

# 乙型肝炎免疫球蛋白阻断乙肝病毒母婴传播过程中病毒 S 区基因变异的研究

陈素清 朱启榕 王建设

**【摘要】** 目的 了解乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)在阻断母婴传播过程中 S 基因变异的特点,比较与未予阻断者的差异,探讨基因变异与宫内传播的关系,协助评价 HBIG 的治疗安全性。方法 将 18 对乙型肝炎病毒(HBV)携带母亲及其宫内感染新生儿按母亲产前处理分为 HBIG 组 8 对,母亲于产前 3 月起肌肉注射 HBIG 200~400 IU 至分娩前;对照组 10 对,母亲产前不接受 HBIG 者。巢式 PCR 扩增 HBV S 基因片段并直接测序。以每对病例第一份(母亲孕中期)血清 HBV 株 S 基因区氨基酸(或核苷酸)作为标准,对每对病例第二份血清(母亲分娩前)和第三份血清(新生儿)HBV 株进行分析。结果 HBV S 区碱基替代突变率和氨基酸变异数在 HBIG 组和对照组之间的差异均无统计学意义;18 例宫内感染儿 17 例其病毒株与母亲分娩前的优势株一致,其中 4 例为 S 区变异株;18 例宫内感染儿病毒株分型 B 型 *adw2* 12 例, C 型 *adrq*<sup>+</sup> 6 例。结论 无症状携带 HBV 孕妇产前使用现有剂量 HBIG 至临产并未增加 HBV S 区的变异。HBV S 区变异株和未变异株均可经宫内传播,宫内感染发生于孕后期;HBV S 区变异并非发生宫内感染的主要原因。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒;免疫球蛋白,乙型肝炎;基因突变

**Study on the S region gene mutation of hepatitis B virus during prevention of HBV transmission in uterus with hepatitis B immunoglobulin** CHEN Su-qing, ZHU Qi-rong, WANG Jian-she. Department of Infectious Diseases, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**【Abstract】** **Objective** To study the relationship between hepatitis B immunoglobulin (HBIG) injection before delivery and hepatitis B virus (HBV) S gene mutation. **Methods** 18 neonates infected with HBV in uterus and their mothers were divided to a) HBIG group (8) in which their mothers received HBIG injection before delivery and b) control group (10) in which their mothers never received any treatment. HBV DNA fragments were amplified by nest-PCR from sera of these neonates and their mothers. S gene region of these HBV DNA fragments were directly sequenced and data on mutations was analyzed. **Results** There was no significant difference on nucleotide and amino acid changes in the S gene between the HBIG group and the control group. The majority HBV strains of newborn (17/18) were identical to their mother's dominant strains before delivery, including four mutation HBV strains. Among 18 newborns with HBV intrauterine infection, 12 were infected by B type (*adw2*), and 6 by C type (*adrq*<sup>+</sup>). **Conclusion** Mothers who were asymptomatic HBsAg carrier and received injections of HBIG before delivery would not be influenced by HBV S gene mutation. HBV intrauterine transmission with or without gene mutation might occur in the third-trimester of pregnancy. Gene mutation of HBV was not the main factor in intrauterine transmission of HBV.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Hepatitis B, immunoglobulin; Gene mutation

母婴宫内传播是乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)的主要传播方式,降低母婴传播率是预防和控制乙肝的关键。近年来采用的在乙肝表面抗原(HBsAg)阳性孕妇中产前使用小剂量乙肝免疫球蛋白(HBIG)对 HBV 母婴宫内传播的良好阻断效果渐引起学术界的关注<sup>[1,2]</sup>,但该方法对 HBV 突变以及宫内传播的影响,国内外均未见相关临床报道。

本研究旨在通过对无症状 HBV 携带母亲及其宫内感染新生儿体内 HBV S 基因序列的分析,了解 HBIG 在阻断母婴传播过程中 S 基因变异的特点,比较与未予阻断者的差异,探讨基因变异与宫内传播的关系,协助评价 HBIG 的治疗安全性。

## 对象与方法

1. 研究对象:18 对来自 2003 年 12 月至 2005

年 2 月在福建医科大学附属第一医院和莆田县医院等产科筛查出的无症状携带 HBsAg 母亲及其所生拟宫内感染新生儿。母亲在孕中期和分娩前两次筛查 HBsAg 均阳性, 血谷丙转氨酶正常; 而且既不存在妊高症、前置胎盘、胎盘早剥等病理产科情况; 也未接受其他抗 HBV 治疗或因其他原因应用激素或免疫抑制剂。新生儿外周血 HBsAg 和 (或) HBV DNA 阳性。按母亲产前接受 HBIG 情况将研究对象分为①HBIG 组 8 对: 每对中母亲于产前 3 月起每月一次肌肉注射 HBIG 200~400 IU 至分娩前, 至少 3 次; ②对照组 10 对: 产前未接受 HBIG。两组留取孕中期 (孕 20~24 周) 和分娩前 1~7 天 (HBIG 组即应用 HBIG 前、后) 的静脉血标本, 所有新生儿均留取外周血。分离血清, -70℃ 冻存, 统一进行 HBV DNA 的抽提及扩增、测序。

