

## 乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型研究

许建平, 钟国权(广东省河源市源城人民医院检验科 517000)

**【摘要】目的** 研究聚合酶链反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)检测乙型肝炎(下称乙肝)病毒核苷类药物耐药位点和基因型的可行性。**方法** 运用多重 LDR 和 PCR 原理,在乙肝病毒基因相关区域设计引物和探针检测突变位点和基因型。**结果** 156 例临床样本中,B 型占 60.90%(95/156),C 型占 37.20%(58/156),非 B 非 C 型占 1.90%(3/156)。此外共检出 56 例样本存在突变,其中拉米夫定耐药突变 41 例。**结论** 本研究显示拉米夫定耐药突变主要在 rtM204I/V 和 rtL180M,阿德福韦以 rtN236T/rtA181V 为主;恩替卡韦一般联合拉米夫定耐药,并且发生耐药突变以 B 型为多。

**【关键词】** 耐药; 突变; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)09-1240-03

Study on nucleoside analogue-resistant mutation and genotypes in hepatitis B virus XU Jian-ping, ZHONG Guo-quan (Department of Clinical Laboratory, Yuancheng People's Hospital, Heyuan, Guangdong 517000, China)

**【Abstract】Objective** To study the feasibility of PCR-LDR assay for detecting nucleoside analogue resistant loci and genotypes of hepatitis B virus (HBV). **Methods** The multiplex LDR and PCR principle was used to design primers and probes in the HBV related regions for detecting mutation loci and genotypes. **Results** 156 clinical samples, B type accounted for 60.90% (95/156), C type accounted for 37.20% (58/156); non-B non-C type accounted for 1.90% (3/156). Further 56 samples of mutations were detected, in which 41 cases were lamivudine-resistant mutations. **Conclusion** This study shows that lamivudine resistance mutations are mainly in rtM204I/V and rtL180M, adefovir resistance is dominated by rtN236T/rtA181V; entecavir plus lamivudine are resistant in general. And the occurrence of resistant mutations is mainly B-type.

**【Key words】** resistance; mutation; genotype

根据最新流行病学调查表明,我国乙型肝炎(下称乙肝)病毒(HBV)携带者达到 1 亿人左右,其中慢性乙肝患者超过 2 000 万人。HBV 持续感染与肝炎、肝硬化、肝癌的发生密切相关。目前,临床长期广泛使用核苷类药物,该类药长期使用,会使慢性乙肝患者体内 HBV 出现不同程度对核苷类药物耐药突变。此外,HBV 基因型是病毒长期变异进化的结果,不同基因型反映了 HBV 变异进化特点,并且与肝病临床表现、预后存在一定相关性。聚合酶链反应-连接酶检测反应(PCR-LDR)是一种最新的单核苷酸多态性(SNP)检测方法,PCR-LDR 可通过一次扩增检测产物中的多个突变位点<sup>[1-6]</sup>。本研究通过该方法检测 HBV 常见耐药突变和基因型,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究标本取自 2012 年 3 月至 2014 年 3 月广东省河源地区 156 例慢性乙肝患者,均符合 2000 年肝炎防治会议制定的诊断标准。其中男 98 例,女 58 例,年龄 26~69 岁,平均 46.5 岁。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 采集慢性乙型肝炎患者空腹不抗凝静脉血 5 mL,2 500 r/min 离心 10 min,分离血浆至专用血浆保存管,-20℃储存备用。

