

· 调查报告 ·

某县 204 例乙型肝炎病毒基因型及其临床相关性分析

马明炎¹, 廖俐雅¹, 余登琼¹, 熊中政¹, 郭元元², 廖 璞^{2△}

(1. 重庆市垫江县人民医院检验科 408300; 2. 重庆市临床检验中心 400014)

摘要:目的 了解重庆垫江县地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布及其与临床的相关性。方法 选取垫江县 HBV-DNA 阳性的 HBV 感染者 204 例,应用聚合酶链反应(PCR)和直接测序法检测 HBV 基因型并分析其与临床的相关性。结果 204 例 HBV-DNA 阳性血清标本中,测序成功为 146 例。其中 B 型 98 例(67.12%),C 型 47 例(32.19%),D 型 1 例(0.69%),C 基因型丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)指标高于 B 基因型($P < 0.05$);C 基因型患肝硬化和肝细胞癌的比例高于 B 基因型($P < 0.05$)。结论 B 型为本地区的优势基因型,并且 C 型 HBV 感染者易引起肝脏的严重损伤。

关键词:肝炎病毒,乙型;基因型;临床相关性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3747-02

Analysis on 204 cases of hepatitis B virus genotypes in a county and their clinical correlation

Ma Mingyan¹, Liao Liya¹, Yu Dengqiong¹, Xiong Zhongzheng¹, Guo Yuanyuan², Liao Pu^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Dianjiang County People's Hospital, Chongqing 408300, China;

2. Chongqing Municipal Clinical Laboratory Center, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes in Dianjiang area of Chongqing and their clinical correlation. **Methods** Serum samples from 204 HBV-DNA positive patients with chronic HBV infection, including 183 cases of chronic hepatitis B (CHB), 15 cases of liver cirrhosis (LC) and 6 cases of hepatocellular carcinoma (HCC), were collected and detected for HBV genotypes by PCR and direct sequencing. Their clinical correlation was analyzed. **Results** Of all 204 HBV-DNA positive serum samples, 146 cases were detected successfully by direct sequencing, including 98 cases (67.12%) of genotype B, 47 cases (32.19%) of genotype C and only 1 cases (0.69%) of genotype D. The value of ALT and AST in genotype C was significantly higher than that in genotype B ($P < 0.05$); genotype C was more prevalent in LC and HCC than genotype B ($P < 0.05$). **Conclusion** Genotype B is the superior genotype in this area. Genotype C may induce more serious damage of liver in the patients with chronic HBV infection.

Key words: hepatitis B virus; genotype; clinical correlation

HBV 感染呈全球性分布,各地区不同程度的流行性与生活习惯、经济条件、人种等因素有关外,与病毒本身的生物学特点更加密切相关^[1]。从 1988 年开始,根据 HBV 全基因序列异质性大于等于 8% 的界限,对 HBV 核苷酸进行序列分析,HBV 被分为 8 个基因型:即 A、B、C、D、E、F、G 和 H^[2]。HBV 基因型呈地域分布,不同基因型在致病性、对药物的敏感性及基因变异等方面均有差异^[3]。现将垫江县 204 例乙型肝炎病毒基因型及其临床相关性分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取重庆市垫江县人民医院门诊及住院的 HBV-DNA 阳性的 HBV 感染者 204 例,其中,慢性乙型肝炎 183 例,肝硬化 15 例,肝细胞癌 6 例;疾病的诊断依据参照 2000 年全国肝炎会议拟订方案。所有标本经乙型肝炎 5 项检测,其中 115 例表面抗原、e 抗原、核心抗体为阳性,85 例表面抗原、e 抗体、核心抗体为阳性,3 例表面抗原、e 抗原为阳性,仅 1 例表面抗原阳性。标本(血清)保存于 -80℃ 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 微量样品基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)、2×Pfu PCR Master Mix、1 000 bp DNALadder 购自德国 Qiagen 公司;HBV 血清学标志物检测试剂盒、HBVDNA 荧光定量 PCR 试剂盒购自广州达安有限公司,琼脂糖购自美国 Gibco 公司,引物由 TaKaRa 有限公司合成。PCR 扩增仪为北京生物有限公司产品,HC-3018R 型高速冷冻离心机为科大创新公司产品,凝胶图像分析系统 DocGel2000 为美国 BioRad

