

阿德福韦酯耐药慢性乙型肝炎患者 HBsAg变异分析

杨松 李玥 王笑梅 欧蔚妮 邢卉春 成军

【摘要】目的 探讨阿德福韦酯耐药慢性乙型肝炎患者相关S抗原变异、疫苗逃逸相关变异以及部分已知特异性T细胞表位变异情况。**方法** 收集2007年12月至2011年9月于首都医科大学附属北京地坛医院收治的阿德福韦酯治疗失败的慢性乙型肝炎患者70例,并随机选择ADV治疗非耐药患者70例作为对照。采用PCR产物直接测序法获得患者HBV反转录酶区与S抗原序列。应用PCR产物直接测序法与焦磷酸测序法明确阿德福韦酯耐药情况。比较阿德福韦酯耐药患者与无阿德福韦酯耐药患者耐药相关S抗原变异、疫苗逃逸相关变异以及HBV特异性T细胞表位变异情况。**结果** ADV耐药组与对照组患者人口学等指标差异无统计学意义。本组患者中42例rtA181T耐药变异关联的HBsAg变异均为sW172^{*}。在rtA181T/sW172^{*}变异患者体内,该变异株在病毒准种中所占平均比率为(42.6 ± 22.1)% (12.2%~100%)。与非ADV耐药组患者相比,ADV耐药组患者发生HBsAg疫苗逃逸变异($\chi^2 = 12.8736, P = 0.0003$)以及T细胞抗原表位变异($\chi^2 = 4.8344, P = 0.0279$)几率显著升高。**结论** 我国ADV耐药患者rtA181T变异关联的HBsAg变异主要为sW172^{*}变异,HBsAg抗原疫苗逃逸变异以及T细胞抗原表位变异与ADV耐药相互影响,相关机制尚待进一步研究。

【关键词】 肝炎,乙型,慢性;肝炎病毒,乙型;阿德福韦酯;肝炎病毒表面抗原,乙型

HBsAg mutations in patients with chronic hepatitis B undergoing adefovir dipivoxil resistance Yang Song, Li Yue, Wang Xiaomei, Ou Weini, Xing Huichun, Cheng Jun. Division 3 of Center of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: Xing Huichun, Email: huichunxing@126.com

【Abstract】Objective To investigate adefovir dipivoxil (ADV) resistant mutation related HBsAg mutation, vaccine escape mutation and T cell epitope mutations in Chinese patients with chronic hepatitis B (CHB) who underwent adefovir resistance. **Methods** Seventy CHB patients who underwent ADV resistance from December 2007 to September 2011 in Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University were enrolled. While 70 ADV treated patients without ADV resistance were randomly selected as control group. HBV Rt/S ORF were sequenced with PCR product Sanger sequencing and pyrosequencing. ADV resistant mutation related HBsAg mutation, vaccine escape mutation and T cell epitope mutations were compared between ADV treated CHB patients with and without ADV resistance. **Results** Total of 70 ADV resistant patients with CHB were enrolled, while 70 ADV treated CHB patients without ADV resistance were set as control. Baseline characteristics were comparable between the two groups. All 42 rtA181T mutations were related to sW172^{*} mutations. Mean ratio of rtA181T/sW172^{*} mutations in quasispecies was (42.6 ± 22.1)% (12.2%-100%). More patients in resistance group showed vaccine escape mutation ($\chi^2 = 12.8736, P = 0.0003$) and T cell epitope mutations ($\chi^2 = 4.8344, P = 0.0279$) than control group. **Conclusions** In Chinese patients with CHB, rtA181T is mainly related to sW172^{*} mutations. ADV resistance is related to vaccine escape mutation and T cell epitope mutations. Further studies should focus on the possible mechanism.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; Adefovir dipivoxil; Hepatitis B surface antigen

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.03.005

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才队伍建设专项经费(No.2016-108);北京市医院管理局扬帆计划项目(肝炎专业)(No.ZYLX201402);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: huichunxing@126.com

