

# 闽南地区核苷(酸)类药物经治的乙型肝炎患者乙型肝炎病毒基因型与逆转录酶区耐药突变特点

张小曼 徐涛 许正锯

**【摘要】目的** 分析闽南地区核苷酸(类)药物(NAs)经治的乙型肝炎患者乙型肝炎病毒(HBV)基因型与逆转录酶区(RT)耐药突变特点。**方法** 采用PCR产物直接测序法分析2012年1月至2017年12月中国人民解放军联勤保障部队第910医院肝病中心收治的524例HBV感染者HBV RT区K169~M250核苷酸序列。随访患者抗病毒治疗史,同时检测其血清中HBV e抗原(HBeAg)、HBV DNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)等水平。**结果** 入组524例患者中,293例(55.92%)为HBV B型,231例(44.08%)为HBV C型。HBV B型和C型患者性别、HBeAg状态、病程、NAs药物选择、不同药物治疗方式下NAs相关耐药突变率、NAs用药时间及血清HBV DNA载量、ALT、AST水平差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。但HBV C型患者年龄( $t = 6.486$ ,  $P < 0.001$ )和NAs相关耐药突变率(64.94% vs. 51.88%,  $\chi^2 = 8.493$ ,  $P = 0.003$ )显著高于HBV B型患者。524例患者中NAs相关耐药突变检出率为57.63% (302/524), 204位点突变频率最高,其次为180、181和229。10个位点突变均伴随M204变异出现,包括169、173、180、200、202、207、214、237、245和250。HBV C型患者在9个位点上(180、181、184、191、200、221、224、229和238)的突变率显著高于B型患者,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。HBV B型患者在236和250位点的突变率显著高于C型患者( $\chi^2 = 5.867$ ,  $P = 0.015$ ,  $\chi^2 = 4.226$ ,  $P = 0.040$ )。M204相关的伴随突变在基因型B和C中亦表现出不同的倾向性:M204I突变更易出现在B型患者中,而L180 + M204I、T184 + L180 + M204V更易出现在C型患者中。**结论** 在NAs药物选择压力下,HBV B型感染者和C型感染者表现出不同耐药突变特点。

**【关键词】** 乙型, 肝炎病毒; 基因型; 耐药; 核苷(酸)类

**Characteristics of genotypes and resistant mutations within hepatitis B virus (HBV) reverse transcriptase sequences of nucleos(t)ide analogues experienced patients with HBV infection in southern Minnan region** Zhang Xiaoman, Xu Tao, Xu Zhengju. Liver Diseases Center, the 910th Joint Logistic Support Unit of the People's Liberation Army of China, Quanzhou 362000, China

Corresponding author: Xu Tao, Email: 27188665@qq.com

**【Abstract】Objective** To investigate the characteristics of hepatitis B virus (HBV) genotype and reverse transcriptase region (RT) resistance mutation of hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide analogues (NAs) in southern Minnan region. **Methods** The K169-M250 nucleotides in HBV RT region of 524 patients with hepatitis B admitted to Liver Diseases Center, the 910th Joint Logistic Support Unit of the People's Liberation Army of China from January 2012 to December 2017 were analyzed by direct sequencing of PCR products. The patients were followed up after antiviral therapy, and the levels of HBV e antigen (HBeAg), HBV DNA, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected, respectively. **Results** Among the enrolled 524 patients, 293 cases (55.92%) were HBV genotype B and 231 cases (44.08%) were HBV genotype C. The sex, HBeAg status, course of disease, selection of NAs drug, mutation rate of drug resistance after NAs application, period of NAs application and serum HBV

