维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0169-06

经母婴传播获得 HBV 感染儿童及其母亲体内 HBV EnhII/CP/PreC 基因变异研究

许红梅,彭明利,凌　宁,卿玉玲,任　红

(重庆医科大学肝炎研究所,重庆　400010)

【摘　要】目的:通过对经母婴传播获得 HBV 感染的子女及其母亲慢性携带者体内 HBV EnhII/CP/PreC 基因序列研究,了解来源相同的 HBV 毒株在不同程度病毒血症情况下 EnhII/CP/PreC 基因变异特点。方法:选择 15 对母子 AsC,根据 HBV 病毒血症高低分为 3 组,每组 5 对母子,即Ⅰ组(母子均为高病毒血症)、Ⅱ组(子女为高病毒血症、母亲为低病毒血症)和Ⅲ组(子女为低病毒血症、母亲为高病毒血症)。同对母子 HBV 亚型相同,各组中有 4/5 对母子为 B/adw2、1/5 对母子为 C/adrq+ 亚型。应用 T-A 克隆技术构建重组质粒 pGEM-EnhII/CP/PreC、双酶切鉴定,每个病人选 2 个酶切鉴定正确的克隆测序并分析。结果:高病毒血症组间或低病毒血症组间 HBV EnhII/CP/PreC 基因变异数目及位点均无明显差异,低病毒血症病人变异数目及位点明显高于高病毒血症。高病毒血症中 16 例 B/adw2 亚型的 32 个 EnhII/CP 共有 6 个变异位点;4 例 C/adrq+ 亚型的 8 个克隆中有 4 个变异位点,均无热点变异;PreC 无变异。低病毒血症中 8 例 B/adw2 亚型病人的 16 个克隆共有 26 个变异位点,变异与年龄无关。结论 经母婴传播获得 HBV 感染儿童及其母亲无症状携带者中,HBV EnhII/CP/PreC 变异与病毒血症高低有关,低病毒血症病人变异明显高于高病毒血症。HBV 的低复制状态是 CP、EnhII 及 X 蛋白等结构和功能改变综合影响的结果,与年龄无关。

【关键词】乙型肝炎病毒;母婴传播;EnhII/CP/PreC;变异

【中国图书分类法分类号】R512.62　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-09-27

The study on the EnhII/CP/PreC gene mutation of hepatitis B virus in children infected by mother-to-infant transmission and their mother

XU Hongmei, et al

(*The institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To invistigate the characteristics of mutations in EnhII/CP/PreC of HBV in AsC children infected through mother-to-infant transmission and their AsC mothers with different degrees of viremia. *Methods*: There were 15 pairs of children and mothers. They were divided into three groups based on the level of viremia: group Ⅰ (both children and mothers presented high viremia), group Ⅱ (children presented high and mothers presented low viremia) and group Ⅲ (children presented low and mothers were high viremia). There were 5 pairs in each group with 4/5 of HBV being B/adw2 and 1/5 of HBV being C/adrq+ in each group. EnhII/CP/PreC was amplified and cloned into pGEM-T vector. Tow clones were selected to sequence each patient. *Results*: Substitution was the main model of mutations. There were no significant differences in the mutation numbers in EnhII/CP/PreC among high viremia groups or between two low viremia groups. There were significant differences between each high viremia group and each low viremia group. In patients with high viremia, there were 6 mutational positions in 32 clones in 16/20 patients with B/adw2, and there were 4 mutational positions in 8 clones in 4/20 patients with C/adrq+. In patients with low viremia (mothers of group Ⅱ and children of group Ⅲ), there were 26 mutational positions totally. *Conclusion*: The mutations in EnhII/CP/PreC are related to the degree of viremia in AsC children infected through mother-to-infant transmission and their AsC mothers, and no associated with age.

