

TẦN SUẤT ĐỘT BIẾN GEN pre-S CỦA VIRUT VIÊM GAN B TRÊN BỆNH NHÂN VIÊM GAN B MẠN TÍNH VÀ NGƯỜI MANG HBV MẠN TÍNH KHÔNG TRIỆU CHỨNG

Đỗ Văn Thành^{*}; Nguyễn Trọng Chính^{**}
Lê Hữu Song^{**}

TÓM TẮT

Để tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến (ĐB) gen pre-S của virus viêm gan B (HBV) với biểu hiện bệnh chúng tôi phân tích 77 mẫu, bao gồm: 30 người mang HBV mạn tính không triệu chứng (ASM) và 47 bệnh nhân (BN) viêm gan B mạn tính (CHB). Phân tích gen preS bằng kỹ thuật nhân gen (PCR), sau đó giải trình tự gen trực tiếp trên máy sequencing. 8/77 mẫu có ĐB gen vùng pre-S (10,38%), cao hơn ở nhóm CHB so với nhóm ASM (17,02% so với 0%, $p < 0,05$). Nồng độ HBV ADN trên nhóm ASM cao hơn có ý nghĩa so với nhóm CHB ($p < 0,05$). Như vậy, ĐB pre-S ở nhóm CHB thường gặp hơn so với nhóm ASM.

* Từ khóa: Đột biến gen; Virus viêm gan B.

FREQUENCY OF HEPATITIS B VIRUS pre-S GENE MUTATION IN CHRONIC HEPATITIS B AND ASSYMPTOMATIC CHRONIC HBV CARRIERS

SUMMARY

Using PCR-sequencing we analyzed 77 persistently infected patients, including 30 asymptomatic carriers (ASM) and 47 with chronic hepatitis B (CHB). Pre-S mutations were detected in 8 out of 77 cases (10.38%); it was more frequently found in the CHB group than in the ASM one (17.02% vs 0%, $p < 0,05$). HBV DNA in ASM group is significant higher in compared with CHB ($p < 0,05$). Thus, pre-S mutation is more frequency in CHB compared to ASM.

* Key words: Pre-S gene mutation; Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus viêm gan B là một virus có nhân ADN chứa 4 khung đọc mở, bố trí chồng ghép nhau, mã hoá cho protein X, ADN polymerase, nucleocapsid và vỏ (envelope). Protein vỏ (envelope) được hình thành bởi 3 cấu trúc gọi là protein lớn (L), trung gian

(M) và nhỏ (S). Protein S có 226 axit amin (aa), còn các protein M và L được hình thành do thêm đoạn aa đầu cuối với 55 aa của vùng pre-S2 và 108-119 aa của vùng pre-S1. Vùng pre-S là khu vực mà virus thâm nhập vào tế bào gan [1], tham gia điều hoà miễn dịch qua các quyết định kháng nguyên của tế bào lymphô T và B và kiểm

* Bệnh viện Bạch Mai

**Bệnh viện TWQĐ 108

Phản biện khoa học: GS.TS. Nguyễn Văn Mùi

soát tổng hợp các protein vỏ HBs trung gian (M) và nhỏ (S) thông qua vùng khởi động S.

Các protein L và M rất cần thiết cho chu kỳ nhân lên của HBV. Tuy nhiên, protein M lại

không cần thiết cho sự hình thành virut hoàn chỉnh, giải phóng virut và khả năng gây nhiễm trùng của virut [5]. Đột biến vùng Pre-S có 2 dạng chủ yếu: 1) Đột biến điểm tại vị trí bắt đầu của Pre-S2 dẫn đến HBV không có khả năng tổng hợp protein M và 2) Đột biến mất đoạn pre-S1 hoặc pre-S2 làm protein S ngắn lại. Mặc dù sinh bệnh học do đột biến pre-S vẫn chưa thực sự hiểu rõ nhưng đã có nhiều nghiên cứu chứng minh mối liên quan của đột biến này với mức độ tiến triển bệnh do nhiễm HBV [2]. Hơn nữa, đột biến mất đoạn pre-S cũng thường xuất hiện nhiều trên các quần thể có lưu hành dịch cao [3].

