

· 实验研究 ·

贵州省四城市乙型肝炎病毒感染 病毒基因型调查研究

丁静娟 张权 彭亮 刘悦晖 李忠 刘三都 胡莲

【摘要】 目的 调查贵州省 4 城市乙型肝炎病毒(HBV)感染者的病毒基因型及其与临床的关系。方法 选择贵阳、遵义、凯里、都匀 4 城市慢性 HBV 感染患者共 786 例,其中无症状携带者(ASC)346 例,慢性肝炎(CH)313 例,肝硬化(LC)77 例,肝细胞肝癌(HCC)50 例。用 S 基因限制性片段长度多态性确定基因型,直接测序分析 B 基因亚型,比较主要基因型地区分布及临床特征。结果 786 例中,B 基因型 497 例(63.23%),C 型 275 例(34.99%),A 型 7 例(0.89%),D 型 7 例(0.89%),未发现 E、F 型。B 型的分布:凯里市最高(96.04%),遵义、都匀市其次(78.79%、64.52%),贵阳市最低(53.14%)。C 型的分布,贵阳(45.84%)高于都匀(34.41%)、遵义(13.13%)及凯里市(3.96%),差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。94 例 B 型感染者中,93 例为 Ba(98.94%)、1 例为 Bj 亚型。从 ASC、CH、LC 到 HCC 组,B 型的分布逐渐降低,而 C 型在各组的分布逐渐增高。与 B 型相比,C 型感染者年龄较大;ALT 水平较高($P < 0.05$);HBeAg 阳性较低($P < 0.025$)。结论 贵州省存在 A、B、C、D 4 种 HBV 基因型,但以 B 型为主,C 型其次,A、D 型极少。B 型中又以 Ba 亚型为主。B、C 基因型在贵州省 4 城市的分布有一定差异。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;基因型;限制性片段长度多态性

Investigation on virus genotype in patients infected with hepatitis B virus in four cities of Guizhou DING Jing-juan*, ZHANG Quan, PENG Liang, LIU Yue-hui, LI Zhong, LIU San-du, HU Lian. *Department of Infectious Diseases, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in Guizhou and to study the relationship between the genotype and the progression of liver disease. **Methods** 786 patients with chronic HBV infection, from 4 cities of Guizhou, including 346 asymptomatic carriers (ASC), 313 chronic hepatitis (CH), 77 liver cirrhosis (LC), 50 hepatocellular carcinoma (HCC) were examined. HBV genotype was determined by restriction fragment length polymorphism analysis and the subtypes were determined by direct sequencing of PCR product in 94 patients with HBV B genotype, the relationship between HBV genotype and the progression of liver disease was studied by multifactor analysis such as HBeAg positivity, HBV DNA load and ALT level. **Results** Of the 786 patients, 7(0.89%), 497 (63.23%), 275 (34.99%), and 7(0.89%) belonged to genotype A, B, C, D, respectively. There was statistically significant difference in the distribution of genotype B among Kaili (96.04%), Zunyi (78.79%), Duyun (64.52%) and Guiyang (53.14%) ($P < 0.01$). Genotype C was more prevalent in Guiyang than in other three cities ($P < 0.01$, or $P < 0.05$). Out of 94 genotypes B, 93 (98.94%) belonged to subtype Ba, only one was subtype Bj. There were statistically significant difference in the distribution of genotype B and C among various stage of liver disease ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Genotype B showed a gradual decrease from ASC, CH, LC to the HCC group while in contrast, genotype C showed a gradual increase in the same order. The ALT levels and the mean age were significantly higher and older in patients with genotype C than those in genotype B ($P < 0.01$ or 0.05). The HBeAg positivity was significantly lower in genotype C than that in genotype B ($P < 0.025$). **Conclusion** Data showed that there were genotype A, B, C and D existing in Guizhou. Genotype B was the major one but genotype C was more commonly seen. In genotype B, subtype Ba appeared to be predominant. The geographic distribution of genotype B and C were different in some cities of Guizhou. Compared to genotype B, genotype C was associated with the development of more severe liver damage.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; Restriction fragment length polymorphism

