

论 著

· 临床研究 ·

## 乙型肝炎病毒核心启动子区核苷酸G1613A和C1653T变异的临床意义

黄鹏宇, 许智慧, 刘妍, 李晓东, 廖昊, 粘学渊, 刘新光, 欧超伟, 徐东平

**[摘要]** 目的 评价HBV G1613A和C1653T变异对乙型肝炎患者疾病进展、病毒体外复制力及核心启动子(CP)转录活性的影响。方法 共纳入258例研究对象, 包括65例急性乙型肝炎(AHB)患者, 120例慢性乙型肝炎(CHB)患者和73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全长基因组, 统计G1613A、C1653T和G1613A+C1653T变异的发生率。构建相应载体进行体外功能实验, 观察病毒质粒转染HepG2细胞后对病毒复制力及其CP转录活性的影响。结果 258例患者中共检出B、C、D三种基因型, 其检出率分别是22.2%、76.2%和1.6%。G1613A、C1653T及G1613A+C1653T变异发生率随疾病程度加重依次升高。AHB、CHB和ACLF患者上述3种变异的检出率分别为13.70%、31.80%和45.20% ( $P<0.01$ ), 2.30%、16.30%和27.40% ( $P<0.01$ ), 2.29%、12.07%和23.29% ( $P<0.05$ )。与野生株相比, G1613A变异株复制力升高6%, HBsAg降低15%, HBeAg表达呈阴性, CP转录活性降低16.2%; C1653T变异株复制力升高10%, HBsAg升高55%, HBeAg与野生株接近, CP转录活性升高17.1%; G1613A+C1653T变异株复制力升高7%, HBsAg升高66%, HBeAg升高227%, 但对CP转录活性没有影响。结论 G1613A、C1653T在CP区的变异可增加HBV复制力, 影响CP转录活性和HBV抗原的表达, G1613A+C1653T联合变异可能对这些功能产生协同作用, 推测这三种变异与乙肝重症化发生机制相关。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 启动区, 遗传; 遗传变异; 肝功能衰竭

**[中图分类号]** R512.62

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0577-7402(2016)03-0204-07

**[DOI]** 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.03.07

### The clinical significance of nucleotide G1613A and C1653T mutations in the core promoter region of hepatitis B virus

HUANG Peng-yu<sup>1,2</sup>, XU Zhi-hui<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, LI Xiao-dong<sup>2</sup>, LIAO Hao<sup>1</sup>, NIAN Xue-yuan<sup>2</sup>, LIU Xin-guang<sup>3</sup>, OU Chao-wei<sup>1\*</sup>, XU Dong-ping<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China

<sup>2</sup>Research Center for Clinical and Translational Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China

\*Corresponding author. XU Dong-ping, E-mail: xudongping302@sina.com; OU Chao-wei, E-mail: ouchaowei163@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81271847)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the impact of hepatitis B virus (HBV) genome G1613A and C1653T mutations on disease progression, viral replication capacity, and transcription activity of HBV core promoter (CP). **Methods** A total of 258 patients were enrolled in the present study, including 65 patients with acute hepatitis B (AHB), 120 with chronic hepatitis B (CHB), and 73 with acute on chronic liver failure (ACLF). Serum HBV DNA was extracted from patients, and full-length HBV genome was amplified by PCR. The incidences of G1613A, C1653T and G1613A+C1653T in different groups were compared, and through functional experiments, the impact of mutants and wild-type virus on viral replication capacity and CP transcription activity was assessed. **Results** Genotype B, C and D were the three detected genotypes in 285 patients, with detection rates of 22.2%, 76.2% and 1.6%, respectively. The incidences of G1613A, C1653T and G1613A+C1653T mutations increased with the disease exacerbation, and they were 13.70%, 31.80% and 45.20% in AHB patients ( $P<0.01$ ), 2.30%, 16.30% and 27.40% in CHB patients

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81271847)

**[作者简介]** 黄鹏宇, 医学硕士。主要从事病毒性传染病的基础研究

**[作者单位]** 524001 广东湛江 广东医学院(黄鹏宇、廖昊、欧超伟); 100039 北京 解放军302医院临床研究管理中心(黄鹏宇、许智慧、刘妍、李晓东、粘学渊、徐东平); 523808 广东东莞 广东医学院检验学院生物化学与分子生物学研究所(刘新光)

