

乙型肝炎病毒 P 区耐药突变与基因型及临床相关性分析

向华国 杨晓丽 刘小君

摘要 **目的** 探讨 HBV 的 P 基因耐药突变的分布特征以及与基因型、临床的相关性。 **方法** 对慢性乙肝患者的血液样本进行 P 基因核苷类似物作用靶区进行聚合酶链反应,扩增产物进行测序,比较序列差异性,同时对其进行基因分型检测。 **结果** 79 例乙型肝炎患者共检测出 B 基因型 61 例(79.2%), C 基因型 18 例(20.8%)。通过对 HBV-DNA 进行 P 区测序表明耐药突变以拉米夫定耐药为主,为 27 例(51.9%);其中 B 基因型对拉米夫定和阿德福韦的耐药率分别为 31.1%(19/61)和 9.8%(7/61),二者交叉耐药率为 6.6%(4/61),而 C 基因型对拉米夫定和阿德福韦的耐药率分别为 44.4%(8/18)和 22.2%(4/18),二者交叉耐药率为 16.7%(3/18),明显高于 B 型基因($P<0.05$)。慢性肝炎患者中, B 型显著多于 C 型,为 89.4%(59/66);肝癌、肝硬化等重症中, B 型感染者则明显少于 C 型感染者,为 15.4%(2/13)($P<0.05$)。 **结论** 79 例患者 HBV 基因型以 B 型为主, C 型次之,耐药突变主要以拉米夫定耐药为主,临床与基因型及耐药突变有显著性关联。

关键词 乙型肝炎病毒;基因型;聚合酶链反应。

中图分类号 R512.6² **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)12-1436-02

Correlation of mutations of HBV precore region in hepatitis B patient with HBV genotype and drug resistance.

XIANG Hua-guo, YANG Xiao-li, LIU Xiao-jun. (Baoan District Fuyong People's Hospital, Shenzhen 518103, Guangdong P. R. China)

Abstract **Objective** To study the correlation of mutations in the HBV precore region of hepatitis B virus (HBV) DNA with HBV genotype and drug resistance. **Methods** The HBV precore region in serum samples from hepatitis B patients were detected by polymerase chain reaction (PCR) and HBV gene sequencing and typing were performed after amplification. **Results** HBV genotype in 79 hepatitis B patients were detected, 61 (79.2%) were genotype B, 18 (20.8%) were genotypes C. The resistance to lamivudine was 51.9% (27/71) highest among the four resistance drug. The resistance rates of HBV genotype B to lamivudine and adefovir were 31.1% (19/61) and 9.8% (7/61), while the cross drug resistant mutations to lamivudine and adefovir was 6.6% (4/61). The resistance of HBV genotype C to lamivudine and adefovir were 44.4% (8/18) and 22.2% (4/18) and the cross drug resistant mutations to lamivudine and adefovir was 16.7% (3/18), significantly higher than that of HBV genotype B ($P<0.05$). HBV genotype B occupied 89.4% (59/66) among the patients with the chronic hepatitis, significantly higher than the genotype C (10.6%). While HBV genotype B was observed in 15.4% (2/13) of the patients with the hepatic cirrhosis or hepatic cancer, significantly lower than that of HBV genotype C (84.6%) ($P<0.05$). **Conclusion** The HBV genotypes in patients with HBV-related chronic liver disease were mainly type B, and then type C. The main resistant mutations was lamivudine mutations in the precore region of HBV DNA. There was significant difference for genotype distribution among patients with HBV-related the chronic hepatitis, hepatic cirrhosis and hepatic cancer.

