

HBV 基因组 C1913A/G 变异在不同疾病进程患者间的表现及对病毒复制力的影响

江玲 许智慧 刘妍 李晓东 辛绍杰 徐东平

【摘要】 目的 评价 HBV 基因组核苷酸 C1913A/G 变异对乙型肝炎患者疾病进程及体外病毒复制力的影响。方法 385 例研究对象包括 116 例慢性乙型肝炎轻中度(CHB-M) 患者, 123 例慢性乙型肝炎重度(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 DNA 全长, 统计分析 G1896A, A1762T + G1764A 和 C1913A/G 变异的发生率, C1913A/G 变异引起核心蛋白第 5 位氨基酸残基由脯氨酸变为苏氨酸或丙氨酸。统计各组变异与不同疾病进程患者间的单因素与多因素分析。挑选代表性 C1913A/G 变异株通过定点突变回复为野生型对照。用 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。结果 CHB-M、CHB-S 和 ACLF 三组患者 G1896A, A1762T + G1764A 和 C1913A/G 变异检出率分别为 17.45%、27.43% 和 51.63% ($P < 0.01$), 21.32%、32.64% 和 78.61% ($P < 0.01$), 15.52%、33.33% 和 35.62% ($P < 0.01$), CHB 与 ACLF 患者年龄校正以后两组比较 C1913A/G 检出率分别为 26.34% 和 31.13% ($P < 0.01$)。C1913A 变异株的复制力和 HBsAg 水平较野生株分别降低了 32.6% 和 9.7%, C1913G 分别降低了 50.7% 和 9.2%。结论 C1913A/G 变异发生率随疾病程度加重依次增高且有统计学意义; C1913A/G 变异降低 HBV 病毒复制力并进而降低 HBsAg 表达水平, 可能与核心蛋白结构发生改变有关, 结果提示该变异可能与慢性乙型肝炎重症化发生机制相关。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 突变; 病毒复制

Incidences of hepatitis B virus genome C1913A/G mutation in different disease progressions and the effect on viral replication JIANG Ling, XU Zhi-hui, LIU Yan, LI Xiao-dong, XIN Shao-jie, XU Dong-ping. Peking University 302 Military Hospital Beijing 100039, China

Corresponding author: XU Dong-ping, Email: xudongping@yahoo.com

【Abstract】 Objective To evaluate the impact of hepatitis B virus(HBV) genome C1913A/G mutation on disease progression and the viral replication capacity *in vitro*. **Methods** 385 patients were categorized into mild chronic hepatitis B(CHB-M, 116), severe hepatitis B(CHB-S, 123), and acute on chronic liver failure(ACLF, 146) sub-groups. Full-length HBV genome extracted from patient's serum was amplified by PCR and the G1896A, A1762T + G1764A and C1913A/G variant incidences were calculated. C1913A/G mutation can cause the core protein's fifth residue proline replacement by threonine or alanine. The difference in incidences of C1913A/G among groups was analyzed. The representative C1913A/G mutant was picked out for site-directed mutagenesis converted to wild type as controls by. HBV 1.0 full length genome derived by BspQ I / Sca I double digestion was transfected into HepG2 cells to compare viral replication capacity and HBsAg expression between C1913A/G mutant and wild type. **Results** G1896A, A1762T + G1764A and C1913A/G mutation detection rates were 17.45%, 27.43% and 51.63% ($P < 0.01$); 21.32%, 32.64% and 78.61% ($P < 0.01$), 15.52%, 33.33% and 35.62% for CHB-M, CHB-S and ACLF respectively ($P < 0.01$). The C1913A/G detection rates were 26.34% and 31.13% ($P < 0.01$) after the age-revised in CHB and ACLF groups. Replication capacity and HBsAg expression of C1913A mutants reduced by 32.6% and 9.7% compared to that of wild type; C1913G reduced by 50.7% and 9.2% respectively. **Conclusions** Incidence of C1913A/G mutation increased along with disease severity, which was statistically significant. C1913A/G mutation reduced viral replication capacity and HBsAg expression; it was possibly due to changes in the core protein structure. The results suggested that C1913A/G mutation may be associated with disease progression of chronic hepatitis B.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.08.092

