

# 2019 – 2024 年慢性 HBV 感染患者恩替卡韦耐药突变谱演变及其临床意义

李旭阳<sup>1</sup>, 思兰兰<sup>2</sup>, 李乐<sup>2</sup>, 贺梦雯<sup>1</sup>, 陈雪媛<sup>2</sup>, 姚增涛<sup>2</sup>, 王春艳<sup>3</sup>, 纪冬<sup>1,3\*</sup>, 刘妍<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>北京大学三〇二临床医学院, 北京 100039; <sup>2</sup>解放军总医院感染病医学部, 北京 100039; <sup>3</sup>解放军总医院肝病医学部, 北京 100039

[中图分类号] R512.6<sup>2</sup> [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1561.2025.1219

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 李旭阳, 思兰兰, 李乐, 等. 2019—2024 年慢性 HBV 感染患者恩替卡韦耐药突变谱演变及其临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(2): 171-177.

[收稿日期] 2025-08-04

[录用日期] 2025-10-20

[上线日期] 2025-12-19

**[摘要]** **目的** 分析 2019—2024 年临床慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染患者恩替卡韦(ETV)基因型耐药突变检出特征, 以期揭示 ETV 耐药模式的转变规律, 为临床合理抗病毒治疗提供依据。**方法** 收集 2019 年 7 月—2024 年 6 月在解放军总医院第五医学中心接受 HBV 耐药突变检测及核苷(酸)类似物(NAs)治疗的 4697 例慢性 HBV 感染患者进行回顾性分析; 根据是否检出 ETV 耐药基因突变, 将患者分为 ETV 耐药突变组( $n=547$ )与无 ETV 突变组( $n=4150$ )。从患者血清中提取病毒基因组, 采用单管巢式 PCR 方法扩增 HBV 反转录酶(RT)区, 分析 NAs 耐药相关位点的突变情况; 结合临床资料, 采用 logistic 回归分析耐药相关危险因素。**结果** 在 4697 例患者中, 547 例(11.6%)检出 ETV 耐药基因突变。ETV 耐药突变主要出现在既往接受过 NAs 治疗的患者中, 以拉米夫定(LAM)→ETV 序贯治疗(66.5%)和 LAM→阿德福韦酯(ADV)→ETV 治疗(20.0%)为主。在检测到的 59 种 ETV 耐药突变模式中, 基于 rtS202 位点的突变最常见, 共 302 例(55.2%); 基于 rtT184 位点的突变共 233 例(42.6%), 基于 rtM250 位点的突变共 71 例(13.0%)。ETV 耐药突变组的男性比例、年龄、谷丙转氨酶、HBV DNA 载量、HBeAg 阳性率、HBV 基因 C 型、肝硬化及 LAM 治疗史的比例均明显高于无 ETV 突变组( $P<0.05$ )。多因素分析结果显示, 年龄 $\geq 45$  岁、HBeAg 阳性、HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$  IU/ml、HBV 基因 C 型、肝硬化及 LAM 治疗史是 ETV 耐药突变的独立危险因素。在 184 例接受基于富马酸替诺福韦(TDF)/富马酸丙酚替诺福韦(TAF)挽救治疗的随访患者中, 48 周时有 148 例(80.4%)实现病毒学应答, 其中接受 TAF+聚乙二醇干扰素 $\alpha$ (PEG IFN- $\alpha$ )的 2 例患者实现 HBeAg 血清学转换。**结论** ETV 作为当前指南推荐的一线核苷类强效口服抗病毒药物, 其临床耐药突变模式正在演变为以 rtS202G+rtL180M+rtM204V 突变为主。年龄较大、HBeAg 阳性、HBV DNA 高载量、HBV 基因 C 型、肝硬化及 LAM 治疗史为 ETV 耐药突变主要危险因素。针对 ETV 耐药患者, 基于 TDF/TAF+PEG IFN- $\alpha$  的挽救治疗可能是实现功能治愈的有效方案。

**[关键词]** 慢性乙型肝炎; 恩替卡韦; 基因型; 耐药突变

## The evolution of entecavir resistance mutation spectrum in patients with chronic hepatitis B virus infection from 2019 to 2024 and its clinical implications

Li Xu-Yang<sup>1</sup>, Si Lan-Lan<sup>2</sup>, Li Le<sup>2</sup>, He Meng-Wen<sup>1</sup>, Chen Xue-Yuan<sup>2</sup>, Yao Zeng-Tao<sup>2</sup>, Wang Chun-Yan<sup>3</sup>, Ji Dong<sup>1,3\*</sup>, Liu Yan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Peking University 302 Clinical Medical School, Beijing 100039, China

<sup>2</sup>Senior Department of Infectious Diseases, <sup>3</sup>Senior Department of Hepatology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

\*Corresponding author. Liu Yan, E-mail: liuyan5360@163.com; Ji Dong, E-mail: jidg302@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82470632), and the National Key Research and Development Program of China (2023YFC2306800)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the detection characteristics of entecavir (ETV) genotypic resistance mutations in patients

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82470632); 国家重点研发计划(2023YFC2306800)

