

## 乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药研究热点与瞻望

杨松 成军

HBV 核苷(酸)类似物耐药是慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)研究的热点之一。虽然最新的欧美乙型肝炎管理指南均推荐抑制 HBV 作用强并高耐药屏障的药物为一线治疗<sup>[1,2]</sup>,但我国受社会经济等诸多因素所限,现有 4 种核苷(酸)类似物在临床上有大量应用;另外,核苷(酸)类似物在我国已应用 10 余年,存在大量核苷(酸)类似物治疗失败的患者。因此,我国核苷(酸)类似物耐药管理依然严峻。本文拟就核苷(酸)类似物耐药研究的部分热点及待解决的问题综述如下。

### 一、核苷(酸)类似物的耐药机制研究

核苷(酸)类似物耐药发生机制至少可从两个层面进行研究:第一,从分子构象角度来探讨 HBV 反转录酶区变异如何影响反转录酶的构象而导致其复制能力以及对核苷(酸)类似物敏感性的改变;第二,从临床角度探讨核苷(酸)类似物耐药如何导致患者 HBV DNA 与 ALT 等改变并最终影响患者临床结局。

近年来,关于 HBV 反转录酶分子模型研究取得一定进展。已有研究构建了 HBV 反转录酶的数字模型<sup>[3,4]</sup>,在此数字模型上探讨拉米夫定(lamivudine, LAM)与恩替卡韦(entecavir, ETV)等抑制 HBV 的作用机制以及部分变异如 rtM204V/I 与 rtL180M 等对核苷(酸)类似物与 HBV 反转录酶亲和力的影响。但关于阿德福韦酯(adeфовир dipivoxil, ADV)与替比夫定(telbivudine, LdT)等耐药位点的研究尚不多见,将患者的反转录酶序列构建数字模型以明确其对核苷(酸)类似物耐药情况的研究尚未见报道。

临床上采用克隆测序的方法对 LAM 治疗患者发生 rtM204V/I 变异过程进行随访监测,完整记录了自检出 rtM204V/I 变异到变异株在体内病毒群中逐渐成为优势株而致患者出现 HBV DNA 突破和反跳<sup>[5]</sup>。目前关于核苷(酸)类似物耐药发生机制也认为<sup>[1]</sup>,当体内出现耐药变异后应继续应用核苷(酸)类似物治疗,野生病毒株因对核苷(酸)类似物敏感而继续被抑制;变异株会逐渐替代野生株,成为体内 HBV 优势株,从而导致核苷(酸)类似物耐药。那么,当出现病毒学突破时,是否变异株均以优势株存在呢?变异株在病毒群中达到什么比率才可以称为优势株?如果在发生病毒学突破时,体内病毒株均为优势株,那么在进行耐药检

测时,采用PCR产物直接测序法(研究表明仅能检出 $>20\% \sim 30\%$ 变异株)即完全可以检测出变异株病毒,但实际临床检测是否如此呢?另外,有报道部分耐药检测方法可于病毒群中检出 $1\%$ 甚至 $1\%$ 的变异株<sup>[6,7]</sup>,如果在发生病毒学突破时变异株比率仅为 $1\%$ 甚至 $1\%$ ,那么变异株在导致患者出现病毒学突破中的意义又该如何解释?这些问题的解决在于将目前耐药发生机制中的定性研究深入为定量研究,即进一步明确患者体内变异株的比率或者变异株的拷贝数与临床的关系,而目前国内外均无此类研究。

## 二、核苷(酸)类似物常见耐药变异位点与变异发生率

核苷(酸)类似物耐药发生率的报道主要来源于相关注册临床试验,这些注册临床试验的设计并非对固定患者人群进行长期随访观察,很难确切计算其耐药率。有研究提出了累计耐药发生率的计算方法,从而根据药物临床试验数据给出LAM、ADV、ETV与LdT相应的累计耐药发生率<sup>[8]</sup>。需要说明的是,这些数据是基于相关临床试验人群的数据总结,不同药物的数据来源人群与检测方法均存在一定差异,结果不具备可比性。即使对于同一种药物,不同观察人群的观察结果也会存在一定差异。如对ETV,其根据注册临床试验计算的3年累计耐药发生率为 $1.2\%$ 。而日本进行的ETV治疗核苷(酸)类似物初治的CHB患者3年累计基因型耐药发生率为 $1.7\%$ <sup>[9]</sup>。目前尚无基于我国患者人群的系统随访数据。