**[通讯作者]** 徐东平, E-mail: xudongping302@sina.com; 欧超伟, E-mail: ouchaowei163@163.com

( $P < 0.01$ ), and 2.29%, 12.07% and 23.29% in ACLF patients ( $P < 0.05$ ). Compare with wild-type strain, the G1613A mutant strain of HBV increased the viral replication capacity by 6%, reduced HBsAg level and core promoter activity by 15% and 16.2%, and reduced HBeAg to undetectable level; the C1653T mutant strain increased the viral replication capacity, HBsAg level, and core promoter activity by 10%, 55% and 17.1%, respectively, and the HBeAg level was comparable to that of wild-type strain; the G1613A+C1653T mutant strain increased viral replication capacity, HBsAg level and HBeAg level by 7%, 66% and 227%, respectively, while it had no influence on core promoter activity. **Conclusion** The G1613A and C1653T mutation in CP region may increase HBV replication capacity and alter CP activity and HBV antigens expression, the doublet mutation of G1613A+C1653T shows synergic effect on these changes, suggesting these mutations are associated with liver disease progression.

**[Key words]** hepatitis B virus; promoter regions, genetic; genetic variation; liver failure

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是世界性的公共健康问题,我国约有9300万慢性HBV感染患者<sup>[1-2]</sup>。慢性乙型肝炎(CHB)可进一步进展为肝硬化(liver cirrhosis, LC)、慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等终末期肝病。其中,ACLF是在慢性肝病的基础上出现的急性肝功能失代偿,病情进展迅速,预后不良<sup>[3]</sup>,中、晚期ACLF的死亡率高达50%~80%<sup>[4]</sup>。ACLF是我国肝衰竭的主要类型,主要由HBV感染引起,其具体发病机制目前尚未完全明确,而病毒变异可能是其中一个重要因素。HBV病毒在复制过程中,由于HBV DNA聚合酶缺乏读码校正功能,在宿主免疫、药物等各种外界压力下,易出现各种形式的变异<sup>[5]</sup>,一些关键区域的重要位点一旦发生变异,将出现重要的生物学活性改变<sup>[6]</sup>。HBV核心启动子(core

promoter, CP)区变异可对HBV的转录、复制及表达产生重要影响,从而加速疾病进展<sup>[7]</sup>,并可能在某些特定环境下成为ACLF的始动因素。本研究通过对临床HBV感染不同病程阶段的患者进行HBV基因测序,并结合生物学功能实验,阐明HBV CP区G1613A和C1653T变异对ACLF发生、发展的临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 纳入2007年7月—2009年6月在解放军302医院就诊的258例HBV患者。其中急性乙型肝炎(AHB)65例,CHB 120例,诊断符合2000年9月(西安)全国会议修订的《病毒性肝炎防治方案》<sup>[8]</sup>标准;ACLF 73例,符合2006年中华医学会制定的《肝衰竭诊疗指南》<sup>[9]</sup>诊断标准,无重叠或混合感染者。3种类型乙型肝炎患者的临床背景资料见表1。

表1 患者临床资料分析

Tab.1 Clinical data of the patients

Item	AHB (n=65)	CHB (n=120)	ACLF (n=73)	P value
Male [n(%)]	53(80.2)	104(86.6)	59(80.8)	0.21
Age (year)	37 ± 12	40 ± 13	46 ± 12	<0.01
HBeAg+ [n(%)]	22(33.8)	70(58.3)	22(30.1)	<0.01
HBV DNA(U/ml)	3.5 ± 2.0	5.8 ± 1.6	5.0 ± 1.9	<0.01
ALT (U/L)	1257.7 ± 680.1	318.1 ± 349.3	527.7 ± 995.6	<0.01
TBIL (μmol/L)	103.0 ± 70.7	74.4 ± 101.3	313.4 ± 144.3	<0.01
PTA (%)	100.7 ± 23.3	83.6 ± 20.9	33.4 ± 4.2	<0.01

