

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

中国 11 城市乙型肝炎病毒慢性感染者中
乙型肝炎病毒基因型分布

高俊薇 李雅娟 庄辉 李杰 王佳 董庆鸣 陈雅洁 牛俊奇
马为民 赵伟 赵保安 钟金群

【摘要】 目的 了解中国乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染者中 HBV 基因型的分布情况。方法 收集北京、清远、深圳、石家庄、汉川、南京、长春、济南、聊城、宁波和温州市共 1214 份 HBV DNA 阳性的慢性 HBV 感染者血清样本,用型特异性引物聚合酶链反应法(PCR)进行基因型测定,并对其部分样本以 PCR 产物直接测序验证。结果 在 1214 份血清中,检测到 A 基因型 9 例,占 0.7%;B 基因型 345 例,占 28.4%;C 基因型 709 例,占 58.4%;B、C 混合基因型(B+C)151 例,占 12.4%。未检测到其他基因型。北方地区(长春、北京、石家庄市等)慢性 HBV 感染者中,C 基因型比例较高,分别为 58.2%、67.5%和 63.6%,山东省聊城和济南市的 C 基因型比例分别高达 90.2%和 87.9%。随地理位置南移,B 基因型比例逐渐增加,广东省清远和深圳市的 B 基因型比例分别为 71.4%和 63.6%。结论 HBV 基因型分布有明显地区差异。在中国慢性 HBV 感染者中,HBV C 和 B 基因型为主要流行株。北方地区以 C 基因型为优势株,而南方地区则 B 基因型较为多见。

【关键词】 乙型肝炎病毒;聚合酶链反应;序列分析;基因型

Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection among 11 cities of China GAO Jun-wei*, LI Ya-juan, ZHUANG Hui, LI Jie, WANG Jia, DONG Qing-ming, CHEN Ya-jie, NIU Jun-qi, MA Wei-min, ZHAO Wei, ZHAO Bao-an, ZHONG Jin-qun. *Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Corresponding author: LI Jie, Email: jieli69@263.net; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients with chronic HBV infection among 11 cities of China. **Methods** A total of 1214 serum samples from patients with chronic HBV infection were collected in 11 cities of China, including Beijing, Qingyuan, Shenzhen, Shijiazhuang, Hanchuan, Nanjing, Changchun, Liaocheng, Jinan, Ningbo and Wenzhou. Genotypes of the 1214 HBV strains were identified by PCR method with type specific primers. Parts of the results were confirmed by direct sequencing analysis of PCR products. **Results** Among the 1214 patients with chronic HBV infection, 0.7% (9/1214) were genotype A, 28.4% (345/1214) genotype B, 58.4% (709/1214) genotype C, and 12.4% (151/1214) genotype B and genotype C mixed infection. No other genotypes were found. Genotype C was predominant in the northern part of China, such as Changchun, Beijing, Shijiazhuang, while genotype B was more commonly seen in south of China. 71.4% (20/28) for patients from Qingyuan and 63.6% (70/110) from Shenzhen were infected with genotype B. **Conclusion** HBV genotypes had distinct geographic distribution. Genotype B and C the predominant strains in patients with chronic HBV infection in China. Genotype C was predominantly identified in the northern part of China versus genotype B the south.

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

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02);北京市科委课题资助项目(H020920020190)

作者单位:100083 北京大学医学部微生物学系(高俊薇、李雅娟、庄辉、李杰、王佳);北京地坛医院(董庆鸣);长春市北方肝胆医院(陈雅洁);吉林大学第一附属医院(牛俊奇);北京大学深圳医院(马为民);南京市第二医院(赵伟);湖北省汉川市疾病预防控制中心(赵保安);广东省清远市疾病预防控制中心(钟金群)

通讯作者:李杰, Email: jieli69@263.net; 庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

乙型肝炎病毒 (HBV) 的慢性感染是一个严重的公共卫生问题。目前, 根据 HBV 的基因多态性, 来自不同国家和地区的所有 HBV 可分为 A~H 等 8 个基因型^[1-4]。研究表明, HBV 基因型呈明显的地域分布, 各国家和地区差异明显, 甚至同一国家不同地区的 HBV 基因型分布也有差异; 感染不同 HBV 基因型的患者, 其临床表现及病毒学特征明显不同^[5-10]。我国慢性 HBV 感染者中, 以 B 和 C 基因型为主, 也存在 B+C 混合型感染; 北方地区主要以 C 基因型为主, 南方则以 B 型较为多见^[9-15]。本研究应用型特异性引物 PCR 法, 检测我国 11 城市 1214 份慢性 HBV 感染者的 HBV 基因型, 以进一步了解我国 HBV 基因型分布情况。

