

• 临床研究 •

甘肃地区乙型肝炎病毒基因型分布研究*

何莉莉¹, 张兴旺², 王 平², 张哲梅², 居 军²

(1. 甘肃卫生职业学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院检验中心, 甘肃兰州 730000)

摘 要:**目的** 分析甘肃地区乙型肝炎病毒(HBV)的基因型分布。**方法** 采用型特异性引物-聚合酶链式反应(SSP-PCR)技术对 300 例 HBV DNA 阳性患者进行 HBV 基因分型。**结果** 在 300 份血清标本中, 279 份标本被成功分型, 其中基因型 B 59 份, 占 19.7%; 基因型 C 169 份, 占 56.3%; 混合基因型 B/C 47 份, 占 15.7%; 混合基因型 C/D 4 份, 占 1.3%; 未确定型别 21 份, 占 7.0%。不同基因型 HBV 感染患者间性别、年龄分布及丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$); B 型 HBV 感染患者乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性率(40.7%)略高于 C 型患者(35.5%), 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 甘肃地区 HBV 基因型包括 B、C、B/C、C/D 型, 其中 C 型为优势基因型。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 特异性引物; 聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.028 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)05-0647-02

乙型肝炎病毒(HBV)基因型的分布具有明显的种族和地域性差异,我国主要以 B、C 型感染为主,其中北方以 C 基因型为主,南方以 B 基因型为主。而甘肃省位于我国西北地区,属于 HBV 感染高流行区,其 HBV 基因型分布值得关注。本研究旨在分析甘肃地区 HBV 基因型的构成情况,为指导临床病情分析及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月至 2011 年 7 月甘肃省人民医院肝病和消化科门诊、住院患者及甘肃省肿瘤医院患者共 300 例,HBV DNA 定量检测均为阳性,其中男 220 例、女 80 例,年龄 15~70 岁,40%来自甘肃省兰州市,60%来自甘肃省除兰州市以外的地区。纳入的所有患者诊断均符合 2000 年第 10 次全国(西安)病毒性肝炎会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[1],均排除其他病毒性肝炎及自身免疫性肝炎。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 抽取受检者静脉血 2 mL,室温放置 30 min 自然凝固,3 000 r/min 离心 10 min,离心半径为 8 cm,吸取血清,−20 ℃保存备用。

1.2.2 HBV DNA 的定量检测 HBV DNA 定量检测采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR),于 LightCycler 荧光定量 PCR 仪(德国罗氏公司)上检测;定量结果大于 1.00×10^3 copies/mL 则判为阳性。核酸扩增和温度循环条件设置严格按照厂商试剂说明书进行。

1.2.3 HBV 血清学标志物(HBV-M)的检测 HBV-M 检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(HBsAb)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)检测使用上海科华公司试剂在全自动酶免分析仪(瑞士 Tecan 公司)上运行测试,反应程序设置严格按照厂商试剂说明书进行,同时做室内质控。

1.2.4 HBV 基因分型 采用特异性引物-PCR(SSP-PCR)技术进行检测,引物参考文献[2]方法,根据前 S1 基因到 S 基因中的保守序列设计出 10 条引物,其中 2 条外引物,8 条内引物,包含 6 种基因型。每条内引物具有型特异性,使得各种基因型 PCR 产物大小各不相同。所用引物序列见表 1,由上海生工生物科技有限公司合成。

表 1 SSP-PCR HBV 基因分型所用引物序列

引物	序列	位置	特异性	方向
第 1 轮 PCR(外引物)	P1 5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'nt	2 821~2 843	通用	正义
	P2 5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'nt	685~704	通用	反义
第 2 轮 PCR(内引物)				
A 组	B2 5'-GGC TCC AGT TCA GGA ACA GT-3'nt	65~84	A-E 型特异性	正义
	BA1R 5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3'nt	111~132	A 型特异性	反义
	BB1R 5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'nt	322~343	B 型特异性	反义
	BC1R 5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'nt	163~184	C 型特异性	反义
B 组	BD1 5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3'nt	2 977~2 994	D 型特异性	正义
	BE1 5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3'nt	2 953~2 976	E 型特异性	正义
	BF1 5'-GCT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3'nt	3 030~3 049	F 型特异性	正义
	B2R 5'-GGA GGC GGA TCT GCT GGC AA-3'nt	3 076~3 095	D-F 型特异性	反义

* 基金项目:甘肃省技术与开发专项计划项目(0709TCYA025)。

1.2.5 HBV DNA 的提取 取待测 HBV 血清标本各 100 μL , 加入 100 μL 核酸提取液 A, 振荡混匀 15 s, 1 300 r/min 离心 10 min, 弃上清。再加入 50 μL 核酸提取液 B 至沉淀中, 振荡混匀 10 s, 100 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 13 000 r/min 离心 2 min, 取上清液作为 PCR 扩增的模板。

1.2.6 PCR 扩增反应 (1) 以 HBV DNA 为模板, 用外引物 P1 与 P2 进行第 1 轮 PCR。PCR 反应体系 (25 μL) 如下: Taq 预混酶 12 μL , 50 pmol/ μL 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 DNA 2 μL , 双蒸水 10 μL 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 结束反应。同时以蒸馏水为模板扩增作为阴性对照。(2) 以第 1 轮 PCR 产物为模板, 分别以 A 组引物 (B2、BA1R、BB1R、BC1R) 和 B 组引物 (B2R、BD1、BE1、BF1) 为内引物进行第 2 轮 PCR, 检测 HBV DNA 基因型 A、B、C、D、E、F。PCR 反应体系 (25 μL) 如下: Taq 预混酶 12 μL , 50 pmol/ μL 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 DNA 2 μL , 双蒸水 10 μL 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 结束 PCR 反应。同时以蒸馏水为模板扩增作为阴性对照。