**1.2.2 DNA 提取** 使用 Qiagen DNA Mini Kit 试剂盒(德国),按照试剂说明书从 200 mL 血浆中提取血浆 HBV DNA。

**1.2.3 主要试剂** 乙肝耐药和分型检测试剂盒购自上海星耀

医学科技发展有限公司,其中 TaqDNA ligase 酶和 dNTP 来自上海英俊,Taq 酶来自大连宝生物公司。PCR 引物和 LDR 探针和序列见表 1。

**1.2.4 主要仪器** ABI3130 DNA 测序仪(美国 ABI 公司),MJ2000 PCR 仪(美国 Agilent 公司)。

**1.2.5 PCR 和 LDR 扩增体系和条件** PCR 扩增体积 50 μL 体系,包括 10 μL PCR 缓冲溶液,10 pmol 引物 2 μL,2 U DNA 聚合酶(TaKaRa),5 μL HBV DNA 模板,补充蒸馏水至 50 μL。PE9600 PCR 仪进行扩增,95℃ 4 min,94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 60 s,循环 40 次,然后 72℃ 延伸 10 min。LDR 反应 20 μL 体系,包括 2 μL PCR 缓冲溶液,3 μL PCR 扩增产物,1 U DNA 连接酶,补充蒸馏水至 20 μL 进行 LDR,95℃ 变性 2 min,95℃ 30 s 和 65℃ 2 min,循环 25 次。2.5 μL LDR 产品与上样缓冲液等体积混合。将混合物在 94℃ 持续 2 min 变性,急速冷冻。然后 ABI3130 DNA 测序仪电泳 30 min。结果采用 GeneMapper4.0 软件分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HBV 基因型结果** 156 例 HBV 基因型分别为:B 型 60.90%(94/156),C 型 37.20%(64/156),非 B 非 C 型 1.90%(3/156)。HBV 基因型以 B 型为主。在各基因型中均可检出耐药基因突变,基因型 B 型和 C 型中耐药基因突变差异无统计学意义( $\chi^2 = 4.157, P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 HBV 基因 PCR 引物和 LDR 探针序列

引物探针	序列(5'~3')	长度(bp)
Primer F	CTACCAGCACGGGACCATGC	575
Primer R	TACATGCATATAAAGGCATTGAGG	—
L180	P-GAGAAACGGACTGAGACCTACCTACCTACCTACCT-FAM	—
L180-M	ACCTACCACCTACCTACCTAGTAAACTAGACCAT	70
L180-W	ACCTACCTACCTACCTACCTAAAGTAAACTGAGCCA	72
M204	P-ATATAACTGAAAGCCACCTACCTACCTACCTACCTAA-FAM	—
M204-W	ACCTACCTACCTACCTACCTAAAATACCACATCATCC	74
M204-I	CCACCTACCTACCTACCTACCTACCTAAAATACCACATCATCA	78
M204-V	ACCTACCTACCTACCTAACCTACCTATACCACATCACCCAC	80
A181	P-CCAAGAGAAACGGACTGAGGCCACTCCCATAGGAATCTTGCG-FAM	—
A181-M	AGCCCTACGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAA	83
A181-W	AAAGCCCTACGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAG	85
N236	P-TCAAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGGTAATAGAGGTAA-FAM	—
N236-M	CCATGAAGTTAAGGGAGTAGCCCCAACGTTTGGTTTTATTAGGGG	86
N236-W	TCCCATGAAGTTAAGGGAGTAGCCCCAACGTTTGGTTTTATTAGGGT	87
T184	P-ACGGACTGACAAAAGACACACCTACCTACCCACCTACCTACCTAAC-FAM	—
T184-M	CCTGGACTGACAAAAGACACACCTACCTACCCACCTACCTACCTAAG	90
T184-W	ATTGGACTGACAAAAGACACACCTACCTACCCACCTACCTACCTAAGC	92
M250	AGAGAAACGGACTCCAAAGACAACCTATACCACACCACTCCCTGGTAAT-FAM	—
M250-M	TGCTGAAACGGACTCCAAAGACAACCTATACCACACCACTCCCTGGTAATC	93
M250-W	GCCTGAAACGGACTCCAAAGACAACCTATACCACACCACTCCCTGGTAATCGC	95

注：—表示无数据。

表 2 不同基因型核苷类药物耐药基因发生例数(n)

基因型	未突变	突变
B	55	39
C	48	16
非 B 非 C	2	1

**2.2 HBV 基因突变结果** 在 156 例样本中共 56 例检出耐药,占 33.98%(56/156)。4 种核苷类药物耐药基因检出率各异,41 例检出 rtM204I 及其混合突变,为拉米夫定(LAM)耐药,占 75.00%(42/56)。单一点突变 32.14(18/56),多耐药突变 67.86(38/56),其中检出 5 例拉米夫定/替比夫定(LDT)/阿德福韦(ADV)共同耐药。见表 3。

