

乙型肝炎病毒核心启动子缺失突变的初步观察

陈美娅¹, 周飞¹, 毛乾国², 卢雅丕¹, 陈建民¹, 王琳¹, 任建林, 董菁¹ (1. 厦门大学附属中山医院 消化内科, 厦门 361004; 2. 厦门市中医院, 厦门 361001)

摘要: 目的 研究乙型肝炎病毒 (HBV) e 抗原阴性患者 HBV 核心基区启动子变异方式。方法 自 5 例慢性 HBV 感染者血清中分别提取 HBV DNA, 应用多重 PCR 法鉴定其基型。PCR 扩增 X 基区序列, 克隆入 pMD19 T 载体, 共挑选 23 个克隆测序, 与已知 HBV 基区相应序列比较该患者体内 HBV 基区变异程度。结果 5 例患者中 3 例基型分别为 B、C 和 B/C 混合型, 2 例患者通过现行多引物方法无法分型。16 个 (16/23, 69.6%) 克隆在 X 基区下游出现大段缺失突变, 其中 15 例缺失长度为 234 bp, 1 例为 245 bp。缺失突变区域包括 C 基区启动子区, 并导致前-C 区起始密码子 ATG 编码缺失, 这种缺失突变在 5 例患者中均被检出。结论 CP/HBeAg 起始密码子缺失突变可能是 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎的一种变异模式。

关键词: 乙型肝炎病毒; X 基区; 缺失突变; C 启动子区

Primary study on core promoter deletion mutation in hepatitis B virus

CHEN Mei-ya¹, ZHOU Fei¹, MAO Qian-guo², LU Ya-pi¹, CHEN Jian-min¹, WANG Lin¹, REN Jian-lin¹, DONG Jing¹ (1. Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2. Xiamen Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen 361001, China)

Abstract: Objective To investigate a novel mutant which leads to HBeAg negative chronic HBV infection. **Methods** HBV DNA were extracted from 5 patients with chronic HBV infection. Multiple PCR was employed to identify the genotypes. Partial genome sequence, including X region and partial pre-C gene, was amplified by PCR from a patient with HBeAg negative/positive chronic hepatitis B and the PCR products were subcloned into pMD19 T vectors, respectively. Totally 23 clones were selected to be sequenced. Sequence comparison with HBV genome submitted in GenBank was made to find the mutation sites. **Results** The genotypes of 3 in 5 patients were B, C and the mixed type of B and C, respectively. The other patients could not be typed. Comparing with known HBV sequence, there is a long range deletion in X gene downstream in 16 clones (69.6%). Length of deletion is 234 bp (15 clones) and 245 bp (1 clone), which cover the core promoter and the ATG of pre-C gene. Deletion of core promoter were detected in all five patients. **Conclusions** The deletion mutant of core promoter and the ATG of pre-C gene is popular in patients with chronic hepatitis B.

Key words: Hepatitis B virus; X gene; Deletion mutation; Core promoter

乙型肝炎病毒 (HBV) 基因组含有 4 个开放读码框架 (ORF), 分别为 S、C、P 和 X 区, 除此之外还有多个基区表达调控序列, 其中包括 4 个启动

子 (SP1、SP2、XP 和 CP)。HBV 基因组的编码区与调控序列相互重叠, X 蛋白编码区涵盖了核心启动子 (CP) 区, 该段序列调控 HBeAg 的表达, CP 的下游延伸到前-C 区的起始密码子 ATG 下游。

目前认为, 10% ~ 30% 的慢性乙型肝炎 (CHB) 患者为 HBeAg 阴性, 表现为 ALT 反复波动或持续异常, 干扰素 α (IFN α) 治疗的疗效差; 病情呈持续发展, 易进展为肝硬化和或原发

项目资助: 厦门市首批重大疾病科研攻关项目 (WKZ0501); 厦门市卫生局医学科研立项项目 (WSK0506); 厦门大学引进人才科研启动基金 (Z03109); 福建省青年科技人才创新项目 (K70007); 福建省高校新世纪人才资助
通讯作者: 董菁 Email: dj@xmzsh.com

