

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)02-0157-03

江苏地区不同类型乙型肝炎患者 HBV 基因分型研究

李桂珍, 刘兴祥, 王兴亮 (淮安市第四人民医院分子生物学实验室, 江苏 淮安 223300)

HBV genotyping in hepatitis B patients in Jiangsu province

LI Gui-Zhen, LIU Xing-Xiang, WANG Xing-Liang

Laboratory of Molecular Biology, Fourth People's Hospital, Huaian 223300, China

【Abstract】 AIM: To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes of hepatitis B patients in Jiangsu province and analyze the relationship of HBV genotypes with the serum HBV DNA levels of patients. METHODS: The HBV genotypes and HBV DNA levels of 176 patients in Jiangsu province were detected by real-time quantitative PCR and Taqman MGB probe technology. RESULTS: Among 176 HBV-infected patients, the proportions of genotype C, B-C mixed-type, B, A and D were 66.5% (117/176), 22.7% (40/176), 5.1% (9/176), 0.6% (1/176) and 0.6% (1/176), respectively. The results showed there were significant differences between genotype C and genotype B-C mixed-type in HBV DNA load ($P < 0.05$), and the HBV DNA level of genotype B-C mixed-type was significantly higher than that of genotype C. The rate of genotype C among the patients of chronic hepatitis B was 71.4%, higher than that among the patients of acute hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, but it showed no significant differences in the various clinical types of HBV infection tested ($P > 0.05$). CONCLUSION: Genotype C and genotype B-C mixed-type are the two dominant genotypes in the patients in Jiangsu province, and genotype B, A, and D are also found, but not common. The HBV DNA load of genotype B, C mixed-type is significantly higher than that of genotype C.

【Keywords】 Hepatitis B Virus; Genotype; polymerase chain reaction

【摘要】目的: 了解江苏地区乙型肝炎病毒基因型分布特征, 探讨 HBV 各基因型与血清 HBV DNA 水平的关系。方法: 采用荧光定量 PCR 结合 Taqman MGB 探针技术, 对江苏地区 176 份乙型肝炎患者血清中的 HBV DNA 进行基因分型和定量检测。结果: 176 例血清中, C 型 117 人 (66.5%), B, C 型 40 人 (22.7%), B 型 9 人 (5.1%), D 型 1 人 (0.6%), A 型 1

人 (0.6%)。C 型与 B, C 混合型在 HBV DNA 水平上存在统计学差异 ($P < 0.05$)。B, C 混合型的 HBV DNA 水平明显高于 C 型。C 基因型在慢性乙型肝炎患者中的所占比例 (71.4%) 比在急性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者中所占的比例较高, 但差异无统计学意义。结论: 江苏地区 HBV 基因型以 C 型为主, B, C 混合型次之, B 型较少, D 型, A 型极少, B, C 混合型患者的 HBV DNA 数量水平高于 C 型。

【关键词】 肝炎病毒; 乙型; 基因型; 聚合酶链反应

【中图分类号】 R512.62 **【文件标识码】** A

0 引言

乙型肝炎病毒 (HBV) 为一双链 DNA 病毒, 主要引起急、慢性肝炎、肝硬化和肝癌, 其基因序列高度变异, 目前 HBV 已分为 A ~ H 8 种基因型^[1], HBV 基因型呈一定的地域性分布。国外研究发现, HBV 基因型与临床表现、预后、治疗应答均有一定关系, 不同基因型具有不同的致病性, HBV 基因型与肝癌发生率也存在一定相关性, HBV DNA 水平与其基因型之间有无关系存在争议。国内研究多集中在研究某地区乙型肝炎患者 HBV 基因型的组成与分布上, 关于 HBV 基因型与 HBV DNA 水平、肝病严重程度等之间的关系等方面的研究还比较少, 研究结果也多存在争议。本研究采用荧光定量 PCR 结合 Taqman MGB 探针技术, 对江苏淮安地区 176 例乙型肝炎患者进行 HBV 基因分型和 HBV DNA 定量检测, 探讨 HBV 各基因型与血清 HBV DNA 水平的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 176 份 HBV 感染血清均于 2005-09/2006-02 采自江苏省淮安市第四人民医院门诊和住院患者, 其中急性乙型肝炎 19 例, 慢性乙型肝炎 119 例, 肝硬化及肝癌 38 例。其中, 男性 134 例, 女性 42 例, 年龄 10 ~ 77 (平均年龄 37.5) 岁, 诊断标准符合 2000 年第十次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案^[2]。GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System 为美国 PE 公司产品。HBV 基因分型荧光 PCR 检测试剂盒, 由杭州博赛基因诊断技术有限公司提供; HBV-PCR 荧光定量检测试剂盒由上海复星医学科技发展有限公司提供,

收稿日期 2006-06-06; 接受日期 2006-10-13

通讯作者: 李桂珍, 主管检验师。Tel: (0517) 4924143 Email:

408670136@qq.com

检测灵敏度为 4.2×10^2 IU/L.

