

高中生乙型肝炎血清学及 S 基因序列进化分析*

王静霓¹, 姚晴青¹, 袁权², 夏玉刚¹, 陆一涵¹, 高眉扬¹, 葛胜祥², 姜庆五¹, 郑英杰¹

摘要: 目的 了解江苏省海门市高中生乙型肝炎感染情况及其 HBV S 基因的变异情况。方法 采用整群抽样方法抽取江苏省海门市职业中心校的 407 名高三学生进行乙肝血清学调查; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和巢氏聚合酶链式反应 (PCR) 扩增方法检测血清样本的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎病毒表面抗体 (抗-HBs) 和乙型肝炎病毒 (HBV) S 基因并进行进化分析。结果 407 名高中生中乙肝表面抗原 (HBsAg) 阳性率为 6.39%; 在家中、乡镇卫生院和县级及以上医院出生学生的 HBsAg 阳性率分别为 11.76%、8.02% 和 2.27%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 抗-HBs 滴度 $\geq 10U/L$ 者占 72.5%, 且呈 U 形分布; 不同乡镇、不同性别学生抗-HBs 滴度差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 407 名高中生 HBV S 基因均为 C 基因型, 主要变异在蛋白疏水区, 抗原决定簇 a 区未发生免疫原性改变。结论 出生时接受的医疗水平对 HBV 感染有影响; 海门市高中生 HBV S 基因受到正选择作用而出现变异, 但未发生免疫原性改变。

关键词: 乙型肝炎; 血清学; S 基因; 进化分析; 免疫原性

中图分类号: R 512.6⁺ 2 Q 786

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2011)01-0065-02

Prevalence of hepatitis B virus infection and phylogenetic analysis of HBV S gene among high school students

WANG Jingni, YAO Qingqing, YUAN Quan, et al Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, the Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education (Shanghai 200032, China).

Abstract Objective To understand the hepatitis B infection and HBV S gene variation among high school students in Haimen city, Jiangsu province. **Methods** A serological survey of hepatitis B was conducted in a high school with cluster sampling method. HBsAg and anti-HBs were detected with ELISA, and phylogenetic analysis for HBV S gene with nested PCR. **Results** HBsAg positive rate was 6.39% and the rate for the students born at home, township health centers and hospital above the county level was 11.76%, 8.02%, and 2.27%, respectively with significant difference ($P < 0.05$). The percentage of the students with anti-HBs titer $\geq 10U/L$ was 72.5%, and the titer distribution was U-shaped. The difference in anti-HBs titer between boys and girls as well as different towns was statistically significant ($P < 0.01$). All genotype of HBV S gene was C-type, and the main variation was in protein hydrophobic area. The change of immunogenicity in antigenic determinant "a" zone was not observed. **Conclusion** The level of health care at birth can affect the HBV infection among high school students in Haimen. S gene variation occurs through positive selection, but not antigenicity.

Key words hepatitis B; serology; S gene; phylogenetic analysis; immunogenicity

乙型肝炎是一种严重危害人类健康的常见病及多发病, 而乙型肝炎病毒 (HBV) 基因型具有明显的地域性, 中国以 R C 型最为常见。江苏省海门市是我国病毒性肝炎和肝癌的高发区, 于 1992 年将乙肝疫苗纳入计划免疫管理^[1]。为了解海门市乙型肝炎疫苗计划免疫前出生人群乙型肝炎感染及其 HBV S 基因的变异情况, 于 2009 年 3 月对江苏省海门市职业中心校整群抽取的 407 名高三学生进行乙型肝炎血清学调查, 并检测血清样本的 HBsAg、抗-HBs 和 HBV S 基因。结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 采用整群抽样方法抽取江苏省海门市职业中心校的 407 名高三学生进行乙型肝炎血清学调查。其中男生 149 人, 女生 258 人; 城镇学生 101 人, 农村学生 306 人; 平均年龄 (18.91 ± 0.18) 岁。

