# 乙型肝炎病毒前 S1/S2功能区变化与临床转归的可能联系*

张 瑞** 顾长海 赵秋敏 王洪莉*** 王海涛**** (第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心)重庆, 400038

提 要 目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)前 S1/S2基因变异规律及其与 HBV感染临床转归的关系。方法: 选择急性自限性乙型肝炎患者、慢性 HBV 携带者及慢性重型乙型肝炎患者各 3例,用半巢式 PCR法从此 9例 HBV 感染者血清中扩增出前 S1/S2片段,并用标准分子生物学方法对 PCR产物进行克隆和序列分析。每个 HBV感染者随机选择 10个克隆,总共测定了 90个克隆。通过核苷酸、氨基酸序列同源性比较分析前 S1/S2区内肝细胞结合位点、B细胞表位和前 S1、S2调控区的缺失状况。结果: 不同转归的 HBV感染者体内的 HBV 前 S1/S2变异具有明显不同的特征。急性自限性乙型肝炎: 前 S1/S2各功能区稳定, T、B细胞表位无变化。慢性 HBV 携带者: 前 S1/S2各功能区变异较大,存在着 T、B细胞表位的漂移。慢性重型乙型肝炎: 优势株内可能存在引起机体免疫性增高的区域。结论: 本研究为较全面地了解 HBV 前 S1/S2功能区变化与临床转归的可能联系提供了实验依据。

关键词 HBV;前 S1/S2;功能区;临床转归
中图法分类号 R512.6

现有的研究证实前 S1/S2区为 HBV变异最大的区段,并且最易出现缺失突变[1]。由于前 S区编码的前 S1/S2蛋白是与 S蛋白共同组成引发保护性抗体的主要蛋白[2],在前 S1蛋白的 N端包含着与肝细胞结合的位点[3], C端在病毒的合成与分泌中起关键作用[4,5]。而前 S2基因编码的前 S2蛋白内含有 B细胞及 HLA-I限制的 $CD_8^+$、$CD_4^+$ T细胞表位[6,7]。而前 S1/S2区的变异会直接造成以上功能的变化,因此对前 S1/S2区的研究无论是对乙型肝炎的发病机制,还是新型疫苗的研制均有重要意义[8,9]。但现有的研究存在许多不足,其一是方法的局限性,其二是选择病例的单一,至今为止还没有从不同转归的多组病人进行多克隆的研究报道。因此对前 S1/S2区变异程度的研究以及变异与临床转归关系的推导受到限制。本研究的目的旨在对前 S1/S2功能区的变化及其与临床关系进行初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 血清采集

9例研究对象中 3例急性自限性乙型肝炎患者取自天津 254医院 1994年 4月至 1995年 7月住院病人,发病后 3个月复查 HBsAg转阴,血清中 HBV-DNA多次检查阴性。3例慢性重型乙型肝炎为本院 1993年至 1994年住院病人,均死亡。3例慢性 HBV携带者为广西地区普查人群,诊断均符合 1996年全国《病毒性肝炎防治方案》。

### 1.2 菌种、质粒、噬菌体及其它试剂

大肠杆菌 XL1-Blue为本室保存。噬菌体 M13 mp19、M13 mp18购于华美生物工程公司。限制性内切酶 PstⅠ及 KpnⅠ购于 Promega公司。T4 DNA连接酶购于 Promega公司。测序药盒(T7 Sequence Kit)购于 USB公司, $^{35}S$-α-dATP购于杜邦公司。GeneCleanⅡ盒购于 Bio101公司。QIAprep Spin M13盒为 QIAGEN公司产品。

### 1.3 引物

前 S/S基因 PCR扩增所用引物为:

