

武汉市乙型肝炎病毒基因型分布和 P 区耐药突变模式及两者相关性分析*

崔 艳, 李 艳[△], 乔 斌, 汪 明(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨武汉地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布情况和 P 区耐药突变模式及两者的相关性。**方法** 提取 HBV-DNA 进行聚合酶链反应(PCR)扩增后以直接测序法检测 HBV 基因型及 P 区耐药突变位点, 用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。**结果** 219 例慢性乙型肝炎患者血浆中检出 HBV 基因型 B 型 135 例(61.6%)、C 型 61 例(27.9%)、D 型 2 例(0.9%)、B+C 混合型 3 例(1.4%)、B+F+G 混合型 1 例(0.4%)、未分型 17 例(7.8%)。对 202 例分出基因型的标本进行耐药突变检测, 其中 76 例发生耐药突变, 突变位点以 M204I(42.9%)、M204V(22.1%)、L180M(27.3%) 多见。YMDD 突变的发生率在 B、C 基因型之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 YMDD 突变类型中的 M204V 和 M204I 在 B、C 基因型中的分布比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 武汉地区 HBV 基因型以 B 型和 C 型为主, HBV 耐药突变以 M204I、M204V、L180M 多见, 临床医生应根据基因型和耐药突变结果为慢性乙型肝炎患者选择适合的治疗方案。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 基因型; 耐药突变; 核苷(酸)类似物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)05-0577-03

Distribution of genotypes of hepatitis B virus in Wuhan and P region drug resistance mutation patterns and their correlation analysis* CUI Yan, LI Yan[△], QIAO Bin, WANG Ming (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To study the distribution of hepatitis B virus(HBV) genotypes and its correlation with the mutation patterns in the P region of HBV. **Methods** HBV DNA was extracted for conducting PCR. Then the HBV genotypes and P region drug resistance mutation sites were detected by using the direct sequencing method and the detection results were statistically analyzed by using the SPSS 19.0 software. **Results** Among 219 patients with chronic hepatitis B, 135 cases(61.6%) of HBV genotype B, 61 cases(27.9%) of genotype C, 2 cases(0.9%) of genotype D, 3 cases(1.4%) of genotype B+C, 1 case(0.4%) of genotype B+F+G and 17 cases(7.8%) of undefined genotype were detected out. Among them, 76 cases developed the drug resistance mutation, the mutation sites were mainly M204I(42.9%), M204V(22.1%) and L180M(27.3%). The occurrence rate of YMDD mutation had no statistically significant difference between the genotype B and C ($P > 0.05$). But in the YMDD mutation patterns, M204I and M204V had statistical difference in the distribution of C and D genotypes($P < 0.05$). **Conclusion** The HBV genotypes in Wuhan are mainly genotype B and C. The major drug resistant mutations are M204I, M204V and L180M. Clinical doctors should select the proper therapeutical scheme for treating chronic hepatitis B based on the results of the genotyping and drug-resistant mutations.

【Key words】 hepatitis B virus; genotype; drug-resistant mutation; nucleos(t)ide analogues

乙型肝炎病毒(HBV)基因型包括 A~H, 不同地区的分布特征可能存在差异, 我国以 B、C 型常见, 还有少量 D 型。基因型是影响 HBV 感染结果的主要决定因素之一, 不同基因型的致病性有所差异, 并且与临床表现、预后、治疗应答均有一定的关系^[1]。目前, 临床应用最广泛的抗 HBV 药物为核苷(酸)类似物, 但由于长期及不规范用药, 使 HBV 产生耐药突变, 影响了治疗效果。因此, 本研究进行 HBV 基因型分型及耐药变异检测, 以为临床医生合理用药提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 219 例血浆标本均来自本院 2011 年 4 月至

2014 年 4 月门诊及住院部的慢性乙型肝炎患者, 年龄 18~76 岁, 其中男 183 例, 女 36 例。慢性肝炎的诊断标准符合中华医学会肝病学会和感染病学分会于 2010 年更新的《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]。所有患者血浆丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、戊型肝炎病毒(HEV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)等检测均为阴性。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 提取 HBV-DNA 提取采用上海莱枫生物科技有限公司生产的体液游离 DNA 微量提取试剂盒, 提取过程严格按照试剂盒说明书操作。

* 基金项目: 国家重点临床专科建设项目(财社【2010】305 号)。

作者简介: 崔艳, 女, 在读研究生, 主要从事分子诊断研究。△ 通讯作者, E-mail: yanli.1120@hotmail.com。

1.2.2 HBV 基因分型及耐药突变检测 对待检血浆标本中提取的 HBV-DNA 进行 Pol 基因 RT 区核酸聚合酶链反应 (PCR) 扩增后直接测序, 测序引物为上海生工合成, 上游引物为 5'-TGG ACT TCT CTC AAT TTT CT-3', 下游引物为 5'-TGA CAG ACT TTC CAA TCA AT-3', 采用美国 ABI 公司 3500 测序仪及其配套试剂检测, 并将所测序列与美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 核酸序列数据库 (GenBank) 中 HBV-DNA Pol 基因 RT 区参考序列 AF100309、AB014381 和 X51970 等进行比对分析, 确定受检血浆标本中 HBV-DNA 的基因型, 以及所检测区域是否发生耐药突变和其耐药突变类型。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理与统计学分析, 计数资料以例数、频次或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV-DNA 基因型分布及耐药分布 219 例慢性乙型肝炎患者血浆中共检出 HBV 基因型 B 型 135 例 (61.6%)、C 型

