

## 乙型肝炎病毒准种的临床意义

郑彩霞 陈立 潘晨

准种(quasispecies)是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的自然存在方式,而准种的存在不仅可能使病毒逃避宿主免疫监视,导致感染慢性化及病情进展,而且可能影响抗病毒疗效和耐药发生。本文就目前 HBV 准种与感染慢性化、临床转归及抗病毒疗效与耐药的的关系作一综述。

### 一、准种是 HBV 的自然存在方式

准种最早是由德国学者 M. Eigen 提出,用于描述 RNA 复制子的自我组织和适应过程。准种是在一些 RNA 病毒中发现的,在病毒随机突变、自我复制和宿主的选择压力等共同作用下, RNA 病毒以高度同源但又各有差别的状态存在<sup>[1]</sup>。大多数依赖 RNA 的 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶(即逆转录酶)缺乏 3'→5' 核酸外切酶活性,缺乏校正功能,从而产生一群存在不同位点变异的基因组 DNA 或者 RNA,而病毒变异是准种产生的根本原因,是准种不断变迁的始动因素<sup>[2]</sup>。此外,来自细胞内的编辑酶(如参与构成体内抗病毒天然免疫机制的核苷酸脱氨酶的 ADAR 或者 APOBEC 家族)的修饰和电离辐射、光化作用等对病毒基因组造成的化学损伤,也可能参与准种的发生<sup>[3]</sup>。

目前认为生活史中存在 RNA-RNA 或者逆转录过程的病毒均可在子代病毒中表现为准种群的存在。Ngui 等<sup>[4]</sup>报道了 HBV 前-C/C 区存在准种分布。Kim 等<sup>[5]</sup>对同一来源的 5 个克隆基因进行全长序列测定,系统分析这 5 个序列并和 37 份参照序列进行多重对比,发现序列具有高度一致性,但彼此间又存在微小的差别,提示 HBV 全长序列存在准种分布。Kojima 等<sup>[6]</sup>从 20 例慢性乙型肝炎患者肝活检组织中提取 HBV DNA,发现肝组织中也存在 HBV 准种现象。兰林等<sup>[7]</sup>、董菁等<sup>[8]</sup>、成军等<sup>[9]</sup>对慢性乙型肝炎患者血清中 HBV 基因的前-C/C 区、X 区、S 区、P 区、全长基因的序列异质性进行研究,为 HBV 准种在慢性感染个体中普遍存在提供了直接的分子生物学证据。因此,HBV 准种分布是 HBV 的自然存在方式,存在于与 HBV 功能有关的各基因区。

### 二、HBV 准种的临床意义

1. HBV 准种与感染慢性化的关系:病毒准种是一个变异的谱系,但不是各种变异株简单的集合,病毒种群之间相互影响,具有生物学上的关联性,这种相互作用利于病毒入侵及复制<sup>[10,11]</sup>。在特定的环境中,病毒变异谱系本身或在压力作

用下快速产生多样性并致表型变异如逃逸突变,是病毒能够躲避特异性免疫监视的重要因素,HBV 准种中的免疫逃逸突变株成为优势种群,使得 HBV 得以持续感染并导致感染的慢性化<sup>[2]</sup>。由于病毒复制过程中的低保真性导致病毒的快速进化,改变了 T 细胞和 B 细胞对其原有的识别位点,使细胞毒性 T 淋巴细胞或中和抗体不能进行有效的识别和应答,从而逃避免疫监视<sup>[12]</sup>。病毒进化过程中,选择压力作用于整体病毒种群,而不是单一的变异株<sup>[13]</sup>。

