

辽宁省乙型肝炎监测病例HBV基因型分布及主蛋白抗原主要亲水区变异特点分析

张爽 沈立萍 缪宁 任毅 周文亭 王锋 毕胜利 王富珍

【摘要】 目的 了解辽宁省乙型肝炎(乙肝)监测病例HBV基因型分布及其主蛋白抗原主要亲水区(MHR)氨基酸(aa)位点变异情况。方法 采集辽宁省监测试点县区乙肝病例血清,提取HBV DNA并进行序列扩增,测序得到S基因序列,利用生物学软件比较分析。结果 共得到HBV S基因序列81条,基因型分布B型为8.64%(7/81)、C型为86.42%(70/81)、D型为4.94%(4/81)。S基因MHR aa位点变异率为4.87%,T126I变异率最高,为8.64%。HBV MHR变异株总流行率为49.38%(40/81),其中B型为42.86%(3/7),C型为47.14%(33/70),D型为100%(4/4)。在不同年龄、性别、基因型和抗-HBc IgM(+/-)分类比较中,差异无统计学意义,但ALT正常组(<43 IU/L)该流行率显著高于ALT异常组(≥ 43 IU/L)。结论 辽宁省乙肝监测病例中,基因型分布以C型为主,B型次之,偶见D型。HBV MHR aa位点变异与既往研究结果一致,仍为今后乙肝监测重点。

【关键词】 乙型肝炎病毒基因型;主蛋白抗原;主要亲水区;变异

Analysis on genotype distribution and mutation of major hydrophilic region of hepatitis B virus in Liaoning Zhang Shuang¹, Shen Liping¹, Miao Ning², Ren Yi³, Zhou Wenting¹, Wang Feng¹, Bi Shengli¹, Wang Fuzhen². 1 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, 2 National Immunization Programme, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3 Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Wang Fuzhen, Email: wfnip2@163.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10002-001).

【Abstract】 Objective To understand the genotype and the mutation of amino acid (aa) in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus (HBV) among the hepatitis B cases under surveillance in Liaoning province. **Methods** The serum samples were collected from hepatitis B cases under surveillance in Liaoning. The complete S gene of HBV were amplified and sequenced. The aa sequences were analyzed with bioinformatics software. **Results** A total of 81 sequences of S gene of HBV were obtained, including 7 sequences of genotype B (8.64%), 70 sequences of genotype C (86.42%) and 4 sequences of genotype D (4.94%). The mutation rate of aa of MHR of S gene was 4.87%. The mutation rate of T126I was highest (8.64%). The overall prevalence of mutant strain of MHR was 49.38%(40/81), and it was 42.86% for genotype B(3/7), 47.14% for genotype C (33/70) and 100% for genotype D (4/4). Statistical analysis revealed that there was no age, sex, genotypes and anti-HBc IgM (+/-) specific significant differences in aa mutant strains prevalence, while the difference between ALT abnormal group (ALT ≥ 43 IU/L) and ALT normal group (ALT<43 IU/L) was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Among the hepatitis B cases under surveillance in Liaoning, HBV genotype C predominant, followed by genotype B and genotype D. The mutation of aa in MHR of HBV detected in this study was consistent with previous research results. It is necessary to strengthen the surveillance for HBV mutation to provide accurate information for the development of hepatitis B prevention and control measures.

【Key words】 Hepatitis B virus genotype; SHBsAg; Major hydrophilic region; Mutation

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.02.011

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10002-001)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(张爽、沈立萍、周文亭、王锋、毕胜利),免疫规划中心(缪宁、王富珍);辽宁省疾病预防控制中心(任毅)

通信作者:王富珍, Email: wfnip2@163.com

辽宁省 2006 年血清流行病学调查显示 1~59 岁人群 HBsAg 调整阳性率为 5.50%^[1],与 1992 年调查结果(8.79%)比较下降了 3.29%^[2],表明预防控制已取得显著成效,但仍有新发病例。HBV 感染者的自然史特点和制定免疫接种、抗病毒治疗等防控措施均与病毒基因型及其变异情况有关^[3]。了解新发病例感染 HBV 特征,特别是其主蛋白抗原主要亲水区(MHR)的变异,对防控有重要意义。为此本研究分析辽宁省乙型肝炎(乙肝)监测病例 HBV 基因型分布特点及其主蛋白抗原 MHR 的氨基酸(aa)位点变异,为当地制定免疫规划方案提供依据。

