



**广西医科大学**  
Guangxi Medical University

# **广西地区慢性丙型肝炎患者NS5A、NS5B抑制剂 天然耐药突变的研究**

**广西医科大学第一附属医院**

**苏明华 阳光 伍菲菲 江建宁 张怀东 周奕 李林蔓  
江梦凤 黄锦妮 梁丹丹 刘志红 韦麒**



- ◆ **直接抗病毒药物（DAA）是治疗HCV感染的新选择，其在抗病毒过程中具有高SVR率，泛基因型谱，疗程短，不良反应少，患者依从性好和禁忌症少等优点。**
- ◆ **随着DAA在临床的应用，部分患者会出现耐药相关突变（RAV），而有些RAV可以显著降低DAA的疗效。**



- ◆ 甚至还有部分患者在抗病毒治疗前，其体内就已经存在大量的HCV准株，这些准株可能携带了针对某一 DAA 药物的耐药基因，即患者存在天然耐药突变。
- ◆ 2019EASL数据显示：29%的初治患者存在基线RAS
- ◆ 目前DAAs主要包括NS3/4A蛋白酶抑制剂、NS5A抑制剂和NS5B聚合酶抑制剂，其中NS5B抑制剂的耐药屏障是相对较高的。

广西地区慢性丙型肝炎患者针对NS5A、NS5B抑制剂的天然耐药突变情况？





**探讨广西地区未进行抗病毒治疗的慢性丙型肝炎患者NS5A、NS5B抑制剂天然耐药突变的情况**



## 1. 研究对象的选择

### 入选标准：

- (1) 丙型肝炎的诊断符合2015年《丙肝防治指南（2015更新版）》诊断标准；
- (2) 患者此次就诊前均未进行抗病毒治疗；

### 排除标准：

- (1) 哺乳期或妊娠期妇女和儿童；
- (2) 合并其他肝炎重叠感染；
- (3) 合并代谢性肝病、自身免疫性肝炎、酒精性肝病；
- (4) 合并HIV感染者；
- (5) 伴有肾功能不全、严重心肺疾病等；



