

• 临床检验研究论著 •

HBsAg 和 HBsAb 双阳患者前 C/C 区基因突变分析

王 蕾^{1△}, 宁小晓¹, 王 珊²

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 苏州大学, 江苏苏州 215021)

摘要:目的 探讨乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎表面抗体(HBsAb)同时阳性(以下简称双阳)患者前 C/C 区基因突变的特点及其与 S 区基因突变的关系。方法 选取 18 例双阳患者, 对前 C/C 区及 S 区基因序列扩增并测序, 分析测序结果。结果 18 例双阳患者中, 检出前 C/C 区氨基酸突变者 7 例; 前 C/C 区发生突变与未发生突变者比较, 其 S 区氨基酸的突变次数及突变率明显增加($P < 0.05$); 7 例前 C/C 区氨基酸突变患者中, 4 例为前 C 区 nt1896 突变, 其中 1 例为 HBeAg(-), 3 例为 HBeAg(+). 结论 双阳患者不仅 S 区氨基酸突变增多, 其前 C/C 区氨基酸突变也明显增加; 双阳患者前 C 区 nt1896 突变更常见于 HBeAg 阳性者, 可能与双阳患者病毒株的复杂性有关。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 肝炎表面抗原, 乙肝; 肝炎表面抗体, 乙肝; 前 C/C 区; 基因突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)18-2200-02

Analysis of precore/core gene mutations in hepatitis B virus carriers with coexistence of HBsAg and HBsAb

Wang Lei^{1△}, Ning Xiaoxiao¹, Wang Shan²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Longhua Hospital, Shanghai 200032, China;

2. Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215021, China)

Abstract: Objective To analyze the characteristics of precore/core gene mutations in hepatitis B virus carriers with coexistence of HBsAg and HBsAb(double positivity). **Methods** Specimens collected from 18 cases with double positivity were detected for the mutation of precore/core gene and S gene. **Results** 7 cases with precore/core gene mutations were demonstrated, who were with more S gene mutations and higher mutation rate than those cases without precore/core mutation($P < 0.05$). 4 of the cases with precore/core gene mutations were positive with nt1896 mutation in precore gene, of which 1 case was HBeAg-negative and 3 cases HBeAg-positive. **Conclusion** Hepatitis B virus carriers with double positivity might be not only with more S gene mutations, but also with more precore/core gene mutations. nt1896 mutation in hepatitis B virus carriers with double positivity could be more common in HBeAg-positive patients than HBeAg-negative patients, which might be associated with the complexity of HBV isolates.

Key words: hepatitis B virus; hepatitis B surface antigens; hepatitis B surface antibodies; precore/core gene; mutation

乙型肝炎表面抗体(HBsAb)是机体对乙型肝炎病毒(HBV)产生的保护性免疫,被认为是 HBV 感染后机体具有免疫力的标志。血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和 HBsAb 呈序贯表达,理论上少有机会同时出现阳性(以下简称双阳)。但临床报告的双阳例数却日益增加,可能与仪器检测灵敏度不断提高,乙型肝炎疫苗和高效价球蛋白广泛使用,HBV 基因突变^[2-3],宿主免疫压力下的病毒免疫逃逸或先后感染不同血清型 HBV 等因素有关^[1-6]。笔者前期对 HBsAg、HBsAb 同时阳性患者进行了 HBV 基因测序,发现双阳患者 HBV S 区基因,尤其是 a 决定簇氨基酸较易发生突变,造成 HBsAg 的抗原性发生改变,导致双阳现象的发生,而 HBV 前 C/C 区基因突变特点及其与 S 区基因突变的关系尚未明确。因此,本研究拟对双阳患者 HBV 前 C/C 区基因进行测序分析,以全面了解双阳患者 HBV 基因突变的特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从前期研究纳入的受试对象中选取 18 例 HBV DNA > 104 IU/mL 双阳患者^[7],并采集患者空腹静脉血,常规分离血清。

