

• 临床检验研究论著 •

慢性乙型肝炎患者 HBsAg 和 HBsAb 共阳性与 preS 区及 S 区突变关系的研究*

邬 兰¹, 杜同信¹, 焦 杰¹, 王自正¹, 瞿 卫¹, 颜 宁², 俞 杨^{1△}

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院:

1. 核医学科实验诊断部分子诊断室; 2. 感染性疾病科, 江苏南京 210006)

摘要:目的 探讨 HBsAg、HBsAb 共阳性慢性乙型肝炎患者 HBV preS 及 S 基因突变的关系。方法 对 6 例 HBsAg、HBsAb 共阳性慢性乙型肝炎患者(试验组)、9 例 HBsAg 阳性、HBsAb 阴性慢性乙型肝炎患者(对照组)进行 HBV DNA 的提取及 HBV 基因组 preS 和 S 基因的 PCR 扩增和测序, 比较组间突变率差异。结果 试验组与对照组所感染 HBV 均为 B 型或 C 型。试验组未检出 preS 区缺失突变, 对照组检出 1 例 preS1 区 15 bp 缺失。试验组与对照组比较, preS/S、preS、preS1、preS2 区核酸点突变率无统计学差异($P > 0.05$), S 区核酸点突变率有统计学差异($P < 0.05$)。在氨基酸水平上, 试验组与对照组 preS/S、preS/S、preS1、preS2 区及 α 决定簇点突变率比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论 HBV preS 基因的缺失及 S 基因的氨基酸突变均不是 B 型或 C 型慢性乙型肝炎患者出现 HBsAg、HBsAb 共阳性的决定性因素。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; HBV S 基因; HBV preS 基因; 基因缺失

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0016-04

Correlation between mutations in preS/S gene region and coexistence of HBsAg and HBsAb in chronic hepatitis B patients*

Wu Lan¹, Du Tongxin¹, Jiao Jie¹, Wang Zizheng¹, Qu Wei¹, Yan Ning², Yu Yang^{1△}

(1. Molecular Diagnosis Unit in the Department of Nuclear Medicine; 2. Department of Infectious Diseases,

Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University/Nanjing First Hospital, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between HBV preS/S gene and coexistence of HBsAg and HBsAb in patients with chronic hepatitis B. **Methods** HBV DNA, extracted from 6 cases of chronic hepatitis B patients positive with HBsAg and HBsAb(experimental group) and 9 cases of chronic hepatitis B patients positive with HBsAg and negative with HBsAb(control group) was detected for the mutation in preS and S gene. The mutation rate was compared between the two groups. **Results** Both the experimental group and the control group were of HBV genotype B or C. There was no preS deletion in experimental group, while one case in control group showed 15 bp deletion in preS1 region. There was no statistical difference of nucleic acid point mutation rates in PreS/S, preS, preS1 and preS2 gene between the two groups($P > 0.05$), but that in S gene was with statistical difference($P < 0.05$). There was no statistical difference of amino acid point mutation rates in preS/S, preS/S, preS1, preS2 gene and α determinant (aa124-147)($P > 0.05$). **Conclusion** Concurrent HBsAg and HBsAb might not be associated with HBV preS deletion or the mutation of amino acids in S gene in patients with chronic HBV infection(genotype B or C).

Key words: hepatitis B virus; HBV S gene region; HBV preS gene region; gene deletion

