

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.12.002

· 论 著 ·

HIV-1/HBV 共感染患者 HBV 病毒基因组前 S 区、BCP 区和前 C 区的变异

丁莉莎¹, 姚 涛², 江培学³, 杨志军³, 贺健梅¹, 郑 军¹, 陈 曦¹

(1 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005; 2 长沙市第一医院, 湖南 长沙 410011; 3 上海星耀医学科技发展有限公司, 上海 200083)

【摘要】目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)合并人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)感染者和 HBV 单独感染者 HBV 基因组三个重点区域的变异。**方法** 收集湖南省 HIV-1/HBV 合并感染患者(试验组)和 HBV 单独感染者(对照组)血清各 40 份,进行 HBV 全基因组扩增及测序,并对突变位点进行分析。**结果** 有 59 份血清 HBV 成功分型和测序,其中试验组 21 份,对照组 38 份,试验组与对照组 HBV 载量值和不同基因型比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。试验组 4 例患者血清标本 HBV 在前 S 区 22 个氨基酸发生变异,12 例在前 C 区和 BCP 区 45 个核苷酸发生突变,试验组和对照组前 S 区氨基酸总体缺失突变率分别为 0.60%、0.64%,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.042, P > 0.05$)。试验组与对照组前 C 区和 BCP 区各个主要突变位点变异发生率比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),试验组和对照组前 C 区和 BCP 区总体变异发生率分别为 1.36%、1.73%,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.920, P > 0.05$)。**结论** 共感染患者的 HBV 变异水平与单感染患者基本一致,短时间内 HIV-1 暂未对 HBV 的进化突变造成显著影响。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒 1 型;乙型肝炎病毒;合并感染;突变**【中图分类号】** R512.91 R512.6⁺2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9638(2018)12-1042-04

Variation in pre-S region, BCP region, and pre-C region of HBV virus genomes from HIV-1/HBV co-infected patients

DING Li-sha¹, YAO Tao², JIANG Pei-xue³, YANG Zhi-jun³, HE Jian-mei¹, ZHENG Jun¹, CHEN Xi¹ (1 Hunan Provincial Center for Disease Prevention and Control, Changsha 410005, China; 2 The First Hospital of Changsha, Changsha 410011, China; 3 Shanghai Fosun Pharmaceutical (Group) Co., Ltd., Shanghai 200083, China)

【Abstract】 Objective To evaluate variation of three key regions of HBV genome in patients with co-infection of hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) as well as those only infected with HBV. **Methods** Forty serum specimens from patients with co-infection of HIV-1/HBV (trial group) as well as 40 serum specimens from those only infected with HBV (control group) in Hunan Province were collected, the whole-genome of HBV was amplified and sequenced, the mutation sites were analyzed. **Results** HBV in serum of 59 cases were successfully genotyped and sequenced, 21 of which were from trial group and 38 from control group, there was significant difference in HBV load and genotype between trial group and control group (both $P < 0.05$). In trial group, 4 patients were detected 22 amino acid mutations in the pre-S region of HBV in serum specimen, 12 were detected 45 nucleotide mutations in pre-C and basic core promoter (BCP) regions, the overall deletion mutation rates of amino acid in pre-S region of trial group and control group were 0.60% and 0.64% respectively, with no significant difference ($\chi^2 = 0.042, P > 0.05$). There were no significant difference in mutations in key sites of pre-C and BCP regions between trial group and control group (both $P > 0.05$), the overall variation rates in pre-C and

[收稿日期] 2018-05-31

[基金项目] 湖南省卫生计生委科研项目(B2017134)

[作者简介] 丁莉莎(1982-),女(汉族),湖南省醴陵市人,副主任技师,主要从事病原微生物 HIV 方向研究。

[通信作者] 陈曦 E-mail:chenxi161@sohu.com

BCP regions of trial group and control group were 1.36% and 1.73% respectively, difference was not significant ($\chi^2 = 1.920, P > 0.05$). **Conclusion** HBV mutation in co-infected patients is basically the same as that in single-infected patients, HIV-1 has not obvious affect on the evolution of HBV mutation during a short time.

