

· 基础论著 ·

乙型肝炎患者 HBV 基因型与核苷(酸)类似物耐药变异的关系

刘映霞 位兴辉 罗志雄 李红梅

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因型与核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中耐药变异发生的关系。**方法** 采用荧光定量聚合酶链反应(PCR) DNA 测序方法,进行 HBV 基因分型,同时检测拉米夫定、阿德福韦酯和恩替卡韦特异耐药变异位点。**结果** 在湖南 128 例拉米夫定治疗患者中,HBV 基因型 B 为 107 例,占 83.6%;基因型 C 为 21 例,占 16.4%,未发现基因型 A、D、E、F、G、H 型。总的耐药变异发生率 48.4% (62/128),发生在 12、24 和 36 个月者分别为 4.7% (6/128)、16.4% (21/128)、42.9% (55/128),随治疗时间延长,变异发生率增加($P < 0.01$)。基因型 B、C 感染发生 YMDD 突变率分别为 49.5% 和 42.9%,无显著差异($P > 0.05$),但 YMDD 变异类型在两基因型中不同,基因型 B、C 发生 YVDD 变异分别为 64.2% (34/53) 和 0.0% ($P < 0.01$),YIDD 变异分别为 22.6% (12/53) 和 88.9% (8/9), $P < 0.01$ 。阿德福韦酯和恩替卡韦治疗一年尚未检测到耐药变异,45 例经阿德福韦酯治疗 24 月时变异发生率为 4.4% (2/45),变异率在 B、C 基因型患者中分别为 0% (0/38) 和 28.6% (2/7),变异型均为 N236T。**结论** 基因型 B 为湖南省的优势基因型,HBV 基因型对核苷(酸)类似物抗病毒治疗反应有一定的影响。

【关键词】 HBV 基因型;拉米夫定;阿德福韦酯;恩替卡韦

The relationship between nucleos(t)ide analogues resistance mutants and HBV genotypes LIU Ying-xia, WEI Xing-hui, LUO Zhi-xiong, LI Hong-mei, Infectious Disease Department, First Affiliated Hospital, Nanhua University, Hengyang 421001, China

Corresponding author: yingxialiu@hotmail.com

【Abstract】 Objective The aim of this study is to investigate the relationship between hepatitis B virus (HBV) drug-resistance mutants and its genotypes during nucleos(t)ide analogues therapy. **Methods** HBV genotypes, lamivudine, adefovir dipivoxil and entecavir resistance mutants were determined by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequence analysis. **Results** Of 128

基金项目:国家教委留学回国人员基金和湖南省自然科学基金(06jj4106)

作者单位:421001 湖南衡阳,南华大学附属第一医院感染科

通讯作者:刘映霞 Email: yingxialiu@hotmail.com

patients treated with lamivudine, 107 were genotype B (83.6%), 21 were genotype C (16.4%). Genotype A, D, E, F, G, H were not detected. The study demonstrated that the total mutation rate was 48.4% (62/128), 49.5% for genotype B, 42.9% for genotype C, respectively, which did not showed significant difference between genotype B and C. The mutation rates were 4.7% (6/128), 16.4% (21/128) and 42.9% (55/128) in 12, 24 and 36 months of lamivudine therapy, respectively ($P < 0.01$). There was a significant difference in the tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) mutation types between genotype B and C. YVDD mutation rates were 64.2% (34/53) vs 0 in genotype B and C, respectively ($P < 0.01$). YIDD mutation rates were 22.6% (12/53) vs 88.9% (8/9), respectively ($P < 0.01$). No mutation was found in patients treated with adefovir dipivoxil or entecavir for one year. The mutation rate was 4.4% (2/45) in 45 patients with adefovir dipivoxil therapy for 24 months, which is 0% (0/38) vs 28.6% (2/7) in genotype B and C, respectively ($P < 0.01$). All mutation types are N236T mutants. **Conclusions** These results indicate that genotype B is the major genotype in Hunan, and HBV genotypes are associated with the effect of nucleoside analogues therapy in some way.

