• 论 著 •

乙型肝炎病毒分型和耐药突变基因检测应用研究

王光彦, 高冬花, 李春燕, 杨思俊
(楚雄州人民医院检验科, 云南楚雄 675000)

摘要:目的 研究楚雄地区乙型肝炎病毒(HBV)基因分布特征及基因耐药情况,有利于临床合理抗病毒治疗及治疗预后评估。方法 采用荧光定量PCR和基因芯片方向斑点技术检测乙型肝炎患者血清中DNA水平、基因分型及耐药性。结果 对103例乙型肝炎患者进行检测,未检测出乙型肝炎DNA水平18例,检测出DNA水平85例。对85例基因分型:C型63例,占74.1%;B型21例,占24.7%;B、C混合型1例,占1.2%。检出野生型基因位点57例,占67%;检出突变型基因位点28例,占33%。基因突变位点rt180M(17例),rt204V(12例),rt204I(6例),rt207I(3例),rt181V(3例),rt236T(3例)。拉米夫定5例敏感,23例耐药;替比夫定22例敏感,6例耐药;阿德福韦酯24例敏感,4例耐药;恩替卡韦11例敏感,17例可能产生耐药。结论 该地区乙型肝炎分型主要以C型为主,基因突变位点主要以rt180M为主,其次是rt204V。抗病毒治疗药物拉米夫定耐药最常见,替比夫定及阿德福韦酯最敏感,恩替卡韦居中。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因分型; 耐药基因位点

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2353-02

Research of hepatitis B virus genotyping and resistance mutation gene detection

Wang Guangyan, Gao Donghua, Li Chunyan, Yang Sijun

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Chuxiong, Chuxiong, Yunnan 675000, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution characteristics of hepatitis B virus gene types and the situation of drug resistance gene in Chuxiong area and to benefit the rational clinical antiviral therapy and the prognostic evaluation. Methods The DNA content, hepatitis B virus gene types and drug resistance associated sites in serum of hepatitis B patients were detected by the technology of fluorescence quantitative PCR and the gene chip of reverse dot blot. Results Among 103 serum samples, detection of DNA content in 85 samples was positive while DNA content of 18 samples was negative. 85 positive samples were typed for hepatitis B virus DNA, of which 63 samples were classified as type C (74.1%), 21 samples were classified as type B (24.7%) and 1 sample was classified as mixed type B and C (1.2%). 57 samples had the wild-type gene loci (67%) and 28 samples had the mutant gene locus (33%). Among these samples, 17 cases of mutation were placed in rt180M, 12 cases were placed in rt204V, 6 cases were placed in rt204I, 3 cases were placed in rt207I, 3 cases were placed in rt181V and 3 cases were placed in rt236T. Among 28 samples of drug resistance gene mutation, 5, 22, 24 and 11 samples were sensitive to lamivudine, telbivudine, adefovir and Entecavi, respectively. Conclusion The main hepatitis B virus genotype is type C in Chuxiong area. The most important mutant site is rt180M and the second is rt204V. The most sensitive drugs are telbivudine and adefovir in clinical antiviral therapy and the second sensitive drug is Entecavi While the most commonly resistant drug is lamivudine.

Key words: hepatitis B virus; genotyping; the gene reverse dot blot

乙型肝炎病毒(HBV)感染在世界范围内广泛流行,仅慢性HBV携带者就有近4亿人^[1]。2006年全国乙型肝炎流行病学调查表明,中国一般人群乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率为7.18%,据此推算,现有的慢性HBV感染者约9300万人,其中慢性乙型肝炎患者约2000万人,每年因HBV导致的肝硬化和肝癌死亡30余万例,新发HBV病例约50~100万例。该病发病率居中国传染病之首,严重影响了人类健康^[2]。

HBV基因型分为8种(A-H),其分布具有地域性,中国乃至亚洲流行的乙型肝炎病毒几乎都是B、C型,此外还有少量D型,不同的基因型易发生的突变类型不同,与病情转归也密切相关^[3]。HBV基因分型和耐药突变检测对乙型肝炎抗病毒治疗及疗效具有重要的指导意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组研究对象来自楚雄彝族自治州人民医院2012年5月至2014年12月门诊及住院乙型肝炎患者。85例HBV-DNA阳性患者中,男57例,女28例,年,年龄18~67

