

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1405-03

HBV 前 C/C 及其调控序列热点变异与肝炎病变程度的关系

梁蔚芳, 何海棠, 刘志华, 骆抗先 (南方医科大学南方医院感染内科 广东 广州 510515)

Correlation between hot spot mutation in HBV PreC/C, BCP and disease progress

LIANG Wei-Fang, HE Hai-Tang, LIU Zhi-Hua, LUO Kang-Xian

Department of Infectious Diseases, Nangfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 AIM: To study the mutants of preC/C gene and the base core premotor (BCP) in 42 patients with different phases of chronic hepatitis B, so as to find out the relationship between hot spots in different regions and the disease progress. **METHODS:** The HBV DNA of BCP and PreC/C were amplified by PCR from serum samples of 42 patients with chronic hepatitis B, and the products were cloned into T vector and sequenced. **RESULTS:** Of the BCP double mutations, the T1762/A1764 mutants occurred in 5 patients (38.5%) in the mild hepatitis group, 4 patients (30.8%) in the moderate hepatitis group and 11 patients (68.7%) in the severe hepatitis group. The T1762/A1764 double mutations were not significantly different among the three groups ($P > 0.05$). A1896 mutation occurred in 30.8% of mild hepatitis group, in 46.2% of moderate hepatitis group and in 50.0% of severe hepatitis group. The A1896 mutation was not significantly different among the three groups ($P > 0.05$). Of the hot spots in the core region, there were 23 amino acids substituted in mild hepatitis group, 33 in moderate hepatitis group and 40 in severe hepatitis group. The amino substituted in the core region was significantly different among the three groups ($P < 0.05$), and the substitutes were increased along with the disease progress. **CONCLUSION:** The mutation in the preC/C and BCP gene is multiple and complex and associated with chronic hepatitis progression and immune clearance.

【Keywords】 HBV; chronic hepatitis B; mutation

【摘要】目的:通过对慢性 HBV 患者中 HBV preC/C 基因及其调控序列的变异热点的分析,研究各区段变异热点与疾病病变程度的关系。方法:对 42 例慢性 HBV 患者中扩增的 HBV DNA 各 3 个克隆进行序列分析。结果:42 例不同病变程

度的慢性 HBV 中, T1762/A1764 双突变在轻度慢性肝炎中发生变异 5 例(38.5%), 中度慢性肝炎发生变异 4 例(30.8%), 重度慢性肝炎发生变异 11 例(68.7%), T1762/A1764 双变异在三组患者中的分布无差异($P > 0.05$)。前 C A1896 变异在轻度慢性肝炎中发生率为 30.8%, 在中度慢性肝炎中发生率为 46.2%, 在重度慢性肝炎中的发生率为 50.0%, A1896 变异在三组患者中分布的差异无统计学意义($P > 0.05$)。HBV/C 区的变异热点中, 轻度慢性肝炎患者中发生氨基酸替代合计 23 个, 中度慢性肝炎患者中发生氨基酸替代合计 33 个, 重度慢性肝炎患者中发生氨基酸替代合计 40 个。在三组患者中 C 区氨基酸替代的分布有统计学差异($P < 0.05$), 替代随病变程度的加重而增加。结论:慢性 HBV 患者的 HBV C 基因及其调控序列变异具有多样性和复杂性, 与体内的免疫清除和病毒逃避免疫攻击相关, 从而容易导致疾病的慢性化。

【关键词】 乙型肝炎病毒, 慢性乙型肝炎, 突变

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

0 引言

在慢性 HBV 感染 HBeAg 阳性免疫耐受期, 早期常无炎症活动, C 基因序列显示保守, 在 e 抗原转换前期, HBeAg 仍阳性, 但可有炎症活动, C 基因出现随意变异, 在血清转换成抗 HBe 阳性后炎症仍可活动, C 基因产生聚集变异。重度肝炎的发生主要是机体对 HBV 产生过强的免疫应答的结果, 但重度肝炎常与 HBeAg 阴性的表型相关, 提示 HBV 毒株的不同也可能有不同的致病力。本研究对 42 例慢性 HBV 患者的 HBV 进行前 C, C 及其调控序列分析, 试图了解不同变异热点与病变程度的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 HBV DNA 阳性的慢性 HBV 患者 42(男 36, 女 6)例。年龄 13~56 岁不等。其中慢性 HBV 轻度 13 例, 中度 13 例, 重度 16 例。所有病例的诊断均符合 2000 年西安全国传染病与寄生虫病学术会议制定的病毒性肝炎诊断标准, 并排除合并感染其他病毒性肝炎^[1]。均有肝组织病理诊断, 根据肝脏炎症活动度进行分级, 病理诊断及分级标准同上^[1]。

