

# HBsAg 与 anti-HBs 共阳性慢性乙肝患者病毒 S 蛋白序列分析

申春梅, 唐思叶, 王妹芳, 贺乐奇

复旦大学附属上海市第五人民医院, 上海 200240

**摘要:** **目的** 分析慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者乙型肝炎病毒 S 蛋白序列突变与 HBsAg、anti-HBs 共阳性的相关性。**方法** 随机选择 33 例 HBsAg、anti-HBs 共阳性的 CHB 患者作为试验组, 随机选择 33 例 HBsAg 阳性而 anti-HBs 阴性的 CHB 患者作为对照组, 对乙型肝炎病毒 S 区基因进行扩增测序并进行序列分析。**结果** 两组感染的乙型肝炎病毒均为 B 或 C 基因型, 未见其它基因型; 两组在年龄、性别、HBV 基因型、血清 HBV DNA 水平上差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ); 试验组 S 蛋白在 N-端(2.61% vs. 1.21%)、主要亲水结构区域(1.69% vs. 0.48%)(major hydrophilic region, MHR)、特别是“ $\alpha$ ”决定簇(3.23% vs. 0.63%)的氨基酸突变率均显著高于对照组(均  $P < 0.01$ ), 但在 C-端(1.75% vs. 1.22%)氨基酸突变率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 试验组突变率最高的点是 S 蛋白的第 126 位氨基酸; 两组氨基酸插入和缺失突变差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** CHB 患者中 S 蛋白序列氨基酸的突变特别是“ $\alpha$ ”决定簇的突变可能与 HBsAg、anti-HBs 共阳性相关。

**关键词:** 乙型肝炎表面抗原; 乙型肝炎表面抗体; 共阳性; S 基因; 突变

**中图分类号:** R373.2<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1458-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.014

## Sequence of S protein in chronic hepatitis B patients with coexisting HBsAg and anti-HBs

SHEN Chun-mei\*, TANG Si-ye, WANG Mei-fang, HE Le-qi

\* Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200240, China

Corresponding author: HE Le-qi, E-mail: leqi\_he@126.com

**基金项目:** 上海市闵行区自然科学基金资助项目(2014MHZ040)

**作者简介:** 申春梅(1979-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事院感控制工作。

**通信作者:** 贺乐奇, E-mail: leqi\_he@126.com。

类别基本一致<sup>[3-7]</sup>, 但含量略低于国内河流中药物含量水平。

闽江流域福州段沿江两岸的内河污水、污水处理厂处理出水及居民生活污水以及工业废水等排放, 是抗生素污染的主要贡献者。闽江流域的水产养殖和畜牧业废水的排放已经成为闽江流域福州段水体抗生素污染的主要来源之一。目前, 闽江流域受抗生素污染的研究, 尚未见有人报道, 而受客观因素的影响, 本文仅进行 1 个丰、枯水期的调查研究, 且还是处于初阶段。随着闽江流域药物污染状况呈加重趋势, 其对生态风险和人体健康风险加大, 将继续对福州水环境水体中药物污染进行调查和研究, 掌握福州水环境水体中药物污染情况, 评估其对生态系统及人体健康的影响, 为治理闽江水域污染提供科学依据。

**参考文献**

[1] Yan JF, Yang GG, Zhou JL, et al. Spatial and seasonal distribution of se-

lected antibiotics in surface waters of the Pearl rivers, China [J]. J Environ Sci Health B, 2011(46): 272-280.

[2] Yang CX, Yang GG, Zhuo JL, et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment [J]. Environ Pollut, 2013, 175(1): 22-29.

[3] 高立红, 史亚利, 厉文辉, 等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法检测环境水样中 22 种抗生素类药物[J]. 色谱, 2010, 28(5): 491-497.

[4] 陆克祥, 隋铭皓, 高乃云, 等. 固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱测定水中 19 种抗生素[J]. 分析测试学报, 2010, 29(12): 1209-1214.

[5] 叶计册, 邹世春, 张干, 等. 典型抗生素药物在珠江三角洲水体中污染特征[J]. 生态环境, 2007, 16(2): 384-388.

[6] 孙广大, 苏仲毅, 陈猛, 等. 固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱同时分析环境水样中四环素和喹诺酮类抗生素[J]. 色谱, 2009, 27(1): 54-58.

