

乙型肝炎患者及其子女 HBV DNA U5 样序列单核苷酸多态性分析

王培林 王修海 丛书英 马洪明 张学成

【摘要】 目的 进一步探讨乙型肝炎在患者及其亲子代之间的垂直传播。方法 应用单核苷酸多态性(SNP)、聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析等分子遗传学技术和方法检测了乙型肝炎患者家系30个,68例受试者。结果 U5样序列PCR检测结果表明,游离型和整合型HBV DNA在乙型肝炎患者(HBP)与其发病后出生子女(HBP_a)实验组检出率之间一致性增高,其检出率分别与乙型肝炎患者发病前出生子女(HBP_b)和正常对照组的比较,差异均显著, $P < 0.05$ 。乙型肝炎患者父子之间的SNP分析发现,在U5样序列区和非U5样序列区多个碱基位点处出现碱基替换、插入或缺失,1908A→T,1950G→T,1967T→C,还存在1900T缺失和1903C插入等。乙型肝炎患者父子之间的SNP在1908、1950、1967、1900和1903位点一致。结论 乙型肝炎可以在HBsAg阳性的男性乙型肝炎患者(MHBP)及其子女之间遗传传递,为乙型肝炎的遗传传递进一步提供了分子遗传学证据。

【关键词】 肝炎;乙型;单核苷酸多态性;遗传学

An Analysis of Single Nucleotide Polymorphism on HBV DNA U5 Sequence of Hepatitis B Patients and Their Children WANG Pei-lin^{1,2}, WANG Xiu-hai², CONG Shu-ying², MA Hong-ming¹, ZHANG Xue-cheng¹.

(¹ College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003; ² Medical College, Qingdao University, Qingdao 266021, P. R. China)

Corresponding author: ZHANG Xue-cheng. E-mail: xc Zhang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study further vertical transmission of hepatitis B between the hepatitis B patients and their children. **Methods** 30 families(68cases) of hepatitis B patients and their children were examined by the molecular genetic methods and techniques of single nucleotide polymorphism(SNP) and polymerase chain reaction single strand configuration polymorphism(PCR-SSCP). **Results** It showed that the frequency of freed and integrated HBV DNA were higher consistently between the hepatitis B patients and their children born after the occurrence of hepatitis B, and they had more significant differences than the children born before their parent suffered from hepatitis B, $P < 0.05$. SNPs of hepatitis B patients and their children were analysed and discovered that there were base substitution, insertion or deletion in many base sites of HBV DNA U5 sequence and non-U5 sequence, 1908A→T, 1950G→T, 1967T→C, and deletion in 1900T, insertion in 1903C and so on. The SNPs in the loci of 1908, 1950, 1967, 1900 and 1903 of male hepatitis B patients and their children born after the occurrence of hepatitis B was identical. **Conclusion** Hepatitis B may be inherited from the male hepatitis B patients to their children born after the occurrence of hepatitis B; thereby, a molecular genetic evidence is provided further for hereditary transmission of hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B; Single nucleotide polymorphism(SNP); Genetics

目前,应用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)探讨乙型肝炎病毒DNA(HBV

DNA)在乙型肝炎(简称乙肝)患者及其子女间的垂直传播的研究报道尚属少见。本研究采用SNP技术检测乙肝患者及其子女游离型和整合型HBV DNA U5样序列、突变型的HBV DNA U5样序列及其基因突变和类型,探讨分析HBV DNA在乙肝患者及其子女间的垂直传递。为乙肝的遗传传递提供分子遗传学证据。

基金项目 国家自然科学基金(No. 3870310);山东省自然科学基金(No. 91C0125)

作者单位 266021 青岛,中国海洋大学海洋生命学院(王培林、张学成、马洪明),青岛大学医学院(王培林、王修海、丛书英)

通讯作者 张学成(E-mail: xc Zhang@hotmail.com)

1 材料和方法

1.1 研究对象:乙肝患者(HBP)家系 30 个,乙肝患者全为男性乙肝患者,平均年龄 42 岁。发病前出生子女(HBPb)10 例,发病后出生子女(HBPa)28 例,平均年龄 15 岁。68 例受试者均进行血清学检查,HBsAg 均系 HBsAg 阳性;HB 诊断标准按照 1990 年上海病毒性肝炎会议修订的方案。随机选择 20 例正常个体作为正常对照组(NC)。

1.2 试剂:PCR 试剂购自北京华美生物工程公司。PCR 引物引物 1,位于 HBV DNA 正链的 1 829 ~ 1 848 区,20bp,序列为 5'-GTCCTACTGTTC AAGCC-TCC-3';引物 2,位于 HBV DNA 负链的 1 948 ~ 1 967 区,20bp,序列为 5'-AGGAGATCTCGAATAGACGG-3',扩增产物含 138bp,内含 U5 样序列。引物 1、2 由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.3 方法^[1]:

1.3.1 血清 HBV DNA 和 PBMC 中人基因组 DNA 的制备 分别取受试者 100 μ L 血清,常规 SDS、蛋白酶 K 消化、苯酚、氯仿/异戊醇、乙醇抽提 HBV DNA。将 DNA 溶于 30 μ L TE 缓冲液中,置 -20 $^{\circ}$ C 备用。取肝素抗凝血 5mL,按照制备血清 HBV DNA 的常规方法提取基因组 DNA,溶于 100 μ L TE 中,-20 $^{\circ}$ C 保存,备用。

1.3.2 PCR 扩增 从血清及全血中提取的 DNA 作为模板,以人工合成的 20bp 的寡核苷酸为引物,试剂盒中乙肝阳性血清作对照,进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系含 10 \times Buffer 5 μ L,4 \times dNTP(10mmol/L) 3 μ L,MgCl₂(25mmol/L)3 μ L,Primer(1.2)各 20pmol/L,模板 500ng,双蒸水 30 μ L 样品经 95 $^{\circ}$ C 变性 7min 后,加入 Taq 酶,经 30 个循环,扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,与阳性对照的 DNA 条带在同一水平位置者确定为 HBV DNA 扩增阳性。

1.3.3 PCR-SSCP 分析 取纯化产物 5 μ L,加入 SSCP 加样缓冲液 15 μ L,98 $^{\circ}$ C 变性 8min 后迅速置入冰

浴中,样品加入 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染观察结果。

1.3.4 U5 样序列核苷酸序列分析 对 SSCP 分析出现异常单链构象带的 PCR 产物进行测序分析。取 PCR 扩增产物应用 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外光下鉴定产物质量。直接从凝胶中回收、纯化产物。取纯化后的模板 250ng,采用双脱氧末端终止法荧光标记(末端标记),用 AmpliTaq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Perkin-Elmer 公司)进行测序反应。测序 PCR 反应程序为 96 $^{\circ}$ C 变性 10s,50 $^{\circ}$ C 退火 5s,60 $^{\circ}$ C 延伸 4min,25 circles。标记产物用乙醇沉淀纯化,收集沉淀物,烘干。将样品溶解于 25 μ L TSR 溶液中,混匀。95 $^{\circ}$ C 变性分散 2min,迅速取出置于 0 $^{\circ}$ C 冷却,把处理好的样品上样于 ABI 310 型 DNA 自动测序仪(Perkin Elmer 公司)进行测序。

2 结果

PBMC 内整合型 HBV DNA U5 样序列检测结果见表 1。

2.1 PCR-SSCP 分析:所有受试者 U5 样序列 PCR 扩增阳性产物,经 SSCP 分析,发现单链构象多态性分析阳性者 4 例。

为了排除 PCR 分析的假阳性结果,设置阳性、阴性对照标本。同时,将冲洗人类基因组 DNA 过程的液体进行 PCR 分析,排除了血清和细胞质内游离 HBV DNA 污染的可能性。

2.2 U5 样序列测序分析:对 3 个父子家系 5 个成员的 9 个游离和整合型的 HBV DNA U5 样序列标本做了测序分析,发现在 U5 样序列区和非 U5 样序列区多个碱基位点出现碱基替换、插入或缺失,父子之间的 SNP 基本一致(见表 2、3)。乙肝患者父子家系 201 父子之间的 SNP 存在于 U5 样序列区 1 889G \rightarrow C、1 908G \rightarrow T、非 U5 样序列区 1 950G \rightarrow T 和 1 968T \rightarrow C(见图 1、2)。

表 1 HBP 及其 HBPa、HBPb 的 HBV DNA U5 样序列的分析

Table 1 Analysis of HBV DNA U5 sequence of HBPs and HBPa, HBPb

例数	血清游离型 HBV DNA(+)	检出率(%)	PBMC 内整合型 HBV DNA(+)	检出率(%)
NC	0	0.00	0	0.00
HBP	23(23/26)	88.46	21(21/25)	84.00
HBPb	2(2/10)	20.00	2(2/10)	20.00
HBPa	19(19/20)	95.00	16(16/20)	80.00

