

• 论 著 •

西安市乙肝患者 HBV 基因型分布及临床相关性指标的研究

王 威^{1,2},王海峰²,薛飞肖²,童 开³,赵 棉⁴,杨玉琮^{1△}

(1. 西安交通大学第一附属医院检验科 710061; 2. 陕西省西安市第三医院检验科 710018;
3. 第四军医大学第一附属医院检验科, 西安 710032; 4. 陕西省西安市第一医院检验科 710002)

摘 要:目的 研究了解西安市乙型肝炎病毒(HBV)的基因型分布及其与临床相关性指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)关系和临床意义。方法 采用巢式 PCR 对 389 例西安市 HBV 感染患者的血清标本进行 HBV DNA 扩增, 后用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RLFP)鉴定 HBV 基因型。并用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙肝五项, 速率法检测 ALT 和 AST。结果 西安市 389 例 HBV 感染患者基因型分布为 HBV B 基因型 58 例占 14.9%(58/389), HBV C 基因型 326 例占 83.8%(326/389), HBV B/C 混合型 5 例占 1.2%(5/389)。其中 HBV B、C 基因型与患者在性别和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性率、HBV DNA 载量水平及 ALT 和 AST 比较差异均无统计学意义($P>0.05$); B、C 基因型患者在 HBV 携带者和慢性乙肝中分布比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但在肝硬化和肝癌中比较差异有统计学意义($P<0.05$)。HBV C 基因型较 B 基因型更易发展成为肝硬化甚至肝癌。结论 西安市 HBV 感染者存在 HBV B、HBV C、HBV B/C 混合型 3 种基因型, 以 HBV C 为主要基因型, B 型次之, B/C 混合型最少; 肝硬化的发生与 C 型存在着一定关系, 提示 HBV C 基因型更容易发展成为肝硬化。

关键词: 乙肝病毒; 分布; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)04-0475-03

Study on HBV genotype distribution and clinical correlative indexes in patients with hepatitis B in Xi'an

WANG Wei^{1,2}, WANG Haifeng², XUE Feixiao², TONG Kai³, ZHAO Mian⁴, YANG Yucong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Municipal Third Hospital, Xi'an, Shaanxi 710018, China;
3. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 4. Department of Clinical laboratory, The First Hospital, Xi'an, Shaanxi 710002, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship and clinical significance of hepatitis B genotype distribution in Xi'an City and clinical relative indicators. **Methods** The nested PCR was used to amplify HBV DNA in 389 serum samples from HBV infected patients in Xi'an City, then polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RLFP) was used to identify HBV genotypes. **Results** Among 389 cases of HBV Infection in Xi'an City, 58 cases of HBV B genotype accounted for 14.9% (58/389), 326 cases of HBV C genotype accounted for 83.8% (326/389) and 5 cases of HBV B/C mixed type accounted for 1.2% (5/389). The gender, HBeAg positive rate, HBV DNA load level, ALT and AST had no statistical difference between HBV genotype B and C with the patients ($P>0.05$); There was no statistically significant in the distribution of B and C genotypes between the patients with chronic hepatitis B and HBV carriers ($P>0.05$), but it had statistical difference between liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma ($P<0.05$). HBV genotype C was easier to develop liver cirrhosis even liver cancer than genotype B. **Conclusion** The three kinds of HBV genotype B, C and B/C exist in the HBV infected persons in Xi'an City, with the genotype C as the main genotype, genotype B takes the second and mixed genotype B/C is minimal. The liver cirrhosis occurrence has a certain relationship with the genotype C, which suggesting that the genotype C is more likely to develop liver cirrhosis.

