

于药物不易进入所致,而可能主要与细胞-细胞或细胞-基质的相互作用所致的整个细胞群体的耐药表型改变有关^[2-5].我们研究发现当肿瘤细胞与基质成分FN结合后,其耐药性较单层培养明显增加,进一步证实了细胞黏附在肿瘤耐药中的作用.细胞黏附由几个黏附分子家族所介导(包括选择素家族、CD44家族、整合素家族、钙粘素家族等),已证明这些黏附分子与细胞间和细胞内信号传导有关,并可通过对细胞周期和凋亡的调控,影响对治疗的反应.已知许多抗癌药物可通过诱导癌细胞凋亡而达到抗癌作用,所以细胞凋亡能力可直接影响抗癌药物的效应^[6-7].我们发现,HT29细胞与FN结合后,其Bax蛋白表达增加,而Bcl-2蛋白表达下降,细胞凋亡减少,提示肿瘤细胞与基质的结合,可能通过上调Bax和下调Bcl-2基因的表达,使致肿瘤细胞的抗凋亡能力增强,从而增加细胞的耐药性.

肿瘤本身作为一个整体具有与其单个癌细胞不同的特性.然而目前许多治疗药物的筛选和临床前研究仍采用的是单层培养系统(保持的基本上仍是单个细胞的特性),而忽略了细胞间的相互作用.要想成功治疗肿瘤(特别是实体瘤),肿瘤的这种特性必须予以重视.我们应用 β -1整合素抗体阻断细胞与基质的结合,发现A

549-ADR细胞凋亡增加,同时也增加了肿瘤细胞对药物的敏感性.因此针对破坏细胞黏附的手段与化疗药联合应用,将可能成为化疗增敏或逆转耐药的一个新的策略.

4 参考文献

- 1 梁后杰, 黄海辉. 细胞黏附与肿瘤多细胞耐药. 第三军医大学学报 2002;24:1257-1258
- 2 Rasey JS, Cornwell MM, Maurer BJ, Boyles DJ, Hofstrand P, Chin L, Cervený C. Growth and radiation response of cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-GTM). *Br J Cancer* 1996;74(Suppl):S78-S81
- 3 Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of bcl-X_L and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:18-25
- 4 Han EKH, Tahir SK, Cherian SP, Collins N, Ng SC. Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;83:83-88
- 5 Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 2000;60:2497-2503
- 6 Ogiso Y, Tomida A, Lei S, Omura S, Tsuruo T. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res* 2000;60:2429-2437
- 7 Ramp U, Dejosez M, Mahotka C, Czarnotta B, Kalinski T, Wenzel M, Lorenz I, Muller M, Krammer P, Gabbert HE, Gerharz CD. Deficient activation of CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2000;82:1851-1859

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

河南抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者病毒前 C 区 1896 位点的突变及临床意义

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所 河南省郑州市 450052
项目负责人: 汲振余, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所. jizhenyu@zzu.edu.cn
电话: 0371-6912691 传真: 0371-6912679
收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-13

摘要

目的: 了解抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区 1896 位点的突变状况.

方法: 应用 3' 碱基特异聚合酶链反应(3' BS-PCR)结合 PCR 产物直接测序法检测前 C 区热点突变.

结果: 72 例抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区 1896 位点突变检出率为 34.7%; 慢性肝炎重度患者 19 例检出 8 例单纯突变株感染, 其检出率显著高于慢性肝炎轻度组 ($P < 0.05$); 慢性肝炎重度组总突变率(47.4%)亦显著高于慢性

肝炎轻度组(17.4%) ($P < 0.05$); 16 例患者经测序发现有 1 例存在前 C 1899 位点 G → A 点突变.

结论: 河南地区抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者存在一定比例的病毒变异株; HBV 前 C 区 1896 位点的变异与慢性肝炎进展程度相关.

