

· 临床论著 ·

上海地区慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型特点分析

王金蕾 刘刚 金嘉琳 孟成艳 张文宏

【摘要】 目的 探讨上海市乙型肝炎病毒(HBV)基因型分布及与 HBV 感染患者的临床意义。方法 选择 2005 年 2 月至 2006 年 2 月上海华山医院门诊及住院患者中 HBV DNA 阳性(荧光定量 PCR 法)的 HBV 感染者 45 例,采用 S 基因序列分析法检测 HBV 基因型,并分析相应的前-C/C 基因序列特点。根据患者的 HBV 标志物和 HBV DNA 水平判断不同基因型与疾病的相关性。结果 45 例 HBV 感染者中基因型 B 共 15 例,C 型 30 例,无 A、D、E、F、G、H 基因型。15 例 HBV/B 均为 Ba 亚型,其中 2 例的前-C/C 基因与 HBV/C 在 nt 1975 ~ nt 2293 之间发生重组。HBV/C 的 HBeAg 阳性率显著高于 HBV/B(分别为 83.3%,33.3%; $P < 0.05$),抗-HBe 阳性率则显著低(分别为 53.3%,73.3%; $P = 0.02$)。2 种基因型的 HBV DNA 水平无显著差异。结论 本次抽样检查结果中 HBV 基因型为 B 型和 C 型,以 C 型为主,未发现 A、D、E、F、G、H 型。HBV/C 型与 B 型相比有较高的 HBeAg 阳性率和较低的抗-HBe 阳性率。

【关键词】 肝炎病毒;基因型

Study on HBV genotypes and their clinical significance in chronic hepatitis B patients in Shanghai WANG Jin-lei*, LIU Gang, JIN Jia-lin, MENG Cheng-yan, ZHANG Wen-hong. *Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: ZHANG Wen-hong, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the status of hepatitis B virus (HBV) genotyping and its clinical significance to patients with chronic hepatitis B (CHB) in Shanghai. **Methods** Forty-five CHB patients have been enrolled in this study from out-patient and in-patient clinics, Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, from Feb., 2005 to Feb., 2006. HBV DNA was detected by real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction (PCR). HBV genotyping was conducted by HBV S gene sequencing, and characteristics of pre-C/C regions were analyzed. The relationships between HBV genotypes and HBV markers and HBV

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970672)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院感染病科(王金蕾、金嘉琳、孟成艳、张文宏);复旦大学附属第五人民医院感染病科(王金蕾、刘刚)

通讯作者:张文宏 Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

DNA levels were also analyzed. **Results** Forty-five CHB patients were identified as genotype B for 15, and genotype C for other 30, none was genotype of A, D-H. All 15 patients with genotype B are subgenotype Ba. Among them, 2 has recombination with genotype C in pre-C/C region (nt 1975-nt 2293). Positive rate of HBeAg is significantly higher in genotype C than that in genotype B (83.3% vs 33.3%; $P < 0.05$), and anti-HBe positive rate also has significant difference (53.3% vs 73.3%; $P = 0.02$). HBV DNA levels remain no difference between the two genotypes. **Conclusions** In this study only B and C genotypes were found in CHB patients in Shanghai, and genotype C is the majority. None was genotype of A, and D-H. Comparing with genotype B, genotype C patients have significant higher positive rate of HBeAg and lower positive rate of anti-HBe.

【Key words】 Hepatitis virus; Genotype

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球关注的严重影响健康的严重问题。HBV DNA的基因克隆化是1979年首次完成的,随后根据HBV感染者针对不同的HBsAg抗原表位产生的抗体不同,将HBV分成不同的血清型(serotype),1988年Okamoto等^[1]根据HBV DNA核酸序列差异大小提出基因型(genotype)概念,至今全球范围内已发现A~H等8个HBV基因型。同时发现各基因型的分布存在显著的地域差异,并可能与疾病的进展、转归及抗HBV治疗效果相关。虽然已有人将我国不同地区的基因型做了比较分析,但一般采用基因型特异性引物PCR法、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法进行研究,故难以反映基因重组状况,且上海地区所占病例数少,未能反映本地区HBV基因组的特性全貌。本研究采用基因序列分析法对上海市华山医院45例HBV感染患者进行基因分型,并将相应的前-C/C基因测序分析,以探讨HBV基因型分布特点及与HBV相关肝病可能存在的相关性。