Key words: hepatitis B virus; distribution; genotype

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球性问题, 人群普遍易感, 我国隶属高流行区, 流行病率为 7.2%^[1]。从现有的文献可知, HBV 分为 10 个基因型, 即 HBV A~J 型^[2-4], 并且 HBV 基因分型具有地域性特点, 北方主要以 C 型为主, 南方以 B 型为主^[5-6]。不同的基因型的 HBV 对于抗病毒的治疗也存在着不同的应答效果, 因此了解西安市 HBV 感染者的基因型分布及其与临床相关性指标的关系已经成为成功预防 HBV 感染和治疗的必要手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月至 2015 年 12 月在西安市第二

医院收集乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性血清标本 389 例, 经酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测乙肝五项确定, HBsAg、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)均为阳性的患者 128 例, HBsAg、乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)、HBcAb 均为阳性者 215 例, HBsAg、HBcAb 均为阳性者 46 例。其中男 215 例, 女 174 例, 平均(49.5±13.2)岁, 所有患者入组前 6 个月均未曾接受过任何抗病毒、免疫调节治疗。并排除人类免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎病毒(HAV)等合并感染且无合并免疫性或酒精、药物性肝病及恶性肿瘤等。诊断符合《2010 年中国慢性乙肝防治指南》。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 扩增仪 AGS-AFD9600, 试剂盒为中山达安乙肝病毒核酸定量检测试剂盒。生化由贝克曼全自动生化分析仪测定, 试剂为贝克曼原装进口试剂; 乙肝五项采用 ELISA 方法测定, 试剂由上海科华生物技术有限公司提供。VD fast5 小量病毒 DNA 快速抽提试剂盒购自飞捷生物公司; 外侧引物正义链为 5'-GGG ACA CCA TAT TCT TGG-3' 和反义链为 5'-TTA GGG TTT AAA TGT ATA CCC A-3'; 内侧引物正义链为 5'-GCG GGG TTT TTC TTG TTG A-3' 和反义链为 5'-GGG ACT CAA GAT GTT GTA CAG-3'。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 提取及 PCR 扩增 利用巢式 PCR 法扩增 HBV 的 S 基因并将 PCR 产物进行凝胶电泳鉴定 HBV 的基因型并采用 ELISA 法测定乙肝五项, 速率法测定 ALT 和 AST。按照 HBV DNA 提取试剂盒说明书操作。

1.3.2 采用巢式 PCR 扩增 HBV DNA S 基因 采用巢式 PCR 扩增 HBV DNA S 基因 585 pb 片段。第 1 次 PCR 扩增条件: 93 ℃ 变性 5 min, 93 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 30 轮循环; 第 2 次 PCR 扩增条件: 93 ℃ 变性 5 min, 93 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 轮循环。

1.3.3 基因型鉴定 经过巢式 PCR 扩增, 将 PCR 产物在 3% 的琼脂凝胶中进行电泳, 同时加入标志物对比, 确定出基因型 B 的电泳长度为 281 bp; 基因型为 C 的电泳长度为 122 bp。

1.4 统计学处理 数据处理采用 SPSS17.0 软件, 检验分析均为双侧检验, 计数资料采用四个表 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验并以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 基因型的分布 389 例患者中 HBV B 基因型 58 例, HBV C 基因型 326 例, HBV B/C 混合型 5 例。HBV B 基因型和 HBV C 基因型显著高于 HBV B/C 混合型。HBV C 基因型属于明显优势基因型, 未见其他型基因。

2.2 HBV 基因型与各个阶段临床病情的关系 将患者根据临床病情分为患者血清 HBsAg 阳性持续半年以上, 但肝功能正常, 既往无乙肝病史且无临床症状者为无症状携带 (ASC) 组; 患者 HBsAg 阳性超过 6 个月, 现 HBsAg 或 HBV DNA 仍为阳性者为慢性乙肝 (CHB) 组; 患者有乙肝病史且 B 超、CT 和 (或) 磁共振检查显示肝硬化征象者为肝硬化 (LC) 组; 第四组患者经病理检查证实, 临床诊断符合原发性肝癌诊断标准^[7] 为肝细胞癌 (HCC) 组。58 例 HBV B 基因型感染者中 ASC 为 11 例、CHB 为 36 例、LC 为 9 例、HCC 为 2 例。326 例 HBV C 基因型感染者中 ASC 为 34 例、CHB 为 159 例、LC 为 93 例、HCC 为 40 例, 5 例 HBV B/C 混合型皆为 CHB。HBV C 基因型与 HBV B 基因型相比更容易发展成为肝硬化和肝癌, 见表 1。

表 1 乙肝患者各组在 HBV 基因型中的分布[n(%)]				
组别	n	B 基因型(n=58)	C 基因型(n=326)	P
ASC 组	45	11(19.0)	34(10.4)	0.063
CHB 组	195	36(62.1)	159(48.8)	0.062
LC 组	102	9(15.5)	93(28.5)	0.039
HCC 组	42	2(3.4)	40(12.3)	0.047

