

67例乙型肝炎病毒rtA181位点突变患者的临床分析

杨志国 陈晓慧 李平 常静霞 汪茂荣

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒rtA181位点突变患者的临床特点,并初步探讨其临床治疗策略。方法 对核苷(酸)类似物(NUCs)治疗过程中出现病毒学突破或治疗效果不佳的患者,进行HBV DNA P基因区NUCs相关耐药位点(共22个常见位点)的检测,其中出现rtA181位点突变者,回顾性分析其NUCs使用情况;观察部分病例改变治疗策略后的疗效,并采用描述性统计分析。结果 227例NUCs相关耐药位点变异阳性患者中出现rtA181位点突变者共103例;病例资料完整的67例患者中,单一A181T或A181V突变者21例,A181T + A181V突变者2例;A181T、A181V合并N236T突变者22例,A181T、A181V合并L180M、M204V和(或)M204I突变者13例,A181T、A181V合并其他突变者(包括L80I、V173L、S202G和M250L)者9例。5例患者单独使用拉米夫定治疗出现病毒学突破后加用阿德福韦酯,效果不佳;9例患者单独使用阿德福韦酯治疗出现病毒学突破或效果不佳加用拉米夫定,HBV DNA下降也不理想;检测HBV DNA P区NUCs相关耐药位点,均出现rtA181位点突变,改变治疗方案为阿德福韦酯加用恩替卡韦治疗3~6个月后,HBV DNA均出现显著下降,效果理想。结论 拉米夫定、阿德福韦酯治疗过程中,如出现HBV DNA病毒学突破或疗效不佳,只是简单地分别加用阿德福韦酯或拉米夫定,治疗效果可能不理想;可靠的方法是检测HBV DNA P区NUCs相关耐药位点,根据耐药位点的检测结果来变更有效的治疗方案,对于合并rtA181位点突变患者,可考虑阿德福韦酯加用恩替卡韦治疗。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;rtA181位点;突变;临床分析

Clinical analysis on 67 cases of chronic hepatitis B with rtA181 mutation YANG Zhi-guo, CHEN Xiao-hui, LI Ping, CHANG Jing-xia, WANG Mao-rong. Liver Disease Center of PLA, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: YANG Zhi-guo, Email: lvyang_001@163.com

【Abstract】 **Objective** To observe the clinical characteristics of patients with chronic hepatitis B with rtA181 mutation. **Methods** Twenty-two mutation sites in HBV DNA P gene correlated to nucleos(t)ide analogues (NUCs) were detected in patients who experienced virological breakthrough during NUCs treatment. The antiviral therapy and response history of patients infected with rtA181 mutation were analyzed. Treatment effect of partial patients after switching therapy strategy was also analyzed. **Results** Total of 103 patients were detected positively with rtA181 mutation in 227 cases with mutation sites. Among 67 cases with detailed clinical data, 21, 2, 22, 13 and 9 cases were detected positively with single A181T/V mutation positive, A181T + A181V mutation positive, A181T + rtA181V + N236T mutation positive, A181T/V + L180M (M204V/I) mutation and A181T/V + (L80I, V173L, S202G, M250L) mutation positive, respectively. Among 67 cases, there were 5 patients experienced virological breakthrough during LAM treatment, 9 patients experienced virological breakthrough during ADV treatment. Treatment effect were poor in these patients after adding ADV and LAM, respectively. Total of 14 patients were detected positively with A181 mutation. Undetected HBV DNA was achieved in all patients after ADV + ETV treatment for 3-6 months. **Conclusions** Mutation sites in HBV DNA P gene correlated to NUCs should be detected in patients who experienced virological breakthrough during LAM or ADV treatment. If A181 mutation was positive in these patients, treatment with ADV + ETV would produce an ideal virological suppression.

