

· 临床论著 ·

e 抗原阴性的慢性乙型肝炎患者病毒基因变异与临床转归

李新立 肖迪 杜文军

【摘要】 目的 研究 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎病毒的基因变化及其与临床转归的关系。**方法** 应用基因测序的方法检测 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎、肝硬化患者乙型肝炎病毒 1762、1764、pre-1896 3 个位点的基因突变,分析肝炎、肝硬化的发生与各位点变异的关系。**结果** 135 例 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者中发生 1762 位点变异者 9 例,pre-1896 位点变异者 36 例,1762、1764 位点联合变异者 27 例,1762、1764、pre-1896 位点联合变异者 63 例。45 例肝硬化患者中发生 pre-1896 位点变异者 27 例,1762、1764 位点联合变异者 9 例,1762、1764、pre-1896 位点联合变异者共 9 例。**结论** 山东地区 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒以 BCP1762、1764、pre-1896 位点联合变异为主,其中 pre-1896 位点的变异对于肝硬化的发生有重要意义。

【关键词】 e 抗原;慢性乙型肝炎;基因测序

Study on gene mutation and clinical prognosis of chronic hepatitis B patients with e antigen-negative LI Xin-li, XIAO Di, DU Wen-jun. *Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China*

Corresponding author: LI Xin-li, Email: fasthandli@sina.com

【Abstract】 Objective To study gene mutation and clinical prognosis of chronic hepatitis B with e-antigen negative. **Methods** Gene sequencing was used to detect 3 sites of gene mutation (1762, 1764 and pre-1896) of hepatitis B virus in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B or liver cirrhosis. The relationship between gene mutation and hepatitis or cirrhosis were analyzed. **Results** Among 135 chronic hepatitis B cases with e-antigen negative, there were 9 cases with 1762 mutation, 36 cases with pre-1896 mutation, 27 cases with 1762 and 1764 joint variation, and 63 cases with 1762, 1764 and pre-1896 joint variation. However, among 45 liver cirrhosis cases, there were 27 cases with pre-1896 mutation, 9 cases with 1762 and 1764 joint variation, and 9 cases with 1762, 1764 and pre-1896 joint variation. **Conclusions** Most cases in Shandong province with HBeAg-negative chronic hepatitis B have 1762, 1764 and pre-1896 joint variation, of which pre-1896 mutation is important to liver cirrhosis.

作者单位:250021 济南市,济南市传染病医院

通讯作者:李新立,Email:fasthandli@sina.com

【Key words】 HBeAg; Chronic hepatitis B; Gene sequencing

为了探讨乙型肝炎病毒基因各位点的变异与临床转归的关系,笔者对2006~2007年间本院收治的135例HBeAg阴性的慢性乙型肝炎、肝硬化患者的血清HBV DNA进行基因测序,现将结果报告如下。

资料与方法

一、研究对象和材料

选择济南市传染病医院2006年1月至2007年12月收治的HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者135例,患者来自山东省11个不同地市。其中,肝硬化患者45例,临床诊断符合2005年慢性乙型肝炎防治指南修订的病毒性肝炎诊断标准^[1]。所有病例血清HBsAg,抗-HBc持续阳性1年以上。乙型肝炎病毒血清学指标经EIA定性检测,试剂由上海科华生物技术公司提供。所有病例连续两次以上血清HBV DNA阳性(PCR法),试剂盒由洛阳华美生物工程公司提供。

二、实验方法

1. 样本处理:(1)将100 μ l血清与100 μ l聚乙二醇混合均匀,13 000 r/min离心10分钟;(2)弃上清,剩余沉淀中加入30 μ l裂解液(吸取裂解液前需将其混匀,保证树脂颗粒含量不低于15%),震荡混合均匀,干式加热器上98℃加热10分钟,13 000 r/min离心5分钟,取上清作为模板,用于PCR扩增。

2. PCR扩增:实验前将试剂解冻,并离心使试剂集中于离心管底。取装有试剂PCR-MIX的离心管,依次加入1 μ l的Taq酶、1.5 μ l的DNA模板,混匀,于PCR仪上进行扩增。反应条件:94℃预变性4分钟,94℃变性30秒,58℃退火30秒,72℃延伸30秒,35个循环,72℃延伸4分钟,反应产物于4℃保存备用。

3. PCR产物与pGEM-T载体的连接反应见表1:采用Promega公司的pGEM-T克隆载体,产物4℃过夜或室温连接2小时。

表1 PCR产物与pGEM-T载体的反应体系(μ l)