资料与方法

一、研究对象

选择2005年2月至2006年2月上海市华山医院门诊及病房HBV DNA阳性(荧光定量PCR法)的慢性乙型肝炎患者45例。其中男31例,女14例,年龄21~61岁(平均44岁),全部患者的诊断符合2000年西安会议《病毒性肝炎防治方案》制定的标准。

二、仪器与方法

1. 常规肝炎标志物(包括HBsAg、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)检测:用酶联免疫吸附法(ELISA),HBV DNA水平用核酸扩增的荧光定量聚合酶链反应(PCR)法,由华山医院检验科检测。

2. HBV DNA提取:采用深圳匹基生物股份有限公司乙型肝炎病毒核酸扩增荧光定量PCR检测试剂盒中核酸提取液及方法。100 μ l血清获得30 μ l的PCR

模板。

3. 引物: S 基因引物: HBV11: 5'-GGG TCA CAA TAT TCT TGG GAA CAA GAK CTA C-3'; HBMF1: 5'-YCC TGC TGG TGG CTC CAG TTC-3'; HBV22: 5'-CAA TWC KYT GAC ANA CTT TCC AAT CAR TWG G-3' (nt 55 ~ nt 1008); 前-C/C 基因引物: HC-1: 5'-TCT TTG TAC TAG GAG GCT GTA GGC-3'; HC-2: 5'-CAG GTA CAG TAG AAG AAT AAA GCC C-3'; HC-3: 5'-TAA CTG TAA GAG GGC CCA CAT-3' (nt 1735 ~ nt 2480)。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

4. 巢式 PCR 扩增: S 基因第 1 轮 PCR: 反应体系 25 μl , 其中 PCR 模板 0.5 μl , 10 \times Ex-taq 缓冲液 (Mg^{2+} plus) 2.5 μl , dNTP 混合物 2.5 μl , Ex-taq 酶 0.5 μl , 外引物 HBV11、HBV22 各 1 μl , 无菌双蒸水 (ddH_2O) 17 μl 。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 延伸, 扩增 25 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 5 min。第 2 轮 PCR: 反应体系 50 μl , 其中第一轮 PCR 产物 0.5 μl , 10 \times Ex-taq 缓冲液 (Mg^{2+} plus) 5 μl , dNTP 混合物 4 μl , Ex-taq 酶 0.5 μl , 内引物 HBMF1、HBV22 各 1 μl , ddH_2O 38 μl 。扩增循环增至 30 个, 余反应条件与第 1 轮相同。前-C/C 基因 2 轮 PCR 反应体系同 S 基因, 外引物为 HC-1、HC-3; 内引物为 HC-1、HC-2。反应条件: 第 1 轮 PCR 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 延伸, 扩增 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 10 min。第 2 轮 PCR 将扩增循环增至 30 个, 余不变。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。10 \times Ex-taq 缓冲液 (Mg^{2+} plus)、dNTP 混合物及 Ex-taq 酶购自 TaKaRa 公司, PCR 仪为 Eppendorf 公司 Mastercycler personal PCR 仪, PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司测序。

5. HBV 基因型和种系分析: 采用从美国国立卫生研究院国家生物工程中心 (NCBI) 核苷酸序列数据库 (GenBank) 中下载的已知基因型别的 HBV 全基因序列作为参照序列。采用序列分析法根据 S 基因序列同源性 $\geq 96\%$ 的标准^[2] 测定 HBV 基因型, 并将相应的前-C/C 基因与参照序列一起用 DNASTar 软件 MegAlign Clustal V method 进行比较分析, 绘制遗传树。

三、统计学处理

采用 t 检验及卡方检验。

结 果

一、HBV 基因型分布及种系分析

对本研究的 45 例 HBV 感染者进行基因分型, 其中 B 型 (均为 Ba 亚型) 15 例 (33%), C 型 30 例 (67%), 未发现其他基因型如 A、D ~ H 型, C 型为该地区的优势基因型。所有序列测定结果为 HBV/C 标本的前-C/C 基因与 HBV/C 参照序列比较均有高同源性 (95.1% ~ 99.5%)。但在通过 S 基因序列分析测定为 HBV/B、在遗传树分析中属于 B 型分支的 15 个标本中, 发现 2 个标本的前-C/C 基因与 HBV/C 参照序列有较高的同源性 (分别为 93.3%, 97%; 表 1), 在遗传树分析中属于 C 基因型分支 (图 1)。

