

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00929

乙肝相关疾病中乙肝病毒核心启动子区变异频率及发病风险评估

张敏峰^{1△}, 钱培新^{2△}, 蒲蕊³, 韩雪⁴, 张宏伟³, 杨甲梅¹, 殷建华^{3*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院特需科, 上海 200438
2. 张家港市第一人民医院检验科, 张家港 215600
3. 第二军医大学流行病学教研室, 上海 200433
4. 上海市杨浦区疾病预防控制中心, 上海 200090

[摘要] **目的** 检测乙肝病毒核心启动子(basic core promoter, BCP)区变异位点在乙肝相关疾病中的变异频率, 评估乙肝病毒变异在终末期肝病发生中的风险。**方法** 收集 2 093 例 HBV 无症状携带者(asymptomatic HBsAg carrier, ASC)、慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者, 应用测序法检测 HBV 位点变异; 运用病例对照研究方法, 以 ASC 组为对照, 研究乙肝病毒核心启动子区的变异与乙肝相关疾病发生间的关系。应用非条件 Logistic 回归法分析校正年龄和性别后 HBV 变异在 CHB、LC 和 HCC 发生中的风险。**结果** HCC 组中除 T1768A 变异外, 其余变异位点的变异频率均大于 30%, 而在 ASC 组中无变异位点的变异频率超过 30%; 7 个变异位点在 4 组人群中变异频率均逐渐增高($P_{\text{trend}} < 0.001$); 除 T1768A 位点外, 其余变异在 CHB、LC 和 HCC 组中的校正比值比(adjusted odds ratio, AOR)均逐渐增加, A1762T/G1764A 双突变在 HCC 发生中的 AOR 为 13.91(95%CI 9.66~20.03); HBV BCP 区位点累积变异频率在乙肝相关疾病进展过程逐渐递增($P_{\text{trend}} < 0.001$)。**结论** 随着 HBV BCP 区变异在 HBV 相关肝病进展过程中逐渐累加, 终末期肝病的发病风险增加; HBV BCP 区变异可作为早期预测 HBV 相关终末期肝病发生的潜在分子标记物。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 突变; 肝肿瘤; 肝细胞癌; 慢性乙型肝炎; 肝硬化

[中图分类号] R 512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)09-0929-05

Frequencies and risk of basic core promoter region mutations of HBV in HBV-related liver diseases

ZHANG Min-feng^{1△}, QIAN Pei-xin^{2△}, PU Rui³, HAN Xue⁴, ZHANG Hong-wei³, YANG Jia-mei¹, YIN Jian-hua^{3*}

1. Department of Special Treatment, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Clinical Diagnosis, The First People's Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China
3. Department of Epidemiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
4. Center for Disease Control and Prevention of Yangpu District, Shanghai 200090, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the frequencies and risk of HBV mutations in basic core promoter (BCP) region in HBV-related liver diseases. **Methods** This case-control study enrolled a total of 2,093 cases, including asymptomatic HBV carriers (ASC), chronic hepatitis B (CHB) patients, liver cirrhosis (LC) patients and hepatocellular carcinoma (HCC) patients. HBV mutations were detected by DNA sequencing method. The association of HBV mutations with the risks of CHB, LC, and HCC was evaluated by non-conditional Logistic regression model adjusted for age and sex as compared to ASCs. **Results** The frequencies of all the HBV mutations, except for T1768A mutation, in the HCC patients were higher than 30%; while all the HBV mutations frequencies were lower than 30% in ASCs. The frequencies of all the 7 HBV mutations gradually increased in ASCs, CHB, LC, and HCC groups in order ($P_{\text{trend}} < 0.001$). The adjusted odds ratios (AOR) of all the HBV mutations, except for T1768A, were gradually increased in the CHB patients, LC patients, and HCC patients in order compared to ASCs. It was found that A1762T/G1764A was associated with HCC (AOR=13.91; 95%CI=9.66-20.03). The

[收稿日期] 2013-05-10 **[接受日期]** 2013-07-25

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(13ZR1449000). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (13ZR1449000).

[作者简介] 张敏峰, 硕士, 住院医师. E-mail: dr-zmf@hotmail.com; 钱培新, 主管检验技师. E-mail: zjgqpx@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871061, E-mail: hawkyjh163@163.com

cumulative frequency of HBV mutations in the BCP region gradually increased with progression of hepatitis B-related diseases ($P_{\text{trend}} < 0.001$). **Conclusion** HBV mutation frequencies in the BCP region gradually accumulate during the progression HBV-related liver diseases, which finally leads to end-stage liver diseases. These HBV mutations can be used for early prediction of HBV-related end-stage liver disease.

