

· 临床论著 ·

拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者的 HBV 逆转酶区突变模式

许春 李佰君 张明香 魏倪

【摘要】目的 研究慢性乙型肝炎患者在拉米夫定(LAM)治疗过程中出现耐药后,HBV逆转录酶区基因的突变模式及临床特征。**方法** 采用巢式PCR方法对2007年4月至2010年12月于沈阳市第六人民医院肝病门诊或住院诊治的共260例慢性乙型肝炎LAM耐药患者的HBV聚合酶基因逆转录酶区进行扩增,对PCR产物进行直接测序,回顾性分析LAM耐药时HBV聚合酶基因的不同突变模式及患者的临床特征。**结果** 260例患者诊断为LAM耐药,215例患者检测到LAM相关的HBV聚合酶基因突变。患者血清HBV DNA为 $(5.41 \pm 1.29) \log_{10}$ 拷贝/ml。98.1% (211/215)患者存在YMDD基序突变。其中3种主要突变类型分别为:单位点rtM204I突变占40.0% (86/215);rtL180M + rtM204V占37.2% (80/215);rtL180M + rtM204I占13.0% (28/215)。与rtM204I相比,rtM204V多以联合rtL180M突变的形式存在($P < 0.05$)。LAM耐药时,单位点突变与联合突变类型患者的血清HBV DNA、ALT、年龄、HBeAg阳性与阴性,肝硬化与慢性乙型肝炎差异均无统计学意义($P > 0.05$)。测出基因突变患者与伴生化学突破患者HBV DNA载量较高($P < 0.05$)。**结论** YMDD基序突变是LAM耐药后HBV聚合酶基因突变的主要模式,LAM耐药后患者临床病情轻重可能与HBV聚合酶基因突变类型无关。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;拉米夫定;耐药

The mutation patterns of HBV polymerase gene in chronic hepatitis B patients with lamivudine resistant XU Chun, LI Baijun, ZHANG Mingxiang, WEI Ni. The Sixth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110006, China

Corresponding author: ZHANG Mingxiang, Email: zmx6511@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical features and mutation patterns of HBV polymerase gene in patients with chronic hepatitis B (CHB) after the emergence of drug-resistance during lamivudine (LAM) therapy. **Methods** The HBV gene RT region from 260 serum samples was amplified by nest PCR, and PCR products were directly sequenced. The outpatients and hospitalized CHB patients with LAM-resistant in the No. 6 People's Hospital of Shenyang from April 2007 to December 2009 were collected. Clinical features after the emergence of LAM-resistant mutations were analyzed, retrospectively. **Results** Total of 260 patients with CHB were diagnosed as LAM-resistant. Among them 215 patients were found to had LAM-resistant-associated mutations in the polymerase gene. The median of serum HBV DNA was $(5.41 \pm 1.29) \log_{10}$ copies/ml. There were 98.1% (211/215) patients had YMDD mutations. Three major mutation patterns of LAM-resistant HBV were identified as rtM204I with 40.0% (86/215), rtL180M + rtM204V with 37.2% (80/215) and rtL180M + rtM204I with 13.0% (28/215). The rtM204V mutation was accompanied more frequently by the rtL180M mutation compared with the rtM204I mutation ($P < 0.05$). There were no significant difference in ALT or HBV DNA levels and age, gender, HBeAg status, cirrhosis or not were found among patients with one point mutation and joint mutation patterns ($P < 0.05$). HBV viral load was higher in patients who were detected gene mutation and accompanied with biochemical breakthrough. **Conclusions** YMDD is the major mutation pattern of HBV polymerase gene after emergence of LAM-resistant. The mutation patterns of HBV polymerase gene are possibly not related to the clinical severity of CHB patients during LAM therapy.

