

拉米夫定耐药后序贯治疗中HBV准种的演变

吴珍萍, 韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智

吴珍萍, 天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170
韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
吴珍萍, 天津医科大学硕士, 主要从事乙型肝炎病毒耐药变异的临床研究。

国家重点基础研究发展规划(973计划)基金资助项目, No. 2007CB512801

科技部科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-005
天津市科委重点攻关专项基金资助项目, No. 05YFSZSF02500

天津市科委应用基础研究计划面上基金资助项目, No. 06YFJMJC13100

作者贡献分布: 吴珍萍与韩涛对此文所作贡献均等; 此课题的设计与写作由吴珍萍、韩涛、高英堂及杜智完成; 数据采集与分析由吴珍萍、李莹、韩涛及高英堂完成; 研究过程由吴珍萍、高英堂、刘彤及景丽完成。

通讯作者: 韩涛, 教授, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院肝病科, hantaomd@126.com

电话: 022-84112315 传真: 022-24382234

收稿日期: 2009-11-10 修回日期: 2010-02-01

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Evolution of hepatitis B virus quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection

Zhen-Ping Wu, Tao Han, Ying-Tang Gao, Ying Li, Tong Liu, Li Jing, Lei Liu, Zhi Du

Zhen-Ping Wu, the Third Central Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China.

Tao Han, Ying-Tang Gao, Ying Li, Tong Liu, Li Jing, Lei Liu, Zhi Du, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512801; the Major Research Project of the Ministry of Science and Technology of China, No. 2008ZX10002-005; the Key Science and Technology Project of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 05YFSZSF02500; and the General Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 06YFJMJC13100

Correspondence to: Professor Tao Han, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China. hantaomd@126.com

Received: 2009-11-10 Revised: 2010-02-01

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the evolution characteristics of hepatitis B virus (HBV) quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant HBV infection.

METHODS: Serum samples were collected from seven patients with lamivudine-resistant HBV infection during sequential therapy. The reverse-transcriptase (RT) region of the HBV polymerase gene was amplified, cloned and sequenced. Sequence mutations were analyzed to characterize the evolution of HBV quasispecies.

RESULTS: Lamivudine-resistant strains were persistently present in the serum of patients 1, 4 and 5. The main mutation patterns were M204I+L80I, M204I+L80I+L180M, M204V+L180M+G173L, and M204V+L180M. The proportion of these mutant strains changed constantly. The wild-type strain was detected in patients 2 and 3. However, lamivudine-resistant strains were detected in patient 2 during following therapy. Double-resistant mutant strains M204V+L180M+G173L+T184A and M204V+L180M+G173L+N236D were detected in patient 6, who underwent combination therapy with adefovir dipivoxil and lamivudine, and in patient 7, who underwent adefovir dipivoxil monotherapy.

CONCLUSION: Lamivudine-resistant mutant strains in the serum of patients with HBV infection do not easily disappear during sequential therapy. Cross-resistant or multi-resistant strains of HBV quasispecies are often present during sequential therapy and affect the response to the therapy, thereby resulting in therapeutic failure.

Key Words: Lamivudine; Resistance; Hepatitis B virus; Quasispecies

Wu ZP, Han T, Gao YT, Li Y, Liu T, Jing L, Liu L, Du Z. Evolution of hepatitis B virus quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 779-785

摘要

目的: 探讨拉米夫定(LAM)耐药后序贯治疗中HBV准种的演变特点。

方法: 收集7例拉米夫定耐药患者序贯治疗中的血清, 对HBV聚合酶基因逆转录酶区进行

■背景资料

拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LdT)等核苷(酸)类似物(NAs)被广泛用于抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗, 但长期服用NAs易使HBV聚合酶基因发生选择性耐药突变。拉米夫定能够快速抑制HBV的复制, 但耐药发生率很高, 针对这些LAM耐药患者, 目前常用的有效补救治疗方案是联合ADV或换用ETV治疗。在长期应用LAM治疗过程中HBV聚合酶基因会连续变异产生不同类型的耐药位点。那么LAM耐药后的序贯治疗中HBV聚合酶基因耐药突变如何演变? 值得进一步深入研究。

■同行评议者

王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

■相关报道

Gerolami等报道服用LAM时出现ADV耐药株A181V.

