

· 临床论著 ·

阿德福韦酯初治耐药与阿德福韦酯挽救治疗
再耐药患者的临床特征比较

李平 张佳娟 张馨 杨志国 高蕾 汪茂荣

【摘要】目的 研究阿德福韦酯(ADV)初治耐药和ADV挽救治疗拉米夫定(LAM)耐药者再耐药的临床和病毒学特点。**方法** 对ADV治疗过程中出现病毒突破的患者进行耐药位点的检测。明确耐药位点患者中单用ADV者37例, LAM耐药后换用ADV的患者40例, 患者发生病毒突破时留取血清标本, 行血生化检测并收集其临床资料。**结果** ADV初治耐药(ADVr)组和ADV挽救LAM耐药再耐药(LAMr/ADVr)组患者临床特征中的平均年龄、性别分布、HBsAg定量、HBV DNA载量、基因型分布、肝功能指标(TBil、ALT和AST水平)等差异均无统计学意义(P 均 > 0.05), 但两组患者的HBeAg阳性率差异具有统计学意义(57.5% vs 83.8%; $\chi^2 = 6.339$, $P = 0.012$)。在病毒学特征方面, N236T变异、A181T + N236T变异更多发生于ADVr组患者中, 而LAMr/ADVr组患者的耐药模式更加复杂。**结论** LAM耐药后换用ADV治疗同样会导致病毒耐药的发生, 临床特征和ADV初治耐药相近, 但引起HBV变异模式的复杂化。

【关键词】 病毒性肝炎, 乙型; 核苷(酸)类似物; 耐药; 变异; 临床特征

Analysis of clinical characteristics between patients with adefovir-naïve resistant and adefovir-rescue resistant LI Ping*, ZHANG Jiajuan, ZHANG Xin, YANG Zhiguo, GAO Lei, WANG Maorong. *Liver Diseases Center of PLA, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: LI Ping, Email: leep2002@163.com

【Abstract】Objective To study the clinical and virological characteristics of adefovir dipivoxil (ADV) de novo resistance and ADV rescue therapy lamivudine (LAM) resistance. **Methods** Patients treated with ADV were detected drug resistance when occurring viral breakthrough. There were 37 ADV-naïve patients and 40 ADV rescue LAM resistant patients enrolled in this study. Their conventional biochemical tests results and clinical data were collected. **Results** The average age, sex distribution, HBsAg quantification, HBV DNA load, genotypes, liver function (TBil, ALT and AST levels) between the two groups showed no significant difference (P all > 0.05). The proportion of HBeAg-positive was significantly different in the two groups (57.5% vs 83.8%; $\chi^2 = 6.339$, $P = 0.012$). In virological characteristics, N236T mutation and A181T + N236T mutation were more often seen in ADVr group, LAMr/ADVr group had more complex resistance patterns. **Conclusions** Switching to ADV therapy after LAM resistance could also cause the occurrence of viral resistance, the clinical characteristics were similar to ADV de novo resistance, but the HBV mutation patterns were more complex.

【Key words】 Hepatitis B virus; Nucleos(t)ide analogues; Resistance; Mutation; Clinical characteristics

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.007

基金项目: 国家科技重大专项子课题 (No. 2008ZX10002004-001-024)

作者单位: 210002 南京市, 解放军第八一医院全军肝病中心 (李平、张馨、杨志国、高蕾、汪茂荣); 南京市红十字血液中心体采科 (张佳娟)

通讯作者: 李平, Email: leep2002@163.com

核苷(酸)类似物 [Nucleos(t)ide analogues, NAs] 是目前治疗慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 的重要药物, 数年间已有拉米夫定 (lamivudine, LAM)、阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦 (entecavir, ETV)、替比夫定 (telbivudine, LdT) 和替诺福韦酯 (tenofovir disoproxil, TDF) 陆续经 FDA 批准上市^[1]。由于 ADV 对乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的野生株和 LAM 耐药株均有抑制作用, 因此, 被广泛用于 CHB 患者初始治疗和 LAM 耐药患者的挽救治疗中。但随着治疗时间的延长, 无论 ADV 初治或用于 LAM 耐药者的挽救治疗, 均可引起 HBV 的耐药变异, 造成抗病毒治疗失败, 加剧病情的进展。目前为止, 关于 LAM 耐药后 ADV 序贯治疗再耐药患者的临床特征报道尚不多, 为进一步探讨这类耐药患者的临床相关指标和耐药突变特点, 本研究对 37 例 ADV 初始治疗耐药患者与 40 例 LAM 耐药后 ADV 挽救治疗再耐药患者的临床和病毒学特征进行了比较分析, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