公司产品,荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

1.2.2 HBV S 基因扩增和测序 按照 Qiagen 微量样品基因组 DNA 提取试剂盒说明书处理标本,获得模板 DNA。PCR 扩增 HBV S 基因:正义链:5'-GCG GGG TTT TTC TTG TT GA-3' 反义链:5'-GGG ACT CAA GAT GTT GTA CAG-3',引物由 TaKaRa 有限公司合成。PCR 反应体系(总量 25 μL):2×Taq PCR Master Mix 13 μL;模板 DNA 3 μL;正义链引物(10 μmol/L)1 μL;反义链引物(10 μmol/L)1 μL;双蒸水 7 μL。PCR 反应条件:95℃ 10 min;95℃ 30 s;52℃ 45 s;72℃ 90 s;72℃ 10 min;35 个循环。将 204 份 PCR 扩增产物(25 μL)送北京华大基因公司测序。将测得基因序列与 Gen Bank 进行同源性比较,以确定 HBV 基因型。

1.2.3 HBV-DNA、肝功能及乙型肝炎标志检测 运用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪检测 HBV-DNA;采用 AU2700 全自动生化分析仪检测丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST);应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 HBsAg、抗-HBs、HbeAg、抗-Hbe、抗-HBe 等乙型肝炎标志物,按产品说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

测序成功 146 例,其中,慢性乙型肝炎 125 例,肝硬化 15 例,肝细胞癌 6 例;B 型 98 例(67.12%),C 型 47 例(32.19%),

△ 通讯作者, Tel: (023) 63519127; E-mail: liaopu@sina.com。

D 型 1 例(0.69%);B 型男 66 例,女 32 例,年龄(33±16.5)岁;C 型男 32 例,女 15 例,年龄(35±13.6)岁;D 型男 0 例,女 1 例,年龄 22 岁。HBV 基因型与患者血清学标志物及 HBV-DNA 载量的关系、患者临床表现及预后的关系及不同 HBV 基因型与病情比较见表 1~3。

表 1 B、C 基因型 HBV-DNA 水平及 HBeAg 阳性率比较

基因型	n(%)	HBV-DNA($\bar{x}\pm s$,Log 值)	HBeAg 阳性率(%)
B 型	98(67.12)	6.62±1.43	69.39
C 型	47(32.19)	6.05±1.46	70.21

表 2 B、C 型 ALT、AST 比较

基因型	n(%)	ALT($\bar{x}\pm s$,U/L)	AST($\bar{x}\pm s$,U/L)
B 型	98(67.12)	168.23±42.10	153.82±48.94
C 型	47(32.19)	301.22±84.07*	338.54±76.71*

*: $P<0.05$,与 B 型相比较。

表 3 B、C 型病情比较[n(%)]

基因型	慢性乙型肝炎	肝硬化	肝细胞癌
B 型	93(94.9)	4(4.08)	1(1.02)
C 型	31(65.96)	11(23.40)*	5(10.64)*
D 型	1	0	0

*: $P<0.05$,与 B 型相比较。

3 讨 论

HBV 基因型是长期点突变累积形成的,由于 HBV 在逆转录过程中的不对称转录和缺乏校对酶的作用,HBV 突变率较高。最近有报道在越南发现新的 HBV 基因型 I^[4],使得 HBV 基因型增至 9 个。随着进一步深入研究,发现同一种基因型,病毒的序列特点及临床表现也存在一定的差异,根据全基因组序列异质性大于 4%而小于 8%的原则,HBV 基因型进一步可分为不同的基因亚型,如:A 基因型可分为 A1(Aa)、A2(Ae)、A3(Ac)亚型;B 基因型可分为 B1(Bj)、B2(Ba)、B3、B4 亚型;C 基因型可分为 C1、C2、C3、C4 亚型等。近年的研究表明,HBV 分型在 HBV 基因型之间存在一定的流行病学与临床特征差异^[5]。Zeng 等^[6]研究表明,中国 HBV 感染者的基因型主要是 B 和 C 型,南方地区主要以 B 型为主,北方地区则以 C 型较多。本文应用 HBV S 区基因直接测序法来进行分型,该方法准确度高,结果可靠;检测出垫江县 HBV 感染者的基因型以 B 型居多,与文献报道结果一致;但本调查结果也显示,HBV 基因型与性别及年龄之间没有相关性。

