

150例不同基因型慢性乙型肝炎患者 逆转录聚合酶区耐药变异位点特征 及耐药影响因素

郑璇¹ 张宝² 李世龙³ 张晓茹¹

【摘要】目的 观察150例不同基因型慢性乙型肝炎(CHB)患者乙型肝炎病毒(HBV) DNA逆转录聚合酶(RT)区域耐药变异位点特征, 并分析耐药影响因素。**方法** 回顾性分析唐山市传染病医院2018年1月至2020年12月收治的行RT区检测的150例CHB患者的临床资料, 比较不同基因型CHB患者RT区耐药变异位点特征, 根据HBV DNA RT区测序结果将患者分为耐药变异位点突变组(突变组)与未发生耐药变异位点突变组(未突变组), 采用Logistic回归分析耐药变异位点突变的影响因素。**结果** 150例CHB患者中74例发生耐药变异位点突变, 76例未发生耐药变异位点突变; 耐药变异位点突变发生在B和C基因型中, 其中B基因型3例, C基因型71例; 以rtM204I/V/S、rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S、rtL180M + rtM204I/V/S、rtA181T/V占比最高; B基因型CHB患者仅有rtM204I/V/S、rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S、rtL180M + rtM204I/V/S突变, C基因型患者RT区耐药变异位点较多; 耐药变异位点突变组患者抗病毒治疗状况为持续治疗($\chi^2 = 57.075$ 、 $P < 0.001$)、不适当停药($\chi^2 = 5.543$ 、 $P = 0.019$)、基因型C基因型($\chi^2 = 3.062$ 、 $P = 0.003$)占比高于未发生耐药变异位点突变组, HBV DNA ($t = 14.579$ 、 $P < 0.001$)、HBsAg ($t = 21.863$ 、 $P < 0.001$)高于未突变组, 差异均有统计学意义。两组患者年龄、性别、HBeAg、饮酒史、家族CHB史、高血压史、糖尿病史、高血脂史、是否同期接受其他治疗、肝纤维化、病程、总胆红素(TBil)、白蛋白(ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷氨酰转肽酶(GGT)和碱性磷酸酶(ALP)差异均无统计学意义($P > 0.05$)。单因素Logistic回归分析显示, 抗病毒治疗($OR = 5.765$ 、 $P < 0.001$)、不适当停药($OR = 2.757$ 、 $P = 0.021$)、HBV DNA ($OR = 1.617$ 、 $P = 0.004$)、HBsAg ($OR = 2.296.820$ 、 $P < 0.001$)以及基因型($OR = 12.307$ 、 $P < 0.001$)均为CHB患者耐药发生的危险因素; 经多因素Logistic回归分析显示, 抗病毒治疗($OR = 11.141$ 、 $P = 0.006$)、不适当停药($OR = 5.962$ 、 $P = 0.019$)、HBV DNA ($OR = 1.849$ 、 $P = 0.040$)、HBsAg ($OR = 5.490.477$ 、 $P < 0.001$)以及基因型($OR = 12.456$ 、 $P < 0.001$)为CHB患者耐药发生的危险因素, 差异均有统计学意义。**结论** 入组不同基因型CHB患者HBV DNA RT区耐药变异位点存在差异, C基因型患者占比较高, 耐药变异位点多; 患者耐药受不适当停药、HBV DNA及HBsAg水平影响, 临床可针对各项危险因素制定干预措施, 并在治疗期间为患者更换抗病毒药物, 以减少病毒突变株的产生。

【关键词】 肝炎, 乙型, 慢性; 基因型; 逆转录聚合酶; 变异位点; 不适当停药; 乙型肝炎表面抗原

Characteristics of drug resistance mutation sites in reverse transcription polymerase region and influencing factors of drug resistance in 150 patients with different genotypes of chronic hepatitis B

Zheng Xuan¹, Zhang Bao², Li Shilong³, Zhang Xiaoru¹. ¹Department of Nuclear Medicine Laboratory, ³Department of Laboratory Medicine, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China; ²Department of Laboratory Medicine, Tangshan Infectious Diseases Hospital, Tangshan 063000, China

Corresponding author: Zheng Xuan, Email: chen60917woai@163.com

【Abstract】Objective To investigate the characteristics of drug resistance mutation sites in reverse

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.02.002

基金项目: 河北省2018年度医学科学研究重点课题计划(No. 20181234)

