

垂直传播中乙型肝炎病毒 S 区变异株检出及其流行病学意义

王珊珊 姜普林 彭桂福 曾年华 王志斌

【摘要】 目的 研究垂直传播中乙型肝炎病毒 S 基因变异的流行病学意义。方法 以配偶无乙型肝炎病毒(HBV)标志的 4 名女性携带者与 6 名男性携带者及其子宫内感染 HBV 的胎儿为对象,以双脱氧链末端终止法检测母子、父子所携 HBV S 区 451~660 位核苷酸序列。结果 母子、父子间同源性 98%~100%, 检出 491、494、530、546、581 位点变异致使 113、114、126、131、143 位氨基酸替代,其中 2 对父母与胎儿检出 126 位变异。4 例胎儿检出 131 位变异,其中 2 例胎儿合并检出 143 位变异。结论 HBV 垂直传播中存在 S 基因变异株,可能以 126、131、143 位氨基酸变异株为主,这些变异株可能使 HB 疫苗免疫失败。

【关键词】 乙型肝炎病毒 垂直传播 S 基因变异

Detection of S- gene mutation strain in vertical transmission of HBV and its significance WANG Shanshan, JIANG Pulin, PENG Guifu, et al. Institute for Military Medicine, Guangzhou Command, PLA, Guangzhou 510507

【Abstract】 Objective To study S- gene mutation of hepatitis B virus (HBV) in its vertical transmission and its significance. **Methods** Nucleotides of S- gene nt451-660 of HBV were sequenced with dideoxy end termination technique in four female and six male carriers without HBV markers in their spouses and in their intrauterine infected fetuses. **Results** It was showed that homology of HBV nucleotide and amino acid sequences in the mothers, fathers and their fetuses was very high. Mutation at the sites 491, 494, 530, 546 and 581 of S- gene resulted in amino acid substitution at the sites 113, 114, 126, 131 and 143, respectively. Mutations at the sites 126 were detected in two pairs of mother or father and her or his fetuses and mutations at the sites 131 in four fetuses, respectively, including combined mutation at the site 143 in two fetuses. **Conclusion** Strains with S- gene mutation, mainly at the sites 126, 131 and 143, could be found in HBV vertical transmissions, which could cause failure in HB vaccine immunization.

【Key words】 Hepatitis B virus Vertical transmission S- gene mutation

乙型肝炎病毒(HBV)的垂直传播是造成免疫耐受的重要原因^[1,2],免疫耐受则是免疫预防失败的主要因素。目前的研究表明垂直传播不仅包括母子传播而且包括父子传播^[3],这种传播方式对形成我国人群中的健康携带状况与 HBV 储存库起重要作用。HBV 在两代间的传播同样受到强大的免疫压力,病毒变异是必然的生物学现象。本研究试图检出垂直传播中 HBV S 区的主要变

异株,探讨人群中免疫耐受致使 HB 疫苗免疫失败可能的原因。

材料及方法

一、研究对象:从 1995 年 3 月至 1996 年 3 月在湖南某县以 HBsAg 筛检前来终止妊娠的孕妇及其丈夫,选择 4 名女性 HBV 携带者与 6 名男性携带者及 HBV DNA 阳性的子宫内感染胎儿为研究对象。男、女性携带者以 ELISA 检测常规五项 HBV 血清学标志进一步确定。均无既往肝炎史,谷丙转氨酶正常,

无乙肝疫苗注射史,其配偶 ELISA 检测 HBV 血清学标志及 PCR 检测 HBV DNA 均阴性。年龄均在 23~35 岁之间。取终止妊娠 6~8 月引产胎儿,胎儿血在产出当时从心脏采取,分离血清保存于 -20℃。同时分离白细胞,无菌条件下取肝脏。以 PCR 检测胎儿血清、白细胞、肝脏 HBV DNA,任何一项阳性则判定为子宫内感染。凡是胎儿与母亲均阳性而父亲阴性者为一组,胎儿与父亲均阳性而母亲阴性者为一组纳入本研究。各种标本在住院期间收集。另外选择 5 对无任何 HBV 标志的夫妇及胎儿为对照。

二、检测方法:

