

胞进入 S 期,使细胞停滞于 G₁ 期,如二者失调将导致细胞增生和恶变,已有研究证实,多种实体肿瘤中存在 p27 低表达和 cyclinE 高表达^[8,9]。本实验发现 p27 阳性表达率降低, cyclinE 阳性表达率增加, p27 和 cyclinE 在 GIST 中表达呈负相关。表明处于分裂增生状态的细胞 p27 表达减少, cyclinE 表达增加,促进细胞进入 S 期,表现无限增生而导致 GIST 向恶性方向发展。提示 p27、cyclinE 平衡失调可能促进 GIST 的发生。因此,联合检测 p27 和 cyclinE 表达水平,对预测 GIST 的预后有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Gelen T, Elpek GO, Aksoy NH, *et al.* p27 labeling Index and proliferation in gastrointestinal stromal tumors: correlations with clinicopathologic factors and recurrence [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(7):346-352
- 2 Haber MH, Gattuso P, Spitz DJ, *et al.* Gastrointestinal mesenchymal neoplasms. Differential diagnosis in surgical pathology [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:188-192
- 3 Gelen T, Elpek GO, Aksoy NH, *et al.* p27 Labeling index and prolif-

eration in gastrointestinal stromal tumors: correlations with clinicopathologic factors and recurrence [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(7):346-352

- 4 章建国,池鸣鸣,施公胜,等. 胃肠道间质瘤中 p16、p27、Ki267 表达 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2006, 22(1):54-56
- 5 张志勇,赵增仁,冯俊伟,等. p27、bcl-2、Ki-67 在胃肠道间质瘤的表达及其意义 [J]. *中国医药导刊*, 2006, 8(4):242-244
- 6 Muller-tidow C, Metzger R, Kugler K, *et al.* CyclinE is the only Cyclin2dependent kinase - associated Cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non - small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:647-652
- 7 何东来,李铁钢. 大肠癌. p27 和 CyclinE 表达及其临床病理意义 [J]. *医学临床研究*, 2008, 25(4):651-654
- 8 Sasaki T, Katayose Y, Suzuki M, *et al.* Adenovirus expressin mutant p27kip1 enhanced apoptosis against cholangiocarcinoma than adenovirus - p27kip1 wild type [J]. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51(55):68-75
- 9 Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma [J]. *Yonsei Med J*, 2005, 46(5):597-613

(收稿:2010-04-19)

异源双链分析法快速检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类耐药性

王 伟 石瑞如 张国龙 付光宇 彭义利 苑 星

摘 要 目的 采用变性高效液相色谱 (DHPLC) 和 Surveyor 酶法分析结核分枝杆菌氟喹诺酮类耐药基因 *gyrA* 突变, 探讨这两种异源双链分析法在结核菌耐药快速检测中的应用价值。**方法** 102 株结核分枝杆菌临床分离株 (常规药敏试验显示 80 株氧氟沙星耐药, 22 株敏感), PCR 扩增 *gyrA* 基因氟喹诺酮类耐药决定区域, 与参照菌株 *M. tb* Erdman 的扩增产物形成异源双链, 然后分别采用 DHPLC 和 Surveyor 酶法检测基因突变, 同时进行 DNA 测序作为对照。**结果** DHPLC 法和 Surveyor 酶法与 DNA 测序法相比, 具有同样的检出率 (均为 100%), 80 株耐药株均存在 *gyrA* 基因突变, 而 22 株敏感株均无基因突变发生。**结论** DHPLC 法和 Surveyor 酶法均可用来快速检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类耐药。两者均简便, 稳定, 灵敏, 前者高通量, 全自动化, 但需要昂贵的设备; 后者成本低, 不需要特殊设备, 适合我国大部分临床实验室开展。

关键词 异源双链分析 基因突变 高效液相色谱法 核酸酶 分枝杆菌 结核

Rapid Detection of Fluoroquinolone - resistance of Mycobacterium Tuberculosis Isolates by Heteroduplex Analysis. Wang Wei, Shi RuiRu, Zhang Guolong, Fu Guangyu, Peng Yili, Yuan Xing. Department of Clinical Laboratory and Sino - US Tuberculosis Research Center, Henan Provincial Chest Hospital, Henan 450008, China

