

乙型肝炎病毒 rtA181 变异的临床特点分析

李 平¹, 骆抗先^{1*}, 何海棠¹, 汪茂荣², 常静霞²

(¹南方医科大学南方医院感染内科, 广东 广州 510515; ²解放军第 81 医院全军肝病中心, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:分析乙型肝炎病毒(HBV)逆转录酶区 A181 位点(reverse transcriptase A181, rtA181)变异的临床特征,为抗病毒治疗提供理论基础。方法:通过 PCR 产物测序法确定 HBV 耐药位点和基因型,收集 85 例经核苷(酸)类似物治疗产生 rtA181 变异的患者的标本,对其临床资料进行回顾,并对发生耐药时的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBsAg、HBeAg、HBV DNA 等指标进行检测。结果:rtA181 变异至少有 8 种不同模式,主要分布在阿德福韦单药和拉米夫定换用(或加用)阿德福韦治疗组中。其中 B 基因型患者 13 例(15.7%),C 基因型患者 72 例(84.3%),基因型在 rtA181 变异模式无统计学差异($P = 0.175$)。发生 rtA181 变异时,患者 ALT、HBV DNA、HBsAg 等指标仍有明显改善(P 值分别为 < 0.001 、 0.013 和 < 0.001),且 HBsAg 水平在 rtA181T 变异组和 rtA181V 变异组之间存在差异[(3.40 ± 0.35)lgCOI vs (3.62 ± 0.54)lgCOI, $P = 0.030$]。结论:rtA181 变异主要和临床使用阿德福韦有关,变异模式在 B、C 基因型无明显差别。rtA181 变异后部分患者仍有生化和病毒学指标的改善,rtA181T 变异后的 HBsAg 水平较 rtA181V 的低。

[关键词] 乙型肝炎病毒;核苷(酸)类似物;变异;基因型

[中图分类号] R512.62

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1265-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130918

Clinical characteristics of hepatitis B virus rtA181 mutation

Li Ping¹, Luo Kangxian^{1*}, He Haitang¹, Wang Maorong², Chang Jingxia²

(¹Department of Infectious Disease, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515; ²PLA Liver Diseases Center, Nanjing PLA 81th hospital, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the characteristics of the HBV rtA181 mutation, and to provide the theoretical basis for anti-viral treatment. **Methods:** Eighty-five patients' serum samples of rtA181 mutation were collected, and the liver function, surface antigen, e antigen and HBV DNA at the occurrence of resistance were analyzed. PCR products were sequenced to determine the resistance mutations and genotypes. **Results:** Eight different resistance patterns were observed in rtA181 mutations, which were mainly in adefovir (ADV) monotherapy and ADV plus or change LAM groups. There were 13 (15.7%) patients with HBV genotype B and 72 (84.3%) with genotype C. The genotypes showed no significant difference in rtA181 mutation patterns ($P = 0.175$). After occurrence rtA181 mutation, ALT, HBV DNA and HBsAg were still significant improved (P value were < 0.001 , 0.013 and < 0.001 , respectively), and the HBsAg level was different between rtA181T and rtA181V group [(3.40 ± 0.35)lgCOI vs (3.62 ± 0.54)lgCOI, $P = 0.030$]. **Conclusion:** The rtA181 mutation was relevant to adefovir medication, and has no significant difference in HBV genotype B and C. Some patients still received biochemical and virological response after rtA181 mutation. HBsAg level of rtA181T mutation group was lower than that of rtA181V group.

