

漳州地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义

郑瑞丹 高建平 卢燕辉 谢佳新 曹广文 朱青川 苏亚勇

【摘要】 目的 了解漳州地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型分布情况并探讨其临床意义。**方法** 采用特异性引物以巢式多重聚合酶链反应对 271 例乙型肝炎患者的血清标本进行基因型检测,同时对部分 PCR 产物进行测序并确定其基因型。**结果** 271 例慢性乙型肝炎患者中,HBV 基因 B 型 228 例,占 84.1%;C 型 38 例,占 14.0%;D 型 4 例,占 1.5%;B、C 混合型 1 例,占 0.4%。入选患者中未检出 A、E、F 基因型。B、C 基因型在不同程度乙型肝炎患者中的分布无显著差异,与肝炎程度无显著相关性。B、C 型肝炎患者的年龄,性别,ALT、AST、TBil、DBil、TP、ALB 水平,HBV DNA 载量及 HBeAg 阳性率均无显著性差异。**结论** 漳州地区 HBV 基因型以 B 型为主,C 型次之,有少量的 D 型及 B、C 混合型。B、C 基因型与乙型肝炎患者 ALT 水平、HBV DNA 载量、HBeAg 阳性率等临床指标无显著相关性。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;基因型;聚合酶链反应;序列分析

Characteristics and clinical significance of HBV genotypes distribution in Zhangzhou ZHENG Rui-dan, GAO Jian-ping, LU Yan-hui, XIE Jia-xin, CAO Guang-wen, ZHU Qing-chuan, SU Ya-yong. Research and Therapy Center for Liver Diseases, 175th Hospital of PLA, The Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China

Corresponding author: ZHENG Rui-dan, Email: zhengruidan@tom.com

【Abstract】 Objective To study the characteristics and clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes distribution in Zhangzhou. **Methods** All 271 serum samples of patients with chronic HBV infection were selected and detected by nested PCR with multiplex pairs of genotype-specific primers and the positive results were investigated by DNA sequencing in order to detect the genotypes. **Results** The prevalence of genotype B was 84.1% (228/271) of 271 patients with chronic hepatitis B,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.02.015

基金项目:南京军区联勤部卫生部卫生专业“122 工程”人才培养基金项目(南 20070129);福建省漳州市科技计划项目(Z2010085)

作者单位:363000 漳州市,福建漳州第一七五医院肝病治疗中心、厦门大学附属东南医院(郑瑞丹、卢燕辉、苏亚勇);漳州市中医院(高建平、朱青川);上海第二军医大学流行病学教研室(谢佳新、曹广文)

通讯作者:郑瑞丹,Email:zhengruidan@tom.com

type C was 14.0% (38/271), type D was 1.5% (4/271), mixed genotype B and C was 0.4% (1/271), while none of genotype A, E and F were found. There were no significant difference and relation in the distribution characteristics of genotype B and C among various degree of patients with HBV infection. No significant difference was found in the positive rate of HBeAg or the serum level of HBV DNA, ALT, AST, TBil, DBil, TP, ALB or the age, gender among the patients of genotype B and C.

Conclusions Genotype B was the major type in patients with HBV infection in this area, genotype C was the medium, genotype D and mixed genotype B and C were both low. There were no significant association between genotypes B, C and ALT level or HBV DNA load, or HBeAg positive rate of patients with chronic hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; Polymerase chain reaction; Sequence analysis

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝 DNA 病毒科,其基因组约 3200 bp,是已知真核细胞中最小的 DNA 病毒。在我国 HBV 慢性感染是原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)最主要的危险因素,目前我国 HBV 慢性感染者约有 1 亿,占全球的 1/3,其中 3000 万是活动性乙型肝炎患者。据推测,25% ~ 40% 的 HBV 慢性感染者最终发展成为 HCC,成为我国严重的公共卫生负担^[1]。目前,依据 HBV 核苷酸全序列异质性 $\geq 8\%$ 或 S 基因核苷酸序列异质性 $\geq 4\%$,可将其分成 A ~ J 共 10 种基因型,其中 A、B、C 基因型又可进一步分为各基因亚型: Aa/A1(亚洲/非洲亚型)、Ae/A2(欧洲亚型)、Bj/B1(日本亚型)、Ba/B2(亚洲亚型)、Cs/C1(南亚亚型)、Ce/C2(东亚亚型)^[2]。