作者单位: 063000 唐山市, 唐山市人民医院核医学检验科¹、检验科³; 063000 唐山市, 唐山市传染病医院检验科²

通信作者: 郑璇, Email: chen60917woai@163.com

transcription polymerase (RT) region in hepatitis B virus (HBV) DNA of 150 patients with different genotypes of chronic hepatitis B (CHB), and to analyze the influencing factors of drug resistance. **Methods** The clinical data of 150 patients with CHB who underwent detection of RT region of CHB in Tangshan Infectious Diseases Hospital from January 2018 to December 2020 were analyzed, retrospectively. The characteristics of drug resistance mutation sites in RT region in hepatitis B virus (HBV) DNA of CHB patients with different genotypes were compared. According to the sequencing results of HBV DNA RT region, the patients were divided into drug resistance mutation site mutation group (mutation group) and non drug resistance mutation site mutation group (non-mutation group). Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of drug resistance mutation. **Results** Among the 150 patients with CHB, 74 patients had mutation in drug resistance mutation sites and 76 patients did not have mutation in drug resistance mutation sites; mutation in drug resistance mutation site occurred in genotype B and C, among which there were 3 cases of genotype B and 71 cases of genotype C; rtM204I/V/S, rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S, rtL180M + rtM204I/V/S, rtA181T/V accounted for the highest proportion; only rtM204I/V/S, rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S, rtL180M + rtM204I/V/S mutations were found in CHB patients with genotype B, there were more drug resistance mutation sites in RT region in patients with genotype C; the proportions of continuous treatment as the antiviral treatment status ($\chi^2 = 57.075$, $P < 0.001$), inappropriate drug withdrawal ($\chi^2 = 5.543$, $P = 0.019$), genotype C ($\chi^2 = 3.062$, $P = 0.003$) of patients in mutation group were higher than those in non-mutation group, and the levels of HBV DNA ($t = 14.579$, $P < 0.001$) and HBsAg ($t = 21.863$, $P < 0.001$) were higher than those of non mutation group, with significant differences. Age, gender, HBeAg, drinking history, family history of CHB, history of hypertension, history of diabetes mellitus, history of hyperlipemia, whether they received other treatments, liver fibrosis, duration of disease, total bilirubin (TBil), albumin (ALB), aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) between patients in the two groups were without significant difference (all $P > 0.05$). The results of univariate Logistic regression analysis showed that antiviral treatment status ($OR = 5.765$, $P < 0.001$), inappropriate drug withdrawal ($OR = 2.757$, $P = 0.021$), HBV DNA ($OR = 1.617$, $P = 0.004$), HBsAg ($OR = 2\ 296.820$, $P < 0.001$) and genotyping ($OR = 12.307$, $P < 0.001$) were all risk factors of drug resistance in CHB patients, with significant differences. The results of multivariate Logistic regression analysis showed that antiviral treatment ($OR = 11.141$, $P = 0.006$), inappropriate drug withdrawal ($OR = 5.962$, $P = 0.019$), HBV DNA ($OR = 1.849$, $P = 0.040$), HBsAg ($OR = 5\ 490.477$, $P < 0.001$) and genotyping ($OR = 12.456$, $P < 0.001$) were the risk factors of drug resistance in patients with CHB, with significant differences. **Conclusions** There are differences in drug resistance mutation sites in RT region in HBV DNA of CHB patients with different genotypes, the proportion of patients with genotype C is high, and with more drug-resistant mutation sites. The drug resistance is affected by inappropriate withdrawal, HBV DNA and HBsAg levels. Interventions could be developed for various risk factors and replace antiviral drugs during treatment to reduce the mutant strains.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Genotype; Reverse transcription polymerase; Mutation sites; Improper drug withdrawal; Hepatitis B surface antigen

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 可进展为终末期肝病, 诱发肝硬化、肝细胞癌, 甚至危及患者生命^[1]。目前临床尚缺乏CHB特效治疗药物, 尽管随着核苷酸类似物 (nucleo-side/nucleotide analogues, NAs) 的应用, 抗病毒疗效有所提高^[2]。但NAs仍难以实现CHB的功能性治愈, 用药所需时间较长, 长期用药可产生病毒耐药, 进一步影响患者疗效^[3-4]。多项研究指出, CHB患者治疗失败与基因型耐药突变有关, 可分为原发耐药和补偿变异, 两者均涉及到逆转录聚合酶 (reverse transcription polymerase, RT) 区域基因型突变^[5-6]。