【Key words】 Hepatitis B virus; Lamivudine; Drug resistance

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.04.005

基金项目: 中国肝炎防治基金会·王宝恩肝纤维化基金(No. CFHPC20110028)

作者单位: 110006 沈阳市, 沈阳市第六人民医院肝病门诊

通讯作者: 张明香, Email: zmx6511@126.com

拉米夫定 (lamivudine, LAM) 是首个被批准用于慢性乙型肝炎 (CHB) 治疗的核苷类 (nucleoside analogue, NA) 药物, 多年来在全球范围内广泛用于抗 HBV 治疗。治疗期间在药物的选择性压力下, HBV 聚合酶 (polymerase, P) 基因的逆转录酶区 (reverse transcriptase region, RT) 会发生耐药突变。长期接受 LAM 治疗的患者随着用药时间延长, 发生病毒耐药突变的比例也相应增加 (第 1、2、3 和 4 年分别为 14%、38%、49% 和 66%)^[1]。病毒基因变异出现可导致治疗失败甚至病情加重, 后果包括病毒学突破, 其后出现生化指标反弹及临床情况恶化, 少数患者甚至出现肝功能失代偿以致威胁生命^[2]。本研究对 260 例 LAM 治疗失败患者的血清 HBV-P-RT 区进行测序, 以探讨 LAM 耐药的突变模式及与临床的相关性。

资料与方法

一、病例来源

回顾性分析 2007 年 4 月至 2010 年 12 月于沈阳市第六人民医院门诊及住院患者 260 例, 其全部为初治接受 LAM 单药治疗至少 6 个月者。临床均表现为病毒学突破^[3]。排除合并 HCV、HDV、HEV 和 HIV 感染者; 排除曾有其他 NA 治疗史者; 排除不规范服药及服假药者, 全部病例均接受耐药基因检测。

二、实验室检查

采用实时荧光 PCR 法进行 HBV DNA 定量 (试剂购自深圳凯杰生物有限公司), 最低检测下限为 1 000 拷贝/ml; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 HBV 血清学标志物 (试剂购自北京万泰生物药业有限公司); 肝功能检测采用全自动生物化学分析仪, 试剂购自美国雅培公司。

三、HBV-P-RT 序列分析

应用巢式 PCR 方法进行 DNA 扩增: 首先对多条 GenBank 上的 HBV DNA 序列的基因多态性进行分析, 重点比对了我国常见的 C 型和 B 型序列, 根据 HBV-P-RT 的保守区序列, 进行巢式 PCR 引物设计, 外引物上游序列为 5'-CTGTGAGGA ACTTCTGTCTAC-3' 和下游序列 5'-CAGTATGCACGGTCTACGAG-3'; 内引物上游序列为 5'-GCCAAGGCGTTAGTACGAT-3' 和下游序列 5'-CTCGCAGGCACCATATCACAGG-3', 均由大连宝生物有限公司合成。血清 HBV DNA 提取采用天泽基因工程有限公司生产的病毒 DNA out 试剂; 基因

扩增采用天泽基因工程有限公司生产的即用型 PCR 试剂盒。PCR 产物由大连宝生物公司生产的回收试剂盒回收纯化后, 用 ABI3130 自动测序仪 (美国应用生物系统公司产品) 进行 DNA 序列测定, 分析 HBV-P-RT 片段核苷酸编码的氨基酸差异。

四、统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 不符合正态分布的数据以中位数 (范围) 表示, 两样本均值采用独立样本 *t* 检验。计数资料以频数和百分数表示, 率的比较采用 χ^2 检验。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、病例资料

260 例病毒学突破的患者中, 共 215 例测出 HBV-P-RT 区突变 (82.7%, 215/260), 其中男性 171 例, 女性 44 例, CHB 患者 157 例, 肝硬化 (LC) 患者 58 例。其中 HBeAg 阳性 142 例, HBeAg 阴性 73 例, 年龄 17~80 (42.5 ± 11.5) 岁, HBV DNA 为 (5.41 ± 1.29) log₁₀ 拷贝/ml; 其中 82 例 (31.54%) 患者伴有生化学突破^[3], ALT 升高者的中位数 1 120 (80~3 250) U/L, 53 例患者同时伴有 AST 等其他肝功能指标异常。诊断均符合 2005 年制定的慢性乙型肝炎防治指南^[4], 中位治疗时间为 22 (6~60) 个月。

