

• 临床检验研究论著 •

慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒基因分型的临床意义

彭 瑛, 邓正华, 黄远帅, 温先勇

(泸州医学院附属医院检验科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨不同乙型肝炎病毒(HBV)基因型与相关生化指标和 HBV-DNA 定量水平的相关性。方法 采用 DNA 芯片技术,对 216 例 HBV 感染患者进行 HBV 基因型分型检测,同时检测血清 HBV-DNA 和肝功能指标。结果 216 例患者中,HBV-B 型 138 例(占 63.89%,138/216),HBV-C 型 68 例(占 31.48%,68/216),HBV-B+HBV-C 型混合感染 8 例(占 3.70%,8/216),HBV-D 型 2 例(占 0.93%,2/216)。各基因型 HBV 感染者之间比较,HBV-DNA 水平和肝功能指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 该院患者 HBV 感染以 HBV-B 型为主,HBV-C 型次之。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因型; 分布

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)22-3025-03

Clinical significance of HBV genotypes in patients with chronic hepatitis B

Peng Ying, Deng Zhenghua, Huang Yuanshuai, Wen Xianrong

(Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship of the HBV genotypes with liver function indicators and HBV-DNA. **Methods** HBV genotypes were detected by DNA chips technology, and the serum levels of HBV-DNA and liver function indicators were determined. **Results** In all of the 216 cases of patients, there were 138 cases of HBV-B infection (63.89%, 138/216), 68 cases of HBV-C infection (31.48%, 68/216), 8 cases of HBV-B and HBV-C mixed infection (3.70%, 8/216), and 2 cases of HBV-D infection (0.93%, 2/216), respectively. Comparing among the patients infected by HBV with different genotypes, there was no significant difference in the levels of HBV-DNA and liver function indicators ($P>0.05$). **Conclusion** The major genotype of HBV might be B genotype in the patients in the hospital, followed by C genotype.

Key words: hepatitis B virus; genotype; distribution

乙型肝炎病毒(HBV)是全球最普遍感染的病毒之一。世界范围内大约有 20 亿人(占世界人口的 1/3)有血清学证据在过去或持续感染 HBV,我国 HBV 携带者超过 1 亿。HBV 感染存在明显的地域差异,根据 HBV 全基因序列异质性大于等于 8% 的特点,现已明确 HBV 分为 A~H 8 个基因型^[1]。HBV 基因分型与疾病的发生、治疗和预后都有一定的关联,因此 HBV 基因分型将有助于治疗药物的选择和疗效评价。本研究采用 PCR 体外扩增和 DNA 反向点杂交相结合的 DNA 芯片技术,对本院 216 例住院患者血清样本进行 HBV 基因分型、HBV-DNA 定量以及丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)、胆碱酯酶(CHE)检测,旨在了解不同 HBV 亚型在本院患者中的分布特征及 HBV 基因型与相关生化指标的相关性,为临床医生治疗 HBV 感染提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 216 例患者血清均来自 2012 年 1 月至 2013 年 5 月泸州医学院附属医院传染科慢性乙型肝炎住院患者,男 144 例,女 72 例,年龄 15~69 岁,平均(36.36±13.06)岁。患者均排除其他类型的肝炎病毒感染和合并其他原因导致的肝脏损伤。临床诊断符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》标准^[2]。

1.2 仪器与试剂 深圳凯杰 HBV-DNA 定量检测试剂盒,深圳亚能生物工程公司 HBV 基因分型检测试剂盒,ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 扩增仪,FYY-3 型分子杂交仪;所有试剂均

为配套试剂,并严格按照仪器说明规范操作和使用试剂。

1.3 方法

1.3.1 ALT、AST、CHE、TBIL 的检测 严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 HBV-DNA 定量 DNA 的提取按照试剂盒说明书操作,PCR 扩增体系按照试剂说明书进行。

1.3.3 基因分型 DNA 的提取方法同 DNA 定量检测,反应条件为 50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,94 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,30 个循环;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。得到的扩增产物进行杂交和显色;结果的判读 HBV 膜条上的探针排列顺序如下:膜条第 1 行 rt180L、rt204M、rt207M、rt207V 为拉米夫定敏感检测位点,rt181A、rt236N 为阿德福韦酯敏感检测位点;膜条第 2 行 rt180M、rt204V、rt204I、rt207I 为拉米夫定耐药检测位点,rt181V、rt236T 为阿德福韦酯耐药检测位点;HBV-B、HBV-C、HBV-D 分别表示 HBV 基因亚型 B、C 和 D;PC 为显色内控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学处理,计数资料用 χ^2 检验进行率的比较,计量资料用 t 检验进行计量资料进行统计,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