但现有研究未能确定CHB患者RT区变异特征, 不利于为治疗方案的改进提供参考意见。基于此, 本研究进一步观察不同基因型CHB患者RT区耐药变异位点特征, 并分析耐药相关因素, 报道如下。

资料和方法

一、一般资料

回顾性分析唐山市传染病医院2018年1月至2020年12月行乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) DNA RT区检测的150例CHB患者临床资料。

二、入选标准

1. 纳入标准: ①符合CHB诊断标准^[7]; ②乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)阳性; ③行肝组织学检查可见肝炎病变; ④接受NAs抗病毒治疗 ≥ 1 年; ⑤临床资料齐全。

2. 排除标准: ①妊娠期或哺乳期妇女; ②肝细胞癌或肝功能衰竭患者; ③黄疸患者; ④合并人类免疫缺陷病毒或嗜肝病毒感染; ⑤遗传代谢性肝病、血吸虫性肝硬化患者; ⑥药物性肝损伤患者。

三、方法

患者均给予阿德福韦酯行抗病毒治疗。记录患者基线资料, 包括年龄、HBeAg(阳性/阴性)、饮酒史、家族CHB史(有/无)、高血压史(有/无)、糖尿病史(有/无)、高血脂史(有/无)、是否同期接受其他治疗(如酒精性肝病、代谢性肝病、自身免疫性肝病治疗)、抗病毒治疗状况[未治疗(既往未应用抗HBV药物治疗)、经治(既往应用抗HBV药物治疗, 但已停药6个月以上)、持续治疗(持续使用抗HBV药物治疗)]、不适当停药、合并肝纤维化、病程、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA、HBsAg、血清总胆红素(total bilirubin, TBil)、白蛋白(albumin, ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、谷氨酰转肽酶(gamma glutamyl transferase, GGT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平以及基因分型。

各指标检测方法: 抽取患者空腹静脉血3 ml, 以5 000 r/min(离心半径 $r=8$ cm)的速度离心8 min, 取血清。采用美国Abbott 12000全自动微粒子化学发光免疫分析仪定量检测HBeAg及HBsAg水平, 以HBeAg < 1.0 COI为阴性; 采用ABI 7500实时荧光定量PCR仪定量测定HBV DNA载量; 采用贝克曼库尔特AU5800全自动生化分析仪检测患者TBIL、ALB、AST、ALT、GGT、ALP水平。

利用ABI基因测序仪3130对HBV DNA $> 1.0 \times 10^3$ 拷贝/ml的标本进行检测。记录耐药位点包括rtA181V/T、rtA181V/T/S、rtA194T、rtF249A、rtI169M、rtL180M、rtM204I/V/S、rtM204V/I、rtM250V/L、rtN236T、rtN/H238T/D、rtP237H、rtP177G、rtQ215S、rtS213T、rtS202G/I、rtT184A/G/I/S、rtV173L、rtV207I/L/G、rtV214A, 将存在

耐药变异位点突变的患者纳入耐药变异位点突变组。采用Chromas 2.0软件分析HBV DNA P基因片段核苷酸编码氨基酸的差异和变异类型, 将测序结果与DNA序列数据库GenBank中已知的HBV不同基因型野生株序列比较, 进一步确定感染的HBV基因型。

根据HBV DNA RT区测序结果将患者分为耐药变异位点突变组与未发生耐药变异位点突变组, 比较两组患者基线资料, 分析耐药变异位点突变的影响因素。

四、统计学处理

采用SPSS 24.0软件对数据进行统计学分析, 计量资料年龄、病程、HBV DNA、HBsAg、TBil、ALB、AST、ALT、GGT、ALP均呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验; 计数资料性别、HBeAg、饮酒史、家族CHB史、高血压史、糖尿病史、高血脂史、是否同期接受其他治疗、抗病毒治疗状况、不适当停药、肝纤维化、基因分型以[例(%)]表示, 组间比较采用连续校正 χ^2 检验; 将单因素分析 $P < 0.2$ 或有显著临床意义的变量纳入多因素分析, 采用向后逐步选择法选择最终变量, 采用多因素Logistic回归分析影响CHB患者耐药发生的因素; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、入组患者基本资料

