

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.024

核昔(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎耐药变异的临床分析

何吕富¹,雷巧²,梅洪建¹

(九〇三医院:1.消化科;2.检验科,四川江油 621700)

摘要:目的 探讨核昔(酸)类似物(NAs)治疗慢性乙型肝炎(CHB)过程中乙型肝炎病毒(HBV)耐药变异的临床意义。方法 对 67 例耐药位点阳性的 CHB 患者 HBV 反转录酶(RT)区与 NAs 相关的耐药突变进行回顾性分析。结果 单用阿德福韦酯(ADV)组耐药变异位点 N236T 13 例, A181V 14 例, A181T 7 例, A181S 1 例。单用拉米夫定(LAM)组主要耐药变异位点 M204V/I 11 例,其中 M204V+L180M 7 例、M204I 4 例,次要变异位点 L180M 7 例, A181T 1 例, L229M/V 3 例, Q215H 1 例, V173L 1 例, L80I 2 例, S213T 2 例, V207M 2 例。序贯治疗组耐药变异位点有 LAM 耐药特征的耐药位点为 M204V+L180M 14 例, M204V/I+L180M 1 例, M204I 5 例;有 ADV 耐药特征的耐药位点为 A181T/V 9 例, N236T 6 例;有恩替卡韦(ETV)耐药特征的耐药位点为 S202G 7 例, T184A/I 3 例。次要耐药位点包括 ADV 次要耐药位点 V214A 1 例, S85A 1 例; LAM 次要耐药位点 L80V/I 2 例, A213T 3 例, L229F/M/W 3 例。基因型 B 和基因型 C 主要耐药变异位点分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 高耐药、低基因屏障药物序贯治疗容易导致多药耐药, LAM 耐药患者再序贯 ETV 治疗容易导致 ETV 耐药, HBV 基因型别对耐药变异位点分布无影响。

关键词:慢性乙型肝炎;核昔(酸)类似物;耐药

中图法分类号:R575.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)21-3243-04

The gene mutation analysis of nucleoside analogues resistance in treatment of chronic hepatitis B

HE Lyufu¹, LEI Qiao², MEI Hongjian¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Clinical Laboratory, the 903 Hospital of Jiangyou, Jiangyou, Sichuan 621700, China)

Abstract: Objective To evaluate nucleoside analogues (NAs) resistant gene mutation in hepatitis B virus (HBV) and its further clinical significance in treatment of chronic hepatitis B (CHB). **Methods** A total of 67 cases with mutated drug-resistant site at the reverse transcriptase (RT) region in HBV were retrospectively reviewed, and study the relation between the mutation of RT in HBV with the drug-resistance of NAs. **Results** The main mutated drug-resistant sites after using Adefovir Dipivoxil (ADV) only were N236T (13 cases), A181V (14 cases), A181T (7 cases) and A181S (1 cases). Those mutated sites after using Lamivudine (LAM) only were M204V/I (11 cases), L180M (7 cases), A181T (1 cases), L229M/V (3 cases), Q215H (1 cases), V173L (1 cases), L80I (2 cases), S213T (2 cases), V207M (2 cases). The main sites after sequential therapy were diverse, the LAM-like sites were M204V+L180M (14 cases), M204V/I+L180M (1 cases) and M204I (5 cases). The ADV-like sites were A181T/V (9 cases) and N236T (6 cases). The Entecavir (ETV)-like sites were S202G (7 cases), T184A/I (3 cases). The minor sites after sequential therapy were V214A (1 cases), L80V/I (2 cases), A213T (3 cases), S85A (1 cases) and L229F/M/W (3 cases). There was no significant difference in distribution of major drug-resistant mutation on genotype B and genotype C. ($P>0.05$). **Conclusion** Sequential therapy of highly resistant and low gene barrier drugs is likely to lead to multidrug. Sequential ETV therapy to LAM-resistant patients with CHB easily leads to ETV resistance. Genotype had no effect on the distribution of major drug-resistant mutation.