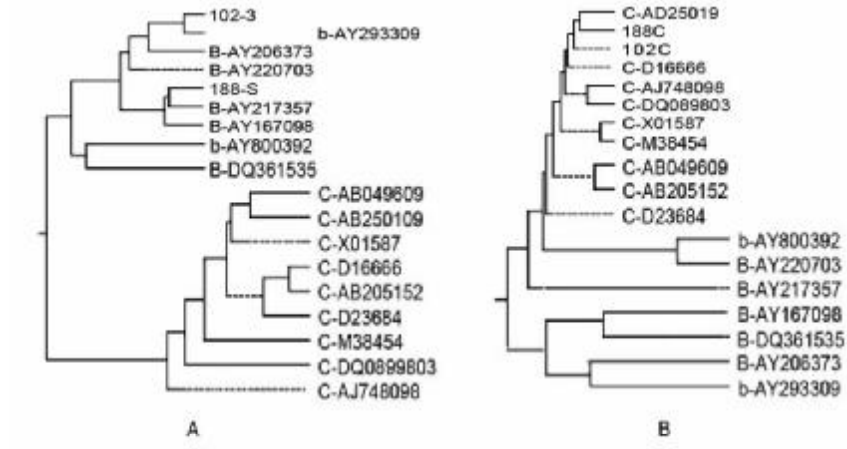


图1 HBV B/C重组与HBV/B、C参照序列的基因树分析布
 分析中共18个标本:7个B型、9个C型来自GenBank,2个B/C重组来自本研究。HBV B/C的S基因属于B型分支,但其前-C/C基因被分至C型分支。

该结果提示这2个标本在前-C/C区发生了B/C基因型间重组。通过与HBV/B、C参照序列的比较发现重组部位位于nt 1975~nt 2293之间(图2)。

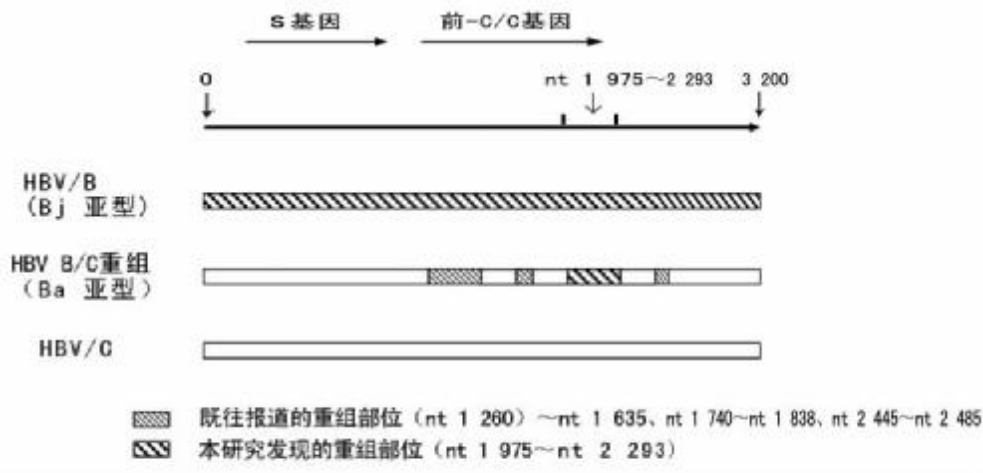


图2 HBV/B与HBV/C前-C/C基因的重组位点

二、HBV基因型与病毒复制相关性

45例HBV感染者中B型的HBeAg阳性率为33.3%(5/15),C型为83.3%(25/30)。两者存在显著差异($P = 0.0007$);B型患者的抗-HBe阳性率显著低于C型患者(分别为73.3%,53.3%; $P = 0.02$),两者亦存在统计学差异。但在HBV DNA水平2种基因型差异则无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

表1 上海市 HBV S 基因和前-C/C 基因与参考序列的同源性比较(%)

HBV 基因型(数量)	S 基因同源性		前-C/C 基因同源性	
	基因型 B(AY800392*)	基因型 C(D23684*)	基因型 B(AY80039*)	基因型 C(D23684*)
B/C(n=2)	97.3~98.1	92.3~93.3	88.5~93.4	93.2~98.1
B(n=13)	95.5~98.1	89.6~93.3	88.1~99.0	86.2~97.2
C(n=35)	89.9~93.3	96.0~99.0	90.8~94.2	95.1~99.5

注:HBV/B、C 参照序列的 GenBank 登录号

表2 HBV 基因型与病毒复制相关性^[2]

