·论著·

乙型肝炎病毒表面抗原-抗体复合物治疗慢性乙型肝炎患者病毒 S 基因变异研究

马张妹[1] 田晓晨[1] 李潇潇[1] 徐道振[2] 郭利民[2] 赵 铠[3] 闻玉梅[1]

【摘要】 **目的** 研究应用乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)-抗体复合物治疗性疫苗(YIC)治疗慢性乙型肝炎患者是否会诱生 S 基因免疫逃逸变异株的出现。**方法** 选取 5 例用 30 μg 或 60 μg YIC 治疗后血清乙型肝炎病毒(HBV)DNA 水平下降 > 2 log10、伴有乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)转阴应答,但在随访 6 个月后病毒 DNA 水平重复升高的患者作为研究对象,另选取 1 例对 YIC 治疗始终无应答患者和 1 例注射安慰剂患者作为对照,用聚合酶链反应(PCR)方法扩增治疗前(0 周)及治疗后(44 周)血清中 HBV DNA 的 S 基因、前-核心基因、核心基因启动子片段,并进行序列比对分析。**结果** S 基因"a"决定簇及前-核心基因均未发生变异,但 YIC 治疗后有 3 例 HBV 的核心基因启动子 1762/1764 位点序列有变异,另有 2 例在核心基因启动子的其他位点有核苷酸变异。**结论** 研究显示 5 例出现病毒重新复制的患者并非由于发生了病毒 S 基因逃逸变异所致。

【关键词】 治疗性疫苗; 病毒变异; 乙肝表面抗原-抗体

Studies on hepatitis B virus S gene mutation in chronic hepatitis B patients treated with HBsAg-HBIG immunogenic complex therapeutic vaccine

MA Zhang-mei, TIAN Xiao-chen, LI Xiao-xiao, XU Dao-zhen, GUO Li-min, ZHAO Kai, WEN Yu-mei (Keylaboratory of Medical Molecular Virology, Shanghai Medical College Fudan University, Shanghai 200032)

【**Abstract**】 **Objective** To study whether HBsAg-HBIG immunogenic complex therapeutic vaccine (YIC) could induce S gene immune escape mutants. **Methods** Five chronic hepatitis B patients who had been treated with 6 injections of either 30 or 60 micrograms of YIC were recruited for this study. These patients were those who responded to YIC treatment, shown as a drop in serum HBV DNA virus load > 2 $\log_{10}$, with serum HBeAg converted to negative at 24 weeks. However, their virus load rebound at the end of 24 weeks follow-up. As controls, one was a patient who did not respond to YIC treatment and remained serum HBV DNA positive at similar level during and after treatment, while the other one was a patient immunized with the alum placebo. Serum samples before treatment and 6 months after termination of treatment were collected, and DNA extracted. PCR was used to amplify HBV S gene, the precore/core gene and the core promoter regions followed by sequencing. **Results** In all 7 patients treated with YIC or alum no S gene mutation was found in the "a" determinant, nor was precore stop codon mutation detected. However, three patients had mutations in the 1762/1764 core-promoter region, other two patients had mutations in the core promoter region other than the 1762/1764 double mutation. **Conclusion** The rebound of HBV replication in five YIC-treated patients was not due to the emergence of HBV S immune-escape mutants.

【**Key words**】 Therapeutic vaccine; Viral mutation; Hepatitis B virus surface antigen-antibodies