Nhiều nghiên cứu cho thấy viêm gan B mạn tính là nguyên nhân hàng đầu gây ung thư tế bào gan [4, 5]. Tuy nhiên, không phải tất cả BN nhiễm HBV đều gây ung thư gan, nhưng có thể gây nên nhiều thể bệnh khác nhau như người mang HBV mạn tính không triệu chứng, viêm gan cấp tính tự hồi phục, viêm gan mạn tính và xơ gan. Vậy nguyên nhân nào dẫn đến sự khác biệt đó cho đến nay vẫn còn chưa thực sự hiểu rõ. Việt Nam là nước nằm trong khu vực có tỷ lệ nhiễm HBV cao nhất với tỷ lệ nhiễm ở nữ nhi là 12,5%, trẻ em 18,4%, thanh thiếu niên 20,5% và người lớn 18,8%. Tỷ lệ đã từng nhiễm HBV ở người lớn lên tới 79,2% [6].

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến gen pre-S với thể lâm sàng nhiễm HBV.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Bảng 1: Đặc điểm cận lâm sàng của các nhóm nghiên cứu.

77 BN chia thành 2 nhóm: 30 người mang HBV mạn tính không triệu chứng và 47 BN viêm gan B mạn tính.

*Tiêu chuẩn chẩn đoán:

- Người mang HBV mạn tính: BN tình cờ phát hiện có HBsAg (+), không có bất kỳ triệu chứng lâm sàng nào, không có tổn thương gan (ALT bình thường).

- Viêm gan B mạn tính: tiền sử có HBsAg (+) > 6 tháng, ăn ngủ kém, mệt mỏi, gan to chắc, ALT tăng > 40 IU/ml, siêu âm gan có âm gan tăng, antiHBc (+) tít IgG (+).

2. Phương pháp nghiên cứu.

Theo phương pháp tiến cứu, mô tả cắt ngang.

Thực hiện xét nghiệm huyết học, sinh hoá, miễn dịch, siêu âm, X quang, mô bệnh học tại Bệnh viện TWQĐ 108.

Định lượng nồng độ HBV ADN tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108 theo nguyên lý Taqman, sử dụng công nghệ RT-PCR trên hệ thống ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Mỹ).

Giải trình tự gen Pre-S trên hệ thống giải trình tự gen CEQ 8800 Beckman Coulter (Mỹ).

Phân tích thống kê trên phần mềm phân tích gen Bioedit, CEQ 8000. Số lượng các mẫu có đột biến được đếm và tính toán so sánh trên phần mềm Stview 4.5.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu.

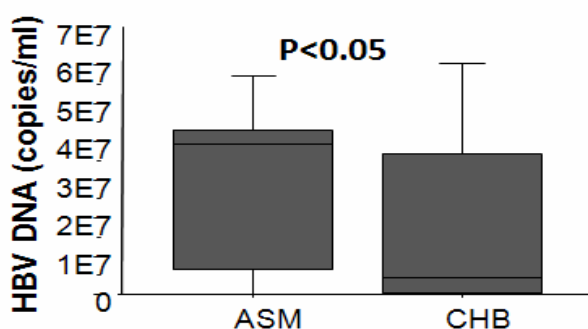
Tổng số 77 BN (52 nam và 25 nữ, tuổi trung bình 43,42, thấp nhất 15, cao nhất 65 tuổi).

CHỈ SỐ	NHÓM NGHIÊN CỨU	
	ASM (n = 30) (1)	CHB (n = 47) (2)
HBsAg (+/-)	30/0	47/0
HBeAg (+/-)	18/12	27/20
TC	256 ± 23	243 ± 34
AST	28 ± 3	435 ± 56*
ALT	27 ± 5	574 ± 75*
Bilirubin	13 ± 3	32 ± 5*
Albumin	43 ± 5	39 ± 3

Ghi chú: ASM = người mang HBV không triệu chứng; CHB = viêm gan B mạn tính; TC = tiểu cầu.

* So với nhóm người mang HBV mạn tính không triệu chứng, BN viêm gan B mạn tính có AST, ALT và bilirubin tăng hơn ($p < 0,01$).