Key words: chronic hepatitis B; nucleoside analogues; drug resistance

核昔(酸)类似物(NAs)因服药方便,抗乙型肝炎病毒(HBV)作用强,不良反应少等优势,在临床上被广泛用于治疗慢性乙型肝炎(CHB)^[1]。由于 NAs 主要抑制 HBV 复制的反转录环节,对共价闭合环状脱氧核糖核酸无直接抑制或清除作用,很难彻底清除

HBV,需要长期进行抗 HBV 治疗^[2]。随着用药时间的延长,患者可能对 NAs 产生耐药,耐药不仅可导致疾病进一步进展,并可增加发生肝功能失代偿和肝癌的风险,还会增加后续治疗的难度和成本^[3]。如何能减少 NAs 治疗的耐药和正确处理耐药是一个急需解

决的问题。本研究采用回顾性研究方法,对长期使用 NAs 治疗的耐药位点阳性 CHB 患者进行分析,为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006 年 5 月至 2017 年 5 月本院长期使用 NAs 治疗,出现病毒学突破或反弹,并且检测耐药位点阳性的 CHB 患者 67 例,其中男 56 例,女 11 例;年龄 18~78 岁,平均(44.85±15.76)岁;CHB 患者 35 例,CHB 肝硬化患者 32 例。单用拉米夫定(LAM)组 15 例,口服 LAM,每次 100 mg,每天 1 次,疗程 2~7 年。单用阿德福韦酯(ADV)组 25 例,口服 ADV,每次 10 mg,每天 1 次,疗程 2~8 年。序贯治疗组 27 例,序贯治疗即 LAM 治疗出现病毒学突破序贯 ADV,或 ADV 治疗出现病毒学突破序贯 LAM,治疗再出现病毒学突破序贯替卡韦(ETV),ADV(口服,每次 10 mg,每天 1 次)、LAM(口服,每次 100 mg,每天 1 次)、ETV(口服,每次 0.5 mg,每天 1 次)疗程 2~10 年。所有患者诊断均符合中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会 2015 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》标准^[1]。

1.2 方法 (1)用全自动生化分析仪检查血清丙氨酸氨基转移酶(ALT);(2)用化学发光法检测 HBV 标志物;(3)用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 HBV DNA 定量(HBV DNA>1×10³ copy/mL 为阳性)。(4)HBV 基因分型和耐药位点检测严格按上海复星医学科技发展有限公司 HBV 基因分型和耐药位点检测试剂盒的要求操作,统一由四川金域医学检验中心检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药位点检测 单用 ADV 组主要耐药位点 N236T 13 例,A181V 14 例,A181T 7 例,A181S 1 例,见表 1。

单用 LAM 组主要耐药位点 M204V/I 11 例,其中 M204V+L180M 7 例、M204I 4 例,次要位点

L180M 7 例、A181T 1 例、L229M/V 3 例、Q215H 1 例、V173L 1 例、L80I 2 例、S213T 2 例、V207M 2 例,见表 2。

序贯治疗组中耐药位点有 LAM 耐药特征的 20 例,主要耐药位点为 M204V+L180M 14 例,M204V/I+L180M 1 例,M204I 5 例;有 ADV 耐药特征的 15 例,主要耐药位点为 A181T/V 9 例,N236T 6 例;有 ETV 耐药特征的 10 例,主要耐药位点为 S202G 7 例,T184A/I 3 例。次要耐药位点包括 ADV 次要耐药位点 V214A 1 例,S85A 1 例;LAM 次要耐药位点 L80V/I 2 例,A213T 3 例,L229F/M/W 3 例,见表 3。

表 1 单用 ADV 组耐药变异检出情况

基因型	n	耐药位点	耐药种类
4B/2C	6	A181V	ADV-R、LAM-I
3B/2C	5	A181T	ADV-R、LAM-I
5B	5	N236T	ADV-R、TDF-I
4B/2C	6	A181V、N236T	ADV-R、LAM-I、TDF-I
1B/1C	2	A181T、A181V、N236T	ADV-R、LAM-I、TDF-I
1C	1	A181S	ADV-R

