

· 专题报道 ·

乙型肝炎病毒前 C 区 1896 点突变、基因分型及其实验室特征分析

吉 强,高春芳*,赵云鹏,鲁 莹,王爱华,陈思佳

(第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科,上海 200438)

[摘要] **目的:**分析乙型肝炎病毒(HBV)前 C 区 1896 位基因突变与 HBV 基因型、HBV 复制以及患者肝功能之间的关系。**方法:**对 60 例 HBV DNA 阳性患者进行荧光扩增检测前 C 区 1896 变异、HBV DNA 基因分型、HBV DNA 定量检测,酶免微粒子化学发光法检测血清 HBeAg 及 HBeAb,全自动生化仪检测肝功能指标。**结果:**前 C 区 1896 变异者 ALT 水平为(109±111) U/L,比野生型者显著上升($P<0.05$);1896 位点变异与 HBeAg、HBV 基因型及 HBV DNA 水平无关;乙型肝炎患者 HBV DNA 水平 C 型显著高于 B 型($P<0.05$)。**结论:**HBV DNA 前 C 区 1896 变异感染可能与肝细胞受损加重有关;基因型 C 型 HBV DNA 水平显著高于 B 型,提示 C 型病毒复制更为活跃。

[关键词] 点突变;基因型;肝炎病毒,乙型

[中图分类号] R 373.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1302-04

Analysis of HBV precore 1896 site mutation and its HBV genotype and other laboratory features

JI Qiang,GAO Chun-fang*,ZHAO Yun-peng,LU Ying,WANG Ai-hua,CHEN Si-jia (Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438,China)

[ABSTRACT] **Objective:**To analyze the relationship between hepatitis B virus (HBV) gene mutation at 1896 in precore region with genotype and replication of HBV and the liver function of patients. **Methods:**HBV precore 1896 site mutation, the genotype of HBV and serum content of HBV DNA were determined by PCR in 60 patients positive of HBV DNA. Chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) was used for detection of serum HBeAg and HBeAb. Liver function parameters were obtained by routine biochemistry method. **Results:**The alanine aminotransferase (ALT) level in HBV with 1896 site mutation was significantly higher than that in the wildtype virus. Site mutation at 1896 had no correlation with HBeAg, HBV genotype and HBV DNA content. HBV DNA content in patient with genotype C was significantly higher than that with genotype B($P<0.05$). **Conclusion:**Mutation at 1896 in precore region of HBV gene is related to aggravation of hepatocyte injury. The serum content of HBV DNA is higher in genotype C than that in genotype B, indicating genotype C HBV has more active replication activity than genotype B.

[KEY WORDS] point mutation;genotype;hepatitis B virus

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(12):1302-1305]

1989年,Carman等^[1]发现一种HBeAg缺陷的乙型肝炎病毒(HBV),该病毒发生了1896(G>A)突变,使原来编码色氨酸的前C区第28位密码子TGG转变为终止密码子TAG,但并未发现与病毒复制调节有关。1993年Lamberts等^[2]报道,前C蛋白(HBeAg前体)能有效控制HBV复制。1896(G>A)突变能阻断前C蛋白的合成,但是否会使HBV复制加强并影响患者肝功能尚不明确。目前根据HBV DNA全基因核苷酸序列的异质性 $\geq 8\%$,或S基因核苷酸序列的异质性 $\geq 4\%$,可将乙肝病毒分为A~H 8种基因型,在我国分布存在着差异^[3]。不同基因型中是否存在1896突变频率的差异也未见报道。本研究对60例血清HBV DNA阳性HBV感染者采用荧光标记探针PCR扩增技术进行了HBV 1896(G>A)变异、HBV DNA定量和HBV各基因型检测,旨在探讨HBV 1896变异与