S1: 5′-CGCGGTACCGGTCACCATATTCTTGGGAA-3′(2815~2835),划线处为 KpnⅠ位点。

S2 5′-TGCGACTGCAGTTAGGGTTTAATGTATACC-3′(842~832),划线处为 PstⅠ位点。

S3: 5′-AAACTGCAGCCGTCCTGATGT(T/G)(G/A)TG(T/C)TCTCCAT-3′(155~181),划线处为 PstⅠ位点。

### 1.4 血清中 HBV DNA的扩增

取 200μl血清,加 20% PEG 8000,冰浴 40 min,离心取上清;加裂解液 4 mol/L异硫氰酸胍、25 mmol/L柠檬酸钠等,冰浴沉淀,酚、氯仿抽提;用无水乙醇沉淀 DNA后,将 DNA溶解于 20μl水中。先以引物 S1、S2在 94℃ 1 min、60℃ 1.300 min、72℃ 1.300 min条件下扩增 30个循环,再取首轮扩增产物 1μl以引物 S1、S3在 94℃ 1 min、64℃ 1 min、72℃ 1 min条件下扩增 35个循环。扩增产物在 1.5%琼脂糖电泳,在 608 bp处可见明显扩增带。

### 1.5 PCR产物的克隆和序列分析

根据文献提供的标准方法进行。取 M13 mp19分别用 PstⅠ、KpnⅠ酶切后,用 GeneCleanⅡ盒纯化(按试剂盒说明操

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39270642
** 张 瑞,女,36岁,主治医师,博士
*** 天津 254医院传染科 天津, 300142
**** 军事医学科学院 北京, 100059

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作)。PCR扩增 DNA产物也经同样双酶切,经酚、氯仿抽提后,用无水乙醇沉淀 DNA,将 DNA溶于水,在 T4 DNA连接酶参与下,连接目的基因和 M13 mp19,转化于 XIL 1-Blue菌,在含 IPTG和 X-gal的培养基上培养 8 h,随机挑取 10个噬菌斑。在 2× YT培养基中,于 37℃培养 5 h,将 M13 mp19阳性克隆原种液以模板,用 R F引物扩增含阳性克隆的片段,再以上述方法分别进行 PstⅠ、KpnⅠ酶切,并纯化与 M13 mp18载体连接后,以同样的方法制备 M13 mp18原种(方法同上)。以 QIAGEN Spin M13盒按说明提取单链 DNA。用 T7测序药盒进行序列分析。放射自显影后读片。

### 1.6 序列的计算机分析

采用 Goldkey软件(军事医学科学院吴加金等编制),对所有克隆进行同源性分析等。

## 2 结果

### 2.1 基本资料

采用 Goldkey软件将所测每个序列与 HBV基因库中的 27条 HBV序列比较,选出同源性最高者为假定野生株。并经 Goldkey排列核苷酸序列方阵(略)。将各核苷酸序列翻译成氨基酸,并排列成氨基酸序列图(略)。

### 2.2 不同转归的 HBV感染者前 S1/S2区功能区的变化及缺失位点分析

#### 2.2.1 不同转归的 HBV感染者肝细胞结合位点区的变化

从表 1可见:① 3例急性自限性乙型肝炎患者肝细胞结合位点无变化。② 3例慢性 HBV携带者,肝细胞结合位点的变化平均克隆数为 6.67个,其区内氨基酸的变异率为 17.95%。③ 3例慢性重型乙型肝炎患者,优势株中的肝细胞结合位点无变化,而相似株中的肝细胞结合位点变化平均克隆数为 2.3个,其内的氨基酸变化率为 15.90%。

#### 2.2.2 不同转归的 HBV感染者 B细胞表位区的变化

从表 1可见:① 3例急性自限性乙型肝炎患者,B细胞表位区变化。② 3例慢性 HBV携带者,B细胞表位区变化的平均克隆数为 5.3个,其区内氨基酸变异率为 47%。③ 3例慢性重型乙型肝炎患者,优势株中的 B细胞表位呈固定变化(第 2位 R-K,第 7位 F-L的变化),而相似株的 B细胞表位区变化平均克隆数为 2个,其内的氨基酸变化率为 36.67%。