## 1.研究对象的选择

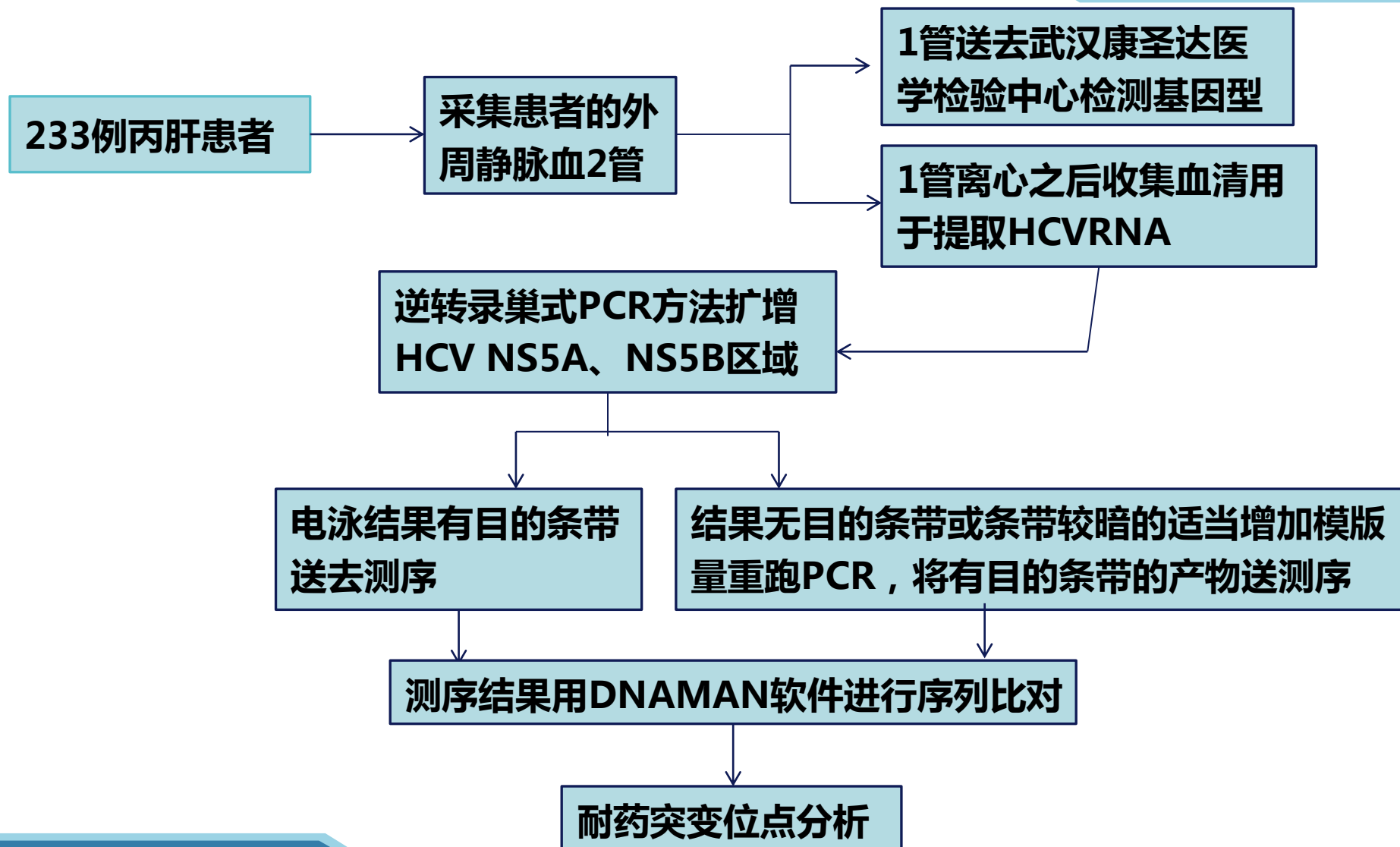
按入选标准和排除标准本研究共纳入**223**例患者

期中**213**例患者成功扩增**NS5A**区并测序成功

**126**例患者成功扩增**NS5B**区并测序成功



## 2.实验路线图





# 结果1--NS5A区

## 1.1 研究对象的一般资料

本研究共入选**233例**患者，有**214例**患者样本扩增并测序成功NS5A区，其中慢性丙型肝炎患者**191例**，肝硬化患者**23例**。基因1a型**19例**，基因1b型**100例**，基因3a型**23例**，基因3b型**30例**，基因6a型**42例**。各个基因型的一般资料如下表

变量	1a (n=19)	1b (n=100)	3a (n=23)	3b (n=30)	6a (n=42)	F值	P值
男/女	11/8	50/50	12/11	18/12	24/18	0.401	0.801
平均年龄 (岁)	42.4±8.7	47.1±12.6	43.9±9.7	42.7±9.6	45.0±12.1	1.343	0.255
ALT (U/L)	83.9±49.6	73.1±62.0	100.2±82.4	90.0±71.6	84.0±65.2	1.008	0.404
AST (U/L)	60.1±42.4	69.4±63.6	88.1±76.0	77.7±52.9	63.4±41.1	0.960	0.430
HCVRNA(Ig, copies/mL)	6.2±0.7	6.6±0.8	6.6±1.2	6.5±0.7	6.6±1.0	0.958	0.431





