

ĐỘT BIẾN GENE TIỀN NHÂN (PRE-CORE) CỦA VIRUT VIÊM GAN B (HBV) CÓ LIÊN QUAN VỚI UNG THƯ GAN

LÊ HỮU SONG - Bệnh viện TỰ QUỠ 108

TÓM TẮT

Mục tiêu: tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến tiền nhân của virus viêm gan B (HBV) với tiến triển ung thư gan (UTG) trên BN (BN) nhiễm HBV.

Đối tượng và phương pháp: 140 BN được chia thành 2 nhóm: 90 BN UTG và 50 người mang HBV mạn tính không triệu chứng (NMVR). Đột biến tiền nhân được phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự gene trực tiếp.

Kết quả: có 3 dạng đột biến điển hình tại khu vực tiền nhân là G1896A, G1899A và G1896A/G1899A đã được tìm thấy trên các BN nghiên cứu. Đột biến điểm tại vị trí 1896 (G→A) gặp nhiều hơn trên BN UTG so với NMVR (55,55% so với 22%, $P < 0,001$). Đột biến điểm tại vị trí 1899 (G→A) gặp nhiều hơn trên BN UTG so với NMVR (50% so với 18%, $P < 0,001$). Ở nhóm NMVR ít gặp đột biến đồng thời tại 2 điểm G1896A và G1899A trên 1 BN so với nhóm UTG (14% so với 45,55%, $p < 0,001$). Đột biến tiền nhân được phát hiện trên cả các BN có HBeAg (+) và HBeAg(-), tuy nhiên đột biến này xảy ra nhiều hơn trên BN có HBeAg (-) so với nhóm có HBeAg (+) (79,3% so với 6,1%, $P < 0,0001$). Đột biến đôi tại cả 2 vị trí G1896A và G1899A gặp nhiều hơn trên BN có HBeAg (-) so với BN có HBeAg (+) (62,1% so với 6,1%; $p < 0,0001$).

Kết luận: Đột biến gene tiền nhân của HBV có liên quan đến ung thư gan.

Từ khóa: HBV, NMVR, UTG, preCore, Đột biến

SUMMARY

Aims: to evaluate the association of hepatitis B virus (HBV) PreCore mutation with hepatocellular carcinoma (HCC).

Patients and methods: 140 patients including 90 HCC patients and 50 asymptomatic chronic HBV carriers (ASY) were analyzed by direct sequencing.

Results: Three forms of mutation in preCore region were found such as G1896A, G1899A and double mutation G1896A/G1899A. Point mutation at 1896 (G→A) was found more frequent in HCC patients compared to ASY (55.55% vs 22%, $P < 0.001$). Similarly, rate of point mutation at 1899 (G→A) in HCC group was significant higher than those in ASY group (50% vs 18%, $P < 0.001$). Double mutation at G1896A/G1899A was found less frequent in ASY compared to HCC (14% so với 45,55%, $p < 0,001$). PreCore mutation has been found in both patient with HBeAg (+) and HBeAg (-), but higher in the first group (79.3% vs 6.1%, $P < 0.0001$). Double mutation at G1896A/G1899A was found more frequent in patient with HBeAg (-) compared to patient with HBeAg (+) (62.1% vs 6.1%, $p < 0.0001$).

Conclusion: Thus, preCore mutation is associated with HCC in this study.

