维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中 国 病 毒 学 Vol.13 No.3
1998年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1998

214.22.1 R512.65

丙型肝炎病毒高变区基因变异特点初探*

潘文胜 王海涛 汪 涛 郭华章

(军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

骆抗先

(南方医院传染科,广州 510515)

摘 要 对两例HCV RNA持续阳性者分三个时间点随访五年,测定了HCV的高变区基因序列,每个时间点平均测定28个克隆,总共测定了168个克隆。研究发现HCV高变区基因变异有五个明显特点:(1)变异程度大,高变区至少有89%的核苷酸位点都可能发生变异;(2)变异形式多样,除常见的替代突变外,缺失突变(缺失1、2或3个核苷酸)的克隆数占总克隆数的22.5%;(3)优势克隆明显,即有若干个克隆高变区的核苷酸和氨基酸序列相同;(4)类似株现象严重;(5)变异幅度大。该研究说明HCV高变区基因变异具有高度复杂多样性。

关键词 丙型肝炎病毒,高变区,基因变异

1991年美国Chiron公司的Weiner等通过对丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)序列的比较分析发现在HCV外膜蛋白E2的N起始端,即HCV氨基酸的第384～411位存在一个高变部位,并称之为高变区(hypervariable region, HVR)。HVR共有81个核苷酸,占HCV全基因的0.8%,而其变异核苷酸占HCV全部变异核苷酸的4%左右,占氨基酸变异的5%,并且HVR两侧的核苷酸和糖基化位点总是相对保守的。研究还发现HVR具有中和性抗原决定簇[1-3],是疫苗的有效靶位。但其相应抗体保护性无一例外都非常局限,它不能保护不同型别的HCV感染,甚至对同一个体中不同的克隆株都缺乏保护性[3-5]。HVR抗体的单一保护性源于HVR的变异。HVR以其快速的变异逃避免疫系统的监视,造成持续性感染。所以弄清HVR变异的特点是目前HCV疫苗研制急待解决的问题之一。

目前已有许多HVR变异的研究,但均存在许多不足。其一是横断面的资料比较多[6],这只能说明HVR变异的多样性;其二是HVR变异的动态研究,即连续观察不同时间点的变异,存在单个时间点克隆数少[6-8](10个克隆左右)和时间较短[7,9]等不足。

本研究的目的旨在对HVR变异的特点进行初步探索。我们选择了2例HCV携带者,分三个时间点连续观察5年,平均每个时间点测定28个克隆,对总共168个克隆的变异位点、插入和缺失突变、类似株(quasispecies)的多样性和同源性等进行了统计分析,期望能有所发现。

收稿日期:1997-09-22,修回日期:1998-01-04

* 国家自然科学基金重点资助项目(项目编号:39630020)

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料与方法

1　血清标本

两例代号分别为 94－1 和 29－1 的丙型肝炎感染者系列血清分别于 1991 年 10 月、1994 年 6 月和 1996 年 10 月采自河北省固安县某自然村，他们均因献血感染了 HCV，1991 年后未再输血。其血清经 5′非编码区 PCR 扩增证实为 HCV RNA 阳性。这两例 HCV 感染者的乙型肝炎病毒(HBV)PCR 检测呈阴性。

2　主要试剂

克隆载体 M13mp18 及有关酶购自华美生物工程公司，测序试剂盒购自美国 USB 公司，M13 单链提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。^{35}S－dATP 为美国杜邦公司产品。

