

贵州省乙型肝炎病毒前 C 区及基本核心启动子变异分布

丁静娟 刘悦晖 王梅

【摘要】 目的 调查贵州省乙型肝炎病毒(HBV)前 C 区 A1896、基本核心启动子区(BCP) T1762/A1764 变异分布。方法 收集贵阳、遵义、凯里、都匀 4 地区不同民族无症状携带者(ASC)、慢性肝炎(CH)、肝炎肝硬化(LC)、肝细胞肝癌(HCC)患者血清 482 份,用测序及限制性片段长度多态性检测 A1896、T1762/A1764 变异,用 S 基因 PCR-RFLP 确定基因型。结果 A1896、T1762/A1764 变异检出率分别为 23.03% 和 29.67%。汉族感染者 A1896、T1762/A1764 变异检出率为 27.64% 和 36.04%,高于侗、苗、布依族感染者合并后的 7.96%、8.85% ($P < 0.01$)。A1896 变异在 B、C 基因型中的分布为 20.34% 和 27.13% ($P > 0.05$), T1762/A1764 变异为 18.97% 和 46.28% ($P < 0.01$)。A1896、T1762/A1764 变异在 HBeAg 阴、阳性组间的分布差异有统计学意义(P 值均 < 0.01)。从 ASC 到 HCC 组, A1896、T1762/A1764 变异分布逐渐增高, LC、HCC 组的检出率明显高于 CH 和 ASC 组 (P 值均 < 0.01)。A1896、T1762/A1764 变异的分布:贵阳(分别为 31.79% 和 41.06%) 高于遵义(10.94% 和 14.06%)、都匀(8.64% 和 11.11%) 及凯里(2.86% 和 2.86%), 但多因素 logistic 回归分析在控制了 HBeAg、HBV 基因型及临床类型影响后,在地区间分布差异无统计学意义。结论 A1896、T1762/A1764 变异在贵州省不同民族间分布有一定差异。C 型感染者易发生 T1762/A1764 变异,两种变异均与疾病进展有关。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 变异; 限制性片段长度多态性

Study on the distribution of hepatitis B virus precore and basic core promoter mutations in Guizhou area
DING Jing-juan, LIU Yue-hui, WANG Mei. Department of Infectious Diseases, Guiyang Medical College Affiliated Hospital, Guiyang 550004, China

Corresponding author: DING Jing-juan, Email: dingjj@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) precore A1896 and basic core promoter (BCP) T1762/A1764 mutations in Guizhou area. **Methods** 482 patients with chronic HBV infection, belonging to 4 nationalities, including 225 asymptomatic carriers (ASC), 158 chronic hepatitis (CH), 57 liver cirrhosis (LC), 42 hepatocellular carcinoma (HCC), from 4 areas of Guizhou province were examined. HBV A1896 and T1762/A1764 mutations were determined by direct sequencing and restriction fragment length polymorphism (RFLP). HBV genotypes were determined by PCR-RFLP based on S gene. The relationship among these mutations and genotype and the progression of liver disease were studied by multi-normal logistic regression analysis. **Results** A1896 and T1762/A1764 mutations were detected 23.03% and 29.67% among 482 patients. These mutations were more prevalent in Hans than in Dong, Miao and Buyi minorities ($P < 0.01$, respectively). The mutations of A1896 and T1762/A1764 were more commonly seen in HBeAg negative than in HBeAg positive patients ($P < 0.01$, respectively). The mutation of T1762/A1764 was significantly higher in genotype C than in genotype B ($P < 0.01$). There were significantly statistical differences in the detective rate of A1896 and T1762/A1764 mutations between patients with HCC, LC and CH, ASC. The distribution of these mutations in Guiyang (31.79% and 41.06%) was higher than in Zunye (10.94%, 14.06%), Duyun (8.64%, 11.11%) or Kaili (2.86%, 2.86%). However, there was no statistical difference by multi-normal logistic regression analysis after controlling the influence of HBeAg statu, genotype and clinical types. **Conclusion** The distributions of A1896 and T1762/A1764 mutations were different in some nationalities of Guizhou province. The mutation of T1762/A1764 was more commonly seen in genotype C than in genotyp B. These mutations were closely related to progression of chronic liver diseases.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; Restriction fragment length polymorphism

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30360098);贵州省优秀科技教育人才省长基金资助项目