216 例患者中,HBV-B 型 138 例,占 63.89%(138/216);HBV-C 型 68 例,占 31.48%(68/216);HBV-B+HBV-C 型混合感染 8 例,占 3.70%(8/216);HBV-D 型 2 例,占 0.92%(2/

216)。HBV-B 型和 HBV-C 型感染者之间比较,ALT、AST、TBIL、CHE 和 HBV-DNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。HBV-B+HBV-C 型混合感染和 HBV-D 型感染者例数较少,不予比较。结果见表 1。

表 1 216 例患者 HBV 基因型和肝功能指标及 HBV-DNA 定量的关系($\bar{x}\pm s$)						
基因型	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mol/L)	CHE(U/L)	HBV-DNA($\times 10^3$ copy/mL)
HBV-B	138	144.97 $\pm$ 217.57	109.63 $\pm$ 121.34	30.07 $\pm$ 63.29	3 123.52 $\pm$ 1 586.31	6.02 $\pm$ 0.95
HBV-C	68	137.28 $\pm$ 185.26	106.56 $\pm$ 111.29	40.51 $\pm$ 69.89	3 450.19 $\pm$ 1 629.44	5.89 $\pm$ 0.67
HBV-B+HBV-C	8	146.82 $\pm$ 216.99	89.65 $\pm$ 75.16	39.33 $\pm$ 13.74	3 307.16 $\pm$ 1 534.35	5.75 $\pm$ 0.61
HBV-D	2	145.07 $\pm$ 175.68	96.32 $\pm$ 64.56	34.26 $\pm$ 64.56	3 246.54 $\pm$ 1 243.27	5.92 $\pm$ 0.23

3 讨 论

根据 HBV 膜蛋白的个别氨基酸改变将其分为 adw、adr、ayw 和 ayr 4 个主要血清亚型^[3]。这种基于外膜蛋白表现型的 HBV 亚型分类,并不能确切反映病毒的异质性。近年来根据不同病毒株全基因序列间的差异在 8%或以上,或 S 基因序列差异在 4%或以上的原则,HBV 被分为 A~H 8 个基因型^[1]。这种建立在基因测序基础上的分型方法能够更为准确地反映病毒基因的异质性。由于 HBV 逆转录酶缺乏 3'→5'外切酶活性,HBV 在复制过程中基因变异率较高,HBV 会在不同的地区形成相对稳定的野生株,所以不同国家和地区存在不同的 HBV 基因型的分布特点,HBV 基因型呈一定的地域差异这一论点基本得到学者们的认同。我国 HBV 的主要流行毒株为 HBV-B 型和 HBV-C 型,南方以 HBV-B 型为主,北方以 HBV-C 型为主,HBV-D 型仅见于少数民族地区,如西藏和新疆,HBV-A、HBV-F 型偶有发现^[4-5]。

本研究分析了本院 216 例慢性 HBV 感染者的基因型分布情况,结果显示本院慢性 HBV 感染以 HBV-B 型和 HBV-C 型为主,HBV-B 型占 63.89%(138/216),HBV-C 型占 31.48%(68/216),HBV-B+HBV-C 型混合感染占 3.70%(8/216),HBV-D 型占 0.92%(2/216),基本符合我国西南地区的特点。HBV-B 型感染率比胡朝辉等^[6]研究报道的结果(56.8%)要高,但是低于任文娟等^[7]报道的 86.7%,与谭文婷等^[8]报道重庆地区 HBV 基因分布特点的有差异,HBV-B 型占 45.6%,HBV-C 型占 53.9%。究其原因可能与研究者选测对象、范围和样本量的多少以及试验方法等有关,另本院是川南最大的一所三级甲等教学医院,地处云南、贵州、四川交界等复杂地理位置因素有关。

ALT 在肝炎急性期升高明显,是判断肝脏损害程度的主要指标。HBV-DNA 是诊断乙型肝炎、提示病毒复制活跃与否的金标准。近年来,关于 HBV 基因型与肝功能及 HBV-DNA 水平等相关性的研究很多,但是结果很不一致。部分研究结果显示 HBV 基因型与肝脏受损程度及 HBV-DNA 水平有关,HBV-C 型感染更容易发展为肝硬化与肝癌,HBV-C 型 HBV-DNA 水平高于 HBV-B 型^[9-11]。但也有学者认为,HBV 基因型与肝脏受损程度及 HBV-DNA 水平无关^[12-13]。本研究结果显示:任意 2 种 HBV 基因型之间 ALT、AST、TBIL 和 HBV-DNA 定量水平的差异均无统计学意义($P>0.05$),可说明不同基因型与病毒复制活跃情况及对肝脏的损害程度关系不大。从患者的 HBV-DNA 定量结果可知,各种基因型的 HBV 复制都非常活跃,而 ALT 和 AST 水平波动范围很大,因此感染同一基因型 HBV 的患者存在很大的个体差异。CHE 是反映肝