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

作者单位: 100039 北京大学解放军 302 医院教学医院肝衰竭诊疗与研究中心病毒性肝炎研究室

通讯作者: 徐东平, Email: xudongping@yahoo.com

【Key words】 Hepatitis B virus; Mutation; Virus replication

虽然乙型肝炎疫苗在预防 HBV 感染方面发挥了重要作用,但是在全球范围,HBV 感染是引起慢性肝炎和进展性肝病包括肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌的一个主要原因。HBV 感染后机体是否发病,由病毒和机体双方相互作用决定;影响疾病转归和临床结局的因素很多,其中 HBV 基因组发生变异就可能是一个重要的原因。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,使得 HBV 在复制周期中容易发生变异^[1]。相对于 HBV 基因组其他区域的研究,C 区的研究较少,C 区变异影响 HBcAg 的合成和表达,进而影响 HBV DNA 的复制。本研究检测 C1913A/G 变异对病毒复制力和 HBsAg 表达的影响,探讨 C 区 C1913A/G 变异引起的 HBV 病毒生物学变化及其对乙型肝炎重症化发生的影响。

资料与方法

一、临床资料

样本来源于 2005 年 8 月至 2008 年 5 月于解放军 302 医院就诊的 385 例病毒性乙型肝炎患者,其中慢性乙型肝炎轻中度(CHB-M)患者 116 例,慢性乙型肝炎重度(CHB-S)患者 123 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》标准^[2],慢加急性肝衰竭(ACLF)患者 146 例,诊断标准符合 2006 年中华医学会制定的《肝衰竭诊疗指南》^[3]。

二、主要试剂及引物

病毒 DNAout 提取试剂盒、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 STRAT-AGENE 公司;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。

三、方法

1. HBV DNA 全基因组序列扩增和 TA 克隆:采用病毒 DNAout 试剂裂解病毒并沉淀 DNA,再用 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^[4]。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 阳性的克隆送测序。

2. 对 1913 位点定点突变:用 QuickChange 定点突变试剂盒对 1913A/G 定点突变回复为野生型 1913C,获得除 1913 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 °C 2 min;95 °C 20 s,60 °C 10 s,68 °C 4 min,18 个循环;68 °C 5 min。产物模板 DNA 经 Dpn I 酶消化后,选择性地保留未甲基化的质粒,转化 JM109 高感受态细胞,挑选阳性克隆送测序确定是否突变成功。

表 1 定点突变引物

引物名称	引物序列	引物用途
P1	5'-ATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTT-3'	定点突变
P2	5'-AAATTCTTTATACGGGTCAATGTCAT-3'	定点突变

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 3.2 kb 左右的 DNA 条带,获得 1.0 倍 HBV DNA 全长,用紫外分光光度计定量,浓度为 0.6 ~ 1.2 μg/μl,且 A260/A280 值为 1.8。将人肝癌细胞系(HepG2)于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中,37 °C 5% CO₂ 培养,转染前 1 d 按 1.5 × 10⁵ 个细胞/孔接种于 12 孔板中,细胞生长至 50% ~ 60% 融合度时采用脂质体转染法进行转染,每孔转染全长 HBV DNA 1 μg,脂质体 2 μl,设置未转染孔为阴性对照,转染 72 h 后收获细胞。

4. 上清分泌的 HBsAg 和细胞内 HBV 核心颗粒检测: HepG2 细胞转染 72 h 后,收集细胞上清采用 ELISA 方法检测乙型肝炎 HBsAg。收集细胞经 0.5% NP-40 裂解,先后经 DNase I 和 Proeinase K 消化,再用酚、氯仿/异戊醇抽提,异丙醇沉淀,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。

四、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用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐采用方差分析,方差不齐采用 K-W 秩和检验。计数资料用 χ^2 检验。多因素分析采用多重 Logistic 回归分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