Key words: Hepatitis B virus; Genotype; Polymerase chain reaction

乙型肝炎病毒(HBV)是高突变率的病毒,随着核苷类似物药物的使用,在 P 基因易产生耐药突变^[1-3]。了解 HBV 的 P 基因突变,对乙型肝炎的诊断、治疗和基础研究都具有极其重要的意义。陆续有文献报道, P 基因突变与药物使用、基因型、临床症状等存在相关性。我们采用 PCR 产物直接测序的方法,对 79 例乙肝样本进行分析,旨在探讨本院 HBV 基因型分布特征,以及基因型、耐药基因突变和临床的相关性,为评价药物治疗疗效提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 选取深圳市宝安区福永人民医院 2011 年 6 月

~2011 年 7 月间慢性乙型肝炎患者 79 例,男 57 例,女 22 例,年龄 18~65 岁,平均 35.6 岁,诊断标准按 2000 年病毒性肝炎防治方案^[4]。所有患者静脉取血 3ml,分离血清后置 -20℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 的提取 采用 TIAamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取 HBV DNA。

1.2.2 病毒 DNA 的扩增 对 HBV 的 P 基因的核苷类似物作用靶区进行聚合酶链反应,引物 5'-ATGTTTCCTCTGTGCTG-3', 5'-CCAACTTCCAATTACATATCCC-3',扩增条件为 95℃ 150s, 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s, 共 35 循环, 72℃ 10min, PCR

产物经电泳切胶纯化后进行测序反应。

1.2.3 HBV 基因分型检测 HBV 基因分型试剂盒, 由上海浩源生物科技有限公司提供, 具体操作按照说明书。

1.2.4 测序及分析 核苷酸测序使用 ABI3730 遗传分析仪, 使用 SeqMan 进行序列比对。

2 结果

2.1 HBV 基因型与临床关系 79 例标本, 共有 B 基因型 61 例 (79.2%), C 基因型 18 例 (20.8%), 未发现其他基因型。这一结果符合我国北方多流行 C 型, 在南方多流行 B 型的特点^[5, 6]。

按照临床标准, 79 例患者可分为肝癌、肝硬化、慢性肝炎 3 组, 各组的基因型检出情况见表 1。慢性肝炎患者中, B 型显著多于 C 型, 为 89.4% (59/66); 而在肝癌、肝硬化等重症中, B 型感染者则明显少于 C 型感染者, 为 15.4% (2/13) ($P < 0.05$)。

表 1 79 例乙型肝炎患者 HBV 基因型分布

症状	B 型	C 型	合计
肝癌	0	2	2
肝硬化	2	9	11
慢性肝炎	59	7	66
合计	61	18	79

2.2 P 区耐药突变检测及与临床关系 对 HBV-DNA 进行 P 区测序, 在 79 例标本中, 其中 27 例没有出现耐药突变, 余下 52 例耐药患者中以拉米夫定耐药为主, 为 27 例 (51.9%), 阿德福韦耐药为 11 例 (21.2%), 拉米夫定 + 阿德福韦交叉耐药 7 例 (13.5%), 其他耐药 7 例 (13.5%)。其中 B 基因型对拉米夫定和阿德福韦的耐药率分别为 31.1% (19/61) 和 9.8% (7/61), 二者交叉耐药率为 6.6% (4/61); 而 C 基因型对拉米夫定的和阿德福韦的耐药率分别为 44.4% (8/18) 和 22.2% (4/18), 二者交叉耐药率为 16.7% (3/18), 明显高于 B 型基因 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 79 例标本的耐药型分析

突变	B 型	C 型	合计
无耐药突变	24	3	27
拉米夫定耐药	19	8	27
阿德福韦耐药	7	4	11
替比夫定耐药	3	0	3
恩替卡韦耐药	4	0	4
拉米夫定+阿德福韦交叉耐药	4	3	7
合计	61	18	79

3 讨论

本研究对本院的 79 例 HBV 标本进行分型, 共有 B 基因型 61 例 (79.2%), C 基因型 18 例 (20.8%), 未发现其他基因型。由于深圳属于中国南方, 符合以往报道的“HBV 基因型南方以 B 型为主, 北方以 C 型为主^[5, 6]”的观点。