二、HBV-P-RT 区序列分析

1. 总体突变类型及频率: 211 例 (98.1%, 211/215) 患者存在 YMDD 基序突变, 在单位点及联合突变中存在 rtM204V 突变者 95 例 (44.2%)、存在 rtM204I 突变者 116 例 (54.0%)。总体突变模式共 8 种, 其中主要为 rtM204I 单位点突变及 rtL180M + rtM204V 组合突变模式 (40% 及 37.2%), 其次为 rtL180M + rtM204I 突变 (13%), 另有 rtV173L + rtL80M + rtM204V, 占 4.2% (9/215)。6 例为单位点 rtM204V 突变 (2.8%, 6/215), 2 例 (占 0.9%, 2/215) rtL180M + rtM204I/V 突变, 3 例 (1.4%, 3/215) 为单位点 rtV173L 突变, 1 例 (0.5%, 1/215) 单独存在 rtL180M 突变。与 rtM204I 相比, rtM204V 多以联合 rtL180M 突变的形式存在 ($P < 0.05$)。单位点 rtM204V、rtL180M 和 rtV173L 突变较为少见。

2. rtL180M 联合 rtM204V、rtM204I 的突变频率: 总体在 215 例中存在 rtL180M 突变共有 118 例

(54.9%)，117例并存YMDD基序变异，其中联合在rtM204V突变者89例(76.1%)，联合在rtM204I突变者28例(23.9%) ($\chi^2 = 6.48, P < 0.05$)，提示rtM204V更多见以联合rtL180M突变的形式存在。

3. rtV173L 联合 rtM204V/I 和 rtL180M 的突变频率：总体215例中存在rtV173L突变者有14例(6.5%)，与其他位点联合突变11例(78.6%)，其中联合rtM204V突变者9例占81.8%，且均同时联合rtL180M突变。仅2例与rtM204I联合突变(18.2%，2/11) ($\chi^2 = 8.91, P < 0.05$)，提示rtV173L多与rtM204V、rtL180M突变同时发生。

三、按不同突变模式分组比较人口学及病毒学、生化学特征

按单位点突变及联合位点突变分两组，比较患者的年龄、性别、是否有LC、HBeAg状况、HBV DNA及ALT水平，差异均无统计学意义($P > 0.05$)，见表1。

四、按是否检出突变位点及是否伴生化学突破分组比较HBV DNA载量

按检测出基因突变的215例与未检出基因突变的45例分组比较提示，检测出突变位点者的HBV DNA载量高于未检出者；按是否伴生化学突破的82例与不伴生化学突破的178例分组比较提示，伴生化学突破者的HBV DNA载量高于不伴有生化学突破者，见表2。

讨 论

我国是HBV感染的高发区，抗病毒是治疗的关键环节。LAM抑制病毒速度快、不良反应少、服用简便，在临床上已得到广泛应用，但其耐药问题成为了棘手的难题。形成耐药的机理为筛选出HBV-P-RT

区发生点突变，其中如rtM204V/I(YMDD变异)为主要耐药突变，其可显著降低HBV对LAM的敏感性，而其他变异位点则为补偿性突变，常与YMDD变异同时出现，可能恢复变异株的复制能力^[5]。

本研究检测到HBV-P-RT区突变的215例患者中，211例(98.1%)存在YMDD突变，再次证明其为LAM耐药的主要生物学模式。综合分析，以rtM204I单位点突变率最高(86/215, 40.0%)，其次为rtM204V+rtL180M联合突变(80/215, 37.2%)，与周先珊等^[6]研究一致。在联合突变病例中，rtM204V联合rtL180M或rtV173L的出现率高于M204I联合L180M或rtV173L($P < 0.05$)。从补偿性突变来看，rtL180M联合rtM204V的出现率最高；rtV173L或rtL180M+rtM204V的出现率均高于rtV173L+rtM204I的出现率，且rtV173L多与rtM204V和rtL180M同时发生。本研究中仅发现1例为rtL180M突变，3例rtV173L单位点突变，是否提示部分病例可单独或首先出现180或173位点变异，需进一步研究证实。

本研究中LAM单位点与联合突变的患者之间在病毒载量、ALT水平差异无统计学意义($P > 0.05$)，提示不同的HBV聚合酶突变模式可能与病情无关，与邓俊等^[7]研究一致。LAM耐药所致肝炎复发可能与病毒水平与患者的免疫激活有关。当体内耐药株增多、病毒复制并升高至一定程度可能激活抗HBV细胞免疫反应，攻击感染的肝细胞，导致肝细胞炎症坏死的肝炎表现^[8]。同样突变模式与患者的诊断及人口学指标无关，见表1。但由表2可见伴生化学突破患者的HBV DNA载量增高，提示ALT升高往往发生于病毒学突破之后。

