

• 论著 •

大连地区无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染 pre-S/S 区基因分析*

王东¹ 邓雪莲¹ 周璐¹ 方琳琳² 宋浏伟² 袁权² 安万新^{1△}

(1. 大连市血液中心 辽宁 大连 116001; 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)

摘要:目的 了解大连地区无偿献血者隐匿性肝炎乙型病毒感染(OBI)的情况和 pre-S/S 区基因的变异情况。方法 对大连市血液中心 2010 年 12 月 2 日-2013 年 5 月 31 日的无偿献血者血液标本进行常规 ELISA(HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 和抗-TP)和 HIV/HBV/HCV 联合 NAT 筛查,对于单独核酸检测反应性的献血者加以跟踪或回溯,结合乙型肝炎血清学标志物的试验、鉴别试验、病毒定量试验和半巢式 PCR 来确定 OBI,同时对 OBI 的 pre-S/S 区基因序列与对照组(HBsAg+ 序列, Genbank) 做比对分析。结果 共筛查 158 232 份血液标本,确定了其中的 69 份 OBI,流行率为 1: 2 293(69/158 232)。41 例 OBI 获得 pre-S/S 区基因序列: B 型 6 例、C 型 34 例、D 型 1 例;与对照组相比, OBI 在 S 区的氨基酸序列的变异明显($P_B=0.013$; $P_C=0.003$),主要变异位点为 B 型的 V14G/A、Y161F/S、V168A、P217L 和 C 型的 E2G/A/V、T118R/K/A/M、P127T/L/H/S、E164D/G、L175S、S174N。结论 大连地区献血者 OBI 在 HBV 基因组 S 区的氨基酸序列存在多个位点的变异,这些变异与 OBI 的产生存在某种关系,且这种关系受基因型的影响。

关键词: 隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI); pre-S/S 区基因; 氨基酸序列变异; 乙型肝炎病毒; 无偿献血者; 大连
中图分类号: R446.11⁺² R512.6⁺² Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-549X(2015)1-0026-06

Analysis of pre-S/S gene in occult hepatitis B virus infection from blood donors in Dalian, China WANG Dong¹, DENG Xuelian¹, ZHOU Lu¹, FANG Linlin², SONG Liuwei², YUAN Quan², AN Wanxin¹. 1. Dalian Blood Center, Dalian 116001, China; 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Science, Xiamen University. Corresponding author: AN Wanxin.

Abstract: Objective To understand the prevalence of occult infection of hepatitis B virus (OBI) and the mutations of pre-S/S gene from blood donors in Dalian. **Methods** From December 2nd, 2010 to May 31st, 2013, samples from blood donors in Dalian Blood Center were screened with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV and anti-TP and triplex nucleic acid detection (NAT) for HIV RNA, HBV DNA and HCV RNA. A follow-up was conducted on donors who were tested negative by ELISA but reactive by NAT. OBI was determined by testing the specimens from the follow-up or archive with serological markers of hepatitis B virus, identification examinations, quantitative and semi-nested PCR. The sequences of pre-S/S gene of OBIs and the control group were analyzed (HBsAg+, Genbank). **Results** 158 232 blood samples were screened, 69 of which were OBIs. The prevalence rate of OBIs was 1: 2 293 (69/158 232). The pre-S/S gene sequences were analyzed in forty-one cases of OBI: 6 were type B, 34 were type C, and 1 was type D. Comparing the amino acid sequences between the experimental and control groups, there were statistical significance in the S region of OBI ($P_B=0.013$; $P_C=0.003$). The main mutation sites of amino acids for type B were V14G/A, Y161F/S, V168A and P217L while for type C were E2G/A/V, T118R/K/A/M, P127T/L/H/S, E164D/G, L175S and S174N. **Conclusion** There were multiple mutation loci on the amino acid sequence of OBI from blood donors in Dalian. A particular relationship existed between these mutations in S region from HBV genome and the mechanism of OBI, which was influenced by genotypes.