1.2 方法 (1) 问卷调查: 采用自行设计调查问卷, 由学生自行填写调查表并现场收回, 对自填不合格问卷由调查员进

行一对一面访调查。内容包括基本情况、患病史、乙肝相关因素 (口腔诊疗史、输血史、手术史、创伤性美容史等) 和免疫接种史。(2) 实验室检测: 采集血样在海门市疾病预防控制中心进行血清分离并冷冻后, 送至上海复旦大学公共卫生学院进行实验室检测。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和巢氏聚合酶链式反应 (PCR) 扩增方法^[2] 检测血清样本的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、表面抗体 (抗-HBs) 和 HBV S 基因。PCR 产物纯化和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。根据《病毒性肝炎防治方案》^[3] 的诊断标准对现症 HBV 感染者进行诊断, 即只要符合血清 HBsAg 阳性者即为现症 HBV 感染者。(3) 进化分析: 应用 MEGA v4.1(beta)、PAUP v4.0(Motest v3.7、PhyIP v3.6、DAMBE v5.0 和 DNAsp v5.0 软件, 对测得的 HBV S 基因序列与参比序列进行进化分析。根据 S 基因核苷酸推导的 122、160、127 及 177 位氨基酸^[4] 确定 HBsAg 阳性样本的血清型并比较分析其氨基酸突变情况。

1.3 仪器与试剂 Ek50A 洗板机和 ELx800 通用酶标仪 (美国 Biotek 公司); Anke TGL-16G 型高速离心机 (上海安亭宁科学仪器厂); GNP-9080 型隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); Eppendorf PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); HBsAg 和抗-HBs 试剂盒 (北京万泰生物技术有限公司); QIAamp DNA Blood Mini kit (德国 Qiagen 公司); Taq 酶、脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 和 ddH₂O (上海天根生物技术有限公司); PCR 扩增引物和测序引物 (上海英骏生物有限公

* 基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAI02A03); 传染病重大专项 (2008ZX10002-012); 上海市重点学科项目 (B118)

作者单位: 1 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室教育部公共卫生安全重点实验室, 上海 200032 2 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

作者简介: 王静霓 (1983-), 女, 北京人, 硕士在读, 研究方向: 传染病流行病学。

通讯作者: 郑英杰, E-mail: yizheng@smu.edu.cn

司)。

1.4 统计分析 采用 EpData 3.1 建立数据库,应用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验和 Fishers 确切概率法分析。

2 结果

2.1 不同特征学生 HBsAg 检测 407 名学生中 HBsAg 阳性率为 6.39%; 在家中、乡镇卫生院和县级及以上医院出生学生的 HBsAg 阳性率分别为 11.76%、8.02% 和 2.27%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。男生和女生 HBsAg 阳性率分别为 9.21% 和 4.71%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。城镇和农村学生 HBsAg 阳性率分别为 7.92% 和 5.88%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 不同特征学生抗-HBs 检测 407 名学生中抗-HBs 滴度 ≥ 10 U/L 者占 72.3%, 呈 U 形分布, 即抗-HBs 滴度为 10~20 U/L 和 > 160 U/L 的人数相对较多; 其中女生抗-HBs 滴度 < 10 U/L 和 > 160 U/L 人数较多; 男生抗-HBs 滴度 10~20 U/L 人数最多, 其他区间滴度的人数基本持平。不同乡镇、不同性别学生抗-HBs 滴度比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 城镇和农村学生抗-HBs 滴度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 HBV S 基因序列进化分析 PCR 扩增 26 份 HBsAg 阳性标本后, 得到 17 份 S 基因阳性检测结果, 占 65.4%。应用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 服务器中 BLAST 序列相似搜索程序对 GenBank 序列数据库中的人类 HBV 基因进行同源性检索, 将样本序列与 9 种标准 HBV 基因序列比较, 结果表明, 本研究样本均为 C 基因型, 其血清型均为 adrq+ 亚型, 抗原决定簇 a 区未发生因 aa 145 位甘氨酸突变导致的免疫原性改变。17 份样本序列中, 5 份样本 HBV S 基因核苷酸排列完全一致, 其中 4 份来源于同一班级, 但居住于不同乡镇; 另有 9 份样本核苷酸排列完全一致, 其中有 2 份样本均为同一班级、居住于不同乡镇男生, 其中 1 名学生样本 G223 抗-HBs < 10 U/L, G247 抗-HBs > 20 U/L, 家庭中均无乙肝患者。将相同核苷酸排列顺序的序列划归为同一序列后分析表明, 仅 5 例存在不同程度的 HBV S 基因核苷酸突变, 突变发生率为 29.4%。

