

## 南通地区乙型肝炎病毒 P 区耐药突变 与基因型及其临床意义\*

黄书明, 曹亚丽, 陈琳 (南通市第三人民医院, 江苏南通 226006)

**摘要:**目的 探讨南通地区乙型肝炎病毒 P 区耐药基因突变特征与基因型, 为临床合理用药提供科学依据。方法 选择 158 例经核苷(酸)类似物治疗至少 2 年以上慢性乙型肝炎(CHB)患者和 30 例未接受过核苷(酸)类似物治疗的 CHB 患者作为研究对象, 采用 PCR 产物直接测序法检测 HBV P 区耐药基因和基因型, 同时观察三种主要突变模式与 ALT 和 HBV DNA 水平的关系。结果 158 例 CHB 患者检出 B 基因型 42 例(26.58%), C 基因型 116 例(73.42%)。131 例发生 P 区不同位点突变, 突变率为 82.91%。共检出 11 个 HBV 突变位点, 主要突变位点是 M204I, L180M, M204V, A181V 和 A181T, 耐药频率依次为 41.14%, 37.34%, 22.15%, 11.39% 和 10.13%, 11 个突变位点有 21 种突变模式。拉米夫定(LAM)耐药相关突变中以 L180M 和 M204V 合并出现为主, 其次以 M204I 单独出现;阿德福韦酯(ADV)耐药相关突变中以 A181V 为主;恩替卡韦(ETV)耐药率较低。结论 南通地区 HBV 基因型以 B 和 C 型为主, C 型为优势基因型;耐药突变主要集中在拉米夫定和阿德福韦酯耐药相关的突变位点, 而恩替卡韦耐药率较低。多位点耐药突变检测有助于及时发现病毒耐药, 更好地指导临床治疗。

**关键词:** 肝炎病毒; 乙型; 基因型; 耐药突变

中图分类号: R512.62; Q754 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-103-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.028

## Drug Resistance Mutations and Genotypes of Hepatitis B Virus P in Nantong Area and Its Clinical Significance

HUANG Shu-ming, CAO Ya-li, CHEN Lin

(the Third People's Hospital of Nantong, Jiangsu Nantong 226006, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the mutation characteristics and genotype of hepatitis B virus resistance gene in Nantong area, and provide scientific basis for clinical rational drug. **Methods** A total of 158 cases of chronic hepatitis B (CHB) patients who were received with nucleos (T) ide analogues therapy for at least 2 years as the research object, and 30 cases of CHB patients who were not received nucleos (T) ide analogues for the treatment as the control group. PCR-sequencing method was used to detect the HBV P resistant gene and genotype, meanwhile, observe the relationship between three main mutation model and the levels of ALT and HBV DNA was also investigated. **Results** B genotype was detected in 42 (26.58%) out of 158 CHB patients, and 116 cases (73.42%) were C genotype. A total of 131 patients with different site mutations in P region, the mutation rate were 82.91%. There were totally 11 HBV mutation sites, including the main mutation site: M204I, L180M, M204V, A181V and A181T, the frequency of drug resistance were 41.14%, 37.34%, 22.15%, 11.39% and 10.13%, respectively. Moreover, 11 mutation sites had 21 mutation patterns. In lamivudine (LAM) resistance associated mutations, the L180M and M204V sites were mainly co-occurrence, followed by M204I alone. In adefovir dipivoxil (ADV) resistance associated mutations, A181V was the main mutation site. Whereas, the drug resistance rate of entecavir (ETV) was low. **Conclusion** The main genotypes of HBV were type B and C in Nantong area, and C type was the dominant genotype. The resistance mutations mainly concentrated in LAM and ADV resistance associated mutations, while the resistance rate of ETV was low. Multi-locus drug-resistant mutation detection may help to detect viral resistance and guide clinical treatment better.