入组150例CHB患者年龄30~65岁, 平均(49.26 ± 6.47)岁; 其中男性112例、女性38例; 乙型肝炎病毒e抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)阳性67例, HBeAg阴性83例; 有饮酒史92例; 病程14~26个月, 平均(19.49 ± 3.78)个月。

二、不同基因型CHB患者RT区耐药变异位点特征

150例CHB患者中, 有74例(49.33%)发生耐药变异位点突变, 有76例(50.67%)未发生耐药变异位点突变; 耐药变异位点突变发生在B和C基因型中, 未发现其他基因型, 其中B基因型3例, C基因型71例。以rtM204I/V/S、rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S、rtL180M + rtM204I/V/S、rtA181T/V占比最高; B基因型CHB患者仅有rtM204I/V/S、rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S、rtL180M +

rtM204I/V/S突变, C基因型患者RT区耐药变异位点较多; 不同基因型CHB患者RT区发生耐药变异位点差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表1。

三、耐药变异位点突变组与未发生耐药变异位点突变组患者基线资料

耐药变异位点突变组患者抗病毒治疗状况为持续治疗、不适当停药、基因分型C基因型占比高于未发生耐药变异位点突变组, HBV DNA、HBsAg高于未发生耐药变异位点突变组, 差异均

有统计学意义(P 均 < 0.05)。两组患者年龄、性别、HBeAg、饮酒史、家族CHB史、高血压史、糖尿病史、高血脂史、是否同期接受其他治疗、肝纤维化、病程、TBil、ALB、AST、ALT、GGT和ALP差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表2。

四、CHB患者发生耐药的单因素Logistic回归分析

将基线资料中有统计学差异的抗病毒治疗状

表1 不同基因型 CHB 患者 RT 区耐药变异位点 [例 (%)]

耐药变异位点	B基因型 (3例)	C基因型 (71例)	P 值 ^a
rtM204I/V/S	1 (33.33)	9 (12.68)	0.870
rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S	1 (33.33)	5 (7.04)	0.579
rtL180M + rtM204I/V/S	1 (33.33)	9 (12.68)	0.870
rtA181T/V	0 (0.00)	10 (14.08)	1.000
rtM250V/L + rtN236T	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtN/H238T	0 (0.00)	3 (4.23)	1.000
rtV214A	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtS213T	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtV207I/L/G + rtV214A	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtV207I/L/G	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtM204I/V/S + rtP237H	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtM204I/V/S + rtV214A	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtM204I/V/S + rtV207I/L/G	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtA181T/V + rtN236T	0 (0.00)	4 (5.63)	1.000
rtA181T/V + rtV214A	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtA181T/V + rtS213T	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtA181T/V + rtT184A/G/I/S + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtT184A/G/I/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtT184A/G/I/S + rtV214A	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtA181T/V	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtT184A/G/I/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtS213T	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtM204I/V/S + rtV207I/L/G	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S + rtV207I/L/G	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtT184A//G/I/S + rtM204I/V/S + rtM250V/L	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtT184A//G/I/S + rtS202G/I + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtT184A//G/I/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtT184A/G/I/S + rtM204I/V/S	0 (0.00)	2 (2.82)	1.000
rtL180M + rtA181T/V + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtA181T/V + rtT184A/G/I/S + rtS202G/I + rtM204I/V/S + rtN236T	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M + rtA181T/V + rtS202G/I + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtL180M	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtV173L + rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtV173L + rtM204I/V/S	0 (0.00)	1 (1.41)	1.000
rtV173L + rtL180M + rtM204I/V/S	0 (0.00)	2 (2.82)	1.000