[Key words] hepatitis B virus; mutation; liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; chronic hepatitis B; liver cirrhosis
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(9): 929-933]

乙型肝炎(hepatitis B virus, HBV)的慢性感染所导致的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)给我国居民带来了沉重的负担。2006年全国肝炎血清流行病学调查结果显示我国乙肝HBsAg流行率为7.18%^[1],据此估计我国约有9400万乙肝感染者。因此,预防HBV慢性感染所致终末期肝病的发生是我国公共卫生的重大需求。目前有研究表明乙肝癌转化过程中不同疾病阶段存在基因型特异性变异谱,尤其是HBV核心启动子区(basic core promoter, BCP)的变异与乙肝相关疾病的进展密切相关^[2-3]。前瞻性队列研究表明A1762T/G1764A双突变能够早期预测HBV相关HCC的发生^[2-3]。因此,本研究通过大样本的病例对照研究设计,收集HBV无症状携带者(asymptomatic HBsAg carrier, ASC)、CHB、LC和HCC人群样本,研究BCP区高风险变异位点在不同乙肝相关疾病中的变异频率;以ASC为对照,CHB、LC和HCC为病例,评估乙肝病毒变异在终末期肝病发生中的风险以及作为分子标记物的价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 HBV无症状携带者选取2006年10月至2012年3月来自浙江省湖州市、上海市杨浦区和江苏省张家港地区的社区队列人群;CHB患者选取2006年10月至2010年11月在上海长海医院、上海长征医院、江苏省张家港市第一人民医院住院的慢性乙肝患者;LC患者收集上海长海医院、上海长征医院、江苏省张家港市第一人民医院和山东泰安解放军第88医院在2008年10月至2011年11月初次诊断为LC的住院患者;HCC患者选取2007年12月至2010年12月在上海东方肝胆外科医院和江苏省张家港市第一人民医院初次诊断为HCC的住院患者。纳入和排除标准如文献所述^[4-5]。采集外周静脉血5 mL, $3\ 000 \times g$ 离心10 min,收集血清-80℃保存。所有研究对象经血清学检查,均无甲型肝炎、丙型肝炎和HIV抗体阳性。所有研究对

象均知情同意并签署知情同意书。本研究得到第二军医大学医学伦理委员会审核批准。

1.2 样本量估计 根据非匹配病例对照研究设计估计样本量含量,病例组:对照组为1:3,根据文献估计对照组平均变异率为0.1^[2-3],比值比(odds ratio, OR)=3,计算后病例组每组最低样本量为135例,对照组最低样本量为405例。

1.3 乙肝标记物及HBV DNA载量的检测 乙肝标记物检测采用酶联免疫吸附法检测试剂盒(科华生物工程有限公司,上海);HBV DNA定量采用TaqMan探针法,试剂盒购自深圳匹基生物有限公司,仪器采用Roche公司LightCycler480仪器(德国)。

1.4 HBV基因型及变异检测 HBV基因型检测采用已建立的型特异性引物多重PCR方法鉴定^[4]。HBV变异检测:采用巢式PCR法对HBV基因组的BCP区扩增^[2],挑选条带清晰且单一的PCR目的产物经纯化后送上海迈浦生物科技有限公司,采用ABI 3730基因分析仪进行产物直接双向测序。

1.5 统计学处理 采用MEGA 5.0和Bioedit 7.0软件进行序列分析。应用SPSS 18.0软件(SPSS 18.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL)进行数据录入和统计学分析。采用 χ^2 检验比较分析分类变量,如性别、HBsAg、HBV突变在各组间的分布。采用独立样本 t 检验或方差分析比较计量资料,如年龄等在组间的差异,非正态分布的计量资料如HBV DNA和ALT,经对数转换后再进行Student's t 检验或方差分析的比较。OR的计算采用非条件Logistic回归模型,同时加入年龄和性别两个最常见的混杂因素后获得HBV变异位点的校正OR值。本研究中所有检验均为双侧检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 样本人群的一般临床资料及病毒学特征 共成功获得2093例患者的HBV病毒BCP区序列,其中包括848例ASC患者、369例CHB患者、316例

LC 患者和 560 例 HCC 患者。4 组不同乙肝相关疾病的平均年龄、性别、HBeAg 阳性和基因型构成等差异均有统计学意义(表 1)。

表 1 不同乙肝相关疾病样本的临床及病毒学特征

Tab 1 Clinical and virus characters of patients with different HBV-related diseases

