

## 乙型肝炎病毒逆转录酶基因突变的临床意义\*

何紫琪, 李从荣, 尹路 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**摘要:**目的 分析服用核苷酸类似物的乙肝患者逆转录酶(RT)基因突变模式及其与生化指标的相关性,探讨该基因突变的临床意义。方法 采用半巢式PCR对634例来自武汉地区的乙肝病毒感染者血浆HBV进行扩增后,Sanger测序法进行基因序列分析;将RT基因突变组与野生组和各表型突变组中患者的谷氨酸氨基转移酶(ALT)、乙肝病毒e抗原(HBeAg)和HBV DNA阳性率作比较。结果 在测序成功的622例患者中,144例(23.15%)发生RT基因突变。他们在11个位点(rtM204,rtL180,rtA181,rtN236,rtV173,rtL80,rtM250,rtS202,rtV207,rtV214和rtV84)出现碱基突变。在突变组中,患者的ALT,HBeAg和HBV DNA阳性率显著高于非突变组( $P<0.05$ )。表型分析显示:拉米夫定(LAM)耐药最常检测到,占52.78%,其次为阿德福韦(ADV)耐药占27.78%和恩替卡韦(ETV)耐药占6.94%,多重耐药LAM+ADV于18例患者中检出12.5%。多重耐药组患者ALT,HBeAg和HBV DNA阳性率高于其他耐药组( $P<0.05$ );ADV耐药组患者ALT,HBeAg和HBV DNA阳性率高于LAM,ETV耐药组。结论 HBV RT区域的突变形式与血清学指标ALT,HBeAg和HBV DNA阳性状态有显著关联,该基因的突变形式可用作患者临床表现的指示指标。

**关键词:**乙型肝炎病毒;逆转录酶基因;耐药突变;生化指标

中图分类号:R512.62;Q754 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)04-083-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.022

### Clinical Significance of Reverse Transcriptase Gene Mutations in the Hepatitis B Virus

HE Zi-qi, LI Cong-rong, YIN Lu (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** Objective To explore the clinical significance of RT mutations through analyzing the mutation patterns and their biochemical parameters of the nucleotide analog treatment patients. **Methods** 634 plasma from HBV patients infected with HBV were amplified by semi-nested PCR, and then analyzed by Sanger DNA sequencing. ALT, HBeAg and HBV DNA positive rate were compared between mutation group vs. wild group and different mutation pattern groups. **Results** Among the 622 patients who were amplified successfully, 144 (23.15%) had RT gene mutations. They showed the following mutation patterns in 11 sites: rtM204, rtL180, rtA181, rtN236, rtV173, rtL80, rtM250, rtS202, rtV207, rtV214 and rtV84. In the mutated group, ALT, HBeAg and HBV DNA positive rates were significantly higher ( $P<0.05$ ). Phenotypic analysis showed that lamivudine resistance was most frequently detected (52.78%), followed by adefovir resistance (27.78%) and entecavir resistance (6.94%). Multidrug resistance was detected in 18 cases (12.5%). The LAM+ADV resistant group had a higher proportion of cases in ALT, HBeAg and HBV DNA positive rate, and the ADV-resistant group also had a higher proportion of cases than other two groups. **Conclusion** The results in our study shows correlations between the mutation status of the RT domain and biochemical parameters such as ALT, HBeAg and HBV DNA positive rates. The presence of RT gene mutations could therefore be utilized as a predictor of clinical status.

**Keywords:** hepatitis B virus; reverse transcriptase gene; drug resistance mutation; biochemical parameter

中国一直以来是HBV携带者最高的国家之一,其携带率高达8%~20%,相比携带率约2%~7%的地中海国家和日本,以及约0.1%~2%的欧美地区<sup>[1]</sup>,我国仍面临HBV感染的沉重负担,每年因HBV致死的人数约30万。目前可供选择的HBV感染药物治疗方案就是聚乙二醇干扰素和核苷酸类似物,但考虑到经皮注射的干扰素副作用多且有明显禁忌症,因此,口服药物NAs的优势让其在临床得以广泛应用<sup>[2]</sup>。

