

前C区基因变异对慢性重型乙型肝炎免疫应答的影响

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新, 无锡市传染病医院 江苏省无锡市 214005

江苏省科技计划项目, No. BS2003615

无锡市自然科学基金资助, No. CK030013

通讯作者: 黄利华, 214005, 江苏省无锡市兴源路88号, 无锡市传染病医院. huanglihua1964@sina.com

电话: 0510-82307555-6205 传真: 0510-82717162

收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-11

Influence of mutation in hepatitis B virus precore region on immune response of patients with chronic severe hepatitis B

Li-Hua Huang, Yue-Ming Jiang, Ya-Xin Dai

Li-Hua Huang, Yue-Ming Jiang, Ya-Xin Dai, Hospital of Infectious Disease, Wuxi 214005, Jiangsu Province, China
Supported by the Science and Technology Program of Jiangsu Province, No. BS2003615, and the Natural Science Foundation of Wuxi City, No. CK030013

Correspondence to: Li-Hua Huang, Hospital of Infectious Disease, 88 Xingyuan Road, Wuxi 214005, Jiangsu Province, China. huanglihua1964@sina.com

Received: 2006-02-22 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To investigate the role of mutation at site 1896 in hepatitis B virus (HBV) precore region in the pathogenesis of chronic severe hepatitis B and its influence on the immune response of patients.

METHODS: The production of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) by Th1/Th2 and Tc1/Tc2 cells in the peripheral blood from 31 patients with chronic heavy hepatitis were assessed by flow cytometry. The serum concentration of IL-4 and IFN- γ were examined by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HBV DNA was amplified by nested polymerase chain reaction and the precore/core fragment was directly sequenced.

RESULTS: The mutation at site 1896 in HBV precore region appeared in 8 of 31 (25.8%) patients with chronic severe hepatitis. Of the 8 patients, 4 (50%) were confirmed with the mutation

at site 1913. However, of the 23 patients without the mutation at site 1896, 1 case was detected with the mutation at site 1913. The level of Tc1 was significantly higher in the patients with G1896A mutation than that in those without G1896A mutation ($t = 2.407$, $P = 0.023$). The levels of serum IFN- γ and IL-4 were not markedly different between the patients with and without G1896A mutation ($P > 0.05$). The mortality rate was also similar between the two groups.

CONCLUSION: Tc1 level is significantly enhanced due to G1896A mutation and plays an important role in the pathogenesis of chronic severe hepatitis B.

Key Words: Precore gene; Mutation; Chronic severe hepatitis B; Immune response

Huang LH, Jiang YM, Dai YX. Influence of mutation in hepatitis B virus precore region on immune response of patients with chronic severe hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(19):1921-1923

摘要

目的: 分析乙型肝炎病毒(HBV)前C区G1896A变异对慢性重型乙型肝炎(慢重肝)发病及免疫应答的影响。

方法: 流式细胞仪检测31例慢重肝患者外周血细胞胞内细胞因子IFN- γ , IL-4的百分率; 测定Th1, Th2, Tc1, Tc2; 固相夹心法酶联免疫吸附试验检测其血清IL-4, IFN- γ 的水平; 套式聚合酶链反应扩增HBV DNA前C/C基因并作序列分析。

结果: 在31例患者中8例(25.8%)发生G1896A变异, 8例G1896A变异株中4例(50%)出现1913位联合变异, 而23例野毒株仅1例(4.3%)出现C1913A变异; G1896A变异株Tc1水平显著高于野毒株($P = 0.023$, $t = 2.407$); G1896A变异株与野毒株相比IL-4, IFN- γ 水平无显著性差异($P > 0.05$); 变异株与野毒株2组死亡率无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: G1896A变异能显著增强Tc1水平, 后者

■背景资料

国内外对乙型肝炎肝细胞损伤机制的研究主要集中在HBV基因变异及机体免疫异常两方面。基因变异的乙型肝炎病毒可能通过各种途径刺激机体的免疫系统, 使免疫细胞活化, 并释放细胞因子, 导致肝细胞损伤, 与重型肝炎的发生密切相关。

■研发前沿

重型肝炎病毒热点变异主要集中在前C区1896位的终止变异。目前研究热点为: 1896位的终止变异与重型肝炎的关系, 基因变异加重肝脏损害的机制, 病毒基因其他位点的变异, 重型肝炎的不同阶段机体细胞免疫的特点以及细胞因子的表达程度及基因和免疫治疗的策略。

■应用要点

本研究深化了我
国慢性乙型肝炎
发病机制的研究,
从重型肝炎的不
同阶段探索机体
细胞免疫的特点
以及细胞因子的
表达特点,为今
后重型肝炎预防
、治疗尤其是根
据Th1/Th2型细
胞因子在重型肝
肝损害中的变化
而实施的生物治
疗、预后预测提
供理论依据,同
时对重型肝炎病
毒基因变异理论
和以后的基因治
疗提供了帮助。

在慢重肝发病中起重要作用。

关键词: 前C基因; 变异; 慢性重型乙型肝炎; 免疫应答

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新. 前C区基因变异对慢性重型乙型肝炎免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1921-1923
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1921.asp>