PCR扩增克隆并测序,结合临床用药分析序列突变,探讨其演变特征.

结果:患者1、4、5在序贯治疗中LAM耐药变异株一直存在,主要以M204I+L80I、M204I+L80I+L180M、M204V+L180M+G173L、M204V+L180M为主,所占比例在不断发生变化.患者2、3在序贯治疗中检测出野生株,但患者2在后续治疗中又选择出LAM耐药变异株.患者6在ADV联合ETV治疗时、患者7在单用ADV治疗时测时分别测出双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A和M204V+L180M+G173L+236D.

结论:拉米夫定耐药后序贯治疗中原耐药突变不易消失,且容易在此基础上筛选出交叉耐药株或多重耐药株,他的出现影响序贯治疗的应答甚至导致序贯治疗的失败.

关键词: 拉米夫定; 耐药; 乙型肝炎病毒; 准种

吴珍萍, 韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智. 拉米夫定耐药后序贯治疗中HBV准种的演变. 世界华人消化杂志. 2010; 18(8): 779-785

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/779.asp>

0 引言

拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LdT)等核苷(酸)类似物(nucleotide/side analogs, NAs)被广泛用于抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗,但长期服用NAs易使HBV聚合酶基因发生选择性耐药突变.拉米夫定能够快速抑制HBV的复制,但耐药发生率很高,针对这些LAM耐药患者,目前常用的有效补救治疗方案是联合ADV或换用ETV治疗^[1,2].在长期应用LAM治疗过程中HBV聚合酶基因会连续变异产生不同类型的耐药位点^[3].那么LAM耐药后的序贯治疗中HBV聚合酶基因耐药突变如何演变?值得进一步深入研究,本研究主要探讨7例LAM耐药患者序贯治疗中HBV准种的演变特征.

1 材料和方法

1.1 材料 选取7名2003-2008年间在天津市第三中心医院肝胆内科就诊的HBV患者,这些患者LAM耐药后接受NAs序贯治疗.每例患者选取3-4份不同时间点的血清进行HBV聚合酶基因的序列分析.7例患者基本特征及临床用药见表1.此研究经本院医学伦理委员会批准,患者签署

知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA的定量:采用上海科华生物工程有限公司生产的HBV核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒(S200359),检测下限为500拷贝/mL,本研究中将低于检测下限定为阴性.

1.2.2 巢式PCR扩增:用上述试剂盒处理的血清样品进行巢式PCR扩增,扩增区域为聚合酶基因的逆转录酶区(A-F, rt40-rt280).应用Primer Express 2.0软件设计引物,上游引物1为5'-GAG TCTAGACTCGTGGTGGAC-3',下游引物2为5'-GGGTCTTTTGGGCTTTGCTGCC-3',下游引物3为5'-TGATTGGAAAGTATGTCAGAGAC-3'.一次PCR反应体系包括:5 μ L 10 \times PCR缓冲液(含Mg²⁺),4 μ L dNTP(各1.25 mmol/L)、引物1/2各1、2 μ L Taq酶(1 U/ μ L)、4 μ L模板,加超纯水至50 μ L 反应条件:预变性94 $^{\circ}$ C, 2 min;变性94 $^{\circ}$ C, 1 min;复性60 $^{\circ}$ C, 45 s;延伸72 $^{\circ}$ C, 45 s;35个循环,延长72 $^{\circ}$ C, 5 min.二次PCR反应体系同前,引物为1/3,模板为一次PCR产物.

1.2.3 克隆及测序:将二次PCR产物电泳、纯化回收后克隆到PMD18-T载体中,每个样本挑选5-12个重组克隆送上海英俊生物技术有限公司测序,序列峰图应用Chromas(V1.62)分析,序列比对采用BioEdit(V7.0.4)软件,选用的GenBank序列包括M57663(A基因型)、D00329(B型)、X01587/X75656/X75665(C型)、X02496(D型)、X75657(E型)、X69798(F型)、AF160501(G型),患者HBV序列均与X01587相似性最高,为C基因型.

