论著

文章编号:1000-5404(2011)12-1258-04

HBV基因型在HBV感染性肝癌及慢性HBV感染自然史不同阶段的分布

黄亚琴,杨丽莎,吴淋玲 (541001 广西 桂林,桂林医学院附属医院消化内科)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)基因型在HBV相关性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)及慢性HBV感染自然史不同阶段的分布。**方法** 选择广西桂北地区46例HBV感染相关性HCC患者,慢性HBV感染自然史不同阶段者共90例,通过实时荧光定量PCR鉴定HBV基因型。临床实验室检查结果和病理资料摘抄自患者病案。**结果** 本地区慢性HBV感染者中基因型B占77.8%,基因型C占18.9%,非B非C占3.3%;HCC中基因型B占78.3%,基因型C占21.7%,慢性HBV感染者和HCC之间的基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$)。慢性HBV感染不同阶段者之间的基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$)。慢性HBV感染者中基因型B、C比较,临床资料差异无统计学意义($P>0.05$),HCC中基因型B、C间HBV-DNA比较差异有统计学意义($P<0.01$)。慢性HBV感染不同阶段组和HCC组比较,ALT、AST、TBIL、ALB、年龄,性别差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 广西桂北地区的慢性HBV感染者和HBV相关性HCC以基因型B为主,基因型在HBV感染自然史不同阶段和HCC对比分布无差别。基因型C的HBV-DNA水平更高。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;基因型;癌,肝细胞;广西

【中图法分类号】 R195.4;R512.62;R735.7 **【文献标志码】** A

Distribution of HBV genotypes in HBV infection-associated hepatocellular carcinoma and in different phases of natural chronic HBV infection history

Huang Yaqin, Yang Lisha, Wu Linling (Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

【Abstract】 Objective To study the distribution of HBV genotypes in HBV infection-associated hepatocellular carcinoma (HCC) and in different phases of natural chronic HBV infection history. Methods HBV genotypes in 46 patients with HBV infection-associated HCC and 90 patients with a natural chronic HBV infection history at different phases in the Northern Guangxi Zhuang Autonomous Region were identified by real-time fluorescence quantitative PCR. Laboratory findings and pathological data were obtained from medical records of the patients. Results Genotypes B, C, and non-A and B accounted for 77.8%, 18.9%, and 3.3%, respectively, in patients with chronic HBV infection. Genotypes B and C accounted for 78.3% and 21.7% in HCC patients. No significant difference was observed in distribution of HBV genotypes among the patients with HBV infection, HCC, and chronic HBV infection at different phases ($P>0.05$). A significant difference was found in HBV-DNA between genotypes B and C ($P<0.01$). The ALT, AST, TBIL, ALB, and age levels were significantly higher in HCC patients than in those with chronic HBV infection at different phases ($P<0.05$). Conclusion Genotype B is dominant in patients with chronic HBV infection and HBV infection-associated HCC in the Northern Guangxi Zhuang Autonomous Region with no difference in distribution of HBV genotypes in patients with HCC and a natural chronic HBV infection history at different phases. The HBV-DNA level is higher in genotype C than in other HBV genotypes.

【Key words】 hepatitis B virus; genotype; hepatocellular carcinoma; Guangxi Zhuang Autonomous Region

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30760294) and the Foundation for Sci & Tech Research Project of Public Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region (200978). Corresponding author: Yang Lisha, Tel: 86-773-2807914, E-mail: yangsha@glmc.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30760294);广西壮族自治区卫生厅重点科研课题(200978)

【通信作者】 杨丽莎,电话:(0773)2807914,E-mail:yangsha@glmc.edu.cn

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)重要的病因,据统计原发性肝癌中约 1/3 的人有慢性 HBV 感染史,流行病学调查发现肝癌患者 HBsAg 阳性率可达 90%,提示 HBV 与肝癌高发有关[1]。我国广西地区不但是乙型肝炎高发地,也是肝癌高发区,广西常住成年居民的 HBsAg 阳性率明显高于全国其他地区[2]。尽管目前 HBV 感染导致 HCC 的机制尚未明确,但是国内外针对 HBV 基因型与乙型肝炎和 HCC 的研究表明,HBV 基因型与乙型肝炎和 HCC 发生、发展、疗效和结局有明显的关系[3-6]。本研究针对广西桂北地区 HBV 感染相关性肝癌及 HBV 感染自然史不同阶段进行基因型分型,通过比较基因型分布及临床资料,初步探讨基因型与慢性 HBV 感染后疾病自然进程的关系,旨在为临床疾病预测及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 资料