DNA level, levels of ALT and AST were not significantly different (all  $P > 0.05$ ). However, the age of patients with HBV genotype C ( $t = 6.486$ ,  $P < 0.001$ ) and mutation rates of NAs related drug resistance (64.94% vs. 51.88%;  $\chi^2 = 8.493$ ,  $P = 0.003$ ) were significantly higher than those of patients with HBV genotype B, with significant differences. Among the 524 patients, the detection rate of NAs related drug resistance mutation was 57.63% (302/524), and the frequency of mutation at site 204 was the highest, followed by 180, 181 and 229 sites. Ten mutations with M204 mutation were found, including 169, 173, 180, 200, 202, 207, 214, 237, 245 and 250 sites. The mutation rates of patients with HBV genotype C at 9 sites (180, 181, 184, 191, 200, 221, 224, 229 and 238 sites) were significantly higher than those of patients with HBV genotype B, with significant differences (all  $P < 0.05$ ). The mutation rates of HBV B-type patients at 236 and 250 sites were significantly higher than those of C-type patients ( $\chi^2 = 5.867$ ,  $P = 0.015$ ;  $\chi^2 = 4.226$ ,  $P = 0.040$ ). The mutation associated with M204 also showed different tendency in HBV genotype B and C: M204I mutation was more likely to occur in patients with genotype B, and L180 + M204I, T184 + L180 + M204V were more likely to be present in patients with genotype C. **Conclusion** Under the pressure of NAs drug selection, HBV genotype B and C infection showed different characteristics of drug resistances mutation.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Genotype; Resistance mutation; Nucleoside/nucleotide analogues

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 慢性感染已成为重大的公共卫生问题之一, 在亚洲地区流行尤为广泛。目前, 已被确定的HBV基因型有10种 (A~J), 且分布具有地域差异性。欧洲、非洲以HBV A、D型为主, 东南亚、远东主要以HBV B、C型为主; 我国也是B和C基因型为主<sup>[1]</sup>。因HBV各基因型病毒学特征不尽相同, 对临床表现、抗病毒治疗及预后均有潜在影响<sup>[2]</sup>。本文共纳入福建闽南地区524例经核苷(酸)类药物 (nucleotide/nucleoside analogues, NAs) 治疗的HBV感染者, 进一步分析HBV基因型分布特征、临床特征及HBV逆转录酶区 (reverse transcriptase, RT) 耐药突变位点差异, 为闽南地区乙型肝炎诊断、抗病毒治疗和预防提供理论依据, 现报道如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象

2012年1月至2017年12月中国人民解放军联勤保障部队第910医院肝病中心接受过NAs抗病毒治疗的HBV感染者524例, 其中HBV B型293例, HBV C型231例; 慢性乙型肝炎患者428例; 乙型肝炎相关肝硬化患者 (liver cirrhosis, LC) 68例, 乙型肝炎相关肝癌患者28例 (primary hepatocellular carcinoma, PHC)。入组患者4种NA药物包括: 拉米夫定 (lamivudine, LAM)、替比夫定 (telbivudine, LDT)、阿德福韦酯 (adefovir, ADV) 和恩替卡韦 (entecavir, ETV)。

治疗方式: ①LAM单药治疗79例, 用药疗程

为 (33.0 ± 25.9) 个月; ②LDT单药治疗33例, 用药疗程为 (19.0 ± 25.9) 个月; ③ADV单药治疗65例, 用药疗程为 (35.0 ± 23.8) 个月; ④ETV单药治疗114例, 用药疗程为 (32.0 ± 25.0) 个月; ⑤至少包含两种NA药物的多药治疗233例, 用药疗程为 (54.0 ± 35.4) 个月。

抽取患者静脉血清, 4 h内分离血清, 并保留在-80℃。纳入病例的诊断标准均符合2010年颁布的《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[3]</sup>和2011年我国卫生部发布的《原发性肝癌诊疗规范》<sup>[4]</sup>。排除血清HBV DNA < 500 IU/ml且由甲型肝炎和丙型肝炎等其他因素引起的肝功能损伤患者。

### 二、检测方法

1. 实验室检测: 血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平采用美国贝克曼 (Beckman Coulter) AU 680全自动生化分析仪检测; 乙型肝炎病毒e抗原 (hepatitis B virus e antigen, HBeAg) 采用罗氏 (Roche) e601全自动电化学发光分析仪; 血清HBV DNA定量及HBV RT区测序试剂采用上海申友技术有限公司HBV及耐药突变检测试剂盒, 操作方法参见说明书。HBV DNA扩增采用美国安捷伦 (Agilent Technologies) Mx 3000P QPCR实时荧光定量PCR仪, HBV RT区序列测定采用美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) ABI 310型全自动DNA测序仪。