1.2 方法

1.2.1 血清 HBV 标志测定 采用酶联免疫吸附法, 试剂由 3V 生物技术有限公司提供。

收稿日期 2006-08-28; 接受日期 2007-01-10

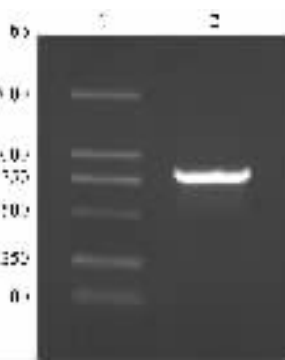
通讯作者 骆抗先. Tel (020) 61641946 Email heplab@fimmu.com

作者简介:梁蔚芳, 博士生(导师骆抗先). Tel (020) 87636914

Email weifl@fimmu.com

1.2.2 引物序列如下 P1:CAAGGTCTTGCATA-AGAGGACT (nt1643-nt1664); P2: CTAACATT-GAGATTCCCC(nt2430-2452);由上海生物工程技术服务公司合成。

1.2.3 PCR 扩增 血清标本 100 μ L 以蛋白酶 K (Promega) 消化,酚-氯仿抽提,无水乙醇沉淀。沉淀物溶于 20 μ L TE 中,取 5 μ L 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。



1: DL2000 marker; 2: DNA 扩增片段(810 bp)。

图 1 HBV DNA PCR 扩增结果

1.2.4 PCR 产物的胶回收 取 PCR 扩增产物 20 μ L 在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,将 810 bp DNA 条带从凝胶上切下来,用小量胶回收试剂盒回收,操作按说明书进行。

1.2.5 克隆测序 将回收后的 PCR 产物分别克隆到 PMD-T 载体(Takara)上,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,接种到含 ampicillin/IPTG/X-gal 的 LB 平板上,挑选白色菌落筛选阳性克隆。每份标本各选取三个克隆送上海生物工程技术服务公司测序。

1.2.6 核苷酸、氨基酸序列分析 用 DNASIS 软件及 PROSIS 软件处理,结果与 GenBank 标准序列中的 Adr 亚型比较。

统计学处理 组间率的比较应用 SPSS13.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 BCP 双突变 在核心基因启动子 BCP 中存在两种联合位点突变,其中一个常见的 G1762T/G1764A 双突变,42 例不同病变程度的慢性 HBV 中,轻度慢性肝炎发生变异 5 例(38.5%),中度慢性肝炎发生变异 4 例(30.8%),重度慢性肝炎发生变异 11 例(68.7%)。另一个是新发现的 C1673T/C1779G 双突变。G1762T/G1764A 双突变与 C1673T/C1779G

双突变在三组慢性 HBV 患者中的分布均无统计学差异(表 1),认为 G1762T/G1764A 双突变与 C1673T/C1779G 双突变均与病情发展无关。

表 1 BCP 双突变及前 C 区变异热点与慢性肝炎病变程度的关系 [n(%)]

临床诊断	n	BCP 双突变位点		前 C 区变异热点			
		G1762T/ G1764A	C1673T/ C1779G	A1846T	T1858C	G1896A	G1899A
慢性肝炎							
轻度	13	5(38)	10(77)	4(31)	4(31)	4(31)	2(15)
中度	13	4(31)	4(31)	4(31)	3(23)	6(46)	3(23)
重度	16	11(69)	8(50)	4(25)	3(19)	8(50)	3(19)
χ^2		4.781	5.610	0.162	0.577	1.167	0.251
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 前 C 区变异 HBV 前 C 区常见的变异在不同病变程度的慢性 HBV 患者中的分布不一(表 1)。A1896 变异在轻度慢性肝炎中发生率为 30.8%,在中度慢性肝炎发生率为 46.2%,在重度慢性肝炎发生率为 50.0%。A1896 变异在三组患者中的分布无统计学差异($P > 0.05$),认为 A1896 变异与病情发展无关。

2.3 C 区变异 慢性 HBV 患者的 C 区出现频率最高的点变异是 AA5, AA27, AA38, AA60, AA87, AA97, AA130, AA135。其在不同病变程度乙肝患者中分布见表 2。轻度慢性肝炎患者共 39 个克隆中发生氨基酸替代合计 23 个,替代率为 59%;中度慢性肝炎患者共 39 个克隆中发生氨基酸替代合计 33 个,替代率为 85.6%;重度慢性肝炎患者共 48 个克隆中发生氨基酸替代合计 40 个,替代率为 83.3%。在所研究的 42 例患者共 126 个克隆中,中重度慢性肝炎患者的 C 区氨基酸替代率高于轻度慢性肝炎患者,统计学分析显示组间替代率的差异有统计学意义($P < 0.05$),从而认为 C 区氨基酸替代与病情发展有关。

3 讨论

HBV C 基因启动子变异特别是 T1762/A1764 联合位点变异在我国慢性 HBV 患者中普遍存在,变异的发生只是降低了 HBV 前 C mRNA 的转录效率,而不是完全中止 HBeAg 的复制。目前对于 T1762/A1764 联合位点变异对 HBeAg 表达的影响及其与病变发展、炎症活动的关系还存在较大的争议。Chun 等^[2]认为 T1762/A1764 联合突变不影响 HBV DNA 的复制和 HBeAg 的表达,与肝损伤也没有显著相关。

