

# 以聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)檢測 B 型肝炎病毒表面蛋白(pre-S)突變株

許冠宗 湯麗玲 馬孝瑀 江建成

邱內科診所 核子醫學部 分子醫學實驗室

背景：HBV 慢性肝炎及病毒的活躍情形與表面蛋白在血清及組織中的表現情形有相當的關聯。表面蛋白的基因由 pre-S1，pre-S2 以及 S 區段組成，目前已知 pre-S 突變株的 B 型肝炎帶原者轉化成肝癌的機率相對非常高。因此 pre-S 突變株之檢測可能發展成肝癌篩檢的工具。臨床檢驗患體內 pre-S 突變可以提供相當的資訊，已決定肝癌的預防，治療以及追蹤檢查。

方法：以聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法對 HBV DNA 陽性的血清進行快速檢測，PCR 增殖 pre-S 區段，以辨認是否產生 deletion 突變。再從 DNA 序列分析確認突變的發生。

結果：8 個樣本中有 5 個在 PCR 後有 deletion 突變的現象，其中 4 個 DNA 片段經過序列分析後確認是 deletion 突變株。

結論：利用分子生物學方法進行檢測是臨床檢驗的趨勢。PCR 的高靈敏度及精確性可以在低血清病毒量時期快速且精確篩檢出 pre-S 突變株，HBV 帶原患者，只需抽血，便可以檢驗出是否帶有突變 pre-S 基因，進而預測肝癌的發生機率。

關鍵詞：HBV，B 型肝炎，表面蛋白，pre-S，肝癌

## 前言

臺灣地區目前約有 260 萬個 B 型肝炎帶原者，因慢性肝炎造成的肝硬化，肝癌，長期以來為國人十大死因之一。B 型肝炎患者體內病毒的複製情況以及疾病活動的程度 HBV 抗原的表現相關聯[1-7]。慢性 HBV 感染可分為三個階段：A. 感染初期為免疫容忍期(immune tolerance)，此時有高血清病毒量，大量肝細胞表現 HBV 核心抗原(HBcAg)，且主要在細胞核，而少數肝細胞在細胞質內看

得到表面抗原(HBsAg) [3,8,9]。B. 免疫廓清期(immune clearance)的宿主免疫反應增強，毒殺性 T 細胞攻擊被感染的細胞，血清病毒下降，伴隨有急性發炎反應，HBcAg 在細胞質中普遍表現，而 HBsAg 表現量極輕微。C. 嵌入(integration)或殘存期，病毒非複製期(non-replication)，血清病毒量非常低微或是消失，組織中測不到 HBcAg，而大量肝細胞表現 HBsAg。

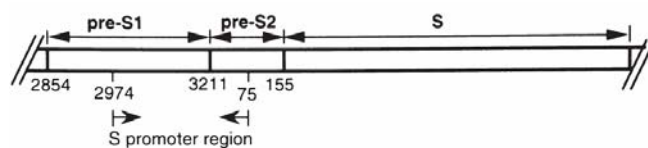


Figure 1. Genome map of HBV S gene. S gene contains pre-S1, pre-S2 and S regions and a S promoter within pre-S region.

HBV 表面抗原共有三種蛋白 large, middle, small S。三種表面蛋白在 HBV 的基因體中由 S 基因表現而來(fig. 1)，S 基因由 pre-S1, pre-S2 與 S 區段組成，large S 是 pre-S1, pre-S2 與 S 三個區段轉譯出，middle S 為 pre-S2 與 S 區段轉譯，而 S 區段單獨轉譯出主要的 small S 蛋白。三種蛋白的比例會影響病毒顆粒的釋出[10]。在病毒複製期，middle 與 small 蛋白的表現量會遠大於病毒組合的需求量，並且快速釋出球狀病毒顆粒。Large 表面蛋白則會形成長纖維狀的病毒顆粒，並且會因而陷在細胞的 ER 中無法釋出。

