

• 论 著 •

乙型肝炎病毒核苷类似物交叉耐药株 RT 区变异分析*

滕 旭¹, 林乐勋¹, 陈丽玲², 梁 爽³, 徐 晖⁴, 谷鸿喜¹

(1. 哈尔滨医科大学微生物学教研室, 黑龙江哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学
大庆校区检验系, 黑龙江 大庆 163000; 3. 哈尔滨市疾病预防控制中心, 黑龙江哈尔滨 150056;
4. 哈尔滨医科大学医学遗传学教研室, 黑龙江哈尔滨 150081)

摘要:目的 研究多种核苷类似物(NAs)序贯治疗产生交叉耐药的患者体内乙型肝炎病毒(HBV)RT 区变异位点和变异类型。方法 筛选 6 例临床上对两种或两种以上 NAs 产生交叉耐药的患者, 并从患者血清中获取 HBV 交叉耐药株 DNA, 进行全基因克隆和测序, 从而分析其变异特点和规律。结果 经测序鉴定, 6 位患者体内 HBV 基因型均为 C 型, 产生交叉耐药的相关性变异以 rtM204V/I(YMDD)变异为主(50%), 部分 YMDD 变异株伴有 rtL180M 变异(16.7%)、其他伴随变异包括 rtV173L(16.7%), rtL80I(16.7%)。此外, 还发现 RT 区次要变异伴随位点 rtL269I(40%)、rtQ333K(56.7%)、rtH337N(56.7%)。结论 RT 区次要变异伴随位点 rtL269I、rtQ333K、rtH337N 的出现可能增强了 HBV YMDD 变异株在体内的复制能力, 并对交叉耐药准种所占比例起到了放大的效果, 从而导致本研究 6 例患者出现对拉米夫定、恩替卡韦、阿德福韦和替比夫定产生多重耐药。

关键词:乙型肝炎病毒; 交叉耐药; 病毒变异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1179-03

Analysis on variations of reverse transcriptase region in hepatitis B virus nucleoside analogues cross-resistant strains*

Teng Xu¹, Lin Lexun¹, Chen Liling², Liang Shuang³, Xu Hui⁴, Gu Hongxi¹

(1 Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China;

2. Department of Clinical Examination, Harbin Medical University(Daqing Campus), Harbin, Heilongjiang 163000, China;

3. Harbin Municipal Center for Disease Control and Prevention, Harbin, Heilongjiang 150056, China;

4. Teaching and Research Section of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China)

Abstract: Objective To study the sites and types of hepatitis B virus (HBV) variations at reverse transcriptase(RT) region in the patients with cross drug resistance generated by the nucleoside analogues (NAs) sequential treatment. **Methods** 6 adult patients with cross-resistance to 2 or above NAs were screened out. The DNA of cross resistant HBV strains was obtained from the serum of the patients and performed the whole-genome clone and sequencing for analyzing its variation characteristics and rule. **Results** The sequencing identification showed that HBV genotype in 6 patients was the type C and the related variations generating the cross drug resistance were dominated by rtM204V/I(50%), rtL180M(16.7%), rtV173L($n=16.7\%$) and rtL80I($n=16.7\%$). In addition, some secondary variations accompanying sites at the RT region such as rtL269I(40%), rtQ333K(56.7%), rtH337N(56.7%) were found. **Conclusion** The secondary variations at RT region could enhance the replication capacity of HBV YMDD variant strains, and enlarge HBV quasispecies variant populations, which caused the emergence of multi-drug resistant mutant virus during sequential or combination therapy with lamivudine, entecavir, adefovir and telbivudine in 6 patients of this study.