Keywords: HBV, HCC, ASY, preCore, mutation.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus viêm gan B (HBV) được cho là một trong những nguyên nhân gây ung thư gan (UTG). Tuy nhiên, không phải tất cả BN nào nhiễm HBV cũng có thể tiến triển thành UTG. Nguyên nhân có thể do đáp ứng miễn dịch của cơ thể hoặc do bản thân virus có sự khác biệt về cấu trúc, hình thái...[1]. Nghiên cứu về sinh học phân tử người ta thấy bộ gene của HBV có nhân là DNA, có kích thước khoảng 3.2 kb, được phân bố bởi 4 vùng đọc mở mã hóa cho các protein S, Polymerase, HBX và Core/preCore. Trong đó gene core/preCore được bắt đầu từ điểm 1814 cho đến điểm 2458. Đoạn gene này mã hóa cho 2 protein là HBeAg và HBcAg. Khi gene core được mã hóa từ điểm 1901 thì protein C (HBcAg) được tổng hợp, nếu mã hóa từ điểm 1814 thì HBeAg được tổng hợp. Tại khu vực này có 2 đột biến điển hình đã được tìm thấy ở vị trí 1896 (Guanine → Adenine) và 1899 (Guanine → Adenine). Các đột biến này đã được ghi nhận có liên quan đến biểu hiện của các thể bệnh [2]. Để tìm hiểu tỷ lệ đột biến gene vùng tiền nhân (preCore) trên 2 nhóm BN ung thư gan và người mang HBV mạn tính chúng tôi tiến hành nghiên cứu này.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng: Tổng số có 140 BN nhiễm HBV được chia thành 2 nhóm: 90 BN ung thư gan và 50 người mang HBV mạn tính không triệu chứng. BN ung thư gan được thu thập tại Khoa Tiêu hóa, người mang HBV mạn tính không triệu chứng được thu thập tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TỰ QUỠ 108 từ tháng 5 năm 2008 đến tháng 5 năm 2010. Tiêu chuẩn chẩn đoán UTG dựa trên giải phẫu bệnh lý có hình ảnh tế bào gan ác tính, HBsAg (+). Người mang HBV mạn tính không triệu chứng được xác định khi có HBsAg (+), không triệu chứng lâm sàng, các xét nghiệm AST, ALT, Bilirubin bình thường.

2. Phương pháp.

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp tiến cứu, mô tả cắt ngang.

2.1. Các xét nghiệm thường quy như: huyết học, sinh hoá, miễn dịch, siêu âm, Xquang, mô bệnh học được tiến hành thường quy tại các Khoa cận lâm sàng Bệnh viện TỰ QUỠ 108.

2.2. Định lượng nồng độ HBV DNA được thực hiện tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TỰ QUỠ 108 theo nguyên lý Taqman, sử dụng công nghệ Real Time PCR trên hệ thống ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Mỹ).

2.3. Giải trình tự gene Pre-Core được thực hiện trên hệ thống giải trình tự gene CEQ 8800 Beckman Coulter, Mỹ. Bộ môi sử dụng là:

HBV_pre Core F:

5'-TACACCTCCTTCCATGGCTGCT-3'

HBV_pre Core R:
5'-CCTGAGTGCTGTATGGTGAGG-3'

3. Phân tích-thông kê: Kết quả được phân tích trên các phần mềm phân tích gene Bioedit, CEQ 8000. Số lượng các mẫu có đột biến được đếm và tính toán so sánh trên phần mềm Stata 7.0 và Stview 4.5.

KẾT QUẢ

1. Đặc điểm chung giữa 2 nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm về giới và tuổi của 2 nhóm nghiên cứu

Chỉ số Nhóm	Nam (n=119)	Nữ (n=21)	Tuổi (TB±ĐLC)
NMVR (n=50)	42	8	27,3±8,3
UTG (n=90)	77	13	55,1±13,2
P	>0,05	<0,05	

Nhận xét: Tổng số có 119 bệnh nhân Nam chiếm 85%, 21 bệnh nhân nữ chiếm 15%. Giữa 2 nhóm không có sự khác biệt về tỷ lệ nam/nữ. Tuổi ở nhóm ung thư gan cao hơn có ý nghĩa so với NMVR (P<0,05).

Bảng 2. So sánh một số chỉ số xét nghiệm giữa 2 nhóm

Chỉ số	Nhóm	NMVR (n=50)	UTG (n=90)	P
HBeAg (+/-)		28/22	54/36	>0,05
TC (G/L)		252 ± 33	107 ± 34	<0,05
Prothrombin (%)		85 ± 10	72 ± 10	<0,05
AST (U/L)		25,44±10,2	110,8±107,4	<0,05
ALT (U/L)		26,5 ± 7,7	100,3±91,9	<0,05
Bilirubin TP (µMol/L)		9,8 ± 0,9	35,4 ± 15,1	<0,05
Protein TP (g/L)		78 ± 10	72 ± 13	>0,05
Albumin (g/L)		40 ± 3	35 ± 3	>0,05

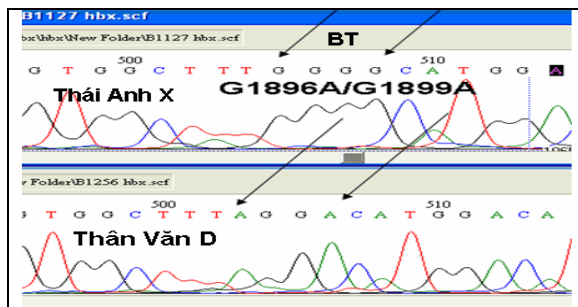
Nhận xét: Không có khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu về tình trạng mang kháng nguyên e, nồng độ protein, albumin (P>0,05). Tiểu cầu, prothrombin, AST, ALT, Bilirubin TP giữa 2 nhóm có sự khác biệt có ý nghĩa (P<0,01).

