

· 临床论著 ·

湖南省怀化市少数民族及汉族慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及临床分析

于红缨 邵凌云 符政远 蒋建勇 王菲菲 王金蕾 孟成艳 张文宏

【摘要】 目的 了解湖南省怀化市少数民族及汉族慢性乙型肝炎患者病毒基因型分布特点及不同基因型与临床肝病的相关性。**方法** 采用S基因序列分析法对湖南省怀化市111例慢性乙型肝炎患者进行乙型肝炎病毒基因分型,并分析相关流行病学、病例构成、HBV DNA载量、HBeAg阳性率及肝功能情况。**结果** 该地区111例慢性乙型肝炎患者HBV基因型检测到B型及C型,其中B型90例(81.08%),C型19例(17.12%),2例(1.80%)无法分型。B、C基因型分布情况:33例少数民族组患者B基因型31例(93.93%),C型2例(6.07%);76例汉族组患者B基因型59例(77.63%),C基因型17例(22.37%)。C基因型患者肝硬化及肝癌构成比高于B基因型患者,HBV DNA载量、HBeAg阳性率及球蛋白水平高于B基因型,而白蛋白水平低于B基因型。**结论** 该地区乙型肝炎病毒基因型以B型为优势基因型,少数民族与汉族患者HBV基因型构成有显著差异,C基因型患者HBeAg血清转换率低,可能较易发生肝病进展。

【关键词】 慢性乙型肝炎;乙型肝炎病毒基因型;少数民族

Genotyping of hepatitis B virus and clinical analysis in patients with chronic hepatitis B from minority and Han people in Huaihua city of Hunan province YU Hong-ying, SHAO Ling-yun, FU Zheng-yuan, JIANG Jian-yong, Wang Fei-fei, WANG Jin-lei, MENG Cheng-yan, ZHANG Wen-hong. Huaihua First People's Hospital, Hunan 418000, China

Corresponding author: ZHANG Wen-hong, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the genotypes of hepatitis B virus (HBV) and the relationship between genotypes and liver diseases in patients with chronic hepatitis B (CHB) from minority and Han people in Huaihua city of Hunan province. **Methods** S region sequencing was employed to detect HBV genotypes in 111 CHB cases in Huaihua city of Hunan province. The data of epidemiology, case composition, serum HBV DNA level, HBeAg positive rate and liver function were analyzed, respectively. **Results** Genotype B and C were detected in 111 CHB cases in

基金项目:国家重点基础研究计划(973计划2005CB523102)

作者单位:418000 怀化市,湖南省怀化市第一人民医院感染科(于红缨、符政远、蒋建勇);复旦大学附属华山医院感染科(邵凌云、王菲菲、王金蕾、孟成艳、张文宏)

通讯作者:张文宏 Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

this area. Ninety cases (81.08%) were genotype B, 19 cases (17.12%) were genotype C and 2 cases (1.80%) couldn't be genotyped. Among 33 cases of minority people, 31 cases (93.93%) were genotype B and 2 cases (6.07%) were genotype C. Among 76 cases of Han people, 59 cases (77.63%) were genotype B and 17 cases (22.37%) were genotype C. The constituent ratio of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma, serum HBV DNA level, HBeAg positive rate and serum globulin level in patients with genotype C HBV infection were all higher than those in patients with genotype B. And serum albumin level in patients with genotype C HBV infection was lower than that in patients with genotype B. **Conclusions** Genotype B is the major HBV genotype in this area. The composition of HBV genotypes in minority people is significantly different from that in Han people. HBeAg seroconversion rate is lower and liver disease progression is worse in patients with genotype C.

