

乙型肝炎病毒 BCP 联合点突变与中医证型的关系

周 飞 王灵台 陈建杰 赵 钢 张 斌

摘要 目的 观察乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基本 C 区启动子(basal core promoter, BCP)联合点突变与中医证型的关系。**方法** 收集未经拉米夫定及干扰素治疗的 HBV DNA 阳性慢性乙型肝炎患者 102 例,分为湿热中阻型、肝郁脾虚型、肝肾阴虚型、脾肾阳虚型和瘀血阻络型,分别检测血清 HBV DNA、肝脏生化指标及 BCPnt 1762A-T 和 nt 1764G-A 联合点突变。**结果** 实证组的变异株检出率明显高于虚证组,其中湿热中阻型患者变异株的检出率最高。**结论** 实证者可能较易发生 BCP 联合点突变,其中湿热中阻型患者可能更为显著。

关键词 乙型肝炎病毒;基因变异;辨证分型

Relationship between Basal Core Promoter Combined Point Mutation of Hepatitis B Virus and TCM Syndrome Type ZHOU Fei, WANG Ling-tai, CHEN Jian-jie, et al *Department of Hepatopathy, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200021)*

Abstract Objective To investigate the relationship between basal core promoter (BCP) combined point mutation of hepatitis B virus (HBV) and TCM syndrome type. **Methods** One hundred and two patients with chronic hepatitis with positive HBV DNA and hadn't ever been treated by Lamivudine and interferon were differentiated according TCM syndrome differentiation into 5 types, two excess types (damp-heat blocking Zhong-jiao type and blood stasis blocking collaterals type) and three deficiency types, Gan-stagnation with Pi-deficiency type, Gan-Shen Yin-deficiency type and Pi-Shen Yang-deficiency type. The serum HBV DNA, hepatic biochemical indexes, and the mutation of BCPnt 1762A-T and nt1764G-A combined point were determined, respectively. **Results** The variant strain positive rate detected in the excess type was significantly higher than that in the deficiency type, the highest rate appeared in patients of damp-heat blocking Zhong-jiao type. **Conclusion** BCP combined point mutation may be liable to happen in patients of TCM excess type, especially in patients of damp-heat blocking Zhong-jiao type.

Key words hepatitis B virus; gene mutation; syndrome differentiation

HBV 是一种高度变异的病毒,病毒变异后往往引起抗原性和致病性的改变。本研究通过检测未经拉米夫定及干扰素治疗的 HBV DNA 阳性慢性肝炎患者基本 C 区启动子(basal core promoter, BCP)核苷酸 nt1762A-T 和 nt1764G-A 联合点突变,来观察它与中医证型的关系。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 西医诊断标准 按 2000 年(西安)中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎的诊断标准》^[1]。

1.2 中医辨证标准及分型 按 1991 年天津会议

制定的《病毒性肝炎中医辨证标准(试行)》^[2],分为湿热中阻型、肝郁脾虚型、肝肾阴虚型、脾肾阳虚型和瘀血阻络型。实证包括湿热中阻型和瘀血阻络型,虚证包括肝郁脾虚型、肝肾阴虚型和脾肾阳虚型。

2 临床资料 病例均为曙光医院肝病科自 2001 年 7 月—2003 年 7 月的门诊或住院患者,共 102 例,男 52 例,女 50 例,年龄 21~59 岁,平均(40.21±11.22)岁,病程 8 个月~16 年,平均(5.35±3.42)年。另外选择 30 名各型肝炎病原学标志检测均为阴性的健康体检者为健康对照组,男 18 名,女 12 名,年龄 22~55 岁,平均(39.24±12.62)岁。

3 观察指标

3.1 血清 HBV DNA 的检测 采用核酸扩增(PCR)荧光定量检测,试剂购自上海复星实业股份有限公司。用 FX-990 荧光检测仪。

3.2 肝脏血清生化指标的检测 丙氨酸氨基转

作者单位:上海中医药大学附属曙光医院肝病科(上海 200021)