表 1 不同转归的 HBV感染者前 S1/S2功能区变化

**Tab 1 Changes of HBV preS function domains in different clinical outcomes**

| Function domains | Acute hepatitis B | | | | Chronic HBV carriers | | | | Chronic severe hepatitis B | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | W | L | U | (%) | H | F | Wu | (%) | B | Bi | Zo | (%) |
| The varying clones in B epitiope | 0 | 0 | 0 | (0) | 4 | 5 | 7 | (5.3) | 2 | 1 | 3 | (2.00) |
| The varying rate of amio in B epitiope | 0 | 0 | 0 | (0) | 36.65 | 34.67 | 70.00 | (47.10) | 28.33 | 26.67 | 55 | (36.67) |
| The varying clones of hepatitis recepte | 0 | 0 | 0 | (0) | 5 | 5 | 10 | (6.67) | 2 | 1 | 4 | (2.30) |
| The varying rate of amio in hepatitis recepte | 0 | 0 | 0 | (0) | 9.62 | 13.85 | 30.38 | (17.95) | 17.09 | 1.54 | 28.48 | (15.90) |

1: Every clone is compared with the wide type HBV; 2 The total number of clones in every patient was 10; 3: In the chronic severe hepatitis B, the hepatitis receptes were no change of in dominant clones; 4: The B cell epitope is located on the 14 ~ 24 amio of PreS2 protein, the hepatitis B repcete is located on the 21~ 47 amio of PreS2 protein

## 3 讨论

HBV前 S1/S2各功能区的 HBV感染者转归的联系。

### 3.1 肝细胞结合位点区段相对恒定是 HBV感染的基础

现有的研究认为前 S1区的 21~ 47位氨基酸内包含有与肝细胞膜结合的位点[2],HBV通过此区段介导与肝细胞的结合,并脱掉外壳进入肝细胞,在感染宿主的肝细胞内进行病毒的复制。一般认为此区较恒定[10]。另有人认为此区内包含着 T细胞识别位点[11]。

我们的研究发现:在急性自限性乙型肝炎病人组内,肝细胞结合位点相对恒定;慢性 HBV携带者此区变异较大,此区内的氨基酸变异率为 9.62%~ 30.38%;慢性重型乙型肝炎组中,优株株内肝细胞结合位点稳定,而"相似株"中存在着氨基酸的一些变异,变异范围为 1.54%~ 28.48%。

推测前 S1区的变异可能与机体对抗病毒入侵的保护性免疫有关,使某些病毒不能和肝细胞结合。但这仅是问题的一方面,总的来说,病毒的感染是占主导地位的,几乎 100%的急性自限性乙型肝炎患者体内的病毒,70%~ 90% HBV携带者体内的 HBV及 81%~ 98.5%慢性重型乙型肝炎患者体内的病毒是具有传染性的。

那些不能和肝细胞结合的病毒在肝损伤中起什么作用,变异的 HBV是否还有与肝细胞结合的能力也需要澄清。

### 3.2 免疫表位的稳定是机体清除 HBV的基本保证

已知在前 S2区内富含免疫表位,其内除具有 B细胞表位外,还有 MHC限制的 $CD_4^+$、$CD_8^+$ T细胞表位[12~14],由于感染者体内 MHC的差异,T细胞表位在序列上的分布区域会有所不同,因此,我们仅选用 B

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞表位区分析三种不同转归 HBV感染者的免疫状况。

我们的研究发现:① 急性自限性 HBV肝炎患者体内各克隆的 B细胞表位与野生株相比均无变化,推测此类病人体内 HBV病毒 $CD^4$、$CD^8$ T细胞表位也是恒定的(因为此种病人体内 HBV前 S1/S2区的变异率极低),因此已经致敏的 CTL或抗体能够很准确地攻击受染的肝细胞,从而清除病毒,机体在经过一过性的炎性损伤后,逐渐恢复痊愈。② 慢性 HBV携带者,此类病人体内各 B细胞表位的变化克隆数为 5.3%,其内氨基酸的变异率平均为 47.00%,说明此类病的 B细胞表位变化极大,并可以推测 $CD^4$、$CD^8$ T细胞表位也发生很大的漂移。体内原先能识别抗原位点的中和抗体和特异性 CTL也不能再识别不断变异的抗原位点,导致已建立的免疫无效或低效。使 HBV变异株得以长期存在于宿主体内。③ 慢性重型乙型肝炎,此类患者 B细胞表位的变化克隆数平均为 2.3%,氨基酸平均变异率达 15.76%,介于前两者之间。优势克隆中 B细胞表位区域恒定,并在其上第 2及第 7位氨基酸上出现了固定的 R-K, F-L的变化。推测此二位氨基酸的变化可能使 HBV的抗原性加强,从而诱发过强的免疫应答,但这 3例病人中的优势株是否与过强的免疫相关,没得到实验证实。