【Key words】 Chronic hepatitis B; HBV genotype; Minority people

乙型肝炎病毒是一种 DNA 病毒,其基因组由不完全的双链 DNA 组成,根据 HBV 全基因组核苷酸序列同源性 $\geq 92\%$,或 S 基因序列同源性 $\geq 96\%$ 的标准^[1]分为 8 个基因型(A~H)。HBV 基因易发生遗传变异和进化^[2],人类感染 HBV 病毒基因型的类别可能与感染途径、疾病的感染谱、疾病的进展有一定的相关性^[3,4]。HBV 不同的基因型具有明确的地理性分布特征,湖南省怀化市位于湘西南地区,与贵州、广西交界,世代居住着侗族、苗族和土家族等少数民族同胞。本研究采用乙型肝炎病毒 S 基因序列分析法对怀化市 33 例少数民族及 78 例汉族慢性乙型肝炎患者的 HBV 基因分型进行检测,以探讨本地区少数民族与汉族慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布特点及可能存在的进化差异,同时对不同的 HBV 基因型与临床病情相关性进行了分析研究。

资料与方法

一、研究对象

收集 2005 年 6 月至 2007 年 6 月湖南省怀化市第一人民医院感染科住院及门诊 HBV DNA 阳性慢性乙型肝炎患者 111 例,其中少数民族组患者 33 例(侗族 27 例,苗族 6 例),男 32 例,女 1 例,年龄 11~60 岁,平均年龄(35.50 ± 12.31)岁;汉族组患者 78 例,其中男 69 例,女 9 例,年龄 12~68 岁,平均(35.84 ± 13.74)岁。所有病例诊断标准符合中华医学会感染病学分会和肝病学会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》。患者血清标本置 -80°C 冰箱保存,收集完毕后送至上海复旦大学国家重点生物遗传工程实验室进行 HBV 基因分型检测。

二、材料与方法

1. HBV 血清学标志物检测:采用上海科华生物有限公司产品。
2. HBV DNA 检测:采用德国 Roche Lightcycler II 型实时荧光定量 PCR 仪,试剂为深圳匹基生物技术有限公司产品。以上由当地医院检验科检测。

3. HBV DNA 提取:采用德国 QIAGEN 有限公司 QIAamp DNA Blood Minikit 试剂盒。

4. 引物: S 基因引物: HBV11 5' -GGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAKC-TAC-3'; HBMF1: 5' -YCCTGCTGGTGGCTCCAGTT-3'; HBV22 5' -CAATWCKYT-GACANACTTTCCAATCARTWGG-3' (nt 55 ~ nt 1008)。所有引物由上海英俊生物工程技术服务有限公司合成。

5. S 基因巢式 PCR 扩增:第 1 轮 PCR:反应体系 25 μ l,其中 PCR 模板 1 μ l, 10 \times PCR Buffer (Mg plus) 2.5 μ l, dNTP Mixture 2.5 μ l, TaKaRa Taq TM 酶 0.5 μ l, 外引物 HBV11、HBV22 各 1 μ l, 无菌双蒸水 (ddH₂O) 16.5 μ l。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s 变性, 60 $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 45 s 延伸, 扩增 25 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延长 5 min。第 2 轮 PCR:反应体系 50 μ l, 其中第一轮 PCR 产物 1 μ l, 10 \times PCR Buffer (Mg plus) 5 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, TaKaRa Taq TM 酶 0.5 μ l, 内引物 HBMF1、HBV22 各 1 μ l, ddH₂O 37.5 μ l。扩增循环增至 30 个, 余反应条件与第 1 轮相同。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。10 \times PCR Buffer (Mg plus)、dNTP Mixture 及 TaKaRa TaqTM 酶购自 TaKaRa 公司, PCR 仪为 TaKaRa 公司 PCR Thermal cycler 仪, PCR 产物测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

6. HBV 基因分型分析:以美国国立卫生研究院国家生物工程中心 (NCBI) 核苷酸序列数据库 (GenBank) 中下载的已知基因型别的 HBV 全基因序列作为参照序列, 采用 DNASTar 软件 MegAlign Jotum Hein Method 比较分析。标准: S 基因序列同源性 $\geq 96\%$ 。

三、统计学处理

计数及配对资料采用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 U 或 t 检验。

结 果

一、湖南省怀化市 111 例慢性乙型肝炎患者 HBV 基因分型及分布

该地区 HBV 基因型检测到 B 型及 C 型, 其中 B 型 90 例 (81.08%), C 型 19 例 (17.12%), 2 例 (1.80%) 无法分型, 无其他明确型别及混合型。少数民族组与汉族组慢性乙型肝炎患者 B、C 基因型分布情况对比见表 1。少数民族组中 27 例侗族患者 HBV 基因型 B 型 25 例, C 型 2 例, 6 例苗族患者 HBV 基因型均为 B 型。

