Precore mutants ของไวรัสตับอักเสบ บี

พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์*
ยง ภู่วรวรรณ**

Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Precore mutants of hepatitis B. Chula Med J 1999 Aug; 43(8): 599 - 611

HBeAg negative HBV phenotypes most frequently arise due to mutations in the precore region of the viral genome. The commonest mutation is a G to A change at nucleotide 1896 resulting in a stop codon which prevents HBeAg synthesis. Variation in the prevalence of the A-1896 mutant in different parts of the world is related to differences in the predominant HBV genotype. Only HBV genotypes with T at nucleotide 1958 have been shown to develop the A-1896 mutation. This could be partly explained by the presence of a hairpin structure in the pregenome encapsidation signal, which is critical for viral replication. Precore mutants HBV may emerge during the course of infection with wild type HBV in response to immune pressure along with seroconversion to anti-HBe. Clinically, precore mutant chronic hepatitis B is characterized by an HBsAg positive, HBeAg negative, anti-HBe positive and HBV DNA positive serological profile together with raised serum ALT. Diagnosis is usually based on phenotypic characterization without the need for genotypic analysis of the virus. Precore mutants were initially reported to be more frequently found in patients with fulminant hepatitis or chronic active hepatitis, but they can also be found in asymptomatic carriers. Most studies show that the presence of precore mutants is associated with sub-optimal response to interferon therapy.

Key words: *Hepatitis B virus, Precore mutation.*

Reprint request : Tangkijvanich P, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. April 5, 1999.

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไวรัสตับอักเสบ บี (hepatitis B virus, HBV) เป็น DNA ไวรัสที่มีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation) สูงกว่า DNA ไวรัสชนิดอื่น ๆ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication) ต้องอาศัย pregenomic RNA เพื่อสร้าง DNA โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งขั้นตอนนี้ทำให้มีโอกาสกลายพันธุ์สูงเพราะไม่มีกลไกที่ตรวจแก้ความผิดพลาด (proof-reading mechanisms) ในระหว่างการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ วิธีการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase นี้คล้ายกับการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ของกลุ่ม retroviruses เช่น HIV ซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์สูงประมาณ 1/100,000 - 1/1,000 ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสในแต่ละครั้ง[1] การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ (heterogeneity) มากขึ้น เนื่องจากโรคไวรัสตับอักเสบ บี เป็นโรคเรื้อรังดังนั้นจึงมีรายงานการพบไวรัสที่กลายพันธุ์ได้บ่อย

โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบ บี

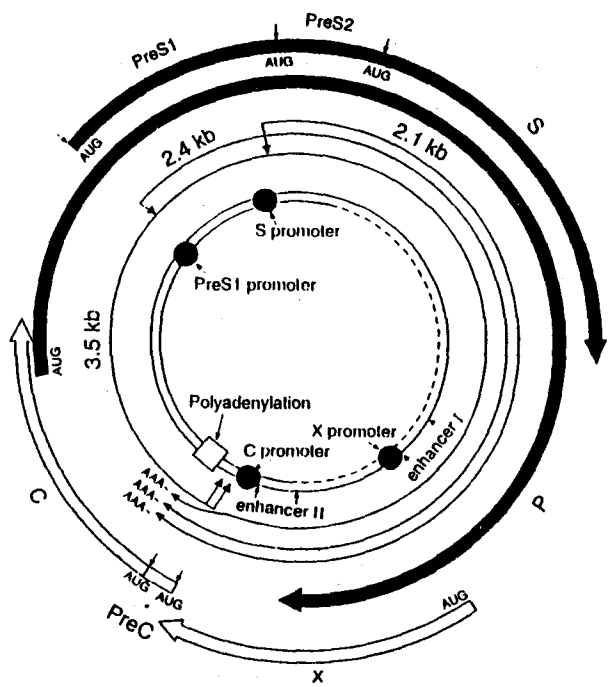
ไวรัสตับอักเสบ บี อยู่ใน family *Hepadnaviridae* ซึ่งเป็น DNA ไวรัสขนาดเล็กประกอบด้วย double strand DNA ที่มี long strand หรือ (-) strand ความยาวขนาด 3.2 kilobases (kb) และ short strand หรือ (+) strand ที่มีขนาดไม่แน่นอน (มีความยาวประมาณ 50-70% ของ long strand)[2,3] (รูปที่ 1)

Long strand ประกอบด้วย 4 open reading frame (orf) ได้แก่ S, C, X และ P ทั้ง 4 ส่วนนี้มีส่วนที่ซ้อนกันอยู่ โดยเฉพาะส่วน P ซ้อนอยู่กับทั้ง 3 ส่วนที่เหลือ ส่วนของ short strand หรือ (+) strand ไม่มีส่วนของ open reading frame (orf คือจุดเริ่มต้นในการถอดระหัสเพื่อสร้างโปรตีนบน messenger RNA ที่มี codon เริ่มต้นเป็น AUG)

S-orf ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เปลือกผิวของไวรัส ประกอบด้วย S gene (สร้าง HBsAg) PreS1 และ PreS2 gene ส่วนของ S และ PreS2 จะมีความยาวที่คงที่แน่นอนในทุก subtype ของไวรัส ส่วน PreS1 จะแตกต่างไปตามชนิดของ subtype

HBs subtypes จะมีแอนติเจนร่วมหรือ determinant เป็น a และมี determinant อื่นๆ เป็น y หรือ d และ w หรือ r พบว่า subtype determinant ในประเทศไทยมักเป็น ad ส่วนทางตะวันตกเป็น ay เป็นส่วนใหญ่

