

• 论 著 •

某地区乙型肝炎病毒基因型分布和 P 区耐药突变模式分析

左万超¹, 刘小亮², 李 莲¹, 付红霞^{3△}(1. 湖北医药学院附属人民医院检验部, 湖北十堰 442000; 2. 湖北省丹江口市汉江医院药剂科 442700;
3. 湖北省十堰市太和医院检验科 442000)

摘要:目的 探讨十堰地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型分布和 P 区耐药突变模式及两者的相关性。方法 将在该院进行治疗的 224 例慢性乙型肝炎患者纳入本研究,提取患者血液标本中的 HBV DNA,利用 ABI 3730 型遗传分析仪对 DNA 进行测序,通过 SeqMan 软件实施序列比对,分析 HBV DNA 的基因型和 P 区耐药突变的情况。结果 检出 HBV 基因型为 B 型者 136 例,占 60.71%;为 C 型者 62 例,占 27.68%。二者比例均高于 D 型、B+C 型及未分型者,差异有统计学意义($P<0.05$)。78 例明确出现耐药突变,其中 B 基因型对于拉米夫定以及阿德福韦的耐药率分别为 18.38%与 9.56%,与 C 基因型对于二者的耐药率 16.13%与 9.68%相比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。B 基因型患者 M204V、M204I 耐药突变的发生率分别为 38.60%、17.54%,C 基因型患者则分别为 28.57%与 38.10%,两种基因型患者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。B、C 型基因突变患者间 YMDD 突变(M204V、M204I)及非 YMDD 突变所占比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。B 基因型及 C 基因型分别与 M204V 及 M204I 两种突变均呈正相关。结论 十堰地区 HBV 的基因型主要是 B 型及 C 型,发生的 HBV 耐药突变则以 M204I 和 M204V 为主,在临床治疗时应按照基因型以及耐药突变情况合理选择药物进行慢性乙型肝炎的治疗。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因型; 耐药突变; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.18.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)18-2582-03

Distribution of hepatitis B virus genotypes and drug resistance mutations in P region in a certain area

ZUO Wanchao¹, LIU Xiaoliang², LI Lian¹, FU Hongxia^{3△}(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Pharmacy Department, Hanjiang Hospital, Danjiangkou, Hubei 442700, China;
3. Department of Clinical Laboratory, Taihe Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To study the distribution of hepatitis B virus genotypes in Shiyan City and analyse the correlation between it and the pattern of drug resistance mutation in P district. **Methods** Totally 224 patients with chronic hepatitis B were enrolled in the study, after the HBV DNA samples were extracted, nucleotide sequencing was carried out by using ABI 3730 genetic analyzer, the sequence alignment was done by using SeqMan software. The HBV genotype and drug resistance mutation at P region of HBV DNA were analyzed. **Results** Genotype B was detected in 136 cases accounting for 60.71%; genotype C was detected in 62 cases accounting for 27.68%. The proportion of the two were higher than those of D type, B+C type and non-classification cases, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Totally 78 cases were confirmed to have drug resistance mutation. The drug resistance rate of genotype B to lamivudine and adefovir were 18.38% and 9.56% respectively, while those of genotype C were 16.13% and 9.68% respectively. The difference between the two genotypes was not statistically significant ($P>0.05$). There was no significant difference among the proportion of B mutations (M204V, M204I) and non YMDD mutation in patients ($P>0.05$). B and C genotypes were positively correlated with M204V and M204I mutations. **Conclusion** The genotypes of HBV in Shiyan city were mainly B and C and the types of drug resistance mutations were mainly M204V and M204I. The therapies should be chosen according to the genotype and drug resistance mutation.

Key words: hepatitis B virus; genotype; drug resistance mutations; correlation

乙型肝炎病毒(HBV)属于 DNA 病毒,容易感染人体并引发肝炎。目前已经确定该病毒具有 A 至 H 共计 8 个基因型,而且我国各地区人口所携带的 HBV 基因型分布存在一定差异。各基因型 HBV 的致病能力有差异,进而导致治疗用药方案的不同^[1]。有研究表明,HBV 的基因十分容易发生突变^[2],尤其是当应用强效抗 HBV 药物进行治疗时,HBV 基因会发生变异进而躲避药物杀伤。接受核苷类药物进行治疗的患者检测出 P 基因突变且此变异和 HBV 的耐药性有关^[3]。因此了解患者 HBV 基因型分布特点以及掌握基因耐药突变的情况对临床治疗有极大帮助。本课题组分析了十堰市的 HBV 基因型分布及其与 P 区耐药突变模式的相关性,旨在为临床