HBV基因型、HBV的感染和复制以及血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平等之间相关性及其临床意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象 血清标本采自2007年1-4月本院门诊及住院60例慢性乙型肝炎患者。病例入选标准:临床诊断为慢性乙型肝炎,血清HBV DNA阳性。排除:(1)人类免疫缺陷病毒(HIV),肝炎病毒丙型(HCV)、丁型(HDV)、戊型(HEV)和梅毒(syphilis)等除HBV感染之外的其他病原感染;(2)排除自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝病和

[基金项目] 国家自然科学基金(30571774)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571774)。

[作者简介] 吉 强,检验师, E-mail: ehbhjcqj@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: gaocf1115@yahoo.com

Wilson 病, 其中男 47 例, 女 13 例, 平均年龄 (49.1 ± 10.1) 岁。诊断符合 2000 年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的《病毒性肝炎治疗方案》诊断标准^[4]。

1.2 HBV DNA 定量 采用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪检测, 检测试剂由达安基因诊断中心提供。按血清 HBV DNA 提取、PCR 扩增、荧光标记探针杂交、标准 DNA 建立的直线回归方程计算出待检血清中的 HBV DNA 水平 (以每毫升基因拷贝数的对数值报告)。

1.3 HBV DNA 前 C 区 1896 位点变异和 HBV 各基因型检测 采用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪检测, 试剂由杭州博塞基因诊断技术有限公司提供, 采用乙型肝炎病毒特异引物, 利用核酸扩增、荧光标记探针, 结合 Taqman MGB 探针技术, 对人血清中乙型肝炎病毒 1896 位点变异及基因分型进行检测。

1.4 病毒血清标志物检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAg 采用 Architect I 2000SR 化学发光微粒子免疫分析法 (CMIA) 及美国雅培

Architect 配套试剂盒检测。

1.5 临床实验室肝功能指标检测 采用 Hitachi 7600 全自动生化分析仪检测, 试剂由日本 Wako 公司提供。包括丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBIL)、前白蛋白 (PALB) 等。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件对研究数据进行统计分析。各指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数作 *t* 检验和两样本率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 HBV 前 C 区 1896 变异及其 DNA 水平和肝功能指标分析 60 例 HBV 感染者中, 检出 37 例野生株 (61.7%) 和 23 例变异株 (38.3%), 变异型患者 ALT 水平为 (109.66 ± 111.11) U/L, 显著高于野生型患者 ALT 水平 (66.38 ± 57.54) U/L ($P < 0.05$); HBV 前 C 区 1896 变异与 TBIL、PALB、HBV DNA 水平无明显相关性 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 HBV 前 C 区 1896 位点的变异的 ALT、TBIL、PALB 及 HBV DNA 水平 (lg 值)

Tab 1 Levels of ALT, TBIL, PALB and HBV DNA in patients with mutation at 1896 in HBV precore region

Genotype	N	ALT ($\alpha_B/U \cdot L^{-1}$)	TBIL ($c_B/\mu mol \cdot L^{-1}$)	PALB ($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	HBV DNA (copy $\cdot ml^{-1}$)
Wild	37	66.38 ± 57.54	25.2 ± 14.80	16.44 ± 6.17	5.12 ± 1.02
Mutation	23	109.66 ± 111.11*	22.9 ± 12.21	16.04 ± 5.36	5.14 ± 1.33

ALT: Alanine aminotransferase; TBIL: Total bilirubin; PALB: Prealbumin. * $P < 0.05$ vs mutation

2.2 HBV 前 C 区 1896 变异和乙肝病毒基因分型 60 例 HBV 感染者中, HBV 前 C 区 1896 变异和乙肝病毒基因分型在发生率上无明显相关性 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 HBV 前 C 区 1896 变异和乙肝病毒基因分型

Tab 2 Mutation at 1896 in precore region of HBV and genotype of HBV

Genotype	N	B	C	B, C mixed	Non-B, C
Wild	37	9(24.3)	26(70.3)	1(2.7)	1(2.7)
Mutation	23	4(17.4)	17(73.9)	0(0)	2(8.7)

