

异性,且不受一些慢性及自身免疫性疾病的干扰,在感染初期抗体尚未出现之前即可检出 HCVcAg,大大缩短了“窗口期”,且费用低廉,适合临床及血站推广应用。

参 考 文 献

1 杨朝国,陈川.丙型肝炎病毒感染的实验室检测及临床应用.国外医学临床生物化学与检验学分册,2004,25:379.

2 邢文革,郑怀竟.必须提高丙型肝炎病毒实验室检验结果的可信度.中华肝脏病杂志,2004,12:170-171.

3 Zanetti AR,Romano L,Brunetto MA,et al. Total HCV core antigen assay:a new marker of hepatitis C viremia for monitoring the progress of therapy.J Med Virol,2003,70:27-30.

(收稿日期:2007-12-17)

(本文编辑:钱燕)

乙型肝炎病毒核心启动子缺失突变导致 HBeAg 表达不能

周飞 毛乾国 卢雅丕 陈美娅 陈建民 王琳 任建林 董菁

目前认为 10%~30% 的慢性乙型肝炎(CHB)患者为乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性 CHB,表现为丙氨酸氨基转移酶(ALT)反复波动或持续异常,对干扰素(IFN)治疗的疗效差,病情呈持续发展,易进展为肝硬化和(或)原发性肝癌^[1]。导致 HBeAg 阴性的病毒学因素有 3 种:前-C 区 G1896A 突变直接导致该密码子自 TGG 变化为 TAG,使得前-C 区在第 28 位氨基酸残基处发生终止突变,HBeAg 表达被终止;(2)C 区启动子区(CP 区)替换变异,最常见的变异是 CP 区内 A1762T 和 G1764A 的单/双替换突变,该变异可作为独立因素导致 HBeAg 表达不能;(3)前-C 区内部发生其他点替换突变、C 区内部缺失突变(CID)、插入突变均可能导致 HBeAg 表达呈阴性。本研究分析 1 例自行发生 HBeAg/抗-HBe 血清学转换的原因。

资料与方法

一、血清来源和 DNA 提取

患者男性,34 岁,被检测出乙型肝炎病毒(HBV)感染 10 年。采集静脉血,蛋白酶 K 消化-饱和酚 氯仿(1:1)抽提法提取 200 μl 血清中的 HBV DNA,-20℃ 保存备用。患者被诊断为病毒性肝炎,乙型,慢性,诊断符合 2000 年西安会议《病毒性肝炎防治方案》标准。

二、HBV 基因型分析

参考 Naito 等^[2]建立的 6 种主要基因型分型方法,应用巢式-多引物-多聚酶链反应,外引物上游引物序列:5'-AGCATGGGAGGTGGTCTTC-3',下游引物序列:5'-AAGGCACTCAAGGCAGGATAGC-3',目的片段长度约 1 430 bp。A 组内引物:上游通用引物序列为 5'-GGCTCAAGTCCGGAACA GT-3',A 基因型特异性下游引物为 5'-CTCGCG

GAGATTGACGAGATGT-3',B 基因型特异性下游引物为 5'-CAGGTTGGTGGTGA CTGGAGA-3',C 基因型特异性下游引物为 5'-GGTCTAGG AAT CCT GAT GTT G-3';B 组内引物下游通用引物序列为 5'-GGA GGC GGA TCT GCT GGC AA-3',D 基因型特异性上游引物为 5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3',E 基因型特异性上游引物为 5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3',F 基因型特异性上游引物为 5'-GCT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3'。由于 G、H 型没有在亚洲发现,未进行这两种型别的检测。

外引物扩增 PCR 程序参数如下:94℃ 1 min 变性,94℃ 1.5 min 变性,59℃ 1.5 min 退火,72℃ 2 min 延长,共 30 个循环,72℃ 延长 10 min。内引物扩增 PCR 程序参数如下:94℃ 1 min 预变性,94℃ 30 s 变性,58℃ 30 s 退火,72℃ 30 s 延长,共 35 个循环。巢式 PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳后判断 HBV 基因型。

三、多聚酶链反应(PCR)扩增目的片段

参考董菁等^[3]克隆的中国大陆地区 HBV 基因组相关区域序列,设计引物以扩增 HBV 基因组中的 X 基因及前-C/C 基因,上游引物:5'-CAAGTGTTCCTGACGCAACC-3',下游引物:5'-CTATCAACAAATGTCCTCCTGC-3',目的片段长度约 1 300 bp,靶区域为前-X 至 C 蛋白编码下游。PCR 参数如下:94℃ 1 min 预变性,94℃ 40 s 变性,58℃ 40 s 退火,72℃ 80 s 延长,共 35 个循环,72℃ 再延长 10 min。