治疗方案的选择提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取自 2015 年 2 月到 2015 年 10 月在本院治疗的 224 例慢性乙型肝炎患者纳入本研究,男 184 例、女 40 例,年龄 21~73 岁,平均(51.4±2.1)岁。纳入标准:(1)满足 WHO 关于慢性乙型肝炎的有关诊断标准^[4];(2)其他类型的肝炎病毒及 HIV 病毒检测呈阴性;(3)年龄>20 岁。排除标准:(1)有其他种类的肝脏病变;(2)恶性肿瘤者;(3)血液类疾病者。本研究获得患者本人的知情同意且已签署同意书。本院伦理委员会同意进行本研究。

1.2 方法 选用产自北京天根生化公司的 TIAamp 病毒基因

组的 DNA/RNA 提取试剂盒对患者血液标本中的 HBV DNA 进行提取操作。对于 HBV P 基因相关核苷类似物的作用靶区实施聚合酶链反应,构建引物的序列为 5'-ATG TTT CCC TCT TGT TGC TG-3' 以及 5'-CCA ACT TCC AAT TAC ATA TCC C-3',扩增条件:95 ℃ 150 s;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 10 min。对 PCR 产物经过电泳、切胶和纯化之后进行测序。对于 HBV 基因分型的检测,使用产自上海浩源公司的试剂盒进行处理,操作过程严格按说明书步骤进行。利用 ABI 3730 型遗传分析仪对核苷酸进行测序,通过 SeqMan 软件进行序列比对,确定检测区域发生的耐药突变情况。

1.3 观察指标 分析 HBV 的基因型和耐药情况,P 区基因发生耐药突变的情况,HBV YMDD 的突变类型和基因型之间的关系,以及不同基因型与 P 区基因耐药突变模式的相关性。

1.4 统计学处理 通过 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,相关性用 Pearson 相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 的基因型和耐药情况分析 224 例患者中,HBV 基因型为 B 型者占 60.71%(136/224),C 型者占 27.68%(62/224),两者所占比例均高于 D 型、B+C 型及未分型者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。B 基因型患者中发生耐药突变的占 37.50%(51/136),与 C 基因患者中发生耐药突变者的百分比 43.55%比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.653$; $P=0.419$)。见表 1。

表 1 患者 HBV 基因型的分布和发生耐药突变的情况				
基因型	<i>n</i>	构成比(%)	发生耐药突变	
			<i>n</i>	百分比(%)
B 型	136	60.71*△#	51	37.50
C 型	62	27.68*△#	27	43.55
D 型	4	1.79	0	—
B+C 型	4	1.79	0	—
未分型	18	8.04	0	—
合计	224	100.00	78	81.05

注:与 D 型比较,* $P<0.05$;与 B+C 型相比,△ $P<0.05$;与未分型相比,# $P<0.05$;—表示该项无数据。

2.2 P 区耐药突变的检测结果分析 除 18 例未分型外,为 206 例 HBV 基因型明确的患者进行 HBV DNA P 区的测序,其中 78 例出现耐药突变。B 基因型患者对于拉米夫定以及阿德福韦的耐药率分别为 18.38%与 9.56%,与 C 基因型对于二者的耐药率(16.13%和 9.68%)比较,差异均无统计学意义($\chi^2=0.149$, $P=0.700$; $\chi^2=0.001$,0.979)。见表 2。

表 2 P 区耐药突变的检测结果分析[n(%)]		
项目	B 型	C 型
无耐药突变	79(58.09)	41(66.13)
拉米夫定耐药	25(18.38)	10(16.13)
阿德福韦耐药	13(9.56)	6(9.68)
替比夫定耐药	9(6.62)	0(0.00)
恩替卡韦耐药	6(4.41)	0(0.00)
拉米夫定及阿德福韦的交叉耐药	4(2.94)	5(8.06)