C-orf ทำหน้าที่สร้าง core protein (HBcAg) และ



รูปที่ 1. แสดง genome ของไวรัสตับอักเสบ บี

precore ซึ่งสร้าง HBeAg

P-orf ทำหน้าที่สร้าง DNA polymerase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด reverse transcriptase activity

X-orf ทำหน้าที่สร้าง HBxAg ที่เป็น polypeptide ขนาด 145-154 amino acid ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งตับ (hepatic oncogenesis)

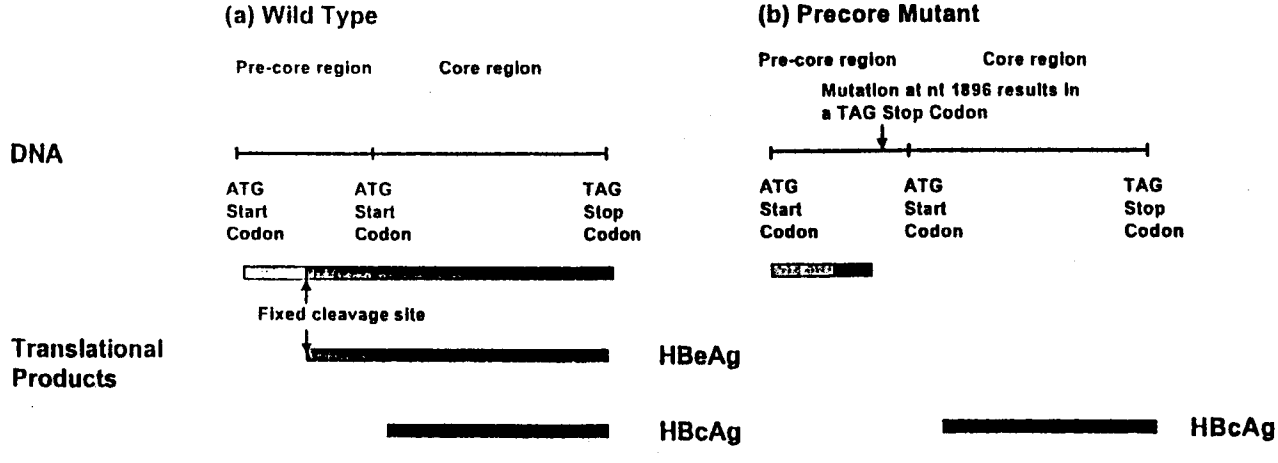
ปัจจุบันพบว่า HBV มีการกลายพันธุ์ได้ทุก open reading frames[4,5] เช่น pre-S/S gene mutations ทำให้เกิด vaccine escape mutants หรือ polymerase gene mutations พบในผู้ป่วยตับอักเสบที่ได้รับการรักษาด้วยยากลุ่ม nucleoside analogues ชนิดใหม่ๆ เช่น lamivudine หรือ famciclovir เป็นต้น ตำแหน่งการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่พบได้บ่อยที่สุดและมีการศึกษากันมากที่สุดคือการเกิด precore mutations ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดต่อไป

Precore mutations ของไวรัสตับอักเสบ บี [6]

HBcAg และ HBeAg สร้างจาก core region (549 หรือ 555 bp) และ precore region (87 bp) ตามลำดับใน open reading frame เดียวกันแต่คนละตำแหน่ง (รูปที่ 2) การสร้าง HBeAg เริ่มต้นที่ ATG codon แรก ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1814 บน precore/core gene ได้เป็น HBe precusor ซึ่งมีกรดอะมิโนจำนวน 212 ตัว ก่อนที่มีการตัด (cleavage) กรดอะมิโน 19 ตัวทางด้าน amino terminal และอีก 33 ตัว ทางด้าน carboxy terminal ออกไป ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นภายใน endoplasmic reticulum ผลที่ได้คือ HBeAg ที่สมบูรณ์ ซึ่งมีขนาด 17 kDa และมีกรดอะมิโน 160 ตัว HBeAg ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกหลั่งเข้าในเลือดต่อไป

ส่วนการสร้าง HBcAg หรือ core protein ซึ่งเป็น polypeptide ที่มีขนาด 21 kDa และมีกรดอะมิโนประมาณ 183 หรือ 185 ตัว (ขึ้นกับ genotype ของไวรัส) เริ่มต้นที่ ATG codon ที่สองบน precore/core region (ตำแหน่ง nucleotide 1901) ตรวจพบ HBcAg ได้เฉพาะในเซลล์ตับที่มีการติดเชื้อเท่านั้นแต่จะไม่พบ HBcAg อิสระในเลือด ทั้ง HBcAg และ HBeAg นี้มีตำแหน่งของกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 150 ตัว

Precore mutations อาจเกิดจาก point mutation, deletion หรือเกิดจาก frameshift mutations ก็ได้ ที่พบได้บ่อยมากกว่า 95 % ของการกลายพันธุ์ทั้งหมด คือการเกิด point mutation ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1896



รูปที่ 2 แสดงการสร้าง core protein และ HBe protein จาก precore/core gene (A. Wild-type virus B. Precore mutant virus)

