

## ·综述·

## 乙型肝炎病毒rtA181位点变异特点及其临床意义

庞婷 邢卉春

**【摘要】**核苷(酸)类似物(NAs)是目前治疗慢性乙型肝炎(CHB)的重要措施,但在治疗过程中不可避免地会出现耐药变异,严重影响临床疗效。rtA181位点变异为多药交叉耐药通路,影响病毒复制、HBsAg分泌,并且存在潜在发生肿瘤的风险。本文旨在对以上几点进行综述。

**【关键词】**肝炎病毒,乙型;rtA181变异;耐药

**Features and clinical significance of rtA181 mutation of hepatitis B virus** Pang Ting, Xing Huichun.

Department of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Xing Huichun, Email: hchxing@sohu.com

**【Abstract】** Patients with chronic hepatitis B (CHB) could be successfully treated using nucleos(t)ide analogues (NAs), but drug resistance mutations of hepatitis B virus (HBV) frequently arise which seriously affect the clinical efficacy. RtA181 mutation is a cross-resistant mutance, which affects viral replication and the secretion of HBsAg, it could also increase the risk of hepatoma occurrence. This article reviewed the above points.

**【Key words】** Hepatitis B virus; rtA181 mutation; Drug resistance

目前,抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NAs]共有5种,即拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、替比夫定(telbivudine, LdT)和替诺福韦酯(tenоfovir disoproxil, TDF)。抗病毒药物可有效抑制病毒的复制,进而减少肝硬化和肝癌的发生<sup>[1]</sup>。然而由于HBV高复制率、低保真性的特点,易出现病毒基因的变异,最终出现病毒对抗病毒药物的耐药,给进一步治疗带来了难度。HBV DNA为一种部分环状的双链DNA病毒,基因组全长3.2 kb,有4个部分重叠的开放阅读框(open reading frame, ORF),分别为S、C、P和X基因区,其中P区编码DNA多聚酶,具有逆转录酶的活性,核苷(酸)类似物抗病毒作用的靶点是P区,故耐药变异位点均位于P区,即rt(reverse transcriptase)区<sup>[2]</sup>。rtA181位点变异可影响病毒对多种药物的敏感性,并影响病毒复制、HBsAg分泌,且具有潜在的致癌性等。本文就以上内容进行综述。

### 一、rtA181位点变异

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.02.005

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(No. 2014ZX10005001);首都特色应用研究项目(No. Z14110700250000);北京市中医药科技项目(No. JJ2014-25);北京市医院管理局扬帆计划项目(肝炎专业)(No. ZYLX2014-02);登峰计划项目(肝病专业)(No. DFL20151701)

作者单位:100015北京,首都医科大学附属北京地坛医院肝病三科

通信作者:邢卉春, Email: hchxing@sohu.com

1. 目前主要的耐药通路:根据药物分子结构可将HBV对抗HBV NAs耐药模式分为以下4个通路<sup>[3]</sup>:①L-核苷耐药通路:rtM204V/I变异,可引起病毒对LAM和LdT耐药。②无环磷酸盐耐药通路:rtN236T变异,可引起病毒对ADV耐药,并降低对TDF的敏感性。③共享(交叉)耐药通路:rtA181T/V变异可导致病毒对L型核苷(LAM、LdT)和ADV耐药,并降低对TDF的敏感性。④D-环戊烷类(ETV)耐药通路:在rtL180M + rtM204V/I的基础上再加上rtT184、rtS202或rtM250至少一个位点变异时,病毒对ETV敏感性降低。

2. rtA181位点变异类型:rtA181位点变异类型有rtA181T、rtA181V、rtA181S和rtA181C等。rtA181位点变异还常与其他变异同时出现,一项大样本研究显示,单独发生rtA181T耐药变异者占40.0%(66/165),与rtA181V/N236T共存者占46.1%(76/165),rtM204V/rtM204I共存者占12.1%(20/165);还有1.8%为多重耐药变异株,均为rtA181T + M204V/I + N236T<sup>[4]</sup>。