**[作者简介]** 李旭阳, 硕士研究生, 主要从事 HBV 感染相关肝病方面的基础和临床研究

**[通信作者]** 刘妍, E-mail: liuyan5360@163.com; 纪冬, E-mail: jidg302@126.com

with chronic hepatitis B virus (HBV) infection from 2019 to 2024, aiming to elucidate the evolving patterns of ETV resistance and provide a basis for rational clinical antiviral therapy. **Methods** A total of 4697 chronic HBV-infected patients who underwent HBV resistance mutation testing and received nucleos(t)ide analogs (NAs) treatment at the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital between July 2019 and July 2024 were included in this retrospective study. Based on the detection of ETV resistance mutations, patients were divided into ETV-resistance mutation group ( $n=547$ ) and non-ETV resistance mutation group ( $n=4150$ ). Viral genomes were extracted from serum, and the HBV reverse transcriptase (RT) gene region was amplified using single-tube nested PCR, followed by Sanger sequencing to analyze NAs resistance-associated mutations. Clinical data were analyzed using logistic regression to identify risk factors for ETV resistance. **Results** ETV resistance mutations were detected in 547 (11.6%) of the 4697 patients. These mutations were predominantly found in patients with prior NAs therapy, mainly those receiving lamivudine (LAM)-to-ETV sequential therapy (66.5%) or LAM-to-adeфовир (ADV)-to-ETV therapy (20.0%). Among the 59 detected ETV resistance mutation patterns, mutations involving the rtS202 site were the most common (302 cases, 55.2%), followed by those involving the rtT184 site (233 cases, 42.6%), and the rtM250 site (71 cases, 13.0%). Compared with non-ETV resistance mutation group, ETV-resistance mutation group had a significantly higher proportion of males, older age, elevated alanine aminotransferase (ALT) levels, higher HBV DNA loads, higher HBeAg positivity rate, higher prevalence of HBV genotype C, cirrhosis, and a history of LAM therapy ( $P<0.05$ ). Multivariable analysis identified age  $\geq 45$  years, HBeAg positivity, HBV DNA  $\geq 3.0 \log_{10}$  IU/ml, HBV genotype C, cirrhosis, and prior LAM therapy as independent risk factors for ETV resistance. Among the 184 patients who received tenofovir disoproxil fumarate (TDF)/tenofovir alafenamide (TAF)-based rescue therapy and were followed up, 148 (80.4%) achieved virological response at week 48. Notably, two patients receiving a TAF+pegylated interferon  $\alpha$  (PEG IFN- $\alpha$ ) regimen achieved HBeAg seroconversion. **Conclusions** As a first-line potent oral nucleoside antiviral drug recommended by current guidelines, the clinical resistance pattern of ETV is evolving, with the rtS202G+rtL180M+rtM204V mutation combination becoming predominant. Older age, HBeAg positivity, high HBV DNA load, HBV genotype C, cirrhosis, and prior LAM therapy are key risk factors. For ETV-resistant patients, rescue therapy based on TDF/TAF in combination with PEG IFN- $\alpha$  may be an effective strategy to achieve a functional cure.

**[Key words]** chronic hepatitis B; entecavir; genotype; drug resistance mutation

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染仍是全球重要的公共卫生难题,与肝硬化、肝癌、肝衰竭等终末期肝病密切相关<sup>[1-2]</sup>。核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogs, NAs]是目前临床治疗HBV感染的主要药物,通过靶向HBV聚合酶反转录酶(reverse transcriptase, RT)区抑制病毒复制<sup>[3]</sup>。恩替卡韦(entecavir, ETV)因其快速高效抗病毒、高耐药基因屏障和安全性好的优势,先后被美国肝病学会、欧洲肝病学会、亚太肝病学会和中国肝病学会慢性乙肝防治指南推荐为一线强效口服抗病毒药物。自2005年在我国获批临床应用以来,ETV已成为我国慢性HBV感染抗病毒治疗的一线用药。常以单药使用或与富马酸替诺福韦二吡呋酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)联用<sup>[1]</sup>。然而,尽管ETV具有较高的耐药基因屏障,长期应用仍有耐药风险,尤其在既往接受过拉米夫定(lamivudine, LAM)或替比夫定(telbivudine, LdT)治疗的患者中尤为显著<sup>[3]</sup>。

ETV经典耐药突变通常发生在LAM/LdT耐药的背景下,即在rtM204V/I+rtL180M突变基础上,进一步发生rtT184、rtS202或rtM250位点的突变,本课题组早在2010年的一项研究中发现,在128例检出ETV耐药突变的患者中,rtT184位点的突变是ETV耐药中最常见的突变模式(79/128, 61.7%)<sup>[4]</sup>。随着ETV临床应用的推进,关于临床真实世界ETV耐药

突变的检出率及突变模式是否发生演变尚缺少大样本、系统性研究。本研究拟对近5年ETV耐药突变特征及其演变模式进行分析,并结合临床数据阐明ETV耐药的危险因素,旨在帮助全面理解ETV耐药突变的情况,对临床实践中优化抗病毒治疗策略也具有重要的指导价值。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集2019年7月—2024年6月在解放军总医院第五医学中心就诊并接受HBV耐药突变检测的4697例慢性HBV感染患者的血清样本进行回顾性分析。纳入标准:参照《慢性乙型肝炎防治指南》(2019年版)<sup>[5]</sup>,确诊为慢性乙型肝炎或乙型肝炎肝硬化,并接受过NAs治疗的患者。排除标准:同时感染甲、丙、丁、戊型等其他肝炎病毒或人类免疫缺陷病毒者,以及肝癌患者。将所有患者根据是否检出ETV耐药基因突变,分为ETV耐药突变组( $n=547$ )与无ETV耐药突变组( $n=4150$ )。本研究获解放军总医院第五医学中心伦理委员会审批(KY-2024-10-156-1)。