通讯作者:周 飞, Tel: 021-53821650 转 782, E-mail: zhoufeii@hotmail.com

移酶(ALT)和门冬氨酸氨基转移酶(AST)采用酶动力学法;总胆红素(TBIL)采用碘酸法;白蛋白(ALB)采用溴甲酚绿法。

3.3 血清 BCPnt1762A-T 和 nt1764G-A 联合点突变的检测 方法参考文献^[3]。试剂购自第一军医大学基础部生物医学诊断研究中心。550 型酶标仪及基因扩增仪。

4 统计学方法 采用美国 SPSS 软件进行统计处理。计数资料采用 χ^2 检验,各组间的两两比较时检验水准采用 $\alpha' = 2\alpha/(K - 1)$,其中 $\alpha = 0.05$,K 为样本率的个数;计量资料采用方差分析。

结 果

1 BCP 联合点突变与中医虚实证的关系 见表 1。慢性肝炎患者中,实证组与虚证组比较,变异株的检出率差异有显著性($P < 0.01$)。

表 1 中医虚实证的 BCP 联合点突变检测结果 [(%)]

组别	例数	变异株	野生株
实证	湿热中阻	43 23(53.49) [△]	20(46.51)
	瘀血阻络	9 4(44.44)	5(55.56)
	合计	52 27(51.92) [*]	25(48.08)
虚证	肝郁脾虚	30 3(10.00)	27(90.00)
	肝肾阴虚	12 2(16.67)	10(83.33)
	脾肾阳虚	8 1(12.50)	7(87.50)
	合计	50 6(12.00)	44(88.00)

注:与虚证组合计比较,^{*} $P < 0.01$;与肝郁脾虚型比较,[△] $P < 0.01$

2 BCP 联合点突变与中医证型的关系 见表 1。慢性乙型肝炎患者中,湿热中阻型患者变异株的检出率最高(53.49%),而肝郁脾虚型患者变异株的检出率最低(10.00%),两组比较差异有显著性($P < 0.01$)。BCP 联合点突变检出率由高到低依次为湿热中阻型、瘀血阻络型(44.44%)、肝肾阴虚型(16.67%)、脾肾阳虚型(12.50%)和肝郁脾虚型(10.00%)。

3 BCP 联合点突变与肝功能的关系 见表 2。慢性肝炎患者中,实证各组及虚证各组的 ALT、AST 及 TBIL 水平明显高于健康对照组,但 ALB 水平低于健康对照组。实证变异株组的 ALT、AST 及 TBIL 水平高于实证野生株组,与虚证变异株组比较也显著升高。虚证变异株组与野生株组的 ALT、AST 及 TBIL

水平相当,差异无显著性。结果提示实证组肝脏炎症活动较虚证组重,尤以实证变异株组为明显,而虚证组肝脏炎症活动较轻。

讨 论

HBV 基因组系双股环状 DNA,核苷酸长度大约为 3 200 个碱基对(bp),其 DNA 复制是通过前基因组 RNA 利用病毒本身的 DNA 多聚酶(DNAP)以逆转录的方式合成负链 DNA,然后是正链 DNA。而在逆转录过程中所需的 DNAP 缺乏校正功能,同时,由于 HBV 承受宿主巨大的免疫压力和抗病毒药物的使用,使 HBV 的变异性比较高,其突变率较一般 DNA 病毒要高 4 个数量级。1986 年法国 Wands 等首先报道了有别于已知 HBV 毒株的变异株。

上世纪 90 年代初期研究表明,第 1762 位核苷酸 A 变为 T,第 1764 位核苷酸 G 变为 A 的联合点突变[即 X 基因/C 基因启动子(nt1743 - 1849)变异]^[4]而影响 HBV 合成分泌 HBeAg,但不影响病毒复制,因而血清中检测不到 HBeAg,但存在病毒复制。HBeAg 阴性慢性乙型肝炎呈现全世界分布,特别是在总人群中慢性 HBV 感染率较高(>2%),且 HBV 感染主要发生于儿童时期的地区,HBeAg 阴性慢性乙型肝炎较为普遍。例如,地中海地区 2/3 成年慢性乙型肝炎患者为 HBeAg 阴性^[5],而且发生率随着年龄的增长而增高。