Abstract Objective To detect *gyrA* gene mutation and fluoroquinolone - resistance of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates by using two types of heteroduplex analysis: denaturing high - performance liquid chromatography (DHPLC) and Surveyor nuclease meth-

基金项目:河南省医学科技攻关重点项目 (200702015)

作者单位:450008 郑州, 河南省胸科医院检验科及中美结核病研究中心 (王伟、石瑞如、张国龙、彭义利、苑星); 450000 郑州市安图绿科生物有限公司 (付光宇) (注:王伟和石瑞如为并列第一作者)

通讯作者:张国龙, 电子信箱:guolongzhang@hotmail.com

od and to evaluate their potential value in future clinical use. **Methods** One hundred and two *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates (80 ofloxacin – resistant, 22 ofloxacin – sensitive, by routine method) were applied for PCR amplification of quinolone resistance determining region in *gyrA* gene. PCR products was hybridized respectively with *M. tb* Erdman. Heteroduplex was analyzed by DHPLC and Surveyor nuclease methods at the same time. DNA sequencing was performed as gold standard. **Results** High detection rate (100%) was shown both in DHPLC and in Surveyor nuclease method, compared with DNA sequencing. Eighty ofloxacin – resistant isolates were found with *gyrA* mutation while those 22 ofloxacin – sensitive isolates with no mutation. **Conclusion** DHPLC and Surveyor nuclease methods can both be regarded as promising rapid tools for analysis of fluoroquinolone – resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. The former has many advantages: simple, stable, sensitive, high through – put, automatic, except the need of an expensive equipment. The latter is cost – effective with no need of special equipment, can be widely used in most of clinical laboratories in our country.

Key words Heteroduplex analysis; Gene mutation; High performance liquid chromatography; Nuclease; *Mycobacterium*; *Tuberculosis*

我国是结核病高负担国家,目前耐药问题给结核病的控制造成很大威胁,因此早期筛查耐药结核菌,采取有效治疗措施成为当务之急^[1,2]。但是由于结核菌生长慢,分裂 1 次需要 24h,常规药敏测定至少需要 2 个月时间,成为困扰结核领域的一大难题。分子生物学的发展揭示了结核菌耐药的机制是耐药基因的变异,各种药物均有相关的耐药基因存在,检测其热点区域有否突变便可知结核菌是否耐药^[3]。本研究即是用异源双链分析的两种新方法:变性高效液相色谱法(DHPLC)和 Surveyor 酶法来分析 *gyrA* 基因突变,以快速检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类耐药情况。

材料与方法

1. 菌株:结核分枝杆菌 *M. tb* Erdman (ATCC 35801)来自日本国家结核病研究所抗酸菌参比中心,102 株结核分枝杆菌临床分离株(常规药敏试验显示 80 株氧氟沙星耐药,22 株敏感)均来自于河南省胸科医院中美结核病研究中心,为 2003 ~ 2005 年期间笔者医院结核病患者(男性 65 人,女性 37 人,年龄 15 ~ 75 岁)的标本培养物,并经菌种鉴定为结核分枝杆菌。检测前,将待测菌株转种到改良罗氏培养基上,37℃ 培养 3 周。本研究从标本采取,菌株分离,冻存以及整个实验操作过程均经过河南省胸科医院伦理委员会和生物安全委员会的审批。

2. PCR 扩增:菌株提取 DNA 后,*gyrA* QRDR 部位 227bp 进行 PCR 扩增,所用引物为:*gyrA*1:5' – GACCGCAGCCACGCCAAG – 3', *gyrA*2:5' – AGCATCACCATCGCCAACG – 3',PCR 所用扩增酶为 Ampli Taq Gold,将一份扩增产物纯化并进行 DNA 序列测定。

3. DNA 杂交:*M. tb* Erdman 的扩增产物与样本的扩增产物等摩尔混合(通常为 1:1 体积),95℃ 5min 变性,然后以每 4s 下降 0.1℃ 的速度逐渐降温至 25℃,同源双链和异源双链在此过程中形成。杂交产物一份用于 DHPLC 分析,一份用于 Surveyor 酶法分析。

