

· 临床论著 ·

一例 YMDD 变异治疗后乙型肝炎病毒准种的变化

刘磊 韩涛 高英堂 刘彤 景丽 李莹

【摘要】 目的 研究拉米夫定耐药后续治疗过程中乙型肝炎病毒准种的变化情况。**方法** 选取1例拉米夫定耐药变异后加用阿德福韦酯治疗无应答、换用替比夫定仍无应答的病例,对其中的两个时间点(拉米夫定耐药后和替比夫定无应答)的血清进行巢式PCR扩增、克隆分析。**结果** 发现了治疗过程中的几种变异模式:L80I + M204I; L80I + L180M + M204I; L80I + A181T + M204I; L80V + M204I。**结论** 随着不同抗病毒药物的应用,乙型肝炎病毒的准种不断演变,拉米夫定耐药相关突变会影响到以后其他核苷类似物的后续治疗。

【关键词】 变异;乙型肝炎病毒;准种;耐药

The evolution of HBV quasiespecies of one patient with YMDD mutant after sequential treatment LIU Lei, HAN Tao, GAO Ying-Tang, LIU Tong, JING Li, LI Ying. Department of Hepatobiliary Diseases, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Corresponding author : HAN Tao, Email: hantaomd@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the evolution of HBV quasiespecies of one patient with YMDD mutant when received sequential antiviral therapy. **Methods** Sera from one patient who had been found to have resistant HBV mutations to lamivudine, lamivudine plus adefovir, and telbivudine, were cloned after nested polymerase chain reaction. **Results** The patterns of mutation were: L80I + M204I; L80I + L180M + M204I; L80I + A181T + M204I; L80V + M204I with the administration of NAs. **Conclusions** The quasiespecies of the HBV evolve step by step. Lamivudine-resistance in HBV polymerase region may affect the efficacy of sequential antiviral therapy with other NAs.

【Key words】 Mutation; Hepatitis B virus; Quasiespecies; Resistance

核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎患者在带来益处的同时易产生耐药变异,拉米夫定治疗过程中,最常出现的问题是 YMDD 模式突变导致病毒对拉米夫定的敏感性下降、病毒学反弹、生物化学反弹,最终导致治疗失败^[1]。后续治疗

基金项目:天津市科委基金(06YFJMJC13100)

作者单位:300170 天津,天津市第三中心医院肝内科(刘磊、韩涛、李莹);天津市第三中心医院天津市人工细胞重点实验室肝胆疾病研究所(韩涛、高英堂、刘彤、景丽)

通讯作者:韩涛, Email: hantaomd@126.com

过程中病毒准种的变化常常影响到后续核苷类似物的补救治疗,本研究对一例患者的血清准种变化进行研究。

资料与方法

一、研究对象

选择于本院门诊进行治疗的一例代偿期乙型肝炎肝硬化(Child-Pugh A级)患者,诊断标准符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会2000年在西安制定的病毒性肝炎防治方案^[2]。患者的基本情况如下:男,38岁,用药前丙氨酸氨基转移酶(ALT)波动于80~200 U/L之间,总胆红素(TBil)正常,HBV DNA $6.88 \log_{10}$ 拷贝/ml,乙型肝炎病毒标志物 HBsAg、HBeAg、HBcAg 阳性,基因分型为C型。拉米夫定治疗3个月后开始出现HBV DNA 阴转,肝功能恢复正常,服用4月至12个月时HBV DNA 水平始终在 $(1.00 \sim 3.90) \log_{10}$ 拷贝/ml之间,服用12个月时开始出现肝功能异常,ALT 上升至75 U/L,后联合应用阿德福韦酯10 mg,1次/d,效果不明显,HBV DNA 水平及肝功能无明显变化,HBV DNA 始终在 $(3.90 \sim 4.55) \log_{10}$ 拷贝/ml之间,后换用替比夫定治疗,但HBV DNA 逐渐上升,两个月后至 $6.32 \log_{10}$ 拷贝/ml,故换用恩替卡韦0.5 mg,1次/d,治疗1月后HBV DNA 阴转,肝功能恢复正常,患者目前仍然在密切随访之中(图1)。选取两个时间点的血清进行克隆分析分别为标本Y1372(治疗12个月即在发生拉米夫定耐药后还没有加用阿德福韦酯之前的血清)和Y1589(治疗26个月即联合应用拉米夫定和阿德福韦酯治疗后无应答换用替比夫定之后仍然无应答的血清)。