注: ^a: Fisher's 确切概率法

表 2 耐药变异位点突变组与未发生突变组患者的基线资料

基线资料	突变组 (74例)	未突变组 (76例)	统计量	P值
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	49.55 \pm 6.52	48.97 \pm 6.08	$t = 0.564$	0.574
性别 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.009^a$	0.924
男	55 (74.32)	57 (75.00)		
女	19 (25.68)	19 (25.00)		
HBeAg [例 (%)]			$\chi^2 = 0.409^a$	0.523
阳性	35 (47.30)	32 (42.11)		
阴性	39 (52.70)	44 (57.89)		
饮酒史 [例 (%)]			$\chi^2 = 2.394^a$	0.122
有	50 (67.57)	42 (55.26)		
无	24 (32.43)	34 (44.74)		
家族CHB史 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.333^a$	0.564
有	51 (68.92)	49 (64.47)		
无	23 (31.08)	27 (35.53)		
高血压史 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.423^a$	0.516
有	7 (9.46)	5 (6.58)		
无	67 (90.54)	71 (93.42)		
糖尿病史 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.000^a$	1.000
有	4 (5.41)	5 (6.58)		
无	70 (94.59)	71 (93.42)		
高血脂史 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.213^a$	0.644
有	26 (35.14)	24 (31.58)		
无	48 (64.86)	52 (68.42)		
是否同期接受其他治疗 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.001^a$	0.972
是	29 (39.19)	30 (39.47)		
否	45 (60.81)	46 (60.53)		
抗病毒治疗 [例 (%)]			$\chi^2 = 57.075^a$	< 0.001
未治疗	9 (12.16)	50 (65.79)		
经治	17 (22.97)	18 (23.68)		
不适当停药 [例 (%)]			$\chi^2 = 5.543^a$	0.019
有	20 (27.03)	9 (11.84)		
无	54 (72.97)	67 (88.16)		
肝纤维化 [例 (%)]			$\chi^2 = 0.082^a$	0.774
合并	15 (20.27)	14 (18.42)		
未合并	59 (79.73)	62 (81.58)		
病程 ($\bar{x} \pm s$, 月)	19.61 \pm 4.07	19.36 \pm 3.55	$t = 0.401$	0.689
HBV DNA ($\bar{x} \pm s$, logIU/ml)	5.92 \pm 1.21	5.39 \pm 0.89	$t = 3.062$	0.003
HBsAg ($\bar{x} \pm s$, logIU/ml)	3.86 \pm 0.27	3.18 \pm 0.30	$t = 14.579$	< 0.001
TBil ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)	23.14 \pm 2.57	22.61 \pm 3.02	$t = 1.156$	0.250
ALB ($\bar{x} \pm s$, g/L)	42.85 \pm 6.16	43.09 \pm 5.94	$t = 0.243$	0.808
AST ($\bar{x} \pm s$, U/L)	65.74 \pm 5.68	64.39 \pm 6.07	$t = 1.406$	0.162
ALT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	68.56 \pm 6.13	67.19 \pm 5.84	$t = 1.402$	0.163
GGT ($\bar{x} \pm s$, U/L)	75.67 \pm 5.39	76.04 \pm 5.12	$t = 0.431$	0.667
ALP ($\bar{x} \pm s$, U/L)	92.58 \pm 10.74	93.06 \pm 9.91	$t = 0.285$	0.776
基因分型 [例 (%)]			$\chi^2 = 21.863^a$	< 0.001
B型	3 (4.05)	26 (34.21)		
C型	71 (95.95)	50 (65.79)		

注: HBeAg: HBV e 抗原; HBV DNA: 乙型肝炎病毒 DNA; HBsAg: HBV 表面抗原; TBil: 总胆红素; ALB: 白蛋白; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; GGT: 谷氨酰转肽酶; ALP: 碱性磷酸酶。^a: 连续校正卡方检验

况、不适当停药、HBV DNA、HBsAg、基因分型纳入作为自变量并说明，见表3，以患者耐药发生情况为因变量，发生赋值为“1”，未发生赋值为“0”。经单因素Logistic回归分析显示，抗病毒治疗（ $OR = 5.765$ 、 $P < 0.001$ ）、不适当停药（ $OR = 2.757$ 、 $P = 0.021$ ）、HBV DNA（ $OR = 1.617$ 、 $P = 0.004$ ）、HBsAg（ $OR = 2\ 296.820$ 、 $P < 0.001$ ）以及基因分型（ $OR = 12.307$ 、 $P < 0.001$ ）均为CHB患者耐药发生的危险因素。

五、CHB患者发生耐药的多因素Logistic回归分析

将基线资料中 $P < 0.01$ 的资料纳入并进行校正，建立多元Logistic回归模型，多因素分析显示抗病毒治疗（ $OR = 11.141$ 、 $P = 0.006$ ）、不适当停药（ $OR = 5.962$ 、 $P = 0.019$ ）、HBV DNA（ $OR = 1.849$ 、 $P = 0.040$ ）、HBsAg（ $OR = 5\ 490.477$ 、 $P < 0.001$ ）以及基因分型（ $OR = 12.456$ 、 $P < 0.001$ ）均为CHB患者耐药发生的危险因素，见表5。