【Key words】HBV; Mother-to-infant transmission; EnhII/CP/PreC; Mutation

自 1989 年 Carman 首先报道在乙型肝炎患者体内发现 HBV 变异以来,已有较多相关研究,其中与 HBV 复制、转录和表达密切相关的 EnhII/CP/PreC 变异引起了广泛的关注,并发现变异 nt1896G→A、

作者介绍:许红梅(1965-),女,博士,
主要研究方向:感染性疾病临床表现与病原体变异。

基金项目:国家自然科学基金资助(项目编号:396-30280)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

nt1899G→A、1762A→T/1764G→A 等变异，但它们在乙型肝炎发病机理中的作用尚无定论。我国是HBV 感染的高流行区，母婴传播是最主要的传播途径，也是形成人群 AsC 和 HBV 贮存库的重要原因，对经母婴传播获得 HBV 感染的子女及其母亲体内 HBV 变异进行比较性研究，能最大限度避免不同毒株引起的差异，从而明确来源相同的 HBV 在不同年龄期、不同程度病毒血症情况下、不同的 HBeAg 状况下的变异特点，并可能得出普遍性的结论。故本文以经母婴传播获得 HBV 感染的 AsC 儿童及其 AsC 母亲为研究对象，对 EnhII/CP/PreC 进行研究，明确在不同年龄期 AsC 体内该基因变异与病毒血症高低、HBeAg 血清转换的关系，以上研究将为进一步研究 EnhII/CP/PreC 基因变异与慢性肝病的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2001 年 3 月 ~2002 年 3 月在重庆医科大学儿童医院感染消化科就诊的 99 对母子无症状携带者（AsC），母亲孕前确诊为 HBV 感染（两对半 HBsAg、HBeAg、抗 -HBc 阳性），诊断符合《病毒性肝炎防治方案》[1]（西安）。儿童均未接种过乙肝疫苗，并在 3 岁以前发现 HBsAg、HBeAg、抗 -HBc 阳性，定期随访肝脏功能正常，母子未使用过抗 HBV 药物，父亲无乙型肝炎。经血清 HBV 定量检测（HBV 滴度≥10^7/ml 为高病毒血症，≥10^5/ml 为低病毒血症），筛选出子女为高病毒血症、母亲为低病毒血症母子 5 对（Ⅱ组），母亲为高病毒血症、子女为低病毒血症母子 5 对（Ⅲ组），随机选 5 对均为高病毒血症的母子（Ⅰ组）；高病毒血症 HBV 血清学标志物均为 HBsAg、HBeAg、抗 -HBc 阳性，低病毒血症 HBV 血清学标志物均为 HBsAg、抗 -HBe、抗 -HBc 阳性。15 对母子肝脏功能正常，抗 HAV-IgM、抗 HDV、抗 HCV、抗 HEV-IgM 均阴性。子女 7~12 岁（即学龄期儿童），母亲 28~40 岁（即青壮年）。病人所感染的 HBV 血清型、基因型已根据 S 基因 PCR 产物测序结果确定（见表 1）。子女及其父母血清保存于 -70℃超低温冰箱。

1.2 主要试剂

引物根据 HBV 序列[2]设计（上海生工生物工程公司合成），Ex Taq DAN 聚合酶（Takara 公司），Apa Ⅰ和 Sac Ⅰ（Roche 公司），pGEM-T 载体（Promega 公司）

1.3 研究方法

1.3.1 血清 DNA 提取 采用酚 - 氯仿抽提法。

1.3.2 母子 HBV EnhII/CP/PreC 基因的扩增、克隆、酶切鉴定和测序 上游引物 P1 5′ CTTCACCTCTGCACGTTG 3′ 下游引物 P2 5′ AACTCCACACAGTAGCTCCA 3′。PCR 参数为预变性 94℃ 5min，94℃ 30s、51℃ 30s、72℃ 45s（共 35 个循环），延伸 72℃ 7min。胶回收纯化目的基因，与 pGEM-T 载体连接过夜，重组载体 pGEM-EnhII/CP/PreC 转入感受态 JM109，氨苄青霉素和 X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落。提取重组质粒，Apa Ⅰ和 Sac Ⅰ双酶切鉴定，每个病人选 2 个酶切鉴定正确重组质粒的 JM 109 菌液，送上海生工生物工程公司测序，测序引物 T7 和 SP6。采用 Clustalx(1.81)软件进行分析。