2.3 乙肝病毒基因分型和 HBV DNA 水平 乙肝病毒基因分型 (因非 B 非 C 型数量较少, 故未列入计算), 其中检出 B 型 13 例 (21.7%) 和 C 型 43 例 (71.7%), C 型的 HBV DNA 水平 (5.40 ± 1.11) 显

著高于 B 型的 HBV DNA 水平 (4.71 ± 0.90) ($P = 0.02$)。

2.4 HBeAg/Ab 乙肝患者与 HBV 前 C 区 1896 变异的相关性分析 HBeAg/Ab (按 eAg⁺/eAb⁻、eAg⁻/eAb⁺、eAg⁻/eAb⁻ 和 eAg⁺/eAb⁺ 分为 4 组) 乙肝患者与 HBV 前 C 区 1896 变异之间无明显相关性 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 1896 位点变异者 HBeAg/Ab 分析结果

Tab 3 Results of HBeAg/Ab analysis in patients with mutation at 1896 in HBV precore region

Genotype	eAg ⁺ / eAb ⁻ (N=8)	eAg ⁻ / eAb ⁺ (N=40)	eAg ⁻ / eAb ⁻ (N=4)	eAg ⁺ / eAb ⁺ (N=8)
Wild	6(75.0)	25(62.5)	1(25.0)	5(62.5)
Mutation	2(25.0)	15(37.5)	3(75.0)	3(37.5)

3 讨论

乙型病毒性肝炎病情轻重是由宿主和病毒两方面所决定,许多研究都显示前 C 区变异与肝炎活动及严重性有关^[5]。其中最常见的变异为 HBV DNA nt1896 位核苷酸由 G→A 的点突变,使得在 mRNA 水平上由密码色氨酸(TGG)变为终止密码(TAG),致使 HBeAg 合成终止,导致 HBeAg 前体蛋白的合成中断,造成 HBeAg 减少或消失,但病毒本身复制不受影响。HBeAg 能诱导机体产生对 HBV 的免疫耐受,它的缺失将导致免疫耐受被打破,从而引起肝脏病变的活动^[6]。很多研究认为这种前 C 区变异株感染通过复制增强导致乙型肝炎病情加重^[7-8],但也有发现该变异发生后 HBV 变异株复制力减弱。另有研究者认为该变异仅仅是与 nt1858 位碱基配对,形成稳定二级结构的需要^[9],与肝脏病变的加重无关。关于 HBeAg、HBV DNA 与转氨酶的关系,国内外均有大量文献报道,这些报道大多数认为 HBeAg、HBV DNA 与转氨酶的升高呈正相关^[10-11]。本研究结果显示 HBV 前 C 区 1896 变异对患者 ALT 水平有影响,变异者 ALT 水平高于野生型患者($P < 0.05$),但 HBV 前 C 区 1896 变异与 HBV DNA 水平之间无明显相关性($P > 0.05$),未发现不同 HBe 系统乙肝患者 1896 位点变异及其 DNA 水平存在明确相关性($P > 0.05$)。本研究结果与文献报道的感染前 C 区 1896 变异毒株者 ALT 水平一般较高一致。ALT 升高通常是杀伤性 T 细胞攻击带有病毒抗原的肝细胞而导致肝细胞溶解的结果,前 C 区 1896 变异可能通过影响宿主清除体内的 HBV,使患者血中的 ALT 水平居高不下。另一方面,病毒复制和机体的记忆免疫状态,也是肝细胞大量破坏使 ALT 升高的原因之一。已有研究表明 HBV 活动性复制是肝细胞持续破坏的重要原因^[12]。血清 e 抗原向 e 抗体的转变并不代表病毒复制的完全停止和肝脏病变的好转,可能是 HBV 逃逸机体免疫的一种方式。因此,血清学 HBeAb 阳性者应同时进行 HBV DNA 检测,对于协助临床诊断和治疗,正确评估病情的预后有重要意义。

