DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.009

慢性乙型重型病毒性肝炎患者前 S基因变异的观察*

张 瑞** 王海涛*** 顾长海 潘文胜*** (第三军医大学附属西南医院传染病中心)重庆,630038

提 要 目的:探讨慢性乙型重型病毒性肝炎患者前 S_1基因的变异。方法:采用半巢式 PCR从乙肝患者血清中扩增前 S_1基因,克隆于噬菌体 M13mp19,随机挑选9个克隆进行 DNA序列分析。结果:与野生株 HB-Vadr序列相比,所测克隆呈高度异质性,核苷酸差异率 4.7%~31.3%,氨基酸差异率 22.0%~94.0%,无一克隆与野生株序列一致,所测9个克隆中,5个克隆有碱基缺失,其中4个的缺失大于24%,而且缺失在前 S_1基因的后半部分。结论:HBV 前 S_1基因的高度异质性和部分缺失与慢性重型乙型肝炎可能有联系。

关键词 前 S基因;基因突变;肝炎,病毒性

中图法分类号 R512.6

HBV基因变异是当前乙型肝炎研究的热点之一,但基因变异与临床的关系一直未有定论[1,2]。这主要因为 HBV在体内呈"相似株"(Quasispecies)存在,目前的研究大多采用 PCR产物直接测序方法分析一个序列,显然不能代表同时在体内存在的"相似株";其次,研究样本小,难以检测 HBV全序列,而部分序列很难代表全病毒的基因变异。国内限于条件,未见从同一例乙型肝炎病人血清中克隆多个序列的报道。为研究 HBV基因变异与临床关系,我们用半巢式 PCR(Half-nested PCR)从一例临床确诊的慢性重型乙型肝炎病人血清中扩增出 HBV 前 S_1基因,克隆至 M13mp19载体,随机筛选9个克隆测序,发现除了克隆呈高度异质性外,另一显著特征是前 S_1基因的部分缺失。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病人血清

男性42岁,1992年4月入院,血清 HBsAg(+),抗 HBc(+),抗-HBe(+)无 HDV、HCV 重叠感染,按全国《病毒性肝炎防治方案》符合慢性重型肝炎的诊断标准,并经肝穿活检证实。

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 M13mp19购于华美生物工程公司。限制性内切酶 PstⅠ及 KpnⅠ购于 Promaga公司。T4DNA连接酶购于 Boehringer. Mannheim公司。测序药盒为:T7 Sequencing kit购于 U.S.B公司,35S-a-dATP购于 Du Pont公司。Geneclean Ⅱ kit购于 Biolol公司。QIAprep Spin M13 kit为 Qlagen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,离心弃上清;加裂解液(4M异硫氰酸胍,25mM 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℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 1.5min,30循环作首轮扩增;再取首轮扩增产物,以引物 S1、S3在94℃ 1min,64℃ 1min,72℃ 1min条件下扩增35循环。扩增产物以1.5%的琼脂糖电泳,在600bp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[3]提供的标准方法进行。取 M13mp19分别用 PstⅠ、KpnⅠ酶切后,用 GenecleanⅡ kit纯化(按试剂盒说明操作)。PCR扩增 DNA产物也经同样双酶切,经酚、氯仿抽提后,

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270642

** 张 瑞,女,34岁,讲师,主治医师,博士

*** 军事医学科学院微生物流行病研究所 北京,100071

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

用无水乙醇沉淀 DNA,将 DNA溶于水,在 T4DNA连接酶参与下,连接目的基因和 M13mp19,转化于 XL1-Blue菌,在含 IPTG和 X-gal培养皿上培养 8 h,随机挑取 9个白色噬菌斑。在 XYT培养基中,于 37℃培养 8 h,以 QIAprep Spin M13 kit按说明提取单链 DNA 用 T7聚合酶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 Godkeg软件(北京军事医学科学院吴加金编制)将所测序列与 HBV基因库中 HBV DNA序列比较选出同源性最好 HBV adr株作为野生株。

2 结果

2.1 HBV前 S_1基因的变异方式

如表1所示,与野生株 HBV adr前 S_1前300个碱基序列相比,从慢性重型肝炎病人血清中克隆出的9个克隆的核苷酸序列,存以碱基突变常见的三种模式。碱基替代范围为5~ 30个,替代率 1.7%~ 13.0%,平均替代率4.1%;碱基插入2~ 5个,插入率0.7%~ 1.7%,平均插入率0.8%;碱基缺失明显,为5~ 87个,缺失率1.7%~ 29.0%,平均缺失率12.7%。三种突变模式中,缺失最为明显,而且9个克隆中,5个克隆有缺失,其中4个缺失率超过24%,另一值得注意的现象是:9个克隆中的7个在前 S_2基因后半部分不同位置存在的终止密码。

表1 各克隆与 HBV野生株(adr)的前 S_1核苷酸区序列变异方式

Tab 1 Mutant models of the nucleotide sequences of PreS_1 gene in all clones and HBV adr (wild type)