性肝癌^[1]。初步研究表明,3种病毒学变异机制导致HBeAg不能表达:①前-C区G1896A突变直接导致该密码子由TGG变化为TAG,使得前-C区在第28位氨基酸残基处发生终止突变,HBeAg表达阴性;②C区启动子区(CP区)替换变异,最常见的变异是CP区内A1762T和G1764A的单双替换突变,该变异可作为独立因素导致HBeAg表达阴性;③前-C区内部发生的其他点替换突变、C区内部缺失突变(CID)、插入突变等均可导致HBeAg表达阴性。

笔者观察到1例患者自行发生HBeAg/抗-HBe血清学转换,其X基/CP区出现缺失突变,缺失突变跨度达234 bp。为排除当时试验研究的偶然性,本研究挑选2例HBeAg阳性和2例HBeAg阴性HBV长期感染患者,以及1例HBsAg、HBeAg阴性但抗-HBe、抗-HBc阳性患者,着重研究X基/CP区变异情况,探讨导致HBeAg阴性的CHB可能存在的机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 5例患者诊断均符合2000年西安会议《病毒性肝炎防治方案》(试行)标准,具体临床资料见表1,分别采集5例患者静脉血,蛋白酶K消化-饱和酚:氯仿(1:1)抽提法提取200 μl血清中的HBV DNA,-20℃保存备用。

1.2 HBV基型分析 参考Naito等^[2]设立的6种主要基型分型方法,引物设计,PCR参数见以往文献^[3]。巢式PCR产物经过3%琼脂糖凝胶电泳后判断HBV基型。

1.3 多聚酶链反应(PCR)扩增的片段 参考以往克隆的中国大陆地区HBV基型相关区域序列设计引物^[4],上游引物为:5'-CAAGTGTGGCTGACGCAACC-3',下游引物为:5'-ACAGCTTGGCGGCTTGAACAG-3',扩增的片段长度约702 bp,靶区域为前-X基上游至前-C区上游。PCR参数如下:94℃预变性1分钟,(94℃40秒,58℃40秒,72℃80秒),共35个循环,72℃再延长10分钟。

1.4 克隆的片段 将方法3中获得的PCR产物在0.9%琼脂糖凝胶中电泳,切取的片段,玻璃

奶法回收PCR产物,与pMD19 T载体(TaKaRa公司)连接过夜。将重组质粒转入TOP 10菌株,氨苄青霉素和X-gal蓝白斑法筛选阳性菌落。提取质粒,限制性核酸内切酶酶切鉴定。

1.5 DNA测序 各患者HBV DNA PCR产物克隆分别选择3个以上克隆,共选择23个克隆测序,由上海英骏生物公司完成。测序结果与美国国立卫生院GenBank中登录号分别为:AF458665(C型,上海)、AY707087(B型,厦门)、AB010290(Bj,日本)、AF363961(C型,北京)和EF134945(B型,厦门)的HBV全基型序列比对。

2 结果

2.1 HBV基型判别 通过多引物PCR进行扩增,3%琼脂糖凝胶电泳后提示B、C以及B/C混合型各1例,有2例不能用该方法进行基型分型。

2.2 测序结果比较 经过比较,以Eco R I位点为起始计数,本研究观察到23个克隆有16种变异方式,其中7株表现为X基点替换突变,另16株缺失均位于1601~1834位点,涵盖了CP的1643~1849 bp的绝大部分。在X基下游出现大段缺失突变,其中15株表现为234 nt缺失突变,涵盖CP区及前-C区起始密码子ATG,1株表现为245 nt缺失突变,导致HBx不能表达,发生234 nt缺失突变的病毒株HBx氨基酸长度仅为76 aa(图1)。

3 讨论

1989年,Carmen等^[5]提出G1896A位点替换突变导致HBeAg不能表达,伴或不伴有C1858T突变都可能是HBeAg阴性的原因。之后的研究认为,CP区下游的基础核心启动子区(BCP)内部变异,如A1762T或G1764A单/双替换变异可导致HBeAg阴性CHB。目前认为前-C区和/或BCP点替换突变是HBeAg阴性CHB的主要原因。