材料与方法

1. 血清标本: 所有血清标本均由 11 市各家医院采自慢性 HBV 感染者, 共 1214 份, 男性 903 份, 女性 311 份。其中长春 67 份、北京 120 份、石家庄 99 份、聊城 133 份、济南 132 份、宁波 105 份、温州 386 份、南京 12 份、汉川 22 份、清远 28 份及深圳 110 份。慢性 HBV 感染诊断符合 2005 年发布的《慢性乙型肝炎防治指南》^[16]。所有患者均排除 HAV、HCV、HDV 及 HEV 感染及自身免疫性肝病、药物性肝炎、酒精性肝炎和阻塞性黄疸等其他因素引起的肝脏损伤。血清标本采集后于 -20℃ 冻存备检。

2. 仪器和试剂: RNAagents[®] Total RNA Isolation System 试剂盒、DNA 分子量标志 G316A 购自美国 Promega 公司, 琼脂糖、dNTP 购自华美生物工程公司。Gold Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl)、10× 反应 buffer、25 mmol/L MgCl₂ 购自 AB 公司。AB-9700 型 PCR 热循环仪, 台式高速离心机为 Sigma 1-15K 型, 紫外检测为美国 Bio-Rad 公司 Mini-Transilluminator, Standard Electrophoreses Hood 快照成像。PCR 反应引物由上海基康生物技

术有限公司合成, 引物序列见表 1。

3. 型特异性引物 PCR 法对 HBV DNA 进行基因型分型: 应用改进的 RNAagents[®] Total RNA Isolation System 试剂盒提取 HBV DNA^[10]。HBV 基因分型用多对引物巢式 PCR 法: 采用 40 μl 的反应体系 (10× 反应 buffer 4 μl, dNTP 4 μl, MgCl₂ 2.4 μl, P1 0.8 μl, S4R 0.8 μl, HBV DNA 模板 10 μl, Gold TaqE 0.2 μl, H₂O 17.8 μl), 按 95℃, 10 min; 95℃, 20 s; 55℃, 20 s; 72℃, 1 min, 进行 40 个循环, 72℃, 7 min。取第一轮 PCR 产物作为模板进行第二轮扩增: 40 μl 反应体系 (10× 反应 buffer 4 μl, dNTP 4 μl, MgCl₂ 2.4 μl, B2 0.8 μl, BA1R 0.8 μl, BB1R 0.8 μl, BC1R 0.8 μl, 或 B2R 0.8 μl, BD1 0.8 μl, BE1 0.8 μl, BF1 0.8 μl, 第一轮 PCR 产物 5 μl, Gold TaqE 0.4 μl, H₂O 21 μl), 按 95℃, 10 min; 95℃, 20 s; 65℃, 20 s; 72℃, 30 s, 进行 40 个循环, 72℃, 7 min, 然后取 2 μl 的第二轮 PCR 产物在 100 V 电压下, 经 3% 琼脂糖凝胶电泳 20 min, 紫外检测仪观察电泳条带的大小, 以确定其基因型。A 型为 68 bp, B 型为 281 bp, C 型为 122 bp, D 型为 119 bp, E 型为 167 bp, F 型为 97 bp^[9,10]。

4. PCR 产物直接测序法分型以验证 PCR 分型法的准确性: 随机选取上述基因分型结果为 B 型的样本 5 例, C 型 5 例。将第二轮 PCR 分型产物进行直接测序。PCR 产物纯化和测序由北京华大中学生科技发展有限公司完成。用 Clustal W 和 Blast 软件进行序列比对和同源性分析, 验证其基因型。

