

论著·临床研究

重庆地区 HBV 基因型与临床特征相关性分析*

李 甜,覃 英,廖 璞[△]
(重庆市人民医院,重庆 400014)

摘 要:**目的** 分析重庆地区乙型肝炎病毒(HBV)感染人群中 HBV 基因型的群体差异,以及不同的基因型种类与患者临床特征之间的关系,为重庆地区乙型肝炎诊断、治疗和预防提供理论依据。**方法** 采集重庆 8 个地区 768 例 HBV 感染者血清样本及其临床诊疗历史数据,PCR 提取目的基因,采用直接测序法分析获得的 HBV S 基因序列,运用 NCBI 在线软件及 MEGA6.0 软件分析每例 HBV 样本的基因型种类,使用多种生物信息分析软件对 S 基因突变位点进行分析,探讨基因型情况与临床特征及 S 基因突变三者间的相关性。**结果** 重庆地区 HBV 感染者中,B 和 C 基因型在年龄、性别、临床用药及 HBV DNA 载量方面差异无统计学意义($P>0.05$);HBV 感染者中丙氨酸氨基转移酶(ALT)异常值(>40 U/L)比例方面 C 基因型明显高于 B 基因型,HBeAg 阳性率方面 C 基因型明显高于 B 基因型,差异均有统计学意义($P<0.05$);肝硬化/肝细胞癌组中 C 基因型比例显著高于无症状 HBV 携带者组和慢性乙型肝炎组,与之相应的 B 基因型在无症状 HBV 携带者组和慢性乙型肝炎组的比例高于肝硬化/肝细胞癌组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。B 和 C 基因型 HBV S 基因不同细胞表位均存在大量突变,C 基因型的多突变率高于 B 基因型,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 重庆地区 B 基因型为优势基因型;C 基因型比 B 基因型具有更强的致病力和更高的多突变率,且容易引起肝硬化及肝细胞癌。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因型; 临床相关性; 重庆
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.20.006 **中图法分类号:**R394;R512.6+2
文章编号:1673-4130(2018)20-2488-04 **文献标识码:**A

Analysis of the correction between HBV genotypes and clinic features in Chongqing*
LI Tian ,QIN Ying ,LIAO Pu[△]
(Chongqing General Hospital,Chongqing 400014,China)

Abstract: Objective To analyze the group differences of HBV genotypes and the correction between different genotypes and clinical characteristics of patients with hepatitis B virus infection in Chongqing, and to provide theoretical basis for diagnosis, treatment and prevention of HBV infection in Chongqing area. **Methods** Totally 768 HBV-infected patients (HBsAg-positive) from 8 regions of Chongqing were selected, and the serum samples and clinical data were collected. HBV S gene sequences were achieved by PCR and direct sequencing. The HBV genotypes were analyzed by the NCBI online software and MEGA6.0, and the S gene mutation sites were analyzed by the bioinformation softwares. Then further study were conducted on the relationship between of genotypes and clinical feature or the S gene mutations. **Results** Among the HBV-infecting patients in Chongqing, there were no statistically significant difference between genotype B and C with gender, age, the load of HBV DNA and clinical medication ($P>0.05$). ALT abnormal rate (>40 U/L) and HBeAg-positive rate with genotype C were significantly higher than those of genotype B ($P<0.05$). The proportion of genotype C in liver cirrhosis/ hepatocellular carcinoma group were significantly higher than asymptomatic carrier group and chronic hepatitis B group and the proportions of genotype B in asymptomatic carrier group and chronic hepatitis B group were significantly higher than liver cirrhosis/ hepatocellular carcinoma group ($P<0.05$). There were a large number of mutations in different cell epitopes of HBV S gene in both genotype B and C. The multi-mutation rate in genotype C were higher than genotype B, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** HBV genotype B is the dominant genotype in Chongqing residents; however, genotype C shows more virulent and higher multi-mutation rate than genotype B, which make pa-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81572089)。
作者简介:李甜,女,硕士研究生,主要从事分子生物学检验和实验室管理工作。 [△] 通信作者, E-mail:liaopu@sina.com。
本文引用格式:李甜,覃英,廖璞. 重庆地区 HBV 基因型与临床特征相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20): 2488-2491

tients susceptible to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatitis B virus; genotype; clinic interrelation; Chongqing

