

# HBV 基因型分析及 B/C 型共感染的血清病毒种群分析\*

余南<sup>1</sup>, 崔进<sup>2</sup>, 程相华<sup>2</sup>, 周国宝<sup>2</sup>

(1. 广州萝岗区妇幼保健所中心实验室, 广东 广州 510730;  
2. 广州开发区医院, 广东 广州 510730)

**摘要:** 为了解 HBV 大三阳青年妇女的 HBV 基因型及体内病毒种群特征, 从 19~35 岁青年妇女 HBV 感染者血清样本中筛选出 24 例 HBV 血清学标志物检测结果为大三阳的样本进行 HBV 基因分型检测, 14 例为 B 型, 9 例为 C 型, 1 例为 B/C 基因型共感染。对 14 例大 S 蛋白基因通过特异性扩增、序列克隆和测序确认的分型结果与分型检测一致。发现的 1 例 B/C 共感染样本来自阿德福韦酯抗病毒治疗 35 周患者, 大 S 蛋白基因序列分析显示 10 条序列中 4 条为 B 型, 准种分散值为 2.8; 其 6 条为 C 型, 准种分散值为 0.6。 $\alpha$  决定簇分析该患者体内病毒种群包含 3 种血清型。病毒种群分析结果提示本地区青年妇女 HBV 感染的基因型主要为 B 型和 C 型, B/C 基因型共感染患者体内 HBV 病毒种群呈复杂的多基因型分布, 不同基因型内部以准种形式存在。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 大 S 蛋白; “a” 决定簇; 准种

**中图分类号:** R373.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 06-0103-04

## HBV Genotypic Analysis and Population Analysis of HBV Genotype B/C Co-Infection *in vivo*

YU Nan<sup>1</sup>, CUI Jin<sup>2</sup>, CHENG Xianghua<sup>2</sup>, ZHOU Guobao<sup>2</sup>

(1. Central Laboratory of Women and Children's Health Care Institute of Luogang District,  
Guangzhou 510730, China;

2. Guangzhou Development District Hospital, Guangzhou 510730, China)

**Abstract:** To investigate genotypes of HBV and the viral population *in vivo* in young women, we collected serum samples from 24 cases HBV carriers of 19~35 years old young women with both HBsAg and HBeAg positive. Twenty-four samples were tested 14 genotype B, 9 genotype C and one B/C genotypes co-infection. Nucleic acid extracts from 14 serum samples were used to amplify HBV large S protein genes through specific PCR. The amplification products were cloned and ten positive clones of each sample were selected for sequencing. The results confirmed that the 14 samples' genotype were same. The case of B/C genotypes co-infection was a patient accepted adefovir anti-virus therapy for 35 weeks. Four of the ten sequences were of genotype B with  $D_A$  2.8. The other six sequences were of genotype C with  $D_A$  0.6. There were three serotypes among the ten sequences through “ $\alpha$ ” determinant analysis. Population analysis suggested that the main genotypes of HBV infected young women in this region were B and C. HBV *in vivo* might distribute in a complex mode constructed with genotypes as well as quasispecies.  
**Key words:** hepatitis B virus; large S protein; “a” determinant; quasispecies

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 在我国流行。长期感染可发展为肝硬化和肝癌, 严重威

\* 收稿日期: 2011-04-08

基金项目: 广州市医药卫生科技项目资助项目 (2006-YB-196)

作者简介: 余南 (1968 年生), 女, 博士, 高级实验师; E-mail: yunan86@126.com

胁患者健康。得益于疫苗的推广, HBV 的水平传播受到控制, 以母婴传播为主的垂直传播越来越引起人们的重视。本研究选择 19 ~ 35 岁青年妇女 HBV 感染者为研究对象, 了解 HBV 基因型的分布。此外, 本实验室前期初步建立了 HBV 大 S 蛋白基因变异纵向研究方法<sup>[1]</sup>。在此方法基础上, 我们对获得的 HBV B/C 基因型共同感染 (co-infection) 病例样本进行病毒种群分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源及试剂仪器