2. HBV RT区序列分析: HBV RT区核苷酸序列分析与比对采用DNA Star 5.0 和MEGA 4.0软件。本研究入组患者HBV RT区潜在NAs相关耐药变异

位点共有42个(表1)<sup>[5]</sup>。本研究分析HBV RT区K169~M250的核苷酸序列,分析其中26个NAs相关耐药突变位点的氨基酸改变。

### 三、统计学处理

采用Prism 5.0统计学软件进行数据分析和作图。计量资料(用药时间、年龄、HBV DNA血清浓度、ALT及AST血清浓度)呈正态分布,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 $t$ 检验;计数变量(性别、HBeAg状态、病程、NAs药物选择、NAs治疗相关耐药突变率、不同NAs治疗耐药突变率)以频数或百分率表示,采用Chi-square检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、临床特征分析

HBV B型和HBV C型感染者间性别、HBeAg状态、病程、NAs药物选择、不同NAs治疗相关耐药突变率、用药时间、血清HBV DNA载量,血清ALT和AST水平差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。524例标本中302例(57.63%, 302/524)发生NAs相关耐药突变,且302例发生突变感染者中,B型感染者和C型感染者所占比例基本持平(50.33% vs. 49.67%,  $\chi^2 = 0.001$ 、 $P = 0.981$ )。但若分别以HBV B型感染者或C型感染者为群体计算突变率,则发现HBV C型感染者NAs相关耐药突变率显著高于B型感染者[64.94% (150/231) vs. 51.88% (152/293),  $\chi^2 = 8.493$ 、 $P = 0.003$ ],提示HBV C型感染者发生NAs相关耐药突变的倾向性更高。HBV C型感染者年龄显著偏高( $t = 6.486$ 、 $P < 0.001$ )。HBV C型感染者在CHB、LC和PHC各组中所占比例逐渐升高,但差异无统计学意义( $\chi^2 = 4.821$ 、 $P = 0.090$ ),见表2。

### 二、NAs相关耐药突变位点分析

524例HBV感染者中57.63% (302/524) 发生

NAs相关耐药突变,HBV RT区K168~M250发生NAs相关耐药突变位点共22个,4个位点未检测到突变,包括194、215、217和233。在22个突变位点中,204位点突变率最高,为41.99% (220/524),其次为180 (20.80%、109/524)、181 (7.44%、39/524)和229 (5.92%、31/524)。另外,10个位点的突变均伴有M204位点变异,包括169、173、180、200、202、207、214、237、245和250,见表3。HBV C型患者在9个位点的突变率(180、181、184、191、200、221、224、229和238)显著高于HBV B型发生者;而HBV C型发生者在236、250位点上的突变率显著低于HBV B型发生者,见表4。

三、524例HBV感染者中与M204位点伴随突变的位点及突变模式

204位点主要突变形式为M204I (59.55%、131/220)和M204V (37.73%、83/220),少数为M204I/V混合突变 (2.73%、6/220)。在突变概率方面,M204I在HBV B和C型间的突变率差异无统计学意义[25.26% (74/293) vs. 24.68 (57/231),  $\chi^2 = 0.003$ 、 $P = 0.960$ ],M204V在HBV B和C型间的突变率差异亦无统计学意义[13.65% (40/293) vs. 18.61% (43/231),  $\chi^2 = 2.029$ 、 $P = 0.154$ ]。突变形式方面,HBV B和C基因型中M204V均伴随L180突变 (100%、83/83),但HBV B型中M204I单独突变概率显著高于C型[67.67% (46/69) vs. 33.33% (23/69),  $\chi^2 = 13.80$ 、 $P = 0.002$ ],见图1。

其他伴随突变模式也表现出不同的基因依赖性:首先,HBV B型和C型相比:①L180 + M204I、T184 + M204V、I224 + M204V在C型中的突变概率均显著高于B型( $\chi^2 = 14.60$ 、 $4.04$ 、 $4.12$ ,  $P < 0.0001$ 、 $= 0.04$ 、 $= 0.04$ )。其次,两种基因型中L180 + M204V和S202 + M204V突变率均分别显著高于L180 + M204I和S202 + M204I (B型:  $\chi^2 = 39.65$ 、 $12.08$ ,  $P$ 均 $< 0.0001$ ; C型:  $\chi^2 = 15.27$ 、 $14.75$ ,  $P$ 均 $< 0.0001$ ),见图1。