Key words: occult hepatitis B virus infection; pre-S/S gene; mutation in amino acid sequence; hepatitis B virus; blood donors; Dalian

隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)是指在感染者肝脏中能够检出 HBV DNA(血清中

能够检出或者检测不到 HBV DNA)而 HBsAg 呈阴性的状态。若血清中检出 HBV DNA,其病毒载量大都维持在较低浓度(<200 IU/mL)^[1]。OBI 不同于 HBV“窗口期”感染,后者在“窗口期”过后血清学 HBsAg 结果会转为阳性,而 OBI 则始终呈阴性(以目前的血清学检测手段),在临床输血和器官移植等领域这就有可能产生潜在的 HBV 感染风险。现有的研究显示,我国无偿献血者中的 OBI 流行率为 1: 570 - 1: 7 517^[2-5]。随着核酸检测技术(nucleic acids technology, NAT)

doi: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2015.01.009

* 大连市科技计划指导性项目(大卫科发[2013]50号),大连市医学重点学科优秀卫生专业人才培养资助项目(大卫科发[2013]383号);△通信作者:安万新(1956.01-),男,主任技师、教授,硕士研究生导师,主要从事无偿献血和血液安全管理工作,电话:0411-82815618, E-mail: anwx560129@163.com

的应用,可以有效筛查出 OBI 人群,从而降低了 HBV 感染风险^[6-9,15]。目前 OBI 的发生机制仍不明确,但存在很多推测,其中之一就是 pre-S/S 区基因的变异可能与 OBI 的发生存在关系^[3,10,11]。为此,我们对大连地区无偿献血者 OBI pre-S/S 区基因的变异情况做了研究和分析,意在探究本地区献血者 OBI 发生情况及其机制,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本的分类和采集处理 1) 常规筛查标本: 2010 年 12 月 2 日 - 2013 年 5 月 31 日,本中心采集的献血者血液标本,采血时通过血袋回袋留样或旁袋留样^[15],留样管采用 5 mL EDTA-K₂ 抗凝管,1 支无分离胶用于血清学检测和 2 支含分离胶用于 NAT 检测,标本采集后于 4℃ 保存,核酸管采集后 < 4 h 离心(1 600 g, 15 min); 2) 跟踪标本: 对献血者后续跟踪,通过静脉留样,标本的采集后处理同常规筛查标本; 3) 回溯标本: 实验室存档的重复献血者血样标本,血浆量为 0.5 mL, -20℃ 保存。

1.2 研究对象的跟踪与回溯 参照文献^[15]方法。

1.3 无偿献血者血液常规筛查 1) 采集的血液标本应用 ELISA 方法作 2 次 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 和抗-TP 筛查 [HBsAg 所用为厦门新创和美国索灵试剂、抗-HCV 所用为厦门新创、上海科华、美国索灵和美国强生试剂、抗-HIV 所用为厦门新创第 3 代和法国伯乐第 4 代试剂、抗-TP 所用为厦门新创、北京吉比爱 and 北京万泰试剂,所有试剂均为批批检定合格;全自动加样系统为 AT2(瑞士 Hamilton)、RSP200(瑞士帝肯)和 EVO(瑞士帝肯),全自动酶联免疫检测分析系统为 FAME 24/20(瑞士 Hamilton)。2) 血液标本应用核酸检测系统采集的作 1 次 HBV、HCV、HIV 的核酸联合检测。全自动核酸检测系统为 Cobas s 201(美国罗氏)和 Procleix Tigris(美国诺华),所用试剂均为配套试剂且批批检定合格。

1.4 HBV 的鉴别与定量 对 NAT(+) ELIAS(-) 标本或其跟踪标本作鉴别试验(诺华 Procleix Tigris 及罗氏 Cobas Taqman 系统配套试剂);对确定为 HBV DNA(+) HBsAg(-) 标本测定病毒载量(罗氏 Cobas Taqman HBV DNA 试剂)。

1.5 HBV 血清学标志物 采用电化学发光方法测定 HBV DNA(+) HBsAg(-) 标本以及跟踪或回溯标本的抗-HBe、HBsAg、抗-HBs、HBeAg 和抗-HBe(罗氏 Cobas e 411 系统及配套试剂)。

1.6 pre-S/S 区的基因调取和克隆测序 对 NAT(+) ELIAS(-) 的标本或其跟踪标本采用磁珠法 HBV DNA 提取试剂盒(北京万泰)提取 HBV 基因组,操作按试剂盒说明书;采用半巢式聚合酶链反应(semi-nested PCR)扩增 pre-S/S 区的基因片段,外引物序列为 Kp2356sF(5'-TCCgCTAgAgATCTgg-TACCATggCAggTCCCCTAgAAgAAgAACT-3')和 Hd1627R(5'-TCTTATCTAgAAgCTTgCgTTCACggTggTCTCCATgC-3'),第 1 轮 20 μL 扩增体系含模板 DNA 5 μL,配液终浓度为 0.4 mmol/L dNTP,0.2 μmol/L 引物,0.05 U/μL LA Taq(Takara),扩增程序为 95℃ 4min,94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 3 min,35 个循环,72℃ 10 min;内引物序列为 Kp2356sF 和 Hd1599sR(5'-TCTTATCTAgAAgCTTACAgAgTgAAgCgAAgTgCACACgg-3')。