3　引物

根据已经发表的 26 条 HCV 全长基因序列和部分 HVR 序列设计引物如下，引物位置参照国内第一株 HCV Ⅱ型全基因序列[10]。

外引物：　3 号(1403～1426)　　正链 5′－GCCTTGCCTACTATTCC(T/A)TGGTGG－3′

　　5 号(1841～1861)　　负链 5′－GGGTGAAACAA(C/T)ACACTGGAC－3′

内引物：　25 号(1456～1477)　　正链 5′－TAGAATTCCTCGAG(C/T)T(A/G)CT(C/T)T T(C/T)GC(C/T)GGCG T(T/C)GA(T/C)G－3′

　　26 号(1563～1585)　　负链 5′－GCGAATTCACTAGT(A/G)CC(A/G)TTGGT (A/G)TT(T/C/G)AT(A/G/C)AG(C/T)TGG－3′

4　HCV RNA 提取及 cDNA 合成与 PCR 扩增

HCV RNA 提取采用经典的聚乙二醇沉淀、异硫氰酸胍裂解法[11,12]。cDNA 合成：随机引物 100 ng、AMV 反转录酶 7.5 u、2.5 mmol/L dNTP 8 μL，反应总体积 20 μL，42 ℃ 水浴 1 h。两轮 PCR 扩增条件相同：2.5 mmol/L dNTP 3 μL、引物(浓度均为 50 ng/μL)各 1.5 μL、Taq 酶 3 u、反应体积为 50 μL。95 ℃ 预变性 2 min 后，94 ℃ 1 min、55 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min，35 个循环，再于 72 ℃ 延伸 10 min。取第二轮 PCR 产物 10 μL，用 1% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

5　PCR 产物的克隆测序

大量扩增 HVR 片段，经酚、氯仿抽提沉淀后，EcoRI 酶切、低溶点琼脂糖回收备用。载体 M13mp18 也经 EcoRI 酶切、去磷酸化后回收，与 HVR 片段连接、转化 XL1－blue 细菌，挑选无色噬斑，经 PCR 鉴定阳性克隆，用试剂盒提取单链。按 USB 公司序列分析试剂盒说明书进行序列测定。

6　序列分析

采用军事医学科学院编制的 Goldkey 软件。

结　　果

1　HVR 核苷酸序列比较

HVR 的 PCR 扩增片段长度为 153 bp，以下只列出高变区序列，共 81 bp。结果见图 1。

2　HVR 基因变异位点统计

从图 1 可看出 HVR 核苷酸的许多位点发生了变异，总结其特点有：(1)在所测的 168 个克隆中，共有 38 个克隆分别有 1 个、2 个或 3 个核苷酸的缺失突变，占 22.62%；(2)错义突变位点均明显多于同义突变位点，结果见表 1；(3)核苷酸位点突变率为 88.88%；(4)同一时间点存在一个或几个优势克隆，即有若干个克隆 HVR 的核苷酸和氨基酸序列相同。有些时间点有几个优势克隆，有些时间点只有一个优势克隆。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 研究对象HVR基因变异位点统计