**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基因工程有限公司; pGEM-Teasy载体、JM109感受态细胞和荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司; Taq酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶购自日本TaKaRa公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自德国QIAGEN公司;定点突变试剂盒购自美国Agilent Technologies公司; Kpn I、Bgl II、BspQ I、Sac I内切酶购自美国NEB公司; DMEM培养基购自美国Gibco公司;转染试剂盒X-tremeGENE HD购自美国Roche公司; HBsAg、HBeAg诊断试剂盒购自北京万泰生物公司;实时荧光定量试剂盒购自上海复兴公司; pTriEx-1.15倍

HBV表达载体由解放军302医院临床研究管理中心设计合成。引物合成和基因测序由北京天一辉远公司完成。

## 1.3 方法

**1.3.1 HBV全基因组扩增测序** 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。采用经典一步法PCR扩增HBV全基因组序列<sup>[10]</sup>,经ABI 3739xl DNA分析软件获得测序结果。将HBV基因序列提交GenBank,序列号为GQ377514-GQ377579(AHB)、FJ562218-FJ562338(CHB)、EU939536-EU939609(ACLF)。

**1.3.2 HBV DNA全基因组克隆及测序** 挑选6例代

表性样本, 扩增HBV全长序列, 将全长PCR产物进行胶回收, 与pGEM-Teasy载体连接, 转化JM109感受态细菌后进行蓝白斑筛选, 挑选白色菌落PCR阳性克隆送测序。获得4种(WT、A1613、T1653、A1613+T1653)不同变异形式HBV全长克隆质粒。

**1.3.3 CP区1613和1653位点定点突变** 采用Agilent Technologies定点突变试剂盒将HBV全长克隆质粒CP区A1613+T1653定点突变回复为1613A单变异

型、1653T单变异型及G1613+C1653野生型, 获得除1613、1653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、P3和P4(表2), 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感受态细胞, 挑选阳性克隆送测序确定突变是否成功。

表2 PCR扩增引物序列

Tab.2 Primer sequences for PCR amplification

Primer	Sequence(5'→3')	Note
P1	TGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGA	Used for site-directed mutagenesis
P2	CTCCATGCGACGTGCAGAGGTGGAGC	Used for site-directed mutagenesis
P3	TTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGAC	Used for site-directed mutagenesis
P4	GTAAGACCTTGGGCAAGACCTGGTGG	Used for site-directed mutagenesis
P5	CCGGTACCCGCATGGAGACCACCGTGAAC ( <i>Kpn</i> I)	Sense primer for PCR amplification of CP region
P6	GGAGATCTGCCCAAAGCCACCCAAGGCAC ( <i>Bgl</i> II)	Antisense primer for PCR amplification of CP region
P7	GGGCGGCCGCCGCATGGAGACCACCGTGAAC ( <i>Not</i> I)	Sense primer for PCR amplification of CP and Core region
P8	GGGAGCTCCTAACATTGAGATTC ( <i>Sac</i> I)	Antisense primer for PCR amplification of CP and Core region

**1.3.4 构建pTriEx-1.15倍HBV复制子** 提取4种不同变异形式的含有全长HBV DNA的质粒进行BspQ I / Sca I双酶切, 胶回收酶切产物, 获得3.2kb左右长度的DNA条带, 用T<sub>4</sub> DNA连接酶将其自连, 采用P7、P8引物(表2)进行PCR扩增目的片段, 扩增的CP+Core区目的片段经电泳鉴定后行T-A克隆测序, 提取含有目的片段的T-easy载体质粒。采用Not I / Sac I酶切构建好的4种变异形式的载体质粒及野生型pTriEx-1.15倍HBV表达载体, 行CP+Core区序列替换, 替换后的重组质粒进行克隆测序, 鉴定成功后提取转染级质粒备用。

**1.3.5 pTriEx-1.15倍HBV复制子体外实验** 将人肝癌细胞系(HepG2)培养于含10%胎牛血清的DMEM中(37℃、5%CO<sub>2</sub>)复苏传代2~3次, 转染前24h按1.0 × 10<sup>5</sup>个细胞/孔分到24孔板中, 在分板后16~18h、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1.15倍pTriEx-HBV DNA 1μg, 脂质体2.5μl, 设置未转染孔为阴性对照, 每个样本做3个复孔, 转染24h后收获细胞上清。采用ELISA方法检测HBsAg、HBeAg表达水平。采用实时荧光定量PCR法检测上清中HBV DNA载量。

