

论著 · 临床研究

Sanger 测序法在乙型肝炎患者耐药突变检测中的应用*

马 亮,于 洋,张婧莹,丛 笑,刘 倩,杨 辉,曹永彤[△]
(中日友好医院检验科,北京 100029)

摘 要:**目的** 分析 Sanger 测序在乙型肝炎病毒(HBV)耐药和基因型检测中的应用,并进一步探讨替比夫定(LdT)、阿德福韦(ADV)、拉米夫定(LAM)、恩曲他滨(FTC)、替诺福韦(TDF)以及恩替卡韦(ETV)6 种核苷酸药物耐药发生的情况,为临床用药提供参考。**方法** 收集中日友好医院 215 例 HBV-DNA 拷贝数大于 10³ 的乙型肝炎患者血清,提取血清中的 HBV-DNA,采用聚合酶链式反应(PCR)方法进行扩增,并对 PCR 产物进行 Sanger 测序,使用 STANFORD 软件分析比对测序结果。并采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。**结果** 本研究中,共有 40 例(18.6%,40/215)患者检测到发生耐药基因突变,其中具有对应参考价值的为 21 例(9.77%,21/215)。这 215 例患者中相关药物耐药突变发生率从高至低依次是 LdT(9.77%,21/215)、FTC(7.44%,16/215)、ETV(6.98%,15/215)、LdT(6.05%,13/215)、ADV(0.93%,2/215);未检出与 TDF 耐药相关突变。215 例患者中 C 基因型发生率明显高于 B 基因型($P<0.01$),C 基因型与 B 基因型基因突变情况差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 该研究提示 Sanger 测序可以较全面地分析乙型肝炎耐药基因突变情况;并且该研究也提示 LAM 药物作为慢性乙型肝炎(CHB)治疗首选药物的高耐药发生性。

关键词:乙型肝炎病毒; 耐药基因突变; Sanger 测序; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.001 **中图法分类号:**R512.6+2

文章编号:1673-4130(2019)01-0001-04 **文献标识码:**A

Application of Sanger sequencing in detection of drug-resistant mutations in patients with hepatitis B*

MA Liang, YU Yang, ZHANG Jingying, CONG Xiao, LIU Qian, YANG Hui, CAO Yongtong[△]
(Department of Clinical Laboratory, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract:**Objective** To analyze the application of Sanger sequencing in the detection of hepatitis B virus drug resistance and genotype, and to further explore the occurrence of six nucleotide drug resistance in hepatitis B, including tibivudine (LdT), adefovir (ADV), lamivudine (LAM), entecavir (FTC), tenofovir (TDF) and entecavir (ETV). To provide reference for clinical medication. **Methods** The serum samples of 215 patients with HBV-DNA copies greater than 10³ in China-Japan Friendship Hospital were collected. The HBV-DNA in serum was extracted and amplified by PCR. The PCR products were sequenced by Sanger sequencing. The results were analyzed and compared by STANFORD software. SPSS17.0 software was used for statistical analysis. **Results** A total of 40 patients (18.6%, 40/215) were found to have drug resistance gene mutations, of which 21 (9.77%, 21/215) had corresponding reference value. Tibivudine (9.77%, 21/215), entecavir (7.44%, 16/215), entecavir (6.98%, 15/215), tibivudine (6.05%, 13/215) and adefovir (0.93%, 2/215) were the most common drug-resistant mutations in the 215 patients. The incidence of genotype C was significantly higher than that of genotype B in 215 patients ($P<0.01$). There was no significant difference between genotype C and genotype B ($P>0.05$). **Conclusion** This study suggests that the mutation of HBV resistance gene can be analyzed comprehensively by Sanger sequencing, and this study also suggests the occurrence of high drug resistance of LAM drugs as the first choice for the treatment of chronic hepatitis B (CHB).

