世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年9月18日; 16(26): 2997-3000
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

家族聚集性慢性乙型肝炎的病毒前C区和基本核心启动子变异与临床病理的关系

杨友国, 刘成永, 王春颖, 王 骥, 钱秀梅, 孙 庆, 侯远沛

杨友国, 刘成永, 王春颖, 王骥, 钱秀梅, 孙庆, 侯远沛, 江苏徐州市传染病医院 江苏省徐州市 221004
作者贡献分布: 研究过程由刘成永, 王春颖, 杨友国及王骥操作完成; 研究所用新试剂及分析由钱秀梅, 孙庆及侯远沛完成; 数据分析由刘成永与王春颖完成; 本论文写作由刘成永完成.
通讯作者: 刘成永, 221004, 江苏省徐州市, 江苏省徐州市传染病医院检验科. crblt@126.com
电话: 0516-83668716
收稿日期: 2008-06-03 修回日期: 2008-07-21
接受日期: 2008-08-17 在线出版日期: 2008-09-18

Relationship between hepatic histological alterations and hepatitis B virus basic core promoter/precore mutations of family assemble chronic hepatitis B

You-Guo Yang, Cheng-Yong Liu, Chun-Ying Wang, Ji Wang, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Yuan-Pei Hou

You-Guo Yang, Cheng-Yong Liu, Chun-Ying Wang, Ji Wang, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Yuan-Pei Hou, Xuzhou city' Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Cheng-Yong Liu, Department of Inspection Division, Xuzhou city Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. crblt@126.com
Received: 2008-06-03 Revised: 2008-07-21
Accepted: 2008-08-17 Published online: 2008-09-18

Abstract

AIM: To study the relationship between hepatic histological alterations and hepatitis B virus gene mutations of family assemble chronic hepatitis B.

METHODS: A total of 112 chronic Hepatitis B patients with family assemble features were selected as the experimental group, and 110 chronic hepatitis B patients without family assemble features were taken as control group. Basic core promoter/precore mutations were detected using genechip technology, and liver tissue inflammation grade and liver fibrosis grade were detected by liver biopsy.

RESULTS: The double mutation rate of basal core promoter T1762/A1764 in experimental group was significantly higher than in control group (χ^2 = 4.5626, P = 0.0044); the liver tissue inflammation grade in experimental group was significantly higher than in control group (u = 6.3397, P = 0.0000); the liver tissue inflammation grade of family assemble chronic hepatitis B with only basal core promoter T1762/A1764 mutations was significantly higher than without such site mutation but only precore mutations(t' = 8.0111, 7.958, $t'\alpha$ = 2.1651, 2.059, all P < 0.05).

CONCLUSION: The higher grade of liver tissue inflammation and liver fibrosis in patients with family assemble chronic hepatitis B is associated with the higher mutation rate of basal core promoter T1762/A1764.

Key Words: Hepatitis B virus; Hepatic histopathology; Mutation; Family assemble chronic Hepatitis B

Yang YG, Liu CY, Wang CY, Wang J, Qian XM, Sun Q, Hou YP. Relationship between hepatic histological alterations and hepatitis B virus basic core promoter/precore mutations of family assemble chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(26): 2997-3000

摘要

目的: 分析家族聚集性慢性乙型肝炎的基因变异特征和肝组织病理学改变的关系.

方法: 选择家族聚集性慢性乙型肝炎112例作实验组和非家族聚集性慢性乙型肝炎110例作对照组; 用基因芯片法检验前C1896和BCP1762、1764双突变; 并肝组织活检进行肝组织炎症活动度计分和肝纤维化计分.

结果: 实验组BCP T1762/A1764双突变率显著高于对照组(χ^2 = 4.5626, P = 0.0044); 实验组炎症评分显著高于对照组(u = 6.3397, P = 0.0000); 家族聚集性慢性乙型肝炎者中单独BCP T1762/A1764双突变者炎症计分显著高于与无此类位点变异者和单独前C区1896变异者(t' = 8.0111, 7.958, $t'\alpha$ = 2.1651, 2.059, 均 P<0.05).

■背景资料
HBV基因型以及C、P、X读码框架区内其他位点的变异对HBV感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病的预后等都有一定的影响, 被证实是病毒与宿主相互作用的重要影响因素.

■同行评议者
刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科

■研发前沿
近随着分子生物学技术的发展, HBV基因型以及C、P、X读码框架区内其他位点的变异一直是近年来的研究热点, 而家族聚集性感染者的这些变异特点的报道并不多见, 对于家族聚集感染乙型肝炎的不同临床表现及发生机制进行研究, 将有利于疾病的治疗和预后分析等.