NAs药物针对的靶点是HBV的逆转录酶区,

因此该基因的突变与NAs耐药密切相关。当人体内源性宿主免疫应答作用和外源性药物共同作用时,适应性最强的耐药株会被选择出来成为优势病毒株,随即引起患者体内ALT的升高和肝脏疾病的进展。因此,HBV感染者病情的反复始终困扰着临床医生,动态监测慢性乙肝患者体内HBV毒株的变异发生、发展及其与临床指标的相关关系,对指导临床治疗意义重大。

本研究采用半巢式PCR技术对HBV RT基因进行扩增后,Sanger测序法检测序列全长,大大

\* 作者简介:何紫琪(1989—),女,在读硕士,主要从事病原微生物快速检测研究。

通讯作者:李从荣,女,硕士研究生导师,E-mail:congongli33@hotmail.com。

提高了方法学灵敏度,使低拷贝的病毒也易于检测到。以此技术检测 NAs 经治患者的 RT 区基因,并分析常见的 14 个耐药相关突变位点,探究 NAs 治疗后 HBV 各类感染者中耐药突变的检出率、突变模式及其与临床生化指标之间的相关关系。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 选择 2010~2015 年间武汉大学人民医院住院的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性患者 634 例,收集其血浆标本,于-20℃冻存。患者包括男性 516 例,女性 118 例,年龄 15~79,40.01±12.99 岁,患者排除其他引起肝脏病变的疾病。其中,经 NAs 药物治疗者在治疗前均于我院或外院进行了排除感染耐药株的检测(病史询问或既往病历查阅获得),因此我们认为,纳入本研究的标本所发生的耐药突变应为药物引起。

## 1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要试剂:体液游离 DNA 微量提取试剂盒,Taq PCR Master Mix(上海 LifeFeng 公司);琼脂糖凝胶粉末(GENE 公司),Bigdye 3.1(含 dNTP 和标记的 ddNTP)(美国应用生物系统公司),DNA marker(Biotec 公司),凝胶回收试剂盒(Axygen 公司)。

1.2.2 主要仪器:PCR 扩增仪(ABI 公司),ABI 3130-DNA 测序仪(ABI 公司),凝胶电泳仪,高速冷冻离心机(SIGMA 公司)。

## 1.3 研究方法

1.3.1 半巢式 PCR 扩增:见表 1。将 RT 区分为 RT1 和 RT2 两段分别进行扩增,目的基因片段总长度为 1 225 bp。F 与 R 分别代表正、反向引物。

表 1 半巢式 PCR 测序引物

引物名称	引物位置	引物序列	片段长度(bp)
RT-F/RT1-F	nt 57~74	CTGCTGGTGGCTCCAGTT	550
RT1-R	nt 588~606	CCTACTACACCATAACCCC	
RT2-F	nt 523~515	GGCACTAGTAACTGAGCC	
RT-R/RT2-R	nt 1 281~1 263	GAGTTCGCGAGTATGGATCG	759

扩增条件:2×Taq PCR Master Mix 10 μl; ddH<sub>2</sub>O 7 μl;引物 1 μl;DNA 模板 2 μl。

反应条件:预变性 95℃ 3 min,变性 94℃ 30 s;退火 57℃ 30 s;延伸 72℃ 45 s,35 个循环。

1.3.2 Sanger 法测序 RT 基因:Bigdye 0.3 μl; Buffer 0.45 μl;1.0 μl Primer;1.5 μl ddH<sub>2</sub>O;2 μl DNA 模板。

反应条件:预变性 96℃ 1 min;变性 96℃ 10 s;退火 5 s;延伸 60℃ 4 min。

1.3.3 序列分析比对:将所测序列与本科室设计的 BLAST 软件进行比对,突变位点显示“\*”。

1.3.4 血清学指标检测:①ALT,HBsAg 水平的

测定由 Roche 分析仪完成;②HBV DNA 水平的测定由 Roche LC 480 定量分析仪完成。患者于治疗后 6~12 个月首次复查的血清学指标用于数据分析,本次研究认为 ALT≥40 IU/L,HBsAg“+”,HBV DNA≥2×10<sup>3</sup> IU/ml 为阳性指征。

