

# 慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区及 BCP 区变异与血清细胞因子的关系

蒋孝华, 李小芬

(南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的** 探讨乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性和阳性慢性乙型肝炎(CHB)患者乙型肝炎病毒(HBV)前 C 区、基本核心启动子(BCP)区变异特点以及与血清细胞因子干扰素(IFN)- $\gamma$ 、白细胞介素(IL)-10 水平的关系。**方法** 将 120 例 HBV DNA 阳性 CHB 患者(HBeAg 阴性和阳性各 60 例)与 60 例健康体检者(对照组)纳入研究。荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测 HBeAg 阴性和阳性组患者 HBV DNA 水平,直接测序法检测两组前 C 区 G1896A 变异及 BCP 区 A1762T 和 G1764A 变异,双抗夹心酶联免疫吸附试验检测血清细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-10 的水平。**结果** 120 例 HBV DNA 阳性 CHB 患者 HBV 前 C 区和 BCP 区变异总检出率为 60.00% (72/120),其中 HBeAg 阴性组变异检出率为 80.00% (48/60),HBeAg 阳性组变异检出率为 40.00% (24/60),两组比较,差异有显著性( $\chi^2 = 20.00, P = 0.000$ )。HBeAg 阴性组 G1896A 变异(38.33%)和联合变异(G1896A、A1762T 和 G1764A 同时变异, 25.00%)的检出率明显高于 HBeAg 阳性组(16.67%、0.00%)(分别  $\chi^2 = 7.06, P = 0.008$ ;  $\chi^2 = 17.14, P = 0.000$ )。变异组血清 IFN- $\gamma$  水平为(102.33  $\pm$  27.20)pg/mL,明显高于无变异组(79.18  $\pm$  16.43)pg/mL 及对照组(35.77  $\pm$  4.23)pg/mL(分别  $t = 5.72, t = 19.33$ , 均  $P = 0.000$ );变异组血清 IL-10 水平为(28.13  $\pm$  7.00)pg/mL,明显高于无变异组(13.91  $\pm$  5.42)pg/mL 及对照组(13.68  $\pm$  2.27)pg/mL(分别  $t = 12.50, t = 15.65$ , 均  $P = 0.000$ )。**结论** G1896A 变异和联合变异更常见于 HBeAg 阴性 CHB;G1896A 和 A1762T/G1764A 变异与血清细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-10 水平升高有关。

**[关键词]** 肝炎,乙型,慢性;肝炎病毒,乙型;前核心区;基本核心启动子;基因变异;干扰素- $\gamma$ ;白细胞介素-10

**[中图分类号]** R512.6<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)05-0320-04

## The relationship between HBV precore and basal core promoter mutations and serum cytokines in patients with chronic hepatitis B

JIANG Xiao-hua, LI Xiao-fen (The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the characteristics of hepatitis B virus (HBV) precore G1896A mutation and basal core promoter (BCP) A1762T and G1764A mutations among HBeAg-negative and HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) patients, and to explore the relationship between the above mutations and the serum levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-10 (IL-10) in these patients. **Methods** 120 patients with HBV DNA positive CHB including 60 HBeAg-negative CHB (group A) and 60 HBeAg-positive CHB (group B), and 60 healthy persons were enrolled in this study. The serum HBV DNA of group A and B were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The HBV precore G1896A mutation and BCP A1762T and G1764A mutation in group A and B were detected by PCR and direct sequencing. The levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 in serum were measured by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The total incidence of precore and BCP mutations was 60.00% (72/120) in 120 patients, the incidence of precore and BCP mutation in group A and B was 80.00% (48/60) and 40.00% (24/60) respectively ( $\chi^2 = 20.00, P = 0.000$ ). The incidence of precore G1896A mutation (38.33%) and the united mutation (G1896A and A1762T and G1764A mutation, 25.00%) in group A were significantly higher than those in group B (16.67%, 0.00%) ( $\chi^2 = 7.06, P = 0.008$ ;  $\chi^2 = 17.14, P = 0.000$ ). The serum level of IFN- $\gamma$  in the mutation group were (102.33  $\pm$  27.20)pg/mL,