Bảng 3. Nồng độ HBV DNA ở 2 nhóm nghiên cứu

Chỉ số	Nhóm NC	NMVR	UTG	P
HBV DNA (copies/ml)		4,6 x 10 ⁸ ± 9,08 x 10 ⁷	4,8 x 10 ⁷ ± 1,6 x 10 ⁷	<0,05

Nhận xét: Nồng độ HBV DNA ở nhóm UTG thấp hơn nhóm NMVR (P<0,05).

2. Đột biến gene vùng tiền nhân (pre Core)



Hình 1. Một số hình ảnh điển hình của đột biến vùng tiền nhân

Nhận xét: Hình ảnh điển hình của đột biến tại cả 2 điểm 1896 và 1899 trên cùng một BN.

Bảng 4. So sánh tỷ lệ đột biến tiền nhân tại vị trí G1896A trên các nhóm nghiên cứu

Loại đột biến	Axit amin	NMVR (n=50)	UTG (n=90)	P
G1896A n, (%)	W28stop	11 (22)	50 (55,55)	<0,001

Nhận xét: đột biến điểm ở khu vực tiền nhân tại vị trí 1896 (G→A) gặp nhiều hơn trên BN UTG, với P<0,001.

Bảng 5. So sánh tỷ lệ đột biến tiền nhân tại vị trí G1899A trên các nhóm nghiên cứu

Loại đột biến	Axit amin	NMVR (n=50)	UTG (n=90)	P
G1899A, n (%)	G29D	9 (18)	45 (50)	<0,001

Nhận xét: đột biến điểm ở khu vực tiền nhân tại vị trí 1899 (G→A) gặp nhiều hơn trên BN UTG, với P<0,001.

Bảng 6. So sánh tỷ lệ đột biến tại cả 2 vị trí G1896A và G1899A ở 1 BN trên các nhóm nghiên cứu

Loại đột biến	NMVR (n=50)	UTG (n=90)	P
G1896A/G1899A, n (%)	7 (14)	41 (45,55)	<0,001

Nhận xét: trên nhóm NMVR ít gặp đột biến đồng thời tại 2 điểm G1896A và G1899A trên 1 BN so với nhóm UTG (p<0,001).

3. Mối liên quan giữa đột biến tiền nhân với HBeAg

Bảng 7. So sánh tần suất đột biến tiền nhân trên các BN có HBeAg (+) và HBeAg (-).

Kiểu ĐB	HBeAg (+) n = 82	HBeAg (-) n = 58
G1896G, n (%), Không ĐB	77 (93,9)	12 (20,7)
G1896A, n (%), ĐB	5 (6,1)	46 (79,3)
P	<0,0001	

Nhận xét: Đột biến tiền nhân được phát hiện trên các BN có HBeAg (+) và HBeAg(-), tuy nhiên đột biến này xảy ra nhiều hơn trên BN có HBeAg (-) so với nhóm có HBeAg (+) (79,3% so với 6,1%, P<0,0001).

Bảng 8. So sánh tần suất đột biến tiền nhân tại cả 2 điểm G1896A và G1899A trên BN có HBeAg (+) và HBeAg (-).

Đột biến đôi	HBeAg (+) n = 82	HBeAg (-) n = 58
G1896A/G1899A, n (%)	5 (6,1)	36 (62,1)
P	<0,0001	

Nhận xét: Đột biến đôi tại cả 2 vị trí G1896A và G1899A gặp nhiều hơn trên BN có HBeAg (-) so với BN có HBeAg (+) với p < 0,0001.