61 例 (27.9%)、D 型 2 例 (0.9%)、B+C 混合型 3 例 (1.4%) 及 B+F+G 混合型 1 例 (0.4%)、未分型 17 例 (7.8%)。B 基因型标本中 50 例发生耐药突变, C 基因型标本中 26 例发生耐药突变, B、C 基因型耐药突变发生率比较差异无统计学意义 ($\chi^2=3.609, P=0.057$)。HBV 耐药突变检测结果见图 1。

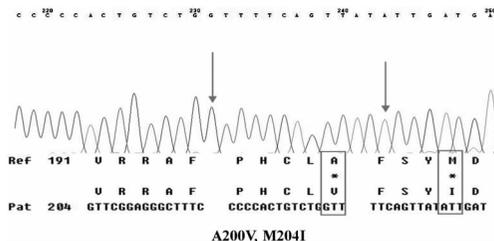


图 1 HBV 耐药突变检测结果

2.2 HBV 耐药模式分布 对 202 例基因分型标本中 HBV-DNA 的 P 区进行测序, 其中 12 例没有发生突变, 113 例发生的突变尚不确定与核苷 (酸) 类似物耐药相关, 76 例明确发生耐药突变。与耐药相关的单个氨基酸突变模式见表 1。

表 1 HBV 单个氨基酸突变模式结果

突变模式	检出频次	检出率 (%)	相关药物
A181T	8	10.4	替诺福韦/拉米夫定/阿德福韦/替比夫定/恩替卡韦
A181V	9	11.7	替诺福韦/拉米夫定/阿德福韦/替比夫定/恩替卡韦
M204V	17	22.1	拉米夫定/替比夫定/恩替卡韦
M204I	33	42.9	拉米夫定/替比夫定/恩替卡韦
N236T	10	13.0	拉米夫定/阿德福韦
L180M	21	27.3	恩曲他滨/拉米夫定/替比夫定/恩替卡韦
M250V	3	3.9	拉米夫定/替比夫定
M250R	1	1.3	拉米夫定/替比夫定/恩替卡韦
M207I	3	3.9	拉米夫定/替比夫定
V173M	1	1.3	恩曲他滨/拉米夫定
V173L	3	3.9	恩曲他滨/拉米夫定/替比夫定/恩替卡韦
L80I	10	13.0	阿德福韦
L80V	6	7.8	阿德福韦
S202I	3	3.9	恩替卡韦
V84M	1	1.3	阿德福韦

表 2 HBV YMDD 突变与基因型的关系

基因型	n	YMDD 突变	非 YMDD 突变	YMDD 突变 (%)
B 型	50	34	16	68.0
C 型	26	14	12	53.8

表 3 HBV YMDD 突变类型与基因型的关系

基因型	n	M204V	M204I
B 型	34	15	19
C 型	14	1	13

2.3 YMDD 突变与基因型之间的关系 B 基因型和 C 基因型 YMDD 突变的发生率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=1.783, P=0.182$); 而 YMDD 突变类型中的 M204V 和 M204I 在 B、C 两种基因型中的分布比较差异有统计学意义 ($\chi^2=6.01, P=0.014$)。见表 2~3。

3 讨 论

HBV 基因型分布呈现一定的地区差异性, 其中 A 基因型主要分布在欧洲西部、北部及非洲撒哈拉沙漠地区; B、C 型主要分布在远东东部和亚洲南部; D 型的分布较广, 常见于地中海地区及近东地区, 同时在亚洲少数地区也有发现; E 型主要在非洲撒哈拉沙漠地区; F 型主要分布在美国^[3]。本研究显示, 武汉市慢性乙型肝炎患者的基因型以 B 型 (61.6%) 为主,

其次为 C 型(27.9%),这一结果符合我国 HBV 基因型南方以 B 型为主、北方以 C 型为主的分布特征^[4-5]。此外,在本次研究中还发现了在我国较少见的几种基因型,其中 D 型 2 例(0.9%)、B+C 混合型 3 例(1.4%)、B+F+G 混合型 1 例(0.4%),由此可见武汉市 HBV 基因型分布有复杂化的趋势。临床上进行 HBV 基因分型检测具有相当重要的意义,与 B 基因型相比,C 基因型的 HBV 感染更易发生重症肝病、肝硬化、肝癌等肝脏疾病。此外,C 基因型 HBV 感染者的乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性率较高,病毒复制活跃,免疫清除比较晚,不易发生 HBeAg 血清转化^[1]。而且,不同基因型的 HBV 对抗病毒治疗药物的反应有着十分大的差异,总体上 B 基因型比 C 基因型易治疗^[6]。

