

- ing factor TFIIID. *Cell*, 1990; **61**:1171
- 11 Starr D B, Hawley D K. TFIIID binds in the minor groove of the TATA box. *Cell*, 1991; **67**:1231
 - 12 Lee D K, Horikoshi M, Roeder R G. Interaction of TFIIID in the minor groove of the TATA element. *Cell*, 1991; **67**: 1241
 - 13 Nash H A, Granston A E. Similarity between the DNA-binding domains of IHF protein and TFIIID protein. *Cell*, 1991; **67**:1038
 - 14 Smale S T, Schmidt M C, Berk A J *et al.* Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator; specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:4509
 - 15 Roy A L, Meisterernst M, Pogmonec P *et al.* Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Nature*, 1991; **354**:245
 - 16 Comai L, Tanese N, Tjian R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, 1992; **68**:965
 - 17 Wu L, Rosser D S E, Schmidt M C *et al.* A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. *Nature*, 1987; **326**:512
 - 18 Lin Y-S, Green M R. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. *Cell*, 1991; **64**:971
 - 19 Meisterernst M, Horikoshi M, Roeder R G. Recombinant yeast TFIIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 9153
 - 20 Taylor I C A, Workman J L, Schuetz T J *et al.* Activation domains of stably bound GAL4 derivatives alleviate repression of promoters by nucleosomes. *Genes Dev*, 1991; **5**:1285

乙型肝炎病毒变异株研究进展

叶 昕 甘人宝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

乙型肝炎病毒在其复制过程中需通过以 RNA 为中间体的逆转录过程, 因而其突变率较一般的 DNA 病毒高, 随着对 HBV 研究普遍和深入开展, 最近几年发现了一些新的具有不同生物功能的变异株. 文章综述了近年来对 HBV 变异株研究的进展, 内容主要包括: 表面抗原相关变异, e 抗原表达变异, 核心抗原相关变异以及变异与肝癌的关系.

关键词 乙型肝炎病毒, 乙肝疫苗, 变异株

乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病. 最新的统计表明, 世界上 HBV (乙型肝炎病毒) 携带者已占人口 5%. 中国是世界上受害最严重的国家, 目前携带乙肝病毒的患者已有一亿多, 每年通过母亲传染的新生儿患者已达百万人以上. 乙型肝炎的病原体是一个较小的 DNA 病毒——乙型肝炎病毒 (HBV). 因而开展对 HBV 深入研究, 无论从基础理论, 基因工程疫苗乃至临床诊断及治疗都是具有重大意义的研究课题.

1979 年巴斯德研究所 Tiollais 等人首先发表了 ayw HBV DNA 的结构, 从而开创了 HBV 分子生物学的研究. HBV 基因组含有 4 个开放阅读框架, 它们分别编码表面抗原 (HBsAg), 核心抗原 (HBcAg), 内源聚合酶和 X 蛋白^[1]. 按照表面抗原免疫特性分类, HBV 主要可分成 adr, adw ayr, ayw4 种亚型变异株. HBV 虽很小仅 3.2kb, 但其包含了一个病毒所具有的生

物活性的全部信息, 整个基因组都用以编码蛋白. 而 HBV 的自发突变频率为 $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5}$ /位点/年^[2]. HBV 在其复制过程中需通过以 RNA 为中间体的逆转录过程, 因而其突变率较一般的 DNA 病毒高. 人体被 HBV 感染的漫长过程中, 每个位点都可能发生突变. 人们在早期研究 HBV 工作中, 已经观察到同种亚型 HBV DNA 中存在一定差异^[3], 无论内切酶酶切点和核苷酸序列都有变异, 对 HBV 的多态性作了初步报道, 并预示其可能存在的生物学意义.