■创新盘点
本研究从HBV前C区和基本核心启动子变异与临床病理的关系着手, 对家族聚集感染者慢性乙型肝炎的分子病理机制进行探讨, 以期能够解释一些家族聚集性感染的不同临床表现及发生机制.

结论: 家族聚集慢性乙型肝炎肝组织炎症计分和纤维化计分较高, 与BCP1762和1764的变异率较高有关.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 变异; 家族聚集感染

杨友国, 刘成永, 王春颖, 王骥, 钱秀梅, 孙庆, 侯远沛. 家族聚集性慢性乙型肝炎的病毒前C区和基本核心启动子变异与临床病理的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(26): 2997-3000
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2997.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起肝损伤的过程有宿主、病毒等多个因素影响. 由于病毒基因控制着抗原的表达, 不同毒株出现某些变异的频率不同, 对机体的免疫清除能力也不同. 已有许多作者研究证实HBV基因型以及C、P、X读码框架区内其他位点的变异对HBV的感染后的自然病史、疾病的严重程度[1]、抗病毒药物的敏感程度[2-3]、病毒标志物的血清学转换[4]以及疾病的预后等都有一定的影响[5], 被证实是病毒与宿主相互作用的重要影响因素. 我们用这些成果来研究HBV家族聚集性感染的肝组织病理学改变与前C区和基本核心启动子变异, 期望能够解释一些家族聚集性感染的不同临床表现及发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 按照我院2006-05/2007-02门诊和住院就诊的顺序选择具有家族聚集感染特征家族45个(家族聚集性乙型肝炎是指乙肝患者的父亲或母亲, 以及同胞中有2个以上感染了HBV, 并包括家庭内水平传播和垂直传播), 且HBV DNA结果≥1.00×10^3 copies/L, 去除基因型或基因变异检测失败的病例和不愿或不适于肝穿刺活检的病例, 去除有干扰素等抗病毒药物干预的病例, 临床诊断为慢性乙型肝炎(CAH)者共112例作为实验组; 并随机选择无明显家族聚集性的、行同样实验室检查的并无抗病毒药物干预的CAH 100例作为对照分析组, 其诊断均符合2000年第10次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学分会联合修订的病毒型肝炎防治方案[6]. 两组均排除HIV、HCV、HDV和HEV等其他病毒感染、自身免疫性肝病、药物性肝炎和肝豆状核变性.

1.2 方法 抽取患者静脉血3 mL, 取分离出的血清0.5 mL左右, -80℃冷冻备检.

1.2.1 乙型肝炎病毒分子生物学的检测: HBV基因分型方法采用DNA测序的方法, B61作为测序引物, 用测序仪mgeabace-500进行测序. 测序分析软件为Chromas, 序列比对软件为CLUSTALX. 由上海之江公司协助测试; HBV基因变异的检测用基因芯片的方法, 主要检测前C区1896位点、BCP区1762和1764位点的变异, 操作严格按照说明书进行, 质量控制由芯片设计的质量控制位点阴阳性对照的检测所确定. 乙肝病毒基因多态型分析芯片由宁波瑞芯生物科技有限公司提供.

1.2.2 临床生化学检测: 肝功能由SYSMEX CHEMIX-180全自动生化分析仪完成, HBV-M用上海新波公司时间分辨免疫荧光定量试剂和仪器, 以上两项目的试剂均为原厂配套, 行严格的室内质量控制保证; HBV DNA定量用Roche Lightcycle荧光定量扩增仪, 试剂由深圳匹基公司提供, 以室内质控作保证, 结果≥1.00×10^3 copies/mL为阳性.

1.2.3 肝穿刺活检方法及病理诊断、分级、计分: 肝穿刺活检采用在彩超引导下快速穿刺活检术, 活检组织均在1.5 cm左右, 用100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, HE染色, 光镜观察. 肝纤维化计分标准: “中央静脉周及窦周”纤维化仅限于小叶内尚未构成纤维间隔者, 程度相对较轻, 依轻、重程度分别计1、2分; “汇管区”依纤维化范围是单纯扩大、有隔相连或已发生肝硬化给予1、2、3分; “纤维隔”的计分依间隔的数量(N)与宽度(W)及间隔内胶原沉积密度综合评分, 如仅见一个极细间隔, 则宽度计以0.5分, 纤维化占肝穿标本2/3, 计4分. 总分为P+L+2(N×W). 肝组织炎症活动度计分标准: 炎症活动度计分分为汇管区(P)、小叶内(L)、碎屑坏死(PN)及桥接坏死(BN)四项, 每项依病变轻、中、重程度分别计以1、3、4分, 计分公式为P+L+2(PN+BN). 总分为四项计分之和. 质量控制方法为: 认真培训人员, 充分掌握标准, 每次有两名医师分别单独完成并对照[7].

