

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

乙型肝炎病毒基因型和前 C 及基本核心启动子突变与乙型肝炎疫苗阻断母婴传播的关系

王佳 李杰 庄辉 刘社兰 李荣成 李艳萍 梁争论

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)基因型和前 C 及基本核心启动子(BCP)突变与乙肝疫苗阻断母婴传播的关系。方法 采集江苏省 16 对乙肝疫苗阻断失败的母婴血清样本 32 份,以及 88 对阻断成功的母婴血清样本 176 份。以型特异性引物 PCR 法检测 16 对乙肝疫苗阻断失败的母婴和 88 例阻断成功的母亲血清样本中 HBV 基因型,用 PCR 产物直接测序法检测 HBV 前 C/BCP 突变,采用 Clustal W 1.8 软件进行序列分析。结果 在 16 例阻断失败的母亲中,15 例(93.8%)为 HBeAg 阳性,且均为 C 型(15/15, 100%);88 例阻断成功的母亲中,51 例(58.0%)为 HBeAg 阳性,其中 C 基因型占 45.1%(23/51)。在 HBeAg 阳性母亲中,阻断失败组的 C 基因型检出率明显高于阻断成功组($\chi^2 = 14.3, P = 0.003$)。但在 C 基因型 HBeAg 阳性母亲中,阻断成功组与失败组的 T1762/A1764 突变率差异无统计学意义(分别为 13.3% 和 33.3%, $P = 0.4$),且均无 A1896 突变。结论 感染 HBV 基因 C 型的母亲可能更易导致乙肝疫苗阻断失败,而前 C/BCP 基因突变与阻断母婴传播无关。

【关键词】 乙型肝炎病毒;乙型肝炎疫苗;基因型;突变

Interruption failure of hepatitis B virus vaccination in mother-to-infant transmission and hepatitis B virus genotypes and preC/BCP mutations WANG Jia^{*}, LI Jie, ZHUANG Hui, LIU She-lan, LI Rong-cheng, LI Yan-ping, LIANG Zheng-lun. *Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China*

Corresponding author: LI Jie, Email: jiel69@263.net; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the association of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore(PreC)/basal core promoter(BCP) mutation with interruption failure of HBV vaccination in mother-to-infant transmission. **Methods** A total number of 208 serum samples were collected from infants and mothers, including 16 infants who had become HBsAg-positive despite a complete and timely course of immunization and another 88 infants successfully protected from mother-to-infant HBV transmission. HBV genotypes were determined by type-specific primers PCR method. PreC/BCP mutations were detected by direct sequencing of PCR products, and Clustal W 1.8 software was applied to analyzing the sequences. **Results** Of 16 mothers who were having vaccine failure infants, 15 (93.8%) were HBeAg positive and infected with genotype C (15/15, 100%). Among 88 mothers of having children being protected by vaccine, 51 (58.0%) were HBeAg positive, with 45.1% (23/51) of genotype C. The proportion of genotype C in HBeAg mothers of infants with vaccine failure, was significantly higher than that of mothers with vaccine protected infants ($\chi^2 = 14.3, P = 0.003$). However, the frequencies of T1762/A1764 mutations had no significant differences between genotype C HBeAg positive mothers with vaccine failure or protected infants (33.3% and 13.3%, respectively, $P = 0.4$). No A1896 mutation was found in these two groups. **Conclusion** HBV genotype C might contribute to the immune failure of HBV vaccination in mother-to-infant transmission, while PreC/BCP mutation might not have correlation with it.

【Key words】 Hepatitis B virus; Hepatitis B vaccine; Genotype; Mutation

乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)主要经血和血制品、母婴、破损的皮肤和黏膜及性接触传播。在我

国,乙肝母婴围生期传播是 HBV 主要传播途径之一。目前应用乙肝疫苗或与乙肝免疫球蛋白(HBIG)联合免疫可明显降低乙肝母婴传播。HBV 存在不同基因型,且在同一基因型 HBV 可能存在不同的突变株^[1,3]。有研究表明,HBV 基因型及前 C(PreC)和基本核心启动子(BCP)突变与乙肝的进

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)

作者单位:100083 北京大学医学部微生物学系(王佳、李杰、庄辉);江苏省疾病预防控制中心(刘社兰);广西壮族自治区疾病预防控制中心(李荣成、李艳萍);中国生物制品检定所(梁争论)

通讯作者:李杰, Email: jiel69@263.net; 庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

展有关^[4,5]。为探讨 HBV 基因型和 PreC/BCP 变异与乙肝疫苗阻断母婴传播的关系,本研究对江苏省 16 对疫苗阻断失败和 88 对阻断成功的母婴血清标本进行了 HBV 基因型和 PreC/BCP 突变检测,现将结果报道如下。