2 结果

2.1 患者临床特征 患者1、2、5用药过程中HBV DNA(以下简称DNA)和ALT的动态演变分别见图1-3.患者1开始服LAM时Child-Pugh分级为A级,在LAM耐药后联合ADV治疗22 wk,由于DNA持续阳性而换用LdT,10 wk后DNA反弹至6.32log₁₀拷贝/mL,同时出现ALT反弹,故换用ETV 0.5 mg/d,13 wk后DNA持续阴性,ALT亦恢复正常,患者病程中未出现任何并发症.患者2开始服LAM时已并发腹水、胸水,Child-Pugh分级为B级,服LAM 63 wk时出现DNA反弹至5.64log₁₀拷贝/mL,继续服LAM仍维持在5-7log₁₀拷贝/mL,132 wk后ALT反复异常,139 wk时DNA反弹至8.53log₁₀拷贝/mL,后联合ADV治疗,56 wk后DNA基本维持阴性,但ALT仍异常,且

表 1 患者的基本特征及序贯用药情况

患者	1	2	3	4	5	6	7
诊断	CR	CR	HCC	HCC	HCC	CHB	CHB
年龄/性别	36/男	55/男	58/女	70/男	51/男	22/男	34/女
HBeAg/HBeAb	+/-	+/-	-/+	+/+	+/-	+/-	+/-
基因分型	C型	C型	C型	C型	C型	C型	C型
初始治疗药物	LAM	LAM	LAM	LAM	LAM	LAM	LAM
用药时间(wk)	40	139	62	28	48	48	40
第2次序贯用药	LAM+ADV	LAM+ADV	LAM+ADV	LAM	LAM	LAM	ETV
用药时间(wk)	22	119	88	60	40	48	12
第3次序贯用药	LdT	ETV 1 mg/d		LAM+ADV	LAM+ETV 0.5 mg/d	ADV	ADV
用药时间(wk)	10	55		22	8	70	48
第4次序贯用药	ETV 0.5 mg/d				ETV 1 mg/d	ETV 1 mg/d	ADV+ETV 0.5 mg/d
用药时间(wk)	45				44	20	28
第5次序贯用药						ADV+ETV 0.5 mg/d	
用药时间(wk)						36	

患者4、5、6服用LAM中间自动停药, 后再次服用LAM, 第2次用药时间为停药后重新服LAM的时间; CR: 肝硬化; HCC: 肝细胞癌, CHB: 慢性乙型病毒性肝炎。

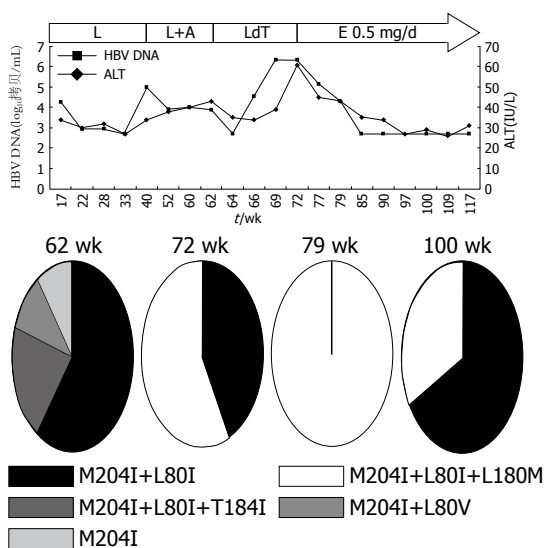


图 1 患者1病毒耐药突变的临床过程和进化. 该患者LAM耐药后联合ADV序贯治疗, 病毒载量一直在 $3-4\log_{10}$ 拷贝/mL, 换用LdT 10 wk后出现病毒反弹, 后改用ETV 0.5 mg/d. 抗病毒治疗方案在图的上方显示, L: 拉米夫定; A: 阿德福韦酯; E: 恩替卡韦。

