

乙型肝炎病毒基因变异及耐药突变研究进展

汪杨, 王峰, 辛桂杰, 牛俊奇 (吉林大学第一医院 感染科, 吉林 长春 130021)

全球有近4亿人感染乙型肝炎病毒(HBV), HBV持续感染是当前严重威胁人类健康的全球问题之一^[1]。我国是HBV感染的高发区, 慢性乙型肝炎(CHB)是我国肝硬化、肝功能衰竭和原发性肝癌的主要危险因素。HBV变异给疾病的治疗、预防、诊断等方面带来了很多新的问题, 同时随着核苷(酸)类似物广泛应用于CHB患者的治疗, 产生的耐药问题已在一定程度上限制了其进一步应用。深入了解HBV的变异、耐药情况及解决途径对指导临床用药有重要意义。

HBV高速复制通常会导致慢性HBV感染患者血浆中病毒水平大于或等于 $10^8 \sim 10^{10}$ 拷贝/ml。病毒的半寿期为1~2天, 病毒复制产量高, 每天能产生 10^{11} 拷贝的病毒^[2]。HBV多聚酶是一种逆转录酶, 缺少3'-、5'-端的核酸外切酶, 因此缺乏纠错功能, HBV基因组长约3200个核苷酸, 多聚酶错配率为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$, 故血液循环中的病毒包含大量突变病毒或准种。我们把具有临床意义的HBV基因组突变分为3种, 即HBeAg及HBcAg基因突变、包膜蛋白基因突变、影响对抗病毒药物敏感性的HBV多聚酶突变。

1 HBeAg及HBcAg编码基因的突变

慢性HBV感染主要分为2个状态: HBeAg阳性和HBeAg阴性。HBeAg阴性的患者被认为感染了不产生HBeAg的突变株。HBeAg已在体外实验中被证明通过减少HBcAg二聚体能够减慢HBV DNA复

制, 从而使pgRNA包装减少^[3]。HBeAg对于HBV复制并不是必需的, 但对于评估持续感染是很重要的。体外实验已证明前核心蛋白有抗细胞凋亡的能力^[4], 在体内发挥免疫耐受原的作用^[5]。因此, HBeAg是HBV生命周期中一种重要的附属蛋白。已证明2种突变能减少或阻断HBeAg的表达: 第一种是翻译机制, 第二种是转录机制。

前核心区基 ϵ 结构区第1896 nt的单个碱基取代(G-A)产生了翻译的终止密码子(TGG变为TAG)^[6]。这种病毒链的突变考虑与暴发性乙型肝炎及CHB的严重恶化有关。在高度保守的RNA ϵ 主干环状结构, 第1896 nt与1858 nt组成碱基对。HBV基型B、D、E、G型及部分C型, 第1858 nt是胸腺嘧啶(T), 因此第1896 nt的G1896A(T-A)突变能够使 ϵ 结构更加稳定。在基型A、F型及部分C型HBV, 由于1858 nt是胞嘧啶(C), 更容易形成Watson-Crick(G-C)碱基配对, 所以很少出现这种终止密码子的突变。第二组突变影响基础核心启动子(BCP), 典型的突变位点在第1762 nt和1764 nt, 能够引起前-C/C mRNA转录受限^[7]。BCP突变, 如A1762T加G1764A, 可以独立发生, 也可伴前-C突变, 这与HBV基型有关。其他BCP突变与HBeAg水平变化、HBeAg血清学转换、疾病进展相关。一项对台湾CHB患者的研究分析了HBV基型分布和临床表现^[8], 在第1753、1773、1846、1896、1899 nt, HBeAg阴性患者比HBeAg阳性患者的突变率高。在这项队列研究中, 晚期肝病患者在

