

· 临床论著 ·

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

罗志雄 刘映霞 彭忠田 李红梅

【摘要】 目的 观察核苷(酸)类似物治疗 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者的 HBV 聚合酶(HBV-P)基因序列的准种组成及其变异特点,探讨其与抗病毒疗效的关系。方法 巢式 PCR 法扩增 HBV-P 基因中覆盖 B 区~E 区序列的基因片段,PCR 产物纯化后直接测序以评估 HBV 准种的复杂性。观察拉米夫定治疗完全应答组、部分应答组和无应答组患者治疗前、治疗 12 周和 24 周的准种组成并分析其与疗效的关系。疗效评估包括血清学、病毒学、血液生物化学和综合应答。结果 拉米夫定治疗 2 年,完全应答者 36 例,部分应答者 59 例,无应答者 32 例。HBV DNA 转阴率 81.2% (103/127), HBeAg/HBeAb 血清转换率 37.9% (48/127), ALT 复常率 86.4% (109/127)。治疗前、治疗后 24 周、48 周、96 周时 YMDD 变异率分别为 0、2.4% (4/165)、11.2% (18/161) 和 25.9% (38/147)。所有患者 HBV 准种变异在治疗前、治疗 12 周和 24 周时均有不同程度的改变,无应答组 12 周与 24 周时 HBV 准种复杂性显著高于完全应答组 ($P < 0.001$)。结论 HBV P 区准种变异的复杂性与慢性乙型肝炎患者拉米夫定抗病毒治疗的持续疗效存在相关性,治疗 12 周与 24 周时的 HBV 准种变异可能作为核苷(酸)类似物抗病毒持续疗效的预测指标之一。

【关键词】 乙型肝炎病毒;准种;疗效;拉米夫定

Primary research of HBV P gene quasispecies as an predictor for nucleos(t)ide analog(ue) treatment of chronic hepatitis B patients with HBeAg positive LUO Zhi-xiong, LIU Ying-xia, PENG Zhong-tian, LI Hong-mei, Infectious Diseases Department, The First Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding author: LIU Ying-xia, Email: yingxialiu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between hepatitis B virus P gene (HBV-P) quasispecies mutants and nucleos(t)ide analogues treatment effect in chronic hepatitis B patients with HBeAg positive. **Methods** HBV quasispecies were determined by nested polymerase chain reaction (NT-PCR) and DNA sequence analysis. One hundred and sixty five patients were treated with lamivudine

基金项目:国家教委留学回国人员基金和湖南省自然科学基金(06 jj4106);深圳市科技计划重点项目基金

作者单位:421001 湖南衡阳,南华大学附属第一医院感染科(罗志雄、刘映霞、彭忠田、李红梅);深圳市第三人民医院(刘映霞)

通讯作者:刘映霞, Email: yingxialiu@hotmail.com

100 mg once daily for 9 to 24 months. Therapeutic effect evaluation involved serum HBV DNA level, HBeAg/HBeAb seroconversion and biochemical response. According to the therapeutic effect, patients were divided into three groups including the long term complete responders (CRL), partial responders (PR) and non responders (NR). Analysis of the relationship between HBV-P quasispecies and nucleos(t)ide analogues treatment effect was carried out. **Results** Of the 165 patients received lamivudine for two years, thirty six reached CRL, fifty nine reached PR and 32 were NR. The ratios of HBV DNA negative, HBeAg/HBeAb seroconversion and normal alanine aminotransferase (ALT) were 81.2% (103/127), 37.9% (48/127) and 86.4% (109/127), respectively. YMDD mutants was not discovered before therapy, but were found in 2.4% (4/165) patients on the 6th month, 11.2% (18/161) on the 12th month and 25.9% (38/147) on the 24th month. All the quasispecies were different among the three groups during treatment of lamivudine. The quasispecies mutation was distinctly different between the group CRL and NR on the 12th, 24th week of treatment ($P < 0.001$). **Conclusions** The complexity of HBV quasispecies was correlated with therapy effect. HBV quasispecies mutations on the 12th week and the 24th week was an important predictor for nucleos(t)ide analog(ue) treatment of chronic hepatitis B patients with HBeAg positive.

