



乙型肝炎病毒S基因变异株在母婴向的选择性传播

乙型肝炎病毒表面抗原A决定簇变异及孕妇乙型肝炎的高传染性已被认为是婴儿乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)及乙型肝炎疫苗联合免疫失败的原因[1][2]。最常见的变异是S区587位碱基发生由G到A的替代,导致145位甘氨酸被精氨酸替代,该点变异使外膜蛋白的外袢构型改变,并使 α 肽段的亲水性与野生毒株相应肽段有所不同,从而使抗原性发生改变,导致变异株不能被抗体中和。这可以解释为什么婴儿体内虽有抗体存在,但仍感染有变异株。在其他免疫失败的病例中也发现位于126、129、133、141、144等位点的变异,同时合并或者不合并145位变异[2][3][4]。我们对所有配对母婴进行HBV DNA定量检测,并对7例免疫失败的婴儿所携病毒的S区序列进行分析,以进一步了解免疫失败与S区变异及母亲血清内HBV DNA含量的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2000年7月~2001年4月在北京佑安医院住院分娩的HBsAg阳性孕妇95例及所产新生儿95例。孕妇于产前留静脉血,婴儿于产后24 h、7月、12月留取静脉血, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,待统一进行检测。新生儿出生后24 h及1月时各注射乙型肝炎免疫球蛋白200 U。2、4、5个月各给予重组酵母乙型肝炎疫苗10 μg 肌注。

1.2 方法

1.2.1 血清HBV标志物检测 采用ELISA方法,检测各样本血清标志物(试剂盒购自美国强生公司。)

1.2.2 HBV DNA定量检测 取40 μl 待测血清加入DNA提取液20 μl ,混匀, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沸水水浴10 min。12 000 r/min离心10 min,保留上清。取2 μl 上清加入37.5 μl PCR反应液、0.4 μl Taq酶、0.1 μl UNG混匀后盖紧,置于Roch公司的LightCycler定量分析仪中进行定量测定(试剂购自深圳匹基公司)。

1.2.3 血清HBV DNA的抽提 取血清100 μl ,加入20 μl $10\times$ 抽提Buffer(5%SDS, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-Cl)和10 mg/ml蛋白酶K 10 μl ,加无菌去离子水至总体积200 μl , $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化2 h,常规苯酚和氯仿法抽提。

1.2.4 PCR扩增 以上述抽提的HBV DNA为模板,取10 μl 用外引物BS1和S1R进行第1轮PCR扩增,取5 μl 第1轮扩增产物用内引物BS1和P29行第2轮PCR扩增,得到700 bp S区。PCR所用引物序列见表1,PCR反应条件见文献[5]。

表 1 PCR 所用引物

Tab.1 Primers used for the polymerase chain reactions

Primer	Sequence	Position
BS1	5'CTGCTGGTGGCTCCAGTTCC3'	S56~76
S1R	5'TAGGGTTTAAATGTATACCC3'	S842~822
PreS2	5'GGGACACCATATTCTTGG3'	S2820~2837
P29	5'TACCCAAAGACAAAAGAAAA3'	S827~807

表1 PCR所用引物

Tab.1 Primers used for the polymerase chain reactions

1.2.5 PCR产物克隆、测序 载体为PGEM-T(试剂盒购自Promega公司),受体菌为JM109(本室传代保存)。在连接酶作用下,4℃水浴连接过夜,连接产物转化受体菌,在IPTG和X-gal存在下有外源基因插入者为白斑,挑取白斑扩大培养,用PCR法筛检阳性克隆,克隆产物直接测序。测序由上海生物工程公司进行,在ABI377型自动测序仪上测序,测序引物为BS1。

2 结果

2.1 婴儿HBV感染情况

95例HBsAg阳性母亲的婴儿,1年内有7例测得HBsAg阳性,阳性率为7.3%。其中3例在出生后24 h静脉血即出现HBsAg,1例出生后6月出现HBsAg,3例出生后12月出现HBsAg。

2.2 母亲病毒水平

95例HBsAg阳性母亲检测出HBV DNA阳性58例,7例免疫失败的婴儿的母亲亦在其中。7例免疫失败组婴儿和另51例免疫成功组婴儿母亲血清中HBV DNA含量水平比较见图1,两者比较有显著性差异($F=17.42$, $P<0.01$)。