通讯作者: 牛俊奇, Email: junqiniu@yahoo.com.cn

第1762、1764、1753、1766及1768 nt突变频率增加,而在第1752、1773、1799及1858 nt突变频率减低。另外,同时发生A1762T和G1764A两个突变会使HBeAg水平明显减低,并与病毒载量增高有关。基型A HBV感染个体的这种突变方式是导致HBeAg缺失的主要原因,而在其他基型中,HBeAg缺失主要与前核心区突变有关。更重要的是,这些BCP突变并不影响HBV pgRNA转录或核心区或多聚酶蛋白的翻译。因此通过去除前核心蛋白对HBV复制的抑制作用,BCP突变似乎可以通过抑制与前基区RNA相关的前-C/C mRNA而使病毒复制增加。BCP位于X ORF内,BCP的2个主要突变 A1762T+G1764A导致X蛋白的2个密码子改变(xL130M及xV131I),还可产生一个BCP转录因子HNF-1的结合位点。已发现感染了带有A1762T和G1764A BCP突变的HBV可引起比野生型病毒更加严重的肝病,包括肝硬化和肝细胞癌^[9]。这些BCP突变在基型C型HBV中更加多见,这或许可以解释基型C型比基型B型毒力更强的原因。近来,另一个双重突变,G1764T、C1766G于基型D型的BCP区域发现,这可能形成一个HNF-3的新结合位点^[10]。

HBeAg阳性的CHB患者被认为处于免疫清除期,在此期主要清除的是HBeAg,因此C ORF处于免疫压力下。最常见的HBeAg突变发生于第97号密码子,该位置野生型氨基酸——苯丙氨酸(F)或异亮氨酸(I)变为亮氨酸(L)。cF97L/cI97L突变被认为与分泌的未成熟表型有关,导致HBV复制中间体在细胞内的滞留^[11]。其他HBeAg突变,如cP5T及cL60V改变与HBV分泌水平低有关。

核心蛋白按机能分为2种主要结构域,即N-末端结构域和C-末端结构域。C-末端结构域对于结合pgRNA及基区复制有作用,并已证明含有能被B细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别的抗原决定簇^[12]。在CHB清除阶段,C-末端的这些抗原决定簇可选择性的发生逃逸突变。这些核心基区变异与HBeAg阴性及活动性肝病有关。

2 包膜蛋白基区突变

外膜基区变异可导致HBsAg阴性的HBV感染出现^[13]。病毒外膜蛋白中和结构域的决定性氨基酸成分发生点突变被认为可以逃避抗体(抗-HBs)的中和。

目前的乙肝疫苗包含HBsAg的主要部分,抗-HBs与HBsAg的第99~170位氨基酸残基的主要亲水区域(MHR)结合介导保护性免疫反应。应用这个抗原决定簇的变异制成疫苗及乙肝免疫球蛋白(HBIG),HBIG应用于肝移植受体以预防乙型肝炎。大多数疫苗及HBIG可以发生在HBsAg的第145位氨基酸残基变异,甘氨酸变成精氨酸(sD144A),而一旦发生sG145R变异,疫苗就失败了,并已证明能够传播并致病^[14]。

有时还可发现有的HBV基区无法合成前-S1及前-S2蛋白,尤其是无法合成前-S2的病毒基区经常是慢性携带者感染的主要病毒^[15]。前-S1突变与病毒外膜蛋白在细胞内储存及肝细胞玻璃样变组织学改变有关。前-S2区域与对酶活性无重要作用的Pol蛋白的区域有重叠。前-S2缺失变异一般为病毒复制优势株,可能意味着前-S2缺失变异是一种免疫逃逸变异。

3 多聚酶突变

在过去10年中,随着安全、有效的口服抗病毒核苷(酸)及其类似物的应用,CHB的治疗取得了显著进步。目前上市的药物包括拉米夫定(LAM),一种合成的带有非天然L-结构的脱氧胞嘧啶类似物,其他相关的L-核苷酸包括恩替他滨(emtricitabine)、替比夫定(LdT)、克拉夫定(clevudine)。另一组为无环磷酸酯,包括阿德福韦酯(ADV),一种2-脱氧单磷酸腺苷的无环核苷酸类似物(dAMP)——阿德福韦的前体物质,其结构与目前治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的替诺福韦酯(TDF)相似。最新研制成功的第三类药,包含环戊烷/环戊烯半糖及目前发现的大多数抗病毒的优点,脱氧鸟嘌呤核苷类似物恩替卡韦(ETV)。患者出现病毒耐药一般会出现以下情况:病毒载量增加(一般指由最低基线升高超过1 log₁₀ IU/ml)、血清谷丙转氨酶

