

· 临床论著 ·

慢性乙型肝炎患者阿德福韦酯治疗出现病毒学突破的耐药分析

杨松 邢卉春 王琦 王笑梅 欧蔚妮 段英 李贲 李玥 刘顺爱 成军

【摘要】目的 明确临床实际工作中阿德福韦酯(ADV)治疗出现病毒学突破患者基因型耐药情况并对耐药相关因素进行分析。**方法** 收集ADV治疗出现病毒学突破患者的血清样本及临床资料,应用PCR产物直接测序法联合焦磷酸测序法进行基因型耐药检测;分析基因型耐药与患者抗病毒治疗经过、基线HBV DNA载量等因素的相关性;并进一步分析rtA181T变异患者的病毒学及生化学指标变化。**结果** 共收集106例ADV治疗出现病毒学突破患者,共检出基因型耐药45例,耐药位点67个;既往LAM等经治换用ADV患者ADV耐药检出率显著高于ADV初治患者($\chi^2 = 6.584$, $P = 0.010$);rtA181T耐药变异患者HBV DNA较最低值升高水平显著高于不包含rtA181T变异患者($t = 566.000$, $P = 0.014$);包含rtA181T变异患者生化学突破率显著高于不包含rtA181T变异患者($\chi^2 = 5.140$, $P = 0.023$)。**结论** 本组患者数据提示ADV治疗出现病毒学突破患者基因型耐药发生率约为40%,rtA181位点变异多于rtN236位点变异,rtA181T变异虽抑制耐药株病毒复制,但导致患者出现生化学突破几率并未减少。

【关键词】 阿德福韦酯; 耐药; 肝炎, 乙型, 慢性; 焦磷酸测序

Genotype resistance profile in patients with chronic hepatitis B who underwent virological breakthrough during adefovir dipivoxil treatment YANG Song*, XING Huichun, WANG Qi, WANG Xiaomei, OU Weini, DUAN Ying, LI Ben, LI Yue, LIU Shunai, CHENG Jun. *Center of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: CHENG Jun, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

【Abstract】Objective To investigate the genotype resistance profile in patients with real-life chronic hepatitis B who underwent virological breakthrough during adefovir dipivoxil (ADV) treatment and clinical factors related to ADV resistance. **Methods** The clinical data and serum samples were collected from CHB patients who underwent virological breakthrough during ADV treatment. PCR products direct-sequencing and pyrosequencing were used for detecting ADV genotype resistance. Correlation between resistance and treatment history, baseline HBV DNA level etc were analyzed, respectively. Virological and biochemical features of rtA181T resistance were analyzed. **Results** Total of 106 CHB patients were enrolled and ADV genotype resistance were found in 45 patients while 67 ADV resistance mutations were identified. Less resistance were identified in ADV naïve patients than that in patients who took lamivudine/ADV sequential therapy ($\chi^2 = 6.584$, $P = 0.010$). ADV resistant patients carrying rtA181T mutation had lower level HBV DNA rise from nadir than patients without rtA181T mutation ($t = 566.000$, $P = 0.014$). More patients with rtA181T mutation underwent biochemical breakthrough than patients without rtA181T mutation ($\chi^2 = 5.140$, $P = 0.023$). **Conclusions** About 40% ADV treated patients who underwent virological breakthrough were identified as ADV genotype resistance. RtA181 resistance mutation was more common than rtN236 for ADV resistance. RtA181T mutation may inhibit HBV replication and cause no less biochemical breakthrough than other ADV resistance mutations.

