

## 132 例乙型肝炎病毒感染者基本核心启动子变异分析

刘悦晖<sup>1</sup>, 范学工<sup>1</sup>, 丁静娟<sup>2</sup>

(1 中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008; 2 贵阳医学院, 贵州贵阳 550004)

**[摘要]** 目的 研究乙型肝炎病毒(HBV)感染者基本核心启动子(BCP)变异情况。方法 收集 HBV 感染者血清标本 132 份(HBV DNA 均阳性),用半巢式聚合酶链反应扩增 HBV C 基因部分片段,产物纯化后直接测序,检测 BCP T1762/A1764 变异。用 S 基因错配聚合酶链反应(PCR-RFLP)法确定 HBV 基因型。结果 51 例乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性患者 BCP T1762/A1764 双变异检出率为 27.45%,81 例 HBeAg 阴性患者 BCP T1762/A1764 双变异检出率为 62.96%,两组比较,差异有高度显著性( $\chi^2 = 15.79, P = 0.00$ )。BCP T1762/A1764 双变异的 HBV 感染者 B 基因型检出率为 33.85%,明显低于 C 基因型的检出率 66.15%( $\chi^2 = 24.25, P = 0.00$ )。结论 HBV 感染者普遍存在 BCP T1762/A1764 双变异,以 C 基因型感染者多见。

**[关键词]** 肝炎病毒,乙型;基本核心启动子;测序;变异;基因

**[中图分类号]** R512.6<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)04-0245-03

## Mutation of hepatitis B virus basic core promoter in 132 cases of HBV infected patients

LIU Yue-hui<sup>1</sup>, FAN Xue-gong<sup>1</sup>, DING Jing-juan<sup>2</sup> (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the hepatitis B virus basic core promoter (BCP) mutation in HBV infected patients. **Methods** The serum samples from 132 HBV infected patients (all were HBV DNA positive) were collected. The gene covered HBV BCP were amplified by nested polymerase chain reaction (nPCR). The PCR products were sequenced directly, and the mutations in BCP T1762/A1764 were determined by sequence analysis. HBV genotypes were also detected by restriction fragment length polymorphism based on S gene PCR products. **Results** The mutation rates of BCP T1762/A1764 were 27.45% in 51 cases of HBV infected patients with HBeAg(+), 62.96% in 81 cases of HBV infected patients with HBeAg(-). The mutation of patients with HBeAg(-) was significantly higher than those with HBeAg(+)( $\chi^2 = 15.79, P = 0.00$ ). The detection rate of B gene mutation of BCP T1762/A1764 in HBV infected patients was 33.85%, which was obviously lower than 66.15% of C gene mutation ( $\chi^2 = 24.25, P = 0.00$ ). **Conclusion** The mutation in BCP T1762/A1764 generally exist in HBV infected patients and common in genotype C.

**[Key words]** hepatitis B virus; basic core promoter; sequencing; mutation; gene

[Chin Infect Control, 2009, 8(4): 245-247]

本研究采用直接测序法分析 132 例乙型肝炎病毒(HBV)感染者基本核心启动子(BCP) T1762/A1764 变异情况。以 S 基因错配聚合酶链反应(PCR-RFLP)法确定 HBV 基因型,探讨 BCP T1762/A1764 变异与基因型、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)及 HBV 载量的关系。

### 1 对象与方法

1.1 研究对象 在 2003—2004 年间收集贵阳医学院附属医院门诊及住院的汉族 HBV 感染者血清标本 132 份,采样同时收集临床资料。其中,男性 107 例,女性 25 例;年龄 14~74 岁;根据 2000 年西安会

[收稿日期] 2007-11-10

[作者简介] 刘悦晖(1975-),男(苗族),湖南省邵阳市人,医师,主要从事感染与免疫学研究。

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan@hotmail.com

议修订的诊断标准<sup>[1]</sup>,其中无症状 HBV 携带者 31 例,慢性乙型肝炎 33 例,肝炎肝硬化 34 例,原发性肝癌 34 例(均经 CT 等影像学诊断)。

1.2 主要试剂与仪器 琼脂糖(美国 Promega 公司),DNA 分子量 Marker、4×dNTPs、Taq 酶(上海华美生物工程公司),限制性内切酶 Mbo I、BstNI、BsmA I、Hpa II(立陶宛 MBI Fermentas 公司)。GeneAmp5700 实时荧光定量基因扩增仪、9600 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),3K-30 型低温高速台式离心机(德国 Sigma 公司),稳压稳流 ZDJ-多功能紫外透视仪(上海顾村光电仪器厂)。