乙型肝炎病毒(HBV)感染已成为全球性的公共健康问题^[1-2]。HBV 被清除的特征为乙型肝炎表面抗原(HBsAg)在血清中消失及表面抗体(HBsAb)在血清出现。理论上,体内存在 HBV 复制的同一患者中二者不可能同时检出,但也有部分临床患者血清标本中二者均可检出,且多见于慢性乙型病毒性肝炎(简称乙肝)患者^[3]。有研究认为 HBsAg、HBsAb 共阳性与 HBV S 基因主要亲水区 α 决定簇的氨基酸突变及 preS 区,特别是 preS2 的核酸缺失、突变等因素密切相关^[4-6]。本研究分析了 HBsAg 和 HBsAb 共阳性及 HBsAg 阳性、HBsAb 阴性 HBV 感染患者 preS、S 区基因核酸及对应编码蛋白的突变情况,以期发现 HBsAg、HBsAb 共阳性慢性乙肝患者 preS、S 区可能的突变模式。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 5 月至 2011 年 12 月 1 554 例 HBsAg 阳性标本中 60 例 HBsAb 亦为阳性,筛选其中聚合酶链反

应(PCR)检测显示存在 HBV DNA 复制的标本 6 例,编号 1~6 号,其中 1、2、3 号标本为同一患者分别于 2010 年 5 月 10 日、2011 年 2 月 17 日、2011 年 6 月 24 日的检测标本。另从相同的 1 554 例标本筛选 9 例 HBsAg 阳性、HBsAb 阴性血浆标本(对照组),编号 A~I。患者均符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[7]规定的诊断标准,且均无明确的 HBV 疫苗接种史。本研究符合南京医科大学伦理委员会伦理审查标准并取得患者的知情同意。

1.2 方法 采集患者乙二胺四乙酸二钾抗凝静脉血 2 mL,分离血浆后采用 HBV 荧光定量试剂盒(上海复星)及 LightCycler480 荧光定量 PCR 扩增仪(瑞士 Roche)进行 HBV DNA 复制水平检测;采用 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光免疫仪及配套试剂(美国 Abbott)进行 HBV 血清标志物检测;采用 MODULAR P800 全自动生化分析仪及配套试剂(瑞士 Roche)进行丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶

* 基金项目:南京市医学科技发展资金(卫生青年人才培养项目)资助项目(NJH201132)。作者简介:邬兰,女,研究实习员,主要从事分子诊断研究。△ 通讯作者:E-mail:yuyang713@gmail.com。

(AST)检测;采用 E. Z. N. A. Viral DNA Kit(美国 Omega)提取血浆 HBV 基因组后以 S1000 扩增仪(美国 Bio-Rad)进行 HBV preS、S 区巢式 PCR 扩增。巢式 PCR 反应体系为:10×PCR 缓冲液(无 Mg²⁺) 5 μL, MgSO₄ 1 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.2 mmol/L, Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶(美国 Invitrogen)1 U, 模板 5 μL, 补 ddH₂O 至 50 μL。第 1 轮 PCR 模板为 HBV 基因组, preS 区上、下游引物分别为 HBS5、HBAS6, S 区上、下游引物分别为 HBS5、HBV full-out R;第 2 轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物, preS 区上、下游引物分别为 preS-F、preS-R, S 区上、下游引物分别为 PRT-F、PRT-R(见表 1)。两轮 PCR 反应条件相同,均为 94 °C 30 s, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 90 s 循环 35 次, 68 °C 7 min。以 2%琼脂糖胶 120 V 条件下电泳检测巢式 PCR 产物,经 Gel Doc EZ Imager 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD)分析后对目的条带进行切胶,采用 E. Z. N. A Gel Extraction Kit(美国 Omega)纯化、回收后纯化产物送金斯瑞公司进行测序,测序仪为 ABI 3730(美国 Life technologies)。PreS 区上、下游测序引物分别为 preS-F、preS-R, S 区上、下游测序引物分别为 PRT-F、PRT-R(见表 1)。使用 Laseragene 软件分析测序结果,采用 GenBank BLAST 确定 HBV 基因型后对照 GenBank 中 HBV DNA 的 B、C 型序列数据进行比较(B 型参考序列: B-AF100309、B-AB033554、B-D00329, C 型参考序列: C-AB014381、C-AY103041、C-X04615),分析核酸突变位点及突变率,将测序结果及参考序列翻译为氨基酸,分析氨基酸突变位点和突变率。

