

# 广西地区乙型肝炎病毒无症状携带者 乙型肝炎病毒前 C 区突变分析

方钟燎 庄辉 杨进业 葛宪民 王学燕 龚健 李荣成 Roger Ling Tim J Harrison

**【摘要】** 目的 调查广西地区乙型肝炎病毒(HBV)无症状携带者 HBV 前 C 区基因突变株的流行情况。方法 用套式聚合酶链反应(nPCR)对 77 例广西南部、北部地区人群 HBV 无症状携带者血清 HBV 前 C 区进行扩增,阳性者用直接测序法进行序列分析。结果 39 例 HBsAg 无症状携带者血清 HBV DNA 阳性,阳性率为 50.7%(39/77),突变株出现率为 22.1%(17/77)。南部地区阳性率为 55.6%(20/36),其中 6 份标本出现突变株,占 30%,常见的突变类型是 nt1858 位发生点突变(T→C),只有一份标本在 nt1896 发生点突变(G→A),导致终止密码产生,该标本同时伴有 nt1837 点突变(A→G)。北部地区阳性率为 46.3%(19/41),其中有 11 份标本出现突变株,占 57.9%,常见的突变类型是 nt1896 位发生点突变(G→A),这些标本中有 4 份同时在 nt1846 发生点突变(A→T),2 份同时在 nt1862 发生点突变(G→T),标本 734 分别在 nt1856、1858 发生点突变(C→T、T→C)。结论 广西地区 HBV 无症状携带者 HBV 前 C 区突变株的流行率居全国中等水平,广西南部、北部是否存在主要突变类型不同值得进一步研究。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒;基因;前 C 区;突变;感染率

**The prevalence of hepatitis B virus precore mutant isolated from asymptomatic carriers in Guangxi** FANG Zhongliao\*, ZHUANG Hui, YANG Jinye, GE Xianmin, WANG Xueyan, GONG Jian, LI Rongcheng, Roger Ling, Tim J Harrison. \*Centre for Diseases Control of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**【Abstract】 Objective** In order to understand the prevalence of hepatitis B virus (HBV) precore mutants isolated from asymptomatic carriers in Guangxi. **Methods** Nested polymerase chain reaction (nPCR) was used for amplification of HBV DNA precore in 77 carrier sera, followed by HBV DNA nPCR products sequencing using direct sequencing. **Results** Fifty point seven per cent of 77 carriers was positive for HBV DNA with a prevalence of mutants 22.1% (17/77). HBV DNA positive rate in the southern part of the autonomous region was 55.6% (20/36). Six of them were mutants, counting for 30%. The common mutation in the southern part was seen T→C at nt1858 while nt1896 stop mutation was discovered in one sample only, which was accompanied by point mutation at nt1837 (A→G). HBV DNA positive rate in the northern part was 46.3% (19/41) with 11 of them were mutants, counting for 57.9%. The common mutation in that area stopped at nt1896. Among samples with stopped mutation, 4 samples had mutation at nt1846 (A→T), 2 samples at nt1862 (G→T). Both mutation at nt1856 (C→T) and nt1858 (T→C) could be seen in sample 734. **Conclusions** The prevalence of HBV precore mutant in asymptomatic carriers in Guangxi was at the average level in China. Further study is needed to determine the difference between the southern and the northern part of the region in the common type of mutation exists.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Gene, pre C; Mutation; Prevalence

## 感染乙型肝炎病毒(HBV)可引起宽的肝脏损

基金项目 卫生部科研基金资助项目(98-1-351);广西科技厅科研基金资助项目(桂科回字 9817136)

作者单位:530021 南宁 广西壮族自治区疾病预防控制中心(方钟燎、杨进业、王学燕、龚健、李荣成);北京大学基础医学院(庄辉);广西职业病防治研究所(葛宪民);Department of Medicine, Royal Free Campus, University College London(Roger Ling, Tim J Harrison)

