

· 短篇论著 ·

### 3 例阿德福韦酯临床耐药患者血清乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列分析

闫杰 冯鑫 宋川 张剑平 王磊 王晶波 谢雯

抗乙型肝炎病毒(HBV)新药-阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)已于2005年经国家食品药品监督管理局(SFDA)批准在我国上市。临床研究表明,ADV能有效抑制HBV DNA复制,使HBV DNA滴度迅速降低<sup>[1-3]</sup>。但随着ADV的长期应用,目前已发现该药亦存在耐药现象。为了解临床耐药患者血清中HBV逆转录酶(reverse transcriptase, RT)基因变异情况,本研究采用PCR产物直接测序方法对此类患者体内HBV RT区基因序列进行分析。

#### 一、材料与方法

1. 研究对象:3份慢性乙型肝炎(CHB)患者血清取自济南市传染病医院就诊患者。3名患者均应用ADV治疗1年以上,治疗过程中曾出现HBV DNA低于检测下限,此后再次出现HBV DNA反跳。

2. 病毒DNA的抽提:采用异硫氰酸胍一步法提取血清中的DNA。待检血清50 μl中加入含4 mol/L异硫氰酸胍的裂解液60 μl,37℃温育10 min;加入酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)50 μl,震荡混匀后13 000 r/min离心10 min;取上清,加入等量异丙醇,-20℃沉淀2 h,13 000 r/min离心10 min,弃上清;加入60%乙醇50 μl,13 000 r/min离心10 min,弃上清,室温干燥后加入20 μl双蒸水溶解,-20℃保存。

3. 巢式PCR引物设计:检索GenBank收录的HBV基因全序,采用Primer Premier 5.0及Oligo 6.67软件辅助分析,于HBV RT区内设计巢式PCR引物,其中外引物:

P1:5'-CCTCACCCATATCGTCAA-3' (nt 105 ~ 122), P2:5'-GAGCCACAAAGGTTCCAC-3' (nt 1255 ~ 1238);内引物:P3:5'-GCACCGAACATG-GAGAAC-3' (nt 146 ~ 163), P4:5'-AGGCAGGATAGCCACATT-3' (nt 1051 ~ 1034)(引物由上海生工生物技术公司合成)。

4. 巢式PCR反应:30 μl PCR反应体系含TaKaRa Ex Taq™ DNA聚合酶(购自大连宝生物工程有限公司)1 U、10×扩增缓冲液3 μl、25 mol/L dNTP 0.12 μl、50 mol/L引物0.12 μl;第1轮PCR模板为血清抽提物6 μl,引物为P1、P2;第2轮PCR模板为第1轮PCR产物3 μl,引物为P3、P4。两轮PCR循环温度条件均

基金项目:北京市卫生局青年科学研究资助项目(QN2007-47)

作者单位:100011 北京,北京地坛医院(闫杰、冯鑫、宋川、张剑平、谢雯);济南市传染病医院(王磊、王晶波)

通讯作者:闫杰 Email:jieyan@bbn.cn

为 94℃ 3 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 30 循环, 72℃ 7 min。取第 2 轮 PCR 产物 8 μl, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于紫外灯下观察结果, 于 906 bp 处出现荧光条带者为阳性。

5. PCR 产物测序: 将第 2 轮 PCR 产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化后, 分别以 P3、P4 为测序引物, 应用双脱氧末端终止法进行序列测定(由上海生工生物技术公司完成)。

6. 序列分析: 选取 GenBank 中收录的 HBV 基因序列 250 条(均与核苷类药物治疗无关), 与 3 份标本测序结果一同进行核苷酸序列及氨基酸序列分析。序列分析应用 DNASTAR、Clustalx、GeneDoc 等分子生物学软件完成。

## 二、结果

3 份标本均成功测序, 测序结果已提交至 GenBank, 其序列号(accession number)分别为: DQ309328、DQ343155、DQ343156。HBV RT 区序列分析发现: 3 份标本均存在变异; 除检测到已知 ADV 变异位点(rtA181V、rtN236T)外, 尚发现两处既往未见报道的变异位点: rtA87E、rtA194V(表 1)。

表 1 经 ADV 治疗 12 个月后 HBV RT 区氨基酸变异情况

GenBank 号	氨基酸变异情况
DQ343155	rtA87E、rtA181V
DQ343156	rtA181V、rtA194V
DQ309328	rtN236T

**讨论** 随着 ADV 临床应用时间的延长, 与之相关的 HBV 耐药变异发生率亦逐年增多, 并且该类耐药变异的出现可能会导致严重的肝脏失代偿<sup>[5]</sup>, 因此监测 ADV 耐药变异对于患者预后的判断及进一步抗病毒治疗方案的选择意义重大。ADV 相关耐药变异位点 B 区 rtA181V 和 D 区 rtN236T 已得到学界公认<sup>[6]</sup>; 亦有研究显示, 位于 C、D 间区的 rtV214A 或 rtQ215S 及两点的联合变异也与此药耐药相关<sup>[7]</sup>; 新近发现在尚未开始抗病毒治疗的患者体内存在与阿德福韦酯耐药的 rtI233V 变异株<sup>[8]</sup>。我们通过对 3 例 ADV 临床耐药患者体内的 HBV RT 区基因序列进行分析, 发现其中 2 例存在 rtA181V 变异, 1 例存在 rtN236T 变异。此外尚发现两处既往未见报道的变异位点: rtA87E、rtA194V; 这两处变异是否与 ADV 临床耐药相关, 尚需在可控性良好的体外实验模型上进行药效学实验, 以明确其表型耐药情况。

HBV 存在准种状态, 随机克隆测序不适于研究抗病毒治疗前后的病毒基因序列变化, 应从准种中的优势种群的变异情况来阐明 HBV 基因的变化与临床病情间的相互关系<sup>[9]</sup>。故本研究采用 PCR 产物直接测序方法进行拉米夫定治疗后 HBV RT 区基因序列变异分析。该方法所获得的测序结果可代表患者体内某时点的 HBV 优势株, 故而具备治疗前后的可比性。为保证测序结果的可靠性, 在 PCR 及测序实验中均应用了具有 3'→5' 外切活性的高保真 DNA 聚合酶, 从而保

证了实验结果的可信性。

### 参 考 文 献

- 1 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2003,348:800-807.
- 2 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2003,348:808-816.
- 3 Schiff ER, Lai CL, Hadziyannis S, et al. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology*, 2003,38:1419-1427.
- 4 王小红,何忠平,庄辉,等. 乙型肝炎病毒聚合酶链反应基因分型法的建立及应用. *中华肝脏病杂志*,2003,11:310-311.
- 5 Fung SK, Andreone P, Han SH, et al. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol*, 2005,43: 937-943.
- 6 Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology*,2003,125: 292-297.
- 7 Yadav V, Chu CK. Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants; a molecular dynamics study. *Bioorg Med Chem Lett*,2004,14: 4313-4317.
- 8 Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med*, 2006,354: 1807-1812.
- 9 成军. 科学研究的设计和方法中的科学性. *世界华人消化杂志*,2004,12:1513-1516.

(收稿日期:2007-06-12)

(本文编辑:温少芳)