全球有 3.5 亿乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者,约 50 %在我国,部分可发展为肝硬化、肝癌。持续存在的乙型肝炎病毒(HBV)不仅对感染者是极大的威胁,还可成为传染源。虽然目前已有数种抗 HBV 药物用于临床治疗,但抗 HBV 药物仅能暂时抑制病毒复制,需长期服用,停药后病毒又可重新复制,而且长期使用会导致耐药毒株的出现。此外,作为免疫治疗的主要药物——干扰素(IFN)也常用于治疗慢性乙型肝炎,具有抑制病毒复制,调节机体免疫的作用,但用 IFN 治疗的乙型肝炎患者中仅有约 1/3 患者有较好应答,且 IFN 引起的反应也较严重。本室长期开展用 HBsAg-抗体复合物(YIC)作为乙型肝炎治疗性疫苗的应用基础研究[1-4]。2002 年获得国家药监局批准,开展了临床 I 期研究,证明 YIC 安全并可诱生高效价的乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)及细胞因子 IFN-γ 与白细胞介素-2(IL-2)[5]。在临床 IIA 期对 36 例慢性乙型肝炎患者的研究中,发现用 60 μg YIC 注射 6 针后,5/10 名对 YIC 应答者显示出血清 HBV DNA 下降 > 2 $\log_{10}$,伴有 HBeAg 转阴及抗-HBe 出现。应答患者多数出现血清-丙氨酸转氨酶升高及经 HBsAg 诱生的细胞因子[6]。在随后进行的临床 IIB 期研究中,分别用 30 μg 及 60 μg YIC 注射治疗。为研究 YIC 注射是否存在诱生 S 基因变异株出现的可能,对 6 例用 YIC 治疗的慢性乙型肝炎患者及 1 例注射对照剂的慢性乙型肝炎患者注射前(0 周)及注射后(44 周)随访血清

作者单位:1. 复旦大学上海医学院医学分子病毒学重点实验室,上海 200032;2. 北京地坛医院;3. 北京生物制品研究所

通讯作者:闻玉梅,E-mail:ymwen@shmu.edu.cn

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HBV DNA 的 S 基因、前-核心区(pre-C)、C 启动子区片段进行了 PCR 扩增、测序及序列比对研究。

材料和方法

1. 病例及标本来源 本研究的血清标本采集自在北京解放军第 302 医院、上海交通大学医学院附属瑞金医院、重庆医科大学附属第一医院和浙江省第一医院参与 YIC ⅡB 期临床研究的慢性乙型肝炎患者。标本采集均根据患者所签署的知情书进行。根据研究方案,参与 YIC ⅡB 期临床研究的患者,每 4 周肌内注射 1 次 30 μg 或 60 μg YIC,共注射 6 次。完成全程治疗后随访 24 周。本研究的对象为 5 例治疗过程中曾出现过血清 HBV DNA 下降 > 2 $\log_{10}$、HBeAg 转阴,但随访中,血清 HBV DNA 重复升高的患者,另收集 1 例治疗前、后 HBV DNA 无变化患者和 1 例注射对照剂的患者作为对照。收集上述患者的治疗前(0 周)及最后 1 次随访的血清(44 周)。

2. 实验方法

(1) 血清 DNA 提取:取患者血清 100μl 加入 300μl TES 溶液(10mmol/L 二羟甲基氨基甲烷盐酸,0.5mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 pH 8.0,0.5 %十二烷基硫酸钠,200 μg/ml 蛋白酶 K)混匀,65 ℃水浴消化 3 h,取出后加等体积酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提 1 次。17 860 g 离心 10 min。取上清液,加 2.5 倍体积无水乙醇,1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.0)沉淀 DNA,70 %乙醇漂洗 1 次,将 DNA 溶于 20 μl 灭菌双蒸水中。

(2) 聚合酶链反应(PCR)引物设计:根据 HBV 全基因序列设计 S 基因的扩增引物序列及位置,C8-S5:5′- CTA GGA TCC ATG GAG AGC ACA ACA TCA G-3′(正链 nt 157-175),C8-S3:5′-GCC GAA TTC TCA AAT GTA TAC CCA AAG AC-3′(负链 nt 837-820)。C 基因的扩增引物序列及位置,Pc1:5′-CCC AAG GTC TTA CAT AAG AGG -3′(正链 nt 1643-1663),Pc2:5′-GGT GGC CAA ATT CAT CAA CT-3′(负链 nt 2112 - 2093)。以上引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

