

某市苗族、侗族及汉族乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测

欧阳^{1,2}, 陈玲², 丁显平^{1△} (1. 四川大学生命科学学院/特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 成都 610064; 2. 贵阳医学院第二附属医院, 贵州凯里 556000)

【摘要】 目的 研究凯里市苗族、侗族及汉族乙型肝炎病毒(HBV)的基因分型和耐药基因变异状况。方法 采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)和基因芯片反向斑点杂交技术检测凯里市苗族、侗族及汉族 293 例乙型肝炎患者基因型和对拉米夫定、阿德福韦耐药突变基因型。用试剂盒自带的阴性、阳性对照作为每次测定的质控, 确保结果的准确性。结果 (1) HBV 基因型检测到 B 型及 C 型, 其中 B 型 259 例(88.4%), C 型 25 例(8.5%), 无法分型 9 例(3.1%)。汉族 B 基因型比例低于苗族和侗族, C 基因型比例明显高于其他 2 个民族, 其基因型分布与其他少数民族比较, 差异有统计学意义($\chi^2=15.55, P<0.01$); (2) 286 例对拉米夫定敏感, 7 例对拉米夫定耐药; 7 例对拉米夫定耐药的突变基因中, 为苗族和汉族患者, 侗族未见拉米夫定耐药。但 3 个民族 HBV 耐拉米夫定变异检出率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=3.20, P>0.05$)。所有 293 例患者均对阿德福韦敏感。结论 凯里市 HBV 基因型以 B 型为主; HBV 基因 B 型患者易对拉米夫定耐药, 且以突变基因型以 180M 和 204V 为主。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 基因型; 耐药基因; 基因芯片

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)13-1845-03

Genotyping and detection of drug resistance gene of hepatitis B virus among Miao, Dong and Han nationalities in a city
OU Yang^{1,2}, CHEN Ling², DING Xian-ping^{1△} (1. Bioresource Research and Utilization Joint Key Laboratory of Sichuan and Chongqing, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610014, China; 2. Second Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Kaili, Guizhou 556000, China)

【Abstract】 Objective To research the genotyping and drug resistance gene mutation status of hepatitis B virus (HBV) among Miao, Dong and Han nationalities in Kaili city of Guizhou province. **Methods** The quantitative PCR and reverse dot blot hybridization microarray technology were adopted to detect the HBV genotypes and lamivudine, adefovir resistant mutations genotypes in 293 cases (Miao, Dong and Han nationalities) of hepatitis B. The negative control and positive control of the reagent kit served as the quality control in each determination for ensuring the accuracy of the results. **Results** (1) 259 cases of genotype B (259/293, 88.4%) and 25 cases of genotype C (25/293, 8.5%) were detected, and 9 cases (3.1%) were unable genotyping. A lower frequency of genotype B in Han population was found compared to Miao and Dong population and a higher frequency was seen in genotype C, resulting in statistical significance in genotyping distribution compared with other minorities ($\chi^2=15.55, P<0.01$). (2) 286 cases were sensitive to lamivudine, 7 cases showed lamivudine resistance, and all these 7 cases were Miao or Han patients without lamivudine resistance in Dong population, and lamivudine-resistant HBV mutation detection rate had no statistically significant difference among the three ethnic groups ($\chi^2=3.20, P>0.05$). All 293 patients were sensitive to adefovir. **Conclusion** Genotype B is the dominant HBV genotype in Kaili city. HBV genotype B patients easily become lamivudine-resistant and the mutant genotype mainly are 180M and 204V.

【Key words】 HBV; genotype; resistance gene; gene chip

乙型肝炎病毒(HBV)有 8 种不同的基因型包括 A~H^[1-2], 近年又有报道发现新的 I 型和 J 型^[3-4]。人类感染 HBV 基因型的类别有可能与疾病的感染谱、疾病的进展、感染途径有一定的联系^[5], HBV 基因容易发生基因的进化和基因的遗传变异^[6]。HBV 基因型耐药动态检测以及耐药性突变的频率差异对乙型肝炎抗病毒治疗药物疗效评价具有重要的指导意义。为了解凯里市苗族、侗族及汉族的 HBV 基因分型和耐药基因变异状况, 本文采用了膜基因芯片技术对凯里市苗族患者 96 例、侗族患者 89 例、汉族患者 108 例的 HBV 基因型和耐药变异进行了检测, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有患者均来自贵阳医学院第二附属医院, 且乙型肝炎表面抗原阳性。其中苗族 96 例, 平均年龄(38±17)岁, 男 51 例, 女 45 例; 侗族 89 例, 平均年龄(32±14)岁, 男 48 例, 女 41 例; 汉族 108 例, 其中男 79 例, 女 29 例, 平均年龄(35±13)岁。患者诊断符合 2010 年中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订的“慢性乙型肝炎防治指南”诊断标准^[7], 均未经拉米夫定等药物抗病毒治疗, 血清甲、丙、戊、庚型肝炎病毒均为阴性。