119 wk时患者出现肾损害, 故换用ETV 1 mg/d, 同时予胸腺肽调节免疫, DNA仍维持阴性, 26 wk后ALT正常, 该患者病程中反复出现腹水、胸水及食管胃底静脉曲张出血, 予保肝、利尿、补充白蛋白、间断放腹水、胸水治疗, 食管胃底静脉曲张予套扎治疗, 病情稳定. 患者5

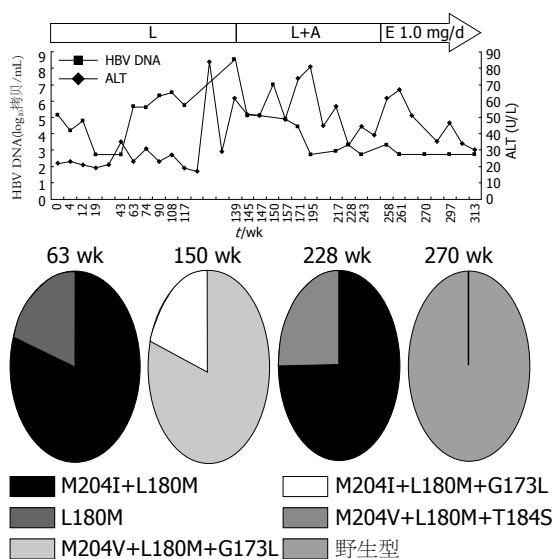


图 2 患者2病毒耐药突变的临床过程和进化. 该患者在使用LAM 63 wk后出现病毒反弹继续使用LAM, 病毒一直维持在 $5-7\log_{10}$ 拷贝/mL, 139 wk时为 $8.53\log_{10}$ 拷贝/mL联合ADV治疗, 56 wk后病毒基本维持阴性, 但119 wk时患者出现肾损害, 最终换用ETV 1 mg/d.

开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 停药24 wk后再服LAM, 32-40 wk DNA在 $4-5\log_{10}$ 拷贝/mL波动, 联合ETV 0.5 mg/d治疗, 8 wk后DNA仍为 $4.75\log_{10}$ 拷贝/mL, 换用ETV 1 mg/d, DNA从第6周开始持续阴性, 治疗期间ALT基本维持正常, 在此期间先后行8次TACE治疗, 84 wk时ALT的

应用要点

对需抗病毒治疗的HBV感染者, 初始治疗尽可能选耐药率低的NAs。

■同行评价

本文选题明确,具有一定的创新性,方法简单可靠,可重复性强,较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容。

