

- 20 Rovina Ruslami, Hanneke M J Nijland, I Gusti N, *et al.* Adhiarta pharmacokinetics of antituberculosis drugs in pulmonary tuberculosis patients with type 2 diabetes[J]. *Antimicroblal Agents and Chemotherapy*. 2010, 54(3):1068 - 1074
- 21 Martens GW, Arian MC, Lee J, *et al.* Tuberculosis susceptibility of diabetic mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(5):518 - 524
- 22 Restrepo BI, Fisher - Hoch SP, Pino PA, *et al.* Tuberculosis in poorly

controlled type 2 diabetes; altered cytokine expression in peripheral white blood cells[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(5):634 - 641

- 23 Nijland HM, Ruslami R, Stalenhoef JE, *et al.* Exposure to rifampicin is strongly reduced in patients with tuberculosis and type 2 diabetes[J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(7):848 - 854

(收稿:2011-05-08)

(修回:2011-06-22)

一株柯萨奇病毒 B 组 5 型 (Cox. B5) 病毒的分离及 VP1 基因分析

李 华 杨卉娟 柯华昕 陈俊英 潘 玥 赵玉娇 孙强明 马绍辉

摘 要 目的 研究 2009 年昆明市无菌性脑膜炎的病原柯萨奇 B5 (coxsackie virus B5, CVB5) 分离株 (KMA193-09) 的 VP1 基因特征。方法 采用 RD 细胞、Hep-2 细胞对患者粪便标本进行病毒分离, 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增病毒 VP1 基因并进行序列测定, 用 Mega 4.0 等软件分析处理。结果 从无菌性脑膜炎患者粪便标本中, 分离到 CVB5, 其 VP1 区的核苷酸长度均为 831bp, 未发现核苷酸插入与丢失。与浙江 COXB5/ZHEJIANG/12/02 (CFS) 株、山东 02336/SD/CHN/2002/CB5 株及浙江 COXB5/ZHEJIANG/13/02 株氨基酸同源性最高为 98.19%, 与国外毒株的同源性为 95.67%~97.83%。在进化树上与 YZ081/SD/CHN/2005/CB5 株显示在同一个分支上。结论 分离的肠道病毒为柯萨奇病毒 B 组 5 型 (CVB5), 分离株 (KMA193-09) VP1 区变异较小。

关键词 无菌性脑膜炎 柯萨奇病毒 B 组 5 型 (Cox. B5) VP1 基因 分析

Analysis of VP1 Gene of Coxsackievirus B5 for Aseptic Meningitis Prevailing Isolated from Kunming in 2009. Li Hua, Yang Huijuan, Ke Huaxin, *et al.* Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To analyze the genetic characterization of the VP1 gene of coxsackie virus B5 causing meningitis isolated from Kunming in 2009. **Methods** The specimens of stool were isolated in Hep-2 and RD cell lines. Viral RNA was extracted and the VP1 gene was amplified using RT-PCR and sequenced. The sequence of the VP1 gene was compared with VP1 gene sequences of other coxsackie virus from Genbank using Mega4.0 software. **Results** The VP1 gene of coxsackie virus B5 isolated from stool specimens was 831 nucleotides. There was no missing and insertion of nucleotide. Compared with the coxsackie virus B5 strains isolated from other countries, the homology of amino acids were 95.67% - 98.19%. Phylogenetic analysis revealed that the evolutionary relationship of the coxsackie virus B5 was closest to the YZ081/SD/CHN/2005/CB5 strains. **Conclusion** The KMA193-09 strain was belong to coxsackie virus B5. The VP1 gene of coxsackie virus B5 in china was strictly conserved.

Key words Aseptic meningoencephalitis; Coxsackie virus B5; VP1 gene; Analyze

柯萨奇病毒 B5 (coxsackie virus B5, CVB5) 感染可引起多种人类疾病, 包括无菌性脑膜炎、肌肉麻痹、病毒性心肌炎、手足口病、胰腺炎和糖尿病等, 在我国均有报道^[1-4]。

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室 (李华、杨卉娟为共同第一作者)

