

MỐI LIÊN QUAN GIỮA KIỂU GEN VIRUT VIÊM GAN B VỚI MỘT SỐ XÉT NGHIỆM SINH HOÁ, SINH HỌC PHÂN TỬ Ở NGƯỜI MANG VIRUT KHÔNG TRIỆU CHỨNG VÀ BỆNH NHÂN UNG THƯ GAN

*Nguyễn Trọng Chính**; *Mai Hồng Bằng**; *Nguyễn Hồng Thắng***
*Trần Thị Huyền Trang**; *Trần Hà Hiếu*****; *Phan Đình Phó****; *Lê Hữu Song**

TÓM TẮT

Nghiên cứu 54 bệnh nhân (BN) ung thư gan (UTG) và 54 người mang virus không triệu chứng (NMVR). Định lượng HBV ADN bằng RT-PCR theo nguyên lý Taqman còn xác định HBV genotyp theo phương pháp PCR dựa trên tính đa hình của một đoạn giới hạn (RFLP-PCR) và giải trình tự gen. **Kết quả:** 5 kiểu gen đơn B, C, D, E, F và 5 kiểu gen đồng/bội nhiễm BC, BD, BE, CE, CE được tìm thấy trên 2 nhóm nghiên cứu; trong đó hay gặp nhất là các kiểu gen C (64,8%), BC (12,9%) và CE (11,1%). Kiểu gen đồng/bội nhiễm gặp nhiều hơn ở nhóm BN UTG so với nhóm NMVR. Nồng độ HBV ADN ở nhóm BN UTG mang kiểu gen C cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có kiểu gen B và kiểu gen đồng/bội nhiễm; HBV ADN trên nhóm BN UTG có kiểu gen đồng/bội nhiễm cao hơn nhóm có kiểu gen B.

* Từ khoá: Ung thư gan; Viêm gan virus B; Kiểu gen; Xét nghiệm sinh hoá, sinh học phân tử.

HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH BIOCHEMICAL, MOLECULAR BIOLOGICAL PARAMETERS IN ASYMPTOMATIC CHRONIC HBV CARRIERS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS

SUMMARY

54 HBV-infected patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and 54 asymptomatic chronic HBV carriers (ASYM) were enrolled in this study. HBV DNA was measured by RT-PCR using Taqman prob, HBV genotype was detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR and sequencing. **Results:** 5 single genotype (B, C, D, E, F) and 5 HBV genotype mixtures (BC, BD, BE, CE, CE) have been found, among them, genotype C, BC and CE are predominant (64.8%, 12.9% and 11.1%, respectively). HBV genotype mixture in HCC group has been found more frequent in comparison to ASYM. HBV DNA level in HCC patients infected with HBV genotype C was significantly higher than those infected with genotype B and genotype mixtures; and HBV DNA level in HCC patient infected with genotype mixture was higher than those infected with genotype B ($p < 0.05$).

* Key words: Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; Genotype; Biochemical, molecular, biological parameters.

* Bệnh viện TWQĐ 108

** Bệnh viện 103

*** Bệnh viện Nam Định

**** Bệnh viện 175

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê trên thế giới, khoảng 2 tỷ người nhiễm HBV và trên 350 triệu người đang nhiễm HBV mạn tính. Nhiễm virus

viêm gan B thì nguy cơ tiến triển thành ung thư biểu mô tế bào gan cao hơn 100 lần so với người bình thường [1].

Hiện nay, 8 kiểu gen của HBV được xác định dựa trên sự khác biệt 8% nucleotid

giữa các kiểu gen và được ký hiệu từ A đến H [3]. Như vậy, khi BN được phát hiện có HBsAg (+), không có nghĩa là họ đều nhiễm cùng một chủng HBV, thực chất, họ có thể nhiễm nhiều chủng HBV và có thể là nhiều kiểu gen khác nhau.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

54 BN UTG được chẩn đoán xác định và đang điều trị tại Khoa Tiêu hoá, Bệnh viện TWQĐ 108. 54 NMVR phát hiện qua khám sức khoẻ định kỳ và theo dõi định kỳ theo hướng dẫn của Hội Gan mật.

