

一例中国重型肝炎病人乙型肝炎病毒基因组全序列的测定*

侯金林 郭亚兵 骆抗先 王战会 梁焯采

(第一军医大学南方医院, 广州 510515)

R512.602
R393.21

A 摘要 用聚合酶链反应(PCR)产物直接和克隆后序列分析,测定1例重型肝炎病人感染的HBV变异毒株全基因组序列,该毒株长3221个碱基,为adw亚型,与同一地区HBsAg阳性无症状携带者感染的adw亚型全序列比较,有35个罕见和独特的核苷酸改变,导致27个氨基酸替代,其中前C和C基因变异最多,这一毒株在多种调节序列,包括启动子SPI、SPII、XP、增强子ENI和ENII,也存在变异。但并无日本毒株的X区和ENHII-CP的聚集变异。结果说明我国重肝HBV毒株有独特的变异特点。

关键词 重型肝炎,乙型肝炎病毒,病毒变异

基因组,全序列测定

近来通过对HBV变异株的研究,对乙型肝炎发病机理产生了新的认识。70和80年代认为免疫占主导地位,目前认为HBV感染后的多种临床现象和血清学特征均与病毒基因变异有关^[1,2]。以重型肝炎为例,一般认为是由于机体免疫对急性感染的过强应答^[1,2],然而,在南欧和中东发现其发生和发展可能与HBV的前C基因变异有关,HBV变异后不能合成HBeAg,从而导致细胞毒T细胞集中攻击肝内表达的靶抗原HBcAg,肝细胞大块溶解坏死^[3,4]。但是,有相当部分重肝病人HBV前C区并未出现此种变异,而且在一些非重肝病例中也发现感染此变异株^[5],因此,重肝病人HBV分子病毒学特征可能更为复杂。我们最近完成1例重型肝炎病人HBV毒株全序列测定,现报道如下:

材料与amp;方法

1 血清来源

病人男性,32岁,亚急性重型肝炎,HBsAg(+),HBeAg(-),抗HBc(+),HBV DNA斑点杂交法阳性。患者血清抗-HCV和HCV RNA均阴性。

HBeAg和HBeAg阳性慢性无症状HBV携带者1例,临床观察已一年以上,无肝病症状和体征,血清丙氨酸转移酶正常。

2 菌种、质粒、工具酶和其它试剂

大肠杆菌JM101, JM105, T₄ DNA连接酶购于BRL公司, EcoRI, PstI, SmaI和NcoI等工具酶购自Boehringer Mannheim公司, 测序试剂食用USB生产的Sequenase Version 2.0和Promega公司的fmel试剂盒,³⁵S-dATP和 γ -³²P-dATP购于Amersham公司。

收稿日期:1996-09-28, 修回日期:1997-01-30

* 国家和广东省自然科学基金资助课题

3 血清 HBV DNA 的抽提和扩增^[6,7]

血清和蒸馏水各 50 μ L 混匀稀释后,加入 100 μ L 裂解液(25 mmol/L 醋酸胺,2.5 mmol/L EDTA,1% SDS,2 mg/mL 蛋白酶 K)和 10 μ g/mL tRNA 载体,68 $^{\circ}$ C 消化 2 h 后,常规苯酚和氯仿法抽提。

4 DNA 序列分析^[8]

用引物 M3 (5'-CTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATT-3',1730~1754)和 3C (5'-CTAACATTGAGATTCCCAGAGA-3',2460~2439)各 50 pmol/L 扩增得到 HBV 前 C/C 基因片段。电泳纯化后,PCR 产物被插入 pUC19 的 SamI 位点,克隆后选择数个克隆测序。测序用 PC1 (5'-GCACCATGCAACTT-3',1811~1824)、4C (5'-GTGGTTTCACATTTCTTG-3',2206~2222)、BC1 (5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA-3',1974~1955)、1C (5'-CTCTGGATCCTGGATCTT-3',2149~2133)、2C (5'-CTCTGGATCCTGGATCCTT-3',2149~2133)和 3C 引物。

