

- reduces visceral and cutaneous pain in mice, and induces visceral analgesia after simultaneous inactivation of 5-HT₃ receptors. *Brain Res* 1998;788:20-24
- 15 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT₃ receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anesthetised rat. *Gut* 2000;46:474-480
- 16 Delvaux M, Louvel D, Mamet JP, Campos-Oriola R, Frexinos J. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:849-855
- 17 Viramonts BE, Camilleri M, McKinzie S, Pardi DS, Burton D, Thomforde GM. Gender related differences in slowing colonic transit by a 5-HT₃ antagonist in subjects with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;92:2671-2676

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 研究快报 •

ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊

闫杰, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊, 北京地坛医院五病区 北京市 100011
冯鑫, 宋淑静, 北京地坛医院病毒研究室 北京市 100011
王磊, 山东大学医学院济南市传染病医院四病区 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, 北京地坛医院五病区. jieyan@bnn.cn
电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-29

摘要

目的: 建立一种简便、快速、实用的乙型肝炎病毒(HBV)阿德福韦(ADV)耐药变异-rtN236T 变异的快速检测方法。

方法: 根据 GenBank 收录的 HBV 基因全序设计巢式 PCR 引物, 使野生株(rt236N)PCR 产物中含有 DraI 酶切位点(5'-TTTAAA3'), 而变异株(rt236T)无此限制性酶切位点。同时 PCR 扩增 2 份已行 HBV RT 区基因测序证实未出现 rtN236T 变异的慢性乙型肝炎患者血清及自行构建的对照质粒, 扩增产物经 DraI 酶切, 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。

结果: 所建立的 ntPCR-RFLP 方法灵敏度高, 可以检测到 10⁶copies/L 的 HBV DNA; 特异性强, 其 RFLP 分析结果与 DNA 测序结果一致。

结论: ntPCR-RFLP 方法灵敏、特异、简便、实用, 适用于 ADV 耐药变异的临床监测工作。

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊. ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异. 世界华人消化杂志 2005;13(4):543-545
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/543.asp>

0 引言

阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)是由美国 Gilead Science 公司开发的新型核苷类抗乙型肝炎病毒(hepatitis B, virus HBV)药物, 已在国外进行了 II、III 期临床试验^[1-2], 并已获美国 FDA 批准上市^[3]. 我国药品监督管理局于 2000-12 批准该药在中国进行临床试验, 目前, I 期临床试验已结束, II 期临床试验也已在 2002-12 正式启动. 临床研究表明 ADV 能有效地抑制 HBV DNA 复制, 使 HBV DNA 滴度迅速降低, 而且在出现拉米夫定(lamivudine)耐药的患者中 ADV 能继续有效地抑制变异株^[1-2, 4]. 但随之出现 ADV 耐药变异株为 HBV rtN236T 变异^[5-6]. 为此, 我们建立了基于巢式聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(ntPCR-RFLP assay)的快速检测方法, 以便对该耐药变异进行监测, 指导临床合理用药。

1 材料和方法

1.1 材料 两份慢性乙型肝炎患者血清取自北京地坛医院就诊患者, 为拉米夫定治疗前保留血清(标本号 216, 393). 其 HBV RT 区基因序列已采用 PCR 产物直接测序方法进行检测, 结果表明未出现 rtN236T 变异(测序结果已提交至 GenBank, accession number: AY762898、AY762900). 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 μ L, 13 000 g 离心 10 min, 弃上清, 室温干燥后加入双蒸水 20 μ L 溶解, -20°C 保存.

1.2 方法 rtN236T 变异是由于 HBV 基因组第 836 碱基由腺嘌呤 (A) 突变为胞嘧啶 (C), 从而导致 HBV 聚合酶 D 区 rt236 氨基酸由天冬酰胺 (asparagine, N) 变异为苏氨酸 (threonine, T) (图 1). 故而以此为基础, 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, 设计巢式 PCR 引物 (外引物: P1、P2, 内引物: ADVup1, ADVlow); 旨在使野生株 (rt236N) PCR 产物中含有 *Dra*I 酶切位点 (5' TTTAAA3'), 而变异株 (rt236T) 无此限制性酶切位点 (图 1, 表 1). 以血清提取物为模板进行 PCR 扩增, 野生型对照质粒以 ADVup1 和 ADVlow 为引物, 变异型以 ADVup2 和 ADVlow 为引物, 从而将碱基突变引入变异型对照质粒 (表 1). 将 PCR 产物纯化后与 T-载体 (美国 Promega 公司) 连接, 构建重组质粒, 转化 JM109 菌. PCR 鉴定阳性克隆后, LB 培养液中培养并提取质粒, 应用双脱氧末端终止法进行序列测定 (由北京三博远志生物技术公司完成). 巢式 PCR 反应 30 μ L PCR 反应体系含 Taq 酶 1U, $10\times$ 扩增缓冲液 3 μ L, 25 mol/L dNTP 0.12 μ L、50 μ mol/L 引物 0.12 μ L; 第一轮 PCR 模板为血清提取物 6 μ L, 引物为 P1, P2; 第二轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物 3 μ L, 引物为 ADVup1, ADVlow. 两轮 PCR 循环温度条件均为 94°C 3 min, 94°C 10 s, 53°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 循环, 72°C 7 min. 对照质粒 1:50 稀释后按上述步骤进行第二轮 PCR. 取第二轮 PCR 产物 8 μ L, 以 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于紫外灯下观察结果, 于 304 bp 处出现荧光条带者为阳性. 限制性内切酶酶切 10 μ L 酶切反应体系内含第二轮 PCR 产物 8.5 μ L, *Dra*I 10U, 酶切缓冲液 1.5 μ L, 于 37°C 酶切 4 h. 将全部酶切产物以 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于紫外灯下观察结果. PCR 产物经酶切后野生株较变异株缺失 19 bp, 故电泳速度稍快, 将标本同对照质粒相比较即可判定是否变异.