1. ELISA 检测 HBV 五项血清学标志包括 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc。

2. 各种标本的处理及 DNA 的抽提方法见文献^[4]。

3. PCR 技术检测 HBV DNA,引物取自 S 区(表 1)。外引物为 S1R、BS1,扩增片段为 787bp。内引物为 S3、BS3,扩增片段为 261bp。第一轮 PCR 产物 1:50 稀释作为第二轮 PCR 的模板,每轮 PCR 均设阳、阴性对照与空白对照。常规 PCR 方法参考文献^[4]。阳性标本以斑点杂交法确认,操作按说明书。

表 1 PCR 引物序列

引物	位置	序 列
S1R	842~822	5'TTAGGGTTTAAATGTATACCC 3
BS1	56~76	CCTGCTCGTGGCTCCAGTTCC
S3	427~448	CATCITTCTGTGTGGTCTTCTG
BS3	687~668	GGCACTAGTAACTGAGCCA

4. 取第二轮 PCR 产物,以等体积醋酸铵与 2 倍体积异丙醇纯化,用 Fmol DNA cycle sequencing system 以双脱氧链末端终止法测序。读片结果输入计算机用 DNASIS 软件处理。结果与发表的序列(genebank)比较。

三、试剂:引物合成于中科院上海细胞所。Taq 酶、Mark 等购自华美试剂公司。Fmol DNA cycle sequencing system 购自 Promega 公司。 γ -³²P-ATP 购自北京亚辉公司。地高辛标记的 HBV DNA 探针购自上海医科大学。

结 果

4 名女性 HBV 携带者 HBsAg、HBeAg 阳性,血清与白细胞 HBV DNA 亦阳性。4 例胎儿血清、白细胞、肝脏 HBV DNA 均阳性。仅 1 例血清 HBsAg 阳性。6 名男性携带者中 4 名 HBsAg、HBeAg 阳性,2 名 HBsAg、抗-HBe 阳性。6 名携带者血清、5 名携带者白细胞、5 名携带者精液、精子 HBV DNA 阳性。胎儿 6 例血清、肝脏,5 例白细胞 HBV DNA 阳性,仅 1 例血清 HBsAg、HBeAg 阳性。以巢式 PCR 检测 HBV DNA 62 份标本,阳性 58 份,其中 63.8% (37/58) 是第二轮 PCR 检测时出现阳性结果。尤其是精子标本在第一轮均阴性。5 例对照胎儿与父母各种标本均无 HBV 感染标志。

以 PCR 产物直接序列分析,测定 10 名携带者与 10 例胎儿的 HBV S 基因第 451~660 位核苷酸(从 HBV 的 EcoR1 酶切点计算)。4 例胎儿及母亲、6 例胎儿及父亲的 HBV S 基因第 451~660 位核苷酸同源性均在 98%~100%。根据 HBsAg 第 122 位与 160 位氨基酸是赖氨酸或精氨酸确定 HBsAg d、y 与 w、r 亚型。4 例胎儿及母亲、6 例胎儿及父亲在 122、160 位均为 AAA(赖氨酸),故均为 adw 型,可能与研究对象来自同一地区有关。从 S 基因的检测结果看,4 对母子与 6 对父子共同变异的有 5 个位点,即 493、499、508、529、530 位,仅第 3 对母子与第 3 对父子在 530 位由 A 变为 G 致使第 126 位氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸。其它均为无表型变异。4 对母子中 2 对,6 对父子中 4 对胎儿的此段序列与父、母亲完全一致。另外 2 对母子、2 对父子在个别碱基有差异,第 544、546 位碱基父、母亲为 A、C,胎儿为 C、A。其中 2 对 581、586 位碱基父、母亲为 A、C,胎儿为 T、T。其中 1 对父子 491、499 位父亲为 T、T,胎儿为 A、A。上述变异位点中 491、494 位的变异使胎儿 S 区第 113、114 位氨基酸由丝氨酸变为苏氨酸,546 的变异使 S 区第 131 位氨基酸由苏氨酸变为天冬酰胺。581 位的变异使第

143 位氨基酸由苏氨酸变为丝氨酸。其它均为无表型变异。值得注意的是第 4 对父亲的血清、精子与胎儿血清 HBV 基因的此段序列两个位置均与原型株有差异, 第 499、508 位原型株为 C, 此对父子为 A、G, 虽然此变异未引起表型变异, 但父亲生殖细胞所携 HBV 特点与胎儿一致。图 1 所示此对父子中父亲血清、精子与胎儿血清 HBV S 区 596~ 630 位核苷酸序列完全相同。