结果

1. 患者临床资料分析:患者的人口学资料和临床检测资料按分组呈现(表 2)。对来自患者样本的数据

表 2 患者临床资料分析

组别	例数	男/女	年龄 (岁 $\bar{x} \pm s$)	HBeAg (+/-例)	ALT (U/L $\bar{x} \pm s$)	TBIL (mmol/L $\bar{x} \pm s$)	PTA (% $\bar{x} \pm s$)	HBV DNA (log ₁₀ 拷贝/ ml $\bar{x} \pm s$)	G1896A (%)	A1762T + G1764A (%)	C1913A/ G (%)
CHB-M	116	100/16	41.1 ± 13.0	88/28	169.00 ± 249.00	42.38 ± 76.80	95.62 ± 33.91	6.27 ± 1.26	17.45	21.32	15.52
CHB-S	123	106/17	38.8 ± 13.4	58/65	460.39 ± 376.02	106.54 ± 112.31	65.60 ± 18.93	5.93 ± 1.36	27.43	32.64	33.33
ACLF	146	119/27	46.0 ± 12.0	49/97	527.70 ± 995.60	313.40 ± 144.30	33.42 ± 4.20	5.00 ± 1.90	51.63	78.61	35.62
P 值		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 不同变异在不同患者分组中年龄校正后的分析

组别	例数	年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	G1896A (%)	A1762T + G1764A (%)	C1913A/G (%)
CHB	111	32.02 ± 6.23	43.22	68.52	24.34
ACLF	45	33.47 ± 4.73	55.61	77.84	31.13
单因素分析 P 值	校正		<0.01	<0.01	<0.01
多因素分析 P 值			0.02	0.02	0.03

进行统计分析,G1896A ,A1762T + G1764A 和 C1913A/G 变异检出率在 CHB-M、CHB-S 和 ACLF 三组患者中分别为: 17.45% ,27.43% 和 51.63% (P < 0.01); 21.32% ,32.64% ,和 78.61% (P < 0.01); 15.52%、33.33% 和 35.62% (P < 0.01)。检出率在 CHB-M、CHB-S 和 ACLF 中呈升高趋势,CHB-M 和 CHB-S 和 ACLF 比较发生率明显增加,单因素分析各组变异率有统计学差异。临床资料显示 CHB-M、CHB-S 和 ACLF 患者 HBeAg 阳性率,PTA 和 HBV DNA 载量依次降低 (P < 0.01),而 ALT 和 TBIL 含量则依次升高 (P < 0.01)。

2. 不同变异在不同分组患者中年龄校正后的单因素和多因素分析: 将入选样本患者年龄校正后分为两组 CHB 组和 ACLF 组(表 3),单因素分析 G1896A ,A1762T + G1764A 和 C1913A/G 变异率均有统计学差异 (P < 0.01),多重 Logistic 回归分析显示 G1896A ,A1762T + G1764A 和 C1913A/G 变异是 CHB 患者发展为 ACLF 的风险因素。

3. HBV DNA 复制力的评价及表面抗原检测: 以经典的 A1762T/G1764A 双联变异作为对照,Real-time PCR 方法对提取的核心颗粒进行 HBV DNA 定量,反映 1.0 倍 HBV 体外复制力,变异型的双联变异 A1762T/G1764A 复制力较相应野生株提高了 67%,C1913A 和 C1913G 复制力较相应野生株分别降低了 32.6% 和 50.7% (图 1)。检测乙型肝炎 HBsAg,双联变异的 A1762T/G1764A HBsAg 滴度较相应野生株提高了 20.9%,C1913A 和 C1913G HBsAg 滴度较相应野生株降低了 9.7% 和 9.2% (图 2)。

讨 论

目前,在全世界乙型肝炎病毒感染都是一种主要的公共卫生问题,全世界大约有 4 亿人感染了乙型肝炎病毒^[5]。在成人感染者中只有 5% 的人会发展成慢性肝炎,相反的,在出生时或年幼时即感染者则有 90% 以上会进展为慢性肝炎。HBV 感染后发生慢性化和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 基因变异可能是其中重要原因之一。前 C 区 G1896A 和基本核心启动子区 (BCP) A1762T/G1764A 的突变都是重要的常见突变,在改变 HBeAg 的表达方面起重要作用,HBeAg 与宿主的持续病毒感染有关^[5]。HBV 前 C 区 G1896A 变异使第 28 位色氨酸密码子 (TGG) 变为终止密码子 (TAG),从而使 HBeAg 翻译合成终止^[6],BCP 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,促进病毒转录的发生和复制^[7]。