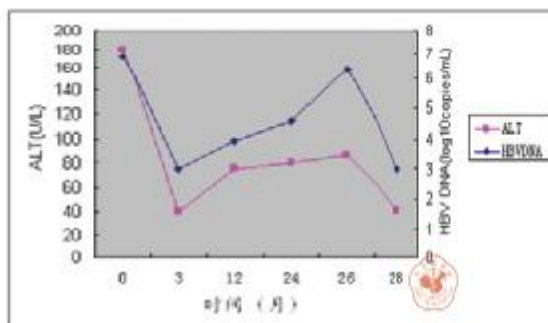


图1 抗病毒治疗 HBV DNA 和 ALT 变化
注:第12个月时联合应用阿德福韦酯治疗(10 mg/d, 第24个月时换用替比夫定(600 mg/d, 在第26个月时换用恩替卡韦(0.5 mg/d)治疗

二、主要仪器及试剂

TaKaRa EX Taq PCR 扩增试剂盒(大连宝生物公司), HBV DNA 荧光定量试剂盒(上海科华生物技术公司), ABI 7000 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司), *E. coli* DH-5 α 、PCR 产物经胶回收纯化试剂盒(北京天根生物技术公司), pMD-18T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTP(大连宝生物公司)。引物设计参照 Gen-

Bank 中公布的 C 型(X01587)乙型肝炎病毒序列,根据 HBV P 基因保守序列,在 HBV 聚合酶逆转录区 A-E 基因序列两侧设计 PCR 引物(表 1),引物由上海英骏生物技术公司合成。

表 1 巢式 PCR 引物序列

引物	位置	方向	核苷酸序列
P1	nt 246 ~ 266	正义链	5'-GAGTCTAGACTCGTGGTGGAC-3'
P2	nt 1002 ~ 1027	反义链	5'-GGGCAGCAAAGCCCAAAGACCCAC-3'
P3	nt 246 ~ 266	正义链	5'-GAGTCTAGACTCGTGGTGGAC-3'
P4	nt 972 ~ 999	反义链	5'-GTCTCTGACATACTTTCCAATCAATAGG-3'

三、方法

按照试剂盒说明书进行血清 HBV DNA 提取,一部分直接用于 HBV DNA 荧光定量,另一部分作为模板,采用巢式 PCR 方法进行扩增。第 1 轮上游和下游引物分别为 P1 和 P2,第 2 轮 PCR 上游和下游引物为 P3 和 P4,PCR 扩增条件均为:94℃ 30 s,56℃ 60 s,72℃ 45 s,共 35 个循环,反应体系为 50 μl。PCR 产物经胶回收纯化后直接测序,同时采用 pMD18-T 载体 TA 克隆试剂盒筛选含目的片段的克隆,摇菌后鉴定阳性质粒进行测序(上海英骏生物技术有限公司)。核苷酸及氨基酸序列分析采用 BioEdit(V7.0.4)生物分析软件进行分析。

结 果

一、序列比对

选用 GenBank 中公布的标准 C 基因型序列 X01587、X75656、X75665 做为标准序列与测序结果进行比较分析。发现在保守区内的氨基酸替换的主要位点分别集中在 rt80(A 区)、rt173(B 区)、rt180(B 区)、rt181(B 区)、rt204(C 区)、rt256(E 区)(图 2~图 9)。标本 1372 分离出 6 株 L80I + M204I,标本 1589 分离出 5 株 L80I + M204I,2 株 L80I + L180M + M204I,1 株 L80I + A181T + M204I,1 株 L80V + M204I。发现治疗过程中的几种变异模式:L80I + M204I;L80I + L180M + M204I;L80I + A181T + M204I;L80V + M204I。需要说明的是第一行为参照序列,下面各序列为比较序列,与参照序列相同的氨基酸用点表示,不同的表示为相应的氨基酸符号。