【Key words】 Hepatitis B virus; rtA181 locus; Mutation; Clinical analysis

HBV感染呈世界性流行,但不同地区HBV感染的流行强度差异很大;我国现有的慢性HBV感染者约9300万人,其中慢性乙型肝炎患者约2000万例^[1]。目前,包括我国2010年版慢性乙型肝炎防治指南在内的各类指南,均强调治疗HBV感染的关键是抗病毒,只要有适应证且条件允许,就应进行规范的抗病毒治疗^[2]。抗病毒的治疗药物主要是干扰素和核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NUCs],其中NUCs对于抑制HBV复制,减轻肝脏组织学炎症和纤维化的疗效确切,使用方便、不良反应少,且得到了AASLD、EASL、APASL和国内慢性乙型肝炎防治指南的推荐;随着NUCs在临床上的广泛使用,也有部分病例因出现原发无应答、疗效不佳和长期治疗中的耐药突变等原因而导致治疗失败(其中耐药突变是最为常见的原因),导致其抗病毒的疗效尚不能令人满意。因此,探索各种优化治疗(如个性化治疗、联合治疗等)显得十分必要^[3]。其中使用拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)抗HBV治疗过程中,均可能因为出现rtA181位点突变,导致治疗效果下降或治疗失败;本研究主要是调查NUCs治疗HBV感染者中,出现HBV rtA181位点突变患者的临床特点,并初步探讨其临床治疗策略。

资料与方法

一、一般资料

病例来源于中国人民解放军第八一医院2010年10月至2012年8月门诊和住院患者,共67例,男性62例,女性5例,年龄25~59岁,平均年龄41.0岁;均有使用拉米夫定和(或)阿德福韦酯的治疗史,在治疗过程中因出现病毒学突破或治疗效果不佳,进行了HBV DNA P基因区NUCs相关耐药位点的检测,对于出现rtA181位点突变者,分析其NUCs的使用情况,并观察了部分病例改变治疗策略后的疗效和安全性。本研究为回顾性非干预性研究,符合医学伦理学相关要求。

二、方法

1. 主要指标及检测方法:采用ABI7300型荧光定量PCR仪检测HBV DNA载量,试剂购于上海科华生物工程股份有限公司,定量范围为:500~1×10⁸拷贝/ml;采用测序法检测HBV DNA P基因区耐药位点,主要包括以下22个常见NUCs相关耐药位点(L80I/V、V173L、L180M、M204V/I、A181T/V、N236T、A194T、I169T、S202G/I、T184G/S/A/I/L/F

和M250V/I/L),检测由深圳华大基因研究院完成;肝功能及血液生化指标:采用Beckman全自动生化分析仪检测肝功能指标(ALT、AST、TBil、ALB、GLB等)及肾功能指标(BUN、Cr)。

三、统计学处理

本研究为一般资料的统计,均采用描述性统计分析。

结 果

一、420例HBV DNA P区NUCs相关耐药位点的检测

在使用LAM、ADV、替比夫定(telbivudine, LdT)和(或)恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗过程中,有420例患者因出现病毒学突破或治疗效果不佳,进行了HBV DNA P区NUCs相关耐药位点的检测(共22个常见位点),其中NUCs相关耐药位点变异阳性患者共227例,出现rtA181位点突变共103例,占45.4%(103/227),其中病例资料完整者67例,均纳入本研究。

二、rtA181位点单一突变和合并其他位点突变的模式

103例rtA181位点突变患者中,单一A181T突变者54例,单一A181V突变者34例,A181T+A181V突变者15例;A181T和(或)A181V合并N236T突变者36例,A181T和/或A181V合并L180M、M204V和(或)M204I突变者25例,A181T和(或)A181V合并其他突变者(包括L80I、V173L、S202G、M250L)22例;无合并L80V、A194T、I169T、S202I、T184G、T184S、T184A、T184I、T184L、T184F、M250V、M250I等位点突变者。103例rtA181位点突变患者中,临床资料完整者67例,rtA181单一位点突变和合并其他位点突变的模式见表1,A181T和(或)A181V合并其他突变者包括L80I、V173L、S202G、M250L等。

三、rtA181位点突变患者NUCs的使用情况

本组病例中,67例临床资料完整者检测HBV DNA P基因区出现耐药位点前NUCs的使用情况见表1。

四、部分rtA181位点突变患者改变治疗方案后的疗效

本组病例中,有5例患者单一使用LAM治疗12~48个月,出现病毒学突破后加用ADV,因治疗6~48个月,效果不佳或出现病毒学突破,检测HBV DNA P基因区NUCs相关耐药位点出现rtA181位点突变,改变治疗方案为ADV加用ETV,治疗3

表1 67例rtA181位点突变患者NUCs使用情况 [例 (%)]

