

· 临床论著 ·

## 慢性乙型肝炎患者 HBsAg“a”决定簇变异与 HBV 基因型的相关性

林太杰 高海兵 林明华 潘晨 王香梅 黄水文

**【摘要】 目的** 探讨 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者 HBsAg“a”决定簇氨基酸(AA)变异与 HBV 基因型的相关性。**方法** 对 99 例 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者进行 HBV S 基因直接测序,分析 HBV 基因型及 HBsAg“a”决定簇的 AA 变异,并应用 Logistic 回归分析其相关性。**结果** B 基因型占 52.5% (52/99),C 基因型占 47.5% (47/99),未发现其他基因型;HBsAg AA126 Thr 存在变异,而 AA124、131、133、139、141、145 未发现变异及 AA122~124 未发现缺失或插入,其中 AA126 Thr 占 52.5% (52/99),Ile 占 39.4% (39/99),Ser 占 4.0% (4/99),Ala 占 4.0% (4/99);AA126 Thr 变异为 Ile 在 C 基因型中多见( $\chi^2 = 35.201, P < 0.001, OR = 48.125$ )。**结论** HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者 HBsAg“a”决定簇 AA 变异多发生在 AA126 Thr 变异为 Ile,且基因型 C 较基因型 B 更易发生 AA126 Ile 变异。

**【关键词】** 乙型肝炎,慢性;“a”决定簇;基因型

**Relationship between mutations within HBsAg “a” determinant and HBV genotypes in chronic hepatitis B patients** LIN Tai-jie, GAO Hai-bing, LIN Ming-hua, PAN Chen, WANG Xiang-mei, HUANG Shui-wen. Department of Hepatology, Fuzhou Municipal Hospital of Infectious Diseases, The Affiliated Infectious Diseases Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: LIN Ming-hua, Email: fulmh@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To study the relationship between mutations within HBsAg “a” determinant and HBV genotypes in HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) patients. **Methods** All 99 HBeAg-positive CHB patients were recruited for research. HBV genotypes and mutations within HBsAg “a” determinant were assayed by sequencing HBV S gene, and then Logistic regression was used to identify their correlation. **Results** HBV genotypes in all patients were B and C, 52.5% (52/99) and 47.5% (47/99), respectively, and other genotypes were not found. There were mutations at amino acid position of 126 in HBsAg “a” determinant, but not at amino acid

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.01.008

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,Email:fulmh@yahoo.com.cn

position of 124, 131, 133, 139, 141 or 145. Also there were no deletions or insertions at amino acid position from 122 to 124. At amino acid position of 126 in all patients, threonine were 52.5% (52/99), isoleucine were 39.4% (39/99), serine were 4.0% (4/99) and alanine were 4.0% (4/99). Furthermore, the substitutions of threonine to isoleucine were found more often in genotype C than B ( $\chi^2 = 35.201$ ,  $P < 0.001$ ,  $OR = 48.125$ ). **Conclusions** The mutations in HBsAg "a" determinant are found more often at amino acid position of 126, where threonine can be substituted to isoleucine more often than serine and alanine. Furthermore, the substitutions of threonine to isoleucine are found more often in genotype C than B.

**【Key words】** Hepatitis B, chronic; "a" determinant; Genotype

HBV 是变异率较高的 DNA 病毒,其基因突变与基因型均为其异质性的体现。S 基因位于核苷酸第 155 ~ 833 位,编码由 226 个氨基酸组成(amino acids, AA)的外膜主蛋白即 HBsAg,后者是引起机体产生保护性免疫的主要成分,其包含一个优势共同抗原表位称为"a"决定簇,位于 AA124 ~ 147 位,是 HBV 各血清亚型的共同决定簇。S 基因的某些位点变异可以使"a"决定簇的二级或三级结构改变,成为免疫逃逸株。已有研究发现 HBsAg"a"决定簇 AA145Gly 变异为 Arg, AA141 Lys 变异为 Glu,与 E 基因型关系密切,提示 HBsAg"a"决定簇氨基酸变异与基因型关系密切<sup>[1]</sup>。而我国 HBV 主要以 B、C 基因型为主,其中北方以 C 基因型为主,南方以 B 基因型为主<sup>[2]</sup>,福建省 HBV 感染以 B 基因型为主,其次是 C 基因型,D 基因型少数分布<sup>[3]</sup>。为此,本课题就 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者 HBsAg"a"决定簇 AA 变异与 HBV 基因型,主要是与基因型 B、C 的相关性作以下探讨。

