学检验杂志,2009,10(3):174-176.
[4] 周霞,王宇明.乙型肝炎病毒基因分型的研究进展[J].重庆医学,2008,37(1):91-93.
[5] Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact[J]. J Clin Virol, 2005, 32(2):102-212.

(上接第 2007 页)

分析可见,ROC 曲线下面积最大的是肌红蛋白,其次为同型半胱氨酸,肌酸激酶同工酶最小,对于急性心肌梗死疾病的诊断效率由高到低依次为肌红蛋白、同型半胱氨酸、肌酸激酶同工酶,不过肌红蛋白在胸痛患者早期就已经发生改变,其特异性比较差,其浓度上升变化幅度并不一定能完全反映出心血管损伤的程度^[15];另外从 ROC 曲线图可以看出同型半胱氨酸的曲线上幅度比较大,说明随着患者病情程度加重,该指标的活性有显著性升高,也比较特异。所以同型半胱氨酸是诊断急性心肌梗死疾病较为理想的指标,也可以用于患者病情监测。

综上所述,血清同型半胱氨酸可作为诊断急性心肌梗死疾病的常规检测指标,对患者的病情监控和预后都有一定的临床价值,对于急性心肌梗死和不稳定性心绞痛的鉴别诊断也有一定的临床意义。

参考文献

[1] 祝惠民.实用内科学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2009:132-136.
[2] 杨振华.急性冠脉综合征与检验医学[J].诊断学理论与实践,2003,2(4):337-339.
[3] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管杂志编辑委员会.不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J].中华心血管病杂志,2007,35(4):295-304.
[4] 张克坚,杨振华.应用 ROC 曲线图评价检验项目的临床准确性[J].江西医学检验,1999,17(2):66-68.
[5] 周琦,王归圣,王归真.不同年龄男性急性心肌梗死患者的临床特点对比研究[J].实用心脑血管病杂志,2011,19(1):6-7.

[6] 雷廷昌,郝有华,田拥军,等.湖北地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性[J].中华肝病杂志,2005,13(2):109-112.
[7] 张岩,白雪帆,李新红,等.陕西地区乙型肝炎患者血清中病毒的基因分型[J].第四军医大学学报,2002,23(8):746-748.
[8] 许军,王齐欣,钱海华,等.陕西地区乙型肝炎患者基因型与病情轻重的关系[J].中华肝病杂志,2003,11(1):11-12.
[9] Kao JH,Chen PJ,Lai MY,et al. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1):22-25.
[10] Tenny DJ, Pokomowski KA, Rose RE, et al. Entecavir at five years shows long-term maintenance of high genetic barrier to hepatitis B virus resistance [J]. Hepatology, 2008, 20(2):213-214.
[11] Liaw YF, Gane E, Leung N, et al. 2-Year globe trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2009, 136(2):486-495.
[12] Yeon JE, Yoo W, Hong SP, et al. Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil [J]. Gut, 2006, 55(10):1488-1495.
[13] 刘林,王雅军.乙型肝炎病毒基因型的研究进展[J].中国煤炭工业医学杂志,2011,14(8):1256-1257.
[14] 曹新民,赵伟,刘伟,等.基因芯片检测拉米夫定引起的乙型肝炎病毒基因 YMDD 变异的研究[J].南京医科大学学报:自然科学版,2005,25(9):637-640.

(收稿日期:2014-02-28)

[6] 杨静,裴丽红,蒋薇,等.缺血性脑血管病颈动脉粥样硬化相关危险因素分析[J].中国实用神经疾病杂志,2012,15(18):6-8.
[7] Fiqiel I, Kasprzak JD, Peruqa J, et al. Heart-type fatty acid binding protein-a reliable marker of myocardial necrosis in a heterogeneous group of patients with acute coronary syndrome without persistent ST elevation[J]. Kardio Pol, 2008, 66(3):253-259.
[8] 李馨,谢朝欢,王小芳.急性心肌梗死患者血清同型半胱氨酸和心肌肌钙蛋白 I 检测临床意义[J].华夏医学,2010,23(2):158-160.
[9] 陈晓亮,翁春花,鲍绪新.急性心肌梗死患者血清炎症因子及同型半胱氨酸水平变化[J].中国基层医药,2010,17(8):1078-1079.
[10] 严湘红,潘建华.同型半胱氨酸与急性心肌梗死及稳定型心绞痛的相关分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(3):367-368.
[11] 袁明远,邱京晶,岳枫,等.不同年龄及性别健康成人血浆同型半胱氨酸的水平研究[J].中国病理生理杂志,2010,26(11):2226-2228.
[12] 刘晓峰,陈雪礼,涂艳.血浆同型半胱氨酸与 B 型钠尿酸联合检测在急性心肌梗死中的应用评价[J].检验医学,2013,28(5):379-381.
[13] 王奕忠,陈永丰,杨宏生.血清肌钙蛋白 T 和肌红蛋白测定在急性心肌梗塞患者早期诊断中的意义[J].河北医学,2010,16(5):524-525.
[14] 封志岚,王宏.血清心肌酶及肌钙蛋白 I 测定在诊断急性心肌梗死中的价值[J].临床合理用药杂志,2011,19(1):128.
[15] 曾令恒,姜朝新,赵艳华,等.心肌标志物在诊断急性心肌梗死中的临床应用及诊断临界值分析[J].检验医学与临床,2013,18(1):2365-2367.

(收稿日期:2014-02-05)