讨 论

HBV属于部分闭合的环状双链DNA病毒，病毒复制过程依赖逆转录酶产生的前基因组RNA，而逆转录酶缺乏校正活性，因此HBV具有高变异性^[8]。目前NAs是CHB的重要治疗药物之一，可有效降低患者肝细胞癌及肝纤维化发生风险，延长患者生存时间^[9]。但部分CHB患者肝功能损伤进展不可逆，需行无限期治疗，加上患者个体特征影响，导致病毒出现耐药性，可出现RT区位点突变，影响患者治疗效果及预后^[10-11]。因此分析与慢性乙型肝炎患者逆转录聚合酶区耐药变异位点的因素，对提高治疗效果尤为重要。

本研究显示，150例CHB患者耐药变异位点突变发生率为49.33%，耐药变异位点突变以C基因型为主，B基因型CHB患者仅有rtM204I/V/S、rtL180M + rtS202G/I + rtM204I/V/S、rtL180M + rtM204I/V/S突变，C基因型患者RT区耐药变异位

表 3 CHB 患者发生耐药的自变量赋值说明

自变量	变量说明	赋值
抗病毒治疗状况	分类变量	未治疗 = “1”、经治 = “2”，持续治疗 = “3”
不适当停药	分类变量	有 = “1”，无 = “0”
HBV DNA	连续变量	—
HBsAg	连续变量	—
基因分型	分类变量	C基因型 = “1”，B基因型 = “0”

注：“—”：无相应赋值

表 4 CHB 患者发生耐药的单因素 Logistic 回归分析

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
抗病毒治疗状况	1.752	0.263	44.437	< 0.001	5.765	3.444~9.649
不适当停药	1.014	0.441	5.287	0.021	2.757	1.161~6.545
HBV DNA	0.480	0.166	8.327	0.004	1.617	1.167~2.241
HBsAg	7.739	1.213	40.688	< 0.001	2 296.820	212.995~24 767.570
基因分型	2.510	0.637	15.524	< 0.001	12.307	3.531~42.897

表 5 CHB 患者发生耐药的多因素 Logistic 回归分析

影响因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI值
常量	34.196	6.068	31.761	—	—	—
抗病毒治疗状况	2.411	0.874	7.603	0.006	11.141	2.008~61.819
不适当停药	1.785	0.759	5.538	0.019	5.962	1.348~26.378
HBV DNA	0.615	0.299	4.229	0.040	1.849	1.029~3.323
HBsAg	8.611	1.493	33.250	< 0.001	5490.477	294.113~102 495.859
基因分型	2.522	0.644	15.345	< 0.001	12.456	3.526~43.997

注：“—”：无相应数据

点较多。说明不同基因型CHB患者RT区耐药变异位点存在差异,C基因型患者占比较高,耐药变异位点多。耐药位点变异后,CHB患者在接受NAs治疗时,含有耐药突变的变异株不易被抗病毒药物清除,逐渐成为优势株,进而导致HBV群耐药,治疗难度较大^[12-13]。目前认为耐药变异位点突变的主要原因为应用NAs治疗CHB过程中,药物持续作用于特定部位,患者易发生局部核酸改变,如果药物抑制病毒的能力较弱,所需治疗时间较长,病毒更易发生局部核酸改变,使病毒对药物敏感性降低,进而发生耐药变异^[14-15]。因上述位点为拉米夫定、替比夫定和阿德福韦酯等NAs药物的耐药位点,给予CHB患者抗病毒治疗时,可选用替诺福韦酯、恩替卡韦等药物进行挽救,以提高疗效^[16-17]。