**1.2 实验室检测** HBV DNA定量、乙肝血清学标志物检测和肝功能检测由本单位临床检验中心完成。HBV DNA定量采用上海科华生物工程股份有限公司生产的实时荧光定量PCR试剂盒,最低检测下限为20 IU/ml。乙肝血清学标志物均采用电化学发光法,

使用瑞士罗氏 Cobas e601 全自动电化学发光免疫分析仪和配套试剂。肝功能检测项目包括总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 等, 采用美国贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪和配套试剂。

**1.3 HBV 基因型耐药分析和系统发育树分析** 采用本课题组创建的单管巢式聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法扩增 1225 bp 病毒基因片段 [核苷酸 (nt)54–1278], 该片段覆盖了 HBV 基因组的全长 RT 区 (nt130–1161) 及部分重叠的表面抗原 (S) 基因区 (nt155–835)。该巢式 PCR 方法使用 200  $\mu$ l 血清作为模板, 最低检测下限为 10 IU/ml (专利号: ZL200910092331.1)。使用 Sanger 法直接测序分析耐药突变, 采用 MEGA 4 软件对 RT/S 基因序列进行分子进化树分析, 以肝炎病毒数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 的标准序列为参照进行 HBV 基因分型, 重点分析 RT 区 rtL180、rtA181、rtT184、rtS202、rtM204、rtN236、rtM250 等 NAs 耐药相关位点的突变<sup>[4,6-8]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 R 4.1.3 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者以  $\bar{x}\pm s$  表示, 两组间比较采用成组 *t* 检验; 偏态分布者以  $M(Q_1, Q_3)$  表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。计数资料以例 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验。采用 logistic 回归分析 ETV 耐药突变的影响因素。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ETV 耐药突变组与无 ETV 突变组患者的临床特征比较** 与无 ETV 突变组相比, ETV 耐药突变组患者的年龄较大 ( $P < 0.001$ ), 男性占比较高 ( $P = 0.037$ ), ALT 水平升高 ( $P = 0.004$ ), HBeAg 阳性率、肝硬化发生率、HBV DNA 载量、既往接受 LAM 治疗的比例较高 ( $P < 0.001$ ); HBV 基因型分布显示, ETV 耐药突变组中 HBV 基因型 B 型占 16.1% (88/547), C 型占 81.5% (446/547), D 型占 2.4% (13/547), ETV 耐药突变组 C 型占比高于无 ETV 突变组, B、D 型占比低于无 ETV 突变组, 整体基因型分布差异均有统计学意义 ( $P = 0.019$ ) (表 1)。

表 1 ETV 耐药突变组与无 ETV 突变组患者临床特征比较

Tab.1 Comparison of clinical data between ETV-resistant and non-ETV-resistant mutation groups

项目	合计 (n=4697)	ETV 耐药突变组 (n=547)	无 ETV 突变组 (n=4150)	$\chi^2/t/Z$	P
男性 [例 (%)]	3581 (76.2)	437 (79.9)	3144 (75.8)	4.328	0.037
年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$ )	47.1 $\pm$ 12.6	51.3 $\pm$ 10.9	46.5 $\pm$ 12.6	9.458	<0.001
PLT [ $\times 10^9/L$ , $M(Q_1, Q_3)$ ]	178.0 (111.0, 231.0)	173.0 (113.50, 221.0)	179.0 (110.0, 232.0)	-1.582	0.114
ALT [U/L, $M(Q_1, Q_3)$ ]	32.0 (21.0, 58.0)	38.0 (22.5, 66.5)	31.0 (21.0, 56.0)	2.863	0.004
AST [U/L, $M(Q_1, Q_3)$ ]	31.0 (23.0, 56.0)	33.0 (24.0, 56.5)	31.0 (23.0, 56.0)	0.529	0.597
TBIL [ $\mu$ mol/L, $M(Q_1, Q_3)$ ]	15.1 (11.0, 23.4)	15.1 (11.5, 21.3)	15.10 (11.0, 23.7)	-0.042	0.967
HBeAg 阳性 [例 (%)]	4680 (99.6)	547 (100)	4133 (99.6)	0.001	0.975
HBeAg 阳性 [例 (%)]	2028 (60.2)	281 (75.7)	1747 (58.3)	41.322	<0.001
HBV DNA [ $\log_{10}$ IU/ml, $M(Q_1, Q_3)$ ]	2.9 (2.1, 4.2)	4.8 (3.3, 6.6)	2.7 (2.0, 3.9)	19.202	<0.001
HBV 基因型 [例 (%)]				7.961	0.019
B	909 (19.3)	88 (16.1)	821 (19.8)		
C	3615 (77.0)	446 (81.5)	3169 (76.4)		
D	173 (3.7)	13 (2.4)	160 (3.8)		
肝硬化 [例 (%)]	386 (8.2)	149 (27.2)	237 (5.7)	217.03	<0.001
既往 LAM 治疗史 [例 (%)]	3648 (77.7)	473 (86.5)	3175 (76.5)	27.62	<0.001