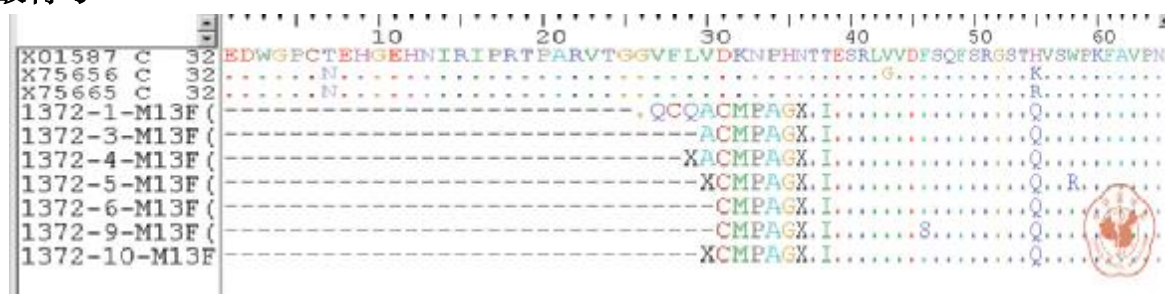


图 2 55 位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸分别为 H、K、R 所测 7 株病毒均为 Q

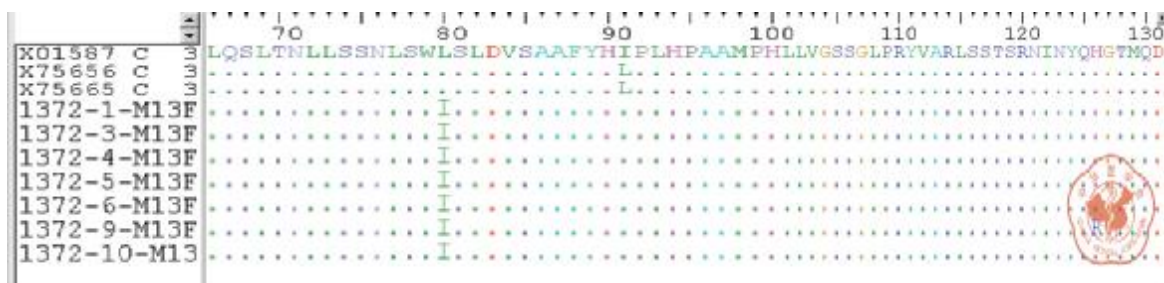


图3 80位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸均为 L, 所测 7 株病毒均为 I

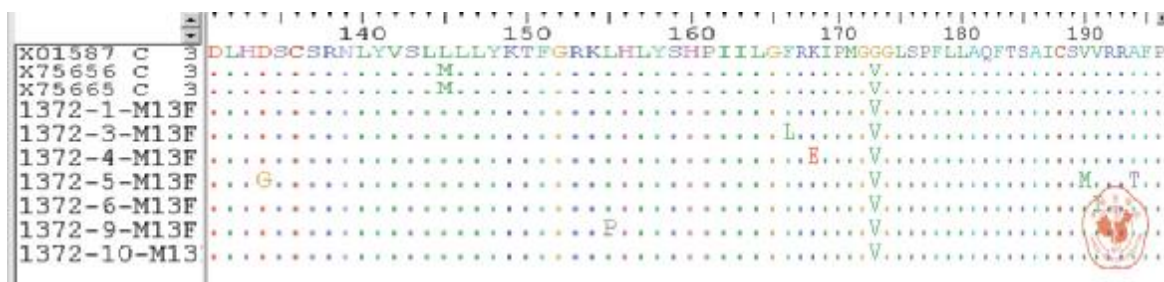


图4 173位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸分别为 G、V 所测 7 株均为 V, 180位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸为 L 所测 7 株均为 L

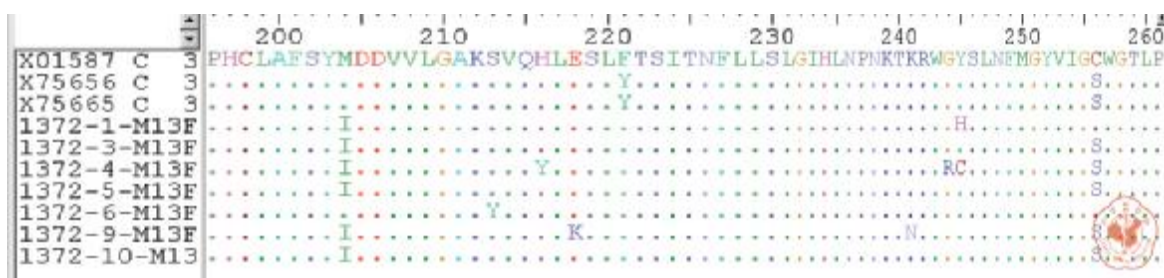


图5 204位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸为 M 所测 7 株中 6 株为 I, 1 株为 M

