

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32620121150537

UDC_____

厦 门 大 学

硕士学位论文

西藏林芝地区藏族人群乙型肝炎病毒血清
及分子流行特征研究

Serological and Molecular Characterizations of Hepatitis B
Virus Infection among Tibetan Population in Tibet Nyingchi
of China

指导教师姓名: 俞海 讲师

专业名称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2015 年 5 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)的研究成果,获得(该)课题(组)经费或实验室的资助,在(该)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 林林林

2015 年 5 月 25 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 

2015年5月15日

摘要

背景：乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染可以引起肝脏损害，并可以持续慢性感染，HBV 长期慢性感染会造成肝硬化、原发性肝癌等失代偿性终末期肝病，从而导致死亡，是我国乃至全球最重要的公共卫生问题之一。西藏自治区地处我国西北部，早期研究认为其属于 HBV 高流行地区，但目前对该地区 HBV 流行病学以及分子特征研究较少。为了解西藏自治区慢性乙型肝炎等重要传染病的流行情况和 HBV 的分子流行病学现状及特征，本研究于 2012 年通过血清流行病学调查，研究西藏林芝地区全年龄人群慢性乙型肝炎等重要传染病尤其是 HBV 感染的流行现状和影响因素，评价该地区慢乙肝防治效果，并为其进一步制定预防和控制慢乙肝流行的策略提供科学依据。

结果：本研究在西藏林芝地区常住人口中采集到 1945 份血清样本，其中在 1892 份有效样本中，共检测出 256 份样本为 HBsAg 阳性，阳性率为 13.49%；1413 份样本为 Anti-HBc 阳性，阳性率为 74.37%。调查人群中男性 HBsAg 阳性率、Anti-HBc 阳性率分别为 13.89%、73.63%，女性人群阳性率分别为 13.19%、75.05% 均无显著差异 ($\chi^2=0.201$, $p=0.654$; $\chi^2=0.499$, $p=0.480$)。对比 1992 年和 2006 年开展的全国范围的病毒性肝炎血清流行病学调查结果，我国西藏地区的 HBsAg 携带率呈下降的趋势，但下降速度远不及中国其他地区。本研究显示，西藏林芝地区目前仍为 HBV 高流行区。自 2003 年西藏地区普及乙肝疫苗免疫以来，小于 10 岁儿童 HBsAg 阳性率 5.71%，显著低于大于 10 岁人群。政府应采取扩大免疫人群等防治措施来控制乙肝流行。

为研究我国西藏林芝地区慢乙肝感染者 HBV 基因型及其分子流行病学特征，本研究从 256 份 HBsAg 阳性的样本中，选取 HBV DNA 定量大于 10^5 copies/mL 的样本，进行全长序列的调取、测序，共得到 73 株 HBV 全长序列，与 GeneBank 中的 HBV 参考株进行核苷酸序列同源性比对分析，并绘制系统发生树分析，得到 C 型为 5 株，C/D 重组型为 68 株，根据重组的区域不同又可分为 CD1 型（在 700 bp 左右处重组）和 CD2 型（在 1500 bp 左右处重组）。在 C/D 重组的序列中，CD1 和 CD2 两组比较：基本核心启动子 BCP A1762T/G1764A

的突变率无显著性差异($P=0.747$), 前 C 区 A1896 的突变在两基因型间也无显著性差异($P=0.585$)。本研究结果显示西藏林芝地区的乙型肝炎病毒的基因型主要为 CD1 和 CD2 重组型并了解了基因突变的基本情况, 为制定针对该地区的乙型肝炎预防控制策略和指导临床治疗提供了一定的参考依据。