4. DHPLC 分析:杂交双链置于 96 孔板中,上样于 WAVE

核酸片段分析系统(Transgenomic 公司,美国),DNASep 分析柱,L – 7610 在线脱气装置,D – 7000 面板,L – 7100 泵,L – 7250 双板自动进样器,7250 样本冷藏器,L – 7300 温箱,L – 7400UV 检测器,缓冲液均来自于 Transgenomic 公司。缓冲液 A 为 0.1mol/L 醋酸三乙胺,缓冲液 B 为 0.1mol/L 醋酸三乙胺和 25% 乙腈,A 与 B 的比例由 WAVE 系统自动调节,流速 0.9ml/min,洗脱的 DNA 双链于 260nm 进行紫外吸收检测。所用检测温度为 67.7℃。

5. Surveyor 酶切反应:采用 Surveyor 突变检测试剂盒(美国 Transgenomic 公司),杂交形成的异源双链或同源双链作为底物与 Surveyor 酶在 60μl 反应体系[20mmol/L Tris – HCl (pH 值为 7.4),25mmol/L 氯化钾,10mmol/L 氯化镁,600ng DNA 底物,1μl Surveyor 核酸内切酶增强剂,1μl Surveyor 核酸内切酶]中进行孵育。底物 DNA 所用量为 600ng,需事先准确测定底物的浓度,加入所需的量和上述各种成分,然后以相应体积的去离子水调整至总反应体系 60μl,42℃ 水浴 28min 后加入 6μl 终止液(0.5mmol/L EDTA),混匀后置 – 20℃ 保存。电泳:聚丙烯酰胺凝胶电泳:15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,1 倍 TBE 缓冲液(90mmol/L Tris – 碱,1mmol/L EDTA, pH 值为 8.3),120V,45min,溴化乙锭染色。酶切产物的存在表示有基因突变存在,酶切后片段的长短提示突变的位置,片段的种类与突变的位点数有关。

结 果

测序结果表明,102 株 *gyrA* 基因 95 位密码子均为 ACC,与 *M. tb* Erdman 的相同。22 株氧氟沙星敏感株均未发现基因突变,80 株耐药株中均有点突变存在,其中 64 株(80%)带有 94 位密码子的突变,GAC 突变为 GGC, GCC, TAC, AAC, 导致 94 Asp 突变为 Gly, Ala, Tyr, Asn 4 种类型。45 株(57%)携有 Ala90Val 突变。8 株(10%)带有 Ser91Pro 突变。DHPLC 结果表明,敏感株均呈现单一尖锐的峰形,而突变株(耐药株)出现不同的宽大畸形的峰,除了 Asp94Gly 和 Asp94Asn 图形相似之外,其他的突变类型有各自特点的峰形出现(图 1)。Surveyor 酶切图谱