## 1.2电泳结果图

图2-1

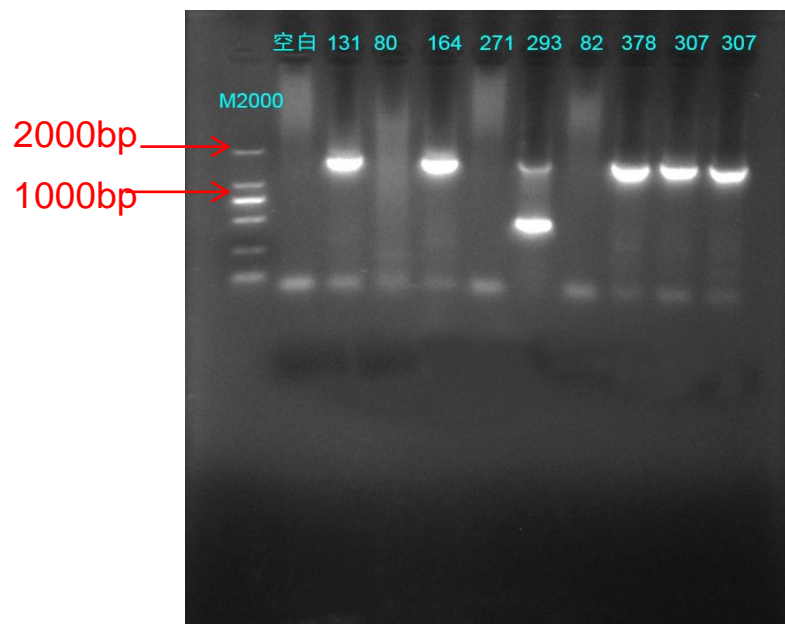


图2-1为**基因1a型**部分样本第二轮PCR产物电泳结果图，最左侧为maker，从左至右第一个孔道为空白对照，部分样本在**1500bp**处有目的条带。

图2-2

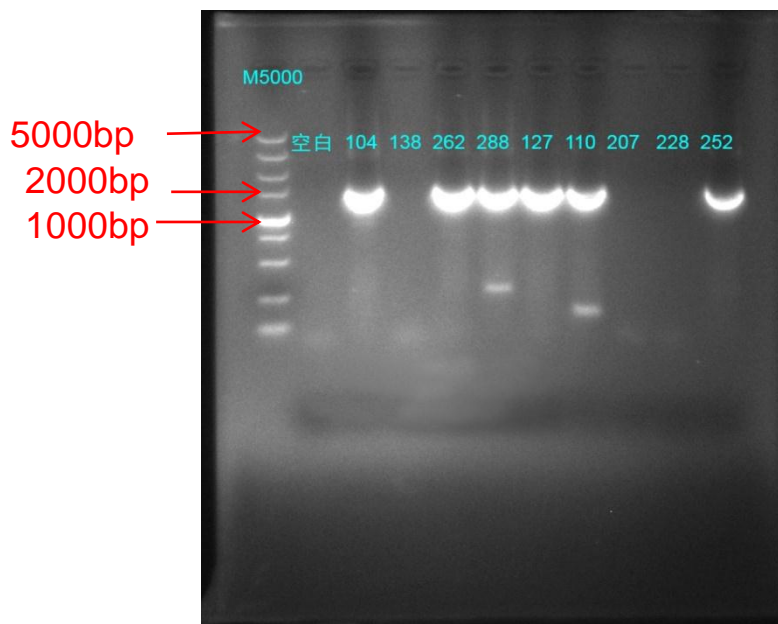


图2-2为**基因3a/b型**部分样本第二轮PCR产物电泳结果图，最左侧为maker，从左至右第一个孔道为空白对照，部分样本在**1300bp**处有目的条带。