注:R 表示耐药;I 表示敏感性降低;TDF 为替诺福韦酯

表 2 单用 LAM 治疗组耐药变异检出情况

基因型	n	耐药位点	耐药种类
3B	3	M204V、L180M	LAM-R、LDT-R、ETV-I
C	1	M204V、L180M、A181T	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-I
B	1	M204V、L180M、L229M	LAM-R、LDT-R、ETV-I
C	1	M204V、L180M、Q215H	LAM-R、LDT-R、ADV-U、ETV-I
C	1	M204V、L180M、V173L、L229V	LAM-R、LDT-R、ETV-I
C	1	M204I、L80I、S213T	LAM-R、LDT-R、ETV-I
C	1	M204I、L80I	LAM-R、LDT-R、ETV-I
2C	2	M204I	LAM-R、LDT-R、ETV-I
C	1	S213T	LAM-U
1B/1C	2	V207M	LAM-U
B	1	L229V	LAM-U

注:U 代表敏感性可能降低;LDT 为替比夫定

表 3 序贯治疗组耐药变异检出情况

用药史	n	基因型	耐药位点	耐药种类
ADV-LAM-ETV	1	B	M204V、L180M、S202G、A213T	LAM-R、LDT-R、ETV-R
	1	B	M204V、L180M、S202G、N236T	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-R、TDF-I
	1	B	M204V、L180M、S202G、N236T、S85A	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-R、TDF-I
	2	2C	M204V、L180M、S202G	LAM-R、LDT-R、ETV-R
	1	C	M204I、M204V、L180M、A181T、T184I	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-R
	1	B	M204V、L180M、A181T、T184I	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-R
	3	1C/2B	M204V、L180M	LAM-R、LDT-R、ETV-I
	1	B	M204V、L180M、S213T、A181V	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-I

续表 3 序贯治疗组耐药变异检出情况

用药史	n	基因型	耐药位点	耐药种类
	1	B	M204I、L80I	LAM-R、LDT-R、ETV-I
LAM-ADV-ETV	2	2B	M204V、L180M、S202G、A181T/V	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-R
	1	B	M204V、L180M、T184A	LAM-R、LDT-R、ETV-R
	1	B	M204I、L80I、L229W	LAM-R、LDT-R、ETV-I
ADV-LAM	3	2C/1C	M204V、L180M、A181T/V	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-I
	1	C	M204I、A181T	LAM-R、LDT-R、ADV-R、ETV-I
	1	C	M204I、L80V	LAM-R、LDT-R、ETV-I
	1	C	L229M	LAM-U
LAM-ADV	1	B	M204I、N236T、L229F	ADV-R、LAM-R、LDT-R、TDF-I、ETV-I
	1	B	S213T、N236T	ADV-R、LAM-U、TDF-I
	1	C	A181V、N236T、V214A	ADV-R、LAM-I、TDF-I
	2	2C	A181V、N236T	ADV-R、LAM-I、TDF-I

2.2 基因型与主要耐药位点分布 该组患者检测出基因型 B 37 例,基因型 C 30 例,对两基因型主要耐药位点分布进行比较,两基因型主要耐药位点分布差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 基因型与主要耐药位点分布

基因型	n	rt204	rt181	rt236	rt202	rt184
B	37	17	19	14	5	2
C	30	18	20	6	1	2
χ^2		0.81	1.03	1.74	0.85	0.00
P		0.37	0.31	0.19	0.83	1.00

3 讨 论

LAM、ADV、ETV 是我国目前治疗 CHB 的主要 NAs 药物^[1]。NAs 主要通过抑制 HBV 聚合酶的 RT 区活性,阻止 HBV 复制过程中以 HBV 的前基因组 RNA 为模板反转录生成新的病毒 RNA,从而发挥抑制病毒复制的作用^[4]。病毒为了生存,在复制中将 HBV 聚合酶区某些特定部位的氨基酸进行置换,置换后药物对病毒的结合力及敏感性下降^[5],由于 CHB 需要进行长期抗病毒治疗,随着治疗时间的延长,不但耐药发生率不断升高,而且耐药性也越来越复杂,正在从单药耐药向多药耐药转化。本研究对病毒学突破或反弹并且耐药位点检测阳性的 67 例 CHB 患者进行分析,单用 ADV 组检出耐药位点有 N236T 13 例(52%),A181V 14 例(56%),A181T 7 例(28%),A181S 1 例(4%),主要耐药位点与既往研究一致^[6-7],N236T 和 A181T/V/S 均可导致 HBV 对 ADV 耐药^[8-9]。单用 LAM 组主要耐药位点 M204V/I 11 例(73.33%),该变异位点可导致 HBV 对 LAM 耐药,体外试验显示该变异株对 LAM 敏感性下降 1 000 倍以上。次要位点 L180M、Q215H、V173L、L80I、V207M 均为 LAM 的代偿性突变,可增强病毒复制能