由于 HBV 在逆转录过程中缺乏较对酶的作用,发生突变的几率较高,长期累积的变异形成了不同的基因型,与临床表现、预后存在相关性,基因型分析将会对乙肝的诊断、治疗和预后判断发挥积极的作用。HBV 基因型是 HBV 基因异质性的表现之一,最早于 1988 年提出^[13],至今已发现的基因型有 A-H 共 8 种。研究发现 HBV 基因型呈一定的地

理区域性分布,我国发现有 B、C、D 基因型,偶有 A 型,其中以 C 型和 B 型为主,北方主要是 B 型。本研究对 60 例 HBV DNA 阳性患者 HBV 基因型的研究结果提示 HBV 基因型以 C 型为主,B 型次之,另有少量 BC 混合型和其他类型,并且 C 型 HBV DNA 水平显著高于 B 型,与文献报道相似^[14-15]。本研究结果 C 型 HBV DNA 水平显著高于 B 型($P < 0.05$)说明 C 型患者病毒复制活跃,但是 B 型、C 型的 HBeAg 阳性率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。在后续的研究中,我们将进一步扩大样本量,进一步从 HBV DNA 的基因突变、基因分型、HBV 病毒标志物、肝功能指标、临床表现、疗效、预后等多指标、多视角探讨 HBV 基因变异的临床意义,为临床 HBV 感染的诊治提供实验室依据。

[参考文献]

- [1] Carman W F, Jacyna M R, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic HBV infection[J]. *Lancet*, 1989, 2: 588-591.
- [2] Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, et al. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis[J]. *J Virol*, 1993, 67: 3756-3762.
- [3] 罗凯,尹一兵. 乙型肝炎病毒的基因分型[J]. *检验医学*, 2006, 21: 555-558.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *传染病信息*, 2000, 13: 141-150.
- [5] 陈然峰,陈国军,董长林,等. 乙型肝炎复制与感染指标的相关性及各指标在肝病防治中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2004, 14: 1084-1086.
- [6] Ulrich P P, Bhat R A, Kelly I, et al. A precore-defective mutant of hepatitis B virus associated with e antigen-negative chronic liver disease[J]. *J Med Virol*, 1990, 32: 109.
- [7] Brunetto M R, Giarin M M, Oliveri F, et al. Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 4186-4190.
- [8] Scaglioni P P, Melegari M, Wands J R, et al. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein[J]. *J Virol*, 1997, 71: 345-353.
- [9] Lindh M, Furuta Y, Vahlne A, et al. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence on pregenomic base pairing between nucleotides 1858 of 1896[J]. *J Infect Dis* 1995, 172: 1343-1347.
- [10] 施理,刘树人,孔祥平,等. 免疫接种乙型肝炎病毒外膜小 S 蛋白产生的细胞免疫反应[J]. *中华医院感染学杂志*, 2003, 13: 710-713.
- [11] 戴二黑,宋亚军,陈翠英,等. 应用突变特异 PCR 检测 HBV 前 C 区 nt1896 位点突变[J]. *疾病控制杂志*, 2005, 9: 292-295.
- [12] 袁玮,申建维,彭铁汉. 乙型肝炎病毒前 C 区 1896 点突变的检测与病毒复制水平关系的探讨[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15: 139-141.
- [13] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B vi-

rus by homology in nucleotide sequence; comparison of surface antigen subtypes[J]. J Gen Virol, 1988, 69: 2575-2583.

[14] 王俊明, 牟振云. 乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义[J]. 临床荟萃, 2006, 21: 825-827.

[15] 周光耀, 蒋道荣, 姚登福, 等. 乙肝病毒基因分型及其临床意义[J]. 中国交通医学杂志, 2006, 20: 49-53.