HBV 的突變機率遠高於其他的 DNA 病毒，原因是病毒複製的週期會經過 RNA 時期以及反轉錄酵素(reverse

transcriptase)的作用[11-13]。突變常常造成 HBV 逃過宿主的免疫反應或是引起細胞學上的變化。最新的研究結果發現 pre-S 突變的患者，有極高比例會轉化成肝癌，pre-S 的突變因而對於 HBV 病患轉化肝癌的預測與追蹤有很大的意義。我們從臨床檢驗上，欲利用分子生物學的方法，直接從患者血清 HBV DNA 檢驗其 pre-S 區段的 deletion 突變。

#### 材料與方法

##### 血清 HBV DNA 萃取製備

HBV DNA 從患者 100ul 的血清中萃取，使用 High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche Applied Science, Germany)。

##### 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)分析

PCR 反應的總體積 30ul，包含：萃取 DNA 5ul，primer43 (5'-gggtcaccatattcttg-3')與 primer44 (5'-tcctaggaatcc-3')濃度 5uM dNTP 6.875 nmol，10X Taq buffer 3ul，Titanium Taq DNA polymerase (BD Biosciences, USA) 0.5 Units。反應混合物先以 95 度 C 預設 5 分鐘，而後以 95 度 1 分鐘，52 度一分鐘，72 度 1 分鐘，進行 40 個循環，最後 72 度 10 分鐘後降至 4 度。PCR 反應產物以 3% 洋菜電泳進行分析。

##### DNA 序列分析(Sequencing)

從電泳膠上切下分離的 DNA 片段，以 Agarose Gel DNA Extraction Kit(Roche Applied Science, Germany)純化後進行序列分析。DNA 定序使用的 primer 是 PCR 所使用的 primer43，使用 BigDye 3.1 Terminator cycle sequencing Kit 以及 Prism3700 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA) 進行分析。

#### 結果

從 HBV DNA 陽性病患血清樣本中，抽取 DNA 後以 primer43, 44 進行 PCR 反應。電泳分析顯示，8 個樣本 HBV DNA 均帶有 wild type 的 pre-S 片段，其中 3 個樣本顯示明顯的 deletion 短片段(fig. 2, c, e and h)，2 個樣本則顯示微弱的短片段(fig. 2, d and f)。

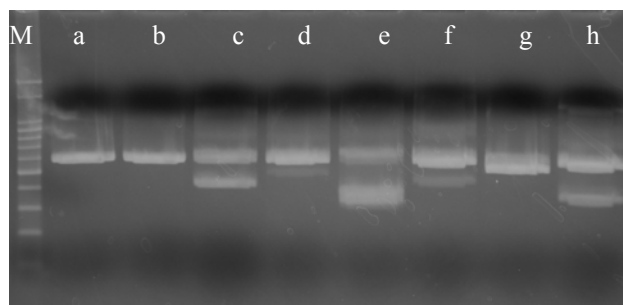


Figure 2. The 3% agarose gel electrophoresis of PCR amplified pre-S fragments with primer 43 and 44. M contains a 100 kb ladder marker.

我們進一步以 DNA 定序分析短片段以及同一樣本的長片段。其中一個樣本雖然從電泳圖可以辨認微弱的位移片段(fig. 2, d)，但是因為短片段 PCR 產物量過低，無法進行 DNA 定序，難以確認其 deletion 的發生。其他產生位移之短片段定序分析分別顯示了不同的 deletion 突變(fig. 3)。這幾個樣本突變株發生 deletion 的位置與長度各不相同，均發生在 pre-S1 與 pre-S2 區段內，且包括了 S 啓動子區段，推論將導致造成突變的 large S 蛋白，以及影響 small S 蛋白的表現。