随着对 HBV 研究普遍和深入开展, 最近几年发现了一些新的具有不同生物功能的变异株. 1986 年, 法国 Tiollais 首先发现在免疫学上有别于 HBV 的变异株^[4], 次年 Coursaget 等也首先发现塞内加尔的 HBV 感染患者中携带一种具有特异免疫特性的 HBV, 命名为 HBV₂^[5], 引起了全世界许多实验室重视并相继开展 HBV 变异株研究, 这些变异株的发现对 HBV 有了新的认识, 开拓了一个新的研究课题. 总结国内外进展大致可分以下几个方面.

1 HBsAg 相关变异

HBV 免疫学上分类是根据 HBsAg 的免疫特性, HBsAg 由 226 个氨基酸组成, 不同亚型的 HBsAg 多肽链上存在着氨基酸组成特殊差异, 这些特殊差异正是免疫学分型的分子基础. 而这些特异氨基酸的差异可引起亚型上的变化. 已有研究表明当 113 位的丝氨酸突变为苏氨酸, 或 22 位的精氨酸突变为赖氨酸, 134 位的酪氨酸突变为苯丙氨酸后, HBsAg 便由 y (+) d (-) 向 y (+) d (+) 亚型转化, 而当上述突变同时存在时, 则 HBsAg 便完全由 y 变成 d 亚型. 160 位的精氨酸突变为赖氨酸后, HBsAg 便由 r 转变为 w 亚型^[6]. 在临床上就存在这种亚型变化的变异株^[7], 如日本学者通过深入分析发现一些慢性持续感染病人最初感染 ayr 亚型, 人体经过长期感染产生点突变, 部分病毒变异为 adw, 由 adw 与 ayr 共同感染肝细胞后形成比较罕见的 adywr 表面抗原. 另外还

有一种病人则是最初被两种不同亚型的 HBV (adr, ayw) 同时感染所致, 过去认为机体被某种亚型 HBV 感染后就会排斥其它亚型 HBV 的感染. 而上述研究结果表明不同亚型的 HBV 共存于同一个体是可能的, 揭示 HBV 可能存在着新的感染机制.

上述病人感染过程中产生的新的变异株是否给临床上治疗带来了困难目前还不清楚. 1990 年英国的 Thomas 对一组意大利儿童进行研究时发现一种疫苗诱导型 HBV 变异株^[8], 称之为 vaccine escape mutant, 患者接种疫苗后依然表现严重肝炎症状, 对其血清中的 HBV 进行序列分析, 发现表面抗原基因 a 抗原主要决定簇位点第 587 位碱基发生 G→A 突变, 导致 S 蛋白 145 位 Gly 变成 Arg, 患者体内 HBsAg 抗原性很弱, 无论主动还是被动免疫均不能中和这种病毒, 该变异株很稳定, 并具有较高的复制能力, 在患者体内已存活五年. 最近, Ostberg 等人对 3 例肝脏移植的患者体内的 HBV 进行追踪研究, 病人手术前后均给予抗 HBsAg 单克隆抗体, 术后 HBsAg 阴性, 但分别在 143, 251 及 252 天后转阳, 表达水平低, 抗原性减弱, 对其 S 基因 DNA 进行分析, 发现存在许多点突变, 导致 S 蛋白 124, 129, 131, 137, 140 及 145 位氨基酸发生改变, 其中 145 位突变所占比例最高, 研究者认为这类变异可能是免疫压力所致^[9]. 在我国, 临床上也发现不少疫苗治疗失败的病例. 患者使用乙肝疫苗后, 体内 HBsAg 与抗 HBs 持续阳性, HBV DNA 依旧阳性, 血液具有感染活力, 这类病人感染的 HBV 很可能是一种 HBV 变异株, 最近我们对一例疫苗失败患者进行研究, 发现 preS2 区 C 末端缺失 69 个碱基的 HBV DNA, 这种缺失型 HBV 与野生型 HBV DNA 共存于患者体内, 其生物学意义尚不清楚. 对这类变异株的深入开展有可能发现具有新的生物功能的变异株, 为临床上治疗提供新的理论基础和新的治疗方案.