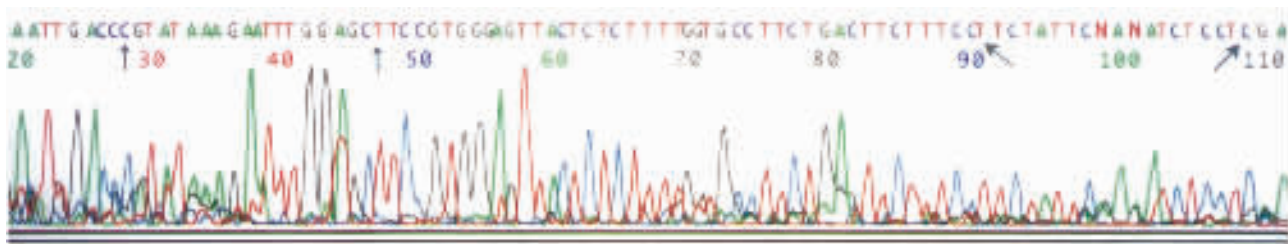


图 1 家系 201 父亲 HBV DNA U5 样序列测序分析

Fig. 1 The sequencing analysis of HBV DNA U5-like sequence of the father with hepatitis B in the family 201

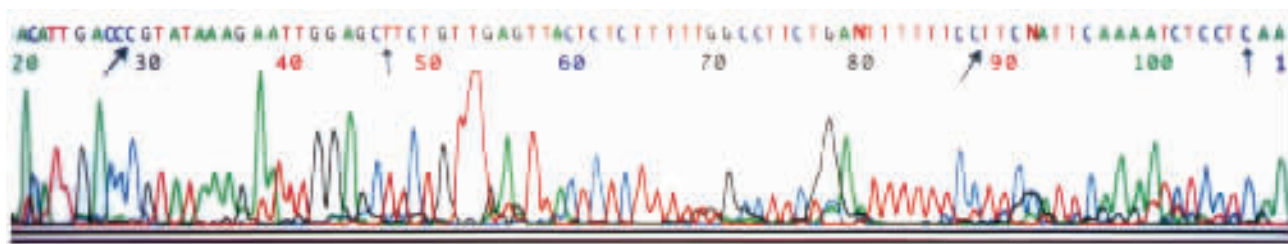


图 2 家系 201 父亲发病后出生儿子 HBV DNA U5 样序列测序分析

Fig. 2 The sequencing analysis of HBV DNA U5-like sequence of the baby born after his father suffered from hepatitis B in family 201

表 2 3 个乙肝患者父子家系相同位点的 SNPs

Table 2 SNPs of the same loci in 3 families of hepatitis B patients

病例	U5 样序列区	非 U5 样序列区	
	1 908	1 950	1 967
201	A→T	G→T	T→C
202	A→T	G→T	T→C
1 301	A→T	G→T	T→C
2 301	A→T	G→T	T→C
2 302	A→T	G→T	T→C

表 3 乙肝患者父子家系 2 301 的 SNPs

Table 3 SNPs of the family 2 301 with hepatitis B patient

	核苷酸位点	父	子	
U5 样序列区	1 871	G→A	G→A	
	1 874	G→A	G→A	
	1 889	C→A	C→A	
	1 890	G→T	G→T	
	1 900	T 缺失	T 缺失	
	1 903	C 插入	C 插入	
	1 908	A→T	A→T	
	1 801	C 缺失	C 缺失	
	非 U5 样序列区	1 950	G→T	G→T
		1 967	T→C	T→C

3 讨论

SNP 是继 RFLP、STR 之后的第三代人类基因组作图的分子标记。目前,越来越多地用于疾病和群体遗传学。在疾病遗传学集中基因内或与基因关联的 SNPs 中寻找遗传病相关基因,在群体遗传学中重视基因外和低重组区的 SNP 标记,研究人类的遗传多态性和分子流行病学等^[2]。

SNP 为基因组水平上单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性,表现形式有单碱基的转换、颠换、插入、缺失等。转换与颠换比约为 2:1,1/4 的 SNPs 发生 T→C 转换。本研究发现 SNPs 表现形式有 4 种,即单碱基的转换、颠换、插入、缺失。在 3 个家系的 5 个受试者中,转换与颠换比为 1:2,1/3 的 SNPs 发生 T→C 转换。在 2 301 家系中,转换与颠换比为 3:4,T→C 转换和涉及的 T、C 点突变约占 2/5。

应用 PCR、SSCP、核苷酸序列分析等技术分析受试者 U5 样序列的 SNP 为简便易行的方法。SSCP 技术可检测含 SNP 突变型 U5 样序列片段,在 PCR 产物 < 200bp 时,突变检出率为 70% ~ 95%。本研究 PCR 产物为 138bp。U5 样序列是 HBV 基因组中一段最保守的核苷酸序列,位于 1 857 ~ 1 918 区,61bp。

本课题 U5 样序列 PCR 检测结果表明,HBp 和 HBPa 等实验组的检出率分别与 HBpb 的比较,差异

均显著 ($P < 0.05$)^[3-6]。结果提示, HBPa HBV DNA 检出率增高是与遗传传递因素有关, 由于在父子间不存在围产期的感染, 可排除水平传播的可能因素, 因此整合型 HBV DNA 检出率显著增高归因于发病的父亲, 通过有 HBV DNA 整合的精子传递给后代, 有人认为这是 HBPa 遗传物质损伤的主要因素^[7,8]。