**Keywords:** hepatitis B virus; genotype; drug resistance mutation; clinical significance

我国现有乙型肝炎病毒(HBV)感染者约 9 300 万人, 其中慢性乙型肝炎(CHB)患者约 2 000 万例<sup>[1]</sup>。核苷(酸)类似物(NA)是目前使用广泛的抗 HBV 药物, 其直接抑制 HBV-DNA 复制, 为 CHB 的治疗带来了突破性的进展, 长期给予一种抗病毒药物时可诱导或使已存在于准种群中的耐

药变异株获得选择性扩增, 产生基因或临床耐药性<sup>[2,3]</sup>。因此, 在 CHB 治疗过程中及时监测耐药突变显得尤为重要。我们采用 PCR 产物直接测序法对 158 例 CHB 患者的 HBV 基因型和 HBV-DNA P 区基因位点的耐药突变情况进行分析, 以期临床上更加合理使用 NA 提供参考。

\* 作者简介: 黄书明(1972-), 男, 副主任技师, Tel: 18912288899, E-mail: sanyuanhsm@163.com。

通讯作者: 曹亚丽(1981-), 女, 主管技师, Tel: 13962959002, E-mail: 873508805@qq.com。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2013年10月~2015年11月于南通市第三人民医院就诊的慢性乙型肝炎(CHB)患者158例,男性121例,女性37例,平均年龄 $46.0 \pm 10.8$ 岁。入选标准:①规范口服NA,疗程至少在2年以上;②患者开始NA治疗前不存在HBV P区耐药突变;③伴有或不伴有血清ALT升高;④排除并发其它肝炎病毒感染、酒精性肝炎等非病毒性肝炎、免疫性疾病及其它系统严重疾病;⑤排除NA治疗过程中患者依从性差而引起的HBV病毒学突破。另外选择30例未接受过NA治疗的CHB患者作为对照组,男性25例,女性5例,平均年龄 $40.4 \pm 15.1$ 岁。诊断符合中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》<sup>[4]</sup>。

1.2 试剂和仪器 本研究所需试剂为:北京鑫诺美迪股份有限公司提供的HBV P区耐药基因检测试剂盒;上海蓝怡科技有限公司提供的ALT检测试剂盒;上海科华生物工程股份有限公司提供的HBV DNA检测试剂盒。本研究所需仪器为:AU2700生化仪,ABI公司的7500荧光PCR仪及3130测序仪。

1.3 检测方法 抽取研究对象清晨空腹静脉血3 ml,分离血清,  $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。采用PCR产物直接测序法检测HBV基因型和HBV P区耐药突变核酸。HBV P区基因片段扩增引物:上游引物5'-GGACGGAAATTGCACCTGTATTC-3';下游引物5'-CCGCAAGAGCATATTGTACTG-3'。HBV P区基因片段扩增体系:上、下游PCR引物( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{l}$ ,热启动5 U/ $\mu\text{l}$  Taq酶 $0.2 \mu\text{l}$ ,dNTP $2.5 \text{ mmol/L}$   $2 \mu\text{l}$ ,  $10 \times \text{PCR}$ 反应缓冲液(含 $\text{Mg}^{2+}$ )  $2.5 \mu\text{l}$ ,去离子水补齐至 $20 \mu\text{l}$ ,最后加入提取的HBV核酸模板 $5 \mu\text{l}$ 。扩增条件为: $95^{\circ}\text{C}$  150 s,1个循环; $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s,35个循环; $72^{\circ}\text{C}$  10 min,1个循环。扩增产物利用DNA纯化试剂盒进行纯化、回收,然后利用ABI3130XL型遗传分析仪进行测序,通过Sequencing Analysis v5.4软件将测序结果与GenBank的标准序列比例,确定基因型和突变位点。采用IF-CC法检测血清ALT水平;采用PCR-荧光探针法检测HBV DNA载量;以上实验的操作过程均严格按试剂盒操作说明书进行。

1.4 统计学分析 采用SPSS16.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对各指标进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 基因型构成 158例患者共有B基因型42例(26.58%),C基因型116例(73.42%),未发现其他基因型。对照组30例患者共有B基因型7例(23.33%),C基因型23例(76.67%),未发现其他基因型。