另外, 由于 HBV 基因组各开放读码框高度重叠, 因此为了进一步研究该地区 HBV 的病毒学特征, 需要构建包含 1.1 倍以上的 HBV 基因组的质粒, 以实现在体外细胞模型中复制。传统构建 HBV1.1 倍体复制子的克隆方法涉及多步 DNA 酶切/连接, 操作复杂, 耗时较长。而本研究发展了一种基于新型克隆技术 Gibson Assembly 快速构建 HBV1.1 倍体复制子质粒的新方法, 在获得 HBV 基因组 DNA 后仅需一步体外装配操作即可完成。利用该技术, 成功从 4 份 HBV 感染者标本中获得 HBV1.1 倍体复制子, 并通过瞬时转染 Huh7 细胞, 证明其能够支持 HBV 的体外复制。本研究为从临床标本中快速获得 HBV 复制子克隆以研究病毒表型功能提供了更为高效的新方法。

综上所述, 本研究调查了西藏林芝地区慢乙肝感染的流行情况并研究了 HBV 感染的分子特征, 为深入了解西藏地区 HBV 感染并为其控制提供了必要的依据。同时发展了一种新型构建 HBV 1.1 倍体的方法, 为临床标本的功能研究提供了高效的方法。

关键词: 西藏林芝地区; 乙型肝炎病毒(HBV); 流行病学调查; 分子流行病学; 基因型; C/D 重组; 1.1 倍体; Gibson Assembly

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most important public health problems in our country and even worldwide. Long term chronic hepatitis B virus infection causes cirrhosis, hepatocellular carcinoma and other decompensated end-stage liver disease, even death. HBV infection is highly endemic in China, especially in remote areas such as Tibet of China with poor-quality health care and little local HBV information, however, studies for Tibetans on HBV seroprevalence and molecular epidemiology are limited so far. Therefore, the present study was carried out to investigate the epidemiology of prominent infectious diseases and molecular epidemiology, phylogeny and population dynamics of HBV, which is important for evaluating vaccination programs and national disease prevention and control efforts.

A total of 1945 serum samples were collected from Nyingchi area in this study. Of which 1892 samples were proved to be eligible to participate. Serum samples from participants were tested for HBsAg and antibody against hepatitis B core antigen (Anti-HBc). 256 samples (positive rate:13.49%) among them were HBsAg-positive, while anti-HBc were tested from 1413 samples (positive rate:74.37%). Prevalence of HBsAg-positive and anti-HBc-positive among males were 13.89% and 73.63%, respectively. Prevalence of HBsAg-positive and anti-HBc-positive among males were 13.19% and 75.05%, respectively ($\chi^2=0.201$, $P=0.654$; $\chi^2=0.499$, $P=0.480$). Compared to two epidemiological survey results of hepatitis B virus infection in China in 1992 and 2006, the prevalence of HBsAg-positive was decreased year by year in Tibet, however, the rate of decay fall far behind other districts in China. Our study result suggested that, Nyingchi area in Tibet is still a high popularity for HBV infection. After carrying out hepatitis B vaccine immunization in Tibet in 2003, the HBV infection among children was significantly lower than adults. Therefore, the government should devote greater effort on HBV vaccination to decrease the HBV

prevalence.

The present study was carried out to investigate the molecular epidemiology, phylogeny of HBV based on 256 HBV-infected patients. A total of 73 sequences from 256 samples and 8 references sequences representing different genotypes of HBV were aligned for phylogenetic tree reconstruction using the NJ method. Seventy-three samples containing 5 haplotypes belonged to genotype C and 68 belonged to C/D recombinant; no other genotypes were identified in this study. Among the 68 C/D recombinant isolates, two types of C/D recombinant were identified: 44 belonged to 'CD1' and 24 belonged to 'CD2'. The differences were not significant between Tibetans with HBV/CD1 and HBV/CD2 in the pre-core stop mutation(A189G) ($P=0.747$), as well as in the double mutations in the core promoter(T1762/A1764) ($P=0.585$). The further analysis across the genome has proved that the majority genotype of HBV was C/D hybrid and investigated the prevalence of mutations.