[**Key words**] human immunodeficiency virus type 1; hepatitis B virus; co-infection; mutation

[Chin J Infect Control, 2018, 17(12): 1042 - 1045]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的前 C 区及 C 区启动子的变异是近十年来肝炎领域的研究热点。上述两个区域,以及前 S 区和 Enh II 区发生突变已被证明与肝纤维化和肝癌的产生密切相关。由于 C 区,特别是基本核心启动子区在病毒复制中起着重要作用,一旦变异将影响到乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)的表达和宿主的免疫应答,并直接影响慢性肝病患者的病程进展及药物治疗的效果^[1-4]。近年来,乙型肝炎病毒合并人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)共感染人群数量不断上升,防治形势十分严峻,而 HIV 与肝炎病毒交叉感染会导致感染者免疫水平下降,病毒复制活跃,引发肝脏持续性炎症因子的表达和单核淋巴细胞的活化,加速病程进展。相对于 HBV 单感染,共感染患者体内的 HBV 受到 HIV-1 和宿主免疫系统的共同作用和影响,尚不清楚是否会导致病毒变异和进化的加快。本研究目的为分析共感染人群 HBV 重点区域的变异,初步探讨此问题。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2017 年 1 月—2018 年 1 月长沙市第一医院和郴州市第二人民医院进行 HIV 和 HBV 检测的患者,经知情同意后随机挑选 40 例 HIV 确证阳性且 HBV DNA 阳性作为共感染试验组,40 例 HBV DNA 阳性作为单感染对照组,于未开展抗病毒治疗前采血。对乙型肝炎的诊断符合乙型病毒性肝炎诊断标准(WS 299 - 2008)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 ABI 7500 荧光 PCR 仪为 ABI 公司生产,普通 PCR 仪为珠海黑马医学仪器有限公司生产。

1.2.2 试剂 乙肝五项检测试剂盒购自珠海丽珠医药公司,HBV DNA 提取试剂盒、定量试剂盒和扩增试剂盒均由上海星耀医学科技发展有限公司提供。

1.3 全基因组扩增及测序

1.3.1 引物 全基因组扩增引物:HP1 5'→3' CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTC TGCCTAATCA;HP2 5'→3' CCGGAAAGCTT-

GAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG。

1.3.2 扩增体系及步骤 试剂准备、标本处理和加样按照定量试剂盒说明书和实时荧光定量 PCR 仪操作规程进行。定量检测反应条件为:50℃,2 min→94℃,5 min→94℃,10 s→60℃,40 s 共 40 个循环。而全基因组扩增体系(50 μL)为:DNA Polymerase 0.5 μL, Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μL, dNTP Mixture 4 μL, Primer HP₁ 1 μL, Primer HP₂ 1 μL, HBV DNA 5 μL, ddH₂O 28.5 μL。扩增程序为:94℃,1 min→94℃,40 s→60℃,90 s→68℃,3 min 共 40 个循环,每 10 个循环增加 2 min,30 个循环以后 9 min。

1.3.3 结果检测及测序 采用 ABI 7500 real time Data Analysis 分析定量结果。全基因组扩增则每管分别取 5 μL PCR 扩增液,1.5% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min,在 3.2 kb 处有条带的视为成功扩增目的片段,并送上海生工测序。

1.4 序列分析应用 NCBI BLAST 进行基因分型和序列分析,标准参照序列为 GQ924603 和 FJ562219。

1.5 总体变异率比较 以每 100 个氨基酸/核苷酸中发生氨基酸/核苷酸替换数目的百分比来计算^[2],前 S 区分析片段总长 174 个氨基酸,前 C 区和 BCP 区分析片段总长 158 个核苷酸。前 S 区总突变率 = 氨基酸突变数/(测序例数 × 174) × 100%,前 C 区和 BCP 区总突变率 = 氨基酸突变数/(测序例数 × 158) × 100%。

1.6 统计方法 应用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,正态分布采用 *t* 检验比较两组间均数,非正态分布采用秩和检验比较两组间中位数,采用 χ^2 检验对各组间差异性进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本信息 试验组 40 例患者中,仅 21 例(52.50%)能成功测得 HBV 全基因组序列,其中男性 17 例(80.95%),女性 4 例(19.05%);≤40 岁者 10 例

(47.62%), >40 岁者 11 例(52.38%)。而对照组 40 例患者中,有 38 例(95.00%)成功测得 HBV 全基因组序列,检出的基因型和 HBV 载量值以及性别、感染途径等见表 1。湖南省 HIV 患者感染 HBV 基因(亚)型以 B 型为主。试验组与对照组 HBV 载量值和不同基因型比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。试验组年龄为(40.7 ± 15.0)岁,对照组为(36.3 ± 15.2)岁,两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 成功测得 HBV 全基因组序列的两组患者基本资料比较

Table 1 Comparison in basic data of two groups of patients who were successfully detected whole-genome sequence

项目	试验组	对照组	t/ χ^2	P
性别				
男	17	24	2.02	0.155
女	4	14		
感染途径				
性传播	20	35	0.21	0.647
吸毒传播	1	3		
HBeAg				
阳性	12	25	0.432	0.511
阴性	9	13		
HBV 基因型				
B 亚型	18	23	4.047	0.044
C 亚型	3	15		
HBV DNA(log)	5.9	7.8	-	0.038
AST(U/L)	80.5	61.5	-	0.722
ALT(U/L)	64.5	76	-	0.722
TBil(μ mol/L)	20.5	16	-	0.722

