

阿德福韦酯耐药株感染者乙型肝炎病毒基因型和多聚酶区基因变异分析

吴 菲 吕铁锋 郭晓凤 武 静

摘 要 **目的** 了解阿德福韦酯耐药株感染者 HBV 基因型、多聚酶区基因变异位点和变异类型,并分析 HBV 基因型和多聚酶区基因变异的关系。**方法** 应用 PCR 扩增和直接测序法检测 73 例阿德福韦酯耐药患者 HBV 基因型、多聚酶基因区变异位点、病毒载量。**结果** 73 例阿德福韦酯耐药株感染者中,HBV B 基因型占 35.6%,C 型占 64.4%;HBV 多聚酶基因区基因突变位点主要以 rtA181V/T(39.8%)、rtN236T(31.5%)为多见,rtA181V/T + rtN236T(20.5%),其他(8.2%);其中 rtA181V/T 位点变异中 B 型占 10.3%,C 型占 89.7%;rtN236T 位点变异中 B 型占 78.3%,C 型占 21.7%。rtA181V/T + rtN236T 位点变异 B 型占 26.7%,C 型占 73.3%;基因型 B 和 C 的病毒载量分别为 (6.38 ± 1.24) lg 和 (6.27 ± 1.10) lg 拷贝/毫升。**结论** 阿德福韦酯耐药株感染者 HBV 基因型主要为 B 型和 C 型;HBV 多聚酶区基因突变位点主要为 rtA181V/T 和 rtN236T,基因型与多聚酶区基因突变位点之间有一定相关性。C 基因型易发生 rtA181V/T 变异,B 基因型多出现 rtN236T 变异。C 基因型比 B 基因型更易出现 rtA181V/T + rtN236T 双突变,可能与 C 基因型容易导致的严重的肝脏疾病有关,基因型与病毒载量之间无相关性。

关键词 阿德福韦酯 多聚酶区基因变异 基因型 病毒载量

Polymerase Region Mutations and Hepatitis B Virus Genotypes in Chronic Hepatitis B Patients with Adefovir Resistant Strains. Wu Fei, Lü Tiefeng, Guo Xiaofeng, Wu Jing. Institute of Liver Diseases, Hangzhou Sixth People's Hospital, Zhejiang 310000, China

Abstract Objective To investigate genotypes characteristics, HBV polymerase gene mutation sites and types in Adefovir resistant strains infected patients, and analyze the relationship between HBV genotypes and polymerase gene mutations. **Methods** Serum samples were collected from 73 hepatitis B patients resistant to Adefovir. HBV P gene RT region was amplified by PCR. The PCR products were directly detected for the genotypes, polymerase region mutations sites and viral loads. **Results** The mutation forms were rtA181V/T (39.8%), rtN236T(31.5%), rtA181V/T + rtN236T (20.5%), others (8.2%) in 73 patients harboring YMDD mutations. The most frequent genotypes were B(35.6%) and C(64.4%). The rtA181V site mutation in type B and C were 10.3% and 89.7%; rtN236T site mutation in type B and C were 78.3% and 21.7%, rtA181V + rtN236T site mutation in type B and C were 26.7% and 73.3%. The virus load of genotype B and genotype C were (6.38 ± 1.24) lg and (6.27 ± 1.10) lg copies/ml. **Conclusion** The main genotypes in Adefovir resistant strains infected patients were B and C. Genotypes had no direct correlation with the viral load. Adefovir – resistance mutations and genotypes have relevance. The mutation frequency of rtA181V/T in genotype C was higher than in genotype B, and rtN236T in genotype B was higher than in genotype C. Genotype C other than B was more likely to have double mutations because of genotypes C being easy to cause severe liver diseases.