【Key words】 Adefovir dipivoxil (ADV); Resistance; Chronic hepatitis B; Pyrosequencing

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.025

基金项目: 中国肝炎防治基金会光辉基金资助项目(No. GHF20100207); 北京市优秀人才培养资助D类项目(No. 2012D003034000030); 首都卫生发展科研专项项目(No. 首发2011-2017-02)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心(杨松、邢卉春、王笑梅、欧蔚妮、段英、李贲、成军), 传染病研究所(王琦、刘顺爱、成军)

通讯作者: 成军, Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

抗病毒治疗是慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗关键。目前阿德福韦酯(adeфовир dipivoxil, ADV)在我国CHB患者抗HBV治疗中仍有大量应用。ADV注册临床研究表明,ADV治疗5年累计基因型耐药发生率为29%^[1]。抗HBV治疗过程中患者HBV DNA较最低值升高 $> 1 \log_{10}$ 拷贝/ml,即考虑出现病毒学突破,在排除患者依从性以及药物质量等问题后应考虑ADV耐药的可能性。有研究对ADV的4项注册临床试验中总计242例病毒学突破患者采用PCR产物双脱氧测序法进行检测分析结果表明,36%病毒学突破的患者检出耐药相关变异^[2]。目前国内对于实际临床工作中ADV治疗出现病毒学突破患者的耐药相关临床数据分析尚不多见。本研究拟分析实际临床工作中ADV治疗出现病毒学突破患者的耐药情况并对耐药相关因素进行分析,报道如下。

资料与方法

一、一般资料

1. 患者资料与血清收集:患者来源于首都医科大学附属北京地坛医院2007年12月至2011年9月就诊的CHB患者,患者服用ADV单药(10 mg/d)抗HBV治疗出现病毒学突破;自愿提供详细病史资料并接受抗病毒耐药检测。其中病毒学突破患者定义为:在治疗过程中,HBV DNA自下降至最低值后升高 $\geq 1 \log_{10}$ 拷贝/ml。收集患者血清样本及临床资料供本研究用。

2. 主要试剂与仪器:体液病毒DNA/RNA小量制备试剂盒购自Axygen公司;PCR反应试剂盒购自TaKaRa公司;乙型肝炎病毒耐药突变焦磷酸测序法检测试剂盒购自基因科技(上海)有限公司。焦磷酸测序仪由Biotage公司提供。PCR扩增仪由德国Eppendorf公司提供。PCR产物双脱氧法测序由北京奥科生物科技有限公司与上海英骏生物技术有限公司完成。

二、方法

1. PCR模板制备:取患者血清100 μ l,采用Axygen公司提供的试剂盒提取HBV DNA,具体操作参照试剂盒说明书。

2. 巢式PCR扩增HBV反转录酶区:第一轮PCR引物为:P3(5'-YCTCWSYCAATCGTCAA-3', nt105-122)与AP3(5'-GAGMCACAAAGGTTCCAC-3', nt1238-1256)。反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性50 s,50℃退火45 s,72℃延伸1 min 10 s,

共35个循环;72℃延伸7 min。第二轮引物为Xnp2(5'-AGGCAGGATAGCCACATT-3', nt146-163)与XAnp2(5'-GCACCGAACATGGAGARC-3', nt1034-1051)。反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性50 s,50℃退火45 s,72℃延伸1 min 10 s,共40个循环;72℃延伸7 min。PCR产物经纯化后直接用于测序分析。

3. PCR产物双脱氧法直接测序:上述PCR产物由北京奥科生物科技有限公司、上海英骏生物技术有限公司进行纯化、测序。测序引物选择Xnp2,XAnp2为备用测序引物。测序结果应用Vector NTI 9.0,以Chromas软件对测序结果进行耐药位点分析。

4. 焦磷酸测序反应:取上PCR产物进行焦磷酸测序,具体操作详见焦磷酸测序用试剂盒说明书^[3]。

三、统计学处理

应用SPSS 11.5软件进行统计分析。本研究中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较根据正态分布检验与方差齐性检验结果采用 t 检验、 t 检验或Wilcoxon秩和检验。计数资料比较根据样本量相应采用Pearson卡方检验与Yates卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、患者的一般资料

