

恩替卡韦治疗失败的慢性乙型肝炎患者耐药分析20例

薛瑞霞, 张缙云, 杨松, 王琦, 邢卉春, 谢雯, 郭江, 成军

■背景资料

抗病毒治疗是慢性乙型肝炎的核心治疗措施。核苷类似物是目前抗病毒治疗的主流药物。ETV作为目前抗病毒效力最强的核苷类药物, 其耐药问题备受关注。

薛瑞霞, 张缙云, 山西医科大学第一医院感染病科 山西省太原市 030001
杨松, 王琦, 成军, 首都医科大学传染病研究所 北京市 100015
邢卉春, 谢雯, 郭江, 北京地坛医院肝病中心 北京市 100015
首都特色临床医学技术发展研究研发攻关类基金资助项目, No. Z07050700690702
作者贡献分布: 此课题由成军、张缙云、邢卉春及谢雯设计; 病例收集由郭江完成; 研究过程及数据分析由薛瑞霞和杨松完成; 本论文写作由薛瑞霞、张缙云、杨松、王琦及成军共同完成。
通讯作者: 成军, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 首都医科大学传染病研究所, jun.cheng.ditan@gmail.com
电话: 010-84322613
收稿日期: 2009-01-14 修回日期: 2009-03-21
接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-04-28

Resistance analysis of entecavir-refractory in chronic hepatitis B patients

Rui-Xia Xue, Liao-Yun Zhang, Song Yang, Qi Wang, Hui-Chun Xing, Wen Xie, Jiang Guo, Jun Cheng

Rui-Xia Xue, Liao-Yun Zhang, Department of Infectious Diseases, the first Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Jun Cheng, Qi Wang, Song Yang, Institute of Infectious Diseases, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Hui-Chun Xing, Wen Xie, Jiang Guo, Center of Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 10015, China
Supported by: the Capital Special Clinical Medicine Development Project Key Research Item, No. Z07050700690702

Correspondence to: Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Capital Medical University, Beijing 10015, China. jun.cheng.ditan@gmail.com
Received: 2009-01-14 Revised: 2009-03-21
Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-04-28

Abstract

AIM: To investigate the resistance profiles of chronic hepatitis B patients with entecavir (ETV) refractory treatment.

METHODS: Twenty serum samples of patients who failed treatment with ETV were assigned into non-complete virological group and virological breakthrough group in accordance with response action. Direct sequencing of PCR products was used to determine ETV resistance. NCBI HBV genotyping tool was used to identify HBV genotype.

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

RESULTS: ETV resistance was detected from 11 out of 20 ETV-refractory patients, all of which was in virological breakthrough group, and rtM204V + rtL180M + rtT184L was common in Chinese ETV resistance patients. There was remarkably statistical difference between the two groups ($P = 0.0022$). Three in 6 patients with genotype B were detected to have ETV resistance, meanwhile 11 in 14 with genotype C. There was no statistical difference in resistance among genotype B and C patients.

CONCLUSION: rtM204V + rtL180M + rtT184L mutations are common in genotype B and C ETV resistance patients. Patients with virological breakthrough experienced more ETV resistance than non-complete virological group. There is no statistical difference in resistance between genotype B and C patients.

Key Words: Chronic hepatitis B; Entecavir; Drug resistance; Genotype

Xue RX, Zhang LY, Yang S, Wang Q, Xing HC, Xie W, Guo J, Cheng J. Resistance analysis of entecavir-refractory in chronic hepatitis B patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(12): 1260-1263

摘要

目的: 检出恩替卡韦(ETV)治疗失败的慢性乙型肝炎(CHB)患者的耐药。

方法: 收集ETV治疗失败的患者血清20份, 根据应答情况分为非完全病毒学应答组和病毒学突破组。PCR产物直接测序法检测ETV耐药, NCBI HBV基因型分析软件确定HBV基因型。

结果: 20例患者中, 检出ETV耐药11例, 其变异类型以rtM204V+rtL180M+rtT184L为主。非完全病毒学应答组6例患者中未检出ETV耐药, 病毒学突破组14例患者中检出ETV耐药11例, 二者之间有统计学差异($P = 0.0022$)。B基因型6例患者中检出ETV耐药3例, C基因型14例患者中检出ETV耐药8例, 二者之间无统计学差异。