Key words Adefovir; Polymerase region mutations; Genotypes; Viral load

乙型肝炎病毒(HBV)可引起隐性感染、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化和肝癌,根据 HBV 全基因序列差异 >8%,或 S 区基因序列差异 >4%,分为 A ~ J10 种基因型^[1]。阿德福韦酯(ADV)是目前较为有效的抗 HBV 药物,对 HBV 野毒株和拉米夫定耐药相关的

YMDD 变异株均有明显的抑制作用;但随之出现的耐药问题严重影响了 ADV 抗病毒治疗的临床疗效^[2]。本研究通过研究 73 例阿德福韦酯耐药株感染者病毒基因型和 HBV 多聚酶基因区耐药位点的关系,以期对抗病毒治疗起到一定的指导作用。

对象与方法

1. 临床资料:选择 2007 ~ 2008 年在杭州市第六人民医院就诊的慢性乙型肝炎患者经单用阿德福韦酯治疗(10mg/d,疗程 > 12 个月)后出现临床耐药的 73 例患者。所有患者均符合 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》^[3]。所有患者留取耐药变异时血清样本,置 -70℃ 冰箱保存。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2091061);杭州市医药卫生科技计划项目(2010A016)

作者单位:310000 杭州,浙江中医药大学(吴菲);杭州市第六人民医院感染科(吕铁锋、郭晓凤、武静)

通讯作者:吕铁锋,电子信箱:tiefenglv@126.com

2. 研究方法:(1) 病毒学检测:测血清 HBV DNA 定量采用荧光定量 PCR 方法检测,试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,在 PE5700 扩增仪上进行操作。(2) 血清 HBV DNA 的提取:取 60μl 血清加入 60μl 裂解液,混匀,煮沸 10min,10000r/min 离心 10min,取上清液备用。(3) HBV 多聚酶基因区序列扩增和测序:根据 HBV P 基因的保守区序列设计一对引物。扩增的核苷酸片段,覆盖 B~E 区。引物序列如下:上游引物 5'-GTA TGT TGC CCG TTT GTCCTC-3'(nt461~481);下游引物 5'-CCF TGA CATACT TTC CAAATA-3'(nt997~974),引物由上海申友生物技术有限责任公司合成。PCR 的反应体积为 40μl,反应条件为 94℃ 预变性 3min;94℃ 30s,55℃ 40s,72℃ 1min,循环 35 次;72℃ 5min 延伸。取 PCR 产物 3μl 进行琼脂糖凝胶电泳,对扩增产物进行初步鉴定。对 PCR 产物进行纯化,以纯化后的产物为模板进行测序扩增,扩增条件为:95℃ 20s,50℃ 15s,60℃ 60s,循环 25 次;醋酸铵一乙醇法沉淀扩增产物,重溶于 9μl MegaBACE loading solution;用 MegaBACE DNA 分析系统进行序列测定。测序样本共 73 份。(4) 乙肝病毒基因型监测:采用 TaqMan 荧光 PCR 技术结合 HBV S 区 PCR 产物直接测序验证。实时荧光 PCR 设计一条含有 VIC 荧光素作为报告基团的探针检测 HBV B 型基因,另设计一条含有 FAM 荧光素作为报告基团的探针检测 HBV C 型基因,探针设计参照文献[4]进行 HBV B/C 基因联合检测。检测采用美国 ABI7000 型实时荧光定量检测仪,引物、探针及 TaqMan 酶委托上海之江生物技术有限公司购买。

3. 统计学方法:所有统计学处理采用 SPSS 13.0 统计学软件进行。符合正态分布的计量资料的比较采用 *t* 检验,否则采用非参数检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

结 果

1. 乙肝病毒基因型分类:经过检测,73 例中 47 例为 C 型,占 64.4%,26 例为 B 型,占 35.6%,无 B + C 型。C 基因型出现频率高于 B 基因型。

2. HBV 多聚酶基因区基因突变位点分类:根据 73 例患者 HBV 多聚酶基因区基因突变变异情况,将各 HBV 多聚酶基因区基因突变位点合并为 4 类:第 I 类为 rtA181V/T,比率占 39.8%;第 II 类为 rtN236T,比率占 31.5%;第 III 类 rtA181V/T + rtN236T,比率占 20.5%;第 IV 类为剩余其他变异位点如 rtL180M、rtM204I,比率占 8.2%。