PCR-SSCP 分析表明, HBV DNA U5 样序列突变率为 5.4%, 其中 2 301 患者家系的父子之间具有完全一致的单链泳动变位。提示该患儿可能是由于获得其患病父亲精子细胞中整合的 HBV DNA 所致。

HBV DNA U5 样序列核苷酸序列分析表明, 所检测受试者的 9 份 U5 样序列标本中, U5 样序列区和非 U5 样序列区共同存在 3 个位点的 SNPs, U5 样序列区 1 908 位点 A→T 颠换, 非 U5 样序列区 1 950 位点 G→T 颠换和 1 967 位点 T→C 转换。作为存在于人类基因组内的 HBV 基因组的这些碱基替换均为点突变, 与乙肝的发生、发展、治疗不愈和传递等直接相关。家系 2 301 父子两人 PCR-SSCP 阳性。检测 SNP, 发现至少 10 个位点共同存在 SNPs, 除 U5 样序列区的 1 871、1 874、1 889、1 890、1 908 5 个位点和非 U5 样序列区的 1 950、1 967 2 个位点的碱基替换之外, 在 1 900、1 801 位点和 1 903 位点分别为 T、C 碱基的缺失和 C 碱基的插入。这 10 个位点点突变的分子遗传学特征决定了父子两人的临床特点。患者为慢性活动性肝炎, HBsAg、HBeAg 和抗-Hbe 均阳性, 即“大三阳”, 其儿子发病后出生, 乙肝五项检查也为“大三阳”^[9]。

本研究结果表明, HBV 感染可以在 HBsAg 阳性的 MHBP 及其子女之间遗传传递, 通过生殖细胞在亲子代间进行传递是有可能的, 从分子遗传学水平为 HB 的遗传传递学说提供了证据^[10-12]。

参 考 文 献

1 Wang PL, Wang XH, Cong SY, et al. Molecular epidemiologic analysis of hepatitis B. Chin J Prev Med 1998, 32 :10 - 12.
[王培林, 王修海, 丛书英, 等. 乙型肝炎分子流行病学分析. 中华预防医学杂志, 1998, 32 :10 - 12.]

2 Wu XY, Zhang QH, Chen Z. The research and application of single nucleotide polymorphism. Chin J Med Genet, 2000, 17 :57 - 60.
[吴昕彦, 张庆华, 陈竺. 单核苷酸多态性研究及应用. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17 :57 - 60.]

3 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, et al. The chromosomes of sperm were influenced by HBV. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 1999, 11 :72 - 74.
[黄建民, 黄天华, 邱焕英, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 在肝炎患者精子染色体上的整合. 致癌、致畸、致突变, 1999, 11 :72 - 74.]

4 Pasquinelli C, Melegari M, Villa E, et al. Hepatitis B virus infection of peripheral blood mononuclear cells is common in acute and chronic hepatitis, J Med Virol, 1990, 31 :135 - 141.

5 Huang YQ, Bai JY, Ge QT, et al. The examination of HBV DNA in peripheral blood mononuclear cells and in serum of the hepatitis B patients and its significance. Journal of Clinical Laboratory, 1997, 15 :39 - 40.
[黄育清, 白敬羽, 葛其童, 等. 乙型病毒性肝炎患者外周血单个核细胞及血清内 HBV DNA 的检测及其意义. 临床检验杂志, 1997, 15 :39 - 40.]

6 Wang PL, Cong SY, Dong XY, et al. A genetic study of human interferon- α -induced repair of DNA damage in hepatitis B patients. Mutat Res, 1991, 262 :125 - 128.

7 Davision F. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozou, urine, saliva and leucocytes of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. J Hepatol, 1987, 14 :37 - 43.

8 Wang PL, Liu SF, Shen SL, et al. A study of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of hepatitis B patients with HBsAg positive and their children. Mutat Res, 1986, 175 :249 - 254.

9 Kazim SN, Wakil SM, Khan LA, et al. Vertical transmission of hepatitis B virus despite maternal lamivudine therapy. Lancet, 2002, 359 :1488 - 1489.

10 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2nd ed)(Translated by Dongyan Jin, Mengfeng Li, et al). Beijing : Science Press, 1995 :304 - 342.
[Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第二版)(金冬雁, 黎孟枫等译)北京 科学出版社, 1995.304 - 342.]

11 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. New Engl J Med, 2004, 350 :1118 - 1129.

12 Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, et al. Viral hepatitis B. Lancet, 2003, 362 :2089 - 2094.

(收稿日期 2005-12-20)

(本文编辑:王璐)