作者单位:550004 贵阳医学院附属医院感染科

通讯作者:丁静娟, Email: dingjj@vip.163.com

乙型肝炎病毒(HBV)前 C 区 A1896 终码变异导致 HBeAg 不能生成,基本核心启动子(BCP) T1762/A1764 变异可引起 HBeAg 表达下降,两种变异是形成 HBeAg 阴性慢性肝炎(CH)的机制之一。鉴于 HBeAg 阴性 CH 的分布具有一定的地理特征,且与临床疾病进展及抗病毒治疗应答均有联系。因此,分析不同地区前 C 区 A1896、BCP T1762/A1764 变异的分布,对乙肝的防治具有指导意义。以前对贵州省进行的 HBV 前 C 区及 BCP 变异研究,仅局限于某一地区的 HBV 感染者^[1],其他地区、不同民族肝病患者的前 C 区及 BCP 变异仍不清楚。为进一步明确贵州省 HBV 前 C 区和 BCP 变异的分布,阐明变异与基因型及疾病的相关性,我们对贵州省 4 个地区共 482 例患者进行了调查。

对象与方法

1. 研究对象:共 482 例。系 2004 年 4 月至 2005 年 12 月,贵州省的贵阳(302 例)、凯里(35 例)、遵义(64 例)、都匀(81 例)4 地区不同民族慢性 HBV 感染者。男性 362 例,女性 120 例,年龄 16~70 岁。根据 2005 年全国肝病会议修订标准,其中无症状携带者(ASC)225 例,CH 158 例,肝炎肝硬化(LC)57 例,肝细胞肝癌(HCC)42 例。

2. 血清标本收集:采静脉血 3 ml,离心后取血清冻存备用;同时收集临床资料。

3. 引物设计:根据公布的 HBV 序列,在 C 区设计 6 条引物,其中 C₃、C₄ 为测序分析引物,扩增产物长 383 bp,涵盖前 C1896 及 BCP1762/1764 位点。酶切分析引物 4 条,C₅(错配正义引物),C₆(反义引物)扩增产物长 194 bp,仅包含前 C 区 1896 位点。C₁(正义引物),C₈(错配反义引物)扩增产物长 184 bp,仅包含 BCP1762/1764 位点。C₅ 引物参照文献[2],其余引物自行设计,由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。

4. 主要试剂与仪器:琼脂糖(美国 Promega 公司),DNA 分子量 Marker、4×dNTPs、Taq 酶(华美生物工程公司),限制性内切酶 *Bsu*36I、*Bcl*I(立陶宛 MBI Fermentas 公司)。5700 型荧光定量扩增仪、9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),凝胶图像分析系统(上海天能公司)。

5. HBV DNA 模板的提取:采用匹基公司提供的方法。

6. 酶切检测 A1896、T1762/A1764 变异:采用本

室建立的 PCR-RFLP 方法。主要步骤:从血清中抽提 HBV DNA 后,以 C₅、C₆、或 C₁、C₈ 为引物,PCR 扩增前 C 区或 BCP 区部分片段,产物经 *Bsu*36I 或 *Bcl*I 酶切,根据酶切片段长度多态性判断变异株、野毒株^[3]。

表 1 PCR 所用引物序列

| 名称 | 序列(5'~3') | 位置 | 产物长度(bp) |
|---|-------------------------------------|-----------|----------|
| C ₃ (sense) | CACCTCTGCACGTCGCATGG | 1592~1611 | 383 |
| C ₄ (antisense) | GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA | 1955~1974 | |
| C ₅ (sense) ^a | CAAGCCTCCAAGCTGTGCCTT GGGTGGCCTT | 1865~1895 | 194 |
| C ₆ (antisense) | GTATGGTGAAGTGAACAATG | 2058~2039 | |
| C ₁ (sense) | TCGCATGGAGACCACGGGA | 1604~1623 | 184 |
| C ₈ (antisense) ^b | CCTACAGCTCTAGTACAA TGA | 1787~1765 | |

^a错配引物[1893 位的 T 改为 C,在变异株中引进一个 *Bsu*36I 的切点(CC↓TNAGG)];^b错配引物[1767 位的 A 改为 T,在变异株中引进一个 *Bcl*I 的切点(T↓GATCA)]