核苷(酸)类似物耐药位点确立一直是研究热点之一。部分耐药位点已得到广泛认可,如LAM耐药相关的rtM204V/I变异。有研究表明,rtA181T变异与ADV耐药相关的病毒学突破与治疗48周无病毒学应答(HBV DNA $>1000$ 拷贝/ml)无显著相关<sup>[10]</sup>。考虑到rtA181T变异有其自身特点,导致HBsAg改变可影响患者HBV DNA的反跳情况<sup>[11]</sup>。另外HBV DNA无显著反跳不一定代表无显著肝细胞损伤。理论上rtA181T导致HBsAg的截短变异可导致截短HBsAg在肝细胞内的蓄积,而已有研究表明HBsAg在肝细胞内蓄积会增加肝细胞被免疫清除的敏感性<sup>[12]</sup>。

每个耐药位点的提出与确立都需要大量的工作,在这个过程中可能还存在反复。如有报道在ADV原发性耐药患者检出rtI233V变异并可导致ADV敏感性下降<sup>[13]</sup>,有研究提出rtI233V变异后HBV对ADV仍敏感,同样有临床病例的支持<sup>[14]</sup>。分析结果的差异,是否是由于两个研究采用的表型耐药检测体系的差别,是否由于患者初始临床指标存在差异?rtI233V变异在中国人群中对ADV耐药情况又如何?因此,单个变异位点可能需要与患者HBV全基因组序列情况(包括基因型)以及患者的临床指标相结合才能引起患者HBV DNA以及ALT等改变,也就是要改变既往“耐药变异”直接等同于“临床耐药”的观点,而应结合耐药变异与个体化因素考虑其可能引起的临床改变,这就需要当前耐药研究的深入与细化。另一方面,需要深入开展基于国内患者人群的研究,着力于发现国内患者的核苷(酸)类似物耐药规律。



### 三、乙型肝炎病毒耐药变异的检测

核苷(酸)类似物耐药检测方法包括 PCR 产物直接测序法(可进一步分为双脱氧测序法与焦磷酸测序法等)、克隆测序法、PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)法、实时荧光定量 PCR 法、线性探针反向杂交法、基因芯片法与限制性片段质谱多态性法(RFMP)等,这些方法在既往研究中均有报道。新的耐药检测方法不断报道,现有检测方法所能检测的核苷(酸)类似物耐药种类也在不断增加<sup>[15]</sup>。线性探针反向杂交法虽然在大型临床试验中广泛采用,一方面价格昂贵,另一方面其方法本身在检测基因 B 型与 C 型患者在 rtN236T 变异时存在假阳性结果(在该试剂盒说明书中有相关说明),而国内 CHB 患者则以基因 B 型与 C 型为主,这就影响了其检验效能。RFMP 方法在韩国研究中多有报道<sup>[7]</sup>,但该方法检测需应用飞行时间质谱分析,价格昂贵且一般实验室并不具备。在国内应用最广泛的是 PCR 产物直接测序法、PCR-RFLP 法与实时荧光定量 PCR 法。

随着核苷(酸)类似物应用时间的延长,越来越多的患者在进行耐药检测时曾应用过两种或两种以上核苷(酸)类似物,此类患者往往需检测多个耐药位点,也希望明确其挽救治疗药物的敏感性。在这种情况下,PCR-RFLP 与实时荧光定量 PCR 方法即凸显不足,因为 PCR-RFLP 法对于每种变异均需特异性的引物与酶切反应体系,而实时荧光定量 PCR 法则对每种变异均需特异性探针。如需检测多种变异,则检测成本与工作量会相应增加。

PCR 产物直接测序法中双脱氧测序法应用最为广泛,缺点为只有当变异株在病毒群中所占比率 > 20% ~ 30% 时方可检出。核苷(酸)类似物耐药检测的指征尚不明确,一般认为耐药检测不应与 HBV DNA 载量一样作为常规检测<sup>[16]</sup>,绝大多数耐药检测患者为临床提示耐药可能性,如在治疗依从的患者出现了病毒学突破或患者长时间治疗 HBV DNA 下降不理想,耐药变异株在病毒群中所占比率 < 20% ~ 30%,变异株在 HBV DNA 升高或下降中的作用如何呢?这也提示对耐药检测方法的研究应该摆脱既往“耐药变异”等同于“临床耐药”的观点,应该深入研究变异株的动态变化与患者 HBV DNA 等临床指标变化的关系。