#### 討論

肝組織與血清中表面抗原量的關係與 HBV 感染的發展有相當的關聯。在病毒複製以及慢性發炎時，血清中有高量的抗原而組織中則是低量[14-16]。而血清抗原低量，在肝組織內高量且堆積在細胞內的情況則出現在進一步的肝病變或是肝硬化。研究發現，pre-S 突變株在細胞培養的實驗中會造成細胞中的表面蛋白累積，並且減少表面蛋白分泌到細胞外[10]。而 pre-S 突變也證實會在肝細胞形成特殊的表面蛋白表現模式，此時血清中表面蛋白含量低，但肝細胞中會有大量 large S 蛋白累積，並伴隨病情惡化，以及轉化肝癌機率的升高。pre-S 突變株所造成的效果不利於病毒的組合釋放，反而促使 HBV 病毒長期存在細胞內，可能即是造成 DNA 鑲嵌入人體 DNA，以及造成細胞轉型[15]。pre-S 突變可能會影響其中 S 啓

```

W   gggagtggctttcaacctcgaaggca tggggacaaatctttctgtccccaatcccctg
D   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

W   ggattcttccccgatcatcagttggaccctgcat tcaaaagccaactcagaaaatccagat
D   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

W   tgggacc tcaatccttacacgacaaaccggc acggatcgccaaaagacgtggagtatgat
D   |||||||||-----

W   TATTGGGGGAGGGTTTCATCCCTCCACATGGGGACTGGTGGGGAGGAGCGCTCATGCTCA
D   -----

W   AGGCACACTCTCAACTGTGACAGCAGATCCTCTCTCTGCTTGGCCAAATGGGCAGTCAGGA
D   -----

W   AGGCATATCCACCCTCTAAGGGAGCTAACTCCCTTATCCACTCATCTCAGGCCATGCAGTGG
D   -----

W   AACTCCACCactttccaccaaaactcttcaagatcccagagtcagggccctgtactttcct
D   ----- ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

W   gctgggtgctccagttcaggaacagtgagccctgctcagaatactgtctctgccatactg
D   |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||| ||||

W   tcaatctttatcgaagactggggaccctgtaccgaa-catggagaaacatcgcatcaggatt
D   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

```

Figure 3. Sequences of wild type pre-S (W) and deletion mutant (D). Dashes indicated deleted nucleotides.

動子，而使得 small S 蛋白無法表現，因而造成細胞內 large S 蛋白的累積。而突變也可能造成表面蛋白改變免疫淋巴細胞及抗體辨認的區域，可以逃避宿主的免疫反應[17]。

細胞內累積大量 Large S 蛋白的肝細胞被發現會成簇聚集，可能源自於單株細胞的增生，顯示 Pre-S 突變造成細胞內大量 large S 蛋白對於細胞調控機制也可能造成影響，促進其生長，而這些細胞落中也不會發生 T 細胞的浸潤(infiltration)以及細胞壞死(necrosis)[9,18]。pre-S1 已經證實會啟動細胞 transforming-growth-factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 的表現，而 TGF- $\alpha$  在肝癌的發生過程中扮演重要角色之一。另外，在基因轉殖小鼠實驗模型中，已經知道 large S 蛋白直接與肝癌的生成有關[a48-50]。綜合這些發現，pre-S 的突變 dk3s/6 與 HBV 所造成的肝癌有極大的關聯。

流行病學的統計，二三十歲的 HBV 帶原者 3%到 5%有突變蛋白，但是四十歲後則有 20%到 40%的高比例。本次實驗中，8 個樣本以 PCR 檢測出 5 個含有 deletion 突變，其中 4 個可以以 DNA 序列分析確認，高達 50%以上產生 pre-S 的 deletion 突變。

我們初步嘗試以分子生物學方法在臨床檢驗上建立快速且準確的檢測 pre-S deletion 突變的工具，而以 PCR 的方法，患者只需抽血，可以在一天的時間內成功地迅速篩檢出血清 HBV DNA 陽性病患體內是否帶有 pre-S 的 deletion 突變株，可以提供疾病的診斷，預測以及治療策略相當有用的資訊。

#### 參考文獻

1. Chu CM, Liaw YF. Intrahepatic expression of pre-S1 and pre-S2 antigens in chronic hepatitis B virus infection in relation to hepatitis B virus replication and hepatitis delta virus superinfection. Gut 1992; 33:1544-8.
2. Fraiese A, Pontisso P, Cavalletto D, Fattovich G, Alberti A. Expression of preS1 and preS2 in the liver of chronic hepatitis B virus carriers. J Hepatol 1988; 7: 157-163.
3. Govindarajan S, Fong TL, Valinluck B, Edwards V, Redeker AG. Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. Am J Clin Pathol 1988; 89: 233-7.