7. 测序检测 A1896、T1762/A1764 变异:用 PCR 产物直接测序,具体操作参照文献[1]。

8. HBV 基因分型:采用本室建立的 S 基因 PCR-RFLP 方法^[4]。

9. HBV 血清标志物检测:用 ELISA 法,试剂由科华公司提供,操作按说明书。

10. HBV DNA 检测:用荧光定量 PCR 法,试剂由深圳匹基公司提供,根据外参照标准曲线判断结果,<10³ 拷贝/ml 判为阴性。用求算对数平均值方法计算 HBV DNA 的平均拷贝数。

11. 统计学分析:均数的比较用 *t* 检验,率的比较用 χ^2 检验,多变量资料用 logistic 回归分析。

结 果

1. 临床资料:482 例 HBV 感染者中,ASC 225 例(46.68%),CH 158 例(32.78%),LC 57 例(11.83%),HCC 42 例(8.71%)。平均年龄(30.56±23.62)岁,平均 ALT 水平(149.92±139.62)U/L,平均 HBV DNA 含量(6.93±2.27)log 拷贝/ml,HBeAg 阳性率为 61.41%。在 4 组研究对象中,从 ASC 到 HCC,女性的比例逐渐降低,患者的平均年龄逐渐增高。CH 组的谷丙转氨酶水平和 ASC 组的 HBeAg 阳性率均显著高于其他组,HCC 组的 HBV DNA 含量显著低于其他组(*P* 值均 < 0.05)。

2. A1896、T1762/A1764 变异的检出率:177 份标本用测序、305 份标本用酶切检测了 A1896、

T1762/A1764 的变异,发现单纯 A1896 变异 59 份,单纯 T1762/A1764 变异 91 份,A1896 联合 T1762/A1764 变异 52 份。将联合变异与单纯变异合并,则 A1896 变异检出率为 23.03% (111/482), T1762/A1764 变异检出率为 29.67% (143/482)。

3. A1896、T1762/A1764 变异的地区分布: A1896 和 T1762/A1764 变异的分布,贵阳均高于遵义、都匀、凯里(表 2)。但多因素 logistic 回归分析在控制了 HBeAg、HBV 基因型及临床类型影响后,两种变异在各地区间分布无差异(表 3)。

表 2 不同地区 A1896 和 T1762/A1764 变异的分布

| 地区 | 例数 | A1896 | | T1762/A1764 | |
|----|-----|-------|--------|-------------|--------|
| | | 例数 | 构成比(%) | 例数 | 构成比(%) |
| 贵阳 | 302 | 96 | 31.79 | 124 | 41.06 |
| 遵义 | 64 | 7 | 10.94 | 9 | 14.06 |
| 都匀 | 81 | 7 | 8.64 | 9 | 11.11 |
| 凯里 | 35 | 1 | 2.86 | 1 | 2.86 |
| 合计 | 482 | 111 | 23.03 | 143 | 29.67 |

表 3 侗、苗、布依、汉族感染者 A1896 和 T1762/A1764 变异分布

| 民族 | 例数 | A1896 | | T1762/A1764 | |
|-----|-----|-------|--------------------|-------------|--------------------|
| | | 例数 | 构成比(%) | 例数 | 构成比(%) |
| 侗族 | 28 | 1 | 3.57 | 1 | 3.57 |
| 苗族 | 30 | 1 | 3.33 | 1 | 3.33 |
| 布依族 | 55 | 7 | 12.73 | 8 | 14.55 |
| 汉族 | 369 | 102 | 27.64 ^a | 133 | 36.04 ^b |
| 合计 | 482 | 111 | 23.03 | 143 | 29.67 |

与侗、苗、布依族相同变异比,^a $\chi^2 = 18.8974$,^b $\chi^2 = 30.6589$, P 值均 < 0.05

4. A1896、T1762/A1764 变异的民族分布:侗、苗、布依族感染者中 A1896 变异较低,T1762/A1764 变异的分布分别为 3.57%、3.33% 和 14.55%。汉族感染者 A1896 变异的检出率为 27.64%, T1762/A1764 变异为 36.04%,与侗、苗、布依族 HBV 感染者合并后的 7.96% 和 8.85% 相比,差异有统计学意义(表 3)。

5. A1896、T1762/A1764 变异在 B、C 基因型中的分布:B 基因型 60.17%,C 型 39.00%,A、D 型各 0.41%。B、C 基因型中 A1896 变异的分布分别为 20.34% 和 27.13%,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.95$, $P > 0.05$)。T1762/A1764 变异分布,B 型为 18.97%,明显低于 C 型的 46.28%,差异有统计学意义($\chi^2 = 40.74$, $P < 0.01$)。