1.2.7 基因型的判断 将第 2 轮 PCR 产物分别在 1.5% 琼脂糖中进行电泳后, 在紫外凝胶成像系统拍照, 根据 PCR 扩增产物片段大小来判断基因型。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计数资料以例数或百分率表示, 采用 χ^2 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 基因型的构成 在 300 份血清标本中, 279 份标本被成功分型, 其中基因型 B 59 份, 占 19.7%; 基因型 C 169 份, 占 56.3%; 混合基因型 B/C 47 份, 占 15.7%; 混合基因型 C/D 4 份, 占 1.3%; 未确定型别 21 份, 占 7.0%。基因 C 型所占百分比高于其他 3 种基因型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随机选取基因 B、C 型各 5 份样品及混合基因型 C/D 4 份样品, 均送至大连宝生物工程有限公司进行 S 序列测序, 结果完全符合。

2.2 分型成功的标本来源患者特征 不同基因型 HBV 感染者间性别、年龄分布及丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); B 基因型患者 HBeAg 阳性率 (40.7%) 略高于 C 基因型患者 (35.5%), 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

笔者采用 SSP-PCR 对甘肃地区 HBV 进行基因型鉴定, 在 300 份血清标本中, 279 份标本被成功分型, 基因型 B 59 份, 占 19.7%; 基因型 C 169 份, 占 56.3%; 混合基因型 B/C 47 份, 占 15.7%; 混合基因型 C/D 4 份, 占 1.3%; 未确定型别 21 份, 占 7.0%; 未发现基因型 A、E、F 存在。结果说明甘肃地区和全国 HBV 基因型分布相似, 也是以 B、C 型为主, 且两者中 C 型所占百分比更高, 基因 C 型为优势基因型, 这与我国有关 HBV 基因型的报道一致^[3-4]。本研究还发现了 4 例 HBV 混合基因型 C/D 感染患者, 这可能与甘肃地区的地理位置及少数民族的存在有一定关系。混合基因型 B/C 和 C/D 的存在,

可能原因是 HBV 感染者免疫功能低下而获得了二次感染, 这有待进一步研究。此外, 21 例患者未确定基因型别, 可能原因分析如下: (1) 可能为 G 或 H 型; (2) 近年来乙型肝炎治疗中新型抗病毒药物的应用导致病毒发生基因突变, 而本试验所用引物不适用于突变基因的检测; (3) 样品在采集和保存过程中 DNA 降解。具体原因仍有待于进一步研究。

在本研究中, 不同基因型 HBV 感染患者间性别、年龄分布及 ALT 水平比较均无明显差异。B、C 基因型 HBV 感染患者 HBeAg 阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与国内学者报道存在差异^[5]。随着研究的深入, 越来越多的研究表明 HBV 基因型与乙型肝炎的发病机制、疾病转归、抗病毒疗效有密切关系^[6-10]。但是, 目前关于 HBV 基因型与 HBeAg 阳性率、HBV DNA 载量、发病年龄及肝功能指标相关性的研究结论不完全一致, 尚无定论。除 HBV 基因型, HBV 感染后疾病进程及转归还与抗病毒治疗、机体免疫状态及宿主遗传因素等密切相关, 而 HBV 基因型只是影响疾病进程的重要因素之一。

综上所述, 甘肃地区慢性乙型肝炎基因型分布构成包括 B、C、B/C 和 C/D 混合型, 其中基因 C 型为优势基因型, 符合我国北方城市 HBV 基因型的流行病学特征。下一步笔者将扩大样本量, 进行基因亚型和不同基因型的乙型肝炎患者转归相关性研究, 为甘肃地区的乙型肝炎防治提供更多的实验室依据。

参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- [2] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 362-364.
- [3] 范金水, 庄辉, 李远贵. 我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(2): 88-91.
- [4] 孙奎霞, 李杰, 闫玲, 等. 中国慢性乙型肝炎病毒感染者病毒基因型及基因亚型分布[J]. 中国病毒学杂志, 2011, 26(3): 177-182.
- [5] 区映研, 杨海红, 曾文铤, 等. 乙肝病毒基因分型与 HBV-DNA 水平及临床表现的研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(5): 750-751.
- [6] 毛国强, 朱朝敏, 许红梅. 慢性乙肝病毒 B 亚型感染儿童不同 HBeAg 状态下 CP 基因变异测定[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(2): 251-253.
- [7] 叶珺. 安徽省乙型肝炎病毒基因型分布及其与抗病毒治疗的相关性[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007.
- [8] 翁伟, 唐吉斌. 乙型肝炎病毒基因分型研究在抗病毒治疗中的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2): 126-130.
- [9] 窦裁凤. HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 定量、乙肝基因分型检测及核苷类似物抗病毒疗效在 HBV 相关性肝病中的临床研究分析[D]. 辽宁: 吉林大学, 2014.
- [10] 于秀艳, 汪杰, 刘鹏, 等. 乙型肝炎病毒基因型与干扰素抗病毒治疗相关性的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(1): 115-116.

(收稿日期: 2015-09-20)