害谱,即从急性自愈性感染到爆发性肝炎、慢性肝炎、肝硬化和肝癌,病毒因素和宿主的免疫反应在决定 HBV 感染的过程中起重要作用。HBe 抗原和 HBc 抗原均以细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)为靶细胞,生成和分泌 HBe 抗原的野毒株感染细胞在血清学转变期间可因被 CTL 破坏而将野毒株清除,但前 C 突变株却因其终止生成 HBe 抗原而逃脱 CTL 的免疫攻击,故仍持续感染<sup>[1]</sup>。在研究爆发性 HB 患者时发现可在病人及其接触者中测到前 C 区终止密

码突变株,提示前 C 区终止密码突变株具有传染性<sup>[2]</sup>,体外研究和动物实验研究结果也支持这个观点<sup>[3,4]</sup>。广西地区人群中 HBV 感染率约 14%,是全国 HBV 感染率较高的地区之一<sup>[5]</sup>。因此,调查广西地区人群 HBV 无症状携带者 HBV 前 C 区基因突变株的流行情况,有助于了解广西人群 HBV 高感染率的原因,现将调查结果报道如下。

### 材料与方法

1. 研究对象:血清标本采自广西南部地区隆安县(36份)和北部地区桂林市(41份)人群 HBV 无症状携带者,601~634 为采自隆安县的标本,702~741 为采自桂林市的标本(表 1),在 77 例携带者中 50 例 HBeAg 阳性,14 例抗-HBe 阳性。这些 HBV 无症状携带者均为献血时筛选出来的,转氨酶均在正常值范围。

2. 试剂:聚合酶链反应(PCR)试剂购自美国克隆技术实验室(CLONTECH Laboratories);DNA 纯化试剂购自美国 Promega 公司;循环测序试剂盒购自美国 USB 公司。

#### 3. 研究方法:

(1)DNA 提取:取 85  $\mu$ l 血清,加入 5  $\mu$ l 蛋白酶 K (20 mg/ml)及 10 倍蛋白酶 K 缓冲液 10  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 温育 5 h;用等体积酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)抽提 DNA 2 次,再用氯仿/异戊醇(24/1)抽提 DNA 1 次,每次抽提离心速度为 13 000 r/min,收集上清液;最后一次抽提后将所得溶液调至 0.3 mol/L NaAc pH 5.2 然后按 2.5 倍体积加入无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 过夜;次日 13 000 r/min 离心 15 min,除去液体,抽空,最后 DNA 溶于 25  $\mu$ l TE (pH 8.0)。

(2)DNA 扩增:取以上 DNA 溶液 10  $\mu$ l 做 ne PCR,反应体积为 50  $\mu$ l。第一轮扩增引物为 B935 (nt1240~1260 5'-GCGCTGCAGAAGGTTTGTGG CTCCTCTG-3') 和 MDC1 (nt2304~2324 5'-TTGATAAGATAGGGCATTTC-3'),反应条件为热启动 94 $^{\circ}$ C 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s。30 个循环后继续循环 1 次(72 $^{\circ}$ C 10 min,22 $^{\circ}$ C 5 min);第二轮扩增引物:CPRF1 (nt1678~1695 5'-CAATGTCAACGACCGACC-3' 和 CPRR1 (nt1928~1948 5'-GAGTAACTCCACAGTAGCTC C-3'),反应条件为热启动 94 $^{\circ}$ C 1 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s。30 个循环后继续循环 1 次(72 $^{\circ}$ C 10 min,22 $^{\circ}$ C 5 min)。

表1 广西南部、北部地区 HBV 携带者 HBV DNA

| 标本号 | 阳性 PCR 标本血清学标记 |       |       |       |       |
|-----|----------------|-------|-------|-------|-------|
|     | HBsAg          | HBsAb | HBeAb | HBeAg | HBcAb |
| 601 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 602 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 603 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 604 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 605 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 606 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 607 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 609 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 610 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 615 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 618 | +              | -     | +     | -     | -     |
| 619 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 621 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 622 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 623 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 624 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 629 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 630 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 633 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 634 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 702 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 704 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 706 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 707 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 711 | +              | -     | +     | -     | -     |
| 712 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 714 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 715 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 716 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 717 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 718 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 729 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 731 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 734 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 735 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 736 | +              | -     | +     | -     | +     |
| 737 | +              | -     | +     | +     | -     |
| 739 | +              | -     | +     | -     | -     |
| 741 | +              | -     | +     | +     | -     |

