

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00834

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒逆转录酶区 N236T 单独突变与 N236T+A181T 联合突变患者临床特征的比较

赵攀^{1,2}, 徐东平^{2*}, 李晓东², 李乐², 钟彦伟²

- 1. 解放军军事医学科学院, 北京 100850
- 2. 解放军 302 医院病毒性肝炎研究室, 北京 100039

[摘要] **目的** 了解乙型肝炎病毒(HBV)逆转录酶区 N236T 单独突变患者与逆转录酶区 N236T+A181T 联合突变患者核苷(酸)类药物应用情况和病毒学特点的异同。**方法** 对发生 HBV 逆转录酶区 N236T 单独突变与逆转录酶区 N236T+A181T 联合突变的慢性乙型肝炎患者的血清 HBsAg、HBV DNA 和丙氨酸转氨酶(ALT)水平进行检测和 HBV 基因分型,并对所有患者的核苷(酸)类药物治疗史进行回顾性调查。**结果** 逆转录酶区 N236T 单独突变组与逆转录酶区 N236T+A181T 联合突变组相比较,两者血清 HBsAg 水平的差异无统计学意义($P=0.9755$),但后者血清 HBV DNA($P=0.0014$)和 ALT($P=0.0032$)水平高于前者。此外,C 型较 B 型容易发生 rtN236T+rtA181T 联合突变($40\% vs 20.45\%$, $P=0.0235$),由拉米夫定换用阿德福韦的治疗方式容易引起病毒突变。**结论** HBV 逆转录酶区 N236T 单独突变患者与逆转录酶区 N236T+A181T 联合突变患者在引起突变的核苷(酸)类药物的使用情况上存在一致性(拉米夫定换用阿德福韦),但基因型构成和血清病毒学指标存在明显差异。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 逆转录酶区; 突变; 阿德福韦

[中图分类号] R 512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0834-04

Patients with only N236T mutation and patients with N236T+A181T mutation in HBV reverse transcriptase region: a comparison of clinical characteristics

ZHAO Pan^{1,2}, XU Dong-ping^{2*}, LI Xiao-dong², LI Le², ZHONG Yan-wei²

- 1. Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China
- 2. Viral Hepatitis Research Laboratory, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To compare the application of nucleotide drugs and the virology characteristics between patients with only N236T mutation and patients with N236T+A181T mutation in the HBV reverse transcriptase(rt) region. **Methods** Sera of patients with only rtN236T mutation and patients with rtN236T+rtA181T mutation were obtained from patients with chronic hepatitis B. Then the levels of sero-HBsAg, HBV DNA and ALT were determined and the HBV genotypes were analyzed. The treatment history with nucleotide drugs was retrospectively reviewed. **Results** The sero-HBsAg levels were not significantly different between only rtN236T mutation group and rtN236T+rtA181T mutation group ($P=0.9755$), and significantly higher viral replication ($P=0.0014$) and higher ALT level ($P=0.0032$) were found in rtN236T+rtA181T mutation group. Moreover, compared to HBV B genotype, patients with HBV C genotype were prone to carry rtN236T+rtA181T mutation($40\% vs 20.45\%$, $P=0.0235$); also we noticed that a switch from lamivudine medication to adefovir medication was liable to induce the virus mutation. **Conclusion** Nucleotide drug application in HBV patients with only rtN236T mutation and rtN236T+rtA181T mutation are concurrent (lamivudine switching to adefovir). However, the HBV genotype constituents and the serum virological characteristics are different between the two types of HBV patients.

[Key words] hepatitis B virus; reverse transcriptase region; mutation; adefovir

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):834-837]

乙型肝炎病毒(hepatitis virus B, HBV)逆转录酶(reverse transcriptase, rt)区 N236T 突变是阿德福韦的标志性耐药变异位点^[1],有些文献认为,rtA181T 变异也与阿德福韦耐药相关,但对此存在

[收稿日期] 2010-03-10 **[接受日期]** 2010-06-24

[作者简介] 赵攀, 博士生, 主治医师. E-mail: mupanda2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 010-66933392, E-mail: xudongping@yahoo.com

争议^[2-3]。为了解 HBV rtN236T 单独突变患者与 rtN236T+rtA181T 联合突变患者的用药形式和病毒学特点的异同,我们对 rtN236T 单独突变患者与 rtN236T+rtA181T 联合突变患者的血清 HBsAg、HBV DNA、丙氨酸转氨酶(ALT)水平、HBV 基因型以及核苷(酸)类药物[nucleos(t)ide analogue, NA]应用情况等方面进行了对比分析。