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30360098)

作者单位:550004 贵阳医学院附属医院感染科(丁静娟、张权、彭亮、刘悦晖);黔东南州医院(李忠);黔南州医院(刘三都);遵义地区医院(胡莲)

根据核苷酸全序列或 S 基因序列差异,可将乙型肝炎病毒(HBV)分为 8 种基因型。基因型的分布具有一定的地理特征,且与 HBV 感染后的临床表现,预后及治疗应答均有联系。因此,分析不同地区基因型的分布,对乙肝的防治具有指导意义。此前对贵州省不同民族进行的 HBV 基因型研究,仅局限于某一地区的病毒携带者^[1],且未对主要基因型做亚型分析;其他地区、不同病期肝病患者的基因型及主要基因型的亚型仍不清楚。为进一步明确贵州省 HBV 基因型的分布,阐述基因型与疾病的相关性,我们对贵州省 4 个城市共 786 例慢性乙型肝炎病毒感染者进行了一次调查研究。

对象与方法

1. 研究对象:系 2003 年 4 月至 2005 年 12 月,贵州省的贵阳(493 例)、凯里(101 例)、遵义(99 例)、都匀(93 例)4 城市 HBV DNA 阳性的慢性 HBV 感染患者,共 786 例。男性 594 例,女性 192 例,年龄在 14~70 岁之间。根据 2000 年西安会议修订的标准,其中无症状携带者(ASC)346 例,慢性肝炎(CH)313 例,肝硬化(LC)77 例,肝细胞肝癌(HCC)50 例。

2. 标本收集:抽静脉血 3 ml,离心后取血清 1.0 ml 用 1.5 ml eppendorf 离心管分装,冻存于 -70℃ 或 -20℃ 冰箱备用。采血同时收集临床资料。

3. HBV 血清标志物检测:用 ELISA 法,试剂由科华公司提供,操作按说明。

4. HBV DNA 检测:采用荧光定量 PCR 法,试剂由深圳匹基公司提供。5700 型荧光定量 PCR 扩增仪为美国 ABI 公司产品,操作按说明。根据外参照标准曲线判断结果, < 10³ 拷贝/ml 判为阴性结果。采用求对数平均值的方法计算 HBV DNA 的平均拷贝数。

5. HBV 基因分型:采用本室建立的 S 基因 PCR-RFLP 方法。主要步骤:从血清中抽提 HBV DNA 后,以 S₁、S₆ 为外引物, S₁、S₂ 为内引物(表 1),

用半巢式 PCR 扩增 S 区段,产物经 Mbo I、BstN I 或 BsmA I 酶切,根据酶切电泳图谱分型^[2]。

6. 测序分型:酶切分型怀疑为混合基因型 HBV 感染的样本,将 PCR 产物纯化后直接测序,与标准株进行核苷酸序列同源性比较确定基因型。测序由上海生工生物工程公司完成。

表 1 PCR 所用引物序列

名称	序列(5'~3')	位置(nt)
S ₆ (Outer sense)	GGGTCACCATATTCTTGGGA	2814~2833
S ₂ (Inner sense)	CATCTTCTGTGCTACTACTG	429~450
S ₁ (Antisense)	TTAGGGTTCACATGTATTCCG	842~822
C ₃ (sense)	CACCTGTCACGTCGCATGG	1592~1611
C ₄ (Antisense)	GGAAGAAGTCAGAAGGCAA	1955~1974

7. HBV B 基因亚型分析:用 PCR 产物直接测序法,具体操作见文献[3]。主要步骤为:从血清中抽提 HBV DNA 后,以 C₃、C₄ 为引物,用 PCR 扩增 C 基因 383 bp 的区段(nt1592~nt1974),产物用 UNIQ-10 纯化回收后作模板,用 Big Dye 测序试剂盒在 377 型 DNA 测序仪上直接测序,分析所得序列的 1838 位核苷酸类型,确定 B 亚型^[4]。