2 结 果

2.1 各种病毒性肝炎血清学标志物及血清 HBV 滴度检测

HBV 血清学标志物及 HBV 定量检测结果见表 1。

各组儿童为学龄期，母亲为青壮年期，各组病人 HBV 亚型 B/adw2、C/adrq+ 分布比例相同，故可在此基础上进行基因变异比较。

2.2 母子 HBV EnhII/CP/PreC PCR 扩增及重组 pGEM-EnhII/CP/PreC 酶切鉴定

5μl 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳，扩增出 1 条约 355bp 的 DNA 片段。重组质粒 pGEM-EnhII/CP/PreC 经 ApaI、SacI 双酶切，可产生 435bp 两个片段。均与预期目的基因大小相符合。

2.3 EnhII/CP/PreC 变异分析

2.3.1 EnhII/CP/PreC 变异方式 与本地区同亚型的标准参照序列比较，各组子女、母亲 EnhI-I/CP/PreC 变异方式见表 2。

表 2 显示 EnhII/CP/PreC 变异以替代变异为主，在低病毒血症组均存在 1、2 株缺失变异，未见插入变异。

替代变异经方差分析和 q 检验，Ⅰ-C、Ⅰ-M、Ⅱ-C、Ⅲ-M 等高病毒血症组间替代变异无显著性差异（均 $P>0.05$），Ⅱ-M、Ⅲ-C 两低病毒血症组间替代变异也无显著性差异（$P>0.05$）。但是高病毒血症组与低病毒血症组间比较有非常显著性差异（均 $P<0.01$）。以上结果表明：EnhII/CP/PreC 替代变异的核苷酸数目与病毒血症高低有关，而与年龄无关。

两低病毒血症组 EnhII/CP/PreC 存在的缺失变异：Ⅱ-M 组一个克隆缺失 19 个核苷酸（位于 nt1757~1775），Ⅲ-C 组两个克隆存在的缺失变异，分别为 20 个核苷酸（位于 nt1753~1772）、12 个核苷酸（nt1740~1751）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　15 对 HBV 慢性携带者母子临床资料、血清中 DNA 滴度及其 HBV 亚型

		Sex	Age	HBeAg/anti-HBe	DNAtiter(copies/ml)	Genotype	Serotype
Group Ⅰ	1C	Female	9	+/−	6.412×10^{7}	B	adw2
	1M		33	+/−	1.700×10^{8}	B	adw2
	2C	2C	10	+/−	7.491×10^{7}	B	adw2
	2M		36	+/−	3.753×10^{7}	B	adw2
	3C	Female	9	+/−	3.720×10^{7}	B	adw2
	3M		30	+/−	2.939×10^{7}	B	adw2
	4C	Male	12	+/−	2.475×10^{8}	B	adw2
	4M		40	+/−	2.590×10^{8}	B	adw2
	5C	Male	8	+/−	3.323×10^{7}	C	adrq+
	5M		31	+/−	3.806×10^{7}	C	adrq+
Group Ⅱ	1C	Female	11	+/−	4.387×10^{7}	B	adw2
	1M		36	−/+	7.158×10^{4}	B	adw2
	2C	Female	7	+/−	1.900×10^{8}	B	adw2
	2M		37	−/+	7.470×10^{4}	B	adw2
	3C	Male	7	+/−	1.014×10^{7}	B	adw2
	3M		28	−/+	5.986×10^{4}	B	adw2
	4C	Male	8	+/−	7.497×10^{7}	B	adw2
	4M		39	−/+	2.734×10^{3}	B	adw2
	5C	Male	10	+/−	4.710×10^{8}	C	adrq+
	5M		34	−/+	8.907×10^{3}	C	adrq+
Group Ⅲ	1C	Male	9	−/+	5.083×10^{3}	B	adw2
	1M		33	+/−	9.859×10^{7}	B	adw2
	2C	Female	9	−/+	1.542×10^{3}	B	adw2
	2M		32	+/−	8.400×10^{7}	B	adw2
	3C	Female	8	−/+	5.042×10^{4}	B	adw2
	3M		33	+/−	4.455×10^{7}	B	adw2
	4C	Male	7	−/+	1.043×10^{4}	B	adw2
	4M		29	+/−	3.320×10^{7}	B	adw2
	5C	Male	11	−/+	6.104×10^{4}	C	adrq+
	5M		40	+/−	9.632×10^{7}	C	adrq+