见图2。22株敏感株均显示1条带形,耐药株由于异源双链的形成,突变处被Surveyor酶切断形成多条带形的图谱,带形与突变类型之间很难鉴别。总

之,DHPLC法与Surveyor酶法与测序结果一致,两者的检出率均为100%。

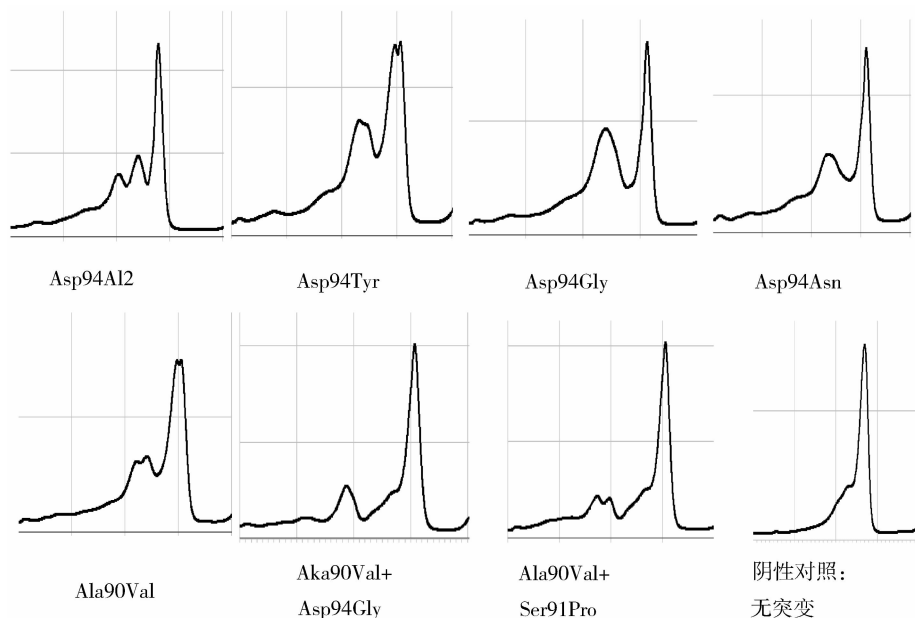


图1 DHPLC峰形与gyrA QRDR突变类型的关系

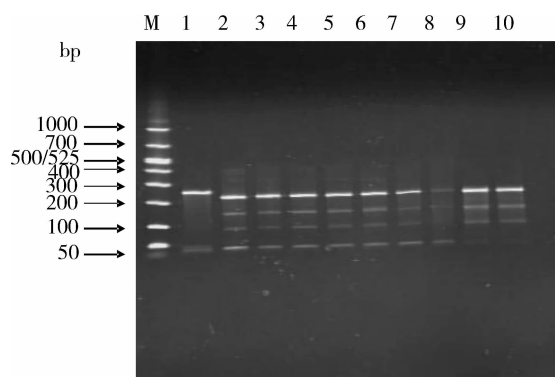


图2 典型的Surveyor-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

M. 标志物;1. 敏感株;2~10. 有gyrA基因突变的左旋氧氟沙星耐药株

讨 论

氧氟沙星等氟喹诺酮类药物在结核治疗中广为使用。其作用靶点为DNA回旋酶。编码该酶A亚单位的基因gyrA发生突变与氟喹诺酮类耐药的相关性达95%以上^[3]。本研究发现氧氟沙星耐药株gyrA突变主要发生在94,90和91位密码子而且94位有4种类型的突变,与其他研究者的报道相一致^[4]。检测基因突变判断耐药,比如rpoB基因与利福平(96%以上),katG联合inhA基因与异烟肼(85%以上),rpsL联合rrs基因与氨基糖甙类药物(80%以

上),以上所有基因联合检测即可在2天之内发现广泛耐药结核分枝杆菌(XDR-TB),分子生物学方法有望将结核分枝杆菌的药敏试验由2个月缩短至2天^[3,5]。DNA测序法价格昂贵,SSCP、RFLP等方法操作繁琐,不便于推广。本项研究表明,异源双链分析检测基因突变的两种新方法DHPLC和Surveyor酶法检出率均高达100%,为临床实现快速药敏测定带来了希望。

DHPLC突变检测技术是高通量筛选DNA序列变异的最新技术,在结核病研究领域,除耐药基因检测外,还可以用于基因分型、序列多态性分析等^[6,7]。DHPLC法高效(1天可检测200份样品),低耗(每份样品2元钱),方便(全自动化),但是设备价格昂贵,目前仅在高等学校、科研院所、疾病预防控制中心的大型实验室里使用。Surveyor酶对DNA错配部位有高度选择性,为植物中提取的核酸内切酶,它与普通的核酸内切酶不同,其酶切位点没有核苷酸序列的特异性,只识别异源双链中单个碱基错配形成的“泡”或未配对的多个碱基形成的“环”,从错配部位的每一条链的3'端切断双链DNA。无基因突变存在时,样本与野生型PCR产物杂交形成同源双链,Surveyor酶找不到酶切位点而不能发挥作用,电泳图谱上仅为1条带;有点突变存在时,杂交后

产物为配位完好的同源双链和错配有“凸起”的异源双链。Surveyor 酶可将异源双链从错配部位切开,电泳图呈现 3 条带,1 条为同源双链条带,另外两条为被切断的异源双链,两条链的长度总和等于同源双链的长度。如果异源双链中有多个错配部位,则 Surveyor 酶可有多个作用位点,产生不同长度、不同种类的酶切片段,也会呈现多种带形的电泳图谱。Surveyor 酶法无需大型设备,仅使用普通的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳即可,也可通过琼脂糖电泳判断有无突变的存在。方法简便稳定,便于推广。