6. A1896、T1762/A1764 变异在 HBeAg 阳性、阴性组间的分布:482 例患者中,301 例为 HBeAg 阳

性,181 例为 HBeAg 阴性。A1896 变异在 HBeAg 阳性和阴性组间的检出率分别为 10.96% 和 43.09%, T1762/A1764 变异则分别为 14.62% 和 54.70%, A1896、T1762/A1764 变异在 HBeAg 阳性、阴性组间的分布,差异有统计学意义(χ^2 值分别为 64.41、87.01, P 值均 < 0.01)。

7. A1896、T1762/A1764 变异在不同临床类型中的分布:从 ASC 组到 HCC 组,A1896 变异在各组中的比例逐渐增高,ASC 组 9.33%、CH 28.48%、LC 42.11%、HCC 52.38%。T1762/A1764 变异在对应组中的分布也有相同规律,分别为 10.67%、28.45%、71.93% 和 78.57%。将 LC、HCC 组与 CH、ASC 组合并分析,则 LC、HCC 组 A1896、T1762/A1764 变异分布均高于 CH、ASC 组(表 4)。

表 4 不同临床类型 HBV 感染者 A1896、T1762/A1764 变异的分布

| 组别 | 例数 | A1896 变异 | | T1762/A1764 变异 | |
|-----|-----|----------|--------------------|----------------|--------------------|
| | | 例数 | 构成比(%) | 例数 | 构成比(%) |
| ASC | 225 | 21 | 9.33 | 24 | 10.67 |
| CH | 158 | 45 | 28.48 | 45 | 28.45 |
| LC | 57 | 24 | 42.11 | 41 | 71.93 |
| HCC | 42 | 22 | 52.38 ^a | 33 | 78.57 ^b |
| 合计 | 482 | 111 | 23.03 | 143 | 29.67 |

HCC、LC 组与 CH、ASC 组相比,^a $\chi^2 = 37.69$,^b $\chi^2 = 121.34$, P 值均 < 0.05

8. A1896、T1762/A1764 变异分布相关因素的多因素 logistic 回归分析:A1896、T1762/A1764 变异与 HBeAg 阴性,临床类型中的 LC、HCC 间存在相关性,但在地区间分布未见差异(表 5)。

讨 论

HBV A1896 和 T1762/A1764 变异株流行率各地报道不一,美国慢性 HBV 感染者中 A1896 和 T1762/A1764 变异的检出率分别为 27% 和 44%^[5],日本的慢性乙肝患者上述变异的检出率为 31.5% 和 54.7%^[6],国内广州报告则分别为 30.7% 和 32.5%^[7]。本研究用测序及 PCR-RFLP 方法,调查贵州省 4 个地区共 482 例慢性 HBV 感染者 A1896、T1762/A1764 变异的分布,发现贵州省 A1896、T1762/A1764 变异的检出率分别为 23.03% 和 29.67%,比日本、美国低,与广州相近。在贵州省的部分地区,两种变异的分布亦不相同。贵阳地区无论是 A1896 或 T1762/A1764 变异的检出率均显著高于遵义、都匀、凯里。但多因素 logistic 回归分析

在控制了 HBeAg、HBV 基因型及临床类型影响后, 变异分布在各地区间无差异。究其原因除与各地样本量大小不等外, 尚与临床类型的差异有关。为全面反映两种变异在贵州各地区的分布, 除扩大调查范围外, 还需注意临床类型的分布。

表5 多因素 logistic 回归分析 A1896、T1762/A1764 变异分布的相关因素

| 变异分布 | OR 值(95% CI) | P 值 |
|-----------------------|--------------------|---------------------|
| A1896 | | |
| HBeAg 阴性 ^a | 4.000(2.359~6.780) | 0.000 |
| C 基因型 ^b | 0.633(0.380~1.053) | 0.078 |
| 地区 ^c | 遵义 | 0.645(0.233~1.785) |
| | 都匀 | 0.609(0.201~1.844) |
| | 凯里 | 0.157(0.020~1.218) |
| 临床类型 ^d | CH | 2.634(1.151~6.024) |
| | LC | 2.749(1.035~7.303) |
| | HCC | 4.321(1.532~12.185) |
| T1762/A1764 | | |
| HBeAg 阴性 ^a | 3.254(1.983~5.340) | 0.000 |
| C 基因型 ^b | 2.093(1.282~3.418) | 0.003 |
| 地区 ^c | 遵义 | 0.716(0.307~1.671) |
| | 都匀 | 0.532(0.237~1.191) |
| | 凯里 | 0.394(0.087~1.782) |
| 临床类型 ^d | CH | 1.096(0.819~1.467) |
| | LC | 7.004(3.301~14.863) |
| | HCC | 6.841(2.824~16.572) |