2.3 P 区耐药突变模式的检测结果分析 B 基因型及 C 基因型的 P 区耐药突变模式以 M204V 及 M204I 为主。B 基因型 M204V、M204I 耐药突变的发生率分别为 38.60%、17.54%,C 基因型这两种突变的发生率分别为 28.57%与 38.10%,2 种基因型比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 P 区耐药突变模式的检测结果分析[n(%)]				
突变模式	B 型(<i>n</i> =57)	C 型(<i>n</i> =21)	χ^2	<i>P</i>
A181T	3(5.26)	1(4.76)	0.008	0.929
A181V	1(1.75)	0(0.00)	0.373	0.541
M204V	22(38.60)	6(28.57)	0.670	0.413
M204I	10(17.54)	8(38.10)	3.651	0.056
N236T	2(3.51)	2(9.52)	1.141	0.285
L180M	9(15.79)	1(4.76)	1.670	0.196
M250V	3(5.26)	1(4.76)	0.008	0.929
M250R	0(0.00)	0(0.00)	—	—
M207I	1(1.75)	0(0.00)	0.373	0.541
V173M	1(1.75)	0(0.00)	0.373	0.541
V173L	3(5.26)	1(4.76)	0.008	0.929
L80I	0(0.00)	0(0.00)	—	—
L80V	1(1.75)	0(0.00)	0.373	0.541
S202I	1(1.75)	1(4.76)	0.556	0.456
V84M	0(0.00)	0(0.00)	—	—

注:—表示该项无数据。

2.4 HBV YMDD 突变和基因型之间的关系 HBV DNA B 型和 C 型患者之间非 YMDD 突变、YMDD 突变的两种类型所占比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 HBV YMDD 的突变类型和基因型之间的关系分析[n(%)]				
基因型	<i>n</i>	非 YMDD 突变	YMDD 的突变	
			M204V	M204I
B 型	57	25(43.86)	22(38.60)	10(17.54)
C 型	21	7(33.33)	6(28.57)	8(38.10)
χ^2		0.703	0.670	3.651
<i>P</i>		0.402	0.413	0.056

2.5 不同基因型与 P 区耐药突变模式的相关性 B 基因型及 C 基因型分别与 M204V 及 M204I 均呈正相关,见表 5。

表 5 不同基因型与 P 区耐药突变模式的相关性				
突变模式	B 型		C 型	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
M204V	0.726	<0.05	0.683	<0.05
M204I	0.804	<0.05	0.711	<0.05

3 讨 论

HBV 可感染人体引发肝炎,严重者会导致肝硬化、肝脏器官功能缺失甚至肝癌,并且由于 HBV 具有泛嗜性,会可造成多器官损伤,其危害性应受到高度重视。我国目前有 9 000 多万人携带 HBV,患有慢性乙型肝炎者数量高达 2 000 万^[5-6]。

由于 HBV 属于 DNA 病毒,进行复制时易出现核苷酸配对出错现象,造成同种病毒核苷酸序列的差异,于是出现了各种基因类型。HBV 基因型直接关系到乙型肝炎患者临床症状以及治疗方案的制订和预后^[7-8]。患者的长期、大量不规范用药会导致 HBV 发生耐药突变,影响临床治疗。在乙型肝炎的治疗过程中,医生应认真研究并掌握患者 HBV 基因型分布特点,检查是否发生耐药突变,进而制订出高效的临床治疗方案。

HBV 可按照 DNA 差异分成 A~H 共 8 个类型,我国 HBV 感染者目前仅包含 A、B、C、D 4 种,主要为 B 型以及 C 型。分布特点表现为北方主要为 C 型,南方主要为 B 型^[9]。各种类型 HBV 致病特点以及对药物的敏感程度等均有所不同,如 B 型感染者出现肝脏纤维化和患肝癌的平均年龄比 C 型感染者大。同时,观察对比各类型病毒复制活动的活跃度发现,C 型复制活跃度更高,不容易出现 HbeAg 型血清转换。B 型更容易出现前 C 区位置突变,而 C 型已发生突变区域则是在核心启动子部位,该位置突变和重型肝炎的发生相关。