Key words: hepatitis B virus; drug resistance gene mutation; Sanger sequencing; genotyping

乙型肝炎病毒(HBV)是一种经血液传播的嗜肝 DNA 病毒,是导致慢性肝炎、肝癌和肝硬化的重要因素。慢性乙型肝炎病毒(CHB)在我国是一种传播范围广、感染人数众多的传染性疾病,我国 HBV 慢性感染者约为 9 000 万,居世界之首,每年约 100 万人死于 HBV 感染所致的肝硬化、肝衰竭及原发性肝癌^[1-2],

* 基金项目:国家自然科学基金青年课题资助项目(81703892)。
作者简介:马亮,男,助理研究员,主要从事分子细胞遗传学方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: caoyongtong92@sina.com。
本文引用格式:马亮,于洋,张婧莹,等. Sanger 测序法在乙型肝炎患者耐药突变检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(1): 1-3.

CHB 的监控和治疗一直以来都是传染病防治的重中之重。目前核苷酸类似物治疗 CHB 患者的疗效已得到肯定,但因其对 HBV cccDNA 无直接作用,患者需长期服用,在治疗过程中很容易引起 HBV 耐药突变^[2]。长期使用单种核苷酸类药物,患者很容易发生针对此药物的耐药突变。同时,由于单种核苷酸药物耐药突变位点所对应药物的多重性,患者很可能产生新的耐药或交叉耐药,为临床治疗带来困难^[3]。使用体外检测手段,对 CHB 患者进行基因耐药突变检测,可以准确有效地对其突变位点进行检测,以判断该患者对已知药物的耐受程度,进而更好地指导临床用药,制定个体化抗病毒治疗方案。目前,已有多种分子诊断技术平台可以检测乙型肝炎耐药基因突变^[4], Sanger 测序法作为测序检测的“金标准”,是目前最为准确、有效的检测手段。本实验使用 Sanger 测序法对 CHB 患者血清核酸 PCR 产物进行测序,检测 HBV 耐药相关位点突变及 HBV 病毒基因型,统计目前常用药物对应位点发生突变的情况,为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 病例标本 收集 2016 年 10 月至 2018 年 6 月中日友好医院 CHB 患者血清共 215 例,其中男 42 例,女 73 例,年龄 19~84 岁,中位年龄 39 岁。所有患者均符合乙型肝炎诊断标准(WS299-2008),HBV-DNA 大于 1×10^3 U/mL,患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 HBV-DNA 提取试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;HBV-DNA 纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;HBV-DNA 测序试剂盒购自广州立菲达安诊断产品技术有限公司;C-1000 TOUCH PCR 仪购自美国 BioRad 公司;3500Dx 测序仪购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集患者空腹不抗凝静脉血 5 mL,2 500 r/min 离心 10 min,分离血清。

1.3.2 HBV-DNA 提取 使用生工生物工程(上海)股份有限公司 DNA 提取试剂盒,按照试剂说明书提取 HBV-DNA。

1.3.3 HBV-DNA 扩增 50 °C 2 min,95 °C 共 15 min 预变性,94 °C 30 s→55 °C 30 s→72 °C 45 s,40 个循环,72 °C 7 min。

1.3.4 HBV-DNA 纯化 使用生工生物工程(上海)股份有限公司提取试剂盒,按照说明书所列步骤进行纯化。

1.3.5 测序 PCR 体系配置 PCR 产物 0.5 μ L, Big-Dye 2 μ L, BigDye Buffer 3 μ L, 测序引物 1 μ L, 无菌纯化水 13.5 μ L, 总体积 20 μ L。扩增程度为 96 °C 1 min, 然后 96 °C 10 s→50 °C 5 s→60 °C 4 min 共 25 个循环,最后 4 °C 保温。

1.3.6 测序产物纯化 各 PCR 反应管加入 2 μ L

125 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)和 2 μ L 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2),再加入 50 μ L 100% 无水乙醇,短时振荡,室温避光放置 15 min;4 °C 12 000 r/min 离心 30 min,去上清,加入 150 μ L 预冷 70% 乙醇,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,去上清,室温避光放置 15~30 min;加入 10 μ L Hi-Di Formamide,短时振荡溶解 DNA,短时离心,95 °C 变性 5 min,冰中冷却 4 min。

1.3.7 电泳 使用 1% 琼脂糖电泳,观察 PCR 产物存在及纯化情况。

1.3.8 测序 变性后的测序产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板,选用具有 IVD 标志的 Seq_std_BDTV3.1_ASSY_POP7 进行测序。