1.4 统计学分析 数据处理采用 SPSS 17.0 软件,成组资料间比较采用 *t* 检验,不同分组之间率的比较采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NA 治疗患者 RT 区碱基突变情况 634 例入选患者标本中,有 622 例测序成功。其中,有 NAs 服用史的患者 482 例,包括 144 例(29.88%)出现 RT 区碱基突变的患者,他们在 11 个位点出现碱基突变,其中,rtM204V 62 例(12.86%),rtM204I 38 例(7.88%),rtL180M 40 例(8.30%),rtA181V 16 例(3.32%),rtA181T 16 例(3.32%),rtV173L 10 例(2.07%),rtL80I 8 例(1.66%),rtL80V 10 例(2.07%),rtN236T 24 例(4.98%),rtS202I 8 例(1.66%),rtM250V 12 例(2.49%),rtV214A 2 例(0.41%),rtV207M 2 例(0.41%),rtV207I 4 例(0.83%),rtV84M 2 例(0.41%)。

2.2 不同碱基突变对应的耐药情况 144 例患者不同突变模式所对应的耐药相关药物中,拉米夫定耐药 76 例(52.78%),其次是阿德福韦耐药 40 例(27.78%),恩替卡韦 10 例(6.94%),此外,还有 18 例(12.5%)患者出现了 LAM 和 ADV 的多药耐药。在 LAM 相关耐药突变中,rtM204 发生率最高,且 204 位突变常伴 180 位突变的发生,此二种突变模式的发生率最高,分别占 55.63%和 28.95%。ADV 相关耐药突变中,以 rtL181 突变最常见,且 rt181 位突变常伴 rt236 位突变的发生,此二种突变模式的发生率最高,分别为 35.00%和 30.00%。ETV 在核苷类似物耐药中发生率相对较低(2.07%),且其耐药突变均发生在与 LAM 耐药相关的 rtM204 突变的基础上。

2.3 耐药组与非耐药组治疗前基础临床特征的比较 见表 2。

表 2 耐药组与非耐药组治疗前临床特征的比较

项 目	耐药(例)	非耐药(例)	<i>P</i>
性别(男/女)	108/36	259/79	0.392
年龄	42.3±13.2	41.0±10.9	0.189
吸烟史	38/106	82/256	0.35
饮酒史	23/121	65/273	0.238
ALT	258.9±155.3	278.3±165.2	0.276
Log HBV DNA	5.29±1.89	5.04±2.01	0.879

将 482 例 NAs 药物治疗患者分为耐药组与非

耐药组,通过病史询问和既往检查结果的查阅,将患者服药前的基础临床特征作一比较,两组患者在使用 NAs 药物治疗前,其基础临床特征之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.4 耐药组与非耐药组生化指标的比较 见表3。将482例 NAs 药物治疗患者分为耐药组与非耐药组,以  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性和 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 为阳性标准,经  $\chi^2$  检验,耐药组与非耐药组间 ALT, HBeAg 及 HBV DNA 阳性患者所占比例差异有统计学意义( $P<0.05$ )。耐药组中  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性及 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 的患者所占比例均高于非耐

表4 各药物组生化指标比较

指 标	LAM	ADV	ETV	LAM+ADV	$\chi^2$	P
ALT	$\geq 40$ IU/L	42	28	5	8.710	0.033
	$<40$ IU/L	34	12	5		
HBeAg	+	40	31	4	10.843	0.013
	-	36	9	6		
HBV DNA	$\geq 2 \times 10^3$ IU/ml	50	35	6	11.602	0.009
	$<2 \times 10^3$ IU/ml	26	5	4		

经  $\chi^2$  检验,各对应的表型耐药药物的 ALT 值、HBeAg 阳性率及 HBV DNA 拷贝数之间患者所占比例差异有统计学意义( $P<0.05$ )。其中, LAM+ADV 组中  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性及 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 的患者所占比例显著高于其他组;其次依次为 ADV 组、LAM 组和 ETV 组。

3 讨论 由于 HBV 的复制是以易于错配的 RNA 介导的,因此它的复制过程中必然常发生碱基突变,这是一直以来难以攻克它的最主要原因。20 世纪中期, NAs 便已参与到慢性乙肝的治疗中来<sup>[3]</sup>,并有效地阻止了许多晚期肝病引起的肝功能障碍和肝硬化等严重疾病的进展<sup>[4,5]</sup>。该药通过与 HBV 逆转录酶基因区编码的蛋白位点相结合来阻止病毒复制,但此过程中发生了药物结合位点的错配时,药物与对应氨基酸结合力降低,便会导致病毒株对该药的耐受。在未更换药物的情况下,这些耐药菌株便会逐步替代野生株大量复制,最终治疗失败。