乙型肝炎病毒前 S1/S2功能区的变化与 HBV感染者转归的关系,是一个极其复杂的问题,由于本研究的局限性仅提出以上几点看法,是否能代表普遍现象。尚需扩大样本和扩大基因分析范围,更需要同行们的工作来进一步证实。

## 参考文献


1 Tiollais P, Pourcel C. The hepatitis B virus. Nature, 1985, 317: 489

2 Heermann K-H, Gerlich W H, Mclachlan A, *et al*. Surface proteins of hepatitis B viruses. In: Boca R ed. Molecular biology of the hepatitis B virus. New York: CRC Press, 1991. 109~143

3 Mangold C M, Streeck R E. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. J Virol, 1993, 67(8): 4588

4 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(3): 1059

5 Barnaba V, Franco A, Alberti A, *et al*. Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liver-Infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. J Immunol, 1989, 143(8): 2650

6 Barrett A D T, Dimock N J. Defective interferring viruses and infections in animals. Curr Top Microbiol Immunol, 1991, 128(1): 55

7 Saul F A, Normand B V, Lema F, *et al*. Cryotal structure of a dominant B-cell epitope from the PreS2 region of hepatitis B virus in the form of an inserted peptide segment in maltodextrin-binding protein. J Mol Biol, 1998, 280(2): 185

8 Trigatni M. Protective efficacy of DNA vaccines against duck hepatitis B virus infection. J Virol, 1998, 72(1): 84

9 Akbar S M. Placebo-controlled trial of vaccination with hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus transgenic mice. J Hepatol, 1997, 26(1): 131

10 Ferrari C, Cavalli A, Penna A, *et al*. Fine specificity of the human T-cell response to the hepatitis B virus preS1 antigen. Ganstroenterology, 1992, 103(1): 255

11 Klinkent M G. Theikmann L, Pfaff E, *et al*. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection. J Virol, 1986, 58(2): 522

12 Budkowska A, Dubreuil P, Maillard P, *et al*. A biphasic pattern of anti-pre-S responses in acute hepatitis B virus infection. Hepatology, 1990, 12(6): 1271

13 Gupps T R, Hoofnagle J H, Ellis R W, *et al*. *In vitro* immune responses to hepatitis B surface antigens S and PreS2 during acute infection by hepatitis B virus in human. J Infect Dis, 1990, 161(3): 412

14 Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of hepatitis B viruses. Ann Rev Biochem, 1987, 56: 651


(收稿: 1998-12-30;修回: 1999-05-12)

(编辑 冷怀明)

# Study of the relationship of the changes of HBV preS function domains with clinical outcome of HBV infection*

Zhang Rui, Gu Changhai, Zhao Qiumin, Wang Hongli, Wnag Haitao (Clinical Center of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

**Abstract** **Objective:** To study the relationship of the changes of HBV preS function domains with the

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39270642

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

clinical outcome of HBV infection. **Methods**: 3 groups of HBV infected cases including 3 cases of acute HBV infection with complete recovery, 3 cases of chronic HBV carrier and 3 cases of chronic severe hepatitis B were studied. The preS genes were amplified from serum samples with half nested PCR and the products were cloned into M13 vectors. 10 clones were randomly selected from each case and sequenced with standard procedures. A total of 90 clones were sequenced and analyzed with DNA homology comparison. **Results**: There were different characteristics in HBV infected cases with different outcomes: ① In case of acute infection, the great indentity of DNA sequences among the clones were accompanied with stable function domains without changes of epitopes for T and B cells. ② In the chronic HBV carriers, the preS function domains showed high changes with epitope dreifts of T and B cells. ③ In case of chronic severe HBV infection, special changes existed in the function domains of B cells, which may be the cause of abnormally high immune response and severe liver damages. **Conclusion**: Our findings confirm the fact that there are relations of the changes of the pre S1/S2 function domains with the clinical outcome of HBV infections.