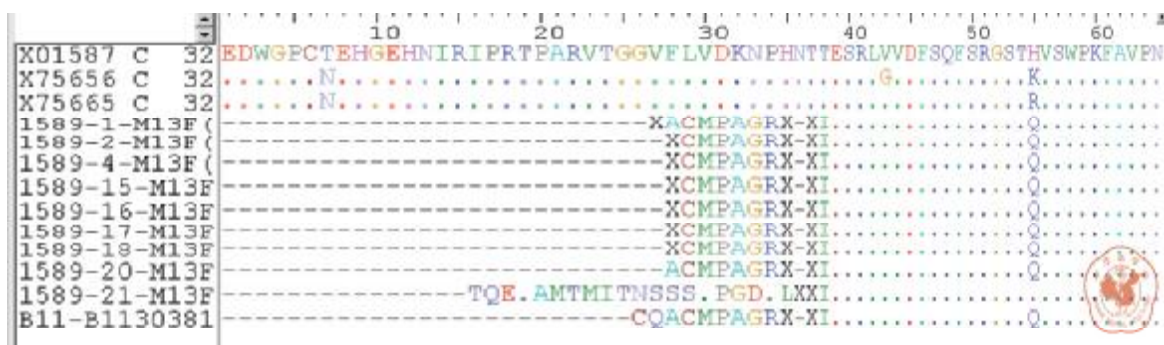


图6 55位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸分别为 H、K、R 所测 10 株病毒中 9 株均为 Q, 1 株为 H

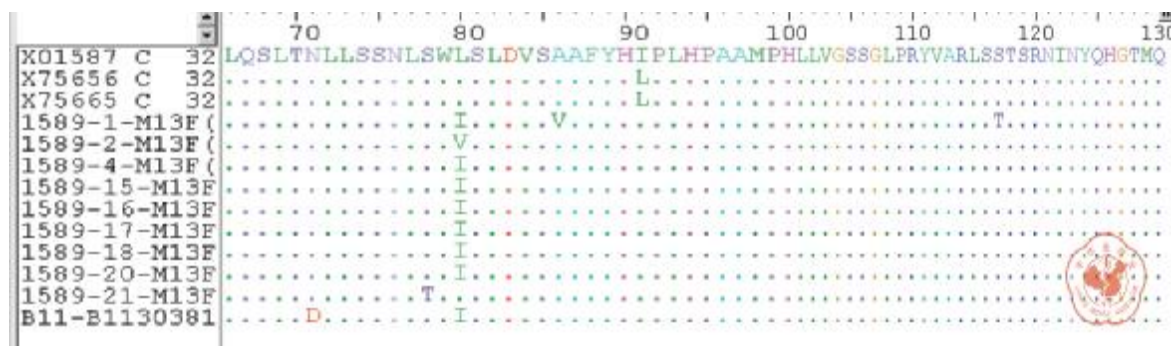


图7 80位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸均为 L 所测 10 株病毒 8 株为 I, 1 株为 L, 1 株为 V

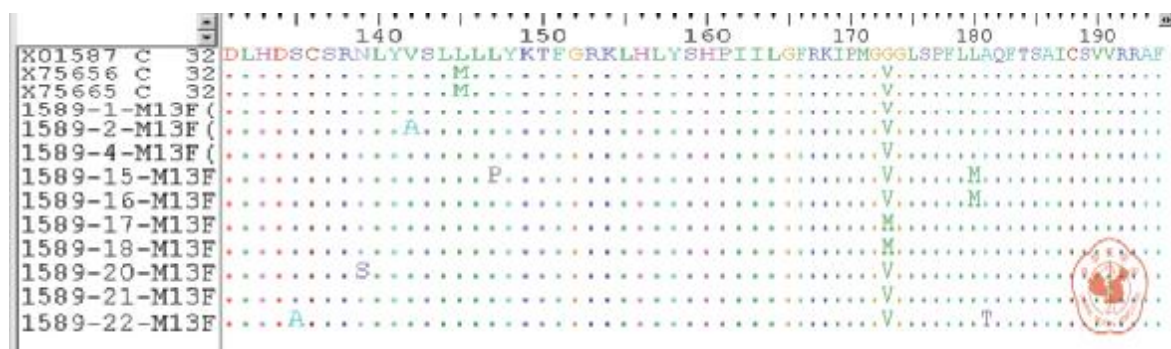


图8 173位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸分别为 G、V 所测 10 株中 8 株位为 V, 2 株为 M; 180 位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸为 L 所测 10 株中 8 株仍为 L, 2 株变为 M; 181 位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸为 A, 所测 10 株中 9 株仍为 A, 1 株变为 T

