临床研究

山西地区61例乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测研究分析

王晓玲 任建平 王效红 高颖 杨少芳

作者单位:030012 太原市,山西省中医院检验科

【摘要】 目的 通过对山西省乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)P区基因测序的研究,探讨HBV基因变异位点及基因分型的分布规律。**方法** 采集61例HBV患者血清标本,采用双脱氧末端终止法对待检标本P区进行基因序列检测,用Chromas 2.23软件对测序结果进行分析,通过在NCBI网站进行序列比对,并进行基因分型。**结果** 53例受检患者均检测出P区的碱基以及氨基酸序列图,其中,有28例(52.8%)发生突变,突变位点分别有rt204、rt180、rt236、rt173、rt181、rt214、rt250、rt213、rt184、rt237;各突变的位点中,以rt204和rt180位点的突变比例最高,分别占67.9%和53.5%。2例为B基因型,阳性率为3.8%,其余51例均为C基因型,阳性率为96.2%。**结论** 山西省地区HBV分布以C基因型多见;发生变异的HBV病毒株中,10个变异位点均有涉及,但是仍以rt204位点突变为主,伴随其他位点突变,提示rt204位点可能存在顺式作用元件,在HBV DNA基因转录、翻译中起到调控作用。

【关键词】 P区基因测序;HBV基因变异;核苷类药物;rt204位点突变

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.010

Research on resistance mutations and genotype in 61 cases of hepatitis B virus of Shanxi Province

WANG Xiao-ling, REN Jian-ping, WANG Xiao-hong, et al. Department of Clinical Laboratory, Shanxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Tianyuan 030012, China

【Abstract】 Objective To discuss genovariation site and genotyping distribution of hepatitis B virus (HBV) in Shanxi Province by dectecting P area gene sequencing of the patients infected with HBV. **Methods** 61 HBV infected serum samples were collected. The genotyping of P area was detected by the dideoxymediated chain termination method. Sequencing results were analyzed by Chromas 2.23 software, and genotyping were done according NCBI. **Results** 53 patients all detected the bases and amino acid sequence of the P area. Among them, 28 cases (52.8%) given mutations, there were rt204, rt180, rt236, rt173, rt181, rt214, rt250, rt213, rt184 and rt237 mutations; The rt204 mutation accounts for 67.9% and rt180 mutation accounts for 53.5%, which were the two toppest mutation rate. 2 cases of B genotype, positive rate was 3.8%, and 51 cases for C genotype, positive rate was 96.2%. **Conclusion** In Shanxi Province the C genotype is most; 10 sites are all involved, but still with rt204 site mutation priority, along with other site mutations, which suggesting rt204 site may have the cis-acting element and make effect in gene transcription and translation of HBV DNA.

【Key words】 P area gene sequencing; HBV gene mutation; Nucleoside analogues; rt204 site mutation

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种DNA病毒,属于嗜肝DNA病毒科[1]。HBV DNA的长链有4个开放性阅读框,即S区、C区、P区和X区,其中,P基因编码DNA聚合酶[2,3]。随着抗病毒药物治疗的广泛开展,病毒变异和耐药株正在不断出现,病毒变异会引起HBV病毒持续感染,使肝癌的发生率明显升高。目前认为,HBV对核苷类似物耐药性的产生与HBV P基因(聚合酶区)变异有关,并且HBV基因变异是多位点的[4],如针对拉米夫定耐药的位点,就有包括YMDD在内的十几个位点,而一个YMDD位点,也会出现YIDD及YVDD两种突变类型,更棘手的是,目前发现的HBV基因型有8种,分别被命名为A到H型,其中各型HBV全基因核苷酸的差异为8%,这些基因型都拥有各自独特的序列插入和缺失,给病毒基因变异的分析带来了更大的挑战。