本研究所中有5例患者均可检测出X基下游/CP区缺失突变病毒株,其中1例HBeAg阳性和1例HBeAg阴性CHB患者,以及抗-HBe、抗-HBc阳性患者所有检测病毒株(共14株)均表现为X基下游/CP区缺失突变,缺失突变位置与笔者早先的报道相同;另1例HBeAg阳性和1例HBeAg阴性CHB患者血清内各有1株表现为X基下游/CP区

表 1 5例患者的临床资料

患者编号	259	278	284	395	441
年龄(岁)	37	19	45	40	22
发现感染年限	11	1	13	1	7年
家族史	无	无	无	无	父兄
临床诊断	肝炎肝硬化	CHB	混合肝硬化	CHB	CHB
HBsAg	+	+	-	+	+
HBeAg	-	+	-	+	-
抗-HBe	+		+	-	+
抗-HBc	+	+	+	+	+

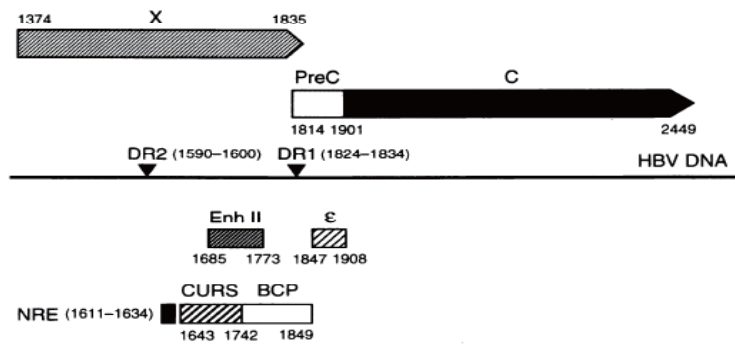


图 1 缺失突变示意图

注: 缺失突变区域1601~1834 nt; 缺失突变造成核心蛋白启动子(CURS和大部分BCP)、增强子II(Enh II)和负性调节因子(NRE)缺失; CURS: 上游调节区域; BCP: 基础核心启动子

缺失突变, 这组中的 HBeAg 阴性肝炎肝硬化患者 7株X基序测序中有1株表现为X基序下游/CP区234 bp缺失突变, 另1位 HBeAg 阳性CHB患者3株克隆有1株被检出发生X基序下游/CP区缺失突变, 除了上述位置相同的234 bp缺失突变以外, 还在缺失突变上游有11 bp的小的缺失突变。笔者观察到的X基序下游/CP区 234 bp的缺失突变, 突变位置涵盖了整个CP区, 同时也包括增强子II和DR I区, 这种缺失突变导致CP功能缺失, 不仅仅导致前-C/C基序 mRNA 转录障碍, 而且可导致前基序组 RNA 的转录异常。此外, 笔者测序的这16个缺失突变克隆还表现为前-C基序的起始密码子ATG丢失。

由于HBV在患者体内以准种形式存在, 研究中每个患者均选择3个以上的克隆进行测序。结果提示, 1例(395号) HBeAg 阳性CHB患者所有送检的7株克隆均表现为X基序下游/CP区大段缺失突

变, 而另1例(259号) HBeAg 阴性肝硬化患者送检的6株克隆仅1株被检出X基序下游/CP区大段缺失突变。分析原因在于: 血清中HBV病毒以准种形式存在, 所送检的病毒株不能穷尽病毒的变异形式; 另一种解释是血清中 HBeAg 阳性与否与肝细胞内病毒编码形式有关, 不能简单以血清中变异形式等同于肝细胞内 HBV主流编码形式。