**1.3.6 HBV CP区扩增及pGL<sub>3</sub>-CP荧光素酶表达载体的构建** 取含有G1613A、C1653T和G1613A+C1653T位点变异型及其野生型的HBV全长克隆质粒, 经BspQ I / Sca I双酶切, 获得胶回收3.2kb左右的DNA条带产物, 加T<sub>4</sub> DNA连接酶后自连。采用普通PCR扩增CP区, 引物为P5、P6, 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pGL<sub>3</sub>-Basic载体分别进行Kpn I / Bgl II双酶切, 胶回收后在T<sub>4</sub> DNA连接酶作用下将两者定向连接, 转化JM109感受态细菌后筛选菌落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。

**1.3.7 pGL<sub>3</sub>-CP表达载体瞬时转染及双荧光素酶报告基因检测** 提取pGL<sub>3</sub>-CP荧光素酶表达载体质粒, 转染方法同前, 以pGL-TK载体作为内参照进行共转染, 每孔0.05μg, 设置pGL<sub>3</sub>-Basic为阴性对照, pGL<sub>3</sub>-Control为阳性对照, 48h后裂解细胞, 按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, 并用内参照对其进行校正。

**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, 方差齐用方差分析, 方差不齐采用Kruskal-Wallis秩和检验。计数资料采用 $\chi^2$ 检验。多因素分析采用多重Logistic回归分析。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** 258例患者的临床资料显示, AHB、CHB和ACLF三组患者年龄、HBV DNA载量、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和总胆红素(TBIL)水平依次升高(P<0.01), 而HBeAg阳性率和凝血酶原活动度(PTA)则依次降低(P<0.01, 表1); 入选样本共检测到B、C、D三种基因型, 检出率分别为22.2%、76.2%和1.6%。其中, B基

因型在AHB患者常见，C基因型在CHB和ACLF患者中常见。对三组患者进行统计分析显示，G1613A、C1653T和G1613A+C1653T联合变异检出率在AHB、CHB和ACLF三组患者中呈上升趋势，分别为13.70%、31.80%和45.20% ( $P < 0.01$ )，2.30%、16.30%和27.40% ( $P < 0.01$ )，2.29%、12.07%和23.29% ( $P < 0.05$ )。

**2.2 定点突变实验结果** 以A1613+T1653典型的双联变异HBV全长克隆质粒为模板，将其定点突变恢复为相应野生型，测序结果显示A1613+T1653双联变异(T1)定点突变恢复为G1613+T1653单变异型

(T2)、A1613+C1653单变异型(T3)及G1613+C1653野生型(T4)。测序显示定点突变鉴定成功(图1)。

**2.3 pTriEx-1.15倍HBV复制子构建及体外评价**

**2.3.1 pTriEx-1.15倍HBV复制子构建结果** 4种不同变异形式HBV T-easy克隆质粒酶切后得到3kb左右的T-easy载体和1000bp左右的CP+Core区片段，将其替换至pTriEx-1.15倍HBV表达载体，酶切鉴定正确后送测序，结果证实定向替换的CP+Core区片段，除1613、1653位点外其他碱基未发生变异，pTriEx-1.15倍HBV表达载体构建成功(图2)。

**2.3.2 CP区不同变异形式的pTriEx-1.15倍HBV复**

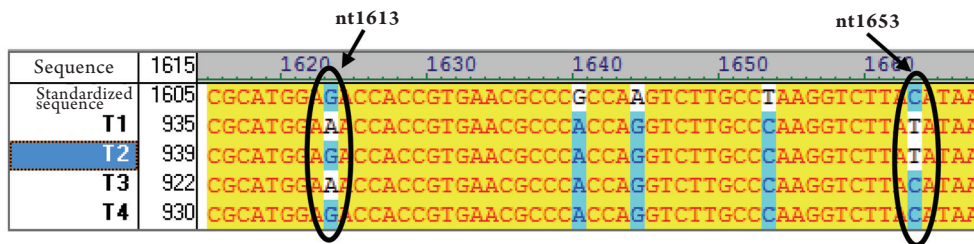


图1 定点突变测序结果

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

T1. A1613+T1653 double-mutations type; T2. G1613+T1653 single-mutation type; T3. A1613+C1653 single-mutation type; T4. G1613+C1653 wild type