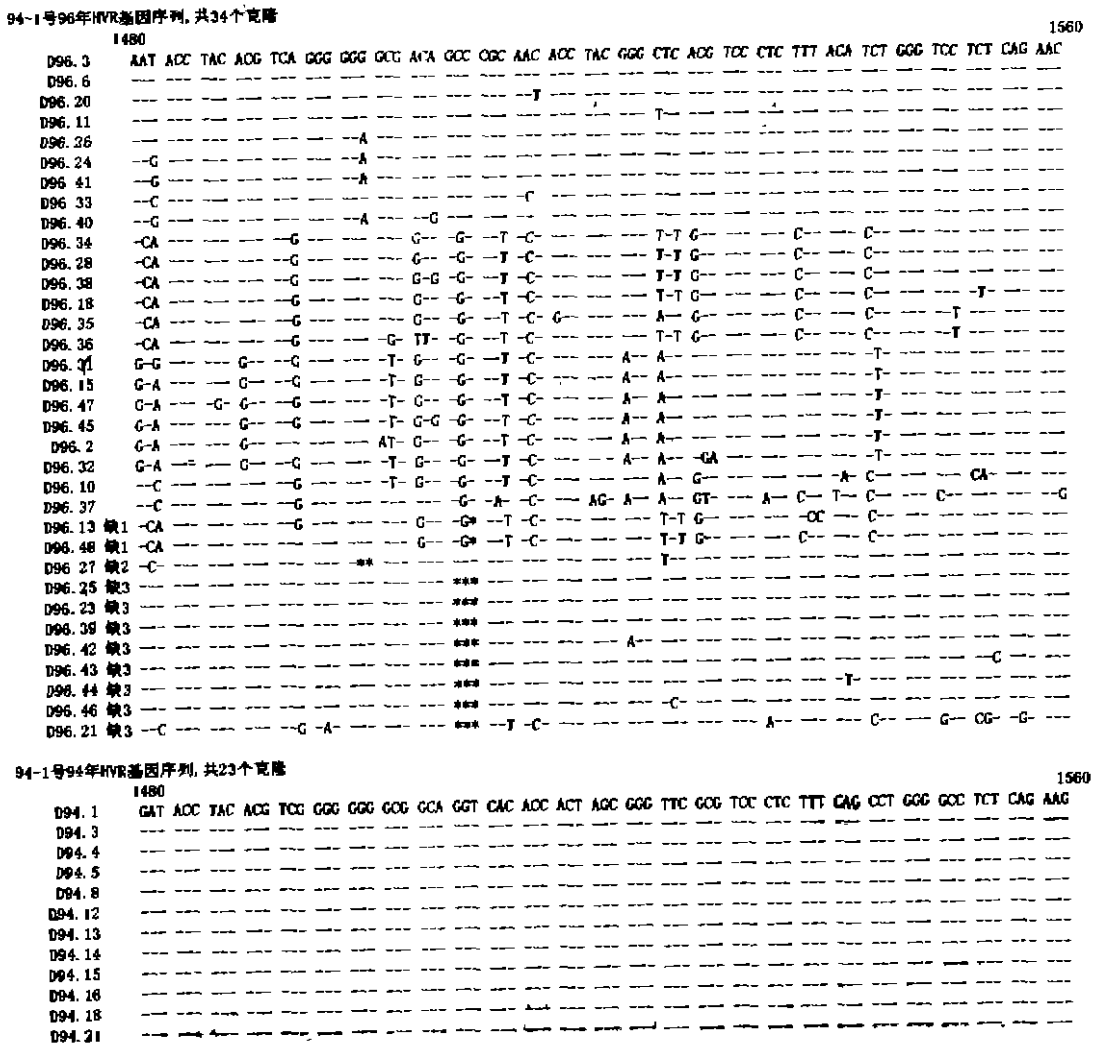
Table 1 HVR gene mutations of the samples

血清 Sera	总位点 Total sites	总突变位点 Total mutations		错义突变位点 Missense mutations		同义突变位点 Samesense mutation		克隆数 Clones
		数量 Numbers	百分率 %	数量 Numbers	百分率 %	数量 Numbers	百分率 %	
94-1	81	59	72.84	49	60.49	10	12.34	85
29-1	81	51	62.96	36	44.44	15	18.52	83
小计 Total	81	72	88.88	59	72.84	13	16.04	168