(3)DNA 纯化:将 PCR 产物加入装有 100  $\mu$ l 纯化缓冲液的 1.5 ml 离心管,加入 1 ml 松香,然后将该混合液加入注射器抽空过滤,加 80% 异丙醇洗注射器,将注射器放入 1.5 ml 离心管 13 000 r/min 离心,除去洗液,等 1 min 后加入 50  $\mu$ l 水,再将注射器放入 1.5 ml 离心管离心 1 min,离心管内的溶液即为 DNA 纯化液。

(4)DNA 序列测定:采用直接测序法,即取纯化的 DNA 2  $\mu$ l 配制循环终止反应混合物(按试剂盒说明书进行),进行循环终止反应,引物为 CPRF1,同位

素用<sup>33</sup>P,循环反应条件为:95℃ 30 s,55℃ 30 s,60℃ 6 min,35个循环后加4 μl 终止液以终止反应。测序反应混合物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电压80 V,时间2 h,在10%醋酸中固定凝胶后,在80℃真空下烘干胶块,然后将凝胶与X线片一起放入暗盒,次日洗片、读片,阅片时假如发现重复带而无法分辨时,进行克隆测序,每份标本调3~5个克隆进行测序。

## 结 果

1. ne PCR 结果:77例HBsAg无症状携带者血清ne PCR扩增后,39例HBV DNA阳性,阳性率为50.7%(39/77)。其中隆安县标本阳性率为55.6%(20/36),桂林市的阳性率为46.3%(19/41),60%(30/50)HBeAg阳性携带者HBV DNA阳性,50%(7/14)抗-HBe阳性携带者HBV DNA阳性。

2. DNA 序列测定结果:由图1可见:①隆安6份标本有突变,占30%,常见的突变类型是nt1858位发生点突变(见标本610、618、619、622、633,T→C);另外有1份标本在nt1896发生点突变(G→A),导致终止密码产生,该标本同时伴有nt1837点突变(A→G)。②桂林市11份标本发生突变,占57.9%,常见的突变类型是nt1896位发生点突变(见标本707、711、712、715、717、731、735、736、737、739,G→A),导致终止密码产生,这些标本中有4份同时在nt1846发生点突变A→T,2份同时在nt1862发生点突变(G→T),标本734分别在nt1856、1858发生点突变(C→T、T→C)。

## 讨 论

目前已发现前C区有三种类型突变(起始密码突变、移码突变和无义突变)均可阻断HBeAg的产生。起始密码突变是单个核苷酸改变,致使密码1变为CTG、TTG、ACG、ATA或ATT,移码突变包括在横跨3至4个密码的5个连续的胸苷中单个或双个胸苷的插入或缺失,其他的移码突变包括在第9、11和29密码的单个核苷酸的插入,在密码2的双个核苷酸的插入,在密码9、11和12的单个核苷酸的缺失,无义突变中除常见的密码28 TAG突变外,其他不常见的还有密码28由TGG→TGA、TGG→TAA,密码2由CAA→TAA,密码21由AAG→TAG<sup>[6]</sup>。本研究39份标本中11份在nt1896发生点突变(G→A)。

这11份标本中8份HBeAg阴性,另外3份标本血清HBeAg仍为阳性,可能的原因是标本采集时病例正处在HBeAg向抗-HBeAg的转变期。nt1858位碱基T→C突变可为nt1896位的G提供更稳定的配对碱基,使nt1896位碱基更不易发生突变<sup>[7]</sup>,本研究共有6份标本出现这种情况。