基因型	HBeAg(+)	抗-HBe(+)	HBV DNA log ₁₀ (拷贝/ml)
B	5(10.05)	11(9)	6.81±1.12
C	25(20.10)	16(18)	6.33±1.40
P 值	0.0007	0.02	>0.050

讨 论

HBV 基因分型常用的方法包括基因型特异性引物 PCR 法、限制性片段长度多态性(RFLP)分析法、线性探针反向杂交法(INNO-LiPA)、PCR 微量板核酸杂交酶联免疫法和基因序列测定法等,其中基因序列测定最为可靠。但由于全基因序列测定繁琐,费用昂贵,而 S 基因在不同基因型间异质性最大,同一基因型内异质性最小,故通常采用 S 基因序列分析代替全基因序列分析^[2]。

HBV 在基因型基础上可进一步分为不同的基因亚型。如 HBV/B 可根据前-C/C 基因与 HBV/C 有无重组序列分为 Ba 和 Bj 两种亚型^[3]。其中 Ba 亚型是 HBV/B 与 HBV/C 的嵌合体,其基因结构主体是 HBV/B,但 B 细胞识别位点(BCP)、前-C/C 基因与 HBV/C 相符合^[4]。因为 2 种基因型的同源性较高,精确的重组位点无法确定。既往研究多次报道了不同的重组部位,如 nt 1260 ~ nt 1639、nt 1740 ~ nt 1838 及 nt 2445 ~ nt 2485 等。本研究中 2 个 HBV B/C 的重组部位均在 nt 1975 ~ nt 2293 之间,与以往报道不同,进一步证明了 HBV/B 与 HBV/C 重组位点的多样性。

HBV 基因型的分布具有一定的地域差异^[5]。有许多证据表明在我国长江以北地区以 HBV/C 为主,B 型在南部省份更占优势,D 型则主要集中于西北部地区。相邻区域的基因型可能存在不同,并与人种起源、历史性人口迁移有关^[6]。有研究指出上海地区的乙型肝炎患者 HBV 基因型主要为 B 型和 C 型,B 型为优势基因型,偶见 B、C 混合型^[9]。但是本次研究显示 HBV/B、C 为上海市主要存在的基因型,并且以 C 型为主,结果与既往报道存在明显差异。差异存在的原因有待深入研究。

HBV 感染的发病机制尚不清楚,目前认为 HBV 诱导的一系列宿主免疫病理反应是引起肝细胞损害的主要原因,而 HBV 的大量复制是加快疾病进展的危险因素之一。不同基因型与 HBV 致病性的相关与否尚无定论,大多数关于基因型 B、C 的研究认为,HBV/C 与 HBV/B 相比,往往有更高的 HBeAg 阳性率和 HBeAg

转换率。在本研究中,HBV/C 患者的 HBeAg 阳性率明显高于 HBV/B 患者,其抗-HBe 阳性率则较低,在 HBV DNA 水平方面 2 种基因型无明显差异,与既往研究相符。

随着分子生物学理论和技术的迅猛发展,从分子水平研究疾病已成为医学发展的必然趋势。但由于 HBV 基因型确定的时间不长,对于其与 HBV 相关性肝病的关系缺乏足够的前瞻性长期随访。故仍应进一步积累充分的循证医学依据说明是否需要检测 HBV 基因型以指导临床治疗。

参 考 文 献

- 1 Okamoto H, Tsuda F, Sadugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence; comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*,1988,69:2575-2583.
- 2 Norder H, Courouce AM, Magius 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 温志立,谭德明,杨铁一,等. 巢式 PCR-RFLP 法对湖南省乙型肝炎病毒 Bj 和 Ba 基因亚型的初步鉴定. *世界华人消化杂志*, 2005, 13:1770-1773.
- 4 Sugauchi F, Orito E, Kato H, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the pre-core region plus the core gene. *J Virol*,2002,76:5985-5992.
- 5 万学发,郑松柏,肖宏,等. 外周血 T 细胞亚群及有关细胞因子水平与前 C 区变异相关性研究. *肝脏*, 2003, 8:62-63.
- 6 Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat*,2005,12: 609-617.
- 7 王新宇,尹有宽,谢怡,等. 上海地区 145 例慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型与 α -2b 干扰素疗效关系的初步探讨. *中国抗感染化疗杂志*, 2005, 5:160-164.

(收稿日期:2006-12-14)

(本文编辑:闫杰)