本文研究中,采用双脱氧末端终止法检测HBV-DNA耐药突变位点集中的P区,探讨HBV基

万方数据

因变异位点及基因分型的分布规律及特点，以便为临床提供更好的诊疗及判断预后依据，并有可能发现新的相关突变位点，以及提供病毒变异的流行病学资料。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2011 年 9 月-2012 年 5 月我院住院及门诊 HBV 患者 61 例,男 47 例,女 14 例,年龄 16~65 岁。诊断无临床症状 HBV 携带者 15 例,慢性肝炎 18 例,肝硬化 25 例,肝细胞肝癌 3 例。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI 公司 7300 荧光定量 PCR 仪，中山达安公司 DA7600 荧光定量 PCR 仪，中佳高速冷冻离心机，上海申友生物工程股份有限公司提供的 HBV 及耐药突变检测试剂盒，无水乙醇,0.1 M EDTA,ABI 公司提供的测序用试剂 BIG-DYE,10× BUFFER,POP 胶。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 模板提取 按照上海申友公司试剂盒说明书并参照文献[5,6]提取 HBV DNA:取 50 μl 浓缩液加到 0.5 ml 的离心管中，再加入 50 μl 的血清标本，以离心半径 4.5 cm,13 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入 40 μl 裂解缓冲液 100 ℃ 10 min,以相同条件离心 5 min,取上清液 4 μl 做 PCR。

1.3.2 HBV P 区 PCR 反应 按每个反应 PCR 反应液 20 μl,酶 1 μl,加入 4 μl 标本,42 ℃ 5 min, 94 ℃ 5 min;94 ℃ 7 s, 60 ℃ 50 s,45 个循环 (60 ℃采集荧光);37 ℃恒温。

1.3.3 PCR 产物酶解 分析荧光定量结果,HBV P 区测序标本浓度应≥ 5×10^3 IU/mL，对于反应结果 CT 值> 25 的取产物 3 μl,CT 值< 25 的取产物 1 μl,再加入 2 μl SAP 的混合物，混匀轻甩,37℃ 60 min,80 ℃ 15 min,最后 4 ℃保存。

1.3.4 测序反应 取酶解产物 3 μl，测序试剂(bigdye)1 μl 和测序引物 2 μl 轻甩,进行扩增,96 ℃ 1 min;96 ℃ 10 s, 50 ℃ 5 s, 60 ℃ 4 min, 25 个循环；最后 4 ℃恒温。

1.3.5 测序产物纯化 向每个反应管中加 15 μl 的无水乙醇,2 μl 的 0.1 M EDTA(pH= 8.0)混匀,轻甩液体到管底。避光静置 15 min,12 000 g 4 ℃离心 30 min,吸干上层液体;加入 70 μl 70%预冷乙醇,用手颠倒混匀,轻磕,12 000 g 4 ℃离心 15 min,吸干上层液体；加入 70 μl 70%预冷乙醇，用手颠倒混匀,轻磕,12 000 g 4 ℃离心 10 min,吸弃上层大部分液体，盖紧管盖再离心轻甩,用白枪头吸干净残余液体;打开管盖，放在生物安全柜里，通风让酒精室温挥发 3-5 min,加入 10~12 μl Hi-Di 溶解 DNA,用手轻弹管底以混匀,PCR 仪上 95 ℃ 4 min 变性,4 ℃保存，待上机。

1.3.6 ABI 3130xl 基因测序仪测序 打开桌面收集软件，新建样品表，采用 Rapid Seq36-POP7,Z-BigDyeV3,装载样品盘,与程序关联后点击 RUN,开始电泳。

1.3.7 测序结果分析 测序完成后，打开桌面下 Sequencing Analysis 软件，设置需要截取的序列范围,分析完成后,保存退出。

1.3.8 耐药突变位点检测 运行 Chromas 2.23 程序,File 菜单下的 Open，浏览到需要分析的测序文件,查找突变位点,并将结果记录在报告上,若没出现则可能前面的序列发生了移码突变、插入碱基等情形，需要对照标准序列将测序序列校正后返回本步骤重新分析[7]。

1.3.9 基因分型检测 所测序列可到 NCBI 网站比对分型,NCBI 网站主页:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/。

2 结果

2.1 P 区 PCR 结果 61 例标本中有 8 例 P 区扩增 CT 值大于 30,达不到测序浓度。

2.2 HBV DNA 测序结果 53 例受检患者均检测出 P 区的碱基以及氨基酸序列图，其中有 28 例(52.8%) 发生突变，突变位点分别有 rt204、rt180、rt236、rt173、rt181、rt214、rt250、rt213、rt184、rt237；产生突变的病毒株中,rt204 突变占 67.9%,rt180 突变占 53.5%,rt236 突变占 10.7%,rt173 突变占 3.6%,rt181 突变占 10.7%,rt214 突变占 7.1%,rt250 突变占 7.1%,rt213 突变占 3.6%,rt184 突变占 3.6%,rt237 突变占 7.1%。在产生突变的 28 例标本中,rt180、rt173、rt237 没有单独突变,均伴随 rt204 位点突变;其中,204 与 180 位点发生联合突变共 15 例,占到突变例数的 53.6%;rt213、rt214 则无伴随其他位点突变,仅发生单一位点突变;rt236、rt250 二者伴随突变 1 例，其余为单一位点突变;rt181 完全突变 2 例,伴随 rt204 位点突变 1 例;见表 1。