脏合成能力的一个灵敏指标,可间接反映患者的预后。董格峰等^[14]报道不同基因型 HBV 感染患者的 CHE 水平差异有统计学意义($P<0.01$),不同基因型 HBV 对肝脏的合成能力影响不同,对疾病预后的影响存在差异。HBV-B+HBV-C 型混合感染对肝脏的合成能力影响最大,预后最差,而 HBV-B 型感染者预后最好,HBV-C 型感染者居中;认为 HBV 基因型对肝脏疾病病情轻重有一定的影响。但是本研究结果显示,感染不同基因型 HBV 的患者 CHE 水平差异无统计学意义($P>0.05$),这可能与本研究样本量相对较少有关。

对于不同地区 HBV 基因型与临床资料相关性研究结果不一致的原因,可能与选择的实验对象、范围与样本量大小等有关。所以,临床医生应综合分析各研究对当地 HBV 基因型的报道,以便了解全国范围内 HBV 基因型与临床表现的相关性。同时,HBV 感染后的临床表现不是仅与 HBV 基因型相关,还与免疫状态、遗传因素及环境有关,HBV 基因型只是其重要影响因素之一。随着对 HBV 研究的深入,HBV 基因型在疾病发病机制、疾病进程及抗病毒治疗中扮演的角色也将被逐一解开。

总之,本院慢性乙型肝炎患者以 HBV-B 型和 HBV-C 型感染为主,HBV-B 型为优势基因型,各基因型 HBV 复制都相当活跃。不同基因型与肝脏的合成能力及 HBV-DNA 定量无关。越来越多的证据表明,HBV 基因型与乙型肝炎发病机制、转归、抗病毒疗效均有密切关系。通过多中心、大样本量进行更深入的研究,对了解我国 HBV 基因型的分布概况和乙型肝炎的防治具有非常重要的意义。

参考文献

[1] Arauz Ruia P, Norder H, Robertoson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central American[J]. J Gen virol, 2002, 83(8): 2059-2073.

[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.

[3] Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes[J]. J Viral Hepatitis, 2005, 12(2): 111-124.

[4] Ding X, Gu H, Zhong ZH, et al. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China [J]. Jpn J Infect Dis, 2003, 56(1): 19-22.

[5] 张岩, 白雪帆, 李新红, 等. 陕西地区乙型肝炎患者血清中病毒的基因分型[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(8): 746-747.

[6] 胡朝辉, 罗华, 邓文斌, 等. 四川地区乙型肝炎患者 HBV 基因型分布特点研究[J]. 西部医学, 2009, 21(12): 2114-2115.

[7] 任文娟, 贾淑芳, 孙慧, 等. 成都市 HBV 基因型(下转第 3029 页)

原体、病毒作用^[9-10]。Ghafouri 等^[6]发现吸烟患者鼻腔灌洗液中 PLUNC 蛋白水平较非吸烟者低。Lindahl 等^[11]发现在职业性刺激性化学物接触者,鼻分泌物中 PLUNC 水平较健康人低。本研究中,有 8 例 AR 患者在过敏原刺激后 PLUNC 蛋白表达下调(下调率 80%),这与 Ghafouri 等^[12]的研究结果较一致,具体机制有待进一步研究。APOA1 主要存在于血浆及乳糜微粒中,参与脂代谢及信号传导作用,有研究发现 APOA1 具有抑制 IL-1、IL-8 等因子抑制中性粒细胞功能的作用^[13],亦有研究显示在学龄儿童体内 APOA1 水平升高与过敏性哮喘关系密切^[14]。本研究发现,在接受变应原刺激后,AR 患者鼻液中 APOA1 表达升高,说明 AR 患者发病时血管通透性升高,但 APOA1 在 AR 中的作用尚不明确。