目前,全球乙型肝炎病毒(HBV)感染广泛流行,感染者共约 2.48 亿人^[1],它所产生的肝损伤最终会导致肝硬化(LC),甚至是肝细胞癌(HCC),因此控制其流行已然成为世界各国亟待解决的公共卫生问题。我国慢性感染者大约 7 400 万人^[2],属于中-高度流行国家^[3]。据《2013 我国卫生统计年鉴》报道,2012 年在重庆地区 HBV 的发病率为 63.67%(每 10 万人),病死率为 0.04%(每 10 万人)。分析重庆地区 HBV 基因型分布特征,以及各基因型与 HBV 感染者临床特征的关系,为重庆地区乙型肝炎诊断、治疗和预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 样本来源为重庆市 8 个地区(黔江区、万州区、合川区、南川区、涪陵区、垫江县、北碚区和沙坪坝区),采集于 2014 年 1 月至 2014 年 5 月。纳入标准:出生地为重庆或在重庆已经长期工作、生活多年,HBsAg 检测为阳性者。排除标准:其他类型肝炎(如酒精性肝炎等)或其他原因引起肝功能异常的疾病。样本采集具体情况见表 1。血清样本分离后保存于-20℃冰箱,使用干冰运送至实验室,保存于-80℃冰箱中。

表 1 重庆区域内收集标本分类数量及对应测序成功数(n)

区域	选取量	测序成功数
北碚区	50	46
沙坪坝区	76	60
合川区	96	58
涪陵区	116	74
南川区	96	91
垫江县	96	54
万州区	96	85
黔江区	142	62
总计	768	528

在血清样本收集的同时,收集患者的基本信息(包括性别、年龄等)以及临床病史相关资料(包括 HBV DNA 载量、临床免疫学检测结果、用药情况及预后等)。按照诊断标准将纳入研究的患者分为 4 组:HCC 组、LC 组、无症状 HBV 携带者(ASC)组、慢性乙型肝炎(CHB)组。HCC 的诊断依据为《原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)》,以病理学检测结果为确认依据;LC 组的诊断依据为《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》,组织学或临床提示存在 LC 的证据;CHB 的诊断依据为《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》,丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续或反复异常,或肝组织学检查有肝炎病变;ASC 组的诊断依据为《慢

性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》,HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 阳性,血清中 ALT 与天门冬氨酸氨基转移酶(AST)在正常范围内,肝组织学检查无病变或病变轻微。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 北京博奥生物有限公司 E-Cycler™ 96 PCR 扩增仪。采用磁珠法(PerkinElmer,中国上海)提取 HBV DNA。核酸扩增用 2×Taq PCR Master Mix 试剂盒(Qiagen,德国)。扩增引物由华大基因合成,引物序列:5'-GCGGGGTTTTCTTGTTGA-3'和 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3'。

1.2.2 标本处理及检测 标本收集后,置-80℃冰箱中保存。核酸提取采用磁珠法进行,按照上海铂金埃尔默生物科技有限公司试剂盒说明书提取。PCR 扩增条件:预变性 95℃ 10 min,然后变性-复性-延伸(95℃变性 30 s,52℃复性 45 s,72℃延伸 90 s)40 个循环,72℃延伸 10 min。核酸扩增产物保存在 4℃,送华大基因测序。

1.2.3 HBV 基因分型 应用 NCBI 在线 Genotyping 软件及 Clustal W2.0 软件对 S 基因序列及 A-G 参考序列进行比对,确定其基因型。基因型 A1 参考序列为 AB076678、M57663, A2 参考序列为 AJ012207; B1 参考序列为 AB20512、A2D23678, B2 参考序列为 AF121250, B3 参考序列为 D00331, B4 参考序列为 AB17759; C1 参考序列为 AB117758、AB205125, C2 参考序列为 AB049609、AB205123, C3 参考序列为 X75656、X75665, C4 参考序列为 AB048705, C5 参考序列为 AB241109; D 参考序列为 AB126681; E 参考序列为 AB205192; F 参考序列为 AB166850; G 参考序列为 AB056513。