1.2 试剂 乙型肝炎标志物(包括乙型肝炎表面抗原、表面抗

体、e 抗原、e 抗体和核心抗体)检测试剂盒由厦门新创公司提供,批号 201311123;甲、丙、戊、庚型肝炎病毒抗体检测试剂盒由厦门新创公司提供,批号 201301031;乙型肝炎病毒 DNA 荧光定量检测试剂盒由深圳匹基有限公司提供,批号 20131203;HBV 基因分型及耐药变异检测试剂盒由深圳亚能科技有限公司提供,批号 20140101。

1.3 仪器 HBV DNA 检测用荧光聚合酶链反应(PCR)仪(由杭州博日科技有限公司提供);基因分型及耐药变异检测用 Rotor-GeneQ 凯杰实时荧光定量 PCR 仪(由德国凯杰公司提供);FYY-3 型杂交仪(兴化市分析仪器厂生产)。

1.4 方法

1.4.1 标本采集空腹采集慢性乙型肝炎患者抗凝静脉血 3 mL,3 000 r/min,离心 10 min,分离血清置 1.5 mL 离心管中 4 ℃ 或 -20 ℃ 储存备用。

1.4.2 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 采用德国凯杰有限公司提供试剂盒,DNA 提取采用煮沸法:取血清 100 μL 加入 100 μL DNA 提取液,混匀后离心 10 min,弃上清液,加入 25 μL DNA 裂解液,放置 10 min 混匀,100 ℃ 煮沸 10 min,离心取上清液 2 μL 放入装有生物素标记引物的 PCR 反应管中加入 2 μL 已处理好的标本,按下列条件扩增:37 ℃ 5 min,94 ℃ 预变性 1 min,然后按 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。

1.4.3 对复检表面抗原阳性者进行 HBV DNA 荧光定量,对荧光定量大于 1×10^4 copy/mL 者进行基因分型及耐药变异检测。基因芯片反向斑点杂交检测采用深圳亚能生物技术有限公司产品。基因芯片反向斑点杂交 PCR 扩增 DNA 提取采取柱层析法:取 1.5 mL 离心管,加入 20 μL 蛋白酶 K,再加入 200 mL 血清和 200 μL 裂解液,混匀后放入 56 ℃ 恒温裂解 10 min,裂解完成后加入 300 μL 无水乙醇,混匀。取离心柱置于收集管内,转移 1.5 mL 离心管内的样本处理液到离心管内,盖上管盖,1 200 r/min 离心 1 min,弃滤液,加入 700 μL 洗液 I(已加入 13 mL 无水乙醇),1 200 r/min 离心 1 min,弃滤液,加入 700 μL 洗液 II,1 200 r/min 离心 1 min,弃滤液,1 400 r/min 离心 2 min,弃收集管,将离心柱置于干净的 1.5 mL 离心管中,开盖室温放置 5 min,加入 50 mL 洗脱液,盖上管盖室温静置 3 min,800 r/min 离心 2 min。取 3 μL 用于 PCR 扩增反应。扩增完成后,PCR 产物煮沸变性 10 min,加入反应膜条置 42 ℃ 杂交 2 h。用洗脱液洗膜 2 次,加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,最后用 NBT/BCIP 系统显色,根据紫色斑点出现的位置和顺序直接判断结果。用试剂盒自带的阴性、阳性对照作为每次测定的质控,确保结果的准确性。

1.4.4 结果判断 基因分型及耐药变异检测采用膜芯片反向点杂交方法,用生物素-亲和素酶联反应显色,在进行 B、C、D 分型的同时检测拉米夫定和阿德福韦 2 种药物的 5 个常见耐药突变位点。如果质控位点出现蓝色表示该结果有效,在某一基因型检测位点显色表明该 HBV 为相应的基因亚型,只在药物敏感位点出现显色点表示 HBV 对该药敏感,一旦在耐药位点出现显色点即表示耐药。

1.4.5 其他(甲、丙、戊、庚)型肝炎病毒抗体检测试剂盒由厦门新创公司提供,具体操作按照说明书。

1.4.6 乙型肝炎标志物采用酶联免疫吸附试验检测,试剂盒由北京科美公司提供,严格按试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计数

资料以率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 293 例乙型肝炎患者 HBV 基因分型及分布 苗族以 B 型为主,其次为 C 型;侗族以 B 型为主,其次为 C 型,汉族以 B 型和 C 型为主。在 3 个民族中未发现除 B、C 基因型以外的其他 HBV 基因型。见表 1。