ETV. 恩替卡韦; PLT. 血小板; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; TBIL. 总胆红素; HBeAg. 乙型肝炎表面抗原; HBeAg. 乙型肝炎 e 抗原; LAM. 拉米夫定

**2.2 ETV 耐药相关 HBV RT 突变模式** 547 例 ETV 耐药患者中共发现 59 种 HBV RT 区突变模式, 涉及位点占前 3 位的依次为: rtS202、rtT184 和 rtM250 位点。其中, rtS202 位点突变最为常见, 检出率为 55.2% (302/547), 全部为 rtS202G 替换, 在 253 例基于 rtS202G 的突变中, 92.1% (233/253) 同时伴有 rtL180M

和 rtM204V 突变。rtT184 位点突变检出率为 42.6% (233/547), 涉及 A/F/G/I/L/S 6 种替换类型, 其中以 rtT184L 最为常见 (67 例, 占 28.8%), 其次为 rtT184A (65 例, 占 27.9%); 在 179 例基于 rtT184 突变中, 81.6% (146/179) 伴随 rtL180M 和 rtM204V 突变。rtM250 位点突变的检出率为 13.0% (71/547), 涉及

I/L/V 3种替换类型,其中以rtM250V最多见(48例,占67.6%);在57例基于rtM250突变中,65.0%(37/57)伴随rtL180M和rtM204V突变。多位点联合突变在ETV耐药中亦较为常见,包括44例检出rtS202G与rtT184双位点联合突变、4例检出rtS202G与rtM250双位点联合突变、9例检出rtT184与rtM250双位点联合突变,以及1例同时检出rtS202G、rtT184I和rtM250L 3个位点联合突变(表2)。

值得注意的是,表2显示有8例患者同时检出针对核苷类和核苷酸类药物的多重耐药模式,抗病毒治疗模式均采用了序贯单药或联合用药策略,其中7例检出rtS202G+A181V+L180M+M204V。具体用药模式如下:模式①( $n=2$ ),初始接受了LAM单药治疗4个月,随后调整为阿德福韦酯(adefovir dipivoxil, ADV)单药治疗4个月,最终过渡至ADV+ETV治疗24个月;模式②( $n=3$ ),初始LAM单药治疗24个月,随后调整为ADV单药治疗24个月,最终转为ADV+ETV联合治疗,持续36个月;模式③( $n=1$ ),初始LAM单药治疗24个月,随后调整为ADV单药治疗24个月,继而转为ETV单药治疗24个月,最后调整为ADV+ETV联合治疗36个月;模式④( $n=1$ ),初始LAM单药治疗6个月,随后调整为ADV单药治疗12个月,最后调整为ETV单药治疗12个月。1例检出rtT184I/L+N236T+L180M+M204V,用药模式为初始LAM单药治疗4个月,随后调整为ADV单药治疗6个月,接着转化为LdT单药治疗12个月,最后调整为ETV单药持续治疗22个月。

**2.3 ETV耐药突变相关的NAs治疗模式** 在547例ETV耐药患者中,所有患者均接受过NAs治疗,治疗时间不短于1年,中位治疗时间为5年,最长达23年。ETV耐药突变主要见于经LAM和ETV治疗的患者,占86.5%(473/547),其中,LAM→ETV和LAM→ADV→ETV序贯治疗为最常见的治疗模式,分别占66.5%(364/547)和20.0%(109/547)。此外,ETV耐药突变亦见于ADV→ETV治疗(12.5%, 68/547)和单ETV(1.1%, 6/547)治疗的患者。

在LAM→ETV治疗的患者中,耐药突变模式是在rtL180M和rtM204V突变[检出率77.2%(281/364)]基础上同时伴有rtS202G突变(43.7%, 159/364)或rtT184A突变(13.2%, 48/364)为主要特征。对于接受LAM→ADV→ETV序贯治疗的患者,耐药突变模式是在rtL180M和rtM204V突变[检出率81.6%(83/109)]基础上同时伴随rtS202G突变(38.5%, 42/109)或rtT184L突变(19.3%, 21/109)为主要特征。

**2.4 ETV耐药突变的独立危险因素** 在ETV耐药突变的单因素logistics回归分析中,男性( $P=0.033$ )、年龄 $\geq 45$ 岁( $P<0.001$ )、ALT $\geq$ 正常值上限(upper limit of