本研究发现广西南部、北部地区HBV前C区常见的突变类型不同,南部常见的突变类型是nt1858位发生点突变(T→C),北部常见的突变类型是nt1896位发生点突变(G→A)。由于本研究用直接测序法进行测序,此法不能区别不同毒株同一位点上的不同碱基,在测序过程中,遇到混合序列的情况时,则采用不同的引物进行测序,而人体可同时感染不同的HBV毒株,可见,本实验方法不能完全测出人体感染的所有毒株。因此,广西南部、北部地区是否存在不同的基因型值得进一步研究。

20世纪80年代初的流行病学调查结果表明,HBV感染率在中国北方较低,其感染率在5%~9%之间,而南方的感染率则较高,在10%~16%之间<sup>[8]</sup>。贺文萍等<sup>[9]</sup>用直接测序法检测东北地区93例HBV无症状携带者,发现其中32例有前C区突变,占33%。为确定HBV前C区突变株在香港居民HBV无症状携带者中的流行情况及突变株有无传染性,Lok研究小组通过指示病例用直接测序法检测89例HBsAg阳性的家庭成员,发现33%的无症状携带者有前C区突变株,并认为第1856位核苷酸突变株(C→T)具有传染性<sup>[10]</sup>。张清波等<sup>[11]</sup>通过克隆测序15例上海HBV无症状携带者,无一例出现突变株。朱建芸等<sup>[12]</sup>检测广州市居民,发现60%的HBV无症状携带者有1896位核苷酸突变株,认为该突变株广泛存在于HBV感染者中。王小飞等<sup>[13]</sup>报道成都HBV无症状携带者有8.7%出现前C区突变株。海南HBV无症状携带者有前C区突变株的百分比为12.1%(8/66)<sup>[14]</sup>。本研究用直接测序法检测广西77例HBV无症状携带者,前C区突变株占22%。可见,北方和南方HBV前C区突变株感染率无明显差异。尽管认为前C区突变株因其终止生成HBe抗原而逃脱CTL的免疫攻击,可持续感染并具有传染性,但以上诸位学者及本研究结果提示HBV在人群中感染率的高低与前C区突变株的出现无明显相关,如何解释这个现象,值得进一步探讨。

