

丙型肝炎病毒基因变异及候选保守表位分析

黄建生 解咏梅 任大明

(复旦大学遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要 HCV 分离株主要分为 4 个基因型 (HCV I ~ IV), 各型间的氨基酸及核苷酸组成同源性均小于 80%, 氨基酸变异率分别为 C 8%, E1 35%, E2/NS1 53%, NS3 27%, NS4 35%, NS5 39%. 不同型别的 HCV 有不同的地区分布特征. 根据 HCV 表达产物多肽的保守性、亲水性、抗原性及空间构型等特性, 已在 HCV 表达产物中鉴定出一些高度保守的候选 B 细胞表位及 T 细胞表位, 其中 B 细胞表位一般为 12~ 40 肽, T 细胞表位一般为 7 ~ 9 肽, 这些 B/T 细胞保守表位的鉴定, 将有助于推动 HCV 的免疫治疗及疫苗研究的发展.

关键词 HCV, 基因变异, 保守表位

学科分类号 Q933

自 1989 年美国 Choo 等^[1]首先成功地获得了丙型肝炎病毒 (HCV) 的 cDNA 克隆后, 有关丙肝

的分子生物学研究进展非常迅猛. 丙型肝炎病毒为单股正链 RNA 病毒, 其基因结构简图见图 1:

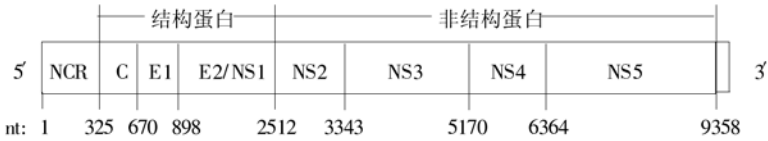


图 1 HCV 的基因组略图

其中 C 代表核心蛋白 (core protein), 包括衣壳蛋白 (capsid protein, C/C) 及膜蛋白 (membrane protein, C/M) 两种, E 代表包膜蛋白 (envelope protein), NS 代表非结构蛋白 (nonstructural protein), NCR 为非编码区 (non-coding region).

与 HBV 相对保守显著不同的是, HCV 病毒株极易变异, 现已测定了数十株 HCV 全基因序列和

许多 HCV 基因片段, 结果显示不同 HCV 株间核酸序列的同源性仅为 60% ~ 92%^[2]. 由于同类病毒不同突变株之间核酸序列的同源性如小于 80% 则分属不同的基因型^[3], 因此目前所获得的 HCV 病毒株比较公认地分为 4 个主要基因型 (HCV I、II、III、IV), 各型间的氨基酸及核苷酸组成同源性均小于 80%. 不同型别的 HCV 有不同的地区分布特征, 表 1 为常见的 HCV 株分布情况:

表 1 HCV 分离株的基因型及其主要分布情况

I 型		II 型		III 型		IV 型	
克隆株	地区	克隆株	地区	克隆株	地区	克隆株	地区
HCV-1	美国	HCV-BK	日本	HCV-J6	日本	HCV-J8	日本
HCV-18	美国	HCV-J	日本	HCV-K2	日本	HCV-K2b	日本
HCT-23	美国	HCV-J1	日本				
HCT-27	美国	HCV-J4	日本				
HCT-H	美国	HCV-JH	日本				
EC1	意大利	HCV-JT	日本				
HG-J1	日本	HG-K1	日本				
Pt-1	日本	HCV-CHN	中国				
		HCV-T3	中国台湾				
		KHCV-LBC1	韩国				

欧美国家流行以 HCV I 型为主, 日本 HCV I ~ IV 型均有但以 HCV II 为主, 我国以及南朝鲜的毒株亦属于 II 型^[4]. HCV RNA 的突变率是原核和真核 DNA 复制突变率的 1 000 000 倍, 因此我们很难见到序列完全相同的 2 个 HCV 分离株, 甚至从同一患者体内不同时间分离到的 HCV 克隆间核酸同源性都有一定甚至很大的差异, 突出体现了 HCV 的异质性.