病例来源于中国人民解放军第八一医院 2010 年 1 月至 2012 年 5 月收治的 77 例患者, 均接受 ADV 治疗且发生耐药, 所有患者接受 NAs 抗病毒治疗 6 个月以上, 诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版)》^[2]。ADV 初治耐药患者 37 例, 男性 31 例, 女性 6 例, 平均年龄 (43.2 ± 10.6) 岁; LAM 耐药 ADV 挽救治疗再耐药患者 40 例, 男性 35 例, 女性 5 例, 平均年龄 (42.7 ± 10.1) 岁。在治疗过程中患者发生病毒学突破时留取血清标本, 行耐药相关检测及血生化检测。本研究为回顾性非干预性研究, 符合医学伦理学相关要求。

二、研究方法

1. 常规检测: 采用奥林巴斯 AU5400 生化分析仪及相关试剂检测血液生化指标; 采用 Roche 公司的 Elecsys 2010 仪器和配套试剂检测 HBV-M; 采用 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司) 检测 HBV DNA (上海科华生物工程股份有限公司)。

2. 耐药位点检测: 采用 PCR 产物进行直接测

序法。按试剂盒说明提取血清病毒 DNA, 采用巢式 PCR 扩增 RT 区基因, 扩增引物见表 1。P1、P2 扩增第 1 轮, P3、P4 扩增第 2 轮。条件均为: 95 °C、2 min 后, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 5 min。产物经电泳鉴定后由 ABI 3730XL 进行测序。结果经 MEGA4 比对后, 参照文献^[3]对其中相关耐药位点进行分析。

表 1 巢式 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	位置
P1	AAGCTCTGCTAGATCCCAGAGT	nt18 ~ 40
P2	TTTCGCTCCAGACCGGCTGC	nt1320 ~ 1301
P3	GCGGGGTTTTCTTGTGAC	nt56 ~ 75
P4	AGTATGGATCGGCAGAGGAG	nt1272 ~ 1253

3. 基因型分析: 由于 HBV 基因组重叠编码, 确定 HBV 基因型的 S 区域 (nt155 ~ 835) 包含于反转录酶 (reverse transcriptase, RT) 区域内^[4], 根据 RT 区测序结果可在线分析 HBV 基因型 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计数资料构成比采用 R × C 表的 χ^2 检验, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同变异患者临床特征的比较

ADV 治疗过程中出现病毒突破患者共 132 例, 均进行了耐药位点的检测。检出相关耐药变异位点患者共 95 例, 其中单用 ADV 患者 37 例, LAM 耐药后再序贯使用 ADV 患者 40 例, 使用过其他抗病毒治疗 18 例 (包括 LDT 换用 ADV、LAM 换用 ETV 再换用 ADV 等)。比较 ADV 初始耐药 (ADV_r) 组和 (ADV 挽救治疗耐药) LAM_r/ADV_r 组患者的临床特征资料, 详见表 2。两组患者的平均年龄、性别分布、HBsAg 定量、HBV DNA 载量、基因型分布、肝功能指标中 TBil、ALT 和 AST 水平等比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。患者出现耐药变异时 HBeAg 阳性比例为 70.1%, 而在两不同变异组中的 e 抗原阳性率存差异具有统计学意义 (57.5% vs 83.8%, $P = 0.012$)。

表2 入组患者的基本情况和临床特征

指标	LAMr/ADVr 组 (40 例)	ADVr 组 (37 例)	统计量	P
男/女(例)	35/5	31/6	$\chi^2 = 0.217$	0.642
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	42.7 \pm 10.1	43.2 \pm 10.6	$t = 0.197$	0.844
TBil ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	18.2 \pm 6.6	19.5 \pm 10.5	$t = 0.664$	0.509
ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)	98.4 \pm 56.6	114.4 \pm 50.1	$t = 1.307$	0.195
AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	79.7 \pm 40.3	101.0 \pm 58.7	$t = 1.848$	0.069
HBV DNA (\log_{10} 拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)	4.19 \pm 1.17	3.91 \pm 1.22	$t = 1.032$	0.306
HBsAg (\log_{10} COI, $\bar{x} \pm s$)	3.54 \pm 0.52	3.61 \pm 0.61	$t = 0.573$	0.568
HBeAg (阳性/阴性, 例)	23/17	31/6	$\chi^2 = 6.339$	0.012
Genotype (B/C, 例)	34/6	30/7	$\chi^2 = 0.210$	0.646