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 治疗的关键是抗病毒治疗, 核苷 (酸) 类似物 [nucleos (t) ide analogues, NAs] 是当前主要的抗病毒药物^[1]。近年来随着对于NAs抗病毒治疗研究的不断深入, NAs治疗过程中不仅会出现耐药相关聚合酶变异, 还可出现乙型肝炎病毒表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 相关变异。NAs治疗过程中HBsAg相关变异主要包括3种, 分别为HBV耐药变异关联的HBsAg变异、HBsAg疫苗逃逸变异与HBsAg抗原表位变异等^[2]。近来研究表明NAs耐药一方面会引起关联的HBsAg变异, 还与HBsAg疫苗逃逸变异以及HBsAg抗原表位变异有关^[3-6]。为明确我国阿德福韦酯治疗CHB耐药患者HBsAg变异情况, 对2007年12月至2011年9月于首都医科大学附属北京地坛医院诊断为ADV耐药患者的HBV测序及临床资料进行回顾性分析, 并随机选择年龄、性别以及ADV治疗时间等相匹配的非耐药患者作为对照, 初步明确ADV耐药患者相关S抗原变异情况, 现报道如下。

资料与方法

一、患者的临床资料与血清收集

2007年12月至2011年9月共计210例口服ADV患者于本院行耐药检测。其中检出ADV耐药患者70例, 将此70例患者纳入耐药组。另采用随机数字表法按照1:1比例随机选择同期于本院口服ADV但未检出耐药患者70例纳入对照组。回顾性分析ADV耐药组与对照组患者的HBV测序结果及临床资料。CHB及ADV耐药诊断符合我国《慢性乙型肝炎防治指南 (2015年版)》中相关诊断标准^[1]。

二、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; PCR扩增仪由德国Eppendorf公司提供。焦磷酸测序采用HBV耐药突变焦磷酸测序法检测试剂盒[基因科技 (上海) 有限公司]。PCR产物双脱氧法测序由北京奥科生物科技有限公司完成。

三、PCR模板制备与扩增

取患者血清100 μ l, 用Axygen公司提供的试剂盒提取HBV DNA, 具体操作详见试剂盒说明书。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 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 50 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min 10 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 50 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min 10 s, 共40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。PCR产物经纯化后直接用于双脱氧法及焦磷酸测序分析。

四、PCR产物双脱氧法与焦磷酸测序

上述PCR产物由北京奥科生物科技有限公司进行纯化、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、Chromas软件对测序结果进行耐药位点分析。同样, 取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, 焦磷酸测序法可同时检测ADV耐药变异关联的HBsAg变异株在准种中所占比率^[7-8]。

五、ADV耐药变异、耐药相关HBsAg变异、HBsAg疫苗逃逸变异以及抗原表位变异分析

将PCR产物直接测序序列输入德国Geno2pheno在线序列分析软件, 可获得序列对应NAs耐药变异、NAs耐药变异关联HBsAg变异HBsAg疫苗逃逸变异以及HBsAg上T细胞抗原表位变异情况。其中ADV耐药位点包括rtA181T/V、rtN236T变异。耐药关联的HBsAg变异包括rtA181T/sW172*变异、rtA181T/s/sW172S、rtA181V/sW173L和rtA181V/sW173F变异。HBsAg疫苗逃逸变异位点包括HBsAg α 抗原决定簇第100~147位氨基酸的共66种变异, 包括Y100C、S117T、P120S、I126V/S、Q129R/H、G130N、T131N、M133T、D134E、N139K和G145A/R等^[9]。HBsAg的T细胞表位变异主要包括sL20W/S和sF220Y/C等^[6]。

六、统计学处理

应用SPSS 11.5软件进行统计分析, 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

共入组ADV耐药的CHB患者70例，对照组患者70例，两组患者一般情况如表1所示。可见两组患者在性别比、年龄、ADV治疗时间、HBV DNA载量以及基因型等差异均无统计学意义（ P 均 >0.05 ）。

二、CHB患者耐药相关HBsAg变异发生率

本组患者共检出ADV耐药变异70例，检出ADV耐药变异类型及数量如表2所示；上述耐药变异关联HBsAg变异主要为rtA181T/sW172*变异，未检出rtA181T/sW172S变异。共检出sW172*变异42例。RtA181V以及rtN236T变异未引起HBsAg变异。