HBV 基因型具有明显的地理分布特点,如 A 型主要在北欧和非洲, B 型和 C 型主要在东亚, D 型在中东、北欧和南非, E 型在非洲, F 型仅在南美^[3]。在同一国家内部也存在明显的差异,如在我国 HBV 主要基因型为 C (68.3%)、B (25.5%)、D 型(1.5%)和混合型(5.7%)。HBV C 型分布于全国,但在长江以南地区所占的比例显著低于长江以北地区; HBV B 型分布与 C 型相反; HBV D 型主要分布在西北地区。HBV 基因亚型主要为 C2 (58.0%)、B2 型(27.3%)和 C1 型(10.7%)。HBV C2 型的比例自黄河以北(82.5%)、黄河和长江之间(66.2%)、长江以南(42.1%)地区逐渐降低; HBV B2 型的分布与 HBV C2 型相反。HBV B 型在 < 20 岁人群中的比例明显高于 20 岁以上的人群; HBV C 型与 B 型分布相反。除 HBV C1、B2、C2 型这 3 种主要亚型外,其他亚型在少数民族中的比例显著高于汉族人群^[4]。此外,不同基因型分布还与 HBV 感染后所致肝脏疾病的严重程度、转归及药物疗效等密切相关^[5]。但是,由于目前研究分析的样本有限,其结果并不完全一致。本研究应用多对型特异性引物以巢式多重 PCR 方法对漳州地区慢性乙型肝炎患者所感染 HBV 基因型进行检测,旨在了解该地区 HBV 基因型分布情况及其临床意义。

材料与方法

一、病例来源

以在漳州市 175 医院肝病治疗中心确诊的 271 例 HBV DNA 阳性住院和门诊患者为本研究对象,采集外周血,血清存于 -40°C 备用。所有患者均进行肝组织活检和 GS 评分,均排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染,诊断标准符合《病毒性肝炎防治方案》和《慢性乙型肝炎防治指南》^[6]。

二、试剂和主要仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Mark I 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司;引物由上海英俊生物技术有限公司合成,引物序列自行设计(表 1);PCR 循环仪为美国 Eppendorf 公司产品。

表 1 巢式 PCR 进行 HBV 基因分型分析所用引物序列

引物	序列
第 1 轮 PCR(外引物)	
P ₁ -S	5'-TTTGGGGTCACCATATTCTTGG-3'
P ₁ -AS	5'-CGAACCACTGAACAAATGGCACTAG-3'
第 2 轮 PCR(内引物)	
A-S	5'-AAACTACTGTTGTTAGACGACGRGACC-3'
A-AS	5'-CTGGATTGTTTGARTTGGCTCCG-3'
B-S	5'-CCAAACTCTTCAAGATCCCAGAGTCA-3'
B-AS	5'-ACARGTTGGTGAGTACTGGAGATTT-3'
C-S	5'-CTCCCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGT-3'
C-AS	5'-CAGGGGTCCTAGGAATCCTGATGPKG-3'
D-S	5'-CAGACGCCAACAAGGTAGGAGCT-3'
D-AS	5'-GAGTGTCTCTCAAAGGTGGAGACAGM-3'
E-S	5'-ATACCCTATGGAAGGCGGGCATCT-3'
E-AS	5'-CCCATTTCGAGAGGGACCGTCCA-3'
F-S	5'-TATCTGTGGGTATCCATTGAATACYTC-3'
F-AS	5'-CGAGCGAAACARGCTGCWAG-3'

三、检测方法

1. 血清 HBV DNA 提取:HBV DNA 提取采用聚乙二醇(PEG)沉淀法,即 200 μl 血清加 400 μl PEG,漩涡振荡混匀后 12,000 r/min 离心 10 min,弃上清后加 60 μl 裂解液,漩涡振荡至无沉淀后短暂离心,沸水浴 10 min,12,000 r/min 离心 10 min,取上清液即为 HBV DNA 模板。

2. HBV 基因型的巢式 PCR 法检测:按照 Chen 等^[7]报道的基因分型方法,首先用 1 对外引物(P₁-S,P₁-AS)进行第 1 轮 PCR,取待检 HBV DNA 6 μl 为模板,P₁-S、P₁-AS 各 1 μl ,dNTP(25 mmol/L)0.4 μl ,*rTaq* 聚合酶(5 U/ μl)0.6 μl ,10 × PCR 缓冲液 5 μl ,加 ddH₂O 至 50 μl ,混匀。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$