研究病例均来源于 2008 年 10 月至 2010 年 9 月桂林医学院附属医院消化内科和桂林市第三人民医院感染科的门诊及住院患者共 136 例,均为 HBV 感染者,来自于广西桂林。HBV 感染相关性肝细胞癌患者 46 例,其中男性 44 例,女性 2 例,年龄(50.30 ± 10.48)岁;所有病例均经肝组织活检病理证实;慢性 HBV 感染自然史不同阶段患者共 90 例,其中男性 76 例,女性 14 例,年龄(33.12 ± 11.19)岁,诊断和分类符合 2005 年《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准[3],排除其他肝炎患者和患有心脑血管病、糖尿病等其他重大疾病者。HBV-DNA 阳性标准为 $\geq 1 \times 10^3$ cp/ml。

1.2 材料与检测方法

1.2.1 材料 乙型肝炎病毒标志物(乙肝两对半)应用时间分辨免疫荧光法,试剂购于苏州新博生物技术有限公司,上海新波生物技术有限公司 ANYTEST 2000 时间分辨仪;肝功能包括血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)应用全自动化分析仪检测。HBV-DNA 和基因型均使用 MJ Opticon Monitor 荧光 PCR 检测仪,HBV-DNA 试剂试剂购于上海科华生物有限公司;基因型试剂购于广州华银基因科技有限公司。

1.2.2 方法

1.2.2.1 基因型检测 按广州华银基因科技有限公司基因型(B、C、D)试剂盒说明书操作每人份按 23 μl B、C、D 反应液分别加入 1 U *Taq* 酶和 2 μl 模板来配制反应体系。荧光 PCR 反应体系反应条件 94 ℃ 1 min;94 ℃ 5 s;60 ℃ 30 s,40 个循环。荧光素设定为 FAM。样本在哪一型反应液中有扩增即为该型。

1.2.2.2 慢性 HBV 感染自然史不同阶段分期 免疫耐受期:血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性、HBV 复制活跃(HBV-DNA > 10^5)、血清 ALT 正常、肝组织学无或轻微炎症、无肝纤维化或进展缓慢。围产期和婴幼儿时期感染者的免疫耐受期会持续多年,病情无明显进展,自发的 HBsAg 清除率低。免疫清除期:HBeAg 阳性、HBV-DNA 水平降低(仍有 HBV-DNA > 10^5 cp/ml)、ALT 水平反复波动、肝组织学有炎症坏死、纤维化进展程度较快。大部分 HBV 感染者都会由免疫耐受期进展为免疫清除期,这一时期自发的 HBsAg 清除率增加。非活动期:HBeAg 消失、出现抗-HBe、HBV-DNA 水平很低或检测不到、ALT 正常、肝脏炎症减轻。此期患者发展为肝硬化的风险较低。恢复期:非活动期 HBV 感染者中,HBsAg 清除者临床预后一般较 HBsAg 持续阳性者好,肝脏炎症和纤维化不断改善[7-8]。由于第 4 期的患者在临床上很少碰到,此次试验只涉及前 3 期。

1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件对研究数据进行统计分析。计量资料通过正态检验后,正态资料选择 $\bar{x} \pm s$ 描述,偏态资料选择中位数(P25 ~ P75)描述;正态资料选择独立样本 t 检验,偏态资料选择秩和检验;两样本率的比较用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;多组采用行 × 列表资料的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HBV 基因型在慢性 HBV 感染者和 HCC 患者中的分布

慢性 HBV 感染者和 HCC 患者基因型分布见表 1。2 组之间的基因型分布比较差异无统计学意义($P = 0.436$),未检测出基因型 D。

表 1 HBV 基因型在慢性 HBV 感染者和 HCC 患者中的分布 [例(%)]

组别	n	基因型		
		B	C	非 B 非 C
慢性 HBV 感染组	90	70(77.8)	17(18.9)	3(3.3)
HCC 组	46	36(78.3)	10(21.7)	0

2.2 慢性 HBV 感染自然史不同阶段者的基因型 B、C 的分布比较

HBV 感染自然史不同阶段组的基因型分布差异无显著性($P = 0.743$),自然史不同阶段和基因型无明显关联。见表 2。

表 2 慢性 HBV 感染组中自然史不同阶段患者的基因型 B、C 的分布 [例(%)]

不同阶段	n	基因型 B	基因型 C
免疫耐受期	24	20(83.3)	4(16.7)
免疫清除期	34	28(82.4)	6(17.6)
非活动期	29	22(75.9)	7(24.1)

2.3 慢性 HBV 感染者和 HCC 患者的基因型 B、C 临床资料比较

慢性 HBV 感染组中基因型 B、C 临床资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$);在 HCC 组中基因型 B、C 比较,HBV-DNA 之间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其他指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表3 慢性HBV感染者和HCC患者不同基因型的临床资料比较