^a HBeAg 阳性为对照组; ^b B 基因型为对照组; ^c 贵阳为对照组, ^d ASC 为对照组

A1896、T1762/A1764 变异与种属有联系, 32% 亚裔、19% 白人和 9% 的黑人患者存在 A1896 变异, 45% 的亚裔和白人以及 31% 的黑人患者出现 T1762/A1764 变异^[5]。但亚裔不同民族患者的分布尚未见报道。本研究以贵州省少数民族中人口比例较多的侗、苗、布依族感染者为对象, 汉族患者为对照, 调查 A1896、T1762/A1764 变异的人种分布。发现两种变异的检出率侗、苗族最低, 布依族其次, 汉族最高, 差异有统计学意义。不同民族患者变异分布的差异, 除种属原因外, 可能与感染的 HBV 基因型不同亦有关^[8]。

A1896、T1762/A1764 变异与 HBV 基因型有关, 但由于样本数量及方法学的不同, 至今未能得到一致的结论^[9,10]。本文以 B、C 型为流行株的贵州省 HBV 感染者为对象, 研究两种变异与 B、C 基因型的关系, 发现 C 型感染者 T1762/A1764 变异检出率高于 B 型, logistic 回归分析也证实 C 基因型是发生 T1762/A1764 变异的重要相关因素, 与多数的报

道一致。A1896 变异的检出率, C 型感染者亦较 B 型高, 但差异无统计学意义, 提示 A1896 变异与 B、C 基因型无明显依赖关系, 这与 Orito 等^[11] 的报道一致。

对 A1896、T1762/A1764 变异与病期联系的分析发现, A1896、T1762/A1764 变异更易发生于 LC、HCC 患者, 提示两种变异均与疾病进展有关。研究表明, A1896 和 T1762/A1764 变异在 HBeAg 阴性患者中的检出率均高于 HBeAg 阳性患者, 说明两种变异均与 HBeAg 阴性状态有关。这与 T1762/A1764 变异导致 HBeAg 表达减少, A1896 变异导致 HBeAg 表达终止有关。

参 考 文 献

- [1] 刘悦晖, 丁静娟, 张权. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒前 C 区和基本核心启动子变异检测和临床意义探讨. 中华消化杂志, 2005, 25(9): 471-474.
- [2] Lindh M, Furuta Y, Ljunggren KK, et al. Detection of hepatitis B virus precore TAG mutant by an amplification-created restriction site method. J Infect Dis, 1995, 171(1): 194-197.
- [3] 丁静娟, 刘悦晖, 王梅. 乙型肝炎病毒前 C 区及基本核心启动子变异检测方法的比较研究. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 402-406.
- [4] 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. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(8): 475-478.
- [5] Chu CJ, Keffe EB, Han SH, et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. Hepatology, 2003, 38(3): 619-628.
- [6] Sumi H, Yokosuka O, Seki N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. Hepatology, 2003, 37(1): 19-26.
- [7] 侯金林, 陈金军, 王战会 等. 乙型肝炎病毒毒株 X 基因/C 基因启动子的热点变异. 中华医学杂志, 1998, 78(2): 107-110.
- [8] 丁静娟, 彭亮, 张权, 等. 贵州侗族、苗族和汉族人群乙型肝炎病毒基因型分布. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(3): 230-233.
- [9] Kidd LK, Oberg M, Kidd AH, et al. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutation; implications for HBeAg status and disease. J Gen Virol, 1997, 78(6): 1469-1478.
- [10] Yuen MF, Sablon E, Yuen HJ, et al. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2003, 37(3): 562-567.
- [11] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes Band C. Japan HBV Genotype Research Group. Hepatology, 2001, 33(1): 218-223.

(收稿日期: 2006-07-26)

(本文编辑: 王多春)