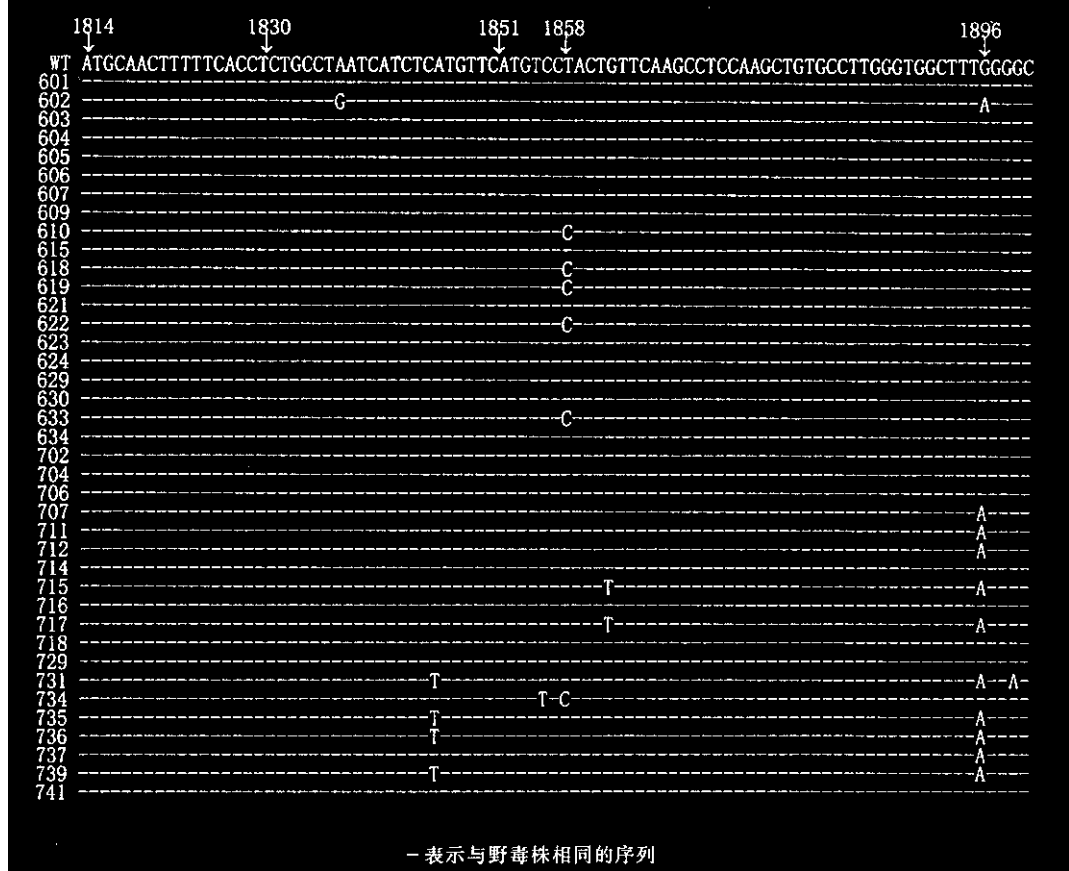


图1 西南部、北部地区 HBV 无症状携带者病毒前 C 区基因测序结果

### 参 考 文 献

- 1 姚楨. 分子乙型肝炎病毒相关病学. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 8.
- 2 Yotsumoto S, Kojima M, Shoji I, et al. Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. *Hepatology*, 1992, 16: 31-35.
- 3 Ton SP, Li JS, Vitvitski L, et al. Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus: relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology*, 1992, 191: 237-245.
- 4 Ogata N, Miller RH, Ishak KG, et al. The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology*, 1993, 165: 127-133.
- 5 丁正荣, 李荣成, 龚健, 等. 乙型肝炎与肝癌关系的流行病学研究——广西 HBsAg 携带者及肝损害者的分布及发生肝癌的前瞻性研究. *中华流行病学杂志*, 1988, 9: 220-223.
- 6 Harrison TJ, Zuckerman AJ. *The molecular medicine of viral hepatitis*. England: Chichester, 1997. 99-103.
- 7 Bozdayi AM, Bozkaya H, Turkyilmaz A, et al. Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV

- infection in Turkey. *Infection*, 1999, 27: 357-360.
- 8 Jiang Y. Epidemiological studies of viral hepatitis A and B in the People's Republic of China. In: Szmuness W, Alter H, Maynard JL, eds. *Viral hepatitis international symposium*, 1981. New York: The Franklin Institute Press, 1981. 1221-1143.
- 9 贺文萍, 山下启子, 武藤妙子, 等. 乙型肝炎病毒前 C 区突变与临床关系的研究. *中国公共卫生学报*, 1997, 16: 260-261.
- 10 Akarca US, Greene S, Lok ASF. Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBsAg-positive family members. *Hepatology*, 1994, 19: 1366-1370.
- 11 张清波, 古兆云, 徐肇, 等. 乙型肝炎病毒前核心区基因变异的研究. *肝脏病杂志*, 1995, 3: 29-32.
- 12 朱建芸, 崇雨田, 谢东英, 等. HBV 前 C 区 1896 位点变异与 HBV 感染者肝功能损害程度的关系. *中国现代医学杂志*, 1998, 8: 4-5.
- 13 王小飞, 刘华瑞, 王锦蓉, 等. 乙型肝炎和肝癌患者乙型肝炎病毒前 C 区 1896 位点突变的研究. *中华传染病杂志*, 1996, 14: 11-14.
- 14 王华民, 屠红, 李平洋, 等. 海南省 HBV Pre-C 区变异研究. *海南医学院学报*, 1997, 3: 111-114.

(收稿日期 2002-01-10)

(本文编辑: 尹廉)