[7] 薛保铭, 杨惟薇, 王英辉, 等. 钦州湾水体中磺胺类抗生素污染特征与生态风险[J]. 中国环境科学, 2013, 33(9): 1664-1669.

收稿日期: 2018-04-04

**Abstract: Objective** To analyze the correlation between the mutation of S protein sequence of hepatitis B virus (HBV) and the coexistence of HBsAg and anti-HBs in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Thirty-three CHB patients with coexisting HBsAg and anti-HBs were randomly selected as the experimental group, and 33 CHB patients with HBsAg positive but anti-HBs negative as the control group. The S gene of HBV was amplified and sequenced. **Results** HBV in the two groups was B or C genotype, without other genotypes. No statistically significant differences were observed in age, gender, HBV genotype and serum HBV DNA level between the two groups (all  $P>0.05$ ). The amino acid mutation rates in the N-terminal (2.61% vs. 1.21%), major hydrophilic region (1.69% vs. 0.48%), especially "α" determinant (3.23% vs. 0.63%) of S protein were significantly higher in the experimental group than in the control group (all  $P<0.01$ ), but no statistically significant difference was found in the amino acid mutation rate in the C-terminal of S protein (1.75% vs. 1.22%,  $P>0.05$ ). The most frequent amino acid mutation in the experimental group was located at position 126 of S protein. There were no statistically significant differences in the deletion or insertion mutations between the two groups ( $P>0.05$ ). **Conclusions** The amino acid mutations, especially those in the "α" determinant, in the patients with CHB may be associated with the coexistence of HBsAg and anti-HBs.

**Key words:** HBsAg; anti-HBs; coexistence; S gene; mutation

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 在复制过程中的 RNA 聚合酶缺乏校正功能,因而具有较高的突变率,常见于 HBV 基因组的前 C 区、核心启动子区域以及 S 区,这些区域的突变最终导致其编码的蛋白氨基酸序列发生改变,蛋白活性也可能发生变化。HBV 的变异问题日益突出,其在病毒感染诊断和抗病毒治疗中所带来的影响也越来越受到临床重视。HBsAg、anti-HBs 同时阳性是临床工作中遇到的一种少见模式,机制尚不明确,本研究通过测序分析 HBsAg、anti-HBs 共阳性患者 HBV 的 S 蛋白氨基酸序列的差异,探讨 HBV S 蛋白氨基酸序列突变与 HBsAg、anti-HBs 共阳性的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 2014 年 9 月-2016 年 12 月期间在上海市第五人民医院进行 HBV 血清学标志物定量检测的患者中,随机选取 HBsAg、anti-HBs 均为阳性且 HBV DNA 高于 500 IU/ml 的慢性乙型肝炎病毒患者 33 例作为试验组,另外随机选取 HBsAg 阳性而 anti-HBs 为阴性且 HBV DNA 高于 500 IU/ml 的慢性乙型肝炎病毒患者 33 例作为对照组,所有患者均为门诊或住院诊断为慢性乙型肝炎患者,处于免疫清除期,且未经抗病毒治疗,诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[1]</sup>,并且排除甲型肝炎、丙型肝炎、药物性、酒精性肝炎等疾病。

**1.2 样本** 在获取患者知情同意后均空腹静脉采血,3 500 rpm 离心 5 min,分离血清,除用于常规指标检测,血清于-70℃冰箱保存备用。

**1.3 试剂** 采用美国雅培 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光微粒子免疫仪及配套试剂进行 HBV 血清学标志物 HBsAg、anti-HBs 定量检测,分别以 HBsAg>