3. 乙肝病毒基因型与 HBV 多聚酶基因区基因突变位点的关系:73 例乙肝病毒患者基因型分为 B 型和 C 型,耐药变异位点为 4 类(同上述)。I 类变异位点 B (10.3%)、C (89.7%);II 类变异位点 B (78.3%)、C (21.7%);III 类变异位点 B (26.7%)、C (73.3%);IV 类变异位点 B (16.7%)、C (83.3%),rtA181V/T 在 C 基因型发生率高于基因型 B ($P < 0.01$),说明 rtA181V/T 在 C 基因型中可能更容易出现变异;rtN236T 在 B 基因型发生率高于 C 基因型 ($P < 0.05$),说明 rtN236T 在 B 基因型可能更容易出现变异;rtA181V/T + rtN236T 在 C 基因型发生率高于基因型 B ($P < 0.05$),说明双位点在基因型 C 可能更容易出现变异(表 1)。

表 1 乙肝病毒基因型与多聚酶基因区变异位点之间的关系 [$n(\%)$]

基因型	<i>n</i>	rtA181V/T	rtN236T	rtA181V/T + rtN236T	其他
B 型	26	3(10.3)	18(78.3)	4(26.7)	1(16.7)
C 型	47	26(89.7)	5(21.7)	11(73.3)	5(83.3)
χ^2		24.575	9.914	8.236	0.196
<i>P</i>		<0.01	<0.05	<0.05	>0.05

4. 乙肝病毒基因型与病毒载量的关系:将出现耐药变异时的病毒载量取对数值,分为 B 型组和 C 型组。B 基因型患者 HBV DNA 水平为 (6.38 ± 1.24) lg 拷贝/毫升, C 基因型患者 HBV DNA 水平为 (6.27 ± 1.10) lg 拷贝/毫升,行两个独立样本的秩和检验(表 2)。B 型与 C 型比较无统计学意义 ($P > 0.05$),说明乙肝病毒基因型与病毒载量无相关性。

5. 多聚酶基因区变异位点与病毒载量的关系:HBV 多聚酶基因区基因突变位点与病毒载量之间作比较 ($P > 0.05$),说明 HBV 多聚酶基因区基因突变位点与病毒载量亦无相关性(表 3)。

表 2 73 例患者基因型与病毒载量对数值的关系 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	<i>n</i>	lgVL(拷贝/毫升)
B 型	26	6.38 ± 1.24
C 型	47	6.27 ± 1.10

$P > 0.05$

表 3 HBV 多聚酶基因区基因突变位点与病毒载量对数值的关系 ($\bar{x} \pm s$)

分型	B 型(lgVL)	C 型(lgVL)	<i>P</i>
rtA181V/T	6.09 ± 1.33	6.11 ± 1.01	>0.05
rtN236T	6.35 ± 1.36	5.91 ± 1.51	>0.05
rtA181V/T + rtN236T	7.05 ± 0.62	7.27 ± 0.77	>0.05
其他	5.46	6.78 ± 1.36	>0.05

讨 论

根据全基因组序列的差异 > 8%, 或 S 基因组序列的差异 > 4%, 将乙肝病毒可分为 A ~ J10 种基因型。目前已基本明确, HBV 存在地理分布差异^[5]。其中 B 型和 C 型主要分布在亚洲东部及南部, 也是我国最为常见的两种基因型。本研究中 B 基因型占 35.6%, C 基因型占 64.4%, 其他基因型少见, 提示本地区 HBV 感染者基因型以 C 型为主。

阿德福韦酯属于反转录酶抑制剂, 目前已经证实阿德福韦酯耐药相关变异主要包括 rtA181V/T 和 rtN236T 及两者的联合变异^[6]。本研究在阿德福韦酯耐药株感染者中发现 HBV 多聚酶基因区基因突变位点主要为 rtA181V/T (39.8%) 和 rtN236T (31.5%)。目前认为人类感染 HBV 病毒的基因型别可能与感染途径、疾病的进展有一定的相关性^[7]。国内有报道 BCP 区双突变随着 HBV 感染后的病情进展而增多。研究发现 BCP 区双突变在 C 基因型中明显比 B 基因型中多见, 认为 BCP 区双突变与基因型 C、严重的进展性肝病有关^[8]。但是目前关于病毒基因型和多聚酶区基因突变的关系报道少, 本研究结果显示阿德福韦酯耐药株感染者 HBV C 基因型易发生 rtA181V/T 变异, B 基因型多出现 rtN236T 变异。因此, 初步认为阿德福韦酯耐药株感染者病毒基因型与多聚酶基因区基因突变存在有一定的相关性。本研究还显示, C 基因型比 B 基因型更易出现 rtA181V/T + rtN236T 双突变, 故推测阿德福韦酯耐药株感染者 rtA181V/T + rtN236T 双突变可能是造成 C 型患者比 B 型存在更严重肝损害的原因之一。