力,M204I 常单独出现,M204V 常与 L180M 联合出现^[10],A181T 位点突变在 LAM 治疗患者中占 2%,可在没有 M204V/I 的情况下发生,同时导致 HBV 对 ADV 和 LAM 敏感性下降^[11],属原发耐药位点。该组还查出 L229M/V 3 例,2 例与 M204V 联合出现,1 例单独出现。纪冬等^[12]认为 L229 位点突变也是 LAM 的代偿性突变,可以增强病毒的耐药性和复制能力。该组还查出 S213T 2 例,1 例与 M204I 联合出现,1 例单独出现,2 例均出现病毒学反弹和 ALT 升高,与孟玉丽等^[13]报道一致,提示 S213T 可能也是 LAM 的代偿性耐药位点,并且可增强病毒耐药性和复制能力。

序贯治疗组存在多药耐药特征,其中有 LAM 耐药特征的耐药位点为 M204V + L180M 14 例,M204V/I+L180M 1 例,M204I 5 例;有 ADV 耐药特征的耐药位点为 A181T/V 9 例,N236T 6 例;有 ETV 耐药特征的耐药位点为 S202G 7 例,T184A/I 3 例;L80V/I 2 例、A213T 3 例、L229F/M/W 3 例是 LAM 次要耐药位点;V214A 1 例和 S85A 1 例被认为是 ADV 的次级突变位点^[10],与 ADV 耐药有关,多药耐药 15 例(55.56%),长期 NAs 单药序贯治疗容易出现针对多种 NAs 的耐药位点,发生多药耐药。ETV 耐药是在 LAM 耐药(M204V/I+L180M)基础上,加上三个位点之一(S202、T184、M250)的联合突变才能产生耐药^[5],该组病例发生 ETV 耐药 10 例,均是在 LAM 耐药基础上再序贯 ETV 所致。因此,LAM 耐药患者用 ETV 再治疗容易发生 ETV 耐药,ETV 初治患者 5 年耐药率为 1.2%,LAM 耐药后改用 ETV,ETV 5 年耐药率可达到 51.0%^[4]。研究还发现,基因型 B 和基因型 C 主要耐药位点分布差异无统计学意义($P>0.05$)^[14]。

综上所述,NAs 长期治疗 CHB 必然出现耐药^[3],及时进行耐药基因检测对耐药患者(下转第 3248 页)