HCV 基因组中 5' 非编码区、C、NS3 和 NS5 基因变异较小, 其中核心区变异率约为 19%, 5' NCR 区仅为 0.7%. E1 区为 35%, 但其中有 14 个氨基酸序列 (HRMAWDMMMNWSPT) 保守率高达 42/44 (株), 8 个半胱氨酸残基也保持高度保守 (351/352)^[5]. E2/NS1 基因尤其是 E2 的 HV 区变异高达 53%, 其 C 端相对保守, N 端内具有两个高度变异部位 HVR1 和 HVR2, 且 HVR1 比 HVR2 更易发生变异, 突变率约为 1 氨基酸/月^[6]. NS3、NS4 及 NS5 的变异率分别为 27%、35% 及 39%^[5].

目前已经从 4 种不同的 HCV 型中获得了许多共同的高度保守 B 细胞及 T 细胞表位, 由于目前

尚无理想的预防及治疗手段, 因此这些高度保守的表位 (特别是保护性表位), 对 HCV 疫苗、HCV 免疫治疗及对 HCV 免疫机理的研究等将可能具有相当重要的意义.

通过对 HCV 表达产物的氨基酸序列进行分析, 根据多肽的保守性、抗原性、亲水性及空间构型等特性, 文献中已经报道了许多高度保守的候选 B 细胞表位及 T 细胞表位 (表 2 和表 3).

B 细胞表位的鉴定主要由多肽的亲水性及抗原性决定, 其保守的程度为至少在目前所发现的 HCV 分离株中保持 80% 以上的保守性. 这些 B 细胞表位一般为 12~ 40 肽, 在核心区则发现一些 5~ 7 肽的表位. 这些保守表位大多已被证实具有良好的抗原-抗体反应特性, 也是 HCV 疫苗设计的重点靶序列.

T 细胞表位的选择则更侧重于该多肽是否能与 MHC-I 类分子结合, 是否能诱发 HCV 特异的细胞毒 (CTL) 作用, 其大小一般为 5~ 12 肽, 以 7~ 9 肽为最多. 由于 HCV 的本身免疫主要为细胞免疫, 因此 T 细胞表位 (特别是那些能诱发强烈 CTL 作用的表位), 可能比 B 细胞表位具有更重要的意义.

表 2 HCV 基因表达产物的候选保守 B 细胞表位^[5, 7~ 18]

基因产物	氨基酸位置	氨基酸序列
C/C	1~ 28 (1~ 28)	MSTNPKPQIKTKRNTNRRPQDVKFPGGG
	9~ 16 (9~ 16)	IKTKRNT
	12~ 26 (12~ 26)	KRNTNRRPQDVKFPG
	13~ 30 (13~ 30)	RNTNRRPQDVKFPGGGQI
	29~ 35 (29~ 35)	QIVGGVY
	34~ 39 (34~ 39)	VYLLPR
	46~ 75 (46~ 75)	VRATRKTSESRQPRGRRQPIPKARRPEGR
	92~ 109 (92~ 109)	GWAGWLLSPQCSRPSWGP
C/M	31~ 69 (146~ 184)	GAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSC
E1	199~ 219 (314~ 334)	HVSGHRMAWDMMMNWSPTTCLVV
	201~ 214 (316~ 329)	SGHRMAWDMMMNWSPT
NS1	192~ 203 (581~ 592)	CPTDCFRKHPEA
	241~ 277 (630~ 666)	RMYYVGGVEHRLEAACNWTRGERCdLEDNRSELSPLL
NS3	222~ 248 (1228~ 1254)	LHAPTSGSKSTKVPAAAYAAQGYKVLVL
	381~ 399 (1387~ 1405)	GGRHLIFCHSKKKCDELAA
	439~ 449 (1445~ 1455)	TGDFDSVIDCN
NS4	86~ 94 (1701~ 1708)	LYREFDEM
	89~ 106 (1704~ 1721)	EFDEMEECASHLPYIEQG
	306~ 325 (1921~ 1940)	AFASRCNHVSPTHYVPESDA
NS5	159~ 198 (2172~ 2211)	TSMLTDPSHITAETAkRRLARGSPPSLASSASQLSAPSL
	570~ 584 (2583~ 2597)	PDLGVRVCEKMALYD
	681~ 695 (2694~ 2708)	CGYRRCRASGLTTS
	746~ 774 (2759~ 2787)	FTEAMTRYSAAPPDPPQPEYDLELITSCS
	780~ 798 (2793~ 2811)	AHDASGKRYYLTRDPTTP

