

HBV YMDD 돌연변이형 검사 시 염기서열법과 Restriction Fragment Mass Polymorphism 법의 비교

의료법인 삼광의료재단¹, 서울보건대학 임상병리과²

정안나¹ · 정희경¹ · 최삼규¹ · 박정오²

The Comparison of Sequencing Method with Restriction Fragment Mass Polymorphism Method for the Detection of HBV YMDD Mutants

An-Na Jung¹, Hee-Kyoung Jung¹, Sam-Kyu Choi¹, and Chung-Oh Park²

Samkwang Medical Laboratories, Seoul 137-887, Korea¹

Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Sungham 461-713, Korea²

YMDD motif mutants of the hepatitis B virus(HBV) emerge in chronic hepatitis B patients after prolonged lamivudine treatment. HBV DNA breakthrough may be accompanied by the emergence of YMDD mutants. We compared the performance of the sequencing method with that of RFMP method in chronic hepatitis B patients who had suffered the HBV DNA breakthrough after lamivudine treatment. Both sequencing and RFMP methods were used to detect YMDD variants in 20 chronic hepatitis B patients. YMDD mutants were detected in 17 samples (85.0%) by both methods. Among them, no mutants were detected in two samples(10.0%), while they were detected in the other sample(5.0%) with the RFMP method. The concordance rate between both methods was 95.0%. There was inconsistency in one sample showing mutants detected by the RFMP method, but not by sequencing method. In the sequencing method, the mutants was detected in the major type virus, but not in the minor type virus. However, both sequencing and RFMP methods were highly concordant except in one sample, so it is suggested that both methods are useful to detect YMDD mutants of chronic hepatitis B patients.

Key Words : HBV YMDD, Lamivudine, Restriction fragment mass polymorphism (RFMP), Sequencing

I. 서 론

만성간염은 HBsAg(B형 간염바이러스 표면항원)이 양성이고 6개월 이상 간염이 지속될 때를 말하며 B형 간염 바이러스가 대부분을 차지한다. 국내의 만성간염 보유율은 5-8%이고, 간세포암은 위암에 이어 많이 발생하는 질환이다.

또한 조직학적 소견에 따라 만성 지속성 간염, 소엽성 간염 및 활동성 간염으로 나누고 최근 질환의 활성도와 병기에 따른 새로운 분류도 사용되고 있다.

만성 B형 간염 치료법으로는 안정, 식이요법 및 간장 보호제에 의존하였으나 인터페론이 소개되어 수년간 인터페론이 만성 간염의 치료제로서 널리 사용되어 왔다.

그러나 인터페론 치료는 e항원 음전율이 25-50% 밖에 되지 않고, 장기간 주사를 맞는 번거로움이 있으며 서양인보다 동양인이 인터페론 치료율이 낮은 것으로 알려져

교신저자 : 정안나, (우) 137-887 서울시 서초구 양재동 9-60 삼광의료재단
Tel : 017-718-4576
E.mail : annaj@smlab.co.kr

보다 효과적인 약물의 출현이 요구되어져 최근 경구용 항바이러스제인 라미부딘(Lamivudine)이 B형 간염 치료제로 사용하게 되었다.

라미부딘은 뉴클레오사이드 유도체로 간세포내에서 HBV DNA 중합효소의 역전사기능으로 DNA 합성을 방해하여 바이러스의 증식을 억제하는 약제로서 (Karayiannis, 2003), 경구요법이 가능하고 치료 후 조직학적, 미생물학적 및 생화학적 소견의 개선 정도가 우수하여 만성 활동성 B형 간염의 일차 치료약제로 사용되고 있으며(Lai 등, 1998; Dienstag 등, 1999; Lok 등, 2003), 국내 및 외국문헌에서도 부작용이 경미하고 B형 간염바이러스 증식 억제 효과가 탁월한 것으로 보고되었다(Mailliard와 Gollan, 2003). 그러나 라미부딘은 장기 투여시 YMDD(thyrosine methionine aspartate amino acid) 변이형이 발생하여 약제 내성이 생기고(Lai 등, 1998; Dienstag 등, 1999; Lok 등, 2003), 약 12개월간 투여시 90% 이상에서 혈청 HBV DNA가 검출되지 않고, HBeAg는 15-45%가 소실된다. 더불어 라미부딘 중단 후 재발이 많이 발생하여 라미부딘에 대한 내성이 있는 B형 간염바이러스 변이종이 10-15%로 나타나는 등의 문제점이 제기되고 있다(Nafa 등, 2000; 손용학 등, 2003).