(3) PCR:S 基因的扩增片段为 681 bp,C 基因的扩增片段为 470 bp。反应体积 50 μl,包括 200 μmol/L 4 ×dNTP,1 ×PCR 缓冲液,10 pmol/L C8-S5 及 C8-S3 或 Pc1 及 Pc2,Taq DNA 聚合酶 2.5U(宝生物工程有限公司)。反应条件:94 ℃变性 3 min,94 ℃30s,55 ℃30s,72 ℃1 min,30 个循环后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1 %琼脂糖凝胶电泳检测为阳性,送上海英俊生物技术有限公司进行序列测定。

(4) 序列分析 运用 Vector NTI 软件(Invitrogen 公司)对同一患者的 0 周及 44 周的 S 基因扩增片段序列、前 C/C 及 C 基因启动子区扩增片段序列作对比分析,分析是否有突变位点出现。

结 果

1. YIC 治疗患者血清 HBV DNA、HBeAg 及抗-HBe 动态变化 6 例用 YIC 治疗的患者中 2 例为用 60 μg YIC 者(#52 和 #92),4 例为用 30 μg YIC 者(#102、#180、#213 和 #241)。另有 1 例(#150)为用对照剂者。患者每 4 周肌内注射 1 次 30 μg 或 60 μg YIC,共注射 6 次。完成全程治疗后随访 24 周。在 YIC 治疗及随访过程中每 12 周检测 1 次患者血清 HBeAg、抗-HBe 及 HBV DNA 水平的变化。结果显示 #92 患者对 YIC 治疗始终无应答。#52、#102、#180、#213 和 #241 患者在运用 YIC 治疗的 24 周中血清 HBV DNA 下降 > 2 $\log_{10}$,HBeAg 转阴,但在随访过程中血清 HBV DNA 复制上升,HBeAg 反跳升高(图 1)。

2. YIC 治疗患者 S 蛋白"a"决定簇变异分析 用 PCR 方法扩增 7 例患者治疗前(0 周)和治疗后(44 周)血清中 HBV DNA 的 S 基因片段。将测序得到的扩增片段核苷酸序列转换成蛋白序列后进行比对分析,寻找是否有突变位点。结果显示除 #150 患者外,其他 6 例患者 S 蛋白的"a"决定簇(124-147 位氨基酸残基)均未见变异(图 2)。#150 患者注射的是对照剂,其在 126 位氨基酸残基发生了异亮氨酸(I)到苏氨酸(T)的突变。以往的研究表明 S 蛋白 126 位 I/T 均可出现,不影响"a"决定簇的抗原性[7]。结果显示 YIC 注射治疗,不论是否出现过应答,治疗前后的 HBV 毒株均未出现 S 蛋白抗原性的改变。

3. YIC 治疗患者前 C 区序列变异分析 用 PCR 的方法扩增 7 例患者治疗前(0 周)和治疗后(44 周)血清中 HBV DNA 的前 C/C 基因片段。将测序结果进行比对分析后发现,7 例患者前 C 区在治疗前均无终止密码突变,治疗后(44 周)无一例出现终止密码突变(结果本文未显示)。结果显示 YIC 治疗,并未诱生 HBV 前 C 区产生终止密码突变。

4. YIC 治疗患者 C 启动子区序列变异分析 前 C/C 基因片段比对结果还显示,在 C 启动子区,1 例(#52)在 44 周时出现 T1762A/A1764G 双突变,另有 2 例(#180 和 #213)0 周为 1762A/1764G,44 周为 1762T/1764A。#92 和 #241 出现了 C 启动子区其他的核苷酸变异(图 3)。