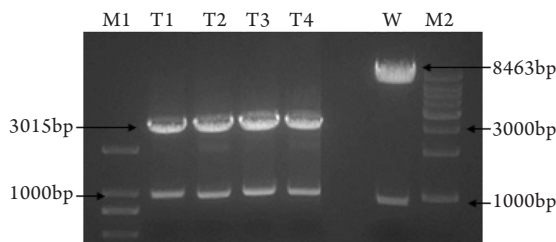


图2 pTriEx-1.15倍HBV质粒双酶切鉴定结果

Fig.2 Identification of pTriEx-1.15 HBV plasmid by *Not* I / *Sac* I digestion

M1. Marker 2000; M2. Marker 1kb ladder; T1. A1613+T1653 double-mutations type; T2. G1613+T1653 single-mutation type; T3. A1613+C1653 single-mutation type; T4. G1613+C1653 wild type; W. pTriEx-1.15 HBV vector

**制子体外评价** CP区不同变异形式及其对应野生型pTriEx-1.15倍HBV复制子转染HepG2细胞后，G1613A变异株与相应定点突变野生株相比复制力升高了6%，HBsAg降低了15%，HBeAg表达呈阴性；C1653T变异株与相应野生株相比复制力升高了10%，HBsAg升高了55%，HbeAg表达与野生株接近；G1613A+C1653T变异株与相应野生株相比复制力升高了7%，HBsAg升高了66%，HbeAg表达升高了227%(图3)。

**2.4 pGL<sub>3</sub>-CP荧光素酶基因表达载体的构建** 构建成功的pGL<sub>3</sub>-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pGL<sub>3</sub>-

Basic载体片段和296bp的CP插入片段(图4)。酶切鉴定正确后送测序，结果证实插入的CP区片段方向与载体核苷酸序列相同，除1613、1653位点外其他碱基未发生变异，表明双荧光素酶基因报告载体构建成功。

**2.5 CP启动子活性检测** 经双荧光素酶基因报告系统检测，A1613变异株的启动子活性与野生株相比降低了16.2%；T1653变异株的启动子活性与野生株相比升高了17.1%；而A1613+T1653双联变异株的启动子活性与野生株相比仅降低了1%，与野生型基本接近(图5)。表明A1613变异使启动子活性降低，T1653变动能升高启动子活性，顺式激活下游基因转录，而两者联合变异后其启动子活性可能产生协同作用，与野生株活性基本一致。

**3 讨 论**

ACLF是由多种因素引起，在慢性肝病的基础上出现的急性肝功能严重障碍或失代偿，出现凝血机制障碍、黄疸、腹水和肝性脑病等为主要表现的一组临床症候群<sup>[9]</sup>。ACLF的致病机制十分复杂，导致其病变进展的因素较多，病毒因素和机体免疫的相互作用可能是导致疾病重症化的主要原因。HBV病毒具有高度变异性，其中在CP区发生变异的概率较高，该区最为经典的组合为A1762T和G1764A双联变异，发生该变异后3'端茎环结构发生改变，