表3 两组患者 HBV RT 区的变异模式

特征	LAMr/ADVr 组	ADVr 组	χ^2	P
A181T	10	9	0.005	0.945
A181V	9	5	1.043	0.307
N236T	0	5	5.781	0.016
A181T + N236T	4	11	4.770	0.029
A181V + N236T	5	7	0.602	0.438
A181T + A181V	2	0	1.899	0.168
A181T + M204I \pm L180M	3	0	2.888	0.089
A181T + M204V \pm L180M	2	0	1.899	0.168
A181V + M204I \pm L180M	2	0	1.899	0.168
A181V + M204V \pm L180M	2	0	1.889	0.168
A181V + L180M	1	0	0.937	0.333

二、不同变异组 RT 区特征分析

本研究 77 例患者中, 变异位点主要涉及 rt181 和 rt236, 变异模式主要有: A181V、A181T、N236T、A181T + N236T、A181V + N236T、A181T + A181V 和 A181T/V + M204I/V \pm L180M 变异等。其中 ADV 初治耐药模式主要有 5 种; 而 ADV 用于挽救治疗 LAM 耐药患者再耐药时的耐药模式有 10 种, 两组患者 HBV RT 区变异类型及分布差异见表 3。

讨 论

耐药突变是 NAs 长期治疗失败的主要原因, 为了减少耐药突变的发生, 国外的 EASL、AASLD 指南提倡选用抑制病毒复制能力强、高耐药屏障的药物^[1,5], 但由于我国经济发展的限制, 初始治疗时采用廉价、低耐药屏障的核苷(酸)类药物单独治疗的患者仍较为常见。ADV 和 LAM 分别属于核苷类和核苷酸类药物, 不具有交叉耐药位点^[6], 当出现 LAM 耐药后, 理论上采用序贯 ADV 的挽救治疗方案是可行的, 但临床实际应用中, ADV 5 年的耐药率分别是 0%、3%、11%、18% 和 29%^[7-8]; 而在 LAM 耐药后换用 ADV 治疗的患者, 耐药率显著升高^[9], 2 年耐药率即可达到 18% ~ 25.4%^[10]。耐药株的出现可导致病毒水平上升、转氨酶升高, 引起疾病进展, 甚至引起肝硬化失代偿和肝功能衰

竭的发生^[11]。耐药变异已成为 HBV 抗病毒治疗中所面临的主要问题。对 HBV 耐药相关知识的研究将有助于耐药问题的解决, 目前为止, 关于 ADV 初治患者耐药变异与 LAM 耐药后 ADV 耐药变异这两者间的差异鲜有报道。因此, 本研究通过对 37 例 ADV 初治耐药和 40 例 LAM 耐药后 ADV 挽救治疗再耐药患者的临床相关特征进行比较, 并对耐药病毒株 RT 区进行测序分析, 以期为病情分析和抗病毒治疗提供依据。

上海交通大学瑞金医院的一项研究, 比较了 75 例使用 NAs 治疗并出现耐药的慢性乙型肝炎患者, 按照耐药变异模式分为: L180M + M204V、M204I、L180M + M204I、V173L + L180M + M204V、N236T 和 A181V 共 6 组, 对各组患者在耐药变异时的 HBV DNA 和 ALT 水平进行检测比较, 结果显示不同组别间患者的病毒水平和转氨酶水平差异均无统计学意义^[12]。本研究结果与之相近, 两组患者的宿主临床特征(年龄、性别分布)和生化指标(TBil、ALT、AST)等方面未表现出显著性差异; 在病毒特征方面的 HBsAg 定量、HBV DNA、基因型分布差异亦无统计学意义。但本研究发现, 两组患者 e 抗原阳性率方面, ADVr 组的 e 抗原阳性率较 LAMr/ADVr 组高, 这是否和 LAMr/ADVr 组病毒出现多耐药位点后复制能力下降, e 抗原分泌的下降有关, 尚有待进一步的验证和研究。