2. 主要试剂: 高保真 PCR 试剂盒 (Roche 公司产品); 琼脂凝胶 (Gibcol 公司产品); 胶回收试剂盒 (Promega 公司产品); 蛋白酶 K、酵母 tRNA (Invitrogen 公司产品)。

### 3. 实验方法:

(1) HBV DNA 的抽提: 采用酚-氯仿抽提法。

(2) HBV S 基因片段的扩增: 巢式 PCR。第一次 PCR 上游引物 5'-CAATCGCCGCGTTCGAGAA G-3'、下游引物 5'-GCGTCAGCAAACACTTGGC-3'; PCR 反应参数为 94℃ 变性 2 min, 然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min; PCR 产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 2000 bp 条带为目的产物, 以胶回收试剂盒回收。第二次 PCR 上游引物 5'-GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'、下游引物 5'-CGAAAGGGGGT (GA) ACA(TCGA)ACCGAA-3'; PCR 反应参数为 94℃ 变性 2 min, 然后 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min; PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 485 bp 条带为目的产物, 以胶回收试剂盒回收。

(3) HBV S 基因片段测序: 由上海华诺公司完成, 测序引物为第二次 PCR 上游引物。

4. 序列分析及统计分析: 核苷酸序列采用 Bioedit 分析软件进行翻译和比对。

(1) 血清型和基因型分析: 首先根据 S 抗原 122、160 位氨基酸判定为 d/y 和 w/r, 再以 127 位氨基酸的种类推断 W 1~4, 以 159 及 177 位氨基酸判定是否 *adrq*。参照文献, 根据 Alw I、Ear I、Bsr I

和 Sty I 四个 S 区内酶切位点附近碱基序列的差异来区分基因型<sup>[3,4]</sup>。

(2) 氨基酸、核苷酸变异的分析: 以每对病例第一份 (母亲孕中期) 血清 HBV 株 S 基因区氨基酸 (或核苷酸) 作为标准, 对每对病例第二份血清 (母亲分娩前) 和第三份血清 (新生儿) HBV 株进行分析; 若缺第一份 (母亲孕中期) 血清, 就以第二份血清 (母亲分娩前) HBV 株 S 基因区氨基酸 (或核苷酸) 作为标准, 对第三份血清 (新生儿) HBV 株进行分析。

(3) 组间差异比较采用  $\chi^2$  分析。

## 结 果

除第 8 对 (HBIG 组) 母亲无孕中期 DNA 样品; 第 14~18 对 (对照组) 母亲无孕中期 DNA 样品, 以上 18 对病例共 48 份 DNA 样品, 均扩增出 HBV S 基因片段。

### 1. HBV S 核苷酸及氨基酸序列比较分析:

(1) 核苷酸序列的分析: 序列分析结果表明, 每对病例不同来源 HBV DNA S 基因片段的同源率达 98.6% 以上, 每对病例母亲及其新生儿病毒株的基因型和血清型均相同。每对病例各株间的变异均为单核苷酸的点替代变异, 无缺失、插入等其他形式的变异。

以每对病例母亲孕中期血清 HBV 株 S 基因区核苷酸作为标准, 比较每对病例母亲分娩时和新生儿 HBV 株核苷酸序列; 若缺母亲孕中期血清, 就以母亲分娩前 HBV 株 S 基因区核苷酸作为标准, 对新生儿 HBV 株进行分析。HBIG 组 15 株共有 47 个碱基变异, 对照组 15 株共有 46 个碱基变异。碱基替代变异率在 HBIG 组和对照组间差异无统计学意义, 尤其在两组的新生儿间无差异 (表 1)。

表 1 分娩前母亲和新生儿 HBV S 基因碱基变异分析

组别	株数	变异株数 ( $\bar{x} \pm s$ )	碱基变异率 (%)
分娩前母亲*			
HBIG 组	15	3.1 ± 1.7	47(0.68)
对照组	15	3.1 ± 1.4	46(0.68)
新生儿#			
HBIG 组	8	2.7 ± 1.6	22(0.61)
对照组	10	2.6 ± 1.2	26(0.58)