2. Nồng độ HBV ADN trên 2 nhóm nghiên cứu.



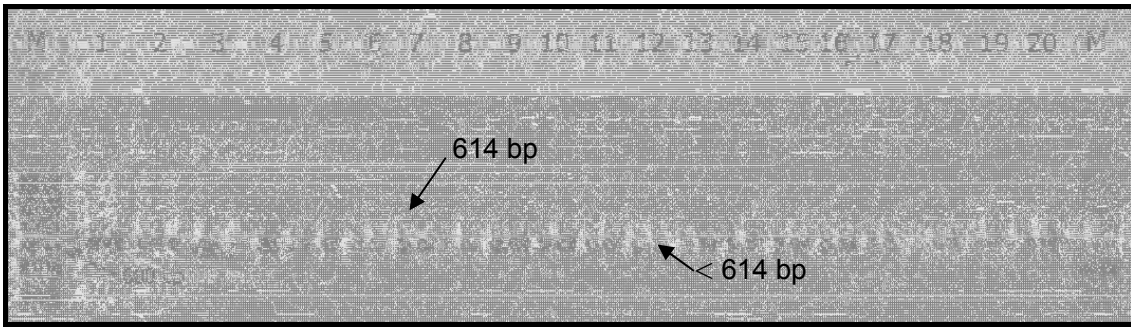
Hình 1: So sánh nồng độ HBV ADN trên 2 nhóm nghiên cứu. So với nhóm CHB, nhóm HBV mạn tính không có triệu chứng (ASM), nồng độ HBV- ADN cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$).

3. Kết quả khuếch đại đoạn gen Pre-S của HBV.

Các mẫu có nồng độ HBV ADN $>10^4$ được tiến hành nhân trực tiếp với cặp mồi HBprS inner F/R, những mẫu có nồng độ HBV ADN thấp hơn 10^4 được tiến hành nhân Nested PCR với cặp mồi ngoài HBprS outer F/R, sau đó mới tiến hành nhân với cặp mồi trong HBprS inner F/R. Sản

phẩm PCR sau cùng được điện di trên agarose 1%.

Kết quả phản ứng PCR: khuếch đại thành công vùng Pre-S của tất cả mẫu nghiên cứu. Hầu hết các mẫu đều cho sản phẩm như dự kiến, một số mẫu có sản phẩm PCR thấp hơn. Điều này khá phù hợp với một số báo cáo trước về khả năng mất đoạn nhỏ trong vùng Pre-S của HBV.

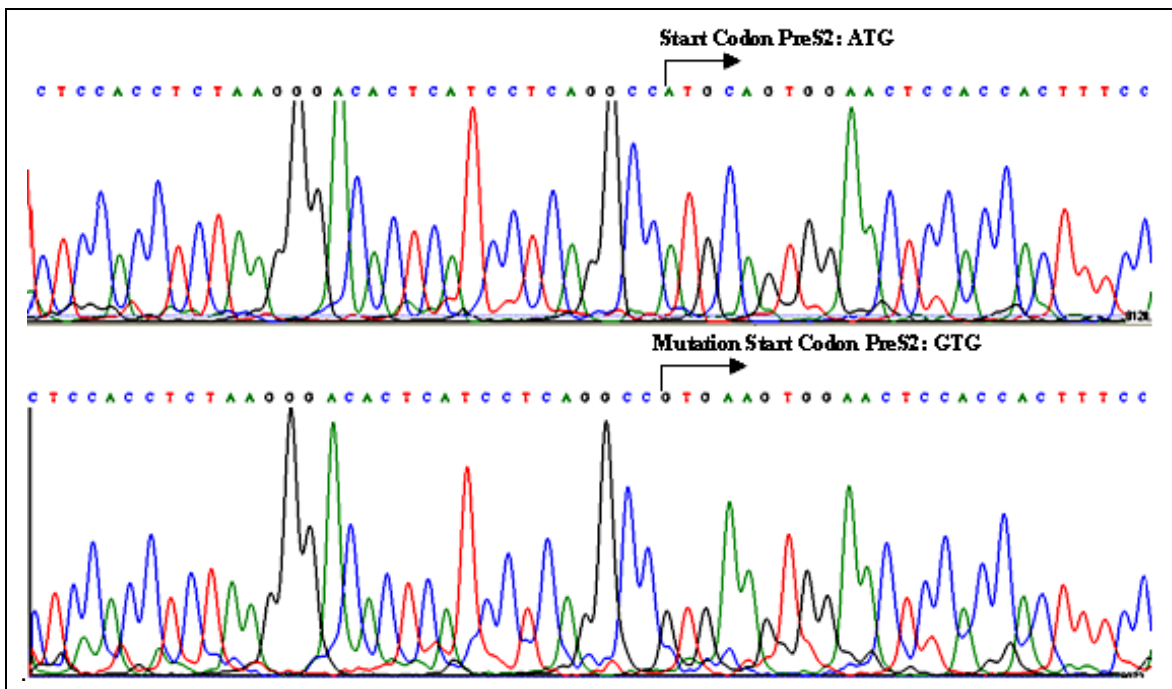


Hình 2: Minh họa một số kết quả kiểm tra điện di các sản phẩm PCR.

