

• 临床经验 •

拉米夫定治疗中病毒核酸无应答患者体内乙型肝炎病毒逆转录酶基因变异分析

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 李蕴铷

闫杰, 冯鑫, 宋淑静, 谢雯, 李蕴铷, 北京地坛医院 北京市 100011
王磊, 山东大学医学院济南市传染病医院 山东省济南市 250021
首都医学发展科研基金, No. 2002-3046
山东省卫生厅计划项目, No. 2001CA1CAA11
项目负责人: 闫杰, 100011, 北京市安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院.
jiejyan@bbn.cn
电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540
收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 了解拉米夫定病毒核酸无应答与 HBV 逆转录酶基因变异之间的关系。

方法: 采用 PCR 产物直接测序方法对 3 例病毒核酸无应答患者体内 HBV RT 区基因序列治疗前后的变异情况进行分析。

结果: 治疗前后 6 份标本核苷酸变异率为 0.63-1.52%, 氨基酸变异率为 0.38-1.90%, 其中出现 rtY203H、rtS256C、rtL269I 变异的频率较高, 此外尚有 1 例出现 rtL180M 变异。

结论: 拉米夫定治疗中病毒核酸无应答可能与 HBV RT 区基因变异有关。

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 李蕴铷. 拉米夫定治疗中病毒核酸无应答患者体内乙型肝炎病毒逆转录酶基因变异分析. 世界华人消化杂志 2005;13(1):130-132

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/130.asp>

0 引言

拉米夫定是目前主流抗乙型肝炎病毒 (HBV) 药物之一, 在短期内可使 HBV DNA 水平下降, 但仍有部分患者出现病毒核酸无应答^[1]. 为了解拉米夫定病毒核酸无应答与 HBV 逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 基因变异有无关系, 我们采用 PCR 产物直接测序方法对病毒核酸无应答患者体内 HBV RT 区基因序列治疗前后的变异情况进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料 自北京地坛医院就诊的慢性 HBV 感染者中选取 3 例经拉米夫定治疗 12 mo 血清 DNA 始终阳性者作为

研究对象; 分别采集治疗前及治疗 12 mo 血清, 于 -70℃ 保存备用. 3 例患者均为男性, 年龄 19-51 岁, 临床诊断符合 2000 年第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[2]; 治疗方法为拉米夫定 (贺普丁, 由英国葛兰素公司生产) 100 mg, 每日 1 次; 每 2 mo 随访 1 次, 检测肝功能、HBV DNA 及 HBVM (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 的提取 采用异硫氰酸胍一步法提取血清中的 DNA. 待检血清 50 μL 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 g 离心 10 min; 取上清, 加入等量异丙醇, -20℃ 沉淀 2 h, 13 000 g 离心 10 min, 弃上清; 加入 600 mL/L 乙醇 50 μL, 13 000 g 离心 10 min, 弃上清, 室温干燥后加入 20 μL 双蒸水溶解, -20℃ 保存。

1.2.2 HBV 基因型检测 采用巢式 PCR 技术进行 HBV 基因型检测, 具体方法见参考文献 [3]。

1.2.3 HBV RT 区基因测序

1.2.3.1 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 Oli go 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' -CCTCACCACATATCGTCAA-3' (nt105-122), P2: 5' -GAGCCACAAAGGTTCCAC-3' (nt1255-1238); 内引物: P3: 5' -GCACCGAACATGGAGAAC-3' (nt146-163), P4: 5' -AGGCAGGATAGCCACATT-3' (nt1051-1034) (引物由上海生工生物技术公司合成)。

1.2.3.2 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) 1U、10 × 扩增缓冲液 3 μL、25 mol/L dNTP 0.12 μL、50 μmol/L 引物 0.12 μL; 第一轮 PCR 模板为血清抽提物 6 μL, 引物为 P1、P2; 第二轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物 3 μL, 引物为 P3、P4. 两轮 PCR 循环温度条件均为 94℃ 3 min, 94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 45 s, 共 30 循环, 72℃ 7 min. 取第二轮 PCR 产物 8 μL, 以

表 1 三例患者拉米夫定治疗前后临床资料

病例号	年龄 (岁)	治疗前					治疗 12 mo 后				
		ALT (IU/L)	Tbil (μmol/L)	HBeAg	Anti -HBe	HBV DNA (copies/L)	ALT (IU/L)	Tbil (μmol/L)	HBeAg	Anti -HBe	HBV DNA (copies/L)
216	20	108	20	+	-	3.6×10^{10}	33	20	+	-	8.1×10^9
393	51	65	14	+	-	8.1×10^{11}	26	42	+	-	3.4×10^9
506	19	62	12	+	-	2.3×10^{12}	46	18	+	-	2.9×10^{10}