2.3 性别不同的感染者 HBV 基因型分布情况 215 例男性

患者中, HBV B 基因型 31 例、HBV C 基因型 180 例。174 例女性患者中 HBV B 基因型 27 例、HBV C 基因型 146 例。HBV B/C 混合型其中男 4 例, 女 1 例。得出不同性别患者 HBV 分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同性别与 HBV 基因型分布的关系[n(%)]				
性别	B 基因型(n=58)	C 基因型(n=326)	χ^2	P
男性	31(14.7)	180(85.3)	0.062	0.803
女性	27(15.6)	146(84.4)		

2.4 HBV 基因型与 HBeAg 的关系 326 例 HBV C 基因型感染者中 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性者 (简称大三阳) 108 例、HBsAg、HBeAb、HBcAb 均阳性者 (简称小三阳) 182 例, HBV B 基因型感染者中大三阳 20 例、小三阳 28 例。见表 3。HBsAg、HBcAb 均为阳性者其中 10 例为 HBV B 基因型、36 例为 HBV C 基因型。5 例 HBV B/C 混合型均为小三阳。B、C 基因型 HBV 感染者比较其 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 水平的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 HBV 基因型与大三阳、小三阳及 HBV DNA 水平的关系			
基因型	大三阳[n(%)]	小三阳[n(%)]	HBV DNA
B 基因型	20(34.5)	28(48.3)	5.32±0.80
C 基因型	108(33.1)	182(55.8)	6.98±0.71
P	0.840	0.287	0.896

2.5 HBV 基因型与 ALT、AST 关系 389 例 HBV B、C 基因型患者在肝功能的丙氨酸氨基转移酶 ALT 和谷草转氨酶 AST 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 HBV 基因型与 ALT 及 AST 的关系(U/mL)				
项目	B 基因型(n=58)	C 基因型(n=326)	t	P
ALT	64.08±144.53	68.73±122.14	0.036	0.849
AST	50.19±54.06	69.17±126.18	1.965	0.164

3 讨 论

1988 年有研究者将 18 株 HBV 全核酸序列分 4 组作比较, 组间序列差异率超过了 8%, 这种差异度被定义为划分 HBV 基因型的标准。大量研究表明 HBV 基因型有高度的地域分布^[8]。本研究对西安地区的 389 例 HBV 感染者进行基因分型, 得出 HBV C 基因型 326 例占 83.8%(326/389), HBV B 基因型 58 例占 14.9%(58/389), HBV B/C 混合型 5 例占 1.2%(5/389)。其中 HBV C 基因型占据主要优势, 与以往研究者对陕西西安地区的研究一致^[9]。

近年来 HBV 基因型的研究已经广泛应用于阐明 HBV 感染机制、预防、治疗、预后评价及流行病学。研究表明 HBV 不同基因型由于其基因结构的不同可造成其致病性的差异, 而进一步影响 HBV 患者的病情发展、转归及抗病毒药物治疗的疗效。有报道称 HBV C 基因型感染者比 HBV B 基因型更易发展成为肝硬化和肝癌^[10]。这与本次研究得出的结论较一致, 本组资料也显示 HBV C 基因型肝硬化和肝癌所占比例比 HBV B 基因型及 HBV B/C 混合型高, 差异有统计学意义

($P < 0.05$)。因此测定 HBV 基因型对于评估判断乙肝患者罹患 LC 和 HCC 的风险有一定的帮助。

关于 HBV 基因型与 HBeAg 阳性率和 HBV DNA 载量水平等相关性的研究结果一直存在分歧^[11-12]。研究结果的不一致可能有多种原因,如研究对象的选择、标本量的大小以及研究方法学的不一致。本次研究 HBV 基因型与 HBeAg 阳性率和 DNA 病毒载量均无统计学意义($P > 0.05$)。本次研究用巢式 PCR 法对西安市 HBV 基因型的分布做出了较为初步的分析,但由于标本量的局限并不能完全的反映出西安地区 HBV 基因型的分布及其与 HBV 感染者病情的发展关系。希望随着对 HBV 的研究更深入更具体,能将 HBV 基因型在疾病的发生、发展与治疗转归中扮演的角色更加清晰的阐述出来,让 HBV 基因型作为 HBV 感染患者的用药指标和治疗标准的参考成为可能。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].临床肝脏病杂志,2015,31(12):1941-1954.
- [2] Panduro A, Maldonado-Gonzalez M, Fierro NA, et al. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America[J]. Antivir Ther, 2013, 18(3): 475-484.
- [3] Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2012, 14(1): 37-46.
- [4] Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus [J]. Hepatol Res, 2010, 40(1): 14-30.