AST:天门冬氨酸氨基转移酶,ALT:丙氨酸氨基转移酶,TBil:总胆红素

表 3 两组患者血清标本 HBV 基本核心启动子区突变率比较[份(%)]

Table 3 Comparison in mutation rates in BCP region of HBV in serum specimen of two groups of patients(No. of specimens[%])

组别	G1752A	T1753G/C	A1760G	A1762T	G1764A	G1776T	G1799A/C	A1762T + G1764A
试验组(n=21)	7(33.3)	1(4.8)	0(0.0)	5(23.8)	7(33.3)	0(0.0)	3(14.3)	5(23.8)
对照组(n=38)	19(50.0)	4(10.5)	1(2.6)	11(28.9)	11(28.9)	1(2.6)	11(28.9)	10(26.3)
χ^2	1.758	0.622	0.578	0.235	0.081	0.578	1.745	0.072
P	0.185	0.430	0.447	0.628	0.776	0.447	0.187	0.788

3 讨论

HBV 是一种不完全双链 DNA 病毒,基因组全长 3.2 kb,由四个重叠的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)组成,分别是前 S/S(preS/S)区,前 C/C(pre core/core)区,X(transcriptional co-activator)区和 P(DNA polymerase)区。由于在复制过程中逆转录酶缺乏校正功能,以及免疫逃避等因素的作用,

2.2 序列比对与分析

2.2.1 前 S 区序列分析比较

前 S 区序列试验组 4 份样本中 22 个氨基酸发生突变,其中,2 个前 S1 区缺失突变,20 个前 S2 区缺失突变。对照组 6 份样本中 42 个氨基酸发生突变,其中 2 个为起始位点突变,16 个前 S1 区缺失突变,24 个前 S2 区缺失突变。实验组和对照组前 S 区氨基酸总体缺失突变率分别为 0.60%、0.64%,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.042, P > 0.05$)。

2.2.2 前 C 区和 BCP 区序列分析

前 C 区和 BCP 区序列试验组 12 份样本 45 个核苷酸发生突变,对照组 32 份 104 个核苷酸发生突变,两组前 C 区和 BCP 区各个主要突变位点变异发生率比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2~3。试验组和对照组前 C 区和 BCP 区总体变异发生率分别为 1.36%、1.73%,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.920, P > 0.05$)。

表 2 两组患者血清标本 HBV 前 C 区突变率比较[份(%)]

Table 2 Comparison in mutation rates in pre-C region of HBV in serum specimen of two groups of patients (No. of specimens[%])

组别	A1864T/C	T1858C	G1862T	G1896A	G1899A
试验组(n=21)	5(23.8)	1(4.8)	1(4.8)	9(42.9)	1(4.8)
对照组(n=38)	9(23.7)	3(7.9)	2(5.3)	19(50.0)	3(7.9)
χ^2	0.000	0.205	0.006	0.249	0.205
P	0.984	0.650	0.936	0.618	0.650

HBV 常发生变异。前 C 区编码 HBeAg 的前体蛋白,是宿主免疫系统攻击的靶位;而 C 启动子区,特别是基本核心启动子(basic core promoter BCP)区在前 C mRNA 和前基因组 RNA(pgRNA)的转录和调控中起着重要的作用,这两个区域的变异直接影响到 HBeAg 的表达、病毒复制状态及肝功能^[1-2]。前 C 区的常见变异为 G1896A 和 G1899A,BCP 区为 T1753V 和 A1762T + G1764A 双突变,在不同亚型中突变关键位点稍有差异,通常与慢性肝病的病

情进展及预后相关,能降低免疫应答并影响干扰素的治疗效果^[3-6],被认为是肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的高风险因素之一^[7]。前 S 区的缺失突变可导致 HBV 表面蛋白表达量减少,并且通过消除 HLA 限制性 B 细胞和 T 细胞表位,使得病毒持续存在^[5]。前 S1/S2 区的缺失突变也经常在隐匿性感染(OBI)病例中检测到^[8]。此外,HBV S 基因中 302G→A、345G→A 引起的氨基酸变异 S50G、Y64C,可能是导致母婴传播 HBV 宫内感染的原因^[9]。而近年来,HBV X 区基因突变与原发肝癌预后的关系也得到证实^[10-12]。