2.3 rt204、rt180 位点氨基酸突变情况 图 1 为 HBV 野生型;图 2 为 YIDD 突变株,105 号碱基由 G 突变为 T,使得该位点氨基酸由 M 转变为 I;图 3 为 YVDD 突变株,103 号碱基由 A 突变为 G,使得该位点氨基酸由 M 转变为 V；图 4 为 rt180 位点突变菌株,31 位碱基由 C 突变为 A,使得该位点氨基酸由 L 转变为 M。

万方数据

表 1　28 例 P 基因区耐药突变位点分布

突变位点	例数	突变碱基
204	3	M→I
204+180	12	204 M→I,M→V 180 L→M
204+180+173	1	204 M→I 180 L→M 173 V→L
204+180+237	2	204 M→I 180 L→M 237 P→H
204+181	1	204 M→I,M→V 181 A→T
181	2	A→V
236	2	N→T
236+250	1	236 N→T 250 M→V
250	1	250 M(+)→L(++)
214	2	V→A
213	1	S→T

2.4　HBV-DNA 基因型检测结果　将已测出的碱基序列在 NCBI 网站进行比对后，得到 53 例患者的 HBV DNA 基因型。在检测的 53 例标本中，2 例为 B 基因型，阳性率为 3.8%，其余 51 例均为 C 基因型，阳性率为 96.2%。

3　讨论

我国 70%的肝癌为 HBV 感染所致[8]。10%~30%的慢性乙肝患者经 10-30 年可发展为肝硬化，约 1%~5%的患者经 20-40 年会发展为肝癌。因此 HBV 的预防、诊断、治疗、预后及新药研制显得必要而迫切。通过对 HBV 基因的分析，可以得知患者是否需要接受抗病毒治疗，对药物疗效、发生耐药的风险进行评估和预测以及评估患者发生临床耐药的突发事件等[9,10]。

本文研究中，通过观察及检测 53 例 C 区高次方(大于等于 1×10^4)患者的 P 区基因序列及基因分型，更详尽的掌握了目前山西地区存在的 HBV 基因型及变异特点。研究中发现，山西省地区 HBV 分布以 C 基因型(96.2%)多见；突变株占到检测病毒株的 52.8%，意味着几乎一半以上的 HBV 发生变异，变异机制仍需进一步做深入研究，可能与药物诱导或 HBV 在压力筛选中已经产生了新的突变株有关；发生变异的 HBV 病毒株中，共涉及 10 个变异位点，变异范围分布几乎涵盖了核苷类似药物的所有相关位点，但是仍以 rt204 位点突变为主，提示 rt204 位点可能存在顺式作用元件，在 HBV DNA 序列的基因转录、翻译中起到调控作用[11]。本文研究中并未发现 rt180 单独突变病例，而是均伴随 rt204 位点突变，是否提示 rt180 位点突变更易导致 rt204 位点的突变，二者之间的变异是否存在协同或促进作用，或者 rt180 位点的单独突变并不导致病毒表型变异，不引起对核苷类似物的耐药，均有待进一步研究。阿德福韦酯耐药相关位点 rt236、rt181 位点发生突变例数少，但均为单独突变，提示阿德福韦酯耐药性的产生不同于拉米夫定，二者耐药位点不互相交叉；相