rt aa seq 229-	L	S	L	G	I	H	L	N	P
Nt seq 814-	<u>TTG</u>	<u>TCT</u>	<u>TTG</u>	<u>GGT</u>	<u>ATA</u>	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>	<u>AAC</u>	<u>CCT</u>
	ADVup1 primer								
	H	L	M	P					
(wild) rt236N	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>	<u>AAC</u>	<u>CCT</u>					
	Dir I site								
	H	L	T	P					
(mutant)rt236T	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>	<u>ACC</u>	<u>CCT</u>					
	no Dra I site								

图 1 PCR-RFLP 检测 rtN236T 变异的设计.

表 1 PCR 引物序列

引物	nt	序列
P1	105-122	5' CCTCACCCATATCGTCAA3'
P2	1255-1238	5' CCTCACCCATATCGTCAA3'
ADVup1	815-835	5' TGTCTTTGGGTATACATTAA3'
ADMow	1103-1118	5' AAGGCCTTGTAAGTTG3'
ADVup2	815-838	5' TGTCTTTGGGTATACATTAAACCC3'

2 结果

对照质粒序列测定结果与预期结果一致, 表明对照质粒构建成功 (图 2). 以不同 HBV DNA 浓度的血清提取物为模板进行 PCR 检测, 终检浓度为 10^6 copies/L (HBV DNA 荧光定量试剂盒购自深圳匹基生物技术公司), 表明该巢式 PCR 反应具有良好的灵敏度. 阳性标本 PCR 产物大小与预期值相符, 为 304 bp (图 3), 且 PCR 产物克隆 (即野生型对照质粒) 测序结果与此前所测得的 HBV RT 区基因序列之间的核苷酸同源性为 97.5%, 表明该巢式 PCR 反应具有高度特异性. RFLP 分析 *Dra*I 酶切后电泳结果显示, 两血清标本与野生型对照质粒的巢式 PCR 产物均被完全酶切, 而变异型对照质粒未被酶切 (图 4); 该结果与 DNA 序列测定结果一致.

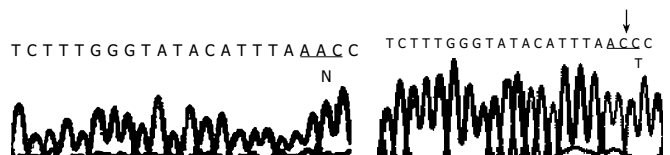


图 2 对照质粒测序结果. W: 野生型对照质粒; A: 野生型对照质粒 (nt: AAC, aa: N); B: 变异型对照质粒 (nt: ACC, aa: T).

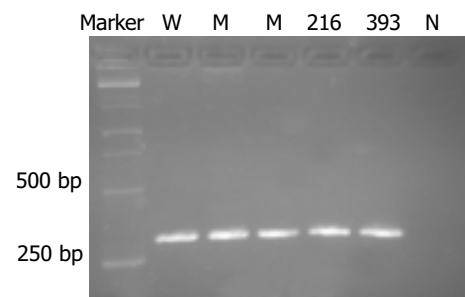


图 3 PCR 产物电泳结果. W: 野生型对照质粒; M: 变异型对照质粒; 216、393: 血清标本; N: 空白对照; DGL2000 DNA Marker.

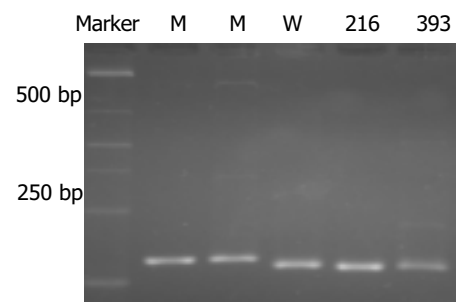


图 4 *Dra*I 酶切产物电泳结果. M: 变异型对照质粒; 216、393: 血清标本; N: 空白对照; DGL2000 DNA Marker.