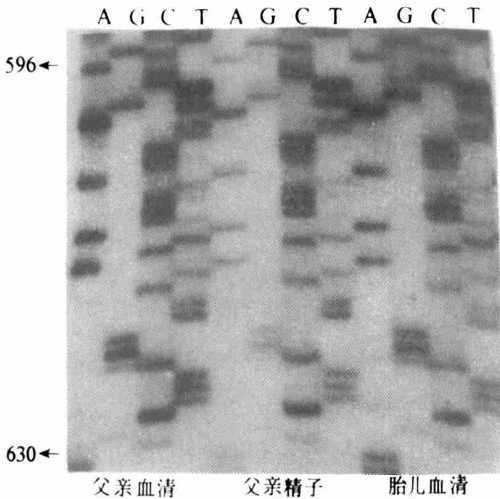


图 1 第 4 对父子 HBV S 区 596~ 630 位核苷酸

讨 论

我国人群 HBV 携带率较高, 其中垂直传播起了重要作用。这种传播方式可在受染子代形成免疫耐受, 致使其对 HB 疫苗免疫失败。目前研究表明无应答中有相当一部分是现症感染^[5], 本研究结果表明垂直传播以 HBV S 区变异株为主(6/ 10), 以 126、131、143 位变异为多。对 HBsAg 免疫优势表位 a 的抗体可对所有亚型的 HBV 感染提供保护免疫。HB 疫苗免疫应答的成熟表现就是抗 a 高亲和抗体的出现。a 肽段位于氨基酸 124 与 147 之间, 具有活跃的反应性也是高度保守区。本研究检出的 126、131、143 位变异正是在此段之中, 由于变异可能改变其抗原性与免疫性, 预计感染此变异株的小儿将对 HB 疫苗无应答, 最终会成为以免疫逃逸株为优势株的携带者。这种无应答实际上是变异株

的现症感染。因此认为此区变异株尤以 a 肽段变异株可能是免疫失败的主要原因。

垂直传播除母婴传播外还应包括父婴传播, 长期以来父婴传播被母婴传播与家庭内传播所掩盖。本研究从最大限度上排除了母子传播的可能, 初步确定出生前期 HBV 的父子传播, 父亲经精子将 HBV 传给子代, 第 4 对父子中父亲血清、精子与胎儿 HBV 在 499、508 位的一致变化, 说明父亲将分子水平特征相同的病毒传给子代。本研究大部分标本是在巢式 PCR 第二轮时出现的阳性结果, 尤以精子标本为甚。文献报告^[3] HBV 携带者精子 PCR 扩增产物无阳性带, 而做膜转移后分子杂交放射自显影 5 天出现阳性带, 这与本研究结果基本一致, 可见精子携带 HBV DNA 的拷贝较少, 但不影响传播。本研究中第 3 例受染胎儿的父亲精液、精子未检出 HBV DNA, 但此对父亲与胎儿所携 HBV 499、529、530 位有相同变异, 而且 530 位的变异是表型变异, 说明此对父子所携病毒在分子水平具有同样特征, 胎儿的病毒来自其父, 但其父精子 HBV DNA 阴性可能精子携带 HBV 不是持续的而是间歇的。采集标本与受精卵生成之间的时间差异可能导致此名父亲的阴性结果, 但是精子中 HBV 的出现受什么因素的影响还待进一步研究。其次精子的 HBV 携带率可能也有一定的限度。既然 HBV 可经生殖细胞传给子代, 那么需要重新从遗传病的角度审视 HBV 以及这种传播方式, 进一步探讨遗传流行病学方面的各种问题。

(本研究序列测定的实验工作是在全军及广东省重点实验室第一军医大学南方医院传染科实验室完成, 感谢骆抗先教授的指导及实验室全体同志协助)

参 考 文 献

- 1 王珊珊, 肖乐义, 徐德忠, 等. 乙型肝炎病毒的垂直传播. 中华流行病学杂志, 1991, 12: 33- 35.
- 2 王珊珊, 姜普林, 曾年华, 等. 乙型肝炎病毒的子宫内传播. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9: 178- 179.
- 3 赵连三, 刘晓松, 张智翔, 等. 乙型肝炎病毒经精子传播的可能性研究. 中华传染病杂志, 1998, 16: 154- 157.

