

# HBV 母婴阻断失败儿童的 HLA 基因多态性研究

## ——附 12 例报告

姚琳 余芹 尹玉竹

**【摘要】 目的** 探讨遗传因素对 HBV 母婴传播免疫阻断失败的影响。**方法** 选择母亲血清 HBsAg 阳性、经联合免疫后发生 HBV 阻断失败的 12 例婴儿为研究对象, 7 月龄时抽取肘静脉血, 提取 DNA, 对其进行 HLA-DPB1、HLA-DPB2 等 2 个基因中 3 个单核苷酸多态性(SNP)位点(rs2281388、rs9277535、rs9366816)的 PCR 扩增测序, 分析目的 SNP 位点的碱基组成和等位基因比例, 统计不同位点的基因频率, 并与国际千人基因组计划中的中国南方人群比较。**结果** 12 例 HBV 母婴阻断失败婴儿的 rs9277535 位点 GA 基因型频率与中国南方人群比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且 GA 基因型与 AA 基因型相比, 新生儿感染 HBV 的风险较低( $OR = 0.064$ , 95%  $CI$  0.006 ~ 0.641); rs9366816 的 C 等位基因频率与中国南方人群比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且 C 等位基因与 T 等位基因相比, 新生儿感染 HBV 的风险较高( $OR = 2.585$ , 95%  $CI$  1.008 ~ 6.629); HBV 母婴阻断失败婴儿的 rs2281388 各基因型及等位基因频率与中国南方人群比较差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。**结论** rs9277535 (HLA-DPB1) 的 GA 基因型可能是 HBV 母婴传播的保护性因素, rs9366816 (HLA-DPB2) 的 C 等位基因可能是 HBV 母婴传播的危险性因素。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; 母婴传播; 易感基因; 单核苷酸多态性

**Study of the polymorphism of HLA gene in the failure of blockage of mother-to-child transmission of hepatitis B virus: a report of 12 cases** Yao Lin, She Qin, Yin Yuzhu. Department of Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Yin Yuzhu, E-mail: yyzst2011@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of genetic factors on the failure of immune blockage of mother-to-child transmission of hepatitis B virus (HBV). **Methods** Twelve infants presenting with the failure of HBV transmission blockage after combined immunotherapy and positive serum HBsAg of their mothers were recruited in this investigation. The venous blood samples were collected from the elbows of the 7-month-old infants. DNA extraction was performed. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs, rs2281388, rs9277535 and rs9366816) at the HLA-DPB1 and HLA-DPB2 loci were subject to PCR amplification sequencing. The base composition and allele proportion of the target SNP sites were analyzed. The gene frequencies at different loci were statistically compared with those in the southern Chinese population recorded in the 1000s Genomes Project. **Results** The frequencies of GA genotype of rs9277535 significantly differed between 12 infants with the failure of HBV transmission blockage and the population from southern China ( $P < 0.05$ ). The infants with GA genotype had a lower risk of HBV infection compared with their counterparts with AA genotype ( $OR = 0.064$ , 95%  $CI$ : 0.006-0.641). The frequency of C allele of rs9366816 also significantly differed from that of the southern population ( $P < 0.05$ ). The infants with C allele had a higher risk of HBV infection compared with those with T allele ( $OR = 2.585$ , 95%  $CI$ : 1.008-6.629). However, there was no significant difference in the frequencies of rs2281388 genotypes and alleles between 12 infants and those from southern China (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** The GA genotype of rs9277535 (HLA-DPB1) may be a protective factor, whereas

the C allele of rs9366816 (HLA-DPB2) is probably a risk factor of mother-to-child transmission of HBV.

**【Key words】** Hepatitis B virus; Mother-to-child transmission; Susceptibility gene; Single nucleotide polymorphisms

HBV 母婴传播是导致人群携带 HBV 的主要原因。研究发现, 孕妇血清 HBeAg 阳性和 HBV DNA 高水平是 HBV 母婴传播免疫阻断失败的危险因素<sup>[1-2]</sup>。然而, 并非所有具有高危因素的孕妇所分娩的新生儿都发生免疫阻断失败。HBV 母婴阻断失败除了与病原学特征、环境、遗传背景等因素有关外, 还可能与宿主存在 HBV 感染的易感基因有关。有报道, 与健康人群相比, 慢性乙型肝炎 (CHB) 患者的 HLA 基因中存在与 HBV 在成年人之间水平传播相关的基因型<sup>[3-9]</sup>。本研究拟从寻找 HBV 感染相关易感基因着手, 探讨遗传因素对 HBV 母婴传播免疫阻断失败的影响, 现报告如下。

