

· 综述 ·

慢性乙型肝炎患者病毒准种的研究进展

任玉莲¹ 宋修光²

【摘要】由于乙型肝炎病毒(HBV)的逆转录酶缺乏校正活性,在病毒复制过程中产生大量核苷酸错配,故HBV在宿主体内表现为大量在遗传学上高度相关而又有差别的病毒群体,这一群体称为准种,宿主体内的病毒准种在宿主免疫压力和药物的选择压力下不断发生动态变化,因此HBV准种变化在慢性乙型肝炎的抗病毒治疗、耐药检测以及预后等方面均有重要作用。本文对HBV准种变化与慢性乙型肝炎进展的关系作一综述。

【关键词】肝炎,乙型,慢性;准种;抗病毒治疗

Research progress on hepatitis B virus quasispecies of chronic hepatitis B Ren Yulian, Song Xiuguang.

¹Talent Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; ²The 6th Department, Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China

Corresponding author: Song Xiuguang, Email: songxiuguang@sina.com

【Abstract】HBV reverse transcriptase lacks proof-reading capacity, which lead to mutation and genetic variation during replication. Consequently, HBV circulates in vivo as a viral population with a spectrum of genetically distinct but closely related variants, known as quasispecies. The quasispecies have dynamic change on immune pressure and antiviral treatment, and play an important role on the antiviral treatment, drug resistance and outcome of chronic hepatitis B. This paper reviews about the quasispecies change on the progress of chronic hepatitis B.

【Key words】Chronic hepatitis B; Quasispecies; Antiviral treatment

准种是用于描述同种生物遗传异质性的概念,表现为呈相互作用的动态变异群体,呈突变株围绕优势株分布。由于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的逆转录酶缺乏校正活性,在病毒复制过程中产生大量的核苷酸错配,故HBV在体内以准种形式存在。Blum等^[1]首先提出HBV准种假说,1997年Ngui等^[2]报道了HBV基因组前-C/C区存在准种分布,首次证实了HBV准种的存在,后续研究相继证实了HBV基因组S区, P区及BCP区均存在准种分布^[3-4]。病毒准种不仅仅是不同突变体的集合,而是相互作用的变异群体,因此,从此观点出发,进化选择的目标是病毒群体而非个体,故研究HBV准种变化对探讨HBV感染转归具有重要意义,现对HBV准种与慢性乙型肝炎疾病及其与抗病毒治疗的关系作一综述。

一、HBV准种的检测方法

准种研究的传统方法为克隆测序,该方法可对病毒准种的单个病毒株进行研究。获得同一患者体内病毒的多个克隆株后,可用于描述HBV的准种特征,包括突变速率、

突变频率、进化速率以及准种异质性^[5]。但克隆测序存在一定的局限性,即当进行多个克隆测序时,实验条件要求高,花费较大,且当突变体所占比例较少时检测灵敏度较低^[6]。除直接测序,还有其他分子生物学技术也可间接检测准种存在,可针对特定位点的变异进行检测。例如最常用的为线性探针反向杂交技术能检测到含量大于5%的突变体,PCR-限制性片段长度多态性分析,熔点分析,质谱分析法和DNA芯片技术等。这些方法虽能区分不同的混合体,但不能检测同一个病毒基因组的多个变异位点,故不能准确描述准种组成。

近年来随着第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)的出现,病毒准种研究开创了新的局面。第二代测序平台可以同时成千上万个克隆序列进行测序,并且提供有力的生物信息学工具对准种特征进行分析描述^[7]。目前第二代测序主要有4个技术平台,最常用的是罗氏公司的GS FLX测序系统,为高通量焦磷酸测序技术(ultra-deep pyrosequencing, UDPS)^[8];随后Illumina公司推出了Solexa基因组分析平台^[9];2007年ABI公司推出了自主研发的SOLiD测序仪^[10]以及由Life Technologies公司推出的Ion Torrent测序系统^[11]。