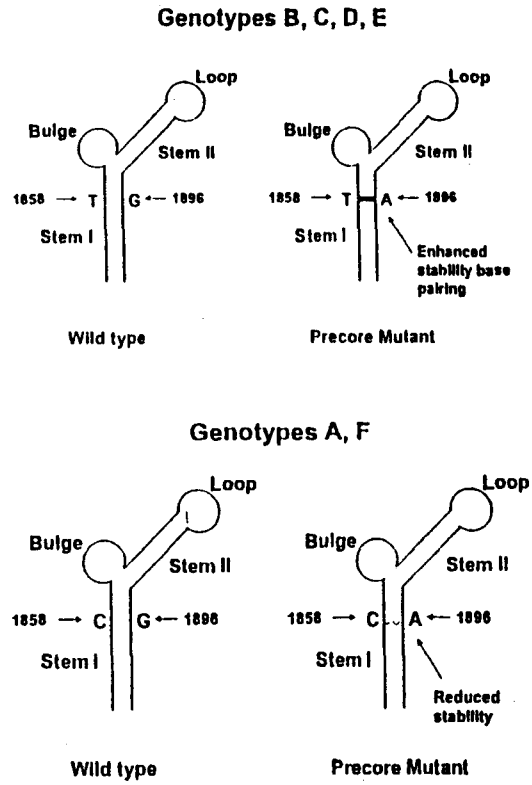
ของ codon ที่ 28 โดยมีการเปลี่ยนจาก G เป็น A (TGG เปลี่ยนเป็น TAG) ซึ่งเป็น stop codon ทำให้ไม่สามารถสร้าง HBe precursor และ HBeAg ต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามจะไม่มีผลต่อการสร้าง HBcAg เพราะใช้ start codon คนละตำแหน่งกันและยังคงมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ตามปกติ [4,7] ผู้ป่วยที่มี precore mutants นี้มีโอกาสเป็นโรคตับอักเสบได้เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่ไม่มีเชื้อที่กลายพันธุ์ (หรือที่เรียกว่า wild type) มีข้อแตกต่างเพียงแต่ตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือดเท่านั้น อาจเรียก precore mutants นี้ว่าเป็น HBe-minus mutants ก็ได้ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่น ๆ นอกเหนือจากตำแหน่ง nucleotide ที่ 1896 นี้ที่ทำให้เกิด stop codon ได้แก่ G เป็น A ที่ตำแหน่ง nucleotide 1898 และ 1989 ของ codon ที่ 29 หรือ C เป็น T ที่ตำแหน่ง nucleotide 1856 ของ codon ที่ 15 และ A เป็น C ที่ตำแหน่ง nucleotide1814 ของ start codon ซึ่งทำให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg เช่นเดียวกัน[8,9] (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. แสดงตำแหน่งที่พบบ่อยของ precore mutations

1. G-A nt 1896, tryptophan-stop codon 28.
2. G-A nt 1899, glycine-aspartic acid, codon 29.
3. A-C nt 1814, loss of start codon.
4. C-T nt 1856, proline-serine, codon 15.
5. G-A nt 1898, glycine-serine, codon 29.

Nt = nucleotide

เหตุผลที่การกลายพันธุ์มักเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 1896 มากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ[10,11] เป็นเพราะส่วนที่เป็น encapsidation ($\mathcal{E}$) signal ของ pregenomic RNA ซึ่งเป็น *cis*-acting element ที่อยู่ส่วนปลายของ 5' มีลักษณะรูปร่างเป็น hairpin หรือ stem loop structure (รูปที่ 3) ตำแหน่งดังกล่าวนี้เป็นที่อยู่ของ nucleotide ส่วนที่เป็น precore เกือบทั้งหมด รวมทั้งส่วนต้นๆของ core (nucleotide ที่ 1852-1930) พบว่า base pairs ของ $\mathcal{E}$ ส่วนใหญ่เป็น A:T หรือ G:C ซึ่งมีความเสถียรสูง ยกเว้นบางตำแหน่งเท่านั้นที่ base pairs เป็น T:G ทำให้ตำแหน่งเหล่านี้มีโอกาสเปลี่ยนเป็น C:Gหรือ T:A (โดย T เปลี่ยนเป็น C หรือ G



รูปที่ 3. แสดง stem-loop structure ของ pregenome encapsidation signal(ε) และตำแหน่งที่พบได้บ่อยของ precore mutations

เปลี่ยนเป็น A อย่างหนึ่งอย่างใด) เพราะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้จะทำให้มีความเสถียรของพันธะระหว่าง base pairs สูงขึ้นกว่าเดิม เมื่อมี การเปลี่ยนที่ตำแหน่ง 1896 จาก G เป็น A จะได้ลำดับ base เป็น TAG ซึ่งเป็น stop codon ทำให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg

ความชุก (prevalence) ของ precore mutants แตกต่างกันไปตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก เช่น พบมากที่แถบเมดิเตอร์เรเนียน (อิตาลี กรีซ และอิสราเอล) และเอเชีย (ฮ่องกง ไต้หวันและญี่ปุ่น) โดยมีความชุกประมาณร้อยละ 50-80 และ 40-55 ตามลำดับ precore mutants พบได้น้อยในสหรัฐอเมริกาและยุโรปตะวันตก[12] ความแตกต่างของความชุกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (genotype) ของไวรัสที่พบมากในภูมิภาคนั้น ๆ เป็นเหตุผลสำคัญปัจจุบันพบว่ามีสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั่วโลกอย่างน้อย 6 ชนิดคือ A, B, C, D, E และ F (ตารางที่2)

ตารางที่ 2. แสดงการกระจายของ genotype ตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก

Genotype	Region
A	Northwest Europe, Central Africa, North America
B/C	South East Asia, China
D	Mediterranean, Saudi Arabia, India
E	Africa
F	South America

สายพันธุ์ A ซึ่งพบมากที่ประเทศสหรัฐอเมริกามีอุบัติการณ์ของการเกิด precore mutants ที่ตำแหน่ง 1896 ไม่บ่อย เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้มีลำดับของ base ที่ตำแหน่ง 1858 ที่อยู่ตรงกันข้ามกับตำแหน่ง 1896 บน hairpin structure เป็น C แทนที่จะเป็น T (รูปที่ 3) ซึ่งมีความเสถียรของคู่ base (C และ G) ดีอยู่แล้ว ดังนั้นถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก G แทนที่ A ที่ตำแหน่ง 1896 จะทำให้สูญเสียความเสถียรของ base pair คู่นี้ไป ยกเว้นว่าจะมีการเปลี่ยนของ C เป็น T ที่ตำแหน่ง 1858 ร่วมด้วย