表 1 侗族、苗族与汉族慢性乙型肝炎患者基因型分布情况[n(%)]

民族	n	B 型	C 型	未分型
苗族	96	91(94.8)	3(3.1)	2(2.1)
侗族	89	81(91.0)	4(4.5)	4(4.5)
汉族	108	87(80.6)*	18(16.7)	3(2.8)

注:与苗族、侗族相比, $\chi^2=15.55, * P < 0.01$ 。

2.2 293 例乙型肝炎患者 HBV 基因分型分布比较 本地区 HBV 基因型检测到 B 型以及 C 型,其中 B 型 259 例(占 88.4%),C 型 25 例(占 8.5%),无法分型 9 例(占 3.1%)。由表 2 可以看出苗族、侗族和汉族中 B 基因型占绝对优势,但汉族 B 基因型比例低于苗族和侗族,C 基因型比例明显高于其他 2 个民族,其基因型分布与其他少数民族比较,差异有统计学意义($\chi^2=15.55, P < 0.01$),3 个少数民族均发现有少量的未分型 HBV 感染。

2.3 293 例乙型肝炎患者耐药突变情况 293 例乙型肝炎患者中,286 例对拉米夫定敏感,7 例对拉米夫定耐药;7 例对拉米夫定耐药的突变基因型中,为苗族和汉族患者,侗族未见拉米夫定耐药。突变基因型以 180M 和 204V 为主,但 3 个民族 HBV 耐拉米夫定变异检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.20, P > 0.05$)。所有患者均对阿德福韦敏感,未检测出耐药突变基因型。见表 2。

表 2 7 例拉米夫定耐药突变基因型[n(%)]

民族	n	拉米夫定检测		阿德福韦酯检测	
		敏感	耐药	敏感	耐药
苗族	96	93(96.9)	3(3.1)	96(100.0)	0(0.0)
侗族	89	89(100.0)	0(0.0)	89(100.0)	0(0.0)
汉族	108	104(96.3)	4(3.7)	108(100.0)	0(0.0)

注:3 个民族相比, $\chi^2=3.20, P > 0.05$ 。

3 讨论

目前人类已发现的 HBV 基因型共 8 种即 A~H。由于 HBV 变异进化后使得 HBV 在自然感染过程中反映了不同基因型的变异特点。HBV 感染后的临床过程有很多种,不仅宿主的感染方式和宿主的免疫状况有关,还与感染 HBV 株的基因型种类有关^[8-9]。近几年来,大批学者发现 HBV 基因型具有地理区域性分布特征^[10-12],各地区优势基因型不同,病毒株也有很大差异,预后也各不一样,所以基因分型的检测在流行病学上对传染源的追踪研究和传播途径具有很重要的意义。

在我国以 C 型和 B 型为主^[13-17],其中南方地区以 B 型为主,北方地区以 C 型为主。本次检测到该地区乙型肝炎患者 HBV 基因型存在 B 型及 C 型,其中 B 型 259 例(88.4%),C 型 25 例(8.5%),无法分型 9 例(3.1%)。无其他明确型别及混

合型,有 4 例汉族、3 例苗族患者无法分型,可能为其他基因型的 HBV 感染,因采用的试剂盒检测探针是针对我国比较常见的 B 型、C 型和 D 型设计的,而对少见的其他基因型不能检出。检测中以 B 型为优势基因,占总体标本的 88.4%,其中苗族患者病毒 B 基因型占苗族标本的 94.8%,侗族患者病毒 B 基因型占侗族标本的 91.0%,汉族组 B 基因型占汉族标本的 80.6%,汉族与苗族和侗族比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究提示贵州省凯里市的侗、苗族及汉族乙型肝炎患者 HBV 基因型以 B 型为主,C 型较少,与丁静娟等^[13]报道一致。