4 JinLin Hou, Peter Karayiannis, Jenny Waters, et al. A unique insertion in the S gene of surface antigen negative hepatitis B virus Chinese carriers. *Hepatology*, 1995, 21: 273- 278.

5 骆抗先. 乙型肝炎—基础和临床. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 40- 43.

(收稿: 1999- 01- 20 修回: 1999- 07- 04)

建立引物双标记的聚合酶链反应—酶联免疫吸附法检测军团菌 mip 基因

朱利平 石尧忠 陈一平 李忠明 钟平 邬祥惠 翁心华

建立一种新的检测嗜肺军团菌 mip 基因的引物双标记聚合酶链反应—酶联免疫吸附(PCR- ELISA)法,应用于豚鼠军团菌感染的早期检测和诊断。其方法是将一对嗜肺军团菌引物分别标记有生物素和异硫氰酸荧光素,经 PCR 扩增后,将标记有生物素的 PCR 扩增产物加入链酶亲和素包被的微孔板中,洗去未结合物后直接加入碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体,待与荧光素结合后,再加入底物产生显色反应,ELISA 仪测得 A 值。通过对该系统的

各项参数的优化,该方法能特异地检出嗜肺军团菌和米克戴德军团菌,检测灵敏度为 150fg 军团菌基因组 DNA(相当于 15~ 30 个军团菌),将不同时间经腹腔感染军团菌的 22 份豚鼠组织标本,应用该方法与培养法比较,结果显示在感染后 3.5 天培养法阳性率为 88.9% (8/9),7.5 天为 0(0/9),而此方法则分别为 100% (9/9)、22.2% (2/9)。引物双标记 PCR- ELISA 法能早期快速、敏感、特异地诊断军团菌病。与 PCR- 凝胶电泳法敏感性相一致,由于该方法是建立在微孔板检测基础上,故可与临床常规使用的试剂及仪器设备相配套,易于临床推广使用。

作者单位: 200040 上海医科大学华山医院传染病学教研室(朱利平、石尧忠、陈一平、邬祥惠、翁心华); 美国食品药品监督管理局(李忠明); 上海生物制品研究所(钟平)

(收稿: 1999- 04- 21)

戊型肝炎病毒结构区编码多肽检测相应抗体方法的建立及应用

李顺天 高桂芝 阎志慧 梁树仁 朱理珉

利用多肽合成技术在戊型肝炎病毒(HEV)的结构区内的开放读码框(ORF)- 2 和 ORF- 3 区合成了 P1、P2 二条具有明确抗原表位的合成多肽,作为 EIA 法抗- HEV 诊断试剂的固相抗原测定抗- HEV。在 78 例急性甲型肝炎中抗- HEV 检出率为 7.8%,慢性乙型肝炎的检出率为 2.9%,志愿献血员为 1.4%,急性输血性丙型肝炎检出率为 0。本室抗- HEV 诊断试剂的精密度检测 CV 值为 6.8%~ 9.1%。优于部颁体外诊断试剂 CV 值 ≤ 15% 的标准。抗- HEV 的灵敏度测定 P1 合成肽为 1: 1 600,而 P2 合成肽 1: 12 800, P2 合成肽的终点稀释度比 P1 合成肽高出 8 倍。P1+ P2 合成肽混合包被检测抗- HEV,经 162 例血清标本的结果检测与 Genelaps 抗- HEV 诊断试

剂的检测结果对比符合率达 98.8%。同时在抗- HEV 检测中发现了有单独抗 P1 合成肽和 P2 合成肽的数例血清样本。上述结果表明 ①所用 P1、P2 二条合成肽选择的合成区域 ORF- 2、ORF- 3 区最为保守,氨基酸的同源分别达 99%~ 100%,是合成 HEV 抗原的理想区域; ②P1、P2 合成肽因合成区域、位点、抗原性、亲水性、片段大小有所不同,而发现数例单独抗- P1 或 P2 合成肽的阳性标本。为此 P1、P2 二条合成肽应混合配置,使抗不同表位的抗体均能与之结合,反应强度也会相应增大,进一步提高抗- HEV 的检出率; ③抗- HEV 诊断试剂的灵敏度、特异性检测结果满意,精密度检测优于部颁标准,同时在与 Genelaps 诊断试剂的对比测定也呈高度一致性。

作者单位: 300192 天津市传染病医院

(收稿: 1999- 01- 25)