[Key words] hepatitis B virus; nucleos(t)ide analogues; mutation; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1265-1269]

核苷(酸)类药物(nucleos(t)ide analogues)是目前治疗慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的重要药物,但随着核苷(酸)类药物治疗时间的延

长,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)可出现变异耐药,造成抗病毒治疗的失败。HBV 逆转录酶区 A181 位点(reverse transcriptase A181, rtA181)是一个特殊的变异位点,其变异后不仅对大部分核苷类药物耐药^[1],而且对病毒的复制、蛋白分泌等都有影响^[2],甚至还与肿瘤的发生有关^[3-4]。关于rtA181 变异

[基金项目] 军队基金课题(012046)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: luokangxian@yahoo.com.cn

与抗病毒用药的关系,变异后的临床特征,rtA181T和rtA181V不同变异的差异等报道尚不多。本文就此展开探讨,为临床病情分析和抗病毒治疗提供理论基础。

1 对象和方法

1.1 对象

2010年1月~2012年1月就诊于解放军第81医院的慢性乙型肝炎患者。纳入标准:诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》^[5];接受核苷(酸)类似物抗病毒治疗,每3~6个月复查1次;出现病毒突破(HBV DNA > 5 × 10²copies/ml),且耐药检测提示rtA181变异。排除标准:丙型肝炎、药物性肝炎和自身免疫性肝病等。共纳入85例,其中男78例,女7例,平均年龄(41.0 ± 10.5)岁。

DNA blood kits (cat 51106#, Qiagen公司,德国),HBV DNA定量检测试剂盒(上海科华生物公司),HBV-M检测采用Elecsys试剂(Roche公司,瑞士);生化检测为上海科华公司配套试剂。LA-Taq酶,pMD18T载体、胶回收试剂盒(TaKaRa公司,大连)。引物和测序由上海英骏公司完成。

1.2 方法

1.2.1 常规生化检测

采用奥林巴斯AU5400生化仪及相关试剂,按说明书进行。

1.2.2 HBV DNA定量

按试剂盒操作步骤进行,使用ABI 7300荧光定量PCR仪进行检测,检测下限是500 copies/ml。

1.2.3 HBV标志物

采用Roche公司的Elecsys 2010仪器和配套试剂,该方法是以化学发光微粒子免疫检测法(chemiluminescent micro particle immunoassay)为基础进行测定。

1.2.4 耐药检测方法

耐药检测为PCR产物直接测序法。按试剂盒说明提取血清标本中病毒DNA后,巢式PCR扩增RT区基因,扩增引物见表1。P1、P2扩增第1轮,P3、P4扩增第2轮。条件均为:95℃ 2 min后,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环后72℃延伸5 min。产物经电泳鉴定后由ABI 3730XL进行测序。结果经MEGA4比对后,参照文献^[6]对其中rt80、rt169、rt173、rt180、rt181、rt184、rt194、rt202、rt204、rt236、rt250耐药位点进行分析。当同一位点存在2种碱基且每种碱基达到20%比例时计为序列共存。

表1 HBV逆转录酶区扩增引物及位置

Table 1 Sequences and location of primers for amplification HBV RT domain

引物名称	引物序列	位置
P1	5'-AAGCTCTGCTAGATCCCAGAGT-3'	nt 18~40
P2	5'-TTTCGCTCCAGACCCGGCTGC-3'	nt 1320~1301
P3	5'-GCGGGGTTTTTCTTGTGAC-3'	nt 56~75
P4	5'-AGTATGGATCGGCAGAGGAG-3'	nt 1272~1253

1.2.5 基因型分析

由于RT区包含完整表面抗原(HBsAg)区域,nt 155~835。根据测序结果经NCBI网站在线分析HBV基因型(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)。

1.3 统计学方法

数据使用SPSS13.0统计软件进行分析。计数资料构成比采用R × C表的χ²检验,定量资料采用独立样本t检验。以P ≤ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药模式和既往用药分析

rtA181变异模式主要有8种,分别是A181T、A181V、A181T + N236T、A181V + N236T、A181T +

A181V、A181T + M204I/V ± L180M ± V173L、A181V + M204I/V ± L180M ± V173L、A181T + N236T + M204I等。根据患者既往用药史,可分为拉米夫定(lamivudine, LAM)单药、阿德福韦(adeфовир dipivoxil, ADV)单药、LAM换用(或加用)ADV,替比夫定(telbivudine, LDT)换用(或加用)ADV等4个组,各组耐药模式分别见表2。