2007 年 11 月至 2009 年 12 月到广州开发区医院传染科、妇产科就诊的 19 ~ 35 岁妇女 HBV 感染者, 采集空腹血 3 mL 分离血清, 4 °C 保存不超过 1 周内检测。TAQ 酶、pMD18 - T 载体为 TaKaRa 公司产品。DNA 胶纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 为 QIAGEN 公司产品。大肠埃希菌 JM109 为本实验室保存, 感受态自行制备。荧光定量 PCR 仪瑞士罗氏公司产品 LightCycler, 运行计算机软件 Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software (Version 3.5.3)。普通热循环仪 ABI2700 (美国)。

### 1.2 检测

乙肝五项检测: 采取 ELISA 法。ALT 和 AST 在全自动生化仪上完成, 分别采用紫外 - 乳酸脱氢酶法和紫外 - 苹果酸脱氢酶法。HBV - DNA 定量检测采用荧光定量 PCR 法 (达安公司 Cat: #DA - BL051)。HBV 基因分型采用乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒 (PCR - 反向点杂交法)。

大 S 蛋白基因序列克隆与测序: 大 S 蛋白基因序列扩增按参考文献进行<sup>[1]</sup>, 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 将符合设计产物相对分子质量大小的电泳条带小心切割后, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 说明书的要求纯化。根据 pMD18 - T 产品说明书的要求连接目的 DNA 片段与 T 载体。连接产物转化到大肠埃希菌 JM109 感受态细胞并培养过夜。次日挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定, 取阳性菌落用于测序。

### 1.3 序列分析

采用 DNASTar 及 BLAST 等在线工具软件进行序列分析。基因分型采用在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 进行。血清型推断通过参考基因比对进行<sup>[2]</sup>。分散值参数计算公式:  $D_a = (\sum D_{(a)})/C_n^2$ , 其中  $a = N (1, C_n^2)$ ,  $n$  = 序列数目。

## 2 结果

### 2.1 基因型检测结果

经筛选 HBV 血清学标志物检测结果为大三阳的 19 ~ 35 岁青年妇女 HBV 感染者共 24 例, 平均年龄 24 岁, ALT/AST 检测结果显示肝功正常, HBV-DNA 定量平均值为  $5.92E + 7$  拷贝/mL ( $3.48E + 5$  拷贝/mL ~  $2.27E + 8$  拷贝/mL)。HBV 分型检测结果显示 14 例为 B 型, 9 例为 C 型, 1 例为 B/C 基因型共感染。该 B/C 基因型 HBV 共感染标本来自一 22 岁女性 HBV 携带者, 前期已经接受阿德福韦酯 (adefovir, ADV) 10 mg/d 治疗 35 周。血清 HBV-DNA 水平  $6.07E + 6$  拷贝/mL, 肝功正常 (ALT 为 20, AST 为 24)。

### 2.2 大 S 蛋白基因测序与基因型确认

选其中 14 例 (9 例 B 型, 4 例 C 型, 1 例 B/C 基因型共感染) 特异性扩增得到大小约 1200 nt 的大 S 蛋白基因编码序列, 克隆到 T 载体培养过夜后每个样品挑取 10 个阳性菌落送测序, 得到共 140 条大 S 蛋白基因序列 (部分测序结果见图 1)。通过在线基因分型工具确认基因型与分型检测结果完全一致。B/C 基因型共感染样品得到的 10 条大 S 蛋白基因序列中 4 条为 B 型 (T1, T3, T8, T9), 6 条为 C 型 (T2, T4, T5, T6, T7, T10)。将测序所得大 S 蛋白基因序列进行基因型分析的结果序列种系发生树分析结果 (图 2)。参考序列来自 GenBank 序列 AY373428 (A 基因型)、AY518556 (B 基因型 adw 血清型)、EF134945 (B 基因型 ayw 血清型)、AY033072 (B 基因型 ayw1 血清型)、AY206373 (B 基因型 adw2 血清型)、AB033550 (C 基因型 adr 血清型)、AB033551 (C 基因型 adw 血清型)、AY206384 (C 基因型 adw2 血清型)、AY090452 (D 基因型 adw3 血清型)、DQ060822