变性 1 min, 57℃ 退火 55 s, 72℃ 延伸 1 min, 28 个循环后再 72℃ 延伸 10 min, 然后以第 1 轮产物为模板, 6 对内引物为引物检测 A ~ F 型 HBV, 反应体系为: 模板 2 μ l, 引物各 1 μ l, 底物 10 μ l, 其余成分同第 1 轮, 扩增条件为 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 62.5℃ 退火 55 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后再 72℃ 延伸 10 min。

3. 结果鉴定; 反应结束后, 取第 2 轮 PCR 扩增产物 5 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 溴化乙锭染色, 在 BIORAD 凝胶成像仪中观察, 并根据条带大小判断基因型: A 型 644 bp、B 型 331 bp、C 型 242 bp、D 型 189 bp、E 型 130 bp、F 型 487 bp, 同时出现 331 bp 和 242 bp 者为 BC 混合型(图 1)。

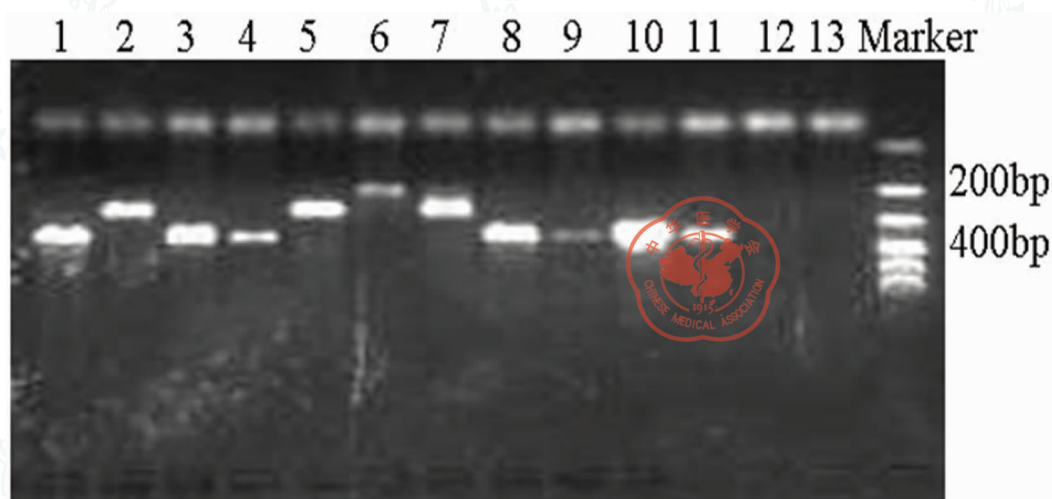


图 1 第 2 轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

注: 第 14 道为 DNA Mark I; 第 1、3、8、9、10、11 道为 B 基因型, 条带大小为 331 bp; 第 2、5、7 道为 C 基因型, 条带大小为 242 bp; 第 6 道为 D 基因型, 条带大小为 189 bp

四、统计学处理

应用 SPSS 16.0 进行统计分析, 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布样本采用 t 检验, 资料分布不明者进行非参数检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验或蒙特卡罗精确概率法。所有统计检验均采用双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、一般资料

入组 271 例患者中, 男性 231 例 (85.2%), 女性 40 例 (14.8%); 年龄 (32.03 ± 9.96) 岁。包括轻度乙型病毒性肝炎患者 122 例 (45.0%)、中度 105 例 (38.8%)、重度 35 例 (12.9%) 和肝炎后肝硬化 9 例 (3.3%)。

二、乙型肝炎患者所感染 HBV 基因型分布

本研究 271 例样本中, B 型 228 例, 占 84.1%; C 型 38 例, 占 14.0%; D 型 4 例, 占 1.5%; B、C 混合型 1 例, 占 0.4%。入组患者中未检出 A、E、F 基因型。

三、基因型与慢性乙型肝炎严重程度的关系

B、C 基因型在轻度、中度、重度慢性乙型肝炎和肝炎后肝硬化患者中的分布差异无统计学意义, 与乙型肝炎严重程度无相关性。

表 2 B、C 基因型在各程度肝炎中的分布(例)