1.3 统计学处理 采用 Excel2003 软件整理数据,采用 SPSS13.0 软件分析数据。基因突变率组间比较采用卡方检验;显著性检验水准为 α=0.05。

2 结 果

2.1 HBV 感染相关检测结果 试验组和对照组 HBV DNA 复制水平均为 1.0×10⁴~8.0×10⁷ IU/mL。各标本 HBV

DNA 复制水平、HBsAg、HBsAb、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)、乙型肝炎和型抗体(HBcAb)、ALT 和 AST 检测结果见表 2。

表 1 PCR 及测序引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物位置
HBS5	TCACCATATTCCTTGGGAACAAGA	nt2817~2839
HBAS6	GTTGGTGAGTGACTGGAGATTT	nt342~321
preS-F	TTGCGGGTCACCATATTCCTT	nt2810~2829
preS-R	AGGAGTCCTGATGCGATGTT	nt180~161
PRT-F	CCTCAGCCATGCAGTGGAA	nt3196~3215
PRT-R	GGAGTTCCGCAGTATGGATC GAGATGACTAGGCAGAGGT-	nt1308~1265
HBV full-out R	GAAAAAGTTGCATGGTGCTGGT- GAAC	nt1845~1801

2.2 PCR 结果 preS 区扩增大小为 522 bp(图 1~2,见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),S 区扩增大小为 1 328 bp(图 3~4,见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.3 核酸序列比对结果 经 BLAST 分析,试验组与对照组 HBV 基因型为 B、C 型。试验组及对照组核苷酸突变模式见表 3;试验组与对照组 S 区核酸点突变率比较有统计学差异(*t*=2.609, *P*=0.048),preS/S、preS、preS1 及 preS2 核酸点突变率比较无统计学差异,*t* 值分别为 0.199、-0.791、-0.865、-0.500, *P* 值分别为 0.850、0.465、0.427、0.638。

2.4 氨基酸序列比对结果 试验组、对照组氨基酸突变模式见表 4;试验组与对照组 preS/S、preS、S、preS1、preS2、α 决定簇氨基酸(aa124~147)突变率比较均无统计学差异,*t* 值分别为 -0.605、-0.968、0.439、-0.810、-0.500、-0.349, *P* 值分别为 0.571、0.377、0.679、0.455、0.638、0.741。

表 2 两组患者 HBV 感染相关检测结果*

组别	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	ALT(5~40 U/L)	AST(5~40 U/L)	HBV DNA(IU/mL)
试验组								
1	+	+	+	-	+	29	24	1.05×10 ⁷
2	+	+	+	-	+	18	19	8.15×10 ⁶
3	+	+	+	-	+	26	22	8.67×10 ⁶
4	+	+	+	-	+	39	35	1.40×10 ⁶
5	+	+	-	+	+	551	214	1.17×10 ⁵
6	+	+	+	+	+	36	26	1.79×10 ⁷
患者组								
A	+	-	+	-	+	27	24	2.09×10 ⁷
B	+	-	+	-	+	50	66	1.15×10 ⁴
C	+	-	+	-	+	NA	NA	3.66×10 ⁶
D	+	-	-	-	-	39	24	1.08×10 ⁴
E	+	-	+	-	+	30	16	5.97×10 ⁷
F	+	-	+	-	+	27	19	1.97×10 ⁴
G	+	-	+	+	+	84	56	2.55×10 ⁶
H	+	-	+	-	+	85	42	7.51×10 ⁷
I	+	-	+	-	+	91	34	5.94×10 ⁶