0.05 mIU/ml、anti-HBs>10 mIU/ml 为阳性判断标准。采用美国 ABI 7300 进行 HBV DNA 定量检测,试剂购自上海科华生物技术有限公司,严格按照试剂盒的说明进行检测。HBV S 基因扩增试剂盒购自大连宝生物有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.4 S 基因扩增及测序** HBV S 基因扩增的引物<sup>[2]</sup>,上游外引物为 F1:5'-TTCTTGGAACAAGAGCTAC-3'(nt 2825-2844);下游外引物为 F2:5'-GCAAAGC-CCAAAAGACCCACAAT-3'(nt 997-1019),PCR 第一轮扩增的条件为:98℃ 2 min;98℃ 5 s,57℃ 10 s,72℃ 40 s,40 个循环;72℃ 5 min。上游内引物为 F3:5'-TTCTTGGAACAAGAGCTACAGCAT-3'(nt 2825-2849);下游内引物为 F4:5'-AATGTGCCCCAACACCCAAT-3'(nt 889-908),第二轮扩增的条件为:98℃ 2 min;98℃ 5 s,58℃ 10 s,72℃ 40 s,40 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物直接送上海生工生物工程技术有限公司进行测序,如果不能直接进行测序则进行克隆后再测序。

**1.5 HBV 基因分型及 S 蛋白氨基酸序列分析** 依据测序结果将 S 区的核苷酸序列在 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上进行比对分析,以差异小于 8% 为同一个基因型。HBV S 基因核苷酸序列比对分析:从 NCBI 网站上的 GenBank 下载 2 个 HBV 全基因序列作为基因型参考序列,其中 C 基因型 1 个 (GenBank 序列号为 EU916239.1),B 基因型 1 个 (GenBank 序列号为 AB554017.1)。应用 Chromas 2.0 软件对测序结果进行评估,通过 DNAMAN 2.0 软件对测序结果与参考序列进行比对,与参考序列不同的碱基即为突变碱基。同时将测序所得的序列通过网站 (<http://web.expasy.org/translate>) 将 S 基因的核苷酸

序列翻译成氨基酸序列,再通过 DNAMAN 2.0 软件将各样本 S 蛋白氨基酸序列与参考序列进行比对分析。

1.6 统计学方法 统计分析使用软件 SPSS 17.0 进行,组间的比较采用  $t$  检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料分析 见表 1。两组平均年龄、男女性别比例、HBV DNA 水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。经序列比对分析两组基因型均为 B 基因型或 C 基因型,均未见其它基因型;两组基因型的分布差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 1 试验组与对照组一般资料的比较

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$ )	性别 (男/女)	HBV DNA (Log10 IU/ml, $\bar{x}\pm s$ )	基因型(n, %)	
					B 基因型	C 基因型
试验组	33	37.61 $\pm$ 13.29	19/14	6.11 $\pm$ 1.14	9(27.27)	24(72.73)
对照组	33	41.31 $\pm$ 12.83	17/16	6.49 $\pm$ 1.69	14(42.42)	19(57.58)
$t/\chi^2$ 值		-1.150	0.244	-1.042	1.668	
$P$ 值		0.282	0.805	0.302	0.301	

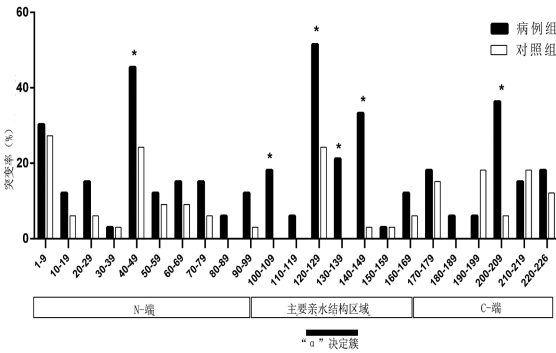
2.2 S 蛋白氨基酸突变率情况 经序列进行比对分析显示, S 蛋白总的氨基酸突变率及不同结构区域氨基酸突变率在两组间差异有统计学意义,见表 2。试验组与对照组在 S 蛋白总的氨基酸突变率(2.11% vs. 0.99%)、S 蛋白 N 端(2.61% vs. 1.21%)、主要亲水结构区域(1.69% vs. 0.48%)、“ $\alpha$ ”决定簇(3.23% vs. 0.63%)突变率差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ ),而 C-端突变率(1.75% vs. 1.22%)两组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。试验组插入突变 2 例,对照组中未发现插入突变;试验组缺失突变 3 例,对照组缺失突变 1 例,插入及缺失均定位于 S 蛋白的 C 端,且发生插入及缺失突变的均为 C 基因型,试验组和对照组间插入(6.06% vs. 0%)及缺失突变(9.09% vs. 3.03%)差异无统计学意义( $P=0.492, 0.613$ )。