总体积	pGEM-T vector	2 × Rapid Ligation Buffer	PCR 产物	T4 DNA 连接酶	ddH ₂ O
10	1 (100 ng)	5	1 (10 ng)	1	2

4. 感受态JM109的制备:(1)将JM109单菌落接种于新鲜50 ml LB培养液中,37℃振荡培养6小时至 $A_{600} = 0.4$;(2)收集菌液,冰浴10分钟,4℃4000 r/min离心10分钟;(3)弃上清,加入10 ml冰预冷0.1 mol/L CaCl₂重悬菌体,冰浴20分钟;(4)4000 r/min,4℃,离心10分钟;(5)用2 ml冰预冷的0.1 mol/L CaCl₂悬起细菌沉淀,得到感受态细胞。

5. 转化:(1)将2 μ l连接物加入到100 μ l JM109感受态细胞中,冰浴30分钟;(2)42℃热激90秒(不搅动),立即冰浴5分钟;(3)加入预热至37℃的SOC培养液950 μ l,37℃150 r/min培养1小时;(4)取100 μ l转化菌涂于含IPTG、X-Gal和氨苄青霉素的琼脂平板上,37℃过夜培养。

6. 质粒 DNA 提取:(1)将阳性白色单克隆菌落接种至含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃、150 r/min 过夜培养;(2)取 1.5 ml 菌液,12 000 r/min 离心 30 秒;(3)弃上清,向菌体中加入 SET 溶液 1 ml,旋涡混合、洗涤菌体;(4)12 000 r/min 离心 30 秒;(5)弃上清,沉淀,加 GET 100 μ l,溶菌酶溶液 20 μ l 使终浓度达到 2 mg/ml,混匀,冰浴 5 分钟;(6)加 200 μ l 碱裂解液溶液,混匀后冰浴 5 分钟;(7)加 150 μ l 3 mol/L 的 KAC/AC 溶液,混匀后冰浴 5 分钟;(8)12 000 r/min 离心 10 分钟,将上清移入另一离心管中;(9)加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)充分混合,抽提蛋白;(10)12 000 r/min 离心 15 分钟,将上清放入另一离心管中;(11)加入1/10体积 3 mol/L 醋酸钠(NaAc)和 2 倍体积的冷无水乙醇, -20℃ 放置 0.5 小时;(12)12 000 r/min 离心 10 分钟,将 DNA 沉淀用 75% 乙醇清洗一次;(13)7500 r/min 离心 5 分钟,收集沉淀;(14)沉淀经自然干燥后溶于 0.1 \times TE 溶液中。

7. 重组子的 PCR 鉴定:PCR 的扩增体系同上。

8. 定好的阳性克隆的序列分析:载体测序由上海基康公司完成。

结 果

应用卡方检验分析统计数据:135 例 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者中发生 1762 位点变异者 9 例, pre-1896 位点变异者 36 例(见图 2、5), 1762、1764 位点联合变异者 27 例(见图 1、3、4), 1762、1764、pre-1896 位点联合变异者 63 例。45 例肝硬化患者中 pre-1896 位点变异者 27 例(见图 2、5), 1762、1764 位点联合变异者 9 例(见图 1、3、4), 1762、1764、pre-1896 位点联合变异者共 9 例(见图 2), 两组间各构成比详见表 2。

表 2 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组与肝硬化组各位点变异

组别	变异位点[例(%)]					合计
	1762	1764	pre-1896	1762、1764	1762、1764、pre-1896	
HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组	9(6.7)	0(0)	36(26.6)	27(20.0)	63(46.6)	135
肝硬化组	0(0)	0(0)	27(60)	9(20)	9(20)	45
两组间各构成比间 P 值	0.4147	-	0.019	0.2881	0.0679	

讨 论

HBV 感染自然病程中,抗-HBe 的出现通常表示病毒复制渐趋静息,病变也趋向恢复。但在因 HBV 基因变异或重叠 HCV 或 HDV 感染而导致 HBeAg 阴性、抗-HBe 阳性的慢性 HBV 感染者中,继续有高水平的病毒血症,ALT 长期异常,病情进展。HBV 基因变异是引起 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎的主要原因^[2],主要是前-C 区和 C 启动子的变异。前-C 区的变异主要是 pre-1896 位点 A-G 的变异,它使编码色氨酸的 28 位密码子 TGG 变成终止密码子 TAG,使 HBeAg 不能正常的合成与表达。而 C 启动子区调节前-C 区的转录,该区的某些变异也能影响 HBeAg 的合成,特别是 C 启动子区 1762(T-A)、1764(A-G)的联合变异使前-C