2. Phương pháp nghiên cứu.

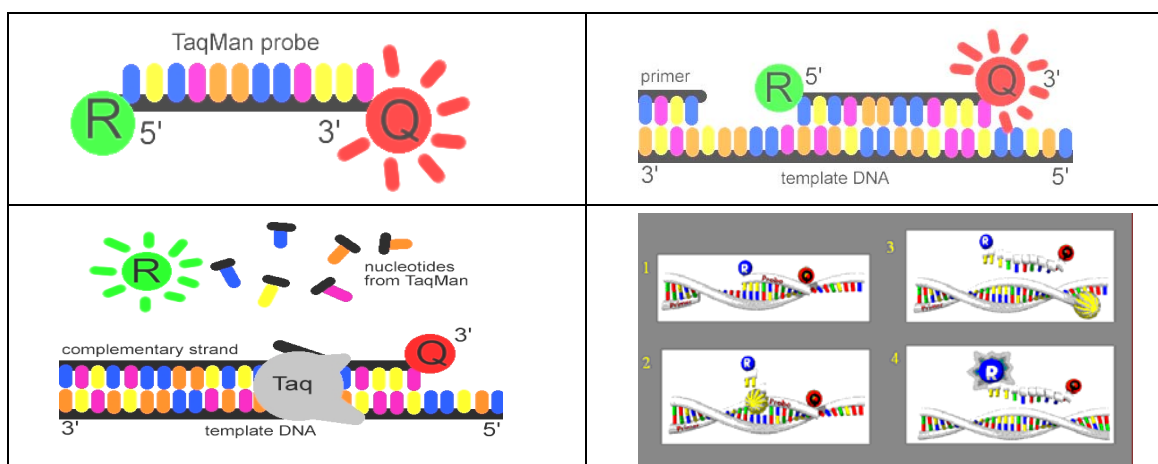
* *Thiết kế nghiên cứu:*

- Nghiên cứu tiến cứu, mô tả, cắt ngang.
- BN nghiên cứu được đăng ký vào một phiếu theo dõi riêng có đầy đủ các chỉ tiêu về dịch tễ, lâm sàng và xét nghiệm.

* *Các phương pháp xét nghiệm:*

Xét nghiệm sinh hoá, miễn dịch và gen tại Bệnh viện TWQĐ 108.

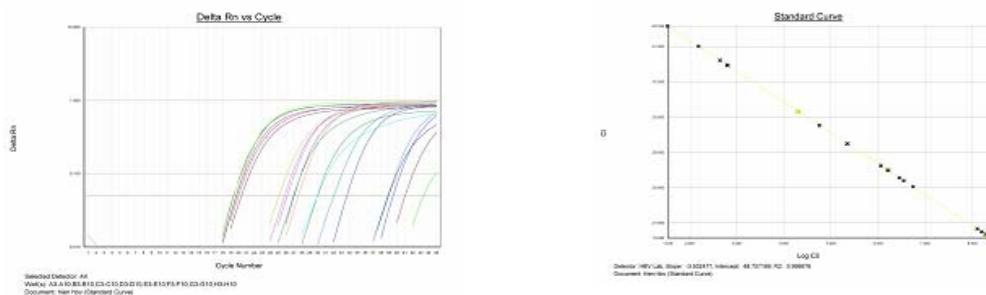
- Phương pháp xét nghiệm định lượng nồng độ HBV ADN: được định lượng bằng kỹ thuật RT-PCR trên hệ thống máy RT-PCR ABI 7500 (Applied BioSystem, Mỹ). Về nguyên lý: sử dụng các đầu dò theo phương pháp Taqman. Đây là phương pháp đặc hiệu nhất hiện nay so với các phương pháp sử dụng trong RT-PCR khác. Cùng với cặp mồi cho PCR, sẽ thiết kế thêm 1 đầu dò là 1 đoạn oligo đặc hiệu có gắn chất phát quang (R) và chất ức chế (Q). Bình thường, chất Q sẽ ức chế sự phát sáng của chất R. Khi có đoạn ADN đặc hiệu với đầu dò, đầu dò sẽ gắn vào và đoạn Q sẽ tách ra, giải phóng R, do đó R phát sáng và máy sẽ đo cường độ ánh sáng qua đó biết chính xác số copies có trong mẫu theo thời gian (*hình 1*).



