

· 实验研究 ·

长春地区乙型肝炎病毒基因分型 与肝病发病关系的研究

黄海燕 孟祥伟 张玲玲

【摘要】 目的 了解长春地区乙型肝炎(乙肝)患者基因型特点及与肝炎严重程度、疾病转归的关系,以指导临床对疾病进展的判断和指导临床用药。方法 选择 216 例乙型肝炎病毒(HBV)阳性肝炎患者,年龄 33~87 岁,平均(60.5±11.4)岁。病变程度的判断根据 2000 年《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准。应用巢式聚合酶链反应方法(nPCR)扩增 HBV S 基因组序列,用第二轮 PCR 产物直接进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析;然后用 HBV S 基因扩增产物采用 Sanger 双脱氧链终止法进行 DNA 测序,将所得到的核苷酸序列及推测的相应氨基酸序列通过 DNASIS 软件处理,并与 GenBank 中已发表的 HBV 中国株及国外株进行同源性比较以确定 HBV 的基因型,证明用 S 基因序列的 RFLP 法 HBV 分型结果与用全基因组序列的基因分析是一致的。表明 S 基因序列 RFLP 法的基因分型结果与 S 基因测序分型结果是一致的。结果 216 例 HBV DNA 阳性标本中单基因型分别检测出 A、B、C、D 四种,其中单基因型中 A 型有 1 例(0.46%),B 型有 19 例(8.8%),C 型有 175 例(81.02%),D 型有 21 例(9.72%)。86 例 HBV DNA 阳性住院患者标本中,C 型为感染的主要基因型,69 例(80.23%)。B 型次之,9 例(10.47%)。6 例原发性肝癌均为 C 型;20 例肝炎后肝硬化的患者中有 17 例(85.0%)为 C 型。结论 长春地区 HBV 基因型仍以 C 型为主(81.02%),B、D 型次之(分别是 8.8%和 9.72%)。同时结果显示长春地区 HBV 感染有基因多样性趋势,表现在检测出了 A 单基因型。肝癌、肝硬化与 C 基因型 HBV 的相关性最大。C 基因型 HBV DNA 拷贝数较非 C 基因型高,提示与 HBV DNA 在 C 型患者体内长期存在有关。HBV 病毒载量与肝脏病变严重程度的关系无统计学意义。

【关键词】 乙型肝炎病毒;基因分型;限制性片段长度多态性

A clinical study on hepatitis B virus genotype HUANG Hai-yan, MENG Xiang-wei, ZHANG Ling-ling. The No. 1 Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

Corresponding author: MENG Xiang-wei

【Abstract】 Objective To study the hepatitis B virus (HBV) genotype and its relation to clinical degree and responsiveness to antiviral therapy on hepatitis in order to guide the clinical therapy. **Methods** We amplified HBV S gene by polymerase chain reaction (PCR), using the second-round PCR product, which was digested by restriction fragment length polymorphism (RFLP). This genotype method was designed under the analysis of the restriction fragment length polymorphism and using the restriction enzymes that identified the genotype-specific sequences. Five restriction enzymes, Hph I, Nci I, Alw I, Ear I and NlaIV, were identified in genotype-specific RFLP from the S gene region. Representative sequences from the S genome region of each HBV genotype were aligned to show the restriction sites by the five restriction enzymes. The amplified S gene nucleotide sequences were sequenced by dideoxy-chain-termination method and the corresponding amino acid sequence was deduced using DNASIS software. Later, they were genotyped by comparing to representative S gene sequences obtained from GenBank. This confirmed the results of RFLP HBV genotyping methods, coincident with that of S gene sequence. **Results** Genotypes A, B, C, D were classified in 216 patients with HBV and DNA positive. The results showed that: 1 case (0.46%) of genotype A, 19 cases genotype B (8.8%), 175 genotype C (81.02%) and 21 genotype D (9.72%). A total of 86 patients in the hospital were divided into either genotype C cases (69) or non-genotype C cases (17). **Conclusion** Genotype C was the major genotype in Changchun. Among HBV patients, type C was 80.95%, followed by genotypes B and D. Both hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis showed relations with genotype C.