Characteristics	ASC(N=848)	CHB(N=369)	LC(N=316)	HCC(N=560)	P value
Age ^a (year)	29.35±16.68	41.81±14.60	50.44±10.73	52.32±11.24	<0.001
Male n(%)	498(58.7)	260(70.5)	244(77.2)	455(81.3)	<0.001
HBV genotype n(%)					<0.001
B	285(33.6)	83(23.5)	68(22.7)	89(16.8)	
C	562(66.4)	270(76.5)	232(77.3)	440(83.2)	
ALT ^a $\bar{x}_B/(U \cdot L^{-1})$	22.00±9.77	153.62±243.45	116.64±193.06	81.27±154.09	<0.001
HBeAg n(%)					<0.001
Negative	339(40.1)	148(42.5)	171(64.5)	341(63.0)	
Positive	507(59.9)	200(57.5)	94(35.5)	200(37.0)	
HBV DNA levels ^a (log ₁₀ copies/mL)	4.19±2.19	4.91±1.91	4.30±1.43	4.62±1.45	<0.001

^a: $\bar{x} \pm s$. ASC: asymptomatic hepatitis B surface antigen carrier; CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; HCC: hepatocellular carcinoma; ALT: alanine aminotransferase

2.2 HBV 变异频率在 4 组人群中的分布 共检测了 7 个文献所报道的与 HBV 所致 LC 和 HCC 密切相关的 HBV 变异位点。结果(图 1)发现:HCC 组中除 T1768A 变异外,其余变异位点的变异频率均大于 30%,而在 ASC 组中变异位点的变异频率均低于 30%;在 CHB 和 LC 组中除 A1762T/G1764A 外,其余变异位点均低于 30%;7 个变异位点在 4 组人群中其变异频率均逐渐增高($P_{trend} < 0.001$)。

外,其余位点变异在 CHB、LC 和 HCC 组中的校正比值比(adjusted odds ratio, AOR)值均逐渐增加。A1762T/G1764A 双突变在 HCC 发生中的 AOR 为 13.91(95%CI 9.66~20.03)。

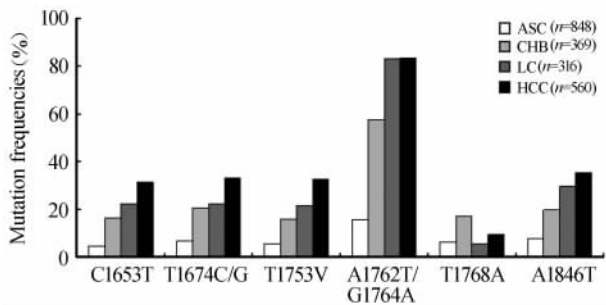


图 1 HBV BCP 变异在 ASC、CHB、LC 和 HCC 组中的发生频率

Fig 1 Frequencies of HBV BCP mutations in ASC, CHB, LC, and HCC groups

ASC: asymptomatic hepatitis B surface antigen carrier; CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; HCC: hepatocellular carcinoma

2.3 HBV 变异在乙肝相关疾病进展中的风险 以 ASC 组为对照,分析 HBV 变异在 CHB、LC 和 HCC 组中的风险,结果(图 2)显示:除 T1768A 位点

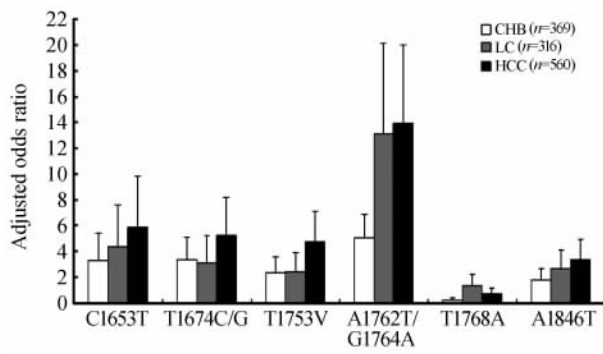


图 2 以 ASC 为对照分析 HBV Enhancer II /BCP/PC 区变异与 CHB、LC、HCC 的关系

Fig 2 The adjusted odds ratio of HBV Enhancer II /BCP/PC mutations in CHB, LC, and HCC compared to ASC

ASC: asymptomatic hepatitis B surface antigen carrier; CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; HCC: hepatocellular carcinoma. $\bar{x} \pm s$

2.4 HBV BCP 区位点的累积变异频率在乙肝相关疾病中的分布 结果(图 3)表明:分析 C1653T、T1674C/G、T1753V、A1762T/G1764A 和 A1846T 的总体变异在各疾病组中的频率,结果发现 HBV BCP 区位点累积变异频率在乙肝相关疾病进展过程逐渐递增($R^2 = 0.8804$, $P_{trend} < 0.001$)。