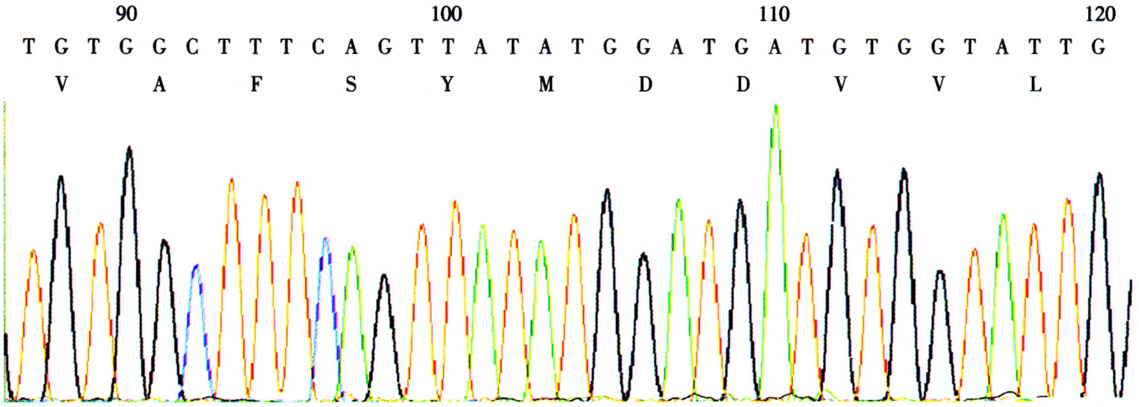

图 1　HBV DNA P 区基因野生型

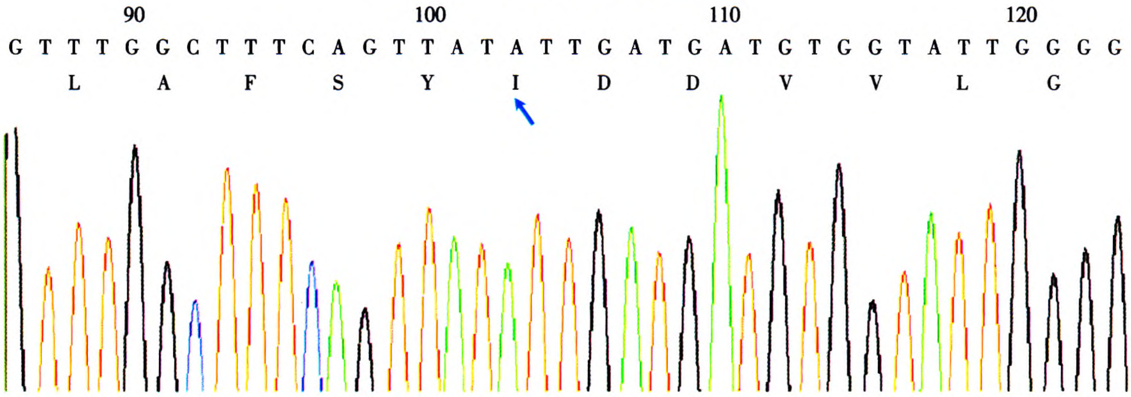

图 2　HBV DNA P 区基因 YIDD

万方数据

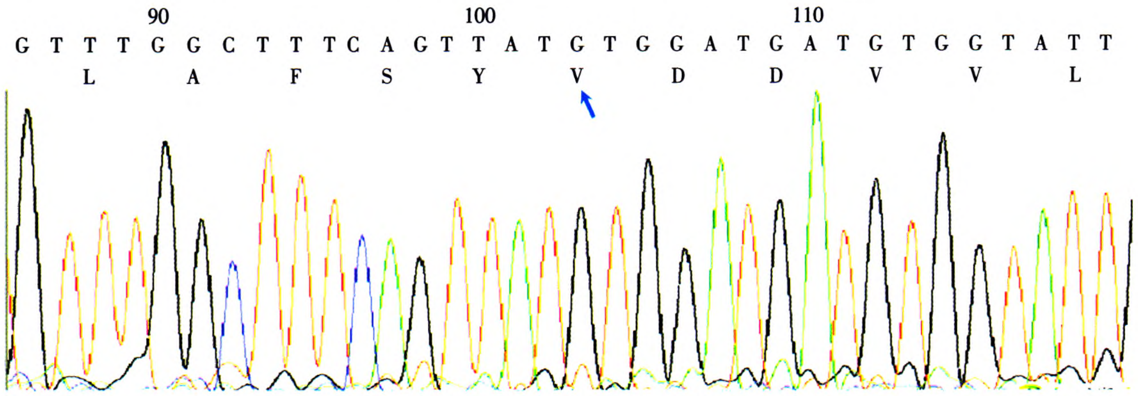

图 3 HBV DNA P 区基因 YVDD

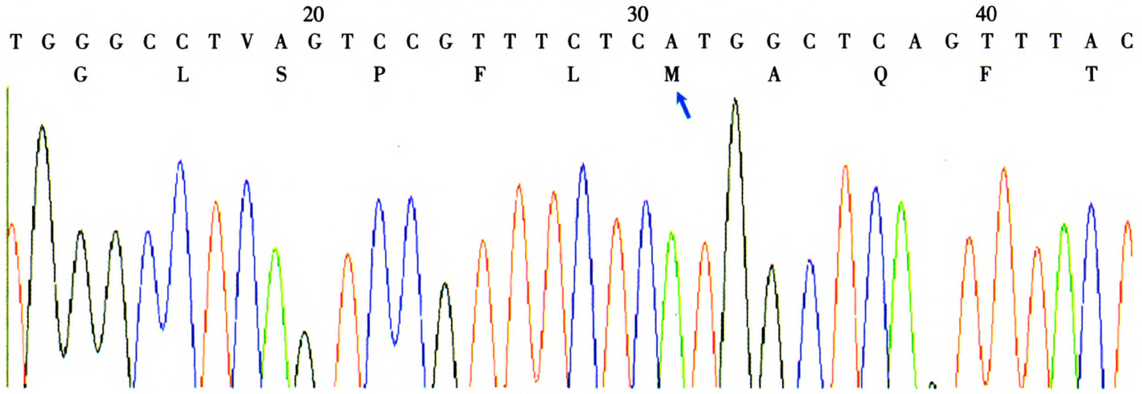

图 4 HBV DNA P 区基因 rt180 L(-)→M(+++)

关研究[12]表明,HBV 基因的联合突变可能导致病毒复制能力增强,而治疗过程中,不同的变异会先后出现,新的变异可能会替代先前的变异;这些基因突变对 HBV 患者治疗效果、预后以及转归等的影响仍需要我们做进一步的随访观察研究。

在长期使用核苷类似药物治疗慢性乙型肝炎的患者中,有部分患者体内出现了 HBV 变异株的优势生长,导致药物对 DNA 聚合酶的亲和力降低,抑制病毒复制的能力下降,导致病毒 DNA 反弹,患者机体细胞免疫增强,引起急性肝损伤,随着机体调节性免疫细胞启动,最终进展为肝硬化或肝癌[13]。因此,通过对慢性乙型肝炎患者核苷类药物耐药位点的分析, 进一步了解不同核苷类药物耐药机制以及产生耐药的先后次序, 从而能够为临床提供更详尽的诊疗依据,并能进一步节约医疗资源,减轻患者经济负担。

4 参考文献

1 何煦,江南. 拉米夫定耐药者乙肝病毒 P 基因区的突变分析. 四川大学学报(医学版),2007,38:895-896.

2 盛嘉. HBV 耐药性检测平台的构建. 上海:上海交通大学,2009,1-84.

3 单万水,徐六妹,吴驰. 基因芯片技术在乙肝病毒分型和耐药突变检测中的应用. 全国第 2 届中西医结合传染病学术会议暨国家中医药管理局第 1 届传染病协作组会议论文集,2008,203-206.

