

· 实验研究 ·

感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析

赵鸿 李俊 李兴丰 斯崇文 于敏 公维波 于岩岩 王贵强

【摘要】 目的 明确乙肝病毒不同基因型和亚型在国内的分布及其与病情的相关性。**方法** 收集来自国内 8 个地区 884 例慢性乙型肝炎病毒感染者的血清和临床资料,用 PCR-RFLP 方法鉴定病毒基因型和亚型,分析不同基因(亚)型与病情间的相关性。**结果** 乙型肝炎病毒 B(20.77%)和 C(78.22%)基因型为最常见,仅 1 例为 D 基因型;所有 B 基因型均为 Ba 亚型,C 基因型中仅发现 C2 和 C1 亚型。北方地区患者多感染 C 基因型(83.62%)/C2 亚型(90.32%)。B 基因型患者的年龄明显小于 C 基因型患者($P < 0.000$)。不同年龄段 B 基因型和 C 基因型比较发现,感染 B 基因型的患者在 30 岁以下、30~50 岁和 50 岁以上年龄段中所占比例逐渐下降,感染 C 基因型的患者比例呈现相反趋势($P = 0.000$)。C1 和 C2 亚型患者的年龄相近。各基因型在肝硬化、慢乙肝和无症状携带者中的分布无差别。B 和 C 基因型(C1 和 C2 亚型)患者的病毒量之间无差别。B 基因型患者的肝脏炎症和纤维化评分明显低于 C 型患者($P < 0.05$)。**结论** 北方地区以 C 基因型和 C2 亚型为主。B 基因型患者的年龄明显小于 C 基因型。B 和 C 基因型(C1 和 C2 亚型)患者的肝脏炎症和病毒量之间无差别。B 基因型患者的肝脏炎症和纤维化评分明显小于 C 型患者。

【关键词】 乙型肝炎病毒;基因型;基因亚型

Clinical characteristics and distribution of hepatitis B virus genotype and sub-genotype ZHAO Hong, LI Jun, LI Xing-feng, SI Chong-wen, YU Min, GONG Wei-bo, YU Yan-yan, WANG Gui-qiang. Department of Infectious Diseases, First Teaching Hospital of Peking University, Beijing 100034, China Corresponding author: WANG Gui-qiang, Email: wanggq@hotmail.com

【Abstract】 Objective To determine the distribution and virologic characteristics of HBV genotypes, sub-type and possible association with the severity of liver disease. **Methods** 884 patients infected with HBV were enrolled from 8 provinces in China. HBV genotype and sub-type was determined, using PCR-RFLP method. **Results** The most common HBV genotypes were B (20.77%) and C (78.22%) but only 1 patient showed genotypes D. We found sub-type Ba in patients with genotype B, C1 and C2 sub-type in patients with genotype C. Genotype C (83.62%) and sub-type C2 (90.32%) were predominant in northern China. Patients with genotype B were much younger than those with genotype C. There was no significant difference between patients with sub-type C1 and C2. There was no significant difference in liver function and serum HBV-DNA load between patients with genotype B and C, or between patients with sub-type C1 and C2. However, hepatic inflammation and fibrosis score in patients with genotype B were significantly lower than those with genotype C. **Conclusion** There were no significant differences in liver function and HBV-DNA load between patients with genotype B and C, or between patients with sub-type C1 and C2. Hepatic inflammation and fibrosis score in patients with genotype B were significantly lower than those with genotype C. Genotype C/sub-type C2 were preponderance in northern China.