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

乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)基因分型与预测乙肝病情、预后、转归及治疗效果,世界不同地区报道各有差异。在我国,还没有大样本量进行 HBV 基因型的测定。本研究旨在了解长春地区乙肝患者基因型特点及与肝炎严重程度、疾病转归的关系,以指导临床对疾病进展的判断和指导临床用药。

对象与方法

1. 对象:选择 2004 年 3-9 月来自长春市传染病院和吉林大学第一临床医院门诊和病房就诊的 216 例 HBV 阳性肝炎患者。患者来自地区分别为长春(167 例)、九台(23 例)、农安(17 例)和榆树(9 例)。其中女性 71 例,男性 145 例,平均年龄(48.5 ± 11.36)岁。病变程度的判断根据 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》中关于肝脏炎症和纤维化分级、分期的诊断标准。

2. 方法:①采用酚-氯仿法提取患者血清中的 HBV DNA。②巢式 PCR(nPCR)方法扩增基因型特异的 HBV S 基因保守序列:依次加入一对外引物 P3(5'-YCC TGC TGG TGG CTC CAG TTC-3') (10 pmol/μl)、E1 (5'-AAG CCA NAC ART GGG GGA AAG C-3', 反义)(10 pmol/L)各 1 μl,进行第一轮 PCR。扩增 25 个循环。然后以 1 μl 第一轮扩增产物、E2(5'-GTC TAG ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC-3', 正义)、E1 (5'-AAG CCA NAC ART GGG GGA AAG C-3', 反义)为内引物,进行第二轮 PCR。扩增产物在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳,于紫外光下观察。每轮 PCR 均设阳性、阴性对照与空白对照。图 1 为阳性 PCR 产物的电泳图(标本号为 119、120、121、122、123)。③用 RFLP 分析进行 HBV 酶切分型:以第二轮 PCR 产物进行限制性消化 3 h。反应在 37℃ 下用 10 U 的 Alw I、Hph I、Nci I、Nla IV 或 Ear I 进行。5 种限制性内切酶 Hph I、Nci I、Alw I、Ear I 和 Nla IV,使来自每个 HBV 基因型的 S 基因组区域典型序列成线性排列,并显示限制性位点。通过 S 基因片段不能被 Ear I 切断,基因型 B 被区分(图 2);而基因型 C 中 S 基因序列无 Alw I 位点(图 3)。只有基因型 E 在 461 位点上有 Nci I 限制性内切位点;而且只有基因型 F 在 82 位点上有 Nph I 限制性内切位点(图 4)。对于基因型 A,在 299 位点上未发现 Nla IV 特异限制性内切酶位点,但是基因型 D 在 256 和 299 位点上

被 Nla IV 消化(图 5)。消化 PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳。RFLP 模式在紫外灯下核定。④基因测序:采用 nPCR 方法进行靶序列的扩增。用一对外引物 P1 (5'-GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GAK CTA C-3', 正义)、P2(5'-CAA TWC KYT GAC ANA CTT TCC AAT CAR TWG G-3', 反义)进行第一轮 PCR。扩增进行 25 个循环。然后以 P3(5'-YCC TGC TGG TGG CTC CAG TTC-3', 正义)、P2 (5'-CAA TWC KYT GAC ANA CTT TCC AAT CAR TWG G-3', 反义)为内引物,进行第二轮 PCR。第二轮扩增产物在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳,于紫外光下观察。采用 Ultraclean 12100-300 试剂盒(硅胶吸附法胶回收纯化)进行 PCR 产物纯化,HBV S 基因扩增产物送上海联众基因公司用 ABI 公司的 3700 型全自动 DNA 测序仪测序。

3. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计学软件,用 χ^2 检验和独立样本 *t* 检验分别对基因型与肝病程度、体内病毒 DNA 拷贝数的关系进行统计学分析。