变异模式	LAM单一使用	ADV单一使用	LAM、ADV联合或序贯	LAM、ADV联合或序贯其他NUCs	合计
A181T或A181V单一突变	2 (25.0)	9 (47.4)	8 (30.8)	2 (14.3)	21 (31.3)
A181T+A181V突变	0 (0)	1 (5.3)	1 (3.8)	0 (0)	2 (3.0)
N236T单一突变	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A181T和(或)A181V合并N236T突变	1 (12.5)	9 (47.4)	10 (38.5)	2 (14.3)	22 (32.8)
A181T、A181V和(或)N236T合并L180M、M204V和(或)M204I突变	5 (62.5)	0 (0)	5 (19.2)	3 (21.4)	13 (19.4)
A181T和(或)A181V合并其他位点突变	0 (0)	0 (0)	2 (7.7)	7 (50.0)	9 (13.4)
合计	8 (100)	19 (100)	26 (100)	14 (100)	67 (100)

~6个月后, HBV DNA均出现显著下降(下降2~4 log₁₀拷贝/ml); 9例患者单一使用ADV 6~36个月后, 效果不佳或出现病毒学突破者加用LAM; 治疗12~30个月后, 因效果不佳或出现病毒学突破者检测P区NUCs相关耐药位点, 出现rtA181位点突变, 改ADV加用ETV, 治疗3~6个月后, HBV DNA水平均出现显著下降(下降2~4 log₁₀拷贝/ml)。

讨 论

核苷(酸)类似物长期治疗中出现疗效不佳和耐药突变是治疗失败的主要原因, 目前为减少疗效不佳和耐药突变的发生, 提倡个性化治疗; 个性化治疗主要包括初始治疗时选用抑制病毒复制能力强、高耐药屏障的药物(尤其是高病毒载量患者)。联合治疗的原理是以不同作用机制或互补机制的药物进行联合, 通过联合无交叉耐药位点的抗病毒药物可在一定程度上延迟或避免耐药突变的发生; 包括初始联合、优化联合和挽救联合, 其中挽救联合治疗应用最为广泛。理想的联合治疗是在不增加不良反应的前提下最大限度地抑制病毒复制及降低耐药发生率。各种指南^[2,4]均推荐LAM治疗过程中, 若出现病毒学突破或疗效不佳可加用ADV; ADV治疗过程中, 若出现病毒学突破或疗效不佳可加用LAM。

本研究中420例患者使用LAM、ADV、LdT和(或)ETV治疗过程中, 出现病毒学突破或疗效不佳, 出现NUCs相关耐药位点变异者共227例, 其中rtA181位点突变共103例, 达45.4%; 103例中临床资料完整的67例患者中, 53例在初始治疗时采用LAM、ADV单一或序贯治疗, 这与目前指南中推荐初始治疗时应选用抑制病毒复制强、高耐药屏障的药物相矛盾, 这可能与开始抗病毒时, 部分地区仅有LAM定进入医保目录、国产ADV药物价格较低, 导致医师和患者选择意向较高; 同时应注意目

前确实有相当数量的患者仍然是采用LAM、ADV单一或序贯治疗。

台湾学者Yeh等^[5]最早报道了rt181变异, 并进一步体外证实了rtA181T变异株对LAM耐药。LdT III期全球注册的临床研究结果^[6]、ADV的多中心随机双盲对照研究发现^[7], 经过52~144周的治疗, HBV DNA阳性患者均出现rt181位点的变异。有研究证实, 在体外rtA181T突变可影响S基因第172位编码色氨酸的密码子突变为终止密码子, 即sW172*突变, 导致HBsAg丢失大部分C-末端疏水区, 从而抑制HBsAg的分泌, 并可引起HBV DNA复制活性下降^[5,8]; 也有相关研究提示慢性乙型肝炎患者体内HBV rtA181T突变不会引起HBsAg、HBV DNA水平的降低^[9-10]。LAM、ADV单药治疗过程中, 均有出现rtA181位点突变的可能, rt181位点变异在不仅会导致相关的核苷类药物耐药, 而且也会影响到病毒自身的复制、蛋白分泌等^[11], 甚至还可能与肿瘤的发生有关^[12-13], rt181位点的突变使得临床表现和治疗方式呈现复杂化与多样化, 这为后续的治疗带来了一定的难度。本研究中5例患者单独使用LAM出现病毒学突破后加用ADV, 效果不佳; 9例患者单独使用ADV出现病毒学突破或效果不佳后加用LAM, HBV DNA下降也不理想; 检测P区NUCs相关耐药位点, 均出现rtA181位点突变, 改变治疗方案为ADV加用ETV后, HBV DNA均出现显著下降。体外实验结果提示单一rtA181V或rtN236T突变时^[14], HBV对ADV的敏感性分别下降4.3倍和7倍, rtA181V和rtN236T联合突变时敏感性将下降18倍; 另有研究表明, 出现rtA181V/T变异株时, LAM的敏感性下降2~11倍, ADV的敏感性下降2~8倍, 出现rtA181V/T和rtN236T联合突变时, LAM的敏感性下降35~43倍, ADV的敏感性下降5倍以上^[15]; 有研究表明rtA181位点突变的病毒株对ETV和LdT仍然敏感^[16]; 本研究结果