[收稿日期] 2010-06-24

[作者简介] 蒋孝华(1965-),女(汉族),湖南省衡阳市人,副教授,主要从事病毒性肝炎的基础和临床研究。

[通讯作者] 蒋孝华 E-mail: snakewin65@yahoo.com.cn

which were significantly higher than ( $79.18 \pm 16.43$ ) pg/mL in the non-mutation group ( $t=5.72, P=0.000$ ) and ( $35.77 \pm 4.23$ ) pg/mL in the healthy control group ( $t=19.33, P=0.000$ ). The serum level of IL-10 in the mutation group were ( $28.13 \pm 7.00$ ) pg/mL, which were also significantly higher than ( $13.91 \pm 5.42$ ) pg/mL in the non-mutation group ( $t=12.50, P=0.000$ ) and ( $13.68 \pm 2.27$ ) pg/mL in the healthy control group ( $t=15.65, P=0.000$ ). **Conclusion** The G1896A mutation and the united mutation commonly occur in the HBeAg negative CHB patients. The mutations of G1896A and A1762T/G1764A may be related to the serum increased levels of IFN- $\gamma$  and IL-10.

[**Key words**] hepatitis B, chronic; hepatitis B virus; precore; basal core promoter; gene mutation; interferon- $\gamma$ ; interleukin-10

[Chin Infect Control, 2010, 9(5): 320-323]

由于乙型肝炎病毒 (HBV) 复制过程中 HBV DNA 聚合酶缺乏校正功能, 免疫压力及抗病毒治疗等导致 HBV 容易发生变异。HBV 变异株感染性、致病性以及与人免疫应答间的相互关系等尚未完全阐明。因此, 加强对 HBV 变异的研究具有重要的生物学意义和临床价值。本研究采用直接测序法检测慢性乙型肝炎 (CHB) 患者 HBV 前 C 区 1896 位核苷酸和基本核心启动子 (basal core promoter, BCP) 区 1762 位和 1764 位核苷酸变异, 同时检测其外周血干扰素 (IFN)- $\gamma$ 、白细胞介素 (IL)-10 的水平, 旨在探讨 CHB 患者 HBV 前 C 区和 BCP 区变异与宿主细胞因子之间的关系。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 以 2008 年 3 月—2009 年 12 月我院门诊和住院的 HBV DNA 阳性的 120 例 CHB 患者为研究对象, 其诊断均符合 2000 年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准<sup>[1]</sup>, 排除甲型肝炎病毒 (HAV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒 (HDV)、戊型肝炎病毒 (HEV) 或其他原因引起的肝损害, 未服用抗病毒药物, 未经免疫抑制剂治疗。另收集 60 例健康体检者为对照组。180 例研究对象中, 男性 117 例, 女性 63 例; 年龄 15~69 岁, 平均 ( $39.64 \pm 13.40$ ) 岁。乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 阴性的 CHB 患者 60 例, 其中轻度 19 例, 中度 29 例, 重度 12 例; HBeAg 阳性的 CHB 患者 60 例, 轻度 22 例, 中度 28 例, 重度 10 例。纳入研究收集的所有血清标本于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 HBV 前 C 区及 BCP 区变异检测** 采用聚合酶链反应 (PCR) 法扩增 HBV 前 C 区及 BCP 区基因片段, PCR 反应引物: P1 为  $5' - \text{TGTCAACGACCGACCTTGA} - 3'$ , P2 为  $5' - \text{ATGTTCCGAGACTCTAAG} - 3'$ , 由上海生物工程公司合成, 产

物 320 bp。纯化 PCR 产物后直接测序, 测序由上海申友生物公司完成。

**1.2.2 血清 IL-10 及 IFN- $\gamma$  检测** 采用双抗夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法, 试剂盒购自 R&D 公司, 严格按说明书操作。