【Key words】 HBV genotype; Lamivudine; Adefovir dipivoxil; Entecavir

乙型肝炎病毒(HBV)是导致肝脏疾病的主要致病因子,全世界已有近4亿人成为慢性HBV携带者,其中75%的感染发生在亚洲并作为慢性肝炎、肝硬化、肝癌的主要原因^[1]。拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦和替比夫定是目前公认抗病毒治疗有效的核苷(酸)类似物,但在长期抗病毒治疗中,HBV出现HBV P基因区耐药变异是临床应关注的问题。由于病毒变异与疾病进程存在一定的关系,因而对HBV异质性研究成为近年热点^[2]。根据HBV全基因序列异质性 $\geq 8\%$,或S基因序列异质性 $\geq 4\%$ 的标准,可将其分为8种不同的基因型A~H^[3,4]。据报道HBV基因型存在一定的地理区域性分布,我们的前期工作也显示基因型与临床结局有某些关联性^[5,6],其与抗病毒耐药变异的关系值得深入研究。本研究应用PCR-DNA测序技术,同时检测拉米夫定、阿德福韦酯和恩替卡韦特异耐药变异位点,调查湖南省HBV基因型分布,探讨基因型与核苷(酸)类似物抗病毒治疗中耐药变异之间的关系。

资料与方法

一、标本来源及治疗方法

128例慢性乙型肝炎为我院2003年1月至2007年1月门诊和住院患者,诊断符合2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准^[7]。其中男108例,女20例,年龄17~66岁,平均(39 \pm 12)岁;基因B型感染107例(83.6%),基因C型感染21例(16.4%)。所有患者血清HBV DNA水平高于 10^4 拷贝/ml, ALT水平高于80 U/L。所有患者口服拉米夫定0.1/d,疗程8~48个月,

发生变异后改服阿德福韦酯(贺维力)10 mg/d,疗程24~26个月,或改用恩替卡韦1.0 mg/d,疗程12个月。均未用过其他抗病毒药物。采集外周血存于-70℃备用。

二、材料和方法

1. 血清标志物检测:HBsAg、HBeAg检测应用ELISA法,按试剂盒(购自北京万泰生物公司)说明进行操作。应用荧光定量PCR仪(MJ OPTICON2, USA)进行HBV DNA检测。

2. HBV基因分型:采用改良的PCR-DNA测序方法。按试剂盒说明提取DNA,在PCR热循环仪上设定如下程序:37℃ 2 min, 95℃ 5 min 保温,在下列条件下进行PCR扩增40次循环:(1)95℃ 10 s;(2)60℃ 30 s,并在PCR循环第2步60℃时收集荧光信号。应用遗传分析仪(ABI 310, 3100 Avant, 3100等)进行序列分析。

3. YMDD及阿德福韦酯特异变异检测:采用改良的PCR-DNA测序方法,能同时检测YMDD、阿德福韦酯及恩替卡韦特异变异位点。rt M204I/V/S位置处氨基酸出现缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)或丝氨酸(S),则已产生了耐药突变;若仅为甲硫氨酸(M),则判定为野生型。rt L180M位置处氨基酸出现甲硫氨酸(M),则已产生了耐药突变;若仅为亮氨酸(L),则判定为野生型。若rt N236T位置处氨基酸出现苏氨酸(T),则已产生了耐药突变;若仅为天冬酰胺(N),则判定为野生型。若rt A181V/T位置处氨基酸出现缬氨酸(V)或苏氨酸(T),则已产生了耐药突变;若仅为丙氨酸(A),则判定为野生型。若rt Q215S位置处氨基酸出现丝氨酸(S),则已产生了耐药突变;若仅为谷氨酰胺(Q),则判定为野生型。测序在上海申友公司完成。

三、统计学处理

组间均数比较用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验,血清HBV DNA载量、ALT水平、年龄均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均在计算机中经SPSS 10.0统计软件处理。

结 果

一、慢性乙型肝炎患者的临床资料及基因型分布

在128例患者中,感染HBV基因型B有107例,占83.6%,基因型C有21例,占16.4%,未发现基因型A、D、E、F、G、H存在。HBeAg阳性率、血清HBV DNA水平在两组基因型感染人群中无显著差异,不同年龄和性别与HBV基因型无明显关系。虽基因型C组ALT水平高于基因型B组,但无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

二、拉米夫定、阿德福韦酯及恩替卡韦特异耐药变异的检出情况

128例慢性乙型肝炎患者中检出YMDD结构位点变异者62例,占48.4%。其中基因型B为53例(49.5%),基因型C为9例(42.9%)。12个月内检出者6例(0.9%),最早于治疗后8个月检出,均为基因型B感染。绝大多数YMDD变

异发生在治疗后 14~36 个月(49/62),其中 88.9% (8/9) 的基因型 C 和 58.5% (41/53) 基因型 B 感染在此阶段出现 YMDD 变异。12、24 和 36 个月变异发生率分别为 4.7% (6/128)、16.4% (21/128)、42.9% (55/128),随治疗时间延长,变异发生率增加 ($P < 0.01$)。45 例出现 YMDD 变异后改为阿德福韦酯治疗的患者,其中基因型 B 为 38 例,基因型 C 为 7 例,在治疗 12~15 个月时进行变异检测,未发现阿德福韦酯特异耐药变异。在治疗 24 个月时变异发生率为 4.4% (2/45),变异率在 B、C 基因型患者中分别为 0% (0/38) 和 28.6% (2/7),差异有显著性 ($P < 0.01$),变异型均为 N236T。8 例出现 YMDD 变异后改用恩替卡韦治疗的患者,其中基因型 B 7 例,基因型 C 1 例,在治疗 12 个月时未检测到恩替卡韦特异耐药变异。但有 1 例基因型 C 感染者经拉米夫定治疗后出现 YMDD 伴随变异(L180M),在未用阿德福韦酯治疗情况下检测出 A181T 变异,后者属于阿德福韦酯特异耐药变异位点。