Lindh และคณะ[13] ได้ทำการศึกษาความชุกของ precore mutants จากภูมิภาคต่าง ๆ ซึ่งสนับสนุนว่า ถ้าพบ C ที่ตำแหน่ง 1858 เป็นส่วนใหญ่จะมีอุบัติการณ์ของ precore mutants ที่ตำแหน่ง 1896 ต่ำ (ตารางที่ 3)

Core promoter mutations ของไวรัสตับอักเสบ บี[14,15]

การทำงานของ precore และ core gene จำเป็นต้องอาศัย promoter gene ในส่วน upstream เพื่อควบคุมการทำงาน ซึ่งก็คือ core promoter ที่อยู่ในตำแหน่ง nucleotide ที่ 1742-1849 ความผิดปกติในส่วนของ promoter อาจมีผลทำให้การทำงานของ precore ลดลงได้ เช่น ทำให้การสร้างของ HBeAg ลดลงกว่าเดิมหรืออาจสร้างโปรตีนไม่ได้เลยแม้ว่าจะไม่มีการ กลายพันธุ์ที่ precore gene ร่วมด้วยก็ตาม ตำแหน่งของ core promoter ที่พบว่ามีการกลายพันธุ์ได้บ่อย ได้แก่ การเปลี่ยนจาก A เป็น T และ G เป็น A ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1762 และ 1764 ตามลำดับ

ความสำคัญของ HBeAg

การศึกษาในสัตว์ทดลอง (transgenic mice) และในผู้ป่วยที่เป็นตับอักเสบแสดงให้เห็นว่า ความรุนแรงของการเกิดตับอักเสบไม่ได้เกิดจากการที่ไวรัสทำลายเซลล์ตับโดยตรง (direct cytopathic effect) แต่เกิดจากผลโดยอ้อมจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host immune response) เช่น CD8+cytotoxic T lymphocytes (CTLs) และ HLA class I molecule ที่ทำลายเชื้อไวรัสโดยที่มี HBcAg ของไวรัสเป็น immune target ที่สำคัญ นอกจากนี้ CD4+lymphocytes (CTLs) และ HLA class II molecule ยังช่วยจับทำลายส่วนโปรตีนของไวรัสที่อยู่ใน

ตารางที่ 3. ความสัมพันธ์ของ T-1858 และ precore stop codon mutation ที่ตำแหน่ง 1896

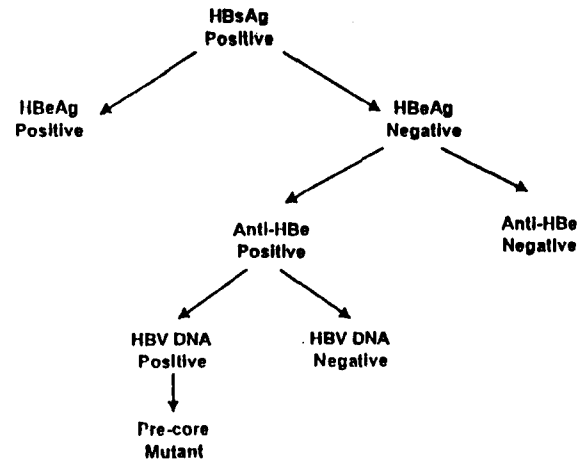
	T-1858 prevalence	C-1858 prevalence	Precore mutant prevalence
Asia	88 %	10 %	51 %
Southern Europe	85 %	17 %	60 %
Middle East	74 %	2 %	53 %
Africa	60 %	31 %	47 %
Northern Europe	22 %	71 %	12.%

เลือด เช่น HBeAg โดยทำงานร่วมกับ antigen-presenting cells อื่น ๆ เช่น macrophage เป็นต้น [1,5,16] ผลของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสที่ไม่เท่ากันในผู้ป่วยแต่ละคน ทำให้ความรุนแรงและการดำเนินของโรคแตกต่างกันออกไป เช่นในรายที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันไม่ดีจะมีโอกาสเป็นพาหะหรือตับอักเสบแบบเรื้อรังสูงขึ้น ตรงกันข้ามในผู้ป่วยที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมากเกินไปอาจทำให้เกิดภาวะตับวายอย่างเฉียบพลัน (fulminant liver failure) ได้

HBeAg เป็น polypeptide ที่พบในเลือดและใช้เป็น marker ที่สำคัญในทางคลินิกที่แสดงถึงการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส (active viral replication) นอกเหนือจากการตรวจหาระดับของ HBV DNA ในเลือด ความสำคัญของ HBeAg ต่อเชื้อไวรัสยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าไม่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของไวรัสโดยตรงเพราะ HBe-minus mutants ยังคงสามารถแบ่งตัวได้ตามปกติไม่ต่างจาก wild type ทั่ว ๆ ไป มีหลักฐานทั้งในสัตว์ทดลองและในคนที่แสดงว่า HBe Ag ทำหน้าที่เป็น toleragen กล่าวคือเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด immune tolerance เพราะมีโครงสร้างคล้ายกับ HBcAg ที่เป็น immune target ของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ HBeAg ยังสามารถแย่งจับกับ CTLs แทนที่ HBcAg ทำให้เซลล์ตับซึ่งติดเชื้อไวรัสถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายน้อยลง[16,17] ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือทารกที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี จากมารดาที่มี HBeAg มีโอกาสเป็นตับอักเสบเรื้อรังสูงกว่าทารกที่ได้รับเชื้อจากมารดาที่ตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือด[18] นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงว่า HBeAg อาจทำให้ cytokines บางอย่างเช่น interferon ทำงานลดลงกว่าปกติ (down regulation)[19]