材料与方 法

1. 研究样本:按照全国乙肝监测项目方案要求,即所选县(区)常住人口>30 万或 2011 年乙肝报告病例数不少于 200 例,在辽宁省内选取城乡各 3 个县(区)作为乙肝监测试点。本文研究对象为乙肝监测试点县(区)医院 2013 年 1—6 月通过传染病网络直报系统上报,且进行抗-HBc IgM 检测的所有乙肝监测病例。

2. 研究方法:

(1)抗-HBc IgM 检测:采用美国雅培公司 ARCHITECT i2000 型自动酶免疫分析仪及配套试剂盒(ARCHITECT Anti-HBc IgM Reagent Kit)。使用化学发光微粒子免疫检测法。

(2)核酸提取、基因扩增及测序:采用德国 QIAGEN 公司生产的 QIAamp DNA Blood Mini Kit,严格按照试剂盒说明书操作提取 HBV DNA。利用半巢式 PCR 扩增 HBV S 基因片段,扩增及测序引物为 SF₁:5'-CCT GTA TTT TCC TGC TGG TGG CTC C-3',SR₁:5'-GCA GCA AAG CCC AAA AGA CCC-3',SR₂:5'-GCA GCA AAG CCC AAA AGA CCC-3'。首先使用外侧引物 SF₁/SR₁。反应体系为 10×PCR 缓冲液 5 μl、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP)混合物 4 μl、100 pmol/μl 引物各 1 μl、Taq 聚合酶(Taq 酶)0.25 μl、DNA 模板 5 μl,加双蒸水(ddH₂O)至 50 μl。反应条件为 94℃ 5 min;94℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min。将目的条带的扩增产物送华大公司测序,测序引物为 SF₁。第一轮未得到目的条带,以第一轮反应产物为模板,继续使用内侧引物 SF₁/SR₂ 完成反应。反应体系为 10×PCR 缓冲液 5 μl、dNTP 混合物 4 μl、100 pmol/μl 引物各 1 μl、Taq 酶 0.25 μl、第一轮 PCR 产物 1 μl,加 ddH₂O 至 50 μl。反应条件退火温

度 54℃,其他同第一轮,扩增产物送华大公司测序,测序引物 SF₁/SR₂。

(3)生物信息学分析:依据既往文献^[4-6],参考国家生物技术信息中心(NCBI)收录的 HBV 基因序列,选取 HBV 参考株进行核苷酸同源性比对分析。生物信息学分析软件选用 Mega 5.0 和 Bioedit 7.0。采用邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发生树,可信度评估采用 1 000 bootstrap 值,确定 HBV 基因型。B、C、D 基因型 HBV MHR aa 参考位点及变异位点均参考文献^[5-9]确定,HBV S 基因测序结果与参考序列比对分析,绘制 HBV 主蛋白抗原 MHR aa 位点置换及变异图。

3. 统计学分析:乙肝监测数据信息采用 Microsoft Excel 软件建立数据库,统计分析采用 SPSS 软件进行,包括χ²检验及 Fisher 精确检验。

结 果

1. 病毒 S 基因序列进化分析:2013 年 1—6 月辽宁省乙肝监测试点县(区)共报告乙肝病例 93 例,其中 81 例成功扩增 S 区序列(片段长度为 678 bp),并与 NCBI 下载的 S 基因参考序列比对,得到系统进化树(图 1)。B、C、D 基因型分别占 8.64%(7 例)、86.42%(70 例)和 4.94%(4 例)。

2. 基因型分布特点:对 81 例乙肝病例检测基因型,其基因型分布在以年龄、性别、ALT 水平、抗-HBc IgM(+/-)、临床初次诊断结果分类比较中的差异均无统计学意义(表 1)。

表 1 辽宁省乙肝监测病例 HBV 基因型分布

变 量	基因型			χ ² 值	P 值
	B(n=7)	C(n=70)	D(n=4)		
年龄组(岁)					
≥40	6	42	2		
<40	1	28	2	1.989	0.463
性别(男/女)	5/2	48/22	4/0	1.371	0.569
ALT(IU/L)					
≥43	7	66	3		
<43	0	4	1	2.723	0.277
抗-HBc IgM(+/-)	3/4	39/31	2/2	0.641	0.885
初次诊断(急性/慢性)	6/1	53/17	2/2	1.807	0.448