三、基因型与 YMDD 变异发生的关系

从表 2 可见,基因型 B、C 感染发生 YMDD 突变率无显著差异 ($P > 0.05$),但 YMDD 变异类型在两基因型者中不同,基因型 B 发生 YVDD 变异达 64.2% (34/53),YIDD 变异达 22.6% (12/53),同时出现两种变异者达 11.3% (6/53),1 例仅出现 L180M 变异。基因型 C 无 1 例发生 YVDD 变异,YIDD 变异达 88.9% (8/9),未发现 YVDD 和 YIDD 两者联合变异,但有 1 例出现 YSDD 变异。基因型 B 发生 YVDD 变异率明显高于基因型 C, $P < 0.001$,而基因型 C 发生 YIDD 变异率显著高于基因型 B, $P < 0.001$ (表 3)。

表 1 128 例患者临床特征及 HBV 基因型分布

基因型	例数(阳性率)	男/女	年龄(岁)	ALT(U/L)	HBeAg(+)(例)	HBV DNA (10^6 拷贝/ml)
B	107(83.6)	98/9	38.3 ± 12.2	219.4 ± 110.7	71	11.8 ± 9.2
C	21(16.4)	18/3	39.1 ± 14.0	261.4 ± 196.0	13	10.3 ± 10.1
总计	128 (100.0)	116/12	38.7 ± 13.0	231.8 ± 156.0	84	11.1 ± 9.4

表 2 62 例慢性乙型肝炎患者 YMDD 变异率及变异型(例)

基因型	例数	YVDD	M + V	YIDD	M + I	I + V + M	M/S	变异率(%)
B	53	6	28	9	3	6	1	49.5
C	9	0	0	4	4	0	1	42.9
总计	62	0	28	13	7	6	2	48.4

注:M 代表 L180 变异,S 代表 YSDD 变异

表 3 基因型 B、C 和 HBV YMDD 变异型之间的关系[例(%)]

基因型	例数	YVDD (V + M)	YIDD (I + M)	M/S	I + V + M
B	53	34(64.2)	12(22.6)	1(1.9)	6(11.3)
C	9	0(0.0)	8(88.9)*	1(11.1)	0(0.0)
总计	62	34(64.2)	20(32.3)	2(3.2)	6(11.3)

注:与基因型 B 组同指标相比,* $P < 0.01$

讨 论

HBV 感染呈地理区域性分布,在东亚地区慢性 HBV 感染者中以基因型 B、C 为主,但各地报道其优势基因型存在一定的差异。本研究应用一种能有效分辨出所有基因型的 PCR-测序方法,调查了湖南省 128 例慢性 HBV 感染者基因型分布,发现以基因型 B 为主,占 83.6% (107/128),基因型 C 占 16.4% (21/128),未发现其他基因型存在,这与我们先前的报道一致^[5]。ALT 水平、HBeAg 阳性率、血清 HBV DNA 水平在两组基因型感染人群中无显著差异,不同年龄和性别与 HBV 基因型无明显关系。本组病例并未发现基因型 B、C 与疾病进展有显著差异,可能与病例选择有关,我们选择的均是慢性乙型肝炎,排除了慢性携带者和重型肝炎。