第 2 轮 50 μL 扩增体系含模板(上一轮产物) 2 μL,除扩增程序变更为 25 个循环,其他同第 1 轮。第 2 轮 PCR 产物鉴定阳性后用 DNA 纯化回收试剂盒(北京 Tiangen 公司)纯化目的片段,然后克隆至 pMD18-T 载体并测序,克隆和测序工作由 Invitrogen(上海)公司完成。

1.7 OBI 的确定标准 确定 OBI 献血者需同时满足: 1) 其血液标本的常规筛查结果为 NAT(+) ELIAS(-); 2) ≥ 2 种不同来源的献血者标本检出 HBV DNA(包括 HBV 鉴别试验、HBV 病毒定量试验和半巢式 PCR),不同来源的标本包括同一时间采集的不同标本(2 支核酸管或血袋血浆)和不同时间采集的跟踪标本; 3) 其血液标本、跟踪标本和回溯标本的血清学结果(电化学乙肝两对半)前后没有明显变化。

1.8 核酸序列和氨基酸序列分析 使用 NCBI 病毒基因分型系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/form.page.cgi>)对测序结果作 HBV 基因分型;从 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=HBV+CHINA>)中随机挑取国内野生型 HBV 序列作为对照组序列,B 型(n=5)序列编号: EU935841、FJ032353、FJ754235、HQ692786 和 JF290201; C 型(n=20)序列编号: AB205123、DQ089793、DQ478899、DQ478900、EU306723、EU439015、EU916240、EU916241、EU939652、FJ032345、FJ386576、FJ386627、FJ562232、FJ562340、FJ653655、GQ261941、HQ692765、JF290195、JQ268594 和 JQ317590。使用 MEGA 5.2 对标本序列与对照序列作核苷酸和氨基酸的比对分析。

1.9 统计学分析 使用 SPSS 13.0 统计软件对所得到的数据作统计分析,采用两独立样本的非参数检验(nonparametric Mann-Whitney test)来分析 OBI 组与野生型对照组氨基酸序列的差异,P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OBI 的确认 2010 年 12 月 2 日 - 2013 年 5 月 31 日,本中心共筛查了 121 954 名无偿献血者,总计 158 232 份血液标本;其中男 74 693 名、女 47 261 名;重复献血者 59 569 名、首次献血者 62 385 名。根据 OBI 的确认标准,综合血清学和 NAT 结果,共确定了其中的 69 份为 OBI(表 1),流行率为 1:2 293(69/158 232)。对于 69 位 OBI 献血者的确认做了多次跟踪和回溯性检测,平均跟踪或回溯次数为 1.6 ± 0.8(1 - 5)次,平均时间跨度为(224 ± 189)(13 - 867) d。OBI 人群的男性比例高于其在总体人群中的比例(P < 0.01)。

2.2 OBI 标本的 pre-S/S 区基因的序列分析 69 份 OBI 标本的 pre-S/S 区基因半巢式 PCR,成功扩增、克隆测序和分型 41 份: B 型 6 份、C 型 34 份、D 型 1 份(表 2)。其中有 5 份序列存在缺失或提前终止: B 型中 DL10 在 pre-S2 区存在 15 个碱基的缺失(nt 2-46); C 型中 DL40 在 pre-S1 区有 6 个碱基的缺失(nt 3112-3117),DL57 缺失 pre-S2 区的起始密码子(nt 3205-3207),DL28 在 pre-S2 区有 21 个碱基的缺失(nt 35-55),DL112 在 pre-S1 区存在无义突变(nt 3157 的 C 置换为 T 形成终止密码子)。将核酸序列翻译成氨基酸序列,对实验组与对照组(HBsAg+)做同基因型间的变异分析(由于 D 型只有 1 份标本序列,故实际参与分析的标本序列共 40

份): 无论是 B 还是 C 型, 变异主要体现在 S 区 ($P < 0.05$ 或 < 0.01) (表 3 图 1)。主要变异位点为 B 型的 V14G/A (3/6)、Y161F/S (3/6)、V168A (3/6)、P217L (3/6) 和 C 型的 E2G/A/V (8/34)、T118R/K/A/M (13/34)、P127T/L/H/S (8/34)、E164D/G (8/34)、L175S (9/34)、S174N (8/34)。

表 1 常规筛查人群与 OBI 人群的情况特征

		总筛查人数(%) (n = 121 954)	OBI 数(%) (n = 69)
性别	男	74 693(61.2)	58(84.1)
	女	47 261(38.8)	11(15.9)
献血者类型	重复献血者	59 569(48.8)	42(60.9)
	首次献血者	62 385(51.2)	27(39.1)

