

HBV-DNA 高水平孕妇的 HBV 前 S 和 S 区基因突变及基因分型

尹玉竹*, 张培珍, 章 钧, 周 瑾, 侯红瑛

(中山大学附属第三医院产科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究 HBV-DNA 高水平孕妇的 HBV 前 S(前 S1 和前 S2)及 S 区的基因突变模式和基因分型, 为从病毒因素探讨 HBV 母婴传播免疫阻断失败提供实验基础。【方法】选取血清 HBsAg 阳性且 HBV-DNA ≥ 105 IU/mL 的孕妇 41 例, 提取血清 HBV DNA, 靶向设计 HBV 各基因型的前 S 及 S 区通用引物, 经 PCR 扩增测序进行序列分析, 检测和分析前 S 及 S 区基因的突变情况, 并进行基因分型。【结果】①在 41 例样本中, 共有 29 例(70.73%)样本存在前 S1、前 S2 及 S 区基因突变, 突变方式以碱基置换为主; 前 S1、前 S2 及 S 区基因的突变频率分别为 8.96%、9.88% 和 3.24%, 前 S1 和前 S2 区的突变频率显著高于 S 区 ($P < 0.05$)。②对 41 例样本根据 S 区点突变的特点进行基因分型及同源树簇集分析, 结果 B 基因型 22 例, C 基因型 19 例, 两基因型在全 S 区的基因突变频率相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B、C 两基因型分别形成独立的簇集, 簇集间同源性 $< 90\%$, 但簇集内 B、C 两个基因型的同源性分别达 96% 和 95%。【结论】①HBV-DNA 高水平孕妇的 HBV 前 S 及 S 区的基因突变普遍存在, 突变形式以碱基置换为主, 突变频率以前 S1 和前 S2 区常见, S 区则相对稳定; ②不同 HBV 基因型间同源性差异较大, 按 HBV 不同基因型分别进行前 S 和 S 区基因突变模式的分析将更有意义。

关键词: 乙型肝炎病毒; HBV-DNA 定量; 前 S 和 S 基因区; 基因突变; 基因型

中图分类号: R714.7

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)01-0039-05

Genetic Mutations and Genotypes of HBV Pre S and S Regions in Pregnant Women with High Level Serum HBV-DNA

YIN Yu-zhu*, ZHANG Pei-zhen, ZHANG Jun, ZHOU Jin, HOU Hong-ying

(Department of Obstetrics, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To provide an experimental basis for exploring the reason of HBV maternal vertical transmission immune blocking failure, we studied the mutation profiles and genotypes of hepatitis B virus (HBV) in the Pre S and S regions of pregnant women with high level serum HBV-DNA before delivery. 【Methods】 HBV DNA were extracted from the serum of 41 pregnant women with HBsAg positive and HBV-DNA ≥ 105 IU/mL. Based on the sequence alignment of all HBV genotypes, specific primers targeting all HBV genotypes were designed to amplify the Pre S and S regions of HBV followed by sequence analysis on the sequencing data available. 【Results】 1. Among the 41 cases, 29 cases (70.73%) showed mutations in the Pre S and S regions, substitution was the main mutation model. Among all cases, PreS1, pre S2 and S regions mutations frequency were 8.96%, 9.88%, and 3.24%, respectively, mutation frequency in pre S1 and pre S2 regions were significantly higher than that in S region ($P < 0.05$). 2. Genotypes based on the mutation in S region and homology tree model were analyzed. In the 41 cases, 22 cases were genotype B, and 19 cases were genotype C. The mutation frequency in the Pre S and S regions between genotype B and genotype C were not statistically significant ($P > 0.05$). Genotype B and genotype C had their own clusters, homology rate was less than 90% between cluster B and cluster C, but in the cluster B and cluster C the homology rate were 96% and 95%, respectively. 【Conclusion】 1. Mutations of HBV Pre S and S regions were common in pregnant women with high level serum HBV-DNA before delivery. The most common mutation in the Pre S and S regions of HBV was substitution, mutation frequency in pre S1 and pre S2 regions were higher than that in S region. 2.