2.4 与华东地区 C 型病毒株 HBV S 基因序列比较结果 在 GenBank 序列数据库中检索中国华东地区 C 型病毒株 HBV S 基因, 排除核苷酸排列顺序相同序列, 得到 28 条上海地区序列和 12 条江苏启东地区序列, 与本研究 5 份样本序列结合后比较其变异情况。结果表明, 45 条核苷酸序列的变异位点约占分析位点总数的 15.34%; 3 个地区中仅海门市样本序列中 HBV S 基因片段受到达尔文正选择加速进化, 上海和启东地区 HBV S 基因片段呈现中性漂变。与上海和启东病毒株比

较, 海门病毒株在疏水区 (nt 659-nt 772) 核苷酸差异度远大于上海和启东病毒株, 而其他区域核苷酸差异度比较接近。由此判定海门病毒株 S 基因片段的变异主要发生在疏水区。

3 讨论

本次研究结果表明, 在家中和乡镇卫生院出生学生 HBsAg 阳性率高于县级及以上医院出生学生, 提示出生时所接受的医疗水平对 HBV 感染有一定影响, 这可能与出生时未及时接种乙型肝炎疫苗或乙型肝炎免疫球蛋白有关。S 基因测序结果表明, 海门市样本抗原决定簇 a 区未发生免疫原性改变; 其中 2 份样本 S 基因片段核苷酸排列完全一致, 均来源于同一班级、居住于不同乡镇男生, 其中 1 名学生抗-HBs < 10 U/L, 1 名学生抗-HBs > 20 U/L, 家庭中均无乙型肝炎患者, 提示不存在 a 决定簇个别氨基酸变异改变其抗原性和免疫应答^[5], 先后感染了不同亚型的 HBV^[6], 患者免疫系统的个体化反应^[7]等所呈现的 HBsAg 和抗-HBs 共存现象。1 例抗-HBs > 20 U/L 样本应归因于 HBV 感染恢复期所形成的 HBsAg-抗-HBs 免疫复合物, 可能与学校内部密切接触所致 HBV 感染有关。与上海和启东病毒株比较, 尽管海门病毒株突变发生在疏水区 (nt 659-nt 772), 且 HBV 抗原性尚未改变, 但其受到正选择作用可导致新产生的有利突变在群体中迅速固定下来并在群体中占主导地位, 提示应密切关注当地 HBV 变异情况, 以防疫苗失效情况发生。

志谢 本研究得到江苏省海门市疾病预防控制中心的大力支持

参考文献

- [1] 周红星, 周亮. 海门市 2006 年一般人群病毒性肝炎监测结果 [J]. 职业与健康, 2007, 23(13): 1120-1121
- [2] 陈长荣, 袁权, 葛胜祥, 等. 无偿献血者中隐匿性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析 [J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 178-184
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华传染病杂志, 2001, 19: 197-200
- [4] Mageridon S, Ladhax A, Trepo C, et al. A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of wild-type hepatitis B virus [J]. J Gen Virol 2005, 86(6): 1687-1693
- [5] Zhang M, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Clin Infect Dis 2007, 44(9): 1161-1169
- [6] Lada Q, Benhanou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants [J]. J Virol 2006, 80(6): 2968-2975
- [7] 董蕾, 施双双, 张国庆, 等. HBsAg 与抗-HBs 同时阳性者体内 S 基因序列分析 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18(5): 535-537

收稿日期: 2010-05-14

(郭薇编辑 宋艳萍校对)

科技论文基本撰写须知

统计资料的表达与描述 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M (Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20 要注意区分百分率与百分比。