

HBV S基因变异与临床疾病的关系

许正锯 潘兴南 魏开鹏 杨环文 李树清 黄志杰

【摘要】 目的 探讨泉州地区乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染者HBV S基因变异与临床疾病的关系。**方法** 采用PCR产物直接测序技术对43例慢性HBV感染者的HBV S区进行序列测定及分析。**结果** 43例慢性HBV感染者中共检出基因B型29例(29/43, 67.44%), C型14例(14/43, 32.56%); 血清学分型adw型28例(28/43, 65.12%), adr型14例(14/43, 32.56%), ayw型1例(1/43, 0.02%)。43例慢性HBV感染者共检出HBsAg氨基酸(aa)变异位点32个, 较常见的aa变异位点为sY200F、sM213I、sI126T和sF85C, 这些变异位点多见于肝功能衰竭患者。HBV主要亲水区(MHR)共检出aa变异19例(19/43, 44.19%), aa替换位点12个。MHR区最常见的变异位点为aa126(7/23, 30.43%), 其次为aa140(3/23, 13.04%)。基因B型患者中sT126I/A变异2例(2/29, 6.90%), 基因C型患者中sI126T变异5例(5/14, 35.71%), 基因C型患者中aa126变异率显著高于基因B型($\chi^2 = 5.753, P < 0.05$)。肝功能衰竭患者aa126变异率为26.67%(4/15), 高于慢性乙型肝炎患者10.71%(3/28), 但差异无统计学意义($\chi^2 = 1.824, P > 0.05$)。肝功能衰竭患者HBV S基因变异率在“a”决定簇上显著高于慢性乙型肝炎($\chi^2 = 4.268, P < 0.05$)。**结论** 泉州地区HBV基因型(血清型)以B型(adw)为主, 其次为C型(adr)。部分HBV S区基因变异与HBV基因型的异质性有关, 可能与严重肝病有一定的相关性。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; S基因; 变异

The correlationship between hepatitis B surface antigen gene mutations and clinical diseases XU Zheng-ju, PAN Xing-nan, WEI Kai-peng, YANG Huan-wen, LI Shu-qing, HUNAG Zhi-jie. Clinical Liver Diseases Research Center, Nanjing Military Command, The 180th Hospital of PLA, Quanzhou 362000, China
Corresponding author: XU Zheng-ju, Email: h180@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlationship between hepatitis B surface antigen gene mutations and clinical diseases in patients with chronic hepatitis B in Quanzhou area. **Methods** Surface gene region of 43 patients with chronic HBV infection was amplified by PCR and mutations were analyzed after sequencing. **Results** Among 43 chronic HBV infected patients, the distributions of genotypes were B (29/43, 67.44%) and C (14/43, 32.56%), while that of subtypes were adw (28/43, 65.12%), adr (14/43, 32.56%) and ayw (1/43, 0.02%), respectively. Total of amino acid 32 (aa) mutations of hepatitis B surface antigen (HBsAg) were observed in these patients. The most common aa mutations including sY200F, sM213I, sI126T and sF85C, which were usually found in patients with hepatitis failure. Nineteen (19/43, 44.19%) aa mutations and 12 substitutions were found in HBV major hydrophilic region. The mutation of aa126 was the most common (7/23, 30.43%) mutation in MHR region, and there after was aa140 (3/23, 13.04%). sT126I/A mutation was found in 2 (2/29, 6.90%) cases with genotype B, while sI126T mutation was found in 5 (5/14, 35.71%) cases with genotype C. The mutation rate of aa126 in patients with genotype C was significantly higher than that of genotype B ($\chi^2 = 5.753, P < 0.05$). The mutation rate of aa126 in patients with liver failure (4/15, 26.67%) was higher than that of chronic hepatitis B (3/28, 10.71%), but with no statistical significance ($\chi^2 = 1.824, P > 0.05$). The mutation rate of surface antigen gene in “a” determinant was higher in patients with

liver failure than that of chronic hepatitis B ($\chi^2 = 4.268, P < 0.05$). **Conclusions** The most common genotype of HBV in Quanzhou area are B (adw) and C (adr). Some HBV surface antigen gene mutations were correlated with HBV genotype heterogeneity, which may be correlated with serious liver disease.