2. HBV 准种与疾病严重程度的关系:Mathet 等<sup>[14]</sup>采用 SSCP 和 DNA 序列分析法发现肝硬化患者体内的 HBV 准种复杂度高于慢性乙型肝炎患者,认为 HBV 准种的复杂度随病情加重而增加。刘映霞等<sup>[15]</sup>采用同样方法对慢性重型肝炎、慢性肝炎和病毒携带者之间 S 区准种复杂性的差异进行分析,发现慢性 HBV 感染者的 S 区准种复杂度随病情进展而增加。温志立等<sup>[16]</sup>采用熔点曲线法比较 HBV 携带者和重度慢性乙型肝炎患者血清波峰数量差异,发现后者血清波峰数量显著多于前者,提示其携带 HBV 准种数多于前者,推测可能因为 HBV 准种数量增多,病毒结构及抗原成分趋于复杂,致病能力也随之增强,从而更严重地干扰了患者免疫系统使得病情加重。以上研究均提示 HBV 准种复杂度和疾病严重程度可能呈正相关,复杂的准种演变可能导致持续感染而不断诱导肝细胞炎性损害,并增加产生新的 HBV 基因变异的机会;另一方面变异病毒毒力的增强和抗原表位的改变,可能引起过度免疫应答反应,造成严重的肝细胞损伤<sup>[17,18]</sup>。不过,目前准种研究方法以“PCR-克隆-测序”为金标准,尚缺乏动态的大样本研究证实复杂的准种分布与病情加重之间的相关性。

Li 等<sup>[19]</sup>应用 PCR 扩增 HBV 全长序列并测序方法,对 2 例伴随 HBeAg 血清学转换的慢性乙型肝炎急性加重患者 4 个不同时间点的血清 HBV DNA 进行研究分析,发现其 HBV 准种构成在疾病急性加重前后并无改变,提示 HBV 准种可能与疾病加重无关,而可能与其他多种因素导致 HBV 复制增加有关。该研究虽然是动态研究,但其所含的样本例数较少,有待大样本的研究进一步证实。

### 三、HBV 准种与抗病毒应答及耐药

1. HBV 准种与干扰素抗病毒应答的关系:Lim 等<sup>[20]</sup>应用生物学方法研究了 40 例 HBV 基因型为 B 型的慢性乙型肝炎患者 HBV 前-C/C 基因区准种演变与 IFN- $\alpha$  治疗后发生 HBeAg 血清学转换的关系,结果发现 HBeAg 血清学转换的患者在转换之前的准种多样性显著高于未发生 HBeAg 血清学转换的患者,HBeAg 血清学转换之后准种多样性显著高于转换前,推测血清学转换前的准种多样性的增高可能与打破免疫耐受有关,随着免疫应答的增强,反过来促进了 HBV 免疫逃逸,使准种多样性增加。Wu 等<sup>[21]</sup>研究了 36 例 HBV 基因型为 C 型的慢性乙型肝炎患者 HBV X 区、前-C/C 基因区准种演变与 IFN- $\alpha$  治疗后发生 HBeAg 血清学转换的关系,与 Lim 等研究相一致的是发现 HBeAg 血清学转换之后准种多样性显示高于转换前,提示血清学转换后准种多样性显著增加可能提高机体特异性免疫应答并促进逃逸突变,另外,发现 HBeAg 血清学转换的患者在转换之前的准种多

样性虽高于未发生 HBeAg 血清学转换的患者,却无显著性差异,可能因为二者研究分析的 HBV 基因区域不同,也可能是 HBV 基因型不同导致宿主的免疫选择压力有差异。