1.2 方法

1.2.1 HBV 血清标志物(HBV-M)检测 采用雅培 AXSYM 全自动酶免疫荧光分析仪及配套试剂进行 HBV-M 检测。

1.2.2 HBV DNA 定量检测 采用上海克隆生物高科技有限公司试剂盒提取 HBV DNA 样本,并连同试剂配套阴(阳)性对照品、质控品和标准品进行聚合酶链反应(PCR)检测,PCR

扩增仪为 ABI7000 全自动基因扩增仪;反应条件为 50 ℃ 2 min, 94 ℃ 5 min, 93 ℃ 30 s, 60 ℃ 90 s 循环 40 次。

1.2.3 目的片段测序 PCR 扩增引物序列 P1: 5'-CAA GGT CTT GCA TAA GAG GAC T-3'; P2: 5'-CTA ACA TTG AGA TTC CCC-3', 由上海超世生物公司合成, HBV DNA 模板提取及扩增由上海超世生物公司和大连宝生物公司完成。PCR 反应条件为 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s 循环 40 次, 72 ℃ 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后以 DNA 胶回收试剂盒进行扩增片段纯化回收,回收产物与半定量 DNA 分子标记物(DNA Marker)进行半定量琼脂糖电泳,用 Quality 软件比较回收产物和半定量 DNA Marker 电泳条带 Volumn 值,计算得知 DNA 浓度为 20~30 ng/μL,故连接产物量为 4 μL。采用 ABI3730 全自动基因分析仪,以 PCR 扩增引物作为测序引物,对连接产物进行测序(标本前处理步骤参照仪器说明书)。

1.2.4 测序结果分析 对 DNA 测序彩图文件进行序列分析,使用 Chromas 软件观察峰形图,选择无非特异性重叠峰、信号较好、本底较低的 DNA 序列部分,与 NCBI 收录的 A~F 基因型 HBV 参考野生株核苷酸序列进行比对和分型,确定基因型;使用 Omega 基因分析软件将前 C/C 区 DNA 序列翻译为氨基酸,与 NCBI 收录的参考野生株氨基酸序列进行比对,确定突变位点。

1.3 统计学处理 使用 Excel 软件整理数据,使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,组间相关指数比较采用非参数秩和

检验, 突变率比较采用四格表 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结 果

2.1 前 C/C 区和 S 区氨基酸突变位点分布 将本研究测得的前 C/C 区碱基序列及前期研究测得的 S 区碱基序列翻译为氨基酸, 与 NCBI 相同基因型序列进行比对, 发现 B 基因 4 例、

C 基因型 14 例 (见表 1)。检出前 C/C 区氨基酸突变者 7 例 (见表 1), 其 S 区氨基酸突变率为 100% (7/7); 未检出前 C/C 区氨基酸突变者 11 例, 其发生 S 区氨基酸突变率为 54.5% (6/11), 二者 S 区氨基酸突变率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.405, P < 0.05$)。前 C/C 区氨基酸突变患者 S 区氨基酸突变个数较未发生前 C/C 区氨基酸突变患者明显增加 ($P < 0.05$)。

表 1 双阳患者前 C/C 区和 S 区氨基酸突变位点分布

序号	基因型	前 C/C 区	S 区
22	B	pcW28STOP	L8P; P67Q; E164G; V175S; L186H; S204N
28	B	pcW28STOP;	E164G; V175S; L186H
9	C	cP5A	S31R; N59K; P62L; Q129N; G145R; F161Y; S204R; L213I
32	C	pcW28STOP;	T47A; F80S; I126T
42	C	cV13A	T47K; P49L; T116N; I126S; L216STOP
56	C	pcM11L; pcG29P	N40S; P49R; L95W; Y100C; I126T; S210R; L216I; F219L
77	C	pcW28STOP; cP5T; cL60V	C69STOP; L98V; W182STOP
51	B	/	/
78	B	/	/
17	C	/	T47A; S55F; P62L; I86T; Y100C; T115N; I126T; M133K; F134V; P188L; V190A
31	C	/	/
45	C	/	L98V; I126S; T131N; M133T;
59	C	/	T47A; Q51R; L95W; I126S
67	C	/	I126T; V168A
73	C	/	/
141	C	/	T47K; I126S; T131N; M133T; S204R
154	C	/	T47A
161	C	/	/