(ALT)水平增高、临床恶化和(或)发现已知得多聚酶区的耐药突变。抗病毒药物耐药会使病毒对药物的敏感性减低,这是在抗病毒治疗的选择性压力下产生的突变。目前已确定2种突变类型:原发耐药突变,与对药物耐受有关;继发或代偿性突变。后者可能会引起病毒复制能力增加,由于其代偿了原发性耐药突变,发挥准种记忆的基库功能,所以非常重要。

3.1 拉米夫定耐药变异 目前,最为人们熟知的拉米夫定(LAM)耐药变异是定位于HBV Pol催化结构域或C结构域的YMDD变异。在LAM抗病毒治疗过程中,逆转录基最主要的耐药突变已被确定为rtM204I/V/S(C结构域)伴或不伴rtL180M(B结构域),其他主要变异包括rtA181T/V。在HBV Pol的其他结构域还发现了代偿性突变,如rtL80V/I、rtI169T、rtV173L、rtT184S及rtQ215S。

治疗过程中LAM耐药率每年增加14%~32%,治疗后48个月可超过70%^[17]。增加耐药产生的因素包括治疗前高水平的血清HBV DNA及ALT、病毒未被完全抑制^[17]。主要的LAM耐药突变rtM204V并不与ADV产生交叉耐药,但rtA181T及rtQ215S会与ADV发生交叉耐药^[18]。还有一些证据表明发现于基C型的rtL80V/I + rtL180M + rtM204I HBV LAM耐药突变与ADV交叉耐药^[19],提示A结构域突变(rtL80V/I)可能对ADV耐药。与LAM相关的耐药变异在细胞外实验中对于LAM的敏感性降低至少100~1000倍。曾在分离病毒株中检测到rtM204I,但rtM204V和rtM204S仅在A结构域或B结构域存在突变时才会出现。耐药突变的5种主要方式:① rtM204I; ② rtL180M + rtM204V; ③ rtL180M + rtM204I; ④ rtV173L + rtL180M + rtM204V; ⑤ rtL80V/I ± rtL180M + rtM204I。具体哪种突变占优势则取决于感染的HBV基型。LAM耐药的分子机制是由于拉米夫定的硫氧环阻碍β侧链缬氨酸或异亮氨酸与三磷酸脱氧核苷酸的结合,而抑制HBV复制^[19]。

3.2 阿德福韦酯耐药突变 ADV耐药最初被认为是位于酶的B(rtA181T)结构域和D(N236T)结构

域^[21],而最近报道了第三种方式的突变:位于C-D之间的结构域,rtV214A和(或)rtQ215S。HBV对ADV的耐药几率较LAM耐药少,2年后的耐药率约为2%,3年后为4%,4年后为18%,5年后为29%。这些ADV相关的位于HBV Pol的突变在体外实验中以半量有效药物浓度(IC₅₀),病毒复制只轻度增加。这些突变与TDF交叉耐药,可能是由于这两种药的分子机制相似,都是间接干扰A及D结构域的二磷酸结合位点^[20]。rtN236T对于LAM的敏感性影响不大,但是rtA181T/V及rtV214A/rtQ215S突变存在与LAM的交叉耐药。A结构域,如rtL80V/I、rtV84M、rtS85A,似乎发挥重要作用。最近,位于逆转录酶结构域的另一突变(rtI233V)已被证实对ADV耐药。临床研究中,约2%患者出现rtI233V突变^[22,23]。

3.3 恩替卡韦耐药突变 目前ETV的耐药仅在对LAM耐药患者中观察到。在病毒多聚酶中已发现与ETV耐药相关的突变,位于HBV Pol的B结构域(rtI69T或rtS184G)、C结构域(rtS202I)及E结构域(rtM250V)。未发现LAM耐药突变,而rtM250V突变导致IC₅₀增加9倍,而rtT184G + rtS202I突变则无明显作用。rtT184G + rtS202I ETV的耐药机制是突变引起靠近YMDD位点的核苷酸结合的袋状结构域的几何构象改变及多聚酶与DNA模板结合部位的几何构象改变^[23]。rtM250V耐药的分子机制被认为是改变了DNA引物链与掺入dNTP的DNA模板链结合的相互作用^[24]。

