

- 生,2013,34(3):378-380.
- [2] 李谡翔,李宏仁.对中小学校医队伍建设的思考和建议[J].中国学校卫生,2003,24(6):677-678.
- [3] 张颖,曾光.2004 年全国学校突发公共卫生事件分析[J].中国学校卫生,2007,28(1):81-82.
- [4] 王淑香,李静.北京市海淀区中小学卫生保健人员现状分析[J].中国学校卫生,2005,26(8):698-699.
- [5] 李娜,陈卫平,顾昉,等.浙江省中小学校校医与保健教师配置现状分析[J].中国学校卫生,2012,33(9):1120-1126.
- [6] 赵海,段佳丽,滕立新,等.北京市中小学校校医和保健教师队伍现状调查[J].中国学校卫生,2015,36(3):466-467.
- [7] 吴小敏,周丽,董国营,等.深圳市中小学校校医和保健老师队伍现状调查[J].中国校医,2011,25(1):49-50.
- [8] 金晓凤,桐庐县中小学校校医配置现状调查[J].浙江预防医学,2013,25(12):65-67.
- [9] 殷俊伟,王云霞.宜兴市中小学校医(保健老师)队伍调查及思考[J].职业与健康,2008,24(4):367-368.
- [10] 北京市疾病预防控制中心.北京市学生健康状况与学校卫生工作年度报告(2007-2008 年度)[M].北京:人民卫生出版社,2009:3-4.
- 收稿日期:2016-05-01;修回日期:2016-06-22

· 基础研究 ·

学龄前儿童乙型肝炎病毒株氨基酸变异研究

王晓存¹,杨燕²,杨梅³,王立杰⁴,吴军⁵

1.新疆医科大学第六附属医院医院质量管理体系办公室,乌鲁木齐 830011;2.乌鲁木齐县水西沟中心卫生院;

3.新疆医科大学基础学院;4.乌鲁木齐市疾病预防控制中心;5.新疆医科大学公共卫生学院

【摘要】 目的 了解学龄前儿童(2~6 岁)隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)后 HBV S 基因氨基酸的变异情况,为防控 OBI 的发生发展提供参考。**方法** 采用整群抽样方法选择乌鲁木齐 4 所幼儿园,对在园的学龄前儿童采用 ELISA 进行 HBsAg,anti-HBs,HBsAg,anti-HBe 和 anti-HBc 5 项检测,对 259 例 HBsAg 阴性的血清用 Promega 公司生产的试剂盒进行 HBV-DNA 产物提取,运用 PCR 方法扩增 HBV-DNA S 基因片段,对扩增阳性的序列进行测定;采用分子遗传学软件 MEGA 5.0 对测得的序列进行具体氨基酸分析。**结果** 259 份学龄前儿童血样共发现 21 份 HBV DNA 阳性标本,均测序成功。其中 1 例由于存在氨基酸的插入,没有检出具体的基因型。其余 20 例样本均表现为 C 基因型,血清型均为 adrq+亚型。S 基因序列翻译成氨基酸后分别发生 I110L, S123T, T124S, T126I, T131N, F134Y 和 P142H 突变。**结论** HBsAg 阴性学生血液中存在一定数量的 HBV 隐匿性感染, S 基因存在氨基酸突变,需重视隐匿性的 HBV 感染以及其发生和发展。

【关键词】 肝炎,乙型;抗原变异;氨基酸类;儿童,学龄前**【中图分类号】** R 512.6⁺2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2016)08-1230-03

Amino acid variation of HBV strain among preschool children/WANG Xiaocun^{*}, YANG Yan, YANG Mei, WANG Lijie, WU Jun. ^{*} The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi(830011), China.

【Abstract】 Objective To investigate the variation of S gene amino acids among e preschool children infecting occult hepatitis B virus infection. **Methods** Four kindergartens were chosen by cluster sampling method. ELISA was used to detect HBsAg, HBsAb, HBsAg, HBsAb and HBcAb. HBV-DNA product was extracted with Promega kit, 259 cases of HBsAg negative serum, PCR amplification of HBV-DNA S gene fragment, on the discovery of the copies of the target band sequencing. Molecular genetic for amino acid sequence was analyzed by MEGA5.0 software. **Results** A total of 259 samples were successfully sequenced. One case due to the presence of amion acid insertion and led to a frame shift mutation, so did not detect the gene type. The other 20 samples were C genotype, serotype were adrq+ sub-type. S gene sequence translated into amino acids respectively I110L, S123T, T124S, T126I, T131N, F134Y and P142H mutations. **Conclusion** The HBV infection has been observed among preschool children with negative HBsAg, and there are S gene mutations in amino acid.