/: 未检出氨基酸突变。

2.2 前 C 区 nt1896 突变与乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 的关系 18 例双阳患者中, 共检出前 C 区 nt1896 突变者 4 例, 以 HBeAg ≥ 1.00 S/CO 为阳性判断标准, 3 例为 HBeAg (+), 1 例为 HBeAg (-); 无 nt1896 突变者 14 例, 10 例为 HBeAg (+), 4 例为 HBeAg (-)。HBeAg 定量结果显示, 13 例患者 HBeAg (+) 患者 HBeAg S/CO 定量值中位数为 216.72, 而 3 例 HBeAg (+) nt1896 突变患者 S/CO 定量值 (137.77、138.39、59.54) 均低于该中位数。

3 讨 论

在前期研究中, 笔者发现双阳患者与 HBsAg 阳性患者具有更高的 S 区氨基酸突变率, 尤其是 MHR 区 a 决定簇第 1 个环内氨基酸的突变较多, 使表面蛋白亲水性、等电点和结构发生改变, 导致 HBsAg 抗原性发生改变, 使原来产生的抗体不能清除变异的 HBsAg, 造成突变的 HBsAg 与 HBsAb 同时存在^[7]。HBV DNA 前 C 区和 C 区在同一开放阅读框内, 有不同的起始密码子, 共同编码的产物为 HBeAg 前体。C 区编码乙型肝炎核心抗原 (HBcAg), 前 C 区影响 HBeAg 形成和分泌。HBeAg 和 HBcAg 均是抗病毒免疫的重要靶位, HBcAg 参与病毒核酸包装、DNA 链成熟及病毒颗粒的合成, HBeAg 则是重要的免疫调节蛋白, 二者在抗病毒感染中都有重要作用。

在本研究中, 前 C/C 区氨基酸突变患者较未发生突变患者, 其发生 S 区氨基酸突变的例数及突变个数明显增加 ($P < 0.05$), 可能是由于双阳患者体内 HBV 在宿主免疫压力作用下出现免疫逃逸, 出现 HBV 突变株, 患者体内同时存在突变株与野生株, 所以同一位点基因出现差异。有文献报道, HBV C 基因突变呈聚集性, 多集中在 CD4⁺ Th 细胞表位区, 即 AA1-20、AA28-47、AA50-69、AA61-85 和 AA117-131^[8]。本研究中, 7 例前 C/C 区氨基酸突变患者 C 区碱基突变达 45 次, 但多为同义突变, 相应的氨基酸突变仅 4 次, 原因可能为 HBV C

基因高度保守, 碱基错义突变相对较少, 故氨基酸不易发生突变。本研究中突变位点为 cAA5 位点 2 次、cAA13 位点 1 次、cAA60 位点 1 次, C 区氨基酸突变均位于 CD4⁺ Th 细胞表位区, 与相关报道一致^[8]。

