

儿童乙型肝炎血清HBV cccDNA及病毒基因型研究

孙永红 雷晓燕 杨菊兰 袁宏

【摘要】 目的 了解甘肃省儿童血清乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)及病毒基因型情况。方法 随机选择HBV-DNA阳性124例乙肝患儿(男性84例,女性40例),其中HBV携带者65例、慢性乙肝59例(轻度31例、中度18例、重度10例),对以上患儿进行基因分型、肝功、HBV-DNA载量和血清HBV cccDNA检测。结果 中、重度慢性乙肝患儿HBV cccDNA阳性率高于携带者和轻度组($F=25.429, P<0.01$);HBeAg阳性患儿HBV cccDNA检出率高于HBeAg阴性患儿($F=28.386, P<0.01$);HBV cccDNA阳性组的谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素均高于阴性组(t 值分别为13.241、11.347、15.013,均 $P<0.01$);124例肝炎患儿中,以C、B基因型为主,C基因型为优势,B/C混合型占一定比例,还有一些其他基因型;C基因型患儿中HBV cccDNA阳性的比例高于B基因型患儿($F=23.216, P<0.01$);而B基因型患儿中HBV cccDNA阴性的比例高于C基因型患儿($F=26.364, P<0.01$)。结论 病情越重外周血HBV cccDNA检出率越高,HBV cccDNA和基因型的检测可以较好地反映HBV复制程度和临床严重程度,对诊治乙肝具有一定的指导意义。

【关键词】 乙型肝炎;共价闭合环状脱氧核糖核酸

Research on serum HBV cccDNA and genotype of virus in children with chronic hepatitis B
SUN Yong-hong¹, LEI Xiao-yan¹, YANG Ju-lan¹, YUAN Hong². 1 Department of Pediatrics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China; 2 Department of Infectious Disease, First Hospital of Lanzhou University

Corresponding author: LEI Xiao-yan, Email: leixiaoyan601@163.com

This work was supported by a grant from the Natural Foundation of Gansu Province (No. 099RJYA001).

【Abstract】 Objective To study the serum HBV cccDNA and genotype of hepatitis B virus in children in Gansu province. **Methods** 124 HBV-DNA positive children were randomly selected, with 84 males and 40 females. Among the 124 patients, 65 were HBV carriers, 59 were chronic hepatitis (31 mild, 18 moderate and 10 severe). Genotypes of their serum HBV, liver function, HBV-DNA load and serum HBV cccDNA were detected. **Results** In the moderate and severe groups, HBV cccDNA positive rate was higher than that in the HBV carriers or the mild group ($F=25.429, P<0.01$). The HBV cccDNA detection rate in HBeAg positive group was higher than that in the HBeAg negative group ($F=28.386, P<0.01$). In the HBV cccDNA positive group, glutamic-pyruvic transaminase, glutamic-oxaloacetic transaminase, total bilirubin were higher than that in the negative group (t respectively 13.241, 11.347, 15.013, $P<0.01$). Both C and B genotypes appeared to be the majority while C genotype was dominant in the 124 cases of children hepatitis, with the rest as B/C and some other genotypes. The positive rate of HBV cccDNA C genotype was higher than that of the genotype B ($F=23.216, P<0.01$) and the negative rate of HBV cccDNA genotype was higher than that of the C genotype ($F=26.364, P<0.01$). **Conclusion** Higher detection rate was found in those more severe cases in the peripheral blood streams. HBV cccDNA and genotype testing might better reflect the level of HBV replication and the clinical severity of the disease, showing its guiding role in clinical diagnosis and treatment of hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B; Covalent closed circular DNA

共价闭合环状DNA(cccDNA)是乙型肝炎(乙

肝)病毒(HBV)原始复制模板、HBV持续感染及肝炎复发的关键因素、HBV复制的突出标志、评价HBV感染状态和药物疗效的最重要指标^[1]。本研究对124例儿童乙肝患者血清HBV cccDNA及病毒基因型进行检测。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.12.015