Gong等^[12]分别比较UDPS和传统克隆测序对HBV基因

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.01.002

作者单位: 250011 济南市, 山东中医药大学附属医院人才中心¹;
250021 济南市, 济南市传染病医院六科²

通信作者: 宋修光, Email: songxiuguang@sina.com

组逆转录酶区进行的准种研究,发现UDPS得到的可用序列较传统克隆测序多,且UDPS方法分析所得到的准种复杂度要高,能够检测到传统克隆测序所检测不到的突变,因此在准种异质性分析方面UDPS较传统克隆测序更为敏感和高效。但高通量测序平台亦有自身的局限性^[13]:首先,测序长度较传统测序要短,UDPS序列读取长度最长约700 bp,HBV基因组序列约为3.2 kb,因而不能有效进行长片段以及全基因组序列分析。其次,测序平台自带软件中生物信息学过滤是确定存在核苷酸替代的主要方法,但目前对于插入突变与缺失突变尚不能完全优化,然而在HBV基因组中存在大量插入与缺失突变,尤其是X读码区和前C区^[14-15],在一定程度上提高了错误率。

二、慢性乙型肝炎自然进程中HBV准种的动态变化

慢性乙型肝炎的自然史一般分为3个阶段:免疫耐受期、免疫清除期和HBeAg血清学转换后的非活动期,部分患者可发生HBeAg阴性的肝炎活动,仅有极少数患者可出现HBsAg血清学转换摆脱慢性乙型肝炎感染状态^[16]。自然状态下,宿主免疫压力是HBV准种进化的主要动力,每年有2%~15%的患者出现自发性HBeAg血清学转换,多项研究表明在慢性乙型肝炎自然进程中发生HBV准种的动态变化。Cheng等^[17]研究在自然状态下8例发生HBeAg转换与7例未转换患者在转换前的前-C/C区准种变化,发现在转换前10年的免疫耐受期转换组和非转换组患者病毒准种多样性一致,但是转换前7年转换组患者准种多样性发生率开始上升。将要发生转换时,转换组准种多样性发生率是免疫耐受期的9.3倍,但非转换组患者无显著变化,大部分转换患者在HBV基因组C区发现了正选择位点,表明在基因组C区的部分氨基酸替代更加适应免疫清除过程。Wang等^[18]对自然状态下7例HBeAg阳性患者从免疫耐受期进行长达17年的随访并进行HBV全基因组准种分析,发现在免疫清除期随着病毒量的下降,病毒准种多样性增加,且大部分正选择位点均出现在免疫表位区。以上病毒准种进化的模式提示,在免疫耐受阶段由于无有效的免疫刺激,病毒准种在免疫压力下形成一个稳态,进入免疫清除期后随着免疫压力的上升,在机体免疫系统清除病毒的情况下,HBV病毒载量下降,同时部分病毒株出现免疫逃逸使准种多样性升高。随着免疫清除的进展,病毒准种多样性的上升使病毒持续逃逸,但HBeAg血清学转换这一免疫事件的发生提示可能出现了免疫刺激变异,刺激宿主免疫力能够控制病毒,使免疫清除终止,进而进入免疫控制期;免疫表位区出现正选择位点提示在免疫清除期也许出现了免疫刺激变异^[17]。对于持续免疫清除未发生血清学转换的患者,Homs等^[19]通过UDPS研究1例免疫清除未转换患者,发现在免疫清除期病毒核心区域的变异性下降,在基线期仅占群体1.31%的准种在宿主免疫压力的作用下成为优势株,提示这一准种相对于优势

准种在宿主免疫压力下有更好的适应性,从而被选择出来成为新的优势准种。

三、抗病毒治疗过程中HBV准种的变化

慢性乙型肝炎患者体内HBV准种的性质和特点是病毒准种不同组分的复制能力和机体免疫力相互作用最终达到一种平衡的结果,但在进行抗病毒治疗时,这种平衡被打破,在药物选择的作用下,形成新的平衡,各种病毒种群所占的相对比率也进行新的调整,对抗病毒药物有不同应答的患者有不同的病毒准种进化模式。