收稿日期: 2011-07-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B060600023)

作者简介: 尹玉竹, * 通信作者, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail: izhangpeizhen@163.com

The homology rate between different genotypes was low, and study on the mutation pattern of HBV Pre S and S regions should be analyzed independently in each genotype.

Key words: Hepatitis B virus; HBV-DNA level; Pre S and S regions; Genetic mutation; genotype

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1):39-43]

对 HBsAg 阳性母亲所生新生儿, 出生 24 h 内进行乙肝免疫球蛋白和乙肝疫苗的联合免疫, 阻断的成功率可高达 95% 以上, 但仍有免疫失败发生, 尤其在 HBV-DNA 高水平的孕妇, 其免疫失败率较高^[1]。造成免疫失败的原因除与宫内感染免疫耐受有关外, 还可能与乙肝病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 变异导致免疫逃逸有关。序列分析表明, HBV 基因组 DNA 的 4 个编码框 S 区、C 区、X 区、P 区均可发生变异, 其中 S 区与 HBV 母婴传播免疫阻断密切相关。有研究认为 S 区基因突变可使免疫表位发生改变导致免疫失败^[2]; 前 S 区基因突变可影响 HBV 粘附入胞作用, 进而改变病毒的复制水平导致免疫失败, 而加入前 S 基因序列的新型乙肝疫苗可提高免疫成功率^[3]。但近年来也有研究认为 HBV 前 S 及 S 区基因突变与 HBV 母婴传播免疫阻断失败无明显相关性^[4]。因此, 进一步研究 HBV 前 S 及 S 区基因的突变特征, 尤其是 HBV-DNA 高水平孕妇的 HBV 基因突变特征, 将对探索 HBV 母婴传播免疫阻断失败的病毒因素及研制新型疫苗具有重要意义。本研究对 41 例 HBV-DNA 高水平孕妇血中的 HBV 前 S 及 S 区基因进行 DNA 测序及序列分析, 以探讨 HBV 前 S 及 S 基因的突变模式, 为进一步研究提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本来源 选取在 2009 年 3 月-5 月我院规律产检并住院分娩的血清 HBsAg 阳性且 HBV-DNA 定量 $\geq 1 \times 10^5$ U/mL^[5] 的孕妇 41 例。年龄 21~37 岁, 平均 30(S=4) 岁。所选孕妇均符合以下标准: ① HBsAg 阳性持续时间 ≥ 6 个月, 为 HBV 慢性感染; ② 肝、肾功能正常, 血清甲、丙、丁、戊肝炎系列检查呈阴性; ③ 孕周: 28~42 周。剔除标准: ① 产妇合并自身免疫性疾病; ② 孕期使用抗病毒药物、免疫调节剂和细胞毒性药物, 或长期使用糖皮质激素类药物。

1.1.2 标本收集及处理 所有入选病例均在产前 24 h 内留取静脉血 2 mL, 716 $\times g$ 离心 10 min 后提取 0.2 mL 的血清, 置于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用, 待统一进行检测。

1.2 实验方法

1.2.1 血清病毒 DNA 抽提 根据试剂说明书, 采用血清基因组 DNA 抽提试剂 (达安公司, 广州) 抽提血清 HBV DNA, 将 0.1 mL 待检血清与 0.1 mL 血清 DNA 浓缩液等量混匀, 10 000 $\times g$, 室温离心 10 min; 加 0.03 mL 裂解液至 DNA 沉淀物, 沸水浴 10 min, 10 000 $\times g$ 室温离心 5 min, 上清液置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用, 分批进行检测。