基金项目:甘肃省自然科学基金(099RJYA001)

作者单位:730000 兰州,甘肃省人民医院儿科(孙永红、雷晓燕、杨菊兰);兰州大学第一医院传染科(袁宏)

通信作者:雷晓燕, Email: leixiaoyan601@163.com

对象与方法

1. 病例选择: 2008 年 4 月至 2010 年 4 月, 按门诊和住院就诊的先后顺序从甘肃省人民医院儿科和兰州大学第一医院感染科门诊和住院患儿中选择 124 例 HBV-DNA 阳性的乙肝患儿。诊断标准参照文献 [2], 其中男性 84 例、女性 40 例, 年龄 1 ~ 16 岁, 平均 (11.2 ± 4.9) 岁, 其中 HBV 携带者 65 例、慢性乙肝 59 例 (轻度 31 例、中度 18 例、重度 10 例)。所有患者排除其他肝炎病毒感染、自身免疫性肝病、药物性肝损害及酒精性肝损害等, 均未进行抗病毒治疗, 采集外周血清保存于 -70 °C 冰箱备用。

2. 临床分型: ①轻度: 病情较轻、症状不明显或虽有症状或相关体征但生化指标仅 1 ~ 2 项轻度异常者。②中度: 症状、体征、实验室检查介于轻、重度之间。③重度: 有明显或持续的肝炎症状, 如乏力、纳差、腹胀等。可伴有肝病面容、肝掌、蜘蛛痣或脾肿大 (排除其他原因且无门脉高压症状)。实验室检查血清谷丙转氨酶 (ALT) 反复或持续升高, 白蛋白降低或 A/G 比例异常, 丙种球蛋白明显升高, 白蛋白 ≤ 32 g/L、总胆红素 (TBIL) > 85.5 μmol/L、凝血酶原活动度在 40% ~ 60% 之间 (3 项检测中有 1 项达上述数值者即可诊断为重度慢性肝炎)。

3. 实验方法: ①HBV-DNA 检测: 采用实时荧光定量 PCR 方法进行检查, 试剂购自深圳匹基公司, 按试剂说明书进行操作。②三系统定量检测: 采用时间分辨法, 仪器为上海新波半自动时间分辨仪, 试剂购自上海新波公司, 按试剂说明书进行操作。③HBV-DNA 基因分型: 留取晨空腹静脉血 5 ml, 3000 r/min 离心 10 min, 取 1 ~ 2 ml 血清保存于 -70 °C 冰箱备用, 采用 HBV 基因分型诊断试剂盒检查分型 (PCR 荧光法), 试剂盒购自上海克隆生物技术有限公司, 按试剂盒说明书进行操作。④生化指标: 在美国贝克曼公司 CX4 全自动生化仪上进行。⑤HBV cccDNA 检测: 采用 PCR 荧光分子信标技术检测, 于清晨用一次性注射器采血, 分离血清 200 μl 保存于 -18 °C 备检, PCR 扩增: 先取 DNA 聚合酶 1.2 μl 加入反应液管内 (DNA 聚合酶及反应液管用前需短暂离心数秒), 然后取处理后的样本上清液、阴性对照上清液及标准品 I、II、III 各 5 μl 分别加入反应液管内, 混匀后短暂离心数秒, 然后上机扩增。同时设空白对照一管 (空白对照用去离子水 5 μl 代替样本), 混匀后, 10 000 r/min 离心 10 s。PCR 程序: 预变性 94 °C 3 min; 94 °C 35 s, 55 °C

35 s, 72 °C 40 s, 38 个循环; 72 °C 延伸 3 min。待各 PCR 反应液管充分冷却至 28 °C 后短暂离心, 然后放入荧光检测仪, 读取并记录荧光值, 荧光激发波长为 487 nm, 检测波长为 518 nm。荧光值确定: Ax 值 = 标本或各对照荧光值/空白对照荧光值。Ax 值 > 21 判为阳性, Ax 值 ≤ 21 判为阴性。