乙型肝炎病毒 C 区基因变异可能会改变核心蛋白的构象,使 HBV 通过缺失或者改变免疫表位来逃避免疫监视,部分有免疫活性表位的 HBV 变异株会成为优势病毒株,这种选择性的细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表位逃逸突变和病毒的持续感染有关^[8],引起宿主免疫攻击导致肝脏疾病的重症化,或许可以预测肝脏疾病的进展^[9],同时 HBeAg 的序列及结构改变会影响 HBV 核衣壳包装的稳定性及 HBV 复制的精确度和复制效率,这些改变都可能会对乙型肝炎病毒的生活周期有重要影响。乙型肝炎病毒 C 区包含多个 T 细胞和 B 细胞免疫表位,其中 HBeAg 和 HBeAg 是宿主 CTL 细胞识别和攻击 HBV 感染肝细胞的主要靶目标,CTL 表位的改变

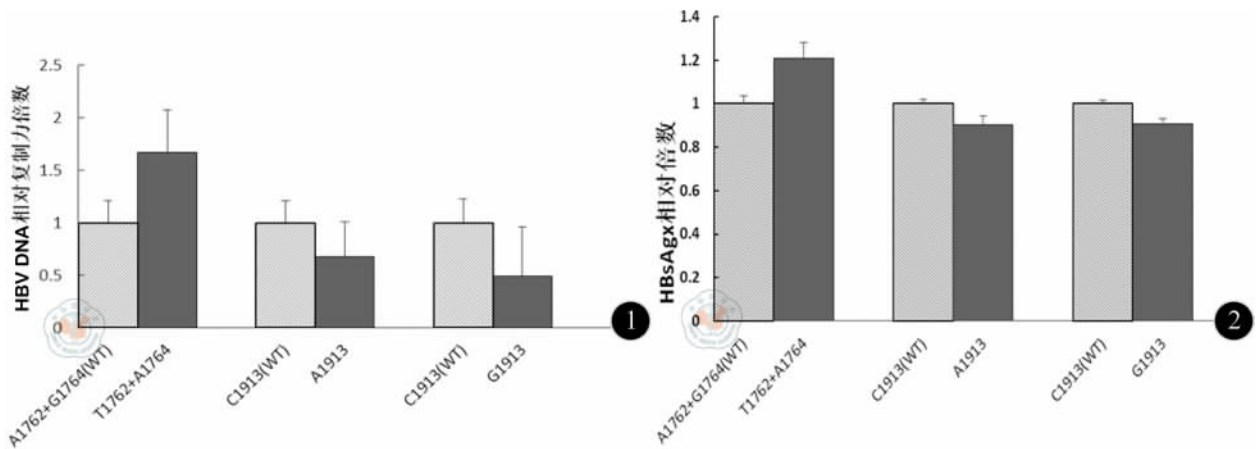


图1 HBV DNA相对复制力倍数 图2 HBsAg检测相对倍数

会显著影响 T 细胞识别和杀伤功能和后续的细胞因子释放,可能和肝病的临床严重程度有关^[10]。C 区基因变异会引起 HBeAg 和 HBcAg 的结构和功能改变,使病毒逃避免疫清除或者影响 HBsAg 和 HBeAg 的检测,给乙型肝炎的预防、诊断和治疗带来新的问题^[11]。