注: OBI 人群的男性比例高于总献血人群中 $\mu = 3.828$ $P < 0.05$

表 2 69 名 OBI 献血者的检测及跟踪与回溯检测情况

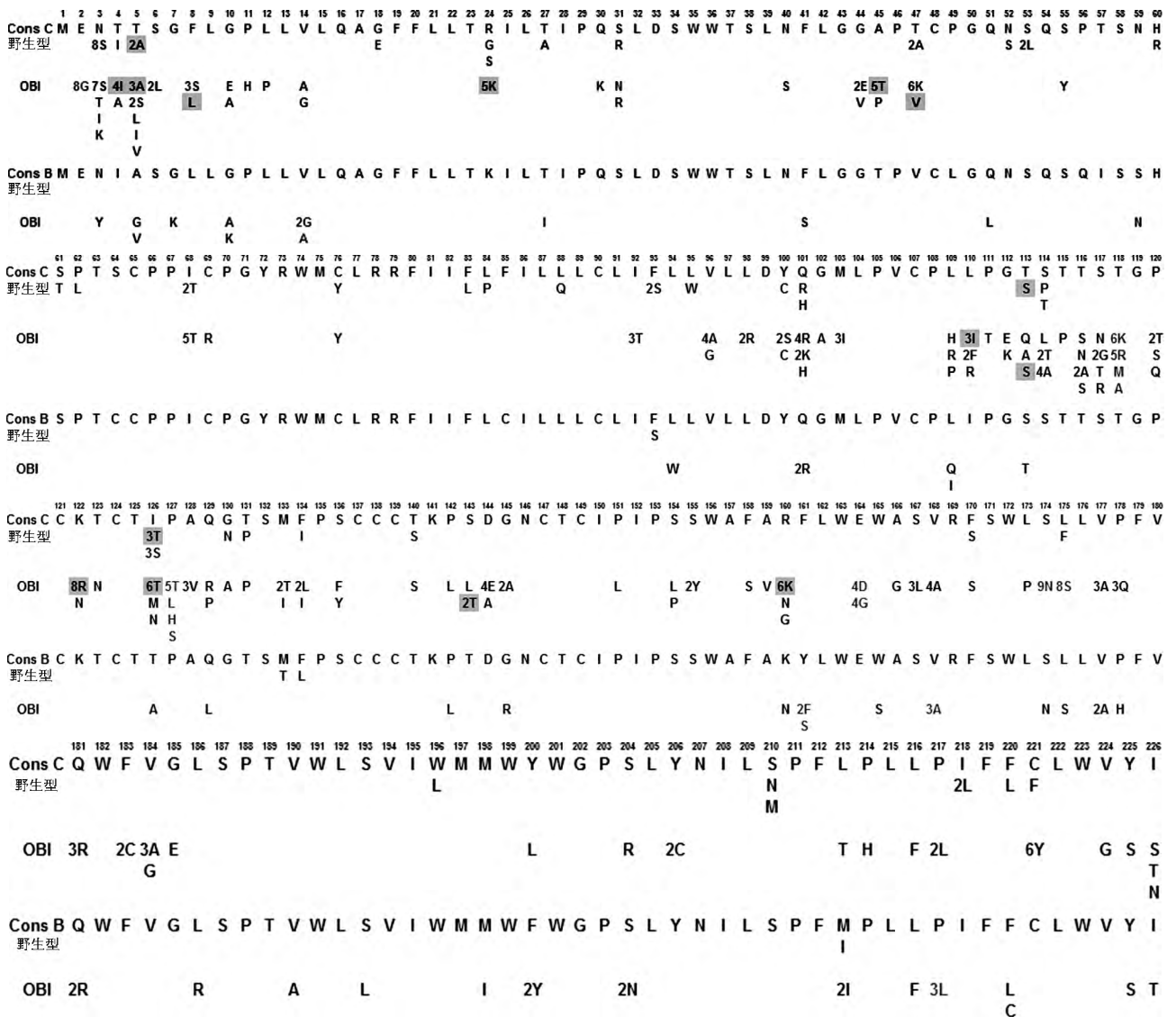
序号	试验编号	核酸鉴别	核酸定量(IU/mL)	半巢式 PCR	基因型	抗-HBs(IU/L)	抗-HBc	HBeAg(COI)	抗-HBe	跟踪(回溯)(次)	跟踪(回溯)(d)
1	DL001	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	2	92
2	DL003	HBV	ND	-	/	17.08	+	-	-	5	867
3	DL004	HBV	<20	+	C	18.85	+	-	+	2	127
4	DL005	HBV	ND	-	/	1000	+	-	+	2	284
5	DL006	HBV	<20	+	D	-	+	-	-	3	270
6	DL009	HBV	<20	+	C	52.21	+	-	+	1	186
7	DL010	HBV	<20	+	B	-	+	-	+	3	168
8	DL014	-	ND	+	/	577.1	+	-	-	3	726
9	DL022	HBV	/	+	C	10.6	+	-	-	2	419
10	DL025	HBV	/	-	/	146.5	+	-	-	3	447
11	DL027	HBV	<20	+	B	-	+	-	+	1	22
12	DL028	HBV	<20	+	C	-	+	-	-	(1)	(-356)
13	DL029	HBV	ND	+	/	441	+	-	-	(1)	(-207)
14	DL030	HBV	<20	+	C	-	+	-	-	1	71
15	DL032	HBV	<20	+	B	36.53	-	-	-	3	358
16	DL033	HBV	330	+	C	441.6	+	80.21	-	(1)	(-271)
17	DL040	HBV	<20	+	C	31.25	+	-	+	1	20
18	DL041	HBV	<20	+	C	12.94	+	-	-	1	77
19	DL042	HBV	<20	-	/	11.03	+	-	-	1	77
20	DL043	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	1	15
21	DL046	HBV	ND	+	B	-	+	-	+	2	368
22	DL047	HBV	/	-	/	86.5	+	-	-	1	399
23	DL048	HBV	<20	+	C	179.7	+	-	+	1	350
24	DL049	HBV	<20	+	C	-	+	-	-	3	421
25	DL051	HBV	ND	+	/	5.29	+	-	+	2	534
26	DL052	HBV	<20	+	C	65.1	+	-	+	1	101
27	DL054	HBV	22.7	+	C	40.1	+	-	-	1	97
28	DL055	HBV	<20	+	C	-	+	-	-	(1)	(-495)
29	DL057	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	2	273
30	DL060	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	2	296
31	DL061	HBV	<20	+	C	94.35	+	-	+	3	168
32	DL064	-	ND	+	C	24.7	+	-	-	2	608
33	DL067	HBV	<20	+	C	91.07	+	-	-	1	161
34	DL068	HBV	<20	+	C	12.31	+	-	+	1	163
35	DL069	HBV	<20	+	C	24.4	+	-	-	1	310
36	DL070	HBV	ND	+	/	43.19	-	-	-	1	196
37	DL072	HBV	<20	+	B	-	+	-	-	2	136
38	DL076	HBV	/	+	/	-	+	-	-	(1)	(-403)
39	DL078	HBV	/	+	/	331.2	+	-	+	1	393
40	DL079	-	<20	-	/	53.54	-	-	-	2	523
41	DL081	-	ND	+	/	180.2	+	-	-	1	253
42	DL082	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	1	107
43	DL083	HBV	ND	+	/	86.16	+	-	-	2	104
44	DL084	HBV	23.6	+	C	-	+	-	-	1	82
45	DL085	HBV	ND	-	/	33.31	+	-	+	2	226
46	DL088	HBV	162	+	C	-	+	-	+	1	70
47	DL090	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	(1)	(-769)
48	DL091	-	ND	+	C	-	+	-	-	1	97
49	DL093	HBV	ND	+	C	37.55	+	-	+	3	211
50	DL096	-	ND	+	/	-	+	-	+	(1)	(-192)
51	DL097	HBV	ND	+	/	-	+	-	+	3	209
52	DL098	-	ND	+	/	-	+	-	+	1	13