注:均为确切概率法

3. 主蛋白抗原 MHR aa 位点置换情况:HBV 主蛋白抗原 MHR 位于 S 基因 99~169 位 aa,α 抗原决定簇位于 S 基因 124~147 位 aa。图 2 为乙肝监测病例 HBV 主蛋白抗原 MHR 分别与参考序列比对结果,aa 位点分布如图 2。B 基因型序列变异位点为 Q129H、T143M、A159V;C 基因型序列变异位点为

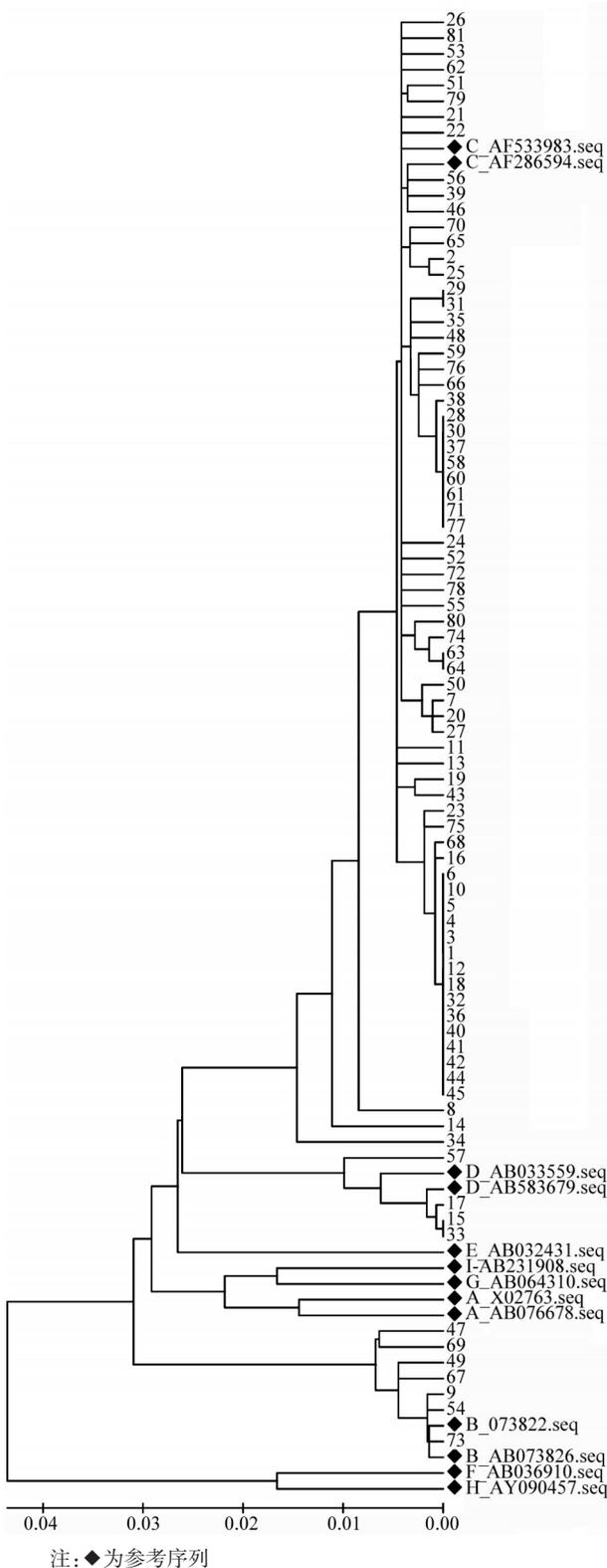


图1 辽宁省乙肝监测病例HBV S基因序列进化分析

Y100C、Q101K、T113S、S117T、I126S/N、T126I、P127T、A128V、Q129H、G130N、T131N、M133T、G145R、F158S、A159G、V168A; D基因型序列变异位点为S113T、T126I、Y134F、S143L、G159A。所有乙肝监测病例的HBV主蛋白抗原MHR aa位点总变

异率为4.87%, 126 aa变异率最高为8.64%(图3)。

4. HBV S基因主蛋白抗原MHR变异株分布: 81例中HBV主蛋白抗原MHR变异株总流行率为49.38%。在不同年龄、性别、基因型和抗-HBc IgM(+/-)分类比较中, 差异无统计学意义, 但在ALT正常组(<43 IU/L)该流行率显著高于ALT异常组(≥43 IU/L), 差异有统计学意义(表2)。