新近有研究表明 C 区的 C1913A/G 变异在 ACLF 患者中检出率较高,认为 C1913A/G 变异是 ACLF 的独立危险因素,但未对该变异对病毒生物学活性的影响进行分析^[12]。也有报道指出^[13],在 HBeAg 血清转换的病例中,C1913A 在炎症活动期的突变率(33.3%)明显高于免疫耐受期的突变率(0)。在 ALT 高的患者中,C 区氨基酸突变也明显增高。1913 核苷酸突变后,使核心区第五位氨基酸残基由脯氨酸转变苏氨酸或者丙氨酸,由于脯氨酸对维持蛋白质的结构有重要作用,因此该突变可能影响到蛋白质的二级结构,使乙型肝炎病毒的核心抗原结构发生变化,分析认为 C1913A/G 虽然引起 HBV 复制力降低,但会使核心蛋白第 5 个氨基酸发生变异,因为离核心蛋白 N 端比较近,可能会影响蛋白成熟前信号肽的结构,信号肽不能切掉使前体核心蛋白停留在内质网上,免疫攻击核心蛋白时也会引起细胞膜系统的破坏,从而引起细胞的大面积死亡,可能与乙型肝炎重症化发生有关,后续假设还需要功能学上实验的证实。

本研究发现 C1913A/G 位点是除 G1896A A1762T + G1764A 等位点外的潜在变异,其在不同诊断的乙型肝炎患者中,随疾病严重程度递增,HBeAg 阳性率,PTA 和 HBV DNA 载量降低($P < 0.01$),而 ALT 和 TBIL 含量则依次升高($P < 0.01$),在年龄校正和多因素分析基础上,提示 C1913A/G 变异与乙型肝炎重症化相关。在统计学分析基础上,对 C1913A/G 进行定点突变,获得除研究位点以外基因背景完全相同的野生型副本对照,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,以经典的 A1762T/

G1764A 作为对照进行复制力评价,结果表明 C1913A/G 位点变异后,病毒复制力显著降低,HBsAg 检测结果与复制力一致降低。核心区 C1913A/G 位点变异引起核心蛋白变化从而影响 HBsAg 的表达和 HBV DNA 复制力的作用机制及对乙型肝炎重症化的影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sheldon J,Rode's B ,Soriano V ,et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. J Viral Hepat ,2006 ,13: 427-434.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000 8: 342-345.
- [3] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 实用肝脏病杂志 2006 9: 321-324.
- [4] Stephan GN ,Bi-Chen Li ,Hans W ,et al. A novel method for efficient implication of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. J Virol ,1995 69: 5437-5444.
- [5] Hakami A ,Ali A ,Hakami A. Effects of hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity. Open Virol J 2013 7: 12-18.
- [6] Gandhe SS ,Chadha MS ,Walimbe AM ,et al. Hepatitis B virus: Prevalence of precore/core promoter mutants in different clinical categories of Indian patients. J Viral Hepat 2003 ,10: 367-382.
- [7] Jammeh S ,Tavner F ,Watson R ,et al. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. J Gen Virol , 2008 89: 901-909.
- [8] Sendi H ,Mehrab-Mohseni M ,Magnius LO ,et al. CTL escape mutations of core protein are more frequent in strains of HBeAg negative patients with low levels of HBV DNA. J Clin Virol ,2009 ,46: 259-264.
- [9] Kim D ,Lyoo KS ,Mehta S ,et al. Number of mutations within CTL-defined epitopes of the hepatitis B Virus(HBV) core region is associated with HBV disease progression. J Med Virol 2011 83: 2082-2087.
- [10] Tanaka H ,Ueda H ,Li BH ,et al. Mutations in hepatitis B virus core regions correlate with hepatocellular injury in Chinese patients with chronic hepatitis B. World J Gastroenterol 2005 ,11: 4693-4696.
- [11] Jing YZ ,Pu SB ,Gao ZH ,et al. Detection and analysis of gene polymorphism in hepatitis B virus C region. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2011 25: 241-244.
- [12] Yan T ,Li K ,Wang H ,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 Med Virol 2011 83: 996-1004.

813.

- [13] Wu JF ,Ni YH ,Lin YT et al. Human interleukin-10 genotypes are associated with different precore/core gene mutation patterns in children with chronic hepatitis B virus infection. J Pediatr ,2011 ,158: 808-

(收稿日期:2013-04-15)

(本文编辑: 马超)

江玲,许智慧,刘妍,等. HBV 基因组 C1913A/G 变异在不同疾病进程患者间的表现及对病毒复制力的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013,7(8): 3357-3361.