【Key words】 Hepatitis B virus; Quasispecies; Effect; Lamivudine

准种是由 Eigen^[1]首先提出的用于描述同种生物遗传异质性的概念。准种研究是近年病毒变异研究的热点之一^[2-6],有关 HBV 准种特性的研究近年也逐渐受到重视。有学者指出,关于 HBV 准种形成的原因及其与临床表现之间的相互关系是研究 HBV 准种特性的重要意义所在^[7-10]: HBV 具有的准种特性可能是引起乙型肝炎慢性化和抗病毒治疗失败的一个非常重要的病毒学因素。本研究采用巢式 PCR 和 PCR 产物直接测序技术,检测 HBV-P 区的核苷酸序列组成。同时检测拉米夫定、阿德福韦酯特异耐药变异位点,探讨 HBV 准种及变异与核苷(酸)类似物抗病毒疗效的关系。

资料与方法

一、病例资料

165 例 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者为我院 2006 年 7 月至 2008 年 7 月门诊和住院患者诊断符合 2000 年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准^[11]。其中男 108 例,女 57 例,年龄 17~66 岁,平均(33±12)岁;所有患者血清 HBV DNA 水平高于 10^4 拷贝/ml,其中 HBV DNA $>1 \times 10^6$ 拷贝/ml 者 102 例, 1×10^4 拷贝/ml \leq HBV DNA $\leq 1 \times 10^6$ 拷贝/ml 者 63 例。ALT 水平平均高于 80 U/L。

二、治疗方法

所有 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者以拉米夫定(贺普丁)100mg 每日一次口

服治疗 12 ~ 24 月。疗效评估包括血清学、病毒学、血液生化学和综合应答。所有患者在本次抗病毒治疗前均未用过其他抗病毒药物。分别与治疗前、治疗后 3 个月、6 个月、12 个月采集外周血存于 -80℃ 备用。如果出现耐药变异,则加用阿德福韦酯(贺维力)10 mg 每日一次口服。重叠 12 周后改为单用阿德福韦酯(贺维力)10 mg 每日一次口服。

三、观察项目

1. 血清标志物检测: HBsAg、HBeAg 检测应用 ELISA 法,按试剂盒(购自北京万泰生物公司)说明进行操作。

2. 肝功能检测:采用 IFCC 法在生化分析仪上测定。

3. HBV DNA 定量检测:应用荧光定量 PCR (MJOPTICON2, USA)进行 HBV DNA 检测(试剂盒由上海申友生物公司提供)。

以上 3 个实验步骤由本院肝病中心实验室完成。

4. HBV 准种检测:采用巢式 PCR 扩增目的片段,PCR 产物直接测序的方法。(1)按试剂盒说明提取 DNA:以 HBV 基因序列为依据,设计两对引物,外侧上游引物为: S1 5' -CTAGGACCCCTGCTCGTGT-3'; 外侧下游引物为: RS1 5' -GCAAACCCCAAAGACCCA-3'。内侧上游引物为: S2 5' -AAAATCCTCACA AT-ACCAC -3'; 内侧下游引物为: RS2 5' -GACATACTTTCCAATCAATAG -3'。引物由上海瑞捷生物公司合成。靶区域覆盖 HBV RT 的 B 区 ~ E 区,包含逆转录酶区的 345 个氨基酸残基的编码序列。(2)以巢式 PCR 法自患者的血清中扩增出靶基因片段。PCR 扩增的反应体系:第一轮, S1、RS1 分别加 2 μl, DNA 模版 2 μl, 2 × PCR Master 24 μl, 去离子水 20 μl, 总反应体积为 50 μl; 第二轮, S2、RS2 分别加 2 μl, DNA 模版 2 μl, 2 × PCR Master 24 μl, 去离子水 20 μl, 总反应体积为 50 μl。参数如下:第一轮,预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 60 s, 退火 56℃ 60 s, 延长 72℃ 45 s, 共 30 个循环, 72℃ 再延长 10 min; 第二轮,预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 60 s, 退火 48℃ 60 s, 延长 72℃ 45 s, 共 30 个循环, 72℃ 再延长 10 min。取 5 μl PCR 产物在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统下观看并保存结果。(3)PCR 产物纯化并测序:琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型, 上海瑞捷生物工程有限公司),按试剂盒说明操作将 50 μl PCR 产物纯化,并送上海生物工程公司进行序列测定。

