

乙型肝炎病毒核苷(酸)药物耐药变异检测技术研究进展

闫杰(首都医科大学北京地坛医院 内三科, 北京 100015)

新型核苷(酸)药物的出现为抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗提供了新的手段。该类药物具有迅速抑制HBV复制,口服给药,服用方便,良好的耐受性,较干扰素 α (IFN- α)经济等优点,已成为继IFN- α 之后的又一类用于HBV抗病毒治疗的一线药物。目前已经在我国上市的核苷(酸)类药物有拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LdT)。该类药物为逆转录酶抑制剂,可抑制HBV复制,但对细胞核内的HBV ccc DNA无直接抑制作用,故很难彻底清除患者体内的HBV。加之HBV DNA聚合酶缺乏校正功能,患者体内的HBV以准种状态存在,随着用药时间的延长,在核苷(酸)类药物的选择压力下,耐药变异病毒株逐渐成为优势株,从而影响疗效。因此耐药变异便成为核苷(酸)类药物长期应用的最大障碍。本文拟就HBV核苷(酸)类药物耐药的常见位点以及常用基因型耐药(genotypic resistance)检测技术作以综述。

1 HBV核苷(酸)药物耐药变异位点的命名方法

已知核苷(酸)药物耐药变异均发生在HBV聚合酶基因(pol)上。HBV pol可分为4个功能区:终端蛋白、间隔区、逆转录酶区及RNase H区。逆转录酶区包含7个功能保守序列(A~G),其中A、C、D区为逆转录酶与三磷酸核苷结合的结合域,B、E区为RNA模板和引物定

位域。目前临床应用的核苷(酸)类药物主要靶点位于逆转录酶RT区的B及C区,故而耐药变异亦多位于B区和C区内。HBV耐药变异以国际通行的氨基酸单字母加变异位点来标记。例如,YMDD代表逆转录酶区的4个氨基酸残基(酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸),其中的蛋氨酸(M)变为亮氨酸(V)或异亮氨酸(I)则会引起拉米夫定耐药。起初HBV耐药变异的位置是从HBV pol的第一个氨基酸数起,由于HBV 8个基因型的HBV pol长短不同,以不同HBV基因型为参照,同一耐药变异所处的位点不同。例如YMDD变异曾被报道成M552V、M550V、M539V等不同命名。为避免混乱,Stuyver等^[1]提议将HBV耐药变异统一从逆转录酶区(各基因型均为344个氨基酸残基)的第一个氨基酸数起并加前缀rt(例如YMDD变异被命名为rtM204V)。

2 常见耐药变异位点

2.1 与拉米夫定耐药相关的变异 LAM的耐药性与HBV逆转录酶C区的YMDD基序相关。在LAM的治疗过程中,可选择性地出现逆转录酶基因变异,主要包括C区的rtM204I/V/S和B区的rtL180M。rtM204I变异可单独发生,而rtM204V和rtM204S变异的发生常伴有B区或A区的其他变异^[2]。rtL180M + rtM204V、rtL180M + rtM204I、rtV173L + rtL180M + rtM204V和rtM204I是LAM耐药变异的主要组合方式^[3]。此外尚可伴随出现rtL80I、rtI169T、rtA181T、rtT184S、rtQ215S等变异位点。

2.2 与阿德福韦酯耐药相关的变异 ADV耐药与

基金项目:首都医学发展科研基金项目(2002-3046)

通讯作者:闫杰 Email: jieyan@bbn.cn

逆转录酶B区rtA181T和D区N236T变异有关^[4]。有研究显示,位于C、D间区的rtV214A或rtQ215S及两点的联合变异也与此药耐药相关^[5]。HBV的聚合酶基因区变异可使该药的半数抑制浓度(IC₅₀)增加3~8倍,并且可导致ADV与替诺福韦酯(TDF)出现交叉耐药。引起ADV耐药的rtN236T变异株并不影响病毒对LAM的敏感性,但rtA181T/V、rtV214A、rtQ215S变异株可同时导致LAM的交叉耐药。新近有研究发现:3例出现LAM耐药患者初次应用ADV时即出现临床耐药,但对TDF敏感;测序分析及体外试验证实三者体内均存在rtI233V HBV变异株^[6]。其后对GenBank收录的HBV序列分析时发现,500个序列中有3个发生该变异且均为C基因型(我国常见基因型为B型及C型)。