## 1.2电泳结果图

图2-4

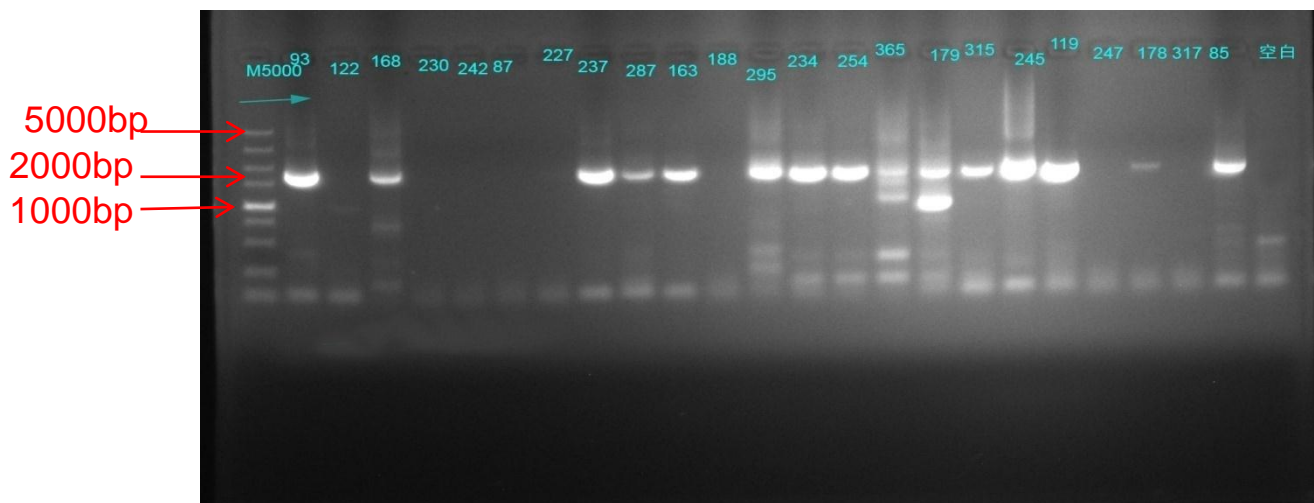


图2-4为**基因6a型**部分样本第二轮PCR产物电泳结果图，最左侧为maker，从左至右最右边孔道为空白对照，部分样本在**1600bp**处有目的条带。

## 1.3 序列结果比对图

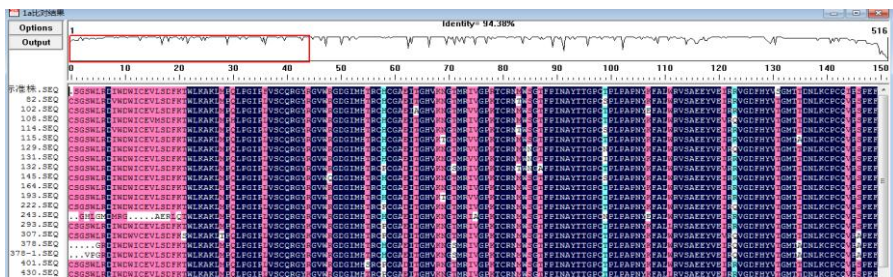


图3-1为基因1a型的序列结果比对图，标准株为HCV1a型（AF009606.1）

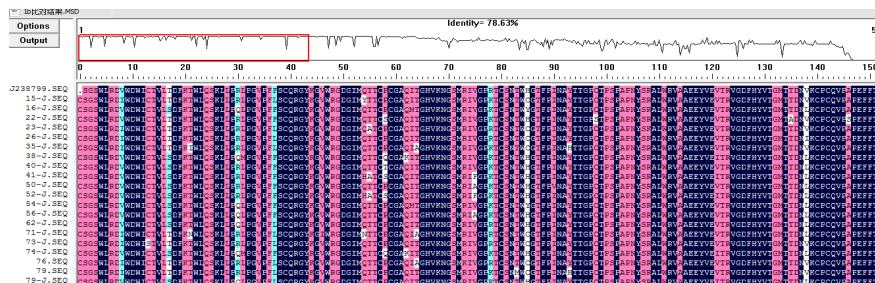


图3-2为基因1b型的序列结果比对图，标准株为HCV1b型（AJ238799.1）

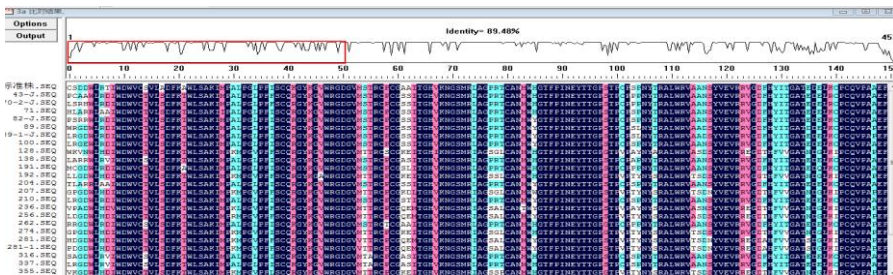


图3-3为基因3a型的序列结果比对图，标准株为HCV3a型（D17763.1）



图3-4为基因3b型的序列结果比对图，标准株为HCV3b型（JQ065709.1）



## 1.4-1 基因1型患者相关位点突变情况

NS5A区域相关位点突变	GT1a ( n=19 ) ( % )	GT1b ( n=100 ) ( % )
Q30H	1 ( 5.3 )	-
R30Q	-	23 ( 23.0 )
Q54H	-	5 ( 9.0 )
H58P	1 ( 5.3 )	-
P58S	-	4 ( 4.0 )
Y93H	-	6 ( 6.0 )
M28T+H58P	1 ( 5.3 )	-
H58P+E62D	4 ( 21.0 )	-
Q54H+ P58S	-	2 ( 2.0 )
L31M+ R30Q	-	2 ( 2.0 )
Q54H+ R30Q	-	4 ( 4.0 )
合计	7 ( 36.8 )	46 ( 46.0 )



## 1.4-2 基因3型患者相关位点突变情况

NS5A区域相关位点突变	GT3a ( n=23 ) ( % )	GT3b ( n=30 ) ( % )
M28L	-	1 ( 3.3 )
K30A	-	1 ( 3.3 )
A30K	2 ( 8.7 )	-
M31L	-	3 ( 10.0 )
L31M	1 ( 4.3 )	-
T54A	-	4 ( 13.3 )
A30R+L31M	6 ( 26.0 )	-
K30A+M31L	-	1 ( 3.3 )
合计	9 ( 39.1 )	10 ( 33.3 )