本次研究 18 例患者中, nt1896 位点突变发生率较高, 达 22.2% (4/18)。ntG1896A 是 HBV 前 C 区最常见点突变, 可使前 C 区氨基酸序列的 AA28 由色氨酸 (TGG) 突变为终止密码子 (TAG), 从而不能产生 HBeAg, 在血清学上表现为 HBeAg 阴性^[9-11]。但也有文献报道 HBeAg 阳性状态下也会发生 nt1896 突变^[12-14]。在本研究中, 4 例 nt1896 突变双阳患者 3 例为 HBeAg 阳性, 可能与以下因素有关: (1) 由于 HBV 自身编码的 DNA 聚合酶具有逆转录酶功能, 可由前基因组 RNA 逆转录为子代病毒基因组, 但逆转录酶缺乏 3'-5' 校对功能, 造成子代 HBV 基因组与模板间存在一定差异, 在复制过程中极易产生突变; (2) 本研究选取的双阳患者体内病毒株较为复杂, 同时存在野生株与突变株。据文献报道, 野生株所占比例相对较小的患者, 虽然仍能产生一定数量的 HBeAg, 但 HBeAg 定量结果较低^[15]。本研究中 nt1896 突变患者 HBeAg 定量值明显低于 HBeAg 阳性者的中位数, 同样证实了上述观点。

综上所述, 双阳患者不仅 S 区氨基酸突变增多, 其前 C/C 区氨基酸突变也明显增加; 双阳患者前 C 区 nt1896 突变不仅出现在 HBeAg 阴性者, 而且更常见于 HBeAg 阳性者, 可能与双阳患者病毒株的复杂性有关。

参 考 文 献

[1] 谢士达, 刘成永, 王伟民, 等. 抗-HBs 和 HBsAg 共存的不同模式对乙型肝炎病毒感染的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(3): 244-248. (下转第 2203 页)

$P < 0.05$)。

3 讨 论

高胆红素血症是新生儿常见病,胆红素沉积不但可引起胆红素脑病,还可导致多脏器功能损伤。由于换血治疗能快速降低血清胆红素,使胆红素在短时间内下降至安全水平,避免身体各脏器损伤,因此被认为是治疗新生儿重症高胆红素血症最迅速、有效的方法,特别是胆红素脑病的预防中具有不可替代的作用^[5-7]。

G6PD 是防止红细胞氧化损伤的保护酶之一,红细胞 G6PD 缺乏与新生儿高胆红素血症的关系已受到广泛关注,但库存血 G6PD 活性对换血治疗效果的影响尚未引起足够重视。多种储存损伤(如氧化损伤、代谢损伤、生物化学损伤、生物机械损伤等)均可导致库存血红细胞被破坏^[8]。若库存血 G6PD 活性降低,则加重了红细胞储存损伤,并进一步缩短其生存期限,导致换血后新生儿体内的红细胞氧化应激反应而发生溶血。氧化应激反应在围产期婴儿中的发生率较高,且换血时患儿机体本身亦处于应激状态^[9]。这种连续而不明显的溶血导致胆红素生成增加,而导致换血后血清胆红素水平下降缓慢。

高胆红素血症患儿换血后血清胆红素水平与换血前 TBil 水平、换血量、黄疸持续时间及胆红素组织分布等有关,因此本研究同时采用 TBil 水平及其下降幅度作为观察指标^[9-12]。本研究纳入患儿的一般资料相似,而换血 24 h 后试验组患儿 TBil 水平高于对照组,下降幅度则小于对照组,表明血源 G6PD 活性降低将导致患儿换血后胆红素水平下降较慢;试验组患儿换血后的平均光疗时间比对照组明显延长,再次换血的患儿百分比亦明显增高。试验组患儿 TBil 水平较高可能是由于红细胞持续溶血所致,因膜损伤可导致库存血红细胞形状异常,加之 G6PD 活性降低,因此在遭遇氧化应激时易于发生血管外和血管内溶血;同时由于试验组患儿换血后 TBil 水平下降较慢,导致其换血后平均光疗时间明显延长,再次换血的概率增加。