4. 统计学方法: 用 SPSS 12.0 软件进行数据分析, 组间比较采用方差分析, 率的比较采用 χ² 检验, 两独立样本比较采用 t 检验。

结 果

1. HBV cccDNA 检出率: 中、重度慢性乙肝患儿 HBV cccDNA 阳性率高于携带者和轻度组, 各组之间差异有统计学意义 (P < 0.01), 见表 1。

表 1 124 例乙肝患儿血清中 HBV cccDNA、HBV DNA 检出情况

临床诊断	病例数 ^a	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	HBV ^b	
			cccDNA	DNA
携带者	65(42/23)	7.2 ± 3.7	21(32.3)	65(100.0)
乙肝患者				
轻度	31(19/12)	10.3 ± 4.8	17(54.8)	31(100.0)
中度	18(13/5)	9.6 ± 5.2	14(77.8)	18(100.0)
重度	10(6/4)	11.2 ± 4.5	10(100.0)	10(100.0)
F 值			25.43	0
P 值			<0.01	>0.05

注: ^a分子为男性例数, 分母为女性例数; ^b括号外数据为阳性例数, 括号内数据为阳性率 (%)

2. 血清 HBV cccDNA 与 HBeAg 的关系: HBeAg 阳性者 HBV cccDNA 检出率为 68.3% (41/60), HBeAg 阴性者 HBV cccDNA 检出率为 32.8% (21/64), 两者差异有统计学意义 (P < 0.01)。

3. 血清 HBV cccDNA 与肝功的关系: HBV cccDNA 阳性组的 ALT、谷草转氨酶 (AST)、TBIL 均高于阴性组, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 见表 2。

表 2 HBV cccDNA 阳性组和阴性组 ALT、AST、TBIL 水平 ($\bar{x} \pm s$) 比较

HBV cccDNA	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μmol/L)
阳性组	93.2 ± 17.4	89.2 ± 21.5	67.1 ± 25.6
阴性组	51.5 ± 18.1	48.4 ± 24.3	28.7 ± 23.8
t 值	13.241	11.347	15.013
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

4. HBV-DNA 基因型分布: 124 例乙肝患儿中, C 基因型 62 例 (50.0%), B 基因型 48 例 (38.7%), B/C 混合型 9 例 (7.3%), 非 B/C 型 5 例 (4.0%), 以 C、B 基因型为主, C 基因型为优势。

5. 血清 HBV cccDNA 与病毒基因型的关系: B 基因型组中 HBV cccDNA 阳性 13 例 (27.1%)、阴性 35 例

(72.9%); C 基因型组中 HBV cccDNA 阳性 41 例(66.1%)、阴性 21 例(33.9%)。C、B 基因型 HBV cccDNA 阴性比例差异有统计学意义($P < 0.01$), C 基因型中 HBV cccDNA 阳性比例高于 B 基因型; 而 B 基因型中 HBV cccDNA 阴性的比例高于 C 基因型(表 3)。

表 3 乙肝 C、B 基因型与 HBV cccDNA 的关系

基因型	病例数	HBV cccDNA	
		阳性	阴性
B	48	13(27.1)	35(72.9)
C	62	41(66.1)	21(33.9)
F 值		23.22	26.36
P 值		<0.01	<0.01

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为百分比(%)

讨 论

HBV cccDNA 存在于肝细胞核内, 是病毒成功感染肝细胞的标志, 也是慢性乙肝持久存在的关键^[3]。HBV cccDNA 的产生有两个途径, 既可由肝细胞内已有的病毒在复制周期中产生, 也可由新感染的病毒颗粒产生^[4]。

本研究结果显示, 124 例患儿 HBV-DNA 均为阳性, 随着病情加重, HBV cccDNA 检出率增加, 提示 HBV cccDNA 反映临床严重程度。已有研究大部分利用 FQ-PCR 技术检测肝组织内 cccDNA 含量, 但肝穿活检有创伤性, 患儿家属不易接受, 因而临床上难以推广。有研究表明外周血可检测到 cccDNA, 其大多来自肝组织, 推测肝细胞核内的 cccDNA 分子在肝细胞变性、坏死时可以释放到血液中, 炎症坏死越严重, 血液中的 cccDNA 应该越高, 这与肝内 cccDNA 有非常好的相关性, 在一定程度上反映肝内 cccDNA 水平^[5]。