四、克隆目的片段

将方法三中获得的 PCR 产物在 0.9% 琼脂糖凝胶中电泳,切取目的片段,玻璃奶法回收 PCR 产物(博大泰克公司),与 pMD19 T 载体(Takara 公司)连接过夜。将重组质粒转入 TOP 10 菌株,氨苄青霉素和 X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落。提取质粒,限制酶切鉴定确定 PCR 产物的插入。

五、DNA 测序

共选择 20 个克隆测序,由上海英骏生物公司完成。测序结果存入美国国立卫生院 GenBank 中。应用 Vector NTI 8.0 软件将测序所得核苷酸序列结果进行比较,选择的对照为储存

作者单位:361004 厦门大学医学院附属中山医院消化内科,厦门大学消化病研究所(周飞、卢雅丕、陈美娅、陈建民、王琳、任建林、董菁);厦门中医院肝病三科(毛乾国)

于 GenBank 中的 HBV 全基因组序列,分别为: AF458665 (C 型,上海)、AY707087 (B 型,厦门)、AB010290 (Bj,日本)、AF363961 (C 型,北京)、EF134945 (B 型,厦门)。

结 果

患者 2006 年 4 月出现肝功能异常,ALT 升高大于 2 倍正常值上限 (ULN),当时化验为 HBsAg、HBeAg 和抗-HBc 阳性,患者未进行抗病毒治疗。2006 年 8 月 1 日化验:ALT 501 IU/L (ULN 为 40 IU/L),AST 228 IU/L, TBil 49.3 μmol/L, HBsAg、HBeAg 和抗-HBc 阳性,HBV DNA 为 4.62×10^6 拷贝/ml;采血时间为 2006 年 9 月 25 日,样本编号 X381。2006 年 9 月 26 日化验:ALT 167 IU/L,AST 96 IU/L, TBil 48.1 μmol/L, HBsAg 和抗-HBc 阳性,HBV DNA 为 7.15×10^6 拷贝/ml;2006 年 10 月 3 日经肝组织活检提示:慢性肝炎,轻度,GIS1。2006 年 10 月 10 日化验:ALT 391 IU/L,AST 189 IU/L, TBil 48.8 μmol/L, HBsAg、抗-HBe 和抗-HBc 阳性,HBV DNA 为 6.82×10^6 拷贝/ml。

通过多引物 PCR 进行扩增,3%琼脂糖凝胶电泳后分析该患者的血液中 HBV 的基因型为 B 型(见图 1)

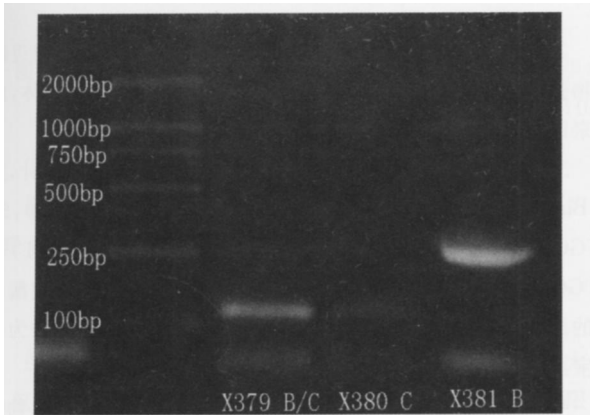


图 1 患者多引物 PCR 产物基因分型电泳图

经 PCR 法自该患者的血清中扩增出约 1 200 bp 片段,回收后连接入 pMD 19 T 载体,克隆出 201 个克隆。考虑到 HBV 是以准种形式存在,经酶切鉴定后,我们选择 20 个克隆测序。测序靶片段(去除引物部分)长度均为 1 126 bp。测序结果存储于 GenBank 中,可按以下序列号查询: EF608587 ~ EF608597。

测序结果提示 20 个克隆有 10 个克隆的 DNA 序列完全一致,克隆 E13、H11、H13、H16、I4、I7、I10、I12、I13 和 H3 编码序列一致,为主流核苷酸序列,20 株克隆有 11 种变异形式,核苷酸一致率为 98.5%。