表 3 34 例不同核苷类药物耐药基因突变位点分析

突变位点	n	基因型	耐药物
rtM204I	8	6B/2C	LAM
rtM204V	15	9B/6C	LAM
rtA181V/T	6	4B/2C	ADV
rtN236T	3	2B/1C	ADV
rtA181T/rtN236T	2	B	ADV
rtL180M/rtM204V/rtS202I/rtT184G	2	1B/1 非 B 非 C	ADV/LAM/ETV
rtS202I/rtM204V/	1	B	ETV/LAM
rtT184G/rtM204V/rtT184G	2	B	ETV/LAM
rtL180M/rtM204I	12	8B/4C	LAM/LDT
rtM204V/rtA181T/rt N236T	4	B	LAM/ADV
rtM204I/I/rtL181M	1	B	LAM/ADV

注:ETV 为恩替卡韦。

**2.3 PCR-LDR 方法验证** 从 56 例 HBV 耐药变异样本中随

机挑选 20 例,PCR 扩增后送上海英俊公司测序,所得测序结果在 DNA star 软件上比对,19 例测序结果与 PCR-LDR 耐药变异一致,1 例测序结果没有变异,PCR-LDR 与金标法测序一致性为 95%。本方法通过检测丙型肝炎病毒样本、人巨细胞病毒样本等非 HBV 样本,所得结果均为阴性,特异性为 100%。

**3 讨 论**

对于 HBV 核苷酸类似物耐药的检测,欧美国家多采用 IN-NO-LIPA 方法,其灵敏度和特异性都比较高,但试剂盒非常昂贵,在我国尚难推广普及。目前国内检测 HBV 基因耐药变异的方法主要有以下几种,各有优缺点。实时 PCR 操作简便,可检测变异发生率低于 10%的耐药变异。缺点为仅能检测已知位点,同样难以实现一次进行多个耐药突变位点检测;同时,针对每个位点不同变异均需合成相应的探针。随着耐药位点增多,相应合成探针的费用增高。PCR 产物直接测序:PCR 产物直接测序法可检测已知和可能的未知耐药变异位点,是最常用的基因型耐药检测方法之一。PCR 产物直接测序的方法应作为基因型耐药检测的金标准,该方法的缺点是灵敏度较差,只有当变异株超过 HBV 准种池的 20%时才能被发现。

PCR-LDR 是一种新兴的单 SNP 分型检测方法。其原理是高温连接酶检测到模板 DNA 与 2 条探针 DNA 的接头处存在碱基错配,则连接反应不能进行;即如果探针与模板有 1 个碱基不配对,连接反应不能进行,如果探针与模板完全互补,连接反应完成。与其他检测技术相比,LDR 检测技术拥有准确度高、通用性强、通量大、操作简单、成本低等众多明显优势<sup>[6]</sup>。

本研究结果显示,河源地区 HBV 基因 B 型占 60.90%,C 型占 37.20%,非 B 非 C 型占 1.90%,与左兴等<sup>[7]</sup>广东地区 HBV 基因型(62.00%为 B 型,33.00%为 C 型)基本一致。LAM 耐药突变目前报道发现的与 LAM 相关的主要耐药突变有 rtM204V、rtM204I 和 rtL180M,其他突变位点有 rtL80V/I、rtI169T、rtV173L 等;ADV 相关的耐药突变多为多点突变,目前得到学界公认的主要耐药位点有 rtA181T、rtA181V 和

rtN236T;ETV 的耐药变异需要在 rtM204+rtL180 位突变的基础上,再联合 rtT184,rtS202,rtM250 和 rtI169 位点上一个或多个氨基酸突变;LDT 主要与 M204I 变异相关<sup>[8-12]</sup>。本研究结果显示,LAM 耐药突变主要在 rtM204I/V 和 rtL180M,LDT 耐药突变与 LAM 相同,没有检测到其他突变位点。ADV 以 rtN236T/rtA181V 为主;ETV 一般联合 LAM 耐药,并且发生耐药突变以 B 型为多。

本研究与金标法测序进行对比,二者一致性达到 95%,1 例 PCR-LDR 阳性样本测序阴性,通过第 3 种方法 RealTime-PCR 检测为阳性变异,通过相对定量估测其突变比率在 10% 左右,说明该样本测序阴性主要是灵敏度较低造成的。PCR-LDR 在检测丙型肝炎病毒、人巨细胞病毒等非 HBV 样本时均为阴性,特异性达到 100%。以上验证说明该方法的准确性和特异性均达到高值<sup>[9-10]</sup>。