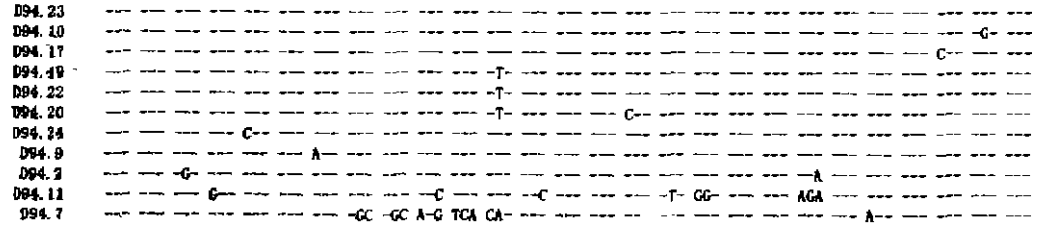
3 类似株分析

3.1 HVR变异的多样性

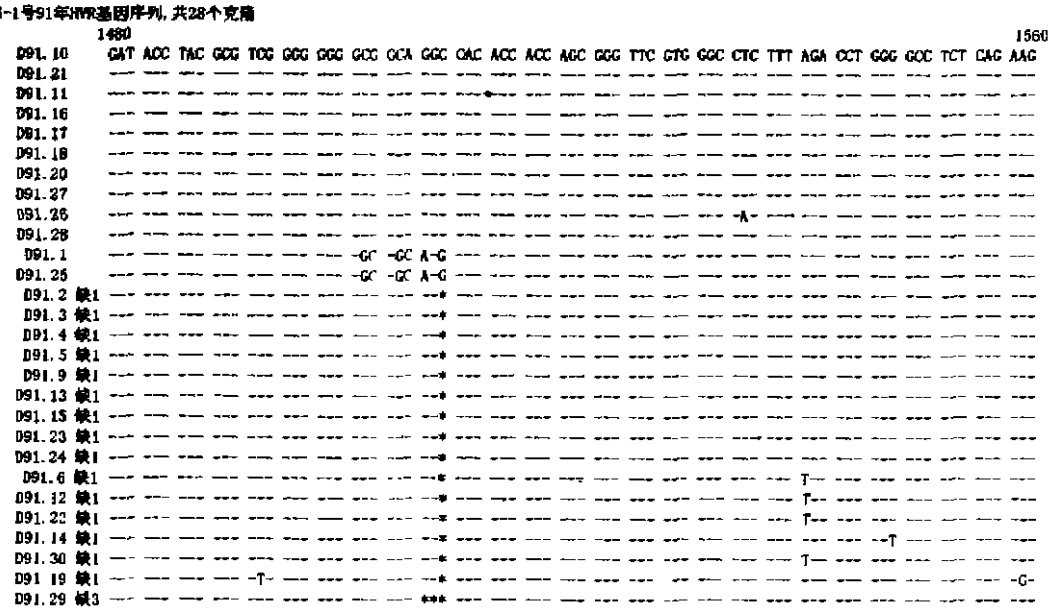
所测的各个时间点由不同的克隆组成，它反映了体内HVR基因的变异多样性，这些亲缘



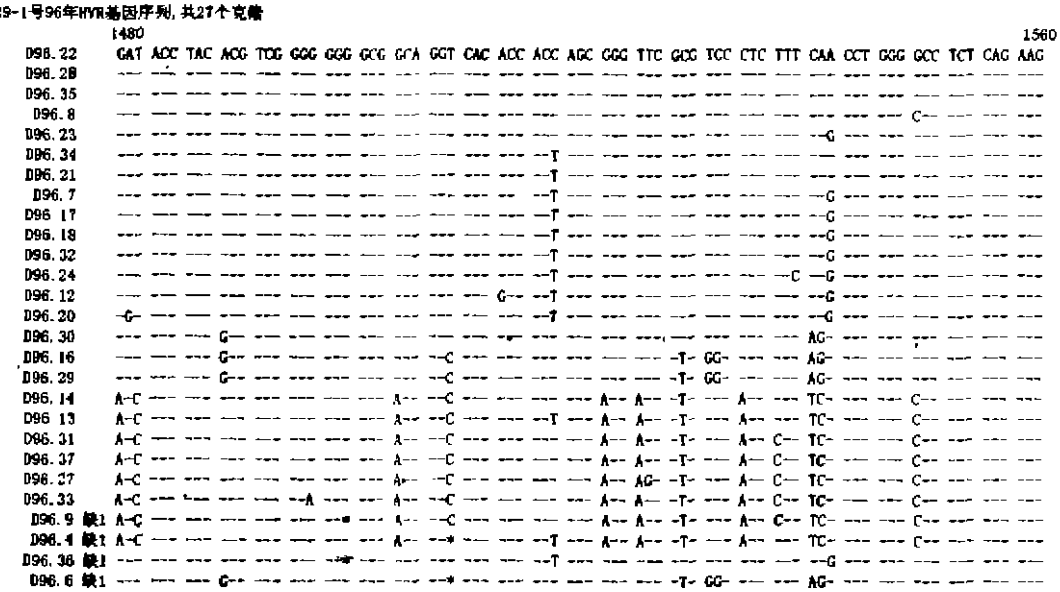