通讯作者: 马绍辉, 电子信箱: shaohuima@imbcams.com

CVB5 属于肠道病毒属小核糖核酸病毒, 无包膜、单股正链 RNA, 病毒基因组由 7402 个碱基构成, 基因组顺序依次为 5' 端非编码区、P1、P2、P3 区和一段 3' 端非编码区, 其中 P1 区编码病毒的主要结构蛋白, 即衣壳蛋白 (capsule protein), 分别为 VP1、VP2、VP3 和 VP4, 而病毒主要的免疫原性蛋白和中和抗原位点在 VP1 上^[1,3-5]。

为了了解 2009 年引起无菌性脑膜炎的病原分离株 KMA193-09 (基因登陆号为 HQ423145) 的遗传特

性,我们对其 VP1 基因片段进行扩增及分析,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞:Hep-2、RD 细胞皆由中国医学科学院医学生物学研究所检定室保存并提供。(2)标本来源:昆明市儿童医院脑炎疑似病例(年龄)的粪便标本。(3)RNA 提取试剂盒:Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Miniprep Kit. lot: KC50090501-B-G。(4)RT-PCR Kit:TAKARA One step RT-PCR Kit VER. 2203. lot:BK1101。

2. 方法:(1)病毒分离::采用组织培养法,取粪便标本 1g,加入 5ml 0.01mol/L PBS(pH7.4)制成悬液,3000r/min,离心 30min,用 0.45μl 滤器除菌过滤,接种已长成致密单层的 Hep-2、RD 细胞,细胞培养严格按 WHO 分离肠道病毒规程操作,于 37℃ 培养,培养液为含 10% 小牛血清的 MEM^[6]。观察病毒在细胞上的细胞病变情况(CPE),如果无 CPE,盲传 3 代;3 代后无 CPE 出现,判为阴性。病毒继续在 RD 细胞培养增殖 2 代。(2)病毒核糖核酸(RNA)提取:采用 Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Miniprep Kit,按试剂盒说明书提取病毒 RNA。(3)引物:扩增与测序引物参照文献[7]:肠道病毒公用引物见表 1。扩增片段长度为 831bp,引物由上海生物工程有限公司合成。(4)反转录-聚合酶链反应(RT-PCR):采用 TaKaRa 公司生产的 One-step RNA PCR kit(AMV)试剂盒。反应条件:50℃ 30min,反转录 95℃ 2min 后 94℃ 30s, 51℃ 30s, 72℃ 1.5min,循环 39 次,72℃ 延伸 7min,然后转入 4℃。取扩增产物 5μl,用 1.0% 琼脂糖电泳,根据 Marker 位置对扩增片段进行确认。(5)序列测定和数据分析:扩增阳性的 PCR 产物由北京三博生物技术有限公司进行纯化和序列测定。其他有关 CVB5 的 VP1 序列从 NCBI 的基因数据库(Genbank)上下载,并采用码格。Mega 4.0 软件对测序结果进行分析处理。

表 1 用于 RT-PCR 的引物

名称	位置	序列
VP3	2226~2248	5'-TGIGTIYTTTGRTICCTGGAT-3'
VP1	2883~2902	5'-ATGTAYRTICCCICGNGG-3'
VP1	2953~2934	5'-GGRTTIGTIGWYTGCCA-3'
2A	3641~3622	5'-TCNACIANICCGICCYTC-3'

结 果

1. 病毒分离:将直接从临床样品中鉴定为 CVB5 的 3 例无菌性脑膜炎患儿的粪便标本,分别接种 RD 和 Hep-2 细胞后,仅培养分离到一个阳性分离物,收集上清,并保存在-70℃。

2. 病毒分离株 VP1 序列测定:将阳性培养物上清,采用特异性引物作 RT-PCR 扩增,均能扩增出柯萨奇 B5 病毒的 831bp 特异性核酸片段;对 PCR 产物

进行基因序列的测定,将结果输入 Genbank,用 BLAST 检索比对,进一步证实该分离株为柯萨奇 B5 病毒。

3. 柯萨奇 B5 病毒分离株 VP1 基因核苷酸和氨基酸分析:VP1 基因核苷酸和氨基酸同源性比较分别显示:KMA193-9 与其他 Cox. B5 病毒分离株核苷酸同源性在 85.4%~95.7% 之间,氨基酸同源性在 95.67%~98.19% 之间(表 2)。KMA193-9 在氨基酸上与其他分离株存在 5 个位点的差异,它们分别是 3 号位点由 P 变为 T、95 位点由 S 变为 N、164 位点由 S 变为 T、188 位点由 G 变为 C、200 位点由 R 变为 K(图 1)。