2.3 与恩替卡韦耐药相关的变异 目前研究结果显示,产生ETV耐药性的先决条件是需要有LAM耐药变异(rtM204I/V/S ± rtL180M)的存在。在此基础上rtI169T、rtT184A/G/I/S、rtS202G/I或rtM250V等变异的出现可形成对ETV的耐药性^[7]。体外试验显示:在未出现LAM耐药时,rtM250V可使该药的IC₅₀提高9倍,而rtT184G + rtS202I并无耐药性^[8]。

2.4 与替比夫定耐药相关的变异 在一项III期全球注册(GLOBE)试验中,接受LdT治疗治疗52周的HBeAg阳性和HBeAg阴性患者血清中HBV DNA水平≥1000拷贝/ml的比例分别为(34%)和19/227(8%)。基因型分析发现:治疗超过16周、HBV DNA仍高于检出限的患者体内HBV出现一个或多个氨基酸替换(rtM204I、rtL80I/V、rtA181T、rtL180M、rtL229W/V)的比例在HBeAg阳性和HBeAg阴性患者中分别是49/103和12/12。在上述变异位点中rtM204I最为常见且与病毒学反跳明显相关。

3 常用基因型耐药检测技术

3.1 位点特异性引物PCR 位点特异性引物仅与特异突变序列结合,可特异地扩增出突变株。但每对引物只能检测一种突变,且反应条件不易控制,存

在非特异扩增的可能,因此很难应用于临床检测。

3.2 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)^[9] 将待测的DNA片段经PCR扩增后用限制性内切酶酶切,以识别并切割特异的序列,将酶切后的产物进行电泳,根据DNA片段的大小来判断目的基因是否具有特异性序列。该方法具有灵敏、特异、简便等优点,曾被国内外众多实验室广泛应用于LAM耐药变异检测工作中,我们曾建立了基于该技术的ADV耐药变异检测方法^[10,11]。然而PCR-RFLP只能检测单点突变,仅用于少数耐药变异位点监测时尚不失为一种简便、快速、廉价的方法。但随着多种核苷(酸)类药物的相继问世和HBV耐药变异位点的不断出现,该方法便难以胜任了。

3.3 线性探针 将多条探针^[12]分别固定在固相杂交膜的不同位置,每条探针用来检测一种突变序列;然后与HBV聚合酶的基因扩增产物杂交。控制反应条件,使不同突变序列与相应探针结合,根据结合的位置不同来判读突变情况。基于该技术的INNO-LiPA方法在国外已获准应用于临床检测。该方法经PCR扩增后杂交,敏感度好,可检测变异株大于10%的低滴度样品,尚具有提供信息量大、自动化程度高等优点;但试剂价格昂贵,国内尚未获准临床应用许可。

3.4 肽核酸-PCR(PNA-PCR) PNA是一种核酸类似物,它的骨架为肽键链,碱基连在骨架链上的氮原子上^[13]。寡聚PNA可以与单链核酸模板结合,但不能作为引物引导DNA的合成。寡聚PNA结合力较普通寡核苷酸强,退火温度(T_m)比普通寡核苷酸高50%,但如果出现错配,则结合力迅速下降。设计位于PCR引物上游的寡聚PNA作为阻遏物,在模板为野生株时,寡聚PNA与模板完全配对,不能发生PCR反应;当模板为变异株时,寡聚PNA与模板出现错配,结合力迅速下降,失去阻遏作用,使PCR反应得以进行。该方法操作简便,敏感性高,可以从10⁵~10⁹个野生型拷贝中检测到0.01%~0.001%(10~10 000)突变拷贝,有望成为新的HBV耐药变异检测方法。该