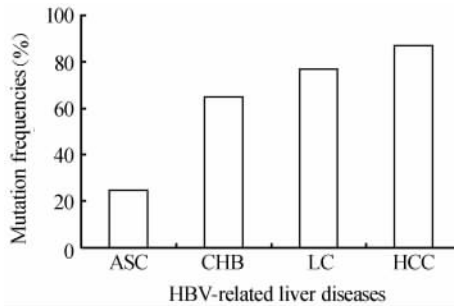


图3 HBV BCP 区位点在乙肝相关疾病中的累积变异频率

Fig 3 The cumulative HBV BCP mutation frequencies in HBV-related liver diseases

ASC: asymptomatic hepatitis B surface antigen carrier; CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; HCC: hepatocellular carcinoma

3 讨论

本研究采用大样本的非匹配病例对照设计,共纳入 2 093 例样本分析 HBV BCP 区域的变异频率在不同乙肝相关疾病人群中的分布,结果发现纳入研究的 7 个位点的变异频率在乙肝的致癌过程中逐渐递增,且除 T1768A 位点外,HCC 组中的变异频率均超过 30%,与之前文献报道的结果^[2,6-7]一致。结果提示 HBV 变异与 HCC 的发生密切相关,随着 HBV 相关肝病的进展,HBV 变异对终末期肝病的风险逐渐增加,可通过 HBV 变异的检测早期预测 HCC 的发生。一些 HBV 的变异频率会随着年龄的增加而增高,且在终末期肝病中,男性多于女性^[3,8]。因此,在此类研究中年龄和性别是最主要的混杂因素。本研究中 ASC 组人群的年龄和男性比例均低于其余 3 组 HBV 患者。因此,本研究在分析 HBV 变异与 HBV 相关疾病的风险时把年龄和性别作为混杂因素进行校正,校正后的结果同样显示出 HBV 变异风险在肝病进展过程中逐渐增高,并且变异的累积频率逐渐增加,至 HCC 发生时,HBV 累积变异率可达到 86.8%,发病风险增加到 13.91,提示可通过多个 HBV 变异位点的联合检测预测终末期肝病的发生。

HBX 蛋白 C 端是由核心启动子区域编码而成的, C1653T、T1674C/G、T1753V、A1762T 和 G1764A 等变异分别导致 aa94 (H-to-T)、aa101 (S-to-A/P)、aa127 (I-to-T/N/S)、aa130 (K-to-M) 和 aa131 (V-to-I) 等氨基酸的变化,进而导致 HBX 蛋白变异。HBX 蛋白变异尤其是 C 端缺失在 HCC

癌组织中的频率较高^[9-10]。大多数截短型 HBX 蛋白不能再抑制细胞增殖和转化,但仍保留了与 p53 的结合能力并减弱 DNA 的修复能力和 p53 介导的凋亡,这给癌前病变的肝细胞或肝癌细胞提供了一个选择克隆的优势并有助于肝癌的进一步发展^[11]。目前,HBX 蛋白 C 端的氨基酸变化在肝细胞癌变中的作用尚不清楚。但近期一项研究表明 HCC 患者术后抗病毒治疗预防复发失败的原因可能与 HBX 蛋白变异相关^[12]。研究证明,核心启动子区域的 1762/1764 双突变能够影响病毒复制,而高病毒滴度是 HCC 发生和术后复发的最重要危险因素^[13-18]。高病毒滴度会引起 HBV 核心启动子区域的变异从而成为 HBV 相关 HCC 发生的重要原因之一。Enhancer II /BCP/PC 区的 HBV 变异是在 HBV 慢性感染阶段通过 HBV 与宿主相互作用并被选择出来的,从而驱动宿主肝脏癌变过程;也有可能是变异的 X 蛋白反式激活了那些可推动 HCC 发生的宿主癌基因或在肝脏癌变阶段宿主的某些癌基因编码的反式作用因子选择出特异的 HBV 变异。基因型 C 是 HCC 的独立危险因素,C 型病毒核心启动子区域的变异也同样是 HCC 的危险因素^[2]。HBV 变异发生后改变转录因子结合位点^[19],从而促进病毒与宿主的交互作用,包括促进 HBV 相关 HCC 的发生、病毒的复制、癌基因的反式激活和致癌过程^[7, 20-21]。