维普资讯 http://www.cqvip.com



94-1号91年HVR基因序列,共28个克隆



29-1号96年HVR基因序列,共27个克隆



维普资讯 http://www.cqvip.com

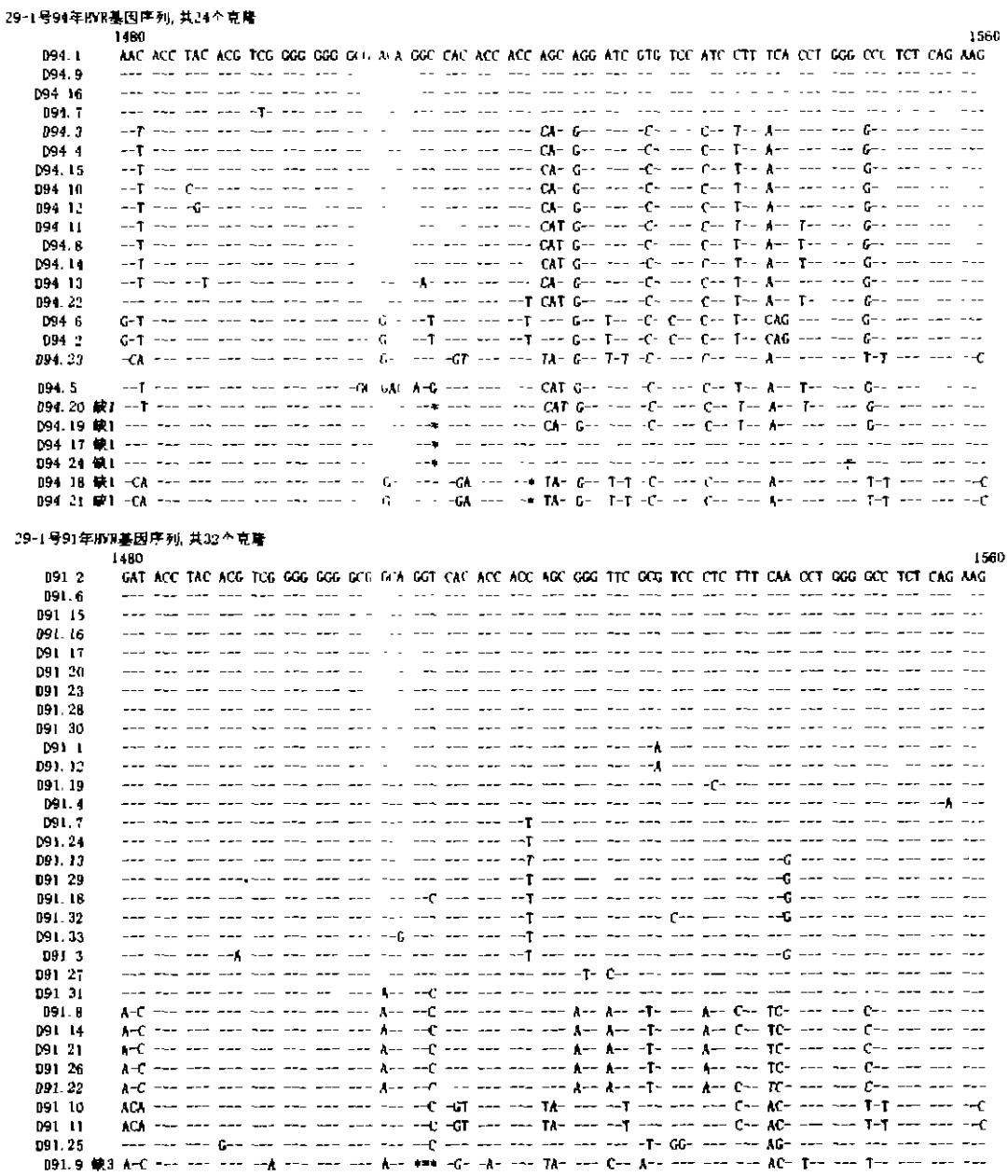


图 1 所测 168 条 HVR 基因核苷酸序列排列方阵("*"代表缺失)