(接下页)

(续上页)

序号	试验编号	核酸鉴别	核酸定量(IU/mL)	半巢式 PCR	基因型	抗-HBs(IU/L)	抗-HBc	HBeAg(COI)	抗-HBe	跟踪(回溯)(次)	跟踪(回溯)(d)
53	DL099	HBV	<20	+	C	52.8	+	-	-	1	102
54	DL100	HBV	<20	-	/	27.73	+	-	-	2	162
55	DL102	HBV	155	+	C	77.9	-	-	-	1	108
56	DL104	-	ND	+	/	29.98	+	-	-	2	147
57	DL107	HBV	<20	+	B	-	+	-	+	1	48
58	DL108	-	ND	+	/	5.72	-	-	-	1	46
59	DL109	HBV	27.6	+	C	37.5	+	-	-	1	35
60	DL110	HBV	<20	+	/	-	+	-	+	1	51
61	DL111	HBV	ND	+	C	15.6	+	-	-	2	97
62	DL112	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	1	96
63	DL113	HBV	<20	+	C	-	+	-	+	1	88
64	DL115	-	ND	+	/	-	+	-	+	1	67
65	DL116	HBV	<20	+	/	65.97	+	-	-	1	42
66	DL120	-	ND	+	/	20.47	+	-	+	1	39
67	DL123	-	ND	+	/	150.6	+	-	+	1	233
68	DL127	HBV	<20	+	/	32.86	-	-	-	1	78
69	DL128	-	/	+	/	72.22	-	-	-	1	184