3. rtA181位点变异的发生率:国内一项对3 013例慢性乙型肝炎患者进行HBV测序分析结果显示,5.5%(165/3 013)患者可检测出rtA181T变异<sup>[4]</sup>。针对rtA181不同变异形式的发生率,一项回顾性研究以54例HBV rtA181位点变异的患者为研究对象,结果发现57.5%患者包含rtA181T变异,35.2%患者包含rtA181V变异,7.4%患者同时包含rtA181T和rtA181V的混合变异株<sup>[5]</sup>。

4. 发生rtA181位点变异患者的既往用药史: 发生rtA181位点变异患者的既往抗病毒药多为LAM和(或)ADV。Jiang等<sup>[6]</sup>研究显示, ADV单药治疗发生耐药者出现rtA181T变异的总发生率为70.89% (56/79), 而刘海霞等<sup>[7]</sup>发现在11例LAM治疗失败的患者中出现rtA181V位点变异者有1例(占9.0%), 而9例ADV治疗失败患者中出现rtA181T单位点变异4例(占44.4%), 另有1例(11.1%)出现rtA181T + rtN236T联合变异。还有研究分析联合变异与用药模式的关系, 结果显示应用多种NAs者, 多位点变异的比率较应用单一药物者高, 易出现多位点变异和多重耐药<sup>[5]</sup>。另外, 解放军第302医院一项研究发现, 5例使用ETV治疗的患者出现rtA181T/V变异, 但这些患者对ETV治疗有应答, 并未引起HBV DNA反弹, 认为该变异为病毒基因的自然变异<sup>[8]</sup>。国内有学者对未使用抗病毒治疗的患者进行耐药分析, 发现81例患者中4例(检出率为4.9%)检测到预存耐药变异, 均为rtA181T位点<sup>[9]</sup>。

## 二、rtA181位点变异与体外药物试验

多项体外药物试验研究显示rtA181位点变异可使HBV对多种NAs敏感性下降。Villet等<sup>[10]</sup>从10例对LAM和(或)ADV耐药的患者分离出rtA181T/V变异株, 转染Huh7细胞后检测病毒对各种NAs的敏感性, 结果显示rtA181T/V变异的HBV对LAM的敏感性下降10倍, 对ADV的敏感性下降2~8倍, 对TDF的敏感性仅下降2~3倍, 而对ETV敏感性未下降。另一项体外试验<sup>[11]</sup>显示, rtA181V变异对ADV敏感性下降了4.3倍, 对其他多种NAs的敏感性下降的幅度从3.2倍(TDF)~191倍(克拉夫定)。另外, 值得注意的是, rtA181T + rtN236T联合变异对以上3种药物敏感性下降的幅度较rtA181T单位点变异更大, 如rtA181V + rtN236T联合变异对ADV敏感性下降了18倍。

## 三、rtA181T变异与HBV表面抗原之间的关系

HBV是一种含包膜的病毒。包膜蛋白由pre-S1、pre-S2和S基因编码。广义的HBsAg包括主要表面蛋白(S蛋白或小分子HBsAg), 中分子HBsAg(S、pre-S2蛋白)和大分子HBsAg(S、pre-S2和pre-S1蛋白)。临床检测的HBsAg是指S蛋白, 由226个氨基酸残基组成, 存在糖基化和非糖基化两种形式。pre-S1蛋白由108-109个氨基酸残基组成, N-端游离, C-端与S2蛋白的N端相连, 不含糖基。pre-S2蛋白由55个氨基酸残基组成, N-端游离, C-端与S蛋白的N端相连, 含有糖基。包膜蛋白基因与多聚酶基因完全重叠<sup>[12]</sup>。因此, 多聚酶基因变异将相应地引起包膜蛋白基因的变异。

S基因变异可使其编码的pre-S/S蛋白产生错义突变、无义突变或者沉默突变, 部分常见逆转录酶区变异引起S区变异如表1所示<sup>[13]</sup>。其中, rtA181T变异不仅可导致sW172\*变异, 还可变异为sW172S<sup>[14]</sup>、sW172L变异等<sup>[15]</sup>。Rodriguez等<sup>[16]</sup>研究发现, rtA181T变异者中有80%~90%发