1 对象和方法

1.1 研究对象 在 2007 年 7 月至 2009 年 12 月送至解放军 302 医院病毒性肝炎研究室进行 HBV rt 区序列测定的所有诊断为慢性乙型肝炎的患者(诊断符合 2000 年全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的诊断标准^[4],均排除其他肝炎病毒感染、药物或酒精性肝病)血清中,选取 rtN236T 单独突变(rt 区无其他突变)的患者血清标本 92 例,rtN236T+rtA181T 突变(rt 区无其他突变)的患者血清标本 47 例,对这些标本的 HBsAg、HBV DNA、ALT 水平以及 HBV 基因型进行检测,并对这些患者的核苷(酸)类药物治疗史进行回顾性调查。单独 rtN236T 突变组的年龄中位数为 40,四分位数间距为 17,男 85 例,女 7 例;rtN236T+rtA181T 组的年龄中位数为 42,四分位数间距为 20,男 45 例,女 2 例。

1.2 HBV rt 区序列测定和分析 采用四川绵阳天泽基因工程有限公司生产的病毒 DNAout 试剂提取病毒 DNA。将完全包括整段 rt 基因(nt 130~1 161)的 HBV 基因片段(nt 54~1 278)用巢式 PCR 方法进行 2 轮扩增,第一轮扩增的上游引物为 Up3 (nt 3 146~3 167): 5'-AGT CAG GAA GAC AGC CTA CTC C-3',下游引物为 Down1 (nt 1 577~1 596): 5'-AGG TGA AGC GAA GTG CAC AC-3';第二轮扩增的上游引物为 Up4 (nt 54~75): 5'-TTC CTG CTG GTG GCT CCA GTT C-3';下游引物为 Down2 (nt 1 258~1 278): 5'-TTC CGC AGT ATG GAT CGG CAG-3'。产物经琼脂糖凝胶电泳(0.7%琼脂糖、1×Super Buffer,210 V,5 min)鉴定,送北京天一辉远生物科技有限公司行 DNA 序列测定。用 Vector

NTI 软件对序列测定结果进行比对,并对每个位点的序列峰图依次进行分析,对正、反双向测序结果进行比较印证。

1.3 HBV 基因分型 应用 MEGA4.0 软件中的 ClustalW 组件对 HBV rt 区序列(包含完整 S 区序列)进行比对, Kimura 两参数法计算进化距离, Neighbour-Joining 法构建系统进化树分析基因型; Bootstrap 分析其可靠程度(校正次数不低于 1 000)。已知基因型的 HBV 全基因组序列作为本研究基因型分析的标准序列,具体包括: A 型(X70185)、B 型(D00330、AB073849、AB073824、AB073830、AY217358)、C 型(X01587、AB074755、AF182804、AF411409、M12906)、D 型(X68292)、E 型(X75664)、F 型(X75663)、G 型(AF160510)、H 型(AB059660)。

1.4 血清 HBsAg、HBV DNA、ALT 定量测定

(1)应用瑞士罗氏诊断公司 Modular E170 全自动电化学发光免疫分析仪对血清 HBsAg 进行测定,将标本产生的光电信号强度与定标液中 HBsAg 含量进行比较,计算出 S/Co 值及 Cutoff 值,并与标本的计算值比较。试剂为罗氏诊断公司 HBsAg II 代检测试剂。(2)应用实时荧光 PCR 对血清 HBV DNA 进行定量测定,检测仪器为罗氏 Light Cycler 480 II 检测仪,试剂购自上海复星公司。最低检测下限为 100 IU/ml。(3)应用日本奥林巴斯 AU5400 型生化分析仪检测 ALT,检测试剂也购自该公司,正常范围上限为 40 U/L。

1.5 统计学处理 应用 SAS 9.0 软件对数据进行统计学分析,HBsAg、HBV DNA、ALT 水平的组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,HBV 基因型构成比较采用 χ^2 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 两组 HBsAg、HBV DNA、ALT 水平的比较 逆转录酶区 N236T 单独突变组与 N236T+A181T 联合突变组血清 HBsAg 水平差异无统计学意义,但后者血清 HBV DNA($P=0.0014$)和 ALT($P=0.0032$)水平高于前者(表 1)。

表 1 rtN236T 单独突变组与 rtN236T+rtA181T 突变组 HBsAg、HBV DNA、ALT 水平的比较

Tab 1 Levels of HBsAg, HBV DNA and ALT in group with only rtN236T mutation and group with rtN236T+rtA181T mutation

[M(Q3-Q1)]

Group	n	HBsAg(Coi)	HBV DNA z_B /(IU·ml ⁻¹)	ALT z_B /(U·L ⁻¹)
Only rtN236T mutation	92	6 299(206 4)	58 800(768 800)	38(31)
rtN236T+rtA181T mutation	47	5 864(382 9)	1 650 000(6 595 400)	59.5(98)
Z value		0.030 8	3.204 2	2.944 2
P value		0.975 5	0.001 4	0.003 2

2.2 两组病毒基因型构成的比较 两组病毒基因型构成情况见表2,可见B型发生rtN236T单独突变的比例较高(79.55% vs 60%),而C型发生rtN236T+rtA181T联合突变的比例较高(40% vs 20.45%, $P=0.0235$)。