2.2 患者临床资料的比较

患者接受核苷(酸)类似物抗病毒治疗为10~43个月。尽管出现rtA181病毒耐药变异,部分患者的临床病毒学和生化学指标仍有改善,通过t检验发现患者血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBV DNA、HBsAg等指标较抗病毒治疗前显著下降(P < 0.05,表3),而卡方检验提示HBeAg状态在治疗前

表 2 85 例患者抗病毒用药情况和 rtA181 变异模式

Table 2 Clinical occurrence of rtA181T/V resistance mutations and drug therapy

治疗用药	逆转录区变异模式	发生率[n(%)]
LAM(n=1)	A181T + M204I	1(1.18)
ADV(n=25)	A181T	5(5.88)
	A181V	4(4.71)
	A181T + N236T	6(7.06)
	A181V + N236T	10(11.76)
	A181T	19(22.35)
LAM 换用(或加用)ADV(n=55)	A181V	12(14.12)
	A181T + N236T	4(4.71)
	A181V + N236T	7(8.24)
	A181T + M204I/V ± L180M	6(7.06)
	A181V + M204I/V ± L180M ± V173L	5(5.88)
	A181T + A181V	2(2.35)
	A181V	1(1.18)
LDT 换用(或加用)ADV(n=4)	A181T + M204I	2(2.35)
	A181T + N236T + M204I	1(1.18)

表 3 患者抗病毒治疗前与耐药时临床资料的比较

Table 3 Compare characteristics of patients before treatment and drug resistance

($\bar{x} \pm s$)

临床指标	抗病毒治疗前(n=85)	病毒耐药时(n=85)	P 值
ALT(U/L)	174.98 ± 130.21	81.89 ± 49.38	< 0.001
HBsAg(IgCOI)	3.66 ± 0.36	3.51 ± 0.46	0.013
HBV DNA(Ig copies/ml)	5.97 ± 1.26	4.10 ± 1.18	< 0.001
HBeAg(阳性/阴性)	63/22	62/21	0.931

后变化不大($P = 0.931$)。

2.3 rtA181 变异与基因分型

85 例患者中 HBV B 基因型 13 例 (15.7%), 其中 rtA181T 变异 4 例, rtA181V 变异 9 例; C 基因型 72 例 (84.3%), 其中 rtA181T 变异 40 例, rtA181V 变异 30 例, rtA181T + rtA181V 变异 2 例。不同变异在基因型分布中无统计学差异($\chi^2 = 3.491, P = 0.175$)。

2.4 不同 rtA181 变异的临床特点

除 rtA181T + rtA181V 同时变异的 2 例患者外,

根据 rtA181 不同变异, 将患者分成 rtA181T 变异组和 rtA181V 变异组, 比较不同 rtA181 变异的临床特征。 t 检验结果显示: 在患者抗病毒治疗前和病毒耐药时的临床特征中, 只有病毒耐药时的 HBsAg 存在差异 ($P = 0.030$, 表 4), 而在患者年龄、ALT、HBV DNA、HBsAg 水平等指标均没有统计学差异 ($P > 0.05$)。卡方检验结果提示: 不同变异模式的患者在 HBeAg 状态、合并其他位点变异等方面亦没有差异 ($P > 0.05$, 表 4)。

表 4 rtA181T 和 rtA181V 不同变异的临床特征

Table 4 Characteristics of rtA181T mutation and rtA181V mutation patients at in the study

($\bar{x} \pm s$)