Nucleotide mutation	Clonal number									
	Y7	Y8	Y10	Y9	Y54	Y3	Y4	Y6	Y47	X
Repalce(%)	15	7	7	30	10	5	5	5	5	12.22
	(5.0)	(2.7)	(2.7)	(13.7)	(3.3)	(1.7)	(1.7)	(1.7)	(1.7)	(4.1)
Deletion(%)	6	5	5	6	18	72	72	87	72	38
	(2.0)	(1.7)	(1.7)	(2.0)	(6.0)	(24.0)	(24.0)	(29.0)	(24.0)	(12.7)
Insertion(%)	2	2	2	5	2	2	2	2	3	2.14
	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(1.0)	(0.8)

2.2 克隆间,克隆与野生株之间的核苷酸变异

在分析的9个克隆中,y8与 y10,y3与 y4的核苷酸序列相同,但克隆间的核苷酸差异范围为0~ 110,差异率为0.0%~ 40.7%,因此,克隆仍呈高异质性。与野生株相比,差异范围是15~ 94,差异率4.7%~ 31.3%。9个克隆中没有与野生株序完全一致者。从表2还可看出,克隆间的变异比与野生株的变化大。

表2 各克隆间以及与野生株(adr)前 S_1区核苷酸序列变异

Tab 2 Mutations of the nucleotide sequences of Pre-S_1 gene among clones and HBV adr

	WT	Y7	Y8	Y10	Y9	Y54	Y3	Y4	Y6	Y47
WT	-	7.7	5.0	5.0	16.7	4.7	27.0	27.0	31.3	27.3
Y7	23	-	6.3	6.3	19.3	3.0	26.0	26.0	31.3	27.7
Y8	15	19	-	0.0	15.3	3.7	18.3	18.3	27.7	25.3
Y10	15	19	0	-	15.3	3.7	18.3	18.3	27.7	25.3
Y9	50	58	46	46	-	16.7	36.7	36.7	40.7	35.0
Y54	14	9	11	15	50	-	26.3	26.3	31.0	29.3
Y3	81	78	55	55	110	79	-	0.0	5.7	2.7
Y4	81	78	55	55	110	79	-	0.0	5.7	2.7
Y6	94	94	89	89	122	93	17	17	-	6.0
Y47	82	83	76	76	105	88	8	8	18	-

Down-left: the numbers of mutant nucleotides; up-right: mutant rate; WT: wild type

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

2.3　克隆间,克隆与野生株之间氨基酸的变异

已测的9个克隆均存在缺失和插入突变,因此,氨基酸的差异比核苷酸的差异大得多,见表3.最高变异率竟达94%(Y47和Y4)。克隆与野生株氨基酸序列差异为22.9%～94.0%。充分说明了克隆的高度异质性。在所比较的100个氨基酸中,有4个克隆缺失在24个以上,这可能是慢性重型乙型肝炎病人的一个特征。

表3　各克隆间以及与野生株(adr)前 S_1区氨基酸序列变异

Tab 3　Mutations of the amino acid sequences of Pre-S_1 region among clones and HBV adr

	WT	Y7	Y8	Y10	Y9	Y54	Y3	Y4	Y6	Y47
WT	–	25.0	22.0	22.0	92.0	24.0	49.0	49.0	43.0	94.0
Y7	25	–	6.0	6.0	90.0	24.0	49.0	49.0	56.0	94.0
Y8	22	6	–	0.0	90.0	39.0	47.0	47.0	55.0	92.0
Y10	22	6	0	–	90.0	39.0	47.0	47.0	55.0	92.0
Y9	92	90	90	90	90	–	93.0	90.0	92.0	60.0
Y54	24	24	39	39	88	–	48.0	48.0	41.0	92.0
Y3	49	49	47	47	94	48	–	0.0	0.0	59.0
Y4	49	49	47	47	89	44	80	–	30.0	59.0
Y6	43	56	55	55	92	41	0	30	–	70/0
Y47	94	94	92	92	65	92	59	59	79	–

Down-left: the numbers of mutant amino acids, up-right: the mutant rate.

3　讨论

一般认为,HBV前 S_1基因的完整性可对人体产生合适的免疫反应,是清除 HBV很重要的条件或基础[4,5]。因为前 S_1蛋白不但含有与肝细胞膜结合的位点,也含有诱导宿主产生细胞免疫和体液免疫的抗原位点[6]。最新资料表明[7,8]:在细胞毒性 T细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)所识别的关键性抗原位点的突变,可能导致 HBV变异株的抗原相似于 T细胞受体(T-cell receptor, TCR)的拮抗剂,从而使原来识别野生株的 CTL不能识另 HBV变异株,导致细胞免疫麻痹,使 HBV变异株得以长期存在于宿主体内。本研究报道的9个克隆中,除两对克隆的氨基酸序列一致外,有7种不同的氨基酸排列方式,其抗原的免疫优势位(Immunodominant)可能发生了很大漂移,同时,9个克隆有4个克隆发生了较大部分缺失(>24%),该区域的原抗原位点已经消失,使原来对抗野生株的 CTL和/或抗体丧失攻击目标,从而导致 HBV变异株得以生存。