乙型肝炎抗病毒治疗的应答受宿主及病毒因素的影响。近来乙型肝炎病毒基因型对乙型肝炎抗病毒及免疫调节治疗的应答及转归的影响已经日益引起重视^[8-10]。本文应用荧光定量 PCR-DNA 测序方法,能同时进行 HBV 基因分型、检测 YMDD 和阿德福韦酯及恩替卡韦耐药特异变异。优点是简单、方便、准确。拉米夫定、阿德福韦酯和恩替卡韦是 3 种有效的核苷(酸)类抗病毒药物,拉米夫定因其高疗效和轻微的不良反应而广泛应用于慢性乙型肝炎的治疗。阿德福韦酯对耐拉米夫定病毒株和 HBeAg 阴性患者有显著的疗效^[11,12]。恩替卡韦抗病毒作用强、见效快,但对耐拉米夫定者需倍量使用。近年研究显示,不同 HBV 基因型慢性乙型肝炎使用干扰素、拉米夫定抗病毒的疗效是有差别的。Akuta 等报道了 B 基因型应用拉米夫定持久有效者要显著优于 C 基因型^[13],基因型对抗病毒疗效的影响是与耐药变异的发生密切相关的。Paik 等报道早期检出 YMDD 变异者 3 年拉米夫定治疗后 HBeAg 转阴率和病毒反弹分别为 12.5%、75.0%,而野生株感染 HBeAg 转阴率和病毒反弹分别为 57.4%、14.3%,提示早期 HBV YMDD 变异检测对拉米夫定抗病毒长期疗效有预测作用^[14]。也有报道认为基因型与抗病毒治疗效果无明显关系^[15]。本文研究表明,拉米夫定耐药变异最早于治疗后 8 个月即可发生,变异发生率随治疗时间延长而增加,12、24 和 36 个月变异发生率分别为 4.7%、16.4% 和 42.9%。基因型 B、C 感染发生 YMDD 突变率无显著差异,分别为 49.5%、42.9% ($P < 0.01$),但 YMDD 变异类型在两基因型者中不同。基因型 B 以发生 YVDD 变异为主,达 64.2%,基因型 C 无 1 例发生 YVDD 变异。基因型 C 以 YIDD 变异为主,达 88.9%,而基因型 B 发生 YIDD 变异率仅 22.6%,后者同时出现 YVDD + YIDD 两种变异者达 11.3%,1 例仅出现 L180M 变异。基因型 C 有 1 例出现 YSDD 变异。

rt N236T 和 rt A181V/T 突变是阿德福韦酯耐药特异变异^[16],45 例改用阿德福韦酯治疗者 12 个月时未发现变异,24 个月时仅 2 例出现 N236T 变异,变异率明显低于拉米夫定,提示阿德福韦酯为拉米夫定耐药者良好的选择。本实验提示阿德福韦酯耐药特异变异者均为基因型 C 感染,是否基因型 C 感染应用阿德福韦酯疗效较基因型 B 差,有待在更大标本量人群中验证。但 1 例基因型 C 感染

者经拉米夫定治疗后除出现拉米夫定耐药变异 L180M 外,在未用阿德福韦酯治疗的情况下检测出 A181T 变异。这提示可能存在原发耐阿德福韦酯变异株,如果假设成立,通过此联合耐药检测,可预知疗效差的抗病毒治疗,并据此指导抗病毒药物选择。故对慢性乙型肝炎患者,在使用抗病毒药物前进行基因型和耐药变异检测,可能对抗病毒治疗结果有较好的预测作用。

参 考 文 献

- 1 Merican I, Guan R, Amarapukaa D, et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol*,2000, 15:1356-1361.
- 2 刘映霞,胡国龄,谭德明,等. 乙型肝炎病毒 S 区准种与疾病活动性关系的研究. *中华传染病杂志*,2002,20:282-286.
- 3 Stuvver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*,2000,81:67-74.
- 4 Alvarado-Esquivel C, Sablon E, Conde-Gonzalez CJ, et al. Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. *World J Gastroenterol*,2006,12:6540-6545.
- 5 刘映霞,胡国龄,谭德明,等. 湖南省乙型肝炎病毒基因型分布及临床意义. *湖南医科大学学报*,2002,27:29-31.
- 6 Liaw YF, Sollano JD. Factors influencing liver disease progression in chronic hepatitis B. *Liver Int*,2006,26 Suppl 2:23-29.
- 7 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志*,2001,19:56-62.
- 8 Chien RN, Lin CY, Yeh CT. Hepatitis B virus genotype B is associated with better response to thymosine alpha1 therapy than genotype C. *J Viral Hepat*,2006,13:845-850.
- 9 Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S. Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy. *Clin Lab*,2006,52:43-47.
- 10 Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int*,2005,25:1097-1107.
- 11 Lampertico P, Vigano M, Manenti E, et al. Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology*,2005,42:1414-1419.
- 12 Fung SK, Fontana RJ. Management of drug-resistant chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis*,2006,10:275-302.
- 13 Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother*, 2005,55:139-142.
- 14 Paik YH, Han KH, Hong SP, et al. The clinical impact of early detection of the YMDD mutant on the outcomes of long-term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*,2006,11:447-455.
- 15 Zalewska M, Domagala M, Simon K, et al. Hepatitis B virus genotypes and the response to lamivudine therapy. *Pol Arch Med Wewn*,2005,114:1190-1199.
- 16 Osioy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, et al. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2). *J Clin Microbiol*,2006,44:1994-1997.

(收稿日期:2007-01-12)

(本文编辑:孙凤霞)