阶段	临床特征	rtA181T 变异组(n=44)	rtA181V 变异组(n=39)	P 值
抗病毒治疗前	年龄(岁)	39 ± 10	43 ± 10	0.096
	ALT (U/L)	177.2 ± 139.5	170.4 ± 123.3	0.816
	HBsAg (IgCOI)	3.60 ± 0.37	3.73 ± 0.35	0.117
	HBV DNA(Ig copies/ml)	6.10 ± 1.26	5.80 ± 1.25	0.270
	HBeAg 阳性[n(%)]	35(79.5)	26(66.7)	0.185
病毒耐药时	ALT (U/L)	83.98 ± 50.31	79.36 ± 50.08	0.677
	HBsAg (IgCOI)	3.40 ± 0.35	3.62 ± 0.54	0.030
	HBV DNA(Ig copies/ml)	4.08 ± 1.12	4.08 ± 1.27	0.998
	HBeAg 阳性[n(%)]	35(79.5)	25(61.4)	0.117
	合并 rtN236T[n(%)]	11(25.0)	17(43.6)	0.074
	变异 rtM204I/V[n(%)]	9(20.5)	4(10.3)	0.202

3 讨论

台湾学者 Yeh 等^[7]于 2000 年首次报道了 rtA181T 变异位点的存在,随后的研究陆续发现 rtA181 变异对 ADV、LDT,甚至替诺福韦 (tenofovir disoproxil, TDF) 的药物敏感性均呈现一定程度的下降^[8-9],是目前唯一交叉核苷和核苷酸的多药耐药位点^[10]。rtA181 变异后的病情复杂,其相关研究将有助于耐药问题的解决,指导临床调整和优化治疗。

对 85 例 rtA181 变异患者的临床用药分析后发现:rtA181 变异主要和抗病毒治疗过程中使用 ADV 有关。从用药模式来看,主要集中在 ADV 单药治疗和 LAM 换用(或加用)ADV 治疗这两种情况下。但在 LAM 换用(或加用)ADV 患者中,同时出现 rtM204V/I 变异的仅为 20%,可能由于使用 ADV 治疗后,先前已存在的 rtM204I/V 变异准种逐渐减少或消失,而以 cccDNA 的形式存在肝细胞核中。实际上,这部分患者是临床“隐形”存在的多重耐药患者,在后续的“挽救”治疗更需要慎重对待。

1988 年日本学者 Okamoto 根据全基因序列异质性 $\geq 8\%$ 的标准,首次提出 HBV 基因型的概念,目前为止 HBV 已发现 A~J 10 种基因型^[11]。HBV 基因型与疾病进展和干扰素治疗效果有关^[5],而与核苷(酸)类似物抗病毒耐药的的关系尚未确认^[12]。关于基因型和 rtA181 变异之间的关系, Li 等^[13]进行的研究认为:在以 B 和 C 基因型为主的中国人人群中, rtA181V 更多见于 C 基因型中。但是他们随后的一篇报道又认为 rtA181V 在 B 和 C 基因型中的分布没有差异^[14]。另有两篇文章调查后也发现 rtA181T/V 变异和 B、C 基因型没有关系^[15-16]。在本研究中,85 例患者按照 B、C 基因型分组,虽然 B 基因型在 181V 变异中的比例较高,但两组患者在不同耐药模式的分布并没有统计学差异。

由于 HBsAg 基因与 RT 区完全重叠,部分 RT 区的变异可影响 HBsAg 基因功能。Warner 等^[2]的体外实验结果证明 rtA181T 变异后可引起表面抗原的截短,影响到 HBsAg 基因上 172 位原来编码色氨酸(W)的密码子突变为终止密码子,即 sw172stop 变异,可导致 HBsAg 蛋白分泌障碍。而 181V 变异只影响到 HBsAg 基因 173 位亮氨酸(L)被置换变异为苯丙氨酸(F),并不引起 HBsAg 蛋白的截短或缺失,因此在病毒的分子结构方面 rtA181T 变异和 rtA181V 变异存在一定差异。但从临床结果显示:rtA181 不同变异的患者在抗病毒治疗前的一般资料、生化指