\*  $\chi^2 = 0.00, P = 0.68$ ; #  $\chi^2 = 0.04, P = 0.48$

(2) 氨基酸序列的分析: 由核苷酸推导出氨基酸序列。以每对病例母亲孕中期血清 HBV 株 S 基因区氨基酸作为标准, 比较每对病例母亲分娩前新生

儿 HBV 株氨基酸序列;若缺母亲孕中期血清,就以母亲分娩前 HBV 株 S 基因区氨基酸作为标准,对新生儿 HBV 株进行分析。HBIG 组 15 株共有 2 个氨基酸变异,对照组 15 株有 2 个氨基酸变异(表 2)。

表2 分娩前母亲和新生儿 HBV S 基因氨基酸和核苷酸变异

来源	氨基酸位置	核苷酸变化	氨基酸变异
第 5 对母亲分娩前和新生儿	47	ACG→AAG	T→K
第 6 对母亲分娩前和新生儿	159	GCA→GTA	A→V
第 10 对母亲分娩前和新生儿	133	ATG→TTG	M→L
第 15 对新生儿	126	ACT→ATT	T→I

2. HBV 血清型和基因型的分析:结果见表 3。

表3 18 对病例血清优势 HBV 株的分型

组别	病毒株编号	来源	基因型	血清型	
HBIG	1,2,3	第 1 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	4,5,6	第 2 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	7,8,9	第 3 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	10,11,12	第 4 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	13,14,15	第 5 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>	
	16,17,18	第 6 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	19,20,21	第 7 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2	
	22,23	第 8 对母亲分娩前、新生儿	B	adw2	
	对照	24,25,26	第 9 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2
		27,28,29	第 10 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	B	adw2
		30,31,32	第 11 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>
		33,34,35	第 12 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>
		36,37,38	第 13 对母亲孕中期、分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>
		39,40	第 14 对母亲分娩前、新生儿	B	adw2
		41,42	第 15 对母亲分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>
		43,44	第 16 对母亲分娩前、新生儿	B	adw2
		45,46	第 17 对母亲分娩前、新生儿	B	adw2
		47,48	第 18 对母亲分娩前、新生儿	C	adrq <sup>+</sup>

讨 论

目前我国的 HBIG 制剂是以重组乙肝疫苗免疫健康献血员后采血制备的。疫苗本身是以 S 基因重组,因而我们考察 S 基因序列,特别是编码“α”抗原决定簇的基因序列片段。S 区编码的 3 种外膜蛋白在病毒生命周期中起重要作用,包括附着和侵入肝细胞,参与病毒外膜装配,促使病毒成熟、分泌和阻断宿主的免疫应答及提供保护性免疫的免疫原。因此该区基因突变,可能影响 HBV DNA 的复制过程和结果或仅是导致 HBsAg 构象的改变从而逃避宿主的免疫监视。

1. 无症状携带 HBV 孕妇产前使用 HBIG 对病

毒变异的影响:本研究以无症状携带 HBV 孕妇孕中期(使用 HBIG 前)血清中的病毒株为标准,考察 HBIG 使用后病毒在 S 区变异的情况,结果显示无论是单核苷酸的点替代突变率还是氨基酸的变异数在 HBIG 组和对照组间差异均无统计学意义。提示无症状携带 HBV 孕妇产前使用现有剂量 HBIG 至分娩前并未使血清中占优势的病毒株发生明显的变化,至少短期内未显示比对照组有更多的变异株出现。

研究显示<sup>[5]</sup>,在乙肝相关性肝病终末期行肝移植时使用 HBIG 预防 HBV 再感染,出现病毒 S 基因区 α 决定簇的变异株,反映了 HBIG 对 HBV 的免疫选择。α 决定簇的抗体对所有亚型的 HBV 提供保护,该决定簇内某些个别氨基酸突变,就可能改变 HBsAg 的构型,从而改变其抗原性和免疫原性,具有重要生物学意义。已被证实的有 aa124, aa127, aa129, aa141, aa142, aa145, aa147 等位置的变异株,或不被抗体识别,或不能被惯用的血清学试验检测出,与移植后期再感染、移植失败有显著的相关性。这类研究中 HBIG 通常使用达 3 个月以上,总剂量达 2 万至 10 万 IU 以上。还有文献报道突变和 HBIG 使用的时间、剂量有关<sup>[6]</sup>,在 HBIG 使用仅 2 个月内,总剂量不足 2 万 IU 的病例中未观察到该区域病毒变异。停止使用 HBIG 后,变异株消失。变异病毒株的出现与其作用机理密切相关,大剂量的 HBIG 旨在中和循环中的病毒株,占优势的病毒株被大量清除,原有的非优势的不被 HBIG 识别的变异株得以扩增,可能成为新的优势株而被检出。当外在的免疫压力消失后,原有的病毒株再次成为优势株。这已在一些研究中得到证实<sup>[6,7]</sup>。本研究中无症状 HBV 携带孕妇在孕晚期接受的 HBIG 总剂量为 600~1600 IU,持续时间 12-16 周,远低于文献报道的剂量和疗程,对 HBV 的免疫压力有限,可能因此并未增加病毒变异。