## 资料和方法

### 一、研究对象

选择 2009 至 2010 年在福州市传染病医院就诊的福建部分地区(包括福州市、莆田市、宁德地区)99 例 HBeAg 阳性的 CHB 患者作为研究对象,诊断标准按中华医学会肝病学会、感染病学分会制定的慢性乙型肝炎防治指南诊断标准<sup>[4]</sup>,分别记录患者的性别、年龄、首次就诊时丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBV DNA 载量、体重指数(body mass index, BMI)及家族史(即父母或兄弟姐妹中至少有 1 个 HBsAg 阳性)等,所收集资料由 Microsoft Excel 2003 软件建立数据库。

1. 入选标准:HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性持续 6 个月以上且 HBsAb 阴性;年龄 18 ~ 60 岁;HBV DNA 载量  $\geq 10^5$  拷贝/ml;ALT  $\geq 2 \times \text{ULN}$ ,且入选前 6 个月内有确证的 ALT 升高史。

2. 排除标准:急性乙型肝炎;肝衰竭;肝硬化;原发性肝癌;合并药物肝、酒精肝或脂肪肝;合并其他肝炎病毒感染(HAV、HCV、HDV、HEV、CMV、EBV)及其他严重疾病(严重心、肺、肾疾患,精神病,恶性肿瘤,糖尿病等);入选前使用抗病毒

药物;入选前6个月内或治疗期间接受免疫抑制剂、免疫调节剂治疗;合并自身免疫性肝病或系统性自身免疫性疾病。

## 二、主要试剂

HBV 血清标志物检测 ELISA 试剂盒为厦门晶美生物工程公司产品,HBV DNA 定量检测试剂盒为深圳匹基生物公司产品。

## 三、实验方法

1. 生化指标及血清标志物检测:肝功能采用美国 Beckman CX9 ALX 型全自动生化分析仪及其配套试剂检测,HBV 血清标志物采用 ELISA 检测,HBV DNA 载量采用实时荧光定量 PCR 检测。所有检测均严格按照试剂盒说明书进行操作。

2. HBV S 基因直接测序:将 99 例患者血清标本收集后,由上海申友生物技术有限公司进行引物设计,样本 HBV DNA 提取、纯化及 S 基因测序。根据测序结果对 HBV 基因型及 HBsAg“a”决定簇的 AA124、126、131、133、139、141、145 位点和 AA122~124 可能存在的变异进行分析。

## 四、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。多因素分析时先行单因素 Logistic 回归分析,对  $P < 0.10$  的指标再进行多因素 Logistic 回归分析(以  $P < 0.05$  为标准),并计算比值比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(confidence interval, CI)。

# 结 果

## 一、研究对象基本资料

99 例患者中,男性占 81.8% (81/99),女性占 18.2% (18/99),阳性家族史者占 46.5% (46/99),平均年龄( $31.8 \pm 9.4$ )岁,平均 BMI( $21.9 \pm 2.4$ ) kg/m<sup>2</sup>,平均 ALT 水平( $194.4 \pm 98.0$ ) U/L,平均 HBV DNA 载量( $7.52 \pm 0.96$ ) log<sub>10</sub> 拷贝/ml。B 基因型占 52.5% (52/99),C 基因型占 47.5% (47/99),未发现其他基因型;HBsAg AA126 Thr 存在变异,而 AA124、131、133、139、141、145 未发现变异及 AA122~124 未发现缺失或插入,其中 AA126 Thr 占 52.5% (52/99),Ile 占 39.4% (39/99),Ser 占 4.0% (4/99),Ala 占 4.0% (4/99)。

## 二、HBsAg AA126 Thr 变异为 Ile 与基因型的相关性

由于 HBsAg AA126 由 Thr 变异为 Ser、Ala 的例数较少(各为 4 例),故未予以统计分析,仅对 AA126 Thr 和 AA126 Ile 与 HBV 基因型的关系行单因素和多因素 Logistic 回归分析(表 1~2),结果发现 HBV 基因型 B、C 与 AA126 Thr 变异为 Ile 有关,即 C 基因易发生 AA126 Ile 变异,而此变异与家族史、ALT、HBV DNA 载量等无关。