表 3 HCV 基因表达产物的候选保守 T 细胞表位^[5, 19~ 28]

基因产物	氨基酸位置	氨基酸序列
C/C	31~ 45 (31~ 45)	GGVYLLPRRGPRLG V
	35~ 44 (35~ 44)	YLLPRRG PRL
	81~ 100 (81~ 100)	YPWPLYGNEGLGW- AGWLLSP
	129~ 144 (129~ 144)	GFADLMGYIPLVGAPL
	132~ 140 (132~ 140)	DLMGYIPLV
C/M	34~ 46 (149~ 161)	RALAHGVRLEDG
	63~ 70 (178~ 185)	LLALLS
E1	126~ 132 (317~ 323)	RMAWDM M
NS1	193~ 201 (582~ 590)	PTDCTRKHP
	222~ 228 (611~ 617)	YPYRLWH
	235~ 243 (624~ 632)	ASRCMVAM
NS2	234~ 239 (963~ 968)	GLRDLA
NS3	20~ 24 (1026~ 1030)	LAPIT
	155~ 160 (1161~ 1166)	LKGSSG
	229~ 235 (1235~ 1241)	GKSTKVP
	250~ 255 (1256~ 1261)	PSVAAT
	278~ 293 (1284~ 1298)	TITTGAPVTYSTY GK
	323~ 331 (1329~ 1337)	IGTVLDQAE
	408~ 413 (1414~ 1419)	AVAYYP
	439~ 447 (1445~ 1453)	TGDFDSVID
	440~ 451 (1446~ 1457)	GDFDSVIDCNTC
	481~ 485 (1487~ 1491)	RRGRT
	548~ 553 (1554~ 1559)	HLEFWE
	555~ 558 (1561~ 1564)	VFTG
NS4	154~ 166 (1769~ 1781)	ISGIQYLAGLSTL
	193~ 202 (1807~ 1816)	LLFNILGGWV
	238~ 243 (1853~ 1858)	AGYGAG
	283~ 288 (1898~ 1903)	CAAILR
	299~ 304 (1914~ 1919)	QWMNRL
NS5	160~ 165 (2173~ 2178)	SMLTDP
	167~ 171 (2180~ 2184)	HITAE
	186~ 195 (2199~ 2208)	ASSSASQLSA
	574~ 580 (2587~ 2593)	VRVCEKM
	715~ 724 (2728~ 2737)	GLQDCTMLV
	768~ 775 (2781~ 2788)	ELITSCSS

在这些表位中，少部分 B 细胞表位同时含有 T 细胞表位，如 NS3 中的 B 细胞表位 TGDFDSVIDCN，前 9 个氨基酸也同时是 T 细胞表位；NS5 中的 FTEAMTRYSAAPPDPPQPEY-DLELITSCS (S) B 细胞表位后 7 个氨基酸也含有另一个 T 细胞表位。这种具有双重“身份”的候选表位，在疫苗研究中值得重点考虑。

HCV 的高度变异性提示，可能有某种特殊的机理维持 HCV 重要功能基因的相对稳定，同时又促使某些基因高度突变，来满足生存和进化的需要。RNA 病毒为适应环境和逃脱宿主的免疫清除而易发生突变，逐渐形成了新的 HCV 突变株并各

自独立演化。HCV 的高度变异性是丙型肝炎慢性化及重症化的重要原因，不同型 HCV 的毒力以及对抗病毒治疗的反应有所差别，也意味着针对某一型的丙型肝炎疫苗可能无法对其他型或亚型的 HCV 起保护作用。无论是免疫治疗还是疫苗研究，均应尽量能针对各种不同型和亚型的 HCV 分离株，而深入研究 HCV 保守的保护性表位将有助于克服目前 HCV 的高变性及抗体的无反应性等障碍。