การตรวจหา precore mutations

ในทางคลินิกควรสงสัยว่ามีการติดเชื้อ precore mutants เมื่อพบว่าผู้ป่วยที่มีติดเชื้อไวรัส บี แบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B) มีการทำงานของตับผิดปกติ (elevation of transaminase) โดยที่ตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือด แต่ยังคงมีระดับของ HBV DNA ในเลือดสูง (รูปที่ 4)



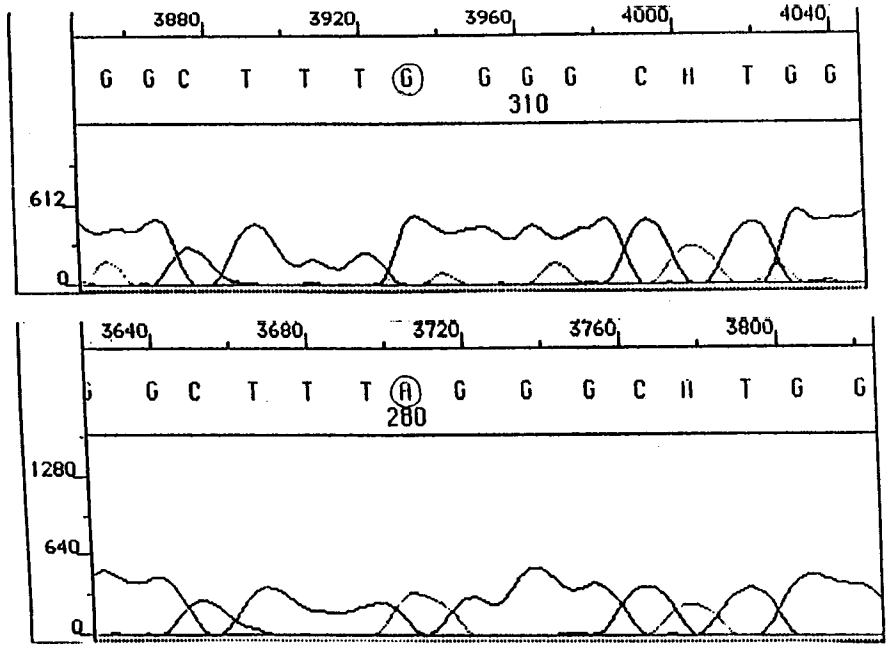
รูปที่ 4. แสดง serological profile ของ precore mutant chronic hepatitis B

โดยทั่วไปมักจะอนุโลมว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะดังกล่าวนี้ (phenotypic characteristics) มีการติดเชื้อ precore mutants โดยไม่จำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ยีน (genotypic analysis) ของเชื้อไวรัสโดยตรง

วิธีการตรวจวิเคราะห์ยีนเพื่อยืนยันว่าเป็น precore mutants โดยวิธีทางห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล ซึ่งใช้ในงานวิจัยมีหลายวิธี เช่น การตรวจลำดับของ DNA (DNA sequencing) ในส่วนของ precore gene (รูปที่ 5) หรือการตรวจหา TAG mutation ของ codon ที่ 28 โดยใช้วิธี allele-specific PCR หรือวิธีอื่น ๆ เช่นวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นต้น

ความสำคัญของ precore mutations ในทางคลินิค

ปัจจุบันยังไม่ทราบความสำคัญในทางคลินิกของ precore mutants อย่างชัดเจนแม้ว่าในระยะแรกๆ ของการค้นพบ precore mutants จะมีรายงานถึงความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตับวายอย่างเฉียบพลัน (fuminant hepatitis) และตับอักเสบเรื้อรัง (chronic active hepatitis) ที่รุนแรงกว่า wild types ทั่ว ๆ ไป[20-22] อย่างไรก็ตามในระยะหลัง ๆ มีรายงานเพิ่มเติมที่แสดงว่า precore mutants พบได้ในกลุ่มที่มีการดำเนินของโรคไม่รุนแรง เช่นผู้ป่วยที่เป็นพาหะหรือผู้ป่วยที่มีตับอักเสบไม่รุนแรง (mild hepatitis)[23-27]



รูปที่ 5. แสดงการตรวจลำดับของ DNA (DNA sequencing) ในส่วนของ precore gene ที่ตำแหน่ง nucleotide 1896

การดำเนินของโรคตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัส บี ชนิด precore mutants

การดำเนินของโรคตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัส บี ของ wild type โดยทั่ว ๆ ไปแบ่งเป็น 3 ระยะ[28] ดังนี้

1. ระยะของ immune tolerance หรือระยะ HBe Ag positive มักพบในเด็กหรือวัยรุ่น ระยะนี้จะมีการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสจำนวนมากในร่างกายและตรวจพบ HBV DNA ในระดับสูง แต่เมื่อตรวจการทำงานของตับจะอยู่ในเกณฑ์ปกติ ผู้ป่วยมักไม่มีอาการผิดปกติใด

2. ระยะของ immune clearance หรือระยะ HBe Ag seroconversion มักพบในช่วงอายุประมาณ 20-40 ปี ผู้ป่วยจะมีการกำเริบของตับอักเสบเป็นระยะ ๆ เนื่องจากกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำลายเซลล์ตับที่มีการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวข้างต้น ตรวจพบระดับของ HBV DNA ลดลง HBeAg ในเลือดจะค่อย ๆ หายไป และตรวจพบ anti-HBe

