

· 临床论著 ·

核苷(酸)类药物引起 HBV 基因突变的危险因素与模式分析

张小曼¹ 肖子鸿¹ 张纯瑜¹ 魏开鹏¹ 潘兴南²

【摘要】目的 分析应用核苷(酸)类药物(NA)治疗慢性乙型肝炎(CHB)患者耐药基因突变发生的危险因素和突变模式。**方法** 选取本院经NA治疗的209例CHB患者,采用直接测序法检测患者血清标本中的HBV基因分型及耐药位点,并对结果进行分析,对可能影响HBV逆转录酶(RT)区耐药基因突变的危险因素,包括年龄、性别、基因型、HBeAg状态、HBV DNA水平、HBsAg阳性时间、家族史、病期、核苷(酸)类药物选择以及用药时间等进行统计分析,筛选出独立危险因素。**结果** 年龄、基因型、NA药物选择及用药时间与HBV RT区耐药基因突变发生相关。209例患者测序结果中86例发现有耐药基因突变,突变率为41.15%,B型和C型基因患者耐药突变率分别33.67%和47.75%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.25, P < 0.05$),但Logistic回归分析表明基因型不是HBV耐药基因突变发生的独立危险因素。HBV RT区突变以rtM204V/I(79.1%)、rtA181V/T/A/S(19.8%)和rtN236T(11.6%)突变株为主,rtM204V位点变异大多伴随了rtL180M突变。**结论** 年龄大于45岁、曾使用LAM或LDT进行长时间治疗的CHB人群更容易导致HBV突变的发生,在使用NA治疗慢性乙型肝炎患者过程中,出现的变异模式复杂多样,应及时监测患者耐药基因以指导临床用药。

【关键词】 肝炎,乙型;核苷(酸)类;耐药;突变

The risk factors and mutation patterns of HBV gene mutation induced by nucleos(t)ide analogue therapy Zhang Xiaoman¹, Xiao Zihong¹, Zhang Chunyu¹, Wei Kaipeng¹, Pan Xinnan². ¹Clinical Liver Diseases Center Laboratory, ²Clinical Liver Diseases Research Center, Nanjing Military Command, 180th Hospital of PLA, Quanzhou 362000, China
Corresponding author: Pan Xinnan, Email: xnpncn@163.com.

【Abstract】Objective To analyze the risk factors that affect gene mutations in HBV reverse transcriptase gene and the mutation patterns in patients with chronic hepatitis B (CHB) receiving nucleos(t)ide analogue therapy. **Methods** Among the 209 patients with CHB treated with nucleos(t)ide analogue therapy, HBV reverse transcriptase gene was analyzed by a direct PCR sequencing assay. The factors including age, sex, genotype, HBeAg status, level of serum HBV DNA, course of diseases, HBsAg positive time, family history of CHB, drug of choice and therapeutic time were analyzed, respectively. Independent risk factors related to HBV gene mutation were screened by statistical software. The mutation patterns were profiled too. **Results** Statistical analysis showed that age, genotype, drug of choice and therapeutic time were correlated with viral mutations in HBV reverse transcriptase gene. However, genotype was not the independent risk factor related to HBV mutation in the Logistic regression analysis. Eighty six patients were detected to be drug resistant among 209 (41.15%) cases. The percentages of genotype B and C of drug resistant mutations were 33.67% and 47.75%, respectively, with significant difference ($\chi^2 = 4.25, P < 0.05$). The frequency of mutations on rtM204V/I (79.1%), rtA181V/T/A/S (19.8%) and rtN236T (11.6%) were major in this cohort. Compared with the rtM204I mutations, the rtM204V mutations were preferentially accompanied by the rtL180M mutations. **Conclusions** HBV drug resistant mutations occurred more frequently in over 45 years old CHB patients with lamivudine or telbivudine treatment experience for a long therapeutic time. The mutation patterns were complicated variable and the reverse transcriptase gene of HBV in patients with CHB should be monitored just in time for better curative effect of antiviral therapy.