表 2　不同程度病毒血症 AsC 母子 EnhII/CP/PreC 变异方式分析(每个病人 2 个克隆)

		Group Ⅰ C n=10	Ⅰ M n=10	Group Ⅱ C n=10	Ⅱ M n=10	Group Ⅲ C n=10	Ⅲ M n=10	*F*	*P*
Substitution	X	0.80±0.31	1.20±1.06	1.00±0.46	11.10±4.85	10.30±5.10	0.80±0.63	27.82	<0.01
	Numbers of mutation(%)	8 (0.29%)	12 (0.43%)	10 (0.36%)	111 (4.01%)	103 (3.72%)	8 (0.29%)		
Deletion	Numbers of mutation(%)	0	0	0	19 (0.69%)	32 (1.16%)	0		

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3.2 核苷酸变异位点分析

2.3.2.1 B/adw2 亚型 HBV EnhII/CP/PreC 核苷酸变异位点分析

(1) EnhII/CP(nt1624~1771/nt1643~1849):16 例高病毒血症的 32 个克隆中 EnhII/CP 基因共有 6 个变异位点,11/32 克隆无变异、21/32 克隆有 1~2 个核苷酸变异,分布较分散,无年龄的差别。

8例低病毒血症病人每个克隆的 EnhII/CP 基因有 4 个位点以上的变异,16 个克隆共有 26 个变异位点,Ⅱ-M、Ⅲ-C 两低病毒血症组变异位点分别有 22、24 个,有 16 个变异位点相同,其余的仅存在于 1~2 个克隆中,所以变异位点与年龄无关。在 16 个两低病毒血症组共同拥有的变异位点中,13 个位点每组 4/8 以上克隆共同拥有(即变异热点),这些位点为 nt1636、nt1652、nt1673、nt1674、nt1703、nt1727、nt1730、nt1740、nt1773、nt1799、nt1802、nt1803、nt1846,有 5 个变异位于 EnhII/CP 的顺式激活结合位点内,2 个变异位于与转录有关的转录位点 Sp1 site2 内,但均未涉及到 4 个 AT 盒。而报道较多的 nt1762A→T/1764G→A 双变异在 B/adw2 亚型只在母亲低病毒血症组中有 1 个克隆。高、低病毒血症病人变异位点有 2 个相同(nt1679、nt1726),高病毒血症病人 5/32 克隆、低病毒血症病人 2/16 克隆存在 nt1679 变异,高病毒血症病人 4/32 克隆、低病毒血症病人 4/16 克隆拥有 nt1726 变异,可能与病毒血症的高低、病毒的复制无关,为差异而非变异。

Ⅱ-M、Ⅲ-C 两低病毒血症组各有 1 个克隆存在缺失变异,缺失的核苷酸分别位于 nt1757~1775、nt1753~1772,此外还存在缺失区外 EnhII/CP 热点变异。

(2) PreC(nt1814~1900):高病毒血症病人中无变异出现。低病毒血症病人中 9/16 个克隆存在变,主要集中在 nt1846~1858,其中 nt1846A→T(8/16个克隆)、nt1855T→C (1/16 个克隆)、nt1858T→C (8/16 个克隆)均为无意义变异,nt1850T→A(8/16 个克隆)使 Ser(TCA)→Thr(ACA)。热点变异位点 nt1846、nt1858、nt1850 均同时出现,并与 EnhII/CP 区域的热点变异同时存在。低病毒血症病人中只发现 1/16 克隆存在 nt 1896G→A 变异。发生缺失的 HBV 株 PreC 无变异。