10 g/L 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。

1.2.3.3 PCR 产物测序 将第二轮 PCR 产物经 10 g/L 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 (由北京鼎国生物技术有限公司完成)。

1.2.3.4 序列分析 基因型检测结果显示各标本均为 C 型, 故选取 GenBank 中收录的 HBV C 型基因序列 50 条 (均与拉米夫定治疗无关), 生成共享序列 (consensus); 并从中随机选取 6 条 (AB014378、AF223960、AF068756、D23683、AB014389、AF458664) 与 6 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。

2 结果

2.1 巢式 PCR 产物电泳结果 阳性标本 PCR 产物大小与预期值相符, 为 906 bp (图 1)。

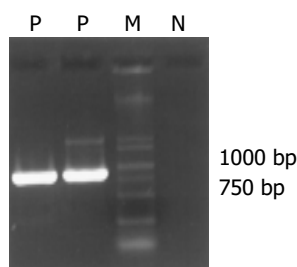


图 1 PCR 产物电泳结果. P: 阳性标本; N: 空白对照; M: DGL2000 DNA Marker.

2.2 HBV RT 区测序结果 3 例患者治疗前及治疗 12 mo 时共 6 份标本均成功测序, 有效序列长度为 786 bp (nt217-1002). 测序结果已提交至 GenBank, 其序列号 (accession number) 分别为: AY762897, AY762898, AY762899,

表 2 各序列与 consensus 间的变异率

	核苷酸序列(%)	氨基酸序列(%)
AB014378	1.65	1.52
AF223960	2.67	3.43
AF068756	1.65	0.76
D23683	1.39	1.14
AB014389	1.52	2.67
AF458664	1.01	1.52
216 ²	1.27	1.14
216 ¹	0.76	0.76
393 ²	1.27	2.29
393 ¹	0.63	0.76
506 ²	0.89	0.38
506 ¹	1.52	1.90

¹ 拉米夫定治疗 12 mo 后; ² 拉米夫定治疗前。

AY762900, AY762901, AY762902.

2.3 HBV RT 区序列分析 6 份标本核苷酸变异率为 0.63-1.52%, 氨基酸变异率为 0.38-1.90%, 较既往 GenBank 中收录的 HBV C 型基因序列的变异率无明显差别 (1.01-2.67%, 0.76-3.43%) (表 2). 但进一步分析拉米夫定治疗前后 HBV RT 区氨基酸变异情况发现: 变异集中在逆转录酶第 269, 256, 203 氨基酸位点上, 此外尚有一例出现 rtL180M 变异 (表 3)。

表 3 经拉米夫定治疗 12 mo 后 HBV RT 区氨基酸变异情况

病例号	氨基酸位置	核苷酸变异	氨基酸变异
216	30	GTT → TTT	V → F
	269	ATC → CTC	I → L
393	37	AGC → ACC	S → T
	180	CTG → ATG	L → M
	189	TTA → TCA	L → S
	203	CAT → TAT	H → Y
	256	TGT → AGT	C → S
	269	ATC → CTC	I → L
506	164	CTG → ATG	L → M
	203	TAT → CAT	Y → H
	256	AGT → TGT	S → C
	269	CTC → ATC	L → I

3 讨论

作为有效的抗 HBV 药物, 拉米夫定治疗 12 mo 时的 HBV DNA 阴转率约为 80%^[4], 仍有部分患者表现为病毒核酸无应答^[1]. 既往研究多聚焦在拉米夫定耐药与 HBV P 区变异间的关系, 鲜有关于拉米夫定治疗中病毒核酸无应答患者体内乙型肝炎病毒基因变异状况的报道. 但曾有研究揭示 HBV C 区基因变异可能与干扰素治疗无应答有关^[5], HBV P 区 V555I 变异多出现在泛昔洛韦初治无应答患者体内^[6]. 为解拉米夫定病毒核酸无应答与 HBV RT 区变异有无关系, 本研究采用 PCR 产物直接测序方法对病毒核酸无应答患者体内 HBV RT 区基因序列治疗前后的变异情况进行了分析. 除检测到 rtL180M 这一常见拉米夫定耐药变异外, 尚发现病毒核酸无应答患者体内 HBV RT 区出现 rtY203H、rtS256C、rtL269I 变异的频率较高. 进一步检索 GenBank 发现 rtL269I 在以往发表序列中亦较多见, 说明该位点保守性较差, 可能对逆转录酶活性影响不大; 但未检索到其他位点变异. 上述变异位点均在 HBV 逆转录酶活性区域内, 也是拉米夫定抑制 HBV 复制的关键部位, 因此有必要进行体外实验研究, 以进一步明确上述变异对拉米夫定的药代动力学和药效学的影响. 再者, 本研究样本量较小且 PCR 产物直接测序花费较大, 故尚应设计更为经济、有效的检测方法以进行大样本研究, 进一步明确与病毒核酸无应答相关的关键变异位点。

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^[7]. 故本研究采用 PCR 产物直接测序方法进行拉米夫定治疗前后 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.