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

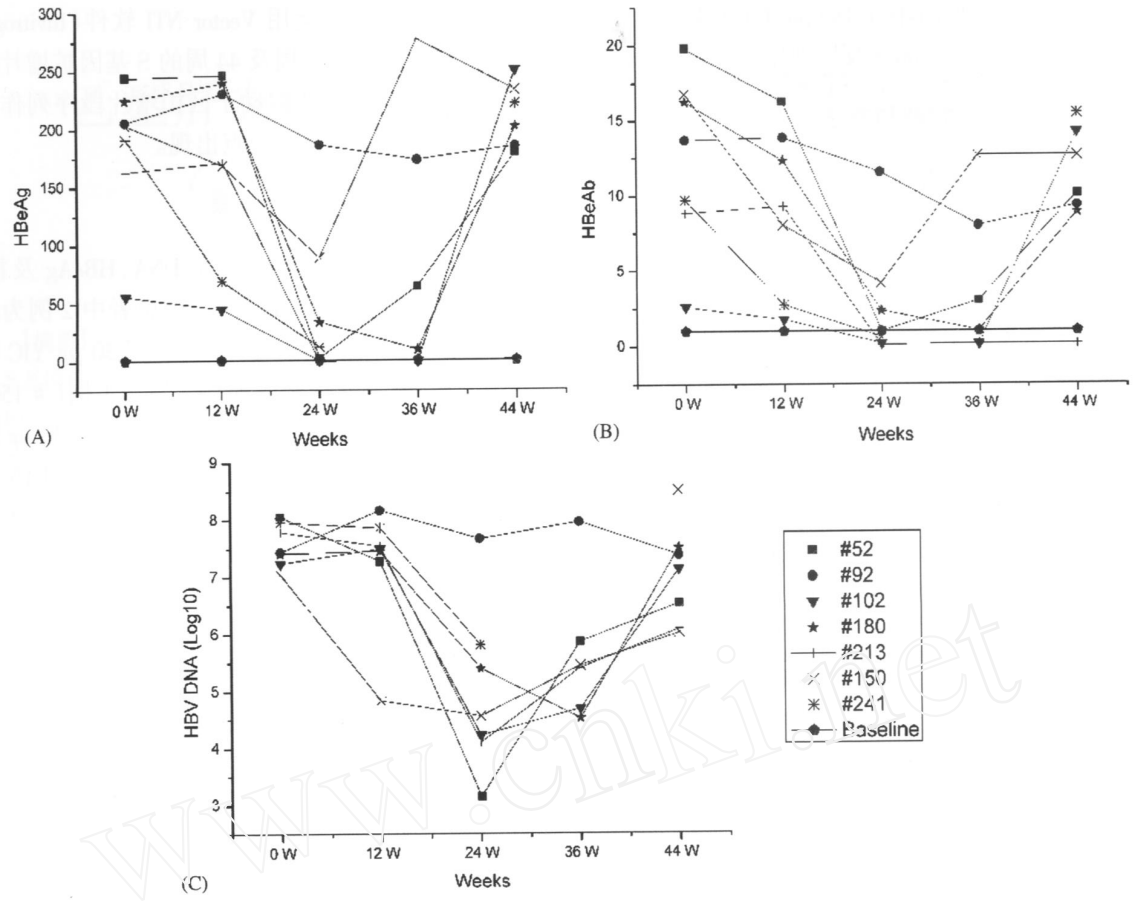


图 1 YIC 治疗出现病毒载量反跳的患者血清 HBV DNA、HBeAg、抗- HBe 的动态变化

Fig 1. Kinetics of serum HBV DNA, HBeAg, anti-HBe in seven YIC treated patients who showed rebound in viral load

150 was injected with placebo, # 92 was non-responder, the others were responders during treatment, but virus rebound during follow-up. (A): Kinetics of serum HBeAg; (B): Kinetics of serum HBeAb; (C): Kinetics of HBV DNA.