汲振余, 陈茜, 陈洪涛, 朱金凤. 河南抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者病毒前 C 区 1896 位点的突变及临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1944-1946
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1944.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染和复制与乙型肝炎慢性化、肝硬化和肝癌发生密切相关^[1-2]. 在慢性 HBV 感染的患者中常有不少病例表现为 HBeAg 阴性、抗-HBe 阳性、而 HBV DNA 阳性, 表明病毒仍复制活跃, 此类

患者病变可持续活动,甚至发展为重症肝炎^[3].很多资料显示该类型患者HBV DNA前C区存在变异^[4-5].我们应用3'碱基特异聚合酶链反应(3'BS-PCR)结合PCR产物直接测序法,对72例抗-HBe阳性、HBV DNA阳性患者所携带的HBV前C基因区进行变异分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1999-05/2001-10我所抗-HBe阳性慢性乙型肝炎72例.其中男52例,女20例,年龄22-63岁;慢性肝炎轻度(CMiH)23例,慢性肝炎中度(CMoH)30例,慢性肝炎重度(CSH)19例.诊断参照1995年修订的病毒性肝炎诊断标准.无其他类型肝炎病毒重叠感染,PCR-HBV DNA全部为阳性,使用华美生物工程公司PCR试剂盒,扩增仪为英国Genius.采用ELISA法检测患者血清HBV Markers,所有病例HBeAg均为阴性,试剂盒为潍坊3V公司生产.

1.2 方法 3'BS-PCR扩增根据参考文献[2,6]设计三条PCR引物:P₁(1 879-1 896)5'-GTG CCT TGG GTG GCT TTG-3';P₂(1 879-1 896)5'-GTG CCT TGG GTG GCT TTA-3';P₃(2 235-2 253)5'-TAC TCA AGA ACA GTT TCT C-3',由北京赛百盛公司合成.其中引物P₁3'末端碱基为野生型(G),引物P₂3'末端碱基为突变型(A).引物P₃分别与引物P₁和引物P₂配对扩增,产物长度为375 bp.样品DNA提取方法按文献[7]进行.扩增方法:50 μL的3'BS-PCR反应体系中包括各20 pmol的引物P₁(或P₂)和引物P₃,1.5 mmol/L MgCl₂,50 μmol/L dNTP,5 μL提取的HBV DNA模板,1.5 U Taq酶.于PCR仪中94℃预变性2 min后,按94℃40 s,61℃30 s,72℃1 min循环30次,最后72℃延伸5 min.反应产物在15 g/L琼脂糖凝胶中电泳,以pUC19 DNA/MspI(Hpa II) Marker作为参照,溴乙锭染色,紫外灯下观察,出现375 bp长度的片段者为扩增的靶序列产物.序列分析则根据已发表的乙型肝炎病毒基因序列(adr亚型),在病毒基因前C区1896位点的上游和下游各设计一条引物,其核苷酸序列分别为:上游引物P₄(1 695-1 715)5'-CTT GAA GCA TAC TTC AAA GGA-3';下游引物P₅(1 955-1 975)5'-CGG AAA GAA GTC AGA AGG CAA-3',由美国Integrated DNA Technologies, Inc合成.PCR产物测序工作在美国Salk研究所完成.

统计学处理 使用SPSS10.0软件包,χ²检验.

2 结果

以引物P₁或P₂与P₃配对,以及HBV DNA前C基因1896位点上、下游引物配对(P₄+P₅),经PCR扩增后72份血清标本全部为HBV DNA阳性,与华美生物工程公司PCR筛选实验结果相符;另外选取10名健康献血员血浆标本,以设计的引物扩增(P₁+P₃,P₂+P₃,P₄+P₅),结果均为阴性,证实本实验设计的引物敏感性和特异性达到实验要求.从72份HBV DNA阳性慢性乙型肝炎

患者血清中,随机抽取16份,以引物P₄+P₅进行PCR扩增后直接进行测序,结果出现5例前C区1896位核苷酸G→A突变,1例1896 G→A突变,未出现其他位点突变.由于引物P₁3'末端碱基为野生型碱基G,引物P₂3'末端碱基为突变型碱基A,因而引物P₁+P₃组合能扩增出阳性条带者为野生型病毒株,引物P₂+P₃组合PCR阳性者则为突变型病毒株.P₁+P₃组合和P₂+P₃组合PCR均能扩增出特异性阳性条带,则为野生与突变株混合感染(图1).以已测序的16份已知野生株和突变株血清标本进行3'BS-PCR分析,以探测最佳退火温度点.当退火温度设置为61℃时,3'BS-PCR分析法测出的突变与测序分析结果完全相符.以此实验条件对72例慢性乙型肝炎患者血清标本进行3'BS-PCR扩增,共检出25例病毒突变株,突变率为34.7%.其中混合感染(即P₁+P₃和P₂+P₃均阳性)者为11例,占15.3%;单纯突变株感染(仅P₂+P₃阳性)为14例,占19.4%(表1).