1.2.2 PCR 扩增及其产物的鉴定与分析 分两段 PCR 扩增 HBV 前 S 及 S 基因区, 两个片段长度均 800 bp 左右。PCR 反应体系为 25 μL , 主要包括: 血清病毒 DNA 5 μL 、Platinum Taq DNA 聚合酶 0.2 μL 、10 \times PCR 缓冲液 (不含 Mg 离子) 2.5 μL 、10 mol/L 的 dNTP 混合液 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 0.5 μL (二者的寡核苷酸序列可向作者索取)。PCR 扩增采用 ABI2700 扩增仪, PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 随后, 45 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s; 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。采用含 0.5 g/mL 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳来鉴定 PCR 扩增产物。以 DNA 标志物 M1200-50 (Solarbio, Beijing Solarbio Science & Technology Co.Ltd) 为 DNA 片段条带大小及浓度标准品, 采用凝胶成像分析系统 UVP GDS-8000 分析 PCR 扩增的片段长度 (图 1)。将所得片段送上海英潍捷基公司进行 DNA 测序。

1.2.3 HBV 前 S 及 S 区的 DNA 序列分析 从 Genbank 随机下载中国广东省的 HBV 基因全序列 8 条做参考序列 (AY817515.1、DQ448628.1、DQ478896.1、DQ478899.1、DQ478901.1、NC_003977.1、Y18858.1、AY217370.1)。采用 chromas.exe 软件评估测序结果, DNAMAN 软件比对 DNA 序列, 以 S 基因区的突变位点对血清样本 HBV 进行基因分型^[6], 并利用距离法构建同源树进行同源性分析, 寻找 HBV 前 S 及 S 区的不同样本间及不同基因

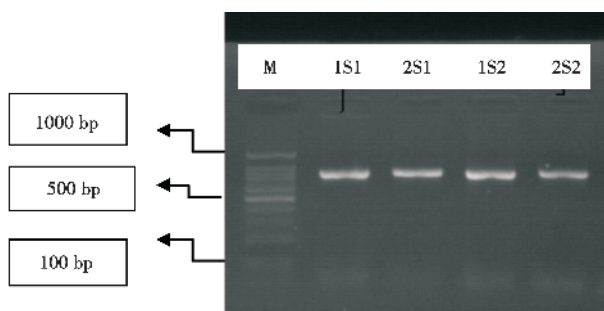


图 1 HBV PreS 及 S 基因 PCR 扩增电泳图

Fig.1 The results of the amplify of the Pre S and S gene regions

M: Marker; S1: Pre-S and a part of S gene regions(835 bp); S2: a part of S gene regions(823 bp)

片段间突变模式。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

41 例孕妇血清样本中的 HBV DNA 均成功进行了基因分型和最终的 DNA 序列分析(图 2)。在 41 例样本中, 有 29 例(70.73%)在 HBV 前 S 及 S 区可检测到一个或多个位点的突变。其中 3 例在前 S1、前 S2 区均发生突变, 3 例在前 S2 及 S 区均发生突变, 8 例在前 S1、前 S2 及 S 区均发生突变, 但三基因区发生基因突变的病患率比较, 差异无统计学意义($P < 0.05$, 见表 1)。就突变频率而言, 在全 HBV-S 基因(前 S1、前 S2 及 S)约 1 209 个碱基中, 发生基因突变 71 个, 除 1 例在前 S2 区第 22 ~ 50 位发生大片段碱基缺失外, 其余均为点突变。点突变中仅 2 例病例分别在 S 区 386 位和 449 位碱基发生插入突变, 插入碱基分别为 G 和 T, 其余均为碱基置换。前 S1 区和前 S2 区基因突变较常见, 突变率分别为 8.96%(32/357) 和 9.88%(17/172); 而 S 区则相对稳定, 突变率仅 3.24%(22/680)。三基因区基因突变率相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 前 S1 区和前 S2 区的基因突变率显著高于 S 区($P < 0.05$), 而前 S1 区和前 S2 区基因突变率相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

对 41 例样本按 HBV S 基因区突变位点的特点进行基因分型, 结果基因型为 B 型和 C 型者分别为 22 例和 19 例。两基因型在全 S 区的基因突

变频率相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 见表 3)。但在同源树簇集分析中, 发现 B、C 两个基因型形成各自的簇集, 两基因型间的同源性 $< 90%$, 而两基因型内的同源性分别达 96% 和 95%(图 2)。