3. ระยะของ HBV integration หรือระยะ anti-HBe-positive ระยะนี้เชื้อไวรัสจะมีการ integrate เข้าไปในเซลล์ของตับ การอักเสบของตับโดยรวมจะลดลงและระดับของ HBV DNA จะต่ำลงมากจนตรวจไม่พบ

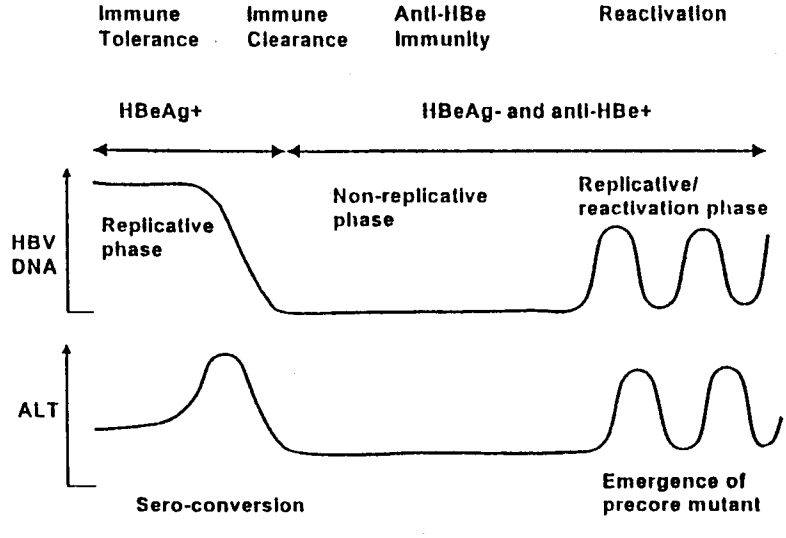
สำหรับผู้ป่วยที่มี precore mutants มักจะมีการกำเริบของโรคภายหลังจากระยะที่มี HBeAg seroconversion แล้ว (ตารางที่ 4) [29] การดำเนินของโรคอาจเป็นแบบหนึ่งแบบใดดังต่อไปนี้

1. ยังคงมีความผิดปกติของการทำงานของตับอย่างต่อเนื่อง เช่นมีระดับ ALT สูงผิดปกติโดยไม่เข้าสู่ระยะสงบของโรค

2. มีระยะกำเริบ (active periods) ของตับอักเสบเป็นระยะ ๆ สลับกับระยะสงบ (inactive periods) ของโรค ซึ่งบางครั้งระยะกำเริบอาจมีความรุนแรงทางคลินิกคล้ายกับตับอักเสบแบบเฉียบพลัน ในกรณีนี้จะตรวจพบว่ามีการเพิ่มของระดับ HBV DNA ในเลือดก่อนที่จะมีการกำเริบของโรคแต่ละครั้ง (รูปที่ 6)[30] ผู้ป่วยบางรายจะมีการดำเนินของโรคต่อไปเป็นตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma)

ตารางที่ 4. แสดงระยะต่าง ๆ ของการดำเนินโรคของ chronic hepatitis B

Phase	Duration	HBV DNA	ALT	Liver Damage	HBsAg
HBeAg positive phase	Short duration or may last for may years	High serum HBV DNA concentrations	Normal or elevated	Little liver damage or progressive liver damage leading to cirrhosis	HBsAg positive
HBeAg sero-conversion	Short duration	Decline in serum HBV DNA	Increased ALT levels	Severe immunologically induced liver necro-inflammation	HBsAg positive
Anti-HBe positive phase	May last for years, decades	HBV DNA decreases to undetectable	Serum ALT returns to normal	Reduced liver necro-inflammation	HBsAg may be cleared and HBV infection eliminared
Reactivation Phase (In patients who develop pre core mutant HBV)	May last for many years or may be associated with fulminant hepatitis B	HBV DNA positive or fluctating HBV DNA levels	Elevated ALT or fluctuating ALT levels	Progressive liver damage which may be severe leading be severe leading to cirrhosis	HBsAg positive



รูปที่ 6. แสดงรูปแบบการดำเนินโรคของ precore mutant chronic hepatitis B

ตับอักเสบเรื้อรังจาก precore mutants

Okamoto และพวก[9] ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) พบว่าในช่วงแรก ๆ ของระยะ HBeAg positive จะตรวจพบเฉพาะ wild type เท่านั้นไม่พบ precore mutants ต่อมาในระยะ HBeAg seroconversion ตรวจพบ precore mutants ได้มากขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อถึงระยะของ anti-HBe phase จะพบ precore mutants เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามยังคงไม่ทราบแน่ชัดว่า precore mutants นี้เป็นการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเพื่อความอยู่รอดของ wild type หรือเพราะมี precore mutants จำนวนน้อย ๆ ที่ตรวจไม่พบตั้งแต่ระยะเริ่มแรกซึ่งรอดพ้นจากการทำลายของ CTLs (escape mutants) และมีการแบ่งตัวของไวรัสเพิ่มมากขึ้นในภายหลัง

ยังไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่าง precore mutants และความรุนแรงของโรคตับอักเสบเรื้อรังดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มีทั้ง wild type และ precore mutants ร่วมกันมักไม่มีตับอักเสบที่รุนแรง อาจเพราะเป็นอยู่ในช่วงกลาง (intermediate stage) ก่อนที่ precore mutants จะเด่นในภายหลัง หรืออาจเป็นเพราะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเหล่านี้ ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัด HBeAg จึงทำให้มีตับอักเสบที่ไม่รุนแรง[23,24]