(一)核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NAs]治疗过程中HBV准种变化

1. NAs治疗过程中HBV准种进化模式:NAs治疗过程中准种变化与抗病毒疗效有密切关系,对NAs有不同应答的患者在治疗过程中病毒准种进化模式不同。以是否发生病毒学应答为观察截点的研究发现抗病毒治疗早期HBV逆转录区的准种变化与发生持续病毒学应答相关。Chen等^[20]研究接受拉米夫定抗病毒治疗48周的25例中国患者,结果显示应答组和无应答组患者治疗前的准种特征差异无统计学意义,但应答患者与无应答患者HBV病毒有不同的进化模式,应答组患者病毒快速地进化为结构简单、变异少的病毒准种,而无应答组患者病毒则缓慢地进化为结构复杂、变异增多的病毒准种,治疗第4周应答组的准种复杂性和准种多样性显著低于无应答组。Tong等^[21]纳入6例接受恩替卡韦治疗的慢性乙型肝炎患者,其中4例发生病毒学应答,2例在治疗24周时发生病毒学突破,结果显示第4周应答组的准种复杂度和准种多样性较病毒学突破者低。Liu等^[22]研究恩替卡韦抗病毒治疗过程中HBV的准种变化,发现应答组治疗第4周病毒准种复杂度下降,但准种多样性升高。以上研究人群均为中国患者,Peveling-Oberhag等^[23]研究拉米夫定/替比夫定治疗德国慢性乙型肝炎患者早期逆转录酶区准种的动态变化,发现拉米夫定/替比夫定治疗早期HBV准种复杂度下降与后期病毒学应答相关。以上研究显示不论是接受拉米夫、替比夫定治疗还是恩替卡韦治疗,在治疗早期应答组的准种复杂度均下降,这种模式改变归结于宿主免疫压力以及抗病毒药物的选择压力,在治疗早期阶段抗病毒药物的选择压力很大程度上调节了准种的变化,是早期病毒准种进化的主要推动力。在不同种族患者中均观察到应答患者与无应答患者在NA治疗过程中有不同的进化模式,应答组患者治疗早期逆转录酶区均出现了准种复杂度的下降,提示治疗早期逆转录酶区准种复杂度变化可以作为预测核苷(酸)类似物治疗过程中病毒学应答的新一检测指标。

如果以治疗过程中发生HBeAg血清学转换为观察截点,则转换组与非转换组患者的准种进化模式也不同。Cheng等^[24]比较拉米夫定治疗过程中出现HBeAg转换患者

和非转换患者的前-C/C区的准种特征,在长达6年的观察过程中发现接受拉米夫定治疗后两组患者的准种多样性均升高,发生血清学转换者的准种多样性升高是非转换者的2.1倍,准种多样性的升高与病毒量的下降呈正相关,转换者T细胞表位和B细胞表位出现氨基酸位点的正选择,这一结果提示前-C/C区准种多样性的升高与拉米夫定诱导的HBeAg血清学转换相关。推测与拉米夫定治疗过程出现的基因突变刺激免疫应答有关:首先,转换患者的氨基酸替代较非转换患者多,尤其是位于免疫表位区的突变可以让突变毒株在宿主免疫压力增强的情况下产生新表位。其次,伴随准种多样性的升高,核苷酸替代增加能够产生CpG模体,增强TLR9和其他TLR9依赖的固有免疫应答,进而使适应性免疫应答增强。这一研究结果与既往以病毒学应答分组研究结果不同,显示拉米夫定治疗过程中不同基因片段有不同的进化模式,但Chen等^[20]研究仅关注了NAs治疗早期病毒准种变化,故有必要对NAs治疗全程进行序贯取样,分析HBV全基因组在治疗过程中准种的动态变化,以期证实病毒学应答与血清学应答过程中不同区段准种变化的内在联系。