【Key words】 Hepatitis B virus; Genotype; Sub-type

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染严重威胁人类健康。根据 HBV 核苷酸全序列异质性 $\geq 8\%$ ^[1](同源性 $> 92\%$)或 S 基因序列核苷酸异质

性 $\geq 4\%$ ^[2,3],可将 HBV 分为 A~H 共 8 个基因型,基因型进一步分为不同的基因亚型^[4-7]。已有的研究表明,我国的 HBV 以 B、C 基因型为主并有不同的地理分布^[8];基因 C 型患者肝脏损伤可能重于基因 B 型^[9,10]、干扰素- α 的应答较差^[11,12],肝细胞肝癌(HCC)的发生率较高^[13]。尚没有关于基因亚型的相关报道。本研究采用 PCR-RFLP 方法检测来自

基金项目:卫生部临床学科重点项目(20010911);美国 CMB 基金;北京大学“985”项目

作者单位:100034 北京大学第一医院感染疾病科

通讯作者:王贵强,Email: wanggq@hotmail.com

我国 8 个地区的 884 例慢性感染者的 HBV 基因型和亚型,对基因(亚)型的分布、所致肝脏病变特点做初步探索。

材料与方 法

1. 病例选择:收集北京、河北、济南、新疆、上海、吉林、广州、江苏地区门诊患者共 884 例,血清 -20℃ 冻存备用。所有患者均进行肝功能、血常规、病毒定量、病毒血清免疫学指标等检测,其中 166 例并行肝脏穿刺活检。

2. 检测方法:设立北京大学第一医院病毒室为中心实验室,病毒定量和基因(亚)型的测定均在中心实验室用同一批次试剂有专人检测。

(1)HBV-DNA 定量:实时 PCR 荧光定量法检测,以 HBV-DNA < 10³ cps/ml 为阴性。

(2)血清免疫学指标:用雅培公司的 Abbott 试剂盒检测血清中 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe。

(3)基因(亚)型:先用酚氯仿法提取核酸;采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法鉴定基因(亚)型^[14,15],所用引物序列见表 1,引物由赛百盛公司合成。部分试剂为 Mizokami Masashi 教授惠赠。限制性内切酶 *Ear* I、*Alw* I、*Ase* I、*Nci* I、*Spe* I、*Mse* I 购自 New England BioLabs 公司。

(4)肝组织病理切片由两位病理学家独立阅片,采用 HAI 评分系统。

3. 统计学方法:所有计量资料均以“均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”或以“ $\bar{x} \pm s/M$ ”表示,正态分布样本采用 *t* 检验、方差分析,样本量少者进行秩和检验,资料分布不明者进行非参数检验。计数资料率的比较用 χ^2 检验或连续校正法或 Fisher 精确概率法。采用 SPSS 统计软件及 SAS 程序进行统计学分析。所有的统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 将被认为所检验的差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:收集北京、河北、济南、新疆、上海、吉林、广州、江苏地区门诊患者共 884 例,按照 2005 年发布的慢性乙型肝炎(慢乙肝)诊断标准,851 例(96.34%)患者为慢乙肝、23 例(2.55%)为肝硬化、10 例(1.11%)为无症状携带者,96.4% 的患者为 HBeAg(+),82.4% 为男性患者。肝硬化患者的年龄(47.52 岁)明显大于慢乙肝患者(31.93 岁, $P =$

0.000)和无症状携带者(35.00 岁, $P = 0.003$),慢乙肝和无症状携带者的年龄间无明显差别。慢乙肝患者的血清 ALT 水平明显高于肝硬化患者($P = 0.008$)和无症状携带者($P = 0.011$),血清 HBV-DNA 水平明显高于肝硬化患者($P = 0.030$),但与无症状携带者无差别($P = 0.168$)。患者感染的病毒基因型以 C 型为主,B 和 C 基因型混合感染仅见于慢乙肝患者,1 例慢乙肝患者感染 D 基因型。仅发现 Ba 亚型;C 基因型中以 C2 亚型为主(表 2)。