本研究对检出的rtA181T/sW172*变异在准种中所占比率应用焦磷酸测序法进一步分析，其中31例患者成功测序并计算rtA181T/sW172*变异在准种中

所占比率（图1），在检出rtA181T/sW172*变异的31例患者中，该变异株在准种中所占平均比率为（ 42.6 ± 22.1 ）%（12.2%~100%）。

三、HBsAg疫苗逃逸变异

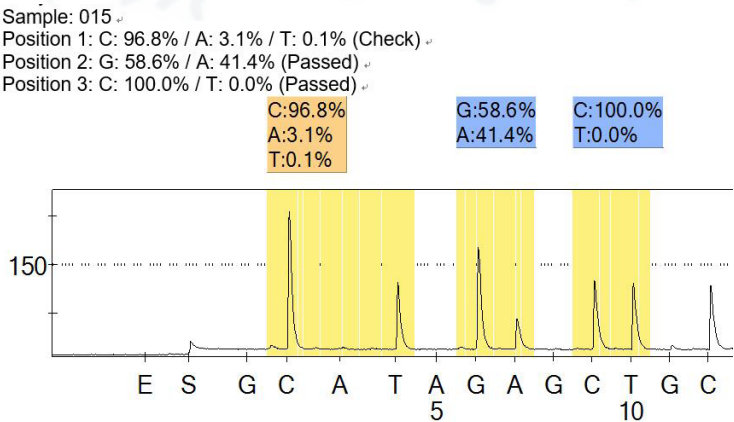
两组患者检出HBsAg疫苗逃逸变异的类型及数量如表3所示。ADV耐药患者共有14例（20%）患者检出HBsAg疫苗逃逸变异，对照组患者检出HBsAg疫苗逃逸变异4例（5.7%），两组差异具有统计学意义（ $\chi^2 = 12.8736$ 、 $P = 0.0003$ ）。在耐药组患者中HBsAg疫苗逃逸变异以sG145A/R变异为主（4/14、28.6%），另外有2例患者为多位点HBsAg疫苗逃逸变异（2/14、14.3%）。

四、HBsAg的T细胞抗原表位变异

本研究检测的T细胞表位变异包括sL20W/S与sF220Y/C。其中对照组共检出sL20S与sF220L变异患者各1例；耐药组患者检出sL20S变异7例，sF220L/C变异2例，两组差异具有统计学意义（ $\chi^2 = 4.8344$ 、 $P = 0.0279$ ）。

表1 ADV 耐药与无耐药 CHB 患者的一般资料

相关指标	ADV耐药组（70例）	无ADV耐药组（70例）	统计量	P 值
男性 [例（%）]	56（80.0）	62（88.6）	$\chi^2 = 1.162$	0.281
年龄（岁）				
平均年龄	35.8	35.5	$t = 0.151$	0.880
年龄范围	27~70	18~67		
ADV治疗时间（ $\bar{x} \pm s$ ，月）	21.6 ± 11.6	19.2 ± 10.0	$t = 1.246$	0.215
HBV DNA（ $\bar{x} \pm s$ ， \log_{10} IU/ml）	4.9 ± 1.2	5.1 ± 1.2	$t = 0.706$	0.482
基因型 [例（%）]				
B型	11（15.7）	16（22.9）		
C型	59（84.3）	54（77.1）	$\chi^2 = 1.147$	0.284



注：rt181 位点编码 ACC 比例为 41.4%，而 GCC 编码比率为 58.6%。实线箭头提示为在测序结果中首位核苷酸分别为 G 与 A 的信号；虚线箭头为根据信号计算的耐药株比率

图1 焦磷酸测序法对rtA181位点核苷酸编码分析

表2 ADV 耐药患者的耐药变异 [例 (%)]

耐药变异类型	耐药变异	合并HBsAg变异
rtA181T	28 (40.0)	28 (66.7)
rtA181V	12 (17.1)	0 (0.0)
rtN236T	7 (10.0)	0 (0.0)
rtA181T + rtA181V	1 (1.4)	1 (2.4)
rtA181T + rtN236T	11 (15.7)	11 (26.2)
rtA181V + rtN236T	9 (12.9)	0 (0.0)
rtA181T + rtA181V + rtN236T	2 (2.9)	2 (4.8)
合计	70 (100.0)	42 (100.0)

表3 两组患者检出 HBsAg 疫苗逃逸变异 [例 (%)]