表 2 S 蛋白不同区域氨基酸突变分析(n, %)

组别	例数	总计 (aa 1-226)	N 端 (aa 1-99)	MHR (aa 100-169)	$\alpha$ 决定簇 (aa 124-147)	C 端 (aa 170-226)
试验组	33	158(2.11)	86(2.61)	39(1.69)	26(3.23)	33(1.75)
对照组	33	74(0.99)	40(1.21)	11(0.48)	5(0.63)	23(1.22)
$\chi^2$ 值		30.89	17.12	15.852	14.51	1.813
$P$ 值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.225

2.3 氨基酸突变热点位点 S 蛋白的全氨基酸序列

以 10 个氨基酸为一区段,分析不同区段氨基酸发生突变的比例,突变率差异较高的区域位于 MHR 区域,突变点集中位于“ $\alpha$ ”决定簇区域,见图 1。突变率最高的氨基酸位点为第 126 位氨基酸,在试验组中发生突变的有 14 例,对照组中发生突变的有 4 例,两组间该位点氨基酸突变率(42.42% vs. 12.12%)差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.639, P<0.01$ ),主要的突变类型为 T/I126A/S,其余突变率较高的是第 144、129、130 位点的氨基酸。



注: \*  $P<0.05$ 。

图 1 HBV S 蛋白氨基酸序列不同区段突变率分析

3 讨 论

随着临床新检测技术的发展,HBV 感染后血清学标志物检测的灵敏度越来越高,传统上一些少见的血清学模式也变得越来越容易遇到,慢性乙肝患者 HBsAg、anti-HBs 共阳性便是其中一种类型,也越来越受到临床工作者的重视。

HBV 不同基因型分布的地域不同,HBV 感染后疾病的发展过程和治疗效果因病毒基因型不同而存在着一定的差异<sup>[3]</sup>。在本研究中试验组和对照组中均为 B 基因型或 C 基因型,在基因型构成比例上无差异,表明 HBsAg、anti-HBs 共阳性与 HBV 基因型之间可能不存在相关性,不同基因型均有可能出现二者同时阳性。

HBV 的 RNA 聚合酶缺乏校正功能,在其复制过程中极易发生突变,并可能最终导致编码区内的氨基酸发生改变。S 基因编码的 S 蛋白由 226 个氨基酸组成,几乎携带了全部的抗原反应性,并且含有与肝细胞、T 细胞及 B 细胞上相应受体结合的位点。S 蛋白中的“ $\alpha$ ”抗原决定簇,含有 2 个特别的环状结构,具有很强的抗原性,是最重要的抗体结合位点<sup>[4]</sup>。S 蛋白氨基酸序列突变往往能影响到 S 蛋白的生物学特性,产生不同的影响:S 蛋白第 142 位到 145 位氨基酸的突变,能导致乙型肝炎免疫球蛋白治疗无效<sup>[5]</sup>;位于 MHR 区域的 C139R、D144E 突变能导致 HBsAg 的抗



原性降低,可以影响到 HBsAg 的检出率,甚至可能导致假阴性的结果出现<sup>[6-7]</sup>;S 蛋白氨基酸序列突变也能使疫苗的作用减弱<sup>[8]</sup>。

在本研究中发现试验组 S 蛋白氨基酸序列突变率高于对照组,突变主要区域是 S 蛋白的 N 端和 MHR,特别是“ $\alpha$ ”抗原决定簇,突变率达 3.23%,而 C 端的突变率没有差异,表明 HBsAg、anti-HBs 共阳性患者感染的 HBV 不同区域发生的突变存在着差异。S 蛋白氨基酸的突变,特别是“ $\alpha$ ”抗原决定簇区域的突变,可以引起 HBsAg 空间构象发生改变,从而导致其抗原性发生改变或者丧失,产生的 HBsAg 浓度降低<sup>[9]</sup>;同时体内产生的 anti-HBs 不能识别结合 HBsAg,或者与之结合能力下降,免疫清除能力下降造成免疫逃逸,因而最终影响机体的免疫应答<sup>[4,10]</sup>,导致体内 HBsAg、anti-HBs 共阳性的出现。不同亚型的 HBV 病毒产生的 HBsAg 空间构象不同,患者若依次感染不同的病毒亚型,所产生的抗体亦不能有效中和 HBsAg<sup>[11]</sup>,同样可能导致体内出现 HBsAg、anti-HBs 共阳性的现象。可能还存在其他的因素可以导致 HBsAg、anti-HBs 共阳性的出现,还有待于更深入的研究。