*:标本 1~3 采集自同一患者。

表 3 两组患者 HBV 基因组 preS、S 区核苷酸突变模式*

组别	preS1 区	preS2 区	S 区	基因型
试验组				
1	3068 插入 T、G3080T、A3104C	A19G	A161T、T281C、T294A、T585C	B
2	3068 插入 T、G3080T、A3104C	A19G	A161T、T281C、T294A、T585C	B
3	3068 插入 T、G3080T、A3104C	A19G	A161T、T281C、T294A、T585C	B
4	3068 插入 T、G3077T、T2898C、C2904T	C1T、T114C、G3207A	C762G、C618T、G542A、G541A、T531C、A496C、C495A	C
5	野生型	C6G、T53C、G43A	C834A、G783A、T784G、C592T、C543T、T429C	C
6	3068 插入 T、C3067A、C3000T	野生型	T701G、C618T、G504C、C502A、C373T	C
对照组				
A	3068 插入 T、T3100C	A19G	A514C	C
B	3068 插入 T、C2958T、C3000A、A3008C、A3103G、A3120T、T3015A、A3013C、C3026T、A3108G、G3031T、C3051T、G3111A	C6A、G42A、T53G/C、C154T	T346C、A456G、A453T、A446T、T531G、T738C	C
C	3068 插入 T、G3102A	A82G	T346C、T531C	C
D	3068 插入 T	T114C	C546T、G633A、T762G	C
E	3068 插入 T、A3057T、C3067G、A3103G	G25A、T114C、C117T	A514C、T832C	C
F	3068 插入 T、C2980T、G2994A、C3056T	T22G	野生型	B
G	3068 插入 T、G2962A、C3041T、G3078A、3162—3176 缺失 15bp	野生型	G381A、A551T	B
H	3068 插入 T、G3027A、C3050T	野生型	A499G	B
I	3068 插入 T、C3050T、G3109A	A28G、A80G	野生型	B

*: 标本 1~3 采集自同一患者。

表 4 两组患者 HBV 基因组 preS 和 S 区氨基酸突变模式

组别	preS1 区	preS2 区	S 区	基因型
试验组				
1	S73I	野生型	N3Y、V47E	B
2	S73I	野生型	N3Y、V47E	B
3	S73I	野生型	N3Y、V47E	B
4	H51R、W77L	野生型	I126T、G130N、P203R	C
5	野生型	T6S、F22L	S210K	C
6	L74I	野生型	S117T、F183C	C
对照组				
A	野生型	野生型	野生型	C
B	W4P、Q10K、H51Q、E54A、N56Q、A60V、A62S、G73N、I84M、T86A	T6N、R18K、F22V	L98V、Y100F、Q101R、I126S、I195T	C
C	野生型	野生型	I126T	C
D	野生型	I42T	L21S、R160K、P203R	C
E	L74V、T86A	I42T、S43L	T131V/A/I	C
F	L45F、P70L	野生型	野生型	B
G	E39K、P65L、W77STOP、106—110 缺失	野生型	C76Y、M133L	B
H	T68I	野生型	野生型	B
I	T68I、V88M	T31A	野生型	B

3 讨 论

HBsAb 具有中和作用, 一般情况下 HBsAb 阳性表示 HBV 已被清除、人体已产生保护作用。有研究发现慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的发生率可达 4.9%~9.15%^[8], 本研究中共阳性检出率为 3.86%(60/1 554)。慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的机制尚不清楚, 多数学者认为可能与 HBV preS 区缺失突变和 S 区氨基酸突变, 特别是 α 决定簇氨基酸突变有关^[3-6, 9-10]。

就分子结构而言, HBV 包膜基因包括 3 个开放阅读框, 即 preS1、preS2、S、preS、S 区突变可能会改变病毒颗粒的免疫原性, 从而影响 HBV 感染患者的临床过程^[5]。S 区主要亲水区的 124~147 号密码子被称为 α 决定簇^[9], 氨基酸突变可改变其空间结构, 从而改变 HBsAg 免疫原性, 常见突变位点为 126、129、133、141、144 和 145^[9]。

体内、体外试验均证实 HBsAg、HBsAb 共阳性情况下的抗原和抗体是不匹配的, 该现象的发生可能与患者感染了不同 HBV 血清型所致^[11]。有学者从共阳性慢性乙肝患者血清中纯化出 HBsAb, 并用酶联免疫吸附法验证了共阳性患者血清中 HBsAg 和 HBsAb 的不匹配性, 同时也对 HBsAg 编码区进行了扩增和测序, 研究结果表明慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性与 HBsAg 编码区突变无关^[8, 12]。

本研究中未在双阳性患者标本中检出 preS 区缺失突变, 而 HBsAg 阳性、HBsAb 阴性患者中存在 preS1 区 15 bp 的缺失; α 决定簇氨基酸点突变率组间比较无统计学差异, 在试验组和对照组中均检出 126 位点的突变, 对照组中还检出 133 位点的突变。因此, 本研究结果并不支持 HBV preS 区缺失突变和 α 决定簇氨基酸点突变造成慢性乙肝患者 HBsAg、HBsAb 共阳性的观点。

本研究结果与 Zhang 等^[8]的研究结果相似, 即 HBsAg、HBsAb 共阳性与 HBV preS 区缺失突变和 S 区氨基酸点突变无必然联系。在 Zhang 等^[8]的研究中, 入组标本都来源于 HBeAg 阳性、ALT 水平高于正常值两倍、HBV DNA 复制水平高于 1.0×10^5 copy/mL 的免疫激活期的患者^[12], 而本研究不仅包括了免疫激活期和免疫耐受期患者, 还包括了 HBeAg 阴性患者。因此, 可以认为本研究结果为 Zhang 等^[8]的观点提供了客观证据。但本研究标本量较小, 试验组与对照组 HBV 基因型均为 B 型或 C 型, 且试验组的 B 型标本(编号 1~3)来源于同一患者, 因此尚有待扩大样本量后进行更为深入的研究。

参考文献

[1] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical

(上接第 15 页)

[9] 刘长明, 丛林, 方慧琴, 等. Treg 和 Th17 在原因不明性复发性流产发病中作用的探讨[J]. 现代妇产科进展, 2011, 12(20): 944-947.
 [10] 何冬梅, 尤昭玲, 雷磊, 等. 寿胎丸对反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS1 和 SOCS3 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(1): 26-28.
 [11] 赖毛华, 尤昭玲, 马红霞, 等. 寿胎丸对母胎界面 Th1/Th2 细胞因

Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 227-242.

[2] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(2): 97-107.
 [3] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers[J]. Virology, 2007, 367(1): 30-40.
 [4] Wang L, Liu H, Ning X, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests[J]. Hepatol Res, 2010, 40(12): 1212-1218.
 [5] Wang YM, Ng WC, Lo SK. Detection of pre-S/S gene mutants in chronic hepatitis B carriers with concurrent hepatitis B surface antibody and hepatitis B surface antigen[J]. J Gastroenterol, 1999, 34(5): 600-606.
 [6] Huang X, Qin Y, Zhang P, et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies[J]. J Med Virol, 2010, 82(1): 23-31.
 [7] 中华医学会肝脏病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
 [8] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis b surface antigen(HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1161-1169.
 [9] Lada O, Benhamou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen(HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers; influence of "a" determinant variants[J]. J Virol, 2006, 80(6): 2968-2975.
 [10] Jang JS, Kim HS, Kim HJ, et al. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Med Virol, 2009, 81(9): 1531-1538.
 [11] Zhang Z, Li L, Tian Y, et al. HBsAg/HBsAb double positive hepatitis B virus infection model in vitro and in vivo[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2009, 29(5): 575-579.
 [12] Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1170-1172.

(收稿日期: 2012-09-08)

子和妊娠结局的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 3065-3068.

[12] Liu W, Putnam AL, Xu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells[J]. J Exp Med, 2006, 203(13): 1701-1711.

(收稿日期: 2012-07-08)