表 2 3例患者的准种分析

各患者在不同时间点的HBV聚合酶基因与参考序列X01857C比对的全部氨基酸替代位点	
患者1	
LAM+ADV 22 wk	(G ₀ 173V ₁₀ M ₀ 204I ₁₀ C ₀ 256S ₁₀ L ₁ 80I ₉ /V ₁ E ₁ 263D ₉ D ₅ 131N ₅ H ₅ 55Q ₄ H ₇ 94R ₃ T ₈ 184I ₂ S ₉ 117P ₁ R ₉ 120K ₁ N ₉ 139S ₁ S ₉ 246P ₁) ₁₀
LdT 10 wk	(H ₀ 55Q ₇ L ₀ 80I ₇ G ₀ 173V ₇ M ₀ 204I ₇ C ₀ 256S ₇ E ₀ 263D ₇ V ₃ 112A ₄ L ₃ 180M ₄) ₇
ETV 7 wk	(H ₀ 55Q ₅ L ₀ 80I ₅ V ₀ 112A ₅ G ₀ 173V ₅ L ₀ 180M ₅ M ₀ 204I ₅ C ₀ 256S ₅ E ₀ 263D ₅) ₅
ETV 21 wk	(H ₀ 55Q ₁₂ L ₀ 80I ₁₂ G ₀ 173V ₁₂ M ₀ 204I ₁₂ C ₀ 256S ₁₂ E ₀ 263D ₁₂ V ₈ 112A ₄ L ₈ 180M ₄ F ₁₀ 46L ₂ D ₁₀ 131G ₂ S ₁₀ 143P ₂) ₁₂
患者2	
LAM 60 wk	(G ₀ 173V ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₉ /A ₂ L ₅ 231S ₅ S ₈ 57T ₂ S ₉ 116A ₁ F ₉ 249L ₁) ₁₀
LAM+ADV 11 wk	(G ₀ 173L ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₉ /I ₂ C ₀ 256S ₁₀ L ₀ 267Q ₁₀ V ₈ 207A ₂ F ₈ 249S ₂) ₁₀
LAM+ADV 89 wk	(G ₀ 173V ₈ L ₀ 180M ₈ M ₀ 204V ₈ S ₀ 223A ₈ I ₀ 224V ₈ C ₀ 256S ₈ N ₆ 65D ₂ L ₆ 72P ₂ K ₆ 168R ₂ F ₆ 178S ₂ L ₆ 229F ₂ R ₆ 280S ₂) ₈
ETV 1 mg/d, 12 wk	(R ₀ 153W ₁₀ G ₀ 173V ₁₀ L ₀ 267Q ₁₀ M ₈ 129V ₂ S ₈ 223P ₂) ₁₀
患者5	
再服LAM 40 wk	(N ₀ 139K ₁₁ G ₀ 173L ₉ V ₅ L ₀ 180M ₁₁ M ₀ 204V ₁₁ S ₀ 213T ₁₁ I ₀ 224V ₁₁ C ₀ 256S ₁₁ D ₂ 134N ₉ L ₈ 229F ₃ S ₉ 116P ₂ R ₉ 120G ₂ F ₉ 227S ₂ P ₉ 237H ₂ S ₁₀ 137P ₁ L ₁₀ 144P ₁ G ₁₀ 165X ₁) ₁₁
ETV 1 mg/d, 16 wk	(D ₀ 134N ₁₀ N ₀ 139K ₁₀ G ₀ 173L ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₁₀ S ₀ 213T ₁₀ I ₀ 224V ₁₀ C ₀ 256S ₁₀ L ₈ 77S ₂ S ₈ 185G ₂ Y ₉ 245H ₁) ₁₀
ETV 1 mg/d, 44 wk	(D ₀ 134N ₇ N ₀ 139K ₇ G ₀ 173L ₇ L ₀ 180M ₇ M ₀ 204V ₇ S ₀ 213T ₇ I ₀ 224V ₇ C ₀ 256S ₇ A ₈ 86T ₁) ₇

扩号内大写字母为氨基酸缩写, 大写字母的下标数字表示克隆数, 大写字母之间数字表示其在逆转录酶区的位置, 数字前的氨基酸代表与参考株相同, 后面的氨基酸代表变异株, 括号外的下标数字为总克隆数。

反弹可能由于在此期间接受了TACE治疗, 病程中病情稳定未出现并发症。

患者3开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 在LAM耐药后联合ADV治疗, 28 wk后DNA持续阴性, 在此期间先后行5次TACE治疗, 并出现食管胃底静脉曲张出血给予套扎治疗, 病情稳定。患者4开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 停药4 wk后DNA为4.89log₁₀拷贝/mL, YMDD为野生型, 再次服LAM 60 wk时DNA反弹至6.69log₁₀拷贝/mL, 联合ADV治疗12 wk时DNA转阴, 但22 wk时又升至3.25log₁₀拷贝/mL, 在此期间先后4次行TACE治疗, 病情稳定未出现并发症。患者6停药64 wk后, 再次服LAM 48 wk时DNA反弹, 换用ADV 70 wk时DNA再次反弹, 后换服ETV 1 mg/d 20 wk, DNA仍阳性; 又换成ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗, 16 wk时DNA为5.49log₁₀拷贝/mL, 36 wk时下降到3.72log₁₀拷贝/mL, 目前仍在随访中。患者7服LAM 40 wk时发生耐药, DNA为6.63log₁₀拷贝/mL, 换用ETV 0.5 mg/d治疗12 wk降至5.72log₁₀拷贝/mL, 后因经济原因换用ADV 48 wk, DNA持续在4-5 log₁₀拷贝/mL波动, 改ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗, 28 wk后DNA转阴, 目前仍在随访中。