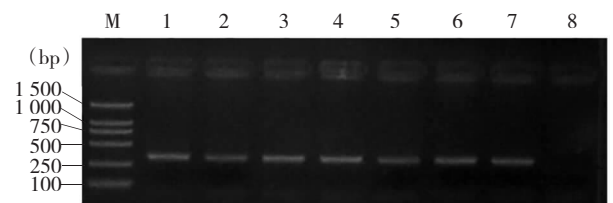
**1.2.3 血清 HBV 标志物检测** 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、抗 HBc 检测应用 ELISA 法, 按试剂盒说明书操作。

**1.2.4 HBV DNA 定量检测** 应用荧光定量 PCR 法, 试剂盒由上海申友生物公司提供, 按说明书操作。

**1.3 统计学处理** 数据采用 SPSS13.0 统计软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数的比较采用独立样本  $t$  检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 PCR 法扩增 HBV 目的基因片段** HBV 前 C 区及 BCP 区 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后在大约 320 bp 处可见一条带, 与预期目的片段长度相吻合, 见图 1。

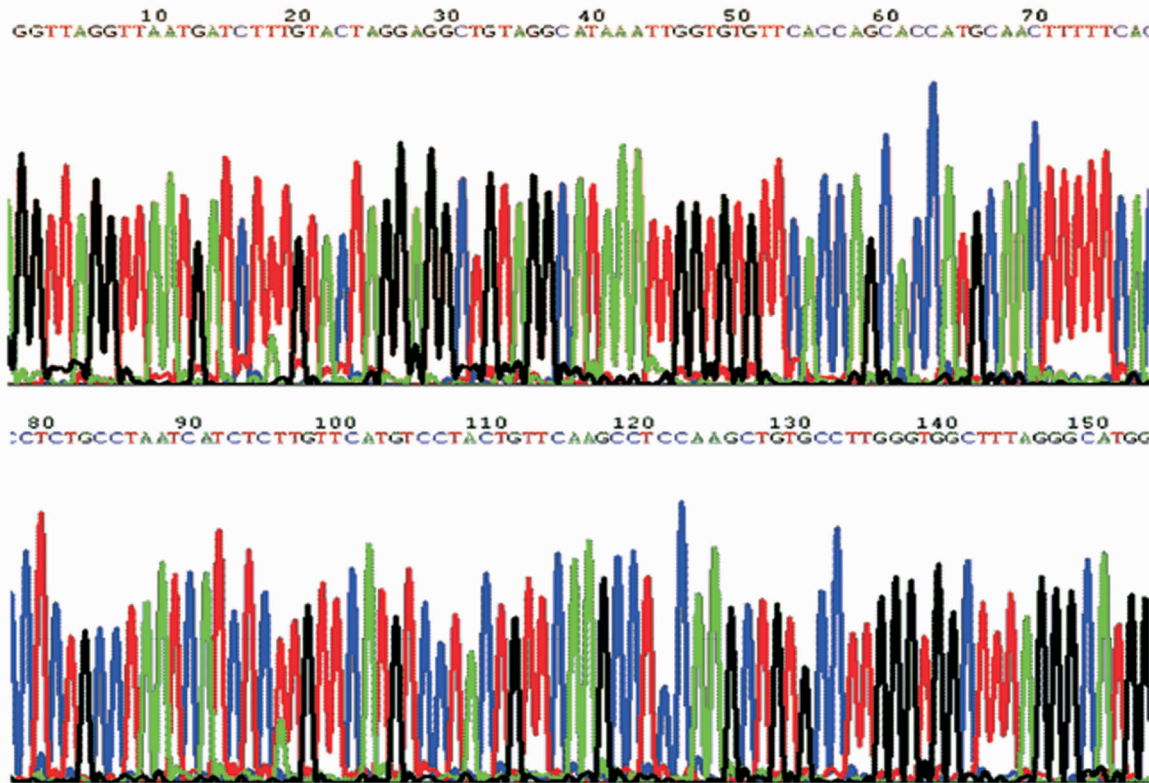


M: 100 bp DNA Marker; 1—7: 血清标本的 PCR 产物; 8: 阴性对照

图 1 HBV 前 C 区及 BCP 区 PCR 产物电泳图

**Figure 1** The electrophoresis result of PCR from HBV precore and BCP gene

**2.2 HBV 前 C 区及 BCP 区序列测定结果** 目的基因测序结果见图 2。



第 12 位碱基相当于 nt 1762 由 A 突变为 T, 第 14 位碱基相当于 nt 1764 由 G 突变为 A, 第 146 位碱基相当于 nt 1896 由 G 突变为 A