基因型	疾病程度				χ^2	<i>P</i>
	轻度	中度	重度	肝硬化		
B	101	91	29	7	0.3334	> 0.05
C	17	14	6	1		

四、B、C 基因型患者临床资料的比较

由表 3 结果可以看到, 感染 B、C 基因型乙型肝炎病毒患者的年龄、性别、血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、病毒载量(HBV DNA)、HBeAg 阳性率均无统计学差异, 基因型分布与乙型肝炎患者临床资料水平无相关性($P > 0.05$)。

表 3 HBV B 型与 C 型者临床资料的比较

	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)	AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	DBil ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	TP (g/L, $\bar{x} \pm s$)
B 型	31.78 \pm 9.95	42.01 \pm 4.97	320.02 \pm 451.05	190.44 \pm 320.22	48.22 \pm 75.15	18.81 \pm 31.83	69.31 \pm 7.87
C 型	32.63 \pm 10.39	42.27 \pm 4.61	412.03 \pm 577.29	184.18 \pm 265.45	55.58 \pm 88.15	20.75 \pm 36.84	68.78 \pm 7.18
<i>t</i>	0.4845	0.3015	1.1154	0.1141	0.5448	0.3399	0.3890
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
	性别[男(%)]		HBV DNA 阳性率[例(%)]		HBeAg 阳性率[例(%)]		
B 型	193(84.65)		141(61.84)		124(54.39)		
C 型	34(89.47)		25(65.79)		24(63.16)		
χ^2	0.6059		0.2163		1.0154		
<i>P</i>	> 0.05		> 0.05		> 0.05		

讨 论

乙型肝炎病毒基因型是在漫长的岁月中点突变累积形成的, 迄今为止, 根据 HBV 核苷酸序列的差异, 可将其分为 A ~ H 共 8 种基因型。基因型反映了 HBV 感染自然史发生变异的特点, 是病毒变异进化的结果, 与疾病进展、预后有一定关系, 且存在一定的种族和地域差异^[8]。最近研究认为, HBV 感染的不同后果可能与其基因组序列差异有关^[9], 根据 HBV 全基因序列异质性 $\geq 8\%$ 的界线, 可将其分为不同基因型。Ohba 等^[10]通过对 HBV 全序列分析发现, 在不同基因型之间 S

区段异质性最大,而型内 S 区段的异质性最小,从而可以根据 S 区基因序列异质性 $\geq 4\%$ 的标准代替全序列进行分型。至今,已在世界各地发现了 A~J 共 10 种 HBV 基因型。研究某地区的 HBV 基因型分布特点对于 HBV 的基础研究、分子流行病学调查、临床诊治过程中出现的基因变异、对抗病毒治疗反应与病情预后评估均有重要意义。

全国乙型肝炎病毒基因组流行病学调查发现,HBV 基因型在我国北方以 C 型为主,南方以 B 型为主,D 型多见于少数民族地区,如西藏、新疆,A、F 型偶见,无 E 型^[11]。李雅娟等^[12]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。

本研究结果显示在所调查的漳州地区 271 例乙型肝炎患者中,HBV 基因 B 型 228 例,占 84.1%;C 型 38 例,占 14.0%;D 型 4 例,占 1.5%;B、C 混合型 1 例,占 0.4%,表明漳州地区分布的主要 HBV 基因型为 B 型,并且占据了绝对优势,明显高于全国 HBV B 型的比例(25.5%),而 C 型却明显低于全国平均比例。此研究结果接近于 Yang 等^[13]报道的台湾地区研究人群 HBV 基因型分布情况。因此,可能与漳州地区人口流动性比较低有关。同时,该地区在我国东南沿海,大量台湾人祖籍在该地区可以解释两地 HBV 基因型分布情况相似这一现象。

众多研究显示,基因型是影响 HBV 感染后疾病转归的主要决定因素之一。不同基因型有致病性差异,如 A 型 HBV 急性感染后易导致慢性持续感染。肝癌发生率也与基因型、年龄有关。Kao 等^[14]报道我国台湾地区以 B、C 型为优势株,50 岁以上 HCC 和 LC 患者中以 C 型为优势基因型,而 50 岁以下则以 B 型为主,提示 C 型与严重肝病有关,而 B 型与年轻人肝癌有关。Watanabe 等^[15]发现 C 基因型 HBV 复制较活跃,易形成持续病毒血症,不易发生 e 系统血清转换,进一步提示 C 型与严重肝病的相关性。但是本研究发现轻度、中度、重度慢性乙型肝炎和肝炎后肝硬化中,两种主要的 HBV 基因型 B 和 C 型的分布并无显著差异,可能与本次研究样本量比较小,样本选择偏倚有关。