【Key words】 Hepatitis B; Antigenic variation; Amino acids; Child, preschool

乙型肝炎病毒(HBV)感染在全世界范围内广泛

分布,是备受关注的健康问题,大部分 HBV 感染者没有明显临床症状,血清中抗-HBs 阳转和 HBsAg 阴转被普遍认为是 HBV 痊愈和清除。近几年研究表明,有部分的 HBV 感染者虽然血清中 HBsAg 呈现为阴性,但是在肝脏组织或血清中仍然能检测到 HBV-DNA,这种现象被称为隐匿性的 HBV 感染(简称 OBI)^[1-2]。随着乙肝疫苗纳入免疫规划的进程后,低年龄人群的

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金-医学联合基金资助项目(2014211C009)

【作者简介】 王晓存(1988-),女,新疆人,在读硕士,主要研究方向为乙型肝炎的免疫学。

【通讯作者】 吴军, E-mail: wuj1997@sohu.com。

DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2016.08.036

HBV 感染率呈逐渐降低趋势。相关研究表明免疫压力可以导致 HBV “a” 抗原决定簇核苷酸的变异,并进一步的在低年龄人群中表现出慢性乙型肝炎病毒感染^[3-4]。越来越多的研究表明,不论是急性自限性肝炎,还是治疗后 HBsAg 为阴性的人群仍可检出 HBV DNA,且进一步发展为肝硬化或肝癌^[5-8]。因此研究学龄前人群隐匿性 HBV 的感染后氨基酸序列迫在眉睫。为此,笔者分析了 21 例表面抗原阴性而 HBV DNA 阳性学龄前儿童的 HBV S 基因氨基酸序列,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 2014 年 8—9 月,采取整群抽样的方法选择乌鲁木齐 4 所幼儿园在园学生作为研究对象,年龄为 2~6 岁。采集对象静脉血 3 mL 并进行 HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe 和 anti-HBc 5 项检测,将 HBsAg 指标阴性的 259 例样本作为本次研究对象。常规离心后将血清平均分为 2 份,并放置在 -80 ℃ 冰箱进行保存。

1.2 方法

1.2.1 血清学检测 一份血清用酶联免疫吸附试验 (ELISA),另一份血清用化学发光定量 (Elecsys, 罗氏公司)法进行 HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe 和 anti-HBc 检测,试剂盒均购于北京万泰生物技术公司。

1.2.2 血块 HBV DNA 抽提 由 Promega Wizard 生产的基因组 DNA 纯化试剂盒提取 DNA,具体操作按试剂盒说明进行,抽提的 HBV DNA 溶于 150 μL DNA 溶解液中。

1.2.3 引物 从 GenBank 中收集不同的 HBV 基因序列,在 S 基因的保守部位分别设计 1 对外引物和内引物,引物由上海生工技术服务有限公司合成。外引物为 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3', 3'-ATAC-CCAAAGACAAAAGAAAA-5';内引物为 5'-GCGGGG TTTTCTTGTGAC-3', 3'-GGGACTCAAGATGTTG-TACAG-5'。

1.2.4 基因扩增 第 1 轮反应体系用外引物进行 PCR 扩增,参数:95 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 10 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环后 72 ℃ 再延伸 10 min。第 2 轮反应体系中第 1 轮产物是模版,用内引物进行 PCR 扩增,参数:95 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 10 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 25 个循环后 72 ℃ 再延伸 10 min。扩增产物目的的长度为 544 bp。基因扩增时用的 PCR Master Mix 由 Thermo 公司生产。

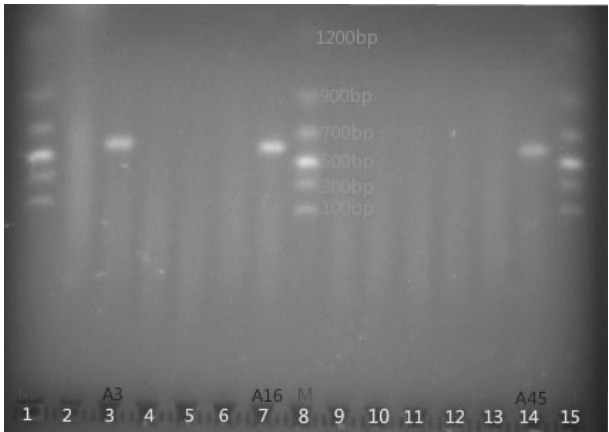
1.2.5 序列测定和分析 PCR 扩增产物由上海华大基因生物工程有限公司进行序列测定。将测得的序列与收集的序列进行比对分析。依据国际核苷酸序