1.2.4 HBV S 基因的多种突变分析 使用 MEGA6.0 软件将 B 基因型及 C 基因型 HBV S 基因序列分别与参考序列比对,同时翻译成氨基酸序列。使用 BioEdit 7.0.9.0 软件分析 HBsAg 突变情况,包括亲水区突变点数、突变频率及突变形式等。

1.3 统计学处理 将患者资料录入 Microsoft Excel 文件中,包括 HBV 基因型、突变情况、患者基本资料及治疗资料等。使用 SPSS17.0 软件进行数据统计分析,两组计量资料比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV S 基因序列分析 所有的血清标本共收集有 768 份,其中 528 份样本扩增成功。将测序的 S 基因序列使用 NCBI 在线软件分析,结果显示 B 基因型一共 346 例,占 65.53%; C 基因型 181 例,占 34.28%; D 基因型 1 例,占 0.19%。

2.2 HBV 基因型与性别、年龄相关性分析 HBV B 基因型患者平均年龄为(40.9±16.4)岁,与 C 基因型的(40.8±14.4)岁比较,差异无统计学意义($P>0.05$);HBV B 基因型患者男女占比分别为 58.33% (196/336)、41.97% (141/336),与 C 基因型的 53.59% (97/181)、46.41% (84/181) 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 HBV DNA 载量及 HBeAg 阳性率与 HBV 基因型的相关性分析 所收集样本中,共有 366 份血清标本具有 HBV DNA 载量,B 基因型 DNA 载量的对数值为 5.8±1.8,C 基因型 DNA 载量的对数值为 5.9±1.6,差异无统计学意义($P>0.05$)。所收集血清样本中,437 例有 HBeAg 信息,其中 C 基因型阳性率 [71.61% (111/155)] 高于 B 型 [59.22% (167/282)],差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 HBV 基因型与 ALT 的相关性分析 所收集病例样本中,把患者按照 ALT 值进行分为正常组(ALT≤40 U/L)和异常组(ALT>40 U/L)。C 基因型的 ALT 异常率为 58.67% (88/150) 高于 B 基因型的 44.57% (115/258),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 HBV 基因与临床使用抗病毒药的相关性分析 所收集病例样本中,共 113 例患者使用抗病毒药,主要为拉米夫定、恩替卡韦、阿德福韦酯及联合用药,HBV 基因型与临床使用抗病毒药无明显相关性($P>0.05$)。

2.6 HBV 基因型与临床表型的相关性分析 由于 HCC 组患者较少(仅 12 例),因而与 LC 组合并。结果显示 CHB 组患者最多占 67.17% (233/332),差异有统计学意义($P<0.05$)。结果显示,LC 及 HCC 组中 C 基因型的比例高于 ASC 组及 CHB 组;而 ASC 组及 CHB 组 B 基因型的比例高于 LC 及 HCC 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.7 HBV S 基因突变分析 软件 BioEdit 分析结果显示,B 和 C 基因型均存在不同表位的突变。HBsAg 主要亲水区为 aa100-160,其中位于 aa124-147 的“a”抗原决定簇是发生变异的主要部位。结果显示,B 基因型突变主要包括 I110L、T140N、K122R、T126A/S、Q129H/R、P127T、M133L、P120T;C 基因型突变主要包括 Q101R、S114T G130N、I126T/N/S、F134L、S143T、G131N、Y100C、T113S。K122R 与 P120T 突变仅在 B 基因型中被发现,T113S 仅在 C 基因型被发现。Y100C、I110L、F134L、M133L、Q101R、S114T、P127T、Q129H/R 这些突变在两种基因型中差别较大。HBV B 基因型共 140 例突变,HBV C 基因型共 84 例突变,两种基因型的突变率差异无统计学意义($\chi^2=1.719,P=0.190$)。在突变株中,C 基因型多突变株的比例 [38.10% (32/84)] 显著高于 B 型 [17.86% (25/140)],差异有统计学意义($\chi^2=11.335,P=0.001$)。