岁,平均42岁。慢性肝炎的诊断标准按照2000年西安会议的《病毒性肝炎诊断标准》^[4]。所有病例血清甲、丙、戊、庚型肝炎病毒均为阴性。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 空腹采集乙型肝炎患者不抗凝静脉血4 mL,待标本凝固后,3000 r/min分离血清,取分离血清在1.5 mL离心管中-20℃储存备用。

1.2.2 DNA提取 具体操作按照说明书进行。

1.2.3 DNA扩增 利用上述步骤提取和纯化的DNA做模板,按照变性温度94~95℃,退火温度54~68℃,延伸72℃,二次30个循环进行。

1.2.4 杂交 将PCR扩增产物按操作放入杂交仪47℃杂交1.5~4 h。

1.2.5 洗膜 取出膜条于按比例配制的POD液中,47℃轻摇洗涤20 min。

1.2.6 显色 室温配制的洗涤液中避光显(下转第2355页)

组相比显著升高 ($P < 0.05$)。IL-8 与 IgA/C3 呈正相关关系 ($r = 0.534, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 HSP 患者与对照组 IL-8、IgA、C3、IgA/C3 水平检测比较

组别	n	IL-8(ng/L)	IgA(mg/L)	C3(mg/L)	IgA/C3
病例组	30	389.00±51.68*	306.20±32.21*	114.50±20.70	3.04±0.51*
对照组	30	229.00±33.31	232.00±16.94	105.70±8.91	2.21±0.26

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

HSP 是儿童常见的血管变态反应性疾病, 发病原因不明, 诱因多为感染、药物过敏、疫苗接种等。发病机制为蛋白质等大分子致敏原作为抗原或小分子致敏原作为半抗原, 刺激机体产生抗体, 形成抗原-抗体复合物, 沉积于血管内膜, 激活补体, 导致中性粒细胞游走、趋化及一系列炎症介质的释放, 引起血管炎性反应^[7]。近年研究表明, HSP 患儿存在免疫功能紊乱, 表现为多克隆 B 细胞异常活化, T 细胞亚群紊乱, 尤其可能和 IL-8 及 IgA/C3 水平失衡密切相关。

本文采用 ELISA 方法检测 HSP 患者静脉血中血浆 IL-8 的细胞因子水平, 全自动生化分析仪检测静脉血中 IgA、C3 水平, 并计算 IgA/C3, 然后分别与对照组进行对比分析。

实验结果说明, HSP 患者静脉血中, 虽然 C3 水平与对照组比较水平差异不显著, 但 IL-8、IgA、IgA/C3 比例相对于对照组均显著升高, 说明细胞因子水平失衡, Ig 和 C 的比例失衡, 免疫机制紊乱, 并且 IL-8 水平与 IgA/C3 呈正相关关系。本课题组在实验中发现, 在部分迁延不愈、长期反复发作的患者中, 这种免疫失衡的关系表现得尤为明显。

HSP 常用的治疗方法主要采用抗感染、抗过敏、大剂量激素、中药等常规药物方法^[8], 但治疗存在不良反应多、易反复等

问题。反而在免疫调节, 尤其是细胞免疫治疗上的方法不多见, 可将治疗思路多着眼于细胞主动免疫治疗与免疫抑制剂的联合应用等^[9], 若从调节机体免疫功能、改善肾功能等新思路、新方法着手治疗 HSP, 极有可能取得更好的效果。