2.2 克隆分析及多重耐药突变的演化 每例患者选取3-4份不同时间点的血清进行克隆测序做准种分析, 研究耐药株聚合酶基因的序

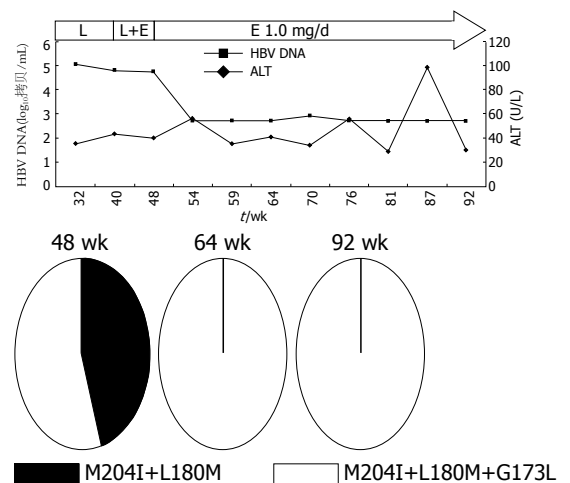


图 3 患者5病毒耐药突变的临床过程和进化。该患者LAM服用48 wk病毒转阴后自动停药24 wk, 重新服用LAM 40 wk时耐药, 改联合ETV 0.5 mg/d治疗, 8 wk后持续不降, 改单用ETV 1 mg/d。

列变化, 总克隆数为225个(表2)。患者1、2、5的耐药突变模式及克隆数见表3, 值得注意的是患者1联合ADV治疗22 wk时, 有20%(2/10)的克隆出现T184I, 在LdT 10 wk时57%(4/7)的克隆出现L180M, 同时出现DNA及ALT反弹, ETV 21 wk时虽然DNA为阴性, 但采用巢式PCR扩增, 克隆测序发现仍存在LAM耐药突变M204I+L80I约67%(8/12)和M204I+L180M+L80I约33%(4/12)。患者2经联合ADV治疗11 wk后,

表 3 耐药突变及克隆分析

	用药时间(wk)	耐药突变模式	克隆数(总)
患者 1	LAM+ADV 22	M204I+L80I	6
		M204I+L80I+T184I	2
		M204I+L80V	1
		M204I	1(10)
	LdT 10	M204I+L180M+L80I	4
		M204I+L80I	3(7)
	ETV 7	M204I+L180M+L80I	5(5)
	ETV 21	M204I+L80I	8
		M204I+L180M+L80I	4(12)
患者2	LAM 63	M204V+L180M	8
		L180M	2(10)
	LAM+ADV 11	M204V+L180M+G173L	8
		M204I+L180M+G173L	2(10)
	LAM+ADV 89	M204V+L180M	6
		M204V+L180M+T184S	2(8)
	ETV 1 mg/d, 12	无耐药突变	10(10)
患者5	LAM+ETV 0.5 mg/d, 8	M204V+L180M+G173L	6
		M204V+L180M	5(11)
	ETV 1 mg/d, 16	M204V+L180M+G173L	10(10)
	ETV 1 mg/d, 44	M204V+L180M+G173L	7(7)

在原耐药突变基础上选择出100%(10/10)的G173L及20%(2/10)的M204I, 但89 wk时G173L及M204I突变消失, 25%(2/8)的耐药株上出现T184S, 换用ETV 1 mg/d, 12 wk时均为野生型(10/10)。患者5在ETV 1 mg/d序贯治疗6 wk后虽然DNA持续阴性, 但16、44 wk时仍检测到M204V+L180M+G173L(10/10、7/7)。