基因片段不编码 HBeAg,编码 HBcAg,长度 182 aa,有 3 种变异形式,克隆 I8 和 I15 分别与主流编码存在 3 个和 1 个氨基酸残基差异,所有的序列均未发现 G1896A 点替换突变。

基因片段编码一种碳端发生缺失突变的 HBx,长度 76 aa,仅有一种编码形式,编码序列如下:MAARLCCQLDPARDVL-CLRPVGAESRGRPLPGPLGALPPASPPLLPTDHGAHLSL-

RGLPVCAFSSA GPCALRFTSA

测序序列与 GenBank 存储的 HBV 基因组 AF458665、AY707087、AB010290、AF363961、EF134945 相比较,上述序列分别来自我国北京、上海、厦门,并与日本 Bj 亚型基因组序列比较。以 EcoR I 为起始计数点,本研究观察到的 20 株克隆均表现为 1601 ~ 1834 位点发生大段缺失突变,长度 234 nt,涵盖了 CP 的 1643 ~ 1849 nt 的绝大部分。

讨 论

1989 年, Carmen 等^[4]提出 G1896 位点替换突变导致 HBeAg 表达不能,伴或不伴 C1858T 突变都可能是 HBeAg 阴性的原因。之后的研究认为 CP 区下游的基础核心启动子区 (BCP) 内部变异,如 A1762T 或 G1764 单/双替换变异可导致 HBeAg 阴性 CHB。目前认为前-C 区和 (或) BCP 区点替换突变是 HBeAg 阴性 CHB 的主要原因。

患者 2006 年 8 月 1 日化验 HBsAg、HBeAg 和抗-HBc 阳性,HBV DNA 为 4.62×10^6 拷贝/ml;而 2006 年 9 月 26 日出现 HBeAg 阴转,结果为 HBsAg 和抗-HBc 阳性。于 2006 年 9 月 25 日采集静脉血保存,观察到 HBeAg 阴转现象后,将该份血清解冻,提取病毒 DNA 进行基因变异的横断面研究。之后患者于 2006 年 10 月 10 日化验提示抗-HBe 阳性,我们采集的血清 HBV DNA 正好代表了 HBeAg 血清学转换过程中病毒基因发生的变化。

本例患者血清中的 HBV 基因片段测序结果表明,CP 区域发生长达 234 nt 的缺失突变,突变位置涵盖了整个 CP 区,导致 CP 功能缺失,同时也包括增强子 H 和 DR I 区,这种缺失突变不仅导致前-C/C 基因 mRNA 转录障碍,而且可导致前基因组 RNA 的转录异常。此外,我们测序的这 20 个克隆发生的缺失突变导致前-C 基因的起始密码子 ATG 丢失。上述这两种涉及 CP 和前-C 基因起始密码子的缺失突变是该患者 HBeAg 阴转的原因,但患者体内的 HBV 仍处于活跃复制阶段。我们发现的 X 基因大段缺失突变同时导致 X 蛋白出现下游编码基因的缺失,这种截短型的 X 基因是否有生物学功能,尚需要进一步研究。

由于 HBV 在患者体内是以准种形式存在,为防止该缺失突变为某个克隆的单个现象,我们通过 TA 克隆技术,获得了患者自 X 基因到 C 基因末端整个区域的 PCR 产物,在 201 个阳性克隆中,随机选择 20 个克隆测序,测序结果提示所有 20 个克隆均一地表现为 1643 ~ 1849 nt 位点缺失突变。20 个克隆中有 10 个克隆测序结果完全一致,另 10 株克隆出现不同位点的点替换突变,但缺失突变的位置是统一的,测序的 20 个克隆共表现出 11 种变异形式。除选择的克隆外,我们将获得的序列与 GenBank 中已储存的序列进行数据库比对,没有发现类似的缺失突变的报道。而 2005 年台湾学者 Chen 等^[5]观察了 200 例患者,以各种点替换突变为主要原因,未报道 CP 的缺失突变。2003 年,我们的研究提示 BCP 内部存在短的缺失突变,长度为 8 或 20 nt 两种类型,可能影响 HBeAg 的表达^[6],

Zhu 等^[7]最近也发现有短的缺失突变(19 nt)存在于 X 基因下游,长度大于 100 nt 的缺失突变目前未见报道。

参 考 文 献

1 侯金林. 正确认识乙型肝炎 e 抗原慢性乙型肝炎. 中华肝脏病杂志, 2007, 15:132-13

2 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. Clin Microbiol, 2001, 39:362-364.