表1 HBV RT区潜在耐药突变位点<sup>[3]</sup>

位点类型	个数	位点名称
主要耐药变异位点	8	I169T、A181T/V、T184A/C/F/G/I/L/M/S、A194T、S202C/G/I、M204I/V、N236T、M250I/L/V
次要/代偿性耐药变异位点	3	L80I/V、V173L、L180M
假定耐药变异位点	26	S53N、T54N、L82M、V84M、S85A、I91L、Y126C、T128N、N139D <sup>a</sup> 、W153Q、F166L、V191I、A200V、V207I、S213T、V214A、Q215P/S、L217R、E218D、F221Y、L229G/V/W、I233V、P237H、N238D/S/T、Y245H、S/C256G
治疗前耐药变异位点	6	T38A、Y124H、D134E、N139K/H <sup>a</sup> 、I224V、R242A

注: <sup>a</sup>: N139位点既属于第3类突变,亦属于第4类突变。

表2 HBV B型和C型感染者的临床特征

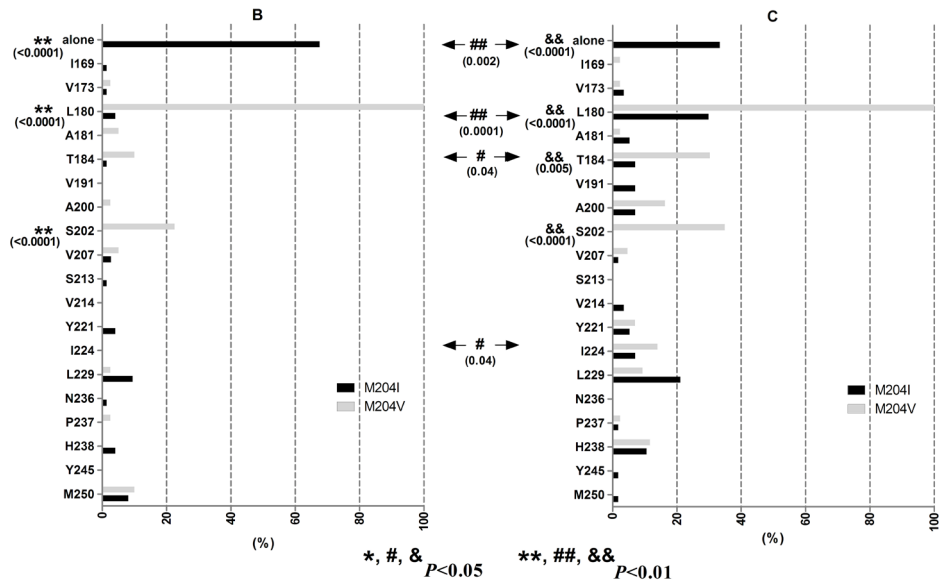
临床特征	例数	HBV B型 (293例)	HBV C型 (231例)	统计量	P值
性别 [例 (%) ]				$\chi^2 = 0.493$	0.483
男	430	244 (56.74)	186 (43.26)		
女	94	49 (52.13)	45 (47.87)		
HBeAg [例 (%) ]				$\chi^2 = 0.010$	0.919
(+)	406	227 (55.96)	179 (44.04)		
(-)	118	66 (53.85)	52 (46.15)		
病程 [例 (%) ]				$\chi^2 = 4.821$	0.090
CHB	428	250 (57.94)	178 (42.06)		
LC	68	27 (39.71)	41 (60.29)		
PHC	28	11 (39.29)	17 (60.71)		
NAs药物选择 [例 (%) ]				$\chi^2 = 6.030$	0.197
LAM	79	46 (57.50)	33 (42.50)		
LDT	33	21 (64.71)	12 (35.29)		
ADV	65	28 (42.42)	37 (57.58)		
ETV	114	77 (67.54)	37 (32.46)		
联合用药	233	127 (54.62)	106 (45.38)		
NAs相关耐药突变率 [例 (%) ]	302	152 (50.33)	150 (49.67)	$\chi^2 = 0.001$	0.981
不同NAs治疗耐药突变率 [例 (%) ]				$\chi^2 = 7.383$	0.117
LAM	55	28 (50.91)	27 (49.09)		
LDT	24	16 (66.67)	8 (33.33)		
ADV	32	13 (40.62)	19 (59.38)		
ETV	43	28 (65.12)	15 (34.88)		
联合用药	148	72 (48.65)	76 (51.35)		
用药时间 ( $\bar{x} \pm s$ , 月)	524	42.00 $\pm$ 31.05	41.00 $\pm$ 31.83	$t = 0.207$	0.835
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	524	36.94 $\pm$ 11.47	43.91 $\pm$ 13.10	$t = 6.486$	< 0.001
HBV DNA ( $\bar{x} \pm s$ , log <sub>10</sub> IU/ml)	524	5.35 $\pm$ 1.49	5.39 $\pm$ 1.56	$t = 0.293$	0.770
ALT ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	524	99.30 $\pm$ 255.48	163.13 $\pm$ 269.27	$t = 0.346$	0.730
AST ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	524	128.40 $\pm$ 193.46	116.17 $\pm$ 271.46	$t = 0.646$	0.519