Sản phẩm PCR được nhân lên dự kiến có 614 bp. Trên hình có 2 mẫu kích thước nhỏ hơn 614 bp (mẫu 3 và 12). Những mẫu này nghi ngờ có đột biến mất đoạn. M: 100bp ADN ladder, 1~20: các mẫu nghiên cứu. Tất cả các mẫu đều được giải trình tự gen và khẳng định sau khi giải trình tự gen.

3. Kết quả giải trình tự gen Pre-S.

Để đảm bảo kết quả giải trình tự chính xác, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng Pre-S bằng cả chiều xuôi và chiều ngược, dùng phần mềm Bioedit để xác định chính xác chuỗi trình tự giải được.



Hình 3: Kết quả phân tích gen pre-S sau khi giải trình tự trên máy CEQ 8800, Beckman Coulter

So với mẫu chuẩn không có đột biến, mẫu số 2 có vị trí đột biến (A→G) tại bộ ba mã hoá axit amin methionine, đây là vị trí khởi đầu của đoạn pre-S2. Khi có đột biến này, protein pre-S2 không được tổng hợp. Kết quả là mất chức năng của pre-S2.

Bảng 2: Tần suất xuất hiện đột biến chung trên các nhóm.

NHÓM	ASM n = 30	CHB n = 47
Đột biến chung, n (%)	0 (0)	8 (17,02)
p	< 0,05	

8/77 mẫu phân tích có đột biến gen vùng pre-S (10,38%); tỷ lệ đột biến xuất hiện nhiều hơn trên nhóm CHB so với nhóm người mang HBV không triệu chứng (17,02% so với 0%, $p < 0,05$). Đột biến chung = tổng tất cả các dạng đột biến, bao gồm đột biến mất đoạn, đột biến điểm, đột biến tại vị trí bắt đầu Pre-S.

Đột biến tại vị trí bắt đầu của đoạn Pre-S2 là phổ biến nhất (63,6%), tiếp theo là đột biến mất đoạn Pre-S2 (22,7%), pre-S1 (9,1%) và đột biến mất đoạn Pre-S2 kết hợp đột biến điểm tại vị trí bắt đầu (4,6%). Không có đột biến nào tại các vùng S1 và vị trí bắt đầu của S được tìm thấy trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, do số liệu còn hạn chế nên chúng tôi không tiến hành phân tích phân bố các kiểu đột biến trên những nhóm BN khác nhau.

BÀN LUẬN

Nhiễm HBV có thể gây nên nhiều mức độ bệnh khác nhau từ người mang virus mạn tính không triệu chứng đến viêm gan cấp tính, viêm gan mạn tính, xơ gan và ung thư gan.

Nguyên nhân gây nên sự khác biệt về biểu hiện lâm sàng đó đến nay vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ. Tuy nhiên, có 2 giả thuyết được nhiều tác giả quan tâm, đó là vai trò của virus (liên quan đến kiểu gen, đột biến gen...) và các yếu tố nội tại của người bệnh (kháng nguyên bạch cầu người HLA lớp I, II, sự biến đổi đa hình của các gen mã hoá cytokine, chemokine, mannose-binding lectin, hoặc vitamin D receptor...).