HBV 感染人体后,由于感染者的 HBV 基因型、年龄、机体免疫力、及 HBV-DNA 载量等的不同,他们的临床表现及预后也有差异。可表现为:一过性病毒血症、急性肝炎、无症状的病毒携带状态、慢性肝炎、肝衰竭、肝硬化及肝癌。本研究显示,C 型感染者血清 ALT、AST 水平均高于 B 型,且基因 C 型感染者较 B 型感染者更易发生肝硬化以及肝细胞癌;这与钟崇芳等^[7]报道,基因 C 型感染者其肝脏炎症坏死评分高于基因 B 型感染者,和基因 C 型 HBV 感染者较 B 型感染者更易发展为肝硬化和肝癌^[8]的报道一致。提示 HBV 基因型与疾病的活动性可能存在一定关系。

本调查对垫江县 HBV 感染者不同基因型的临床特征分析提示,基因 B 型和基因 C 型感染者 HBeAg 阳性率和 HBV-DNA 水平的差异无统计学意义。对于不同基因型 HBV-DNA 水平及 HBeAg 阳性率之间关系的报道众说纷纭^[9-10]。有研究报道,基因 C 型较 B 型的 HBV-DNA 水平更高;也有报道称,

在 HBeAg 阳性患者中 HBV-DNA 病毒载量较高的是:基因 C 型,而 HBeAg 的阴性患者中基因 D 型者病毒载量更高^[11]。也有报道称,不同基因型间的 HBeAg 阳性率及 HBV-DNA 没有关系。因此,不同 HBV 基因型间 HBeAg 阳性率和 HBV-DNA 含量的关系有待进一步研究。

还有研究表明,HBV 基因型与抗病毒治疗有关^[12],但由于目前缺乏大量 HBV 基因型分型与治疗关系的前瞻性研究,国际上还没将 HBV 基因型分型作为用药指标和治疗标准,然而对基因型的研究却仍然势在必行,希望通过大家的共同努力能使其成为乙型肝炎病毒个性化治疗的一个重要指标。

通过本研究了解到垫江县 HBV 基因型的分布情况及其与临床表现及预后的关系,有利于指导临床医生选择合理的治疗方案及个体性指导用药,为有效控制本县乙型肝炎病情提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2009, 373(9663): 582-592.
- [2] Wright T L. Introduction to chronic hepatitis B infection[J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(Suppl 1): S1-6.
- [3] Li XD, Wang L, Liu Y, et al. Characterization of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in 1301 patients with chronic hepatitis B in North China[J]. Chin Med J(Engl), 2011, 124(24): 4178-4183.
- [4] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 67-74
- [5] Sugiyama M, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype and the mutation related to clinical outcome [J]. Nihon Rinsho, 2011, 69 Suppl 4: 350-355.
- [6] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J]. J Viral Hepat, 2005, 12(6): 609-617.
- [7] 钟崇芳,郝娃,李卓. HBV 基因型与肝脏病理改变的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(16): 1859-1864.
- [8] Sumi H, Yokosuka O, Seki IV, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 19-26.
- [9] 郭晓凤,卢德荣,梁伟峰,等. 乙型肝炎病毒基因型与血清病毒载量的关系[J]. 现代实用医学杂志, 2009, 7(2): 773-782.
- [10] Selabe SG, Song E, Burnett RJ, et al. Frequent detection of hepatitis B virus variants associated with lamivudine resistance in treated South African patients infected chronically with different HBV genotypes[J]. J Med Virol, 2009, 81(6): 996-1001.
- [11] Tuaille E, Mondain AM, Nagot N, et al. Comparison of serum HBsAg quantitation by four immunoassays, and relationships of HBsAg level with HBV replication and HBV genotypes[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32143.
- [12] Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2006, 44(2): 326-334.