

HBV基因组A1846T变异对病毒复制力及核心启动子活性的上调作用研究

江玲, 许智慧, 刘妍, 李晓东, 姚伟明, 李韦杰, 戴久增, 辛绍杰, 徐东平

[摘要] 目的 评价乙型肝炎病毒(HBV)基因组核苷酸(nt)A1846T变异对病毒体外复制力及核心启动子(CP)转录活性的影响。方法 385例研究对象包括116例轻中度慢性乙肝(CHB-M)患者, 123例重度慢性乙肝(CHB-S)患者和146例慢加急性肝衰竭(ACLF)患者。从患者血清中提取HBV DNA, PCR扩增HBV全长基因组, 统计A1846T变异的发生率。挑选代表性A1846T变异株HBV全长序列克隆至pGEM-Teasy载体中, 并通过定点突变获得野生型对照。BspQ I /Sca I 双酶切HBV基因组, 转染HepG2细胞, 检测病毒复制力和HBsAg表达水平; 用PCR分别扩增含nt1846变异型和野生型的HBV CP区片段, 构建pGL3-CP双荧光素酶真核报告表达载体, 转染HepG2细胞, 分析检测 A1846T变异对荧光素酶表达的影响。结果 HBV A1846T变异发生率随疾病程度加重依次增高, CHB-M、CHB-S和ACLF患者的变异检出率分别为31.03%、42.27%和55.48%($P<0.01$)。A1846T变异株的复制力、分泌的HBsAg水平和核心启动子活性较野生株分别提高了320%、28%和85%, 常见的CP区A1762T/G1764A双联变异株分别较野生株提高了67%、9%和72%, A1846T变异对提高病毒复制力的影响更强。结论 A1846T变异可显著增加HBV复制力, 提高HBsAg表达水平, 增强启动子活性, 顺式激活下游基因转录表达, 提示该变异可能与慢性乙肝重症化发生机制相关。

[关键词] 肝炎病毒, 乙型; 肝功能衰竭; 突变; 启动区; DNA复制

[中图分类号] R512.62

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2013)01-0010-05

Up-regulation effect of hepatitis B virus genome A1846T mutation on viral replication and core promoter activity

JIANG Ling¹, XU Zhi-hui², LIU Yan², LI Xiao-dong², YAO Wei-ming¹, LI Wei-jie¹, DAI Jiu-zeng², XIN Shao-jie², XU Dong-ping^{2*}

¹Viral Hepatitis Research Laboratory, 302 Hospital of PLA, Peking University; ²Institute of Infectious Diseases and Liver Failure Research Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

*Corresponding author, E-mail: xudongping@yahoo.com

This work was supported by the National "Twelfth Five-Year Plan" Special Project for Infectious Diseases (2012ZX10002004-005)

[Abstract] **Objective** To evaluate the influence of hepatitis B virus (HBV) genome nucleotide A1846T mutation on the viral replication capacity and the transcription activity of HBV core promoter (CP) *in vitro*. **Methods** A total of 385 patients with hepatitis B admitted to the 302 Hospital of PLA were enrolled in the study, including 116 with moderate chronic hepatitis B (CHB-M), 123 with severe chronic hepatitis B (CHB-S), and 146 with acute-on-chronic liver failure (ACLF). Serum HBV DNA was isolated and full-length HBV genome was amplified. The incidence of A1846T was analyzed. Full-length HBV genomes containing 1846T mutation were cloned into pGEM-T easy vector, and the counterpart wild-type 1846A plasmids were obtained by site-directed mutagenesis. The full-length HBV genome was released from recombinant plasmid by BspQ I /Sca I digestion, and then transfected into HepG2 cells. Secreted HBsAg level and intracellular HBV core particles were measured 72 hours post-transfection to analyze the replication capacity (a 1.0-fold HBV genome model). 1846 mutant and wild-type full-length HBV genomes were extracted to amplify the fragment of HBV CP region, and the dual luciferase reporter of the pGL3-CP was constructed. The luciferase activity was detected 48 hours post-transfection. **Results** The incidence of A1846T mutation gradually increased with the severity of hepatitis B, reaching 31.03%, 42.27%, and 55.48% in CHB-M, CHB-S and ACLF patients respectively ($P<0.01$).

