

乙型肝炎病毒 1653T 变异与肝癌相关性研究

刘悦晖¹, 丁静娟²

(1 邵阳市中心医院, 湖南 邵阳 422000; 2 贵阳医学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 研究乙型肝炎病毒(HBV)1653T 变异与肝癌的相关性。**方法** 收集 HBV 感染者血清 119 份(HBV DNA 均阳性, 其中 HBV 携带 24 份, 慢性乙型肝炎 35 份, 乙型肝炎肝硬化 29 份, 原发性肝癌 31 份), 采用半巢式聚合酶链反应扩增 HBV 前 C 及 C 基因部分片段, 产物纯化后直接测序, 检测 1653T 变异; 用 S 基因 PCR-RFLP 方法确定 HBV 基因型。**结果** 24 份 HBV 携带者标本未检出 1653T 变异; 35 份慢性乙型肝炎患者标本中检出 1 份(2.86%)1653T 变异; 29 份乙型肝炎肝硬化患者标本中检出 5 份(17.24%)1653T 变异, 与慢性乙型肝炎患者比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 2.36, P > 0.05$); 31 份原发性肝癌患者标本中检出 14 份(45.16%)1653T 变异, 与乙型肝炎肝硬化患者比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.40, P < 0.05$)。119 份血清标本中有 10 份未能成功定型; 余 51 份 B 基因型标本中检出 2 份 1653T 变异, 58 份 C 基因型标本中检出 18 份 1653T 变异, 两者比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 11.57, P < 0.01$)。**结论** HBV 1653T 变异与原发性肝癌关系密切, 更易发生在 C 基因型; 可作为预测原发性肝癌的指标。

[关键词] 肝炎病毒, 乙型; 肝炎, 乙型; 肝肿瘤; 原发性肝癌; 1653T 变异; 基因型

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)04-0260-03

The relationship between hepatitis B virus mutation at nucleotides 1653T and liver cancer

LIU Yue-hui¹, DING Jing-juan² (1 Shaoyang Central Hospital, Shaoyang 422000, China; 2 Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between hepatitis B virus (HBV) mutation at nucleotides 1653T and liver cancer. **Methods** One hundred and nineteen serum samples of HBV-infected patients were collected (All were positive HBV DNA), 24, 35, 29, and 31 samples were from asymptomatic carriers (ASC), patients with chronic hepatitis B (CHB), liver cirrhosis (LC), and hepatocellular carcinoma (HCC), respectively. Partial fragments of HBV pre C and C gene were amplified by semi-nested polymerase chain reaction. The PCR products were subjected to direct sequencing and the mutation at 1653T was determined by sequence analysis. HBV genotypes were detected by restriction fragment length polymorphism based on S gene PCR products. **Results** All samples from 24 ASC were not found mutation at nucleotides 1653T; 1(2.86%) sample from 35 CHB and 5(17.24%) from 29 LC were found mutation at 1653T; The detection rate of 1653T mutation was not significantly different between CHB and LC ($\chi^2 = 2.36, P > 0.05$); 14(45.16%) samples were found mutation at 1653T in HCC, the mutation at 1653T in HCC was significantly higher than that of LC ($\chi^2 = 5.40, P < 0.05$). Of 119 serum samples of HBV, 2 of 51 genotype B and 18 of 58 genotype C were detected mutation at nucleotides 1653T, the other 10 samples couldn't be determined genotype. The difference in mutation at 1653T between genotype C and B was significant ($\chi^2 = 11.57, P < 0.01$). **Conclusion** HBV 1653T mutation is correlated with HCC, and is more prone to occur in genotype C infection; 1653T mutation can be as predictive risk factors for hepatocarcinogenesis.

[Key words] hepatitis B virus; hepatitis B; liver tumor; hepatocellular carcinoma; 1653T mutation; genotype

[Chin Infect Control, 2011, 10(4): 260-262]

[收稿日期] 2010-03-28

[作者简介] 刘悦晖(1975-), 男(苗族), 湖南省邵阳市人, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎分析生物学研究。

[通讯作者] 刘悦晖 E-mail: hui75116@126.com

在肝癌诊断研究的历程中,甲胎蛋白为代表的肝癌标记和影像医学的进步具有划时代的意义,它们是使肝癌诊断由难变易的基础。但笔者认为在肝癌发生之前就采取措施,降低甚至阻断肝癌的发生,更具有意义。为此,我们进行了如下研究,希望能探寻与肝癌相关的因素,从而筛选出肝癌的易感者。