用另 3 对互相重叠的引物扩增除前 C/C 外的 HBV 全基因^[6];扩增 HBV 核苷酸 2200~428 片段用外引物 4C 和 POL4 (5'-AGGCATAGCAGCAGG-3',428~414),内引物 4CB (B 指生物素化引物)和 POL11 (5'-CCACTGCATGGCCTGAGG-3',3192~3107)及 POS' (5'-TGCGGGTCACCATAT-3',2818~2833)和 S2B (5'-GGCCAAGACACACGGGTGAT-3',290~310);扩增片段 157~1395 用外引物 S1 (5'-ATGGAGAA-CATCACATCAGGA-3',157~177)和 POL3 (5'-AAGGATCCAGTTGGC-3',1409~1395),内引物 S1B 和 POL2 (5'-ACGGGGTAAAGGTTT-3',1138~1152),扩增片段 781~1957,用外引物 POL6 (5'-GT-GAGTCCCTTTATACCG-3',781~798)和 BC1,内引物 POL10B (5'-GGTCTTTTGGGCTTTGC-3',1004~1021)BC1,合成引物时将其中的引物 S1B、S2B 和 POL10B 的 5' 端连接生物素,扩增的 PCR 产物通过生物素和亲和素间特殊的结合力与磁性珠结合,磁架捕捉磁性珠,弃去液相,碱变性后分离正链和互补链,然后分别测序。另外合成测序内引物 BCS3 (5'-GGCACTAGTAAACTGAGCCA-3',687~660)、POL1 (5'-GCAAAGTTCCCCAACTTC-3',912~895)、POL5 (5'-CAATCGGCAGTCAGG-3',3125~3139)、POL7 (5'-AAGATTGTCCTCCCATGCC-3',2868~2882)、POL8 (5'-AGGATAGAATCTAGCAGGC-3',2665~2647)和 POL12 (5'-ACGGGGTAAAGGTTT-3',2988~3009)。

结 果

1 HBeAg 阳性携带者全序列

为 adw 亚型,全序列与发表的 6 株同一亚型 adw 比较(9-13),有 13 个核苷酸(NT)改变,导致 12 个氨基酸(AA)替代。

2 重型肝炎病人感染毒株全基因组序列

该变异株全序列为 3221 个碱基,为 adw 亚型,我们将该变异株与同时得到的野株、发表的 HBV 全序列及国外重肝病例感染的毒株进行了比较,变异特点按前报告标准判定^[14]。常见变异:NT 和 AA 改变出现于 2 株以上发表的 HBV 全序列;罕见变异:NT 和 AA 改变仅出现于 1 株发表的 HBV 全序列;独特变异:NT 和 AA 改变不出现在任何发表的 HBV 全序列。判定为罕见和独特变异的进一步与已发表的重肝序列比较。根据上述判定标准,发现中国重肝毒株有 35 个罕见和独特 NT 变异,导致 27 个氨基酸替代(表 1);与国外报告的重肝毒株比较,有 3 处变异点相同,即:前 C 区 28 位密码子的 TAG 变异,C 区密码子 97 由异亮氨酸变为亮氨酸,S 区密码子 49 由亮氨酸变为脯氨酸。

表 1 一例中国重肝 HBV 毒株 4 个开放读架氨基酸序列变异情况

Table 1 Amino acid sequence variations in a patient with fulminant hepatitis in the 4 open reading frames of the virus

| Codon | PRE-CORE | | CORE | | | | | | PRE-S | | | S | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------|----------------|----------------|----------|----------|----------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 28 | 29 | 80 | 84 | 97 | 113 | 130 | 146 | 147 | 180 | 181 | 108 | 128 | 134 | 11 | 21 | 47 | 49 | 96 | 110 | 164 | 210 | 218 | 220 |
| HBeAg(+) control | W | G | A | L | I | E | P | T | T | E | S | L | H | P | P | L | V | L | V | I | E | S | I | P |
| Fulminant Patient | # | - | - | <u>L</u> | - | <u>T</u> | <u>N</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>S</u> | - | <u>P</u> | <u>L</u> | <u>S</u> | <u>H</u> | <u>S</u> * | <u>A</u> | <u>P</u> | - | <u>T</u> | <u>G</u> | <u>R</u> | <u>I</u> | - |
| Reported case ¹ | # | D [#] | T ¹ | <u>A</u> | <u>L</u> | D [#] | T [#] | - | - | - | <u>P</u> | - | - | - | - | - | T | P | <u>A</u> | <u>L</u> | - | - | - | <u>L</u> |

| Codon | X | | | | | POLYMERASE | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 5 | 42 | 94 | 127 | 130 | 131 | 11 | 45 | 49 | 50 | 81 | 137 | 139 | 286 | 314 | 321 | 464 | 508 | 565 | 575 | 671 |
| HBeAg(+) control | L | F | H | I | K | V | L | N | S | I | D | V | N | Y | S | L | N | I | S | L | P |
| Fulminant Patient | Y | - | - | - | - | - | <u>M</u> | <u>D</u> | - | - | <u>S</u> | <u>I</u> | <u>D</u> | - | <u>P</u> | <u>P</u> | <u>H</u> | - | <u>A</u> | - | - |
| Reported case ¹ | M [#] | S [#] | Y [#] | <u>L</u> | M [#] | I [#] | - | - | <u>N</u> | <u>V</u> | N | A | - | <u>N</u> | - | P | T | <u>V</u> | - | <u>V</u> | <u>S</u> |

Unique amino-acids are in bold and underlined. * Codon 28 and 29 mutations. Rare nucleotides.