目前报道了核苷类药物的一部分耐药位点,但新的耐药突变位点不断被发现,而目前应用于临床的、可全面反映基因耐药情况、有效指导临床药物选择的检测方法十分有限。本研究采用简便和快速的 PCR-LDR 检测 HBV 基因型和核苷类药物耐药基因突变位点,较现有方法具有明显优势。因此,在现有 HBV 基因耐药突变研究的基础上,建立起适合临床的全面检测 HBV 耐药突变的新技术,制订更加合理的抗病毒治疗方案,对可能耐药的患者进行相关耐药方面的检测,及时调整治疗方案,具有非常重要的临床意义。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
- [2] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华传染病杂志,2011,29(1):65-80.
- [3] 徐立中,谢金娜,彭运生.乙型肝炎病毒表面抗原与原发性肝癌的相关性分析[J].河北医学,2008,14(4):406-408.
- [4] 刘传苗,张欣欣,陆志檬.拉米夫定治疗中乙型肝炎病毒

YMDD 野毒株和变异株的变化[J].肝脏,2004,9(2):73-76.

- [5] 刘锦屏,刘友德,杨绍萍,等.烟台地区原发性肝癌患者乙型肝炎病毒基因型分析[J].中华保健医学杂志,2010,12(5):355-357.
- [6] 张智,张珍,李楠,等.185 例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测[J].广东医学,2008,29(1):97-98.
- [7] 左兴,谢奇峰,杨林,等.广东地区 HBV 基因型在家庭聚集感染中的分布及意义[J].中山大学学报:医学科学版,2009,30(S3):19-24.
- [8] Xiao Z, Xiao J, Jiang Y. A novel method based on ligase detection reaction for low abundant YIDD mutants detection in hepatitis B virus[J]. Hepatology Res, 2006, 34(3): 150-155.
- [9] Wang YZ, Xiao JH, Ruan LH, et al. Detection of the rtA181V/T and rt236T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil using a ligase detection reaction assay[J]. Clin Chim Acta, 2009, 408(1/2): 70-74.
- [10] Matetzky S, Sharir T, Domingo M, et al. Elevated troponin I level on admission is associated with adverse outcome of primary angioplasty in acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2000, 102(14): 161-166.
- [11] Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan[J]. Hepatology, 2001, 34(3): 590-594.
- [12] Krucoff MW, Johanson P, Baeza R, et al. Clinical utility of serial and continuous ST segment recovery assessment in patients with acute ST elevation myocardial infarction: assessing the dynamics of epicardial and myocardial reperfusion[J]. Circulation, 2004, 110(25): 533-539.

(收稿日期:2014-11-01 修回日期:2015-01-28)

(上接第 1239 页)

- [4] 佟世民,谭智怀,冯武,等.祛瘀舒筋汤联合针灸治疗腰椎间盘突出症术后神经根水肿 58 例[J].右江民族医学院学报,2013,35(4):553-554.
- [5] 陈胜利,唐凯.针刺配合中药熏蒸对腰椎间盘突出症术后疼痛及功能的影响[J].西南军医,2014,16(2):161-162.
- [6] 唐汉武,黄承军,覃智斌,等.电针治疗腰椎间盘突出症术后综合征的临床疗效观察[J].颈腰痛杂志,2013,34(3):256-257.
- [7] 张海英,徐华.护理干预对腰椎间盘突出症保守治疗效果的影响[J].现代医学,2014,51(6):684-686.
- [8] 张照亮.护理干预对微创介入镇痛术治疗腰椎间盘突出症疼痛的疗效分析[J].贵阳中医学院学报,2013,35(3):300-302.

- [9] 田庆海.分期疗法治疗腰椎间盘突出症的临床观察[J].中国实用神经疾病杂志,2011,14(15):70-71.
- [10] 司志军,王树海,石蛟,等.腰椎间盘突出症并马尾神经损伤综合征诊治分析[J].中国实用神经疾病杂志,2013,16(7):51-53.
- [11] Zhang Y, Ma Y, Jiang J, et al. Treatment of the lumbar disc herniation with intradiscal and intraforaminal injection of oxygen-ozone[J]. J Back Musculoskelet Rehabil, 2013, 26(3): 317-322.
- [12] Baek SW, Kim C, Han C. Intradural schwannoma complicated by lumbar disc herniation at the same level: A case report and review of the literature[J]. Oncol Lett, 2014, 8(2): 936-938.

(收稿日期:2014-10-11 修回日期:2015-01-15)