### 四、乙型肝炎病毒耐药变异的挽救治疗

耐药患者的挽救治疗方案中,除 LAM 耐药的挽救治疗外,都主要基于体外药物敏感试验的结果,而相应的临床证据有限<sup>[1,2,17]</sup>。核苷(酸)类似物耐药患者挽救治疗的报道多为病例报道研究<sup>[18]</sup>,且大多病例数较少,随访时间较短。一方面是由于耐药患者尤其是 ADV 与 ETV 耐药患者本身病例数相对较少,另一方面,目前核苷(酸)类似物耐药的检测尚未完全普及,其确诊存在一定困难。这实际上为我国的耐药研究提供了契机,因为我国有大量应用核苷(酸)类似物治疗以及耐药患者,通过合理的科研设计与协作,必能得出非常有价值的研究成果。

### 五、总结

目前,HBV 核苷(酸)类似物耐药研究已取得一定成果,并有效地指导了临床治疗,但是研究还有待深化与细化。国内该领域研究尚处于初期阶段,对此应充

分利用宝贵的患者资源,开展核苷(酸)类似物耐药的基础与临床研究,一方面可以提高我国耐药研究的整体水平并在国际领域取得相应的学术地位;更重要的是,这些研究成果可以有效地指导国内核苷(酸)类似物耐药患者的治疗。

## 参 考 文 献

- 1 European Association For The Study of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. J Hepatol, 2009, 50(2): 227-242.
- 2 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology, 2009, 50(3): 661-662.
- 3 Langle DR, Walsh AW, Baldick CJ, et al. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. J Virol, 2007, 81(8): 3992-4001.
- 4 Sharon A, Chu CK. Understanding the molecular basis of HBV drug resistance by molecular modeling. Antiviral Res, 2008, 80(3): 339-353.
- 5 Pallier C, Castera L, Soulier A, et al. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. J Virol, 2006, 80(2): 643-653.
- 6 Geng H, Hua B, Wang H, et al. Dual-probe assay for detection of lamivudine-resistance hepatitis B virus by real-time PCR. J Virol Methods, 2006, 132(1-2): 25-31.
- 7 Woo HY, Park H, Kim BI, et al. Comparison of mass spectrometric analysis and TRUGENE HBV genotyping for monitoring lamivudine resistance in chronic hepatitis B patients. Antivir Ther, 2007, 12(1): 7-13.
- 8 Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. Hepatol Int, 2008, 2(2): 147-151.
- 9 Mochida S, Takaguchi K, Yokosuka O, et al. Long term efficacy, safety and resistance analyses of entecavir (ETV) treatment in Japanese nucleoside-naïve patients with chronic hepatitis B (CHB). J Hepatol, 2008, 48: S262.
- 10 Borroto-Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. J Hepatol, 2007, 47(4): 492-498.
- 11 Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172 \* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. Hepatology, 2008, 48(1): 88-98.
- 12 Gilles PN, Guerrette DL, Ulevitch RJ, et al. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma. Hepatology, 1992, 16(3): 655-663.
- 13 Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. N Engl J Med, 2006, 354(17): 1807-1812.
- 14 Curtis M, Zhu Y, Borroto-Esoda K. Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir. J Infect Dis, 2007, 196(10): 1483-1486.
- 15 Lupo J, Larrat S, Hilleret MN, et al. Assessment of selective real-time PCR for quantitation of lamivudine and adefovir hepatitis B virus-resistant strains and comparison with direct sequencing and line probe assays. J Virol Methods, 2009, 156(1-2): 52-58.
- 16 Keeffe EB, Dieterich DT, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B: preventing, detecting, and managing viral resistance. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6(3): 268-274.
- 17 乙型肝炎病毒耐药专家委员会. 乙型肝炎病毒耐药专家共识: 2009年更新. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2009, 3(1): 69-79.
- 18 Yang S, Xue RX, Wang Q, et al. Adefovir plus entecavir or plus lamivudine as rescue therapies for chronic hepatitis B patients who develop resistance to entecavir. Int J Infect Dis, 2008, 12(6): S40.

(收稿日期:2009-12-28)

(本文编辑:孙荣华)

杨松, 成军. 乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药研究热点与瞻望[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(4): 460-463.