Westland 等报道了乙肝基因型与阿德福韦酯疗效关系的结果, 48 周阿德福韦酯治疗后血清 HBV - DNA 下降和 HBeAg 血清转换率在各基因型中均没有统计学差异, 该研究显示, HBV 基因型不影响阿德福

韦酯的疗效。Kao 等研究发现, C 基因型患者的 HBV DNA 水平明显高于 B 型患者。本研究结果显示阿德福韦酯耐株感染者 B、C 两种基因型与病毒载量没有统计学意义, 与 HBV 多聚酶基因区突变位点亦无相关性, 说明 HBV 基因型不影响阿德福韦酯的疗效。

乙型肝炎病毒基因型与多聚酶区基因突变相关性的研究有助于探索乙型肝炎的发病机制, 为临床提供有益的启示。但 HBV 基因型存在有地域性差异及人种差异, 乙型肝炎病毒基因型与多聚酶区基因突变两者之间的关系, 仍需进一步研究证实。

参考文献

- 1 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 Viral*, 2009, 83 (10): 538 - 547
 - 2 刘峰, 王磊, 王丽娜, 等. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎过程中发生病毒突破患者的 (HBV) P 基因变异分析 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2008, 46 (4): 407 - 501
 - 3 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 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13 (12): 881 - 891
 - 4 Rozanov M, Plikat U, Chappey C, *et al.* A web - based genotyping resource for viral sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (7): 654 - 659
 - 5 刘爱平, 徐洪涛, 邢同京, 等. 乙肝病毒基因分型与慢性乙型肝炎患者临床和病理的相关性研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2010, 20 (3): 175 - 177
 - 6 Borroto Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials [J]. *J Hepatol*, 2007, 47 (4): 492 - 498
 - 7 钟崇芳, 郝娃, 李卓, 等. 乙肝病毒基因型与肝脏病理改变的关系 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15 (16): 1859 - 1864
 - 8 孙正伟, 李桂琴, 蔺安鸿, 等. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子基因变异与免疫学标志及 DNA 含量的临床研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15 (2): 166 - 168
- (收稿日期: 2012 - 05 - 11)
(修回日期: 2012 - 06 - 11)
-
- (上接第 91 页)
- 参考文献
- 1 徐小华, 浦佩玉, 刘春祥, 等. 脑胶质瘤患者的全身和局部免疫功能观察 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1995, 21 (6): 323 - 325, 378
 - 2 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1 - 766
 - 3 Kong DS, Kim ST, Lee JI, *et al.* Impact of adjuvant chemotherapy for gliomatosis cerebri [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 424
 - 4 Kwon MJ, Kim ST, Kong DS, *et al.* Mutated IDH1 is a favorable prognostic factor for type 2 gliomatosis cerebri [J]. *Brain Pathol*, 2012, 22 (3): 307 - 317
 - 5 Desestret V, Ciccarino P, Ducray F, *et al.* Prognostic stratification of gliomatosis cerebri by IDH1 (R132H) and INA expression [J]. *J Neu-*
- rooncol, 2011, 105 (2): 219 - 224
- 6 Goedegebuure PS, Eberlein TJ. The role of CD4⁺ tumor - infiltrating lymphocytes in human solid tumors [J]. *Immunol Res*, 1995, 14 (2): 119 - 131
 - 7 齐红, 石虹, 刘玉侠, 等. 253 例恶性肿瘤患者外周血 T 细胞亚群的检测及其临床意义分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13 (11): 1589 - 1590
 - 8 Degli - Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (2): 112 - 124
- (收稿日期: 2011 - 11 - 25)
(修回日期: 2011 - 12 - 01)