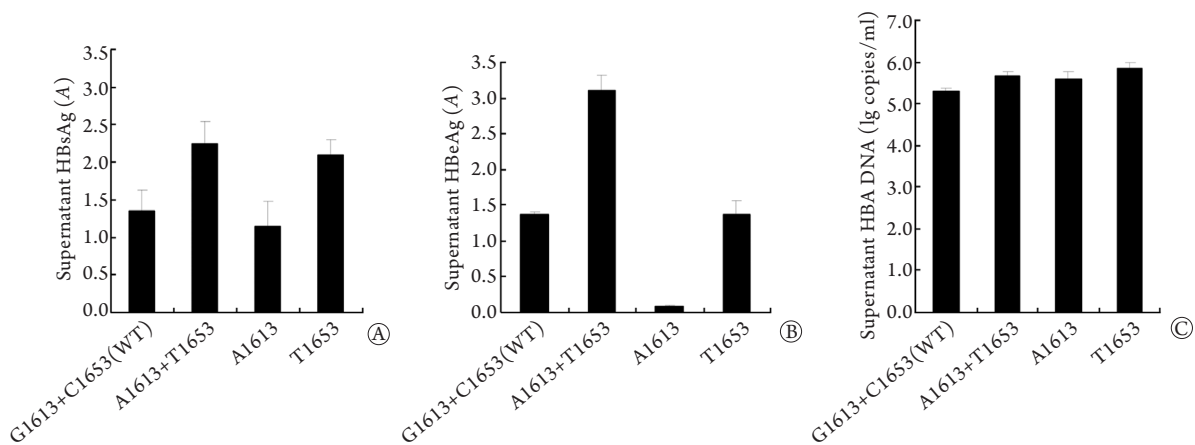


图3 CP区不同变异形式的pTriEx-1.15倍HBV复制子体外评价

Fig.3 Replicative capacity of pTriEx-1.15 HBV with different mutations in CP region

A. Supernatant HBsAg detected by ELISA; B. Supernatant HBeAg detected by ELISA; C. Supernatant HBV DNA detected by real-time PCR

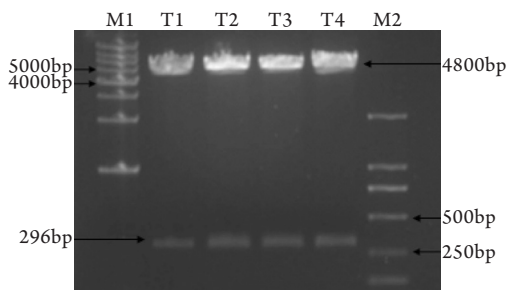


图4 pGL<sub>3</sub>-CP双酶切鉴定结果

Fig.4 Identification of pGL<sub>3</sub>-CP plasmid by *Kpn* I /*Bgl* II digestion

M1. Marker 1kb ladder; M2. Marker 2000; T1. A1613+T1653 double-mutations type; T2. G1613+T1653 single-mutation type; T3. A1613+C1653 single-mutation type; T4. G1613+C1653 wild type

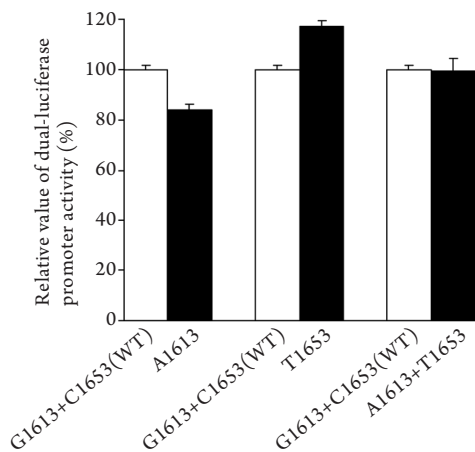


图5 双荧光素酶启动子活性检测

Fig.5 Double luciferase activity of core promoter

稳定性增强,可促进病毒的转录和复制<sup>[11]</sup>。该变异与CHB、LC、ACLF和HCC的发生密切相关,当A1762T、G1764A联合G1613A、C1653T变异时与终末期肝病的发生显著相关<sup>[12-13]</sup>。新近研究显示CP区T1753C、C1766T、T1768A及A1846T等位点在

ACLF患者中出现较多<sup>[14]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>认为A1846T变异是ACLF的独立危险因素,本课题组江玲等<sup>[16]</sup>对A1846T位点变异进行体外生物学功能分析,结果表明A1846T变异可显著增加HBV复制力、提高HBsAg表达水平和增强CP启动子活性,顺式激活下游基因转录表达。上述结果表明,以上CP区重要位点的变异或联合变异与慢性乙型肝炎重症化的发生、发展密切相关。