对象与方法

一、研究对象  
选取 2011 年 1 月至 2016 年 3 月在中山大学附属第三医院产科出生、母亲血清 HBsAg 阳性、经联合免疫后发生免疫阻断失败的婴儿为研究对象。病例选择标准: ①母亲年龄 20 岁或以上, 孕 28 ~ 42 周, 血清 HBsAg 阳性, 本次妊娠为单胎, 无严重肝、肾功能异常及其他严重妊娠合并症, 血清甲、丙、丁、戊、庚型肝炎系列检查均阴性, 妊娠期间未使用抗病毒药物、免疫调节药和细胞毒性药, 无长期使用肾上腺皮质激素类药物史, 配偶 HBsAg 阴性; ②婴儿发生免疫阻断失败, 但无严重的内外科疾病和先天畸形。本研究经中山大学附属第三医院医学伦理委员会批准, 所有研究对象的监护人均已签署知情同意书。

二、诊断标准  
免疫阻断失败是指新生儿出生时 HBsAg 和 (或) HBV DNA 阳性并持续阳性至 7 月龄。HBV

DNA 阳性指血液中的 HBV 数量超过了 HBV-DNA 正常值(100 IU/ml)。

三、免疫接种方案  
新生儿于出生 24 h 内尽早肌内注射乙肝 Ig 100 U, 并按 0、1、6 方案接种重组酵母乙肝疫苗 10 μg 进行主-被动联合免疫。分别于出生时联合免疫前以及 7 月龄时采集婴儿肘静脉血, 进行 HBV 血清标志物 (HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗 HBe、抗-HBe) 的检测。

四、检测方法  
1. 目的基因和位点的选择  
根据文献 [3-9] 报道, 选出 HLA-DPB1、HLA-DPB2 等 2 个易感基因上的 3 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点 (rs2281388、rs9277535、rs9366816) 作为本研究的目的位点。

2. DNA 的提取  
受试婴儿 7 月龄时, 抽取的肘静脉血 2 ml, 置于 EDTA 管中, 混匀后取 200 μl 用于提取 DNA。使用 DNA 提取试剂盒 (血液 DNA 提取试剂-高敏试剂, 和实生物), 按说明书进行操作, 提取基因组 DNA, 置于 -20℃ 中保存备用。

3. 引物设计及合成  
通过 NCBI-Gene 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载目的基因的 DNA 序列, 以目的 SNP 位点为中心, 采用 primer 3 软件设计 PCR 引物, 将设计的扩增引物序列在 PubMed 数据库中进行 blast 分析, 验证引物的特异性。将特异性高的引物序列 (表 1) 送华大基因公司进行引物合成。根据引物说明书加入适量双蒸水, 将单管扩增引物稀释至终浓度 1 μmol/L, 置于 -20℃ 中保存备用。

表 1 HLA 基因 SNP 位点引物序列

位 点	F	R	产物长度 (bp)
rs2281388	CCAGGTCAGGAGCACGAGA	GGGATTGAGGAAGGCAGGT	543
rs9277535	GGGTTTtagtagACAGTAGG	TGACCAAAAGGTGTCAATA	645
rs9366816	ATTGCAGGCATGGACCACT	TCCACCCTCTGGAGGACAG	551

4. 目的基因组扩增及测序  
采用 PCR 扩增直接测序法进行目的 SNP 位点测序。将基因组 DNA、引物与 PCR 反应体系混合,

反应成分及比例为 3 μl 10 倍 Ex Taq 酶缓冲液, 2 μl 脱氧核糖核苷三磷酸 (2.5 mmol/L), 1 μl 上游引物 (10 pmol/L), 1 μl 下游引物 (10 pmol/L),

0.2 μl Ex Taq 酶(5 U/μl), 2 μl DNA 模板(1 ng/μl), 20.8 μl H<sub>2</sub>O。PCR 扩增采用 ABI 2700 扩增仪, 扩增条件为: 96 ℃ 预变性 10 min, 之后 10 个循环(96 ℃ 30 s, 62 ~ 52 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 30 s), 随后 35 个循环(96 ℃ 20 s, 52 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s), 最后于 72 ℃ 延伸 5 min, 4 ℃ 保存。反应结束后取 7 μl 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物。以 DNA Marker R(B600040, BBI Life Sciences) 为 DNA 片段条带大小及浓度标准品, 采用凝胶成像分析系统 ZF-258 分析 PCR 扩增产物的片段长度。确认扩增成功后将余下的 PCR 产物送上海赛默飞公司进行 DNA 测序。