【Key words】 Hepatitis B virus; Surface gene; Mutation

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 在逆转录过程中, 由于HBV聚合酶/逆转录酶缺乏校对酶的作用, 常发生核苷酸 (nt) 的配对错误。HBV S区基因变异后可引起HBsAg氨基酸 (amino acid, aa) 的变化, 使HBsAg构象发生改变, 从而使其抗原性和免疫原性都发生变化。目前有关HBV S区基因变异与乙肝疫苗免疫失败、肝移植乙肝免疫球蛋白逃逸、隐匿性HBV感染等方面的研究较多^[1-2], 而有关HBV S区基因变异对临床疾病影响方面的研究较少。本研究采用PCR产物直接测序技术对43例慢性HBV感染者的HBV S区基因进行序列测定及分析, 旨在探讨慢性HBV感染者HBV S区基因变异与临床疾病进展的关系。

资料与方法

一、血清标本的收集

43例血清标本均来自本院2007年1月至2010年12月收治的泉州地区慢性HBV感染者, 其中慢性乙型肝炎患者28例, HBV相关的慢加急性和慢加亚急性肝功能衰竭患者15例; 本组患者中男性35例, 女性8例, 年龄15~56岁, 血清HBeAg阳性者26例 (60.47%), 血清HBV DNA为 (7.39 ± 0.75) 拷贝/ml。43例患者均未接受抗病毒治疗, 诊断标准均符合2010年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[3]和2006年制定的《肝衰竭诊疗指南》^[4]。空腹抽血5 ml作为标本, 新鲜分离血清, -25℃保存, 待整批检测。

二、检测方法

1. 血清HBV标志物检测: 血清HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc和IgG等均采用放射免疫法检测, 试剂由北京北方生物研究所提供, GC1200型 γ 放射免疫计数器由合肥科大创新中佳分公司生产。

2. 血清HBV DNA水平检测: 采用荧光定量PCR技术, *Taq*酶、脱氧尿嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶糖基化酶购自上海华美生物工程公司。标准品, 阴、阳性对照物, PCR缓冲液均购自上海复星实业公司。引物序列由上海申友公司合成。荧光定量基因扩增仪为Roche Light Cycler公司产品, 配备

Version 5.32分析软件, 自行处理相关数据。HBV DNA测定的灵敏度为 5.0×10^2 拷贝/ml。

3. HBV基因扩增: HBV DNA提取: 取血清10 μ l加裂解液50 μ l混匀, 94℃变性10 min, 混匀, 14 000 r/min离心5 min (离心半径 $r = 7$ cm), 弃上清液。HBV DNA扩增: 取以上DNA提取液行套式PCR, 反应总体积为30 μ l。设计针对S基因区第一轮扩增的外引物对: HBMF1 (5' - AGGACCCCTGCTCGTGTTAC-3', nt181-200), HBMR2 (5' -CANACTTTCCAATCARTWGG-3', nt970-989)。扩增条件: 预变性96℃ 2 min \rightarrow 94℃ 45 s \rightarrow 55℃ 45 s \rightarrow 72℃ 45 s, 扩增25个循环。第2轮扩增的内引物对: HBMF2 (5' - CTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3', nt253-272), HBMR2 (5' -ACATATCCCATGAAGTTAAG-3', nt868-887), 扩增条件: 37℃ 20 min, 94℃ 300 s, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 45 s, 扩增35个循环, 扩增产物片段长度为634 bp。9700型基因扩增仪为美国PE公司产品, 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

4. HBV S基因测序及生物学分析: HBV DNA扩增后的PCR产物由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。采用ABI 3730XL型测序仪, 测序引物为HBMF2 (5' -CTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3', nt253-272)。在GenBank中选取HBV基因型的参考株序列作为参比对照。应用BioEdit软件比对参考株序列和样品株序列, 用Mega软件构建进化树图, 确定样品的HBV基因型。应用Chromas软件比对nt序列及aa序列, 以HBV S基因的第122位赖氨酸/精氨酸判断d/y亚型, 以160位赖氨酸/精氨酸判断w/r亚型。

三、统计学处理

采用SPSS 15.0软件进行统计学分析, 对计数资料及构成比的比较采用Chi-Square检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、血清型及基因型分布

43例患者的测序结果应用Chromas软件转化为

aa序列后,共区分出血清型adw者28例,adr者14例,ayw者1例。测序结果输入Mega软件,应用最大简约法来构建进化树,并应用Bootstrap法验证,共分出基因B型29例,C型14例,未检出其他基因型。HBV基因型与血清型的分布情况见表1。结果显示,泉州地区HBV基因型(血清型)以B型为主(adw占绝对优势,亦可见ayw),其次为C型(adr)。

表1 HBV基因型及血清型的分布[例(%)]

血清型	HBV基因型	
	B型	C型
adw	28 (65.12)	0 (0)
adr	0 (0)	14 (32.56)
ayw	1 (2.33)	0 (0)