患者3在LAM 62 wk时出现DNA反弹, 检测均为M204I+L80I(10/10)突变, 联合ADV治疗20 wk时恢复野生型(9/9), 虽然28 wk后DNA持续阴性, 但36、54 wk时仍检测到M204I+L80I(11/11)、M204V+L180M(10/10)。患者4停药4 wk时均为野生型(10/10), 再服LAM出现DNA反弹时以M204I为优势株(90%, 9/10), 联合ADV治疗22 wk时选择出M204I+L180M+L80I约56%(5/9)和M204I+L80I约44%(4/9)。患者6再次服LAM 48 wk时均为M204V+L180M+G173L(6/6), 换用ADV 70 wk后DNA反弹, 仍为M204V+L180M+G173L(10/10), 在ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗36 wk时出现双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A(10%, 1/10)。患者7在LAM耐药时均为M204V+L180M+G173L(10/10), 在ADV治疗15 wk时出现10%(1/10)双重耐药株

M204V+L180M+G173L+N236D, 48 wk时出现40%(4/10)的M204V+L180V+G173L。

3 讨论

HBV耐药是乙肝患者抗病毒治疗过程中最棘手的问题之一。HBV耐药的根源在于: HBV复制水平很高, 但由于其聚合酶缺乏校正功能, 因而复制过程中很容易参入错误碱基形成变异株。这些变异株的特点各不相同, 在一个HBV感染者体内常形成以某一个优势株为主的相关突变株组成的病毒群称为准种, 他是一个不断变化的病毒群。

本研究除了患者2和3在LAM耐药后的序贯治疗过程中选择出野生株为优势株外, 其余5名患者仍以LAM耐药株为优势株, 且L180M与L80I分别伴随M204V及M204I出现, G173L多在M204V/I+L180M的基础上发生。患者3联合ADV治疗后短期内恢复为野生株, 但随着用药时间的延长, LAM耐药株将再次被筛选出来, 并且呈动态演变, 36 wk时为M204I+L80I, 54 wk时为M204V+L180M。患者1换用ETV后虽然DNA阴性, 但通过巢式PCR提高扩增效率, 仍检测到M204I+L180M+L80I和M204I+L80I耐药株。患者5换用ETV治疗, 在DNA阴性后亦发现

M204V+L180M+G173L耐药株, ETV耐药主要发生在LAM耐药基础上, M204V+L180M+G173L的存在增加了ETV耐药风险^[4]. 这些耐药株影响HBV复制能力及对NAs的敏感性, 此3例患者虽然在目前随访中DNA仍保持阴性, 但从准种角度讲, 序贯治疗仍具有潜在的耐药风险, 对于这类患者将考虑从免疫学等角度进行综合治疗.

患者1、2、5在LAM耐药后最终都采用ETV治疗, 经ETV治疗后患者1和5仍能检测出LAM耐药株, 而患者2中M204V+L180M+T184S和M204V+L180M突变株则全部演变为野生型. 推测这可能与不同的变异株的复制性、对ETV的敏感性及宿主的免疫有关. 突变株M204V+L180M+T184S对ETV耐药, 但患者2经ETV治疗后病毒株却全部演变为野生型, 这提示ETV加倍剂量同时给予胸腺肽调节免疫治疗能更有效地抑制耐药病毒株的复制.

患者6在ADV联合ETV治疗、患者7在单用ADV序贯治疗过程中分别出现双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A和M204V+L180M+G173L+N236D, N236D与ADV的耐药相关, 这与Yim等报道相似^[5,6]. 这种双重耐药变异株可能导致HBV复制能力增强及对NAs敏感性降低, 容易导致序贯治疗的失败^[7].