疫苗逃逸变异类型	耐药组	无耐药组
sY100C	2 (14.3)	0 (0.0)
sS117T	1 (7.1)	0 (0.0)
sP120S	0 (0.0)	1 (25.0)
sI126V/S	1 (7.1)	2 (50.0)
sI126S + sT131N + s M133T + sD134E + sN139K	1 (7.1)	0 (0.0)
sI126V + sM133T + sD134S	1 (7.1)	0 (0.0)
sQ129R/H	1 (7.1)	1 (25.0)
sG130N	1 (7.1)	0 (0.0)
sT131N	1 (7.1)	0 (0.0)
sM133L/I	1 (7.1)	0 (0.0)
sG145A/R	4 (28.6)	0 (0.0)
合计	14 (100.0)	4 (100.0)

讨 论

在NAs抗HBV治疗过程中, CHB患者体内HBV准种在药物和机体免疫双重压力下处在动态的演变过程。其中HBV聚合酶区可表现为HBV对NAs的耐药变异; 在HBsAg则表现为NAs耐药关联的HBsAg变异、疫苗逃逸变异与HBsAg上的抗原表位变异^[2]。此外, 有研究表明HBV耐药变异与HBsAg变异存在相互影响。其中最常见的是HBV耐药变异关联的HBsAg变异, 即由于HBV聚合酶编码序列与HBsAg编码序列存在重叠, 导致HBV聚合酶耐药变异可能会伴随HBsAg变异, 如rtA181T/sW172*变异, 该变异会导致HBsAg表达与分泌障碍, 并可能导致肝细胞癌的发生^[4, 10]。rtA181T/V变异关联的HBsAg变异至少包括sW172*变异、sW172S、sW172L、sW173L和sW173F等5种。目前对于rtA181T/V变异关联HBsAg变异的类型及发生率尚无确切研究报道。Wang等^[11]报道25

例rtA181T/V变异患者, 其中7例患者rtA181T变异关联sW172L变异, 6例rtA181T关联sW172*变异, 另外12例rtA181V变异关联sL173F变异。但本研究中42例rtA181T变异均关联sW172*变异, 无sW172S和sW172L变异病例。此外本研究中24例rtA181V变异患者并未关联HBsAg变异, 为我国CHB患者rtA181T/V变异关联的HBsAg变异研究提供了一定证据。

既往研究提示rtA181T/sW172*变异会导致HBsAg表达、组装与病毒分泌障碍, 故rtA181T耐药株需与野生株在患者体内同时存在^[4, 12]。但发生ADV临床耐药患者体内病毒准种中rtA181T/sW172*毒株所占比率尚无确切报道。进一步分析本研究中42例发生rtA181T变异的ADV临床耐药患者, 采用焦磷酸测序法分析rtA181T/sW172*变异在病毒准种中所占比率, 结果提示rtA181T/sW172*变异株在准种中所占平均比率为 $(42.6 \pm 22.1)\%$, 提示即使在ADV临床耐药患者中, rtA181T/sW172*变异也并非全部以优势株形式存在, 以非优势株存在的rtA181T/sW172*变异即可引起临床ADV耐药, 也提示出现rtA181T/sW172*变异的病毒需要野生株HBV表达的HBsAg来完成病毒的组装与分泌^[12]。

HBV聚合酶的复制能力不仅受到聚合酶耐药变异影响, 还受HBsAg与HBcAg等变异影响^[5, 13-14]。Amini-Bavil-Olyaei等^[5]报道HBsAg上的疫苗逃逸变异sG145R会增加拉米夫定耐药变异株的复制能力。Sayan等^[14-15]报道LAM与ADV耐药变异可诱导HBsAg疫苗逃逸变异。本研究比较ADV耐药患者与非耐药患者HBsAg疫苗逃逸变异的发生率, 结果表明ADV耐药患者疫苗逃逸变异发生率显著高于非耐药患者。尤其是在ADV耐药患者中检出4例sG145R/A变异患者, 亦提示HBsAg疫苗逃逸变异与ADV耐药的相关性, 但尚需进一步研究来明确HBsAg疫苗逃逸变异在ADV耐药中的作用。

在机体免疫以及药物的选择压力下, 在CHB患者体内HBV相关抗原的T细胞与B细胞抗原表位处在动态变化中^[16-17]。NAs临床耐药的发生不仅有HBV DNA复制的再活动, 还存在ALT水平升高与肝脏内炎症活动^[18]。Salpini等^[19]报道在HBV再活动的过程中伴随着HLA-I/II类限制性T细胞表位的变异。相应T细胞表位变异可激活T细胞从而引