1.4 数据收集与分析 使用 ABI 公司 Data Collection® 与 Sequencing Analysis 软件进行数据收集和初步分析,使用 STANDFORD 软件对数据进行深度分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行处理。计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在本研究 215 例患者中,共有 40 例(18.6%, 40/215)患者检测到发生耐药基因突变,其中具有对应参考价值的为 21 例(9.77%, 21/215)。该 215 例患者中相关药物耐药突变率从高至低依次是拉米夫定(LAM, 9.77%, 21/215)、恩曲他滨(FTC, 7.44%, 16/215)、恩替卡韦(ETV, 6.98%, 15/215)、替比夫定(LdT, 6.05%, 13/215)、阿德福韦(ADV, 0.93%, 2/215);未检出与替诺福韦(TDF)耐药相关突变。常见 CHB 治疗用药与相关耐药突变位点, TDF 为 A194T; LdT 为 M204I; ADV 为 A181V/T、N236T; LAM/LMV 为 M204I/V、A181T/V、L180M、V173L; FTC 为 M204I、L180M、V173L; ETV 为 M204I、L180M。见表 1。其余 19 例虽然检测到突变位点,但所发生突变的位点并不与耐药明确相关,以备注中与耐药明确相关的 6 个位点作为参考标准。

2.2 耐药连锁位点突变情况 在检测到的 21 例耐药突变患者中,发生耐药连锁位点突变的共 11 例,占 52.38%(11/21),其余为 47.62% 为单一位点突变。最主要的连锁模式为 M204I+L180M,共 7 例;剩下两种连锁模式 A181V+N236T 和 M204V+L180M 各 2 例。

2.3 不同基因型耐药基因发生情况 本研究 215 例患者中 B 基因型占有所有患者的 29.77%(64/215),耐药发生比例为 6.25%(4/64);C 基因型占有所有患者的 68.84%(148/215),耐药发生比例为 11.49%(17/148);D 基因型占有所有患者的 1.40%(3/215),耐药发生比例为 0。本研究中 C 基因型明显高于 B 基因型($P < 0.01$),C 基因型与 B 基因型基因突变情况差异

无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 21 例患者 CHB 耐药突变位点及对应药物

样本编号	TDF	LdT	ADV	LAM	FTC	ETV
4	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
6	—	—	—	V173L	V173L	—
29	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
34	—	—	—	M204V L180M	L180M	L180M
38	—	—	A181V N236T	A181V	—	—
58	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
63	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
79	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
120	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
124	—	—	—	M204V	—	—
126	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
140	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
143	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
152	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
157	—	M204I	—	M204I	M204I	M204I
159	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M
185	—	—	—	M204V	—	—
201	—	—	—	M204V	—	—
203	—	—	A181V N236T	A181V	—	—
208	—	—	—	M204V L180M	L180M	L180M
212	—	M204I	—	M204I L180M	M204I L180M	M204I L180M

注：—表示无数据

3 讨 论

乙型肝炎治疗的总体目标是最大限度地长期抑制或消除 HBV,减轻肝细胞坏死及肝纤维化,延缓或阻止疾病进展,减少或防止肝硬化,肝癌及其并发症的发生。核苷类药物抗病毒治疗能很好控制疾病进展,长期治疗能使患者肝组织得到改善^[5]。但是,长期应用核苷类药物会使 HBV 在药物选择压力和免疫压力下发生突变,产生耐药基因甚至临床耐药突变^[6]。耐药的发生极大地降低了 CHB 患者的治疗效果。因此在治疗过程中动态地进行耐药监测对 CHB 的治疗和预后具有重要的意义。

而 LAM 目前仍是我国临床进行抗 HBV 治疗的主要药物,本研究中 215 例患者中 21 例患者发生 LAM 耐药突变,突变比例为 9.77%(21/215)。在 21 例患者中,18 例检测到 M204I/V 位点突变,其中 9 例伴随 L180M 位点突变;1 例为 V173L 位点突变;2 例