따라서 라미부딘 치료로 HBV DNA가 현저히 감소했다가 다시 높은 수준으로 검출되는 경우는 YMDD 변이형의 출현을 의심하게 되어 내성 검사를 실시하여 치료를 해야 한다(Perrillo 등, 2003)

이에 본 논문에서는 만성간염환자의 라미부딘 장기 복용시 HBV YMDD 돌연변이를 검출하기위해 최근 염기서열법(Allen 등, 1998)과 RFMP(Rrestriction Fragment Mass Polymorphism)법(Kim 등, 2003; Gut, 2004)이 이용되어짐에 따라 두 검사법간의 유용성을 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 검사실로 의뢰된 20검체로 염기서열법과 RFMP법을 이용하여 HBV YMDD 돌연변이를 검출하였다.

2. 방법

1) 염기서열법

검체로부터 HBV DNA를 1시간 추출하고 PCR target

gene을 4시간 증폭 시킨 후 30분간 전기영동하여 band를 확인하였다. 그 다음 1시간 PCR purification하고 다시 30분간 전기영동하여 sample 농도를 확인하고 3-4시간 정도 sequencing reaction하고 20시간 ethanol down 처리하여 ABI 3730XL capillary DNA Sequencing(ABI, USA) 기기로 분석한 후 Seq Man software로 결과 분석하였다. Sequencing method에 의하여 분석한 결과가 Fig.1㉠ 처럼 코돈 528번 CTG(Leu)과 코돈 552번 ATG(Met)들의 염기서열 변이가 없는 검체를 라미부딘에 의하여 내성이 없는 것으로 판정하였다.

2) RFMP(Restriction Fragment Mass Polymorphism) 법

HBV 유전자의 YMDD motif의 특수 시발체(primer)를 이용하여 중합연쇄반응(PCR) 후, 해당 제한효소로 절단하게 되면, YMDD motif에 출현하는 돌연변이의 종류에 따라 특정 질량을 가지게 되고 이에 얻어진 각 질량 값을 이미 알려진 유전자형의 질량과 비교하여 유전자형을 분석하였다. RFMP 법에 의하여 분석한 결과가 Fig. 1㉡와 같이 코돈 528번 CTG (2102.4/4097.6)와 코돈 552번 ATG (2199.4/3997.6)들의 염기서열 변이가 없는 검체를 라미부딘에 의하여 내성이 없는 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

돌연변이형을 염기서열법에 의하여 분석한 결과 Fig. 2 ㉠와 같이 코돈 528번 CTG(Leu) ATG (Met)와 CTG (Leu)로 공존하고 있고 코돈 552번 ATG(Met)은 ATG (Met), ATT (Ile) 그리고 GTG (Val)로 공존하고 있었다. 코돈 540번 CGT (Arg)가 CGC (Arg)로 변이되었고 코돈 547번 GTG (Val)이 TTG (Leu)로 변이된 것은 내성과 상관 없는 silent mutation이다. 또 RFMP method에 의하여 분석한 결과 Fig. 2와 같이 코돈 528번 CTG (2102.4/4097.6)은 CTG(2102.4/4097.6)과 ATG (2126.4/4072.6)으로 공존하고 있으며 코돈 552번 ATG (2199.4/3997.6)은 ATG(2199.4/3997.6), ATT (2199.4/4021.6), 그리고 GTG (2215.4/3982.6)로 공존하고 있었다.

검사 분석한 20건 중 돌연변이형은 15건(75.0%)이었고, 돌연변이형별은 염기서열분석법과 RFMP법이 모두 일치하였고 돌연변이를 일으키지 않은 검체는 2건(10.0%)이었고, 나머지 1건(5.0%)은 염기서열법에서는 돌

Table 1. Results of YMDD motif of sequencing method and RFMP method in chronic hepatitis B patients

No	Sequencing method		RFMP method	
	DNA breakthrough	Mutant	DNA breakthrough	Mutant
1	M552I	Positive	M552I	Positive
2	M552I	Positive	M552I	Positive
3	M552I, L528M	Positive	M552I	Positive
4		Negative		Negative
5	M552I	Positive	M552I	Positive
6	M552V	Positive	M552V	Positive
7	M552I	Positive	M552I	Positive
8	L528M	Positive	L528M	Positive
9	M552I	Positive	M552I	Positive
10	M552I, L528M	Positive	M552I, M552V, L528M	Positive
11	M552V, L528M	Positive	M552V, L528M	Positive
12		Negative	M552I	Positive
13	M552V	Positive	M552V	Positive
14		Negative		Negative
15	M552I	Positive	M552I	Positive
16	M552V, L528M	Positive	M552V, L528M	Positive
17	M552V	Positive	M552V	Positive
18	M552V	Positive	M552V	Positive
19	M552V, L528M	Positive	M552V, L528M	Positive
20	M552I	Positive	M552I	Positive

연변이가 확인되지 않았으나 RFMP법에서는 돌연변이가 확인되었다(Table 1).