结论: rtM204V+rtL180M+rtT184L变异类型在B和C基因型的ETV耐药患者中较为常见;

ETV耐药多见于病毒学突破患者; ETV治疗失败患者的耐药检出率在B和C基因型中无显著差异。

关键词: 慢性乙型肝炎; 恩替卡韦; 耐药; 基因型

薛瑞霞, 张燎云, 杨松, 王琦, 邢开春, 谢雯, 郭江, 成军. 恩替卡韦治疗失败的慢性乙型肝炎患者耐药分析20例. 世界华人消化杂志 2009; 17(12): 1260-1263
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1260.asp

0 引言

在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗中, 抗病毒治疗是关键. 目前主要有两大类抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)药物: 干扰素和核苷(酸)类似物. 核苷(酸)类似物由于服用方便、抗病毒作用强且不良反应小在临床上应用广泛. 目前在我国临床上应用的核苷(酸)类似物主要有4种: 拉米夫定(lamivudine, LVD)、阿德福韦酯(adefovir dipivoxil, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)和替比夫定(telbivudine, LdT). 随着治疗的进行, HBV会逐渐出现对核苷(酸)类似物的耐药, 这给临床工作带来了很大的困难. 目前对LVD和ADV的耐药研究国内外已经积累了大量的临床和实验室数据, 但有关ETV耐药的报道很少. ETV是新一代抗HBV药物, 为鸟嘌呤核苷类似物, 对HBV有强大的抑制作用^[1], 自2006年在中国正式上市以来, 因其抗病毒活性强且耐药发生率低, 逐渐在临床上得到应用. 但随着治疗时间的延长和治疗群体的扩大, 一些患者出现ETV治疗失败. 因此, 我们对这部分患者进行了耐药检测并对其相关因素进行了初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2008-03/12北京地坛医院就诊的CHB患者20例. ETV由中美上海施贵宝制药公司生产, 批号H20052237.

1.2 方法

1.2.1 入选标准: 符合2000年《病毒性肝炎防治方案》CHB的诊断标准; 患者规范服用ETV(核苷初治0.5 mg/d, LVD治疗失败患者1.0 mg/d)并且出现治疗失败, 除外依从性等原因.

1.2.2 治疗失败的界定: 将病毒学无应答、不充分病毒学应答及病毒学突破的患者归为治疗失败. 病毒学无应答指经过3 mo的ETV治疗, HBV DNA载量下降 $<1 \log_{10}$ copies/mL; 不充分病毒

学应答指经过6 mo的ETV治疗, HBV DNA载量下降 $\geq 2 \log_{10}$ copies/mL, 但仍 $\geq 10^4$ copies/mL; 病毒学突破指在ETV治疗过程中出现完全病毒学应答, 但之后HBV DNA较治疗最低点上升 $\geq 1 \log_{10}$ copies/mL, 1 mo后重复检测再次证实. 将病毒学无应答和不充分病毒学应答归为非完全病毒学应答组.

1.2.3 检测方法及结果判定: 采用聚合酶链反应(PCR)扩增HBV逆转录酶区(RT区), 对PCR产物进行直接测序, 分析测序结果. PCR产物直接测序法: 取患者血清200 μ L提取HBV模板(采用Axygen体液病毒提取试剂盒). 巢式PCR扩增HBV逆转录酶区: 第一轮PCR引物为P3(5'-YCTCWSYCAATCGTCAA-3', nt 105-122)和AP3(5'-GAGMCACAAAGGTTCCAC-3', nt 1238-1256). 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 50 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min. 第二轮引物为Xnp2(5'-AGGCAGGATAGCCACATT-3', nt 146-163)和XAnp2(5'-GCACCGAACATGGAGAR C-3', nt 1034-1051). 反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 50 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min共40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min. PCR产物经纯化后直接用于测序分析, 测序引物采用Xnp2, 测序仪为ABI 3730xl, 通过Sequence Navigator软件得出序列. 测序结果分析: 分析HBV RT区常见的9个耐药位点的变异情况(204、180、173、184、202、250、169、181和236位点). rtM204V、rtL180M合并rtT184、rtS202或rtM250三者中任意一个位点的氨基酸替代即认定为ETV基因型耐药^[2]. HBV基因型通过NCBI HBV基因型分析软件确定^[3].