共纳入ADV治疗出现病毒学突破患者106例,其中男性91例,女性15例。患者年龄18~67岁,平均年龄(30.33 \pm 11.74)岁。ADV平均治疗时间为21.11个月。其中ADV初治患者60例,拉米夫定(lamivudine, LAM)等其他核苷(酸)类似物应答不佳换用ADV治疗的患者46例。

二、患者ADV基因型耐药的检测结果

PCR产物直接测序法和/或焦磷酸测序耐药检测阳性即认定为ADV基因型耐药。共检出ADV耐药患者45例(42.5%),其中rtA181+rtN236双位点联合变异19例。耐药变异位点67个,rtA181T变异数25个,rtA181V变异20个,rtN236T变异22个,相应耐药变异位点情况见表1。

表1 106例ADV治疗病毒学突破患者的基因型耐药情况

基因型耐药类型	例(%)
rtA181T	13(12.26)
rtA181V	9(8.49)
rtN236T	3(2.83)
rtA181V+rtA181T	1(0.94)
rtA181T+rtN236T	9(8.49)
rtA181V+rtN236T	8(7.55)
rtA181V+rtA181T+rtN236T	2(1.89)
合计	45(42.45)

三、ADV治疗出现病毒学突破患者出现基因型耐药的相关因素分析

1. ADV初治患者与LAM等经治换用ADV患者耐药检出率比较:病毒学突破组中ADV初治患者60例,共检出ADV耐药19例;LAM治疗失败患者46例,共检出ADV耐药26例。LAM治疗失败患者ADV耐药检出率高于ADV初治患者,差别具有统计学意义($\chi^2=6.584$, $P=0.010$)。

2. 送检ADV耐药时患者HBV DNA水平与基因型耐药的相关性:检出ADV耐药的45例患者耐药检测时HBV DNA平均水平为 $(5.351 \pm 1.069) \log_{10}$ 拷贝/ml,相应未检出耐药患者耐药检测时HBV DNA水平为 $(5.174 \pm 1.385) \log_{10}$ 拷贝/ml;二者差异无统计学意义($t=0.715$, $P=0.476$)。

3. ADV治疗时间与基因型耐药的相关性:45例检出ADV耐药患者平均治疗时间为 (23.089 ± 11.845) 个月,61例未检出耐药患者平均治疗时间为 (19.656 ± 10.532) 个月,二者差异无统计学意义($t=1.573$, $P=0.119$)。

四、rtA181T耐药变异患者与rtA181T耐药变异患者的临床指标比较

1. HBV DNA较最低值升高水平比较:包含rtA181T变异患者HBV DNA平均升高水平为 $(1.686 \pm 0.875) \log_{10}$ 拷贝/ml,不包含rtA181T变异患者HBV DNA平均升高水平为 $(2.567 \pm 1.114) \log_{10}$ 拷贝/ml,二者比较差异具有统计学意义($t=566.000$, $P=0.014$)。包含rtA181T变异患者可进一步区分为单独rtA181T变异患者与rtA181T联合其它变异患者。两类患者HBV DNA平均升高水平分别为 $(1.534 \pm 0.558) \log_{10}$ 拷贝/ml与 $(1.852 \pm 1.129) \log_{10}$ 拷贝/ml,两者差异无统计学意义($t=165.5$, $P=0.627$)。

2. 生化学突破患者比率比较:包含rtA181T变异患者25例中16例患者出现生化学突破,而不包含rtA181T变异患者中20例中有6例患者出现生化学突破;包含rtA181T变异患者生化学突破率高于不包含rtA181T变异患者,差异具有统计学意义($\chi^2=5.140$, $P=0.023$)。

讨 论

本研究采用的基因型耐药检测方法为PCR产物双脱氧测序法联合焦磷酸测序法,可检出占准种比率1%的耐药株病毒^[4]。本研究106例病毒学突破患者中基因型耐药检出率为42.5%。而Borrito-Esoda