表 1 PCR-RFLP 方法鉴定基因(亚)型所用的引物序列

扩增区段和目的	引物序列
S 区	
> IsI	5'-AAGCTCTGCTAGATCCCAGAGT-3'
鉴定基因型	
> PS3	5'-GAAACATAGAGGTGCCTTGAGCAG-3'
Pre-core 区	
1 st round	
> BAHBF	5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGCTTA-3'
Ba 亚型鉴定	
2 nd round	
> HBAS-4V	5'-ATAGGGGCATTTGGTGGTTCT-3'
> BAHBF	5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGCTTA-3'
> BJA-RV	5'-TTCTTTATAMGGGTCAATGTCCATG-3'
Pre-core 区	
1 st round	
> BJHBF	5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGACTA-3'
Bj 亚型鉴定	
2 nd round	
> HBAS-4V	5'-ATAGGGGCATTTGGTGGTTCT-3'
> BJHBF	5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGACTA-3'
> BJA-RV	5'-TTCTTTATAMGGGTCAATGTCCATG-3'
Pol gene 区	
1 st round	
> HBV964F	5'-ATTAGACCTATTGATTGGAAAGT-3'
鉴定 C1/C2 亚型	
2 nd round	
> HBV1274R	5'-AGTATGGATCGGCAGAGGAG-3'
> HBV976F2	5'-CCTATTGATTGGAAAGTATGTCA-3'
> HBV1274R	5'-AGTATGGATCGGCAGAGGAG-3'

2. 基因型和基因亚型分布:884 例患者的基因型分布各地并不相同(表 3)。北方地区(北京、河北、山东、吉林、新疆)83.62% 的患者感染 C 基因型 HBV,南方地区 B 基因型患者明显多于北方(34.9% vs. 15.7%, $P = 0.000$),55.07% 的广州患者感染 B 基因型 HBV。另有 6 例患者为 B 和 C 混合感染,4 例在济南、2 例在广州。在济南还发现了 1 例 D 型感染者。对其中 585 例患者用 PCR-RFLP 的方法鉴定基因亚型。所有 115 例 B 基因型患者均为 Ba 亚型,未发现 Bj 亚型。其余 470 例为 C 基因型患者。北方地区(北京、河北、吉林)90.32% 的患者均为 C2 亚型,而在广州仅有 28.57% 的患者感染

C2 亚型, 江苏和上海患者仍以 C2 亚型为主。

表2 患者一般情况

项目	慢乙肝 (n=851)	乙肝后 肝硬化 (n=23)	慢性 HBV 携带者 (n=10)
平均年龄(岁)	31.93	47.52 ^a	35.00
男性	705(82.8)	17(73.9)	6(60.0)
HBeAg(+)	830(97.5)	16(69.6)	6(60.0)
ALT、ULN($\bar{x} \pm s$)	4.35 ± 3.06 ^b	2.62 ± 3.62	1.86 ± 2.26
HBV-DNA (log ₁₀ cps/ml, $\bar{x} \pm s$)	7.30 ± 1.23 ^c	6.74 ± 1.40	6.76 ± 0.89
基因型			
B	180(97.8)	3(1.6)	1(0.5)
C	664(95.8)	20(2.9)	9(1.3)
B+C	6(100)	0(0)	0(0)
D	1(100)	0(0)	0(0)
基因亚型			
C1	46(93.7)	2(4.1)	1(2.0)
C2	396(94.1)	17(4.0)	8(1.9)

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%); ^a与慢乙肝患者相比 $P=0.000$, 与慢性 HBV 携带者相比 $P=0.003$; ^b与肝硬化患者相比 $P=0.008$, 与慢性 HBV 携带者相比 $P=0.011$; ^c与肝硬化患者相比 $P=0.030$, 与慢性 HBV 携带者相比 $P=0.168$

3. 同年龄患者感染 HBV 基因(亚)型的差异: B 基因型患者的平均年龄(29.05岁 ± 9.08岁)明显小于 C 基因型者(33.31岁 ± 10.75岁, $P < 0.000$)。C1 与 C2 亚型患者的平均年龄相近(32.00岁 ± 10.49岁 vs. 33.13岁 ± 11.51岁)。41.7% 的 B 基因型患者为 20~30 岁; 而 63.6% 的 C 基因型患者为 20~40 岁。感染 C1 和 C2 亚型患者的年龄分布相似, $P = 0.895$ 。感染 B 基因型的患者在 30 岁以下、30~50 岁和 50 岁以上三个年龄段中所占的比例逐渐下降(27.3%、16.3%、5.2%), 而感染 C 基因型的患者