- [5] Shen L, Yin W, Zhang S, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus genotypes in Southwest, China [J]. J Med Virol, 2014, 86(8): 7-13.
- [6] Wang B, Feng Y, Li Z, et al. Distribution and diversity of B virus genotypes in Yunnan, China [J]. Red Med Virol, 2014, 86(10): 75-82.
- [7] Wang XW, Hussain SP, Huo TI, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma [J]. Toxicology, 2002, 43(47): 181-182.
- [8] 张菁超.乙型肝炎病毒基因型与表型的相关性研究[J].中国医学创新, 2013, 10(30): 127-128.
- [9] 付建军,白艳丽,王巧侠,等.慢性乙型肝炎患者 196 例病毒基因分型与临床的关系[J].山西医科大学学报, 2011, 42(9): 710-713.
- [10] Lu FM, Zhang H. Management of hepatitis B in China [J]. Chin Med J, 2009, 122(1): 3-4.
- [11] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype [J]. J Virol, 2009, 83(20): 10538-10547.
- [12] Lei JH, Liang J, Yang X, et al. Analysis of serum HBeAg/ HBeAb and HBV DNA level in hepatitis B patients of various clinical types [J]. Chin J Mod Med, 2008, 18(17): 2493-2496.

(收稿日期:2016-10-09 修回日期:2016-11-30)

(上接第 474 页)

- Gynecol Obstet Invest, 2009, 68(4): 234-238.
- [2] Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, et al. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss [J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(2): 126-136.
- [3] Coppede F, Migheli F, Bargagna S, et al. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring [J]. Neurosci Lett, 2009, 449(1): 15-19.
- [4] Harisha PN, Devi BI, Christopher R, et al. Impact of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects [J]. J Neurosurg Pediatr, 2010, 6(4): 364-367.
- [5] 徐莉,刘肖曼,张红岩,等.亚甲基四氢叶酸还原酶、凝血因子 V 和凝血酶原基因多态性与原因不明复发性早期流产的关系[J].中华妇产科杂志, 2007, 42(3): 180-183.
- [6] 余章斌,韩树萍,郭锡熔. 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 多态性与先天性心脏病关系的 Meta 分析[J].中国循证儿科杂志, 2009, 54(3): 253-262.
- [7] 于凤娜,张丽萍,李琳.染色体平衡易位伴不良孕产两

- 系四例[J].中华医学遗传学杂志, 2014, 31(4): 545.
- [8] 朱彩丹.妊娠期高血压患者随机尿蛋白/肌酐比值水平与不良妊娠结局的关系研究[J].中国全科医学, 2015, 18(10): 1168-1171.
- [9] 赵永平,林典梁,张晓威,等.精子细胞凋亡率与胚胎停育相关分析[J].中国计划生育杂志, 2012, 20(9): 619-622.
- [10] 付娟娟,杨晨晨,胡小萍. FISH 检测孕早期胚胎停育和自然流产绒毛染色体异常的应用研究[J].新疆医科大学学报, 2015, 38(5): 612-614.
- [11] 尚鹏超.基因芯片法分析 MTHFR C677T 位点多态性与不明原因胎停育的关系[J].中国医师杂志, 2016, 18(5): 702-705.
- [12] 李茜西,伍萍芝,何琳琳.叶酸代谢相关酶基因多态性与不良孕产发生易感性的关系[J].重庆医学, 2015, 44(10): 1330-1333.
- [13] 杨文方,樊静,李丹阳.亚甲基四氢叶酸还原酶多态性与早期妊娠丢失风险的关系研究[J].中国妇幼保健研究, 2015, 26(6): 1128-1130.

(收稿日期:2016-10-05 修回日期:2016-11-26)