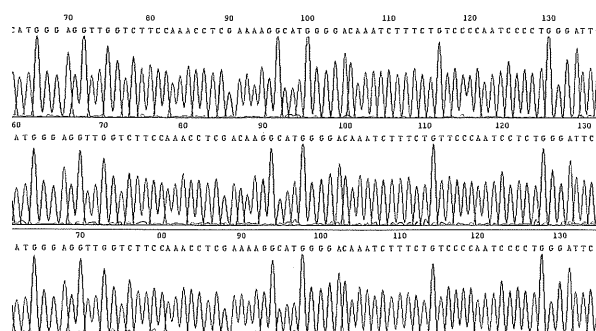


图 1 大 S 蛋白基因序列部分测序结果  
Fig. 1 Partial sequencing results of large S protein gene sequences

(E 基因型 ayw4 血清型)、AY090455 (F 基因型 adw4 血清型)、AF405706 (G 基因型)、AY090457 (H 基因型 adw4 血清型)。

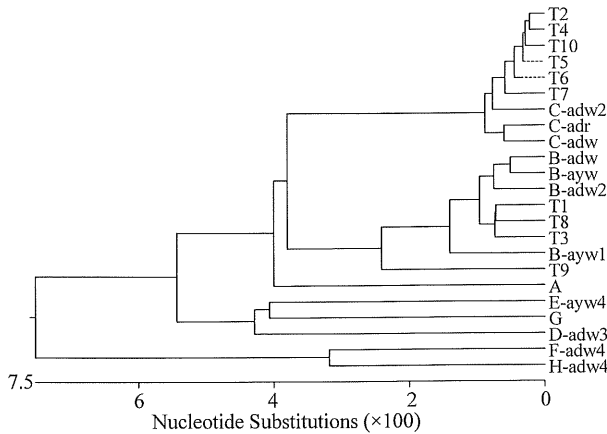


图 2 10 条大 S 蛋白基因序列与 13 条参考序列的种系发生

Fig. 2 The phylogenetic tree of 10 large S protein gene sequences and 13 reference sequences

### 2.3 大 S 蛋白基因序列的比对分析

B/C 基因型共感染样品的 10 条大 S 蛋白编码基因序列未见片段丢失, 其中一序列在氨基酸序列 337 残基处出现终止密码子的现象, 导致该序列不能正常编码完整的大 S 蛋白, 大、中、小 S 蛋白均受到影响。

### 2.4 种群内准种分散值

大 S 蛋白编码基因序列多重比对基础上, 通过公式  $D_A = (\sum D_{(a)}) / C_n^2$  计算, 9 例 B 型感染者的  $D_A$  平均值 0.39 (0.13 ~ 0.96, 标准差 0.26); 4 例 C 型感染者  $D_A$  平均值 0.36 (0.23 ~ 0.57, 标准差 0.15); 1 例 B/C 基因型共感染样品的 10 条序列中 4 条 B 型序列的分散值  $D_A$  为 2.8, 6 条 C 型序列的分散值  $D_A$  为 0.6。共感染样品中 B 型和 C 型的  $D_A$  值均高于单基因型感染者。

### 2.5 “a” 决定簇编码区

对 10 条大 S 蛋白基因序列的“a”决定簇编码区氨基酸残基序列(图 3)中 122 位、160 位进行比较, 存在 3 种不同血清型, 基因型为 B 型的病毒序列有 2 种血清型, 即 ayw 和 adw; 基因型为 C 型的病毒序列只有 adr 血清型。基因型为 B 型的 HBV 大 S 蛋白基因序列中 110I、113S、143T、160K 可能是特征位点; 基因型为 C 型者则 110L、113T、143S、160R 可能是特征位点。上述 4 个位点可有助于二种基因型的鉴别。未见 G145R 变异。