材料与方 法

1. 标本来源:16 对乙肝疫苗阻断失败的母婴配对血清样本 32 份及阻断成功 88 对母婴血清样本 176 份,均由江苏省疾病预防控制中心收集。16 对阻断失败的母婴入选条件为:母亲孕前 HBsAg 阳性,婴儿按 0、1、6 个月程序及时全程接种 5 μg 重组酵母乙肝疫苗后,1 岁后采血检测为 HBsAg 阳性。88 对免疫成功母婴入选条件为:母亲孕前 HBsAg 阳性,其婴儿按 0、1、6 个月程序及时全程接种 5 μg 重组酵母乙肝疫苗后,HBsAg 持续阴性,但抗-HBs 阳转。所有血清置 -70℃ 冰箱保存。

2. HBV 血清学标志物及 HBV DNA 定量检测:应用美国 Abbott RIA 试剂盒对所有血清标本 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc 进行检测。应用深圳匹基 HBV 核酸扩增荧光定量试剂盒检测 HBV DNA。按试剂盒的说明书操作和判断结果。

3. HBV DNA 提取:应用美国 Promega 公司 Total RNA Isolation System 试剂盒,并稍作改进^[6]。

4. HBV 基因分型:应用基因型特异性引物 PCR 法扩增 HBV DNA,经琼脂糖凝胶电泳,根据扩增产物片段大小鉴定基因型^[6]。PCR 仪(型号为 iCycler)及凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

5. HBV PreC 及 BCP 区巢式 PCR 扩增:第一轮 PCR 扩增:上游引物序列(nt1604~nt1625)为 5'-

TCG CAT GGA GAC CAC CGT GAA C-3',下游引物序列(nt2073~nt2054)为 5'-GCT TGC CTG AGT GCC GTA TG-3'。扩增条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 60 s,扩增 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min,扩增产物长度为 470 bp。第二轮 PCR 扩增:上游引物序列(nt1611~nt1629)为 5'-GAG ACC ACC GTG AAC GCC C-3',下游引物序列(nt2064~nt2044)为 5'-GTG CTG TAT GGT GAG GTG AAC-3'。扩增条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min,扩增产物长度 454 bp。PCR 产物 5 μl,用 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 引物及 Taq Plus DNA 聚合酶均购自上海生工生物工程技术有限公司。

6. PCR 产物直接测序及序列分析:第二轮 PCR 产物序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。采用 BioEdit 5.0、Clustal W 1.8 软件进行序列分析。

7. 应用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。

结 果

1. 乙肝疫苗阻断失败母婴血清 HBV DNA 基因型及 PreC/BCP 突变比较:16 对乙肝疫苗阻断失败的母婴中,13 对(81.3%)基因型完全一致,另有 3 对母亲为 C 基因型,其所生婴儿为 B+C 混合型。其中 15 对母婴有 HBV 基因 nt1631~nt2050 序列(包括 PreC/BCP 区)检测结果,1 对因母亲未检出而未能比较,结果该 15 对母婴的 nt1631~nt2050 序列相似性均在 98% 以上,其中 8 对的同源性为 100%。该 15 对母婴均无 A1896 突变(表 1)。

表1 乙肝疫苗阻断失败的母婴 HBV 基因型、PreC /BCP 突变及序列相似性比较

序号	HBeAg		基因型		nt1762/1764		nt1896		序列相似性(%) nt1631~2050
	母亲	婴儿	母亲	婴儿	母亲	婴儿	母亲	婴儿	
FB01	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	100.0
FB03	+	+	C	C	T/A	A/G	G	G	99.5
FB05	+	+	C	B+C	A/G	A/G	G	G	100.0
FB06	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	100.0
FB07	+	+	C	C	T/A	T/A	G	G	100.0
FB10	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	99.8
HD059	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	100.0
HD112	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	100.0
HD082	+	+	C	C	ND	A/G	ND	G	ND
HA375	+	+	C	B+C	T/A	T/A	G	G	99.8
J4040	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	100.0
J3477	+	+	C	C	A/G	A/G	G	G	99.8
J3366	+	+	C	C	T/A	A/G	G	G	98.8
8	+	+	C	B+C	A/G	A/G	G	G	100.0
C112	-	+	C	C	A/G	A/G	G	G	98.6
C127	+	+	C	C	T/A	A/G	G	G	98.6

注:ND:未检出

2. 乙肝疫苗阻断失败的 HBeAg 阳性母亲与阻断成功母亲基因型比较: 在 16 例阻断失败的母亲中, 15 例(93.8%) 为 HBeAg 阳性, 且均为 C 型(15/15, 100%); 88 例阻断成功的母亲中, 51 例(58.0%) 为 HBeAg 阳性, 其中 C 基因型占 45.1% (23/51)。在 HBeAg 阳性母亲中, 阻断失败组的 C 基因型检出率明显高于阻断成功组 ($\chi^2 = 14.3, P = 0.003$) (表 2)。