为 A181V 突变。这类突变发生的比例较高,提示了 LAM 易产生耐药性。本研究结果与王清等^[7]研究结果较一致。本研究中其他耐药突变检出率从高到低依次为 FTC(16/215,7.44%),ETV(15/215,6.98%),LdT(13/215,6.05%),ADV(2/215,0.93%);未检出与 TDF 耐药相关突变。所以从本研究结果可以看出 FTC、ETV 和 LdT 3 种药物耐药发生率也比较高。患者发生 TDF 耐药突变在临床上确实很少出现,这也指示了 TDF 在乙型肝炎治疗广阔的应用前景。

HBV 耐药突变位点连锁分析是指研究多个耐药突变位点是发生于同一个病毒株上还是位于不同病毒株上以及耐药位点的组合方式。多数情况下对同一药物的耐药是由多个耐药突变位点的存在所造成,并且多个耐药突变位点的组合情况对抗病毒药物是否产生耐药以及耐药的程度存在很大的不同^[8]。LAM 主要的耐药突变位点 M204V/I 较野生复制能力低,而 L180M、V173L 的出现使突变株 HBV 的复制能力接近野生株的水平^[9],因此,对 HBV 耐药突变位点进行连锁分析对于临床抗病毒治疗方案的选择以及流行病学的研究意义重大。本研究中主要的连锁模式也是 M204I+L180M,与既往研究结果类似^[10-11]。

HBV 病毒可分为 A~I 19 种基因型,HBV 基因型具有一定的地域性差异,我国南方以 B 型为主,北方以 C 型为主,D 型主要见于西藏和部分少数民族地区。本研究中 C 基因型明显高于 B 基因型($P<0.01$),支持 HBV 基因型具有地域性差异这一结论。并且本研究中也检测到少量 D 基因型 1.40%(3/215),这可能与北京人口流动较大有关。

关于 HBV 基因型与核苷类耐药的相关性分析,结论各有差异,有研究认为二者具有相关性^[12];另一项荟萃分析则表明二者之间没有显著相关性^[13]。本研究中 C 基因型耐药基因发生频率高于 B 基因型,但差异无统计学意义。

4 结 论

本研究采用一代测序方法对乙型肝炎耐药基因突变进行了初步分析,可以看到乙型肝炎耐药在乙型肝炎患者人群中发生的情况,对乙型肝炎患者临床用药具有一定指导作用,也提示了临床进行乙型肝炎耐药检测的必要性。

参考文献

[1] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2015,9(3):1-18.
[2] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].传染病信息,2005,18(z1):S1-S12.
[3] 徐东平,周先志.核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎耐药研究进展[J].传染病信息,2007,20(2):68-70.
[4] 张树永,陈琛,马庆伟,等.乙型肝炎抗病毒治疗中的耐药基因突变检测技术.2016,29(5):311-314. (下转第 7 页)

念与中医辨证施治高度相似,课题组提出 HLA-DP 基因多态性与 RCHC 中医证型相关性的科学假说,寻找中医证型的分子标志物,为中医辨证提供科学依据。本研究结果显示,RCHC 肝郁脾虚证与非肝郁脾虚证相比,肝功能、HCV-RNA 水平及其基因型差异均无统计学意义($P>0.05$),但 HCV 基因型均以 1b 型为主;同时年长的 RCHC 患者更易出现非肝郁脾虚证,即肝肾阴虚型或湿热内阻型或淤血阻络型;凝血系统中 PT 指标差异有统计学意义($P<0.05$)。

研究发现,HLA-DP 基因 rs9277535 位点中,与野生纯合型 GG 相比,GA 杂合型和 AA 突变基因型在对照组、肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组 3 组间均无显著性差异;但等位基因 G 和 A 的分布在肝郁脾虚组和非肝郁脾虚组 2 组间有差异趋势,可作为中医证型分型的潜在标志物,对于传统中医理论研究具有一定的创新价值,可进一步研究。

4 结 论

本课题组在 RCHC 中医证型分子分型研究中,发现肝郁脾虚证最多,肝脏功能损伤程度及病毒水平在不同证型之间差异无统计学意义。HLA-DP 基因 rs9277535 位点中等位基因 G 和 A 的分布在不同证型间有一定的差异趋势,因此,推断 rs9277535 位点中等位基因 G 和 A 可能是 RCHC 不同中医证型的潜在标志物,值得关注。本研究虽然得出了可能与 RCHC 中医证型密切相关的 HLA-DP 等位基因,但仍然难以明确定论。同时,由于本研究病例仅来自湖北省中医院,各种证型的病例数偏少,不够全面。因此,为更准确地反映 HLA-DP 基因 SNP 与 RCHC 中医证型的相关性,尚有待进一步扩大样本量,开展多地域、多民族的深入研究,以探索中医证型的分子机制。