**Key words**　HBV; Pre S1/S2; function domain; clinical outcome

(上接 549页)

### 2.2　动物体内除菌法对细胞培养中霉菌污染的作用

将污染的杂交瘤细胞注入 Balb/c小鼠腹腔中,14 d后每只小鼠可得黄色浑浊腹水 3~ 5 ml,离心(1000转/分)后得到乳白色细胞沉淀,HE染色、革兰氏染色、PAS染色霉菌镜检证明杂交瘤细胞中混杂有较多的淋巴细胞、红细胞及霉菌孢子,霉菌培养证实为白色念珠菌;如此反复处理 4次后霉菌污染仍然存在,杂交瘤细胞不能进行传代培养(细胞死亡)。

### 2.3　两性霉素 B对细胞培养中霉菌污染的作用

将以上从小鼠腹水中得到的细胞置于含有不同浓度的两性霉素 B的细胞培养液中进行培养,5μg/ml和 10μg/ml的两性霉素 B导致细胞死亡,镜下可见大量细胞碎片;而 3μg/ml和 1μg/ml的两性霉素不能抑制霉素生长,于培养第 3天培养液变浑浊,镜下可见细胞死亡及大量布郎运动的微小生物。

### 2.4　低速离心法去除细胞培养中的霉菌污染

将以上从 Balb/c鼠腹水中得到的杂交瘤细胞进行反复(6~ 9次)低速离心(500~ 800转/min),多次离心及棉签反复处理后,显微镜下可见杂交瘤细胞中混杂的其他细胞成份明显逐步减少,于第 3~ 5次离心后于镜下消失,再离心及棉签处理 3次,最后将细胞置于 RPMI-1640细胞培养液中进行培养,镜下见细胞生长良好,于第 3天呈明显克隆化生长;将以上低速离心处理后的细胞进行传代培养后再行霉菌培养,传代细胞生长良好,霉菌培养未见霉菌生长,霉菌污染完全清除。

## 3　讨论

细胞培养过程一旦出现霉菌污染,人们往往显得束手无策。镜下观察,杂交瘤细胞与霉菌孢子相比较,二者体积相差悬殊,我们由此得到启示:利用二者沉降系数间的差异,应该能够将其分离。为此我们使用了低速离心法成功地去除了细胞培养中的霉菌污染。我们的体会是:① 离心速度不宜过快,以 500~ 800 r/min为宜,低速离心情况下,体积较大的杂交瘤细胞最先沉淀于离心管的底部,霉菌及红细胞、淋巴细胞沉淀于其表面;② 应予以多次离心,并于每次离心后用棉签吸净离心管中残存的液体,同时吸掉细胞沉淀的表层细胞。于每次离心和棉签处理后观察处理的效果,至镜下见不到霉菌和其它细胞成份,再离心和棉签处理 2~ 3次,然后进行细胞培养;③ 每次离心处理后都可去除部分霉菌污染,但同时也使数量减少,本方法所需细胞量大,离心前应将细胞注入动物体内扩增;④ 两性霉素 B对细胞培养中霉菌污染的作用有限,浓度过高可致细胞死亡,浓度过低时则不能抑制霉菌生长;⑤ 细胞培养中出现霉菌污染时,将细胞注入动物体内借助动物自身的免疫力可消除污染,但该方法所需时间长、所需费用高,如果在较短时间内不能清除杂交瘤细胞中的霉菌污染,将可能影响杂交瘤细胞的生物学功能[1,2];我们使用动物体内除菌法 4次,耗时近 2个月尚能除细胞培养中的霉菌污染,培养的细胞不能生长;⑥ 低速离心法、动物体内除菌法、两性霉素 B除菌法去除细胞培养中的霉菌污染,三者相比较,前者具有明显的优越性:所需实验条件简单,去除霉菌污染彻底、耗时短,能将霉菌污染所造成的对杂交瘤细胞的不良影响降至最低程度。

关键词　细胞培养;低速离心;霉菌污染

中图法分类号　R329-33

## 参考文献

1 司徒镇强,吴军正 主编. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 1996. 85~ 90

2 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学出版社, 1990. 455~ 457

(收稿: 1998-11-27;修回: 1999-03-31)

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net