2.2 耐药基因突变率 158例CHB患者中131例发生P区不同位点突变,突变率为82.91%。共检出11个HBV突变位点,主要突变位点是M204I, L180M, M204V, A181V, A181T, N236T,耐药频率依次为41.14%, 37.34%, 22.15%, 11.39%, 10.13%,其余位点突变比较少见,见图1。30例未接受过NA治疗的CHB患者中3例发生P区M204V, M204I和L180M位点突变,突变率为10.00%。

2.3 耐药基因突变模式 131例CHB患者发生P区的11个突变位点有21种突变模式。拉米夫定(LAM)耐药相关突变中以L180M和M204V合并出现为主,其次以M204I单独出现;阿德福韦酯(ADV)耐药相关突变中以A181V为主;恩替卡韦(ETV)的耐药率较低,大多发生于LAM耐药的患者,主要由T184G, M250V联合M204V, L180M突变,见表1。30例未接受过NA治疗的CHB患者发生P区的3个突变位点,突变模式有2种,分别为M204I和L180M+M204V。

表1 131例慢性乙型肝炎耐药位点突变情况

突变位点	n	阳性率(%)	相关药物
M204V	3	2.29	LAM
M204I	32	24.43	LAM
L180M+M204I	21	16.03	LAM
L180M+M204V	27	20.61	LAM
A181V	10	7.63	ADV
A181T	7	5.34	ADV
A181T+M204I	2	1.53	LAM ADV
A181V+M204I	2	1.53	LAM ADV
L180M+A181T+M204I	5	3.82	LAM ADV
L180M+S202G+M204V	3	2.29	LAM ETV
M204I+V207I	1	0.76	LAM ADV
A181T+V207L	1	0.76	ADV
A181V+N236T	5	3.82	ADV
N236T	3	2.29	ADV
L180M+T184G+M204V	2	1.53	LAM ETV
A181T+V207I+N236T	2	1.53	ADV
L180M	1	0.76	LAM
L180M+A181V+M204I+N236T	1	0.76	LAM ADV
A181T+T184G+M204I	1	0.76	LAM ETV
M204I+M250V	1	0.76	LAM ETV
T184G+M204I	1	0.76	LAM ETV

2.4 突变模式与 ALT 和 HBV DNA 水平相关性  
见表 2。发生突变的 131 例患者主要耐药突变模式为 L180M+ M204I(A 组),M204I(B 组)以及

L180M+ M204V(C 组),各组 ALT 和 HBV DNA 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 2 3 种主要耐药突变模式与 ALT 和 HBV DNA 水平的关系

项目	A 组( $n=21$ )	B 组( $n=32$ )	C 组( $n=27$ )	F 值	P 值
ALT(U/L)	135.50±22.78	113.10±30.47	149.80±39.53	0.325 5	0.722 9
HBV-DNA(log10,copies/ml)	5.41±0.21	5.67±0.26	5.61±0.32	0.367 9	0.693 2

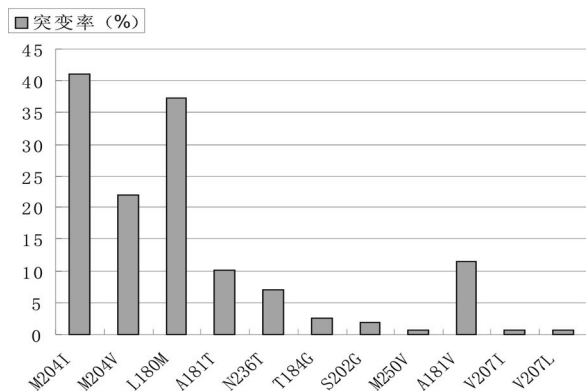


图 1 HBV P 区耐药相关位点的突变率

3 讨论 目前检测 HBV 基因突变的方法有很多,如 PCR 产物直接测序法、克隆测序法、基因芯片、PCR-RFLP 法及 NNO2LIPA 法等方法,而 PCR 产物直接测序“一直被认为是检测基因突变的金标准”<sup>[5,6]</sup>。其优点是便于对多个 NA 耐药位点进行分析,所得序列还可以用于基因型分析,并且费用低。