HBV核心启动子区(CP, nt1575-1849)由基本核心启动子区(BCP, nt1742-1849)和上游调控区(URR, nt1613-1742)组成。URR由负调控区(NRE, nt1613-1636)和核心上游调控序列(CURS, nt1637-1742)所组成。其中,CP区还与X区(nt1374-1838)和增强子II(EN II, nt1627-1774)部分重叠。CP区的主要功能为调节前核心蛋白、核心蛋白和病毒DNA聚合酶的表达,对病毒的复制过程也起关键的调控作用。以往大量文献报道在HCC患者中G1613A和C1653T变异发生率较高,该位点出现的变异可作为预测HCC发生的危险因素<sup>[17-20]</sup>。然而G1613A和C1653T变异在ACLF患者中的临床意义鲜有报道。本课题组针对G1613A和C1653T变异后病毒生物学功能的改变与ACLF疾病进展之间的关系,通过对258例HBV感染不同病程阶段的临床患者进行HBV基因测序,结果发现B、C、D三种基因型,其检出率分别为22.2%、76.2%和1.6%。测序结果提示B基因型在AHB患者中常见,C基因型在CHB和ACLF患者中常见。随着病情加重,G1613A、C1653T和G1613A+C1653T联合变异检出率显著递增,年龄、HBV DNA载量、ALT和TBIL水平依次升高( $P < 0.01$ ),而HBeAg阳性率和PTA则依次降低( $P < 0.01$ ),提示G1613A和C1653T变异可能与ACLF的发生密切相关。

本研究在统计学分析的基础上,对G1613A和C1653T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及单变异型副本对照,构建pTriEx-1.15倍HBV复制模型进行复制力评价,以相应野生株作为对照进行评价,结果表明G1613A位点变异可增加复制力(6%),降低HBsAg表达水平(15%)及核心启动子活性(16%),HBeAg表达呈阴性。对该变异位点进行分析,G1613A位于NRE区的N-末端、EN II和CURS区的上游,NRE区的主要功能是对CP区的EN II和CURS起抑制作用,有研究报道nt1613-nt1615对NRE区的抑制功能起主要作用<sup>[18]</sup>。本研究发现G1613A变异后可增加病毒复制力(6%)并显著抑制HBeAg的表达,与Li等<sup>[21]</sup>关于G1613A变异研究中的HBV复制力和HBeAg表达结果一致,但CP启动子活性结果与其不一致(本研究为降低16%)。有研究报道HBeAg表达降低或呈阴性会引起HBcAg特有的肝损伤及慢性感染期HBV复制力持续升高,可导致严重的肝脏疾病<sup>[22-24]</sup>。以相应野生株作为对照进行评价,结果显示C1653T位点变异可增加复制力(10%)、提高HBsAg(55%)表达水平及增强CP启动子活性(17%)。对该变异位点进行分析发现,C1653T位于CURS区,与X区的box  $\alpha$ (nt1646-1668)和EN II的位置重叠,有研究表明,C1653T发生变异可增加与肝细胞核内因子结合的亲和力,对EN II、BCP和CP启动子活性都有增强的作用,能顺式激活下游基因转录,进而提高病毒复制力、HBsAg表达水平及CP启动子活性,加速疾病重症化进展<sup>[25]</sup>。以相应野生株作为对照进行评价,结果显示G1613A+C1653T联合变异可增加复制力(7%)、提高HBsAg(66%)和HBeAg(227%)表达水平,而启动子活性与野生株基本一致;G1613A+C1653T联合变异位于CP区,其变异对HBV前基因组和Pre-C RNAs的转录有重要的影响,其体外功能实验结果表明联合变异可能产生协同和累积作用并增加HBV的致病性,成为加速疾病重症化进展的因素之一。

以上实验结果提示,核心启动子区G1613A和C1653T变异与ACLF的发生、发展密切相关。本研究进一步证实了HBV CP区变异与肝衰竭发生之间的关系,为肝衰竭的发病机制研究提供了科学依据。