5. 测序结果分析

国际千人基因组计划(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>), 是由中美英德等国科学家共同承担研究任务, 绘制了迄今为止最详尽的、最有医学应用价值的人类基因组

遗传多态性图谱, 其测序人群包含了以广东人群为主的中国南方人群。采用 DNAMAN 软件对比 DNA 序列评估测序结果, Chromas 软件分析测序峰图, 统计目的 SNP 位点的碱基组成和等位基因比例, 计算不同位点的杂合率, 并与国际千人基因组计划中的中国南方人群比较。

五、统计学处理

采用 SPSS 22.0 处理数据。计数资料以百分率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用二分类 Logistic 回归模型分析各基因型与儿童感染 HBV 的关系, 计算优势比(OR)和 95% 可信区间(CI)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、12 例免疫阻断失败儿童的一般资料

2011 年 1 月至 2016 年 3 月符合纳入标准的免疫阻断失败儿童共 12 例, 其一般资料见表 2。

表 2		12 例免疫阻断失败儿童的一般资料				
编 号	性 别	母亲 HBV 标志物 <sup>a</sup>	分娩方式	分娩孕周 (周)	出生体质量 (kg)	喂养方式
1	男	+-++-	阴道分娩	39 <sup>+6</sup>	3.20	母乳
2	女	+-++-	阴道分娩	39 <sup>+5</sup>	3.40	人工
3	女	+-++-	剖宫产	39 <sup>+6</sup>	2.90	人工
4	男	+-++-	阴道分娩	40 <sup>+3</sup>	3.20	人工
5	男	+-++-	阴道分娩	37 <sup>+6</sup>	2.95	人工
6	女	+-++-	阴道分娩	38	3.20	人工
7	女	++-+-	阴道分娩	39 <sup>+1</sup>	2.70	人工
8	男	++-+-	剖宫产	40 <sup>+4</sup>	3.50	人工
9	女	+-++-	剖宫产	39 <sup>+1</sup>	4.10	人工
10	男	+-++-	剖宫产	38 <sup>+3</sup>	3.30	人工
11	男	+-++-	剖宫产	38	3.45	人工
12	男	+-++-	剖宫产	38 <sup>+5</sup>	3.00	人工

注:<sup>a</sup> 母亲 HBV 标志物依次为 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗 HBe、抗-HBe

二、12 例免疫阻断失败儿童的 HLA 基因目的 SNP 位点的测序结果

单因素分析结果显示: 位于 HLA-DPB1 基因上的 rs9277535 和 HLA-DPB2 基因上的 rs9366816, 其基因型或等位基因频率在免疫阻断失败儿童和中国南方人群比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。免疫阻断失败儿童的 rs9277535 的 GA 基因型频率与中国南方人群比较差异有统计学意义(P < 0.05), 且与 AA 基因型相比, 其可能降低了 HBV 母婴传播风险(OR = 0.064, 95% CI 0.006 ~ 0.641); 免疫阻断失败儿童的 rs9366816 的 C 等位基因频率与南方人群比较差异有统计学意义(P < 0.05), 且与 T 等位基因相比, 其可能增加了 HBV 母婴传播的危险性(OR = 2.585, 95% CI: 1.008 ~ 6.629)。另一个 SNP 位点 rs2281388 的各基因型及等位基因频率在免疫阻断失败儿童和中国南方人群间比较差异无统计学意义(P > 0.05), 见表 3。

表 3 HLA 基因上 3 个目的 SNP 位点在免疫阻断失败儿童中的分布及发病风险						
基 因	SNP 位点	基因型/ 等位基因	阻断失败儿童 [ 例 ( % ) ]	国际千人基因组 中国南方人群 ( % )	OR ( 95% CI )	P 值
HLA-DPB1	rs2281388	CC	2 ( 17 )	( 40 )	1	
		CT	6 ( 50 )	( 47 )	2. 591 ( 0. 467 ~ 14. 382 )	0. 276
		TT	4 ( 33 )	( 14 )	6. 333 ( 0. 920 ~ 43. 618 )	0. 061
		C	10 ( 42 )	( 63 )	1	
		T	14 ( 58 )	( 37 )	2. 471 ( 0. 990 ~ 6. 163 )	0. 052
HLA-DPB1	rs9277535	AA	5 ( 42 )	( 15 )	1	
		GA	1 ( 8 )	( 47 )	0. 064 ( 0. 006 ~ 0. 641 )	0. 019
		GG	6 ( 50 )	( 38 )	0. 467 ( 0. 107 ~ 2. 036 )	0. 311
		A	11 ( 46 )	( 39 )	1	
		G	13 ( 54 )	( 61 )	0. 734 ( 0. 297 ~ 1. 812 )	0. 502
HLA-DPB2	rs9366816	TT	2 ( 17 )	( 33 )	1	
		CT	4 ( 33 )	( 49 )	1. 304 ( 0. 212 ~ 8. 032 )	0. 775
		CC	6 ( 50 )	( 18 )	5. 000 ( 0. 826 ~ 30. 281 )	0. 080
		T	8 ( 33 )	( 57 )	1	
		C	16 ( 67 )	( 43 )	2. 585 ( 1. 008 ~ 6. 629 )	0. 048