Fig 1 All 168 sequences of HCV in this study ("*"represents deletion)

关系相近、存在于同一时间点的不同核苷酸组成的克隆，我们称为类似株(quasispecies，简称 Quas.)。类似株的多少直接反映 HVR 变异的多样性。统计每个时间点的类似株数量见表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　各时间点类似株数量

Table 2　Quasispecies of HVR in each time point

血清 Sera	1991 年 1991			1994 年 1994			1996 年 1996		
	类似株 Quas	总克隆数 Total clones	百分率 %	类似株 Quas.	总克隆数 Total clones	百分率 %	类似株 Quas.	总克隆数 Total clones	百分率 %
94-1	8	28	28.57	10	23	43 48	29	34	85.29
29-1	17	32	53 12	16	24	66.67	18	27	66.67

从表 2 可以看出，单个时间点的所有克隆中，至少有 28.57％～87.50％的克隆均不相同，由此可见 HVR 变异的多样性。94-1 号类似株百分率从 1991 年到 1996 年呈直线式上升。29-1 号类似株百分率升高趋势不明显。

3.2　HVR 变异的严重性

为了反映 HVR 变异的程度，我们对每例感染者各时间点之间的相同类似株和相同克隆数进行比较，结果见表 3。

表 3　各时间点之间相同类似株和相同克隆数量比较

Table 3　Identical quasispecies and clones among three time points

时间 Time	血清(Serum) 94-1				血清(Serum) 29-1			
	类似株 Quas	相同类似株 Identical Quas	克隆总数 Clones	相同克隆数 Identical clones	类似株 Quas.	相同类似株 Identical Quas	克隆总数 Clones	相同克隆数 Identical clones
1991:1994	8:10	1	28 23	1	17 16	3	32 24	5
1991:1996	8:29	0	28:34	0	17:18	5	32:27	9
1994:1996	10.29	0	23:34	0	16.18	0	24.27	0

从 94-1 来看，三个时间点之间只有 1991 年和 1994 年之间有一个克隆相同，其余均不相同，可见随着时间的变化，HVR 变异的幅度非常大。

讨　论

本研究选择了两例 HCV 持续感染者，分三个时间点，连续观察体内 HCV 高变区在 5 年内的变异情况。采用直接测序方法而不是采用单链构象多态性[6,8,13]或异源双链构型[14]等方法，测序模板采用单个克隆而不是 PCR 产物，采用单链而不是双链，故结果直接、可靠。每个时间点均采用多个克隆的分析方法(平均每个时间点 28 个克隆)，避免了以往的研究中因克隆数少带来的偏倚。

本研究发现 HVR 至少有 89％的核苷酸位点都可能发生变异，而在以前的研究中，由于受克隆数量的限制，没有发现如此高的变异率，可见，HVR 的基因变异比人们预想的还要大。

对类似株的分析发现，平均每个时间点约有 50％的克隆均不相同，充分显示了类似株在 HVR 乃至整个 RNA 病毒研究中的重要地位。而在以前的研究中，不管是克隆表达还是序列分析等，对此现象往往重视不够。另外，94-1 号类似株占总克隆的百分率，从 1991 年的 28.57％上升到 1994 年的 43.48％，到 1996 年增加至 85.29％，说明随 HCV 感染慢性化病程的延长，类似株的数量呈直线式上升，类似株的数量与慢性化病程是否有关，值得深入研究。

HVR 的变异具有幅度大的特点。94-1 号和 29-1 号从 1994 年至 1996 年的 23～34 个克隆中，竟没有一个克隆相同。高变区如此快的变异显然不是自然突变的结果，而可能是受到体