表 1 少数民族组与汉族组慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布情况 [例 (%)]

	B 型	C 型
少数民族组	31 (93.93%)	2 (6.07%)
汉族组	59 (77.63%)	17 (22.37%)

注: $\chi^2 = 4.25$; $0.01 < P < 0.05$

二、不同 HBV 基因型的 HBV DNA 载量及肝功能水平比较

C 基因型组的 HBV DNA 水平 (\log_{10} 值) 为 6.54 ± 1.18 , 高于 B 基因型组的

5.71 ± 1.83; 其 HBeAg 阳性率 57.89%, 高于 B 基因型的 HBeAg 阳性率 33.33%, 同时其球蛋白水平高于 B 基因型组, 白蛋白及 ALT 水平低于 B 基因型, 均有显著差异 ($P < 0.01$) (表 2)。

三、不同 HBV 基因型的临床分型比较

C 基因型患者肝硬化及肝癌所占比例分别为 57.59% 及 10.53%, 高于 B 基因型患者中肝硬化及肝癌所占比例 33.33% 及 3.33%。两组基因型患者的慢性乙型肝炎、肝硬化及肝癌的构成情况经方差检验有显著统计学差异 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 2 HBV 基因型与 HBV DNA 滴度、HBeAg 及肝功能相关比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HBV DNA (\log_{10} 值)	HBeAg 阳性 [例数 (%)]	ALT (U/L)	白蛋白 (g/L)	球蛋白 (g/L)
B 型	5.71 ± 1.83	30 (33.33%)	253.61 ± 308.44	34.12 ± 5.65	32.78 ± 6.74
C 型	6.54 ± 1.18 *	11 (57.89%) *	180.18 ± 137.54 *	31.45 ± 6.45 *	36.52 ± 7.15 *

注: * $P < 0.01$

表 3 HBV 基因型与临床分型相关比较

临床分型	B 型	C 型
慢性乙型肝炎	57 (63.34%)	6 (31.58%) *
肝硬化	30 (33.33%)	11 (57.59%) *
肝癌	3 (3.33%)	2 (10.53%) *

注: * $P < 0.05$

讨 论

迄今为止, 已发现的 HBV 基因型分为 A ~ H 共 8 型, 其地理分布有明确的特点。我国以 B、C 型最常见, B 型在我国由南向北逐渐增多, C 型则逐渐减少^[5], 各地 HBV 流行的优势基因型也不尽相同。刘映霞等^[6]曾检测湖南湘北地区 185 例慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型以 B 型为主, 而怀化市位于湘西南地区, 以侗族及苗族为主的少数民族人口占总人口的 33%, 人口族源与湘北地区有一定差异。本次研究检测到该地区慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型存在 B 型及 C 型, 无其他明确型别及混合型, 有 2 例汉族病例无法分型, 考虑为 PCR 结果不理想所致。检测中以 B 型为优势基因, 占总体标本的 82.57%, 其中少数民族组慢性乙型肝炎患者病毒 B 基因型占少数民族标本的 93.93%, 汉族组 B 基因型占汉族标本的 77.63%, 两者比较有显著差异 ($P < 0.05$)。在少数民族组中所检测的 6 例苗族患者 HBV 基因型均为 B 型, 提示土著于湘西南地区的侗、苗族少数民族其乙型肝炎患者 HBV 基因型以 B 型为原型毒株, 但随着社会交流的不断发展和汉族人口接触的日益密切, 使在相对闭塞的群聚人口中传播的乙型肝炎病毒受到了外来基因型的干扰, 导致其基因流行谱中出现了少量 C 型基因。