5. 统计学分析: 应用统计分析软件 SPSS 11.0 进行 χ^2 检验及统计分析。

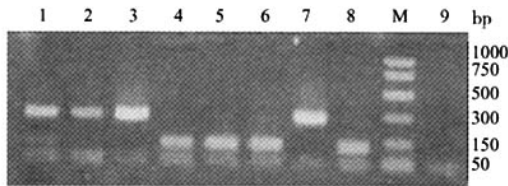
结 果

1. HBV 基因型分型: 根据 PCR 产物电泳后, 观察电泳条带的大小确定基因型。HBV 基因型 PCR 产物大小分别为: A 型 68 bp, B 型 281 bp, C 型

表1 HBV 基因分型引物及序列

基因型	正义链序列	反义链序列
A~F 1st PCR	P1: 5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'	S4R: 5'-AGA AGA TGA GGC ATA GCA GC-3'
A 2nd PCR	B2: 5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	BA1R: 5'-CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3'
B 2nd PCR	B2: 5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	BB1R: 5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'
C 2nd PCR	B2: 5'-GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'	BC1R: 5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'
D 2nd PCR	BD1: 5'-GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3'	B2R: 5'-GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3'
E 2nd PCR	BE1: 5'-CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3'	B2R: 5'-GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3'
F 2nd PCR	BF1: 5'-GYT ACG GTC CAG GGT TCA CA-3'	B2R: 5'-GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3'

122 bp(图 1)。如表 2 所示,1214 份血清中 A 型占 0.7%(9 例),B 型占 28.4%(345 例),C 型占 58.4%(709 例),B+C 占 12.4%(151 例)。在湖北省汉川市和江苏省南京市未检测到 B+C 混合感染。仅在温州市的 386 例样本中发现 9 例 A 型,其他城市未发现 A 基因型。



M:DNA 分子量标准; 1:B+C 混合型(281 bp,122 bp); 2,3,7: B 型(281 bp); 4~6,8:C 型(122 bp); 9:阴性对照

图1 HBV 基因分型 PCR 产物电泳图谱

表2 11 城市 HBV 慢性感染者中 HBV 基因型分布

样本来源	基 因 型			
	B	C	B+C	A
长春	28.4(19/67)	58.2(39/67)	13.4(9/67)	0
北京	20.0(24/120)	67.5(81/120)	12.5(15/120)	0
石家庄	21.2(21/99)	63.6(63/99)	15.2(15/99)	0
聊城	8.3(11/133)	90.2(120/133)	1.5(2/133)	0
济南	5.3(7/132)	87.9(116/132)	6.8(9/132)	0
汉川	31.8(7/22)	68.2(15/22)	0	0
宁波	20.0(21/105)	61.9(65/105)	18.1(19/105)	0
温州	35.8(138/386)	47.9(185/386)	14.0(54/386)	2.3(9/386)
南京	58.3(7/12)	41.7(5/12)	0	0
清远	71.4(20/28)	7.2(2/28)	21.4(6/28)	0
深圳	63.6(70/110)	16.4(18/110)	20.0(22/110)	0
合计	28.4(345/1214)	58.4(709/1214)	12.4(151/1214)	0.7(9/1214)

注:括号外数据为构成比(%);括号内数据为例数/总例数

2. 测序分型:随机选择 5 例用型特异性引物 PCR 法检测为 B 基因型的样品,其 PCR 产物直接测序后进行 Blast 比对,所有 5 例序列与 GenBank 中已知 B 基因型相同。随机选择 5 例用型特异性引物 PCR 法检测为 C 基因型的样品,其 PCR 产物直接测序后进行 Blast 比对,序列和 GenBank 中已知 C 基因型相同。结果显示,型特异性引物 PCR 法分型结果与核酸测序结果一致。进一步验证了型特异性引物 PCR 法可用于鉴定 HBV 基因型。

3. 不同地区 HBV 基因型分布:长春、北京、石家庄、聊城、济南、宁波、温州、清远和深圳等市的慢性 HBV 感染者中,HBV 基因型分布的差异有统计学意义($P < 0.05$)。北方地区以 C 基因型为优势

株,而南方地区以 B 基因型相对较多。如表 2 所示,北方地区如长春、北京、石家庄市以 C 基因型为主,分别占 58.2%(39/67)、67.5%(81/120)和 63.6%(63/99)。山东省聊城和济南市,其 C 基因型比例高达 90.2%(120/133)和 87.9%(116/132)。随地理位置南移,B 基因型的比例逐渐增加,广东省清远和深圳市则以 B 基因型为主,分别为 71.4%(20/28)和 63.6%(70/110)。

4. 慢性 HBV 感染者中不同性别的基因型分布:男性感染者中,B、C 基因型及 B+C 混合型分别为 25.0%(226/903)、65.4%(590/903)和 9.6%(87/903);女性感染者中,B、C 基因型及 B+C 混合型分别为 34.3%(107/311)、56.7%(176/311)和 9.0%(28/311)。HBV 基因型在不同性别中的分布其差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