讨 论

中国是 HBV 感染的高发地区，育龄女性中 HBV 感染率高达 7. 18%，从而使 HBV 母婴传播的风险增加<sup>[10-13]</sup>。对 HBsAg 阳性孕妇所分娩的新生儿进行乙肝 Ig 和乙肝疫苗的联合免疫，可阻断大部分母婴传播，但仍有婴儿发生免疫阻断失败，成为新的 HBV 感染者。有研究表明，HBV 母婴阻断失败可能和病毒因素、妊娠期阻断方式有关，但与宿主遗传因素的关系仍知之甚少<sup>[1-2,14-16]</sup>。自 20 世纪 70 年代初以来，HLA 被证实为最主要的与感染性疾病易感性相关基因，并作为个体组织细胞的遗传学标志，在抗原识别、免疫应答等方面起着重要的作用。其通过影响抗原提呈等免疫应答过程，对宿主清除外来病毒如 HBV 病毒发挥作用，并可能影响病毒感染的持久化以及感染后病情进展。

2009 年，日本全基因组研究中心首次提出 HLA-DPB1 的 rs9277535 与日本成年人 CHB 有关<sup>[3-4]</sup>。针对中国人群的研究也表明 rs9277535 与 CHB 有关，提出 HLA-DP 的基因多态性在成年人 HBV 感染中扮演重要的角色，该研究还证实了 rs9277535 的 A 等位基因与 HBV 的清除有关，能降低中国汉族人罹患 CHB 的风险<sup>[5-7]</sup>。另有研究发现，HLA-DPB2 的 rs9366816 与 HBV 的持续性感染有关<sup>[8]</sup>。2016 年 Fan 等<sup>[9]</sup>的研究表明，HLA-DP 基因上的 rs9277535 GG 基因型、rs9366816 TC 基因型和 rs2281388 GA 基因型与成年人 HBV 持续性感染相关，并进一步发现 rs9277535 的 GA 基因型与 HBV 母婴阻断失败后感染有关。

本研究对 12 例免疫阻断失败儿童外周血中的 3 个相关 SNP 位点进行了 PCR 扩增测序和分析，并与中国南方人群的基因频率相比，结果显示 rs9277535 ( HLA-DPB1 ) 和 rs9366816 ( HLA-DPB2 ) 的基因型或等位基因频率与中国南方人群比较差异有统计学意义，提示这 2 个位点可能与免疫阻断失败有关。其中免疫阻断失败儿童的 rs9277535 的 GA 基因型频率为 8%，远低于中国南方人群的 47%，和 Fan 等<sup>[9]</sup>的研究结论一致。他们的研究认为，rs9277535 的 GA 基因型与儿童免疫阻断失败后感染有关。本研究提示，HLA-DPB1 基因上 rs9277535 的 GA 基因型可能是 HBV 感染的保护性基因型，具有此基因型者，可能会降低 HBV 的母婴感染率。既往研究证实，HLA-DPB2 基因 rs9366816 的 CT 基因型与成年人的 HBV 持续性感染有关<sup>[8-9]</sup>。本研究中，12 例免疫阻断失败儿童的 rs9366816 CT 基因型频率 ( 33% ) 与中国南方人群 ( 49% ) 相近。但免疫阻断失败儿童 rs9366816 的 C 等位基因频率为 67%，高于中国南方人群的基因

频率(43%)，提示 rs9366816 的 C 等位基因可能是 HBV 感染的易感基因，不仅能导致成年人的持续性 HBV 感染，还可能会增加 HBV 母婴阻断失败的风险。既往研究发现，rs2281388 CT 基因型与成年人慢性 HBV 感染有关<sup>[9]</sup>。在本研究免疫阻断失败儿童中的 rs2281388 CT 基因型频率为 50%，与中国南方人群的基因型频率(47%)相近，可能与本研究的样本量较小有关；也可能提示由于儿童的免疫系统与成人相比尚未完全发育，从而存在不同的免疫机制有关，其与儿童 HBV 母婴传播免疫阻断失败无关。