0 引言

HBV前C区基因变异最常见于nt 1896位. 发生G1896A变异后, HBeAg表达终止, 但HBV仍可继续复制, 形成持续的病毒血症. 有研究提示, G1896A终止变异与重型乙型肝炎的发生有关^[1-3]. 为此, 我们就G1896A变异对慢重肝发病及免疫应答的影响作研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-11/2003-12住院的慢重肝患者31例, 女7例, 男24例, 平均年龄 45.9 ± 10.9 岁. 诊断符合2000年全国第十次病毒性肝炎修订的诊断标准. 标本采清晨空腹肘静脉血10 mL, 2 h内分离血清待检. CD₃/CD₄/CD₈、鼠抗人IFN- γ /IL-4、溶血剂、破膜剂由法国Immunotech提供, 流式细胞仪系Benkman Coulter 3XL. IL-4和IFN- γ 检测试剂盒购自法国Diacclone research公司, 用奥地利TECAN公司的全自动酶标分析仪分析. dNTP和Taq酶由Promega公司提供, 末端荧光标记测序试剂盒系PE公司提供, QIAquick纯化柱系德国Qiagen公司提供, 所有试剂均委托上海生工生物有限公司购买. ASAP测序软件由美国Biotronics公司提供.

1.2 方法

1.2.1 Th1/Th2/Tc1/Tc2检测 静脉血2 mL, 肝素抗凝, 取100 μ L按1:1加入1640培养基, 混匀, 加入刺激剂PMA和Ionomycin, 使其终浓度分别为25 μ g/L和1 mg/L, 同时加入终浓度为10 mg/L的抑制剂Monensin; 未刺激对照则只加Monensin, 不加刺激剂, 混匀后在37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂培养箱中培养4 h, 以CD₃, CD₄, CD₈, IFN- γ , IL-4标记细胞膜表面抗原和细胞内细胞因子, 流式细胞仪检测胞内细胞因子IFN- γ , IL-4百分率并进行数据分析, 检测方法见文献[4].

1.2.2 IL-4和IFN- γ 检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测, 用奥地利TECAN公司的全自动酶标分析仪读取450 nm值, 并根据标准曲线计算IL-4, IFN- γ 浓度(ng/L), 具体步骤按说明书

严格操作.

1.2.3 HBV DNA PreC/C基因测序 采用套式聚合酶链反应作基因序列测定. 将血清100 μ L用经典酚氯仿法常规提取HBV DNA作模板, 取提纯的HBV DNA 3 μ L为模板, 双蒸水9.6 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, MgCl₂ 1.6 μ L (2 mmol/L), dNTP 1.6 μ L (160 μ mol/L), Taq酶0.2 μ L (1 U), 引物P1, P2各1 μ L (0.5 μ mol/L)组成PCR反应体系20 μ L, 经94 $^{\circ}$ C预变性3 min后, 按94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环25次, 最后72 $^{\circ}$ C 5 min, 取该产物3 μ L作第2次PCR扩增的模板, 双蒸水9.6 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, MgCl₂ 1.6 μ L, dNTP 1.6 μ L, Taq酶0.2 μ L, 再加入引物P3, P4各1 μ L进行第2次PCR扩增: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环35次, 最后72 $^{\circ}$ C 5 min. 取部分产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭显色后在紫外灯下观察DNA条带, 鉴定后GIAquick纯化柱纯化. 纯化产物及P₃引物加入测序试剂盒进行测序反应, 置CEQ8000型DNA测序仪进行序列测定.

统计学处理 Th1, Th2, Tc1, Tc2比较用SPSS 10.0统计软件进行数据 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 差异有统计学意义. 变异率, 死亡率的比较以小样本四格表统计意义检验便查表^[5]分析, 按表格区间得出 P 值, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 差异有统计学意义.

2 结果

2.1 前C区基因序列的检测 在31例患者中8例(25.8%)发生G1896A变异, 其中1例(3.2%)是变异株和野毒株混合感染. 8例G1896A变异株中4例(50%)出现1913位联合变异, 即C1913A及C1913G变异各2例, 而23例野毒株仅1例(4.3%)出现C1913A变异, 经小样本四格表统计意义检验便查表证实G1896A与1913联合变异有统计学意义($P < 0.05$).

2.2 HBV G1896A变异的 变异株Tc1水平显著高于野毒株($P = 0.023$, $t = 2.407$, 表1). 2组间细胞因子无显著性差异($P > 0.05$, 表1). 31例慢重肝患者死亡率45.2%(14/31), G1896A变异株死亡率50.0%(4/8), 野毒株死亡率43.5%(10/23), 按四格表精确检验法, $P > 0.05$, 两组死亡率无显著性差异.