HBeAg 阳性患儿 HBV cccDNA 检出率显著高于 HBeAg 阴性患儿。HBV cccDNA 检出率与外周血 HBeAg 有显著的相关性, 但部分 HBeAg 阴性者也可检测出 HBV cccDNA, 提示 HBeAg 阴性者体内 HBV 也有一定程度的复制, 所以临床上不能简单认为“大三阳”有传染性, “小三阳”没有传染性。HBeAg 被看作 HBV 复制的血清指标, 但 HBV cccDNA 是反映 HBV 在患者体内大量复制更敏感血清指标^[6]。

研究发现, HBV cccDNA 阳性组的转氨酶和 TBIL 指标高于阴性组, 提示乙肝患儿病情轻重和 HBV 复制的强弱有一定关系。当肝脏组织处于炎症活动阶段时, 存在于肝细胞胞质和线粒体中的转氨酶等酶类在肝细胞被破坏时释放到血液中, 那么存在于肝细胞核内的 HBV cccDNA 分子在肝细胞变性、坏死时应该也可以释放到血液中。而且病情越

严重, 变性坏死的细胞越多, 对于同一位患儿而言, 在某一时间段内, 其血液中的 HBV cccDNA 水平应该也相应地越高^[7]。因此, HBV cccDNA 水平对判断病情有意义。

HBV 基因型一个最显著的特征是 HBV 基因型呈一定的地理区域性分布, HBV 基因型的差异是病毒基因变异的结果, 本研究对甘肃省 124 例乙肝儿童进行基因分型, 结果显示: C 型、B 型、B/C 型、非 B/C 型分别占 50.0%、38.7%、7.3%、4.0%, 以 C 型、B 型为主, 其中以 C 型为优势基因型, 与孙永红等^[8]报道关于甘肃省成年人乙肝基因型分布一致, 其中 B/C 混合型占有一定比例, 儿童 HBV 基因型的检测对指导治疗、评估预后及早期预防具有非常重要的意义。

研究发现, C 基因型 HBV cccDNA 检出率高于 B 基因型, 雷晓燕等^[9]研究发现 HBV 携带者和轻度组中, 以 B 基因型为主, 而在中度和重度组中, 以 C 基因型为主, 随着病情的加重 C 基因型所占病例增高, 此研究发现 C 基因型 HBV cccDNA 检出率高于 B 基因型, 提示 HBV 基因型和 HBV cccDNA 与疾病的活动性、病情的轻重及病毒复制水平有一定关系。


参 考 文 献

- [1] Zhuang LW, Lu HY, Yu YY, et al. HBV cccDNA quantitative method for detection and application. Chin J Experimental Clin Virol, 2007, 21(2): 182. (in Chinese)
庄立伟, 陆海英, 于岩岩, 等. HBV cccDNA 荧光定量检测方法的建立及应用. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(2): 182.
- [2] Chinese Medical Infectious and Parasitic, Virology Branch. Viral hepatitis prevention and treatment programs. Chin J Hepatol, 2000, 8(1): 324-329. (in Chinese)
中华医学会传染病与寄生虫学分会, 病毒学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志, 2000, 8(1): 324-329.
- [3] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64: 51-68.
- [4] Lee CM, Ong GY, Lu SN, et al. Durability of lamivudine-induced HBeAg seroconversion for chronic hepatitis B patients with acute exacerbation. J Hepatol, 2002, 37(5): 669-674.
- [5] Yuen MF, Wong DK, Sum SS, et al. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently elosed-eireular (cce) DNA of chronic hepatitis B infection. Am J Gastroenterol, 2005, 100: 1099.
- [6] Wu FT, Lv QJ. Serum of patients with liver disease clinical significance of HBV cccDNA. Liver, 2007, 12(4): 246. (in Chinese)
吴凤婷, 吕其军. 肝病患者血清中 HBV cccDNA 检测的临床意义. 肝脏, 2007, 12(4): 246.
- [7] Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. World J Gastroenterol, 2004, 10(1): 82-85.
- [8] Sun YH, Chen QF, Xiao P, et al. Relationship between genotypes of hepatitis B virus and clinical and pathological grading and staging. Clin Focus, 2008, 23(8): 566-568. (in Chinese)
孙永红, 陈青锋, 肖萍, 等. 乙型肝炎病毒基因型与临床病理分级分期的关系. 临床荟萃, 2008, 23(8): 566-568.
- [9] Lei XY, Sun YH, Yang JL, et al. Relationship between genotype of hepatitis B virus and clinical classification in children with chronic hepatitis B. Chin J Pediatrics, 2011, 15(4): 102-105. (in Chinese)
雷晓燕, 孙永红, 杨菊兰, 等. 儿童乙型肝炎病毒基因型与临床分度的关系研究. 中国实用儿科杂志, 2011, 15(4): 102-105.