表2 辽宁省乙肝监测病例HBV S基因主蛋白抗原MHR变异株分布

变量	MHR			χ ² 值	P值
	变异株	未变异株	流行率(%)		
总例数	40	41	49.38		
年龄组(岁)					
≥40	25	25	50.00		
<40	15	16	48.39	0.020	0.888
性别(男/女)	27/13	30/11	47.37/54.17	0.312	0.576
ALT(IU/L)					
≥43	35	41	46.05		
<43	5	0	100.00	-	0.026 ^a
抗-HBc IgM(+/-)	19/21	25/16	43.18/56.76	1.482	0.224
基因型					
B	3	4	42.86		
C	33	37	47.14		
D	4	0	100.00	4.118	0.157 ^a

注:^a为确切概率法

讨论

我国自1992年将乙肝疫苗纳入儿童计划免疫管理, 2002年正式纳入国家计划免疫。随着新生儿乙肝疫苗接种率逐年提高, 我国乙肝HBsAg流行率显著降低, 但在国家法定报告传染病直报系统中, 乙肝报告病例数多年来仍居全国法定传染病首位, 这与报告系统的敏感度提高有关, 也与报告系统存在错报、重报有关^[10]。为此我国于2012年开始在全国各省开展急性乙肝监测试点。本研究分析了辽宁省乙肝监测病例HBV基因型分布及其主蛋白抗原MHR变异特点。

我国内地主要流行B、C、D基因型, 北方地区以C型为主, 南方地区以B型为主, D型多见于西藏、新疆等地区。乙肝自然史与基因型密切相关, HBV通过性和母婴传播则以B、C型居多^[11]。本文辽宁省乙肝监测点病例的HBV基因型分布以C型为主, B型次之, 少部分为D型。既往研究结果显示, 我国东北地区B基因型占12.9%、C基因型占84.4%、混合基因型及其他为2.7%^[12], 与本研究结果相似。