HBV 病毒的感染是慢性乙型肝炎发病的始动因素, 机体在渡过了 HBV 感染的免疫耐受期后, 其 HBV 复制水平往往与疾病的进展关系密切。本研究发现 C

基因型的 HBV DNA 水平(\log_{10} 值)为 6.54 ± 1.18 , 高于 B 基因型的 5.71 ± 1.83 , 有显著差异($P < 0.01$), C 基因型的 HBeAg 阳性率 57.89%, 高于 B 基因型的 HBeAg 阳性率 33.33%, 亦有显著差异($P < 0.01$), 与 Kobayashi 等^[7]报道的 C 基因型 HBeAg 阳性率明显高于 B 基因型一致, 提示 C 基因型病毒复制能力强于 B 基因型, 其 HBeAg 血清转换率低于 B 基因型。而在 HBeAg 阴性病例中, Grandjacques 等^[8]曾报道 C 基因型 HBV 前-C 区/基本 C 基因启动子变异发生高于 B 基因型, 变异后毒株的 DNA 复制水平明显高于非变异株, 均可能导致 C 基因型 HBV DNA 水平高于 B 基因型, 最终加快了疾病的进展。

本研究对比了慢性 HBV 感染者 B、C 基因型与临床肝病分型的关系, 发现 C 基因型患者肝硬化及肝癌所占比例高于 B 基因型, 有显著差异。C 基因型患者中肝硬化及肝癌比例高, 提示 HBV 感染结局与基因型有关, Lindh 等^[9]研究东亚 HBV 感染者中发现 HBV CP 变异多发生在 C 型, CP 变异是进展性肝损害的标志, 可引起严重的肝脏炎症和肝纤维化, 导致肝硬化及肝癌等严重肝病。在 B、C 基因型与肝功能情况的对比中还发现 C 基因型患者球蛋白水平高于 B 基因型, 白蛋白及 ALT 水平低于 B 基因型, 有显著差异。球蛋白的升高和白蛋白的降低往往提示着慢性肝病的迁延, 在肝硬化患者血清中该变化较慢性肝炎更加明显, 与上述 C 基因型患者中肝硬化比例较高共同提示 C 基因型 HBV 感染较 B 基因型易引发较重肝病。本研究中 B 基因型 ALT 水平显著高于 C 基因型, 考虑与 B 基因型感染的乙型肝炎患者 HBeAg 血清转换率较高, 机体对 HBV 的免疫耐受降低, 激发了细胞毒 T 细胞对 HBV 的细胞免疫应答, 从而导致肝细胞的损伤和血清 ALT 升高有关。

HBV 基因分型与 HBV 病毒的复制、肝病的演化及抗病毒治疗的反应均有关, 随着分子生物学的进展, 基因型分析将会对乙型肝炎的诊断、治疗和预后判断起着越来越重要的作用。在相对偏远的少数民族地区, 了解 HBV 基因分布情况、研究基因型与临床肝病的相关性对于进一步明确 HBV 基因型分布特点及提高该地区肝炎防治诊疗水平是非常重要的。

参 考 文 献

- 1 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2000, 81: 67-74.
- 2 Wang Z, Liu Z, Zeng G, et al. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J Gen Virol*, 2005, 86: 985-990.
- 3 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC, et al. Does hepatitis B virus genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepatitis*, 1999, 6: 299-304.
- 4 Lindh M, Hannoun C, Dhion AP, et al. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis*, 1999, 179: 775-782.
- 5 范金水, 庄辉, 李远贵, 等. 我国 8 城市 HBeAg 阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998, 18: 88-91.
- 6 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病毒基因型分布及临床意义. *湖南医科大学学报*, 2002, 27: 29-31.
- 7 Kobayashi M, Anise Y, Ikeda K, et al. Clinical of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Gastroenter-*

ology, 2002, 37:35-39.

- 8 Grandjacques C, Pradat P, Stuyven L, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of the hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. J Hepatology, 2000, 33:430-439.
- 9 Lindh M, Horal P, Dhillon AP, et al. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. J Viral Hepat, 2000, 7:258-267.

(收稿日期:2007-12-17)

(本文编辑:王丹静)

于红缨,邵凌云,符政远,等. 湖南省怀化市少数民族及汉族慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及临床分析 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008, 2(1):44-49.