Key words: hepatitis B virus; drug cross-resistance; virus variation

乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染是导致慢性肝病最常见的原因。核苷类似物(NAs)通过抑制多聚酶或逆转录酶发挥抗病毒作用, 然而在宿主免疫反应和药物的选择压力下长期使用 NAs, HBV 的各种变异和耐药株会不断出现^[1-3], 这其中表现为两个原因, 一是针对一种 NAs, HBV 往往会产生多个耐药位点的联合变异; 二是针对多种 NAs, HBV 往往会产生交叉耐药^[4]。交叉耐药将导致病毒对多种药物均发生耐药(多重耐药), 使 NAs 抗病毒治疗彻底失败^[5-7]。本研究筛选临床上对两种或两种以上 NAs(包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定)产生交叉耐药的患者, 并从患者血清中获取 HBV 交叉耐药株 DNA 进行全基因克隆和测序, 分析各类型交叉耐药变异株 RT 区的变异特点和规律。为深入了解中国临床流行的交叉耐药 HBV 感染特点提供帮助, 并为交叉耐药 HBV 感染的防治原则提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2007 年 3 月至 2012 年 6 月在黑龙江省医院住院治疗的慢性乙型肝炎患者(CHB)142 例, 所有病例诊断均符合 2000 年西安全国肝病会议修订的病毒性肝炎诊断标准。从中筛选经不同 NAs 序贯或联合治疗 CHB 52 周以上, 疗效不佳且同时对两种以上 NAs(包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定)产生交叉耐药的患者 6 例(编号 P1~P6), 跟踪调查患者的用药情况及用药后血清中转氨酶、病毒载量、抗原抗体含量等临床指标的变化情况。将这些患者血清标本存入小离心管中, 立即-20℃保存待用。

1.2 血清 HBV DNA 的聚合酶链反应(PCR)扩增、测序及序列分析 HBV DNA 抽提采用 Qiagen GmbH 公司试剂盒, 操作按说明书进行。在 HBV 全基因设计上游引物 HBV F: 5' CCG GAA AGC TTG ACT TTT TCA CCT CTG CCT AAT

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511179)。 作者简介: 滕旭, 男, 副教授, 主要从事病原微生物致病性的研究。

CA 3'(nt1821-1841);下游引物 HBV R:5'CGA AGA GCT CTT CAA AAA GTT GCA TGG TGC TGG 3'(nt1825-1806),引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体积为 20 μL,反应条件:94 ℃ 2 min 预变性,94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 4 min,35 次循环,72 ℃ 延伸 10 min。并将上述 PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体(TaKaRa 生物技术公司产品)连接,构建重组质粒,转化 JM109 菌,测序鉴定。

1.3 统计学处理 采用 Chromas2. 2. 3 软件及 NCBI/BLAST 对 HBV DNA RT 区基因片段核苷酸编码的氨基酸差异、变异

类型及 HBV 基因型进行分析。

2 结 果

2.1 HBV 核苷类似物交叉耐药患者的临床资料 筛选经不同 NAs 序贯或联合治疗 CHB 52 周以上,疗效不佳且同时对两种以上 NAs(包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定)产生交叉耐药的患者 6 例,跟踪调查患者的用药情况及用药后血清中转氨酶、病毒载量、抗原抗体水平等临床指标的情况,结果见表 1。

表 1 患者用药情况及血清中转氨酶、病毒载量、抗原抗体含量

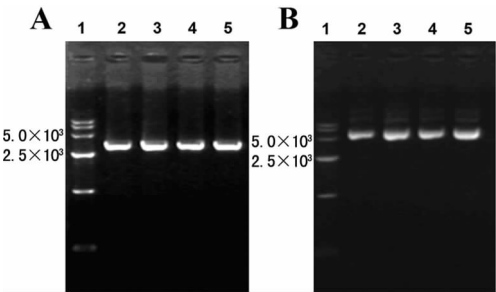
患者 编号	性别	年龄	用药情况	丙氨酸氨基转移酶、天门冬 氨酸氨基转移酶(IU/mL)	病毒载量 (IU/mL)	HBV 表面抗原、 HBV 表面抗体	HBV e 抗原	HBV 核心抗体
P1	F	51	A/E	32/26	9.88×10^3	+/-	+/-	+
P2	M	38	A/L/T/E	44/36	1.75×10^5	+/-	+/-	+
P3	M	46	L/A/E	50/31	3.11×10^5	+/-	+/-	+
P4	M	46	A/L	393/164	2.8×10^6	+/-	+/-	+
P5	M	28	L/A/E	28/26	9.58×10^3	+/-	+/-	+
P6	M	58	E/T/A	188/93	4.77×10^5	+/-	-/+	+

F:女性;M:男性;L:拉米夫定;A:阿德福韦;T:替比夫定;E:恩替卡韦;+:阳性;-:阴性。

2.2 HBV 全基因扩增结果和 pMD18T-HBV 克隆质粒的鉴定 将患者 P2、P4、P5、P6 血清中 HBV PCR 扩增产物在 0.7%的琼脂糖凝胶中电泳,经 EB 染色在紫外灯下观察到约 3.2×10^3 的条带,然后将回收产物分别与 pMD18-T 相连接。分别提取 pMD18T-HBV 重组质粒并用 SacI 进行单酶切鉴定,在 0.7%琼脂糖凝胶中电泳后紫外灯下观察,线状重组质粒 pMD18T-HBV 大小约为 5.89×10^3 ,说明重组质粒 pMD18T-HBV 大小正确。电泳结果见图 1。