mRNA 转录减少,导致 HBeAg 合成减少。由此可见在 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者中可以存在以下 HBV 优势株:(1)前-C 或 C 启动子区的野生株;(2)前-C 终止密码变异;(3)C 启动子区变异;(4)同时出现前-C 终止密码变异和 C 启动子区变异;(5)前-C 区的无义突变。事实上还有一种情况可表现为 HBeAg 阴性,就是野生株感染后,由于宿主免疫因素所致 HBeAg 阴性而 HBV DNA 阳性,表明病毒尚未完全清除。但是野生株感染时,HBeAg 低于检测下限与变异株感染导致 HBeAg 不能表达,是完全不同的两种现象^[3]。



图1 BCP1762、1764 联合变异(荧光显示分别代表野毒株与联合变异株)

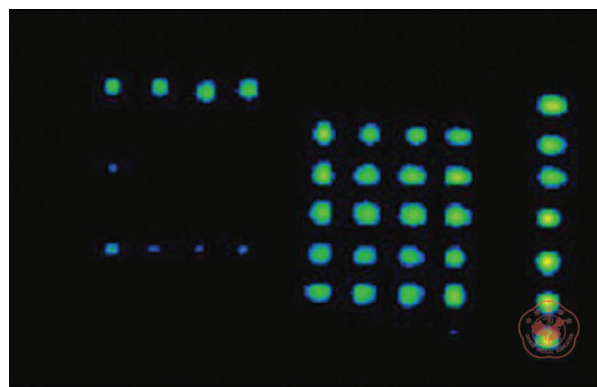


图2 pre-1896 变异(荧光显示分别代表野毒株与 pre-1896 变异株)

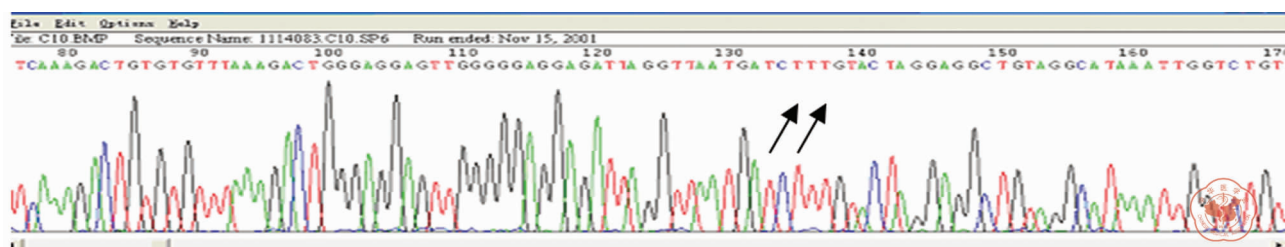


图3 1762T,1764A 的联合突变(黑色箭头标识)

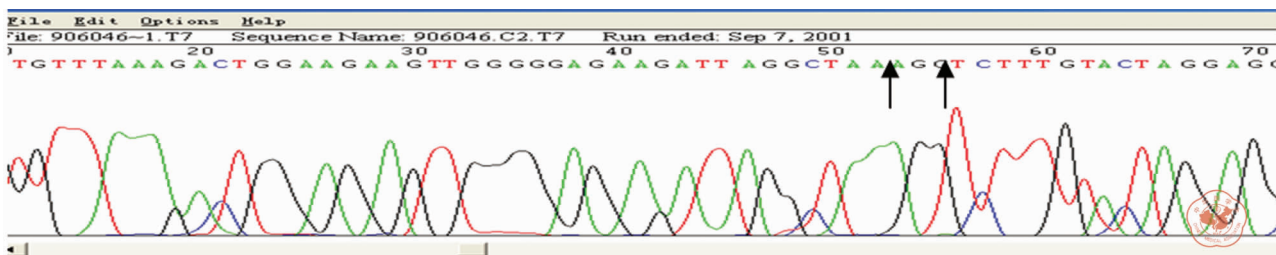


图4 1762A 和 1764G 联合突变(黑色箭头标识)

在本研究中,HBeAg 阴性组中前-C 区和 C 启动子区的联合变异占优势,前-C 区和 C 启动子区的联合变异率为 46.6%,高于单纯的 pre-1896 及 BCP1762、1764 联合变异率(分别为 26.6%、46.6%,两者间无统计学差异),而 C 启动子区 1762、1764 单一位点的变异少见。在肝硬化组以 pre-1896 位点的变异为主,pre-1896 位点的变异占 60%,显著高于 C 启动子区及两者的联合变异率。同时,通过比较 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎组与肝硬化组 pre-1896 位点的变异率,可以看出