Okamoto 等^[4]在抗 HBe 阳性的慢性肝炎中 C 基因启动子变异的检出率为 71%(22/31),同时也发现有 C 基因启动子变异的患者,其体内 HBV DNA 水平明显高于野生株感染者。研究结果认为 BCP 的联合点突变不能完全阻断 e 抗原表达,但可明显增强病毒的复制。Buckwold 等^[6]认为,BCP 联合点突变消除了原有的核结合位点,创造了新的肝脏增强转录因子结合位点,使病毒复制增加,这就是 BCP 变异株在 HBV 慢性感染中具有选择优势的重要原因。

中医学认为,慢性乙型肝炎患者中,湿热疫毒之邪偏胜,若正气盛,邪正斗争剧烈,临床表现即以实证证候为主。如机体正气不足,邪正斗争并不剧烈,无力抗邪,邪恋不去,临床表现即以虚证或虚实夹杂证候为主。

表 2 BCP 联合点突变与肝功能的关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μ mol/L)	ALB(g/L)
实证	变异株	27 190.37 $\pm$ 68.37 ^{*△▲}	176.39 $\pm$ 64.53 ^{*△▲}	82.37 $\pm$ 14.82 ^{*△▲}	32.85 $\pm$ 4.33 [*]
	野生株	25 127.38 $\pm$ 30.94 [*]	136.54 $\pm$ 31.19 [*]	69.45 $\pm$ 10.56 [*]	35.84 $\pm$ 3.65 [*]
虚证	变异株	6 69.77 $\pm$ 17.63 [*]	61.54 $\pm$ 16.78 [*]	25.39 $\pm$ 6.78 [*]	36.14 $\pm$ 3.79 [*]
	野生株	44 66.38 $\pm$ 14.33 [*]	59.38 $\pm$ 16.44 [*]	25.12 $\pm$ 7.18 [*]	36.17 $\pm$ 4.82 [*]
健康对照	30	20.36 $\pm$ 6.49	22.71 $\pm$ 5.78	10.18 $\pm$ 6.42	45.56 $\pm$ 4.84

注:与健康对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与实证野生株组比较,[△] $P < 0.01$;与虚证变异株组比较,[▲] $P < 0.05$

本课题研究表明,BCP 联合点突变中,实证组的变异株检出率明显高于虚证组;湿热中阻型患者变异株的检出率最高;实证组肝脏炎症活动较虚证组重,尤以实证变异株组为明显。

慢性乙型肝炎患者的细胞免疫和体液免疫功能有差别。湿热中阻型实证者细胞免疫功能高于正常者,而肝肾阴虚型和肝郁脾虚型属虚证者细胞免疫功能均低下。实证患者机体的免疫功能亢进,T 细胞处于活化状态,体内的 HBV 受到 T 细胞(尤其 CTL)较强的免疫攻击。在这种免疫压力下,部分 HBV 可能发生变异,从而逃避机体的免疫清除,并逐渐成为优势毒株。虚证患者免疫功能低下,感染 HBV 后并没有很强的免疫应答来清除病毒,HBV 发生变异的可能性很小,但可能一开始就感染了 HBV 变异株,因此虚证中也有变异株的检出。

参 考 文 献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000;8(6):324—329.
Chinese Society of Infectious and Parasitic Diseases, and Chinese Society of Hepatitis, Chinese Medical Association. The programme of prevention and cure of viral hepatitis. Chin J Hepatol 2000;8(6):324—329.