1 对象与方法

1.1 研究对象 在 2003—2004 年间收集贵阳医学院附属医院门诊及住院的汉族乙型肝炎病毒(HBV)感染者血清标本 119 份,同时收集临床资料。上述 HBV 感染者中,男性 89 例,女性 20 例;年龄 14~74 岁,中位年龄 34 岁。根据 2000 年西安会议修订的诊断标准,其中无症状 HBV 携带者 24 例,慢性乙型肝炎 35 例,乙型肝炎肝硬化 29 例,原发性肝癌 31 例(经 CT 等影像学确诊)。

1.2 主要试剂与仪器 琼脂糖(美国 Promega 公司),DNA 分子量 Marker、4×dNTPs、Taq 酶(上海华美生物工程公司),限制性内切酶 *Mbo* I、*Bs*TN I、*Bsm*A I、*Hpa* II(立陶宛 MBI Fermentas 公司)。GeneAmp5700 实时荧光定量基因扩增仪、9600 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 ABI 公司),3K-30 型低温高速台式离心机(德国 Sigma 公司),稳压稳流 ZDJ-多功能紫外透视仪(上海顾村电光仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 模板的提取 采用匹基公司 HBV DNA 提取试剂盒,按操作说明提取 DNA。100 μL 血清中加入等量提取液 I 震荡混匀后以 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀重悬于 25 μL 提取液 II 中,100℃金属浴 10 min 后再 13 000 r/min 离心 10 min,置 4℃冰箱,上清直接用于 PCR 扩增。

1.3.2 前 C 和 C 基因部分片段扩增及产物鉴定 采用半巢式 PCR。第 1 轮 PCR 反应体积 30 μL 中,10×Buffer 3 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL,4×dNTPs 2.4 μL,25 pmol/μL C₃ 及 C₂ 各 0.5 μL, Taq 酶 1.5 U,模板 3 μL;循环参数为:94℃ 5 min,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 50 s,40 个循环后,72℃ 延伸 7 min。第 2 轮 PCR 反应体积仍为 30 μL,取第 1 轮 PCR 产物 1 μL 作模板,除引物改为 C₃、C₄ 外,反应混合液中其余成分及反应条件均与第 1 轮 PCR 相同。取第 2 轮 PCR 产物 5 μL,用 2% 琼脂糖凝胶、1×TAE 液、100V 电泳 30 min 后,溴化乙锭

染色,紫外灯下观察出现目的 DNA 片段为阳性,部分阳性标本经重复扩增、鉴定^[1]。

1.3.3 PCR 产物直接测序检测 1653T 及 T1762/A1764 双变异 将 PCR 产物用 UNIQ-10 柱纯化回收后,取 1 μL 作模板,C₃、C₄ 为测序引物,用 Big Dye 测序试剂盒在 377 型 DNA 测序仪上直接测序(由上海生工公司协助完成)。所得序列与标准株进行核苷酸同源性分析,确定 1653T 及 T1762/A1764 双变异。

1.3.4 HBV 基因分型 采用本室建立的 S 基因 PCR-RFLP 方法,取 HBV DNA 抽提液 3 μL 为模板,以 S₁、S₂ 为引物,用 PCR 方法扩增 S 基因部分片段,扩增产物分别用限制性内切酶 *Mbo* I、*Bs*TN I、*Bsm*A I 酶切,酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,根据酶切片段长度多态性确定基因型^[2]。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HBV1653T 变异与肝癌的关系 1653T 变异检出率自 HBV 携带者、慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、原发性肝癌逐渐增加,见表 1。

表 1 HBV1653T 变异与原发肝癌的关系(株)

Table 1 The relationship between mutation at HBV 1653T and HCC (strain)

Groups	N	Mutant strains	Wild strains
Asymptomatic carriers	24	0	24
Chronic hepatitis B	35	1	34 ¹⁾
Liver cirrhosis	29	5	24 ²⁾
Hepatocellular carcinoma	31	14	17 ³⁾

3) vs 1), 2) respectively, $\chi^2 = 14.43, P = 0.00; \chi^2 = 5.40, P = 0.02$

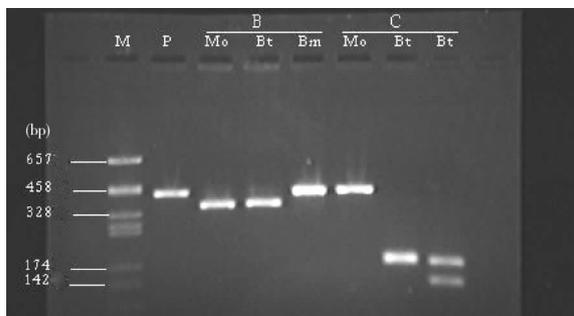
2.2 HBV1653T 变异与基因型的关系 HBV S 基因 PCR 产物的酶切图谱见图 1。1653T 变异更易发生于 C 基因型,见表 2。