3 讨论

时至今日慢性 HBV 感染仍是一个全球性的难题, 全世界约有 3.5 亿人感染, 与之相关的年死亡人数约为 1 200 000^[7]. 因此针对 HBV 的抗病毒治疗受到广泛重视. 随着对 HBV 聚合酶的结构和功能的深入认识, 一些有效抑制 HBV DNA 复制的核苷类药物 (如: 拉米夫定、ADV) 逐步成为抗 HBV

治疗的新选择^[8-9]。由于HBV聚合酶如同其他逆转录病毒的逆转录酶一样具有较高的错配倾向且缺乏校对能力,因此随着感染的持续病毒准种逐年增多^[10-11]。在核苷类药物的选择压力下,耐药变异株将逐渐增多,最终替代野生株成为优势株,从而导致临床耐药现象的出现。多个研究中心相继报道rtN236T变异与ADV耐药有关,并在体外实验中证实该变异可显著降低HBV对ADV的敏感性^[5-6, 12-13]。

我国HBV慢性感染患者众多,在ADV广泛应用之前应建立完善的耐药监测体系以指导临床合理用药,为此亟待建立一种简便、快速的rtN236T变异检测方法^[14]。

基于ntPCR-RFLP技术的拉米夫定耐药变异检测方法已为国内众多实验室广泛应用,具有灵敏、特异、简便、实用之优点^[15-18];因此我们再次选择该技术用以构建rtN236T变异检测方法。为提高PCR扩增效率,在引物设计时选择我国常见基因型-B型和C型^[19-22]为模板。为降低成本和方便操作,在RFLP分析过程中选用30 g/L琼脂糖凝胶电泳,而未使用分辨率高但价格较贵、操作繁琐的聚丙烯酰胺凝胶电泳。该方法更符合我国现状且经济、简便、实用,以便在国内推广,建立全国性的完善的ADV耐药监测体系。

4 参考文献

- 1 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. 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, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:808-816
- 3 黄世杰. FDA 批准阿德福韦治疗乙型肝炎. 国外医学. 药学分册 2003;30:63
- 4 Schiff ER, Lai CL, Hadziyannis S, Neuhaus P, Terrault N, Colombo M, Tillmann HL, Samuel D, Zeuzem S, Lilly L, Rendina M, Villeneuve JP, Lama N, James C, Wulfsohn MS, Namini H, Westland C, Xiong S, Choy GS, Van Doren S, Fry J, Brosgart CL; Behalf of the Adefovir Dipivoxil Study 435 International Investigators Group. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003;38:1419-1427
- 5 Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003;125:292-297
- 6 Villeneuve JP, Durantel D, Durantel S, Westland C, Xiong S, Brosgart CL, Gibbs CS, Parvaz P, Werle B, Trepo C, Zoulim F. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J Hepatol* 2003;39:1085-1089
- 7 Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002;346:1682-1683
- 8 De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004;30:115-133
- 9 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirology* 2003;46:413-420
- 10 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 11 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 12 Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir Ther* 2004;9:149-160
- 13 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
- 14 茅益民, 曾民德. 抗乙型肝炎新药—阿德福韦酯. 中华肝脏病杂志 2004;12:61-63
- 15 封波, 魏来, 陈明, 李秀华. 包含YMDD基因序列的乙型肝炎病毒P区基因变异的研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:29-31
- 16 丁静娟, 张伟三, 张莉莎. 乙型肝炎病毒耐拉米夫定多聚酶基因变异检测方法研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2004;18:24-27
- 17 赵平, 李捍卫, 楼敏, 程勇前, 兰云, 福军亮. 拉米夫定耐药的慢性乙肝患者联合干扰素或苦参素治疗疗效观察. 中华实验和临床病毒学杂志 2004;18:80-82
- 18 刘艳, 胡毅文, 乐晓华, 王召钦, 袁静, 林奕, 骆子义, 蒋小玲. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎1-3 a随访结果. 中华传染病杂志 2004;22:204-206
- 19 许军, 王齐欣, 范春蕾, 蒋栋, 李若冰, 丛旭, 费然, 陈红松, 魏来, 王宇. 中国南北两城市乙型肝炎病毒基因型与血清型的构成差异. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:327-329
- 20 杨洁, 戴琳, 郭亚兵, 杨守昌, 王燕军, 骆抗先. 应用多重PCR法对广东地区HBV进行基因型(A-F)分型. 第一军医大学学报 2002;22:707-709
- 21 葛宪民, 李丹亚, 方钟燎, 黄果勇, 江世强, 潘海东, 杜岩, 王超英, 丁欣, 沟上雅史. 广西乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:174-179
- 22 宋淑静, 何忠平, 庄辉, 闫杰, 董庆鸣. 中国北方5城市慢性乙型肝炎患者的基因型. 中国公共卫生 2004;20:166-167

编辑 潘伯荣 审读 张海宁