α -抗胰蛋白酶是具有蛋白酶抑制作用的一种急性时相反应蛋白,它不仅作用于胰蛋白酶,同时也作用于糜蛋白酶、尿激酶、胶原酶、弹性蛋白酶、纤溶酶和凝血酶等,与这些酶结合,抑制其活性,从而增加细胞生物膜稳定性,起到抗炎、防御作用。本研究发现,在 AR 患者接受过敏原刺激后,其鼻腔灌洗液中 α -抗胰蛋白酶表达上调,说明 α -抗胰蛋白酶在 AR 患者鼻黏膜中具有保护上皮细胞、减少黏膜损伤作用,是 AR 急性发病的一种自我防御、修复作用。

结合珠蛋白是肝脏合成的一种糖蛋白,分布在血清中,与游离血红蛋白结合成稳定的复合物,被单核-巨噬细胞系统吞噬、降解,从而减少游离血红蛋白。结合珠蛋白同时又是一种急性期时相反应蛋白。当机体处于应激状态时,血液中的结合珠蛋白明显增多。本研究中,在受过敏原刺激后的 AR 患者鼻液中,结合珠蛋白表达明显上调,但其具体机制及生物学功能尚不明确,推测可能与急性反应及血管通透性增加有关。

本研究采用蛋白质组学技术方法筛选出 AR 患者在受过敏原刺激后鼻腔灌洗液的差异表达蛋白,初步探索了 AR 的生物标记物,以期能为开发特异度高、快捷、经济的 AR 早期诊断方法提供依据。

参考文献

[1] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008[J]. Allergy, 2008, 63(86): 8-160.

[2] 许以平. 过敏性疾病实验室检测方法的完善刻不容缓[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(8): 673-675.

[3] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2009 年,

武夷山)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 44(12): 977-978.

[4] Choi GS, Shin SY, Kim JH, et al. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis[J]. Clin Exp Allergy, 2010, 40(3): 403-410.

[5] Jun SW, Kim TH, Lee HM, et al. Overexpression of the anaphylatoxin receptors, complement anaphylatoxin 3a receptor and complement anaphylatoxin 5a receptor, in the nasal mucosa of patients with mild and severe persistent allergic rhinitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(1): 119-125.

[6] Ghafouri B, Ståhlbom B, Tagesson C, et al. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting[J]. Proteomics, 2002, 2(1): 112-120.

[7] Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, et al. Lactoferrin in health and disease[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61: 261-267.

[8] Niehaus MD, Gwaltney JM, Hendley JO, et al. Lactoferrin and eosinophilic cationic protein in nasal secretions of patients with experimental rhinovirus colds, natural colds, and presumed acute community-acquired bacterial sinusitis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(8): 3100-3102.

[9] Zhou HD, Li XL, Li GY, et al. Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 309(1/2): 191-197.

[10] Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, et al. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(5): 1201-1206.

[11] Lindahl M, Ståhlbom B, Tagesson C. Identification of a new potential airway irritation marker, palate lung nasal epithelial clone protein, in human nasal lavage fluid with two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight[J]. Electrophoresis, 2001, 22(9): 1795-1800.

[12] Ghafouri B, Irlander K, Lindbom J, et al. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis[J]. J Proteome Res, 2006, 5(2): 330-338.

[13] Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Hatanaka E, et al. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions[J]. Lipids, 2002, 37(9): 925-928.

[14] Nagel G, Koenig W, Rapp K, et al. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2009, 20(1): 81-88.

(收稿日期: 2014-03-18)

(上接第 3026 页)

分布特点及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(5): 575-578.

[8] 谭文婷, 邓国宏, 王宇明, 等. 重庆地区乙型肝炎病毒基因型分布及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2321-2323.

[9] 蒋音, 蔡枫. 乙型肝炎病毒基因分型与临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2007, 24(6): 417-419.

[10] 闵志军, 徐培君, 张力超, 等. 常州地区乙型肝炎病毒基因分型及 HBV DNA 定量的临床研究[J]. 现代实用医学, 2009, 21(2): 99-100.

[11] 于欣, 葛宪民, 李丹亚, 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.

[12] 黄海燕, 孟祥伟, 张玲玲. 长春地区乙型肝炎病毒基因分型与肝病发病关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(12): 1057-1060.

[13] 雷建华, 梁骏, 杨旭, 等. 各种临床类型乙型肝炎病例血清 HBeAg/HBeAb 和 HBV DNA 定量分析[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(17): 2493-2496.

[14] 董格峰, 丁艾昆, 孙玉秋, 等. 乙肝病毒基因分型与 YMDD 变异的关系及其临床意义研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1458-1459.

(收稿日期: 2014-01-08)