比例呈现相反趋势(72.7%、83.7%、94.8%), $P = 0.000$ (图 1)。

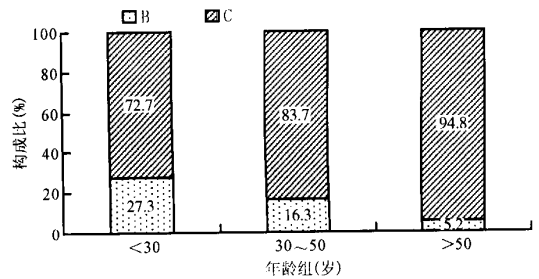


图1 同一年龄段 B 和 C 基因型乙肝病毒的比例

4. 基因(亚)型与病情的关系: 见表 2。B 和 C 基因型患者的血清 ALT、总胆红素、血清白蛋白、碱性磷酸酶、HBV-DNA 定量均无显著性差别。C1 和 C2 亚型间的血清 ALT、总胆红素、碱性磷酸酶、HBV-DNA 定量也无显著性差别, 但 C2 基因亚型患者的血清白蛋白明显低于 C1 亚型患者 ($P = 0.015$)。

5. 不同基因型患者的肝脏病理情况: 见表 4。对 166 例 ALT > 80 IU/L 且 HBV-DNA > 10⁵ log₁₀ cps/ml 的 HBeAg(+) 慢乙肝患者的肝组织活检进行 Knodell HAI 评分, 其中 B 基因型 30 例, C 基因型 136 例。就门脉周围有无桥接坏死、小叶内变性和灶性坏死、门脉炎症、纤维化程度及组织学活动性指数(HAI)进行评分。B 基因型患者在门脉周围桥接坏死、小叶内变性和灶性坏死、纤维化程度及 HAI 的评分均明显低于 C 型, $P < 0.05$; 门脉炎症也较轻, 但未达到差异有统计学意义。

表3 基因型(亚型)与病情间的关系

参数	B (n=184)	C (n=693)	P 值 (B vs. C)	C1 (n=49)	C2 (n=415)	P 值 (C1 vs. C2)
平均年龄(岁)	29.05 ± 9.08	33.31 ± 10.75	< 0.000	32.00 ± 10.49	33.13 ± 11.51	> 0.999
HBeAg(+)	180(97.8)	665(96)	0.275	46(93.9)	396(94)	> 0.999
ALT、ULN(M)	3.04(0.4~22.3)	3.22(0.5~31.9)	0.961	3.10(0.7~9.6)	3.27(0.5~31.9)	0.651
TBIL(μmol/L, M)	13.90(0.3~98.1)	13.4(0.4~33.4)	0.633	13.90(6.1~160.5)	13.35(4.5~334)	0.775
ALB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	44.62 ± 4.24	43.53 ± 4.83	0.07	45.08 ± 5.55	43.00 ± 4.86	0.015
AKP(IU/L, M)	73(32~620)	75(4~311)	0.62	97.6(34~154)	82.5(4~311)	0.168
HBV-DNA(log ₁₀ cps/ml, $\bar{x} \pm s$)	7.40 ± 1.16	7.27 ± 1.25	0.203	7.64 ± 1.06	7.64 ± 1.20	0.988

表4 基因型与 Knodell HAI 评分

诊断	基因型		t 值	P 值	Z 值	P 值
	B	C				
汇管区坏死 ^a	1.40 ± 1.43/1.00	2.08 ± 1.71/1.00	-2.289	0.026	-2.303	0.021
小叶炎症 ^a	1.58 ± 0.97/1.00	1.99 ± 1.02/1.50	-2.042	0.047	-2.059	0.040
汇管区炎症 ^a	2.25 ± 1.07/2.50	2.50 ± 1.18/3.00	-1.086	0.279	-1.411	0.158
纤维化 ^a	1.35 ± 1.21/1.00	1.84 ± 1.27/1.25	-1.935	0.055	-2.031	0.042
HAI ^b	6.55 ± 3.63	8.41 ± 4.25	-2.224	0.027	-	-