表3 524例HBV感染者中NAs相关耐药突变位点伴随M204突变情况 [例 (%) ]

突变位点	突变例数	伴随M204I	伴随M204V	伴随M204I/V
I169	2	1 (50.00)	1 (50.00)	0 (0.00)
V173	6	3 (50.00)	2 (33.33)	1 (16.67)
L180	109	20 (18.35)	83 (76.15)	6 (5.50)
A200	12	4 (33.33)	8 (66.67)	0 (0.00)
S202	24	0 (0.00)	24 (100.00)	0 (0.00)
V207	9	4 (44.44)	4 (44.44)	1 (11.12)
V214	2	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
P237	3	1 (33.33)	2 (66.67)	0 (0.00)
Y245	1	1 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
M250	11	7 (63.64)	4 (36.36)	0 (0.00)

表 4 HBV B 型和 C 型感染者 NAs 相关耐药突变位点 [ 例 ( % ) ]

突变位点	突变例数	HBV B 型 ( 293 例 )	HBV C 型 ( 231 例 )	$\chi^2$ 值	P 值
I169	2	1 ( 0.34 )	1 ( 0.43 )	0.268	0.604
V173	6	2 ( 0.68 )	4 ( 1.73 )	0.500	0.480
L180	109	45 ( 15.36 )	64 ( 27.27 )	10.489	0.001
A181	38	11 ( 3.75 )	27 ( 11.69 )	10.938	0.001
T184	23	6 ( 2.05 )	17 ( 7.36 )	7.464	0.006
V191	10	0 ( 0.00 )	10 ( 4.33 )	10.722	0.001
A200	12	1 ( 0.34 )	11 ( 4.76 )	9.391	0.002
S202	24	9 ( 3.07 )	15 ( 6.49 )	2.722	0.099
M204	220	116 ( 39.59 )	104 ( 45.02 )	1.349	0.245
V207	9	4 ( 1.37 )	5 ( 2.16 )	0.130	0.718
S213	11	9 ( 3.07 )	2 ( 0.87 )	2.111	0.146
V214	2	0 ( 0.00 )	2 ( 0.87 )	0.778	0.377
E218	1	1 ( 0.34 )	0 ( 0.00 )	0.014	0.905
F/Y221	21	3 ( 1.02 )	18 ( 7.79 )	13.672	< 0.001
I/V224	22	0 ( 0.00 )	22 ( 9.52 )	26.808	< 0.001
L229	31	10 ( 3.41 )	21 ( 9.09 )	6.496	0.011
N236	23	19 ( 6.48 )	4 ( 1.73 )	5.867	0.015
P237	3	1 ( 0.34 )	2 ( 0.87 )	0.043	0.836
N/H238	22	6 ( 2.05 )	16 ( 6.93 )	6.478	0.011
R242	1	1 ( 0.34 )	0 ( 0.00 )	0.014	0.905
Y245	1	0 ( 0.00 )	1 ( 0.43 )	0.014	0.905
M250	11	10 ( 3.41 )	1 ( 0.43 )	4.226	0.040