由于HBV/P蛋白聚合酶缺乏矫正功能, HBV在复制过程中存在较高的自然变异率, S基因编码的

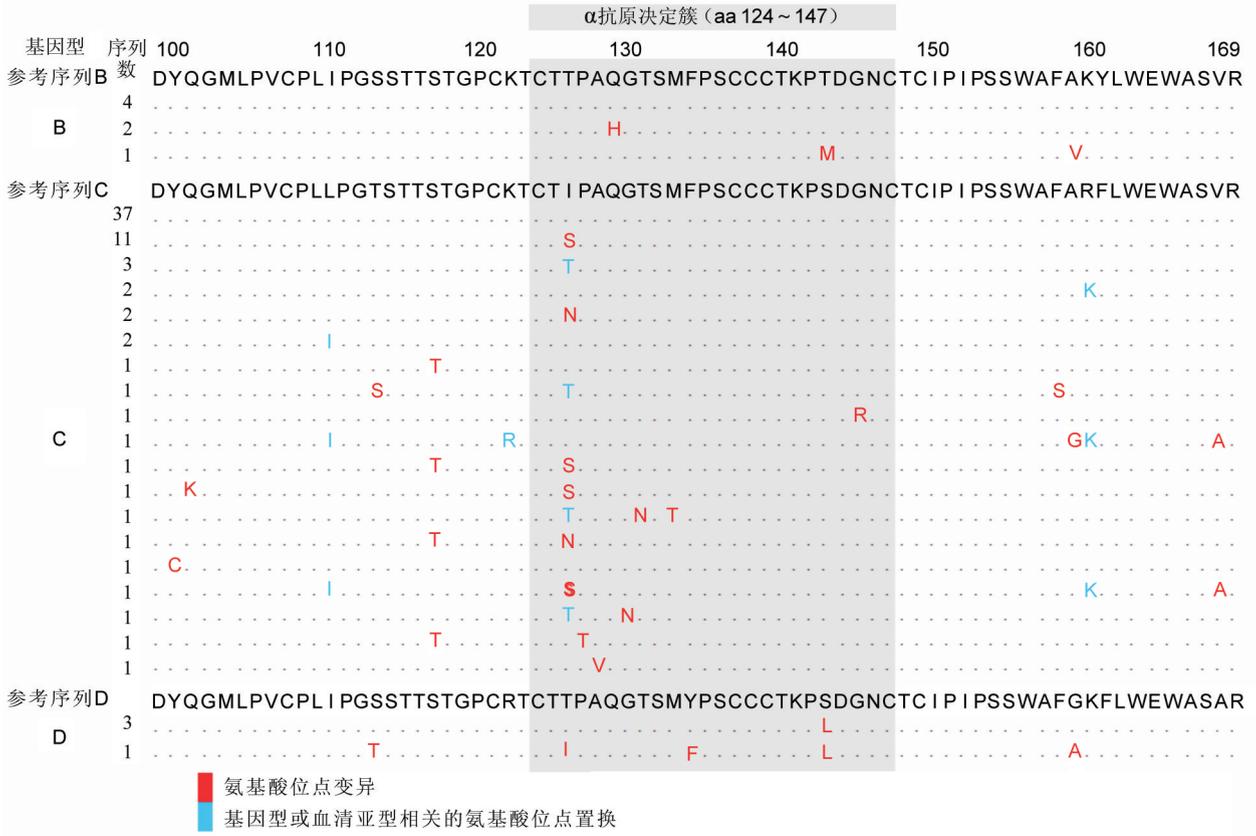


图2 辽宁省乙肝监测病例HBV S基因主蛋白抗原MHR aa位点分布

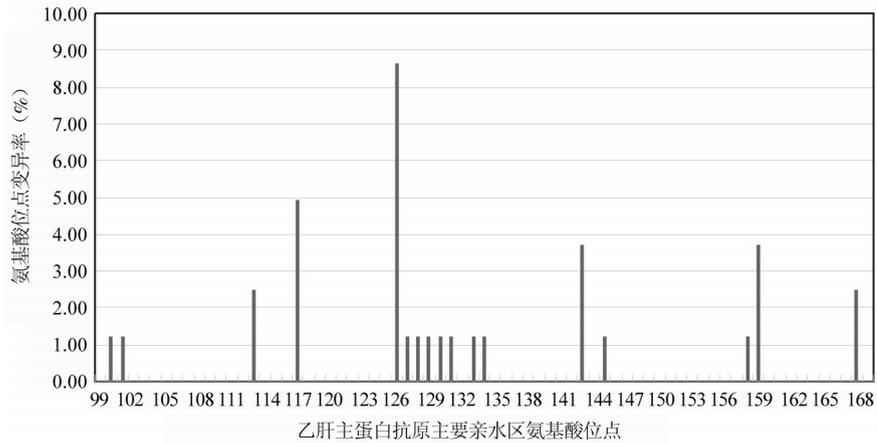


图3 辽宁省乙肝监测病例HBV S基因主蛋白抗原MHR aa位点变异率

外膜蛋白免疫原性较强,在病毒感染和毒力形成中有重要作用。HBV主蛋白抗原MHR位于S基因99~169位aa,含有一系列构象性抗原表位簇,其中有多个半胱氨酸,如位点121、124、137、139和149,这些半胱氨酸之间的相互作用形成抗原构象的重要因素,其中139~147位aa是主要的B细胞表位,160~169位aa是Th细胞表位。我国目前应用的乙肝疫苗,是由转化S基因质粒的酵母表达的主蛋白,免疫原包含外膜蛋白的B细胞表位和Th细胞表位,

不能保护由于S基因变异毒株的感染^[11]。本研究疑似新发病例中HBV主蛋白抗原MHR aa总变异率为4.87%,T126I变异率最高,为8.64%,半胱氨酸位点未发现变异。MHR区变异株总流行率为49.38%(40/81),C基因型MHR变异株流行率为47.14%(33/70),与以往报道我国北方地区C基因型MHR变异株流行率(46.6%)一致^[13]。ALT检测结果正常组(<43 IU/L)MHR变异株流行率显著高于异常组(≥43 IU/L),可能由于病毒变异,与临床症状不明

显的HBV隐匿性感染有关^[11]。但由于本文ALT检测结果异常组(≥43 IU/L)样本量较少,还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Qi XQ, Wang Y. Report of national population sero-epidemiological survey of hepatitis B virus [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 79. (in Chinese)
齐小秋, 王宇. 全国人群乙型肝炎血清流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 79.

[2] Dai ZC, Qi GM. Viral hepatitis in China sero-epidemiological survey in Chinese population (Part B) [M]. Beijing: Scientific and Technological Literature Publishing House, 1996: 49. (in Chinese)
戴志澄, 祁国明. 中国病毒性肝炎血清流行病学调查(下卷)[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1996: 49.