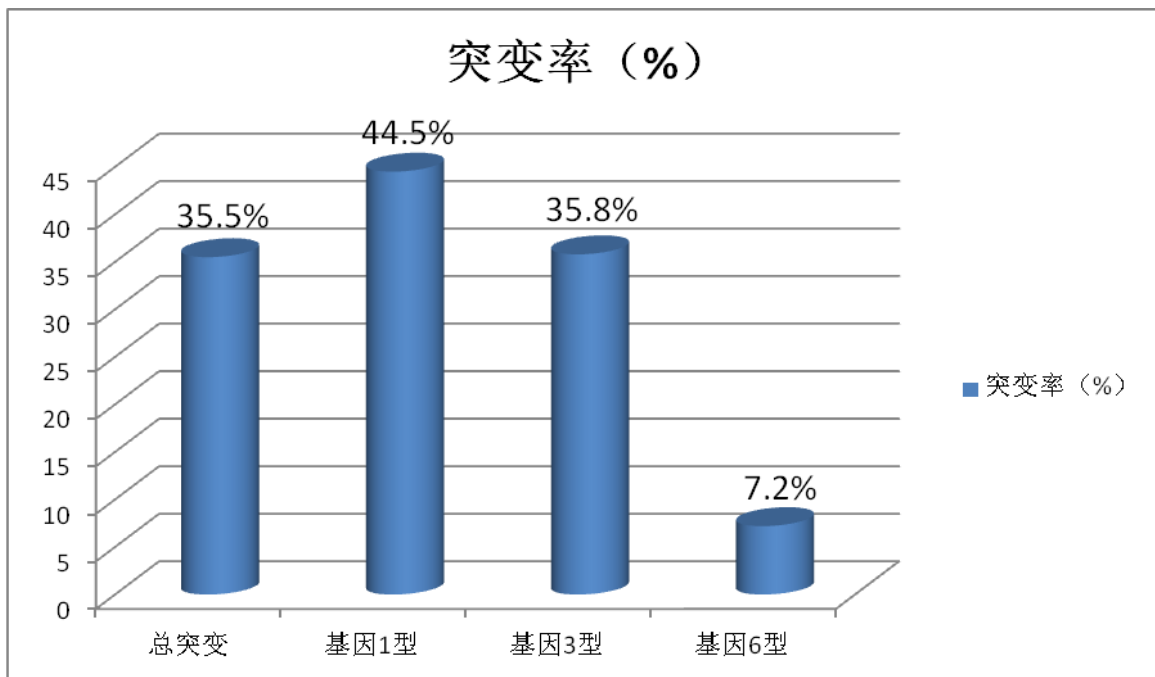


## 1.4-3 基因6型患者相关位点突变情况

NS5A区域相关位点突变	GT6a ( n=42 ) ( % )
<b>F28V</b>	<b>1 ( 2.4 )</b>
<b>T58P</b>	<b>1 ( 2.4 )</b>
<b>T93A</b>	<b>1 ( 2.4 )</b>
<b>合计</b>	<b>3 ( 7.2 )</b>



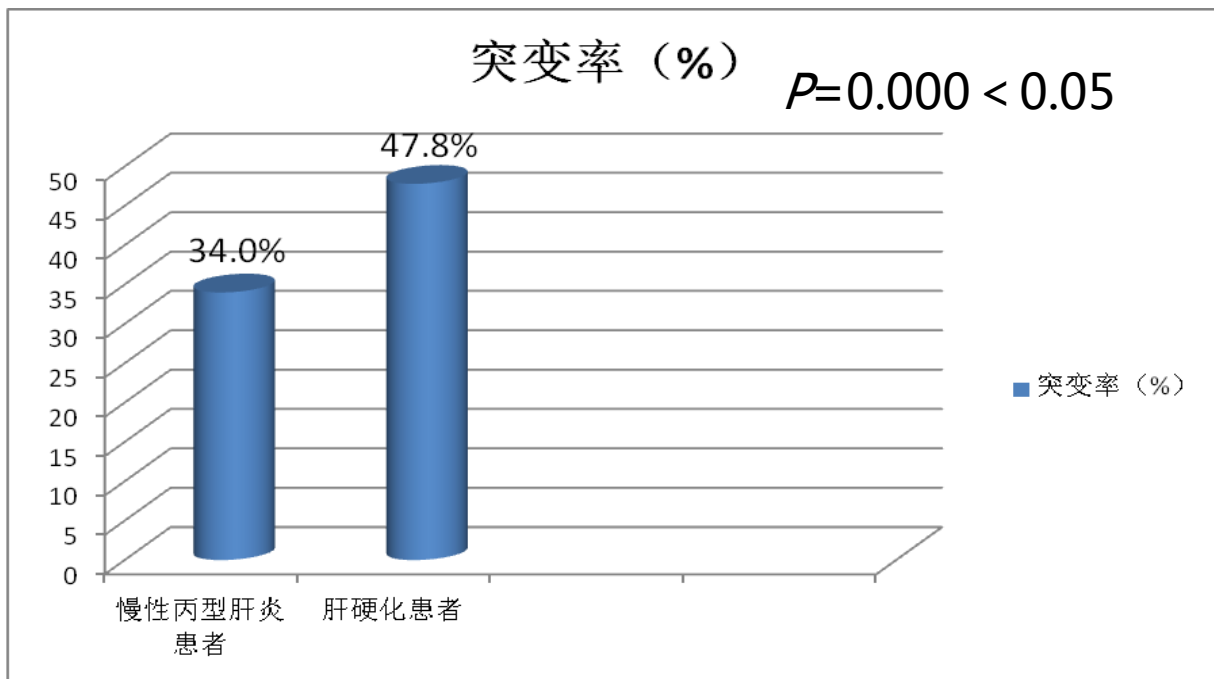
## 1.4-4各基因型突变率的比较



基因1型与基因3型比较： $P=0.286 > 0.05$ ，差异无统计学意义  
基因1型与基因6型比较： $P=0.000 < 0.05$ ，差异有统计学意义  
基因3型与基因6型比较： $P=0.001 < 0.05$ ，差异有统计学意义  
基因1型和基因3型患者的突变率高于基因6型患者。