4 田德英,许东,邢铭友,等. 拉米夫定耐药与 HBV YMDD 变异关系的研究. 临床肝胆病杂志,2004,20:161-162.

5 邓少丽, 黄恒柳. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用. 重庆医学,2008,37:249-251.

6 朱长乐,赖仁胜. 病理基因测序技术介绍. 第四届全国肿瘤病理学诊断研讨会论文集,2006,221-222.

7 窦亚玲, 程歆琦, 李永哲, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 定量值与 HBeAg、抗-HBe 的相关性分析. 中华流行病学杂志,2006,27:709-711.

8 胡兴文,王维鹏,石祖亮. 血清中游离乙型肝炎病毒 DNA 检测分析. 中国实验诊断学,2010,14:555-557.

9 黄清蘅. 乙型肝炎病毒 DNA 载量与 HBeAg 及 ALT 联合检测的意义. 实用医学杂志,2011,27:4308-4310.

10 谢志贤, 谭爱国. 血清中乙型肝炎 5 项标志表现模式与乙型肝炎病毒-DNA 含量的关系. 中华医院感染学杂志,2002,12:81-83.

11 王金桃,赵宏光. 山西省原发性肝癌丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒感染状况分析. 中华流行病学杂志,1999,20:215-217.

12 邝家熙,甘红文,李榕娇,等. 原发性肝癌与 HBV、HCV 感染关系. 中国医药导报,2010,07:42-43.

13 利波,冯军,张娟,等. 乙型及丙型肝炎病毒感染与原发性肝癌的临床研究. 胃肠病学和肝病学杂志,2011,20:338-340.

(收稿日期:2012-12-30)

(本文编辑:杨军)

万方数据