参考文献

[1] 李杰,陈杰,庄辉. 丙型肝炎的流行病学[J]. 实用肝脏病

杂志,2012,15(5):379-381.
[2] 薛博瑜. 难治性慢性丙型肝炎的中医辨证论治[J]. 南京中医药大学学报,2015,31(1):1-3.
[3] 王成宝,陈逸云,聂红明,等. 基于循证医学的慢性丙型肝炎患者病毒基因分型与中医证候之间的关系探讨[J]. 中西医结合肝病杂志,2014,24(5):259-261.
[4] 中华医学会肝病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 肝脏,2015,33(12):933-949.
[5] 中华中医药学会肝胆病分会. 病毒性肝炎中医辨证标准(2017 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志,2017,27(3):193-194.
[6] 谢尧,李明慧. 难治性丙型肝炎治疗现状及发展趋势[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(7):484-486.
[7] 陈新月,尚佳,杨瑞锋. 难治性慢性丙型肝炎初治患者优先治疗后的病毒学应答率研究[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(6):412-417.
[8] FRIED M W, JENSEN D M, RODRIGUEZ-TORRES M, et al. Improved outcomes in patients hepatitis C with difficult-to-treat characteristics: randomized study of higher doses of peginterferon alpha-2a and ribavirin[J]. Hepatology, 2008, 48(4):1033-1043.
[9] 冯晓霞,聂苑霞,梁海林. 益气解毒化瘀方联合抗病毒治疗对难治性慢性丙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群和炎症细胞因子的影响[J]. 实用肝脏病杂志,2016(6):674-677.
[10] 沈健,陈建杰,商斌仪,等. 丙肝冲剂治疗难治性丙型肝炎研究[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(18):1947-1949.
[11] 刘娟娟. HLA-DP 多态性与乙型肝炎病毒感染及其不同结局相关性 Meta 分析[D]. 昆明:昆明医科大学,2017.
[12] HUANG P, FAN H, TIAN T, et al. The relationship between human leukocyte antigen-DP/DQ gene polymorphisms and the outcomes of HCV infection in a Chinese population[J]. Virol J, 2017, 14(1):235-241.

(收稿日期:2018-06-25 修回日期:2018-09-16)

(上接第 3 页)

[5] CHEN C J, YANG H I, SU J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. JAMA, 2006, 295(1):65-73.
[6] VALSAMAKIS A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):426-439.
[7] 王清,曾勇彬,林锦骝,等. 福州地区乙型肝炎患者 HBV P 区突变模式与其基因型及血清标志物的关系[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(2):85-89.
[8] 吴云,庞丽君,李宁. 乙型肝炎病毒耐药突变位点连锁分析[J]. 北京医学,2015,37(12):1146-1148.
[9] 常静霞,汪茂荣. 乙型肝炎病毒基因耐药变异研究进展[J]. 实用肝脏病杂志,2013,16(5):467-470.
[10] MA J, ZHANG Y, CHEN X Y, et al. Association of pre-

existing drug-resistance mutations and treatment failure in hepatitis B patients[J]. PLoS One, 2013, 8:e67606.
[11] YANG J X, LIU B M, LI X G, et al. Profile of HBV antiviral resistance mutations with distinct evolutionary pathways against nucleoside/nucleotide analogue treatment among Chinese chronic hepatitis B patients[J]. Antivir Ther, 2010, 15(8):1171-1178.
[12] 孙晶,贾志远,常军霞,等. 北京地区 HBV 基因型的分布及其与临床表现关系的初步研究[J]. 中国实验和临床病毒学杂志,2013,27(1):39-41.
[13] CHEN X L, LI M, ZHANG X L. HBV genotype B/C and response to lamivudine therapy: a systematic review [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:672614

(收稿日期:2018-05-15 修回日期:2018-07-29)