3 讨论

重型肝炎肝细胞损伤涉及病毒与机体反应两方

表 1 G1896A变异与T细胞免疫细胞因子 (mean ± SD)

分组	n	Th1%	Th2%	Tc1%	Tc2%	IL-4 (ng/L)	IFN-γ (ng/L)
变异株	8	28.8 ± 4.3	4.1 ± 3.0	52.1 ± 10.7 ^a	3.2 ± 0.9	83.6 ± 14.9	47.6 ± 17.9
野毒株	23	26.6 ± 4.8	3.4 ± 2.8	40.7 ± 11.9	3.0 ± 1.8	77.9 ± 10.2	44.9 ± 22.9

$t = 2.407$, $^aP < 0.05$ vs 野毒株.

面, 我国已有研究提示, 重型肝炎与G1896A终止变异有密切关系, 变异发生率报道不一^[6-8]. 我们的结果发现无锡地区慢性重型肝炎G1896A变异发生率25.8%, 并出现核苷酸1913位联合变异, 且显著关联. 提示, 慢重肝患者中的确存在G1896A变异, 但变异发生率并不很高, 因此对慢重肝而言变异仅是影响临床病情的一个方面, 而G1896A与1913位的联合变异又有何临床意义值得进一步探讨. 我们曾报道过, 慢重肝患者存在明显的T细胞免疫紊乱^[4]. Th1, Tc1细胞主要分泌IFN-γ等I型细胞因子, 介导细胞毒效应; Th2, Tc2主要分泌IL-4等细胞因子, 参与体液免疫应答, 通常所说的CTL即为Tc1^[9-10]. 国外报道HBeAg可以耗竭Th1, 从而抑制他们发动CTL攻击感染肝细胞的能力, 一旦HBV发生基因变异, 不能表达HBeAg, 则这种抑制被打破而导致重型肝炎的发生^[11], 我们发现, 慢重肝G1896A变异株Tc1显著升高, 表现出明显增强的细胞免疫应答, 导致肝细胞损伤, 甚至肝衰竭.

IL-4, IFN-γ与慢性重型肝炎发生有关^[12-14], 但G1896A变异株与野毒株相比血液中细胞因子IL-4, IFN-γ并无显著性增高, 分析有以下原因: (1)重型肝炎时肝细胞对IFN-γ的细胞毒效应更加敏感, IFN-γ轻微升高即可引起严重反应; (2)局部产生的肿瘤坏死因子及IFN-γ是导致肝细胞坏死的基础^[15], 他们可以干扰细胞生长、诱导肝细胞凋亡、促进免疫细胞活化及浸润. 因此, Tc1在慢性重型肝炎中起重要作用, G1896A变异对Tc1影响更为明显.

4 参考文献

- Inoue K, Ogawa O, Yamada M, Watanabe T, Okamoto H, Yoshida M. Possible association of vigorous hepatitis B virus replication with the development of fulminant hepatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 383-387
- Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, Martinelli AL. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32: 53-59
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 2004; 74: 228-236
- 黄利华, 王娟华, 刘志辉. 慢性乙型重型肝炎患者外周血Th1/Th2, Tc1/Tc2的表达. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 91-92
- 金丕焕. 医用统计方法. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1995: 460-469
- 王静艳, 穆桂玲, 刘沛, 谷秋红. 乙型重型肝炎基因变异与免疫异常的关系. *中华传染病杂志* 2001; 19: 73-76
- 林裕龙, 侯金林, 王战会, 孙剑, 阎丽, 骆抗先. e抗原阴性重症乙型肝炎患者HBV前C区热点变异研究. *第一军医大学学报* 2001; 21: 852-854
- Wu W, Chen Y, Ruan B, Li LJ. Gene heterogeneity of hepatitis B virus isolates from patients with severe hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 530-534
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146
- 朱迅. 免疫学新进展. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 98-99
- Hou J, Lin Y, Waters J, Wang Z, Min J, Liao H, Jiang J, Chen J, Luo K, Karayiannis P. Detection and significance of a G1862T variant of hepatitis B virus in Chinese patients with fulminant hepatitis. *J Gen Virol* 2002; 83: 2291-2298
- 黄利华, 蒋跃明, 谢志萍, 蒋祥虎. 慢性乙型重型肝炎患者外周血白细胞介素18、白细胞介素4、γ干扰素的变化. *临床荟萃* 2005; 20: 436-437
- 唐宝璋, 陈皋, 陈红英, 陈一晖, 张艳梅. 重型肝炎患者血清内毒素、白细胞介素(IL)-4、IL-18水平的研究. *中华内科杂志* 2004; 43: 137-138
- 陈湖光, 余春艳, 孟雪芹, 冯玉凤, 马亦林, 刘克洲. 病毒性肝炎患者血清白细胞介素-4、12及干扰素-γ水平的观察. *中华传染病杂志* 2000; 18: 195-196
- Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Koda T, Nishimura S, Iwakura Y, Sekikawa K, Nishimura T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol* 2000; 165: 956-961

■同行评价

重型肝炎肝细胞损伤涉及病毒与机体反应两方面, 我国已有研究提示重型肝炎与G1896A终止变异有密切关系, 本文以此角度分析乙型肝炎病毒G1896A终止变异对重型肝炎发病及免疫应答的影响, 选题新颖, 方法可行, 设计严谨, 结论可靠.

电编 张敏 编辑 潘伯荣