การศึกษาส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วยที่มี precore mutants จะมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย interferon ไม่ดีเทียบเท่ากับ wild type ทั่ว ๆ ไป[30] นอกจากนี้ยังมีโอกาสเกิดการกำเริบ (relapse) ภายหลังการรักษาสูงกว่าอีกด้วย[31] มีบางรายงานเท่านั้นที่พบว่าผลการรักษาด้วย interferon ไม่แตกต่างกันในระหว่าง 2 กลุ่มนี้[32] ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการศึกษาโดยใช้ยากลุ่ม nucleoside analogues ชนิดใหม่ ๆ เช่น lamivudine ในการรักษาผู้ป่วยที่มี precore mutants ผลการรักษาเบื้องต้นด้วย lamivudine พบว่าได้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มที่มี HBeAg-positive[33]

ตับวายอย่างเฉียบพลันจาก precore mutants

มีรายงานการเกิดตับวายอย่างเฉียบพลัน (fulminant hepatitis) จาก precore mutants ในหลายประเทศ เช่น แถบเมดิเตอร์เรเนียนและญี่ปุ่น เป็นต้น มีทั้งรายงานในทารกที่เกิดจากแม่ที่มี anti-HBe-positive[25] และผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสทางเพศสัมพันธ์จากผู้ที่มี antiHBe-positive[26] นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดตับวายอย่างเฉียบพลันจาก precore mutants ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive therapy) และในผู้ป่วยที่มีตับอักเสบรุนแรงภายหลังการทำผ่าตัดเปลี่ยนตับ (liver transplantation)[1,9,34] อย่างไรก็ตามยังคงไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนว่า precore mutants เป็นสาเหตุของการเกิดตับวายอย่างเฉียบพลันจริง เนื่องจากพบว่าผู้ป่วยที่มี precore mutants ชนิดเดียวกันนี้เป็นเพียงพาหะของโรค (chronic carrier) ที่ไม่มีอาการใด ๆ[27] ทั้งนี้อาจเป็นจากความแตกต่างจากปัจจัยของผู้ป่วยเอง (host factor) โดยเฉพาะ HLA typing โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับชนิดและความรุนแรงของเชื้อไวรัสโดยตรง[5,35] หรืออาจเป็นผลจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่น ๆ นอกเหนือจากบริเวณ precore gene ที่ทำให้สายพันธุ์ของไวรัสเหล่านี้มีความรุนแรงมากขึ้นเพราะการศึกษาส่วนใหญ่มักไม่ได้ทำการตรวจลำดับของพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้ง genome[6]

การศึกษา precore mutants ในประเทศไทย

จากการศึกษาที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการตรวจหาลำดับของ DNA (DNA sequencing) ในส่วนของ core promoter และ precore gene ของผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังที่เป็น HBeAg-negative จำนวน 16 คนพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nucleotide1896 เพียง 3 ราย(ร้อยละ18.8) มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nucleotide 1814 (start codon) จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 37.5) และที่เหลือเป็นการกลายพันธุ์ที่ core promoter ที่ ตำแหน่ง 1762 และ 1764 จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 75) (บางรายมีการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่ง)

ตารางที่ 5. Hepatitis B virus core promotor and precore mutans in chronic hepatitis

Position of mutation	HBeAg-positive n = 7	HBeAg-negative n = 16
Core promotor		
1762 A-T, 1764 G-A	2 (28.6 %)	12 (75 %)
Precore gene		
Start codon	0 (0 %)	6 (37.5 %)
Codon 28		
1896 G-A	0 (0 %)	3 (18.8 %)

NB. 2 patients showed mutations at promotor and start codon, 2 at promotor and codon 28 (turned to stop codon), 1 at the start codon and codon 28 (turned to stop codon).

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังที่เป็น HBeAg-positive อีกจำนวน 7 คน พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ core promoter จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 28.6) (ตารางที่ 5)[36]

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำการศึกษามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง nucleotide 1896 ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ ในเอเชีย สาเหตุยังไม่ทราบชัดเจน แม้ว่าสายพันธุ์ที่มีลำดับของ base ที่ตำแหน่ง 1858 ซึ่งอยู่ตรงกันข้ามกับตำแหน่ง 1896 บน hairpin structure จะเป็น T เป็นส่วนใหญ่ก็ตาม

สรุป

ไวรัสตับอักเสบ บี มีการกลายพันธุ์ได้หลายตำแหน่ง ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ precore mutants ซึ่งเกิดจาก point mutation ที่ตำแหน่ง nucleotide 1896 (G ไปเป็น A) ของ codon ที่ 28 ได้เป็น TAG ซึ่งเป็น stop codon ทำให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg ได้ (HBe-minus mutants) เหตุผลที่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งนี้มากกว่าตำแหน่งอื่น ๆ อธิบายได้จากรูปร่างแบบ hairpin structure ของ pregenomic encapsidation ($\mathcal{E}$) signal ที่อยู่ส่วนปลายทาง 5' end การเกิด precore mutation นี้ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวและการแสดงออกทางพันธุกรรมของไวรัส ในปัจจุบันยังคงไม่ทราบความสำคัญของ precore mutations อย่างชัดเจนและยังไม่มีหลักฐานยืนยันที่ชัดเจนว่าทำให้เกิดอาการทางคลินิกรุนแรงกว่า wild type ทั่ว ๆ ไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย (สกว.) ในส่วนเมธีวิจัยอาวุโส ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ที่ได้สนับสนุนงานวิจัยในรายงานนี้

อ้างอิง

1. Carman WF, Thomas HC, Zuckerman AJ, Harrison T. Hepatitis B: Molecular variants. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. Viral hepatitis: Scientific Basis and Clinical Management. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1995: 115-36
2. ยง ภู่วรวรรณ. ไวรัสตับอักเสบและการป้องกัน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ชัยเจริญ 2539.
3. Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B virus. Ann Rev Biochem 1987; 56: 651 -93