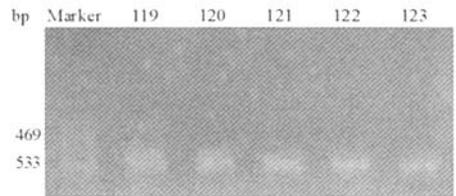


图1 阳性 PCR 产物电泳图

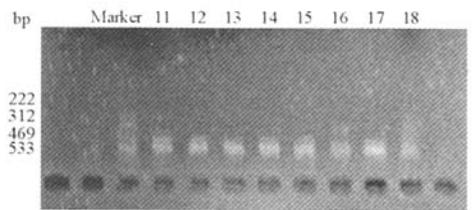


图2 不能被 Ear I 切断的为基因型 B

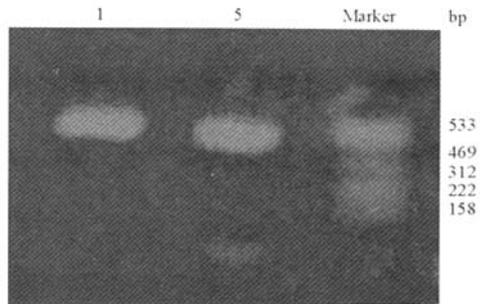


图3 未被 Alw I 消化的为基因型 C

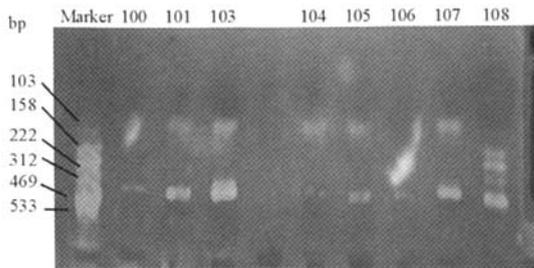


图4 未被 Nph I 在 82 位点切开的基因,故无基因型 F

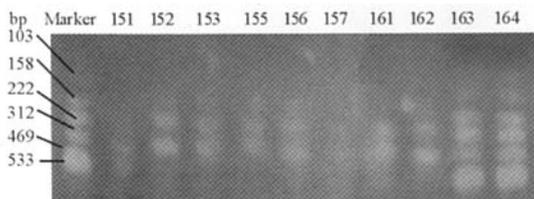


图5 未被 NlaIV 在 299 位点上切开的为基因型 A; 在 256 和 299 位点上被 NlaIV 消化的为基因型 D

结 果

1. HBV 阳性患者的基因分型: 216 例 HBV DNA 阳性标本中单基因型分别检测出了 A、B、C、D 四种, 其中单基因型中 A 型有 1 例(0.46%), B 型有 19 例(8.8%), C 型有 175 例(81.02%), D 型有 21 例(9.72%)。其中 86 例住院患者中, C 型仍然为感染的主要基因型, 69 例, 占全部基因型的 80.23%; B 型次之, 9 例(10.47%)。按病情轻重程度分类, 6 例原发性肝癌均为 C 型, 但其中 1 例合并有酒精性肝硬化; 肝炎后肝硬化的患者组, 20 例中有 17 例(85.0%)为 C 型, 只有 2 例(10.0%)为 B 型, 1 例为 D 型。相比而言, 54 例慢性肝炎中 C 型 41 例占 75.93%, 1 例 A 型(1.85%), 6 例 B 型(11.1%), 6 例 D 型(表 1)。

表1 86 例 HBV 阳性患者的基因分型

组 别	HBV 基因型				合计
	A	B	C	D	
肝癌	0	0	6	0	6
肝硬化	0	2	17	1	20
慢性肝炎	1	6	41	6	54
急性肝炎	0	1	4	0	5
无症状携带者	0	0	1	0	1
合 计	1	9	69	7	86

注: 表内数据为例数

2. 基因型与肝病程度的关系: 将基因 C 型(69 例)和非基因 C 型(17 例)患者按照肝病严重程度分为慢性肝炎(54 例)、肝炎后肝硬化(20 例)和肝癌三

组, 在慢性肝炎、肝硬化及肝癌患者中 C 型多见, 其中肝癌、肝硬化与 C 基因型 HBV 的相关性最大。用 χ^2 检验慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者的基因型有无差异, 结果显示, 各基因型间与肝病的严重程度间差异无统计学意义($\chi^2 = 1.434, P > 0.01$)。