参考文献

- [1] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 655-657.
- [2] Ballinger S. Henoch-Schonlein purpura[J]. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(5): 591-594.
- [3] 白庆峰, 潘凯丽, 黄莹, 等. 过敏性紫癜患儿血清白介素 6、白介素 8 及肿瘤坏死因子 α 水平和免疫球蛋白的变化[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2008, 13(2): 53-56.
- [4] 钱铸山, 张春明, 牛广华. 过敏性紫癜患儿血清 IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 和免疫球蛋白水平研究[J]. 辽宁医学杂志, 2006, 20(1): 6-7.
- [5] Shin JI, Park JM, Shin YH, et al. Serum IgA/C3 ratio May be a useful marker of disease activity in severe Henoch-Schonlein nephritis[J]. Nephron Clin Pract, 2005, 101(2): 72-78.
- [6] 雷静月. 儿童过敏性紫癜患者外周血中抗内皮细胞 IgA 与 D 二聚体水平变化[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 115-116.
- [7] Hisano S, Matsushita M, Fujita T, et al. Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(2): 295-302.
- [8] 黄舫. 过敏性紫癜的治疗[M]. 上海: 上海文化出版社, 2006: 178-184.
- [9] 王忠喜, 李文静, 黄爱霞, 等. 特异性免疫疗法治疗过敏性紫癜 30 例[J]. 医药导报, 2005, 24(9): 780-782.

(收稿日期: 2015-02-15)

(上接第 2353 页)

色 30 min 观察结果。

1.2.7 室内质控要求 严格按照 PCR 室内质控要求及试剂盒室内质控要求进行。

2 结果

2.1 HBV-DNA 水平的基因分型 对检测出的 85 例 HBV-DNA 水平基因分型中, C 型 63 例, 占 74.1%; B 型 21 例, 占 24.7%; B、C 混合型 1 例, 占 1.2%。检出野生型基因位点 57 例, 占 67%; 检出突变型基因位点 28 例, 占 33%。

2.2 基因突变位点 基因突变位点 rt180M(17 例), rt204V(12 例), rt204I(6 例), rt207I(3 例), rt181V(3 例), rt236T(3 例)。

2.3 耐药性 拉米夫定 5 例敏感, 23 例耐药; 替比夫定 22 例敏感, 6 例耐药; 阿德福韦酯 24 例敏感, 4 例耐药; 恩替卡韦敏 11 例敏感, 17 例可能产生耐药。

3 讨论

根据 HBV 全基因组序列差异大于 8% 或 S 基因序列差异大于 4% 的分型标准, 可将 HBV 分为 A~H 8 个基因型。本研究采用 DNA 反向斑点杂交芯片技术, 对楚雄地区 85 例乙型肝炎患者基因分型及耐药性检测, 本地区主要以 C 型为主, B 型其次, 与张智等^[3]、朱中梁等^[5]的观点南方与 B 型为主不相符, 本地区 HBV 感染以 C 型为主, 提示该部分患者更容易引起肝癌, 且 C 型干扰素治疗应答较差^[6]。对 85 例基因突变位点分析, 以 rt180M 突变最多见, 其次为 rt204V 突变, rt207、

rt181V 及 rt236T 突变位点最少。

本研究除基因分型外, 还对拉米夫定、替比夫定、阿德福韦酯及恩替卡韦药敏进行分析, 拉米夫定耐药率最高, 敏感性最差, 其次为恩替卡韦, 替比夫定及阿德福韦酯敏感性最好, 耐药最少。

综上所述, 通过病毒分型和耐药性检测, 可合理指导临床抗病毒治疗, 避免药品浪费及不必要的毒副作用, 缩短抗病毒疗程, 降低诊疗费用, 值得推广。

参考文献

- [1] Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries[J]. Mutat Res, 2000, 462(3): 381-393.
- [2] 张晓平, 邱丽影, 秦俊生, 等. 深圳地区乙型肝炎病毒基因型分布与核苷类药物治疗后相应突变位点筛查的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1163-1165.
- [3] 张智, 张珍, 李楠, 等. 185 例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测[J]. 广东医学, 2008, 29(1): 97-98.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 30(1): 324.
- [5] 朱中梁, 汪宏良, 马娟. 乙型肝炎病毒基因分型及耐药突变基因检测研究[J]. 中国基层医药, 2013, 20(8): 1203-1205.
- [6] 陈爱英, 叶锋, 刘秀英. P 基因片段测序分析 HBV 基因分型及耐药位点[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 726-729.

(收稿日期: 2015-05-30)