本研究通过对我院治疗的慢性乙肝患者体内 HBV 逆转录酶区基因检测,比较发生耐药与未发生耐药组血清 ALT, HBV DNA 载量的高、低水平和 HBeAg 阴、阳性患者所占比例的差异,探究耐药发生后对患者临床表现的影响,并按突变模式进行分类,讨论是否不同的耐药对患者影响不一致。

在这次研究检出的 144 例体内存在突变株的患者中,所涉及到最多的三条耐药通路与大多数研

药组。

表3 耐药组与非耐药组生化指标比较

指 标	耐药组	非耐药组	$\chi^2$	P
ALT	$\geq 40$ IU/L	83	7.433	0.006
	$<40$ IU/L	61		
HBeAg	+	90	44.908	$<0.01$
	-	54		
HBV DNA	$\geq 2 \times 10^3$ IU/ml	98	77.688	$<0.01$
	$<2 \times 10^3$ IU/ml	46		

2.5 耐药组内各对应的耐药药物组间生化指标的比较 见表4。将144例耐药患者按对应的表型耐药药物分组,以  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性和 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 为阳性标准。

究结果相符<sup>[6]</sup>,即 rtM204V/I 的 L-核苷酸通路、rtN236T 的无环磷酸酯通路和 rtA181T/V 的共享通路。其中 rtM204 的突变率最高(52.78%),这与 LAM 耐药屏障低且该药在我国长期使用有关。耐药发生率仅次于 LAM 的是 ADV(7.47%),该药物通常用于 LAM 耐药的患者的治疗,有数据显示,约有 50% 的患者在采用该治疗方案 1~2 年后会出现病毒学反跳并检测到 ADV 耐药株。rtA181(6.64%)和 rtN236(4.98%)是本次研究中出现频率最高的两个 ADV 耐药相关位点,与目前普遍认可的 ADV 耐药突变位点一致。ETV 是耐药屏障较高的一类 NA,其耐药途径是突变位点联合途径,需几种碱基突变同时发生,因此,本研究中所检测到的 ETV 耐药患者所占比例最低(1.66%)。此外,还有 18 例患者出现了多药耐药情况,通过病历资料了解到这几名患者均有两种或两种以上的 NA 药物服用史。

比较突变组与野生组患者血清学指标,我们发现突变组中  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性且 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 的患者所占比例更高,这表明已发生突变的患者肝功能损害更严重。HBeAg 阳性和 HBV DNA 高拷贝是病毒在肝脏中复制活跃的标志物,这两项指标的阳性率高亦显示突变组患者的肝脏受病毒侵害更严重,且较之野生组病毒更易传染给他人。

在不同的耐药组中,比较  $ALT \geq 40$  IU/L, HBeAg 阳性及 HBV DNA  $\geq 2 \times 10^3$  IU/ml 的患者

所占比例,发现联合突变组高于其他组,ADV组高于LAM组和ETV组,这与几类药物耐药屏障的高低有关,也与临床用药进程一致。耐药屏障最高的ETV耐药患者发生的病毒反跳弱于其他组。ADV作为LAM耐药患者的挽救治疗药物,当它发生耐药后,病毒的复制将更难抑制,这也提示我们,经验性加用或未经突变检测便滥用药物会引起治疗失败甚至无药可用<sup>[7]</sup>。

我们的研究对慢性乙肝患者服药NA药物后体内病毒的碱基突变状态作了统计,并将它们与临床生化指标的相关关系进行探究,了解到HBV RT基因突变与患者临床状态存在关联。这意味着乙肝病毒逆转录酶基因突变的检测对临床用药和患者临床状态的预测具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges[J]. Quarterly Journal of Medicine, 2012, 105(2): 109-113.
- [2] Tong MJ, Pan CQ, Hann HW, et al. The management of chronic hepatitis B in Asian Americans[J]. Diges-

tive Diseases and Sciences, 2011, 56(11): 3143-3162.