统计学处理 采用PEMS 3.0统计软件进行统计分析.

2 结果

2.1 家族聚集感染者组男性占73.2%, 年龄为35.3±12.6岁, 对照组男性占67.3%, 年龄为37.8±13.4岁. 两组男性所占百分率(χ^2 = 0.9378, P = 0.3329)和年龄相比较(t = 1.4323, P = 0.1535)均无显著差异.

2.2 肝功能、HBeAg、HBV DNA定量(对数值)

表 1 家族聚集感染者组和对照组肝功能、HBeAg、HBV DNA定量及部分基因变异率

分组	HBeAg定量	HBV DNA定量	ALT	TBIL	前C区1896变异率	BCP T1762/A1764双突变率	前C区1896和BCP T1762/A1764联合变异率
对照组110	0.88 ± 1.52	6.02 ± 1.61	196.2 ± 203.1	38.9 ± 56.6	56.4%	60.0%	29.1%
实验组112	0.87 ± 1.64	7.12 ± 1.78	168.5 ± 156.2	32.5 ± 45.2	57.1%	77.7%	42.9%
	u = 0.0471	u = 4.7898	u = 1.1377	u = 0.9299	χ^2 = 0.0137	χ^2 = 4.5626	χ^2 = 8.0969
	P = 0.9624	P = 0.0000	P = 0.2553	P = 0.3524	P = 0.9067	P = 0.0044	P = 0.0327

表 2 实验组和对照组前C1896和BCP T1762/A1764变异状况与肝组织学改变的关系

评分	对照组110				实验组112			
	无变异	单1896	单双突变	联合变异	无变异	单1896	单双突变	联合变异
	14	30	34	32	9	16	39	48
肝组织炎症	3.85 ± 0.78	5.26 ± 1.25	10.22 ± 2.89	12.56 ± 3.45	4.56 ± 1.67	5.48 ± 1.54	10.87 ± 3.48	14.86 ± 4.55
纤维化	2.82 ± 0.89	3.96 ± 1.11	8.12 ± 2.14	9.02 ± 2.88	3.65 ± 1.46	4.34 ± 1.25	9.56 ± 3.42	10.26 ± 3.34

■应用要点
本文的结论将有助于解释一些家族聚集性感染的不同临床表现及发生机制, 有利于疾病的预防, 治疗, 病情分析和预后判断等.

及部分基因变异状况分析 家族聚集感染者组与对照组相比较, HBV DNA定量、差异极为显著; BCP T1762/A1764双突变率及前C区1896+BCP T1762/A1764联合变异率差异显著, 其他无显著差异(表1). 前C1896和BCP T1762/A1764变异状况与慢性肝炎患者的肝组织学改变的关系见表2.

3 讨论

我国的乙型病毒性肝炎中约70%具有家族聚集性, 而且多数感染始于婴幼儿, 由于其免疫机制尚不健全, 无法识别和清除HBV[8]. 易与肝细胞DNA整合并极难清除, 因此容易长期携带病毒并慢性化, 甚至易于发生LC和HCC. 因此, HBV家族聚集感染者应成为关注的对象, 本研究从HBV前C区和基本核心启动子变异与临床病理的关系着手, 对家族聚集感染者慢性乙型肝炎的分子病理机制进行探讨.