## 3 讨论

HBV 感染在全球流行, 我国尤盛, 是威胁我

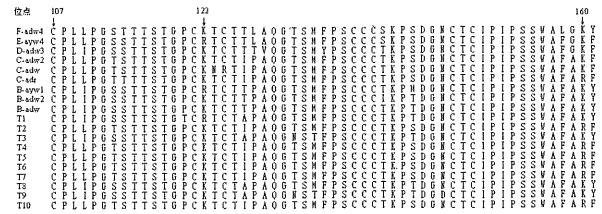


图 3 “a” 决定簇氨基酸残基序列

Fig. 3 “a” determinant sequences of the 10 large S protein and 10 reference sequences

国人口健康的一大问题。根据基因序列特征, HBV 可分为 A-H 型 8 个基因型, 近年又有报道称发现新的基因型 I 型和 J 型<sup>[3]</sup>。在我国分布的 HBV 基因型主要有 A、B、C 和 D 型, 南方最主要的基因型为 B 型和 C 型<sup>[4-8]</sup>, 本研究所地区青年妇女的 HBV 基因型也主要是 B 型和 C 型。我国改革开放以来, 经济高速发展, 人口流动性大大提高, 尤其经济发展比较快的地区汇聚了来自全国各地的流动人口, 同时也伴随着不同基因型的 HBV 传染源的汇集, 不可避免出现不同基因型共感染的现象<sup>[7-8]</sup>。共感染的发生可导致不同基因型 HBV 间病毒重组<sup>[9-10]</sup>, 使 HBV 的种群分析更复杂也更必要。药物治疗的因素也可能影响体内 HBV 共感染的变化<sup>[11]</sup>。本研究中的共感染患者为 ADV 治疗 35 周的患者, 尚不能确定 ADV 治疗在此事件中的影响。

刘映霞等<sup>[12]</sup>使用通过单链构象多态性分析 (SSCP) 技术进行的实验认为 S 区准种复杂性在基因型 B 中大于基因型 C。本研究序列分析显示发生共感染的同一样本中的 C 基因型 HBV 分散值参数为 0.6, 而 B 基因型则为 2.8, 提示后者的准种复杂性高于前者。是否 C 基因型 HBV 具有比 B 基因型更保守的特性, 此特性是否与相应的生物学特征如种内竞争力、传播能力相关联, 是否与不同基因型中 C 型致病性更强<sup>[13]</sup>相关联, 尚不清楚。同时我们的分析还显示, 该例共感染样品中 B 型和 C 型的  $D_A$  值均高于单基因型感染者的  $D_A$  平均值。进一步的结论尚有待于对更多的共感染病例进行准种分散值分析。

准种是病毒序列变异特性而致的一种病毒存在形式<sup>[14]</sup>, 其复杂程度可能具有重要的临床意义<sup>[12]</sup>。已经报道的准种研究方法包括 SSCP 法, 即通过电泳谱带分析 HBV 前 C 区复杂度<sup>[12,15]</sup>; 熔点曲线法<sup>[16]</sup>, 即通过实时荧光定量 PCR 产物的解链温度分析检测产物的差异, 该方法简单易操作, 且不易发生污染, 但对于产物中存在 3 条以上差异序列时, 则无法清晰分辨。本研究采用大 S 蛋白基因