^a $\bar{x} \pm s/M$; ^b $\bar{x} \pm s$

讨 论

研究发现,884 例慢性 HBV 感染者中,78.4% 感染了 C 基因型;B 和 C 基因型的分布有明显的南北方地理差异:南方地区主要为 B 型、北方则以 C 型为主。以往的研究也提示同样的地理分布^[8]。本研究发现,B 型和 C 型患者在血清 ALT、总胆红素、白蛋白、碱性磷酸酶和 HBV-DNA 水平上均无明显差别。

本研究中针对 166 例慢乙肝患者的肝穿病理活检提示:B 型患者门脉坏死、小叶炎症、纤维化和 HAI 评分均明显按低于 C 型患者;而且研究中 87% 的乙肝后肝硬化患者感染 C 基因型。均证实:感染 C 基因型后,患者病情常较重、预后不良。

本研究中感染 B 基因型的患者年龄明显小于 C 基因型者;感染 B 基因型的患者比例随年龄的增长而下降,而 C 基因型则呈相反趋势;提示:感染 B 基因型的患者自然缓解率可能高于 C 基因型患者,从另一个角度支持感染 C 基因型的患者病情发展较重、预后不良。原因可能是:B 和 C 基因型乙肝病毒感染人体后作用于免疫细胞的不同位点,活化的免疫反应产生差异,最终导致免疫清除能力的差异,表现为病情轻重不同。

通过检测 585 例患者的基因亚型发现,所有 115 例 B 基因型均为 Ba 亚型,未发现 Bj 亚型。90.32% 的北方地区(北京、河北、吉林)患者均为 C2 亚型,广州仅有 28.57% 的患者感染 C2 亚型,江苏和上海患者仍以 C2 亚型为主。已有的研究也提示,C2 亚型多见于北方地区,而 C1 则多见于南方地区。这种地理分布与 B、C 基因型的分布有某些相似,但尚不清楚不同的亚型是否影响肝脏病变特点或导致对抗病毒药物的不同疗效。本研究发现,C1 和 C2 亚型患者的年龄分布相似,生化学和血清中病毒载量间差异也无统计学意义。C2 和 C1 亚型患者的血清白蛋白虽有明显的统计学差异,但均在正常范围之内且数值上差别不多,对临床的指导意义不大。因肝脏穿刺标本中 C1 亚型例数太少,未作进一步统计分析。

本研究中主要为慢乙肝患者,仅有少量乙肝后肝硬化和无症状携带者。未能充分证实基因(亚)型与不同病程、肝细胞肝癌等间的相关性。

本研究不但进一步证实了以往关于 HBV 基因型不同地理分布和与病情相关性的报告,而且提供

了 HBV 基因(亚)型的地理分布和生化学、血清中病毒载量间的相关性。对于不同基因(亚)型与病情轻重和治疗应答的相关性研究,是扩大样本量进一步研究的方向。关于 HBV 基因(亚)型的研究,有望为临床个体化治疗提供指导。

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(Pt 10): 2575-2583.
- [2] Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, 198: 489-503.
- [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(Pt 1): 67-74.
- [4] Alestig E, Hannoun C, Horal P, et al. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. *Arch Virol*, 2001, 146: 2321-2329.
- [5] Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, et al. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 4): 883-892.
- [6] Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, et al. Analysis of the complete genome of subtype A, hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 4): 835-839.
- [7] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol*, 2002, 76: 5985-5992.
- [8] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Virol Hepatitis*, 2005, 12: 609-617.
- [9] 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.
- [10] Anna SF, Lok MD. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*, 2002, 35: 1274-1276.
- [11] Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa 2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*, 2005, 365: 123-129.
- [12] Wai CT, Chu CJ, Hussain M, et al. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology*, 2002, 36: 1425-1430.
- [13] Tsubota A, Arase Y, Ren F, et al. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol*, 2001, 65: 257-265.
- [14] Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letters*, 1999, 450: 66-71.
- [15] Tanaka Y, Orito E, Yuen MF, et al. Two subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotype C: a novel subtyping assay Based on restriction fragment length polymorphism. *Hepatol Res*, 2005, 33: 216-224.

(收稿日期:2006-08-15)

(本文编辑:王多春)