## 1.4-5慢性丙型肝炎患者和丙肝肝硬化患者突变率的比较



两者突变率比较， $P=0.000 < 0.05$ ，差异有统计学意义，**丙肝肝硬化患者的突变率高于慢性丙型肝炎患者的突变率。**





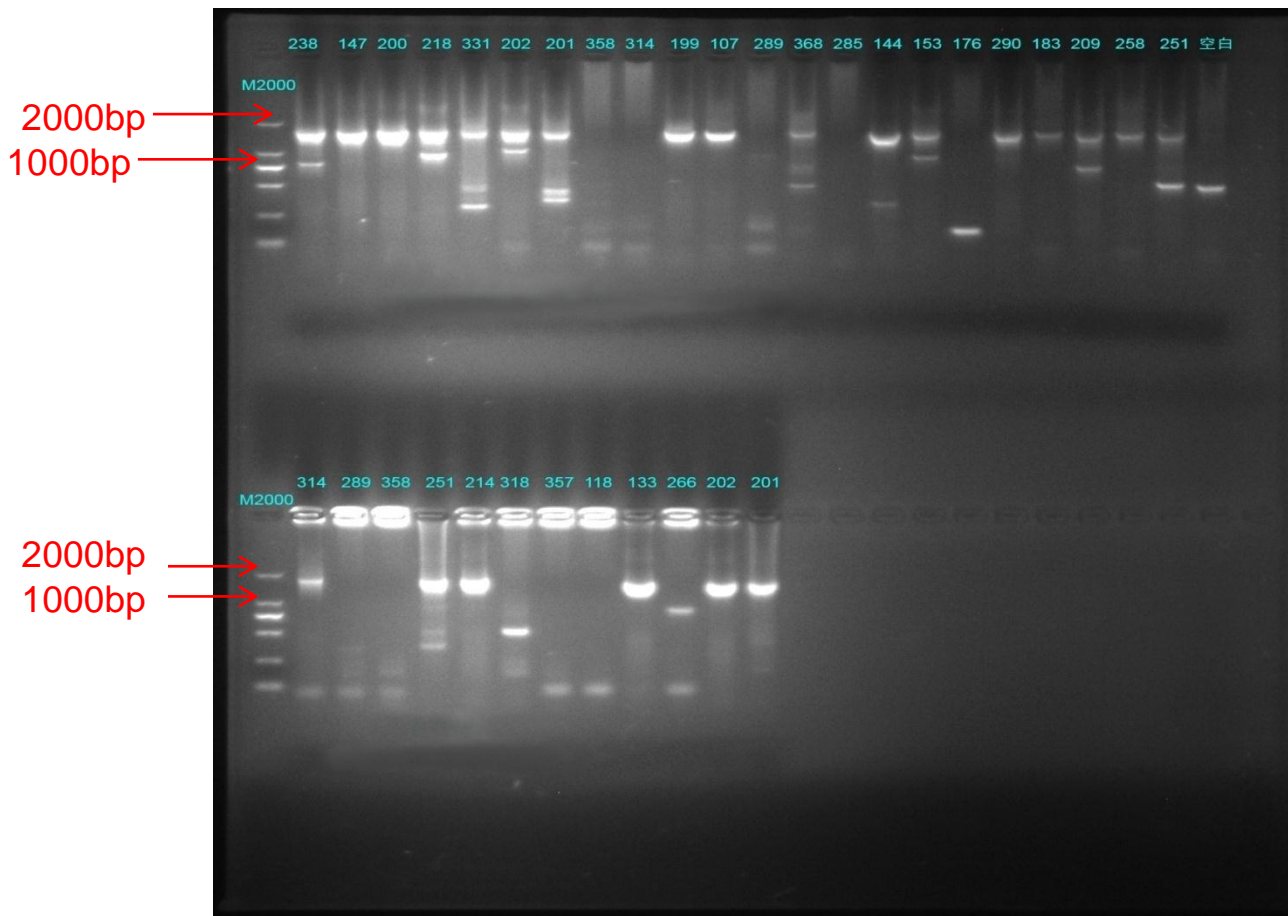
## 2.1研究对象的一般资料

本研究共入选**233**患者，我们对**126**例患者样本扩增并测序成功NS5B区，其中慢性丙型肝炎患者**103**例，肝硬化患者**23**例。基因1b型**55**例，基因3a型**13**例，基因3b型**20**例，基因6a型**38**例。研究对象的临床资料如下表