本研究结果表明,若以 G6PD 活性降低库存血进行换血治疗,将导致高胆红素血症新生儿换血后胆红素水平下降较慢、

光疗时间延长、再次换血概率增加,因此建议在新生儿高胆红素血症换血治疗前对库存血进行 G6PD 活性筛查,避免因库存血 G6PD 活性降低给患儿增加不必要的痛苦。

参考文献

- [1] 陈欣,刘智红,张建梅. 105 例新生儿高胆红素血症临床分析[J]. 疾病监测与控制杂志,2009,3(3):160-161.
- [2] Kaplan M, Hammerman C. Neonatal hyperbilirubinemia; don't let glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency off the hook[J]. Pediatrics, 2008, 122(1): 216-217.
- [3] 邹蓓. 孕妇及高胆红素血症新生儿 G6PD 检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 726-728.
- [4] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿黄疸干预推荐方案[J]. 中国实用儿科杂志, 2001, 16(8): 501.
- [5] 孟燕,孙建伟,康莺歌,等. 同步换血疗法治疗新生儿高间接胆红素血症的临床观察[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(1): 62-63.
- [6] Jon F, Watchko MD. Identification of neonates at risk for hazardous hyperbilirubinemia; emerging clinical insights[J]. Pediatr Clin North America, 2009, 56(3): 671-687.
- [7] 姚家勇. 新生儿高胆红素血症换血前后血细胞指标变化的观察与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7): 882-883.
- [8] Hendrickson JE, Hillyer CD. Noninfectious serious hazards of transfusion[J]. Anesth Analg, 2009, 108(3): 759-769.
- [9] Samanta S, Kumar P, Kishor SS et al. Donor blood glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency reduces the efficacy of exchange transfusion in neonatal hyperbilirubinemia[J]. Pediatrics, 2009, 123(1): 96-100.
- [10] 林凤茹,王艳,李石磊. 新生儿溶血病诊治进展[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5): 335-337.
- [11] 姚家勇. 新生儿高胆红素血症换血前后血细胞指标变化的观察与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7): 882-883.
- [12] 郑珊,陈贻骥. 换血疗法治疗新生儿高胆红素血症的发展现状及影响[J]. 中国社区医师:医学专业, 2012, 14(2): 166-167.

(收稿日期:2012-02-09)

(上接第 2201 页)

- [2] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers[J]. Virology, 2007, 367(1): 30-40.
- [3] Lu HY, Zeng Z, Xu XY, et al. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(26): 4219-4223.
- [4] Lada O, Benhamou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers; influence of "a" determinant variants[J]. Virol, 2006, 80(6): 2968-2975.
- [5] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen(HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.
- [6] Zhang Z, Li L, Tian Y, et al. HBsAg/HBsAb double positive hepatitis B virus infection model in vitro and in vivo[J]. J Huazhong U Sci Med, 2009, 29(5): 575-579.
- [7] Wang L, Liu H, Ning XX, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests[J]. Hepatol Res, 2010, 40(8): 1212-1218.

- [8] 梁蔚芳,何海棠,刘志华,等. 乙型肝炎病毒前 C/C 区及其调控基因变异的研究[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(4): 331-334.
- [9] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 69.
- [10] 万铁林,李文凡,陈金军,等. 影响 HBeAg 血清学状态和滴度的因素分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(13): 2062-2064.
- [11] 邹桂舟,汪渊,李旭,等. HBV 前 C 区 1896 点突变株与野生株感染患者临床特点分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2008, 11(6): 364-365.
- [12] 赵海平,申元英. 乙型肝炎病毒基因变异与免疫逃逸的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2007, 34(5): 336-338.
- [13] Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, et al. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi[J]. BMC Gastroenterol, 2006, 6(1): 20-23.
- [14] Kang HS, Kang KS, Song BC. Precore and core promoter mutations of the hepatitis B virus gene in chronic genotype C-infected children[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(4): 546-550.
- [15] Chang MH, Hsu HY, Ni YH, et al. Precore stop codon mutant in chronic hepatitis B virus infection in children; its relation to hepatitis B seroconversion and maternal hepatitis B surface antigen[J]. J Hepatol, 1998, 28(6): 915-922.

(收稿日期:2012-03-09)