Hình 1: Mô phỏng nguyên lý Taqman để định lượng HBV ADN bằng RT-PCR.

Đoạn mồi được sử dụng là: HBs Forward Primer: 5-CAACCTCCAATCACTCACCAAC-3 HBs primer revers: 5-ATATGATAAAACGCCGACAGACACA-3 HBs-Taq:5-(FAM)-TCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCT-(TAMRA)-3.

Phương pháp này cho phép định lượng chính xác nồng độ của HBV-ADN (số copies/ml), đồng thời cho biết nồng độ của đoạn gen đích ngay trong từng thời điểm quan tâm.



Hình 2: Biểu diễn kết quả của xét nghiệm HBV ADN bằng RT-PCR.

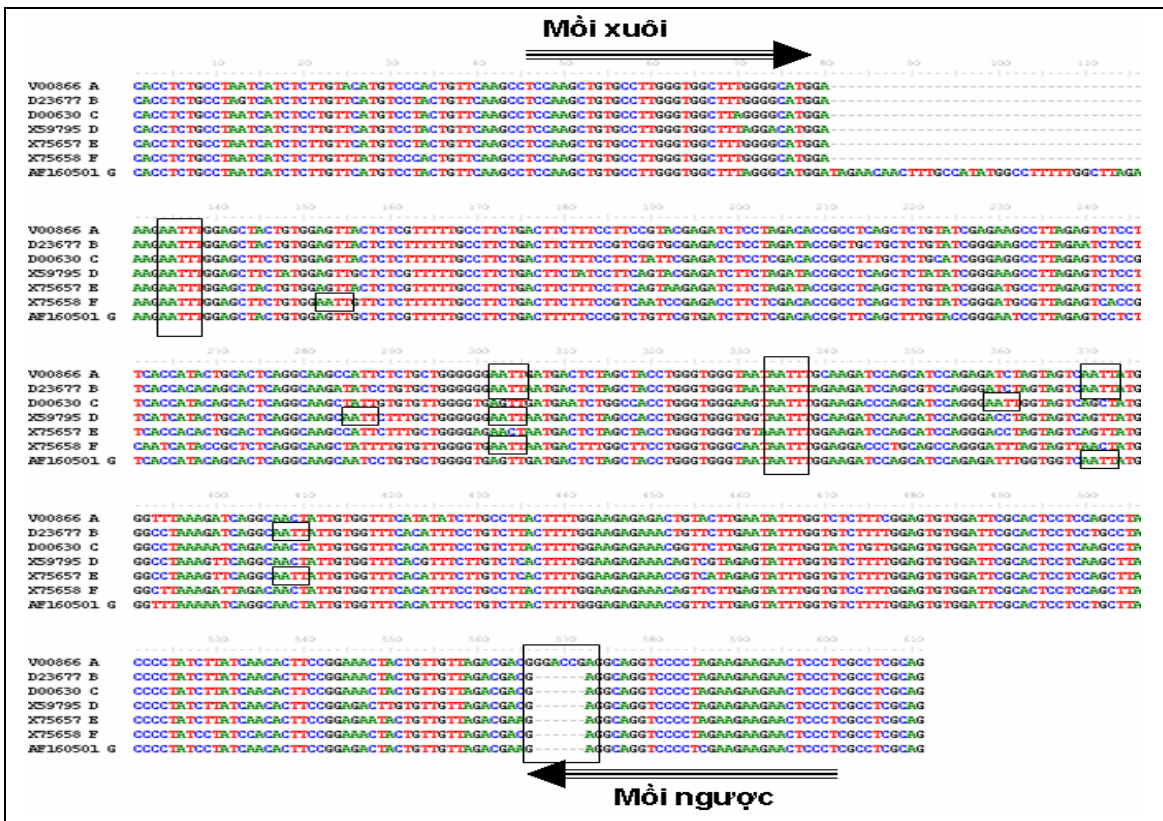
Hình trên cho biết đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang của mẫu đo và đường chuẩn để tính toán nồng độ HBV ADN. Mỗi lần xét nghiệm, chạy song song các mẫu chuẩn đã biết nồng độ nhằm xây dựng đường chuẩn.