Trong quá trình phát triển và nhân lên tự nhiên của virus có thể xuất hiện đột biến trên genome của chúng. Người ta thấy rằng, đột biến trên genome của HBV, đặc biệt là trên gen HBx, pre-S sẽ làm tăng nguy cơ phát sinh ung thư tế bào gan nguyên phát. Nghiên cứu trên 160 BN nhiễm HBV tại Nhật Bản cho thấy: 23% BN có đột biến tại vùng pre-S. Trong đó, đột biến mất đoạn tại vùng pre-S trên BN xơ gan và ung thư gan là 54% so với nhóm viêm gan mạn tính và người mang virus (31%). [8]. Một nghiên cứu khác được thực hiện tại 12 nước trên 387 BN (Việt Nam, Myanmar, Thái Lan, Trung Quốc, Hàn Quốc, Nepal, Nhật Bản, Nga, Tây Ban Nha, Mỹ, Bolivia, và Ghana) đã thấy tỷ lệ đột biến trên vùng pre-S là 18,3%. Tuy nhiên, Việt Nam là nước có tỷ lệ đột biến cao nhất với 36%; tiếp theo sau là Nepal (27,3%), Myanmar (23,3%), Trung Quốc (22,4%), Hàn Quốc (14,3%), Thai Land (10,5%), Nhật Bản (7,7%), và Ghana (4,3%). Khi phân tích dựa trên nhóm bệnh, các tác giả thấy đột biến đoạn pre-S cao nhất ở nhóm ung thư gan (30%), tiếp đến là xơ gan (27,8%), viêm gan cấp (15,4%), người mang HBV mạn tính (12,5%) và viêm gan mạn tính chỉ có 9,6% [9].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nhóm người mang HBV mạn tính không triệu chứng không có đột biến nào, trong khi đó nhóm viêm gan mạn tính có 10,48% mang đột biến pre-S. Như vậy, kết quả này tương đương so với các tác giả trước đây đối với nhóm viêm gan B mạn tính, nhưng khác ở nhóm người mang HBV mạn tính. Một lưu ý rằng trong nghiên cứu của Huy và CS: kết quả đột biến gen pre-S tại Nhật Bản cũng chỉ có 7,7%. Vậy, sự khác biệt phải chăng là do đối tượng BN ở Nhật Bản cũng như ở Việt Nam trong 3 nghiên cứu không cùng trong một khu vực và số lượng BN không đủ lớn.

Từ trước tới nay người ta vẫn cho rằng nhiễm HBV mạn tính không triệu chứng là thể bệnh nhẹ, không có nguy cơ tiến triển nặng thành ung thư và xơ gan. Trước đây, người ta đã dùng từ người lành mang trùng để chỉ những đối tượng này. Tuy nhiên, gần đây lại thấy mặc dù không có tổn thương gan, enzyme AST và ALT bình thường, nhưng trên những BN này vẫn có tỷ lệ tiến triển thành ung thư gan từ 15% đến 30% sau 13 năm theo dõi. Trong nghiên cứu này không phát hiện đột biến gen trên BN mang HBV mạn tính không triệu chứng. Nhưng kết quả cũng chỉ ra mức độ nhân lên của HBV ở nhóm người mang HBV mạn tính không triệu chứng cao hơn có ý nghĩa so với nhóm viêm gan B mạn tính.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp nhân gen kết hợp phân tích trình tự gen chúng tôi đã thành công trong việc phát hiện các đột biến quan trọng tại vùng pre-S của HBV. Kết quả cho thấy đột biến gen pre-S của HBV chỉ gặp ở BN nhiễm HBV mạn (13,38%), chưa gặp ở nhóm BN mang HbsAg không triệu chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Chai N, Gudima S, Chang J, Taylor J.* Immunoadhesins containing pre-S domains of hepatitis B virus large envelope protein are secreted and inhibit virus infection. *J Virol* . 2007, 81, pp.4912-4918.
2. *Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS.* High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology*. 2006, 130, 1pp.153-1168.
3. *Huy TT, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K.* High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol*. 2003, 41, pp.5449-5455.
4. *Beasley RP.* Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Ann Epidemiol*. 2009, Apr, 19 (4), pp.231-234.
5. *Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, Williams J, Livingston SE.* Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2009 Nov 30.
6. *Hipgrave DB, Nguyen TV, Vu MH, Hoang TL, Do TD, Tran NT, Jolley D, Maynard JE, Biggs BA.*

Hepatitis B infection in rural Vietnam and the implications for a national program of infant immunization. Am J Trop Med Hyg. 2003, Sep; 69 (3), pp.288-294.

7. Don Ganem, and Alfred M. Prince. Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. N Engl J Med. 2004, 350, pp.1118-1129.

8. Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, Kuramitsu T, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. J Med Virol. 2003, Aug, 70 (4), pp.537-544.

9. Huy TT, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. J Clin Microbiol. 2003, Dec, 41 (12), pp.5449-5455.

10. Zhou H, Wang H, Zhou D, Wang H, Wang Q, Zou S, Tu Q, Wu M, Hu H. Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis. Eur J Cancer. 2010 Apr, 46 (6), pp.1056-1061.

11. Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Atsumi H, Takaqi M, Arakawa T, Fujimori M. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection who have normal alanine aminotransferase values. J Med Virol. 2010, Apr; 82 (4), pp.539-545.