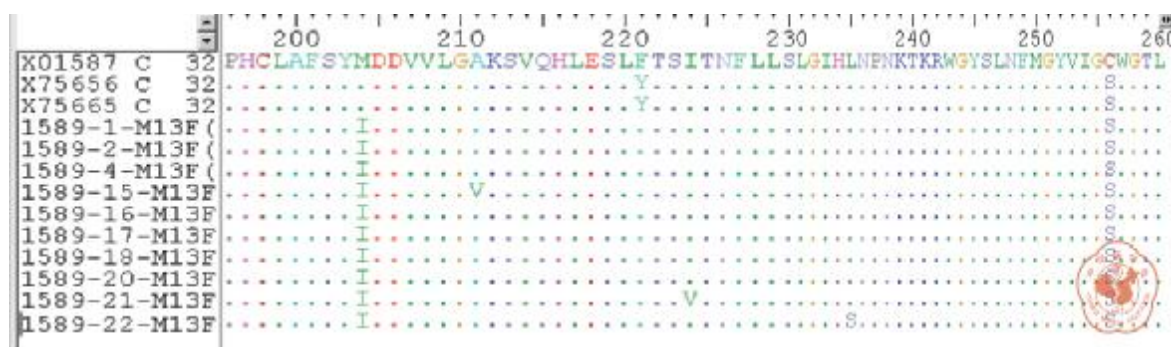


图9 204位 Genbank 中公布的基因型中氨基酸为 M 所测 10 株全部变为 I

讨 论

HBV 复制水平较高,据估计 HBV 病毒颗粒平均每天产生量为 $10^{12} \sim 10^{13}$ 个,由于 HBV 的逆转录酶没有校对功能,一个复制周期中每 10^5 个核苷出现一个错配^[3,4]。这样每天就有 $10^{10} \sim 10^{11}$ 个错配发生。而 HBV 基因组只有约 3200 个碱基对,每天每个位点都可能产生任何形式的碱基突变,因此突变产生的速度相当快,这是 HBV 耐药的基础。治疗前就存在各种 HBV 毒株,包括可能与耐药有关的突变株。治疗过程中变异株可能被选择成为优势株。这些突变株的特点是各

不相同,但是又不能单独成为单独的一个基因型,国际上通常把全基因组序列差异超过8%或者S区差异超过4%以上时,才单独列为一个新的基因型。而这种变异率低于这个标准的病毒体系就是病毒的准种。

通过这个实验,发现了核苷类似物在治疗乙型肝炎病毒感染过程当中,乙型肝炎病毒准种中演变的一些特点,分析如下:对患者在应用拉米夫定发生突变后(标本Y1372)的血清进行了克隆,随机挑取了7个重组质粒分别进行测序发现了6/7(85.71%)的病毒株204位发生了氨基酸置换(M204I),1/7(14.29%)仍然为野生株,说明在拉米夫定的压力下体内的乙型肝炎病毒准种发生了变化,野生株大部分被消灭,留下来的大部分都是对拉米夫定不敏感的耐药变异株。国外文献报道M204I一般不伴有180位的氨基酸替换,而M204V大多数伴有180位的改变,在180位没有发现补偿变异位点的出现,这与文献报导类似^[5]。而在80位所有的7株病毒均为L80I,都是变异株,已经有报导80位的氨基酸置换与173和180位有类似的作用,可以恢复病毒的复制能力,增强病毒对拉米夫定的抵抗能力^[6]。有趣的是在没有发生M204I的野生株中也看到了L80I,提示可能L80I先于M204I的出现,推测可能先产生L80I变异后使野生株先增强复制能力,然后再产生M204I使得乙型肝炎病毒对拉米夫定耐药,并且大量复制。256位属于E区处于保守区在GenBank公布的序列中就有C和S的差异,可能存在基因型内差异,而不具备生物学意义。但是更为准确的检测应该是对其进行体外细胞系的转染,然后检测其复制能力和药物敏感性^[7]。