图 2 1 例 HBeAg 阴性 CHB 患者 HBV 前 C 和 BCP 区序列测定结果

Figure 2 Sequencing result of HBV precore and BCP region in a HBeAg-negative CHB patient

2.3 HBV 前 C 区和 BCP 区变异检出率 120 例 HBV DNA 阳性 CHB 患者 HBV 前 C 区和 BCP 区变异总检出率为 60.00%, 其中 HBeAg 阴性组变异检出率为 80.00%, HBeAg 阳性组为 40.00%, 两组比较, 差异有显著性 ( $\chi^2 = 20.00, P = 0.000$ )。HBeAg 阴性组 G1896A 变异和联合变异 (G1896A、A1762T 和 G1764A 同时变异) 的检出率明显高于 HBeAg 阳性组 (分别  $\chi^2 = 7.06, P = 0.008; \chi^2 = 17.14, P = 0.000$ )。详见表 1。

表 1 HBeAg 状态与 HBV 前 C 区和 BCP 区基因变异模式的关系 (例, %)

Table 1 Relationship between HBeAg state and mutation patterns in HBV precore and BCP region (case, %)

组别	例数	G1896A	A1762T/G1764A 双变异	联合变异
HBeAg 阴性	60	23(38.33)	10(16.67)	15(25.00)
HBeAg 阳性	60	10(16.67)	14(23.33)	0(0.00)
$\chi^2$		7.06	0.83	17.14
P		0.008	0.361	0.000

2.4 HBV 前 C 区和 BCP 区变异与血清 IFN- $\gamma$  及 IL-10 水平的关系 HBV 前 C 区和 BCP 区变异组血

清 IFN- $\gamma$  和 IL-10 水平明显高于无变异组及对照组 (均  $P < 0.001$ ), 见表 2。

表 2 HBV 前 C 区和 BCP 区变异与血清 IFN- $\gamma$  及 IL-10 水平的关系 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

Table 2 Relationship between HBV precore and BCP mutation and serum levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	例数	IFN- $\gamma$	IL-10
变异组	72	102.33 $\pm$ 27.20 <sup>ab</sup>	28.13 $\pm$ 7.00 <sup>ab</sup>
无变异组	48	79.18 $\pm$ 16.43 <sup>b</sup>	13.91 $\pm$ 5.42
对照组	60	35.77 $\pm$ 4.23	13.68 $\pm$ 2.27
F		198.66	149.64
P		0.000	0.000

a: 与无变异组比较, t 值分别为 5.72、12.50, P 值均为 0.000; b: 与对照组比较, t 值分别为 19.33、15.65、19.18, P 值均为 0.000

### 3 讨论

HBV 前 C 区 G1896A 和 BCP 区 A1762T/G1764A 变异发生率各地报道不一。欧美前 C 区 G1896A 变异占慢性 HBV 感染的 12% ~ 27%; 而在亚洲国家前 C 区 G1896A 变异占慢性 HBV 感染的 47% ~ 60%<sup>[2]</sup>。本研究资料显示, 120 例 CHB 患者

中 G1896A 变异和 A1762T/G1764A 变异及联合变异的总检出率为 60%。各地变异检出率的差异,除标本选择及方法学不同外,与各地 HBV 流行株的基因型不同亦有关<sup>[3-5]</sup>。本资料显示,HBsAg 阴性组 G1896A 变异及联合变异的检出率明显高于 HBsAg 阳性组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),提示此 2 种变异更常见于 HBsAg 阴性 CHB。前 C 区野生株 1896 位是鸟嘌呤(G),变异株为腺嘌呤(A),致使 A83 氨基酸(TGC)变异为终止密码(TAG),使前 C 蛋白的翻译终止,导致 HBsAg 不能合成。而 A1762T/G1764A 变异降低了前 C 的 mRNA 转录,HBsAg 表达量减少,但并未完全抑制其合成。前 C 区 G1896A 和 BCP 区 A1762T/G1764A 变异同存,由于 2 种变异的协同作用,血清 HBsAg 滴度更低<sup>[6]</sup>,更易发生于 HBsAg 阴性 CHB。