有报道认为, HBV 不同基因型具有不同的致病性, HBV 基因型与临床表现、预后、治疗应答等均有一定关系, 通常认为 C 基因型感染者病情较重, 而 B 基因型较轻^[7-9]。我们的研究显示, 在慢性肝炎患者中, B 型显著多于 C 型, 而在肝癌、肝硬化等重症中, C 型感染者显著多于 B 型感染者。

核苷类似物治疗是目前常见的 HBV 治疗方案之一, 随着

治疗的深入, 耐药现象日趋严重。体外研究表明, P 区发生耐药突变后, 病毒基因组对药物的敏感性降低。如 rtM204V/I 位点突变后, HBV 基因组对拉米夫定的敏感性下降 1000 多倍, 对恩替卡韦的敏感性下降 30 倍。临床研究也显示, 拉米夫定治疗耐药后可出现一群非常难治疗的患者。拉米夫定由于进入我国临床最早, 目前在我国的耐药现象最严重, 据报道, 5 年累积耐药率可达到 50%~70%, 我们在 79 例患者中也发现了 34 例拉米夫定耐药突变 (含交叉耐药突变)。值得注意的时, 随着替比夫定、恩替卡韦等药物进入我国临床, 我们也发现了一些耐药现象。

将耐药风险降至最低的原则主要是: 密切监控, 及时发现基因型变异, 避免单一药物治疗, 避免药物滥用。同其他方法相比, 基因序列测定, 在技术上和经济上具有明显优势。测序是公认的突变检测的金标准, 对于 HBV 基因组耐药而言, 拉米夫定、恩替卡韦、阿德福韦、替比夫定等药物的耐药位点集中出现在 P 基因上一段 400 碱基的核苷酸序列内, 可以通过一次测序全部发现。该区域也是核苷类似物的作用靶区, 随着新药物的使用, 该区域也有可能发现新的突变位点。本研究发现的耐药突变位点多集中在 rtM204I/V、rtL180M、rtA181T、rtN236T 等以往报道过的位点^[10-12]。其他位点也存在较低比例的变异, 并且出现了一些交叉突变或代偿性突变。

参考文献:

- [1] 哈斯朝鲁. 山西地区 HBV-DNA 定量、分型及 P 区耐药突变点 245 例分析[J]. 临床医学实践, 2010, 19(6B): 788-789.
- [2] 尹波, 安萍, 曹艳雪. P 基因区耐药变异检测在核苷类药物治乙型肝炎中的价值[J]. 肝脏, 2008, 13(2): 134-136.
- [3] 孙剑, 徐朝艳, 王战会, 等. 拉米夫定耐药毒株的 P 基因序列特点[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(6): 533-535.
- [4] 中华医学会传染病寄生虫病学分会、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.
- [5] 黄海燕, 孟祥伟, 张玲玲. 长春地区乙型肝炎病毒基因分型与肝病发病关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1057-1060.
- [6] 葛宪民, 李丹亚, 方钟燎. 广西乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(2): 174-179.
- [7] 周莉, 于岩岩, 王勤环, 等. 乙型肝炎病毒基因型与临床预后关系的研究[J]. 临床肝病杂志, 2005, 21(6): 324-326.
- [8] 许军, 王齐欣, 钱海华, 等. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(1): 11-12.
- [9] 周彬, 黄月华, 单光华, 等. 乙型肝炎病毒基因型及病毒变异对慢性肝病进展的影响[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(4): 302-305.
- [10] 闰杰, 冯鑫, 王磊, 等. ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 543-545.
- [11] 李敏伟, 陈智, 邵骏斌, 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.
- [12] 王春亚, 钟彦伟, 刘杰, 等. HBV 逆转录酶区 M204 位点单独突变患者与 M204+A181T 联合突变患者临床特征比较[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(4): 260-262.

收稿日期: 2011-09-09 编辑: 谢永慧