本研究对影响耐药发生的因素相关机制进行分析:①抗病毒治疗状况为持续治疗:在持续行抗病毒治疗期间,病毒长期繁殖,并产生基因突变,易造成病毒发生变异。此外,长期用药后,在原有药物浓度下,生理反应弱于之前,产生耐药性;②不适当停药:研究证实,病毒学突破与依从性低下及耐药共同导致^[18]。不适当停药可增加病毒学突破风险,促使耐药发生。这说明在对CHB患者实施治疗时,需关注患者治疗依从性,告知患者随意停药可导致耐药风险,以提高患者用药依从性,预防耐药发生;③HBV DNA载量高的患者,病毒颗粒数量释放较多,病毒复制能力强、速度快,毒株不易被清除,应用NAs药物治疗慢性感染所需时间较长^[19]。在治疗期间,参与病毒复制过程的DNA多聚酶缺乏校正功能,可发生碱基配对错误,进一步导致病毒产生变异,变异毒株进一步行快速复制,使突变积累,最终形成耐药^[20-21];④HBsAg水平与HBV DNA载量存在一定关系,并与CHB患者共价闭合DNA有关,HBsAg水平越高,病毒复制越活跃,产生病毒突变株,并发生相关耐药^[22]。此外,HBsAg水平越高时,HBV越可能发生变异,肝脏对HBV的免疫应答较弱,使病毒易发生免疫逃逸,形成病毒突变株,进一步增加耐药发生风险^[23-24]。临床可在治疗期间监测CHB患者HBV DNA及HBsAg水平,并及时改进患者治疗方案;⑤C基因型:唐山地区患者HBV基因分型以B、C型为主,其中C基因型较为常见,C基因型感染者年龄偏高、HBeAg水平高等,报道显示更易发生耐药多位点联合突变,且突

变模式较为复杂^[25]。

综上,本研究入组150例不同基因型CHB患者RT区耐药变异位点存在差异,C基因型患者占比较高,耐药变异位点多,患者耐药受不适当停药、HBV DNA及HBsAg水平影响,临床可针对各项危险因素制定干预措施,并在治疗期间更换抗病毒药物,以减少病毒突变株的产生。但因本研究未能观察CHB患者免疫、炎症指标,故结论尚有存在一定局限性,应进一步分析CHB患者耐药发生的影响因素,为临床合理治疗提供参考。

参 考 文 献

- [1] 时红,陈幼明,郑丽花,等.住院慢性乙型肝炎病毒感染者肝病谱构成比的变化分析[J].中山大学学报(医学科学版),2020,41(6):910-916.
- [2] Martinez MG, Testoni B, Zoulum F. Biological basis for functional cure of chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat,2019,26(7):786-794.
- [3] Kırdar S, Yasa MH, Sayan M, et al. HBV pol/S gene mutations in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside/nucleotide analogues treatment[J]. Mikrobiyol Bul,2019,53(2):144-155.
- [4] 罗皓,徐小元,TAN N,等. HBV前基因组RNA状态可以反映慢性乙型肝炎患者接受核(昔)酸类似物抗病毒治疗的长期预后[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(4):807.
- [5] 庞亚博,汪莉萍. HBV RT区耐药变异对HBsAg的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2018,27(10):1191-1194.
- [6] 李淑悦,程娜,王嘉鑫,等. 不同基因型慢性乙型肝炎患者的耐药变异位点分析[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(3):461-465.
- [7] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015更新版)[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(5):1-19.
- [8] 鲁俊锋,李金娥,柳雅立,等. HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者HBV前C/BCP突变/准种与HBeAg和HBV DNA的关系[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2020,14(4):278-283.
- [9] Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection[J]. Lancet,2018,392(10161):2313-2324.
- [10] Tacke F. Current and future therapy of hepatitis B and D[J]. Dtsch Med Wochenschr,2019,144(8):528-534.
- [11] 中华医学会肝病学分会肝炎学组,中华肝脏病杂志. 非一线核苷(酸)类似物经治慢性乙型肝炎患者治疗策略调整专家共识[J]. 中华肝脏病杂志,2019,27(5):343-346.
- [12] 张欢欢,杨欢,沈思兰,等. 慢性乙型肝炎患者HBV基因型分布及其耐药基因突变分析[J]. 实用肝脏病杂志,2019,22(1):41-44.
- [13] 黄碧霞,刘妍,思兰兰,等. 乙型肝炎病毒反转录酶区耐药突变患者HBsAg主要亲水区免疫逃逸相关突变研究[J]. 解放军医学杂志,2020,45(5):526-530.
- [14] Park S, Park ES, Koo JE, et al. Entecavir-resistant hepatitis B virus decreases surface antigenicity: A full genome and functional characterization[J]. Liver Int,2020,40(7):1564-1577.
- [15] 张柳华,钟备,邓英,等. 慢性乙型肝炎患者HBV核苷(酸)类似物预存耐药基因突变的研究[J]. 肝脏,2020,25(1):39-42.
- [16] Zhang Q, Zhang L, Xing Y, et al. Comparison of the 48-week efficacy of Lamivudine plus Adefovir or Entecavir monotherapy in patients with HBeAg negative hepatitis following Lamivudine treatment