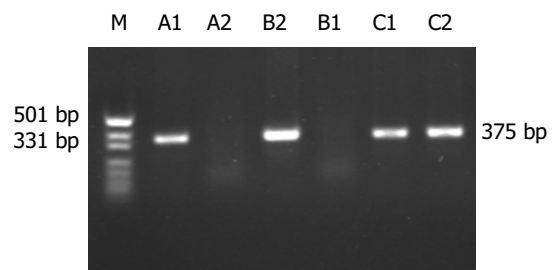


图1 HBV前C区3'BS-PCR电泳结果. M: pUC19 DNA/MspI(Hpa II) Marker; A1, B1, C1: 标本A, B, C; 引物P₁+P₃扩增结果; A2, B2, C2: 标本A, B, C; 引物P₂+P₃扩增结果. A: 野生株; B: 突变株; C: 混合感染.

表1 慢性乙型肝炎患者前C区1896位点突变状况(n %)

分组(类型)	n	野生株	单纯突变株	混合感染	变异总数
I(慢性肝炎轻度)	23	19 (82.6)	1 (4.4)	3 (13.0)	4 (17.4)
II(慢性肝炎中度)	30	18 (60.0)	5 (16.7)	7 (23.3)	12 (40.0)
III(慢性肝炎重度)	19	10 (52.6)	8 (42.1) ^a	1 (5.3)	9 (47.4) ^a
合计	72	47 (65.3)	14 (19.4)	11 (15.3)	25 (34.7)

^aP<0.05 vs Group I.

3 讨论

当乙型肝炎患者血清中HBeAg消失抗-HBe产生后,通常认为意味着病毒复制的停止和病变的改善.但抗-HBe阳性患者仍有部分病例HBV DNA阳性及病变持续^[8].1989年Carman *et al*^[9]首次发现HBV DNA前C区1896位点的G→A突变,可使编码色氨酸的密码子TGG突变为终止密码子TAG,导致HBeAg的合成终止.由于降解的HBeAg与HBeAg有交叉免疫原性^[10],因而可导致抗-HBe的产生,但病毒复制仍然活跃,可造成不同程度的肝损伤,出现肝功能异常^[11].本结果显示,72例抗-HBe阳性的慢性乙型肝炎患者,有25例出现前C区1896位G→A点突变,突变率为34.7%,表明河南地区也存在一定比例的乙型肝炎病毒变异株感染.建议

对于抗-HBe出现,但HBV DNA仍阳性的患者应首先考虑变异株感染的可能性.前C区1896位点突变率资料报道差异较大,其原因可能是因所选择的研究对象不同及所采用的检测点突变的方法不同或由于地区差异而造成.本研究72例抗-HBe阳性患者单纯前C基因1896位点突变仅有14例(19.4%),其他无此终止密码变异的HBeAg阴性病例中也可能存在其他位点的突变.如1899,1858及1862位点的单个或联合突变^[12],前C启动子的碱基突变^[13-14],也可能不同程度地影响HBeAg的合成或分泌.有报道慢性肝炎重度病例前C1896位点突变率要显著高于慢性肝炎轻度组^[15],本文亦证实总突变率和单纯突变率在慢性肝炎重度组均显著高于慢性肝炎轻度组($P < 0.05$),提示这种变异与慢性肝炎进展程度有关.另外我们对16例标本进行了测序分析,在5例变异株中发现有1例同时存在1899位G→A点突变,使编码甘氨酸的密码子GGC突变为编码天冬氨酸的密码子GAC,其突变的临床意义的改变目前尚不清楚.有报道前C1896和1899位点的联合突变者出现更为严重的临床症状,而仅有1896位点变异的病例则症状相对较轻^[16].1896位点至1899位点有连续4个腺嘌呤核苷酸(G)残基相邻,在HBV DNA复制过程中所造成的碱基错配几率相对要大.目前多认为1896位点的终止密码突变是由于宿主的免疫反应压力,持续的慢性感染及抗病毒药物治疗的压力造成的,由于HBeAg是细胞毒T细胞(CTL)攻击的靶抗原,因而这种变异是病毒逃避宿主免疫应答的一种方式,使病毒可持续感染,造成慢性化^[16].