**表2** 547例HBV感染患者HBV RT区ETV耐药突变模式及检测频率

**Tab.2** ETV-resistant mutational patterns of RT region and detection frequencies in 547 HBV-infected patients

ETV-r(例)	RT区ETV耐药突变模式(例)
rtS202 (253)	rtS202G+L180M+M204V (233)
	rtS202G+L180M+M204I (7)
	rtS202G+A181V+L180M+M204V (7)
	rtS202G+M204I (3)
	rtS202G+L180M+M204I/V (3)
	rtT184L+L180M+M204V (63)
	rtT184A+L180M+M204V (60)
	rtT184I+M204I (31)
rtT184 (179)	rtT184I/L+L180M+M204V (7)
	rtT184S+L180M+M204V (5)
	rtT184I+L180M+M204V (3)
	rtT184F+L180M+M204V (2)
	rtT184G+L180M+M204V (1)
	rtT184A/I+L180M+M204V (1)
	rtT184F/I/L+L180M+M204V (1)
	rtT184L+M204I (1)
	rtT184I/L+N236T+L180M+M204V (1)
	rtT184F/L/S+L180M+M204V (1)
	rtT184I+L180M+M204I/V (1)
	rtT184I/L+L180M+M204I/V (1)
rtM250 (57)	rtM250V+L180M+M204V (30)
	rtM250L+M204I (11)
	rtM250L+L180M+M204V (7)
	rtM250V+M204I (5)
	rtM250I+M204I (2)
	rtM250L+L180M+M204V/I (1)
	rtM250V+L180M+M204V/I (1)
	rtS202G+T184I+L180M+M204V (27)
rtS202+T184 (44)	rtS202G+T184I/L/P+L180M+M204V (8)
	rtS202G+T184A+L180M+M204V (5)
	rtS202G+T184L+L180M+M204V (3)
	rtS202G+T184A/I+L180M+M204V (1)
rtS202+M250 (4)	rtS202G+M250V+L180M+M204V (3)
	rtS202G+M250L+L180M+M204V (1)
rtT184+M250 (9)	rtT184A+M250V+L180M+M204V (2)
	rtT184I/L+M250V+L180M+M204V (3)
	rtT184L+M250V+L180M+M204V (3)
	rtT184I+M250L+M204I (1)
rtS202+T184+M250 (1)	rtS202G+T184I+M250L+L180M+M204V (1)

HBV. 乙型肝炎病毒; ETV. 恩替卡韦; RT. 反转录酶

normal, ULN,  $P<0.001$ )、HBsAg阳性( $P<0.001$ )、HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$  IU/ml( $P<0.001$ )、HBV基因型C型( $P=0.019$ )、肝硬化( $P<0.001$ )及既往LAM治疗史( $P<0.001$ )与ETV耐药突变风险明显相关;而血小板

(PLT) < 正常值下限 (lower limit of normal, LLN) ( $P=0.592$ )、AST $\geq$ ULN( $P=0.904$ )、TBIL $\geq$ ULN( $P=0.762$ )、HBsAg 阳性( $P=0.961$ )与 ETV 耐药突变风险无明显相关。

多因素 logistic 回归分析显示, 年龄 $\geq 45$ 岁 ( $P<0.001$ )、HBeAg 阳性 ( $P<0.001$ )、HBV DNA  $\geq 3.0 \log_{10}$  IU/ml( $P<0.001$ )、HBV 基因型 C 型( $P=0.041$ )、肝硬化( $P<0.001$ )和既往 LAM 治疗史( $P<0.001$ )是 ETV 耐药突变的重要危险因素(表 3)。

**2.5 ETV 耐药突变患者的挽救治疗及转归** 在 547 例 ETV 耐药突变患者中, 共 184 例(33.6%)存在完整的挽救治疗及随访数据(随访终点为治疗后 48 周, 病毒

学应答定义为 HBV DNA $<20$  IU/ml)。其治疗方案及转归具体为: (1)73 例换用 TDF+ETV 治疗, 58 例实现 48 周病毒学转阴, 15 例为持续低病毒血症(HBV DNA 20~2000 IU/ml); (2)64 例换用富马酸丙酚替诺福韦(TAF)+ETV 治疗, 51 例实现 48 周病毒学转阴, 13 例持续低病毒血症; (3)41 例由 TDF+ETV 方案调整为 TAF 单药治疗(因肾功能轻度异常或骨骼相关不良事件风险), 33 例实现 48 周病毒学转阴, 8 例为持续低病毒血症; (4)6 例采用 TAF+聚乙二醇干扰素 $\alpha$  (PEG IFN- $\alpha$ )治疗(均为年轻、HBeAg 阳性人群), 全部实现 48 周病毒学应答, 其中 2 例同时出现 HBeAg 血清学转换(表 4)。

**表 3** 慢性乙型肝炎病毒感染患者 ETV 耐药突变的危险因素分析

**Tab.3** Risk factor analysis for ETV-resistant mutations in patients with chronic hepatitis B infection

变量	单因素分析		多因素分析	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
男性	1.271(1.019~1.585)	0.033	1.302(0.974~1.744)	0.077
年龄 $\geq 45$ 岁	2.454(2.002~3.009)	$<0.001$	3.098(2.365~4.059)	$<0.001$
PLT $<$ LLN	1.075(0.826~1.398)	0.592		
ALT $\geq$ ULN	1.430(1.178~1.738)	$<0.001$	1.162(0.915~1.476)	0.218
AST $\geq$ ULN	0.988(0.808~1.207)	0.904		
TBIL $\geq$ ULN	0.970(0.797~1.181)	0.762		
HBsAg 阳性	-	0.961		
HBeAg 阳性	2.236(1.744~2.866)	$<0.001$	2.297(1.752~3.011)	$<0.001$
HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$ IU/mL	5.590(4.421~7.066)	$<0.001$	4.606(3.445~6.159)	$<0.001$
HBV 基因型 C 型	1.367(1.058~1.765)	0.019	1.298(1.011~1.666)	0.041
肝硬化	6.170(4.933~7.718)	$<0.001$	5.201(4.123~6.557)	$<0.001$
既往 LAM 治疗史	1.690(1.357~2.105)	$<0.001$	1.964(1.573~2.453)	$<0.001$