【Key words】 Hepatitis B; Nucleos(t)ide; Resistance; Mutation

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.05.016

作者单位: 362000 泉州市, 解放军第一八〇医院南京军区临床肝病中心实验室¹、临床肝病中心²

通讯作者: 潘兴南, Email: xnpncn@163.com

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)已成为严重威胁人类健康的世界性疾病,也是我国当前流行最广泛、危害性最严重的一种疾病。CHB的治疗主要以抗病毒为主,近年来,因核苷(酸)类药物[nucleos(t)ide analogue, NA]口服给药方便、价格低廉等优点在临床上得到广泛应用,但NA的持续应用会增加病毒耐药的风险,从而导致治疗失败^[1]。由于HBV的逆转录酶缺乏校对功能,NA相关HBV耐药突变大多发生在逆转录酶(reverse transcriptase, RT)区。本文回顾性分析了209例应用NA治疗的CHB患者体内HBV RT区耐药基因突变情况,以期发现与突变相关的重要危险因素并对耐药突变模式进行归纳分析,为及时预测耐药的发生和临床合理用药奠定基础。

资料与方法

一、研究对象

2013年1月至2014年4月在本院肝病中心接受过NA治疗的CHB患者404例,使用的NA药物包括4种:拉米夫定(lamivudine, LAM)、替比夫定(telbivudine, LDT)、阿德福韦酯(adeфовир

dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)。其中病史清楚的共209例,治疗方式包括:单药治疗、单药治疗后出现病毒应答不佳或反弹后序贯或联合治疗,治疗时间3~129个月不等,平均疗程36个月。曾有LAM或LDT用药史的156例,无LAM或LDT用药史的53例;其中男性178例(85.17%),女性31例(14.83%),平均年龄39(18~69)岁;慢性乙型肝炎125例,慢性乙型肝炎肝硬化(liver cirrhosis, LC)55例,原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)29例。抽取209例患者就诊或入院时的血清标本进行HBV RT区耐药基因序列检测,分析的耐药位点有:rtI169、rtV173、rtL180、rtA181、rtT184、rtA194、rtS202、rtM204、rtQ215、rtI233、rtN236和rtM250。收集患者的临床资料包括:年龄、性别、基因型、HBeAg状态、HBV DNA水平、HBsAg阳性时间、家族史、病期、核苷(酸)类药物选择和用药时间。其中HBeAg状态、HBV DNA水平均为行HBV RT区序列测定时的同步检测值。病例诊断标准参照2010年9月颁布的中国《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]。排除下列情况:①HBV与HCV、HDV、HIV混合感染;②有干扰素应用史。

表1 影响HBV基因发生耐药突变的单因素卡方检验结果

影响因素	例数	检测出病毒突变		χ^2 值	P 值
		例数	突变率(%)		
年龄(岁)					
18~44	142	51	35.92	8.72	< 0.05
45~59	47	21	44.68		
≥ 60	20	14	70.00		
性别				0.009	> 0.05
男	178	73	41.01		
女	31	13	41.94		
基因型				4.25	< 0.05
B	98	33	33.67		
C	111	53	47.75		
HBeAg				0.13	> 0.05
(+)	148	62	41.89		
(-)	61	24	39.34		
HBV DNA (IU/ml)				3.36	> 0.05
< 10 000	36	11	30.56		
10 000~1 000 000	85	37	43.53		
> 1 000 000	88	38	43.18		
HBsAg 阳性史(年)				0.49	> 0.05
< 5	53	21	39.62		
5~10	84	33	39.29		
> 10	72	32	44.44		
家族史				0.81	> 0.05
有	131	57	43.51		
无	78	29	37.18		
病期				0.50	> 0.05
CHB	125	49	39.20		
CHB-LC	55	24	43.64		
CHB-PHC	29	13	44.83		
核苷(酸)类药物选择				22.89	< 0.01
曾使用 LAM/LDT	156	79	50.64		
未使用 LAM/LDT	53	7	13.21		
用药时间(月)				13.05	< 0.05
3~36	130	41	31.54		
37~60	49	25	51.02		
≥ 61	30	19	63.33		