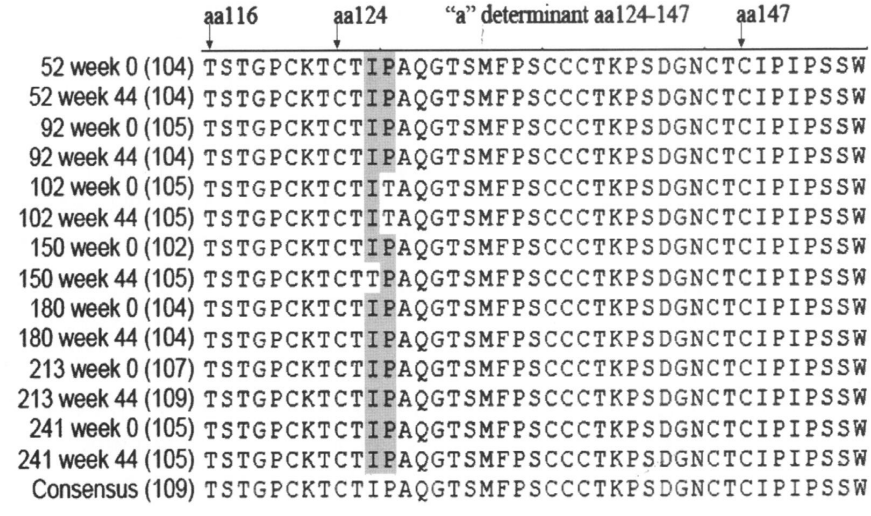


图 2 YIC 治疗出现病毒载量反跳患者 S 蛋白"a"决定簇的氨基酸序列变异分析

Fig 2. Sequence alignment of the "a" determinant of S protein in seven YIC treated patients who showed rebound in viral load

The amino acids in the "a" determinant of S protein showed no changes in sample collected at 0 and 44 weeks (the shaded region shows with sequences different from the consensus sequences summarized in data from GenBank. # 150 was immunized with placebo, and at 126 residue, amino acid I/T does not change the antigenicity of "a" determinant).