Phương pháp xác định kiểu gen HBV: xác định kiểu gen của virus viêm gan B (VRVGB) bằng kỹ thuật cắt gen sau khi nhân đoạn. Phương pháp này có phần thay đổi nhỏ so với phương pháp của Hannoun và CS. Cụ thể, thay vì chỉ sử dụng PCR một bước, chúng tôi đã nâng số copies của virus

lên bằng cách dùng PCR 2 bước (nested-PCR). Đoạn mồi cho PCR thứ nhất là (HB pre 16) 5-CACCTCTGCCTAATCATCTCT-3 và primer (HBV 590as) 5-CTGCGAGGCGA-GGGAGTT-3. Thực hiện PCR sau một bước tách đôi chuỗi ADN (94°C cho 4 phút) 35 vòng với điều kiện sau: 94°C cho 30 giây, 55°C cho 30 giây và 72°C cho 30 giây. Cuối cùng, kéo dài sản phẩm bằng một bước 10 phút ở 72°C. Bước thứ 2 tiến hành như Hannoun và CS [4]: ủ sản phẩm PCR và cắt bằng enzym Tsp509I, sau đó soi dưới đèn cực tím, so sánh với các đoạn gen chuẩn.

Bảng 1: Dự kiến các điểm cắt và kích thước của sản phẩm PCR sau khi cắt bằng enzym Tsp509I.

Genotýp	Kích thước sản phẩm PCR chưa cắt	Vị trí cắt của enzym Tsp509I	Kích thước của đoạn sản phẩm sau khi cắt enzyme
A	520	2091, 2159	168, 226
B	514	2091, 2159, 2196	168, 183
C	514	2148	200, 231
D	514	2074	151, 256
E	514	2196	183, 200
F	514	2188	191, 200



Hình 3: Trình tự gen đoạn nhân (Core) HBV sử dụng để phân biệt các kiểu gen khác nhau.

- Phương pháp giải trình tự gen của HBV: trong một số trường hợp không xác định được kiểu gen của HBV bằng phương pháp nhân gen kết hợp tính đa hình của một đoạn giới hạn. Quá trình giải trình tự gen của HBV tiến hành trên hệ thống CEQ 8800, Beckman Coulter (Mỹ), tại Khoa Sinh học Phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108.

Sau khi giải trình tự gen, so sánh kết quả với trình tự chuẩn trên ngân hàng dữ liệu.

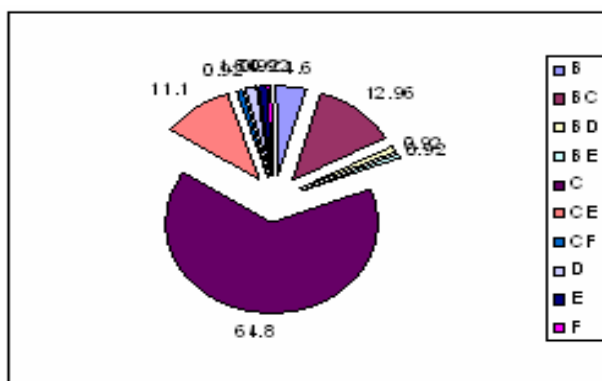
* Phương pháp thống kê: số liệu thu thập phân tích trên phần mềm Staview 4.5 và

Stata 7.0, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân bố kiểu gen HBV trên 108 BN nghiên cứu.