四、疗效判断

参考“阿德福韦酯片治疗成人慢性乙型肝炎的多中心、随机、双盲、对照(拉米夫定)临床研究(临床研究方案号:CS_ ADV, 国家食品药品监督管理局药物临床研究批件号:2003L03645)研究”中的疗效评价标准。(1)完全应答: HBeAg 和 HBV DNA 均阴转, ALT 复常;(2)部分应答: HBeAg 和 HBV DNA 中有一项阴转, ALT 复常;(3)无应答:未达到上述指标者。

初始应答:治疗 12 周出现的情况按上述标准分为初始完全应答、无应答和部分应答。

早期应答:治疗 24 周出现的情况按上述标准分为早期完全应答、无应答和部分应答。

持久应答:治疗结束后随访 6 个月以上,疗效维持不变,无复发。

五、统计学处理

组间均数比较用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验,血清 HBV DNA 载量、ALT 水平、年龄均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。相关分析采用直线回归,所有数据均经 SPSS 13.0 统计软件处理。

结 果

一、主要疗效指标结果(表 1)

1. 持续应答:治疗终点(96 周)时,共 67 例(52.7%)患者血清 HBeAg 转阴,其中 48 例患者出现 HBeAg/抗-HBe 血清学转换(37.9%);共 103 例(81.2%)患者血清 HBV DNA 转阴;109 例(86.4%)患者血清 ALT 复常。随访 6 个月后仍保持完全应答者 36 例。

2. 初始应答:治疗 12 周时,共 16 例(9.6%)患者出现 HBeAg/抗-HBe 血清学转换;共 85 例(51.5%)患者血清 HBV DNA 转阴;108 例(65.4%)患者血清 ALT 复常。

3. 早期应答:治疗 24 周时,共 62 例(39.3%)患者出现 HBeAg/抗-HBe 血清学转换;共 120 例(75.0%)患者血清 HBV DNA 转阴;151 例(94.3%)患者血清 ALT 复常。

二、HBV 准种变异检测结果

1. 巢式 PCR 法扩增 HBV-P 基因序列,目的基因片段约 754 kb,见图 1。

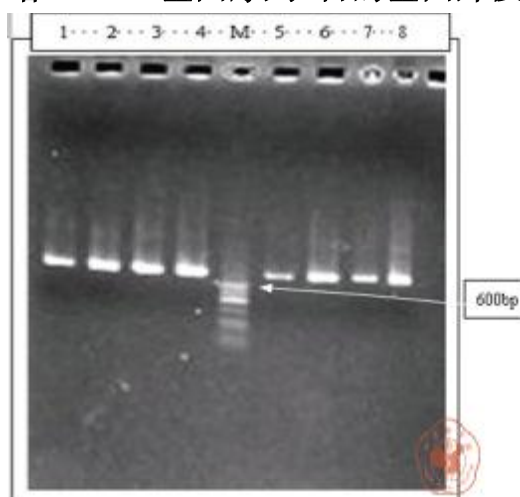


图 1 巢式 PCR 法扩增目的片段的电泳结果
1~8: 标本血清的巢式 PCR 产物; M: 100 bp DNA ladder

2. 部分标本全基因组序列同源性比较: 同一患者血清组内序列同源性为 97.5% ~ 99.8%; 不同患者血清组间序列同源性为 91.6% ~ 100% (图 2)。