2. HBV 准种与核苷(酸)类似物抗病毒疗效及耐药的关系:核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中的准种动力学变化与抗病毒疗效及耐药发生相关。罗志雄等<sup>[22]</sup>观察应用核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎患者前、治疗后 12 及 24 周 HBV P 基因区的准种特点,发现 HBV 准种的异质性随着治疗过程变得更加复杂,无应答组治疗前的准种复杂性比持续应答组高,在 12 与 24 周时 HBV 准种的异质性比持续应答组明显复杂,提出 HBV 准种复杂度与慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗的持续疗效存在相关性,治疗 12 和 24 周的 HBV 准种可能作为核苷(酸)类似物抗病毒持续疗效的预测指标之一。Chen 等<sup>[23]</sup>研究中的 25 例患者均接受拉米夫定(LAM)抗病毒治疗 48 周,其中 14 例患者获得病毒学应答,其余 11 例患者无应答,结果显示治疗应答组和无应答组患者在 LAM 治疗前的准种特征无显著性差异,提示基线的准种异质性与抗病毒疗效无相关性,治疗 4 周时应答组的准种复杂度和多样性显著低于无应答组,且该差异与病毒基因型和 HBeAg 状态无关,提出 LAM 抗病毒治疗过程中,早期的准种复杂度的变化可以比 HBV DNA 载量变化更准确、更早期地预测抗病毒的疗效和耐药发生。Liu 等<sup>[24]</sup>研究 31 例接受恩替卡韦(ETV)抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者治疗准种动力学变化,根据在 48 周时获完全应答和部分应答分为两组,结果显示两组治疗基线的准种异质性与抗病毒疗效无相关性,与部分应答组相比,在治疗 4 周时完全应答组准种复杂度降低,而准种多样性增加。该研究与 Chen 等<sup>[23]</sup>研究相结合,分析不同的药物选择压力作用下的病毒准种动力学变化,结果 LAM 应答组的准种多样性减少,而 ETV 应答者在治疗 4 周时准种多样性增加,提示可能因为 ETV 较 LAM 抗病毒作用强,提供更强的选择压力,并且 ETV 具有更高的耐药屏障,即使已经出现某些变异,但仍可以产生完全应答,使治疗应答组的准种多样性增加。因此,可认为早期的 HBV 准种复杂度变化可能作为核苷(酸)类似物抗病毒持续疗效的预测指标之一。

随着抗病毒药物的广泛应用,耐药问题亦逐渐受到重视。核苷(酸)类似物耐药株在抗病毒治疗之前就可能存在,在抗病毒药物压力下,耐药株逐渐成为优势株,即药物把耐药株选择出来<sup>[25]</sup>。Pallier 等<sup>[26]</sup>研究了 29 例使用阿德福韦酯(ADV)治疗达 240 周并出现耐药的慢性乙型肝炎患者的病毒动力学改变,发现 ADV 会选择出耐药的病毒株。Moriconi 等<sup>[27]</sup>研究了 34 例持续慢性 HBV 感染者的 LAM 治疗过程中,病毒学突破后采用 ADV 补救疗法对 HBV 逆转录酶基因异质性的影响,结果发现 LAM 单一治疗易引起能够影响 ADV 补救疗法应答率的准种出现,并降低对其他核苷(酸)类似物疗法的敏感性。Fen 等<sup>[28]</sup>研究了一例 LAM 治疗 40 周发生生化学反弹后改用 ADV 治疗的慢性乙型肝炎患者复杂的准种动力学变化,发现对 LAM 耐药的变异株在改用 ADV 后逐渐减少直至消失。另

外,Chen 等<sup>[23]</sup>和 Liu 等<sup>[24]</sup>研究发现,在不同的药物选择压力下,无应答患者表现为相似的准种进化模式,提示该模式可能与病毒耐药发生机制有关。从准种的角度看,药物的选择压力使病毒种群所占的相对比率发生改变,优势种群和劣势种群发生转换,即出现种群的漂移现象。随着分子生物学和生物信息学的发展,PCR、分子克隆及序列分析等手段的广泛应用,应用生物信息学方法研究准种是一种必然趋势。

#### 四、小结与展望

HBV 准种概念的引入,替代了以往大多以单一的 HBV 病毒株为对象的研究,使医者对 HBV 的认识更加全面。HBV 准种对于研究抗病毒疗效及耐药的预测具有重要意义,抗病毒治疗过程中,在耐药株成为优势准种前能被检测出来,可作为指导抗病毒药物的选择、及时采取补救治疗、评价抗病毒疗效的依据,将有利于慢性乙型肝炎的优化治疗。遗憾的是,由于准种分析的过程费时、费力,仍难以在临床上广泛开展。