[基金项目] 国家“十二五”传染病重大专项子课题(2012ZX10002004-005)

[作者简介] 江玲, 硕士研究生。主要从事病毒性肝炎发病机制的研究

[作者单位] 100039 北京 北京大学解放军302医院教学医院病毒性肝炎研究室(江玲、姚伟明、李韦杰); 解放军302医院全军传染病研究所/肝衰竭诊疗与研究中心(许智慧、刘妍、李晓东、戴久增、辛绍杰、徐东平)

[通讯作者] 徐东平, E-mail: xudongping@yahoo.com

The replication capacity of 1846T mutants, level of secreted HBsAg, and transcriptional activity of CP promoter were increased by 320%, 28% and 85% respectively, compared with 1846A wild-type strains. While the more common double mutation A1762T/G1764A in CP region was increased by 67%, 9% and 72% respectively, compared with its counterpart wild-type strains. A1846T had a greater influence on viral replication capacity *in vitro*. **Conclusions** A1846T mutation could significantly increase the replication capacity of hepatitis B virus, secretion of HBsAg and transcription activity of CP promoter, and cis-activate the downstream gene transcription. The finding indicates that HBV genome A1846T mutation might play a role in liver disease progression.

[Key words] Hepatitis B virus; liver failure; mutation; promoter regions; DNA replication

乙型肝炎病毒(HBV)感染是引起急慢性肝炎和进展性肝病包括肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌的主要原因^[1]。HBV DNA复制过程中存在反转录过程,由于DNA聚合酶缺乏读码校正功能,在免疫、药物等各种外界压力下,HBV在复制周期中容易发生变异^[2]。HBV部分区段高度保守,是病毒复制的关键序列,这些部位一旦发生变异,会导致重要的生物学活性改变^[3]。HBV 核心启动子(core promoter, CP)位于nt1643-nt1849,可以调节核心蛋白、前核心蛋白和病毒DNA聚合酶的表达,其基因序列的保守性对于维持病毒的活跃复制非常关键。CP区变异与病毒和宿主的相互作用,以及HBV 慢性感染最终引起肝细胞癌或乙肝重症化的发生密不可分^[4]。本研究探讨了CP区变异引起的HBV病毒学变化,及其对乙肝重症化发生的影响。

1 材料与方法

1.1 临床资料 样本来源于2005年8月-2008年5月在解放军302医院就诊的385例病毒性乙肝患者,其中轻中度慢性乙肝(CHB-M)患者116例,重度慢性乙肝(CHB-S)患者123例,慢加急性肝衰竭(ACLF)患者146例,诊断标准符合2000年9月(西安)全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[5]。

1.2 主要试剂及引物 病毒DNA提取试剂盒及PCR试剂购自北京天恩泽公司; Taq酶、T₄ DNA连接酶购自TaKaRa公司; pGEM-Teasy载体、JM109感受态细胞和荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司; 胶回收试剂盒购自QiaGen公司; 质粒提取试剂盒购自上海生工公司; 定点突变试剂盒购自德国Stratagen公司; Kpn I、Bgl II、BspQ I、Sca I内切酶购自NEB公司; 转染试剂盒FuGENE HD 购自Roche公司。HBsAg诊断试剂盒购自北京科卫公司; 实时荧光定量试剂盒购自上海复星公司。引物

由上海生工合成,测序由北京天一辉远公司完成。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA全基因组序列扩增及TA克隆 采用病毒DNAout试剂裂解病毒并沉淀DNA,70%乙醇沉淀蛋白以提高DNA纯度。采用经典的一步法PCR扩增HBV全基因组序列^[6]。将全长PCR产物进行纯化后加A,胶回收加A产物,与pGEM-Teasy载体连接,转化JM109感受态细菌后进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落PCR阳性克隆送测序。

1.3.2 CP区1846位点定点突变 采用QuickChange定点突变试剂盒将CP区1846T定点突变回复为野生型1846A,获得除1846位点以外的基因背景完全相同的副本对照组。定点突变引物为P1、P2(表1),反应条件:95℃ 2min; 95℃ 20s, 60℃ 10s, 68℃ 4min, 18个循环; 68℃ 5min。产物模板DNA经Dpn I酶消化后,选择性保留未甲基化质粒,转化JM109高感受态细胞,挑选阳性克隆送测序确定突变是否成功。

1.3.3 获得1.0倍全长HBV复制子及细胞转染 提取含有全长HBV DNA的质粒进行BspQ I/Sca I双酶切,胶回收3.2kb左右的DNA条带,获得1.0倍HBV DNA全长序列,紫外分光光度计定量,浓度为0.6~1.2μg/μl, A₂₆₀/A₂₈₀值为1.8。将人肝癌细胞系(HepG2)培养于含10%胎牛血清的DMEM中(37℃、5%CO₂),转染前1d按1.5×10⁵个细胞/孔接种于12孔板中,细胞生长至50%~60%融合时采用脂质体转染法进行转染,每孔转染全长HBV DNA 1μg,脂质体2μl,设置未转染孔为阴性对照,转染72h后收获细胞。