胎儿由于免疫系统的特殊性，其基因组中是否含有围生期感染 HBV 的易感基因型尚不明确。本研究中，虽然在免疫阻断失败儿童中发现了 2 个 SNP 位点与南方人群中的基因型频率存在差异，但由于病例数较少，尚不能说明其与 HBV 感染相关，需要在后续的研究中，进一步扩大样本量和增加目的 SNP 位点，继续探讨遗传因素对 HBV 母婴阻断失败的影响，进而为在人群中筛选具有遗传易感性的高危个体，并对其采取针对性的预防措施或治疗手段，为减少 HBV 的母婴传播和控制慢性 HBV 感染提供理论与实验指导。

# 参 考 文 献

- [1] Yin Y, Wu L, Zhang J, Zhou J, Zhang P, Hou H. Identification of risk factors associated with immunoprophylaxis failure to prevent the vertical transmission of hepatitis B virus. *J Infect*, 2013, 66 (5): 447-452.
- [2] Han GR, Cao MK, Zhao W, Jiang HX, Wang CM, Bai SF, Yue X, Wang GJ, Tang X, Fang ZX. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2011, 55 (6): 1215-1221.
- [3] Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet*, 2009, 41 (5): 591-595.
- [4] Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, Kumar V, Kubo M, Hosono N, Takahashi A, Kamatani Y, Miki D, Abe H, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Hum Mol Genet*, 2011, 20 (19): 3884-3892.

- [5] Wang L, Wu XP, Zhang W, Zhu DH, Wang Y, Li YP, Tian Y, Li RC, Li Z, Zhu X, Li JH, Cai J, Liu L, Miao XP, Liu Y, Li H. Evaluation of genetic susceptibility loci for chronic hepatitis B in Chinese: two independent case-control studies. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e17608.
- [6] An P, Winkler C, Guan L, O'Brien SJ, Zeng Z, HBV Study Consortium. A common HLA-DPA1 variant is a major determinant of hepatitis B virus clearance in Han Chinese. *J Infect Dis*, 2011, 203 (7): 943-947.
- [7] Li J, Yang D, He Y, Wang M, Wen Z, Liu L, Yao J, Matsuda K, Nakamura Y, Yu J, Jiang X, Sun S, Liu Q, Jiang X, Song Q, Chen M, Yang H, Tang F, Hu X, Wang J, Chang Y, He X, Chen Y, Lin J. Associations of HLA-DP variants with hepatitis B virus infection in southern and northern Han Chinese populations: a multicenter case-control study. *PLoS One*, 2011, 6 (8): e24221.
- [8] Chang SW, Fann CS, Su WH, Wang YC, Weng CC, Yu CJ, Hsu CL, Hsieh AR, Chien RN, Chu CM, Tai DI. A genome-wide association study on chronic HBV infection and its clinical progression in male Han-Taiwanese. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e99724.
- [9] Fan J, Huang X, Chen J, Cai Y, Xiong L, Mu L, Zhou L. Host genetic variants in HLA loci influence risk for hepatitis B virus infection in children. *Hepat Mon*, 2016, 16 (8): e37786.
- [10] Han GR, Xu CL, Zhao W, Yang YF. Management of chronic hepatitis B in pregnancy. *World J Gastroenterol*, 2012, 18 (33): 4517-4521.
- [11] 徐灵, 张宇亮, 吴成志, 李仁杰, 崔邦铨, 董成林. 不同感染时期慢性乙型肝炎患者表面抗原状况研究. *临床和实验医学杂志*, 2015, 14 (10): 822-824.
- [12] WHO. Draft global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [13] 黄柳, 范祎, 季冰, 叶明. 不同分娩方式与乙型肝炎病毒母婴垂直传播关系的研究——附 290 例分析. *新医学*, 2012, 43 (4): 247-249.
- [14] Wen WH, Chen HL, Ni YH, Hsu HY, Kao JH, Hu FC, Chang MH. Secular trend of the viral genotype distribution in children with chronic hepatitis B virus infection after universal infant immunization. *Hepatology*, 2011, 53 (2): 429-436.
- [15] 尹玉竹, 张培珍, 腾奔琦, 周瑾, 侯红璠. HBV 基因型、前 S/S 基因突变与 HBV 母婴传播免疫预防失败的关系. *中国病理生理杂志*, 2013, 29 (9): 1615-1619.
- [16] Yin Y, Wu L, Zhang J, Zhou J, Zhang P, Hou H. Identification of risk factors associated with immunoprophylaxis failure to prevent the vertical transmission of hepatitis B virus. *J Infect*, 2013, 66 (5): 447-452.

(收稿日期: 2018-02-26)

(本文编辑: 林燕薇)