- [3] Devi U, Locarnini S. Hepatitis B antivirals and resistance[J]. Current Opinion in Virology, 2013, 3(5): 495-500.
- [4] Chen LP, Zhao J, Du Y, et al. Antiviral treatment to prevent chronic hepatitis B or C-related hepatocellular carcinoma[J]. World Journal Virology, 2012, 1(6): 174-183.
- [5] Fan J, Zhang Y, Xiong H, et al. Nucleotide analogue-resistant mutations in hepatitis B viral genomes found in hepatitis B patients[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(pt3): 663-670.
- [6] Michailidis E, Kirby KA, Havhiya a, et al. Antiviral therapies: Focus on hepatitis B reverse transcriptase[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2012, 44(7): 1060-1071.
- [7] 古丽娣, 张丹, 曾惠玲. 核苷(酸)类似物治疗引起乙肝病毒耐药相关基因位点突变的总结分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 122-123, 126.

Gu LD, Zhang D, Zeng HL. Summative analysis of drug resistance genetic mutation on nucleotide (acid) analog anti-HBV[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 122-123, 126.

收稿日期: 2016-01-18

修回日期: 2016-03-13

(上接 82 页)当 MMP-9 的表达特异性抑制时, Tat 处理可引起渗透性增强,可溶性闭锁蛋白浓度降低。

因此,本实验得出的结论是 Tat 通过增强 MMP 的表达和激活而间接破坏闭锁蛋白,从而破坏 BBB 的完整性,使 BBB 渗透性增强。

#### 参考文献:

- [1] Lin CJ, Chang YA, Lin YL, et al. Preclinical effects of honokiol on treating glioblastoma multiforme via G1 phase arrest and cell apoptosis[J]. Phytomedicine, 2016, 23(5): 517-527.
- [2] Wen J, Doerner J, Chalmers S, et al. B cell and/or autoantibody deficiency do not prevent neuropsychiatric disease in murine systemic lupus erythematosus[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 73.
- [3] Castro V, Bertrand L, Luethen M, et al. Occludin controls HIV transcription in brain pericytes via regulation of SIRT-1 activation[J]. FASEB J, 2016, 30(3): 1234-1246.
- [4] Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier[J]. FEBS J, 2015, 282(21): 4067-4079.
- [5] Wang Y, Jin S, Sonobe Y, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110024.
- [6] Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease[J]. Nature, 2014, 508(7494): 55-60.
- [7] Sardo L, Vakili PR, Elbezanti W, et al. The inhibition of microRNAs by HIV-1 Tat suppresses beta catenin activity in astrocytes[J]. Retrovirology, 2016, 13(1): 25.
- [8] Atluri Venkatas SR. Editorial: HIV and Illicit Drugs

of Abuse[J]. Front Microbiol, 2016(7): 221.

- [9] Nagel S, Heinemann PV, Heiland S, et al. Selective MMP-inhibition with Ro 28-2653 in acute experimental stroke—a magnetic resonance imaging efficacy study[J]. Brain Res, 2011, 1368(1): 264-270.
- [10] Huang W, Yang F, Li Y, et al. Anti-tumor effects in mice induced by Bcl-2 targeted siRNA delivered by TAT-g-CS vector[J]. J Control Release, 2015(213): e109-110.
- [11] Kaneai N, Sumitani K, Fukui K, et al. Tocotrienol improves learning and memory deficit of aged rats[J]. J Clin Biochem Nutr, 2016, 58(2): 114-121.
- [12] Alqahtani MF, Smith CM, Weiss SL, et al. Evaluation of new diagnostic biomarkers in pediatric sepsis: matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, mid-regional pro-atrial natriuretic peptide, and adipocyte fatty-acid binding protein[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153645.
- [13] Mieszalo K, fawicki S, Szmikowski M. The utility of metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in diagnostics of gynecological malignancies[J]. Pol Merkuri Lekarski, 2016, 40(237): 193-197.
- [14] Bae MJ, Karadeniz F, Lee SG, et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities by limonium tetragonum extract[J]. Prev Nutr Food Sci, 2016, 21(1): 38-43.
- [15] 李红霞, 国汉邦, 周伟燕, 等. 血清高、低密度脂蛋白胆固醇标准物质的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 10-13.

Li HX, Guo HB, Zhou WY, et al. Preparation of serum reference materials for high- and low- density lipoprotein cholesterol[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(4): 10-13.

收稿日期: 2016-05-01

修回日期: 2016-06-13