HBV has a highly compact genetic organization, that is why the replication-competent genome which can fulfill the entire HBV lifecycle in vitro is arranged as an over 100% head to tail DNA genome, at least 1.1 copies of HBV genome. There always concludes several times of restriction enzyme digestion and connection in the traditional construction methods, leading to the steps of previous methods are cumbersome and time consuming. In this report, we develop a novel strategy based on Gibson Assembly and result in a fast and convenient method which just needs one step to complete the construction after HBV DNA obtained. In this method, we successfully constructed 4 1.1-fold-overlength genome plasmids directly extracted from serum specimens and confirmed the plasmid is replication-competent by transfecting in Huh7 cells. This new strategy simplifies the construction procedures and result in a fast and high-efficiency method which is especially suitable to be applied in clinical samples.

In summary, the present study investigated the epidemiology and molecular epidemiology of HBV, which is important for national disease prevention and control efforts. Besides, This study developed a fast and high-efficiency method which is

especially suitable to be applied in clinical samples.

Key words: Nyingchi Area of Tibet; Hepatitis B virus (HBV); Epidemiologic survey; Molecular epidemiology; Genotypes; C/D recombinant; 1.1-fold-overlength genome; Gibson Assembly

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略词

Anti-HBs: Antibody against Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗体

Anti-HBe: Antibody against Hepatitis B e Antigen, 乙型肝炎病毒 E 抗体

Anti-HBc: Antibody against Hepatitis B Core Antigen, 乙型肝炎病毒核心抗体

ALT: Alanine Aminotransferase, 谷丙转氨酶

bp: base pair, 碱基对

CLEIA: Chemiluminescent Enzyme-Linked Immunoassay, 酶联免疫化学发光检测

CLIA: Chemiluminescent Immunoassay, 化学发光免疫检测

CHB: Chronic Hepatitis B Virus Infection, 慢性乙型肝炎病毒感染

DMSO: Dimethyl Sulfoxide, 二甲亚砜

DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸

DNAP: Hepatitis B Virus DNA Polymerase, 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶

ENH: HBeAg-negative Hepatitis, E 抗原阴性的肝炎

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定

FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清

FDA: Food and Drug Administration, 美国食品及药品管理局

HBsAg: Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原 (主蛋白)

HBx: Hepatitis B Virus X Protein, 乙型肝炎病毒 X 蛋白

HBeAg: Hepatitis B e Antigen, 乙型肝炎病毒 E 抗原

HBcAg: Hepatitis B Core Antigen, 乙型肝炎病毒 Core 抗原

HBV: Hepatitis B Virus, 乙型肝炎病毒

HCV: Hepatitis C Virus, 丙型肝炎病毒

HEV: Hepatitis E Virus, 戊型肝炎病毒

HIV: Human Immunodeficiency Virus, 人类免疫缺陷病毒

IT: Immune Tolerance Phase, 免疫耐受期

IC: Immune Clearence Phase, 免疫清除期

IgG(M): Immunoglobulin G(M), IgG 抗体 (IgM 抗体)