从家族聚集感染者的基因型构成来看, 与无家族聚集特征者相比, 其C基因型所占的百分率并无显著差异[9], 但B基因型HBV家族聚集感染者发病情况和肝损害程度显著低于C型者[10]. 家族聚集感染者慢性乙型肝炎的HBV DNA定量显著高于无家族聚集特征者, HBeAg定量和肝功能则无明显差异. 但是家族聚集性慢性乙型肝炎组BCP T1762/A1764双突变率以及其与前C区1896联合突变率均显著高于对照组. 这与发生BCP T1762/A1764双突变后HBV复制能力加强, 毒力增加有关; 其次, 发生BCP T1762/A1764双突变后HBeAg表达明显减少, 研究发现HBeAg和HBcAg具有共同的表位, 在体内HBcAg较HBeAg可诱发更为强烈的抗体反应[11]. 前C区A1896突变使HBeAg合成终止[12-13]. 但不同疾病状态下的前C区野生株与突变株混合感染率较高, Orito *et al*[14]报道前C区野生株与突变株混合感染率50%左右, 所以即便变异株存在, 仍有HBeAg可以检出. 因此, 虽然家族聚集感染者多发生此种双突变, 下调了HBeAg的表达, 但野生株和混合株的同时存在, 并未减少HBeAg的量, 反而总体上, 仍然处于较高的水平, 这也是突变后造成更为严重的肝损害的一个原因.

在本研究中, 对照组单独BCP T1762/A1764双突变者与无此类位点变异者和单独前C区1896变异者炎症评分相比较(t' = 11.847和9.0901, $t'\alpha$ = 2.0534和2.0364, P<0.05)差异显著; 同样实验组中单独BCP T1762/A1764双突变者与无此类位点变异者和单独前C区1896变异者炎症计分相比较(t' = 8.0111和7.958, $t'\alpha$ = 2.1651和2.059, P<0.05)差异显著; 实验组与对照组单独BCP T1762/A1764双突变者炎症评分相比较(t = 0.8605, P = 0.3924)无显著差异; 在实验组1762、1764双突变加前C区1896联合变异者与单独1762、1764双突变者炎症评分相比较(t = 4.5073, P = 0.0000)差异极显著.

实验组与对照组的炎症评分比较(u = 6.3397, P = 0.0000)差异极显著; 实验组与对照组的纤维化评分比较(u = 6.5081, P = 0.0000)差异极显著.

■同行评价
本研究实验设计和立论依据较完善, 有一定学术价值.

家族聚集感染慢性乙型肝炎的肝组织平均炎症计分和纤维化计分显著高于对照组; 其单独BCP T1762/A1764双突变者也显著高于无此类位点变异者和单独前C区1896变异者; 但是两组间BCP T1762/A1764双突变者的炎症计分却无显著差异. 联合变异有着更高的炎症计分. 这说明肝组织炎症计分与是否家族聚集无关, 而与BCP T1762/A1764的变异有关, 家族聚集慢性乙型肝炎这种变异发生率较高, 因此也有较高的炎症计分, 并且联合突变者有更高的炎症计分, 这也符合以上所述的乙型肝炎的分子病理学机制.

总之, 家族聚集感染者因宿主、病毒等多个因素影响, 其HBV发生BCP T1762/A1764的变异率和与前C区1896联合变异率高于无明显家族聚集倾向者, 其因此造成的肝组织损害也较严重, 这也是家族聚集感染者容易长期携带病毒并慢性化, 甚至易于发生肝硬化和肝癌的重要原因.

4 参考文献

1 许军, 王齐欣, 蒋栋, 陈红松, 魏来, 王宇, 杨柳明, 赵延龙. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 11-13
2 许正锯, 杨红, 张启华, 陈先礼, 李树清, 王崇国. 乙型肝炎病毒基因型与拉米夫定疗效关系的研究. 临床肝胆病杂志 2005; 3: 157-158
3 周建良, 吴诗品. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒B、C基因型疗效比较. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 489-490
4 徐蓓, 姚光弼, 程新建, 朱玫. 乙型肝炎病毒基因型对拉米夫定长期疗效影响的评估. 肝脏 2005; 10: 76-78
5 侯金林, 曾国兵. 乙型肝炎病毒基因型流行病学与临床. 中华内科杂志 2005; 9: 707-708
6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案(2000年西安). 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
7 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 195-197
8 庄辉. 慢性乙型肝炎病毒感染及其防治. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 324-325
9 刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽. 乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1833-1835
10 邵凤珍, 施伯安, 刘文全, 崔丽安, 商红叶, 张琴, 张俊福. 天津地区家族聚集性慢性乙型肝炎病毒感染者病毒载量及组织病变与基因型的关系. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 16-18
11 Nishizono A, Kohno K, Takita-Sonoda Y, Hiraga M, Terao H, Fujioka T, Nasu M, Mifune K. Sequential analyses of the mutations in the core upstream and precore regions of hepatitis B virus genome in anti-HBe positive-carriers developing acute exacerbation. *J Med Virol* 1997; 53: 266-272
12 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591
13 Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshiba M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994; 68: 8102-8110
14 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-223

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-18)