注:表格中将原始血液标本和跟踪标本的 NAT 结果做了整合,血清学结果以最后一次检测为准;ND = not detected;回溯天数为负值表示重复献血者当次献血日期回推到前 1 次献血日期之间的天数



■ 基因型或血型相关的氨基酸变异

图 1 OBI 组与野生型组在 S 区基因的变异分布情况

表 3 OBI 感染者与野生型对照组(HBsAg +) 在 pre-S/S 区氨基酸序列的差异性(基因型 B 和基因型 C)

基因区	OBI _B (n = 6)	HBsAg + (n = 5)	Mann-Whitney U	P	OBI _C (n = 34)	HBsAg + (n = 20)	Mann-Whitney U	P
Pre-S1	4. 0 (2 - 9)	0. 2 (0 - 1)	0. 000	0. 005	2. 6 (0 - 7)	1. 9 (0 - 7)	243. 500	0. 078
Pre-S2	2. 0 (0 - 6)	0. 4 (0 - 1)	6. 500	0. 095	1. 6 (0 - 12)	0. 8 (0 - 2)	302. 000	0. 473
S	9. 5 (1 - 15)	0. 8 (0 - 3)	1. 500	0. 013	8. 5 (0 - 27)	3. 0 (0 - 8)	174. 000	0. 003
MHR	3. 0 (0 - 5)	0. 4 (0 - 2)	4. 000	0. 033	4. 4 (0 - 15)	0. 8 (0 - 4)	155. 000	0. 001

注: OBI 组与野生型对照组的氨基酸序列比较, 表中的数据为组内序列与参照序列氨基酸替换数的平均值, 括号内是替换数的范围; MHR 是 S 区基因的主要亲水区

3 讨论

本次筛查得出大连地区无偿献血者 OBI 流行率为 1: 2 293 (69/158 232), 高于中国东南部地区(除上海) 和国外东南亚地区的流行率^[2-5]。本地区 OBI 献血者的血清学特征以抗-HBc(+) 为主, 占 89. 9% (62/69), 且抗-HBs 多低于 100 IU/L (60/69), 未发现有全阴性的 OBI 标本(表 2), 与其他国内外学者的研究数据存在差异^[2, 4, 9]。69 份 OBI 中共得到 41 份 pre-S/S 区的基因序列, 基因型以 C 型和 B 型为主, 分别占 82. 9% (34/41) 和 16. 3% (6/41), 另外还 1 份为 D 型; 证实了中国、日本和东南亚地区 HBV 基因型分布以 B 和 C 型为主, 而 D 型在世界各地广泛分布, 在国内, B 型主要分布在南方地区, 而北方则主要为 C 型^[3, 16, 17]。