表 2 KMA193-09 分离株 VP1 基因核苷酸和氨基酸同源性比较(%)

分离株	核苷酸同源性	氨基酸同源性
YZ081-SD-CHN-2005-CB5	95.7	97.83
Cox-B5-Zhejiang-12-02(CFS)	95.6	98.19
02336-SD-CHN-2002-CB5	94.6	98.19
Cox-B5-Zhejiang-13-02	95.3	98.19
1603Finland82	86.2	97.47
175081	94.2	97.83
CB5-SD-sewage-090705-2-3H	93.8	97.47
CF219051-06	85.4	97.11
CF1750891-05	93.4	96.75
CF1861061-05	93.2	95.67
CF2380481-05	94.1	97.83
Kor05-CVB5-237cn	94.7	97.11

参比序列 GenBank 登录号为:GQ246516(YZ081-SD-CHN-2005-CB5);AY695108(Cox-B5-Zhejiang-12-02(CFS));GQ329770(02336-SD-CHN-2002-CB5),AY695109(Cox-B5-Zhejiang-13-02);AJ004643(1603Finland82),AM710996(175081);GV272014(CB5-SD-sewage-090705-2-3H);AM711094(CF219051-06),AM236928(CF1750891-05);AM236934(CF1861061-05),AM236951(CF2380481-05);GU272013(CB3SDsewage0905281-4H),FJ868287(05.350.3337);EU590798(Kor05-CVB5-237cn)

4. 柯萨奇 B5 病毒分离株 VP1 基因进化树分析:将不同时期、不同国家和地区的柯萨奇 B5 病毒采用 DNASTar 软件,构建基因系统进化树(图 2)。结果显示,KMA193-09 分离株(基因登录号 HQ423144)与 YZ081-SD-CHN-2005-CB5 株形成一进化分支。与我国的其余柯萨奇 B5 分离株有一定的距离,与 CB5-SD-sewage-090705-2-3H 分离株共同形成一个较大的分支,而与 1603Finland82 株、CF219051-06 株距离远。

KMA193-09	GPTGEAVERA	IARVADTIGS	GPVNSESIPA	LTAAGTGHTS	QVVPADTMQT	RHVKNYHSRS	ESTVENFLCR
YZ081-SD-CHN-2005-CB5	..P.....						
Cox_B5-Zhejiang-12-02 (CFS)	..P.....						
02336-SD-CHN-2002-CB5	..P.....						
Cox_B5-Zhejiang-13-02	..P.....						
1603Finland82	..P.....						
175081-05	..P.....						
CB5-SD-sewage-090705-2-3H	..P.....						
CF219051-06	..P.....						
CF1750891-05	..P.....				..RN...		
CF1861061-05	..P.....	T.....					
CF2380481-05	..P.....						
Kor05-CVB5-237cn	..P.....	I...F...					
KMA193-09	SACVFYTTYK	NHGTDCGNFG	YWVINTRQVA	QLRRKLEMFT	YARFDLELTF	VITSTQEQT	IQQQDSPVLIT
YZ081-SD-CHN-2005-CB5	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Cox_B5-Zhejiang-12-02 (CFS)	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
02336-SD-CHN-2002-CB5	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Cox_B5-Zhejiang-13-02	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
1603Finland82	N...A...	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
175081-05	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CB5-SD-sewage-090705-2-3H	Y.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CF219051-06	A.....	A.....	I.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CF1750891-05	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CF1861061-05	S.....	S.....	H.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CF2380481-05	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Kor05-CVB5-237cn	N...S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
KMA193-09	HQIMYVPPGG	PVPTKVNSYS	WQTTTNPSVF	WTEGSAPPRM	SIPFISICNA	YSMFYDGWAK	FDKQGTYGIN
YZ081-SD-CHN-2005-CB5	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	M.....
Cox_B5-Zhejiang-12-02 (CFS)	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
02336-SD-CHN-2002-CB5	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
Cox_B5-Zhejiang-13-02	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
1603Finland82	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
175081-05	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
CB5-SD-sewage-090705-2-3H	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
CF219051-06	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
CF1750891-05	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
CF1861061-05	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
CF2380481-05	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
Kor05-CVB5-237cn	S.....	S.....	S.....	G.....	G.....	R.....	R.....
KMA193-09	TLNNMGTLYM	RHYNDGSPGP	IVSTVRIYFK	PKHKVTWVPR	PPRLCQYQKA	GNVNFPTGV	TESRTDI
YZ081-SD-CHN-2005-CB5	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Cox_B5-Zhejiang-12-02 (CFS)	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
02336-SD-CHN-2002-CB5	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Cox_B5-Zhejiang-13-02	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
1603Finland82	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
175081-05	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
CB5-SD-sewage-090705-2-3H	S.....	S.....	S.....	S.....	M.....	S.....	S.....
CF219051-06	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	K.....	S.....
CF1750891-05	S.....	S.....	S.....	H.....	S.....	S.....	S.....
CF1861061-05	KY.....	S.....	S.....	S.....	N.....	S.....	S.....
CF2380481-05	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....
Kor05-CVB5-237cn	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....	S.....