生sW172\*变异。rtA181T/sW172\*为rtA181T变异后使包膜蛋白的172位色氨酸表达终止, 羧基末端疏水区的后55个氨基酸残基丢失, 生成截短的S蛋白, 分子量减少6 kD。一项收集1 440例患者的SeqHepB数据库<sup>[17]</sup>显示, 对LAM耐药者rtA181T/sW172\*的检出率为1%, rtA181T/sW172\*合并M204I/V者检出率为1%。在ADV耐药患者中rtA181T/sW172\*检出率为11%, 合并rtN236T者为7%。在使用LAM后又联合ADV治疗的患者中rtA181T/sW172\*合并rtM204I的检出率为42%, 未治疗患者中rtA181T/sW172\*的检出率仅为0.2%。

Warner等<sup>[18]</sup>通过Western blot、免疫组织化学以及电子显微镜等多种方法证实, rtA181T/sW172\*变异后生成截短的S蛋白滞留于细胞内, 可使向细胞外分泌的表面蛋白减少。当rtA181T/sW172\*变异株与野生株共存在时, 胞内截短的S蛋白随sW172\*变异株比例增加而增加, 而当野生株比例增加时, 截短的表面蛋白则也可分泌到上清液中。该研究还证明了发生S蛋白截短时, 病毒颗粒向细胞外的分泌减少, 截短的表面蛋白可使表面蛋白的糖基化减少。李新艳等<sup>[19]</sup>研究也证实, rtA181T/sW172\*变异后生成的截短S蛋白滞留于细胞内, 当rtA181T/sW172\*变异株与野生株共存在时, 截短的S蛋白在细胞内的含量随sW172\*变异株比例增加而增加。Dai等<sup>[20]</sup>分别构建出rtA181T/sW172\*变异质粒和野生质粒转染的鼠模型, 在第1天、3天、5天、7天、10天、12天和15天分别检测两种鼠模型的血清和肝脏组织中HBsAg, HBV DNA、HBcAg含量。研究表明, rtA181T/sW172\*变异可使鼠血清中HBsAg分泌减少, 同时血清中HBV DNA含量也下降, 然而肝脏组织中HBsAg和HBV DNA含量却升高。

## 四、rtA181T变异对HBV DNA的影响

表1 逆转录酶(rt)基因区变异相应的HBsAg变异

rt变异	相应HBsAg变异
rtF166L	sF158Y
rtI169T	sF161L
rtV173L	sE164D
rtA181V	sL173F
rtS184G	sL/V176G
rtS202I	sV194F
rtA204V	sI195M
rtM204I	sW196S/L
rtA181T	sW172*
rtV191I	sW182*
rtM204I	sW196*
rtV207I	sW199*
rtL180M	无氨基酸改变
rtA194T	无氨基酸改变
rtN236T	无氨基酸改变

目前,有关rtA181位点变异后对HBV DNA的影响,体外细胞研究多证实rtA181位点变异可使HBV DNA分泌减少。Warner等<sup>[18]</sup>构建rtA181T变异质粒转染Huh7细胞,发现转染细胞内的复制中间体较野生株明显减少,变异株质粒转染的细胞培养上清中的HBV DNA较野生株减少。Zhou等<sup>[15]</sup>研究也得到了相同的结果。另外,还有体外实验证实,rtA181T、rtA181V变异的病毒株,在体外复制能力较野生株降低,分别为野生株的94.2%和89.0%<sup>[21]</sup>。

而在临床研究中,rtA181T变异对HBV DNA复制的影响结果则不尽相同。国外一项回顾性研究表明,LAM耐药后换用(或加用)ADV的患者,发生rtA181变异者会表现出HBV DNA的病毒学应答不佳<sup>[22]</sup>。国内另一项研究表明,包含rtA181T变异的患者HBV DNA水平较不包含rtA181T变异的低<sup>[23]</sup>。而李晓东等<sup>[4]</sup>研究结果则表明,rtA181变异患者中有73.9%(122/165)体内同时存在rtA181变异株和野生株,这部分患者中rtA181变异对其HBsAg和HBV DNA分泌几乎无影响。因变异株多与野生株共同存在,推测临床上出现不同的结果可能与病毒准种有关。