资料显示,120 例 CHB 患者中变异组血清 IFN- $\gamma$ 、IL-10 水平均明显高于无变异组及对照组( $P < 0.001$ ),提示 HBV 前 C 区、BCP 区变异可能通过细胞因子介导导致机体免疫异常。HBV 本身并不直接损伤肝细胞,病毒所激发的免疫应答和免疫病理反应才是乙型肝炎发病的关键。HBsAg 是重要的调节免疫的功能蛋白。胞浆 HBsAg 在免疫反应期是激活 T 细胞的靶抗原;血清中的 HBsAg 又诱导 T 细胞对感染的免疫耐受性。HBsAg 有使 T 细胞激活或耐受的双重效应,提示在 HBV 感染过程中与宿主相互作用的复杂性。前 C 区变异使 HBsAg 消失;BCP 变异使 HBsAg 表达降低,因免疫耐受性降低,逐渐激活免疫系统。本研究资料显示,前 C 区、BCP 区变异时血清 IFN- $\gamma$  和 IL-10 水平均增高,提示前 C 区和 BCP 区变异改变了宿主的免疫应答。IFN- $\gamma$  属 Th1 型细胞因子,可以抑制 HBV 复制,与抗 HBV 感染和增强肝炎活动性有关;而 IL-10 属于 Th2 型细胞因子,不仅能抑制多种炎性因子的产生,还具有抑制免疫应答,特别是抑制 Th1 应答及拮抗 IFN- $\gamma$  等

抗病毒细胞因子的作用,与 HBV 感染的慢性化有关。本组资料血清 IL-10 合成的增加限制了 IFN- $\gamma$  清除 HBV 的作用,因而可引起 HBV 持续感染或肝炎病变加重,其结果可能取决于 Th1 型细胞因子和 Th2 型细胞因子何者占优势。Falasca 等<sup>[7]</sup>也认为 CHB 患者 Th 细胞因子类型与肝损伤程度相关。综上所述,HBV 前 C 和 BCP 变异可能通过细胞因子介导改变机体免疫应答,从而影响疾病过程,加强对 HBV 变异与机体免疫状况关系的研究具有重要的临床意义。

#### [参考文献]

- [1] 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):324-329.
- [2] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:79.
- [3] Liu Y, Zhong Y, Zou Z, *et al.* Features and clinical implications of hepatitis B virus genotypes and mutations in basal core promoter/precore region in 507 Chinese patients with acute and chronic hepatitis B[J]. J Clin Virol, 2010, 47(3):243-247.
- [4] Sharma S, Sharma B, Singla B, *et al.* Clinical significance of genotypes and precore/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in North India[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(3):794-802.
- [5] Du H, Li T, Zhang H Y, *et al.* Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection[J]. Liver Int, 2007, 27(2):240-246.
- [6] Qin Y, Zhang J, Mao R, *et al.* Prevalence of basal core promoter and precore mutations in Chinese chronic hepatitis B patients and correlation with serum HBsAg titers[J]. J Med Virol, 2009, 81(5):807-814.
- [7] Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, *et al.* Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C[J]. Ann Clin Lab Sci, 2006, 36(2):144-150.

欢迎登录《中国感染控制杂志》网站 <http://www.zggrkz.com>

《中国感染控制杂志》网站 <http://www.zggrkz.com> 于 2010 年 7 月正式开通,同时启用稿件远程处理系统(远程投稿请点击左上角“作者在线投稿”并注册,注册成功后进行投稿、查询)。欢迎广大医务工作者登录和赐稿。