8. 统计学分析:均数的比较使用方差分析或 *t* 检验,率的比较使用 χ^2 检验。

结 果

1. 临床资料:786 例 HBV 感染者中,ASC 346 例(44.02%),CH 313 例(39.82%),LC 77 例(9.80%),HCC 50 例(6.36%)。平均年龄(32.28 ± 12.78)岁,平均 ALT 水平(114.39 ± 114.51)IU/L,平均 HBV DNA 含量(6.96 ± 1.55)lg 拷贝/ml,HBsAg 阳性率为 58.02%。在 4 组研究对象中,从 ASC 到 HCC,女性的患病率逐渐降低,患者的平均年龄逐渐增高。CH 组的 ALT 水平和 ASC 组的 HBV DNA 含量,HBsAg 阳性率均显著高于其他组(*P* 值均 < 0.01)(表 2)。

2. 地理分布:786 例感染者中,发现 A 基因型 7 例(0.89%),B 基因型 497 例(63.23%),C 基因型

表 2 786 例 HBV 感染者的临床资料

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (M,岁)	HBsAg (阳/阴)	ALT (IU/L)	HBV DNA 含量 (lg 拷贝/ml)
ASC	346	227/119	23.38 ± 10.34	248/98*	28.79 ± 9.19	7.42 ± 1.03*
CH	313	255/58	33.39 ± 6.17	179/134	173.64 ± 121.49*	7.10 ± 1.66
LC	77	66/11	43.97 ± 12.35	23/54	114.76 ± 104.68	6.40 ± 1.25
HCC	50	46/4	52.90 ± 11.23*	6/44	83.95 ± 46.83	5.76 ± 1.65
合计	786	594/192	32.28 ± 12.78	456/330	114.39 ± 114.51	6.96 ± 1.55

* *P* < 0.01

275例(34.99%),D型7例(0.89%),未发现E、F基因型。786例研究对象中,贵阳市493例,遵义市99例,凯里市101例,都匀市93例。B、C二种主要HBV基因型在4城市的分布:贵阳市为53.14%(262/493)和45.84%(226/493),遵义市78.79%(78/99)和13.13%(13/99),都匀市64.52%(60/93)和34.41%(32/93),凯里市96.04%(97/101)和3.96%(4/101)。分析发现B基因型的分布,凯里市最高,遵义、都匀市其次,与贵阳相比,差异有统计学意义(χ^2 值分别为13.60,31.17,64.51, P 值均 <0.01)。而C基因型的分布,贵阳市明显高于凯里、遵义、都匀市(χ^2 值分别为61.97,36.04,4.15, P 值分别 $<0.01,0.05$),差异也有统计学意义。A型、D型主要分布在遵义市,但占的比例很小,各为4.04%(4/99,4/99)。

3. 在疾病中的分布:A基因型感染者有7例,其中5例分布在ASC组、2例分布在CH组。7例D基因型感染者分别分布在ASC(3例)、CH(2例)和LC组(2例),由于样本量太小,未作统计学分析。分析B、C二种主要基因型在疾病中的分布,发现从ASC组到HCC组,B型在每组中的比例逐渐降低,分别是ASC 77.17%、CH 58.78%、LC 45.45%、HCC 22.00%。将CH、LC、HCC组分别与ASC组相比, χ^2 值分别为25.71,31.02,63.56, P 值均 <0.005 ;其余3组间B型的分布,差异也有统计学意义(P 值均 <0.05)。而C基因型在每组中的分布逐渐增高,分别为20.52%、39.94%、51.95%和78.00%,将ASC、CH、LC组分别与HCC组相比, χ^2 值分别为71.95,25.22,8.75, P 值均 <0.005 。C基因型在ASC组的分布最低,与CH、LC组相比,差异有统计学意义(χ^2 值分别为29.65,32.14, P 值均 <0.025);在LC组的分布较CH组高,但经统计学处理差异无统计学意义($\chi^2 = 3.65, P > 0.05$) (表3)。