将获得的序列与GenBank中已储存的序列进行数据库比对, 除笔者早期研究序列外, 没有发现类似的缺失突变的报道。1997年, Moriyama^[6]报道了X基序/CP区8 bp和20 bp缺失突变, 笔者早期的研究也证实这两种突变可能影响 HBeAg 的表达^[7], Zhu等^[8]也发现有短的缺失突变(19 bp)存在于X基序下游, 但目前没有发现笔者报道的X基序下游/CP区/前-C起始密码子大段缺失突变。笔者暂时将这种突变形式命名为核心启动子缺失突变(CPD), 这种

涉及了CP和前-C基■起始密码子的缺失突变可能是导致患者 HBeAg 阴转的一种新的病毒学原■。

总之,笔者在5例CHB患者血清发现X基■下游/CP区缺失突变,缺失跨度234 bp, HBeAg起始密码子ATG缺失,本研究提出了一种新的导致HBeAg阴性CHB的分子机制。该突变同时导致了X基■下游部分序列的缺失,从而编码一种截短型的 HBxAg。由于笔者选择的病例均来自厦门及其周边地区,CPD是否具有广泛的流行病学意义,在其他地区是否有类似变异情况? CPD是否可以导致 HBeAg 不能表达? CPD导致的截短型 HBxAg 是否具有生物学功能,这些问题仍需继续研究。

参考文献

- [1] 侯金林. 正确认识乙型肝炎e抗原阴性慢性乙型肝炎[J]. 中华肝脏病杂志,2007,15:132-134.
- [2] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers [J]. J Clin Microbiol,2001,39:362-364.
- [3] 董菁, 任建林, 王琳, 等. 厦门市乙型肝炎患者病毒基■型的分析[J]. 世界华人消化杂志,2007,15:1376-1381.
- [4] 董菁, 李迷, 施双双, 等. 乙型肝炎病毒基■重组种与变异特点的研究[J]. 解放军医学杂志,2002,27:116-118.
- [5] Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection [J]. Lancet,1989,2:588-591.
- [6] Moriyama K. Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter [J]. J Gen Virol,1997,78:1479-1486.
- [7] 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 等. 乙型肝炎病毒核心基■启动子序列突变及重组[J]. 世界华人消化杂志,2001,9:1323-1325.
- [8] Zhu PA, Tan DM, Peng ZT, et al. Polymorphism analyses of hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma patients from southern China [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2007,39:265-272.

收稿日期: 2007-07-20

• 国际快讯 •

肝硬化住院患者的营养习惯评价

研究人员在《营养学》杂志上称,肝硬化住院患者营养不良的发病率高。在该研究中,法■研究人员评价了396例肝硬化住院患者的营养习惯和营养不良状况。

研究小组测量患者入院时的三头肌皮褶厚度和上臂肌肉周径,还评价了患者入院时与住院过程中的自主饮食摄入量。研究人员发现,腹水与营养状态受损有关。他们证实,分别有49%和30%的无腹水患者的上臂肌肉周径和三头肌皮褶厚度低于对照人群的第5百分位数。49%和41%的轻度腹水患者、66%和48%的张力性腹水患者的上臂肌肉周径和三头肌皮褶厚度降低。研究小组发现,饮食摄入量的降低与肝功能衰竭的加重平行。Child-Pugh A级患者中,48%患者的热量摄取低于125 604 J/kg体重、34%患者的蛋白质摄取低于1g/kg体重。Child-Pugh B级患者分别为52%和36%、Child-Pugh C级患者分别为80%和63%。研究小组证实,住院期间的病死率为15%。他们发现,Child-Pugh评分、年龄、重度脓毒症、住院时热量摄取降低均与病死率独立相关。而且,24例患者虽然经■补充,但热量摄取仍偏低(<104 670 J/kg),需要进行肠道营养。其中4例患者在入院前就开始肠道营养,20例患者在平均住院12.4天时开始肠道营养。研究小组发现,接受肠道营养患者的年龄较大、Child-Pugh评分较高。他们的病死率也高于其他患者。

Bernard Campillo博士认为,肝硬化住院患者营养不良的发生率高,多数患者未达到其营养要求;热量摄取降低是短期死亡的独立危险因素;经■补充失败后的肠道营养没有任何临床效果;应在病程早期应用管饲。