# 讨 论

本研究利用非条件 Logistic 回归分析,排除混杂因素,从而更合理地分析慢性乙型肝炎患者 HBsAg“a”决定簇 AA 变异与 HBV 基因型的相关性,具有重要的

科学意义,对 HBV 基因学的研究有一定指导意义。

表1 AA126 Thr、AA126 Ile 与 HBV 基因型的关系(单因素 Logistic 回归分析)

组别	性别 [(n)%]		家族史 [(n)%]		基因型 [(n)%]	
	男	女 <sup>b</sup>	阴性	阳性 <sup>b</sup>	B	C <sup>b</sup>
AA126 Ile	31(79.5)	8(20.5)	19(48.7)	20(51.3)	4(10.3)	35(89.7)
AA126 Thr	44(84.6)	8(15.4)	28(53.8)	24(46.2)	44(84.6)	8(15.4)
<i>B</i>	0.350		0.205		3.874	
<i>Wald</i> $\chi^2$	0.402		0.234		35.201	
<i>P</i>	0.526		0.628		0.000	
<i>OR</i>	1.419		1.228		48.125	
95% CI	0.481 ~ 4.190		0.535 ~ 2.821		13.385 ~ 173.035	
组别	年龄 <sup>a</sup> (岁)		BMI <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )		ALT <sup>a</sup> (U/L)	
AA126 Ile	34.5 ± 8.9		22.4 ± 2.5		191.3 ± 93.7	
AA126 Thr	29.6 ± 9.8		21.5 ± 2.3		194.3 ± 106.3	
<i>B</i>	-0.055		-0.160		0.000	
<i>Wald</i> $\chi^2$	5.417		3.079		0.02	
<i>P</i>	0.020		0.079		0.889	
<i>OR</i>	0.947		0.852		1.000	
95% CI	0.904 ~ 0.991		0.712 ~ 1.019		0.996 ~ 1.004	

注:<sup>a</sup> 为在两组间数据以  $\bar{x} \pm s$  表示;<sup>b</sup> 为参照

表2 AA126 Thr、AA126 Ile 与 HBV 基因型的关系(多因素 Logistic 回归分析)

临床参数	多因素分析			
	<i>B</i>	<i>Wald</i> $\chi^2$	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% CI)
HBV 基因型 B	3.874	35.201	0.000	48.125
HBV 基因型 C <sup>a</sup>				(13.385 ~ 173.035)

注:<sup>a</sup> 为参照,表2为表1延续,多因素分析采用后向消去法,显示最后一步结果就是有统计学意义的参数

我国 HBV 基因型以 B 和 C 型为主,因南北地域分布而比率不同<sup>[5]</sup>。本研究对福建省部分地区 HBeAg 阳性 CHB 患者进行基因分型,结果显示以基因型 B 为主(52.5%),基因型 C 占 47.5%,未发现其他基因型,其中基因型 B 的比例低于本省胡盈莹等<sup>[3]</sup>及郭燕等<sup>[6]</sup>的研究结果(分别是 63.8% 和 68.2%),这可能与病例选择不同有关。

研究发现 HBV 全基因组核苷酸的自然替代速率为  $2.1 \times 10^{-5}$  位点/年<sup>[7]</sup>,而 HBV S 区的核苷酸自然替代率为  $5.1 \times 10^{-4}$  位点/年<sup>[8]</sup>。在本研究中,研究对象均未接受过抗病毒治疗,所以影响 HBV S 区变异的因素只有 HBV 自身与机体的免疫状况,可以说能够较好地反映与 HBV 基因型的相关性。HBsAg“a”决定簇是 HBV 各血清亚型的共同决定簇,由 AA124 与 137、139 与 147 位之间的半胱氨酸残基经二硫键形成两个环,这两个环在维持 HBsAg 抗原性方面有重要意义。其中第二个环是优势“a”决定簇所在,AA141 ~ 145 是抗体结合必需的部位。“a”决