#### 【参考文献】

- [1] Wang Y, Liu Y, Xu ZH, *et al.* Up-regulation effect of G1764A/C1766T/T1768A triple mutations on the transcriptional activation of HBV core promoter[J]. Med J Chin PLA, 2010, 35(8): 954-957.[王耀,刘妍,许智慧,等. G1764A/C1766T/T1768A三联突变对HBV核心启动子活性的上调作用研究[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(8): 954-957.]
- [2] Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B(2010 version)[J]. J Prac Hepatol, 2011, 14(2): 81-89.[中华医学会肝病学会和感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(2): 81-89.]
- [3] Tang SH, Huang QY, Zhou JM, *et al.* Risk factors of cholelithiasis in patients with hepatitis B virus-associated chronic liver diseases[J]. Med J Chin PLA, 2014, 39(6): 485-488.[汤绍辉,黄秋燕,周金梅,等. 乙型肝炎病毒相关慢性肝病合并胆囊肿结的危险因素分析[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(6): 485-488.]
- [4] Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 258-266.
- [5] Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, *et al.* Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(7): 427-434.
- [6] 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.]
- [7] Fu SJ, Gao GS, Hu AR, *et al.* Short-term prognostic value of serum procalcitonin and common inflammation markers combined with CTP score in patients with acute-on-chronic liver failure[J]. Chin J Pract Intern Med, 2015, 35(6): 519-521.[傅叁君,高国生,胡爱荣,等. 血清降钙素原和常用炎症指标联合CTP评分对慢加急性肝衰竭短期预后的预测价值[J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(6): 519-521.]
- [8] 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、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 342-345.]
- [9] Chinese Society of Infectious Diseases, Liver Failure and Artificial Liver Group; Severe Liver Disease and Artificial Liver Group. Guideline for diagnosis and treatment of liver failure[J]. Chin J Hepatol, 2013, 16(3): 210-216.[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[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(3): 210-216.]
- [10] 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]. J Virol, 1995, 69(9): 5437-5444.
- [11] 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.
- [12] Takahashi K, Akahane Y, Hino K, *et al.* Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates[J]. Arch Virol, 1998, 143(12): 2312-2326.
- [13] Park YM. Clinical utility of complex mutations in the core promoter and proximal precore regions of the hepatitis B virus genome[J]. World J Hepatol, 2015, 7(1): 113-120.
- [14] Quarleri J. Core promoter: A critical region where the hepatitis B virus makes decisions[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(2):

- 425-435.
- [15] Zhang A, Wan Z, You S, *et al.* Association of hepatitis B virus mutations of A1846T and C1913A/G with acute-on-chronic liver failure development from different underlying chronic liver diseases[J]. *Hepat Mon*, 2013, 13(9): e12445.
- [16] Jiang L, Xu ZH, Liu Y, *et al.* Up-regulation effect of hepatitis B virus genome A1846T mutation on viral replication and core promoter activity[J]. *Med J Chin PLA*, 2013, 38(1): 10-14. [江玲, 许智慧, 刘妍, 等. 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[J]. *解放军医学杂志*, 2013, 38(1): 10-14.]
- [17] Tatsukawa M, Takaki A, Shiraha H, *et al.* Hepatitis B virus core promoter mutations G1613A and C1653T are significantly associated with hepatocellular carcinoma in genotype C HBV-infected patients[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 458-467.
- [18] Park YM, Jang JW, Yoo SH, *et al.* Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma[J]. *J Viral Hepat*, 2014, 21(3): 171-177.
- [19] Jang JW, Chun JY, Park YM, *et al.* Mutational complex genotype of the hepatitis B virus X/precore regions as a novel predictive marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2): 296-304.
- [20] Xie Y, Liu S, Zhao Y, *et al.* X protein mutations in hepatitis B virus DNA predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(10): 10325-10331.
- [21] Li MS, Lau T, Chan PC, *et al.* The G1613A mutation in the HBV genome affects HBeAg expression and viral replication through altered core promoter activity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21856.
- [22] Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2003, 38(5): 1075-1086.
- [23] Chan HL, Tsang SW, Liew CT, *et al.* Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(2): 406-412.
- [24] Zacharakis G, Koskinas J, Kotsiou S, *et al.* The role of serial measurement of serum HBV DNA levels in patients with chronic HBeAg(-) hepatitis B infection: association with liver disease progression. A prospective cohort study[J]. *J Hepatol*, 2008, 49(6): 884-891.
- [25] Lyu H, Lee D, Chung YH, *et al.* Synergistic effects of A1896, T1653 and T1762/A1764 mutations in genotype C2 hepatitis B virus on development of hepatocellular carcinoma[J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(3): 219-224.

(收稿日期: 2015-11-16; 修回日期: 2016-01-25)

(责任编辑: 熊晓然)