注：“\*”表示B型感染者中，某一位点与M204I或M204V伴随突变的频率比较；“#”表示B型和C型感染者相比，某一位点与M204I或M204V伴随突变的频率比较；“&”表示C型感染者中，某一位点与M204I或M204V伴随突变的频率比较

图1 B型和C型感染者M204I或M204V伴随突变位点分析

讨 论

目前，中国与其他发达国家相比，HBV感染流行率仍然较高，在部分地区其流行率达到13%<sup>[6]</sup>。我国主要的HBV基因型为B型和C型，其中南方地区以HBV B型为主，北方以HBV C型为主，偶有HBV

A、D和I基因型发现的报道<sup>[7-8]</sup>，本文纳入的标本来源于闽南地区，HBV B型患者为55.9%，略高于C型患者（44.1%），与上述研究基本一致。HBV各种基因型在病毒复制、抗病毒应答和疾病进展等方面不尽相同。一项前瞻性研究随访了大样本量HBV相关肝硬化患者，结果发现与HBV B型感染者相比，

HBV C型感染者更易进展为肝细胞癌,提示C型感染者患肝癌的风险更高<sup>[9]</sup>。广东省一项研究表明,HBV C型感染者在肝硬化、肝癌组中所占比例高于慢性肝炎组;而B型感染者在慢性肝炎组中所占比例最高<sup>[10]</sup>。另一项研究认为,HBV B型与急性肝病、暴发性肝病密切相关<sup>[11]</sup>。本研究CHB感染者主要为HBV B型感染者(57.94%),而LC和CHB感染者中则以HBV C型为主(60.00%和60.71%),与以上相关报道一致,表明HBV C型感染者更易进展为恶性肝病。本研究结果显示,HBV C型感染者血清HBV DNA载量、ALT和AST水平均高于HBV B型,这提示C型HBV复制能力更强,易引起较重肝功能损伤,从而加重乙型肝炎病情。

目前与核苷(酸)类药物耐药性相关的HBV RT区突变位点有42个,可被分为4类:①主要耐药变异位点:可导致对某种甚至某一类NAs敏感性下降,如M204I或M204V对LAM耐药;M204I对LDT耐药;N236T、A181V对ADV耐药,A194T可能对ADV、替诺福韦酯(Tenofovir, TDF)耐药;I168T、T184G/L/A/S/I/F、S202G/C或M250V联合LAM耐药位点变异对ETV耐药;②次要/代偿性耐药变异位点:此类变异不会影响对NA的药物敏感性,但可代偿因主要耐药变异而导致的病毒聚合酶功能缺陷,如L80I/V、V173L和L180M;③假定耐药变异位点:此类变异可能与核苷类药物的延长治疗及病毒复制补偿相关,如S53N、T54N和L82M;④治疗前变异:如T38A、Y124H和D134E等<sup>[1, 5]</sup>。前两类变异被称为经典耐药变异位点,包含11个位点,已用于临床核苷类药物耐药性监测,后两类药物为非经典耐药变异,其对核苷类药物的耐药性及临床意义尚未明确。根据现有临床实践数据,对于初治慢性乙型肝炎患者,LAM治疗1年的经典耐药变异位点的突变率为24%,治疗5年其突变率高达70%<sup>[12]</sup>;有报道显示,ETV治疗3年后的经典耐药变异位点突变率分别为1.7%和1.2%<sup>[13-14]</sup>。随着近年来对HBV RT区耐药相关位点研究的深入,越来越多研究表明,一些非经典耐药变异位点在临床耐药中发挥重要作用<sup>[15-19]</sup>,因此本文分析HBV RT区K169~M250间核苷酸序列,并分析了位于此片段的4类共计26个NAs相关耐药位点。在524例患者中,57.63%(302/524)发生NAs相关耐药突变,与国内其他研究相比,其NAs相关耐药突变率处于中等水平<sup>[20-23]</sup>。本研究中ETV单药治疗人群耐药率