#### 五、rtA181T/sW172\*变异与肿瘤发生的相关性

有关S基因突变与肿瘤发生的相关性研究较多的是pre-S基因突变。以往研究集中在肝癌细胞中整合的HBV DNA的pre-S区可产生截短突变<sup>[24]</sup>。有研究发现在S基因第122~139密码子间存在一个反式激活区,在该区域内出现终止子生成的截短型中S蛋白可反式激活多种基因启动子<sup>[25]</sup>。而rtA181T/sW172\*变异株中的终止子临近“反式活性开启区”,是否可引起肿瘤呢?

Lai等<sup>[26-27]</sup>和Yeh等<sup>[28]</sup>对一位39岁的HBV e抗原阳性、HBsAg阴性、从未接受过LAM及ADV治疗的肝细胞癌患者进行了研究,虽然其HBsAg阴性,但在其未发生肿瘤的肝脏组织中却检测出HBsAg和HBcAb,表明此位患者确实感染了HBV,但其HBsAg未能分泌。研究采用PCR方法对患者的血清、肝脏肿瘤组织和未发生肿瘤的组织分别进行核酸检测,均能检测出rtA181T/sW172\*变异。该反式激活试验表明,pre-S/S变异可反式激活猿猴病毒40和人类c-Myc启动子,但不能反式激活c-Fos启动子。其还将能分别稳定表达pre-S/S野生株、变异株及空白对照的NIH3T3细胞注射入裸鼠体内,结果表明5只裸鼠中有4只注射了可表达rtA181T/sW172\*的NIH3T3细胞的鼠发生肿瘤,而野生株及空白对照的细胞则均未产生肿瘤。随后,Lai等<sup>[27]</sup>进行了更大样本的研究,141例肝癌患者中有8例为曾使用LAM的HBsAg阳性患者,对这8例患者的血清和肝组织进行研究,结果表明这8例患者中有7例S基因发生包含rtA181T/sW172\*的变异。其将含有临近“反式激活开启区”的可生成截短蛋白的第15、21、156、172位密码子(即sL15\*、sL21\*、sW156\*、sW172\*)变异的序列分别构建质粒转染HepG2细胞,分别

测定其反式激活癌基因启动子如猿猴病毒40、c-Myc启动子、c-Fos启动子的能力,其中sW172\*变异反式激活猿猴病毒40、c-Myc启动子、c-Fos启动子的能力分别为4.5倍、5.3倍、1.9倍,可稳定表达sL21\*、sW156\*、sW172\*的NIH3T3细胞在裸鼠中产生了肿瘤。

有关rtA181T/sW172\*的致瘤性临床研究较少。Yeh等<sup>[28]</sup>对123例LAM耐药者进行了临床研究,平均随访(26.2±16.4)个月,对其进行基因测序发现有10例(10/123)患者检出rtA181T变异,其中有3例(3/10)发生肝细胞癌,而非rtA181T变异者中仅有2例(2/113)发生肝细胞癌,Kaplan-Meier生存分析显示:rtA181T/sW172\*变异( $P < 0.001$ )、年龄大于50岁( $P = 0.001$ )、肝脏纤维化( $P < 0.001$ )与肝细胞癌的发生呈显著相关。

综上所述,rtA181变异可产生多种耐药形式,为多药交叉耐药位点,目前研究显示对多药敏感性均下降。rtA181T/sW172\*变异在体外实验中多显示可使上清液中HBV DNA含量减少,但临床研究中,因个体内HBV异质性临床数据有限、样本量不大,结果不尽相同,可能与患者体内存在病毒准种有关。rtA181T/sW172\*变异可影响HBsAg分泌,体外研究表明存在潜在的致瘤性,但相关临床研究尚少。