2 HBeAg 表达变异

在临床上已发现与 HBeAg 表达相关的

HBV 变异株, 通常血清中 HBeAg 转为抗 HBeAg 被认为是乙型肝炎病情缓解及血液中 HBV 颗粒消失的标记, 然而一些实验室发现在一些抗 HBe 阳性的慢性乙型肝炎患者血液中 HBeAg 消失, 但体内的 HBV 仍具有复制和感染活力, 分析这些患者 HBV DNA 结构, 发现其 C 区存在着规律性的点突变. 90% 以上是在前 C 基因区末端 (即 HBeAg 编码区) 由于 G→A 点突变导致一个 TAG 终止密码, 位于 1896 或 1899, 人们称之为 HBe-变异株^[10,11], 感染这种变异株的病人病情变化难以预料, 血液具有感染活力, 用 HepG2 细胞进行体外实验证实该变异株具有复制能力^[12].

德国的 Will 等人对大量慢性感染的病人进行分析, 发现该类病人血清中存在混合型 HBV, 既含有野生型, 又含有变异株, 变异位点除上述的无义突变外, 在 HBeAg 起始密码位点也发现变异, 病人经过一段时间的潜伏期, 会再次暴发乙型肝炎^[13]; 最近法国和日本等国的研究者也相继发现这类混合型 HBV 的存在^[14,15]. 研究者认为该 HBV 变异株由于不能合成 HBeAg, 可以逃脱机体免疫清除, 因而较野生型更具生存优势, 在慢性感染的患者体内它们将逐步取代野生型 HBV.

3 HBeAg 相关变异株

临床上鉴别乙肝病人的指标一般都应用 HBsAg 的免疫测定, 同时辅以其他免疫 Mark HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe 在临床上称为“两对半”指标测定, 一般 HBV 感染 (亦可称 HBV1 感染) 患者都可检测到这“两对半”的指标. 最近几年国外不少实验室发表了免疫 Mark 特异的 HBV 变异株, 其中有人称为 HBV2.

几家实验室报道了一些长期感染 HBV 的病人 (主要来源塞内加尔, 西班牙及台湾), 临床检测 HBsAg 为阳性, 但一直未检测到 anti-HBc. 这种特性的变异株可传子代, 在 HBV 感染的病人中有一定的比例^[16].

另外一种 HBV 变异株也引起人们重视,

这种变异株感染人后, 人体内不出现抗 HBeAg, 当 HBsAg 消失后也不出现抗 HBs, 抗 HBc 抗体^[17]. 对有的病例进行 DNA 分析, 发现有下列几种变异: a. pre-C 区发生点突变导致终止密码出现; b. C 基因起始密码突变; c. pre-C 基因区内插入 36 个碱基, 并因此产生一个新的核心蛋白起始密码. 这类变异株感染人体后可导致慢性持续感染, 在成人和儿童中均发现了上述新 HBV 变异株. 还有一种变异株, HBsAg, anti-HBs 及 anti-HBc 均阴性, PCR 检测 HBV DNA 阳性^[18], 这种变异株感染人后为什么没有免疫上的应答反应, 其分子基础还不清楚, 还有待今后研究.

大量免疫 Mark 变异的 HBV 变异株的发现给临床上鉴定提出了新的问题, 即 HBV 感染患者亦可能检测不到免疫 Mark, 但这些病人有乙肝症状, 损伤肝脏, 又有感染活性, 因此应用以前的免疫 Mark 检测法有可能漏检一批携带变异的 HBV 患者, 实际上 HBV 携带者会超过目前检测到的数字, 因此临床必须有新的诊断指标. 最近法国 Trepo 等人已建立了一种将 PCR 和 DNA 点杂交相结合方法^[19], 对可能含有 HBV 变异株病人进行筛选, 并获得了成功, 这将为临床上提供一种新的检测方法.

上述大量的免疫 Mark 变异的研究, 至今主要还处在临床免疫鉴定水平. 因此开展分子生物学工作可能解答临床上发现的现象, 有助于临床诊断, 也可将 HBV 基因表达和调控功能的认识提高到一个新的水平.