维普资讯 http://www.cqvip.com

内的免疫压力造成的。所以有必要进一步弄清高变区基因变异的规律，为今后疫苗的研制打下基础。

在所测的168个克隆中，共有38个克隆分别有1、2或3个核苷酸缺失突变，占22.62%。我们认为缺失突变可能是HVR变异的一个普遍现象，单纯的替换突变显然满足不了HVR逃避免疫的要求，以前没有发现的一个主要原因是扩增HVR引物较单一[6,8]。我们根据已经发表的6个型别的26条HCV基因序列和其它HVR序列，设计了含有15个简并位点的引物，推想能对所有类似株最大限度地扩增。

本研究采用的方法是PCR产物克隆测序，由于PCR所用的Taq酶缺乏矫正功能，大约有0.25%的错配率，故平均每5个克隆中有1个突变位点是由于PCR过程中错配造成的，这显然不会影响本研究的结论。

参 考 文 献

1 Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A *et al*. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. J Virol, 1994, 68:1494－1500

2 Farci P, Shimoda A, Wong D *et al*. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariale region 1 of the envelope 2 protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:15394－15399

3 Kato N, Sekiya H, Dotsugama Y *et al*. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein of hepatitis C virus. J Virol, 1993, 67:3923－3920

4 Rosa D, Campagnoli S, Moretto C *et al*. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93:1759－1763

5 Yoohko K, Shimizu, Hiroko Igarashi *et al*. A hyperinumune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral in cell culture. Virology, 1996, 223:409－412

6 Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y *et al*. Fluctuation of hepatiits C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single－strand conformation polymorphism analysis. J Med Virol, 1994, 75:1361－1369

7 Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M *et al* Sequential change of the hyperariable region of the hepatitis C virus genome in acute infection. J Med Virol, 1994, 42:103－108

8 Kurosaki M, Enomoto N, Marumo F *et al*. Evolution and selection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. Virology, 1994, 205:161－169

9 Scarselli E, Cerino A, Esposito G *et al*. Occurrence of antibodies reactive wit more than one variant of the putative envelope glycoprotein hypervariable regionl viremic hepatitis C virus-infection patients. J. Virol, 1995, 69:4407－4412

10 毕胜利，白宪鹤，从勉尔等 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异．病毒学报，1993，9(2)：114－127

11 Chomezynski P, Sacchi N. Single step metbod of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162:156－159

12 Zonoro A, Puoti M, Fiordalisi G *et al*. Detection of serum hepatitis C virus RNA in actue Non-a, Non-b hepatitis. J Infe Dis, 1991:163:923－924

13 Yuki N, Hayashi N, Moribe T *et al*. Relation of disease activity during chronic bepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. Hepatology, 1997, 25:439－444

14 Jeffery J. Wilson, Stephen J *et al*. Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasispecies by heteroduplex gel shift analysis: correlation with nucleotide sequencing. J Gen Virol, 1995, 76:1763－1771

维普资讯 http://www.cqvip.com

Genetic Variation Characteristics of Hepatitis C Virus Hypervariable Region

Pan Wensheng Wang Haitao Wang Tao Guo Huazhang

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing* 100071)

Luo Kangxian

(*Nan Fang Hospital, Guangzhou* 510515)

Abstract At three time points duing the period of five years, the hypervaviable region gene of HCV from two patients with HCV persistent infection was amplified, sequenced and analyzed. The results demonstrated that there were five significant characteristics in genetic variation of HCV HVR. 1. Wide mutation degree and range. HVR is consistent of 81 nt and 27 aa, 89% nt (72/81) and 96% aa (26/27) mutated in 168 clones; 2. Different mutation types. Except the common substitution mutation, deletion was 22.5%; 3. Apparently dominant clones. Dominant clones always existed, although genetic variation was significant among clones at one time point; 4. Phenomenon of quasispecies is very severe. In conclusion, this study demonstrated that the genetic variation of HCV HVR showed high complexity and diversity.

Key words Hepatitis C Virus, Hypervariable region, Genetic variation