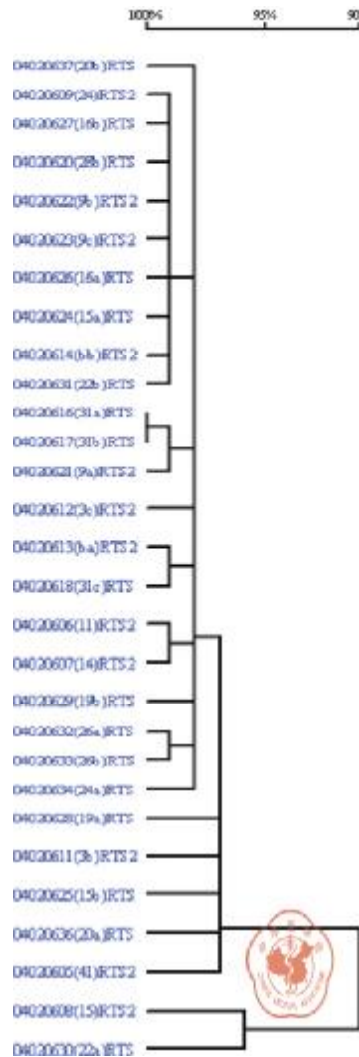


图 2 全基因组序列同源性比较

注: 同例血清组内序列同源性为 97.5% ~ 99.8%; 不同例血清组间序列同源性为 91.6% ~ 100%。数字相同的表示同一患者, 如 31a、31b、31c 表示同一患者治疗前、治疗 12 周、治疗 24 周; 数字不同的即为不同例。

3. 核苷酸序列分析结果及与疗效的相关性: 在已经测序成功的 98 个 HBV-P 区的 DNA 序列中, 核苷酸变异的形式主要为点突变, 包括碱基替换、碱基插入和碱基缺失, 在 22a 和 25b 还发生了小片段碱基缺失, 插入和缺失突变主要集中在 HBV-P 区的 c ~ e 区, DNA 序列中共有 28 个高突变点, 根据这些突变对三联体密码效应的影响对这些突变进行评价, 发现主要为同义突变, 其次为错义突变。HBV-P 区的 DNA 序列测序结果显示: 所有标本该区序列的异质性均小于 4.5%, 符合目前通用的准种标准 (<5%)。纵向比对所测得的序列发现: HBV-P 区的准种组成随抗病毒治疗时间的变化而呈现明显的动态变化, 结果如表 2。

表1 165例患者的综合疗效情况

治疗时间	病例数(例)	ALT 复常 [例(%)]	HBV DNA 转阴 [例(%)]	HBeAg/HBeAb 转换 [例(%)]
12周	165	108(65.5)	85(51.5)	16(9.6)
24周	161	151(94.3)	120(75.0)	62(39.3)
48周	147	129(88.5)	125(85.0)	52(36.1)
96周	127	109(86.4)	103(81.2)	48(37.9)

表2 HBV DNA P区准种变异的动态分布情况

组别	例数(n)	序列间准种差异性($\bar{x} \pm s, \%$)		
		治疗前	治疗12周	治疗24周
持续应答	36	0.9 ± 2.1	1.3 ± 1.9	2.5 ± 1.7
无应答	32	1.1 ± 2.7	4.1 ± 1.2*	4.5 ± 1.3*
部分应答	59	0.7 ± 2.3	1.9 ± 1.2	2.2 ± 1.4

注: *与持续应答组比较, $P < 0.001$

表2结果显示, HBV 准种的异质性在应用核苷(酸)类似物抗病毒治疗患者治疗前、治疗12周及治疗24周这3个时间点均有不同程度的改变, 随着时间的推移, 这三组患者的HBV准种异质性变得更复杂, 在无应答组这种趋势尤为明显。研究纵向动态变化趋势, 发现准种克隆型有不同程度改变, 特别在产生持续应答的36例患者与32例无应答患者两组中, 后者的准种比前者明显复杂。治疗12周与24周时HBV准种的异质性具有显著性差异($P < 0.001$)。

讨 论

抗病毒治疗是治疗慢性乙型肝炎和防止肝病进展的关键。核苷(酸)类似物以其使用方便、相对低廉的价格、确切的近期疗效及良好的耐受性成为抗HBV治疗的重要手段。因需长期治疗, 为保证治疗效果并尽量减轻患者的医药负担, 急需有效的疗效预测指标。慢性丙型肝炎治疗中, 早期病毒学应答是持续病毒学应答的良好预测指标。聚乙二醇化干扰素联合利巴韦林治疗12周时, HCV RNA载量较基线下降量大于 $2 \log_{10}$ 拷贝/ml, 继续治疗的持续病毒学应答为67%~80%^[12]。慢性乙型肝炎治疗中关于核苷(酸)类似物疗效的预测指标也一直是研究的热点问题。根据准种学说, 慢性乙型肝炎患者携带的HBV病毒株随着时间及外来因素的影响而产生微小的变异, 这些微小差异是否与核苷(酸)类似物治疗的疗效存在一定的关系呢?