标本均为新鲜分离血清, -80℃保存, 整批待检。

二、检测方法

1. HBV DNA提取与扩增: 血清标本复融后, 取50 μl, 加入50 μl浓缩液, 13 000 r/min、离心10 min; 弃上清, 往沉淀中加入40 μl裂解液, 待沉淀充分裂解后13 000 r/min、离心10 min, 上清作为PCR模板。PCR反应体系为25 μl体系, 其中含有4 μl HBV DNA模板, 1 μl *Taq* DNA聚合酶 (2.5 U/μl), 20 μl PCR反应液。扩增条件为: 94℃预变性5 min, 94℃、7 s, 60℃、40 s, 扩增40个循环, 采用美国ABI 9700实时荧光定量PCR系统进行DNA定量。

2. HBV RT区序列测定: ①PCR产物酶解: 取HBV PCR产物3 μl, 再加入2 μl Exo-SAP酶混合物震荡混匀, 瞬时离心, 37℃、60 min, 80℃、15 min。②测序PCR: 取酶解PCR产物1 μl、测序试剂 (bigdye) 1 μl、测序引物2 μl进行PCR扩增, 扩增条件: 96℃预变性1 min, 96℃、10 s, 50℃、5 s, 60℃、4 min, 25个循环, 4℃恒温。③测序产物纯化: 采用醋酸钠-乙醇法, 采用美国ABI 310型全自动DNA测序仪进行序列测定。HBV DNA扩增、RT测序试剂均购自上海申友生物技术有限责任公司HBV及耐药突变检测试剂盒。

3. HBV标志物检测: 血清乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、抗-HBs、乙型肝炎e抗原 (HBeAg)、抗-HBe和抗-Hbc采用瑞士罗氏e601全自动电化学发光免疫分析仪。

三、统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行分析, 首先对可能影响HBV耐药位点发生突变的因素, 包括年龄、性别、基因型、HBeAg状态、HBV DNA、HBsAg

阳性时间、家族史、病期、核苷(酸)类药物选择以及用药时间, 进行单因素 χ^2 检验; 将单因素分析中与HBV耐药基因突变发生的有关影响因素作药物选择和用药时间的分层分析, 最后将筛选出的危险因素进行多因素Logistic回归分析; 将HBV发生突变的耐药位点模式进行归纳分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HBV耐药基因发生突变相关因素

纳入的209例CHB患者中, 检测出HBV耐药基因突变86例, 突变率为41.15%。检出基因型为B型(46.9%)和C型(53.1%), 未见其他基因型。采用单因素卡方检验分析结果显示性别、HBeAg状态、HBV DNA水平、HBsAg阳性史、家族史及病期组间差异无统计学意义 (P 均 > 0.05); 患者年龄、基因型、核苷(酸)类药物选择和用药时间与HBV RT区基因突变有关 (P 均 < 0.05), 年龄越大、C型基因、选用LAM或LDT、用药时间越长的人群, HBV突变率越大。

表4 HBV rtM204、rtN236和rtA181相关突变率[例(%)]

变异类型	突变率
包含 rtM204I 的突变形式 ($n=45$)	
rtM204I	30 (34.9)
rtL180M + rtM204I	8 (9.3)
rtM250L + rtM204I	2 (2.3)
rtM250V/L + rtM204I	2 (2.3)
rtA181S + rtM204I	1 (1.2)
rtV173L + rtL180M + rtM204I	1 (1.2)
rtA181S + rtT184I + rtM204I	1 (1.2)
包含 rtM204V 的突变形式 ($n=21$)	
rtM204V	3 (3.5)
rtL180M + rtM204V	14 (16.3)
rtA181V + rtM204V	1 (1.2)
rtL180M + rtA181V + rtM204V	1 (1.2)
rtL180M + rtS202G + rtM204V	1 (1.2)
rtL180M + rtT184S/T + rtM204V	1 (1.2)
包含 rtM204V/I 的突变形式 ($n=2$)	
rtM204I/V	1 (1.2)
rtL180M + M204 I/V	1 (1.2)
包含 rtN236T 的突变形式 ($n=10$)	
rtN236T	5 (5.8)
rtA181T + N236T	2 (2.3)
rtA181V + N236T	2 (2.3)
rtA181S + N236T	1 (1.2)
rtA181 单一位点的突变形式 ($n=8$)	
rtA181V	3 (3.5)
rtA181T	2 (2.3)
rtA181T/A	2 (2.3)
rtA181S	1 (1.2)