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行统计处理, 率的显著性检验运用Fisher确切概率法, 以 $P<0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 一般情况 病毒学突破组14例(男12例, 女2例), 平均年龄42.9(30-66)岁, 平均ETV治疗时间为23.1(16-58) mo. 非完全病毒学应答组包括不充分病毒学应答和病毒学无应答, 其中不充分病毒学应答组4例(均为男性), 平均年龄为42.8(29-45)岁, 平均ETV治疗时间为20(16-26) mo; 病毒学无应答组2例(均为男性), 平均年龄43(28-58)岁, 平均ETV治疗时间为6.5(6-7) mo.

2.2 既往用药与ETV耐药 20例患者中, 有15例既

■ 相关报道

Locarnini *et al*通过表型分析证明M204V+L180M的变异会使得HBV对ETV的敏感性下降1000倍, 这可以解释为何LVD耐药的患者更容易突破ETV的高耐药基因屏障.

■ 创新盘点

目前关于ETV耐药国内仅见个案报道. 本研究对20例ETV治疗失败患者进行初步的HBV基因变异检测和临床特点分析, 为ETV耐药的后续实验室研究和临床应用提供线索和依据.

■应用要点

本研究发现rtM204V+rtL180M+rtT184L在我国ETV耐药患者较为多见,这可以为下一步国内ETV基因芯片等方法的建立及表型耐药研究提供初步依据。

表 1 ETV耐药患者的变异位点

| 编号 | rtM204 | rtL180 | rtT184 | rtS202 | rtM250 |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | V | M | L | G | - |
| 2 | V | M | L | - | - |
| 3 | V | M | L | - | - |
| 4 | V | M | L | - | - |
| 5 | V | M | L | - | - |
| 6 | V | M | A | - | - |
| 7 | V | M | - | G | - |
| 8 | V | M | L | - | - |
| 9 | V | M | L | - | - |
| 10 | V | M | - | G | - |
| 11 | V | M | L | - | - |

往有LVD治疗失败史,其中10例检出ETV耐药变异,4例检出YMDD变异;有3例既往有单一ADV治疗失败史,均未检出变异;有2例既往无任何核苷类似物应用史,其中1例检出ETV耐药。

2.3 PCR产物直接测序结果 对20例患者的血清标本均进行了PCR产物直接测序,运用CHROMAS软件读取测序结果,分析常见耐药位点的变异情况,发现有11例患者出现ETV耐药,其耐药位点如表1所示。可以发现,在rtM204V和rtL180M变异的基础上,rt184是ETV变异的主要位点,而且以rtT184L为主(8/11)。

2.4 病毒学突破组与非完全病毒学应答组耐药检出结果 病毒学突破组14例患者中检出ETV耐药患者11例;非完全病毒学应答组6例患者中未检出ETV耐药。经Fisher确切概率法检验,两组的ETV耐药检出率有统计学差异($P=0.0022$)。

2.5 B基因型与C基因型患者ETV耐药检出率比较 将患者测序结果输入NCBI HBV基因型检测软件,得出此20例患者中B基因型6例,C基因型14例。6例B基因型患者中检出ETV耐药3例;14例C基因型患者中检出ETV耐药8例。两组的ETV耐药检出率无统计学差异($P=1.0000$)。

3 讨论

随着ETV在临床上的逐渐推广,其耐药问题日益受到重视。ETV具有较高的耐药基因屏障,至少要有3个位点的氨基酸置换才能构成临床意义上的ETV耐药,即M204V和L180M再加上1个ETV耐药位点T184、S202或M250。在我们检测到的11例ETV基因型耐药的患者的患者中,变异组合以rtM204V+rtL180M+rtT184L为主(8/11)。结合Tenney *et al*^[2]研究中所发现的16例ETV耐药患者的基因型与相应的耐药位点,我们发现rt184

位点苏氨酸(T)可以被多种氨基酸置换,但被亮氨酸(L)置换主要存在于B、C基因型的ETV耐药患者中。我国的HBV患者以B、C基因型为主,rtM204V+rtL180M+rtT184L很可能是我国ETV耐药患者的主要变异类型,这可以为下一步国内ETV基因芯片等方法的建立提供初步依据。