4 参考文献

- 1 拉米夫定临床应用专家组. 2004 年拉米夫定临床应用专家共识. 中华肝脏病杂志 2004;12:425-428
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 3 王小红, 何忠平, 庄辉, 阎杰, 董庆鸣, 宋淑静. 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
- 4 姚光弼, 崔振宇, 姚集鲁, 张定凤, 籍纳新, 黄瑛. 国产拉米夫定治疗 2200 例慢性乙型肝炎的 IV 期临床试验. 中华肝脏病杂志 2003;11:103-108
- 5 Yoo BC, Kim HJ, Do JH, Park SM. Relationship between core gene mutations of hepatitis B virus and response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis B. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8:381-388
- 6 Gunther S, von Breunig F, Santantonio T, Jung MC, Gaeta GB, Fischer L, Sterneck M, Will H. Absence of mutations in the YMDD motif/B region of the hepatitis B virus polymerase in famciclovir therapy failure. *J Hepatol* 1999;30:749-754
- 7 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

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

局部切除术治疗低位直肠癌 125 例

冯国光, 吕 强, 杨志强

冯国光, 吕强, 杨志强, 上海公利医院普外科 上海市 200135
项目负责人: 冯国光, 200135, 上海市浦东新区苗圃路 219 号, 上海公利医院普外科. fgg-qg@163.com
电话: 021-28802046
收稿日期: 2003-07-10 接受日期: 2003-07-29

摘要

目的: 局部切除术治疗低位直肠癌指征和疗效评估.

方法: 回顾性分析经局部切除术治疗和病理证实的低位直肠癌患者 125 例.

结果: 125 例局部切除术中, 属根治性切除 112 例(89.6%), 姑息性切除 13 例. 无手术死亡及严重术后并发症. 获随访 111 例(88.8%). 98 例早期癌及类癌患者中 93 例(94.9%)术后生存 > 5a, 5 例术后至今已 4a 仍健在; 13 例中、晚期癌患者术后生存 2-4 a. 98 例早期癌及类癌患者中局部复发 5 例(5.1%), 距手术间隔期为 1.5-2a; 其中再次行 Dixon 术 2 例, 改良 Bacon 术 1 例, Miles 术 1 例, 局部扩大全层切除术加术后放疗 1 例.

结论: 对经仔细选择的早期低位直肠癌局部切除术是一种安全而有效的治疗方法; 对中、晚期癌患者因年迈体弱或兼有其他脏器严重并发症不能耐受经腹手术亦可行局部切除术, 并辅以化疗、放疗等综合治疗措施以缓解症状、延长患者生命.

冯国光, 吕强, 杨志强. 局部切除术治疗低位直肠癌 125 例. 世界华人消化杂志 2005;13(1):132-134
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/132.asp>

0 引言

直肠癌是常见恶性肿瘤之一. 我国直肠癌好发于腹膜返折以下的低位, 约占 3/4. 传统的治疗方法是直肠经腹前切除术或腹会阴联合切除术. 近年来局部切除术治疗低位直肠癌日益受到人们重视. 我们回顾性分析了 125 例经局部切除术治疗和病理证实的低位直肠癌临床资料, 对局部切除术的临床应用指征及疗效作一评估, 报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1954-01/2000-06 上海公利医院和瑞金医院共局部切除术治疗 125 例低位直肠癌, 材料均经病理检查证实, 其中男 60 例, 女 65 例, 年龄 22-85 岁, 平均(53 ± 8 岁). 肿瘤距肛缘 7 cm 9 例, 6 cm 23 例, 5 cm 58 例, 4 cm 35 例. 肿瘤直径: >2-3 cm 18 例, 1-2 cm 91 例, <1 cm 16 例.

1.2 方法 肿瘤大体类型: 肿块型 113 例(包括类癌 42 例), 溃疡型 11 例, 浸润型 1 例; 组织学分类: 腺癌 75 例, 黏液癌 5 例, 鳞癌 3 例, 类癌 42 例; 恶性度(Broders 法分级): I 级 105 例, II 级 20 例. Dukes 中国改良法分期: A0 期和 A1 期 112 例(包括 42 例类癌), A2 期 3 例, B 期 5 例, C 期 5 例.