4 变异株与肝癌的关系

乙型肝炎病毒引起的持续性感染是临床流行病学的一大问题. 导致 HBV 持续感染的因素之一可能是 HBV 的变异株, 病人肝脏长期受 HBV 感染而受到严重损伤, 这将有导致癌变. 国内学者闻玉梅等在分析原发性肝癌组织中 HBV C 基因的序列时, 首次发现我国存在的 adr 亚型 HBV 的前 C 区 1898 位点出现终止密码的变异 TGG→TAG 的变异, 这与患者血液中 HBV 的前 C 区的变异相一致^[20]. 国

外学者已报道了地中海地区乙肝患者血清中 HBV 在相同位点有变异,说明这一突变有普遍性和保守性。C 基因的突变与 C 抗原的异常表达的关系,变异的 HBV 与肝炎病症,肝癌的关系是临床上一大课题,还待大量研究才能阐明这些关系。

综合以上所述,目前发现的携带 HBV 变异株的病人中,有很多是慢性持续感染的患者,或是经乙肝疫苗治疗无效的患者。而持续感染肝脏受损的人,容易引起癌变,在我国这样的病人每年有三十万人死亡,因此 HBV 及其变异株极大地危害着人类的健康。另一方面 HBV 是一个自发突变较高的病毒,而其较小的基因组蕴藏着编码蛋白、编码调控区和调控元件等大量的生物信息,具有生物功能区占整个基因组。因此,高频率的自发突变就有可能引起某种生物功能上的变异;如功能蛋白上的突变、调控区、调控元件上的变异、这可能引起亚型上的变化,HBV 免疫 Mark 变化、HBV 感染人体能力变化、有可能引起 HBV 整合到宿主细胞能力的变化等等,这些理论问题尚不清楚,在临床上对于慢性持续感染的患者或经乙肝疫苗治疗失败的患者,还缺乏有效的治疗措施。因此无论基础理论和临床上面临的问题都需对 HBV 变异株进行深入研究,尤其是开展分子生物学研究。

参 考 文 献

- 1 Miller R, Kaneko S, Chung C *et al.* Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*, 1989; **9**: 322
- 2 Girones R, Miller R H. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology*, 1989; **170**(2):595
- 3 吴祥甫,冯宗铭,江福美等. 人乙型肝炎病毒(HBV)adr 亚型基因组的多态性. 生物化学杂志, 1985; **1**(4):69
- 4 Wands J R, Fujita Y K, Isselbacher K J *et al.* Identification and transmission of hepatitis B virus. *PNAS*, 1986; **83**(17):6608
- 5 Coursaget P, Bourdil C, Adamowicz P *et al.* HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet*, 1987; **12**:1284
- 6 AshtonRickardt P G, Murray K. Mutations that change

- the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *J Med Virol*, 1989; **29**(3): 204
- 7 Yamanaka T, Akahane Y, Suzuki H *et al.* Hepatitis B virus surface antigen particles with all four subtypic determinants; point mutations of hepatitis B virus DNA inducing phenotypic changes or double infection with viruses of different subtypes. *Mol Immunol*, 1990; **27**(5):443
- 8 Carman W, Zanetti A, Karayiannis P *et al.* Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, 1990; **336**:325
- 9 McMahon G, Ehrlich P, Moustafa Z A *et al.* Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg; DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. *Hepatology*, 1992; **15**(5):757
- 10 Lok A, Hadziyannis S, Weller I *et al.* Contribution of low level HBV replication to continuing inflammatory activity in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B virus infection. *Gut*, 1984; **25**:1283
- 11 Okamoto H, Yotsumoto Y, Akahane T *et al.* Hepatitis B viruses with precore defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to anti-HBe. *J Virol*, 1990; **64**:1298
- 12 Tong S, Diot C, Gripon P *et al.* *In vitro* replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *J. Virol*, 1990; **181**:733
- 13 Kosaka Y, Takase K, Kojima M *et al.* Fulminant hepatitis B; induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology*, 1991; **100**:1087
- 14 Ulrich P P, Bhat R A, Kelly I *et al.* A precore-defective mutant B virus associated with e antigen-negative chronic liver disease. *J. Med Virol*, 1990; **32**(2):109
- 15 Takeda K, Akahane Y, Suzuki H *et al.* Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HBsAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology*, 1990; **12**:1284
- 16 Lee S-D, Lo K-J, Tsai Y-T *et al.* HBsAg carriers infants with serum anti-HBe negativity. *Hepatology*, 1989; **9**: 102
- 17 Kaneko S, Miller R. Heterogeneity of the core gene sequence in a patient chronically infected with the hepatitis B virus. *J Infect Dis*, 1989; **160**:903