近年来的研究表明,HBV 基因型不仅有重要的流行病学意义,而且与疾病进程、药物疗效及预后等有一定相关性。因此,HBV 基因型比血清型具有更重要的临床意义。另外,HBV 基因分型研究还有助于了解 HBV 在人群中基因变异和进化趋势。

快速、准确地鉴定 HBV 基因型不仅可预示疾病的发展,而且还可监测临床治疗效果。大量研究表明,HBV C 基因型与慢性 HBV 感染者临床病程的严重程度密切相关。在台湾,HBV 感染所导致的肝硬化(LC)及 50 岁以上的肝细胞癌(HCC)患者中,以 C 基因型为主;50 岁以下 HCC 患者中,B 基因型比例高于无症状携带者(ASC);而 35 岁以下的 HCC 患者中,以 B 基因型为主。提示 C 基因型与严重的肝损害有关^[6]。Sugauchi 等^[17]发现,C 基因型与丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续升高的慢性肝病相关性高于 B 基因型。近年来的研究还发现,HBV 基因型与干扰素疗效密切相关。Kao 等^[18]分别对感染 B 和 C 基因型的慢性乙肝患者,用干扰素- α (IFN- α)治疗,发现 B 基因型对 IFN- α 应答明显优于 C 基因型。因此,在治疗前明确患者基因型有助于对药物疗效的评估。

型特异性引物 PCR 法检测 HBV 基因型不仅快速简便,而且准确灵敏^[9,10]。本文 HBV 基因分型结果与以往研究基本一致。夏国良等^[19]对湖南、河南、河北及广西等 4 省(区)共 280 例 HBV 感染者,以 HBV HBsAg 基因扩增产物直接测序法进行基因

分型研究发现,以 B 和 C 基因型占优势,而河南和河北省则主要以 C 基因型多见,广西和湖南省 B 和 C 基因型均常见。范金水等^[11]对我国 8 城市 95 例的 HBV 基因型分布进行分析,发现长春、大同、青岛、西安和昆明 5 城市的 HBV 以 C 型为主,杭州以 B 型为主,深圳则 B 和 C 基因型比例相当。但在本研究所检测的 1214 份血清样本中,B+C 混合型所占的比例为 12.4%,高于上述报道,提示与直接序列法及 PCR-RFLP 法比较,型特异性引物 PCR 法对不同基因型混合感染检测可能更灵敏。

以往对 HBV 基因型的研究涉及地区有限,而且使用的分型方法各异,各地数据无法进行比较。本研究使用型特异引物 PCR 法进行检验,表明 HBV 基因型在 11 城市慢性 HBV 感染者中的分布存在一定的地区差异($P < 0.001$)。北方地区以 C 基因型为优势株,而南方以 B 基因型多见。

参 考 文 献

- [1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988, 69(10):2575-2583.
- [2] Norder H, Hammas B, Lofdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequence of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol*, 1992, 73(5):1201-1208.
- [3] 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(1):67-74.
- [4] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 2002, 83(8):2059-2073.
- [5] Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis*, 1997, 175(6):1285-1293.
- [6] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118(3):554-559.
- [7] Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology*, 2001, 34(3):590-594.
- [8] Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B virus of genotypes B and C. *Hepatology*, 2001, 33(1):218-223.
- [9] 李雅娟, 庄辉, 李杰, 等. 特异性引物聚合酶链反应乙型肝炎病毒基因分型法的建立及应用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(9):859-862.
- [10] 李雅娟, 庄辉, 李杰, 等. 乙型肝炎病毒感染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.
- [11] 范金水, 庄辉, 李远贵, 等. 我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙型肝炎病毒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(2):88-92.
- [12] 宋淑静, 何忠平, 庄辉, 等. 中国北方 5 城市慢性乙型肝炎患者的基因分型. *中国公共卫生*, 2004, 20(2):166-167.
- [13] Ding X, Mizokami M, Yao G, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology*, 2001, 44(1):43-47.
- [14] Ding X, Mizokami M, Ge X, et al. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res*, 2002, 22(1):37-44.
- [15] 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. *Jpn J Infect Dis*, 2003, 56(1):19-22.
- [16] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12):881-891.
- [17] Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(6):671-676.
- [18] Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotype and response to interferon therapy. *J Hepatol*, 2000, 33(6):998-1002.
- [19] 夏国良, Omana VN, 贾志远, 等. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(5):348-351.

(收稿日期:2007-02-07)

(本文编辑:张林东)