表 2 HBV1653T 变异与基因型的关系(株)

Table 2 The relationship between mutation at HBV 1653T and genotype (strain)

Genotypes	N	Wild strains	Mutant strains
Genotype B	51	49	2
Genotype C	58	49	18
χ^2			11.57
P			<0.01

Ten of 119 serum samples were not typed



M: molecular weight marker (pGEM-7Zf(+)DNA/Hae III Markers); P: PCR product; Mo, digested with *Mbo* I; Et, digested with *BstNI*; Bm, genotype *BsmA* I; B, genotype B; C, genotype C

图 1 HBV S 基因 PCR 产物的酶切图谱

Figure 1 Restriction map of PCR product for HBV S gene

2.3 HBV 1653T 变异与 T1762/A1764 双变异的关系 119 份乙型肝炎患者血清标本中检测出 1653T 变异标本 20 份, 此 20 株 1653T 变异株中有 19 株为 T1762/A1764 双变异。

3 讨论

本研究发现 1653T 变异更易发生于肝硬化和肝癌患者, 与 Shinkai 等^[3-4] 研究结果相似。而且 1653T 变异总是伴随基本核心启动子 (BCP) T1762/A1764 双变异。BCP 位于 X 基因的末端, 特别是 1762 位于 HBV/X 基因调节序列的第 2 个 AT 富集区域, 而 X 基因编码的 X 蛋白具有反式激活功能, 除调节 HBV 自身及其他病毒的复制外, 尚可激活 *C-jun*、*C-myc* 原癌基因, 影响细胞分化和增殖, 是导致肝细胞癌变的一个重要协同因素^[5]。BCP T1762/A1764 双变异可能有利于 X 基因功能结构的稳定^[6]。另外, BCP T1762/A1764 双变异导致 HBV 复制中间体在肝细胞内大量堆积, 从而增加了 HBV 整合进肝细胞的概率。此外, 其对调节细胞生长和复制的基因也有影响, 使细胞生长异常, 导致整合 HBV 的肝细胞癌变。BCP T1762/A1764 双变异后, 虽然 HBV 前 C 基因组 RNA 转录下降, 乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 的表达减少, 但前基因组 RNA 转录及病毒的包装功能却增强, 因而病毒的复制水平提高。HBeAg 可诱导新生儿免疫耐受性, 下调成人的免疫应答活性。因而 HBeAg 消失后的病毒血症可伴随肝炎病变的再活动。肝细胞反复受损

可促进肝纤维化形成, 最终导致肝硬化。而在肝硬化基础上易发生肝癌这一临床事实也进一步表明 BCP T1762/A1764 双变异与肝癌的发生应有一定相关性。间接提示 1653T 变异可能导致肝癌的发生, 可作为预测肝癌发生的一个重要指标。Shinkai 等^[3-4] 通过多因素分析也表明 1653T 与肝癌的发生密切相关, 可作为预测肝癌发生的一个重要指标。1653T 变异致癌的机制目前不清楚, 推测可能发生此变异后, 为了病毒本身的稳定性而导致 BCP T1762/A1764 双变异, 从 1653T 变异总是伴随 BCP T1762/A1764 双变异似可验证此点。

本研究发现 1653T 变异在 C 基因型中的发生率明显高于 B 基因型, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而 C 基因型与肝癌密切相关, 可作为预测肝癌发生的一个重要指标^[7]。这也间接提示 1653T 变异与肝癌密切相关, 可作为预测肝癌发生的一个重要指标。综上所述, HBV 1653T 变异与原发肝癌关系密切, 更易发生在 C 基因型, 1653T 变异可以作为预测肝癌的指标之一。

[参考文献]

- [1] 刘悦晖, 丁静娟, 张权. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒前 C 区和基本核心启动子区变异检测及意义[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(9): 529 - 533.
- [2] 彭亮, 丁静娟, 张莉莎. 乙型肝炎病毒 S 基因限制性片段长度多态性分型方法的建立及应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(8): 475 - 478.
- [3] Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, *et al.* Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3191 - 3197.
- [4] Wang Z, Tanaka Y, Huang Y, *et al.* Clinical and virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1, and C2 in China[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 1491 - 1496.
- [5] Terradillos O, Billet O, Renard C A, *et al.* The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice[J]. Oncogene, 1997, 14(4): 395 - 404.
- [6] Buckwold V E, Xu Z C, Chen M, *et al.* Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication[J]. J Virol, 1996, 70(9): 5845 - 5851.
- [7] Chan H L, Hui A Y, Wong M L, *et al.* Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2004, 53(10): 1494 - 1498.