1.3.4 上清分泌的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和细胞内HBV核心颗粒检测 HepG2细胞转染72h后,收集细胞上清,采用ELISA方法检测HBsAg。收集细胞,经0.5%NP-40裂解,先后经DNase I和Proteinase K消化,再用酚、氯仿/异戊醇抽提,异

表1 定点突变及CP区PCR扩增引物

Tab.1 Primer sequences for site-directed mutagenesis and PCR amplification of CP region

Primer	Sequence	Note
P1	5'-CCTAATCATCTCATGTTCATGTCT-3'	Used for sitedirected mutagenesis
P2	5'-AGGACATGAACATGAGATGATTAGG-3'	Used for sitedirected mutagenesis
P3	5'-CGGGGTACCCACCAGGTCTTGCCCAAG-3' (Kpn I)	Sense primer for PCR amplification of CP region
P4	5'-GGAAGATCTAGGCTTGAACAGTAGGACATG-3' (Bgl II)	Antisense primer for PCR amplification of CP region

丙醇沉淀，乙醇漂洗，Elution Buffer重溶获得HBV复制中间体核心颗粒DNA。采用Real-time荧光定量法进行HBV定量，反映1.0倍HBV体外复制力。

1.3.5 HBV CP区扩增及pGL3-CP荧光素酶表达载体构建 取含有nt1846位点变异型与野生型的T-easy质粒，BspQ I /Sca I 双酶切，胶回收3.2kb左右的DNA条带，加T₄ DNA连接酶后自连。采用普通PCR扩增CP区，引物为P3、P4(表1)，反应条件：94℃ 3min；94℃ 15s，54℃ 15s，72℃ 30s，35个循环；72℃ 10min。CP区扩增产物胶回收，与pGL3-Basic载体分别进行Kpn I /Bgl II 双酶切，胶回收后在T₄ DNA连接酶作用下将两者定向连接，转化JM109感受态后筛选菌落PCR阳性克隆，提取质粒，行Kpn I /Bgl II 双酶切鉴定，酶切鉴定正确的载体质粒送测序。

1.3.6 载体质粒瞬时转染及双荧光素酶报告基因检测 QiaGen试剂盒提取转染级pGL3-CP荧光素酶表达载体质粒，转染方法同前，以pRL-TK载体作为内参照进行共转染，每孔0.1μg，设置pGL3-Basic为阴性对照，pGL3-Control为阳性对照，48h后裂解细胞，参照荧光素酶检测试剂盒说明书使用单管型多

功能检测仪对荧光素酶活性进行检测，并用内参对其进行校正。

1.4 统计学处理 应用SPSS 16.0和SAS 9.0软件分析数据。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，方差齐时采用单因素方差分析，方差不齐采用Kruskal-Wallis秩和检验。计数资料采用 χ^2 检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床资料分析 对各组患者进行统计分析，A1846T变异检出率在CHB-M、CHB-S和ACLF三组患者中呈升高趋势，分别为31.03%、42.27%和55.48%(P<0.01)。与ACLF比较，CHB-M和CHB-S的A1846T变异检出率明显降低(P<0.05)，而CHB-M和CHB-S之间差异无统计学意义(P=0.072)。经线性趋势检验，P<0.0001，Z=-3.9805，表明随着病情加重变异率增加。临床资料显示，CHB-M、CHB-S和ACLF患者HBeAg阳性率和HBV DNA载量依次降低(P<0.01)，而谷丙转氨酶(ALT)和总胆红素(TBIL)水平则依次升高(P<0.01，表2)。

表2 患者临床资料分析

Tab.2 Clinical data of the patients

Clinical data	CHB-M patients (n=116)	CHB-S patients (n=123)	ACLF patients (n=146)
Age(year)	41.1±13.0	38.8±13.4	46.0±12.0 ⁽²⁾⁽⁴⁾
Male/Female	100/16	106/17	119/27
HBeAg(+/-)	88/28	58/65 ⁽²⁾	49/97 ⁽²⁾⁽³⁾
ALT(U/L)	169.00±249.00	460.39±376.02 ⁽²⁾	527.70±995.60
TBIL(mmol/L)	42.38±76.80	106.54±112.31 ⁽²⁾	313.40±144.30 ⁽²⁾⁽⁴⁾
HBV DNA(log10 copy/ml)	6.27±1.26	5.93±1.36 ⁽¹⁾	5.00±1.90 ⁽²⁾⁽⁴⁾
A1846T mutation rate (%)	31.03	42.27	55.48 ⁽²⁾⁽³⁾