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA 定量检测 HBV DNA 浓度测定采用荧光定量 PCR 法, HBV DNA 提取按操作说明.

1.2.2 HBV DNA 基因分型检测 血清标本 $50 \mu\text{L}$ 加核酸提取液 $50 \mu\text{L}$, 振荡 10 s, 100°C 干浴 10 min, $14593 g$ 离心 10 min, 上清液即可用作 PCR 反应的模板. 基因扩增时, 取上清液 $4 \mu\text{L}$ 分别加入含有 $36.4 \mu\text{L}$ 各型基因型混合液的反应管中, 混匀, $14593 g$ 离心数秒, 反应管置于 5700 定量荧光仪上, 反应条件为 $37^\circ\text{C} \times 2 \text{ min}$, $94^\circ\text{C} \times 2 \text{ min}$, 再按 $94^\circ\text{C} \times 10 \text{ s} \rightarrow 62^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$, 循环 40 次, 荧光检测在 62°C , 荧光通道检测选择 FAM.

统计学处理: 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 LSD- t 检验. 计数资料组间比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 176 例患者的 HBV 基因分型及其分布 对江苏地区 176 例不同临床类型的 HBV 患者进行基因分型, 本研究检测到 5 种类型的基因型, 构成比由高到低依次为: C 型 66.5% (117/176), B, C 混合型 22.7% (40/176), B 型 5.1% (9/176), A 型 0.6% (1/176), D 型 0.6% (1/176), 无法分型 4.5% (8/176). 因此, C 型和 B, C 混合型是该地区 HBV 的优势基因型, B 型较少, A 型和 D 型都只检测到 1 例, 没有发现 E, G, H 等基因型. 慢性乙型肝炎患者中的 HBV 基因型与急性乙型肝炎、肝硬化或肝癌患者中的相比, C 基因型所占比例较高 (71.4%), 但经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

表 1 乙型肝炎病毒基因分型检测结果及分布 [n(%)]

类型	n	A 型	B 型	C 型	D 型	B, C 型	无法分型
急性乙型肝炎	19		4(21.1)	10(52.6)		4(21.1)	1(5.2)
慢性乙型肝炎	119	1(0.8)	4(3.4)	85(71.4)	1(0.8)	22(18.5)	6(5.1)
肝硬化/肝癌	38		1(2.6)	22(57.9)		14(36.9)	1(2.6)
合计	176	1(0.6)	9(5.1)	117(66.5)	1(0.6)	40(22.7)	8(4.5)

2.2 HBV 基因型与 HBV DNA 数量水平的关系

176 份急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝硬化、肝癌患者血清中 HBV DNA 含量在 $2.01 \times 10^3 \sim 8.97 \times 10^9$ IU/mL 之间, 均值为 7.96×10^6 IU/mL, HBV 各基因型与其 DNA 数量水平如表 2 所示. 经分析, C 型与 B, C 混合型在 HBV DNA 水平上存在统计学差异 (P

< 0.05) B, C 混合型的 HBV DNA 水平明显高于 C 型. C 型与 B 型 ($P > 0.05$) B 型与 B, C 混合型患者 ($P > 0.05$) 的 HBV DNA 水平没有统计学差异. 无法分型的 8 例样本的 HBV DNA 水平为 $(3.53 \pm 0.46) \log_{10}$ IU/mL, 定量值均低于 1.0×10^4 IU/mL, 可能因其浓度较低, 不适宜做乙肝病毒基因型的测定.

表 2 HBV 基因型与 DNA 数量水平的关系

型别	n	HBV DNA (\log_{10} IU/ml, $\bar{x} \pm s$)
C 型	117	5.51 ± 1.69
B, C 型	40	6.35 ± 1.33
B 型	9	6.62 ± 1.92
无法分型	8	3.53 ± 0.46
A 型	1	7.90
D 型	1	5.02

注: 因 A 型、D 型只有 1 例, 用其 HBV DNA 数量表示.