(志谢:感谢日本国家结核病研究所菅原勇博士的大力帮助)。

参考文献

- 1 Zager EM and McNeerney R. Multidrug - resistant tuberculosis. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(1): 10 - 15
- 2 He GX, Zhao YL, Jiang GL, et al. Prevalence of tuberculosis drug resistance in 10 provinces of China. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(12): 166 - 174

- 3 Zhang Y and Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis, 2009, 13(11): 1320 - 1330
- 4 Cheng AF, Yew WW, Chan EW, et al. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone - resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(2): 596 - 601
- 5 Chan RCY, Hui M, Chan EWC, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug - resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Hong Kong. J Antimicrob Chemotherapy, 2007, 59(5): 866 - 873
- 6 Shi R, Otomo K, Yamada H, et al. Temperature - mediated heteroduplex analysis for the detection of drug - resistant gene mutation in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. Microb Infect, 2006, 8(1): 128 - 135
- 7 Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, et al. Automated high - throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis strains by a combination of PCR and nondenaturing high - performance liquid chromatography. J Clin Microbiol, 2004, 42(9): 4175 - 4180

(收稿:2010 - 03 - 21)

阿德福韦酯治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎疗效及其与血清 TNF - α 变化的关系

高海兵 林明华 潘 晨 林太杰 郑 玲 原津津 方建凯 周 锐

摘 要 **目的** 分析阿德福韦酯(ADV)治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎(CHB)的疗效及其与血清 TNF - α 水平变化的关系。**方法** 对 203 例 HBeAg 阳性 CHB 患者采用 ADV(名正)10mg/d 治疗 48 周,观察 24 周和 48 周疗效,包括 HBV DNA 转阴、ALT 复常、HBeAg 转阴及血清转换、应答率,并用 ELISA 测定基线及 48 周血清 TNF - α 水平。**结果** 203 例患者 24 周和 48 周 HBV DNA 转阴率、ALT 复常率、HBeAg 转阴率及血清转换率、应答率分别为 31.5%、59.1%、15.8%、8.9%、13.3% 和 58.6%、78.3%、29.6%、16.7%、25.6%。24 周和 48 周 HBV DNA 载量较基线下降的中位值分别是 $3.56\log_{10}$ 拷贝/毫升和 $4.35\log_{10}$ 拷贝/毫升,且 48 周疗效均优于 24 周($P < 0.05$),而除 HBV DNA 未转阴组、ALT 未复常组外,余疗效组 TNF - α 水平在 48 周较基线均下降明显($P < 0.001$)。**结论** HBeAg 阳性 CHB 患者 ADV 治疗 48 周能够有效地抑制 HBV,降低血清 TNF - α 水平。

关键词 肝炎 乙型 慢性 阿德福韦酯 肿瘤坏死因子 α 疗效

Study on Efficacy of Adefovir dipivoxil in HBeAg - positive Chronic Hepatitis B Patients and its Correlation with Serum Levels of Tumor Necrosis Factor α . Gao Haibing, Lin Minghua, Pan Chen, Lin Taijie, Zheng Ling, Yuan Jinjin, Fan Jiankai, Zhou Rui. Department of Hepatology, Fuzhou Municipal Hospital of Infectious Diseases, The Affiliated Infectious Diseases Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350025, China

Abstract Objective To investigate the efficacy of Adefovir dipivoxil in HBeAg - positive chronic hepatitis B(CHB) patients and study its correlation with serum levels of tumor necrosis factor α . **Methods** 203 HBeAg - positive CHB patients were recruited into the study and were administered with ADV(Minzen) 10mg once daily for 48 weeks. The efficacy including HBV DNA negativity, alanine ami-

基金项目:福州市社会发展科技项目(2008 - s - 74)

作者单位:350025 福州,福建医科大学附属传染病医院(福州市传染病医院)肝病科

通讯作者:林明华,电子信箱:fulmh@yahoo.com.cn