(1)P<0.05, (2)P<0.01 compared with CHB-M patients; (3)P<0.05, (4)P<0.01 compared with CHB-S patients

2.2 定点突变检测结果 测序证实，经典的双联变异型A1762T/G1764A回复突变为野生型A1762/G1764，变异型1846T回复突变为野生型A1846。图1显示定点突变鉴定成功。

2.3 1.0倍全长HBV DNA复制力评价 克隆至pGEM-Teasy 载体中的全基因组HBV DNA经BspQ I /Sca I 双酶切后，胶回收获得1.0倍全长HBV DNA(图2)。变异型的A1762T/G1764A和A1846T复制力较相应野生株分别提高了67%和320%，HBsAg分别提

高了9%和28%，表明A1846T变异可显著增加HBV DNA载量，提高病毒复制力及HBsAg的表达。

2.4 pGL3-CP荧光素酶表达载体的构建 构建成功的PGL3-CP荧光报告载体质粒经Kpn I /Bgl II 双酶切，1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定为4.8kb的载体片段和243bp的CP区插入片段(图3)，酶切鉴定正确后送DNA测序，结果证实插入的CP区片段方向与载体核苷酸序列相同，除1846位点外其他碱基未发生变异，双荧光素酶报告载体构建成功。

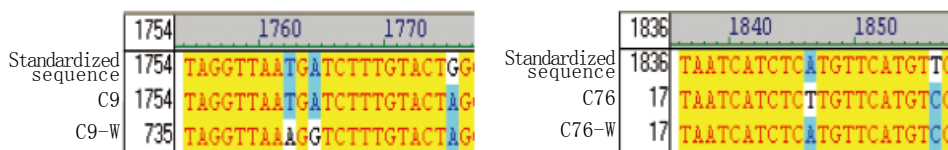


图1 定点突变测序结果

Fig.1 Result of site-directed mutagenesis detected by DNA sequencing

C9. 1762/1764 double-mutation type; C9-W. Wild type; C76. 1846 mutation type; C76-W. Wild type

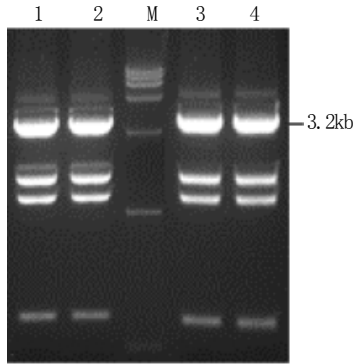


图2 1.0倍全长HBV DNA酶切结果

Fig.2 Identification of the full-length HBV DNA in T-easy plasmid by BspQ I /Sca I digestion

M. Marker 1kb; 1. 1762/1764 double-mutation type; 2. Wild type; 3. 1846 mutation type; 4. Wild type

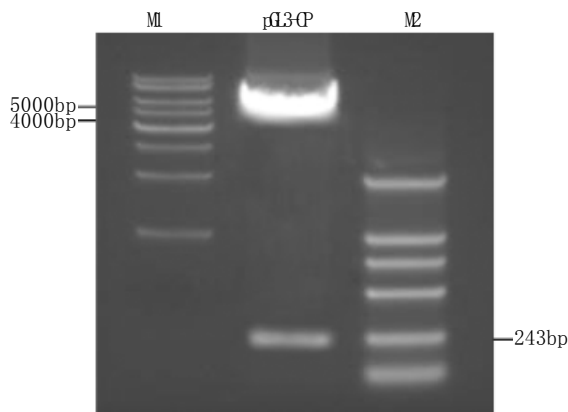


图3 pGL3-CP双酶切鉴定

Fig.3 Identification of pGL3-CP plasmid by Kpn I /Bgl II digestion

M1. Marker 1kb; M2. Marker 2000

2.5 启动子活性检测 经双荧光报告系统检测，变异型A1762T/G1764A和相应野生型的启动子活性分别为0.609和0.353，变异型A1846T和相应野生型启动子活性分别为0.795和0.430，变异型分别较相应野生株提高了72%（与文献[7]报道基本一致）和85%，表明A1846T变异能加强启动子活性，顺式激活下游基因转录，从而增加病毒的产生，与复制力评价结果一致。