[收稿日期] 2007-08-05

[修回日期] 2007-10-19

[本文编辑] 曹静

• 个案报告 •

胆囊癌伴蓝氏贾第鞭毛虫感染一例报告

Giardia lamblia Stiles infection in gallbladder cancer: a case report

侯丽娜, 梁开忠, 高春芳* (第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438)

[关键词] 胆囊肿瘤; 蓝氏贾第鞭毛虫; 感染

[中图分类号] R 735.8

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)12-1305-01

1 临床资料 患者, 女, 46岁。因反复右上腹疼痛不适10余年, 加重1个月, 以“胆囊癌伴肝、肺多处转移”于2007年3月28日收治入本院。患者右上腹持续性疼痛, 阵发性加剧, 无肩背部放射痛, 不伴发热。疼痛以进食油腻食物后为重。2007年3月23日在当地医院以“胆囊炎、胆囊结石”行胆囊切除术。术中发现胆囊硬化、局部肝组织浸润, 肝组织活检示“肝组织内低分化腺癌浸润”, 中止手术后转至我院。入院时查体: 体温36.4℃, 脉搏80次/min, 呼吸20次/min。X线胸片示: 右侧胸腔少量积液, 右下肺陈旧性钙化灶。CT检查示: 胆囊肿瘤伴局部肝组织浸润, 肝内多处转移子灶, 右肺见转移灶。心律齐, 腹软, 无压痛及反跳痛, 肝、脾肋缘下未触及, 胆囊未触及, 肠鸣音正常。实验室检查: 血常规、血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)检测均正常, 肝功能正常, CEA(-), AFP 14 U/ml, CA 19-9 > 1 000 U/ml。粪常规检测于低倍镜下可见椭圆形, 囊壁较厚, 囊壁与虫体之间有明显空隙的蓝氏贾第鞭毛虫包囊(图1); 革兰染色后可见为成熟的4核包囊, 偏于一端, 囊内可见到鞭毛、丝状物、轴柱等(图2)。入院后诊断为胆囊肿瘤晚期, 无手术适应证, 患者要求出院观察, 未做治疗, 于2007年4月4日出院, 目前继续随诊观察。



图1 低倍镜下所见蓝氏贾第鞭毛虫包囊(×100)

2 讨论 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia* Stiles, 1915)简称贾第虫, 分布于世界各地。其感染发病的主要症状是腹痛、腹泻、腹胀、呕吐、发热和厌食等, 典型表现为以腹泻为主的吸收不良综合征。近10多年来, 由于旅游事业的发展, 在旅游者中发病率较高, 故其发病又称旅游者腹泻, 已引起各国的重视。



图2 革兰染色后油镜下所见蓝氏贾第鞭毛虫包囊(×1 000)

贾第虫生活史中有滋养体和包囊两个不同的发育阶段。成熟的4核包囊是感染期, 包囊随污染食物和饮水进入人体, 在十二指肠内脱囊形成2个滋养体。滋养体主要寄生在人的十二指肠内, 有时也可在胆囊内。一般在硬度正常的粪便中只能找到包囊。滋养体则可在腹泻患者粪便中发现。包囊在外界抵抗力较强, 为传播阶段。人体感染贾第虫后, 无临床症状者称带虫者。当虫体寄生在胆道系统时, 可能引起胆囊炎或胆管炎, 如出现上腹疼痛、食欲不振、肝肿大以及脂肪代谢障碍等。研究发现, 蓝氏贾第鞭毛虫基因型决定其临床表现, 有些个体在无任何临床症状的情况下排出感染性的包囊, 一些发展成蓝氏贾第鞭毛虫病, 一些则无任何表现^[1]。人体感染蓝氏贾第鞭毛虫常可表现慢性腹泻和吸收不良等消化道症状, 但感染伴发胆囊癌尚未见报道。本例粪便涂片查见蓝氏贾第鞭毛虫包囊, 但临床无任何相关症状。B超见胆囊有结石征, 不排除虫体寄生胆囊后钙化的可能。

[参考文献]

[1] Read C, Walters J, Robertson I D, et al. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea[J]. Int J Parasitol, 2002, 32: 229-231.

[收稿日期] 2007-09-18

[修回日期] 2007-10-23

[本文编辑] 邓晓群

[作者简介] 侯丽娜, 硕士, 检验师。

* Corresponding author. E-mail: gaocf1115@yahoo.com