表2 年龄与基因型的分层分析

影响因素	例数	是否使用 LAM/LDT 曾使用	未使用	用药时间 (月)
年龄(岁)				
18~44	142	107	35	32±14
45~59	47	35	12	47±21
≥60	20	14	6	35±23
χ^2 值		0.27		
P 值		> 0.05		0.10
基因型				
B	98	75	23	31±17
C	111	81	30	39±15
χ^2 值		0.35		
P 值		> 0.05		0.61

表3 乙型肝炎患者耐药基因变异影响因素 Logistic 回归分析

自变量	回归系数	标准差	Wald 值	P 值	优势比	95%CI
年龄	0.041	0.013	9.969	0.002	1.042	1.015~1.070
基因型	0.476	0.317	2.252	0.133	1.610	0.864~2.999
核苷(酸)类药物选择	0.524	0.162	10.454	0.001	1.688	1.229~2.319
用药时间	0.269	0.212	10.126	0.001	1.325	0.923~2.705
常数项	-4.327	0.862	25.198	0.000	0.013	—

注: “—” 无相关数据

二、多因素Logistic回归分析

将年龄与基因型做核苷(酸)类药物选择和用药时间的分层分析,见表2,结果显示,是否使用LAM或LDT进行抗病毒治疗在不同年龄组及不同基因型分布的人群差异均无统计学意义($P > 0.05$)。另外不同年龄组及不同基因型分布的人群用药时间差异均无统计学意义($P > 0.05$, Kruskal-Wallis检验)。

将HBV耐药基因突变与否作为应变量,将年龄、基因型、核苷(酸)类药物选择、用药时间作为自变量,进行Logistic回归分析,见表3。结果显示,年龄、核苷(酸)类药物选择和用药时间是HBV耐药基因突变发生的独立危险因素,年龄越大,病毒突变的可能性越大;在药物选择上,曾使用过LAM或LDT进行过长时间治疗的人群,越容易导致HBV突变。

三、HBV耐药基因突变模式

NA药物相关的突变位点检测到rtV173、rtL180、rtA181、rtT184、rtS202、rtM204、rtN236和rtM250,而rtI169、rtA194、rtQ215、rtI233未检测到。其中包含rtM204I/V相关突变为79.1%(68/86),包含rtN236T相关突变为11.6%(10/86),包含rtA181V/T/A/S相关突变为19.8%(17/86),见表4。结果显示,rtM204I是最主要的突变位点,相关突变率为52.3%(45/86);rtM204V突变大多伴随了rtL180M的变异,且与rtM204I相比有显著性差异[rtM204V + rtL180M (81%, 17/21) vs rtM204I + rtL180M (20%, 9/45), $P < 0.001$]。

讨 论

目前研究认为治疗前CHB患者高水平的血清HBV DNA和丙氨酸氨基转移酶、高体重指数(body mass index, BMI)及不恰当的治疗策略是引起耐药发生的主要危险因素^[3-5]。在抗病毒治疗过程中,耐药发生的最关键因素是NA药物选择和用药时间,LAM的耐药屏障最低,随着治疗时间的延长,第1、2、3和4年耐药率分别为14%、38%、49%和68%,其次为LDT,治疗时间为2年时的耐药率为21%。本研究发现,年龄、基因型、药物选择及用药时间与耐药基因突变发生相关,分层分析表明年龄和基因型与耐药基因突变的相关性并未受NA药物选择和用药时间的影响。多因素Logistic回归分析显示,年龄、NA药物选择及用药时间是引

起耐药基因突变的独立危险因素。HBV基因型的分布呈现明显地域性差异,我国以B、C型与混合型为主^[6],本研究入组患者以C型为主。张智等^[7]和谭朝霞等^[8]研究显示,C型基因的突变率明显高于B型基因,但本研究结果提示,应用NA治疗过程中HBV耐药变异的发生与基因型无关。赵攀等^[9]对828例进行核苷(酸)类药物治疗的CHB患者耐药情况分析发现,HBV基因突变发生率随年龄增大而逐渐增高,与本研究一致。