变量	男性 (31/66)	女性 (27/60)	统计值	P 值
年龄 (岁)	43.38±6.75	49.39±11.84	t=1.687	P=0.068
HCVRNA (lgIU/ml)	6.57±0.15	8.23±1.65	t=0.829	P=0.412
ALT(U/L)	88.41±15.43	67.92±8.75	t=0.414	P=0.812
AST(U/L)	86.04±16.55	72.00±7.68	t=1.765	P=0.067
突变率 (%)	46.9%	45%		P=1.000

# 结果2-NS5B区

## 2.2电泳结果图



图为**基因1b型**部分样本第二轮PCR产物电泳结果图，最左侧为maker，从左至右，最右边孔道为空白对照，部分样本在**1600bp**处有目的条带。

# 结果2-NS5B区

## 2.3 序列结果比对图

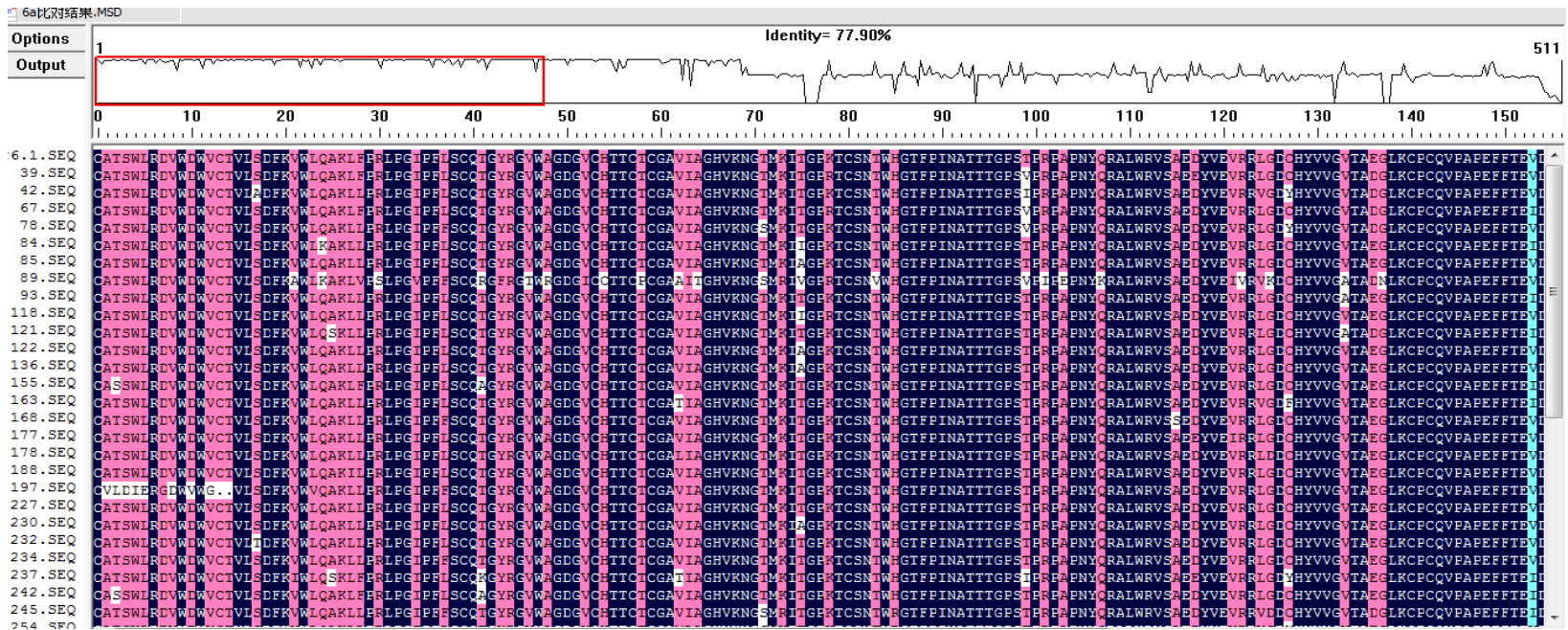


图3-5为基因6a型的序列结果比对图，标准株为HCV6a型（AY859526.1）

# 结果2-NS5B区

## 2.4-1基因1型患者相关位点突变情况

### GT1b型 NS5B区

RAVs	N (%)
C316N/R	52 (94.5)
T19S/G/N/A/E	41 (74.5)
A338V/G/X	39 (70.9)
V321I	14 (25.4)
V499A/T	7 (12.7)
A442T/G/X/S	6 (10.9)
L392I/P	4 (7.3)
V494A/L/S	4 (7.3)
S556R/L	3 (5.5)
L159F	3 (5.5)
S365C/P	2 (3.6)
T424M/V	2 (3.6)
M426P/K	2 (3.6)
M423F	1 (1.8)
M414I/L	1 (1.8)
H95T	1 (1.8)
M71Q	1 (1.8)
N142K	1 (1.8)