注: $\chi^2 = 47.316$, $P < 0.001$

二、HBsAg变异位点的分布

通过样品序列与参考序列比对后发现,慢性HBV感染者HBV S基因区存在很多变异位点,有些位点变异后可引起aa的改变。43例慢性HBV感染者共检出HBsAg变异位点32个: sS61A/I/V/T、sP62T、sT63S/P、sI68T、sC69*、sC76T、sF85C、sI92T、sF93C、sL98V、sY100C、sL109P、sI110L、sS113T、sS117N、sK122R、sT123A、sT126I、sI126T、sP127T、sA128V、sM133T、sT140M/I、sY161F、sV177M、sW196L、sY200F、sS204R/N、sM213I、sL216F、sI218L、sC221Y、sV224A。常见变异位点为sY200F者11例、sM213I者6例、sI126T者5例、sF85C者4例,这些变异位点多见于肝功能衰竭患者,可能与严重肝病有一定相关性。

三、HBV不同基因型“a”决定簇nt及aa序列的差异

B型、C型HBV S基因的“a”决定簇nt序列有显著差异,转化为aa序列后,部分aa序列无变化,

但另一部分aa序列却发生了改变。在B型、C型两种基因型中,“a”决定簇上aa125、aa136、aa146均相同,但在aa126、aa143上却存在显著性差异($\chi^2 = 13.459$ 、 38.566 , P 均 < 0.01)。B型中aa126以苏氨酸为主,而C型以异亮氨酸为主;B型中aa143为苏氨酸,而C型则为丝氨酸。不同基因型“a”决定簇nt序列的差异与HBV基因型的异质性有关,见表2。

四、HBV S基因主要亲水区(MHR, aa100~169) aa替换位点及构成比

43例慢性HBV感染者共检出MHR区aa变异19例(19/43, 44.19%), aa替换位点12个,见表3。MHR区最常见的aa变异位点为aa126(7/23, 30.43%),其次为aa140(3/23, 13.04%)。基因B型患者sT126I/A变异者2例(2/29, 6.90%), C型患者sI126T变异者5例(5/14, 35.71%), 基因C型患者aa126变异率显著高于基因B型($\chi^2 = 5.753$, $P < 0.05$)。肝功能衰竭患者aa126变异者4例(4/15, 26.67%), 慢性乙型肝炎患者3例(3/28, 10.71%), 差异无统计学意义($\chi^2 = 1.824$, $P > 0.05$)。本组资料未检出sP120T、sQ129N/R/P/H、sG130N、sT131N、sM133I、sK141E、sD144E/G、sG145R/A、sF158Y和sF161Y等aa变异,见表3。

五、HBV S基因区aa变异与临床疾病的相关性

肝功能衰竭患者在“a”决定簇上aa变异率显著高于慢性乙型肝炎患者($\chi^2 = 4.268$, $P < 0.05$),而在MHR、第一茎环区及第二茎环区aa变异率差异无统计学意义(P 均 > 0.05),见表4。

讨论

根据HBV nt及aa的差异,目前已发现10个HBV血清型,A~I 9个基因型^[3-4]。在我国HBV基因型以C型和B型为主,血清型主要为adr、adw、ayr和ayw等4个亚型。HBV基因型、血清型具有显著的地域性分布特点。北方地区以基因C型、adr为主,南方

表2 HBV不同基因型“a”决定簇核苷酸及氨基酸序列(例)

基因型	例数	nt527/aa125		nt530/aa126		nt560/aa136		nt581/aa143		nt590/aa146	
		ACA/ Thr	ACG/ Thr	ACT/ Thr	ATT/ Ile	TCA/ Ser	TCT/ Ser	ACG/ Thr	TCG/ Ser	AAC/ Asn	AAT/ Asn
B型	29	21	8	27	2	28	1	29	0	29	0
C型	14	0	14	5	9	0	14	0	14	9	5
χ^2		19.815		13.459		34.615		38.566		8.502	
P		$P < 0.001$		$P < 0.001$		$P < 0.001$		$P < 0.001$		0.004	

注: nt: 核苷酸; aa: 氨基酸; Thr: 苏氨酸; Ile: 异亮氨酸; Ser: 丝氨酸; Asn: 天冬酰胺

表3 HBV S基因主要亲水区氨基酸替换位点及构成比

变异位点	氨基酸替换	检出例数	构成比 (%)
109	sL109P	1	4.35
110	sI110L	1	4.35
113	sS113T	2	8.70
117	sS117N	2	8.70
122	sK122R	1	4.35
123	sT123A	2	8.70
126	sT126I/A, sI126T	7	30.43
127	sP127T	1	4.35
128	sA128V	1	4.35
133	sM133T	1	4.35
140	sT140M/I	3	13.04
161	sY161F	1	4.35
合计		23	100.00

注: HBV基因B型患者中sT126I/A 变异者2例; HBV基因C型患者中sI126T变异者5例

表4 HBV S区基因变异率与临床疾病的相关性 [例 (%)]