Trên 108 BN ở 2 nhóm nghiên cứu, đã xác định được 5 kiểu gen đơn và 5 kiểu gen đồng/bộ nhiễm của HBV. Các kiểu gen đơn phát hiện là B, C, D, E và F. Các kiểu gen đồng/bộ nhiễm phát hiện là BC, BD, BE, CE và CF. Trong đó, các kiểu gen chiếm đa số là C (64,8%), BC (12,9%) và CE (11,1%).



Hình 4: Phân bố kiểu gen của HBV trên 108 BN nghiên cứu.

2. Phân bố kiểu gen của HBV trên 2 nhóm BN UTG và NMVR.

Khi phân tích phân bố kiểu gen HBV trên 2 nhóm BN UTG và NMVR, chúng tôi thấy tần suất xuất hiện các kiểu gen không giống

nhau. Trong đó, kiểu gen C gặp nhiều hơn ở nhóm NMVR, (43/54 BN = 79,6%), so với nhóm UTG có 27/54 BN (50%). Tuy nhiên, khi tính tất cả các kiểu gen đồng/bội nhiễm có C, không có sự khác biệt giữa 2 nhóm.

Bảng 2: Phân bố kiểu gen trên 2 nhóm nghiên cứu.

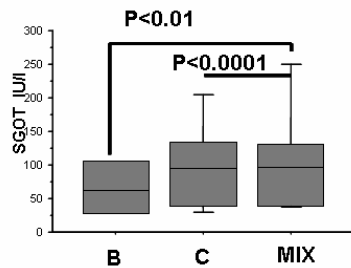
Kiểu gen	B	C	D	E	F	BC	BD	BE	CE	CF	TỔNG
UTG	4	27	1	1	1	10	1	1	7	1	54
%	7,5	50	1,85	1,85	1,85	18,5	1,85	1,85	12,9	1,85	100
NMVR	1	43	1	0	0	4	0	0	5	0	54
%	1,85	79,6	1,85	0	0	7,4	0	0	9,3	0	100

Khi tất cả các kiểu gen đồng/bội nhiễm được gọi chung là kiểu gen hỗn hợp, chúng tôi thấy kiểu gen hỗn hợp ở nhóm UTG nhiều hơn có ý nghĩa so với ở nhóm NMVR (OR = 2,94; 95% [1,1 - 8,23], $p < 0,05$; Chi 2 (1) = 5,7).

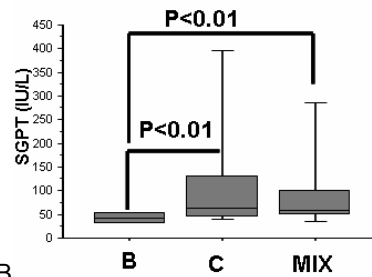
3. Mối liên quan giữa kiểu gen của HBV với biến đổi các chỉ số sinh hoá.

Do NMVR không có biến đổi sinh hoá, chúng tôi chỉ phân tích trên nhóm BN UTG. Ngoài ra, do kiểu gen khác xuất hiện không

nhiều nên chúng tôi chỉ phân tích trên kiểu gen phổ biến là kiểu gen B, C và hỗn hợp. Khi tìm hiểu mối liên quan giữa biến đổi enzym gan SGOT với kiểu gen HBV, nồng độ SGOT tăng cao hơn ở nhóm có kiểu gen hỗn hợp so với 2 kiểu gen B và C (152 ± 52 IU/l so với 94 ± 12 IU/l và 67 ± 22 IU/l; $p < 0,01$ và $p < 0,0001$). Trong khi đó, ở BN mang kiểu gen B, nồng độ men SGOT thấp hơn có ý nghĩa so với BN mang kiểu gen C và hỗn hợp (43 ± 6 IU/l so với 125 ± 25 IU/l và 104 ± 23 IU/l; $p < 0,01$).