与以上观点结论一致;也有研究在ETV抗HBV治疗过程中,检测到rtA181位点突变,还未发现能引起HBV病毒学突破,ETV对这些患者仍具有良好的治疗效果^[17]。关于rtA181位点突变后的临床干预目前尚缺乏相应临床研究的证据支持,尚有待进一步积累临床数据。

在各种NUCs用于抑制HBV复制的长期使用过程中,出现不同的耐药位点突变,与这些NUCs相关的耐药位点不一致或存在部分的交叉,尤其是有一部分交叉耐药位点的药物尤值得引起关注,这就要求在联合用药的药物选择上必须根据实际情况选择切实有效的药物,尤其是具有交叉耐药的药物在选择时更要慎重,这样才能达到期望的良好效果。如果不能以耐药位点检测的方式来选择后续的治疗药物,可能不仅不能达到较好的治疗效果,也有可能带来更大的经济负担,因而在开始治疗之初,即选择抑制能力强、耐药发生率低的药物显得更加重要。LAM、ADV单药或序贯治疗过程中,若出现HBV病毒学突破或疗效不佳,最可靠的方法是检测HBV DNA P区NUCs相关耐药位点,根据耐药位点的检测结果来变更有效的治疗方案,对于合并有rtA181位点突变患者,如先前使用的是LAM可考虑换用ADV加用ETV;如先前使用的是ADV则可考虑加用ETV,而不是加用LAM。对于无合并rtA181位点突变患者,可根据实际情况加用LAM或ADV进行挽救联合治疗,后续的治疗过程中如果再次出现病毒学突破或效果不佳,应该重新进行HBV DNA P区NUCs相关耐药位点的检测,判断是否出现rtA181位点或其他位点的突变,进行NUCs的调整或重新组合,也可考虑换用或联用干扰素进行治疗,以最大程度地抑制病毒复制。

参 考 文 献

- 1 Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China. *Chin Med J (Engl)*,2009,122(1):3-4.
- 2 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(2010年版).中国脏病杂志:电子版,2011,3(1):40-56.
- 3 Carey I, Harrison PM. Monotherapy versus combination therapy for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Investig Drugs*,2009,18(10):1655-1666.
- 4 万谟彬,翁心华.拉米夫定优化治疗慢性乙型肝炎专家共识.中华传染病杂志,2012,30(7):387-390.
- 5 Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*,2000,31(6):1318-1326.
- 6 Lai CL, Gane E, Liaw YF, et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med*,2007,357(25):2576-2588.
- 7 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*,2005,352(26):2673-2681.
- 8 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. *Hepatology*,2008,48(1):88-98.
- 9 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 Korean Med Sci*,2010,25(2):257-264.
- 10 王春亚,钟彦伟,刘杰,等. HBV逆转录酶区A181T突变的临床意义. *军医进修学院学报*,2010,31(11):1125-1126.
- 11 Zoulin F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, 2009,137(5):1593-608.
- 12 Lai MW, Yeh CT. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/ surface truncation mutant. *Antivir Ther*,2008,13(4):875-879.
- 13 Lai MW, Huang SF, Hsu CW, et al. Identification of nonsense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy. *Antivir Ther*,2009,14(2):249-261.
- 14 Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance:clinical consequence and molecular aspects. *Semin Live Dis*,2006,26(2):162-170.
- 15 Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B yreatment failure. *J Hepatol*,2008,48(5):747-755.
- 16 European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guideline: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*,2009,50(2009):227-242.
- 17 赵攀,钟彦伟,徐东平. 5例应用恩替卡韦治疗的慢性HBV感染者发生HBV逆转录酶区单独A181位点突变的分析. *临床肝胆病杂志*, 2011,27(3):289-291.

(收稿日期: 2012-10-23)

(本文编辑: 孙荣华)

杨志国,陈晓慧,李平等. 67例乙型肝炎病毒rtA181位点突变患者的临床分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(2): 238-241.