돌연변이형 중 552번 아미노산 위치에서 methionine이 valine으로 치환되는 M552L 변이가 염기서열법에서는 7건, RFMP법에서는 8건, isoleucine으로 치환되는 M552I 변이는 염기서열법에서는 9건, RFMP법에서는 10건이 나타났고, 528번 아미노산 위치에서 leucine이 methionine으로 치환되는 L528M 변이는 염기서열법에서는 6건, RFMP법에서는 5건이 나타났다.

또한 돌연변이형 중 528번 아미노산 위치에서 leucine이 methionine으로 치환되는 L528M 변이가 염기서열법에서는 나타났지만 RFMP법에서는 나타나지 않은 검체가 1건이 있었고, 552번 아미노산 위치에서 methionine이 valine으로 치환되는 M552L 변이가 염기서열법에서는 나타나지 않았지만 RFMP법에서는 나타난 검체가 1건이 있었다.

그리고 염기서열법에서는 돌연변이가 일어나지 않았지만 RFMP법에서 552번 아미노산 위치에서 methionine이 valine으로 치환되는 M552L 변이가 나타난 검체가 1건이

있었다.

라미부딘은 경구용 항바이러스제로 원래는 에이즈 환자에 사용되던 약이지만 B형 간염 바이러스에도 효능이 있다고 알려지면서 사용하게 되었다. 하지만 장기간 투여 시 약제 내성 HBV 변이형의 출현이 나타나고 라미부딘 약제 내성은 1년간 라미부딘 치료를 받은 환자의 14-32% 정도에서 발생하며(Lai 등, 1998) 치료기간이 길수록 YMDD 변이형의 발생률이 높아진다고 알려져 있다. 외국 보고에서는 임상적 내성의 90% 이상에서 YMDD 변이가 보고되고 있지만(Allen 등, 1998), 염기서열법과 RFMP법을 이용한 우리나라의 다른 보고에서도 내성환자 중 73%에서만 YMDD 변이형이 관찰되었다(김선숙 등, 2002)

IV. 결 론

만성 B형 간염환자의 라미부딘 장기 투여로 인한 HBV YMDD 돌연변이형 검출 시 염기서열법과 RFMP법의 결과의 일치도는 95.0%로 나타났으며, 1건의 불일치건은

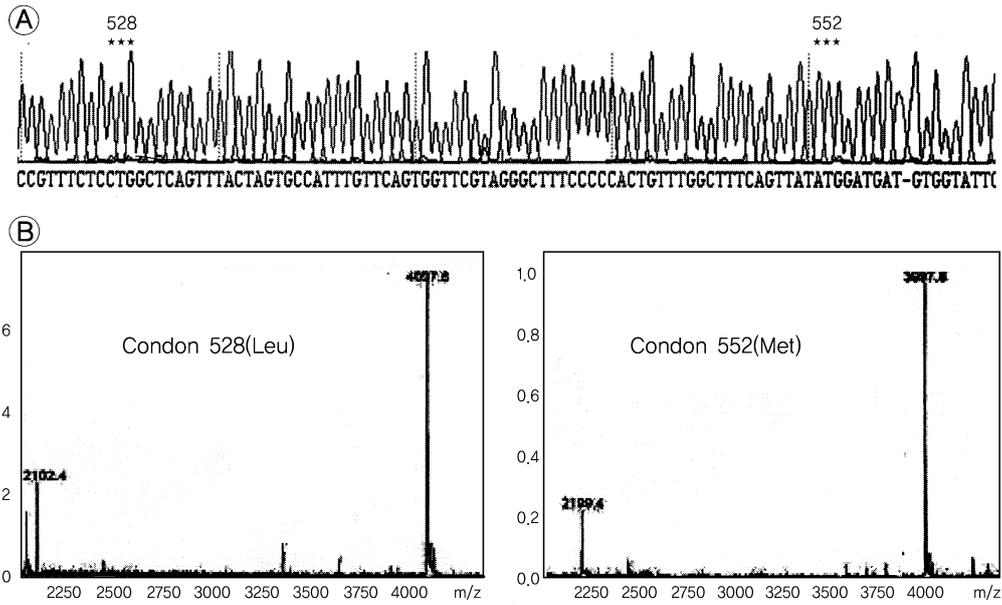


Fig. 1. The negative YMDD mutants in samples were detected by sequencing(A) and RFMP method(B).