3. 基因型和 HBV DNA 载量: 将 86 例住院患者分为基因型 C 型(69 例)和非基因 C 型(17 例)两组, 对其入院后的首次病毒 DNA 进行定量测定, 基因 C 型的均数 \pm 标准差为 $10^{6.22 \pm 1.25}$ 拷贝/ml, 高于非基因 C 型 $10^{5.20 \pm 1.84}$ 拷贝/ml, 取其对数值用来做独立样本 *t* 分析, 结果显示两组差异无统计学意义($t = 2.73, P > 0.05$)。

4. HBV DNA 载量与肝病严重程度的关系: HBV 病毒载量(拷贝/ml)急性肝炎患者为 $10^{5.76 \pm 0.82}$, 慢性肝炎患者为 $10^{4.13 \pm 1.31}$, 肝硬化患者为 $10^{4.02 \pm 1.02}$, 肝癌患者为 $10^{3.97 \pm 0.92}$, 结果显示各组差异无统计学意义($t_1 = 0.34, t_2 = 10.75, t_3 = 0.97, P$ 值均 > 0.05 ; 其中 t_1 为慢性肝炎与肝硬化组比较, t_2 为肝硬化与肝癌组比较, t_3 为急性肝炎与慢性肝炎组比较)。

5. S 基因序列 RFLP 法的基因分型结果与 S 基因测序分型结果一致。

讨 论

HBV 的基因型分布复杂, 分型方法也在不断的发展和完善, 使得基因型的报道日益增多。在我国, 还没有大样本量进行 HBV 基因型的测定。本实验证明用 S 基因序列的 RFLP 法 HBV 分型结果与用全基因组序列的基因分析结果一致, 从而进一步证实应用 RFLP 法进行基因测定简便而准确, 为大样本量进行 HBV 基因测定提供了依据。

有研究表明^[1], 通过测序发现我国南北两城市基因型主要以 B 型、C 型为主。结合文献发现一种趋势, B 型在我国由北向南逐渐增多, 而 C 型逐渐减少^[2]。本次研究对长春地区 216 例 HBV DNA 阳性患者进行基因分型结果显示, 长春地区 HBV 基因型仍以 C 型为主(81.02%), B、D 型次之(分别是 8.8% 和 9.72%)。本研究结果与赵振国等^[3] 在 2004 年用进行的基因分型的结果报道 B 型 8.9%、C 型 60.4% 相比, C 型稍有上升趋势。同时结果显示长春地区 HBV 感染的基因多样性趋势, 表现在检测出了 A 单基因型。本结果提示在长春市 HBV DNA 阳性的肝炎患者存在以上几种 HBV 基因型。

C 型为优势基因型,与国外及我国南方一些地区报道不尽相同^[2]。

本研究对肝硬化和慢性肝炎患者进行的基因分型比较结果表明,尚未发现肝病严重程度因 HBV 基因型而有所不同。以前的研究提示^[4],在台湾地区,绝大部分肝癌患者感染的 HBV 为基因型 B 或 C,基因型 C 与发展为肝硬化、肝癌有关。基因型 B 可能和年轻人发展为肝癌有关,其中 50 岁以下的肝癌与 B 基因型 HBV 相关性最大;而 60 岁以上且伴有肝硬化的肝癌与 C 基因型 HBV 有关。有研究表明,我国大陆 HBV 相关性肝癌的 HBV 基因型大都为 B 或 C^[5]。本实验肝癌患者均为 C 型,可能与 C 型为主要基因型有关。此结果与以前的报道结果一致。HBV 基因型与肝癌的关系有待进一步研究。

本研究中,C 基因型 HBV DNA 拷贝数较非 C 基因型高,但 $P > 0.05$,提示治疗前 HBV 基因型与体内病毒的含量有一定关系,但不一定是其主要影

响因素;但提示 HBV DNA 在 C 型患者体内长期存在有关。HBV DNA 载量与肝病严重程度的关系有待进一步研究,可能与其是否进行抗病毒治疗及其疗程等因素有关。

参 考 文 献

- 1 许军,王齐欣,范春蕾,等.中国南北两城市乙型肝炎病毒基因型与血清型的构成差异.中华实验和临床病毒学杂志,2003,17:327-329.
- 2 范金水,庄辉,李远贵,等.我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙型肝炎者病毒血清型和基因型分析.中华微生物和免疫学杂志,1998,18:88-91.
- 3 赵振国,陈亚洁,李奉山,等.长春市 212 例慢性肝病者血清 HBV 基因型检测与分析.中华传染病杂志,2004,22:44-45.
- 4 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology, 2000, 118: 554-559.
- 5 林旭,徐晓,郑大利,等.肝癌患者乙型肝炎病毒全基因组结构分析.中华肿瘤杂志,2004,26:213-216.