性 疾病的发展主要与个体因素有关. 而 Yotsuyanagi 等^[3]却认为 T1762/A1764 与 HBV 发病过程及病变严重程度有关, Kuang 等^[4]则推测 T1762/A1764 变异与肝癌的发生有关. 本文 42 例不同病变程度的慢性 HBV 中, 轻度慢性肝炎发生变异 5 例(38%), 中度慢性肝炎发生变异 4 例(31%), 重度慢性肝炎发生变异 11 例(69%). G1762T/G1764A 双突变在病变程度不同的三组慢性 HBV 患者中的分布无统计学差异, 认为 G1762T/G1764A 双突变与病情发展无关.

表 2 126 个克隆中 HBV/C 区热点变异分布 [n(%)]

氨基酸变异位点	克隆数(个)			合计
	慢性肝炎轻度 (n=39)	慢性肝炎中 (n=39)	慢性肝炎重度 (n=48)	
5 P-T/H/L/Q/S	4	8	6	18
27 L-V	0	4	6	10
38 Y-H	1	6	2	9
60 L-V	3	7	4	14
87 S-G/T	4	1	6	11
97 I-L	4	1	6	11
130 P-N/T/S/Q	4	3	5	12
135 P-Q/T	3	3	5	11
合计	23(59)	33(85)	40(83)	96(76)
χ^2		9.248		
P		<0.05		

在慢性 HBV 感染中, 前 C 区变异中以第 1896 位核苷酸 G-A 替换突变最常见. 发生突变后产生终止密码子, 使 HBeAg 合成终止. 最初的研究认为, 在血清 HBeAg 发生转化时, A1896 变异可导致较为严重的肝脏病变. 在慢性活动性肝炎和暴发型肝炎中也可检测出 A1896 变异, 从而推测 A1896 变异与 HBV 发病过程及病变严重程度有关^[5]. 但是随后的观察发现 A1896 变异也可发生于病变较轻的 HBV 中, 甚至发现于抗 HBe 阳性的乙肝携带者中, 表明 A1896 变异可能在暴发型肝炎发病过程中不起作用, 至少没有直接的致病作用^[3]. 本研究中, A1896 变异可发生于 HBV 感染的不同临床状态, 在轻度慢性肝炎中发生率为 30.8%, 在中度慢性肝炎发生率为 46.2%, 在重度慢性肝炎发生率为 50.0%. 随着病情加重变异的发生虽然有增加的趋势, 但 A1896 变异在病变程度不同的患者中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$), 从而认为其与病变程度无关, 这可能与研究

例数少有关.

HBV C 基因具有较大的变异性, 本研究中 HBV/C 区点变异发生率最高的是 AA5, AA27, AA38, AA60, AA87, AA97, AA130, AA135. 每个病例的 HBV/C 区均有数量不等的变异. 在 126 个克隆中, 轻度慢性肝炎患者的 C 区氨基酸替代率最低, 替代在三组患者中的分布有统计学差异($P < 0.05$), 认为替代与病情发展有关. C 基因氨基酸替代随着病情发展有增加的趋势, 可能由于这些病例在 HBV 的持续性感染中, 变异株长期积累所致, 也说明了 C 区变异和肝炎的慢性化有关.

轻度慢性肝炎患者 HBV/C 区发生氨基酸替代的频率明显低于中重度慢性肝炎患者, 我们认为, 在慢性 HBV 感染者的肝炎加重期, 宿主的免疫反应加强, 清除病毒及其感染的肝细胞的能力也随之加强, 从而变异株的检出频率高. 变异是 HBV 基因组适应宿主环境及抵抗宿主免疫攻击的机制, 通过变异使病毒逃避宿主的免疫攻击而不是激发宿主的免疫反应更符合生物进化的理论.

HBV 变异与持续性感染以及炎症活动之间的关系尚存在很多争论. 病毒变异随慢性 HBV 感染的活动而发展, 而变异又使感染持续, 如感染反复活动, 病变可能逐渐加重. 持续或剧烈的炎症活动将有利于变异株的优势转化. 两种变异株在不同患者或炎症阶段表现为优势积累或者弱化或者消失, 说明变异与 HBV 持续感染、变异与炎症活动之间的关系尚需要更多的研究.

【参考文献】

- [1] 中华医学会传染病分会与寄生虫分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [2] Chun YK, Kim JY, Woo HJ, et al. No significant correlation exists between core promoter mutations, viral replication, and liver damage in chronic hepatitis B infection [J]. Hepatology, 2000, 32: 1154-1162.
- [3] Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, et al. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2002, 37: 355-363.
- [4] Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, et al. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3575-3580.
- [5] Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, et al. Evolution of precore/core promoter mutations in hepatitis B carriers with hepatitis B e antigen seroreversion [J]. J Med Virol, 2004, 74(2): 237-245.