BÀN LUẬN

Trong quá trình nhân lên, do enzyme Polymerase của HBV không có hoạt tính tự đọc sửa dẫn đến hậu quả là tần suất đột biến xuất hiện rất cao, ước tính mỗi năm có từ 1,5 x 10⁻⁵ đến 5 x 10⁻⁵ vị trí nucleotide thay thế ở những người có HBeAg (+) [3], [4]. Sự thay đổi trên bộ gene của HBV xảy ra sau những đột biến rải rác và có thể là sự chọn lọc ưu thế đối với đáp ứng miễn dịch của vật chủ và các yếu tố khác như kháng thuốc điều trị [3]. Tỷ lệ xuất hiện các đột biến hoặc các đột biến cộng hợp trên HBV ở BN có HBeAg (-) được

ghi nhận là cao hơn các đối tượng khác. Theo Desmond kết quả này gợi mở khả năng đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể có vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của HBV [4]. Trong một số trường hợp quá trình nhân lên của HBV không được thực hiện một cách tuần tự và chính xác như trên dẫn đến việc xuất hiện các đột biến gen và xa hơn nữa là sự xuất hiện của những kiểu gen HBV khác nhau [3].

Khu vực tiền nhân của HBV là một trong những vùng rất dễ bị đột biến và đã được chứng minh là có liên quan đến UTG [5]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành khảo sát đột biến gene khu vực tiền nhân ở 2 nhóm đối tượng: NMVR và UTG. Chúng tôi thấy có 3 dạng đột biến gene điển hình ở khu vực này được tìm thấy trong nghiên cứu này, đó là tại vị trí 1896 (G→A), điểm 1899 (G→A) và đồng thời trên một BN có cả 2 đột biến đó. Tỷ lệ đột biến trên nhóm UTG cao hơn có ý nghĩa so với nhóm NMVR. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác của Asim và cộng sự (2010) [5]. Trong khi đó theo các tác giả Kim và cộng sự (2009) khi nghiên cứu trên các BN nhiễm HBV có dưới kiểu gene C2 thì không có sự liên quan giữa đột biến gene vùng tiền nhân với UTG [6]. Sự không đồng thuận về các kết quả của các nghiên cứu có thể giải thích do sự khác biệt về kiểu gene HBV. Người ta đã chứng minh trong cấu trúc không gian của bộ gene HBV, tại vị trí 1858 của kiểu gene A là Cytosine liên kết bền vững với Guanine (G) tại vị trí 1896. Tuy nhiên trong các kiểu gene khác thì tại vị trí 1858 là Thymine do đó liên kết với G tại vị trí 1896 là kém bền vững. Do đó chỉ cần đột biến tại điểm 1896 là có thể làm cho quá trình mã hóa protein HBeAg không được thực hiện. Kết quả là tỷ lệ đột biến gene vùng tiền nhân sẽ khác nhau trên các đối tượng mang các kiểu gene không giống nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi không khảo sát kiểu gene của HBV, tuy nhiên chúng tôi thấy đột biến gene vùng tiền nhân xảy ra trên cả các BN có HBeAg (+) và HBeAg (-). Trong đó, trên nhóm có HBeAg (-) thì đột biến gene

thường gặp hơn. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi thấy tỷ lệ đột biến gene tiền nhân gặp ở nhóm có HBeAg (-) là 33% so với nhóm có HBeAg (+) chỉ có 2% [7].

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trên 140 bệnh nhân nhiễm HBV chúng tôi thấy có 3 dạng đột biến tiền nhân điển hình được tìm thấy, đột biến tiền nhân xảy ra ở cả bệnh nhân mang HBeAg (+) và HBeAg (-), tỷ lệ đột biến tiền nhân gặp nhiều trên bệnh nhân ung thư gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kao, J.H., P.J. Chen, and D.S. Chen, *Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects*. Adv Cancer Res. 108: p. 21-72.
2. Xu, Z., et al., *Association of hepatitis B virus mutations in basal core promoter and precore regions with severity of liver disease: an investigation of 793 Chinese patients with mild and severe chronic hepatitis B and acute-on-chronic liver failure*. J Gastroenterol. 9/2010.
3. Wei, Y., et al., *Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene*. Pathol Biol (Paris). 58(4): p. 267-72.
4. Desmond, C.P., et al., *A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics*. Antivir Ther. 2008. 13(2): p. 161-75.
5. Asim, M., et al., *Hepatitis B virus BCP, Precore/core, X gene mutations/genotypes and the risk of hepatocellular carcinoma in India*. J Med Virol. 82(7): p. 1115-25.
6. Kim, J.K., et al., *Specific mutations in the enhancer II/core promoter/precore regions of hepatitis B virus subgenotype C2 in Korean patients with hepatocellular carcinoma*. J Med Virol, 2009. 81(6): p. 1002-8.
7. Chauhan, R., et al., *Basal core promoter, precore region mutations of HBV and their association with e antigen, genotype, and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis B in India*. J Med Virol, 2006. 78(8): p. 1047-54.