分散值参数法建立在直接序列分析的基础上, 可研究不同位点的碱基变化, 可靠性、准确性均比较高。

“a” 决定簇编码区与免疫反应关系密切, 其内部的一些变异可导致免疫逃避的发生。本例未发现与免疫逃避关联的 G145R。通过“a” 决定簇序列的特定位点可以推断血清型<sup>[17]</sup>, 本例序列比较显示该 B/C 基因型 HBV 共感染的患者体内包含至少 3 种血清型, 包含不同基因型 (B 型和 C 型) HBV 共感染, 及同一基因型内准种也包含不同血清型。这些结果提示受多基因型 HBV 共感染患者体内病毒种群呈复杂的多基因型构成, 各基因型内以准种形式存在。病毒种群的复杂性特征与临床表现及药物治疗的关联有待进一步研究。Luo 等<sup>[18]</sup>通过对 136 条 HBV 基因组序列分析发现 22 条序列中存在重组现象, B/C 重组可发生于 pre-S 区<sup>[19]</sup>, 本例样品的大 S 蛋白基因序列分析未发现重组, 不过不排除重组发生于其他区域 (如 pre-C/C 区)。我们的后续工作将在横向 (如采用全基因组序列分析<sup>[17]</sup>) 和纵向 (如追踪 3 年或 5 年病毒种群动态变化) 进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 余南, 崔进, 周国宝, 等. 乙型肝炎病毒大 S 蛋白基因纵向研究方法及应用 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(27): 2840 - 2845.
- [2] NORDER H, HAMMAS B, LÖFDAHL S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains [J]. J Gen Virol, 1992, 73 ( Pt 5 ): 1201 - 1208.
- [3] TATEMATSU K, TANAKA Y, KURBANOV F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J [J]. J Virol, 2009, 83(20): 10538 - 10547.
- [4] 杨洁, 戴琳, 郭亚兵, 等. 应用多重 PCR 法对广东地区 HBV 进行基因型 (A - F) 分型 [J]. 第一军医大学学报, 2002 (08): 707 - 709.
- [5] 葛宪民, 李丹亚, 方钟燎, 等. 广西乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, (2): 75 - 80.
- [6] 谭文婷, 邓国宏, 王宇明, 等. 重庆地区乙肝病毒基因型分布及其临床意义 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2321 - 2323.
- [7] 董菲, 王憬惺, 杨通汉 等. 昆明、洛阳两地献血者人群 HBV 携带者的 HBV 基因型分布 [J]. 中国输血杂志, 2009(7): 552 - 555.
- [8] ZUMBIKA E, RUAN B, XU C H, et al. HBV genotype characterization and distribution in patients with HBV-related liver diseases in Zhejiang Province [J]. P. R. China: possible association of co-infection with disease prevalence and severity. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(4): 535 - 543.
- [9] SIMMONDS P, MIDGLEY S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes [J]. J Virol, 2005, 79(24): 15467 - 15476.
- [10] SIMMONDS P, MIDGLEY S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes [J]. J Virol, 2005, 79(24): 15467 - 15476.
- [11] OSIOWY C, GORDON D, BORLANG J, et al. Hepatitis B virus genotype G epidemiology and co-infection with genotype A in Canada. [J]. J Gen Virol, 2008, 89 (Pt 12): 3009 - 3015.
- [12] 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 乙型肝炎病毒 S 区准种与疾病活动性的关系 [J]. 中华传染病杂志, 2002, 20 (5): 282 - 286.
- [13] FURUSYO N, NAKASHIMA H, KASHIWAGI K, et al. Clinical outcomes of hepatitis B virus (HBV) genotypes B and C in Japanese patients with chronic HBV infection [J]. Am J Trop Med Hyg, 2002, 67(2): 151 - 157.
- [14] 陈恩强, 雷秉钧, 唐红. 乙型肝炎病毒准种的临床应用及其研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16 (10): 1086 - 1091.
- [15] 赵学兰, 王宇明, 兰林, 等. 重型乙型肝炎患者肝组织和血清中乙型肝炎病毒前 C 区准种的比较 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(8): 612 - 613.
- [16] 温志立, 谭德明, 彭仕芳, 等. 熔点曲线法研究乙型肝炎病毒准种和临床表现的关系 [J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(1): 19 - 22.
- [17] 黄维金, 周诚, 王佑春, 等. 乙型肝炎病毒中国流行株 B、C、D/C 及 A 基因型的全基因克隆与序列分析 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(29): 2978 - 2983.
- [18] LUO K, LIU Z, HE H, et al. The putative recombination of hepatitis B virus genotype B with pre-C/C region of genotype C [J]. Virus Genes, 2004, 29(1): 31 - 41.
- [19] CHEN B F, KAO J H, LIU C J, et al. Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C co-infected intravenous drug users. [J]. J Med Virol, 2004, 73(1): 13 - 22.