HBV 为 DNA 病毒,由于存在逆转录的复制过程,其自然基因变异率较一般 DNA 病毒为高(每个碱基约  $1.4 \times 10^{-5} \sim 3.2 \times 10^{-5}$ /每年),然而抗病毒药物和疫苗、HBIG 等的应用似乎使 HBV 变异更为突出,已引起学术界的关注<sup>[8]</sup>。本研究对无症状 HBV 携带母亲产前使用小剂量 HBIG,未发现血清中占优势的病毒株发生明显的变化。当然,要明确小剂量 HBIG 产前阻断的安全性,还有待扩大样本量进一步深入研究。

2. 宫内传播病毒株的分析:在本研究的 18 例宫内感染儿中绝大多数(17 例)病毒株的 S 区序列与分娩前母亲血清中优势毒株的 S 区序列一致,即新生儿的病毒株来自分娩前母亲的优势毒株。其中 14 对其母亲孕中期和分娩前血清的优势病毒株相同,而有 3 对其母亲自孕中期到分娩前血清的优势病毒株发生了改变。与原有病毒株相比较,新的优势毒株在 S 区有个别氨基酸的替代突变。提示变异病毒株和非变异病毒株均可经宫内传播;而且宫内传播的发生时期以孕后期可能性大。早期在 HBsAg 携带孕妇的引产胎儿研究中表明,胎肝有 HBV DNA 存在的胎龄大多在 28 周以后。闫永平等<sup>[9]</sup>用原位免疫组化法观察不同孕早期胎盘各层细胞受 HBV 感染情况后,认为 HBV 经胎盘感染胎儿的时间可发生于孕中期,但主要发生于孕晚期。以上报道均与本研究的推测一致。另外,本研究中 18 例宫内感染新生儿,4 例血清中优势毒株在 S 区有变异,只有 2 例变异位于  $\alpha$  决定簇,在宫内感染儿中仅占少数;而且未发现已证实能够影响  $\alpha$  决定簇结构和功能的 aa124、aa129、aa142、aa145、aa147 位置的氨基酸改变。在 HBIG 组还有 1 例母亲感染 S 区 aaM133L 变异株(来自第 5 对),但其新生儿并未发生宫内感染。上述结果均提示病毒变异并非发生宫内感染的主要原因,不排除胎儿自身遗传易感性等因素的影响。

HBV 的表现型是其血清亚型,主要的根据是 HBV 外膜蛋白上的个别氨基酸。而 HBV 的基因型则是根据 HBV DNA 全序列的差异来划分。近年来的研究认为基于 S 基因型序列进行的分型可替代全基因序列分析,简化分型方法<sup>[3,4,10,11]</sup>。本研究根据文献报道 S 区 4 个酶切位点所要鉴别的核苷酸序列的不同,将 52 份标本的病毒株进行基因分型。结果显示 16 例(6 对)为 C 型,32 例(12 对)为 B 型。C 型者的血清型均为  $\text{adrq}^+$ ,B 型者血清型均为  $\text{adw}2$ 。其中 18 例宫内感染儿 B 型 12 例,C 型 6 例。提示福建地区的宫内感染儿以 B 型和 C 型为主,与该地

区人群的 HBV 株的亚型分布一致<sup>[12]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 朱启镛,吕晴,顾新焕,等. 阻断乙型肝炎病毒宫内传播的初步研究. 中华儿科杂志, 1995, 33: 93-95.
- 2 Li XM, Shi MF, Yang YB, et al. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1501-1503.
- 3 Gupta I, Ratho RK. Immunogenicity and safety of two schedules of hepatitis B vaccination during pregnancy. J Obstet Gynaecol Res, 2003, 29: 84-86.
- 4 Masashi M, Tatsunori N, Etsuro O, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. FEBS Lett, 1999, 450: 66-71.
- 5 Shouval D, Sameul D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation. Hepatology, 2000, 32: 1189-1195.
- 6 Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. Hepatology, 1998, 27: 294-297.
- 7 Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology, 1998, 27: 213-222.
- 8 陈素清,朱启镛. 医源性 HBV 变异. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005, 32: 156-158.
- 9 闫永平,徐德忠,王文亮,等. 胎盘乙型肝炎病毒感染与宫内传播的关系. 中华妇产科杂志, 1999, 34: 392-395.
- 10 Norder H, Courouce AM, Magnius LO, et al. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. Virology, 1994, 198: 489-503.
- 11 Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. Rev Med Virol, 2004, 14: 3-16.
- 12 胡盈莹,江家骥,欧文湖,等. 福建部分地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义的探讨. 中西医结合肝病杂志, 2003, suppl: 3-8.

(收稿日期:2005-07-07)

(本文编辑:张林东)