Hình 4.A

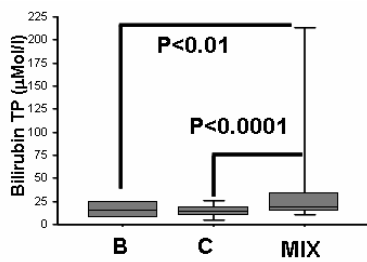


Hình 4.B

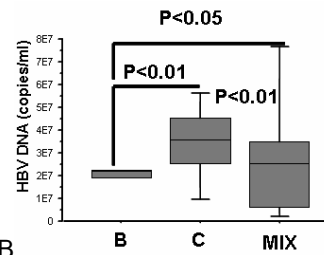
Nồng độ bilirubin toàn phần tăng cao hơn ở nhóm có kiểu gen hỗn hợp so với kiểu gen B và C ($56 \pm 22 \mu\text{mol/l}$ so với $15,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$ và $16,6 \pm 4,6 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,01$ và $p < 0,0001$).

Phân tích sâu về mối liên quan giữa kiểu gen HBV với mức độ nhân lên của virus, chúng tôi thấy nồng độ HBV ADN cao nhất

ở nhóm có kiểu gen C, tiếp đó đến kiểu gen hỗn hợp và cuối cùng là kiểu gen B ($3,6 \times 10^7 \pm 3,4 \times 10^6 \text{ copies/ml}$ so với $2,9 \times 10^7 \pm 6,1 \times 10^6$ và $2 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^6 \text{ copies/ml}$; $p < 0,01$). Ngoài ra, so với kiểu gen B, kiểu gen hỗn hợp cũng có nồng độ HBV ADN cao hơn có ý nghĩa với $p < 0,05$).



Hình 5.A



Hình 5.B

BÀN LUẬN

Do HBV không có khả năng tự đọc sửa trong quá trình nhân lên, nên xuất hiện các đột biến với tần suất cao, ước tính mỗi năm từ $1,5 \times 10^{-5}$ đến 5×10^{-5} nucleotid thay thế trên một vị trí ở những người có HbeAg (+) [5]. Các đột biến cộng hợp tìm thấy nhiều hơn ở virus trên BN có HbeAg (-), điều này gợi ý, đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể có vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của HBV [5]. Trong một số trường hợp, quá trình nhân lên của HBV không thực hiện một cách đúng tuần tự và chính xác, dẫn đến xuất hiện một số kiểu gen khác nhau và hơn nữa là xuất hiện đột biến gen của HBV.

Việt Nam có > 15% dân số có HBsAg (+). Đó là một trong những nguyên nhân làm cho HBV có cơ hội để pha trộn các kiểu gen. Thời đại hội nhập quốc tế góp phần tăng tính giao lưu rộng rãi giữa các nguồn virus gây viêm gan. Điều này tạo nên sự phân bố phong phú các kiểu gen HBV ở Việt Nam. Nghiên cứu trước đây cho thấy: những kiểu gen tổ hợp mới giữa kiểu gen A và C đã xuất hiện ở Việt Nam [6]. Năm 2004, Tuấn Huy và CS cũng đã phát hiện một kiểu gen mới và tự đặt tên là kiểu gen I [7].

Như vậy, tính đa dạng phong phú về kiểu gen HBV ở Việt Nam đã được đề cập đến. Mặc dù từ trước tới nay, các tác giả trong nước vẫn cho rằng chủ yếu ở Việt Nam chỉ có 2 kiểu gen là B và C [8].

Kết quả nghiên cứu này cho thấy: kiểu gen C chiếm tỷ lệ cao nhất (64,8%), trong khi đó kiểu gen B chỉ có 4,6%. Tuy nhiên, nếu tính chung với các kiểu gen đồng/bội nhiễm với kiểu gen B và C, chúng tôi thấy 21/108 BN có kiểu gen B (19,4%) và kiểu gen C là 97/108 BN (89,8%). Phải chăng đây là một lý giải cho sự khác biệt về số liệu giữa các nghiên cứu.