根据全基因组核苷酸序列差异 $\geq 8\%$ 或 S 基因序列差异 $\geq 4\%$ 可将 HBV 分为 A~I 等 9 个基因型。大量调查研究显示,基因型的分布具有明显的地域性差异,我国主要以 C 和 B 基因型感染为主,且北方以 C 基因型为主,南方以 B 基因型为主<sup>[7]</sup>。本研究发现南通地区 CHB 患者中最常见的基因型是 C 型(73.42%),其次是 B 基因型(26.58%),C 型为优势基因型。南通地区是我国乙型肝炎高发区,同时也是我国肝癌的高发区之一。通过对不同地区 HBV 基因型的流行特点进行动态研究可以跟踪 HBV 的流行趋势、耐药特点及变异情况,并为 HBV 的防治策略更新、新药研制及疫苗研发提供及时可靠的实验依据。研究表明对于 B 基因型,C 基因型患者肝组织炎症及纤维化程度较重,容易出现严重的肝损害和肝癌等不良预后<sup>[8]</sup>。因此,本研究确定南通地区慢性乙型肝炎患者的基因型能为临床病情分析及药物治疗疗效预测提供科学基础。

乙肝病毒属嗜肝 DNA 病毒,包含 C, S, X, P

四个开放阅读框(ORF),P 基因区是 4 个 ORF 中最长的读码框,编码 HBV 聚合酶,同时也是抗病毒药物的主要结合区域,该区域碱基发生突变,可导致药物结合能力下降,失去对病毒复制的抑制作用,从而产生耐药。HBV 是高变异的 DNA 病毒,这是由于一方面 HBV 的复制能力很强,每天可产生高达 1 012 个含有单一位点突变的 HBV-DNA,另一方面 HBV 的多聚酶/反转录酶缺乏校对活性<sup>[9]</sup>。由于 HBV 的高变异性,在感染者体内可能已经自然存在极少量的耐药病毒株。本研究结果显示,30 例未接受过 NA 治疗的 CHB 患者检出 P 区 3 个突变位点,突变率 10.00%,与文献报道结果接近<sup>[10]</sup>,突变模式有 2 种,分别为 M204I 和 L180M+ M204V。进一步说明 CHB 患者体内存在自然耐药病毒株,因此,CHB 患者在抗病毒治疗前应进行 HBV 基因突变检测。

目前大多数 CHB 患者为达到持续抑制病毒需要长期采用核苷(酸)类药物抗病毒治疗,它能抑制 HBV 复制中的逆转录过程,显著降低 HBV DNA 载量,但长期使用会引起 HBV P 区发生点突变并导致临床耐药。我国用于治疗慢性乙型肝炎的核苷(酸)类药物可以分为三类:L-构型核苷(拉米夫定、替比夫定)、无环核苷酸(阿德福韦酯)、D-构型核苷(恩替卡韦)<sup>[11]</sup>。与核苷(酸)类药物耐药相关的最主要三个突变通路为 M204V/I, N236T 和 A181V。204 位点突变主要作为 L-构型核苷药物的耐药突变通路位点,236 位点突变主要作为无环核苷药物的耐药突变通路位点,181 位点为两类药物共同的耐药突变通路位点。其它突变位点都作为补偿位点,或增加了对药物的耐药性或提高了突变株的复制能力<sup>[12,13]</sup>,单独出现并不会引起药物的敏感性下降。本文结果显示,NA 治疗慢性乙型肝炎可发生病毒耐药基因突变(突变率为 82.91%),且耐药突变位点(11 个)及模式(21 种)多样,药物间存在交叉耐药。比较发现恩替卡韦的耐药率较拉米夫定和阿德福韦酯低,这主要原因是其高基因屏障,同时需要多个位点的突变才能出现耐药<sup>[14]</sup>。进一步分析不同耐药突变模式与 ALT

和 HBV DNA 水平相关性,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

综上所述,慢性乙型肝炎患者在抗病毒治疗前进行 HBV 基因突变检测是非常有必要的,采用 PCR 产物直接测序法进行多位点耐药突变检测是最直接检测基因变异的方法,有助于及时发现病毒耐药,从而改变抗病毒药物盲目应用的现状,指导临床换用合理药物。