2. NAs耐药过程中的病毒准种变化:随着NAs的广泛应用,长期用药过程中伴随的耐药问题逐渐受到重视。cccDNA是HBV的转录模板,但NAs不能干扰其合成,致使cccDNA稳定地存在于肝细胞中很难被清除,cccDNA是HBV的准种池^[13]。已有多项研究^[25-26]证实部分患者在NAs治疗前就存在少量耐药准种。在抗病毒药物压力下,血清中野生株迅速被抑制,预存耐药变异毒株此时却获得了更多的复制空间,伴随病毒复制的累积可被迅速筛选为优势准种。NAs对变异株的抗病毒活性显著下降,此时种群整体功能表现为对该种NAs的敏感性降低。Rodriguez等^[27]采用UDPS法研究了7例阿德福韦酯单药治疗失败患者治疗过程中各个时间点耐药准种变化,结果发现在阿德福韦酯初治的患者治疗前就存在低比例的不同类型耐药准种,治疗过程中含有阿德福韦酯耐药准种数量不断提高,优势准种数量不断减少,进而出现耐药。

在NAs治疗过程中应答组患者取得病毒学应答的时间长短不一,从数周到数月不等。Solmone等^[28]研究初治患者接受恩替卡韦治疗过程中快速应答患者与缓慢应答者HBsAg/RT区的准种变化,发现治疗基线虽然存在少量耐药突变,但治疗过程中耐药突变并没有选择出来。快速应答组患者表面抗原选择压力大于缓慢应答组,尤其是在CTL表位区,提示恩替卡韦应答缓慢并不是因治疗过程出现了耐药突变,在抗病毒治疗早期清除感染肝细胞时宿主免疫反应可能起了主要作用。因此有必要对NAs的耐药机制进行进一步研究,以揭示在耐药过程中病毒基因特征与宿主免疫应答的相互作用。

(二) 干扰素治疗过程中HBV病毒的进化模式

干扰素敏感区位于前-C/C区,现在关于干扰素治疗过程中HBV的准种进化研究主要集中在前-C/C区和X区。Lim等^[29]应用生物学信息学的方法研究了B基因型HBV前-C/C基因区准种演变与干扰素- α 治疗后发生HBeAg血清学转换的关系,结果发现HBeAg血清学转换的患者在转换之前的准种多样性和变异频率显著高于未发生HBeAg血清学转换的患者,而且在发生转换后准种多样性明显高于转换前。Wu等^[30]研究C基因型的准种变化也得到了类似的结论,提示HBeAg血清转换前准种多样性的升高可能与打破免疫耐受有关,随着免疫增强而不能完全清除病毒,反过来促进HBV免疫逃逸,使准种多样性增加。最近研究相继报道不论是自发诱导还是核苷(酸)类似物或干扰素诱导的HBeAg血清学转换^[17, 24, 30],于转换前随着病毒量的下降呈现一致的前-C/C准种进化模式,HBeAg血清学转换者在转换前均有准种多样性的上升,提示准种多样性上升可能是HBeAg血清学转换的预测因素。

综上所述,HBV的准种进化与慢性乙型肝炎自然进程及抗病毒治疗过程密切相关,随着基因测序检测手段的进一步发展,对HBV准种的了解也在不断深入,HBV的准种异质性可能成为慢性乙型肝炎临床转归及抗病毒疗效的有效预测因素,故有必要对HBV准种进行深入研究,为探讨乙型肝炎患者的转归及抗病毒治疗提供有效的依据。

参 考 文 献

- [1] Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants[J]. Intervirology,1993,35(1-4):40-50.
- [2] Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents[J]. J Viral Hepat,1997,4(5):309-315.
- [3] 兰林,王宇明,黄燕萍. 慢性乙型肝炎患者病毒准种特性的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志,2003,11(4):219-221.
- [4] 董菁,成军,王勤环,等. 乙型肝炎病毒C基因启动子区准种与变异特点的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2002,16(3):264-266.
- [5] Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2012,76(2):159-216.
- [6] Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, et al. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: Mass sequencing approach[J]. World J Gastroenterol,2013,19(41):6995-7023.
- [7] Solmone M, Vincenti D, Prosperi M C, et al. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naive patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen[J]. J Virol,2009,83(4):1718-1726.
- [8] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature,2005,437(7057):376-380.
- [9] Bentley SD, Parkhill J. Comparative genomic structure of prokaryotes[J]. Annu Rev Genet,2004,38:771-792.