在应用替比夫定治疗后患者的HBV DNA不但没有下降反而出现了升高,对其血清(标本Y1589)进行克隆后,挑取了10个重组质粒,看到了在204位分离的10株乙型肝炎病毒都变成了M204I位变异株,说明在随着应用替比夫定治疗的过程中野生株被消灭,而M204I对替比夫定耐药株继续存在,继续被筛选成为优势株,这也提示替比夫定对于M204I的毒株是不敏感的。所以对于已经发生拉米夫定耐药的患者,尽量避免使用具有共同耐药通路的核苷类似物药物治疗,很容易导致治疗失败^[8,9],而应该采用具不同耐药通路的药物进行治疗。在173和180位发现了2株变异株分别是V173M和L180M。与既往文献报导的经典V173L置换不同,V173M的突变意义未知,推测可能①乙型肝炎病毒的基因异质性所致,本来就存在这样的病毒株,只不过是随机分离到,并没有生物学意义;②也许真的有生物学意义,可能和继续应用替比夫定治疗对病毒进行选择的结果。真正的意义有待进一步体外转染肿瘤细胞系进行复制能力和药敏试验得到证实。10株病毒中有2株出现了L180M,推测可能的原因有①原先就有这样的病毒株,只不过在对标本1372进行挑菌的时候没有随机挑到。②随着用药又新的产生了L180M + M204I。文献报导L180M一般总是伴随着M204V出现,M204I可以单独存在也可以和L180M同时存在,当然随着L180M的出现将进一步增强了M204I变异株的复制能力^[5]。L180M + M204I这种模式的出现是病毒耐药及复制能力进一步增强的结果,这种模式的出现有可能影响以后的进一步抗

病毒治疗。同时还发现了1株 L80I + A181T + M204I 变异株,已经有文献报道出现这样的变异模式^[10],这样的毒株对于拉米夫定和阿德福韦酯都耐药,虽然只发现了1株,但是觉得还是非常有意义的,因为这个患者曾经应用过拉米夫定和阿德福韦酯的联合治疗并且治疗效果不佳,可能就与之有关。对于有这样联合变异毒株的患者,继续联合应用拉米夫定和阿德福韦酯的治疗效果很可能不好,因为随着进一步用药的压力选择,最终导致耐药株被筛选出来成为优势株,最终使得治疗失败。在80位看到有1株 L80V,文献报道的 L80I/V 是一致的这样病毒株的意义与 L80I 类似,都是增强病毒的复制能力^[6]。

该患者在应用恩替卡韦治疗后出现了病毒学应答,HBV DNA 迅速变为阴性,但是可以推测,随着用药时间的延长病毒池中很有可能逐渐会出现恩替卡韦耐药株,因为对于拉米夫定耐药基础上的病毒很容易发生恩替卡韦的耐药。所以对于准备应用核苷类似物药物治疗的患者来说,特别是失代偿期的肝硬化患者来说,初始治疗显得很重要,一旦发生了拉米夫定相关耐药突变后续治疗有可能变得很困难。

通过本实验可以初步得出如下结论:在应用核苷(酸)类似物治疗的过程中乙型肝炎病毒池的准种是不断演变的;拉米夫定耐药相关突变会影响到以后其他核苷类似物的后续治疗。

参 考 文 献

- 1 Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med*, 2004, 351:1521-1531.
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8:324-329.
- 3 Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4398-4402.
- 4 Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 4):693-712.
- 5 Ono SK, Kato N, Shiratori Y, et al. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest*, 2001, 107:449-455.
- 6 Warner N, Locarnini S, Kuiper M, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 2285-2292.
- 7 Durantel D, Carrouée-Durantel S, Werle-Lapostolle B, et al. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology*, 2004, 40:855-864.
- 8 Ladner S, Miller T, Otto M, et al. The hepatitis B virus M539V polymerase variation responsible for 3TC resistance also confers cross-resistance to other nucleoside analogues. *Antivir Chem Chemother*, 1998, 9:65-72.
- 9 Chin R, Shaw T, Torresi J, et al. In vitro susceptibilities of wild-type or drug-resistant hepatitis B virus to (-)-beta-D-2,6-diaminopurine dioxolane and 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluracil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45:2495-2501.
- 10 Yim HJ, Hussain M, Liu Y, et al. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology*, 2006, 44:703-712.

(收稿日期:2008-07-20)

(本文编辑:王丹静)

刘磊,韩涛,高英堂,等.一例 YMDD 变异治疗后乙型肝炎病毒准种的变化[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(1):31-37.