在本研究中发现 HBsAg、anti-HBs 共阳性的 CHB 患者 S 蛋白突变率最高的点是第 126 位氨基酸,特别是在 C 基因型中更容易发生此突变,这与 Wang 等报道的结果一致<sup>[12]</sup>。而国外报道中较为多见的突变位点 G145R,在本研究中仅有 1 例,这可能与国外人群中感染的 HBV 基因型主要是 A 基因型和 D 基因型,而我国人群中流行的主要是 B 基因型和 C 基因型有关。第 126 位氨基酸位于  $\alpha$  决定簇的第一个环内,该位点的主要突变类型是 I126T、I126S,这类突变对抗原的影响性比较大<sup>[13]</sup>,有利于免疫逃逸。

HBV 的 S 蛋白氨基酸缺失突变与 HBsAg、anti-HBs 共阳性存在一定相关性,S 基因缺失突变发生在 C 基因型的几率要高于其它基因型<sup>[2]</sup>,在本研究中缺失和插入突变均存在于试验组中,均只见于 C 基因型,发生突变位点主要是 S 蛋白的 C 端区域,这个区域氨基酸序列的改变对 HBsAg 的抗原性影响不大。缺失和插入突变在两组之间无差异,这可能与样本量较小以及入选样本的基因型相关。

从本研究可以发现,HBV 的 S 区基因尤其是“ $\alpha$ ”决定簇具有较高突变率,这个区域的高突变率可能与 HBsAg、anti-HBs 共阳性存在一定的相关性。血清中出现持续的 HBsAg、anti-HBs 共阳性有可能增加 CHB 患者发生肝硬化及肝细胞肝癌的风险<sup>[14]</sup>,因此进一

步从基因突变的角度去分析 HBV 免疫逃逸的发生机制,对于探索 HBsAg 检测方法的改进、HBV 感染后抗病毒治疗等方面均具有重要的价值。

## 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(12):321-340.
- [2] Huang X, Qin Y, Zhang P, et al. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies[J]. J Med Virol, 2010, 82(1):23-31.
- [3] Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(18):5427-5434.
- [4] Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics [J]. World J Hepatol,2015,7(3):583-592.
- [5] Park GC, Hwang S, Ahn CS, et al. Analysis of S gene mutation of the hepatitis B virus in adult liver transplant recipients showing resistance to hepatitis B immunoglobulin therapy[J].Transplant Proc, 2013,45(8):3047-3051.
- [6] Kim KH, Chang HY, Park JY, et al. Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers[J]. Clin Mol Hepatol,2014,20(3):251-260.
- [7] Pollicino T, Cacciola L, Saffioti F, et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variant: pathobiology and clinical implications [J]. J Hepatol, 2014,61(2):408-417.
- [8] Suppiah J, Mohd Zain R, Bahari N, et al. S gene mutants occurrence among hepatitis B carriers in Malaysia[J]. Hepat Mon, 2014,14(12):e22565.
- [9] Liu Y, Zhang L, Zhou JY, et al. Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B patients with coexistence of HBsAg and anti-HBs [J]. PLoS One,2016,11(1):e0146980.
- [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]. J Hepatol,2012,57(4):720-729.
- [11] 高春芳. HBV S 区基因变异与 HBsAg 检测[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(6):574-576.
- [12] Wang L, Liu H, Ning X, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HbsAb tests[J]. Hepatol Res,2010,40(12):1212-1218.
- [13] Sticchi L, Caligiuri P, Cacciani R, et al. Epidemiology of HBV S-gene mutants in the Liguria Region, Italy: implications for surveillance and detection of new escape variants[J]. Hum Vaccin Immunother,2013,9(3):568-571.
- [14] Seo SI, Choi HS, Choi BY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface may increase the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection: a retrospective cohort study[J]. J Med Virol,2014,86(1):124-130.

收稿日期:2017-12-21