Hiện tượng trên một BN nhiễm hơn 1 kiểu gen HBV cũng như HCV đã được thông báo [4, 9]. Nghiên cứu của Hannoun và CS khi sử dụng phương pháp phát hiện kiểu gen bằng RFLP-PCR thấy: 67% BN nhiễm hơn 1 kiểu gen. Như vậy, đồng/bội nhiễm hơn 1 kiểu gen trên một BN tương đối phổ biến. Tuy nhiên, việc phát hiện sự đồng/bội nhiễm các kiểu gen HBV tương đối khó và chưa có phương pháp chuẩn. Người ta thấy rằng, nếu sử dụng phương pháp giải trình tự gen rất khó phát hiện đồng/bội nhiễm các kiểu gen. Chỉ có phương pháp sử dụng tính đa hình của một đoạn giới hạn như chúng tôi đang áp dụng mới có thể phát hiện được đồng/bội nhiễm của các kiểu gen [4].

Gần đây, nhiều tác giả quan tâm đến vai trò của các kiểu gen đồng/bội nhiễm trong tiến triển UTG. Năm 2008, nghiên cứu của Yin J và CS thấy, kiểu gen đồng/bội nhiễm gặp nhiều hơn ở nhóm UTG và có tải lượng virus cao hơn các kiểu gen khác [10]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng thấy kiểu gen đồng/bội nhiễm thường gặp hơn ở nhóm UTG và nguy cơ UTG tăng 2,94 lần khi nhiễm hơn 1 kiểu gen HBV.

Khi phân tích mối liên quan giữa kiểu gen HBV với mức độ tổn thương gan, Yin J và CS thấy: khi nhiễm kiểu gen phối hợp, tổn thương gan nặng hơn so với các kiểu gen khác. Trong đó, enzym transaminase và bilirubin đều tăng hơn ở nhóm có kiểu gen phối hợp so với các kiểu gen khác [10].

Tương tự, khi tìm hiểu mối liên quan giữa kiểu gen HBV với mức độ nhân lên của virut, Yin J và CS cũng thấy: khi nhiễm kiểu gen phối hợp, tải lượng virut tăng hơn rõ rệt so với khi nhiễm các kiểu gen khác. Kết quả này cũng tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu trên 54 BN UTG và 54 NMVR, chúng tôi thấy: khi nhiễm kiểu gen phối hợp, nguy cơ tiến triển thành UTG cao hơn. Tải lượng virut cũng như tổn thương gan cũng nhiều hơn trên BN mang kiểu gen đồng/bội nhiễm này. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác hơn vai trò của kiểu gen HBV, chúng ta cần nghiên cứu theo dõi dọc với số lượng nhiều hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Tran TT, Trinh TN, Abe K.* New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol.* 2008, Jun, 82 (11), pp.5657-5663. Epub 2008 Mar, 19.
2. *Lee, W.M,* Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine.* 1997, 337, pp.45-733.
3. *Acharya SK, Panda SK, Saxena A and Gupta SD.* Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000,15, pp.9-473.
4. *Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M.* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigene subtypes. *J Gene Virol.* 1998, 69, pp.2575-2583.
5. *Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M.* Interpret trial group. Geneotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis.* 2002, 186, pp.9-752.
6. *Desmond CP, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR.* A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, geneotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther.* 2008, 13 (2), pp.75-161.
7. *Hannoun C, Norder H, Lindh M.* An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol.* 2000, Sep. 81 (Pt 9), pp.2267-2272.
8. *Truong BX, Seo Y, Yano Y, Ho PT, Phuong TM, Long DV, Son NT, Long NC, Kato H, Hayashi Y, Trach NK, Kasuga M.* Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV-infected patients from Northern Vietnam. *Int J Mol Med.* 2007 Feb, 19 (2), pp.293-299.
9. *Zhang S, Hui Z, Li H, Qi Z, Widell A.* Dynamic changes in hepatitis C virus genotypes and sequence patterns in plasma donors exposed to reinfection. *J Med Virol.* 2001, 63, pp.228-236.
10. *Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y, Zhang P, Xu L, Tan X, Chen J, Cheng S, Schaefer S, Cao G.* 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. *Carcinogenesis,* 2008, Sep, 29 (9), pp.1685-1691.