临床诊断	例数	MHR (aa100~169)	“a”表位 (aa124~147)	第一茎环 (aa124~137)	第二茎环 (aa139~147)
慢性乙型肝炎	28	12 (0.61)	5 (0.74)	4 (1.02)	1 (0.40)
肝功能衰竭	15	11 (1.05)	8 (2.22)	6 (2.86)	2 (1.48)
χ^2		3.647	4.268	2.321	0.324
P		0.056	0.039	0.128	0.569

注: 表中数值表示方式: 变异频次 (变异率); 变异率: 以平均每100个氨基酸中发生变异的氨基酸数目表示

地区以基因B型、adw为主。研究发现, 泉州地区HBV基因型 (血清型) 以B型为主 (adw占绝对优势, 亦见ayw), 其次为C型 (adr), 未见其他基因型或亚型。泉州地区HBV基因型、血清型分布特点符合我国南方地区的分布规律。

HBV S基因序列位于HBV基因组的nt155~833, 主要编码由226个aa组成的HBsAg, 后者是引起机体产生保护性免疫的主要成份。HBsAg含有与免疫应答有关的T、B淋巴细胞表位, 即“a”决定簇。“a”决定簇位于HBsAg的aa124~147, 是HBV各亚型的共同抗原决定簇, 有一定的空间构型。“a”决定簇肽段高度保守, 其中几个甚至单个aa的改变, 将破坏构型的稳定性, 可使“a”决定簇的二级或三级结构发生改变, 从而改变其抗原性和免疫原性, 形成免疫逃避或免疫耐受^[7-8]。通过“a”决定簇nt序列的研究发现, 基因B型、C型HBV S基因的“a”决定簇nt序列有显著性差异, 转化为aa序列后, 部分aa序列无变化, 但部分aa序列却发生了明显改变。B、C两种基因型在“a”决定簇的aa125、aa136和aa146上均相同, 但在aa126、aa143上却存在显著性差异。基因B型aa126以苏氨酸为主, 而基因

C型以异亮氨酸为主; 基因B型aa143为苏氨酸, 而C型则为丝氨酸。不同基因型“a”决定簇nt序列的差异与HBV基因型的异质性有关。

通过MHR区aa变异研究发现, 慢性HBV感染者MHR区aa变异发生率高达44.19% (19/43), MHR区常见aa变异位点为aa126 (7/23, 30.43%)、aa140 (3/23, 13.04%)。研究发现, 肝功能衰竭患者aa126变异率高于慢性乙型肝炎患者, C型患者sI126T变异率显著高于B型, 结果提示sI126T变异多见于C型HBV的肝功能衰竭患者。aa126变异后aa极性发生改变, 导致MHR区亲水性和HBsAg二级或三级结构的改变, 使HBsAg构象发生改变。由于B、C基因型在“a”决定簇上aa序列的差异, 导致其T、B淋巴细胞与免疫应答有关的抗原表位发生改变, 可能引起过度免疫应答反应, 造成严重的肝细胞损伤^[9-10]。“a”决定簇上nt及aa序列的差异, 可能与不同基因型HBV所致临床疾病严重程度及预后转归等方面的差异存在一定相关性。

研究发现, 肝功能衰竭患者在“a”决定簇上aa变异率显著高于慢性乙型肝炎患者, 结果提示“a”决定簇上aa变异后可能导致较为严重的肝脏

疾病。本研究还发现, sY200F、sI126T、sM213I和sF85C变异可能与严重肝病有一定相关性。由于样本量少, 且样本的采集带有随机性, 尚需要扩大样本量进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 Liu SL, Dong Y, Zhang L, et al. Influence of HBV gene heterogeneity on the failure of immunization with HBV vaccines in eastern China. *Arch Virol*,154(3):437-443.
- 2 宋江丽, 沈中阳, 王建, 等. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染患者的病毒S区与P区重叠基因变异. *中华肝脏病杂志*,2008,16(4):265-269.
- 3 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南2010年版更新版. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2011,5(1):50-60.
- 4 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志*,2006,14(9):643-646.
- 5 Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*,2008,82(11):5657-5663.
- 6 Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*,2008,14(11):1777-1780.
- 7 Moerman B, Moons V, Sommer H, et al. Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin Lab*,2004,50(3-4):159-162.
- 8 Sayan M, Senturk O, Akhan SC, et al. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis*,2010,14(Suppl 3):e136-e141.
- 9 Baumert TF, Thimme R, Weizsacker F, et al. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2007,13(1):82-90.
- 10 Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol*,2006,39(3):113-120.

(收稿日期: 2012-06-11)

(本文编辑: 孙荣华)

许正锯, 潘兴南, 魏开鹏, 等. HBV S基因变异与临床疾病的关系[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(2): 246-250.