等^[2]对ADV的4项ADV注册临床试验中出现病毒学突破患者采用PCR产物双脱氧测序法进行耐药检测结果表明,36%的病毒学突破患者检出ADV耐药相关变异,研究结果提示,约40%临床应用ADV出现病毒学突破患者考虑为耐药变异所致,而对于其他约60%患者应注意排除治疗依从性等原因。本研究检出的ADV耐药变异位点中,rtA181V/T变异位点数为45个,而rtN236T变异位点22个,rt181位变异数多于rt236位。国内相关研究也提示ADV耐药患者rtA181V/T变异检出率高于rtN236T变异^[5]。此外,在ADV治疗出现病毒学突破患者中,序贯治疗换用ADV患者耐药检出率显著高于单用ADV患者,提示在该部分人群更应该进行耐药检测,并应避免抑制病毒作用弱且耐药发生率高的药物序贯应用。

本研究中病毒学突破且检出耐药变异患者中,包含rtA181T变异的耐药患者HBV DNA的突破水平显著低于不包含该变异的耐药患者。既往研究表明rtA181T变异会导致sW172stop变异从而使HBsAg截短,截短的HBsAg自身分泌障碍,同时其还可以抑制野生株HBV的分泌,从而使出现rtA181T变异患者不表现为病毒学突破,或者使病毒学突破时HBV DNA升高幅度较小^[6-7]。本研究进一步表明,rtA181T变异可导致耐药患者HBV DNA水平不升高或升高幅度较小,但对于患者肝脏损伤并未减少,即包含rtA181T变异患者其生化学突破率显著高于未包含该变异的耐药患者。这在既往研究中均未见相关报道,对于该现象尚需增加样本量进一步验证。分析该现象可能的发生机制,考虑rtA181T变异导致截短的HBsAg在肝细胞内的蓄积,而此蓄积可导致肝细胞损伤的敏感性增加并不除外rtA181T变异导致的HBsAg表达量的改变以及HBsAg结构的改变有可能影响机体针对HBsAg的免疫,从而可能导致其对于HBV感染肝细胞的免疫清除^[8-9]。

总之,本研究对临床工作中106例ADV治疗出现病毒学突破患者耐药分析表明,基因型耐药发生率为42.5%,rtA181位点变异多于rtN236位点变异。此外,现有资料表明rtA181T变异虽抑制耐药株病毒复制,但导致患者出现生化学突破几率并未减少。

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 Borrito-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]. J Hepatol, 2007, 47(4): 492-498.

- 3 郑金梅, 赵龙凤, 杨松, 等. 焦磷酸测序法在HBV阿德福韦酯耐药检测中的应用[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(10): 1199-1204.
- 4 孙树梅, 周浩, 周彬, 等. 巢式PCR联合焦磷酸测序法在乙型肝炎病毒耐药基因检测中的敏感性与特异性分析[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(5): 610-613.
- 5 刘峰, 王磊, 王丽娜, 等. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎过程中发生病毒突破患者的(HBV)P基因变异分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2008, 46(4): 407-409.
- 6 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[J]. Hepatology, 2008, 48(1): 88-98.
- 7 Ahn SH, Park YK, Park ES, et al. The impact of the hepatitis B virus polymerase rtA181T mutation on replication and drug resistance is potentially affected by overlapping changes in surface gene[J]. J Virol, 2014, 88(12): 6805-6818.
- 8 Kim JH, Jung YK, Joo MK, et al. Hepatitis B viral surface mutations in patients with adefovir resistant chronic hepatitis B with A181T/V polymerase mutations[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(2): 257-264.
- 9 Yeh CT, Chen T, Hsu CW, et al. Emergence of the rtA181T/sW172* mutant increased the risk of hepatoma occurrence in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 398-408.

(收稿日期: 2014-01-27)

(本文编辑: 孙荣华)

杨松, 邢卉春, 王琦, 等. 慢性乙型肝炎患者阿德福韦酯治疗出现病毒学突破的耐药分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(3): 403-406.