“-”表示 HBsAg 阳性为定性指标, 无对应数值分布。ETV. 恩替卡韦; PLT. 血小板; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; TBIL. 总胆红素; HBsAg. 乙型肝炎表面抗原; HBeAg. 乙型肝炎 e 抗原; LAM. 拉米夫定; LLN. 正常值下限; ULN. 正常值上限

**表 4** ETV 耐药患者挽救治疗方案及 48 周应答情况 [ $n=184$ , 例(%)]

**Tab.4** Rescue treatment regimen and 48-week outcome for ETV-resistant mutations [ $n=184$ ,  $n$ (%)]

治疗方案	病例	病毒学应答	持续低病毒血症
TDF+ETV	73(39.7)	58(79.5)	15(20.5)
TAF+ETV	64(34.8)	51(79.7)	13(20.3)
TDF+ETV $\rightarrow$ TAF	41(22.3)	33(80.5)	8(19.5)
TAF+PEG IFN- $\alpha$	6(3.3)	6(100)*	0

\*其中 2 例实现 HBeAg 血清学转换。ETV. 恩替卡韦; TDF. 富马酸替诺福韦二吡叻酯; TAF. 富马酸丙酚替诺福韦; PEG IFN- $\alpha$ . 聚乙二醇干扰素 $\alpha$

### 3 讨 论

目前, 越来越多的患者正成为乙肝抗病毒治疗优势人群, 在治疗过程中可实现持续的 HBV DNA

低于检测下限、HBeAg 血清学转换、HBsAg 水平降低及肝脏组织学炎症缓解, 从而降低肝硬化及肝癌的发生风险。自 2005 年在我国获批上市, ETV 因其强效抗病毒活性(HBV DNA 抑制率 $>90\%$ )、低耐药率(初治患者 5 年耐药率 $<1.2\%$ )和良好的安全性(包括儿童及合并肾功能不全的适用性), 已成为指南推荐的慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗一线药物的选择。然而, ETV 等 NAs 的抗病毒靶点是 HBV RT 区, 对 HBV 原始复制模板共价闭合环状 cccDNA 并无直接抑制作用, 需长期用药, 在药物和宿主免疫双重压力下 HBV 会产生耐药突变, 从而影响抗病毒疗效甚至疾病进展。ETV 耐药通过多重机制阻碍 HBV DNA 完全应答: 一方面直接削弱病毒抑制, 导致持续病毒血症, 增加病毒学突破风险; 另一方面破坏免疫重建, 延缓 HBsAg 血清学清除, 从而阻碍患者向功能性治愈的转化<sup>[9-10]</sup>。本课题组长期监测的耐药

数据显示,在接受HBV耐药突变检测的抗病毒治疗应答不佳的患者中,ETV耐药突变检出率已由2010年的3.4%(128/3800)上升至11.6%(547/4697)<sup>[4]</sup>;患者表现为病毒学突破和(或)肝炎反复,给临床治愈目标(HBsAg清除)的实现带来挑战。这一现象也提示,在实现“应治尽治”的同时,须重视治疗失败患者的耐药监测与管理。2023年7月,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)多学科专家咨询会议也指出,乙型肝炎病毒耐药(hepatitis B virus drug resistance, HBVDR)仍然是影响全球消除HBV目标的重要挑战<sup>[11]</sup>。如何优化现有的治疗方案、提高临床治愈率,仍是实现2030全球消除HBV目标亟待解决的关键科学问题。

慢性HBV耐药突变的模式演变对长期抗病毒治疗的成功构成了严峻挑战。本研究通过对4697例接受耐药检测的慢性HBV感染患者耐药突变形式的系统分析,揭示了ETV耐药突变模式的显著转变及其临床高危风险因素。本研究发现,在拉米夫定耐药(Lamivudine resistant, LAM-r)基础上的rtS202G突变(25.8%→55.2%)已超越既往报道的rtT184突变(61.7%→42.6%)<sup>[4]</sup>,成为当前ETV耐药的主要突变模式。既往本课题组分析解放军总医院第五医学中心2007—2009年耐药突变模式的研究发现,rtT184突变为ETV的优势突变株,在ETV耐药突变中占61.7%,而rtS202G突变占25.8%<sup>[4]</sup>。ETV这两种突变的占比差距到2016年几乎消失,即rtT184突变在ETV耐药突变中占比下降为38.5%,而rtS202G突变占比从25.8%上升到39.9%<sup>[12]</sup>。通过对近5年(2019—2024年)真实临床数据分析,以及回顾过去本团队的多项研究结果,笔者发现在17年的时间里,rtS202G突变逐步反超rtT184突变,成为ETV的耐药优势株。