表2 乙肝疫苗阻断失败母亲和成功母亲组基因型构成(%)比较

基因型	阻断失败母亲组(n=16)		阻断成功母亲组(n=88)	
	HBeAg(+)	HBeAg(-)	HBeAg(+)	HBeAg(-)
C	100.0(15/15)	100.0(1/1)	45.1(23/51)	24.3(9/37)
B	0	0	27.5(14/51)	16.2(6/37)
B+C	0	0	23.5(12/51)	37.8(14/37)
未分型	0	0	3.9(2/51)	21.6(8/37)

3. HBeAg 阳性且为 C 基因型的阻断成功组与失败组母亲的 HBV PreC/BCP 突变情况比较: 选 HBeAg 阳性 C 基因型阻断失败和成功母亲各 15 例, 比较 T1762/A1764 变异率, 结果前者为 33.3% (5/15), 后者为 13.3% (2/15), 两组间差异无统计学意义 ($P = 0.4$), 其他位点变异亦无差异, 且均未发现 BCP C/G1753 和 PreC 区 T1846、A1896 突变。比较该两组母亲血清 HBV DNA 水平表明, 阻断失败组母亲为 $(6.20 \pm 1.36) \log_{10}$, 阻断成功组母亲为 $(7.04 \pm 0.54) \log_{10}$, 两组差异无统计学意义。

讨 论

HBV 母婴传播主要发生在围生期, 多为在分娩过程中接触 HBV 阳性母亲的血液和体液传播。本研究的 16 对乙肝疫苗阻断失败母婴中, 15 对母亲的 HBV DNA nt1631~nt2050 核苷酸序列(包括 PreC/BCP 区)相似性均在 98% 以上(1 对因母亲未检出而未能比较)。该 16 对乙肝疫苗阻断失败的母婴基因型比较表明, 81.3% (13/16) 母婴的基因型完全一致。另 3 例母亲为 C 型, 其婴儿为 B+C 混合型, 推测可能围生期感染母亲的 C 基因型后, 婴儿通过水平传播又感染了 B 基因型。

在 HBeAg 阳性母亲中, 阻断失败组的 C 基因型检出率明显高于阻断成功组, 分别为 100% 和 45.1% ($\chi^2 = 14.3, P = 0.003$)。有文献报道, 母亲 HBV DNA 水平与母婴传播的发生率有关^[7,8]。但

本研究检测乙肝疫苗免疫成功组与失败组母亲血清 HBV DNA 水平差异无统计学意义, 提示 C 基因型母亲可能更易发生母婴传播, 但其确切机制有待进一步研究。

本研究表明, 感染 C 基因型阻断失败母亲组的 T1762/A1764 双突变率虽稍高于阻断成功母亲组(分别为 33.3% 和 13.3%), 但两者差异无统计学意义, 提示 HBV PreC/BCP 变异可能与新生儿乙肝疫苗阻断失败无关。

有研究报道, 5 μ g 乙肝疫苗对 HBsAg 和 HBeAg 双阳性母亲新生儿的阻断率为 87.29%, 10 μ g 疫苗可达 92%。HBV 疫苗对单阳性母亲所生婴儿的阻断率可达 95% 以上^[5]。但双阳性母亲的新生儿免疫失败率较高, 这可能与 HBV DNA 水平较高有关。本研究也显示, 阻断失败组的母亲中, 93.8% (15/16) 为双阳性母亲。因此, 对双阳性母亲所生婴儿, 建议提高乙肝疫苗剂量或采用乙肝疫苗与 HBIG 联合免疫, 以降低母婴传播的发生率。

参 考 文 献

- [1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence; comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988, 69(10): 2575-2583.
- [2] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2000, 81(1): 67-74.
- [3] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 2002, 83(8): 2059-2073.
- [4] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Clinical and virological aspects of hepatitis B genotypes B and C-infected blood donors. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1): 22-25.
- [5] 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 Hepatol*, 2002, 37(3): 355-363.
- [6] 李雅娟, 庄辉, 李杰, 等. 乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及其临床意义. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(10): 724-729.
- [7] Alter H, Seeff LB, Kaplan PM, et al. Type B hepatitis: the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needlestick exposure. *N Engl J Med*, 1976, 295(17): 909-913.
- [8] Shikata T, Karasawa T, Abe K, et al. Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis*, 1977, 136(4): 571-576.

(收稿日期: 2007-02-01)

(本文编辑: 尹廉)