参 考 文 献

1 Choo Q L, Kuo G, Weiner A J, *et al.* Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B Viral hepatitis genome. *Science*, 1989, **244** (4902): 359~ 362

2 Houghton M A, Weiner J H, Han G, *et al.* Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, **14** (2): 381~ 388

3 Enomoto N, Takada A, Nakao T, *et al.* There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Comm*, 1990, **170** (3): 1021~ 1025

4 Liu K, Hu Z, Li H, *et al.* Genomic typing of hepatitis C virus present in China. *Gene*, 1992, **114** (2): 245~ 250

5 Lin H J, Lau J Y, Lauder I J, *et al.* The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidates epitopes. *Virus Res*, 1993, **30**: 27~ 41

6 沈定霞 (Shen D X). 丙型肝炎病毒包膜蛋白的研究进展. 国外医学微生物分册 (Foreign Medical Sciences—Microbiology), 1996, **19** (1): 49~ 51

7 Wang Y F, Brotman B, Andrus L, *et al.* Immune response to epitope of hepatitis C virus (HCV) structural proteins in HCV-infected humans and chimpanzees. *J Infect Dis*, 1996, **173** (4): 808~ 821

8 Chen Z, Berkower I, Wang R Y, *et al.* Genetic control of the murine humoral response to distinct epitopes of hepatitis C virus core protein. *J Viral Hepatitis*, 1995, **2** (1): 9~ 17

9 Sienoneit K, Silva M D, Koerner K, *et al.* Human monoclonal antibodies for the immunological characterization of a highly conserved protein domain of the hepatitis C virus glycoprotein. *Clin Exp Immunol*, 1995, **101** (2): 278~ 283

10 Kakimi K, Kuribayashi K, Iwasgiro M, *et al.* Hepatitis C virus core region: helper T cell epitopes recognized by BALB/c and C57BL/6 mice. *J Gen Virol*, 1995, **76** (Pt5): 1205~ 1214

11 Mondelli M U, Cerino A, Boender P, *et al.* Significance of the immune response to a major, conformational B-cell on the hepatitis C virus NS3 region defined by a human monoclonal antibody. *J Virol*, 1994, **68** (8): 4829~ 4836

12 Zhang Z X, Sonnerborg A, Sallberg M. Antigenic structure of the hepatitis C virus envelope 2 protein. *Clin Exp Immunol*, 1994, **98** (3): 382~ 387

13 Sienoneit K, daSilvaCardoso M, Wolpl A, *et al.* Isotype-specific immune response to a single hepatitis C virus core epitope defined by a human monoclonal antibody: diagnostic value and correlation to PCR. *Ann Hematol*, 1994, **69** (3): 129~ 133

14 Sallberg M, Pumpen P, Zhang Z X, *et al.* Locations of antibody binding sites within conserved regions of the hepatitis C virus core protein. *J Med Virol*, 1994, **43** (1): 62~ 68

15 Sienoneit K, daSilvaCardoso M, Wolpl A, *et al.* Isolation and epitope characterization of human monoclonal antibodies to hepatitis