关于 HBV前 S_1基因的部分缺失与慢性重型乙型肝炎之间的关系,有两点值得讨论。第一,有资料表明[9,10]:在慢性肝炎中,由于 HBV前 S_1基因的突变,导致前 S/S蛋白比例失调,大分子量表面蛋白相对过高使得肝细胞对炎性细胞因子更敏感,造成肝损伤;第二,有研究报道[11,12]:前 S_1基因含有前 S2和 S蛋白合成的启动子,前 S_1区的缺失会导致前 S2和 S蛋白合成下降,造成大分子量表面蛋白相对增高。此结论可以合理解释本研究前 S_1基因的部分缺失为何导致慢性乙型肝炎重型化。但要证明这一观点,尚需加大样本和进行体外试验。

鉴于 HBV基因组突变模式繁多,临床肝炎的表现形式也很复杂,二者之间的关联性更复杂。因此,通过小样本,部分基因分析,显然不能提供结论。作者认为,在研究 HBV变异与临床关系时,应该注意① 要选择临床诊断明确的病例;② 要选择较大样本;③ 要尽可能克隆和分析基因的不同部分;④ 同病例同一基因要分析多个克隆;⑤ 尽量避免 PCR产物直接测序;⑥ 进行体外突变基因的暂时性表达研究,否则容易造成偏性结果。

参考文献

1 Feitelso M A. Biology of hepatitis B virus variants. Lab. Invest, 1994; 3(71): 324

2 骆抗先,候金林,梁炽森.乙型肝炎病毒基因异研究中亟须商榷的几个问题.中华内科杂志, 1995; 34(4): 221

3 Sambrood J, Fritsh H F, Manistis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbar Laboratory, 1989; 225～228

4 Milich D R, McLachlan A, Moriarty T *et al*. A single 10-residue preS(1) peptide can prime T cell help for antibody production to multiple epitopes within the pre-S(1), pre-S(2) and S regions of HBsAg. J. Immunol, 1987; 138(10): 4457

5 Milich D R, Mclachlan A, Chisar F V *et al*. Immune re-

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

sponse to preS(1) region of the hepatitis B surface antigen (HBsAg): A preS(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to pre(S2) and S regions of HBsAg. J Immunol, 1986; 137(1): 315

6 Mabit H, Vons C, Dubanchet S *et al*. Primary cultured normal human hepatocytes for hepatits B virus receptor studies. J Hepatol, 1996; 24(4): 403

7 Bertoletti A, Sette A, Chisa F V *et al*. Is hepatitis B virus smarter than the immune system? Hepatology, 1995; 21(3): 883

8 Kohno H, Inoue T, Tsuda F *et al*. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. J Gen Virol, 1996; 77(8): 1825

9 Chisari F V, Filippi P, Buras J *et al*. Structural and pathological effects of synthesis of hepatits B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. Proc Nat Acad Sci USA, 1987; 84(12): 6990

10 Gilles H N, Guerrette D L, Ulevitch R J *et al*. Hepatitis B surface antigen retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiologic concentrations of gamma interferon. Hepatology, 1992; 16(3): 655

11 Cattaneo R, Will H, Hemandez N *et al*. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. Nature, 1993; 305(5932): 336

12 Masuda M, Yussa T, Yoshikura H *et al*. Effect of the preS1 RNA sequence on the efficiency of the hepatitis B virus preS2 and S protein translation. Virology, 1990; 174(1): 320

(收稿: 1996-12-30;修回: 1997-04-20)
(编辑 沈锡庚、王 红)

Observation on the preS1 gene mutation in patient with chronic severe hepatitis B*

Zhang Rui, Wang Haitao**, Gu Changhai, Pan Wensheng** (Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: The mutation of PreS1 gene in the patient with chronic severe hepatitis B was investigated. Methods: The preS1 gene was amplified from the serum of a patient with chronic severe hepatits B by half nested PCR. The PCR product was cloned into M13mp19 vector for DNA sequencing. Nine clones were sequenced. Results: showed that① compared with wild-type HBV adr, the nucleotide mutation rates were 4.7% ~ 31.3%, the difference rates of amino acids were 22.0% ~ 94.0%, no clone had entirely identical sequence with HBV adr, confirming the quasispecies of preS1 gene in this patient; ② 5 out 9 clones sequenced had base deletion, the deletion rate was more than 24% in 4 clones, moreover, the deletion located majorly at c-terminal of preS1 gene. Conclusion: The possible correlation of chronic severe hepatitis B to extremely heterogenous preS1 gene was present.

Key words PreS1 gene; gene mutation; chronic severe hepatitis B

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

** The Academy of Military Medical Sciences, P. L. A. Beijing, 100850

书 讯

《医学英语术语构词》

医学专科术语众多,是阅读英语医学专业书籍的最大难点。本书作者参阅了大量的英语医学书刊,对医学术语进行了分析、比较,归纳出英语构词的规律,为扩大词汇量创造了条件。本书由四川科学技术出版社于1997年8月出版,统一书号 ISBN 7-5364-3556-8/R 767,每本定价24元。欲购者请与本刊刘鹏先生联系。

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