方法主要缺点是仅能检测有无耐药变异,不能获得突变部位的基因序列信息。

3.5 荧光定量PCR熔解曲线分析法 该方法基于Lightcycler或Taqman杂交双探针技术;除常规的一对引物外,PCR反应体系中另加有两个能与PCR产物杂交的荧光标记探针,所设计的探针跨过待检测的已知突变位点^[14]。在PCR扩增过程中,通过熔解曲线分析来测定Tm值,最终根据突变株的Tm值低于野生株的Tm值而检测耐药突变的有无。该方法的灵敏度低,且仅能检测单点变异,使其推广受到限制。

3.6 基因芯片技术 基因芯片(gene chip)亦称DNA芯片(DNA chip)、DNA微阵列(DNA microarray),其技术路线是:先将众多探针集成于一张芯片上,从血清样本中提取的病毒DNA经体外扩增后,与芯片探针杂交,再根据杂交信号应用计算机软件自动判读HBV变异情况^[15]。该方法具有快速、高效、敏感、平行化、自动化等优点,但因成本昂贵,目前尚难以应用于临床常规检测工作。

3.7 基因序列测定 以往因为基因序列测定过程复杂、成本高,未能用于临床检测。随着自动测序仪器的普及和PCR产物直接测序技术的成熟,目前该技术已日趋简便、稳定,可准确测序600~800 bp,试剂成本亦降至每个测序反应10元左右(每个测序反应的国内市场价格约50元),故而现已具备应用于临床检测的条件。在美国,基于该技术的HIV耐药变异检测系统已经FDA批准用于临床检测^[16]。目前已知的针对核苷(酸)类药物的HBV耐药变异位点均集中于HBV逆转录酶A~E区,全长549 bp,所以应用PCR产物直接测序技术检测HBV耐药变异不仅可通过一次实验检测全部已知耐药变异位点,而且尚能了解HBV逆转录酶其他位点的变异情况,有助于发现新的耐药变异位点。如能在此基础上,建立HBV基因耐药数据库并编制专用基因序列分析软件,对测序结果进行自动化分析,则有望开发商品化的临床检测试剂盒。

参考文献

- [1] Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, et al. Nomenclature for antiviral resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region[J]. Hepatology,2001,33:751-757.
- [2] Delancy WE 4th, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation[J]. Antivir Chem Chemother,2001,12:1-35.
- [3] Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D[J]. Hepatology,2004,39:42-50.
- [4] Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with development of a novel mutation in the HBV polymerase[J]. Gastroenterology,2003,125:292-297.
- [5] Bartholomeusz A, Locarnini S, Ayres A, et al. Molecular modeling of hepatitis B virus polymerase and adefovir resistance identifies three clusters of mutations[J]. Hepatology,2004,40:246A.
- [6] Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir[J]. N Engl J Med,2006,354:1807-1812.
- [7] Colonna R, Rose R, Levine S, et al. Entecavir two year resistance update: no resistance observed in nucleoside naive patients and low frequency resistance emergence in lamivudine refractory patients[J]. Hepatology,2005,42(suppl 1):A962.
- [8] Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. J Clin Virol,2005,34(suppl 1):S125-S129.
- [9] Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy[J]. Hepatology,1998,27:1711-1716.
- [10] 闫杰, 谢雯, 王磊, 等. 应用巢式聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术检测乙型肝炎病毒阿德福韦耐药变异-rtN236T变异[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2006,15:236-238.
- [11] 闫杰, 谢雯, 王磊, 等. ntPCR-RFLP检测HBV阿德福韦耐药变异-rtA181V变异[J]. 世界华人消化杂志,2006,14:714-717.
- [12] Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy[J]. J Clin Microbiol,2000,38:702-707.
- [13] Ohishi W, Chayama K. Rare quasispecies in the YMDD motif of hepatitis B virus detected by polymerase chain reaction with peptide nucleic acid clamping[J]. Intervirology,2003,46:355-361.
- [14] Whalley SA, Brown D, Teo CG, et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the Lightcycler[J]. J Clin Microbiol,2001,39:1456-1459.
- [15] Jeong H, Mong C, Hyung HK, et al. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. J Korean Med Sci,2004,19:541-546.
- [16] Eshleman SH, Hackett J Jr, Swanson P, et al. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains[J]. J Clin Microbiol,2004,42:2711-2717.