列联合数据库 (INSDC) 已发表的人类 HBV 基因序列,在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 服务器中用 BLAST 菜单对测得的 HBV 基因序列进行确定。

2 结果

2.1 OBI 学龄前儿童血清中乙肝两对半各项目检测结果 在本研究中 PCR 产物电泳时得到 21 份目的条带,全部测序成功,最终得到 21 份 OBI 感染者基因序列。抗-HBs, HBeAg, 抗-HBc 阳性率分别为 23.81% (5/21), 4.76% (1/21), 4.76% (1/21)。HBsAg, 抗-HBe 阳性率均为 0。

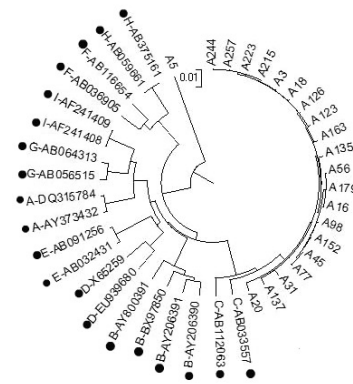
2.2 HBV-DNA 巢式 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳的结果 目的条带长度为 544 bp。从图 1 可看到胶板上共有 3 个目的条带,长度均在 500~700 bp 之间。



注:M 为 Maker 缩写,A 为标本顺序号。

图 1 HBV-DNA 巢式 PCR 产物的电泳图

2.3 基因型分析 用 MEGA 5.0 软件中的 Clustal W 方法将测得的 S 基因序列与收集到的标准序列进行一一比对,用 Maximum Likelihood 方法构建进化树,序列同源性 ≥ 96% 可归为同一基因型。本次测序的 21 株基因序列与 HBV 基因型代表株进行分析后均为 C 基因型。由图 2 的乙型肝炎病毒 S 基因进化树可以看出, A5 由于核苷酸的插入,没有分出基因型。



注:●标记的为标准序列

图 2 乙型肝炎病毒 S 基因进化树

2.4 氨基酸突变分析 用 MEGA 5.0 软件中的 Clustal W 方法将序列剪切为 523 bp(nt224-766), 用 Align 功能将测得的核苷酸序列对应的翻译为氨基酸, 并与标准序列进行一一比对。研究中有 21 份目的片段测序成功, 说明这 21 名学龄前儿童的血清中含有一定水平的 HBV-DNA, 其中有 8 名学龄前儿童 S 基因的主要亲水区(MHR)氨基酸出现了频率不同的变异情况。见表 1。

表 1 学龄前儿童 HBV-DNA S 基因 MHR 区氨基酸变异情况 (n=21)

变异位点	氨基酸置换	变异数
110	I110L	4(19.1)
123	S123T	5(23.8)
124	T124S	6(28.6)
126	T126I	8(38.1)
131	T131N	3(14.3)
134	F134Y	8(38.1)
142	P142H	1(4.8)

注:()内数字为变异频率/%。

3 讨论

有研究显示, 国内各地 HBV 基因型分布各不相同, 我国 A、B、C 和 D 基因型均存在, 且以 B 基因型和 C 基因型为主。在南方地区以 B 基因型为主, C 基因型的感染率从南向北, 呈现出逐渐增高的趋势^[9]。将样本序列与标准 HBV 基因序列比较, 结果表明, 学龄前儿童的 20 例样本均为 C 基因型, 其血清型均为 ad-rq+亚型, 1 例样本由于存在氨基酸插入, 导致移码突变, 没有检测出具体基因型。