IFN: Interferon, 普通干扰素

LR: Low-Replicative Phase, 低复制期

LC: Liver Cirrhosis, 肝硬化

L-HBsAg: Middle Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原（大蛋白）

MAb: Monoclonal Antibody, 单克隆抗体

MHR: Major Hydrophilic Region, 乙型肝炎病毒表面抗原主要亲水区

M-HBsAg: Middle Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原（中蛋白）

mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA

NBS: Newborn bovine serum, 新生牛血清

PCR: Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

PEG: Polyethylene Glycol, 聚乙二醇系列

RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸

VR: Virological Response, 病毒学应答

VLP: Virus-Like Particle, 类病毒颗粒

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
缩略词.....	VI
第一章 前言.....	1
1 乙型肝炎病毒.....	1
1.1 嗜肝 DNA 病毒科.....	1
1.2 HBV 的病毒结构.....	1
1.3 HBV 的基因组结构.....	2
1.4 HBV 基因的编码蛋白.....	4
1.5 HBV 的生命周期.....	9
2 乙型肝炎病毒的流行病学特征.....	10
2.1 HBV 流行病学研究情况.....	10
2.2 HBV 分子流行病学研究情况.....	15
2.3 HBV 感染的自然史.....	20
2.4 慢性 HBV 感染的转归.....	23
3 实验室研究进展.....	24
3.1 HBV 感染的临床诊断.....	24
3.2 HBV 研究模型.....	26
3.3 HBV 复制子克隆构建方法.....	27
4 本研究的思路、目的及意义.....	29
4.1 西藏林芝地区重要传染病的流行病学调查.....	29
4.2 西藏林芝地区的乙型肝炎的分子流行病学特征.....	29
4.3 用 Gibson Assembly 的方法构建乙肝 1.1 倍体.....	30
第二章 材料与方法.....	32
1 材料.....	32
1.1 主要仪器.....	32

1.2 主要试剂与材料.....	33
1.3 常用溶液及培养基配制.....	35
2 方法.....	38
2.1 分子克隆.....	38
2.2 酶联免疫吸附法(ELISA)及化学发光酶联免疫分析(CLEIA).....	40
2.3 HBV DNA 全基因组序列的获取.....	43
2.4 1.1 倍基因组克隆的构建.....	44
2.5.真核细胞表达与检测.....	47
第三章 结果与分析.....	51
第一部分：米林县藏族人群重要传染病的流行情况.....	51
1 调查对象基本特征.....	51
2 重要传染病的流行情况.....	53
2.1 乙型肝炎病毒的流行情况.....	53
2.2 HCV 感染情况.....	60
2.4 HEV 感染情况.....	60
2.3 HIV 感染情况.....	62
3 第一部分小结.....	62
第二部分：HBsAg 阳性者乙肝病毒分子流行病学分析.....	64
1 HBV 全长基因扩增和序列鉴定.....	64
1.1 PCR 扩增结果.....	64
1.2 全基因序列测定.....	64
2 核苷酸序列的同源性分析.....	65
3 基因重组分析.....	68
4 CD1 和 CD2 的临床特征和病毒学特征.....	69
5 第二部分小结.....	70
第三部分：用 Gibson Assembly 的方法构建乙肝 1.1 倍体.....	71
1 利用 Gibson Assembly 构建质粒结果.....	71
1.1 PCR 扩增结果.....	71
1.2 PCR 鉴定结果.....	71

1.3 测序分析.....	72
2 构建质粒转染 Huh7.....	72
3 第三部分小结.....	74
第四章 讨论.....	75
1 流行病学特征.....	75
1.1 调查结果的代表性和真实性.....	75
1.2 西藏林芝地区人群乙肝病毒血清学流行现状和特征.....	76
2 分子流行病学特征.....	78
2.1 乙肝感染者的年龄构成.....	78
2.2 林芝地区 HBV 基因型情况.....	78
3 用 Gibson Assembly 构建 1.1 倍体.....	79
第五章 小结与展望.....	81
参考文献.....	82

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	III
Abbreviations	V
Chapter 1 Preface	1
1 Hepatitis B virus	1
1.1 Hepadnaviridae	1
1.2 Morphology and structure of HBV	1
1.3 Genome of HBV	2
1.4 Proteins of HBV.....	4
1.5 Life cycle of HBV.....	9
2 Epidemiologic characteristics of HBV	10
2.1 Epidemiologic study of HBV.....	10
2.2 Molecular epidemiology of HBV	15
2.3 Natural history and infection	20
2.4 Prognosis of Chronic Hepatitis B	23
3 Laboratory research progress	24
3.1 Clinical diagnosis of HBV infection.....	24
3.2 HBV research models	26
3.3 Construction methods of HBV replication-competent genome.....	27
4 The purpose and meaning of our research	29
4.1 Seropidemiologic research for HBV in Nyingchi of Tibet	29
4.2 Molecular Epidemiologic research for HBV in Nyingchi of Tibet.....	29
4.3 Construction for 1.1 copies of HBV with Gibson Assembly.....	30
Chapter 2 Materials and methods	32
1 Materials	32
1.1 Instruments.....	32
1.2 Reagent and supplies.....	33

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.