(收稿日期:2006-06-19)

(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

青海省玉树县果青牧场藏系绵羊鼠疫疫情调查

于晓涛 崔百忠 赵小龙 慕有 王梅

2005 年青海省玉树县果青牧场有旱獭鼠疫发生并引起藏系绵羊鼠疫的暴发,极易引发人间鼠疫,为了监测该地区鼠疫疫情动态及流行强度,进行了鼠疫血清学调查。藏系绵羊血清 2056 份于 2005 年和 2006 年分别采集于玉树县果青牧场。F1 抗原致敏血球;鼠疫 F1 抗原,均由全国鼠疫布病基地提供。鼠疫间接凝集试验按常规方法进行,阳性判定标准参照国标 GB 15991-1995,血清滴度 $\geq 1:20$ 为阳性。

结果:2005 年 6 月下旬,玉树县果青牧场牧民报告当地有自毙旱獭,但未收集到可检材料。7 月 7 日再次发现自毙旱獭并采集到残骨,经鼠疫细菌学检验分离到鼠疫菌,确定有动物间鼠疫流行。7 月下旬部分藏系绵羊出现精神不振,不吃草,行动迟缓等现象。8 月 2 日发现有藏系绵羊和山羊死亡,并从其体内分离到鼠疫菌。此次疫情一直持续至 8 月 23 日,共死亡藏系绵羊 13 只;山羊 1 只,分离鼠疫菌 6 株。调查表明,在藏系绵羊鼠疫流行期间伴有狐狸、狼、家猫等食肉动物的死亡。通过对 2005 年玉树县果青牧场 1051 份藏系绵羊血清的检测,发现鼠疫 F1 抗体阳性血清 64 份,阳性率 6.08%,滴度介于 1:20~1280。2006 年再次对玉树县果青牧场藏系绵羊进行调查,共采集血清 1005 份,检出阳性血清 7 份,阳性率 0.70%。此次藏系绵羊鼠疫的流行中,当年血清抗体的检出

阳性率远高于次年,经统计学分析,两个年份的鼠疫 F1 抗体的阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 44.79, P < 0.001$)。

结论:鼠疫是在啮齿动物间传播的一种自然疫源性疾病,在青藏高原鼠疫自然疫源地,喜马拉雅旱獭为主要储存宿主,但一些食肉动物和食草动物偶尔也被波及,成为人间鼠疫的重要传染源,在鼠疫流行病学有着十分重要的意义^[1]。藏系绵羊自然感染鼠疫于 1975 年被证实,研究表明,藏系绵羊在自然条件下能感染鼠疫并对鼠疫大约有 4.17% 的相对自然感染率^[2,3]。2005 年果青牧场藏系绵羊鼠疫的流行,阳性率高达 6.08%,可以看出,局部地区藏系绵羊鼠疫的暴发时,其阳性率远远高于藏系绵羊分布区。而且流行期的阳性率较高,至次年随着鼠疫 F1 抗体水平的下降,阳性率也随之下降(0.70%)。关于藏系绵羊感染鼠疫的途径问题有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 王祖郎,罗松,达卫,等.青海省以染疫藏系绵羊为传染源的人间鼠疫流行病学分析.地方病通报,1999,14(3):35-36.
- 2 王文华,詹心如,陈保生,等.实验性藏系绵羊鼠疫的临床观察.中国人兽共患病杂志,1994,10(3):12-15.
- 3 王文华,詹心如,汪伦,等.青海省玉树地区藏系绵羊鼠疫血清学调查报告.中国地方病学杂志,1994,13 特刊:86.

(收稿日期:2006-08-18)

(本文编辑:尹廉)