目前已明确有抗 HBV 效果的药物包括核苷(酸)类似物及 α 干扰素,其中以核苷(酸)类似物应用最为广泛。但由于核苷(酸)类似物的长期应用及不规范用药,使 HBV 产生耐药突变,影响了治疗效果。因此,定期进行 HBV 耐药变异相关检测对指导临床医生用药具有相当重要的意义。我国慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家委员会认为采用核苷(酸)类似物来进行长期治疗的关注点在于选择性耐药位点的出现,治疗期间至少应该每 3 个月进行一次 HBV-DNA 耐药变异检测^[7]。

本研究中,76 例标本检出有核苷(酸)类似物相关耐药变异,突变位点以 M204I(42.9%)、M204V(22.1%)、L180M(27.3%)多见,其中 M204I/V 位点的变异与拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦的耐药相关。L180M 位点的变异常引起拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦、恩替卡韦发生耐药。A181T/V、N236T、L80I/V、V84M 等位点的变异与阿德福韦的耐药有关,其中 A181T 位点突变较为特殊,除了可引起拉米夫定、替比夫定、阿德福韦的非典型耐药以外,还影响 S 蛋白的表达分泌^[8]。此外,rtA181 位点变异被认为是多药耐药的标志,此位点的变异除了导致阿德福韦耐药外,还可引起替诺福韦、拉米夫定和替比夫定耐药^[8],有文献建议临床上治疗 rtA181 位点突变的患者应该采用替诺福韦与恩替卡韦联合用药的治疗方案^[9]。

YMDD 变异是 HBV 对拉米夫定最常见的耐药变异模式。耐药基因位点 YMDD 位于聚合酶的 C 区(rtM204I 或 rtM204V),分别是 YMDD 中的蛋氨酸(M)被异亮氨酸(I)或缬氨酸(V)所取代,形成 YIDD 或 YVDD 变异,这两种变异分别是 HBV 基因组第 739 位碱基腺嘌呤(A)被鸟嘌呤(G)替代和第 741 位碱基鸟嘌呤(G)被胸腺嘧啶(T)替代^[10-11]。本研究分析了拉米夫定经典耐药中的 YMDD 突变与基因型的关系,以及 YMDD 突变类型与基因型的关系。分析显示,YMDD 的发生在 B、C 基因型之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),而 YMDD 中的 M204I、M204V 在 B、C 基因型中的分布比较差异有统计学意义($P<0.05$)。YMDD 突变比例随着服药时间的延长而增加,服用拉米夫定第 1、2、3、4 年的耐药发生率分别为 14%、38%、49%和 66%^[12]。也有文献表明 YMDD 突变的发生率可能与 HBeAg 和 HBV-DNA 水平具有相关性^[13-14]。

综上所述,临床医生在治疗慢性乙型肝炎时应结合 HBV 基因分型和耐药突变模式及其他检测结果制订出合理的治疗方案,从而达到理想的治疗效果。

参考文献

- [1] 李艳,李金明.个体化医疗中的临床分子诊断[M].北京:人民卫生出版社,2013:197-198.
- [2] 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.
- [3] Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18):5427-5434.
- [4] 刘纯,刘伟,王凯,等.天津地区慢性乙型肝炎患者病毒基因型的分析及临床意义[J].中华医院感染学杂志,2014,24(10):174-179.
- [5] 刘会彩,陈国华.乙型肝炎病毒基因分型与临床的相关性探讨[J].中国实用医药,2014,9(12):90-91.
- [6] 明月,谢奇峰,杨林. B、C 基因型乙型肝炎病毒 X 蛋白调控细胞凋亡的比较研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(5):344-347.
- [7] 慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家委员会.慢性乙型肝炎抗病毒治疗专家共识:电子版[J].中华实验和临床感染病杂志,2010,4(1):49-53.
- [8] 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.
- [9] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues [J]. Gastroenterology, 2009, 137(5):1593-1608.
- [10] Yang J, Zhang H, Chen X, et al. Relationship between hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus genotype with spontaneous YMDD mutations[J]. World J Gastroenterol, 2013, 12(24):398-404.
- [11] Ozekinci T, Mese S, Ozbek E, et al. Lamivudine and adefovir motif variants detected in chronic hepatitis B patients[J]. Clin Ter, 2014, 165(1):13-17.
- [12] Wu F, Wu MJ, Zhuge XL, et al. Correlation of the occurrence of YMDD mutations with HBV genotypes, HBV-DNA levels, and HBeAg status in Chinese patients with chronic hepatitis B during lamivudine treatment[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012, 11(2):172-176.
- [13] 张笠,高武,刘小荣.慢性乙型肝炎患者 YMDD 突变与 HBV DNA 定量水平相关性研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(22):2724-2726.
- [14] Tan YW, Ge GH, Zhao W, et al. YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naive patients: a multi-center study[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(3):250-255.