HBV 基因组的 pre-S/S 区基因由 pre-S1、pre-S2 和 S 共 3 个区域组成, 3 区都有各自的起始密码子, 但共同合用 5 端的终止密码子, 其中 S 区含有 HBsAg 决定簇基因, 引起机体产生保护性免疫, 因此 S 区基因的变异对于研究 OBI 的产生具有重要意义^[12, 13]。S 区基因的主要亲水区(MHR, 99 - 169 AA) 和“a”决定簇(124 - 147 AA) 被认为是相对保守区域, 但 OBI 人群中该区域的变异明显^[4, 10, 11, 14, 22]。已有研究认为 OBI 标本序列在 MHR 的多样性可能与机体的免疫作用相关, 且对于不同基因型, 变异程度也存在差别, B 和 C 型的变异低于 D 型, 与 A2 型接近, 高于 A1 型^[4, 20-22]。我们将 B 型 OBI (n = 6) 与野生型对照组 (n = 5) 比较, 从整体的突变情况看, 在 pre-S1 区变异明显 (P < 0. 01) (表 3), 但是这种变异都是在随机位点产生; 而在 S 区, 无论是从整体还是从单个位点, B 和 C 型的 OBI 序列中都存在明显的变异特征(图 1)。由此推测 S 区的变异与 OBI 产生存在相关性。目前报道的 S 区变异位点主要有: G119R、C121Y、C124R/Y/S、I/T126N/S/L、Q129R/N/P/H、G130N、T131N、M133I/T、S136P、C137W、C139R、T140I、K141E、D144A/E/G、G145R/A/D/K^[4, 10, 11, 14, 22], 其中以 G145R 变异最受关注, G145R 是 1 个典型的疫苗免疫逃逸突变, 同时也对 HBsAg 免疫检测试剂反应性有较大影响^[14, 22], 可能是“假”OBI 产生的主要因素。所谓“假”OBI 是指检测结果同样为 HBV DNA(+) HBsAg(-) 的感染, 但由于感染后 S 区发生免疫逃逸突变, 使 HBsAg 的结构发生改变从而导致现有商品试剂盒无法检出, 造成假阴性结果^[1]。本组中只有 1 份 OBI 序列发生了 G145R, 可以间接地说明研究序列中没有或很少存在“假”OBI。另外, 本组 OBI 的主要变异位点与其他学者发现的位点^[4, 10, 11, 14, 22] 也不相同, 而且这些位点在 B 和 C 型之间没有重叠, 说明 S 区的变异具有本地区的独特性, 且这种独特性与 OBI 的发生机制存在的关联, 同时这种关联受基因型的影响。

本研究仍有不足和需要改进的地方: 1) 由于 OBI 人群血浆中的病毒载量过低, 82. 6% (57/69) 的 OBI 标本病毒定量无法检出或 < 20 IU/mL, 最终只有 59. 4% (41/69) 的标本获得基因序列。为了获得更多 OBI 献血者的基因序列, 可以扩大研究标本量同时提高基因的提取和扩增效率; 采用超速离心等技术^[18, 19] 对标本中病毒富集, 从而提高 HBV 基因组提取效率; 设计多组特异性引物做巢式 PCR, 防止由于引物结合位点发生变异导致的扩增失败, 从而提高扩增的灵敏度和特异性。2) 一些学者认为 OBI 中 C 型的比例要高于 HBsAg 阳性感染者, C 型与 OBI 的发生机制存在相关性^[3, 14]; 然而虽然本组中 C 型 OBI 比率最高, 但无法确定该结果是受地域影响还是由这种相关性引起。序列比对中的对照组为 Genbank 上随机挑取的国内野生型 HBV 序列, 希望在今后的研究中同时加入本地区的 HBV DNA(+) HBsAg(+) 献血者对照组, 这样可以更准确地阐明献血者中 OBI 人群和野生型人群的血清学和基因学特征, 也可以验证基因型与产生 OBI 是否存在相关性。同时, 为了进一步研究 OBI 的发生机制和验证本研究中的推测, 仍需要更多的实验研究来证实, 在今后的研究中可以结合基因表达和单克隆抗体技术, 更深入和透彻地探究 OBI 的发生与 HBV 表达、分泌和免疫逃逸的关系。

总之, 大连地区献血者 OBI 在 HBV 基因组 S 区的氨基酸序列存在多个位点的变异, 这些变异与 OBI 的产生存在某种关系, 且这种关系受基因型的影响。

参 考 文 献

- [1] Raimondo R, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol, 2008, 49(4): 652-657.
- [2] Zheng X, Ye X, Zhang L, et al. Characterization of occult hepatitis B virus infection from blood donors in China. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1730-1737.
- [3] Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 357-362.
- [4] Candotti D, Lin CK, Belkhir D, et al. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence. Gut, 2012, 61(12): 1744-1753.
- [5] 邹峥嵘, 谢云峥, 伍晓菲, 等. 上海地区无偿献血者乙型肝炎病毒隐匿性感染情况和突变分析. 中国输血杂志, 2013, 26(8): 701-704.
- [6] de la Fuente RA, Gutiérrez ML, Garcia-Samaniego J, et al. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol, 2011, 17(12): 1543-1548.
- [7] 王东, 于原, 臧亮, 等. 单人份核酸检测在血液乙型肝炎病毒筛