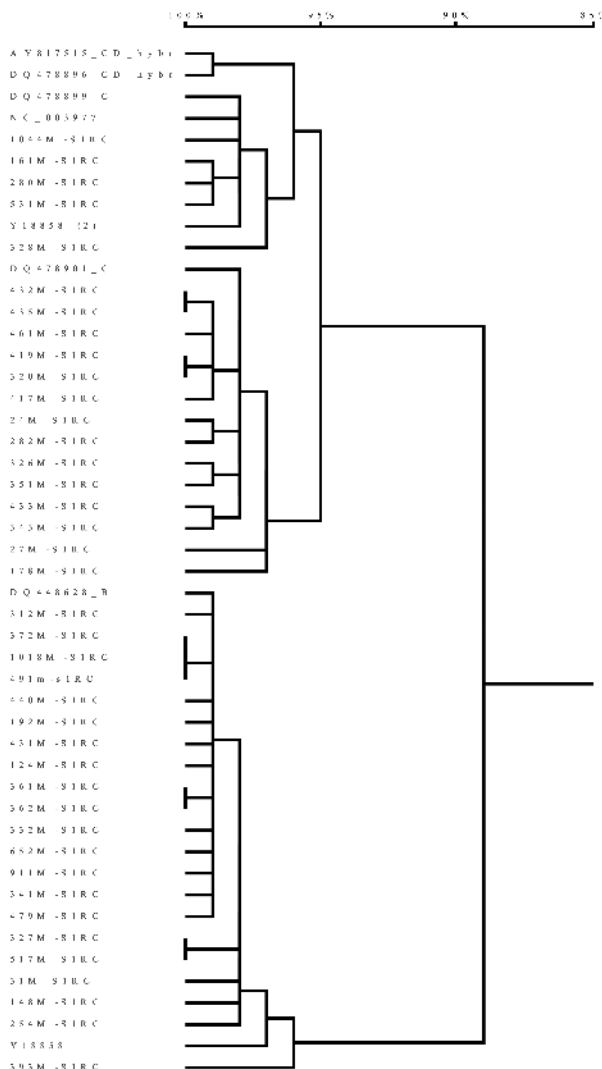


图 2 血清 HBV-DNA 定量 $\geq 10^5$ U/mL 的孕妇产前 HBV 前 S 及 S 区的同源树分析模型

Fig.2 Homology tree model of the Pre S and S gene regions of the serum of pregnant women with HBV-DNA $\geq 10^5$ U/mL before delivery

表 1 前 S1、前 S2 及 S 区基因突变的病患率

Table 1 Prevalence of mutations in preS1, preS2 and S regions

Gene regions	Cases	Mutation number	Percentage/%	χ^2	P
Pre S1	41	21	51.22	1.66	0.44
Pre S2	41	16	39.02		
S	41	16	39.02		
Total	123	53	43.09		

表 2 前 S1、前 S2 及 S 区三区基因突变率的比较
Table 2 Comparison of mutation frequency in pre S1, pre S2 and S regions

Gene regions	Base number	Mutation number	Percentage/%	χ^2	<i>P</i>
Pre S1	357	32	8.96	0.76	0.75 ²⁾
Pre S2	172	17	9.88	13.80	0.001 ³⁾
S	680	22	3.24	12.22	0.001 ⁴⁾
Total	1209	71	5.87	17.42	0.001 ¹⁾

1)Comparison of mutation frequency in pre S1, pre S2 and S gene regions;2)Comparison of mutation frequency in pre S1 and pre S2 gene region;3)Comparison of mutation frequency in pre S2 and S gene regions;4)Comparison of mutation frequency in pre S1 and S gene regions

表 3 B、C 两种基因型全基因突变率的比较
Table 3 Comparison of mutation frequency in HBV-S region between B and C genotypes

Genotypes	Cases	Mutation number	Percentage/%	χ^2	<i>P</i>
B	22	16	63.64	1.10	0.36
C	19	13	47.37		
Total	41	29	53.66		