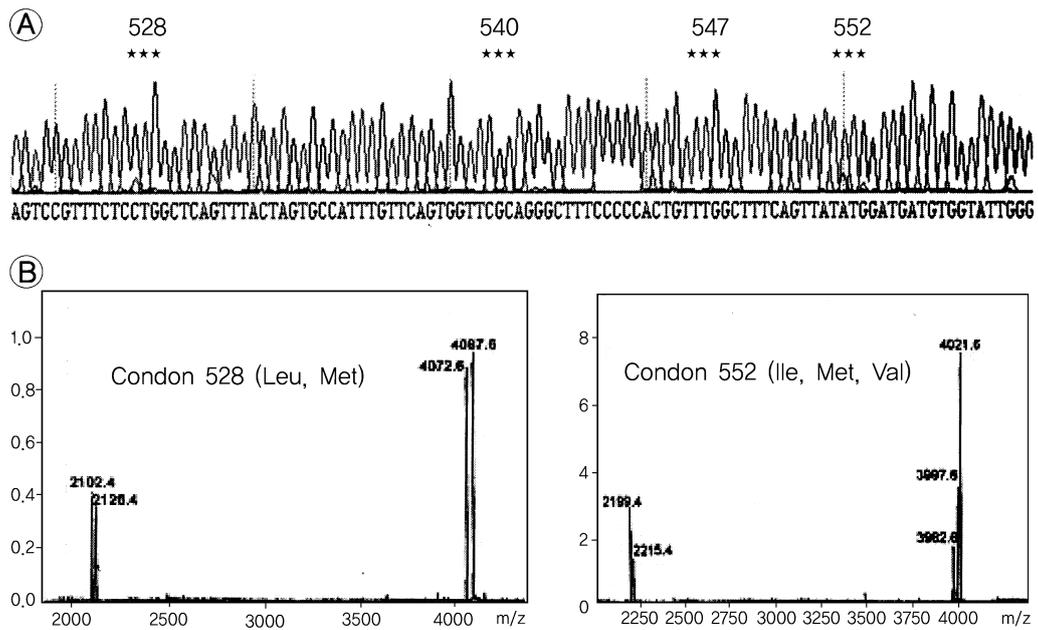


Fig. 2. The negative YMDD mutants in samples were detected by sequencing(A) and RFMP method(B).

염기서열법이 바이러스 중에서 major type은 검출되나 그 양이 적은 minor type에서는 검출이 불가능하여 일치되지 않은 것으로 사료된다. 이에 더 많은 검체를 이용하여 두

방법간의 유용성을 비교 검토하는 것이 바람직하며 두 방법 모두 HBV YMDD 돌연변이형 검출에 유용한 검사 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine clinical investigation group. *Hepatology* 27:1670-1677,1998.
2. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 34:1256-1263, 1999.
3. Gut IG. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat* 23:437-441, 2004.
4. Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 51:761-85, 2003.
5. Kim NK, Hwan SG, Hong SP, Rhee HS, Chung HJ, Kim S, et al. Novel mass spectrometric assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Korean J Genet* 25:63-75,2003.
6. Lai CL, Chien R, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis lamivudine Study group. *N Engl J Med* 339:61-68, 1998.
7. Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 125:1714-1722, 2003.
8. Mailliar ME and Gollan JL, Suppressing hepatitis B without resistance-so far, so good. *N Engl J Med* 348:848-850, 2003.
9. Nafa S, Ahmed S, Tavan D, Pichoud C, Berby F, Stuyver L, Johnson M, et al Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 32:1078-1088, 2000.
10. Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* 32:129-134, 2003.
11. 김선숙, 정문기, 주기탁, 박동균, 권오상, 구양서 등. 만성 B형 간질환에서 라미부딘 내성의임상적, 바이러스적 특성. *대한간학회지* 8:405-417, 2002.
12. 손용학, 차충환, 장성수, 이한주, 이관제, 신은순 등. 염기서열분석을 이용한 HBV YMDD 돌연변이검출. *대한진단검사의학회지* 23:292-297, 2003.