表2 rtN236T单独突变组与rtN236T+rtA181T突变组的基因型构成情况

Tab 2 HBV genotype constituents in group of only rtN236T mutation and group of rtN236T+rtA181T mutation

Group	[n(%)]	
	B genotype	C genotype
Only N236T mutation	35(79.55)	57(60)
rtN236T+rtA181T mutation	9(20.45)	38(40)
Total	44(100)	95(100)

$\chi^2=5.13, P=0.0235$

2.3 两组核苷(酸)类药物应用情况的比较 rtN236T单独突变组与rtN236T+rtA181T突变组患者核苷(酸)类药物应用情况见表3,可见由拉米夫定换用阿德福韦的治疗方式容易引起病毒突变。

表3 rtN236T单独突变组与rtN236T+rtA181T突变组患者核苷(酸)类药物应用情况

Tab 3 Nucleotide drug application in group of only rtN236T mutation and group of rtN236T+rtA181T mutation

Nucleotide drug application	[n(%)]	
	Group of only N236T mutation	Group of rtN236T+rtA181T mutation
ADV	42(45.65)	17(36.17)
LAM	3(3.26)	1(2.13)
L-dT	1(1.09)	0(0)
LAM to ADV	38(41.30)	21(44.68)
ADV to LAM+ADV	3(3.26)	2(4.26)
LAM to ADV to ETV	1(1.09)	0(0)
ADV to L-dT	0(0)	2(4.26)
LAM to ADV to L-dT	0(0)	1(2.13)
LAM to LAM+ADV	0(0)	2(4.26)
Naive	4(4.35)	1(2.13)
Total	92(100.00)	47(100)

LAM: Lamivudine; ADV: Adefovir; L-dT: Telbivudine; ETV: Eentecavir. All the treatment history with nucleotide drugs was at least carried out for 3 months

3 讨论

HBV rt区包括7个功能亚区,从rt区上游第1个氨基酸起依次为A、B、C、D、E、F、G亚区。rtN236位点位于D亚区,rtA181位点位于B亚区。Warner等^[5]通过体外实验研究认为,HBV rt区A181T突变反映到S基因上可以引起172位原来编码色氨酸(W)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;而且突变引起的HBsAg分泌障碍不仅发生在rt区A181T单独突变的病毒株,在A181T与rt区其他位点联合突变的病毒株中也出现了HBsAg分泌障碍。此外,A181T突变还会引起病毒在肝细胞内的积聚和HBV DNA载量的下降,这将影响临床上仅仅依据血清HBV DNA水平诊断病毒学突破的结果。但是,根据本研究,rtN236T单独突变组与rtN236T+rtA181T突变组血清HBsAg水平无统计学差异,此外,rtN236T+rtA181T突变组的血清HBV DNA和ALT的水平要明显高于rtN236T单独突变组,我们倾向认为rtN236T突变与rtA181T突变为互补突变,一种突变可以增强另一种突变的病毒复制力和适应能力,而且rtN236T与rtA181T联合突变导致患者血清ALT升高,这会引发肝脏炎症的波动。体外药敏实验也表明,rtN236T单独突变可使HBV对阿德福韦的敏感性下降7倍,而rtN236T+rtA181T联合突变可使药物敏感性下降18倍^[6]。

在核苷(酸)类药物应用方面,本研究发现,由拉米夫定换用阿德福韦的治疗方式在两组耐药突变患者的用药形式中所占的比例均较高,说明这种临床应用方式不规范,可能会增加病毒耐药突变的产生,这与最近的文献报道一致^[7-9]。在HBV基因型构成方面,本研究显示,C型较B型容易发生rtN236T+rtA181T联合突变,其分子机制不明,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 梁雪松,万漠彬.核苷(酸)类似物长期治疗的常见耐药位点及发生率[J].中华肝脏病杂志,2007,15:55-56.
- [2] Locarnini S, Qi X, Arterburn S, Pichoud C, Xiong S. Incidence and predictors of emergence of adefovir resistant HBV during four years of adefovir dipivoxil(ADV) therapy for patients with chronic hepatitis B(CHB)[J]. J Hepatol,2005,42(Suppl 1):A36.
- [3] Chotiyaputta W, Lok A S F. Hepatitis B virus variants[J]. Nat Rev Gastro Hepatol,2009,6:453-462.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19:56-62.
- [5] 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[J]. Hepatology,2008,48:88-98.
- [6] Bartholomusz A, Locarnini S. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects[J]. Semin Liver Dis, 2006,26:1621-1670.
- [7] Peters M G, Hann Hw H, Martin P, Heathcote E J, Buggisch P, Rubin R, et al. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology,2004,126:91-101.
- [8] Rapti I, Dimou E, Mitsoula P, Hadziyannis S J. Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-nega-

tive chronic hepatitis B[J]. Hepatology,2007,45:307-313.

- [9] Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudi-

ne combination therapy: two-year follow-up[J]. J Hepatol, 2008,48:923-931.

[本文编辑] 孙岩