标、病毒水平、HBeAg 状态等方面相近,只是在出现变异耐药时,rtA181T 变异组的 HBsAg 水平较 rtA181V 组的低。分析其中可能的原因是:患者体内的病毒群是混合存在的,同时存在非变异毒株弥补了 rtA181T 变异病毒株的缺陷,使患者体内能正常分泌 HBsAg^[17],但是这种弥补可能并不完全,临床表现为 rtA181T 变异组患者的 HBsAg 偏低。

总之,rtA181 变异主要有以下特点:①病毒载量一般并不出现大的反弹,与基线水平相比可能有所下降;②病毒变异对疗效影响不大,部分患者仍可获得生化指标的所改善;③rtA181 变异的产生主要和使用 ADV 有关,且主要分布于单用 ADV 和 LAM 换用(或加用)ADV 治疗的患者中;④rtA181 变异模式与 B、C 基因型无关;⑤rtA181T 与 rtA181V 变异组相比,在生化指标、病毒载量、HBeAg 状态等方面无差异,但 rtA181T 变异组的 HBsAg 较 rtA181V 组低。

由于我国经济发展的制约,使用廉价的 ADV 抗病毒治疗在部分地区还较为普遍。基于 rtA181 变异后的特点,建议临床上这些服用 ADV 抗病毒治疗的患者,应定期复查,即使未出现血清 HBV DNA 的反弹和 ALT 水平的升高,也应引起关注和警惕,如条件允许最好尽早换用低耐药屏障的核苷(酸)类似物药物。

[参考文献]

- [1] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(5): 747-755
- [2] 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
- [3] Lai MW, Yeh CT. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/ surface truncation mutant [J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(7): 875-879
- [4] Lai MW, Huang SF, Hsu CW, et al. Identification of non-sense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy[J]. *Antivir Ther*, 2009, 14(2): 249-261
- [5] 中华医学会肝病学会和感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24
- [6] Xu Z, Liu Y, Xu T, et al. Acute hepatitis B infection associated with drug-resistant hepatitis B virus [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(4): 270-274
- [7] Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the orig-

- inal hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy [J]. *Hepatology*, 2000, 31 (6): 1318-1326
- [8] Lai CL, Gane E, Liaw YF, et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(25): 2576-2588
- [9] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (26): 2673-2681
- [10] Zoulin F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1593-608
- [11] 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
- [12] Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 1): 123-130
- [13] Li X, Wang L, Zhong Y, et al. Hepatitis B virus (HBV) subgenotypes C2 and B2 differ in lamivudine- and adefovir-resistance-associated mutational patterns in HBV-infected Chinese patients [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48 (12): 4363-4369
- [14] Li XD, Wang L, Liu Y, et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in 1,301 patients with chronic hepatitis B in North China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(24): 4178-4183
- [15] Zhong YW, Li J, Song HB, et al. Virologic and clinical characteristics of HBV genotypes/subgenotypes in 487 Chinese pediatric patients with CHB [J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 262
- [16] Li W, Warner N, Sozzi V. Hepatitis B virus genotype C encoding resistance mutations that emerge during adefovir dipivoxil therapy: in vitro replication phenotype [J]. *Hepatol Int*, DOI 10.1007/s12072-012-9411-2
- [17] Kim JH, Jung YK, Joo MK, et al. Hepatitis B viral surface mutations in patients with adefovir resistant chronic hepatitis B with A181T/V polymerase mutations [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(2): 257-264

[收稿日期] 2013-04-23

热烈庆祝 The Journal of Biomedical Research (JBR) 成功进入 PubMed 数据库。PubMed 是美国国立卫生院 (NIH) 主办的生物医学文献数据库, 为全球生物医学研究者和临床医生提供免费的科技文献检索服务。自 2013 年起读者可以从 PubMed 上检索并免费下载 JBR 创刊以来的全部文献。成功进入 PubMed 意味着 JBR 有了一个出色的国际检索和交流平台。JBR 是综合性生物医学期刊, 欢迎广大作者投稿。

JBR 在 PubMed 的主页链接如下: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22J+Biomed+Res%22\[jour\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22J+Biomed+Res%22[jour])

JBR 投稿网址: <http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint>