

· 综述 ·

乙型肝炎病毒分子进化在其母婴传播逃逸机制中的研究进展*

刘金霞¹, 冯珍珍² 综述, 卢 安^{3△} 审校

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 河北医科大学, 河北石家庄 050051;

3. 河北省疾病预防控制中心, 河北石家庄 050021)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因突变; 母婴传播

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.030

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)05-0578-03

随着国家免疫规划工作的推进和医疗卫生投入的不断提高, 新发乙型肝炎病毒(HBV)感染大多属于母婴传播。在妊娠和生产过程中, 尽管母亲采取核苷类似物和高效价免疫球蛋白联合进行阻断措施, 新生儿也相继采取主动、被动免疫等措施预防 HBV 母婴传播。然而, HBV 感染的母婴阻断失败率仍然在 15%~20%。这可能与胎盘屏障功能、外周血单核细胞感染及新生儿的遗传易感性等诸多方面因素有关, 更有可能与 HBV 本身的分子进化有关^[1-2]。不过, 从分子进化的角度来看, 病毒是如何适应体内外的环境变化, 包括来自宿主体内的免疫压力和体外的抗病毒压力, 使之从野生株进化为具有选择优势的病毒株的详细过程仍然不清楚。因此, 本文仅就 HBV 的分子进化与母婴传播的关系做如下综述。

HBV 的基因结构包含 4 个开放读码框(ORF): 包膜蛋白基因(S), 核心蛋白基因(C), 聚合酶基因(P)和 X 蛋白基因(X)。这些 ORF 之间存在部分或全部重叠。比如, 包膜蛋白基因(S)与聚合酶基因(P)完全重叠, 而核心蛋白基因(C), X 蛋白基因(X)和聚合酶基因(P)部分重叠。因此, HBV 基因序列变弟能够同时引起 2 种以上蛋白质氨基酸序列的变异^[2-3]。比如聚合酶基因区的变异可以引起与之相互重叠的包膜蛋白基因的变异, 从而使包膜蛋白的抗原性发生变异, 造成抗体对包膜蛋白抗原的结合力下降和免疫逃逸, 进而影响病毒的分泌能力。

1 乙肝疫苗接种和乙型肝炎免疫球蛋白的应用导致“a”决定簇突变株的增多

目前使用的基因工程疫苗仅含有 S 基因产物。“a”决定簇是不同 HBV 亚型表面抗原拥有的共同抗原表位, 位于 S 基因的第 124~147 氨基酸序列间。它能以二硫键的结合方式, 形成与现用抗-HBs 相互作用的 2 个结合位点, 阻断 HBV 与肝细胞受体结合, 达到预防乙型肝炎病毒感染的目的。但是, 这种疫苗只能预防含有“a”决定簇氨基酸序列的 HBV 的感染^[3-4]。乙肝疫苗阻断失败者中存在“a”决定簇变异株, 最为常见的变异位点是 126、129、133、141、144 或 145 位, “a”决定簇的某些关键位点的变异可改变“a”决定簇结构, 使 HBV 成为免疫逃避株, 并使得弱势变异株逐步成为优势株, 导致疫苗免疫阻断失败^[5]。另外, 由于乙型肝炎免疫球蛋白的大量反复应用, HBV 受免疫压力的影响, 产生编码“a”决定簇变异的 HBV 株感染, 最终导致主动、被动免疫失败。Velu 等^[6]的研究也证实大规模的乙肝疫苗接种加速了“a”决定簇突变株的积累。在未

受到乙型肝炎免疫球蛋白和乙肝疫苗免疫压力影响的引产胎儿中亦检出了 HBV S 区突变株, 说明突变株的垂直传播可能与免疫压力有关^[7-8]。

2 核苷类似物的应用诱发 DNA 聚合酶变异与“a”决定簇突变株

在核苷类似物等抗病毒药物作用下, 乙肝病毒逆转录酶和包膜蛋白上出现的正选择位点赋予了病毒在特定环境下的最佳适应性^[9]。在乙肝病毒逆转录酶尚未出现具有选择优势的耐药突变之前, 包膜蛋白上的正选择位点可能通过免疫逃逸的方式使病毒获得生存的机会, 为进一步选择出耐药变异株奠定基础^[10]。如果应用核苷类似物在孕晚期进行母婴阻断, 为逃避抗病毒压力, 编码 S 蛋白“a”决定簇的基因可发生变异, 此时, 尽管新生儿出生后及时正规应用母婴阻断措施, 仍不能避免母婴阻断失败。这可能是因为在药物的压力之下, 逆转录酶基因的进化被抑制, HBV 通过包膜蛋白基因的独立进化而获得生存的机会, 表现为包膜蛋白的免疫逃逸^[2,11]。应用生物信息学技术从适应性进化的角度研究了在拉米夫定治疗过程中 HBV 耐药的发生过程, 对比拉米夫定治疗应答患者和无应答患者在抗病毒压力下病毒基因的适应性进化过程, 证实 HBV 逆转录酶基因的变异是通过正选择作用固定下来的, 有利于病毒在抗病毒压力下的生存, 系统进化树分析表明耐药株的出现是一个逐步选择的过程。通过对与 HBV 逆转录酶基因互相重叠的包膜蛋白基因的适应性进化分析, 结果显示在拉米夫定治疗无应答患者中, 包膜蛋白基因也存在正选择位点, 且出现频率最高的正选择位点落在 HLA-I 类分子限制的 CD8⁺ T 细胞表位上, 表现为免疫逃逸^[12]。因此, 乙肝病毒耐药变异株是在抗病毒压力下逐渐选择出来的, 符合达尔文自然选择规律。

3 母亲感染的 HBV 的基因异质性

在宿主免疫压力导致 HBV 感染后基因变异, 呈现出 HBV 异质性, 各基因区异质性有高低差异, 不同毒株变异位点差异很大。比如, 前 C/C 基因区的某些变异, 有利于病毒的复制。免疫识别位点的变异, 可以使病毒发生免疫逃避, 有助于宫内感染的发生。Alexopoulou 等^[13]研究 1 例反复 3 次急性发作的 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者感染病毒的前 C/C 基因区的准种变化, 对每次急性发作前后的血清进行克隆分析, 发现在每次急性发作时, 病毒前 C/C 基因区都出现新的变异, 其中一部分变异是在急性发作前就已经存在, 随着病情的发展逐渐被选择出来成为优势株, 另外一部分变异则是在急性

* 基金项目: 河北省科学技术研究与发展支撑计划项目(11276103D-2)。 作者简介: 刘金霞, 女, 主任医师, 主要从事乙肝的分子流行病学研究。 △ 通讯作者, E-mail: l-an@163.com。

发作时才出现,急性发作前并不存在。值得注意的是,改变了主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的病毒核心蛋白分子中的 B 细胞表位和 CD4⁺ T 细胞表位,使得新的肽段不能与宿主的 MHC 分子结合,或者结合了也不能被 T 细胞识别,病毒突变株便能避开 T 细胞作用,为病毒在免疫压力下发生免疫逃逸提供了直接证据。而在免疫压力下,HBV 基因变异不但发生在前 C/C 基因区,也可以发生在 S、P 及 X 基因区,导致母婴阻断失败。

4 HBV 通过卵母细胞及精子载体传递至子代

人精子携带的 HBV-DNA 能够在其染色体中发生整合,且能传递至子代,在子代中复制与表达^[14];在动物实验中已经证实 HBV 能够进入生殖细胞,并且能在宿主细胞的染色体上发生整合,并不影响它的受精功能,在早期胚胎中能够复制与表达^[15]。但是,HBV 的复制与表达与卵母细胞的成熟度有否联系及有多少的 HBV-DNA 能够整合?未整合的和已整合的 HBV-DNA 的复制表达的程度是否一致?整合的 HBV-DNA 的复制是否受卵母细胞分裂影响?HBV 感染的卵母细胞的受精率如何?以及受精后的妊娠结局如何?会不会受到免疫的攻击,或者是整合状态的宿主细胞能否逃避免疫的攻击?这些问题仍在研究之中,尚无确切结论。胚胎中多细胞的 HBV 标志物阳性表达,表明 HBV 能随着胚胎的分裂而复制,但也并非每个胚胎如此^[2]。优质胚中 HBV 感染率如何,即使感染其复制水平也不得而知,后续的研究任重而道远。

5 小 结

总之,HBV 在长期的进化过程中,在免疫压力和抗病毒压力作用下,基因结构会不断的发生变异,以适应生存环境的变化,使其基因具有多态性。变异后的 HBV 可能会增加母体内的病毒载量、与宿主细胞的结合能力及其复制能力,从而促成宫内感染的发生^[16-18]。另外,基于乙肝病毒本身的特点,虽为 DNA 病毒,但由于其复制由前基因组 RNA 中间体反转录为负链 DNA,反转录是利用病毒本身的缺乏校对活性的 DNA 聚合酶进行的,发生变异后难以修正,造成复制过程中的反转录失真,导致 HBV 变异,HBV 核苷酸替代率每年约为 $2.1 \times 10^{-4}/\text{nt}$,HBV 变异率高于其他 DNA 病毒约 4 个数量级,而低于 RNA 病毒 1~2 个数量级^[19-20]。病毒散在的点突变较多发生在密码子的第 3 个核苷酸,很少出现编码氨基酸的改变,是一种无表型变异,而发生在密码子第 1、2 个核苷酸的突变可能引起氨基酸的变异,特别是关键位置上个别核苷酸的点突变造成错义变异,可影响病毒的复制和病毒蛋白的表达。HBV 许多核苷酸由于分别参与重叠的开放读码框,一些单一核苷酸点突变可能改变 2 个开放读码框。某些变异能增强病毒的复制能力、抵抗抗病毒治疗、利于病毒黏附和穿透或发生逃逸突变,使病毒逃避宿主的免疫清除,呈持续感染^[21]。在病毒的适应性进化过程中,包膜蛋白基因是否可能参与或辅助耐药变异株的选择过程?从分子进化的角度来看,病毒是如何适应体内外的环境变化,包括来自宿主体内的免疫压力和体外的抗病毒压力,从野生株进化为具有选择优势的耐药株的详细过程仍然不清楚,值得在以后的研究中,进一步探讨和分析。

参考文献

- [1] Mu SC, Wang GM, Jow GM, et al. Impact of universal vaccination on intrafamilial transmission of hepatitis B virus[J]. J Med Virol, 2011, 83(5): 783-790.
- [2] 成军. 现代肝炎病毒分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 559-573.
- [3] Franco E, Bagnato B, Marino MG, et al. Hepatitis B: epidemiology and prevention in developing countries [J]. World J Hepatol, 2012, 4(3): 74-80.
- [4] Chen DS. Hepatitis B vaccination: The key towards elimination and eradication of hepatitis B[J]. J Hepatol, 2009, 50(4): 805-816.
- [5] Schirmer P, Winters M, Holodniy M. HIV-HBV vaccine escape mutant infection with loss of HBV surface antibody and persistent HBV viremia on tenofovir/emtricitabine without antiviral resistance[J]. J Clin Virol, 2011, 52(3): 261-264.
- [6] Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, et al. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers[J]. Jpn J Infect Dis, 2008, 61(1): 73-76.
- [7] Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 1997, 4 (Suppl 1): S11-20.
- [8] Su HX, Zhang YH, Zhang ZG, High conservation of hepatitis B virus surface genes during maternal vertical transmission despite active and passive vaccination[J]. Intervirology, 2011, 54(3): 122-130.
- [9] 黄燕萍, 王宇明, 兰林, 等. 拉米夫定与乙型肝炎病毒准种及变异特点的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(4): 235-238.
- [10] Thibault V, Laperche S, Akhavan S, et al. Impact of hepatitis B virus genotypes and surface antigen variants on the performance of HBV real time PCR quantification[J]. J Virol Methods, 2009, 159(2): 265-270.
- [11] Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B, et al. Comparative immunogenicity of a PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine[J]. Vaccine, 2006, 24(15): 2781-2789.
- [12] Han L, Zhang HW, Xie JX, et al. A meta-analysis of lamivudine for interruption of mother-to-child transmission of hepatitis B virus[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(38): 4321-4333.
- [13] Alexopoulou A, Baltayiannis G, Eroglu C, et al. Core mutations in patients with acute episodes of chronic HBV infection are associated with the emergence of new immune recognition sites and the development of high IgM anti-HBc index values[J]. J Med Virol, 2009, 81(1): 34-41.
- [14] 王珊珊, 李文玲, 彭桂福, 等. 父婴传播的乙型肝炎病毒 S 基因进化树分析[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(6): 451-454.
- [15] Chen BF, Liu CJ, Jow GM, et al. Evolution of hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C [J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 1): 39-49.
- [16] Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaei S, Verbeeck J, et al. Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations[J]. J Med Virol, 2010, 82(3): 379-389.
- [17] De Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus [J]. Virology, 2007, 365(1): 113-124.
- [18] Pourkarim MR, Verbeeck J, Rahman M, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis B virus full-length genomes reveals evidence for a

- large nosocomial outbreak in Belgium[J]. J Clin Virol, 2009, 46(1):61-68.
- [19] Lin CL, Kao JH, Chen BF, et al. Application of hepatitis B virus genotyping and phylogenetic analysis in intrafamilial transmission of hepatitis B virus[J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(11):1576-1581.
- [20] Xu YY, Yu JY, Zhong YW, et al. Association between the frequency of class II HLA antigens and the susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. Int J Biol Sci, 2008, 4(2):

111-115.

- [21] Pajot A, Pancré V, Fazilleau N, et al. Comparison of HLA-DR1-restricted T cell response induced in HLA-DR1 transgenic mice deficient for murine MHC class II and HLA-DR1 transgenic mice expressing endogenous murine MHC class II molecules[J]. Int Immunol, 2004, 16(9):1275-1282.

(收稿日期:2013-12-18)

• 综述 •

贮存式自身输血的现状和应用进展^{*}

王 静 综述, 张洪为, 冯清珍, 李代渝[△] 审校

(四川省泸州医学院附属医院输血科, 四川泸州 646000)

关键词: 输血, 自体; 血样采集; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.031

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)05-0580-03

输血治疗作为目前一种不可替代的医疗技术手段, 在抢救患者生命过程中起着重要作用。但是, 由于目前血液供应无法跟上临床用血量的快速增长, 血液供应紧张已经由“季节化”或者“地域化”转为现在的“常态化”^[1]。近年来不少地区医院都出现因为血液缺乏导致手术延后甚至无法完成的现象^[2]。因此, 如何缓解当前血液紧张成了医疗卫生机构亟待解决的一个重要课题。不少大型医院近几年相继开展自身输血, 减少血液供应, 取得不错的效果^[3-4]。其中, 贮存式自身输血(PABD)是目前应用最广泛的一种自身输血方法, 本文就其应用现状及进展进行综述。

1 贮存式自身输血的发展历程

PABD 是指提前数天或数十天开始分段采集患者自身的血液或血液成分进行保存, 当患者实施择期手术、术后或需要输血时, 再回输这些已保存的自身血液或血液成分。

20 世纪 80 年代末, PABD 在国外就已经开始应用。当时艾滋病和乙型肝炎等病毒的筛查技术低下, PABD 成了预防艾滋病传播的途径之一。1992 年, PABD 采血率为 8.5%, 输血率为 5.0%, 其发展达到高峰。随着血液筛查技术的提高, PABD 的应用呈现下滑趋势^[5]。2001 年 PABD 采血率为 4.0%, 输血率仅为 2.6%。此时, PABD 主要应用于多次输血已产生抗体的患者以及稀有血型患者的血液供应。

由于 1995 年河南省发现艾滋病村, 促使医疗工作者寻找更加安全的输血方式, 于 2002 年率先开展 PABD。随后, 全国各省市均有相应的报道。目前, 我国一些发达城市, 贮存式自身输血的应用及研究正在逐步深入, 有些城市甚至给予政策支持。例如《北京市公民献血用血管理办法》中规定, 三级医院自身输血率要达到临床用血率的 20%。

2 贮存式自身输血的实施

2.1 适应症和禁忌症 (1)只要患者身体一般情况好, 血红蛋白大于 110 g/L 或红细胞压积大于 0.33, 行择期手术, 患者签字同意, 都适合贮存式自身输血。(2)按相应的血液存储条件,

手术前 3 d 完成采集血液。(3)每次采血不超过 500 mL(或自身血容量的 10%), 两次采血间隔不少于 3 d。(4)在采血前可给患者铁剂、维生素 C 及叶酸(有条件的可应用 rH-EPO)等治疗。(5)血红蛋白小于 100 g/L 的患者及有细菌性感染的患者不能采集自身血。(6)对有冠心病、严重主动脉狭窄等心脑血管疾病及重症患者慎用。

2.2 PABD 的具体操作

2.2.1 患者准备 在征得患者同意, 签署知情同意书后, 进行采血准备。一般在采血前, 输血科医师须周密计划, 估计手术用血量与储血量制定采血方案, 决定是否需要使用促进造血药物。倘若需要应用, 可在采血前一周补充铁剂, 有条件者可同时应用 rH-EPO^[6], 刺激患者的红细胞再生。研究显示 rH-EPO 的使用对于进入 PABD 项目的低 Hct 值患者是很有效的^[7], 但是 rH-EPO 的使用会增加患者的住院费用。因此, 基于性价比的角度, 有待进一步研究。

2.2.2 采血方式 (1)“蛙跳式”采血, 适用于预计手术出血量较大的患者。如果两次采血时间间隔为一周(一般为 5 d), 30 d 采血量就可以达到 2 000 mL。(2)直接采集, 适用于估计失血量和需要备血量较小的患者, 可一次性采集所需血液。

2.2.3 采血量 采血量小于或等于 400 mL 在术前 1~4 d 采血; 采血量大于 400 mL 在择期手术前 2 周内根据患者身体状况分次采血。

2.2.4 采血时间 (1)两次采血时间不少于 3 d, 最后一次采血应该在手术前 3 d 完成。(2)如果采血的时间与择期手术的时间间隔不足以让患者的红细胞再生, 那么贮存式输血的最后结果只会是对血液的慢性稀释。研究发现从献血第 1 天到手术当天的时间和患者的红细胞再生状况相关^[8]。Goodnough 等^[9]发现, 从献血的第 1 天到手术当天的时间间隔所对应的患者红细胞再生情况分别为: 6~13 d 为 52%、14~20 d 为 54%、21~28 d 为 75%、28~34 d 为 116%、35~41 d 为 193%。这些数据说明提前 28~34 d 采血, 手术当天患者红细胞才完全

* 基金项目: 四川省泸州市科技局重点计划项目[2011-I-S38(4/4)]。 作者简介: 王静, 女, 检验技师, 主要从事临床检验与输血研究。

△ 通讯作者, E-mail: joldy1956@163.com。