- [10] Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends Genet, 2008, 24(3): 133-141.
- [11] Merriman B, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing[J]. Electrophoresis, 2012, 33(23): 3397-3417.
- [12] Gong L, Han Y, Chen L, et al. Comparison of next-generation sequencing and clone-based sequencing in analysis of hepatitis B virus reverse transcriptase quasispecies heterogeneity[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 4087-4094.
- [13] Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, et al. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: Mass sequencing approach[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(41): 6995-7023.
- [14] Li KS, Yamashiro T, Sumie A, et al. Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low viral replication activity in anti-HBe positive carriers[J]. J Clin Virol, 2001, 23(1-2): 97-106.
- [15] Kohno K, Nishizono A, Terao H, et al. Reduced transcription and progeny virus production of hepatitis B virus containing an 8-bp deletion in basic core promoter[J]. J Med Virol, 2000, 61(1): 15-22.
- [16] Wu JF, Chang MH. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life - the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts[J]. J Biomed Sci, 2015, 22(4): 92-98.
- [17] Cheng Y, Guindon S, Rodrigo A, et al. Cumulative viral evolutionary changes in chronic hepatitis B virus infection precedes hepatitis B e antigen seroconversion[J]. Gut, 2013, 62(9): 1347-1355.
- [18] Wang HY, Chien MH, Huang HP, et al. Distinct hepatitis B virus dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases[J]. J Virol, 2010, 84(7): 3454-3463.
- [19] Homs M, Buti M, Tabernero D, et al. Quasispecies dynamics in main core epitopes of hepatitis B virus by ultra-deep-pyrosequencing[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(42): 6096-6105.
- [20] Chen L, Zhang Q, Yu DM, et al. Early changes of hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment and the correlation with antiviral efficacy[J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 895-905.
- [21] Tong J, Li QL, Huang AL, et al. Complexity and diversity of hepatitis B virus quasispecies: Correlation with long-term entecavir antiviral efficacy[J]. Antiviral Res, 2013, 99(3): 312-317.
- [22] Liu F, Chen L, Yu DM, et al. Evolutionary patterns of hepatitis B virus quasispecies under different selective pressures: correlation with antiviral efficacy[J]. Gut, 2011, 60(9): 1269-1277.
- [23] Peveling-Oberhag J, Herrmann E, Kronenberger B, et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies heterogeneity and virologic response in patients receiving low-to-moderate genetic barrier nucleoside analogs[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(4): 234-239.
- [24] Cheng Y, Guindon S, Rodrigo A, et al. Increased viral quasispecies evolution in HBeAg seroconverter patients treated with oral nucleoside therapy[J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 217-224.
- [25] Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35052.
- [26] Pallier C, Rodriguez C, Brillet R, et al. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir[J]. Hepatology, 2009, 49(1): 50-59.
- [27] 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.
- [28] Solmone M, Giombini E, Vincenti D, et al. Slow response to entecavir treatment in treatment-naïve HBV patients is conditioned by immune response rather than by the presence or selection of refractory variants[J]. Antivir Ther, 2014, 19(2): 201-209.
- [29] Lim SG, Cheng Y, Guindon S, et al. Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion[J]. Gastroenterology, 2007, 133(3): 951-958.
- [30] Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, et al. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion[J]. J Hepatol, 2011, 54(1): 19-25.

(收稿日期: 2016-12-20)

(本文编辑: 孙荣华)

任玉莲, 宋修光. 慢性乙型肝炎患者病毒准种的研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(1): 7-10.