图 1 KMA193-09 分离株 VP1 区氨基酸序列比较

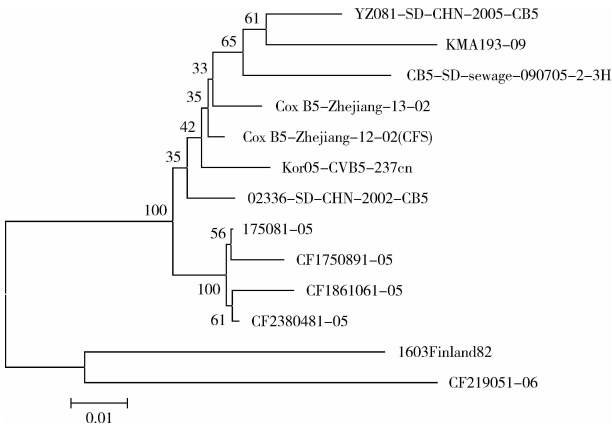


图 2 KMA193-09 病毒分离株 VP1 基因进化树

讨 论

肠道病毒的 VP1 基因不仅是病毒的主要表面抗原的决定簇区,而且具有与病毒血清型完全对应的遗传多样性,目前作为肠道病毒属内不同血清型分类依据,以及小 RNA 病毒科内不同属的分类参考。因此选择 CVB5 VP1 区来分析病毒变异和进化关系。

本次 CVB5 病毒分离中,首先用 RT-PCR 方法检测采集的临床样品,由于 RT-PCR 方法具有快速、灵敏、特异等特点,所以检测出 3 个 CVB5 病毒样品^[8,9]。当接种 Hep-2、RD 细胞后,仅分离得到一株 CVB5 病毒,提示 PCR 法比细胞分离更灵敏,这与文献^[10]报道的一致。

通过对 KMA193-09 病毒分离株 VP1 基因进行系统发生进化树图可以看出,KMA193-09 病毒分离株与中国及其他亚洲的病毒分离株距离较近,而与芬兰、法国等分离株距离较远。而序列分析也显示,KMA193-09 分离株与其他中国分离株之间也显示出一定差异。以上这提示 CVB5 病毒存在明显的地域分布性。

曾有报道 CVB5 病毒在鼠胰腺连续传代 15 代,发现表型发生改变并引起小鼠似糖尿病综合征,而亲代病毒损害腺泡组织有限却 3 天后胰腺感染迹象消失^[11]。通过测序和分析发现全基因序列出 10 个突变,导致 8 个氨基酸突变,其中在 VP1 出现 N95S 突

变;而后研究人员进一步通过反向遗传学发现 VP1 氨基酸 V 94 I 突变使 CVB5 更好适应胰岛 β 细胞株 MIN-6 细胞,认为该位点更重要^[11]。而本研究中 KMA193-09 VP1 的 94 和 95 位氨基酸分别为 I 及 N,这提示该分离株也能较好的在 MIN-6 细胞增殖。

另外, CVB5 病毒在 VP1 的 288 位氨基酸,除 CF219051-06 为赖氨酸(K)外, KMA193-09 与其他病毒分离株均为谷氨酸(E),该位置位于病毒体的表面,赖氨酸为碱性氨基酸,而谷氨酸为酸性氨基酸,这种突变的改变是否影响病毒吸附于细胞表面还有待于进一步的研究^[8]。