为37.72%(43/114),与以往报道的数据存在较大差异<sup>[13-14]</sup>。这很大一方面因两者所统计的耐药位点不同;另一方面在于,我国尚有81%患者仍使用低效、高耐药NAs进行初始治疗,一项对我国114个城市741家医院调查显示,LAM经治的慢型乙型肝炎患者占到39.6%<sup>[24]</sup>,而LAM易产生ETV耐药的基础突变:L180M和M204V/I。再加之我国在上世纪80年代中期才开始施行普遍的乙肝疫苗政策,导致很大一部分HBV感染者体内存在LAM耐药相关的原发性耐药位点突变,故这部分人群虽然采用高耐药屏障的ETV进行初始治疗,但仍较易发生耐药。

本研究结果显示,HBV B、C基因型在药物选择压力下表现出特定的突变倾向,从而导致了耐药性差异。对于LDT耐药,HBV B型主要为M204I单独突变,HBV C型主要为L180 + M204I突变,提示HBV C型基因更易发生ETV方向耐药;对于ETV耐药,HBV B型在250位点上的突变率显著较高,而HBV C型在184、200位点上的突变率显著较高,提示在ETV选择压力下,HBV B型倾向于发生L180 + M204 + M250突变,而HBV C型倾向于发生L180 + M204 + T184或L180 + M204 + A200突变;对于ADV耐药,HBV B型主要表现为N236突变,而HBV C型主要表现为A181突变,而A181突变后,HBV C型对LAM、LDT和ETV的敏感性均下降。此外,HBV C型基因在191、221、224、229和238这4个位点上的突变率也显著偏高。Liu等<sup>[5]</sup>研究表明,HBV C型的NA相关耐药突变率也显著高于B型,主要表现在6个位点上(173、180、181、184、202和204)。本研究中HBV C型患者在173、202和204位点的突变率高于HBV B型,但差异无统计学意义,这可能因标本量及标本所属的地域差异性导致。而HBV C型感染者对NA药物的应答较低、HBV复制力更强可能是导致HBV C型感染者更易发生耐药的原因<sup>[25]</sup>。在非经典耐药突变位点中,L229突变频率最高(5.92%),但其耐药性目前并不明确。有报道认为,L229F突变可能是M204I的补偿或伴随突变位点,但并不改变对LAM的药物敏感性<sup>[18]</sup>。另一项体外研究表明,L229W突变株对NA敏感<sup>[26]</sup>。目前有文献表明,LAM、ADV和TDF治疗均能引起L229位点的突变<sup>[18, 27]</sup>,但其临床意义还需进一步探讨。本研究中,74.19%(23/31)L229突变均伴随M204I或V出现,另外25.80%(8/31)L229伴随其他位点共同出现,提示L229位点为非单一突变位

点,可能发挥复制补偿的作用。

综上,NAs治疗中,HBV C型感染者发生NAs相关耐药的概率显著高于B型。在药物选择压力下,HBV B型和C型呈现不同的耐药突变倾向性:对于LDT耐药,HBV B型以M204I单独突变为主,HBV C型则以L180 + M204I突变为主;对于ETV耐药,HBV B型易产生L180 + M204 + M250突变,而HBV C型则易产生L180 + M204 + T184和L180 + M204 + A200突变;对于ADV耐药,HBV B型和C型的主要突变位点分别为N236和A181。HBV B型和C型突变倾向性差异最终导致耐药性差异,临床治疗中及时监测HBV基因型和NAs相关耐药突变位点,并分析耐药突变位点的突变模式,对发生耐药后调整用药有重要的指导意义。