目前治疗乙型肝炎的主要药物有阿德福韦、拉米夫定、干扰素等。越来越多的学者开始关注感染 HBV 不同基因型的患者对抗病毒治疗反应的差异。拉米夫定作为乙型肝炎一线抗病毒治疗药物,主要耐药机理是 HBV DNA 聚合酶基因发生突变,导致与拉米夫定的结合力降低,7 例对拉米夫定耐药的突变基因型中,突变基因型以 180M 和 204V 为主,使用过抗病毒药物泛昔嘧韦治疗可引起 180M 突变,所以需要排除这个药物的干扰。本次所有患者都无使用泛昔嘧韦的病史。新型抗病毒药物阿德福韦酯是继拉米夫定后的新型抗病毒药物,因为与其他核苷酸类似物无交叉耐药而且近期使用耐药率低,所以在抗 HBV 治疗中起到很重要的作用。但有研究发现,阿德福韦酯长期使用也可导致 HBV 发生耐药突变。目前已证实与阿德福韦酯耐药的突变位点主要为 rtA181 和 rtN236。卜范峰等^[18]研究发现,肝硬化、乙型肝炎 E 抗原阴性状态、年龄和阿德福韦耐药与拉米夫定耐药变异发生明显相关。但本文 293 例患者未检测出阿德福韦耐药突变基因型。虽然本次耐药变异所占的比例较小,但对于即将进行抗病毒治疗或者治疗后无作用的患者,有必要检测 HBV 耐药变异情况,便于指导临床医生合理科学地制订抗病毒治疗方案,以便能达到更好的治疗效果。

本研究表明,利用基因芯片技术检测 HBV 基因型及耐药性发生与否,1 次试验就能为乙型肝炎临床诊疗提供多项参考信息。由于该方法具有高通量,快速灵敏,多个平行检测基因的优点,而且还可进行动态监测,提前发现,及时调整治疗方案等目的,对于针对性指导临床用药具有重要意义,因而在 HBV 基因分型和耐药变异检测中前景看好。目前有证据表明 HBV 基因型与疾病发展和临床治疗效果有着密切关系,在明确基因型后进行抗病毒治疗,可使抗病毒治疗的方案个体化,达到治疗效果的最优化。同时也可积累不同基因型在人类学、流行病学、病原学、临床治疗等方面的资料,为以后其它药物治疗乙型肝炎患者提供有效的、有意义的研究线索。

综上所述,贵州省凯里市乙型肝炎患者 HBV 基因型以 B 型为主。乙型肝炎患者在抗病毒治疗中应监测常见耐药位点的突变,通过对长期服用拉米夫定和阿德福韦酯药物患者进行 HBV 基因型检测和耐药突变,有助于了解不同基因型患者的 HBV 相关耐药基因情况,便于抗病毒药物的更换和选择,为个体化抗病毒治疗方案提供更有利的科学依据。

参考文献

[1] 焦敏,何江,余伍忠. PCR 及其衍生技术在乙型肝炎病毒定量检测中的应用进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,(12):9-11.
[2] La TG, Nicolotti N, De WC, et al. An assessment of the

effect of hepatitis B vaccine in decreasing the amount of hepatitis B disease in Italy[J]. *Virology*, 2008, 5(1): 84-90.

- [3] Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, Southeast Asia[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(11): 1777-1780.
[4] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J[J]. *J Virol*, 2009, 83(20): 10538-10547.
[5] 杨柳,张红梅,徐骄阳,等. 新疆地区回族、汉族人群 HBV 基因分型的研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(9): 936-939.
[6] 于红缨,邵凌云,符政远,等. 湖南省怀化市少数民族及汉族慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及临床分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008, 2(1): 44-49.
[7] 贾继东,李兰娟. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 胃肠病学, 2011, 10(6): 351-366.
[8] 黄彬,陈茶,陈利达. 乙型肝炎病毒基因型检测及其临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(9): 1749-1751.
[9] 段建平,朱坤,吴薇佳,等. 乙型肝炎病毒基因型与 YMDD 基因区序列突变及 BCP 突变关系探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(1): 68-72.
[10] Biswas A, Panigrahi R, Pal M, et al. Shift in the hepatitis B virus genotype distribution in the last decade among the HBV carriers from eastern India: possible effects on the disease status and HBV epidemiology[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(8): 1340-1347.
[11] Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus[J]. *Hepatology Res*, 2010, 40(1): 14-30.
[12] 郭乐,申元英. 中国少数民族 HBV 基因型地理分布研究进展[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(7): 962-964.
[13] 丁静娟,彭亮,张权,等. 贵州侗族、苗族和汉族人群乙型肝炎病毒基因型分布[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3): 230-233.
[14] 王虹,冯妙芙,周东耀,等. 荧光分子信标探针检测拉米夫定耐药基因的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 90-93.
[15] 刘建湘,蒋黎. 戊型肝炎重叠慢性乙型肝炎病毒感染临床分析[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(24): 76-78.
[16] 艾敏,赵伟,陶晨,等. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白检测在恩替卡韦抗病毒治疗中的临床意义[J]. 江苏医药, 2012, 38(23): 2809-2811.
[17] 张晓平,邱丽影,秦俊生,等. 深圳地区乙型肝炎病毒基因分型与核苷类药物[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 4.
[18] 卜范峰,鲁艳芹,韩金祥,等. 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变及其与临床指标的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9): 806-809.