- 在慢性心力衰竭患者心功能评估中的价值[J]. 山东医药, 2016, 56(17): 1-4.
- [2] 田伟萌, 王华, 梁天亚, 等. 住院心力衰竭患者 GDF-15 的改变及相关研究[J]. 中国医刊, 2016, 51(2): 38-41.
- [3] 张月琴, 林珂, 谢晓林. 血清生长分化因子-15 在慢性心力衰竭中的预后价值[J]. 中国慢性病预防与控制, 2015, 23(4): 305-307.
- [4] 田钰茜, 张阔, 郝强, 等. 人生长分化因子 15 的原核表达、纯化与多克隆抗体制备[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(3): 334-337.
- [5] 郭庆玲. 慢性阻塞性肺疾病患者外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞和 GDF-15 水平与其血清炎症因子水平的关系[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(4): 597-599.
- [6] 殷华, 马少雯, 杜一平. 生长分化因子-15 对慢性心力衰竭患者左室重构的预测价值[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(9): 659-662.
- [7] 赵雪燕, 吴超, 康连鸣, 等. 生长转化因子-15 与氨基末端 B 型利钠肽对于判断心力衰竭患者预后价值的比较[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2017, 17(5): 2214-2217.
- [8] 关敬树, 周云, 缪志静, 等. 慢性心力衰竭急性加重患者血清生长分化因子-15 水平及其对预后的评估意义[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(5): 680-687.
- [9] 刘哲, 王晶. 生长分化因子-15 表达水平与心肌梗死致心力衰竭程度的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(7): 959-960.
- [10] PASTERNAK B, MATTSSON A, SVANSTRO M, et al. Comparative effectiveness of bisoprolol and metoprolol succinate in patients with heart failure[J]. Intern J Cardiol, 2015, 190(1): 4-6.
- [11] GILLINOV A M, BAGIELLA E, MOSKOWITZ A J, et al. Rate control versus rhythm control for atrial fibrillation after cardiac surgery[J]. New Engl J Med, 2016, 374(20): 1911.
- [12] FETTIPLACE M R, WEINBERG G. Past, present, and future of lipid resuscitation therapy [J]. Jpen-Parenter Enter, 2015, 39(1 Suppl): 72S.
- [13] MANGMOOL S, DENKAEW T, PHOSRI S, et al. Sustained β ar stimulation mediates cardiac insulin resistance in a pka-dependent manner[J]. Mole Endo, 2016, 30(1): 118.
- [14] REDDY G L N, RAJNARAYANA K, JAYAVEERA K N. Development and in vitro-in vivo evaluation of extended-release multiple-unit pellet system tablets of metoprolol succinate[J]. Asian J Pharm, 2016, 10(1): S39-S42.
- [15] VOLPE M, CARNOVALI M, MASTROMARINO V. The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment[J]. Clin Sci, 2016, 130(2): 57-77.

(收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-05-08)

(上接第 3244 页)

再治疗很重要。高耐药、低基因屏障药物序贯治疗容易导致多药耐药。LAM 耐药患者再序贯 ETV 治疗容易导致 ETV 耐药。初始治疗时尽量选用强效、高耐药基因屏障药物, 避免高耐药、低基因屏障药物序贯治疗才能减少耐药, 特别是多药耐药的发生。

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]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 888-905.
- [2] 梅洪建, 何吕富, 张小莉. 阿德福韦酯长疗程治疗慢性乙型肝炎的疗效及安全性[J]. 四川医学, 2017, 38(2): 205-208.
- [3] 陈成伟, 徐从新, 陈士俊, 等. 核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(1): 10-17.
- [4] 常静霞, 汪茂荣. 乙型肝炎病毒基因耐药变异研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(5): 467-470.
- [5] 樊秀, 林晓东, 岑晓红, 等. 核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎过程中产生耐药的特点及应对策略[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(4): 611-613.
- [6] 范振平, 吉英杰, 秦立, 等. 阿德福韦酯耐药分析[J]. 传染病信息, 2013, 26(2): 119-122.
- [7] 张礼周, 张振华, 梁佳佳, 等. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎原发性无应答患者基因型耐药分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2014, 39(2): 182-183.
- [8] 于桂红. 阿德福韦酯抗病毒研究进展[J]. 中国实用医药, 2013, 8(12): 241-242.
- [9] 杨菁, 刘妍, 陈容娟, 等. HBV 反转录酶区 rtA181S 变异与阿德福韦酯耐药相关性研究[J]. 传染病信息, 2013, 26(6): 339-342.
- [10] 唐红, 陈恩强. 乙型肝炎病毒基因变异及其临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(3): 161-163.
- [11] 李平. HBV 逆转录酶区 181 位点变异研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(5): 469-471.
- [12] 纪冬, 刘妍, 许智慧, 等. 乙型肝炎病毒多聚酶区 rtL229 突变的演变及其表型分析[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(6): 544-547.
- [13] 孟玉丽, 张红旭, 王斌, 等. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者 HBV 多聚酶区基因突变分析[J]. 慢性病学杂志, 2010, 12(7): 635-637.
- [14] 刘妍, 许智慧, 刘立明, 等. 我国患者多重耐药乙型肝炎病毒感染的基因型和表型特点[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(6): 539-543.

(收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-05-02)