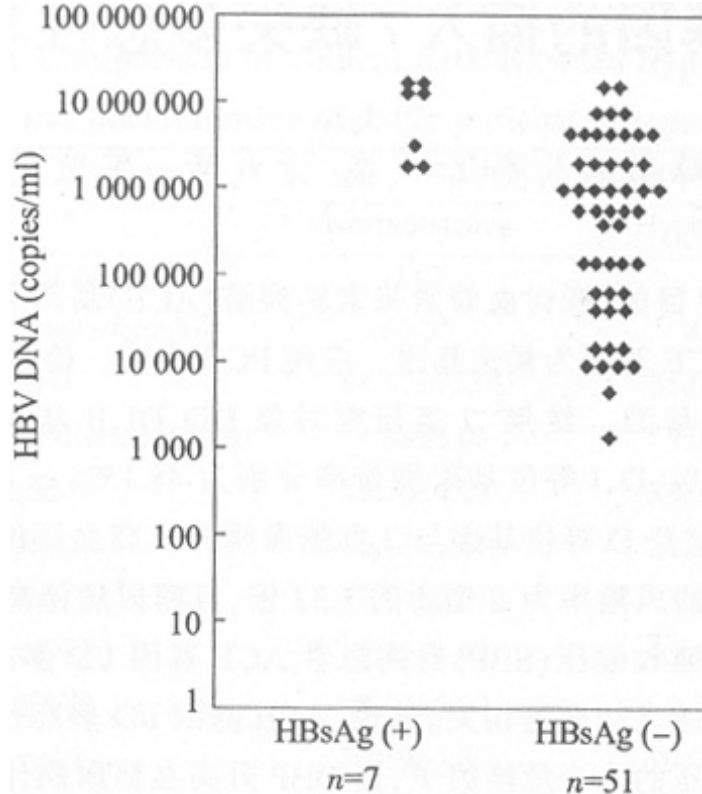


图1 联合免疫失败组与成功组婴儿母亲HBV DNA含量

Fig.1 HBV DNA levels in the mothers of 7 infected nonresponders and in 51 HBV DNA-positive mothers of noninfected responders to hepatitis B vaccine and immunoglobulin

2.3 克隆测序结果

7对母婴配对样本克隆后每1标本各取5个克隆测序，共测70个克隆，分析其序列。其中1对样本中婴儿体内的优势株为母体内的弱势株，所测母婴各5个克隆中，126位苏氨酸仅见于母亲的1个克隆，而在婴儿体内所测5个克隆全部为126苏氨酸。另有1标本与母亲序列比较婴儿出现131位苏氨酸到丙氨酸变异。

3 讨论

文献报道[6]，约6%~7%(8/108)的婴儿尽管给予乙型肝炎疫苗和HBIG联合免疫，在出生后1年内仍发生HBV感染。本研究也有类似结果，约7%~8%(7/95)的婴儿出生后1年内发生HBV感染。发生感染婴儿母亲血清中HBV DNA水平显著高于联合免疫后得到保护的婴儿母亲血清中的水平。

自从Carmen等[1]报导了在给予了免疫预防但仍感染了HBV的婴儿体内发现a决定簇变异后，长期以来一直认为a决定簇变异是导致免疫预防失败的主要原因。但von Weizsacker等[7]所做的一份研究发现，HBsAg阳性母亲所生321例经联合免疫的婴儿20例(6%)发生HBV感染。对此20例中的17例进行序列研究仅2(12%)例出现S基因变异。我们的结果和该结果类似，7例发生乙型肝炎感染的婴儿中仅1例(14.3%)出现S基因131位氨基酸由苏氨酸到丙氨酸的变异。因此，疫苗逃避性变异似乎不是免疫失败的主要原因。

克隆测序结果显示母婴配对样本中有1例母亲的毒株群体和婴儿的毒株群体显著不同，婴儿的序列直接源于母亲，但是母亲感染的毒株群体只有一小部分传播给婴儿；母亲感染的少数株，5个克隆中的1个克隆，成为婴儿的优势株5个克隆中的全部。文献也有类似的报道[8]。国内学者[9]也做过阳性孕妇血清中HBV S基因存在相似株的研究。提示从婴儿体内检测出新毒株，未必是其感染后新出现的变异株，可能在母亲病毒群体中所占比例过少，难以检出，而在新宿主体内得以扩增。本病例选择性发生在126位氨基酸，母亲126位氨基酸为苏氨酸和异亮氨酸混合感染，婴儿126位氨基酸为苏氨酸单一毒株。苏氨酸和异亮氨酸亲水性不同有可能导致a决定簇抗原性改变，从而使母体针对于优势毒株产生的抗体无法中和体内的弱势株。因此，尽管该毒株在