拉米夫定临床耐药尤其多位点联合突变可能改变HBV的生物学特性从而增加治疗难度。在LAM

表1 按突变模式分组比较患者人口学，病毒学及生化学特征

项目	单位点突变	联合突变
例数	96	119
年龄均值(岁)	43.1 ± 10.9	42.1 ± 11.9
性别(男/女)	80/16	91/28
诊断(CHB/LC, 例)	72/24	85/34
HBV DNA (\log_{10} 拷贝/ml)	5.34 ± 1.26	5.48 ± 1.30
HBeAg阳性/HBeAg阴性(例)	61/35	81/38
ALT中位数(U/L)	85 (15 ~ 1320)	79 (28 ~ 3250)

表2 不同分组患者的HBV DNA载量的比较 (\log_{10} 拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)

分组	例数	HBV DNA
检测出突变位点	215	5.41 ± 1.29
未检出突变位点	45	4.17 ± 0.56 ^a
伴有生化学突破	82	6.23 ± 1.01
不伴生化学突破	178	4.72 ± 1.10 ^b

注：HBV DNA载量比较采用两独立样本t检验，^a：检测出与未检出突变位点相比， $t = 10.24, P < 0.05$ ，^b：伴有和不伴生化学突破相比， $t = -10.89, P < 0.05$

耐药突变中 V173L 和 L180M 作为补偿性耐药位点大多联合 M204V/I 突变, 意义在于: V173L 和 L180M 为补偿性突变可进一步降低基因耐药屏障, 容易引起有交叉耐药的其它核苷(酸)类似物耐药, 例如 L180M 联合 M204V 在恩替卡韦突变的概率最高^[9], 与 M204V 单独突变相比, 联合突变对替比夫定敏感性显著降低^[10]; 另外联合突变可影响病毒复制程度, 例如 V173L/L180M/M204V 联合突变的病毒株较 M204V 单独突变的病毒株复制能力提高 7 倍^[11]。

本研究入选的 260 例 LAM 相关病毒学突破患者中, 有 45 例 (17.3%, 45/260) 未检测到耐药位点, 表 2 可见此部分人群 HBV DNA 载量较低, 可能由于耐药株比例低于 25% 未能经 PCR 产物直接测序法检测出^[8]。此比例略低于以往报道的 25%^[12], 可能由于不同检测人群的差异所致。

因此, CHB 患者应用抗病毒药物治疗的过程中应严密观察血清 HBV DNA 含量的变化, 同时也应适时进行 HBV-P-RT 区各耐药位点的监测, 对耐药早期发现及进一步挽救治疗有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance[J]. *J Hepatol*,2000,33(3):469-475.
- 2 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy[J]. *Gastroenterology*,2003,124(1):105-117.
- 3 Lok AS, McMahon BJ. The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Chronic hepatitis B. *Hepatology*,2007,45(2):507-539.
- 4 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. *中华传染病杂志*2005,23(6):421-431.
- 5 Ono SK, Kato N, Shiratori Y, et al. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance[J]. *J Clin Invest*,2001,107(4):449-455.
- 6 周先珊, 万莫彬, 郑瑞英. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者HBV聚合酶基因的突变模式分析[J]. *解放军医学杂志*,2008,33(10):1250-1252.
- 7 邓俊, 张东华, 于德敏, 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]. *中华肝病杂志*,2009,17(5):342-345.
- 8 王程, 孙剑, 陈金军, 等. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者HBV聚合酶区突变序列分析[J]. *南方医科大学学报*,2008,28(5):729-735.
- 9 Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine[J]. *J Antimicrob Agents Chemother*,2004,48(9):3498-3507.
- 10 Levine S, Hernandez D, Yamanaka G, et al. Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2002,46(8):2525-2532.
- 11 Chen RY, Edwards R, Shaw T, et al. Effect of the G1896A precore mutation on drug sensitivity and replication yield of lamivudine-resistant HBV in vitro[J]. *Hepatology*,2003,37(1):27-35.
- 12 Ciancio A, Smedile A, Rizzetto M, et al. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy[J]. *Hepatology*,2004,39(1):64-73.

(收稿日期: 2014-01-07)

(本文编辑: 孙荣华)

许春, 李佰君, 张明香, 等. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者的HBV逆转酶区突变模式[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(4): 473-476.