本研究通过大样本的病例对照研究表明,HBV BCP 区的变异与 HBV 相关肝病的进展密切相关,随着 HBV BCP 区变异在 HBV 相关肝病的进展过程中逐渐累加,终末期肝病的发病风险增加,可作为早期预测 HBV 相关终末期肝病发生的潜在分子标记物。但是还需要开展前瞻性队列研究来进一步验证其能否成为早期预测 HCC 发生的分子标记物。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Liang X, Bi S, Yang W, Wang L, Cui G, Cui F, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2009, 27: 6550-6557.
 [2] Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma

- ma[J]. *Am J Gastroenterol*,2011,106:81-92.
- [3] Yang H I, Yeh S H, Chen P J, Iloeje U H, Jen C L, Su J, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*,2008,100:1134-1143
- [4] Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y, et al. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area[J]. *Carcinogenesis*,2008,29:1685-1691.
- [5] 殷建华,何永超,李成忠,周 贇,张宏伟,曹广文. 乙型肝炎病毒感染相关疾病中病毒基因型和亚型的分布及其与临床指标的关系[J]. *第二军医大学学报*,2008,29:1-5.
- Yin J H, He Y C, Li C Z, Zhou Y, Zhang H W, Cao G W. Distribution of HBV genotypes and subgenotypes in patients with chronic hepatitis B, hepatocellular carcinoma, asymptomatic HBV carriers and its clinical relevance[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2008,29:1-5.
- [6] Liu S, Xie J, Yin J, Zhang H, Zhang Q, Pu R, et al. A matched case-control study of hepatitis B virus mutations in the preS and core promoter regions associated independently with hepatocellular carcinoma[J]. *J Med Virol*,2011,83:45-53.
- [7] Xie J, Zhang Y, Zhang Q, Han Y, Yin J, Pu R, et al. Interaction of signal transducer and activator of transcription 3 polymorphisms with hepatitis B virus mutations in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*,2013,57:2369-2377.
- [8] Cheng H, Su H, Wang S, Shao Z, Men K, Li M, et al. Association between genomic heterogeneity of hepatitis B virus and intrauterine infection[J]. *Virology*,2009,387:168-175.
- [9] Wang Y, Lau S, Sham J, Wu M, Wang T, Guan X. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis[J]. *Oncogene*,2004,23:142-148.
- [10] Chen G, Li M, Ho R, Chak E C, Lau W Y, Lai P B. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Virol*,2005,34:7-12.
- [11] Hussain S P, Schwank J, Staib F, Wang X W, Harris C C. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer [J]. *Oncogene*,2007,26:2166-2176.
- [12] Yin J, Li N, Han Y, Xue J, Deng Y, Shi J, et al. Effect of antiviral treatment with nucleot(s)ide analogues on postoperative prognosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a two-stage longitudinal clinical study[J]. *J Clin Oncol*,2013, doi: 10.1200/JCO.2013.51.8381
- [13] Chen C J, Yang H I, Su J, Jen C L, You S L, Lu S N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level[J]. *JAMA*,2006,295:65-73.
- [14] Wu C F, Yu M W, Lin C L, Liu C J, Shih W L, Tsai K S, et al. Long-term tracking of hepatitis B viral load and the relationship with risk for hepatocellular carcinoma in men[J]. *Carcinogenesis*,2008,29:106-112.
- [15] Chan H L, Tse C H, Mo F, Koh J, Wong V W, Wong G L, et al. High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*,2008,26:177-182.
- [16] Yu M W, Yeh S H, Chen P J, Liaw Y F, Lin C L, Liu C J, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men [J]. *J Natl Cancer Inst*,2005,97:265-272.
- [17] Parekh S, Zoulim F, Ahn S, Tsai A, Li J, Kawai S, et al. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants[J]. *J Virol*,2003,77:6601-6612.
- [18] Hung I F, Poon R T, Lai C L, Fung J, Fan S T, Yuen M F. Recurrence of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma is associated with high viral load at the time of resection[J]. *Am J Gastroenterol*,2008,103:1663-1673.
- [19] Xie J, Zhao J, Yin J, Zhang Q, Pu R, Lu W, et al. Association of novel mutations and heplotypes in the preS region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma[J]. *Frontier Medicine China*,2010,4:419-429.
- [20] Long Y, Chen E, Liu C, Huang F, Zhou T, He F, et al. The correlation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha and 3 beta with hepatitis B virus replication in the liver of chronic hepatitis B patients[J]. *J Viral Hepat*,2009,16:537-546.
- [21] Yanagiya A, Svitkin Y V, Shibata S, Mikami S, Imataka H, Sonenberg N. Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap[J]. *Mol Cell Biol*,2009,29:1661-1669.