(3) X 基因:X 基因位于 nt1374~1835,其后半段与 EnhII/CP 部分重叠。

高病毒血症病人 EnhII/CP 的 6 个变异位点也均位于 X 基因内,其中错义变异位点有 3 个,只存在于 7/32 克隆中并且每个克隆只有 1 个氨基酸变异。低病毒血症病人 EnhII/CP 中 12/13 个热点变异也位于 X 基因内,可引起 8 个氨基酸改变。核苷酸有缺失的 2 个克隆的 X 蛋白则出现截短 (缺失的氨基酸位于 aa126 以后)。

2.3.2.2 C/adrq+ 亚型 HBV EnhII/CP/PreC 核苷酸变异位点分析

(1) EnhII/CP:4 例高病毒血症病人 8 个克隆有 4 个变异位点,其中 3/8 个克隆(3 个病人各有 1 个克隆) 存在 nt1762A→T/1764G→A,2/8 个克隆有 1 个位点的变异。2 例低病毒血症病人 4 个克隆变异位点有 14 个。3/4 个克隆共同的变异位点有 10 个,与 B/adw2 低病毒血症病人的热点变异位点有 8 个相同。1/4 个克隆有缺失 (nt1740~1751),使 Sp1 site3 丧失。高、低病毒血症共有的变异位点为 nt1762A→T/1764G→A 双变异,母子高病毒血症、母高病毒血症子低病毒血症的 4 个病人均有该双变异。

(2) PreC:高病毒血症病人均无变异。低病毒血症病人 3/4 个克隆有 nt 1846、nt 1850、nt 1858,存在缺失的 HBV 株 PreC 无变异。

(3) X 基因:高病毒血症有 1 个错义变异(nt1773)。低病毒血症病人 10 个核苷酸变异可引起 X 蛋白 5 个氨基酸变异。

3 讨 论

由于母亲孕前有 HBV 感染(而父亲非 AsC 或乙肝病人)、其子女婴幼儿期发现已感染 HBV、每对母子基因型和血清型均相同,故可以判断子女 HBV 来自其母亲。所有病人均为 AsC,三个实验组 HBV 亚型组成相同,各组母亲、子女的年龄段相同(母亲为 28~35 岁,儿童为 7~12 岁)。在此基础上对在不同年龄机体内引起不同病毒血症的 HBV EnhII/CP/PreC 变异及其特点进行研究,能最大程度地减少不同病毒亚型、不同疾病状态等可能导致结论出现偏差的因素,以得出客观的结论。同时实验中使用在 PCR 中具有纠错、保真功能的 Ex-Taq DNA 聚合酶以排除 PCR 扩增过程中因错配而导致的替换变异。实验中还设计了阳性、阴性对照以排除污染。

本研究结果显示无论是儿童还是母亲,高病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

血症组间或低病毒血症组间 HBV EnhII/CP/PreC 变异数目及位点均无明显的差异，说明变异与年龄无关。而高病毒血症病人与低病毒血症病人变异数目及位点有非常显著的差异，高病毒血症病人均为 HBeAg(+)，低病毒血症病人均为 HBeAg(-)，说明 HBeAg 血清转换伴随着 HBV 基因转换。