¹ Amino-acid changes in comparison with wild type but common in pre-core variants.

[#] As reported by Ogata *et al.*, 1993.

HBV 的 4 个 ORF 的氨基酸序列比较见表 1, 仅将罕见和独特变异的氨基酸列出, 变异较多区段为前 C/C 和 X 区, 而 P 区和前 S/S 区较少, 与国外报告比较发现, C 基因变异因不同地区的毒株而异, 特别是密码子 84~97 远东毒株有明显的异质性, 密码子 84 在 adr 重肝毒株由亮氨酸变为丙氨酸, 本研究的重肝毒株密码子 97 由异亮氨酸变为亮氨酸。X 基因密码子 126~132 变异, 与 EnhII-CP 重叠, 见于日本重肝毒株, 中国毒株变异率低。

对调节序列的分析表明(表 2): 在中国重肝毒株, EnhI-XP, EnhII-CP, Epsilon, SPI 和 SPII 分别有 1、2、3、2 和 0 个 NT 替代, 包括 1898 变异在内, Epsilon 是变异多的部位, 但并无聚集倾向, 与日本毒株在 EnhII-CP 的 NT1753-1770 变异较多不同^[6,14], 中国这一毒株在此小区段无变异。

表 2 一例中国重肝 HBV 毒株调节序列变异情况

Table 2 Nucleotide sequence variation in a patient with fulminant hepatitis in the 5 cis-acting regulatory elements of the virus

| Position | ENHI-XP | | ENHII-CP | | | | | | EPSILON | | | | SPI | | | | SPII | | |
|----------------------------|----------|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------------|----------|------|----------|
| | 1104 | 1220 | 1634 | 1639 | 1729 | 1753 | 1754 | 1764 | 1766 | 1898 | 1901 | 1917 | 1944 | 1971 | 2717 | 2723 | 2734 | 2797 | 3164 |
| HBeAg(+) control | C | T | A | C | T | G | A | A | G | G | G | G | C | G | A | C | A | - | T |
| Fulminant Patient | - | <u>A</u> | G [#] | - | <u>C</u> | - | - | - | - | A [#] | - | - | <u>A</u> | <u>T</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | - | - | - |
| Reported case ¹ | <u>T</u> | - | C | <u>G</u> | G [#] | <u>A</u> | <u>C</u> | T ¹ | A ¹ | A [#] | A [#] | <u>A</u> | - | - | - | T [#] | <u>C</u> | - | <u>A</u> |

Unique nucleotides are in bold and underlined. * Rare nucleotides.

¹ Nucleotide changes in comparison with wild type but common in pre-core variants. [#] 1898 stop codon and 1901 mutations.

¹ As reported by Ogata *et al.*, 1993.

讨 论

世界各地先后报告发现前 C 变异株可经配偶间的性传播、医院内传播和母婴间的垂直传

播引起易感者的暴发性肝炎。但在法国和美国的研究与上述结果并不一致,并不是所有的重肝病人 HBV 前 C 区出现此种变异。因此,重肝病人 HBV 分子病毒学特征可能更为复杂,已有 HBV 前 C 区的其它变异或前 C 区以外的变异也起重要作用的报道^[8,13]。我们在中国重型乙型肝炎病人中发现了一种新的 HBV 变异株^[8]:前 C 信号肽变异株,变异的结果是 HBeAg 前体不能被信号酶裂解,血清中缺 HBeAg,临床上可表现为重型肝炎或慢性肝炎急性加重。从日本重型肝炎分离出的 HBV 毒株,发现在 Enh II - CP 有一聚集变异区域(NT 1753 ~ 1770),导致 X 基因产物(AA126 ~ 132)替代,这些变异可能对病毒的生物学特性有较大的影响^[6,14]。一般认为,C 基因编码的 HBeAg 是细胞毒 T 细胞(CTL)攻击的靶抗原,C 基因上 T 细胞、B 细胞和 CTL 表位是变异多发部位。本研究中分析了重型肝炎病人感染的 HBV 毒株的变异特点,发现本毒株变异较多的区段为前 C/C 和 X 区,与国外报告比较发现,C 基因变异因不同地区的毒株而异,特别是密码子 84 ~ 97 远东毒株有明显的异质性,密码子 84 在 adr 重肝毒株亮氨酸变为丙氨酸,本研究的重肝毒株密码子 97 异亮氨酸变为亮氨酸。在日本重肝毒株^[14],发现在 Enh II - CP 有一聚集变异区域(NT 1753 ~ 1770),尤其是 NT 1764 位 A 变 T 和 1766 位 G 变 A 常见(与日本文献报告的 NT 命名起始位点不同,差 2 个 NT),在这一中国毒株中未发现此种变异,可能该部位的基因变异随不同的地区的毒株而异^[15]。