2.3 HBV 交叉耐药株 RT 区序列分析 对 6 位患者的 pMD18T-HBV 重组质粒测序(每组至少 5 个克隆),分析各交叉耐药变异株 RT 区的变异特点和规律。如表 2 所示,以上患者体内 HBV 基因型均为 C 型,其中患者 P3 体内 HBV YMDD 变异株为 YVDD 变异类型(rtM204V),同时伴有 RT 区 rtL180M、rtV173L 变异和次要伴随位点 rtQ118K、rtL269I、rtQ333K、rtH337N 的变异;患者 P2、P5 体内 HBV YMDD 变异株为 YIDD 变异类型(rtM204I),同时伴有 RT 区次要伴随位点 rtL269I、rtQ333K、rtH337N 的变异;患者 P6 体内 HBV YMDD 变异株为 YIDD 变异类型(rtM204I),同时伴有 RT 区 rtL80I 变异和次要伴随位点 rtS317A、rtQ333K、rtH337N 变

异;其中 P2、P3、P5 患者用药情况类似(如表 1)。本次测序结果中发现交叉耐药情况下均存在 RT 区次要伴随位点 rtL269I、rtQ333K、rtH337N 变异,因此可推测伴随位点的变异与拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦 3 种药物交叉耐药相关,但还需继续增加病例数量观察变异的形式与趋势。



1:引物;2~5:患者 P2、P4、P5、P6 血清中 HBV 全基因 PCR 扩增产物(A)和 pMD18T-HBV 重组质粒(B)。

图 1 HBV 全基因 PCR 扩增结果(A)和 pMD18T-HBV 重组质粒(B)

表 2 不同患者体内 HBV 交叉耐药株的变异结果

患者 编号	基因 型	克隆编号	编码 HBV 聚合酶基因区	
			主要变异位点	次要变异位点
P3	C	P3-1,P3-2,P3-3,P3-4,P3-5	rtV173L、rtL180M、rtM204V	rtQ118K、rtL269I、rtQ333K、rtH337N
P2	C	P2-1,P2-2,P2-3	rtM204I	rtL269I、rtQ333K、rtH337N
P5	C	P5-4,P5-5	rtM204I	rtL269I、rtQ333K、rtH337N
P4	C	P4-3,P4-4		rtD134E、rtQ333K、rtH337N
P6	C	P6-1,P6-2,P6-3,P6-4,P6-5	rtM204I、rtL80I	rtS317A、rtQ333K、rtH337N
P1	C	P1-2,P1-3		rtT47S、rtL269I

3 讨 论

HBV 的复制特点是以 mRNA 为中间体的逆转录复制,而

参与这一过程的 DNA 多聚酶缺乏校正的功能,容易发生碱基错配,从而使得 HBV 发生突变的频率比其他 DNA 病毒大约

高 10 倍^[8],正因如此,在 NAs 的选择压力下,耐药毒株多聚酶区域的原发耐药突变会对病毒 DNA 复制的适应性产生一定的影响,而代偿性突变的发生增进了病毒的复制能力,使原本并不利于病毒复制的原发耐药突变能够通过共价闭环状 DNA(cccDNA)而传给子代,HBV 基因组的适应性变异便成为导致 NAs 耐药的重要原因之一^[9-10]。由于 HBV 在感染者体内复制速度快,且 DNA 复制的忠实性较差,复制过程中发生突变的频率可达 $1 \times 10^{-5}/\text{bp}$,因此感染者一般均为多种毒株的混合感染,体内的病毒呈高度特异性,这些因素决定了感染者体内的 HBV 准种池将由各种不同的病毒准种组成,病毒准种之间可能仅有 1 个或几个碱基的变异^[11-12]。