低病毒血症病人 HBV PreC 基因均存在核苷酸变异，变异热点为 nt1846A→T、nt1850T→A、nt1858T→C，其中 nt1850T→A 使 PreC 蛋白第 13 位 Ser→Thr，而报道的 HBeAg 血清转换后出现较多的终止密码变异 nt1896G→A[3,4]只存在于 1/16 个克隆中，并且不伴有上述 PreC 热点变异（包括 nt1858T→C）。分子流行病学调查及体外研究均表明[5,6] nt1896G→A 易发生变异与 nt1858 位核苷酸类型有关，这是因为与 PreC 重叠的核包装信号 ε 是位于 nt1847~1908 序列形成的茎环结构，其茎部有三对核苷酸不互补配对：nt1858T 与 nt1896G、nt1855T 与 nt1899G、nt1850T 与 nt1904G。若发生 nt1896G→A，则与 nt1858T 互补，茎环结构就更稳定，有利于病毒包装及 DNA 聚合酶激活。同样道理，nt1858T→C 与 nt1896G 互补配对，也能达到增加该茎环稳定性的效果，由此可以解释本实验 nt1858T→C 变异较高频率发生而 nt1896G→A 发生较低。由于 nt1858T→C 变异或产生终止码 nt1896G→A 两处变异均可出现在低病毒血症、抗 -HBe(+)病人体内，同时还伴有 EnhII/CP 变异，所以可以推测该两处变异可能与 HBeAg 消失无关，更可能是病毒复制的代偿机制、机体免疫选择的结果。本地区 nt1896G→A 发生率较低可能与不同地区流行 HBV 毒株不同有关。茎环稳定性观点还可以解释本实验中低病毒血症病人 1/16 个克隆 nt1855T→C 以及文献报道的 nt1899G→A[7]。但本实验变异热点 nt1850T→A 并不能与 nt1904G 互补、另一与 Lok[5]报道一致的变异热点 nt1846A→T 使与 nt1908T 互补破裂，对此目前尚无满意的解释，可能与它们位于茎环核心区域（nt1852~1903）以外有关。

EnhII/CP 是 HBV 复制关键区域，本实验结果显示低病毒血症病人该区变异明显高于高病毒血症病人。13 个替代变异热点中有 5 个位于顺式激活序列内、2 个位于 Sp1 的第二结合部位，可引起 PreC mRNA、C mRNA 转录下调、HBV 复制减少、HBeAg 合成降低。在 HBeAg(-)/ 抗 -HBe(+)病人中报道较多的 1762A→T/1764G→A 双变异[3,8,9]，在本实验 HBV 为 B/adw2 亚型的病人中只存在于 1/16 个克隆中，而在 HBV 为 adrq+/C 亚型的病人中，无论 HBeAg(-)还是(+)、子女还是母亲均存在该双变异。有关该双变异的研究较多，是否与 HBeAg 血清转换及 HBV 相关肝病有关观点不尽一致[3,10,11]。而将 HBV 基因型引入变异研究后所得的结论则较全面地解释了该变异在 HBV 感染及相关肝病中的地位，研究[4,12]显示该变异与 HBeAg 状态、DNA 水平无关，而与感染基因型 C HBV 以及病情加重有关。本研究在 AsC 中的研究结果也支持以上观点，表明该变异不是本地区 AsC 中 HBeAg 血清转换的主要因素。

在本实验中低病毒血症病人 3 个克隆 EnhI-I/CP 存在缺失变异：nt1756~1772、nt1757~1775、nt1740~1751。前两者分别使 AT2/AT3/HNP4 site2、AT1/AT2/AT3/HNP4 site2 等序列丢失，不但丢失了 PreC mRNA 转录因子结合部位 AT1/AT2/AT3，还丢失了调节两种 RNA 转录的 HNP4 第二结合部位。第三个缺失变异克隆使 Sp1 site3 丢失也可以造成转录两种 mRNA 的能力下降[13]。所以不难理解这三株病毒的复制能力降低、HBeAg 合成减少。

X 基因编码的 X 蛋白对 HBV 复制有转式激活作用，其两个功能区分别位于 aa32~66、aa106~148[14]。低病毒血症病人 EnhII/CP 基因与 X 基因重叠区域的 12 个替代变异热点可导致 8 个 X 蛋白氨基酸改变，其中 6 个位于第二功能区，而 3 个缺失变异株可引起 X 蛋白第二功能区截短，所以以上的变异均可影响 X 蛋白的转式激活作用，使 PreC mRNA 和 C mRNA 转录减少。

综上所述，通过对不同程度病毒血症的、经母婴传播获得 HBV 感染儿童及其母亲的 HBV EnhI-I/CP/PreC 的研究，表明 AsC 中该区域基因变异与年龄无关，而与病毒血症高低（即 HBV 的复制状态）有关，低病毒血症的变异明显高于高病毒血症，HBV 低复制状态是 CP、EnhII 及 X 蛋白等结构和功能改变综合影响的结果，HBeAg 血清转换伴随 HBV 基因转换，而 PreC 基因变异不起主要作用。

参 考 文 献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志，2001；19：53.