3 讨 论

母婴垂直传播为 HBV 感染的主要途径之一,现有对新生儿所实施的联合免疫方案成功率虽可达 95%以上,但仍有部分新生儿未能通过此方案获得成功免疫,存在一定的失败率,其与宫内感染以及 HBV 变异有关。在 HBV 基因组 DNA 4 个编码框中,S 基因与 HBV 免疫应答密切相关,S 基因可进一步分为前 S (前 S1、前 S2) 区和 S 区,其中,S 区转录的表面蛋白有联合免疫的作用表位,前 S 与 HBV 粘附入胞作用密切相关,可以影响病毒复制;还存在免疫应答的辅助作用位点以影响宿主的免疫应答^[7]。由于 HBV 具有高度复制能力,可以 10^{12} 毒粒(virion)/d 的速度进行复制,且基因组小(3.2 kb),逆转录酶又缺乏校正酶的活性,因此,HBV 具有很高的突变频率,理论上,每天均能产生一个单基因突变^[8]。有研究认为 S 区基因突变可使免疫表位发生改变导致免疫失败^[2];前 S 区基因突变可导致病毒粘附能力改变,影响病毒复制,使宿主体内 HBV-DNA 水平改变;还可影响宿主的免疫应答,导致免疫失败^[9]。Shen 等^[10]

对 1 对发生垂直传播的母子血清病毒样本进行克隆测序后认为:前 S 区大片段碱基缺失突变可通过影响病毒粘附入胞作用进一步改变 HBV-DNA 定量,导致 HBV 母婴传播。但近来也有学者认为 HBV S 基因突变形成的病毒变异不是影响母婴传播免疫阻断失败的主要原因^[11]。Xu 等^[12]对 15 对已发生 HBV 母婴传播的病例进行病例对照研究认为:在前 S 及 S 区,基因突变的发生率在 HBV-DNA 低水平的病例中高于 HBV-DNA 高水平的病例,即此区的基因突变未必影响 HBV-DNA 定量,此研究中发现的突变均为点突变,无大片段的碱基缺失突变。

本研究 41 例 HBV-DNA 高水平孕妇的样本中,有 29 例在 HBV 前 S 及 S 基因区检测到一个或多个位点的突变;除 1 例样本出现前 S 区大片段碱基缺失外,其余均为点突变。就突变频率而言,发生在前 S1 区和前 S2 区的基因突变较常见,突变率分别达 8.96% 和 9.88%;S 区突变率为 3.24%。说明 HBV 全 S 基因的突变是普遍存在的,且以前 S 基因区突变为主,其可能影响 HBV 母婴传播免疫阻断的免疫应答而造成免疫失败。目前,有关 HBV 前 S 及 S 区基因突变与 HBV 母婴传播免疫阻断失败相关性的研究,样本量均较小,所报道的基因突变位点及突变方式不同,由此,可能产生不同的分子致病学机制,而得到不同的结论。因此急需大样本前瞻性的病例对照研究,本研究为此提供了一定的实验基础。

有关 HBV 的基因分型,目前研究认为 HBV 病毒株可分为 A-J 10 个基因型^[13],HBV 不同基因型的分布存在种族和地域差别。Zeng 等对我国 9 个省市 1096 份样本的调查发现,在我国流行的 HBV 基因型主要为 B 型和 C 型,北方以 C 型为主,南方则以 B 型较常见。广东地区主要为 B 型和 C 型,B 型稍多于 C 型^[14-15]。本研究 41 例样本中 B 型 22 例,C 型 19 例,未发现其它基因型。有研究认为 HBV 基因型与 HBV 感染及临床治疗结局密切相关^[16]。不同基因型的 HBV 其 HBeAg 血清学的转换时间长短不同,血清 HBeAg 阳性又是发生病毒传播的重要原因,故 HBV 不同基因型的传播方式不同,其中 B、C 基因型以母婴垂直传播为主,A、D 基因型相比之下则更容易发生水平传播^[17]。Su 等^[9]对 457 例 HBsAg 阳性母亲所生的新生儿(其中 6 例最终感染)进行追踪调查认为:母