3 讨论

既往流行病学调查表明 HBV 基因型呈一定的地理区域分布, 我国主要以 HBV C 型和 B 型感染为主, 也存在 A 型、D 型及 B 和 C 型混合感染. 目前认为, 不同地区优势基因型反映了 HBV 自然感染史发生的变异特点, 是病毒变异后进化的结果. 肖扬、周岳进等^[3]对浙江温州地区 966 例患者 HBV 分型研究显示 66.46% 为 C 型, 20.49% 为 B 型, B, C 混合型为 11.08%. 李雅娟等^[4]对北京、长春、汉川、深圳、清远和南京等 6 个城市的 445 例 HBV 感染者进行研究发现 53.7% 为 C 型, 32.6% 为 B 型, 13.7% 为 B 和 C 型混合感染, 未发现有 D 型. 谢秀琴等^[5]对江苏地区 128 例乙肝患者分型研究结果显示, 该地区主要以 C 型 (61.72%) 和 B 型 (37.5%) 为主, 仅发现 1 例 B, C 混合型 (0.78%). 由上可知, 本研究对于江苏地区乙肝患者 HBV 分型的结果与国内其他学者的结果基本一致, 但是 B, C 混合型所占的比例较大, B 型所占的比例较小, 还存在有 A 型、D 型感染, 与以往的研究结果存在差异, 这可能由于样本差异及实验方法不同所致.

国内外众多研究发现, HBV 基因型与临床表现、预后、治疗应答均有一定关系, 不同基因型具有不同的致病性. 葛宪民等^[6]和台湾学者 Kao 等^[7]的研究结果提示, 随着疾病严重程度的增加, C 型所占的比例升高, 而 B 型所占比例降低, C 型与较为严重的肝脏疾病有关. 本研究表明, 慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者主要为 C 型感染为主, 其次为 B, C 混合

型 B 型很少。C 基因型在慢性乙型肝炎患者中的所占比例 (71.4%) 比在急性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者中所占的比例较高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

目前认为, 乙肝发病机制是 HBV 病毒诱导的免疫反应, 而血清中高滴度的 HBV 是乙肝发病的危险因素之一, HBV 的复制状态与其基因型之间有无关系存在争议。Kao 等^[8]研究发现 C 基因型患者的 HBV DNA 水平明显高于 B 型患者, 谢琴秀等^[5]和李朝霞等^[9]的研究结果显示 B 型, C 型 HBV DNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而本研究显示 C 型与 B 型 ($P > 0.05$), B 型与 B, C 混合型 ($P > 0.05$) 在 HBV DNA 水平上没有明显差异, 但 C 型与 B, C 混合型患者的 HBV DNA 水平有显著差异 ($P < 0.05$)。B, C 混合型患者的 HBV DNA 数量明显高于 C 型, 表明 B, C 混合型患者体内 HBV 处于较高复制水平, 这可能也是导致 B, C 混合型乙肝患者的预后极差的原因之一。

HBV DNA 基因分型与 HBV 病毒复制、临床演变及治疗反应相关, 每个地区的主要基因型以及 HBV 的基因型地理分布与 HBV 感染的地方流行性有关。因此, HBV 基因型正成为 21 世纪 HBV 研究的热点, 同时研究乙型肝炎患者 HBV DNA 的基因型对于了解病毒感染后形成的不同临床表现以及对抗病毒药物的治疗效果亦具有重要的意义。文献报道, 干扰素对 B 基因型的疗效优于 C 基因型^[10], 而另有报道, 拉米夫定对 C 基因型的远期疗效明显优于 B 基因型^[11], 这对临床合理用药具有重要的指导意义。随着对基因分型方法学研究的不断深入, 基因型分析将

会对乙肝的诊断、抗病毒治疗、预后判断有着积极的作用。

【参考文献】

- [1] 魏 来. 乙型肝炎病毒的基因型及临床意义 [J]. 传染病信息, 2003, 16: 84-86.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫病学会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329.
- [3] 肖 扬, 周岳进, 王开鉴, 等. 浙江温州地区 1020 例乙型肝炎患者 HBV 基因分型研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(1): 41-42.
- [4] 李雅娟, 庄 辉, 李 杰, 等. 乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及其临床意义 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(10): 724-729.
- [5] 谢秀琴, 许家璋, 李 平, 等. 江苏地区乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义 [J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(2): 171-173.
- [6] 葛宪民, 李丹亚, 方钟燎, 等. 广西乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(2): 174-179.
- [7] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B [J]. Gastroenterology, 2000, 118(3): 554-559.
- [8] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 22-25.
- [9] 李朝霞, 施云珍, 宋亚军, 等. HBV 基因型的检测及其临床意义的探讨 [J]. 浙江临床医学, 2004, 10(10): 839-840.
- [10] Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy [J]. Hepatology, 2000, 33: 998-1002.
- [11] 周胜生, 王永忠. 乙型肝炎病毒基因分型与拉米夫定临床应用反应 [J]. 肝脏, 2004, 9(2): 77-78.

编辑 黄良田