[2] 成 军，杨守纯，主编. 现代肝炎病毒分子生物学[M].

维普资讯 http://www.cqvip.com

北京:人民军医出版社,1997;26-28.

[3] Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion[J]. Hepatology, 1999;29(3):976-984.

[4] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group [J]. Hepatology, 2001;33(1): 218-223.

[5] Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal[J]. Proc Natl Sci USA, 1994; 91:4077-4081.

[6] Li JS, Tong SP, Wen YM, et al. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region[J]. J Virol, 1993;67: 5402-5410.

[7] Friedt M, Gerner P, Lausch E, et al. Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 1999;29(4):1252-1258.

[8] Luo K. Hot spot mutations of hepatitis B virus pre-C/C gene and its promotor in Chinese patients and the clinical implications [J]. Chin Med J (Engl), 1999;112(2): 182-184.

[9] Nagasaka A, Hige S, Marutani M, et al. Prevalence of mutations in core promoter/precore region in Japanese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Dig Dis Sci, 1998;43(11): 2473-2478.

[10] Aritomi T, Yatsuhashi H, Fujino T, et al. Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998;13(11): 1125-1132.

[11] Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B [J]. J Med Virol, 1996; 49(2):115-123.

[12] Kao JH, Chen PJ, Lai MY,et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis [J]. Gastroenterology, 2000;118(3):554-559.

[13] Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor[J]. J Virol, 2001;75(18): 8400-8406.

[14] Ritter SE, Whitten TM, Quets AT, et al. An internal domain of hepatitis B X antigen is necessary for transactivating activity[J]. Virology, 1991;182:841-845.

(上接第 158 页) 态,低水平表达共刺激分子 CD80 和 CD86,体外激发未致敏 T 细胞增殖的能力较弱。结果表明二甲基亚砜联合羟乙基淀粉的非程控降温的保存方法能够长期有效的保存不成熟 DC,为不成熟 DC 的临床应用打下了基础。

Corresponding author:Peng Yizhi E-mail: yizhipen@mail.tmmu.com.cn, Tel:023-68754175

参 考 文 献

[1] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2003;21:685-711.

[2] 刘 芳,魏 力.供者未成熟树突状细胞对大鼠皮肤移植免疫耐受的诱导 [J]. 咸宁医学院学报, 2002;2:110-112.

[3] Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation [J]. J-Immunol-Methods, 2004;288 (1-2): 123-34.

[4] 王 强,彭毅志.小鼠骨髓未成熟树突状细胞体外扩增及鉴定 [J]. 中华烧伤杂志, 2003;19(6):332-335.

[5] 姜 艳,彭毅志,袁志强.人外周血未成熟树突状细胞的体外扩增和鉴定及抗成熟特性的研究[J].中国医师杂志,2005;3:289-291.

[6] 黄友章,杨平地,沈建良,等.低温冻存脐血树突状细胞的生物特性研究[J].海军总医院学报,2002;15(4):202-206.

[7] Jorg Westerman, Ida J. Korner, Joachom Kopp, et al. Cryopreservation of mature monocyte-derived human dendritic cells for vaccination: influence on phenotype and functional properties[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003;52:194-198.

[8] Justin John, Angus Dalgleish, Alan Melcher, et al. Cryopreserved dendritic cells for intratumoral immunotherapy do not require re-culture prior to human vaccination [J]. Journal of Immunological Methods, 2005;299:37-46.