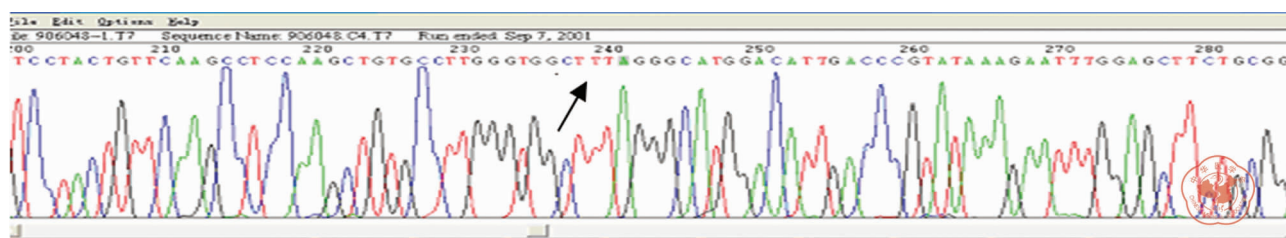


图5 1896A 突变(黑色箭头标识)

两组间有统计学意义($P = 0.019$),而两组间1762、1764联合变异率及3个位点的联合变异率无统计学差异(其 P 值分别为0.2881、0.0679)。由此结果可以看出 pre-1896 位点的变异与肝硬化的发生有一定的关系,这与以往报道是一致的^[4]。Brunnetto 等^[5]认为 pre-1896 位点的变异与 HBeAg 阴性的慢性肝炎重症化有关。Omata 等^[5]最早对暴发性乙型肝炎(FHB)和急性自限性乙型肝炎患者的 HBV DNA 前-C 区核苷酸序列进行分析,结果表明,几乎所有 FHB 患者前-C 区出现 pre-1896 位的点突变,但急性自限性乙型肝炎患者的 HBV 前-C 区核苷酸几乎均为野生型 HBV 序列。因此认为 HBV 前-C 区变异可能在暴发性乙型肝炎的致病机理中起直接作用。同样也有不少研究报道,在较严重的慢性乙型肝炎出现前-C 1896 位变异的频率较高,提示前-C 区基因变异与肝病严重性相关^[6]。但近来更多学者认为,前-C 区变异株是病毒逃避宿主免疫应答的一种方式,而病情的严重性可能是感染持续及病变累积的结果。前-C 区与干扰素治疗效果的关系报道不一。曾有报道认为前-C 区变异不影响干扰素治疗的效果,疗效反而高于野生株感染的患者^[7]。但近来多数学者支持前-C 区基因变异降低干扰素治疗效果的观点。慢性 HBV 感染与原发性肝细胞癌(HCC)密切相关,而 HBV 前-C 区变异使病毒逃避了免疫清除,使感染长期持续,因此推测其与 HCC 的发生有一定的关系^[8]。但是关于前-C 区与肝病的严重性之间是否有直接的关系以及其确切的机制尚需更进一步的研究来证明。

参 考 文 献

- 1 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志,2005,12:1.
- 2 Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HbeAg-negative hepatitis B and associated precore and core promoter variants. J Viral Hepat,2002,9:52-61.
- 3 侯金林,陈金华,王战会. 乙型肝炎病毒株 X 基因/C 基因启动子的热点变异. 中华医学杂志,1998,78:107-110.
- 4 赵学兰,王宇明. 乙型肝炎病毒前 C 基因变异及其临床意义. 国外医学(流行病学与传染病学分册),2004,31:31-33,39.
- 5 Omata M, Ehata T, Yokosuka O, et al. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J Med,1991,324:1737-1739.
- 6 Lok ASF, Akarca US, Greene S, et al. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. Hepatology,1995,21:19-24.
- 7 季伟,王惠芬. α -干扰素治疗乙型肝炎病毒前 C/C 基因突变株感染的疗效. 临床肝胆病杂志,1999,15:12-14.
- 8 Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, et al. Relationship of hepatocellular carcinogenesis with precore mutant virus and serum hepatitis B virus DNA concentration: A longitudinal analysis of patients with cirrhosis. Hepatol Res,1998,10:142-155.

(收稿日期:2008-06-19)

(本文编辑:李卓)

李新立,肖迪,杜文军. e 抗原阴性的慢性乙型肝炎患者病毒基因变异与临床转归[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2009,3(4):391-395.