#### 参 考 文 献

- Smith DB, McAllister J, Casino C, et al. Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *J Gen Virol*,1997,78(7):1511-1519.
- Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*,2007,127(2):131-150.
- Schaub M, Keller W. RNA editing by adenosine deaminases generates RNA and protein diversity. *Biochimie*,2002,84(8):791-803.
- Ngui S, Teo C. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat*,1997,4(5):309-315.
- Kim H, Jee YM, Song BC, et al. Analysis of hepatitis B virus quasispecies distribution in a Korean chronic patient based on the full genome sequences. *J Med Virol*,2007,79(3):212-219.
- Kojima N, Horiike N, Michitaka K, et al. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*,1999,30(3):359-365.
- 兰林, 王宇明, 黄燕萍. 慢性乙型肝炎患者病毒准种特性的初步研究. *中华肝脏病杂志*,2003,11(4):28-30.
- 成军, 董菁, 刘妍, 等. 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式. *世界华人消化杂志*,2003,11(8):1238-1240.
- 董菁, 成军, 王勤环, 等. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区准种与变异特点的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*,2002,16(3):264-266.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, et al. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*,2006,439(7074):344-348.
- Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog*,2005,1(2):102-110.
- Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*,2000,20(1):103-126.
- Biebricher CK, Eigen M. The error threshold. *Virus Res*,2005,107(2):117-127.
- Mathet VL, Feld M, Espinola L, et al. Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. *J Med Virol*,2003,69(1):18-26.
- 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 乙型肝炎病毒 S 区准种与疾病活动性的关系. *中华传染病杂志*,2002,20(5):282-286.
- 温志立, 谭德明, 彭仕芳, 等. 熔点曲线法研究乙型肝炎病毒准种和临床表现的关系. *中华肝脏病杂志* 2006,14(1):19-22.
- Baumert TF, Thimme R, von Weizsacker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2007,13(1):82-90.
- Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic

hepatitis B. *Med Mol Morphol*, 2006, 39(3):113-120.

- 19 Li W, Ikematsu H, Yamaji TK, et al. Hepatitis B virus genomes of chronic hepatitis patients do not contain specific mutations related to acute exacerbation. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(10):2104-2112.
- 20 Lim SG, Cheng Y, Guindon S, et al. Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion. *Gastroenterology*, 2007, 133(3):951-958.
- 21 Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, et al. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*, 2011, 54(1):19-25.
- 22 罗志雄, 刘映霞, 彭忠田, 等. HBV 准种变异预测核苷(酸)类似物治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎持续疗效的初步研究. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(2):16-20.
- 23 Chen L, Zhang Q, Yu DM, et al. Early changes of hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment and the correlation with antiviral efficacy. *J Hepatol*, 2009, 50(5):895-905.
- 24 Liu F, Chen L, Yu DM, et al. Evolutionary patterns of hepatitis B virus quasispecies under different selective pressures: correlation with antiviral efficacy. *Gut*, 2011, 60(9):1269-1277.
- 25 Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis*, 2005, 25(1):9-19.
- 26 Pallier C, Rodriguez C, Brillet R, et al. Complex dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir. *Hepatology*, 2009, 49(1):50-59.
- 27 Moriconi F, Colombatto P, Coco B, et al. Emergence of hepatitis B virus quasispecies with lower susceptibility to nucleos(t)ide analogues during lamivudine treatment. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60(2):341-349.
- 28 Ji F, Zhou L, Ma S, et al. Dynamic changes of HBV quasispecies and deletion patterns in a chronic hepatitis B patient. *J Med Virol*, 2009, 81(9):1551-1559.

(收稿日期:2011-03-17)

(本文编辑:孙荣华)

郑彩霞, 陈立, 潘晨. 乙型肝炎病毒准种的临床意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2011, 5(4):494-498.

中 华 医 学 会