#### 参考文献:

- [1] 古丽娣,张 丹,曾惠玲.核苷(酸)类似物治疗引起乙肝病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.  
Gu LD, Zhang D, Zeng HL. Summative analysis of drug resistant genetic mutation on nucleoside(Acid) analog anti-HBV[J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(1): 122-123.
- [2] Strasfeld L, Chou S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications[J]. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24(2): 413-437.
- [3] 张 玲,吴昊鹤.核苷类似物耐药后乙型肝炎治疗的研究进展[J].临床医学,2011,31(1):104-105.  
Zhang L, Wu HH. Research progress of hepatitis B treatment about nucleoside analogues resistance later[J]. Clin Med, 2011, 31(1): 104-105.
- [4] 中华医学会肝病学会 中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华肝胆病杂志(电子版),2011,3(1):40-55.  
Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B (2010 version)[J]. Chinese Journal Hepatology(Electronic Version), 2011, 3(1): 40-55.
- [5] 徐东平.乙型肝炎病毒耐药的检测方法与临床意义[J].解放军医学杂志,2010, 35(6):611-613.  
Xu DP. Techniques and clinical significance of determination of drug resistance of hepatitis B virus[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2010, 35(6): 611-613.
- [6] 孔令和,高素香,柯云霞,等. PCR 产物直接测序检测乙型肝炎病毒耐药变异位点[J].南方医科大学学报,2012,32(2):277-279.  
Kong LH, Gao SX, Ke YX, et al. Clinical application of DNA sequencing for detecting point mutations in hepatitis B virus associated with drug resistance[J]. J South Med Univ, 2012, 32(2): 277-279.
- [7] 李晓东,李庆虹,李 进,等.华北地区 HBV 基因亚型特点及其与核苷(酸)类抗 HBV 药物耐药突变的关系[J].解放军医学杂志,2010,35(6):629-634.  
Li XD, Li QH, Li J, et al. Characteristics of HBV sub-genotypes in North China and their relationship with the mutation of anti-HBV nucleoside resistant analogs[J]. Med J Clin PLA, 2010, 35(6): 629-634.
- [8] 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):336-338,362.  
Yan NX, Huo JF, Lu F, et al. Analysis of HBV genotypes and mutation patterns of HBV P gene in Shijiazhuang region[J]. China Journal of Hospital Pharm J, 2015, 35(4): 336-338, 362.
- [9] Margeridon Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, et al. Ultra deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor(NRTI) treated patients and NRTI nave patients[J]. J Infect Dis, 2009, 199(9): 1275-1285.
- [10] 娄红梅,刘洪海.乙型肝炎病毒基因自然变异耐药性与 HBV DNA, HBeAg, ALT 及 AST 相关因素分析[J].广东医学,2012,33(9):1279-1281.  
Lou HM, Liu HH. Relationship between HBV polymerase gene pre-existing resistance mutation and HBV-DNA, HBeAg, ALT, AST [J]. Guangdong Medical Journal, 2012, 33(9): 1279-1281.
- [11] 王 莹,雷 君,许绿叶.乙型肝炎病毒多聚酶区耐药突变位点研究进展[J].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(23):10902-10904.  
Wang Y, Lei G, Xu LY. Research progress of the HBV drug-resistant mutations in the HBV polymerase region[J]. Chin J Clinicians(Electronic Edition), 2013, 7(23): 10902-10904.
- [12] 赵淑娟,薛 昀,秦玉花.核苷(酸)类似物耐药相关位点分析[J].中国医院药学杂志,2012,32(2):145-146.  
Zhao SJ, Xue Y, Qin YH. Analysis of drug resistance related sites of nucleoside (acid) analogues[J]. China Journal of Hospital Pharm, 2012, 32(2): 145-146.
- [13] 付丽娟,滕 旭,谷鸿喜.核苷(酸)类似物抗乙型肝炎耐药机制及临床策略[J].中国医药,2013,8(10):1513-1514.  
Fu LJ, Teng X, Gu HX. Drug resistance mechanism and clinical strategy of nucleoside (acid) analogues against hepatitis B[J]. China Medicine, 2013, 8(10): 1513-1514.
- [14] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1593-1608.