1.3 检测方法 HBV DNA 定量检测采用荧光定量 PCR 法,试剂由深圳匹基公司提供,操作按说明进行;根据外参照标准曲线判断结果,以 <10<sup>3</sup> 拷贝/mL 定为阴性。HBV 血清标志物检测:乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、HBeAg、乙型肝炎 e 抗体(抗 HBe)、乙型肝炎核心抗体(抗 HBc)和乙型肝炎表面抗体(抗 HBs)均采用酶联免疫吸附试验

(ELISA)法,试剂购自上海科华公司,操作及结果判断按照说明进行。血清丙氨酸转氨酶(ALT)测定:以 Beckman 全自动生化仪检测。直接测序法分析 132 例 HBV 感染者 BCP T1762/A1764 变异情况,方法参照文献[2]。基因分型方法参照文献[3]。

1.4 统计方法 应用 SPSS 11.5 软件,率的比较采用  $\chi^2$  检验,量的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 BCP T1762/A1764 双变异的检出率 132 例 HBV 感染者的临床资料见表 1。共有 65 例(49.24%)HBV 感染者检测到 BCP T1762/A1764 双变异。51 例 HBeAg 阳性患者 BCP T1762/A1764 双变异检出率为 27.45%,81 例 HBeAg 阴性患者 BCP T1762/A1764 双变异检出率为 62.96%,两组比较,差异有高度显著性( $\chi^2 = 15.79, P = 0.00$ ),见表 2。

表 1 132 例 HBV 感染者的临床资料

Table 1 Clinical data in 132 cases with HBV infection

组别	例数	男/女(例)	平均年龄(岁)	HBeAg 阳性/阴性(例)	ALT(IU/L)	HBV 定量(log 拷贝/mL)
HBV 携带者	31	21/10	31.73	26/5	27.24 ± 5.29	7.59 ± 0.83
慢性乙型肝炎	33	27/6	36.29	12/21	243.28 ± 244.38	6.93 ± 1.35
肝炎肝硬化	34	28/6	42.47	10/24	128.23 ± 144.26	6.68 ± 1.25
原发性肝癌	34	31/3	53.53	3/31	87.40 ± 78.13	5.83 ± 1.35
合计	132	107/25	-	51/81	-	-

HBV 携带者、慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化与原发性肝癌的 HBV 定量值相比,分别 *t* = 2.97, *P* = 0.04; *t* = 4.14, *P* = 0.00; *t* = 6.34, *P* = 0.00

表 2 BCP T1762/A1764 变异与 HBeAg 的关系(株)

Table 2 The relationship between HBeAg and mutation in BCP T1762/A1764 (strain)

组别	野生株	变异株
HBeAg 阳性( <i>n</i> = 51)	37	14
HBeAg 阴性( <i>n</i> = 81)	30	51

Table 3 The relationship between genotypes and mutation in BCP T1762/A1764 (case)

组别	B 基因型	C 基因型
野生株( <i>n</i> = 67)	40	27
变异株( <i>n</i> = 65)	22	43

2.2 BCP T1762/A1764 双变异患者中 B 和 C 基因型的检出率 65 例 BCP T1762/A1764 双变异患者中,C 基因型占 66.15%,B 基因型占 33.85%,两者比较,差异有显著性( $\chi^2 = 24.25, P = 0.00$ ),见表 3。

2.3 BCP T1762/A1764 双变异与血清 HBV DNA 含量、ALT 水平的关系 见表 4。BCP T1762/A1764 双变异与血清 HBV DNA 含量、ALT 水平无相关性。

表 4 BCP T1762/A1764 变异与 HBV DNA 含量及 ALT 水平的关系

Table 4 The relationship between BCP T1762/A1764 mutation and level of HBV DNA and ALT

组别	HBV 定量(log 拷贝/mL)	ALT(IU/L)
野生株	6.91 ± 1.52	89.47 ± 88.45
变异株	6.57 ± 1.29	119.50 ± 141.15
<i>t</i>	-1.32	1.46
<i>P</i>	0.21	0.43

表 3 BCP T1762/A1764 变异与基因型的关系(例)