ETV在核苷初治患者中的耐药发生率很低,但在既往LVD治疗失败的患者中其耐药发生率要明显增高^[4-5]。Langley *et al*^[6]发现, LVD耐药后会导致对ETV的敏感性下降5-58倍。而Locarnini *et al*^[7]的表型分析显示, M204V+L180M的变异会使得HBV对ETV的敏感性下降1000倍。在我们的研究中,11例ETV基因型耐药的的患者中有10例既往有LVD治疗失败史。在这10例患者中,有4例是在LVD治疗失败后停药1年以上进行的ETV治疗。早期研究表明,rtM204I/V/S突变株对LVD高度耐药,但其复制能力却较野生株弱^[8-9],停药一段时间后野生型病毒会重新成为优势株。这4例患者在LVD停药1年以上进行ETV治疗后仍然较容易地出现了ETV耐药,这提示我们, LVD失效/耐药的患者的患者,即使停药后野生株重获优势,应用ETV治疗时, LVD的耐药变异株仍容易被选择出来。其原因可能在于既往发生过LVD变异的患者的患者,停药后变异株并没有完全被野生株取代,应用ETV后强有力地抑制了野生株的复制,使原本处于劣势的LVD变异株重新成为优势株,从而容易出现ETV耐药。

在我们的研究中,病毒学突破组的ETV耐药检出率(11/14)显著高于非完全病毒学应答组(0/6),11例ETV耐药患者全部来自于病毒学突破组;在非完全病毒学应答组, YMDD变异的检出率相对较高(3/6)。由于ETV具有高的耐药基因屏障,所以其出现原发基因型耐药的几率非常小;但如果其中的1个或2个位点发生变异,则会导致病毒对ETV的敏感性下降,从而出现非完全病毒学应答。耐药患者全部来自于病毒学突破组也提示我们,在ETV治疗过程中,如果出现病毒学的突破,要高度怀疑耐药的发生,并及时进行多位点耐药检测,以便指导下一步治疗。

HBV基因型与核苷类似物治耐药的关系在其他核苷类似物中多有研究,有关ETV耐药与基因型的关系目前尚无报道。我们对ETV治疗失败的不同基因型的患者的耐药情况进行分析,20例患者中B基因型6例,C基因型14例。6例B基因型患者中检出ETV耐药3例;14例C基因型患者中检出ETV耐药8例,两组的ETV耐药检出率无

统计学差异. 但由于目前国内外ETV治疗失败的病例报道较少, 本研究受客观限制也仅20例, 仍需要进一步积累样本量进行验证.

总之, 通过对20例ETV治疗失败的患者进行基因和临床分析, 我们发现: (1)我国B/C基因型的乙肝患者中, ETV耐药类型以rtM204V+rtL180M+rtT184L较为多见. (2)ETV耐药多见于病毒学突破的患者. (3)ETV在B基因型和C基因型中的耐药检出率无统计学意义上的差别, 这需要进一步加大样本量进行验证.

对于ETV耐药的患者应该如何治疗, 目前尚没有系统的研究和统一的规定, 主要主张有: (1)换用ADV; (2)LVD+ADV; (3)干扰素; (4)替诺福韦(TDF). 本研究中11例耐药患者依据病情及患者意愿已分别接受了不同的治疗, 随访工作正在进行.

4 参考文献

- Honkoop P, De Man RA. Entecavir: a potent new antiviral drug for hepatitis B. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 683-688
- Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Levine SM, Pokornowski KA, Walsh AW, Fang J, Yu CF, Zhang S, Mazzucco CE, Eggers B, Hsu M, Plym MJ, Poundstone P, Yang J, Colonna RJ. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-

refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 902-911

- Rozaanov M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: W654-W659
- Gish RG, Lok AS, Chang TT, de Man RA, Gadano A, Sollano J, Han KH, Chao YC, Lee SD, Harris M, Yang J, Colonna R, Brett-Smith H. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 133: 1437-1444
- Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J, Silva M, Liaw YF, Cianciara J, Boron-Kaczmarek A, Martin P, Goodman Z, Colonna R, Cross A, Denisky G, Kreter B, Hindes R. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2006; 130: 2039-2049
- Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, Kapur AJ, Colonna RJ, Tenney DJ. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* 2007; 81: 3992-4001
- Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25 Suppl 1: 9-19
- Ling R, Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 3): 601-606
- Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998; 27: 628-633

■同行评价

本研究设计合理, 统计方法正确, 结果可信, 实用性较强, 具有一定的临床指导意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-04-28)