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

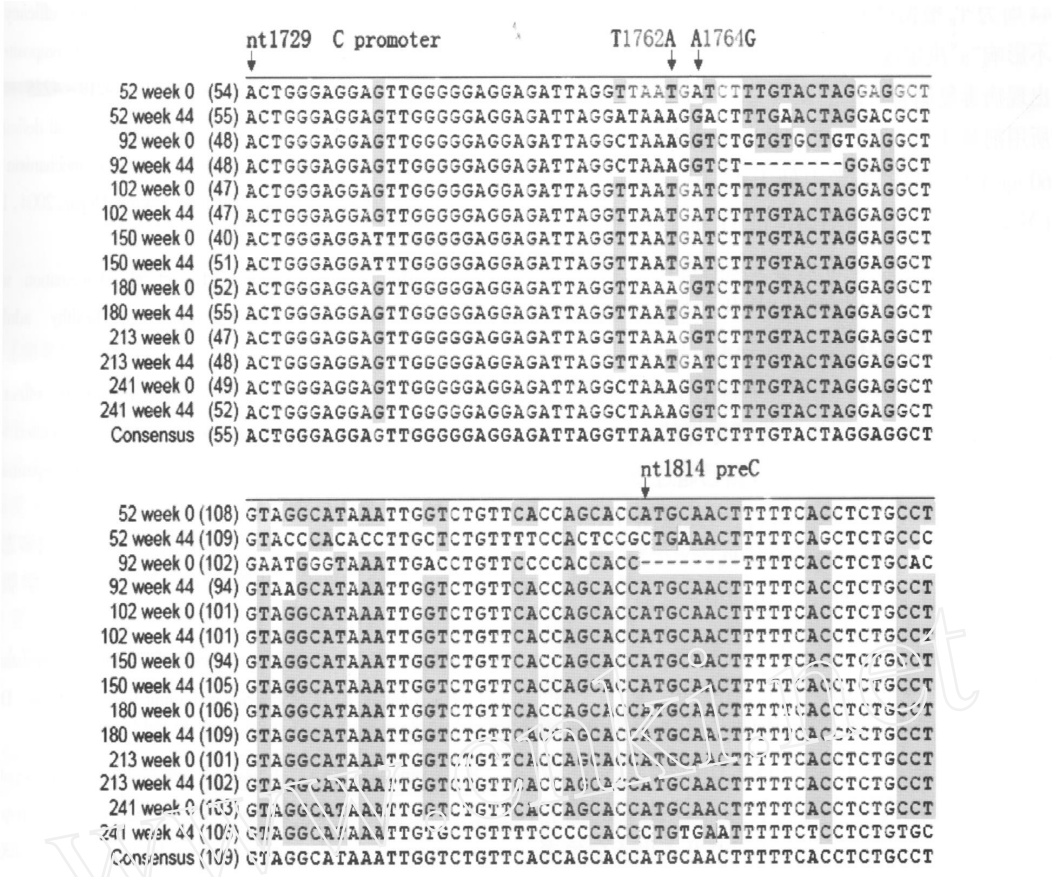


图 3 YIC 治疗出现病毒载量反跳患者 C 启动子区域的核苷酸序列变异分析

Fig 3. Sequence alignment of C promoter region in seven YIC treated patients who showed rebound in viral load

Nucleotide mutations in the core promoter region of samples collected at 0 and 44 weeks from 7 patients (the shaded region shows sequences different from the consensus sequences summarized in data from GenBank).

讨 论

乙型肝炎的治疗包括抗病毒治疗及免疫治疗 2 个方面。由于抗病毒治疗研究已积累了不少经验,而免疫治疗则缺乏经验积累。目前抗病毒治疗的靶点主要为 HBV 复制酶,因此抑制病毒的作用快,短期内可见效果。这类药物一般对机体没有免疫调节作用,撤药后常出现病毒复制反跳,并可出现耐药变异株[8]。作为免疫治疗的主要药物,IFN 有广泛的抗病毒作用,其免疫调节作用主要是通过非特异(天然/固有)免疫系统,如细胞因子,NK 细胞等[9]。免疫治疗的另一种制品是 HBV 特异性的治疗性疫苗。已证实应用特异的免疫治疗可以在部分患者中有效地降低病毒复制水平并伴有 HBeAg 转阴及出现抗-HBe[6]。与抗病毒治疗相比,免疫治疗的效果出现较晚,并常具有治疗完成后的后期效应。因此备受关注的一个问题是,治疗性乙型肝炎疫苗是否会诱生免疫逃逸病毒株。过去单纯应用 HBsAg 或带有前-S2-HBsAg 治疗性疫苗的临床研究中均未发现有免疫逃逸病毒株出现[10]。本研究对用 HBsAg-抗体组建的复合物型治疗性乙型肝炎疫苗(YIC)进行临床研究的患者作了 S 基因变异的研究,同时也对前 C/C 基因、C 启动子区域的变异进行了研究。

由于本研究需对比患者治疗前、后病毒的 S 基因及编码的蛋白质,治疗后患者的血清病毒必须达到一定的水平方可进行。对治疗有效应答者中因 HBV DNA 水平显著降低,难以进行上述研究。为此,选用了治疗过程中虽对 YIC 有效应答,但随访中出现病毒再度复制的患者血清标本与治疗前的血清标本进行对比研究。作为对照,选用了 1 例对 YIC 无应答的患者及 1 例用对照剂免疫的患者,从而可以比较治疗后出现病毒反跳者是否发生病毒变异及其意义。结果显示治疗后再度出现病毒复制者中 S 基因所编码的蛋白,特别是"a"决定簇并未发生变异。注射对照剂的患者(#150)第 126 位 0 周为 I,