准种分析揭示了HBV以群体、动态的形式存在, 很多位点的改变是DNA复制过程中非特异的变异, 受内源(宿主免疫)和外源性(NAs)因素的影响, HBV的变异位点众多, 文中列出患者1、2、5的HBV逆转录酶区域与参考序列比对的所有不同“变异”, 从中可发现患者1在联合ADV治疗时并无L180M变异, 但在换用LdT后57%的克隆上出现L180M, 目前尚无报道此位点与LdT耐药直接相关, 但是LdT与LAM同属左旋类核苷酸类似物, 所以在其作用下是否更容易筛选出L180M值得进一步观察. T184S/I与ETV耐药相关, 患者1和2在LAM联合ADV后分别出现T184I和T184S变异, 同样, 患者5在LAM耐药时11份克隆里有2份出现P237H, 有报道Q215H、P237H、N236D与ADV的耐药有关^[5,8]. 推测这些患者在体内HBV仍复制的情况下, 药物作用更容易筛选出对其他NA耐药的突变, Gerolami等亦报道服用LAM时出现ADV耐药株A181V^[9]. 另外患者2在LAM耐药时20%克隆为M204A, 推测可能是HBV复制过程的非特异突变, 与LAM耐药无关, 他不影响HBV复制能力及对NAs的敏感性, 因而在联合ADV治疗过

程中能被完全抑制, 故联合治疗后M204A消失, 而只检测到M204V/I耐药突变. 患者7在ADV治疗48 wk时40%的突变株出现L180V, 他是否与耐药相关有待进一步实验验证. 另外, 从结果中可看出H55Q、C256S、E263D、S223A、I224V等位点突变率较高, 这些突变的临床意义还需要做体外表型实验来检测其对HBV复制能力及对NAs敏感性的影响^[10].

总之, 本研究分析了7例LAM耐药患者序贯治疗后HBV准种的演变特点, 结果显示部分患者即使采用ADV、ETV等序贯治疗, LAM耐药突变仍不易消失, 即使DNA检测为阴性, 提高扩增效率仍可检测到耐药变异株, 即使短时间内HBV野生株恢复为优势株, 但随着用药时间的延长, 原耐药变异株仍然会被筛选出来, 甚至在此基础上筛选出交叉耐药株或多重耐药株. 因此, 一旦发生耐药, 将对序贯治疗产生持续的影响, 因而进一步说明对需抗病毒治疗的HBV感染者, 初始治疗尽可能选耐药率低的NAs.

4 参考文献

- 1 Yim HJ. [Management of antiviral-resistant chronic hepatitis B virus infection] *Korean J Gastroenterol* 2008; 51: 346-359
- 2 Yuen MF, Fung J, Wong DK, Lai CL. Prevention and management of drug resistance for antihepatitis B treatment. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 256-264
- 3 Natsuizaka M, Hige S, Ono Y, Ogawa K, Nakanishi M, Chuma M, Yoshida S, Asaka M. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepat* 2005; 12: 154-159
- 4 Choe WH, Hong SP, Kim BK, Ko SY, Jung YK, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Kim KH, Ji SI, Kim SO, Lee CH, Kwon SY. Evolution of hepatitis B virus mutation during entecavir rescue therapy in patients with antiviral resistance to lamivudine and adefovir. *Antivir Ther* 2009; 14: 985-993
- 5 Bartholomeusz A, Locarnini SA, Ayres A, Thompson G, Sozzi V, Angus P. Molecular modelling of hepatitis B virus polymerase and adefovir resistance identifies three clusters of mutations. *Hepatology* 2004; 40 (Suppl): 246A
- 6 Yim HJ, Hussain M, Liu Y, Wong SN, Fung SK, Lok AS. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology* 2006; 44: 703-712
- 7 Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouée-Durantel S, Villeneuve JP, Trépo C, Zoulim F. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 2005; 41: 1391-1398
- 8 Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 162-170
- 9 Gerolami R, Bourliere M, Colson P, Halfon P, Borentain P, Henry M, Botta D, Thibault V, Khiri

H, Tamalet C. Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases. *Antivir Ther* 2006; 11: 1103-1106

10 Durantel D, Carrouée-Durantel S, Werle-

Lapostolle B, Brunelle MN, Pichoud C, Trépo C, Zoulim F. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology* 2004; 40: 855-864

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行检查, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)