4. Omata M, Yokosuka O, Imazeki F et al. Correlation of hepatitis B virus DNA and antigens in the liver . A study in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1987; 92: 192-6.
5. Ray MB, Desemet VJ, Bradburne AF, Desmutter J, Fevery J, De Groote J. Differential distribution of hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in the liver of hepatitis B patients. *Gastroenterology* 1976; 71: 462-7.
6. Wee A, Yap I, Guan R. Hepatocyte hepatitis B surface antigen expression in chronic hepatitis B virus carriers in Singapore: correlation with viral replication and liver pathology. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 466-70.
7. Wu PC, Fand JWS, Lai CL et al. Hepatic expression of hepatitis B virus genome in chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 87-95.
8. Chu CM, Liaw YF. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and Core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92: 220-5.
9. Su IJ, Lai MY, Hsu HC et al. Diverse virological, histopathological and prognostic implications and seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepato.* 1986; 3: 182-9.
10. Fan YF, LU CC, Chang YC, Chan TT, Lin PW et al. Identification of a pre-S2 mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen in advanced diseases of chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 519-28.
11. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 904-11.
12. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 651-93
13. Terre S, Petit MA, Brechot C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol* 1991; 65: 5539-43.
14. Deines HP, Gerlich WH, Worsdorfer M et al. Hepatic expression patterns of the large and middle hepatitis B virus surface proteins in viremic and nonviremic chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1990; 98: 1017-23.
15. Lau JYN, Bain VG, Davies SE, Alexander GJM, Williams R. Export of intracellular HBsAg in chronic hepatitis B virus infection is related to viral replication . *Hepatology* 1991; 14: 416-21.
16. Naoumav NV, Portmann BC, Tedder RS et al. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990; 99: 1248-53.
17. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, et al. Vaccin-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-29.
18. Fernholz D, Galle Pr, Stemler M, Bruneto M, Bonino F, Will H. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 1993; 194: 137-48.
19. Tanaka Y, Yeo AET, Orito E, Ito K, Hirashima N, Ide T, Sata M, Mizokami M. Prognostic indicators of breakthrough hepatitis during lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* 2004; 39: 769-75.
20. Minami M, Okanoue T, Nakajima E, Yasui K, Kagawa K, Kashima K. Significance of pre-S region-defective Hepatitis B virus that emerged during exacerbation of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1993; 17: 558-63.

# Detection of pre-S Mutation in HBV DNA Positive Sera by Polymerase Chain Reaction

Kuan-tsung Hsu, Li-ling Tang, Hsiao-yu Ma, Chien-cheng Chian

Division of Molecular Medicine, Department of Nuclear Medicine, Chiu Clinic, Taipei, Taiwan

**Background:** Expression HBV surface antigen (HBsAg) within serum and tissue reflects the progress of the disease and replication status of the virus. The S gene coding for HBsAg includes pre-S1, pre-S2 and S regions. It is known that pre-S mutants are highly associated with Hepatocarcinoma (HCC). pre-S mutant detection could be a meaningful tool in HCC screening and prediction.

**Method:** HBV DNA positive sera were exam for deletion mutation by Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA sequencing analysis confirmed deletion mutation DNA fragments.

**Results:** 5 of 8 HBV DNA positive samples were showing possible deleted DNA fragments after PCR amplification. 4 samples with possible deletion mutants were sequenced for both wild type and mutant DNA fragments. Sequences comparison confirmed the deletion mutation.

**Conclusion:** PCR could be a fast and effective tool to screen pre-S mutants. Possibilities of HCC could be estimated by molecule biology methods.

**Keywords:** HBV, Hepatocarcinoma, pre-S, Surface Antigen, HBsAg.