婴垂直传播率可能取决于 HBV 基因型, C 基因型更容易发生母婴传播。本研究在对 HBV DNA 序列进行同源树簇集分析发现, 虽然 B、C 两种基因型在全 S 基因区的突变率相比, 差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$), 但 B、C 两基因型具有各自的簇集, 两基因型间的同源性 $< 90\%$, 而 B、C 两基因型内的同源性分别高达 96% 和 95% 。提示 HBV 不同基因型的前 S 及 S 区基因差别较大, 其产生的基因突变方式和位点也可能差别较大, 由此可能产生不同的分子致病机制和免疫损伤机理, 因此, 按 HBV 不同基因型分别进行前 S 及 S 区突变模式的分析将更有意义。

由本研究可发现, HBV 前 S 及 S 区基因具有较高的突变率和复杂的突变模式, 并且基因序列在不同的病毒基因型间差别较大。因此, 进一步从基因分型的角度去分析 HBV 前 S 及 S 区基因的突变模式, 对探索 HBV S 基因突变与 HBV 母婴传播免疫阻断失败的相关性, 以及研制新型乙肝疫苗具有重要的价值。

参考文献:

- [1] Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, et al. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(3): 355-363.
- [2] Cheng H, Su H, Wang S, et al. Association between genomic heterogeneity of hepatitis B virus and intrauterine infection [J]. *Virology*, 2009, 387(1): 168-175.
- [3] Hellstrom UB, Madalinski K, Sylvan SP. PreS1 epitope recognition in newborns after vaccination with the third-generation Sci-B-Vac vaccine and their relation to the antibody response to hepatitis B surface antigen [J]. *Virology*, 2009, 6(1): 7-14.
- [4] Davaalkham D, Ojima T, Uehara R, et al. Analysis of hepatitis B surface antigen mutations in Mongolia: molecular epidemiology and implications for mass vaccination[J]. *Arch Virol*, 2007, 152(3): 575-584.
- [5] Liu SL, Dong Y, Zhang L, et al. Influence of HBV gene heterogeneity on the failure of immunization with HBV vaccines in eastern China[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(9): 437-443.
- [6] Magnus LA. Genotypes, nt 1858 Variants, and Geographic Origin of Hepatitis B Virus-Large-Scale Analysis Using a New Genotyping Method [J]. *J Infect Diseases*, 1997, 175(8): 1285-1293.
- [7] Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, et al. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 2): 369-378.
- [8] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1574-1585.
- [9] Su HX, Zhang YH, Zhang ZG, et al. High Conservation of Hepatitis B Virus Surface Genes during Maternal Vertical Transmission despite Active and Passive Vaccination[J]. *Intervirology*, 2011, 54(3): 122-130.
- [10] Shen T, Yan XM, Zou YL, et al. Virologic characteristics of hepatitis B virus in patients infected via maternal-fetal transmission[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5674-5682.
- [11] Su HX, Zhang YH, Zhang ZG, et al. High Conservation of Hepatitis B Virus Surface Genes during Maternal Vertical Transmission despite Active and Passive Vaccination[J]. *Intervirology*, 2011, 54(3): 122-130.
- [12] Xu H, Peng M, Qing Y, et al. A Quasi species of the pre-S/S gene and mutations of enhancer II/core promoter/pre-C in mothers and their children infected with hepatitis B virus via mother-to-infant transmission [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(1): 88-97.
- [13] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J [J]. *J Virol*, 2009, 83(20): 10538-10547.
- [14] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(6): 609-617.
- [15] 肖蕾, 王雪刚, 曾国兵, 等. 中国广东地区乙型肝炎病毒基因亚型的分布[J]. *肝脏*, 2006, 11(3): 149-151.
- [16] Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 Suppl 1: 123-130.
- [17] McMahon B J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B[J]. *Hepatol Int*, 2009, 3(2): 334-342.

(编辑 张恩健)