3.4 替比夫定耐药突变 替比夫定(telbivudine, LdT)是L-脱氧胸腺嘧啶核苷(L-deoxythymidine)的缩写,是一种L-核苷类似物。LdT在美国已作为抗HBV核苷类似物上市,其耐药方面的研究发现LdT可在HBV逆转录酶YMDD基序列区出现4种突变。迄今为止,在LdT治疗的患者中只发现rtM204I突变,而未发现rtM204V突变^[25]。虽然LdT的耐药率较LAM低,但在治疗1年后耐药已经实质性存在,并且耐药率呈指数性上升^[26]。

4 抗病毒治疗的耐药解决方案

活跃的HBV复制通常与活动性肝病相关,而HBV病毒载量越高,发展为肝硬化及肝癌

(HCC) 的风险就越高。血清HBV DNA水平降低通常会促进生化及组织学的改善,相反,血清HBV DNA的反跳,会使生化及组织学恶化。■前核苷(酸)类似物已经广泛应用于CHB的抗病毒治疗中,如何减少或避免耐药变异的发生,已成为肝病领域的重要课题。最有效的方法就是提高抗病毒药物的活性,可采用联合应用药物,至少是追加用药或应用有协同效应的药物等方法。其他方法包括增加耐受药物的用药剂量或应用核苷(酸)类似物增强剂。还可通过提高耐药的基■屏障、提高耐药的药理学屏障等途径来避免耐药的发生。提高耐药的基■屏障,在出现药物逃逸突变及补偿性耐药突变前,选择联用药物来避免多耐药突变。应避免单独治疗,这样会导致多耐药突变。耐药的药理学屏障可通过提高患者的依从性及药物联合应用来提高。

■前,干扰素 α 、LAM、ADV及ETV都作为非肝硬化成人的一线用药。在治疗过程中发现对LAM耐药的突变对于其他L-核苷酸存在交叉耐药,并对ETV敏感性下降,但对ADV或TDF的敏感性不变,对ADV和TDF耐药的HBV多聚酶突变通常仍会对L-核苷酸及ETV敏感。对于L-核苷酸及非环状戊烯/环戊烷构成的药物、ETV,至少存在4种高水平的耐药突变^[27]。■此,ETV的应用或联合应用L-核苷酸及非环状戊烯一般会提高针对耐药的基■屏障。联合治疗的药物应该选择有不同作用机制、有附加或协同作用的。不幸的是,在CHB治疗中,核苷(酸)类似物作用机制相似,针对相同的靶点:通过作用于HBV多聚酶来抑制基■复制。应该通过加深对于HBV耐药变异的理解,制定出可行的治疗方案,使CHB抗病毒治疗更加规范、合理。

参考文献

- [1] Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection[J]. *Lancet Infect Dis*,2002, 2:395-403.
- [2] Lewin SR, Ribeiro RM, Walters T, et al. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed[J]. *Hepatology*,2001,34:1012-1020.
- [3] Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore

protein[J]. *J Virol*,1997,71:345-353.

- [4] Locarnini S, Shaw T, Dean J, et al. Cellular response to conditional expression of the hepatitis B virus precore and core proteins in cultured hepatoma (Huh-7) cells[J]. *J Clin Virol*,2005,32:113-121.
- [5] Milich DR, Jones JE, Hughes JL, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero[J]? *Proc Natl Acad Sci USA*,1990,87:6599-6603.
- [6] Omata M, Ehata T, Yokosuka O, et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis[J]. *N Engl J Med*,1991,324:1699-1704.
- [7] Hunt CM, McGill JM, Allen MI, et al. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations[J]. *Hepatology*,2000,31:1037-1044.
- [8] Chen C H, Lee CM, Lu SN, et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan[J]. *J Clin Microbiol*,2005,43:6000-6006.
- [9] Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection[J]. *J Gen Virol*,1995, 348:625-626.
- [10] Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, et al. T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D[J]. *J Gen Virol*,2005,86:2451-2458.
- [11] Ehata T, Omata M, Yokosuka O, et al. Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Clin Invest*,1992,89:332-338.
- [12] Lohr HF, Gerken G, Schlicht HJ, et al. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B[J]. *J Infect Dis*,1993,68:1133-1139.
- [13] Tang JH, Yeh CT, Chen TC. Emergence of an S gene mutant during thymosin α 1 therapy in a patient with chronic hepatitis B[J]. *J Infect Dis*, 1998, 178:866.
- [14] Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus[J]. *Lancet*,1990,336:325-329.
- [15] Gunther S, Fischer L, Pult I, et al. Naturally occurring variants of hepatitis B virus[J]. *Adv Virus Res*,1999,52:25-137.
- [16] Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy[J]. *Hepatology*,2000,31:1318-1326.
- [17] Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B[J]. *Clin Infect Dis*,2003,36:687-696.
- [18] Bartholomeusz A, Locarnini S, Ayres A, et al. Mechanistic basis for hepatitis B virus resistance to acyclic nucleoside phosphonate analogues, adefovir and tenofovir[J]. *Hepatology*,2005,42(Suppl. 1):594A
- [19] Yeon JE, Yoo W, Hong SP, et al. Resistance to adefovir