本研究比较了漳州地区 B、C 型乙型肝炎病毒感染者的年龄,性别,ALT、AST、TBil、DBil、TP、ALB 水平及 HBeAg 阳性率,未发现显著性差异,尚不能认为不同基因型与乙型肝炎患者的这些临床指标有相关性。

基因型和 HBV DNA 复制水平之间的关系目前仍存在争议,我国北方以 C 基因型为主的地区,C 基因型感染者 HBV DNA 水平较高,复制能力强^[16]。但是本研究发现漳州地区的乙型肝炎患者中,B、C 基因型的 HBV DNA 水平间无差异,与多项研究报道结果不一致,这可能与样本量及地区优势基因型不同有关。

不同 HBV 基因型/亚型对应不同的变异谱,Liu 等^[17]通过 Meta 分析确定了与 HCC 发生显著相关的变异位点,包括 HBV 前-S 区缺失、C1653T、T1753V 和 A1762T/G1764A,并发现 HBV 变异频率在慢性 HBV 感染发展至 HCC 过程中逐渐累加,这些变异及其联合可预测和早期监测 HCC。同时,Yin 等^[18,19]首次应用

HBeAg 阳性携带者序列确定了 HBV B2 和 C2 基因型的野生序列,在此基础上研究了 HBV 前-S 区和核心启动子区的 54 个热点变异,发现 HBV 的 C2964A、C3116T、C7A、T1674C/G 变异是 HCC 的独立危险因素,首次应用单倍型分析证实 HBV 联合变异能够预测 HCC 的发生。因此,对确诊的乙型肝炎患者进行 HBV 基因型和变异检测,对具有 HCC 相关 HBV 变异的乙型肝炎患者及早进行抗病毒治疗,能够有效预防或延缓 HCC 的发生,具有重要的临床价值。

综上所述,漳州地区乙型肝炎患者感染 HBV 以 B 型为主,C 型次之,还有极少的 D 型及 B、C 混合型。主要基因型 B、C 与其所致肝炎程度并无相关性。可能由于样本量少及地区优势基因型不同。因此,今后还需要增加样本量进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-- declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550-6557.
- 2 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(Pt1): 67-74.
- 3 Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology*, 2004, 40(4): 790-792.
- 4 Yin J, Zhang H, He Y, et al. Distribution and hepatocellular carcinoma-related viral properties of hepatitis B virus genotypes in mainland China: a community-based study. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*, 2010, 19(3): 777-786.
- 5 Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(46): 5761-5769.
- 6 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
- 7 Chen J, Yin J, Tan X, et al. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *J Clin Virol*, 2007, 38(3): 238-243.
- 8 Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(Suppl 1): S1-S6.
- 9 Liu WC, Phiet PH, Chiang TY, et al. Five subgenotypes of hepatitis B virus genotype B with distinct geographic and virological characteristics. *Virus Res*, 2007, 29(2): 212-223.
- 10 Ohba K, Mizokami M, Ohno T, et al. Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes. *Virus Res*, 1995, 39(1): 25-34.
- 11 赵鸿, 李俊, 李兴丰, 等. 感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析. 中华流行病学杂志, 2007, 28(1): 74-77.
- 12 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. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(10): 724-729.
- 13 Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(16): 1134-1143.
- 14 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol*, 2004, 72(3): 363-369.
- 15 Watanabe K, Takahashi T, Takahashi S, et al. Comparative study of genotype B and C hepatitis B virus-induced chronic hepatitis in relation to the basic core promoter and precore mutations. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(3): 441-449.
- 16 王融冰, 江宇永, 吴云忠, 等. 中国北方地区乙型肝炎病毒基因型分布的临床意义. 中华传染病杂志, 2005, 23(6): 384-385.
- 17 Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(15): 1066-1082.
- 18 Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of

hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol, 2011, 106(1): 81-92.

- 19 Yin J, Xie J, Zhang H, et al. Significant association of different preS mutations with hepatitis B-related cirrhosis or hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol, 2010, 45(10): 1063-1071.

(收稿日期: 2011-03-15)

(本文编辑: 孙荣华)

郑瑞丹, 高建平, 卢燕辉, 等. 漳州地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2011, 5(2): 212-219.