起对于受HBV感染肝细胞的免疫攻击,从而导致HBV再活动过程中不仅表现为HBV DNA载量升高,还可出现肝脏炎症损伤。本研究比较ADV耐药患者与非耐药患者体内病毒T细胞表位变异发生率,结果表明ADV耐药患者T细胞表位变异发生率显著高于非耐药患者,提示ADV临床耐药过程有可能伴随着T细胞表位的变异,有助于对NAs耐药导致肝细胞损伤机制的理解^[20]。

综上所述,本研究分析了ADV临床耐药患者同时存在的HBsAg耐药变异情况,结果表明我国ADV耐药患者rtA181T/V主要关联的HBsAg变异为sW172*变异,rtA181T/sW172*变异在耐药患者体内准种中以非优势株存在。与非耐药患者相比,ADV耐药患者出现HBsAg疫苗逃逸变异以及其他T细胞抗原表位变异几率显著升高,提示HBsAg抗原变异与ADV耐药存在相互影响,相关机制需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015,(3):1-18.
- [2] Pollicino T, Cacciola I, Saffiotti F, et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications[J]. J Hepatol,2014,61(2):408-417.
- [3] Colson P, Borentain P, Coso D, et al. Hepatitis B virus reactivation in HBsAg-negative patients is associated with emergence of viral strains with mutated HBsAg and reverse transcriptase[J]. Virology,2015,484(1):354-363.
- [4] 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.
- [5] Amini-Bavil-Olyae S, Vucur M, Luedde T, et al. Differential impact of immune escape mutations G145R and P120T on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus e antigen-positive and -negative strains[J]. J Virol,2010,84(2):1026-1033.
- [6] Bauer T, Weinberger K, Jilg W. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals[J]. Hepatology,2002,35(2):455-465.
- [7] 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.
- [8] Yang S, Xing H, Wang Q, et al. De novo entecavir + adefovir dipivoxil + lamivudine triple-resistance mutations resulting from sequential therapy with adefovir dipivoxil, and lamivudine[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2016,15(1):24-28.
- [9] Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, et al. Geno2pheno[HCV]--A Web-based Interpretation System to support hepatitis C treatment decisions in the Era of direct-acting antiviral agents[J]. PLoS One,2016,11(5):e0155869.
- [10] Lai MW, Liang KH, Lin WR, et al. Hepatocarcinogenesis in transgenic mice carrying hepatitis B virus pre-S/S gene with the sW172* mutation[J]. Oncogenesis,2016,5(12):e273.
- [11] Wang LP, Han FZ, Yan XB, et al. Relationship between hepatitis B virus reverse transcriptase 181 mutation and S gene mutation in hepatitis B virus chronically infected patients[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),2016,62(12):18-23.
- [12] 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.
- [13] Cui XJ, Cho YK, Song BC. Influence of the basal core promoter and precore mutation on replication of hepatitis B virus and antiviral susceptibility of different genotypes[J]. J Med Virol,2015,87(4):601-608.
- [14] Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B[J]. Int J Infect Dis,2011,15(10):e722-e726.
- [15] Sayan M, Buğdacı MS. HBV vaccine escape mutations in a chronic hepatitis B patient treated with nucleos(t)ide analogues[J]. Mikrobiyol Bul,2013,47(3):544-549.
- [16] Lin YM, Jow GM, Mu SC, et al. Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children[J]. Sci World J,2013,2013:571875.
- [17] Sun L, Zhang Y, Zhao B, et al. A new unconventional HLA-A2-restricted epitope from HBV core protein elicits antiviral cytotoxic T lymphocytes[J]. Protein Cell,2014,5(4):317-327.
- [18] Menéndez-Arias L, Álvarez M, Pacheco B. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance[J]. Curr Opin Virol,2014,8(1):1-9.
- [19] Salpini R, Colagrossi L, Bellocchi MC, et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression[J]. Hepatology,2015,61(3):823-833.
- [20] Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2016,22(1):126-144.

(收稿日期: 2017-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

杨松, 李玥, 王笑梅, 等. 阿德福韦酯耐药慢性乙型肝炎患者HBsAg变异分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018,12(3):225-229.