致谢 部分工作在英国伦敦大学 St. Mary's 医学院完成,对 HC Thomas 教授和 P. Karayiannis 博士的指导表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Foster GR, Thomas HC. Recent advances in the molecular biology of hepatitis B virus; mutant virus and the host response. *Gut*, 1993;34:1
- 2 Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet*, 1993,342:1335
- 3 Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S *et al.* Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology*, 1991,14:319
- 4 Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N *et al.* A hepatitis B virus variant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *New Eng J Med*, 1991,324:1705
- 5 骆抗先,侯金林. Hot spots for genetic mutation in hepatitis B virus in Chinese patients and its clinical significance. *Chinese Medical Journal*, 1996,109:99
- 6 Karayiannis P, Alexopoulou A, Hadziyannis S *et al.* Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus e antigen - negative infection: importance of host factors. *Hepatology*, 1995,22:1628
- 7 侯金林, Karayiannis P, Waters J *et al.* A unique insertion in the S gene of Chinese HBsAg negative hepatitis B virus carriers. *Hepatology*, 1995,21:273
- 8 侯金林,骆抗先,章康等. HBeAg 阴性重症肝衰竭病人前 C 基因信号酶位点变异. *中华内科杂志*, 1995,34:735
- 9 Ecstasio RC, Chavez CC, Okamoto H *et al.* Nucleotide sequence of a hepatitis B virus genome of subtype adw isolated from a Philippino comparison with the reported three genomes of the same subtype. *J Gastroenterol Hepatol*, 1988,3:215
- 10 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H *et al.* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988,69:2575
- 11 Ono Y, Onda H, Sasada R *et al.* The complete nucleotide sequence of the cloned DNA of hepatitis B virus subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res*, 1987,281:646 ~ 650

- 12 Rivkina NB, Lumin VG, Mahov AM *et al.* Nucleotide sequence of integrated hepatitis B virus DNA and human flanking regions in the genome of the PLC/PRF/5 cell line. *Gene*, 1988, 64:285
- 13 Satrosoewignjo RI, Omi S, Okamoto H *et al.* The complete nucleotide sequence of HBV DNA clone of subtype adw (pWND122) from Manado in Sulawesi Island, Indonesia. *ICMR Ann*, 1987, 7:51
- 14 Ogata N, Miller RH, Ishak KG *et al.* The complete nucleotide sequence of a precore mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in Chimpanzees. *Virology*, 1993, 194:263
- 15 Sternik M, Gonther S, Santantonio T *et al.* Hepatitis B virus genomes of patients with fulminant hepatitis do not share a specific mutation. *Hepatology*, 1996, 24:300~306

Complete Sequence of Genome of Hepatitis B Virus Precore Stop Codon Variant Isolated from a Chinese Patient with Fulminant Hepatitis

Hou Jinglin Guo Yabing Wang Zhanghui *et al*

(Nanfang Hospital, The First Medical College of PLA, Guangzhou 510515)

The sequence of entire hepatitis B virus (HBV) genome from one Chinese patient with fulminant hepatitis and also from a hepatitis B e antigen (HBeAg) positive carrier from the same region was determined using direct sequencing of amplified viral DNA. The fulminant case was infected with the precore stop codon variant. Compared the sequence from this fulminant case with sequences from fulminant isolate previously reported and also from HBeAg positive carrier from the same region, the results showed significant genetic variations throughout the HBV genome in the precore stop variant sequence and less in the wild type. The increase of variability in the core region in fulminant cases in the Far East origin was found; codon 84~97 showing high rates of changes. A clustered mutations previously described in the X region (126~132) in sequences reported in Japanese patients and encompassing the enhancer II - core promoter region were not found in the isolate. This study firstly characterized a Chinese fulminant isolate which has some rare and unique changes compared with previously reported isolate from fulminant case.

Key words Hepatitis B virus, Variation, Genetics, Fulminant hepatitis