本研究通过对165例慢性乙型肝炎患者治疗前、治疗后第3、第6个月血清的PCR产物直接测序检测HBV的准种变异(随着拉米夫定治疗时间的推移, 一部分患者发生HBV变异, 加用阿德福韦酯一个月后就改为阿德福韦酯治疗, 两年后符合条件的还剩127例患者), 结果发现HBV准种的异质性随着时间推移变得更加复杂, 在根据核苷(酸)类似物抗病毒疗效分成的3组患者间均表现出这种趋势, 在无应答组这种趋势更明显。具有良好疗效的持续应答组患者的准种复杂性比其他两组患者要低, 部分应答组又比无应答组低, 说明患者在抗病毒治疗前、治疗12周及治疗24周这3个时间点的HBV准种异质性纵向的动态变化与疗效存在密切关系。通过进一步的统计分析, 我们发现HBV准种克隆型均有不同程

度的改变,特别在产生完全应答的36例患者与32例产生了YMDD变异的无应答两组患者中,后者的准种复杂性比前者明显要高,且在治疗第12周与24周时具有显著性差异。HBV准种的异质性对治疗有影响,治疗12周与24周时HBV准种复杂性高,预示其持续疗效将不理想。

黄燕萍等^[13]比较6例慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗发生YMDD变异后其体内准种特性的变化,发现拉米夫定治疗前患者体内准种的复杂性比治疗后高。经测序发现治疗后2例患者的优势准种株出现M550V/L528M突变,3例患者出现了M550I突变。与我们的研究有一定的出入。分析其主要原因为:(1)分析采样标本的时间不一样,发生YMDD变异的时间较晚,一般都在48周以后,我们的标本是在24周以前,抗病毒治疗条件下,HBV的准种随着时间的推移会有一些的变化;(2)研究准种的方法不一样,我们采用的是研究准种的金标准,即PCR-直接测序。黄燕萍等采用的是单链构象多态性异源双链分析的方法,两种方法各有其优缺点;(3)标本的数量不同,我们是大样本的资料。刘映霞等^[14]采用SSCP和DNA序列分析方法检测了HBV S区准种。结果发现,HBV S基因准种复杂性随病情加重而增加,增加程度与HBeAg阴性、病情轻重及基因型相关,还推测S区、前-C/C区多个基因处也可能同时存在与病情加重有关的病毒准种复杂性。温志立等^[15]研究发现,HBV准种群的数量与临床表现密切相关,严重慢性HBV感染患者的准种群数量显著多于无症状感染者。对同一基因型而言,准种群数越多的患者其临床表现也越严重。Mutimer等^[16]对10例慢性乙型肝炎肝衰竭接受肝移植患者移植前后的血清样本行全程HBV DNA监测,并应用拉米夫定预防移植后再感染,结果50%患者成功预防移植后再感染,另5例患者在移植后8~15个月重新感染拉米夫定耐药株,是否复发与应用拉米夫定前的血清HBV水平有关。推测其原因可能是HBV高复制患者其准种复杂性更高,更有可能包含拉米夫定耐药株,在随后的抗病毒治疗中耐药株迅速被筛选,进而成为优势毒株。同年Cane等^[17]发现YMDD变异株可被拉米夫定所筛选,而停药后原有野生型毒株又成为优势株,这与我们的研究相一致。因此我们认为这些患者携带的HBV病毒株的准种变异与临床疗效确实存在一定的关系。即HBV病毒株的准种变异越复杂,就越有可能产生具有临床耐药的变异,从而影响临床疗效。HBV的准种变异在某种程度上可以预示抗病毒治疗的临床疗效。

拉米夫定是抗乙型肝炎病毒的主要药物之一。随着拉米夫定的广泛应用,拉米夫定导致的耐药问题日益突出,乙型肝炎病毒YMDD变异是引起拉米夫定耐药的主要机制^[18-20]。减少或避免出现耐药性YMDD变异,也显得日益重要。本研究中165例慢性乙型肝炎患者用拉米夫定治疗12~24个月,平均21个月,共检测出YMDD变异38例(23.3%),其中35例(89.4%)用药前HBV DNA载量均大于 6.3×10^7 拷贝/ml,耐药性多易发生在基础病毒水平高的患者。这一结果进一步证实了既往报道^[21]。33例(20%)变异发生在用药6~18个月之间,说明血清病毒载量水平越高,越容易产生YMDD变异,且产生时间较早。相对于拉