由于 HIV 与 HBV 具有相同或相似的感染途径,均可经血液、性接触和母婴等途径传播,两类病毒通常发生重叠感染;约有 90%~95% 的 HIV 感染者曾经感染过 HBV,其中有大约 10%~15% 发展为慢性乙型肝炎患者^[13],双重感染主要高度流行于注射吸毒人群和献血者中^[14-15]。在前期研究中我们发现,大量 HIV 与 HBV 感染患者血浆 HBV VL 值较高而 HBeAg 呈阴性,且与 HBV 亚型有一定相关性,提示共感染患者体内存在 HBV 病毒的高度变异^[16]。本实验共收集 40 份 HIV-1/HBV 共感染血清样本,40 份 HBV 单独感染血清样本,但有 HBV 载量值较高且手工提取 HBV DNA 定量也为阳性的 19 份共感染样本无法扩增或者未测序成功,失败率远高于 HBV 单感染者,原因值得进一步分析,推测可能为引物靶定的位置发生了突变或者个体内突变亚株较多,导致测序紊乱。在成功测序的样本中,共感染组虽然在前 S 区、前 C 区和 BCP 区三个重要区域均有发生缺失突变或者 G1896A、A1762T/G1764A 等(已经证明与病情进展和预后有关)关键位点的突变,但突变率与 HBV 单感染组相比无差异,初步说明短时间内 HIV-1 的存在对 HBV 的突变暂无明显影响。但如果长期共存相互作用, HIV-1 导致机体免疫功能下降、应答缓慢, HBV 复制活跃,是否会发生变化还需更长时间的观察和研究。值得指出的是,部分共感染患者出现一些新的 HBV 突变位点,如 G1854T、A1859T、G1876A 等,新的突变位点是否会影响宿主的免疫应答和治疗效果也需进一步分析。

[参 考 文 献]

[1] 吴小飞,王华雨,周宝勤,等. 乙型肝炎病毒前 C 基因区变异与乙型肝炎病毒复制关系的临床研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志,

2007,16(5):401-403.

- [2] 钱福初,邹伟华,秦基取,等. 乙型肝炎表面抗原、抗体共阳性者的病毒基因组 S 区、基本核心启动子区和前 C 区变异分析[J]. 中华传染病杂志, 2015,33(2):71-74.
- [3] Yin J, Xie J, Liu S, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(1): 81-92.
- [4] 董绍斌,王富珍,张爽,等. 原发性肝癌合并 HBV 感染者的 HBV 基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2017,31(2):92-97.
- [5] Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1): 126-144.
- [6] Sonneveld MJ, Rijckborst V, Zeuzem S, et al. Presence of pre-core and core promoter mutants limits the probability of response to peginterferon in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2012, 56(1): 67-75.
- [7] Asim M, Malik A, Sarma MP, et al. Hepatitis B virus BCP, precore/core, X gene mutations/genotypes and the risk of hepatocellular carcinoma in India[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(7): 1115-1125.
- [8] Chang SL, Liu YC, Chen SY, et al. Identification of two evolutionarily conserved 5' cis-elements involved in regulating spatiotemporal expression of Nolz-1 during mouse embryogenesis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54485.
- [9] 冯珍珍. 乙肝病毒复制水平、基因变异与母婴传播宫内感染关系的研究[D]. 河北:河北医科大学,2015.
- [10] 吴忱思,吴建华,赵乐,等. HBV X 区基因突变与原发肝癌预后的关系[J]. 河北医科大学学报, 2018,39(5):508-513.
- [11] Lee D, Lyu H, Chung YH, et al. Genomic change in hepatitis B virus associated with development of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(23): 5393-5399.
- [12] Wu HC, Tsai HW, Teng CF, et al. Ground-glass hepatocytes co-expressing hepatitis B virus X protein and surface antigens exhibit enhanced oncogenic effects and tumorigenesis[J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(6): 1294-1301.
- [13] 潘光合,胡慧宁,黄彩凤,等. HIV 感染者中乙型肝炎病毒感染及其免疫水平分析[J]. 中国艾滋病性病, 2006,12(2):111-112.
- [14] Garten RJ, Zhang J, Lai S, et al. Coinfection with HIV and hepatitis C virus among injection drug users in southern China[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41 (Suppl 1): S18-S24.
- [15] Qian HZ, Vermund SH, Kaslow RA, et al. Co-infection with HIV and hepatitis C virus in former plasma/blood donors: Challenge for patient care in rural China[J]. *AIDS*, 2006, 20(10): 1429-1435.
- [16] 丁莉莎,陈曦,杨志军,等. 湖南省 HIV-1 和 HBV 合并感染者中 HBV 基因亚型流行情况分析[J]. 中国艾滋病性病, 2011,17(6):621-625.