NA相关的HBV RT区突变复杂多样,本文中 共有23种突变模式,LAM、LDT相关耐药位点rtM204V/I突变率最高,这与LAM、LDT耐药屏障低容易引起突变相一致,rtL80V/I、rtI169T、rtV173L、rtL180M、rtA181V/T、rtT184S/G、rtS202I和rtQ215S常伴随rtM204V/I出现,这些突变能够增强rtM204V/I突变株的复制能力,被称为补偿突变^[10]。本研究中与LAM、LDT耐药相关的补偿突变主要为rtL180M,偶见rtA181V/S、rtT184S、rtS202I,未发现其他补偿突变位点,且rtM204V突变而非rtM204I,大多伴随了rtL180M变异,这可能与rtM204V突变株的复制能力更弱有关^[11]。另外,本研究中rtA181V/T突变率仅次于rtM204V/I,已逐渐发展成为相对较为普遍的耐药株,rtA181V/T单独突变时就能引起交叉耐药(LAM、LDT和ADV)^[10],为临床治疗带来了困难。在209例标本中,出现了4例rtA181的非典型突变rtA181S,国外体外实验表明rtA181S突变株对ADV中度耐药对LAM、ETV、TDF敏感,治疗rtA181S相关的ADV耐药患者,需采用ETV单独或联合治疗^[12]。rtN236T、rtA181V/T、rtI233V突变与ADV耐药有关,本文未发现rtI233V突变,rtL180M + rtM204V ± rtT184S/G ± rtS202I ± rtM250V与ETV耐药相关。本研究结果提示,在抗病毒治疗时,除了考虑药物选择和用药时间对HBV耐药变异的影响因素外,还应注意年龄这一危险因素,另外,在治疗过程中及时监测患者基因型及耐药位点突变情况对临床指导用药和获得抗病毒治疗成功有重大意义。

参 考 文 献

- Holmn J, Glasa J. EASL clinical practice guidelines[J]. J Hepatol, 2009, 51(4): 821-822.
- 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中国医学前沿杂志, 2011, 3(1): 66-82.
- Nafa S, Ahmed S, Tavan D, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2000, 32(5): 1078-1088.

- 4 Yuen MF, Sablon E, Hui CK, et al. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy[J]. *Hepatology*,2001,34(4 Pt 1):785-791.
- 5 Zoulim F, Poynard T, Degos F, et al. A prospective study of the evolution of lamivudine resistance mutations in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine[J]. *J Viral Hepat*,2006,13(4):278-288.
- 6 徐红, 张跃新, 魏来, 等. 新疆汉族人群HBV基因型与临床病情的关系[J]. *实用肝病杂志*,2005,8(1):11-15.
- 7 张智, 张珍, 李楠, 等. 185例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测[J]. *广东医学*,2008,29(1):97-98.
- 8 谭朝霞, 汤影子, 况雪梅, 等. 核苷酸类药物干预下慢性乙型肝炎患者HBV多聚酶区基因突变检测分析[J]. *重庆医学*,2011,40(13):1254-1256.
- 9 赵攀, 戴久增, 柳芳芳, 等. 核苷(酸)类药物治疗慢性乙型肝炎患者HBV基因耐药变异影响因素分析[J]. *传染病信息*,2013,26(2):93-95.
- 10 Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. *Gastroenterology*,2009,137(5):1593-1608.
- 11 Chotiayaputta W, Lok ASF. Hepatitis B virus variants[J]. *Nat Rev Gastro Hepatol*,2009,6(8):453-462.
- 12 Liu Y, Li X, Xin S, et al. The rtA181S mutation of hepatitis B virus primarily confers resistance to adefovir dipivoxil[J]. *J Viral Hepat*,2015,22(3):328-334.

(收稿日期: 2014-12-24)

(本文编辑: 孙荣华)

张小曼, 肖子鸿, 张纯瑜, 等. 核苷(酸)类药物引起HBV基因突变的危险因素与模式分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2015, 9(5): 665-669.