(收稿日期: 2011-05-03)

(本文编辑: 王玉立)

儿童乙型肝炎血清HBV cccDNA及病毒基因型研究

作者: [孙永红](#), [雷晓燕](#), [杨菊兰](#), [袁宏](#), [SUN Yong-hong](#), [LEI Xiao-yan](#), [YANG Ju-lan](#), [YUAN Hong](#)
作者单位: [孙永红,雷晓燕,杨菊兰,SUN Yong-hong,LEI Xiao-yan,YANG Ju-lan\(甘肃省人民医院儿科,兰州,730000\)](#), [袁宏,YUAN Hong\(兰州大学第一医院传染科\)](#)
刊名: [中华流行病学杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Epidemiology](#)
年, 卷(期): 2011, 32(12)
被引用次数: 2次

参考文献(9条)

1. 庄立伟;陆海英;于岩岩 [HBV cccDNA荧光定量检测方法的建立及应用](#)[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#) 2007(02)
2. [中华医学会传染病与寄生虫病学分会;中华医学会病毒学分会](#) [病毒性肝炎防治方案](#)[期刊论文]-[中华肝脏病杂志](#) 2000(01)
3. Seeger C;Mason WS [Hepatitis B virus biology](#)[外文期刊] 2000(1)
4. Lee CM;Ong GY;Lu SN [Durability of lamivudine-induced HBeAg seroconversion for chronic hepatitis B patients with acute exacerbation](#)[外文期刊] 2002(05)
5. Yuen MF;Wong DK;Sum SS [Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular\(ccc\)DNA of chronic hepatitis B infection](#) 2005
6. 吴凤婷;吕其军 [肝病患者血清中 HBV cccDNA检测的临床意义](#)[期刊论文]-[肝脏](#) 2007(04)
7. Chen Y;Sze J;He ML [HBV cccDNA in patients sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage](#)[期刊论文]-[World Journal of Gastroenterology](#) 2004(01)
8. 孙水红;陈青锋;肖萍 [乙型肝炎病毒基因型与临床病理分级分期的关系](#)[期刊论文]-[临床荟萃](#) 2008(08)
9. 雷晓燕;孙水红;杨菊兰 [儿童乙型肝炎病毒基因型与临床分度的关系研究](#)[期刊论文]-[中国实用儿科杂志](#) 2011(04)

引证文献(2条)

1. [雷晓燕](#), [王三萍](#), [孙永红](#), [袁宏](#) [儿童慢性乙肝肝组织病理与相关标志物的研究](#)[期刊论文]-[中国循证儿科杂志](#) 2012(5)
2. [雷晓燕](#), [孙永红](#), [杨菊兰](#), [袁宏](#), [姜惠玲](#) [儿童乙型肝炎血清乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA与临床和病理分级分期的关系](#)[期刊论文]-[中国小儿急救医学](#) 2013(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhlx201112015.aspx