3 讨论

HBV感染后发生重型肝炎的病理机制是由病毒和机体双方决定的，其病变的进展影响因素较多，HBV前C/CP区基因变异可能是其中的重要原因之一。基因变异可能是由多因素决定的，但目前更倾向于是在人体免疫压力的作用下发生的。HBV基因变异可通过增强病毒复制能力、免疫原性和致病性影响机体的免疫应答反应，导致HBV感染持续并加重对肝细胞的损害，因此HBV基因变异可能参与了

重型肝炎的发生和发展^[8]。前C/CP是HBV复制的关键性调控因子，调控HBV前C基因组mRNA和前基因组mRNA的转录，HBV前C区变异还可使免疫耐受因子HBeAg的合成和分泌减少，进而影响CTL介导的肝细胞杀伤，CP区的变异还可能导致病毒的成熟及分泌、感染性及肝外趋向性等发生改变^[9]。CP区的A1762T/G1764A双联变异可使3'端茎环结构发生改变，稳定性增强，促进病毒的转录及复制^[10]，与肝炎活动性、移植后严重肝病和肝细胞癌密切相关^[11]。新近有研究表明CP区的A1846T变异在ACLF患者中检出率较高，但未分析该变异对病毒生物活性的影响^[12]。

本研究发现A1846T变异率随疾病严重程度递增，且该变异会导致病毒活力增强，推测加重机体过强的炎性反应是该变异与乙肝重症化相关的内在机制。以经典的A1762T/G1764A作为对照，结果表明，在不同诊断的乙肝患者中，随着病情加重，A1846T位点的变异率增加，HBeAg阳性率和HBV DNA载量降低(P<0.01)，而ALT和TBIL水平则依次升高(P<0.01)，提示A1846T变异与乙肝重症化相关。在统计学分析基础上，构建1.0倍HBV复制模型进行复制力评价，排除外源启动子对HBV复制的影响，结果表明A1846T位点变异后，病毒复制力显著升高(变异型较野生株提高320%)，HBsAg检测结果与复制力一致(变异型较野生株提高28%)。进一步进行前C/CP区启动子活性研究，结果表明A1846T变异可增强前C/CP启动子活性(变异型较野生株提高85%)，顺式激活下游基因转录。

以上结果提示，A1846T变异可能与乙肝重症化相关。本研究进一步证实了HBV前C/CP变异与重型肝炎发生之间的关系，为重型肝炎的发病机制研究提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] William M, Lee MD. Hepatitis B virus infection[J]. New England J, 1997, 337(24):1733-1745.
- [2] Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(7): 427-434.
- [3] Gao XS, Cheng J, Zhen Z, et al. Research progress in HBV core promoter[J]. World Chin J Digestol, 2005, 13(8): 933-936. [高学松, 成军, 甄真, 等. 乙型肝炎核心启动子研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(8): 933-936.]
- [4] Ren XQ, Xu ZH, Xu DP, et al. Mutation and significance of HBV precore and basal core promoter in 958 patients with chronic hepatitis B[J]. Med J Chin PLA, 2009, 34(6): 663-665. [任晓强, 许智慧, 徐东平, 等. 958例乙型肝炎患者HBV前C/BCP区变异检测及其意义分析[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(6): 663-665.]
- [5] Chinese Society of Infectious Diseases and Parasitology, Chinese

- Society of Hepatology. Management scheme of diagnostic and therapy criteria of viral hepatitis[J]. *Chin J Hepatol*, 2000, 8(6): 342-345. [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, 8(6): 342-345.]
- [6] Günther S, Li BC, Miska S, *et al*. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genome permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. *Virology*, 1995, 69(9): 5437-5444.
- [7] Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame[J]. *Virology*, 1997, 233(2): 374-381.
- [8] Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9): 2009-2011.
- [9] Chen M, Sallberg M, Hughes J, *et al*. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 3016-3027.
- [10] Jammeh S, Tavner F, Watson R, *et al*. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(4): 901-909.
- [11] Gunther S, Piwon N, Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653)→T, A(1762)→T and G(1764)→A mutations in the core promoter[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(pt2): 375-380.
- [12] Yan T, Li K, Li F, *et al*. T1846 and A/G1913 are associated with acute on chronic liver failure in patients infected with hepatitis B virus genotypes B and C[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(6): 996-1004.

(收稿日期: 2012-08-26; 修回日期: 2012-12-30)
(责任编辑: 熊晓然)