4. Wards JR, Scaglioni P, Melegari M. Hepatitis B viral variants. In : Schmid R, Bianchi L, eds. Acute and Chronic Liver Diseases, Molecular Biology and Clinics. Kluwer: Academic Publisher,1996: 12 -26

5. Lee W. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997 Dec 11; 337(24): 1733 -45

6. Tong S, Trepo C. The HBe-minus mutants of hepatitis B. In : Harrison TJ, Zuckerman AJ, eds. The Molecular Medicine of Viral Hepatitis. Chichester: John Wiley & Sons,1997: 89-104

7. Thomas HC, Carmen WF. Envelope and precore/ core variants of hepatitis B virus. Gastroenterol Clin North Am 1994 Sep; 23(3): 499-544

8. Fiordalisi G, Cariani E, Mantero G, Zanetti A, Tanzi E, Chiaramonte M, Primi D. High genomic variability in the pre-C region of hepatitis B viru s in anti - HBe, HBV - DNA positive chronic hepatitis. J Med Virol 1990 Aug;31(4): 297-300

9. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Fanaka T. Hepatitis B viruses with pre - corer egion defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody againste antigen. J Virol 1990 Mar; 64(3): 1298-303

10. Kramvis A,Bukofzer S, Kew MC, Song E. Nucleic sequence analysis of the precore region of hepatitis B virus from sera of Southern African black adult carriers of the virus. Hepatology 1997 Jan; 25 (1): 235-40

11. Li J, Tong S, Wen Y, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A Rarely circulates as an Hbe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. J Virol 1993 Sep; 67(9): 5402-10

12. Schalm SW, Thomas HC, Hadziyannis SJ. Chronic hepatitis B. Prog Liver Dis 1990; 9: 443 - 62

13. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta,Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. Hepatology 1996 Sep; 24(3): 494-501

14. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshiba M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promotor for an e antigen - negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. J Virol 1994 Dec; 68(12): 8102-10

15. Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K. Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. The precore/core promoter mutant (T^{1764} A^{1764}) of hepatitis B virus: clinical significan significance and easy method for detection. J Gen Virol 1995 Dec; 76(12):3159 -64

16. Thomas HC, Jacyna M, Waters J, Main J. Virus-host interaction in chronic hepatitis B virus infection. Semin Liver Dis 1988 Nov; 8(4): 342 - 9

17. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Sep; 87(17): 6599 -603

18. Raimondo G, Tanzi E, Brancatelli S, Campo S, Sardo MA, Rodino G, Rernice M, Zanetti AR.

Is the course of perinatal hepatitis B virus infection influenced by genetic heterogeneity of the virus?J Med Virol1993 Jun;42(2): 510-4

19. Twu JS, Schloemer RH. Transcription of the human interferon gene is inhibited by hapatitis B virus. J Virol 1989 Jul; 63(7): 3065-71
20. Chu CM, Karayiannis P, Fowler M, Moniardino J, Liaw YF, Thromas HC. Natural history of chronic hepatitis in Taiwan: Studies of hepatitis virus DNA in serum: Hepatology 1985 May-Jun; 5(3): 431-4
21. Liang T, Hasikawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidermic of fulminant hepatitis. N Engl J Med 1991 Jun 13; 324(24): 1705-8
22. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K,Ohto M. Mutation in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J Med 1991 Jun 13; 324(24): 1699 -704
23. Carmen WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronicHBV infection. Lancet 1989 Sep 9; 2(8663): 588-91
24. Naoumov NV, Schneider R, Grotzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR, Will H. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. Gastroenterology 1992 Feb;102(2): 538 - 43
25. Hsu HY, Chang MH, Lee CY, Hsieh KH, Ni YH, Chen PJ, Chen DS. Precore mutant of hepatitis B virus in childhood fulminant hepatitis B: an infrequent association. J Infect Dis 1995 Apr; 171(4): 776 - 81
26. Yotsumoto S, Kojima M, Shoji I, Yamamoto K, Okamoto H, Mishiro S. Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. Hepatology 1992 Jul; 16(1): 31-5
27. Aye TT, Uchida T, Becker SO, Shijkata T, Mima S. Completely or nearly identical hepatitis B virus strains replicate between patients with acute or fuminant hepatitis and their respective infectious sources. J Med Virol 1994 Jan; 42(1): 60-5
28. Chen DS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: new light on an old story. J Gastroenterol Hepatol 1993 Sep - Oct; 8(5): 470 - 5
29. Hadziyannis S. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. Viral Hepatitis 1995 Apr; 1(4): 7-36
30. Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, Randone A, Abate ML, Manzini P. Hepatitis B virus unable to secret e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. Gastroenterology 1993 Sep; 105(3): 845 -50
31. Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S,Trep C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and precore region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. J Med Virol 1996 Jan; 48(1):8-16
32. Fattovich G, McIntyre G, Thursz M, Colman K, Giuliano G, Alberti A, Thomas HC, Carman WF. Hepatitis B precore/core variation and

interferon therapy. Hepatology 1995 Nov; 22 (5): 1355 - 62

33. Lai CL, Chien RN, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: a 12 month double-blind, placebo-controlled multicenter study.N Engl J Med1998 Jul 9;339(2):628-33
34. Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JE, Bowden DS. Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. Hepatology 1995 Jan; 21(1):14-8
35. Karayiannis P, Alexopoulou A, Hadziyannis S, Thursz M, Watts R, Suto S, Thomas HC. Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus e antigen-negative infection: Importance of host factors. Hepatology 1995 Dec; 22(6):1628-34
36. Poovorawan Y, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-in N, Hirsch P, Tangkijvanich P, Kull avanijaya P. Hepatitis B virus core promoter and precore mutants in Thai chronic hepatitis patients. J Sci Soc Thai 1999 (inpress).