[3] Cheng J. Modern molecular immunology of hepatitis virus [M]. Beijing: Science Press, 2011: 35-45. (in Chinese)
成军. 现代肝炎病毒分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 35-45.

[4] Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus [J]. Intervirology, 2014, 57(3/4): 141-150.

[5] Kitab BI, El Feydi AE, Afifi R, et al. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers[J]. J Infect, 2011, 63(1): 66-75.

[6] Niu J, He S, Su C, et al. Variability of the S gene of hepatitis B virus in southeastern China [J]. Arch Virol, 2010, 155 (12): 1951-1957.

[7] Bian T, Yan H, Shen L, et al. Change in hepatitis B virus large surface antigen variant prevalence 13 years after implementation

of a universal vaccination program in China [J]. J Virol, 2013, 87 (22): 12196-12206.

[8] Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. No increase in prevalence of hepatitis B surface antigen mutant in a population of children and adolescents who were fully covered by universal infant immunization [J]. J Infect Dis, 2010, 201(8): 1192-1200.

[9] Ma Q, Wang Y. Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen [J]. J Med Virol, 2012, 84 (2): 198-206.

[10] Cui FQ, Lu Y, Wang FZ, et al. Analysis on the proportion of reported hepatitis B through pilot surveillance in China during 2006 [J]. Chin J Epidemiol, 2007, 28(9): 872-874. (in Chinese)
崔富强, 卢永, 王富珍, 等. 中国2006年乙型肝炎报告病例构成分析[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(9): 872-874.

[11] Luo KX. Hepatitis B basic biology and clinical science [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 48-273. (in Chinese)
骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 48-273.

[12] Yin J, Zhang H, He Y, et al. Distribution and hepatocellular carcinoma-related viral properties of hepatitis B virus genotypes in Mainland China: a community-based study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(3): 777-786.

[13] Shi Y, Wei F, Hu D, et al. Mutations in the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus genotype C in North China [J]. J Med Virol, 2012, 84(12): 1901-1906.

(收稿日期: 2014-09-26)

(本文编辑: 张林东)

读者·作者·编者

中华流行病学杂志2014年度审稿专家名单

(按姓氏汉语拼音排序, 2013-11-01-2014-11-30)

- 曹彬 曹卫华 曹晓斌 柴君杰 陈坤 陈文 陈曦 陈东科 陈素良 陈维清 陈裕明 陈园生 程颖
 崔步云 党少农 董碧蓉 段招军 方美玉 方向华 傅继华 高婷 龚向东 龚震宇 郭建花 郭志荣 海荣
 何纳 何耀 贺建华 胡源 胡永华 华琦 还锡萍 黄久仪 贾曼红 姜垣 蒋岩 蒋秀高 荆春霞
 静进 阚海东 李伟 李卫 李劲松 李敬云 李立明 李硕颀 李太生 李献云 李秀央 梁争论 廖苏苏
 林玫 林鹏 刘莉 刘民 刘洋 刘爱忠 刘殿武 刘广文 刘列钧 刘忠泉 卢金星 卢亦愚 陆家海
 吕繁 吕筠 吕嘉春 马军 马越 马冠生 马会来 马家奇 马文军 马依彤 门可 米杰 倪明健
 潘凯枫 潘晓红 庞琳 裴丽君 彭志行 邱洪斌 曲成毅 任爱国 任泽舫 阮玉华 赛晓勇 邵祝军 施榕
 施国庆 施小明 时景璞 苏虹 孙强正 孙照刚 谭红专 汤哲 汤奋扬 唐青 唐耀武 田庆宝 汪宁
 汪天平 王蓓 王岚 王璐 王鸣 王薇 王滨有 王多春 王环宇 王建华 王金桃 王全意 王声湧
 王素萍 王忆军 王增珍 王志萍 魏建春 温博海 乌正赅 武鸣 武阳丰 夏连续 项永兵 肖水源 谢娟
 徐爱强 徐勇勇 许汴利 闫永平 严杰 严卫丽 杨泽 姚应水 殷文武 于普林 余宏杰 余金明 余运贤
 曾年华 曾哲淳 詹思延 张国刚 张丽杰 张顺祥 张卫东 张迎修 张之伦 赵方辉 赵根明 赵景波 赵亚双
 赵一鸣 郑素华 周晓农 朱谦 朱益民 庄辉 庄勳 祖荣强