本研究阐明了 CVB5 病毒 KMA193-09 分离株结构蛋白 VP1 的基因序列,并对其变异性及与其他 CVB5 的关系进行了分析,为今后 CVB5 的基因库和分子流行病的调查研究提供一定的资料及试验依据。

参考文献

- 1 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001: 579-602
- 2 赵国华,许汴利,朱谦,等. 一起柯萨奇 B5 病毒感染引起疾病暴发的流行病学调查[J]. 中国初级卫生保健,2006,20(8):25-26
- 3 葛琼,严菊英,龚黎明,等. 浙江省 2008 年病毒性脑膜脑炎病原柯萨奇 B 组 5 型病毒 VP1 区基因变异分析[J]. 中国疫苗和免疫,

2010,16(1):38-43

- 4 赵月萍,马明英,王建军,等. 一起爆发型柯萨奇病毒性脑炎的病原分离与鉴定[J]. 安徽预防医学杂志,2001,7(6):401-402
- 5 颜谨,柯昌文,郑焕英,等. 基于 VP4 基因扩增和序列测定快速检测鉴别人肠道病毒的研究[J]. 中国计划免疫,2006,12(6):469-471
- 6 世界卫生组织(WHO)扩大免疫规划和传染性疾病部. 脊髓灰质炎病毒检测手册[R]. 1992
- 7 Oberste MS, Maher K, Williams AJ, *et al.* Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses[J]. Gen Virol, 2006, 87(1): 119-128
- 8 Papa A, Dumaidi K, Franzidou F, *et al.* Genetic variation of coxsackievirus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece. [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2006, 12(7): 688-691
- 9 Audrey Mirand, Christine Archimbaud, Ce'cile Henquell, *et al.* Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak[J]. Journal of Medical Virology, 2006, 78: 1624-1634
- 10 Mark H, Sawyer MD. Enterovirus infections: diagnosis and treatment [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2001, 13: 65-69
- 11 Al-Hello H, Davydova B, Smura T, *et al.* Phenotypic and genetic changes in coxsackievirus B5 following repeated passage in mouse pancreas in vivo[J]. Med Virol, 2005, 75(4): 566-574

(收稿:2011-02-24)

布洛芬肠溶微囊的研制

杜丽娜 张文明 金义光

摘要 目的 以肠溶性高分子材料羟丙基甲基纤维素酞酸酯(HPMCP)为囊材将非甾体抗炎药布洛芬制备成肠溶微囊,对该微囊进行体外释药评价。**方法** 采用 HPMCP 为囊材,硫酸钠溶液为凝聚剂,布洛芬粉末为囊心物,以单凝聚法制成微囊。布洛芬微囊含量测定以无水乙醇为溶媒,超声破碎微囊并提取,用一阶导数分光光度法在 274.2nm 处测定。**结果** 布洛芬微囊无布洛芬刺激性气味,在显微镜下,呈不规则晶体状粒子,粒径 3~25 μ m。微囊含量测定方法简单方便,灵敏度可靠。微囊的载药量为 38.50%。微囊在人工胃液中 2h 内几乎不溶解,而在人工肠液中 2h 释药量达 96.5%。**结论** 将非甾体抗炎药布洛芬制备成肠溶微囊,掩盖了药物的刺激性,可达到胃中不溶而肠中溶解的目的。

关键词 单凝聚法 羟丙基甲基纤维素酞酸酯 肠溶微囊 布洛芬 一阶导数分光光度法

Preparation and Evaluation of Enteric Microcapsules of Ibuprofen. Du Lina, Zhang Wenming, Jin Yiguang. Department of Pharmaceutical Sciences, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

Abstract Objective To prepare enteric microcapsules of anti-inflammatory drug - ibuprofen with hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP). **Methods** Ibuprofen microencapsulation with HPMCP through coacervation by the addition of sodium sulphate solution was investigated on the basis of the temperature-dependent coacervating formation of the polymer. The first-order derivative spectro-

作者单位:100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所药物化学研究室(杜丽娜、金义光);475004 开封,河南大学药学院(张文明)

通讯作者:金义光,副研究员,硕士生导师,电子信箱:jinyiguang@gmail.com