4. B、C基因型感染者的临床特征:比较B、C基因型感染者的临床特征,发现与B基因型相比,C基因型感染者的平均年龄大($t = 8.29, P < 0.01$),平均ALT水平高($t = 1.76, P < 0.05$),但HBeAg阳

性率却显著降低($\chi^2 = 5.70, P < 0.025$)。在性别构成、HBV DNA含量方面,B、C基因型间差异无统计学意义(表4)。

表3 不同临床类型HBV感染者的基因型分布

临床类型	例数	基因型			
		A	B	C	D
ASC	346	5(1.44)	267(77.17)*	71(20.52)	3(0.87)
CH	313	2(0.64)	184(58.78)	125(39.94)	2(0.64)
LC	77	0(0.00)	35(45.45)	40(51.95)	2(2.60)
HCC	50	0(0.00)	11(22.00)	39(78.00)#	0(0.00)
合计	786	7	497	275	7

* 与CH、LC、HCC比, P 值均 <0.005 ;# 与ASC、CH、LC比, P 值均 <0.005 ;括号外数据为病例数,括号内数据为百分比(%)

5. 基因亚型分析:94例B基因型感染者中,男性58例,女性36例,其中ASC 40例,CH 38例,LC 10例,HCC 6例。用C₃、C₄引物做PCR,扩增产物纯化后测序,获得nt1592~nt1974的核苷酸序列,根据nt1838核苷酸多态性区分亚型。在该位点上核苷酸A的为Ba亚型,是核苷酸G的为Bj亚型。测序分析结果93例(98.94%)为Ba亚型,仅1例(1.06%)为Bj亚型。

讨论

HBV基因型的分布有一定的地域特征,在东南亚地区慢性HBV感染者中以B、C基因型为主,但各地报道其优势基因型存在一定差异^[5]。国内上海市以C型为主^[6],而台湾省B型常见^[7]。本研究用针对HBV S基因的PCR-RFLP方法,调查贵州省4个城市共786例慢性HBV感染者的基因型分布,发现贵州省存在A、B、C、D 4种HBV基因型,但以B基因型为主(63.23%),C型其次(34.99%),A型、D型占的比例很少(均为0.89%),未发现E、F基因型。在贵州省的不同城市,二种主要HBV基因型的分布亦存在差异。在凯里、都匀、遵义市B基因型占绝对优势,但贵阳市C基因型的分布却显著高于其他3个城市,可能贵阳系省会城市,选择的研究对象又均为贵阳医学院附属医院肝病门诊及感染科住院患者,就诊的患者不仅数量多且来自全省各地,推测人口的流动影响了B、C基因型的省内分布。

表4 B、C基因型HBV感染者的临床特征

基因型	例数	性别(男/女)	年龄(M,岁)	HBeAg阳性(%)	ALT(IU/L)	HBV DNA含量(Ig拷贝/ml)
B	497	378/119	29.80 ± 11.49	306(61.57)	115.02 ± 114.44	6.90 ± 1.42
C	275	213/62	35.36 ± 7.31*	145(52.73) [△]	131.23 ± 127.30#	6.86 ± 1.10
合计	772	591/181	31.78 ± 10.49	451(58.42)	124.12 ± 116.04	6.89 ± 1.31

与B基因型比,* $P < 0.01$, # $P < 0.05$, $\Delta P < 0.025$

HBV 基因型对肝脏疾病的影响已有一些报道,但由于样本数量及方法学的不同,至今未能得到一致的结论^[7,8]。本研究对 B、C 二种主要基因型在疾病中的分布进行比较,发现从 ASC 组到 HCC 组,C 基因型在各组中的分布逐渐增高,而 B 型在各组中的比例逐渐降低,提示 C 基因型 HBV 感染与疾病进展有关。对 B、C 基因型感染者的临床特征比较分析发现,与 B 基因型相比,C 基因感染者的平均年龄较大,ALT 水平较高,但 HBeAg 的阳性率却明显降低,提示 C 基因型 HBV 感染引起的肝脏损害较重,导致的临床结局也更严重。从而支持 C 基因型感染致肝病病变较 B 型重的观点^[9]。但 HBeAg 阳性率较 B 型感染者低与文献报道存在一定差异^[10],这种差异除与不同地区 HBV 流行株及研究所选择的病例不同有关外,可能也受各地区 HBV 前 C1896、基本核心启动子(BCP)T1762/A1764 变异流行率的影响。