临床资料	慢性HBV感染组(n=87)			HCC组(n=46)		
	基因型B(n=70)	基因型C(n=17)	P	基因型B(n=36)	基因型C(n=10)	P
ALT(U/L)	293.32±371.49	124.17±144.60	0.277	59.40±50.39	87.85±63.52	0.060
AST(U/L)	188.12±296.84	68.20±44.05	0.282	98.00±114.86	126.54±138.83	0.980
TBIL(μmol/L)	50.68±72.89	21.98±12.41	0.692	38.00±57.39	34.73±29.40	0.870
ALB(g/L)	35.86±7.14	36.24±7.32	0.845	34.62±5.77	34.90±5.92	0.890
HBV-DNA≥10^5 cp/ml[例(%)]	50(71.40)	13(76.50)	0.909	15(41.67)	10(100.00)	0.004
HBeAg(+/-)	50/20	10/7	0.314	6/30	4/6	0.250
年龄(岁)	32.80±10.90	35.59±13.01	0.476	50.30±11.52	50.30±5.76	0.998
性别(男/女)	58/12	15/2	0.862	34/2	10/0	1.000

表4 慢性HBV感染自然史不同阶段组和HCC组临床资料比较

临床资料	慢性HBV感染自然史不同阶段组(n=87)			HCC组(n=46)	P^a
	免疫耐受期(n=24)	免疫清除期(n=34)	非活动期(n=29)		
ALT(U/L)	26.97±10.47	404.49±383.55	368.54±329.20	65.59±54.05	0.000
AST/(U/L)	24.72±12.72	243.93±310.88	175.87±279.62	104.21±119.40	0.000
TBIL(μmol/L)	14.03±4.65	51.73±64.66	74.55±95.63	37.29±52.31	0.046
ALB(g/L)	40.55±8.55	35.62±4.41	32.48±6.52	34.68±5.73	0.007
年龄	25.58±3.44	31.69±9.43	41.56±12.33	50.30±10.48	0.000
性别(男/女)	19/5	28/6	26/3	44/2	0.144

a:各亚组与HCC组比较

2.4 慢性HBV感染自然史不同阶段组和HCC组临床资料比较

慢性HBV感染不同阶段组和HCC组相比,ALT、AST、TBIL、ALB、年龄差异均有统计学意义(P<0.05)。3个不同阶段组和HCC组分别比较,ALT水平、年龄差异均有统计学意义(P<0.05),免疫清除组ALT水平高于HCC组,其他2组低于HCC组,HCC组年龄均高于其他3组;血清AST水平免疫清除组高于HCC组,免疫耐受组低于HCC;血清TBIL水平HCC高于免疫耐受组;血清ALB水平HCC组低于免疫耐受组。见表4。

3 讨论

根据HBV全基因核苷酸序列的异质性≥8%或S区基因序列差异≥4%,HBV可分为A-H 8种基因型,近来也有基因型I[9]和基因型J[10]的报道。HBV基因型呈一定的地理区域性分布,目前发现我国主要流行A、B、C、D四型,在大陆地区主要为基因型B和C,南方主要为B型,北方主要为C型。本研究发现,广西桂北HBV相关性肝癌以基因型B为主,HBV感染主要以基因型B为主,这跟国内学者报道一致[2,11],也符合南方以基因型B为主的分布特点。陈岳明等[12]对上海地区HBV感染者慢性乙型肝炎和HCC基因型分析比较发现在慢性乙型肝炎感染组中B型占绝对优势,在HCC组中C型占绝对优势。谭文婷等[4]研究发现,随着疾病从慢性乙型肝炎到肝硬化、原发性肝细胞癌的进展,基因型C在HBV感染中所占比例显著上升,HBV基因型是HBV感染者罹患肝癌的独立风险因素。本研究比较慢性HBV感染组和HCC组之间的基因型分布并无统计学意义,这跟国内学者牟一坤等[13]报道一致。进一步对慢性HBV感染组进行不同自然史阶段的基因型分布比较,发现基因型分布亦无统计学差异,HBV基因型和HBV的自然进程无明显的关联。此次试验未发现基因型D,由于试验条件有限,未再进一步将非B非C型的病例进一步分型,因此在本研究后面分析其他数据时未将其列入。

国内外一系列文献资料表明与基因型B相比,基因型C患者HBeAg阳性率和HBV-DNA、ALT水平均较高,基因型C患者HBeAg更易在年龄偏大时发生血清转换延迟,对干扰素的应答率也较低,因此C型患者易慢性化,更易发展为严重肝脏损害。本研究发现慢性HBV感染组基因型B、C临床资料比较无明显差别,HCC中HBV-DNA之间有差异,慢性HBV感染组临床指标比较无差异,跟国内学者报道一致[12]。HCC组中基因型C的HBV-DNA滴度较基因型B更高,庄林等[3]研究发现基因型C与HBV高复制有关并可能存在病毒变异。有研究认为HBV-DNA水平与HCC的发生有关,随着病毒载量的增多,其发生HCC的风险也相应增加,且C型的病毒载量比其他基因型有增