表 2 HBV 基因型与临床特征相关性分析					
项目	<i>n</i>	B 基因型	C 基因型	<i>t/χ²</i>	<i>P</i>
性别[<i>n</i> (%)]				1.057	0.304
男	294	197(67.01)	97(33.00)		
女	225	141(62.67)	84(37.33)		
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)				1.529	0.208
HBV DNA($\bar{x}\pm s$,log)		5.82±1.75	5.90±1.63	1.547	0.214
HBeAg[<i>n</i> (%)]				6.637	0.010
阳性	278	167(60.07)	111(39.93)		
阴性	159	115(72.33)	44(27.67)		
ALT[<i>n</i> (%)]				5.390	0.020
正常	205	143(69.76)	62(30.24)		
异常	203	115(56.65)	88(43.35)		
用药情况[<i>n</i> (%)]				4.449	0.814
LAM	35	19(54.29)	16(45.71)		
ADV	21	11(52.38)	10(47.62)		
EDT	35	15(42.86)	20(57.14)		
联合用药	12	8(66.67)	4(33.33)		
其他	10	6(60.00)	4(40.00)		
临床表型[<i>n</i> (%)]				13.544	0.001
ASC	23	16(69.57) ^a	7(30.43) ^a		
CHB	233	158(67.81) ^a	75(32.19) ^a		
LC/HCC	76	34(44.74)	42(55.26)		

注:与 LC/HCC 组比较,^a $P<0.05$

3 讨 论

大量的研究证实 HBV 的基因亚型分布具有明显的地理差异^[4],A 基因型主要分布在美国南部、欧洲北部国家、非洲少部分地区及印度地区;B 基因型和型多分布于亚洲地区;D 基因型分布广泛,欧洲中部大多数国家、非洲撒哈拉以南、地中海地区及印度地区等;E 基因型仅在西非被发现;F 基因型主要分布于美洲;G 基因型主要分布于法国、德国及美洲;H 基因型分布于中美洲和墨西哥;I 基因型在越南和老挝,以及中国西安和云南^[5-6]分布的较多;J 基因型主要在日本被发现。目前,中国主要以 B、C 基因型为多见,偶有 A、D 和 I 基因型发现的报告,秦岭以南地区以 B 基因型为主,秦岭以北地区以 C 基因型为主,这些研究报告都与本研究一致,也与本课题组前期的研究一致(重庆垫江县)^[7]。但谭文婷等^[8]的研究中,重庆的 B 基因型占 45.6%,C 型占 53.9%,与本研究存在差异,可能与实验方法及人口流动性影响有关。

HBV 基因型与感染后临床表现、疾病进程、治疗方案等密切相关^[9-10]。相对于 B 基因型,HBV C 基因型感染者肝脏病变更为严重,表现为 ALT 水平和 HBV DNA 载量较高、HBeAg 血清转换等,因而更容易导致 LC 和 HCC。HBeAg 是 HBV 活动复制的标志,ALT 是肝脏炎症活动的标志。本研究中,C 基因

型 ALT 异常率和 HBeAg 阳性率明显高于 B 基因型, 这些可能与 B 型 HBeAg 更易转换成 HBeAb 阻止了乙肝的进一步发展有关。本研究中 HBV 基因型与 HBV DNA 载量无明显相关性, 与之前报道的 HBV DNA 在 C 基因型感染者的载量显著高于 B 基因型不一样。马幼丽等^[11]研究发现, HBV 基因型与患者年龄具有相关性, B 基因型患者的平均年龄明显小于 C 基因型, 并且随年龄增加 B 基因型患者所占比例下降, 而与此同时随年龄增加 C 基因型患者所占比例升高。本研究中, 笔者发现 HBV 基因型与年龄相关性不显著, 这与许家璋等^[12]研究结果一致。本研究显示, LC/HCC 组中 C 基因型比例显著高于 ASC 组和 CHB 组, 而在 ASC 组和 CHB 组中 B 基因型比例高于 C 基因型, 表明基因型与肝脏的不同损害可能相关, C 基因型或更容易诱发 LC 及 HCC, 这与一篇 HBV 基因型与肝脏疾病相关 meta 分析结论一致^[13]。近年来的研究表明 HBV 基因型与抗病毒治疗效果有关。本研究中所用药物有拉米夫定、恩替卡韦、阿德福韦酯及联合用药, 但研究结果显示 HBV 基因型与用药没有相关性, 有报道认为在干扰素治疗中 B 基因型感染者的预后要明显高于 C 基因型感染者^[14], 而核苷酸类药物治疗效果与基因型没有相关性^[15]。