定簇变异与 HBV 基因型关系密切。其中 AA145 Gly 变异为 Arg, AA141 Lys 变异为 Glu, 与 E 基因型关系密切, 可能与 E 基因型 HBsAg AA140 为 Ser, 而其他基因型该位点为 Thr 有关<sup>[1]</sup>。本研究也发现 AA126 变异与基因型有关, 即 C 型易发生 AA126 Thr 变异为 Ile, 相关机制目前尚不明确, 可能与 B、C 基因型某些位点 AA 不同有关。王继杰等<sup>[9]</sup>认为, HBsAg“a”决定簇 AA 变异的危险程度与病毒基因型和血清型有明显相关性, 基因型 B 和 adw2 血清亚型携带者受免疫后出现基因变异的 OR 值分别为 31.7 和 28.9, 而 C 基因型和 adr 血清型的 OR 值仅为 1.3 和 0.9, 有异于本研究结论, 是否与选择的研究对象均为 HBeAg 阳性者有关, 还需要进一步探讨。

S 基因的某些位点变异可以使“a”决定簇的二级或三级结构改变, 发生免疫逃逸从而影响 HBV 感染的临床表现和免疫原性。在乙肝疫苗接受者或接受免疫球蛋白治疗的肝移植病例中发现 HBV 外膜氨基酸的替代, 使得 HBsAg 无法被清除<sup>[10]</sup>。在体外试验中, 当 HBsAg 126 位上为丝氨酸时, HBsAg 与 HBsAb 的结合力明显下降, 认为该位点变异可能与 HBV 免疫逃逸有关<sup>[11]</sup>。但本研究发现 AA126 Thr 变异为 Ile 与家族史、ALT 及 HBV DNA 水平无关。更值得一提的是, 本研究 AA126 Thr 变异为 Ile、Ser、Ala 的患者均为 HBsAg 阳性且 HBsAb 阴性, 并未表现出免疫逃逸现象。任红等<sup>[12]</sup>也报道, 在酶免疫分析(EIA)反应中, AA126 位变异体能与抗“a”决定簇单克隆抗体(英国 Wellcozyme)结合。本研究认为可能原因是变异位点不是在第二个环(优势“a”决定簇所在), 未改变 HBsAg 抗原反应性或抗原反应性虽有改变, 但仍能被多数诊断试剂检出。白玉等<sup>[13]</sup>也认为“a”决定簇氨基酸的置换位置和特性对抗原性的影响各有不同。

综上, HBsAg“a”决定簇变异与 HBV 基因型的关系密切, 其意义需要在临床实践中进一步探讨。

## 参 考 文 献

- 1 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*, 1995, 38(1-2): 24-34.
- 2 Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotype in China. *J Viral Hepat*, 2005, 12(6): 609-617.
- 3 胡盈莹, 江家骥, 欧文湖, 等. 福建省部分地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(3): 251-255.
- 4 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(2): 881-891.
- 5 申元英. 中国大陆乙型肝炎病毒基因分型的研究进展. *大理学院学报*, 2006, 5(8): 50-53.
- 6 郭燕, 郑能雄, 姚栩, 等. 福州市乙肝病毒基因型和基因亚型的分布及其与前 C、C 基因启动子变异的关系. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(10): 731-734.
- 7 Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 4): 693-712.
- 8 Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. *J Viral Hepatol*, 2008, 15(4): 239-245.
- 9 王继杰, 颜天强, 李乔生, 等. 单纯乙型肝炎疫苗免疫后表面抗原携带者“a”决定簇基因变异的分子流行病学特征. *实用预防医学*, 2002, 9(2): 106-108.
- 10 He C, Nomura F, Itoga S, et al. Prevalence of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: a prospective study in 176 restaurant employees. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(12): 1373-1377.

- 11 Ren F, Tsubota A, Hirokawa T, et al. A unique amino acid substitution, T126I, in human genotype C of hepatitis B virus S gene and its possible influence on antigenic structural change. *Gene*, 2006, 383(11): 43-51.
- 12 任红, Harrison T. 重组 HBsAg 免疫逃逸突变体的表达及其抗原性分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996, 16(2): 130-132.
- 13 白玉, 夏国良, 贾志远, 等. 常见乙型肝炎病毒表面抗原突变体的抗原性分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(1): 31-34.

(收稿日期: 2010-05-05)

(本文编辑: 孙荣华)

林太杰, 高海兵, 林明华, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBsAg“a”决定簇变异与 HBV 基因型相关性[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2011, 5(1): 47-52.