- C virus core antigen. Hybridoma, 1994, **13** (1): 9~ 13
- 16 Simmonds P, Rose K A, Graham S, *et al.* Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. J Clin Microbiol, 1993, **31** (6): 1493~ 1503
 - 17 Ferroni P, Mascolo G, Zaninetti M, *et al.* Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein. J Clin Microbiol, 1993, **31** (6): 1586~ 1591
 - 18 Akatsuka T, Donets M, Scaglione L, *et al.* B-cell epitopes on the hepatitis C virus nucleocapsid protein determined by human monospecific antibodies. Hepatology, 1993, **18** (3): 504~ 510
 - 19 Kurokohchi K, Akatsuka T, Pendleton C D, *et al.* Use of recombinant protein to identify a motif-negative human cytotoxic T-cell epitope presented by HLA-A2 in the hepatitis C virus NS3 region. J Virol, 1996, **70** (1): 232~ 240
 - 20 Cerny A, McHutchison J G, Pasquinelli C, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA-A2. I binding motif. J Clin Invest, 1995, **95** (2): 521~ 530
 - 21 Weiner A, Erickson A L, Kansopon J, *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (7): 2755~ 2759
 - 22 Shirai M, Arichi T, Nishioka M, *et al.* CTL response of HLA-A2. I-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2. I. J Immunol, 1995, **154** (6): 2733~ 2742
 - 23 Battegay M, Fikes J, Bisceglie A M, *et al.* Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus encoded peptides binding to HLA-A2. I molecules. J Virol, 1995, **69** (4): 2462~ 2470
 - 24 Khudyakov Y E, Khudyakova N S, Jue D L, *et al.* Linear B-cell epitopes of the NS3-NS4-NS5 proteins of the hepatitis C virus as model with synthetic peptides. Virology, 1995, **206**: 666~ 672
 - 25 Shirai M, Okada H, Nishioka M, *et al.* An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. J Virol, 1994, **68** (5): 3334~ 3342

- 26 Erickson A L, Houghton M, Choo Q L, *et al.* Hepatitis C virus specific CTL response in the liver of Chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. J Immunol, 1993, **151** (8): 4189~ 4199
- 27 Kita H, Moriyama T, Kaneko T, *et al.* HLA-B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. Hepatology, 1993, **18** (5): 1039~ 1043
- 28 Koziel M J, Dudley D, Wong J T, *et al.* Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. J Immunol, 1992, **149** (10): 3339~ 3344

Genetic Variation and Conserved Epitopes of Hepatitis C Virus. HUANG Jian-Sheng, XIE Yong-Mei, REN Da-Ming (State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China).

Abstract Hepatitis C virus has four chief genotypes HCV I、II、III and IV, whose homology of amino acids and nucleic acids is less than 80% each other. The variation rates of HCV proteins are core 8%, E1 35%, E2/NS1 53%, NS3 27%, NS4 35%, NS5 39%, respectively. According to the characters of conservation, hydrophilicity, antigenicity and conformation, a series of highly conserved T cell and B cell epitopes are identified from the HCV expressed products, which might be beneficial to the prevention and treatment of hepatitis C. In general, B epitope is about 12~ 40 peptides and T epitope 7~ 9 peptides.

Key words hepatitis C virus (HCV), genetic variation, conserved epitopes

碱液提取箬叶多糖的纯化及其结构性质的研究

陈春英¹⁾ 丁玉强²⁾ E. A. ELMAHADI 周井炎 李 焰 徐辉碧

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

摘要 通过高碘酸氧化、Smith降解、部分酸水解分析、NMR分析等多种方法对以不同浓度的NaOH溶液箬叶中提取的两种多糖F IIIa及F IV-a进行了研究, 结果表明二者均具有多分枝结构, F IIIa主链以 α (1→3)连接的木糖为主, 分子侧链由半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸构成, 葡萄糖醛酸主要位于分子的末端; F IV-a主链由 α (1→3)木糖和 β (1→6)半乳糖构成, 以阿拉伯糖、葡萄糖醛酸组成侧链, 葡萄糖醛酸主要位于分子的末端。

关键词 箬叶多糖, 纯化, 结构分析

学科分类号 Q53

箬叶是禾本科植物箬竹 (*Indocalamus tessellatus*) 的叶。其功用主治清热止血, 解毒消肿。箬竹主要分布于长江流域等地, 《本草纲目》记载: 箬叶“甘, 寒, 无毒”, “治男女吐血、衄血、呕血、

咯血、下血。又通小便, 利肺气, 喉痹, 消痈肿”。

¹⁾ 中国科学院高能物理研究所核技术应用研究部, 2732信箱, 北京 100080.

²⁾ 南阳理工大学化学系, 南阳 473066.

收稿日期: 1997-09-11, 修回日期: 1998-04-09