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

44 周为 T,根据已有资料,T/I、T/S、T/N 均可出现,不影响"a"决定簇抗原性[7]。结果提示,治疗后再度出现病毒复制者可能的原因是,疗程不够长或治疗所用剂量不足。实际结果也显示病毒反跳率在用 60 μg YIC 治疗的患者中低于用 30 μg YIC 治疗者(另文总结)。因此推测如延长 YIC 的疗程将可以进一步减少随访期中病毒重新复制的患者。

由于本实验所用方法为 PCR 产物直接测序,因此获得的结果仅为优势毒株,并未将所有 HBV 的准种全部显示。但实验结果至少显示用 YIC 治疗及随访过程中,并无 S 基因突变优势毒株的出现。结合全球使用 HBsAg 作为预防性疫苗已超过 20 年,尚未出现 S 基因免疫逃逸株的流行,因此应用 YIC 诱生免疫逃逸 HBV 毒株的危险性极低。

本研究还显示治疗 1 年内并未出现前 C 基因终止密码突变,但有 3 例出现了 C 启动子区的 1762/1764 位变异,另有 2 例出现了 C 启动子区中变异热点以外的其他核苷酸变异,说明 C 启动子区是在较短期内可出现变异的热点区。C 启动子区 1762/1764 位变异已被认为与发展为肝硬化或肝癌相关[11],本研究中 5 例病毒重新复制及 1 例无应答者中有 5 例出现 C 启动子区核苷酸变异,对其意义值得在今后进一步研究。

参 考 文 献

1. Wen YM, Xiong SD, Zhang W. Solid matrix antibody-antigen complex can clear viremia and antigenemia in persistent duck hepatitis B virus infection. J Gen Virol, 1994, 75: 335～339
2. Wen YM, Qu D, Zhou SH, et al. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. Intern Rev Immunol, 1999, 18: 251～258
3. Zheng BJ, Ng MH, He LF, et al. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies recombinant composite in HBsAg transgenic mice. Vaccine, 2001, 19: 4219～4225
4. Zheng BJ, Zhou J, Qu D, et al. Selective functional deficit in dendritic cell-T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat, 2004, 11: 217～224
5. Xu DZ, Huang KL, Zhao K, et al. Vaccination with recombinant HBsAg-HBIG complex in healthy adults. Vaccine, 2005, 23: 2658～2664
6. Yao X, Zheng BJ, Zhou J, et al. Therapeutic effect of hepatitis B surface antigen-antibody complex is associated with cytolytic and non-cytolytic immune responses in hepatitis B patients. Vaccine, 2007, 25: 1771～1779
7. 陈哲,朱悦,李亦学,等. 乙型肝炎病毒包膜蛋白多态性的生物信息学分析及其意义. 复旦学报(医学版), 2006, 33: 711～718
8. Fischer KP, Gutfreund KS, Tyrrwll DL. Lamivudine resistance in hepatitis B: Mechanisms and clinical implications. Drug Resist Updat, 2001, 4: 118～128
9. Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, et al. Inhibition of hepatitis virusreplication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recuritment to the liver. J Immunol, 2001, 167: 6701～6706
10. Pol S, Nalpas B, Driss F, et al. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. J Hepatology, 2001, 34: 917～921
11. 佘为民,马张妹,王吉耀,等. 乙型肝炎病毒前 C 区、C 启动子区、前 S2 区基因突变与慢性肝病的相关性. 中华传染病杂志, 2006, 24: 196～199

(收稿日期:2007-06-12)

(上接第 67 页)

3. Ma S, Boerner JE, Tiong Yip C, et al. NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis c virus alone or in combination with alpha interferon. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 2976～2982
4. Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. J Virol, 2005, 79: 9369～9380
5. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature, 2006, 439: 682～687
6. Biswal BK, Cherney MM, Wang M, et al. Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggested mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. J Biol Chem 2005, 280: 18202～18210

(收稿日期:2007-06-06)

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net