### 3 讨论

HBV 的 BCP T1762/A1764 变异发生率各地报道不一。本研究 BCP T1762/A1764 变异的检出率为 49.24% (65/132), 高于 Dumpis 等报道的 7%<sup>[4]</sup>, 与 Hussain 等慢性乙型肝炎中 55.7% 的报道<sup>[5]</sup>相近。各地 BCP T1762/A1764 变异检出率的差异, 除标本选择及方法学不同外, 与各地 HBV 流行株的基因型不同亦有关。

根据 e 系统状况, 将 132 例 HBV 感染者分为 HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性两组, 发现 BCP T1762/A1764 双变异在 HBeAg 阴性组检出率明显高于 HBeAg 阳性组 ( $P < 0.01$ )。BCP 本身即可指导前基因组和前 C RNA 的转录, 其活性需要 BCP 内富含 AT 的区域与肝内广泛存在的转录因子结合后才得以发挥。而变异的 BCP 可改变这种结合, 降低前 C RNA 的转录, 增强前基因组 RNA 转录, 导致 HBeAg 表达减少; 可平均下降 70%<sup>[6]</sup>。因并非终止 HBeAg 的合成, 因此在部分 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者亦能检测到 BCP 双变异<sup>[7-8]</sup>。我们检出的 HBV BCP 变异组中 HBeAg 阳性率为 21.54% (14/65), 这说明虽然有 HBV BCP 变异, 但并未完全阻断 HBeAg 表达, 与上述结果一致。Buckwold<sup>[6]</sup> 等进行的体外实验表明, BCP 变异提高了 HBV DNA 的复制能力。但在本研究中, BCP 变异并未提高 HBV DNA 含量。究其原因, 可能为 HBV DNA 的复制还受机体本身因素的影响。

本研究发现 BCP T1762/A1764 双变异中 C 基因型感染者明显高于 B 基因型感染者 ( $P < 0.05$ ), 即与 B 基因型相比, C 基因型感染者更易发生 BCP 双变异, 这与以往学者的报道<sup>[9-11]</sup> 亦一致。而 C 基因型感染者更易发生严重的肝病<sup>[11]</sup>。这间接提示了 BCP T1762/A1764 双变异可能是提示预后的一个重要指标。

综上所述, HBV 感染者普遍存在 BCP T1762/A1764 双变异, 且以 C 基因型感染者多见。BCP T1762/A1764 双变异可能是提示预后的一个重要指标。BCP T1762/A1764 双变异可导致 HBeAg 阴转, 而 HBV DNA 含量无显著下降, 因此 HBeAg

阴性 HBV 感染者也要常规检测 HBV DNA 含量。

### [参考文献]

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 5(4): 324-329.
- [2] 刘悦晖, 丁静娟, 张权. 慢性乙型肝炎病毒感染病毒前 C 区和基本核心启动子区变异检测及意义[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(9): 529-533.
- [3] 彭亮, 丁静娟, 张莉莎. 乙型肝炎病毒 S 基因限制性片段长度多态性分型方法的建立及应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(8): 475-478.
- [4] Dumpis U, Mendy M, Hill A, *et al.* Prevalence of HBV core promoter/precore/core mutation in Gambian chronic carriers [J]. J Med Virol, 2001, 65(4): 664-670.
- [5] Hussain M, Chu C J, Sablon E, *et al.* Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants [J]. J of Clinic Microbio, 2003, 41(3): 3699-3705.
- [6] Buckwold V E, Xu Z, Chen M, *et al.* Effect of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication [J]. J Virol, 1996, 70(9): 5845-5851.
- [7] Suzuki S, Sugauchi F, Orito E, *et al.* Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in the Cote d'Ivoire; complete genome sequence and phylogenetic relatedness of HBV genotype E [J]. J Med virol, 2003, 69(4): 459-465.
- [8] Hu C M, Yeh C T, Lee C S, *et al.* Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B; Clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg to anti-HBe seroconversion [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 16-21.
- [9] Nakashima H, Furusyo N, Kubo N, *et al.* Double point mutation in the core promoter region of hepatitis B virus (HBV) genotype C may be related to liver deterioration in patients with chronic HBV infection [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(5): 541-550.
- [10] Lindh M, Hannoun C, Dhillon A P, *et al.* Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers [J]. J Infect Dis, 1999, 179(4): 775-782.
- [11] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, *et al.* A case-control study for clinical molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C [J]. Hepatology, 2001, 33(1): 218-223.