### 参 考 文 献

- [1] Shi YH. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes[J]. Jpn J Infect Dis,2012,65(6):476-482.
- [2] Li X, Liu Y, Xin S, et al. Comparison of detection rate and mutational pattern of drug-resistant mutations between a large cohort of genotype B and genotype C hepatitis B virus-infected patients in North China[J]. Microb Drug Resist,2017,23(4):516-522.
- [3] 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.
- [4] 中华人民共和国卫生部.原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(10):929-946.
- [5] Liu BM, Li T, Xu J, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients[J]. Antivir Res,2010,85(3):512-519.
- [6] Fung J, Seto WK, Lai CL, et al. Profiles of HBV DNA in a large population of Chinese patients with chronic hepatitis B: implications for antiviral therapy[J]. J Hepatol,2011,54(2):195-200.
- [7] Yu H, Yuan Q, Ge SX, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I"[J]. PLoS One,2010,5(2):e9297.
- [8] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J]. J Viral Hepat,2005,12(6):609-617.
- [9] Fujie H, Moriya K, Shintani Y, et al. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan[J]. Gastroenterology, 2001,120(6):1564-1565.
- [10] Wang Z, Tanaka Y, Huang Y, et al. Clinical and virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1, and C2 in China[J]. J Clin Microbiol,2007,45(5):1491-1496.
- [11] Yuasa R, Takahashi K, Dien B, et al. Properties of hepatitis B virus genome recovered from Vietnamese patients with fulminant hepatitis in comparison with those of acute hepatitis[J]. J Med Virol,2000,61(1):23-28.
- [12] Yao GB, Zhu M, Cui ZY, et al. A 7-year study of lamivudine therapy for hepatitis B virus e antigen-positive chronic hepatitis B patients in China[J]. J Dig Dis,2009,10(2):131-137.
- [13] Yokosuka O, Takaguchi K, Fujioka S, et al. Long-term use of entecavir in nucleoside-naïve Japanese patients with chronic hepatitis B infection[J]. J Hepatol,2010,52(6):791-799.
- [14] Yuen MF, Seto WK, Fung J, et al. Three years of continuous entecavir therapy in treatment-naïve chronic hepatitis B patients: VIRAL suppression, viral resistance, and clinical safety[J]. Am J Gastroenterol,2011,106(7):1264-1271.
- [15] Yang H, Westland CE, Delaney WE, et al. Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks[J]. Hepatology,2002,36(2):464-473.
- [16] Zöllner B, Sterneck M, Wursthorn K, et al. Prevalence, incidence, and clinical relevance of the reverse transcriptase V207I mutation outside the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy[J]. J Clin Microbiol,2005,43(5):2503-2505.
- [17] Mirandola S, Sebastiani G, Rossi C, et al. Genotype-specific mutations in the polymerase gene of hepatitis B virus potentially associated with resistance to oral antiviral therapy[J]. Antiviral Res,2012,96(3):422-429.
- [18] Ji D, Liu Y, Li L, et al. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation[J]. J Clin Virol,2012,54(1):66-72.
- [19] Kwon SY, Park YK, Ahn SH, et al. Identification and characterization of clevudine-resistant mutants of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients[J]. J Virol,2010,84(9):4494-4503.
- [20] He X, Wang F, Huang B, et al. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(6):9630-9639.
- [21] Zhang HY, Liu LG, Ye CY, et al. Evolution of drug-resistant mutations in HBV genomes in patients with treatment failure during the past seven years (2010-2016)[J]. Virus Genes,2018,54(1):41-47.
- [22] Liu Y, Wang C, Zhong Y, et al. Genotypic resistance profile of hepatitis B virus (HBV) in a large cohort of nucleos(t)ide analogue-experienced Chinese patients with chronic HBV infection[J]. J Viral Hepat,2011,18(4):e29-e39.
- [23] Li XG, Liu BM, Xu J, et al. Discrepancy of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase between nucleos(t)ide analogue-untreated and -treated patients with chronic hepatitis B in a hospital in China[J]. J Med Virol,2012,84(2):207-216.
- [24] 孙秘书,王贵强,张伟.拉米夫定经治慢性乙型肝炎患者治疗现状调查分析[J].中国预防医学杂志,2012,13(1):18-22.
- [25] Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, et al. Four year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern[J]. J Viral Hepat,2011,18(3):206-215.
- [26] Qin B, Zhou Y, Zhou G, et al. Substitutions of rtL228 and/or L229 are involved in the regulation of replication and HBsAg secretion in hepatitis B virus, and do not affect susceptibility to nucleos(t)ide analogs[J]. Mol Med Rep,2017,16(6):9678-9684.
- [27] Lee HW, Chang HY, Yang SY, et al. Viral evolutionary changes during tenofovir treatment in a chronic hepatitis B patient with sequential nucleos(t)ide therapy[J]. J Clin Virol,2014,60(3):313-316.

(收稿日期:2019-01-30)

(本文编辑:孙荣华)

张小曼,徐涛,许正锯. 闽南地区核苷(酸)类药物经治的乙型肝炎患者乙型肝炎病毒基因型与逆转录酶区耐药突变特点[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2019,13(4):293-299.