本研究中,HBV 基因型为 B 型和 C 型者所占比例均高于 D 型、B+C 型及未分型者,但 B 基因型与 C 基因型所占比例比较差异不明显;HBV 基因型主要以 B、C 型为主,与国外 Yukimasa 等^[10]的报道结果一致。B 基因型患者对拉米夫定以及阿德福韦的耐药率与 C 基因型患者比较,差异不明显。这提示 B 基因型以及 C 基因型均可能与拉米夫定和阿德福韦耐药有关。B、C 基因型患者之间 M204V 和 M204I 耐药突变的发生率比较,差异均不明显,而且 YMDD 突变(M204V 和 M204I)和非 YMDD 突变者所占比例比较,差异也不明显。YMDD 突变是 HBV 对拉米夫定耐药最为常见的一类耐药突变模式。其耐药基因的位点 YMDD 在聚合酶 C 区(即 rtM204I 或者 rtM204V),内部的蛋氨酸可被异亮氨酸或缬氨酸取代。相关性分析发现,B 基因型及 C 基因型分别与 M204V 及 M204I 均呈正相关。提示以 M204V 及 M204I 为主的耐药突变在 B 基因型以及 C 基因型中的比例较高,与鲍艳婷等^[11]的报道一致。究其原因,可能是因为发生在 M204V 及 M204I 等位点的突变主要与拉米夫定和替比夫定等药物的耐药作用有关。HBV 的基因结构为环状双股型 DNA,其副链可以编码目前已知的所有 HBV 蛋白质类型,而正链功能为开放读码区,但是不能对病毒蛋白进行编码。因此,虽然 HBV 是 DNA 型病毒,但是该病毒复制不是按照 DNA-DNA 的模式进行的,需要借助前基因组以 DNA-RNA-DNA 模式来完成复制。在 RNA 反转录副链 DNA 期间,因为该病毒的反转录酶不具备严谨的校正机制,使得 HBV 复制时易出现核苷酸错配现象。目前较常用的治疗 HBV 感染的药物为核苷酸类药物,其通过对 HBV 聚合酶中反转录酶区域的活性进行抑制以达到阻断 RNA 反转录产生病毒 DNA 目的,进而抑制 HBV 复制。但是核苷酸类药物治疗 HBV 过程较长,使用量大,面对选择压力,HBV 容易出现耐药突变。HBV DNA 副链具有 4 大开放区域,分别为 S、C、P 和 X 区,其中 P 区为最长区,大概占据整个基因组的 75%,负责对 DNA 多聚酶进行编码,相对更易发生耐药突变^[12]。因此,了解 HBV 基因分型以及突变情况对治疗方案确定具有较高指导意义。

综上所述,十堰地区 HBV 的基因型主要是 B 型及 C 型,发生的 HBV 耐药突变以 M204I 和 M204V 为主,在临床治疗时应按照基因分型以及耐药突变情况合理选择药物。

参考文献

- [1] 陶华兴,吕瑶,俞春松,等. 150 例 CHB 患者 YMDD 突变发生率与乙型肝炎病毒基因型的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(3):254-255.
- [2] 赵建强,刘加法. 山东省潍坊市慢性乙型肝炎患者 HBV P 区基因耐药突变检测及相关因素分析[J]. 病毒学报,2015,31(1):14-17.
- [3] 高国生,翁彭剑,许小敏,等. 慢性 HBV 感染者恩替卡韦耐药突变特征分析[J]. 中华临床感染病杂志,2015,8(2):139-142.
- [4] Ko SY, Kim BK, Kwon SY, et al. Clonal evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations during lamivudine-adeфовir combination treatment[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(44):6437-6446.
- [5] 李晓东,蒋丽红,李梵,等. 乙型肝炎病毒发生 rtA181T 突变的临床特点与意义分析[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(1):23-27.
- [6] Mirandola S, Sebastiani G, Rossi C, et al. Genotype-specific mutations in the polymerase gene of hepatitis B virus potentially associated with resistance to oral antiviral therapy[J]. Antiviral Res, 2012, 96(3):422-429.
- [7] 阎纳新,霍建峰,芦飞,等. 石家庄地区乙型肝炎病毒基因分型及 P 区耐药基因突变分析[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(4):336-338.
- [8] Shen Z, Zheng W, Deng Y, et al. Variations in the S and P regions of the hepatitis B virus genome under immunosuppression in vitro and in vivo[J]. Viral Immunol, 2012, 25(5):368-378.
- [9] 宋仕玲,桂文甲,周洪清,等. 武汉地区 157 例乙型肝炎病毒基因分型和耐药性分析[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2015,24(8):969-972.
- [10] Yukimasa N, Uzawa R, Fukuchi K, et al. Analysis of the complete hepatitis B virus genomes in a patient for repeated seroconversion to anti-HBe antibody due to co-infection with two virus clones[J]. Rinsho Byori, 2012, 60(4):306-311.
- [11] 鲍艳婷,郑良达,陈公英,等. 对慢性乙型肝炎及肝硬化患者的核苷(酸)类药物耐药位点的分析[J]. 医学研究杂志,2014,43(4):83-86.
- [12] 彭定辉,柴红燕,熊陈岭,等. 乙肝拉米夫定治疗前后 YMDD 变异与 DNA 载量的关系[J]. 中华全科医学,2014,12(10):1647-1648.

(收稿日期:2016-02-15 修回日期:2016-04-28)