# 结果2-NS5B区

## 2.4-2 基因3型患者主要相关位点突变情况

NS5B区域相关位点突变	GT3a ( n=13 ) ( % )	GT3b ( n=20 ) ( % )
<b>E237G</b>	-	2 ( 10.0 )
合计	-	2 ( 10.0 )

期中一例患者在用SOF+VEL治疗时失败

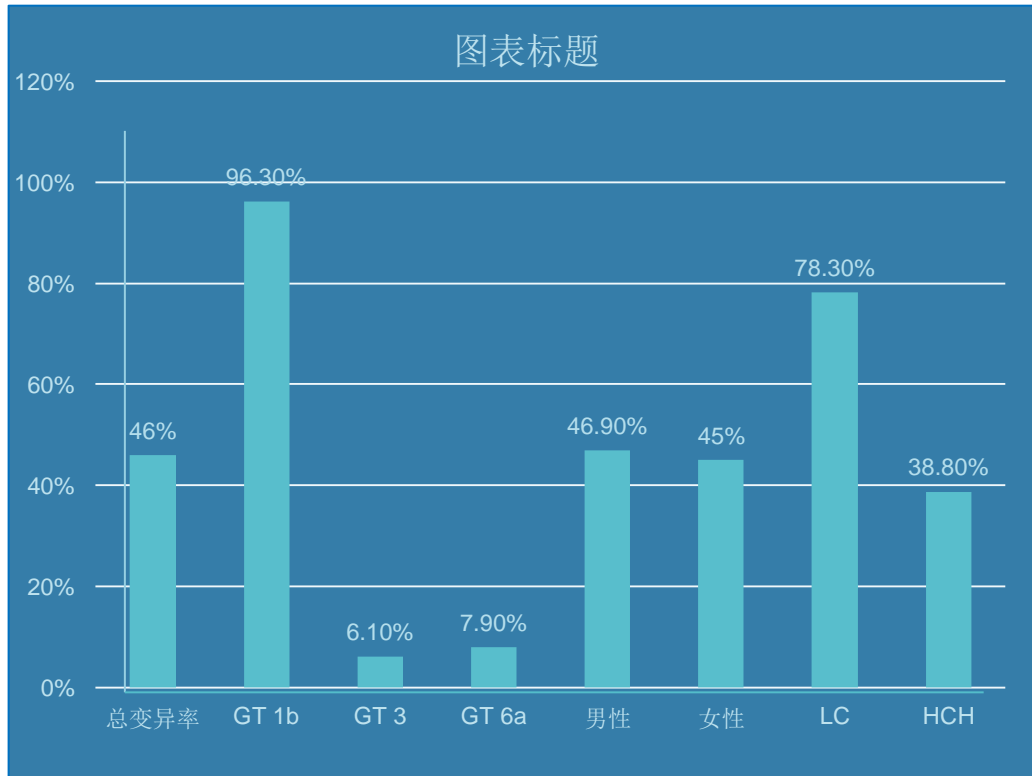
# 结果2-NS5B区

## 2.4-3 基因6型患者主要相关位点突变情况

NS5B区域相关位点突变	GT6a ( n=38 ) ( % )
<b>V494A</b>	<b>3 ( 7.9 )</b>
<b>合计</b>	<b>3 ( 7.9 )</b>

# 结果2-NS5B区

## 2.4-4各基因型突变率的比较



基因6型与基因3型比较： $P > 0.05$ ，差异无统计学意义

基因1型与基因6型比较： $P < 0.05$ ，差异有统计学意义

基因1型与基因6型比较： $P < 0.05$ ，差异有统计学意义

基因6型和基因3型患者的突变率低于基因1型患者。

肝硬化患者的突变率高于慢性丙型肝炎患者  $P < 0.05$

# 结论

- 1.广西地区未进行抗病毒治疗的丙型肝炎患者中存在针对NS5A、NS5B区抑制剂的天然耐药位点突变，既有单位点突变，也有两个位点或多位点联合突变。
- 2.NS5A区基因1型、3型患者的突变率高于基因6型患者。
- 3.NS5B区基因1型的突变率高于基因6型和3型患者，**E237G位点变异**可能是基因3b型患者疗效不佳的原因之一。
- 4.丙肝肝硬化患者的突变率高于慢性丙型肝炎患者的突变率，耐药突变可能跟肝硬化的发生有关。



# 谢谢聆听!



## 我们的团队