Yim 等^[13]研究指出, 在 LAM 变异后换用

ADV 的患者不同时期病毒克隆数中,随着 ADV 用药时间的延长, M204I/V 变异株呈现逐渐减少趋势,直至消失。本研究结果中, LAM 变异的患者再次出现 ADV 变异时,仅 22.5% (9/40) 的患者同时检测出 M204I 或者 M204V 变异,本研究认为此种 M204I/V 变异的消失只是暂时的,由于 M204I/V 对 ADV 敏感,虽然变异株在外周血中不能存活,但是变异株可以 ccc DNA 的形式长期寄存于肝细胞内,从而增加长期抗病毒治疗的难度。77 例患者 RT 区测序结果显示, N236T 变异、A181T + N236T 变异更多发生于 ADV 初始治疗耐药的患者中。国内一项比较 ADV 初治耐药与 ADV 挽救治疗耐药患者 RT 区特征的研究也有相同的结论^[14],该研究发现在 ADV 初治耐药患者中, N236T 变异和 rtA181T + rtN236T 变异的的比例分别为 19.18% 和 38.36%;而在 ADV 挽救治疗耐药患者中这两种变异比例分别为 5.88% 和 8.82%。本研究同时发现,序贯治疗组的耐药模式更加复杂,出现了 A181T + M204I ± L180M、A181V + M204I ± L180M 等多药耐药模式。Yim 等^[13]研究同时发现,在 PCR 产物直接测序检测出多药耐药位点的患者中进一步采用克隆测序的方法进行分析,结果发现,超过 80% 的克隆均含有多变异耐药位点,提示在 NAs 治疗中存在“单株多耐药位点”的可能。虽然本研究中检测出多药耐药变异的的比例尚不多,但是这种变异病毒的出现,势必会增加 HBV 抗病毒治疗的难度。

由于 HBV 的高复制率和较低的复制保真性等特点,决定其容易发生各种变异^[15]。在 NAs 抑制 HBV 复制的长期过程中,RT 区的耐药相关突变被筛选出来。通过本研究发现 LAM 耐药后换用 ADV 治疗同样会导致病毒耐药的发生,且引起 HBV 变异模式的复杂化,增加后期治疗的难度。尽管目前的耐药管理指南建议在 LAM 耐药后调整为 LAM 联合 ADV 抗病毒的方案^[15],以最大程度减少后期再次耐药的发生。但在此仍建议,理想的抗病毒方案是在治疗之初,即选择抑制能力强、耐药发生率低的药物,尽量避免 LAM、ADV 单药治疗或序贯治疗。

李平, 张佳娟, 张馨, 等. 阿德福韦酯初治耐药与阿德福韦酯挽救治疗再耐药患者的临床特征比较 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (2): 183-186.

参 考 文 献

- 1 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol,2012,57(1):167-185.
- 2 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版) [J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- 3 Xu Z, Liu Y, Xu T, et al. Acute hepatitis B infection associated with drug-resistant hepatitis B virus[J]. J Clin Virol,2010,48(4):270-274.
- 4 骆抗先, 陈金军, 李平. 乙型肝炎基础与临床[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2012:1-4.
- 5 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. Hepatology,2009,50(3):661-662.
- 6 Yeon JE, Yoo W, Hong SP, et al. Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil[J]. Gut,2006,55(10):1488-1495.
- 7 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B[J]. Hepatology,2008,48(3):750-758.
- 8 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years[J]. Gastroenterology,2006,131(6):1743-1751.
- 9 Lee JM, Park JY, Kim do Y, et al. Long-term adefovir dipivoxil monotherapy for up to 5 years in lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. Antivir Ther,2010,15(2):235-241.
- 10 Liaw Y, Kao J, Piratvisuth T. Asian-Pacific Consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update[J]. Hepatology Int,2012,6(3):531-561.
- 11 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[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2009,3(1):72-79.
- 12 邓俊, 张东华, 于德, 等. 核苷(酸)类耐药患者中乙型肝炎病毒逆转录酶区基因变异类型及其特点[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(5): 342-345.
- 13 Yim HJ, Hussain M, Liu Y, et al. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy[J]. Hepatology,2006,44(3):703-712.
- 14 邵幼林, 张锁才, 柳龙根, 等. ADV初治耐药与LAM耐药者再耐药时 HBV-RT区的变异特征[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(20):1879-1883.
- 15 参加乙型肝炎耐药讨论会专家. 核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版,2012,6(6):643-650.

(收稿日期: 2013-10-12)

(本文编辑: 孙荣华)