从分子机制来看,rtS202G的耐药优势可能与其独特的“变构耐药”特性相关。相较于rtT184L等通过立体效应直接缩小ETV结合口袋的突变,rtS202G通过破坏T184-S202间及S202-M204间的氢键网络,引发酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(Tyrosine-Methionine-Aspartate-Aspartate, YMDD)环构象动态波动<sup>[13]</sup>。这种柔性构象变化在降低ETV结合稳定性的同时,避免了因刚性结构改变对病毒复制的抑制作用,从而赋予突变株更强的适应性优势。而耐药模式变化对于ETV治疗效果的影响,其中一项对来自4年ETV临床试验的511例患者分离株的耐药表型分析结果显示,以rtL180M+rtM204V为基础的rtS202G突变株的耐药倍数明显高于T184A/I/L/S等突变株<sup>[14]</sup>;而另一项针对6例ETV治疗失败患者的研究显示,合并rtS202G突变的突变株表现出>6000的耐药倍数<sup>[15]</sup>。此外,本研究观察到rtS202G与rtL180M、

rtM204V的协同突变率高达90.9%,该组合不仅增强病毒复制能力,还导致对LAM、LdT的交叉耐药,给挽救治疗带来了困难<sup>[16]</sup>。本研究对184例患者的随访结果提示,TDF/TAF+ETV或TAF+PEG IFN- $\alpha$ 方案对ETV耐药患者具有良好疗效,2例ETV耐药患者接受TAF+PEG IFN- $\alpha$ 治疗后,实现了HBV DNA检测不到且HBeAg血清学转换。但总体有20%的患者处于低病毒血症状态。本课题组前期一项307例抗病毒药物应答不佳患者的研究也显示,在治疗方案调整为TDF/ETV+TDF 48周后,挽救治疗成功率为82.7%<sup>[17]</sup>;而另一项针对所有类型ETV耐药患者进行48周TDF/TDF+ETV挽救治疗结果显示,病毒应答率仅为70%~74%,提示对于ETV耐药突变患者治疗方案优化的必要性和紧迫性<sup>[18]</sup>。

综合以上研究结果,随着ETV的广泛应用和治疗时间延长,病毒进化压力正推动耐药突变模式的适应性调整。本研究的多因素分析显示了ETV耐药突变发生的高危因素:肝硬化、HBeAg阳性及高病毒载量的独立作用,提示肝纤维化微环境与病毒高复制状态的协同效应可加速耐药突变的筛选。推测肝硬化患者因肝功能严重受损影响了抗病毒药物代谢和浓度分布,同时免疫系统功能障碍,宿主清除病毒能力下降;而肝硬化患者肠道屏障受损、内毒素入血加剧炎症反应,为病毒持续复制和ETV耐药变异发生提供了微环境<sup>[19]</sup>。而HBV基因型C型与耐药的关联可能与其流行病学特征相关:我国北方地区C基因型流行率高达80%~90%,且其复制调控元件的固有特性可能为耐药进化提供了便利<sup>[20]</sup>。值得注意的是,本研究发现LAM治疗史为耐药的风险因素,提示低耐药屏障药物的不规范序贯治疗也是不可忽视的风险来源,推测与药物上市时间和患者经济因素的影响有一定关系。笔者推测ETV突变的高检出率与我国LAM经治患者基数庞大密切相关:本研究中86.5%的ETV耐药患者存在LAM暴露史,其诱导的rtM204V/I突变通过降低ETV遗传屏障,使后续仅需单一新增突变(如rtS202、rtT184、rtM250)即可形成完全耐药表型。既往研究也显示,NAAs用药史可能通过共享耐药突变位点(resistance-associated polymorphisms, RAMs)影响后续耐药性的产生<sup>[21]</sup>。

本研究中多重耐药突变检出率为1.46%(8/547),包括7例rtS202G+A181V+L180M+M204V、1例rtT184I/L+N236T+L180M+M204V,相比于本课题组2021年一项大样本耐药数据研究的多重耐药检出率(0.81%,229/28236)明显增高<sup>[22]</sup>。此类ETV突变组合可通过多轮药物选择压力逐步累积,导致多重耐药,呈现“突变累积效应”<sup>[23]</sup>。

综上所述,本研究基于真实临床实践大样本耐药监测数据,系统阐明了2019—2024年ETV耐药突变的动态演变规律及其临床高危因素,为优化治疗策略提供了关键依据:(1)ETV耐药突变检出率为11.6%,主要发生于既往接受NAs序贯治疗的患者;(2)ETV耐药突变模式已发生显著演变,rtS202G位点突变(55.2%)已取代传统rtT184位点突变(42.6%)成为优势突变;(3)多因素分析明确年龄 $\geq 45$ 岁、HBeAg阳性、HBV DNA $\geq 3.0 \log_{10}$  IU/ml、HBV基因型C型、肝硬化及既往LAM治疗史为ETV耐药突变的独立危险因素;(4)以TDF/TAF为基础的挽救治疗方案对ETV耐药患者疗效确切,其中TAF+PEG IFN- $\alpha$ 方案可实现部分患者HBeAg血清学转换,为功能性治愈提供了可行路径;(5)长期不规范NAs序贯治疗可能增加多重耐药突变风险,本研究中多重耐药检出率为1.46%,需引起临床重视。本研究的局限性在于研究为回顾性设计,受限於外院诊疗信息难以完整获取,无法精确分析抗病毒治疗时长及基线ALT水平等关键变量对耐药风险的影响;也限制了耐药突变与肝病进展的因果关联分析的全面性。此外,宿主遗传因素对耐药风险的调控作用尚未纳入分析。未来需通过前瞻性队列追踪耐药突变的动态演变,并深入探索耐药突变的分子机制与宿主遗传调控网络,以开发基于ETV耐药基因型的精准干预策略及解析ETV关键突变分子的干扰机制,完善耐药风险评估体系,推动慢性乙型肝炎功能性治愈目标的实现。