综上所述,本研究中的 6 例患者初治应用拉米夫定、阿德福韦或恩替卡韦单药治疗,出现临床病毒学应答不佳、无应答,病毒学突破时应用恩替卡韦联合阿德福韦挽救治疗,但病毒学应答差,出现临床多重耐药。恩替卡韦作为首选 NAs 一线药物,能够降低长疗程治疗下的耐药风险,单药治疗 5 年耐药率仅为 1.2%^[13-14]。但在研究中发现 P6 患者长期应用恩替卡韦治疗引起了 rtM204I 变异,而且对替比夫定和阿德福韦产生交叉耐药,因此选择具有高耐药基因屏障、低耐药率的药物可以降低抗 HBV 的耐药风险的说法还需慎重,尽量避免单药序贯治疗方式。本研究通过分析 HBV P 基因序列,发现临床上对两种或两种以上 NAs(包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定)产生交叉耐药的相关性变异以 rtM204V/I(YMDD)变异为主(50%),部分 YMDD 变异株伴有 rtL180M 变异(16.7%),其他伴随变异包括 rtV173L(16.7%),rtL80I(16.7%)。这些与文献报道的拉米夫定耐药相关变异类型相似^[15-18]。此外,笔者还发现 RT 区次要伴随位点 rtL269I(40%)、rtQ333K(56.7%)、rtH337N(56.7%)的变异,Kwon 等^[19]曾经在克来夫定耐药患者体内病毒学突破时期发现过 rtH337N 变异。Kurashige 等^[20]报道应用拉米夫定、恩替卡韦和阿德福韦序贯治疗时曾发现过 rtL269I 变异,但 rtQ333K 变异位点尚未见报道,笔者推测这些联合位点的变异增强了 HBV YMDD 变异株在体内的复制能力,并对交叉耐药准种所占比例起到了放大的效果,从而成为拉米夫定、恩替卡韦和阿德福韦 3 种 NAs 多重耐药的联合辅助耐药位点,并导致本研究的 6 例患者出现临床多重耐药,当然这些推论的证实尚需继续增加病例数量观察变异的形式与趋势。

参考文献

- [1] Lau DT, Khokhar MF, Doo E, et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine[J]. *Hepatology*, 2000, 32(4 Pt 1): 828-834.
- [2] Zoulim F. Evaluation of novel strategies to combat hepatitis B virus targetting wild-type and drug-resistant mutants in experimental models[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2001, 12(Suppl 1): S131-S142.
- [3] Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection[J]. *Antiviral Res*, 2004, 64(1): 1-15.
- [4] Sayan M HS, Karatayli SC. Multidrug-resistant hepatitis B virus strain in a chronic Turkish patient[J]. *Hepat Mon*, 2010, 10(2): 141-146.
- [5] Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-

- resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure[J]. *Hepatol Int*, 2008, 2(2): 147-151.
- [6] Liu Y, Wang C, Zhong Y, et al. Evolution and suppression of HBV strains with multidrug resistance to lamivudine, adefovir dipivoxil and entecavir in a patient with chronic hepatitis B[J]. *Antivir Ther*, 2010, 15(8): 1185-1190.
- [7] Durantel D. Fitness and infectivity of drug-resistant and cross-resistant hepatitis B virus mutants; why and how is it studied? [J]. *Antivir Ther*, 2010, 15(3 Pt B): 521-527.
- [8] Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate[J]. *Cell*, 1982, 29(2): 403-415.
- [9] Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA[J]. *J Hepatol*, 2005, 42(3): 302-308.
- [10] Peveling-Oberhag J, Herrmann E, Kronenberger B, et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies heterogeneity and virologic response in patients receiving low-to-moderate genetic barrier nucleoside analogs[J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(4): 234-239.
- [11] Girones R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome[J]. *Virology*, 1989, 170(2): 595-597.
- [12] Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(9): 4398-4402.
- [13] Chang TT, Lai CL, Yoon SK, et al. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e Antigen-Positive chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 422-430.
- [14] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 225-231.
- [15] Zllner B, Sterneck M, Wursthorn K, et al. Prevalence, incidence, and clinical relevance of the reverse transcriptase V207I mutation outside the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2503-2505.
- [16] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management[J]. *Hepatology*, 2007, 46(1): 254-265.
- [17] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1574-1585.
- [18] Warner N, Locarnini S, Kuiper M, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(7): 2285-2292.
- [19] Kwon SY, Park YK, Ahn SH, et al. Identification and characterization of clevudine-resistant mutants of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients[J]. *J Virol*, 2010, 84(9): 4494-4503.
- [20] Kurashige N, Ohkawa K, Hiramatsu N, et al. Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir[J]. *Antivir Ther*, 2009, 14(6): 873-877.

(收稿日期: 2015-01-11)