3 董菁,李进,施双双,等. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志, 2002, 27:116-118.

4 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepa-

titis B infection. Lancet, 1989, 2:588-591.

5 Chen CH, Lee CM, Lu SN, et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. J Clin Microbiol, 2005, 43:6000-6006.

6 皇甫竞坤,董菁,邓红,等. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志, 2001, 9:1323-1325.

7 Zhu PA, Tan D, Peng ZT, et al. Polymorphism analyses of hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma patients from Southern China. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39: 265-272.

(收稿日期:2007-11-29)
(本文编辑:钱燕)

丙型肝炎病毒感染离体培养树鼯肝细胞模型初探

闵峰 王素美

本研究以树鼯为研究对象,采用体外两步灌流法分离肝细胞,然后用丙型肝炎病毒(HCV) RNA 阳性血清直接感染原代培养的肝细胞,观察树鼯肝细胞对 HCV 的易感性,旨在建立较为实用的细胞感染模型,为深入研究 HCV 感染细胞的复制机制提供一定的实验依据。

材料与方 法

一、主要材料

(一)实验动物 成年树鼯购自中国科学院昆明动物研究所,5~8 月龄,体重 110~140 g,雌雄不限,双只关养。Wistar 大鼠购自第三军医大学动物研究所,30~35 d,体重 45~50 g,雌雄不限。

(二)实验血清 实验所用的感染血清(HCV RNA 阳性)均来自慢性丙型肝炎患者,经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测证实 HCV RNA 为阳性,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗 HCV-IgG 阳性,其他肝炎病毒标志物均阴性。HCV RNA 阳性血清无菌采集后分装并冻存于-80 冰箱,用前经 56 30 min 灭活补体。正常人血清来自我院输血科健康供血员,甲、乙、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒标志物检测均阴性,标本采集后分装并冻存于-80 冰箱,用前经 56 30 min 灭活补体。细胞培养所用的小牛血清由本室自制,用前经 56 30 min 灭活补体。

(三)主要试剂

1. 细胞分离和培养试剂: 型胶原酶、L15 培养基、RP-MII640 培养基均为美国 Sigma 公司产品。

2. 免疫组织化学试剂:免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;抗 HCV NS₅ 及 HCV NS₅ 单克隆抗体,由北京医科大学肝病研究所提供。

3. 原位杂交试剂:Dig 标记的 HCV 正链寡核苷酸探针,参照 Bukh 等^[1]的 HCV5' 非编码区探针序列(-95~-56nt):5'-CTGCTA GCCGACTA GTGTTGGGTCCGCGAAACCCTT-GTGG-3',由军事医学科学院二所制备和纯化;碱性磷酸酶标记的地高辛抗体、杂交液、封闭剂和 NB/T/BCIP 溶液,均为德国宝灵曼(Boehringer Mannheim)公司产品。

4. HCV RNA 逆转录套式 PCR 试剂:引物由上海生物工程公司合成并纯化,外引物:F 外(493~518)5'-GCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCTC-3',R 外(987~964)5'-CGTATGGGGCCAGTTCA TCA TCA TCA TCA T-3';内引物:F 内(502~527)5'-AACCTTCCTGGTTGCTCTTTCTCTA T-3';R 内(975~952)5'-GTTCATCA TCATA TCCCATGCCA T-3'。由内引物扩增 HCV cDNA 长度为 474 bp。裂解液 Tripure 为德国宝灵曼(Boehringer Mannheim)公司产品;逆转录酶(AMV)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、无 RNA 酶、Taq 酶、dNTP、MgCl₂ 等为美国 Promega 公司产品。

二、实验方法

(一)细胞分离和培养 采用体外两步灌流法分离树鼯肝细胞^[2]。

(二)HCV 体外感染原代培养的肝细胞 将感染血清与 L15 完全培养基按照 1:2 比例稀释,接种于细胞培养的第 3 天,25 ml 培养瓶每瓶 3 ml,12 孔培养板每孔 1 ml,轻轻摇匀,置入 37 5%CO₂ 培养箱中培养,16~18 h 后,弃取培养上清,并用培养基反复冲洗 3 次,留取最后一次洗涤液待检,然后再

作者单位:361003 厦门 解放军第一七四医院传染科