#### 参 考 文 献

- [1] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. *Gastroenterology*,2009,137(5):1593-1608.
- [2] Rhee SY, Margeridon-Thermet S, Nguyen M H, et al. Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery[J]. *Antiviral Res*,2010,88(3):269-275.
- [3] Gao S, Duan ZP, Coffin CS. Clinical relevance of hepatitis B virus variants[J]. *World J Hepatol*,2015,7(8):1086-1096.
- [4] 李晓东,蒋丽红,李梵,等.乙型肝炎病毒发生rtA181T突变的临床特点与意义分析[J].*中华肝病杂志*,2015,23(1):23-27.
- [5] 姬粉芝,王磊,杨保华,等. rtA181 位点突变乙型肝炎病毒感染患者的临床特点及个体化再治疗效果[J].*中华肝病杂志*,2012,20(4):280-284.
- [6] Jiang SW, Yao LP, Hu AR, et al. Resistant mutants induced by adefovir dipivoxil in hepatitis B virus isolates[J]. *World J Gastroenterol*,2014,20(45):17100-17106.
- [7] 刘海霞,李娟,朱跃科,等.核苷类似物抗病毒治疗失败的慢性乙型肝炎患者基因型耐药分析[J].*临床荟萃*,2011,26(16):1385-1387.
- [8] 恩替卡韦临床应用专家委员会.恩替卡韦临床应用专家共识:2015年更新[J].*临床肝胆病杂志*,2016,32(1):32-39.
- [9] 刘晓彦,徐纯琼,张栩,等.未进行抗病毒治疗慢性乙型肝炎81例预存耐药分析[J].*临床荟萃*,2013,28(8):887-888.
- [10] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure[J]. *J Hepatol*,2008,48(5):747-755.
- [11] Qi X, Xiong S, Yang H, et al. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents[J]. *Antivir Ther*,2007,12(3):355-362.



- [12] Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus[J]. *J Clin Virol*,2002,25(2):97-106.
- [13] Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy[J]. *Antivir Ther*,2010,15(3):471-475.
- [14] 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.
- [15] Zhou LY, Chen EQ, Wang ML, et al. Biological characteristics comparison of HBV rtA181T mutants with truncated or substituted HBsAg expression in vitro and in vivo model systems[J]. *Sci Rep*,2016,6:39260.
- [16] Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, et al. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing[J]. *Hepatology*,2013,58(3):890-901.
- [17] Yuen LK, Ayres A, Littlejohn M, et al. SeqHepB: a sequence analysis program and relational database system for chronic hepatitis B[J]. *Antiviral Res*,2007,75(1):64-74.
- [18] 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.
- [19] 李新艳, 尹有宽, 张继明, 等. 阿德福韦耐药乙型肝炎病毒毒株生物学特性的研究[J]. *中华传染病杂志*,2009(8):478-483.
- [20] Dai J, Chen EQ, Bai L, et al. Biological characteristics of the rtA181T/sW172\* mutant strain of Hepatitis B virus in animal model[J]. *Virol J*,2012,9:280.
- [21] 王江华, 李俊强, 蒋栋, 等. 乙型肝炎病毒rtA181V/T和rtN236T变异ADV耐药株表达质粒的构建及其病毒学特征[J]. *中华检验医学杂志*,2007,30(9):1035-1039.
- [22] Gaia S, Barbon V, Smedile A, et al. Lamivudine-resistant chronic hepatitis B: an observational study on adefovir in monotherapy or in combination with lamivudine[J]. *J Hepatol*,2008,48(4):540-547.
- [23] 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):94-97.
- [24] Kekule AS, Lauer U, Meyer M, et al. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator[J]. *Nature*,1990,343(6257):457-461.
- [25] Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, et al. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene[J]. *J Virol*,1992,66(9):5284-5289.
- [26] Lai MW, Yeh CT. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/surface truncation mutant[J]. *Antivir Ther*,2008,13(7):875-879.
- [27] Lai MW, Huang SF, Hsu CW, et al. Identification of nonsense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy[J]. *Antivir Ther*,2009,14(2):249-261.
- [28] 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*,2011,11:398.

(收稿日期: 2016-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

庞婷, 邢卉春. 乙型肝炎病毒rtA181位点变异特点及其临床意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2017,11(2):125-128.