- 查中的应用. 国际检验医学杂志 2012 33(7):780-781.
- [8] 倪宏英, 欧山海, 谢金镇, 等. 不同核酸检测方法对献血者隐性乙型肝炎病毒感染的研究. 中国输血杂志 2011 24(12):1044-1047.
- [9] Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile M, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*, 2013 53(7):1405-1415.
- [10] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol*, 2012 57(4):720-729.
- [11] Kim H, Lee SA, Kim DW, et al. Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C. *PLOS One*, 2013 8(1):e54486.
- [12] 荣义辉, 辛绍杰. 乙型肝炎病毒 S 区基因变异研究进展. *肝脏*, 2013 18(11):779-781.
- [13] Chang MH. Hepatitis B virus infection. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2007 12(3):160-167.
- [14] 陈长荣, 袁权, 葛胜祥, 等. 无偿献血者中隐性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析. *病毒学报* 2009 25(3):178-184.
- [15] 万新, 邓雪莲, 梁晓华, 等. 大连市血液中心 HBsAg 阴性献血者 HBV 感染的确认与 HBV 核酸检出效率的评估. *中国输血杂志* 2014 27(3):268-273.
- [16] Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004 47(6):289-309.
- [17] Liu Y, Wang J, Huang Y, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in blood donors from five Chinese blood centers. *Arch Virol*, 2012 157(9):1699-1707.
- [18] Milborrow HM, Burneet L, Lowe SB, et al. Rapid method for the concentration of hepatitis B virus particles using Beckman airfuge. *J Clin Pathol*, 1986 39(7):808-809.
- [19] Sanyal D, Kudesia G, Corbitt G. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to HBe antigen and anti-HBe status. *J Med Microbiol*, 1991 35(5):291-293.
- [20] Allain JP, Belkhir D, Vermeulen M, et al. Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors. *Hepatology*, 2009 49(6):1868-1876.
- [21] Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. *J Hepatol*, 2008 49(4):537-547.
- [22] 黄象艳. 乙型肝炎病毒 pre-S/S 基因突变与异常血清学诊断模式的相关性研究. 第二军医大学 2009.

(2014-04-03 收稿 2015-01-09 修回)

本文编辑: 蔡辉

• 论著 •

硝普钠对高原献血者储存末期红细胞质量影响的初步研究

张警丹^{1#} 刘华^{2#} 李晓娟^{2#} 王红¹ 钟锐¹ 闫东¹ 贺曾¹ 岗拉多美² 刘嘉馨^{1△}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所 四川 成都 610052; 2. 西藏自治区血液中心)

摘要: 目的 探讨添加一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)对储存末期42 d的高原献血者悬浮红细胞和分层红细胞各项指标的影响。方法 采自西藏4人份健康献血者血样(400 mL/份),制成悬浮红细胞后保存42 d,将每份悬浮红细胞取出分作2等份,分别归入实验组:使其终浓度为10 μmol/L的SNP溶液;对照组:加与SNP等体积的等渗PBS;置于室温下孵育1 h后检测红细胞的变形性、ATP含量、渗透脆性和胞膜上PS、CD47阳性表达率,用Percoll细胞分离液配置不同浓度(1.091、1.0985、1.106、1.113 5、1.121 g/mL)作密度梯度离心后,依次吸取各层红细胞并检测上述指标。结果 储存末期高原悬浮红细胞未分层各项指标:胞膜PS阳性表达率,实验组与对照组分别为2.18 ± 0.40 vs 3.05 ± 0.24 ($P < 0.05$)。其他各项指标2组差异甚小($P > 0.05$)。经密度梯度离心后,分离出的4层红细胞中2-4层为可用的红细胞层,PS阳性表达率2、3层细胞,实验组与对照组分别为1.95 ± 0.57 vs 2.3 ± 0.57、2.23 ± 0.39 vs 2.83 ± 0.45 ($P < 0.05$)。4层细胞2组无明显差异($P > 0.05$);在100、200剪切率下EI值、胞内ATP含量、渗透脆性NaCl浓度、胞膜上CD47阳性表达率3层红细胞中实验组与对照组分别为0.131 ± 0.013 vs 0.110 ± 0.014、0.211 ± 0.018 vs 0.186 ± 0.022、2.753 ± 0.319 vs 2.190 ± 0.234、4.425 ± 0.180 vs 4.801 ± 0.081、52.13 ± 7.00 vs 49.23 ± 7.44 ($P < 0.05$)。2、4层红细胞中2组差异很小($P > 0.05$)。结论 添加适当浓度NO供体SNP对储存末期未分层高原献血者浓缩红细胞无明显影响,但对分层3层(中年)红细胞有明显改善作用。

关键词: 一氧化氮供体; 硝普钠; 红细胞; 储存末期; 高原; 密度梯度离心

中图分类号: R331.1⁺41 R457.1⁺2 文献标识码:

A 文章编号: 1004-549X(2015)1-0031-06

doi: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2015.01.010

△通信作者: 刘嘉馨(1964.04-) 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事生物医学工程、血液保存、血液代用品研究, 电话: 028-68769102, Email: jxliu8122@vip.sina.com