- 2 中国中医药学会内科肝病专业委员会.病毒性肝炎中医辨证标准(试行).中医杂志 1992;33(5):295.
Chinese Society of Hepatitis, China Association of Chinese Medicine. Standards of Syndrome differentiation on virus hepatitis(Trial). J TCM 1992;33(5):295.
- 3 王 虹,万成松,王省良,等.采用 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究.中华微生物学和免疫学杂志 2001;21(2):234—236.
Wang H, Wan CS, Wang SL, et al. Study on genotypes of HBV DNA using PCR microplate hybridization-ELISA. Chin J Microbiol Immunol 2001;21(2):234—236.
- 4 Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, et al. 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(12):8102—8110.
- 5 Hadziyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition and treatment. J Virol Hepatitis 1995;1:7.
- 6 Buckwold VE, Xu Z, Yen TS, et al. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. J Gen Virol 1997; 78 (Pt 8) : 2055—2065.

(收稿:2004-06-08 修回:2005-03-08)

《冉雪峰医著全集》(3 卷)

定价 360.00 优惠价 280.00

冉雪峰先生,六世医传,早在 20 世纪 30 年代,医坛已有“南冉北张”(南冉:冉雪峰,北张:张锡纯)之誉。冉先生七十年如一日,潜心中医学,於近世中医学界,影响深远。本书由其子冉先德率同门下高足,合数十人之力,费时 3 年,将冉先生的全部遗著加以整理,精心订正,仔细核对,完成此书。全书约 300 万余言,纳《医经》、《方药》、《临证》3 卷。

《秦伯未医学名著全书》

定价 158.00 优惠价 136.00

理论高深 说理透彻 临床实用 思路开阔
上篇 增补《谦斋医学讲稿》(新增 37 篇)
中篇 谦斋专著汇编 《治疗格言》
《中医入门》、《中医临证备要》、《内经类证》
·《清代名医医案精华》、《金匱要略杂病浅说》
《清代名医医话精华》、《内经知要浅解》
下篇 谦斋医案荟萃 内科、妇科、儿科、膏方

《中华医典》电子光盘

简体版 350 元 优惠价:298 元 繁体版 398 元 优惠价:358 元

袁沛然、王永炎、邓铁涛等编审 中国中医学会监制
收录民国以前历代医学古籍 725 部,2.8 亿字,分为本草方药、临床医案、医经养生、综合医集四大部分,从中可以查找你想要的任何疾病、中药、中医名词、诊疗方法等,可打印拷贝,设置了“名医”、“名药”、“名著”、“名方”、“名言”、“名词”六个部分的检索,巨大的容量使您能纵览数千年中华医学之大成。

一套经典巨著在手 中西医临床各科诊疗方案任你拥有

《中国中西医结合临床全书》

定价 480.00 元 优惠价:288.00 元 豪华精装 700 万字

顾问 崔月犁 董建华 陈可冀 高耀远 祝谌予 名著主编 陈敏章

我国中西医结合全科临床经典权威巨著,全书包括临床十一个学科(内、外、妇、儿、骨伤、皮肤、五官等)近千种病症,每病按概述、病因病理、临床表现、实验室及其他检查、并发症、诊断与鉴别诊断、中医辨证、西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗、预防护理等项详述,是迄今为止系统、全面、权威的中西医结合临床专著。该书问世后,好评如潮,连年畅销。

权威性 系统性 可视性 自主性 便捷性

中医学课程示范教学 VCD

伤寒论 70 盒 金匱要略 80 盒 中医基础理论 75 盒 中药学 83 盒
内经 77 盒 温病学 72 盒 中医诊断学 75 盒 方剂学 79 盒
每课优惠价 1050 元 全套 4000 元 每课优惠价 888 元 全套 3500 元

北京中医药大学等院校著名教授主讲,按照大学本科教材,对课文分门别类进行系统精讲,配有中文字幕,随堂摄录,看光盘如身临其境,进入大学课堂,随时随地打开 VCD 或电脑就可亲耳聆听知名教授、名师妙趣横生的讲授。

邮购办法:免费邮寄,汇款地址:北京 39 支局三想医药书店(北京五棵松·解放军医学图书馆内)。邮编:100039; 联系人:张 岩;
电话:(010)68234503、68234504(传真);66931860,万余种医学图书可供选购,函索即寄详细书目。http://www.sanxiangshudian.cn