母体内含量很少, 由于缺乏抗体中和, 可以选择性成为婴儿体内优势株。Ojima等[8]发现126位苏氨酸比126位异亮氨酸更容易形成慢性感染, 可能也为苏氨酸成为婴儿优势株的原因。对于选择性传染, 亟待解决的问题是, 选择是发生于母婴传播过程中还是婴儿体内。为了解决这个问题需要对系列标本进行序列分析, 来显示优势株及弱势株在一段时间内连续的变化。

参考文献:

- [1] Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine • induced escape mutant of Hepatitis B virus[J]. Lancet, 1990, 336(2): 325-9.
- [2] Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mother to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine[J]. Pediatr Res, 1992, 32(4): 264-8.
- [3] Kathigesu VD, Allison LMC, Fortuin M, et al. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children[J]. J Gen Virol, 1994, 75(3), 443-8.
- [4] Oon CJ, Lim GK, Ye Z, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variant in Singapore[J]. Vaccine, 1995, 13(4), 699-702.
- [5] Hou JL, Peter K, Jenny W, et al. A unique insertion in the S gene of surface antigen negative hepatitis B virus Chinese carriers[J]. Hepatology, 1995, 21(2): 273-7.
- [6] Ngui SL, O'Connell S, Eglin RP, et al. Low detection rate and maternal provenance of hepatitis B virus S gene mutants in cases of failed postnatal immunoprophylaxis in England and Wales[J]. J Infect Dis, 1997, 176(5): 1360-5.
- [7] von-Weizsacker F, Pult I, Geiss K, et al. Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis B[J]. Hepatology, 1995, 21(1): 8-13.
- [8] Ojima T, Nvitsuma H, Shan H, et al. HBe seroconversion and HBs mutation among Japanese hepatitis B virus carriers[J]. Hepatol Res, 2001, 20(2): 172-81.
- [9] 李端, 闫永平, 徐德忠, 等. 阳性孕妇血清中乙型肝炎病毒前S/S基因的相似株现象[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(12): 1122-4.
- Li D, Yan YP, Xu DZ, et al. Quasispecies of HBV pre-S/S gene in HBsAg carrying pregnant women[J]. J Forth Mil Med Univ, 2001, 22(12): 1122-4.

参考文献:

- [1] Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine • induced escape mutant of Hepatitis B virus[J]. Lancet, 1990, 336(2): 325-9.
- [2] Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mother to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine[J]. Pediatr Res, 1992, 32(4): 264-8.
- [3] Kathigesu VD, Allison LMC, Fortuin M, et al. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children[J]. J Gen Virol, 1994, 75(3), 443-8.
- [4] Oon CJ, Lim GK, Ye Z, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variant in Singapore[J]. Vaccine, 1995, 13(4), 699-702.
- [5] Hou JL, Peter K, Jenny W, et al. A unique insertion in the S gene of surface antigen negative hepatitis B virus Chinese carriers[J]. Hepatology, 1995, 21(2): 273-7.
- [6] Ngui SL, O'Connell S, Eglin RP, et al. Low detection rate and maternal provenance of hepatitis B virus S gene mutants in cases of failed postnatal immunoprophylaxis in England and Wales[J]. J Infect Dis, 1997, 176(5): 1360-5.

[7] von-Weizsacker F, Pult I, Geiss K, et al. Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis B[J]. *Hepatology*, 1995, 21(1): 8-13.

[8] Ojima T, Nvitsuma H, Shan H, et al. HBe seroconversion and HBs mutation among Japanese hepatitis B virus carriers[J]. *Hepatol Res*, 2001, 20(2): 172-81.

[9] 李端, 闫永平, 徐德忠, 等. 阳性孕妇血清中乙型肝炎病毒前S/S基因的相似株现象[J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(12): 1122-4.

Li D, Yan YP, Xu DZ, et al. Quasispecies of HBV pre-S/S gene in HBsAg carrying pregnant women[J]. *J Forth Mil Med Univ*, 2001, 22(12): 1122-4.

[回结果列表](#)