- 18 Thiers V, kremsdorf D, Schellekens H *et al.* Transmission of hepatitis B virus from hepatitis-B₂seronegative subjects. *Lancet*, 1988; 2:1273
- 19 Li J, Tong S, Vitvitski L *et al.* Rapid detection and further characterization of infection with hepatitis B virus variants containing a stop codon in the distal pre-C region. *J Gen Virol*, 1990; 71:1993
- 20 闻玉梅. 乙型肝炎病毒核心基因突变株的发现及其意义. 中华医学杂志, 1990; 70:664

造血调控因子及其受体转录调控机制的研究进展

贺福初 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

提 要

综述了5种集落刺激因子(CSF)、红细胞生成素(EPO)、5种白介素、干扰素、肿瘤坏死因子、白血病抑制因子、干细胞抑制因子、2种CSF受体(R)、EPOR和两种白介素R等转录调控分子机制的研究进展。

关键词 集落刺激因子, 白介素, 抑制因子, 受体, 转录调控

造血调控因子及其受体在髓系、淋巴系细胞增殖、分化过程中承担着至关重要的调控作用。其调控作用首先决定于内、外环境因素对其基因表达的调控。表达调控的关键则在于转录这一环节。因此, 近年来人们对造血调控因子及其受体转录调控的分子机制进行了广泛、深入的研究。现将其进展分集落刺激因子(CSF)、白介素(IL)、其它造血调控因子和造血调控因子受体等四方面作简要概述。

1 CSF的转录调控机制

1.1 multi(多系)-CSF(IL-3)^[1,2] 在WEHI-3T细胞株中组成性表达, 在正常T淋巴细胞或NK细胞中只在激活后才表达。在其转录起始点上游存在TATA盒(-24bp)、富GC区(-45bp)和CAAT盒(-80bp)。在第二内含子内存在14bp的9个重复序列, 它们组成两个增强子核心序列。其中CCTCCC类似于SV40早期启动子中的CCGCCC。这些真核基因中普遍存在的调控序列在IL-3基因中的存在提示它有着与其它真核基因相似的转录调控机制。此外, 在上游区还存在NF(核因子)-IL3-

A(GATGAA TAAT), AP(激活蛋白)-1, CK(细胞因子)-1及-2(此两位点在多种细胞因子基因的上游区均可见到), AP-2等结合位点, 其中NF-IL3-A, AP-1位点与T细胞中IL-3转录的正向调节相关, 且后者辅助前者, CK-1, -2则作用很小。NF-IL3-A与OCT(八体结合蛋白)-1及-2, pit(脑垂体特异转录因子)-1识别位点的序列相近, 是两者间的一负调控区NIP而不是NF-IL3-1, AP-1结合蛋白与IL-3的诱导性、细胞特异性表达相关。IL-3在WEHI-3细胞中的组成性表达则是由于IAP(intracisternal A particle)基因组内LTR插入到IL-3基因5'端从而激活的缘故。

1.2 GM(粒单系)-CSF^[3,4] 除在人MoT细胞株中组成性表达外, 一般均在T淋巴、成纤维、内皮、巨噬细胞中诱导性表达。与IL-3相同的是, 它也有TATA盒, 但在Mo细胞中未发现其基因重排。其上游存在NF- κ B位点, 已证明它对经PHA或tax(分裂原)刺激后T细胞内GM-CSF的诱导转录十分重要。