#### 【参考文献】

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会,尤红,等.慢性乙型肝炎防治指南(2022年版)[J].中华临床感染病杂志,2022,15(6):401-427.
- [2] 庄辉.消除乙型肝炎进展[J].临床肝胆病杂志,2024,40(5):857-860.
- [3] Tang LSY, Covert E, Wilson E, *et al.* Chronic hepatitis B infection: a review[J]. JAMA, 2018, 319(17): 1802-1813.
- [4] 刘妍,李庆虹,李乐,等.慢性HBV感染患者恩替卡韦基因型耐药突变特征分析[J].解放军医学杂志,2010,35(6):621-624,628.
- [5] 王贵强,王福生,庄辉,等.慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J/OL].中国医学前沿杂志(电子版),2019,11(12):51-77.
- [6] Liu L, Liu Y, Chen R, *et al.* Prevalence of the entecavir-resistance-inducing mutation rtA186T in a large cohort of Chinese hepatitis B virus patients[J]. Antiviral Res, 2019, 164: 131-138.
- [7] Liu Y, Zhou Y, Li X, *et al.* Hepatitis B virus mutation pattern rtL180M+A181C+M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 354-365.
- [8] 王建军,纪冬,李乐,等.经治低水平病毒血症慢性乙型肝炎患者耐药突变的基因型特征[J].解放军医学杂志,2023,48(2):138-142.
- [9] Marlet J, Lier C, Roch E, *et al.* Evolution and phenotypic characterization of whole HBV genome in compliant patients experiencing unexplained entecavir treatment failure[J]. Antiviral Res, 2021, 192: 105106.
- [10] Im YR, Mohammed KS, Martyn E, *et al.* Social, clinical and biological barriers to hepatitis B virus suppression with nucleos(t)ide analogue therapy: who is at risk and what should we do about it?[J]. Sex Transm Infect, 2024, 100(5): 259-263.
- [11] Lumley SF, Mokaya J, Maponga TG, *et al.* Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogue therapy: WHO consultation on questions, challenges, and a roadmap for the field[J]. Lancet Microbe, 2025, 6(8): 101076.
- [12] 刘璐洁,刘妍,陈容娟,等.乙型肝炎病毒新型恩替卡韦耐药突变rtL180M+A186T+M204V的鉴定[J].解放军医学杂志,2019,44(3):197-202.
- [13] Walsh AW, Langley DR, Colonna RJ, *et al.* Mechanistic characterization and molecular modeling of hepatitis B virus polymerase resistance to entecavir[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9195.
- [14] Baldick CJ, Eggers BJ, Fang J, *et al.* Hepatitis B virus quasispecies susceptibility to entecavir confirms the relationship between genotypic resistance and patient virologic response[J]. J Hepatol, 2008, 48(6): 895-902.
- [15] Marlet J, Lier C, Roch E, *et al.* Revisiting HBV resistance to entecavir with a phenotypic approach[J]. Antiviral Res, 2020, 181: 104869.
- [16] Mokaya J, McNaughton AL, Bester PA, *et al.* Hepatitis B virus resistance to tenofovir: fact or fiction? A systematic literature review and structural analysis of drug resistance mechanisms[J]. Wellcome Open Res, 2020, 5: 151.
- [17] 贺梦雯,杨武才,王春艳,等.调整抗病毒治疗方案对慢性乙型肝炎低病毒血症患者预后的影响[J].临床肝胆病杂志,2025,41(6):1056-1061.
- [18] Shang J, Zhou J, Liu H, *et al.* Efficacy of different nucleoside analog rescue therapies for entecavir-resistant chronic hepatitis B patients [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 912.
- [19] Shen Y, Wu SD, Chen Y, *et al.* Alterations in gut microbiome and metabolomics in chronic hepatitis B infection-associated liver disease and their impact on peripheral immune response[J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2155018.
- [20] McNaughton AL, D'Arienzo V, Ansari MA, *et al.* Insights from deep sequencing of the HBV genome-unique, tiny, and misunderstood [J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 384-399.
- [21] 刘妍,徐东平.再谈乙型肝炎病毒反转录酶区/表面抗原区基因变异的临床发生特点及意义[J].解放军医学杂志,2018,43(5):361-366.
- [22] Liu Y, Chen R, Liu W, *et al.* Investigation of multidrug-resistance mutations of hepatitis B virus (HBV) in a large cohort of chronic HBV-infected patients with treatment of nucleoside/nucleotide analogs[J]. Antiviral Res, 2021, 189: 105058.
- [23] Park JH, Jung SW, Park NH, *et al.* Efficacy of tenofovir-based rescue therapy in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients with failure of lamivudine and adefovir combination[J]. Clin Ther, 2015, 37(7): 1433-1442.

(责任编辑:张小利)