- dipivoxil (ADV) in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with ADV[J]. Gut,2006,55:1488-1495.
- [20] Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations[J]. Antivir Ther,2004,9:149-160.
- [21] Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with development of a novel mutation in the HBV polymerase[J]. Gastroenterology,2003,125:292-297.
- [22] Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir[J]. N Engl J Med,2006,354:1807-1812.
- [23] Chang TT, Lai CL. Hepatitis B virus with primary resistance to adefovir[J]. N Engl J Med 2006,355:322-323.
- [24] Warner N, Locarnini SA, Colledge D, et al. Molecular modeling of entecavir resistant mutations in the hepatitis B virus polymerase selected during therapy[J]. Hepatology,2004,40(Suppl.1):245A.
- [25] Yuan HJ, Lee WM. Molecular mechanisms of resistance to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis B[J]. Curr Mol Med,2007,7:185-197.
- [26] Dienstag JL. Looking to the future: new agents for chronic hepatitis B[J]. Am J Gastroenterol,2006,101 Suppl 1:S19-25.
- [27] Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine[J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48:3498-3507.

收稿日期: 2007-06-10

• 健康园地 •

准妈妈不可轻视的小问题——皮肤瘙痒

痒是一种常见的不适,搔抓一下便可消除,人们不会把它当作一回事。但孕期瘙痒可不能轻视。

由于怀孕后体内激素的变化,可能会发生皮肤瘙痒。孕妇皮肤瘙痒是妊娠期较常见的生理现象,不需要特殊治疗,孩子出生后就会消失。如果在孕中期,更为普遍的是在孕晚期,严重瘙痒可能是妊娠期肝内胆汁淤积症的征兆。

妊娠期肝内胆汁淤积症主要发生于孕晚期,少数发生于孕中期,以皮肤瘙痒和胆酸高值为特征,主要由于妊娠后体内高水平的雌激素引起胆盐代谢障碍,造成肝内胆汁淤积。当肝功能受到一定程度影响时则出现黄疸。又由于胆盐积存皮下,刺激神经末梢,就产生了瘙痒症状。然而妊娠肝内胆汁淤积症并非仅仅引起皮肤发痒,其最大危险则是对胎儿的伤害。大量胆汁淤积在胎盘,变成胆盐沉积在胎盘绒毛间隙,使胎盘有效血流量减少,可导致孕妇早产、胎膜早破、胎儿宫内窘迫、孕晚期的胎儿突然死亡,所以应引起准妈妈们的重视。

当你确诊为妊娠肝内胆汁淤积症时,不要惊慌,要积极配合医生药物治疗,除药物治疗外,还需注意:

1. 卧床休息,取左侧卧位以增加胎盘血流量,改善胎儿宫内缺氧的状况。并认真进行胎动计数。
2. 对瘙痒处皮肤不要用热水、肥皂水擦洗,不要过度搓洗皮肤。
3. 勤换内衣,内衣以棉织品为宜,应宽松舒适,避免摩擦。
4. 避免吃刺激性食物,如辣椒、韭菜、大蒜等。
5. 尽量少搔抓,避免再刺激而加剧痒感。
6. 多吃新鲜蔬菜和水果,保持心情舒畅与大便通畅,都有助于减轻皮肤瘙痒。
7. 不可擅自乱用药,谨防发生胎儿畸形或药物性皮炎。