目前检测HBV前C区变异的方法主要有PCR扩增产物直接测序法^[17],3'BS-PCR法^[21],PCR限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)^[18]等.测序法不仅能检测到热点变异,还可检测到其他位点的突变及缺失.但该方法费时费力,价格昂贵,且只能检测到优势毒株,无法检测到混合感染状况.3'BS-PCR法是根据引物3'末端碱基只有与靶序列相对应的碱基互补时才能扩增出所需片段的原理而设计的,其显著优点是能检测到混合感染,且操作简便,成本低,特别适合于大规模筛查.本法主要缺陷是不够稳定.但根据多年的操作经验,我们认为3'BS-PCR的关键是找到最佳退火温度和退火时间,因而应以一定数量的已知变异的血清标本(测序证实)进行质控,有条件的可利用梯度PCR仪,并尽量在短时间内操作完毕.本实验在固定试剂和仪器下,当退火温度和时间在61℃ 30 s时,其变异株检出率与测序法完全相符.但不同实验条件下(主要是试剂和PCR扩增仪),其退火温度和时间亦应不同.只要严格找到并掌握最佳实验条件,本法对于测定定点

突变还是具有很好的应用价值.

4 参考文献

- 1 Chu CM, Yeh CT, Lee CS, Sheen IS, Liaw YF. Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-anti-HBe seroconversion. *J Clin Microbiol* 2002;40: 16-21
- 2 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 3 林裕龙, 侯金林, 王战会, 孙剑, 阎丽, 骆抗先. e抗原阴性重症乙型肝炎患者HBV前C区热点变异研究. *第一军医大学学报* 2001; 21:852-854
- 4 Li LJ, Ruan B, Dennin RH, Wo JE, Chen Z, Chen YG. Mutations in precore and core promoter region of HBV in patients with hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:63-67
- 5 李智伟, 吕飒, 窦晓光, 刘沛. 无症状HBV感染者病理与前C区突变关系研究. *中国公共卫生* 2002;18:785-787
- 6 Shiraki K, Hamada M, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Wagayama H, Shimizu A, Makino Y, Takase K, Nakano T, Tameda Y. Detection of precore-mutant hepatitis B virus genome in patients with acute and fulminant hepatitis using mutation site-specific assay (MSSA). *Hepatogastroenterology* 2002;49:1352-1356
- 7 李旭, 汪渊, 周青. 乙型肝炎病毒前C区1896位点突变的PCR分析法. *中华实验和临床病毒学杂志* 1999;13:212-213
- 8 Dienes HP, Gerken G, Goergen B, Heermann K, Gerlich W, Meyer zum Buschenfelde KH. Analysis of the precore DNA sequence and detection of precore antigen in liver specimens from patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis. *Hepatology* 1995;21:1-7
- 9 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2:588-591
- 10 成军. 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果. *世界华人消化杂志* 2004;12:420-427
- 11 Nakashima H, Furusyo N, Kubo N, Kashiwagi K, Etoh Y, Kashiwagi S, Hayashi J. Double point mutation in the core promoter region of hepatitis B virus (HBV) genotype C may be related to liver deterioration in patients with chronic HBV infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:541-550
- 12 林裕龙, 柳青, 侯金林, 王战会, 阎丽, 孙剑, 郭亚兵, 骆抗先. 不同HBV感染者病毒前C区信号酶裂解位点变异的检测. *解放军医学杂志* 2001;26:198-200
- 13 Ahn SH, Kramvis A, Kawai S, Spangenberg HC, Li J, Kimbi G, Kew M, Wands J, Tong S. Sequence variation upstream of precore translation initiation codon reduces hepatitis B virus e antigen production. *Gastroenterology* 2003;125:1370-1378
- 14 Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Dautreloigne J, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Relationship between the development of precore and core promoter mutation and hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B virus. *J Infect Dis* 2002;186:1335-1338
- 15 赵龙凤, 贾因棠. 慢性乙型肝炎HBV前C区基因突变的临床研究. *山西医科大学学报* 2002;33:409-410
- 16 Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Kubicka S, Boker K, Manns M. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* 1995;37:568-573
- 17 李智伟, 窦晓光, 刘沛. 应用PCR产物直接测序技术测定乙型肝炎病毒前C区基因序列. *中国医科大学学报* 2002;31:247-248
- 18 Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B. *World J Gastroenterol* 2003;9: 2009-2011