文献报道 HBV B 基因型可分为 Ba 和 Bj 亚型^[4],HBV C 基因型至少可分 C₁、C₂ 两个亚型^[11]。HBV 亚型分布有明显的地区性,日本主要为 Bj 和 C₂ 亚型,东南亚国家如泰国、缅甸和越南则以 Ba 和 C₁ 亚型多见,鉴于贵州地区 HBV 感染者的主要基因型为 B 型,对 94 例不同病期 HBV 感染者的 B 基因型分析表明,贵州省主要为 Ba 亚型(98.94%),极少数为 Bj 亚型(1.06%)。对 C 基因型的亚型分析正在进行中。

参 考 文 献

- 1 丁静娟,彭亮,张权,等. 贵州侗族、苗族和汉族人群乙型肝炎病毒基因型分布. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,18:230-233.
- 2 彭亮,丁静娟,张莉莎. 乙型肝炎病毒 S 基因限制性片段长度多态性分型方法的建立及应用. 中华肝病杂志,2004,12:475-478.
- 3 刘悦晖,丁静娟,张权. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒前 C 区和基本核心启动子变异检测和临床意义探讨. 中华消化杂志,2005,9:471-474.
- 4 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. Gastroenterology, 2003, 124: 925-931.
- 5 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: 590-594.
- 6 Ding X, Mizokami M, Yao GB, et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. Intervirology, 2001, 44: 43-47.
- 7 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology, 2000, 111: 554-559.
- 8 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV genotype Research group. Hepatology, 2001, 33: 218-223.
- 9 许军,王齐欣,蒋栋,等. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. 中华肝病杂志,2003,11:11-13.
- 10 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. Hepatology, 2003, 37: 19-26.
- 11 Huy TTT, Ushijima H, Quang VX, et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol, 2004, 85: 283-292.

(收稿日期:2006-03-31)

(本文编辑:王多春)

· 书 讯 ·

《循证医学入门·临床科研方法与实例评价》(第二版)现已出版

该书由中华临床流行病学学会副主任委员徐德忠教授主编,第四军医大学出版社出版发行。全书共分三篇,主要介绍了循证医学和临床流行病学的基本理论、临床科研方法及其临床应用的实例。第一篇为基本理论,分循证医学概论、临床科研的设计、临床测量、临床科研的评价和临床流行病学中分析性流行病学研究方法的进展 5 章;第二篇为初级篇,包括由临床研究生或临床医生研讨班学员撰写的 23 篇临床研究设计实例及评价和 20 篇临床研究论文及评价;第三篇为高级篇,包括国外杂志的临床论文及评语,包括 INCLIN 资源和培训中心的临床流行病学专业硕士生的 8 篇课题设计及评价、17 篇临床硕士或博士毕业生或临床医师撰写的临床论文。该书内容丰富,以实例为主展开理论研讨和评价,既有充分的理论阐述与设计要点,又有无数的示范实例及其点评。因此该书可作为研究生、在职医生继续教育及部分专业本科生的教材,亦可供各级医院临床医生与辅助科室的医务人员阅读与应用,还可作为临床流行病学工作者参考。

该书为正 16 开本,定价 42 元。

订购联系方式: 地址:710032 西安市长乐西路 17 号 第四军医大学军队流行病学教研室

电话:029-84774955、84772182 传真:029-83251302 联系人:龙泳,王波

Email:longyong71@163.com 或 wangbo@fmmu.edu.cn