4 结 论

本研究中 HBV 基因与感染者本身属性(年龄)、临床指标(HBV DNA 载量、肝细胞损伤程度、HBeAg 阳性率等)及抗病毒治疗效果等临床特点的相关结论与先前报道并不一致, 其原因可能为研究方法的差异和研究不同地区人群的差异。同时, 本研究也表明, 重庆地区 B 基因型为优势基因型; C 基因型比 B 基因型具有更强的致病力, 且容易引起肝硬化及肝细胞癌; C 基因型的多突变率比例高于 B 基因型, 而多突变可能会影响 HBV 的致病性, 预示着患有 C 基因型的感染者治疗及预后会更加难以控制。

参考文献

- [1] NELSON N P, EASTERBROOK P J, MCMAHON B J. Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease [J]. *Clinics Liver Dis*, 2016, 20(4): 607-628.
- [2] LU F M, ZHUANG H. Management of hepatitis B in China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(1): 3-4.
- [3] SCHWEITZER A, HORN J, MIKOLAJCZYK R T, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published

- between 1965 and 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 386(10003): 1546-1555.
- [4] KURBANOV F, TANAKA Y, MIZOKAMI M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus [J]. *Hep- atol Res*, 2010, 40(1): 14-30.
- [5] YU H, YUAN Q, GE S X, et al. Molecular and phyloge- netic analyses suggest an additional hepatitis B virus gen- otype "I" [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9297.
- [6] SHEN T, YAN X M, LIU H X, et al. Genotype I of hepa- titis B virus was found in east Xishuangbanna, China and molecular dynamics of HBV/I [J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(1): 37-45.
- [7] MA M, HE M, LIAO L, et al. Molecular epidemiology and population dynamics of hepatitis B virus in Dianjiang County, Chongqing, China [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(1): 117-124.
- [8] 谭文婷, 邓国宏, 王宇明, 等. 重庆地区乙肝病毒基因型分 布及其临床意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(24): 2321-2323.
- [9] LI X D, WANG L, LIU Y, et al. Characterization of hepa- titis B virus genotypes/subgenotypes in 1, 301 patients with chronic hepatitis B in North China [J]. *Chin Med J*, 2011, 124(24): 4178-4183.
- [10] SCOTTO G, FAZIO V. Hepatitis B genotypes and re- sponse to adefovir treatment in patients with HBV chron- ic infection [J]. *J Infect*, 2010, 60(5): 399-401.
- [11] 马幼丽, 王黎芳, 谢服役, 等. 乙型肝炎病毒基因分型检测 及临床意义分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2015, 29(3): 248-250.
- [12] 许家璋, 谢琴秀, 李平, 等. 乙型肝炎病毒的基因型与临床 病理特征的分析 [J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(4): 270- 272.
- [13] WONG G L, CHAN H L, YIU K K, et al. Meta-analysis: the association of hepatitis B virus genotypes and hepato- cellular carcinoma [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 37 (5): 517-526.
- [14] ZHANG Y, WU Y, YE S, et al. The response to interfer- on is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo [J]. *Virus Res*, 2013, 171(1): 65-70.
- [15] WIEGAND J, HASENCLEVER D, TILLMANN H L. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B vi- rus genotypes? A hypothesis generated from an explora- tive analysis of published evidence [J]. *Antivr Ther*, 2008, 13(2): 211-220.

(收稿日期: 2018-03-02 修回日期: 2018-05-18)