多之趋势，因此测定患者病毒载量及HBV基因型有助于判断慢性HBV感染患者患HCC的风险，但也有研究认为B、C基因型HBV-DNA水平差异无统计学意义[14]。血清中高滴度的HBV是乙肝发病的危险因素之一，HBV的复制状态与其基因型之间有无关系仍然存在争议。

2000年亚太会议提出慢性HBV感染的自然史以来，自然史的分期一直在不断更新，2010年慢性HBV抗病毒治疗专家达成共识：慢性HBV感染自然史分为4期。本研究选取前3个阶段HCC分别比较时，发现HCC组血清ALT、AST、TBIL水平均高于免疫耐受组，血清ALB水平低于免疫耐受组。血清高水平ALT、AST、TBIL、低ALB经常被用来评价肝脏损伤水平，免疫耐受组肝功能基本正常，HCC时肝脏炎症存在，提示慢性HBV感染相关性HCC肝脏炎症明显，因此，HCC患者应积极抗炎护肝治疗，延缓疾病进展。

随着对HBV基因型的研究进展，可以肯定的是基因型在慢性HBV感染致病中起到一定的作用，但是以人群为基础的纵向队列研究，有HBsAg阴性对照组的研究是最理想的研究方式。本研究为横断面的、以临床为基础的病例对照研究尚存在不足。除HBV基因型外，HBV感染后疾病进程及转归还与病毒的数量、传播方式，宿主的免疫状态、年龄、合并疾病等其他因素相关。

参考文献：

[1] 陆再英，钟南山. 内科学[M]. 第7版. 北京：人民卫生出版社，2008：368.
[2] 张春燕，黄天壬，张振权，等. 广西肝癌高发区防癌筛查对象HBV感染的现况调查研究[C]//第四届中国肿瘤学术大会暨第五届海峡两岸肿瘤学术会议论文集. 北京：中国抗癌协会，2006：185－186.
[3] 庄林，游晶，陈红英. 等. 云南地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性[J]. 世界华人消化志，2007，15(19)：2120－2127.
[4] 谭文婷，邓国宏，王宇明，等. 重庆地区乙肝病毒基因型分布及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2008，30(24)：2321－2323.
[5] 孙和才，李淑丽. 168例慢性HBV感染者HBV基因型分布调查分析[J]. 中国临床新医学，2009，2(1)：35－36.
[6] Toan N L, Song-le H, Kremsner P G, *et al*. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam[J]. Hepatology, 2006, 43(6)：1375－1384.
[7] 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志，2005，13(12)：881－891.
[8] McMahon B J. The natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl)：S45－S55.
[9] Tran T T, Trinh T N, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam[J]. J Virol, 2008, 82(11)：5657－5663.
[10] Arankalle V A, Gandhe S S, Borkakoty B J, *et al*. A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(7)：501－510.
[11] 陈茂伟，吴健林，李国坚，等. 乙型肝炎病毒基因型与广西肝癌关系的病例-对照研究[J]. 应用预防医学，2009，15(1)：1－4.
[12] 陈岳明，高春芳，戚鹏，等. 乙型肝炎病毒基因型与慢性乙型病毒性肝炎及原发性肝细胞癌病理特点之间的关系[J]. 第二军医大学学报，2009，30(3)：279－282.
[13] 牟一坤，顾琳，曾淑珍. 不同临床类型慢性乙肝患者乙肝病毒基因型检测[J]. 分子诊断与治疗杂志，2010，2(1)：46－49.
[14] 谢琴秀，许家璋，李平，等. 江苏地区乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义[J]. 疾病控制杂志，2005，9(2)：171－173.

(收稿 2010-12-08 修回 2011-01-17)
(编辑 王 红)

我刊获教育部2010年度中国科技论文在线优秀期刊一等奖

近日，接教育部科技发展中心下发《关于公布2010年度“中国科技论文在线优秀期刊”评选结果的通知》(教技发中心函[2011]45号)，我刊荣获一等奖。

为了促进科技期刊健康发展，提高科技期刊的质量，推动科技期刊的数字化建设，提高期刊刊载论文的引用率，扩大期刊的影响力，促进论文免费共享，建设良好的科研环境，使科技期刊更好地为科研和科研工作者服务，根据教技发中心函[2010]190号文件《关于组织2010年度“中国科技论文在线优秀期刊”评选活动的通知》和同时公布的《2010年度“中国科技论文在线优秀期刊”评选指标体系》，教育部科技发展中心对截至2010年12月31日已收录在“中国科技论文在线”科技期刊栏目的教育部主管的期刊，就期刊的影响因子和他引率、网站收录论文数和下载量、期刊入网的完整性及期刊编委的国际化程度、开放存取等统计分析，经过严格的评审，评选出一等奖43项，二等奖92项。