米夫定而言,阿德福韦酯出现耐药性病毒株的时间明显延迟,而且对耐药病毒株的选择作用亦较小^[22,23];本研究中38例慢性乙型肝炎患者YMDD变异后加用阿德福韦酯至治疗终点,发现1例rtN236T变异,且该耐药变异是在治疗15个月后发现。通过对YMDD变异前后血清HBV DNA载量的动态观察分析表明,随着拉米夫定治疗时间的延长,患者体内的HBV野生株被抑制,HBV DNA载量显著下降,部分患者表现为完全应答;出现YMDD变异后1~3个月,患者均出现HBV DNA反弹;由此可见,YMDD变异株的出现是引起HBV DNA反弹的直接原因。由于YMDD变异出现早于HBV DNA突破3个月^[24,25],而HBV的准种复杂性越高,YMDD变异出现的可能性越大,因此,对HBV准种及其变异的检测将有利于指导临床用药及疗效的监测。

本研究结果提示:HBV病毒株准种变异越复杂,就越有可能产生具有临床耐药的变异,从而影响临床疗效。HBV准种变异在某种程度上可以预示抗病毒治疗的临床疗效。治疗12周与24周时HBV准种及变异可以作为慢性乙型肝炎患者应用拉米夫定治疗持续疗效的预测指标。本研究尚未全部结束,尚需进一步研究治疗更长时间的疗效预测指标。因而,本组资料观察的例数及时间有限,对拉米夫定的疗效及影响因素的评价有待进一步研究和总结。

参 考 文 献

- 1 Eigen M. Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Q Rev Biophys*, 1971, 4: 149-212.
- 2 Shuhart MC, Sullivan DG, Bekele K, et al. HIV infection and antiretroviral therapy: effect on hepatitis C virus quasispecies variability. *J Infect Dis*, 2006, 193: 1211-1218.
- 3 Domingo E, Martin V, Perales C, et al. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 299: 51-82.
- 4 Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1023-1035.
- 5 Lyra AC, Fan X, Lang DM, et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies after liver transplantation. *Gastroenterology*, 2002, 123: 1485-1493.
- 6 Fan X, Di Bisceglie AM. Diversification of hypervariable region 1 of hepatitis C virus after liver transplantation. *J Med Virol*, 2003, 70: 212-218.
- 7 Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol*, 2005, 79: 15467-15476.
- 8 Delaney WE 4th, Yang H, Westland CE, et al. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol*, 2003, 77: 11833-11841.
- 9 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1118-1129.
- 10 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义. *解放军医学杂志*, 2002, 27: 112-115.
- 11 中华医学会传染病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8: 324-329.
- 12 Gary LD, Jone BW, Jong GM, et al. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 38: 645-652.
- 13 黄燕萍, 王宇明, 兰林, 等. 拉米夫定与乙型肝炎病毒准种及变异特点的关系. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11: 235-238.
- 14 刘映震, 胡国龄, 谭德明, 等. 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: 282-286.
- 15 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: 19-22.
- 16 Mutimer D, Pillay D, Dragon E, et al. High pre-treatment serum hepatitis B virus titre predicts failure of lamivudine prophylaxis and graft reinfection after liver transplantation. *J Hepatol*, 1999, 30: 715-721.

- 17 Cane PA, Mutimer D, Ratchliffe D, et al. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther*, 1999, 4: 7-14.
- 18 Yuen MF, Kato T, Mizokami M, et al. Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. *J Hepatol*, 2003, 39: 850-855.
19. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*, 2003, 36: 687-696.
- 20 Bozdayi AM, Uzunalimoglu O, Turkyilmaz AR, et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat*, 2003, 10: 256-265.
- 21 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology*, 2001, 34: 583-589.
- 22 Barcena R, Del Campo S, Moraleda G, et al. Study on the efficacy and safety of adefovir dipivoxil treatment in post-liver transplant patients with hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant hepatitis B virus. *Transplant Proc*, 2005, 37: 3960-3962.
- 23 Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, et al. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line probe assay (version 2). *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 1994-1997.
- 24 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.
- 25 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*, 2003, 124: 105-117.

(收稿日期:2009-01-19)

(本文编辑:温少芳)

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[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2009, 3(2): 151-159.