本研究中 S 基因主要亲水区氨基酸变异频率较高的 126 位点和 134 位点均在“a”决定簇, 变异频率均为 38.1% (8/21), 与国内相关研究的结果一致^[10]。“a”决定簇的抗体可以结合乙肝表面的抗原, 从而有效地保护了个体不受病毒的感染。“a”决定簇的氨基酸变异可能会导致机体产生免疫逃避, 继而造成免疫接种的失败。国内已报道的氨基酸变异位点有 126, 127, 134, 143 等^[11]。本研究结果显示, 学龄前儿童的 MHR 区“a”决定簇氨基酸的 T126I, F134Y 和 P142H 位点发生了不同频率的突变, 变异频率分别为 38.1%, 38.1% 和 4.8%。提示“a”决定簇在隐匿性 HBV 感染研究中至关重要, 新疆的学龄前儿童感染 HBV 后基因及氨基酸的突变可能是因病毒株和流行地区的不同而不同。因此对 HBV S 基因 MHR 区的变异进行区域性的研究和分析是很有必要的。

本研究结果显示新疆学龄前儿童存在 OBI 感染, 并且 S 基因 MHR 区“a”决定簇存在氨基酸不同频率的突变, 与本课题组前期研究结果一致^[12], 提示要重

视学龄前儿童 OBI 的发生发展问题。对于血清乙肝两对半检测均阴性的 OBI, 国内外的检出率各不相同。Minuk^[13]的研究表明, 检测 487 名 HBsAg 阴性人群的 HBV-DNA, 检出率为 8%, 而在抗 HBs 阳性和(或)抗 HBe 阳性人群 HBV-DNA 检出率为 18%。就目前而言, 尚不清楚导致两对半结果全阴性的原因是由于急性感染后相应的病毒标记物逐渐消失, 还是从感染开始的时候就已经发生, 或者是由这两种因素共同导致的结果。目前 OBI 感染领域的一个重要课题是研究两对半结果全阴性的原因^[14]。研究中存在乙肝两对半结果全阴性的学龄前儿童 HBV-DNA 的检测阳性, 需进一步研究。

4 参考文献

- [1] ANNE S F L. Occult hepatitis B virus infection: diagnosis implications and management [J]. Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(s7): 114-117.
- [2] GIOVANNI R, TERESA P, IRENE C, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. Hepatol, 2007, 46(1): 160-170.
- [3] 沈立萍, 杨进业, 莫兆军, 等. 乙型肝炎疫苗长期免疫对人群乙型肝炎病毒流行状况的影响 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(7): 659-662.
- [4] KAY A, ZOULIM F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution [J]. Virus Res, 2007, 127(2): 164-176.
- [5] 王林川, 于燕, 徐莉. 乙型肝炎病毒核酸抗原相关的检测及临床意义 [J]. 国外医学(医学地理分册), 2011, 32(4): 261-263, 273.
- [6] 徐俊, 郭楠. 乙型肝炎病毒表面抗原检测准确性分析 [J]. 疑难病杂志, 2010, 9(5): 365-367.
- [7] LAMPERTICO P, MAINI M, PAPTAEODORIDIS G. Optimal management of hepatitis B virus infection-ASL Special Conference [J]. Hepatol, 2015, 63(5): 1238-1253.
- [8] 白丽萍, 张颖慧, 杨雪艳, 等. 血 HBsAg 阴性而抗 HBV 阳性体检人群中的隐匿性乙肝感染 [J]. 医药前沿, 2013, 3(7): 33-34.
- [9] ZHU C T, DONG C L. Characteristics of general distribution of hepatitis B virus genotypes in China [J]. Hepatobil Pancreat Dislnt, 2009, 8(4): 397-401.
- [10] 张丽, 颜丙玉, 纪峰, 等. 山东省人群乙型肝炎病毒“a”决定簇突变分析 [J]. 中华实验和病毒学杂志, 2010, 24(6): 424-426.
- [11] 姚晴青, 董晓莲, 郑英杰, 等. 浙江省农村自然人群隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)情况及进化特征分析 [J]. 复旦大学学报(医学版), 2013, 40(5): 534-540.
- [12] 王晓存, 王立杰, 吴军. 乙型病毒性肝炎隐匿性感染与 S 基因氨基酸变异的研究 [J]. 职业与健康, 2015, 31(7): 913-915.
- [13] MINUK G Y, SUN D F, VHANOVA, et al. Occult hepatitis B Virus infection in a North American community-based population [J]. J Hepatol, 2005, 42: 480-485.
- [14] 贾林梓, 冯英明. 隐匿性乙肝病毒感染 [J]. 肝脏, 2008(5): 438-440.

收稿日期: 2016-01-17; 修回日期: 2016-04-06