HBV基因分型与病毒载量及血清标志物关系的探讨

曹军皓,赵冰红,叶 彬,黄前川 (广州军区武汉总医院检验科,湖北 武汉 430070)

[摘 要] **目的** 探讨HBV基因型与HBV-DNA水平及血清标志物的相关性。**方法** 选择125例乙肝患者血清HBV-DNA复制阳性的标本分别检测HBV病毒基因分型、HBV-DNA、乙肝血清标志物、谷丙转氨酶(ALT)和总胆红素(TBL)。**结果** 125例HBV-DNA复制阳性标本中HBV基因分型以B型为主占71.2%(89/125),C型占24.0%(30/125),BC混合型占2.4%(3/125),非B非C型占2.4%(3/125);B基因型患者血清ALT(297.3±193.6)U/L和TBL(105.1±59.7)mol/L水平高于C基因型患者ALT(158.1±107.5)U/L和TBL(53.1±22.7)mol/L,$P<0.01$;B基因型患者血清抗-HBe阳性率91.0%(81/89)显著高于C基因型的23.3%(7/30),$P<0.01$;B型HBV-DNA水平(5.87±1.72) log10copies/mL与C型(6.01±1.91) log10copies/mL无差异($P>0.05$)。**结论** 本地区HBV病毒基因型以B型为主,C型次之,B基因型对肝脏损害较C基因型重,并与HBV载量及HBeAg系统具有相关性,B基因型易发生YMDD突变。

[关键词] 基因分型;HBV-DNA;HBeAg/HBeAb;血清标志物

[中图分类号] R512.6;R446.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)04-0295-03

Correlation among hepatitis B virus genotype, hepatitis B virus loads and serologic markers

CAO Jun-hao, ZHAO Bing-hong, YE Bin, HUANG Qian-chuan (Department of Laboratory Medicine, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan Hubei 430070, China)

Abstract: Objective To study the relationships among HBV genotype, level of serum HBV-DNA and HBV markers in patients with hepatitis B. **Methods** Serum samples were collected from 125 HBV-DNA positive patients and HBV genotyping, HBV-DNA, ALT, TBL and HBV serum markers were tested respectively. **Results** Of the 125 patients, 71.2% (89/125) were genotype B, 24.0% (30/125) were genotype C, 2.4% (3/125) were mixed genotype (B+C), and 2.4% (3/125) were unknown genotype. The level of ALT and TBL were significantly higher in genotype B than those in genotype C ($P<0.01$). The positive rate of anti-HBe was significantly higher in genotype B than that in genotype C ($P<0.01$). There was no significant difference of HBV-DNA level between genotype B and C. **Conclusion** The predominant HBV genotype in the local area is genotype B. Compared with genotype C, genotype B infection can seriously impair liver and is liable to induce YMDD mutant, which is closely related with the virus loading and the expression of HBeAb/HBeAg.

Keywords: genotype; HBV-DNA; HBeAg/ HBeAb; YMDD

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染在世界各地均有不同程度的流行,但地区差异非常明显[1],其主要与病毒本身生物学特性有关,目前已证实HBV至少存在A~H 8种基因型[2],HBV基因分型和疾病发生、治疗和预后有一定的关联[3],因此基因分型将有助于治疗药物的筛选和评价[4]。本文通过对125例武汉地区乙型肝炎患者的病毒基因分型、病毒载量、肝功能及血清标志物的检测,探讨武汉地区乙型肝炎病毒基因型的生物学特性和临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

标本采集于2009年11月至2010年3月我院住院及门诊确诊为乙型肝炎患者的空腹血清,诊断标准均参照2000年全国病毒性肝炎学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》。患者中男性84例,女性41例,年龄15~78岁,平均(49±28)岁。采集的血清要求无脂血、无溶血现象,采集于一次性无抗凝剂带盖试管中,转速3 000 r/min,离心10 min,及时分离血清冻存于-40 ℃冰箱中待检测。

1.2 方法

1.2.1 HBV血清学分型 采用荧光PCR法,试剂盒由上海复星公司提供,按说明书处理标本及配制反应体系后分别加入B型、C型荧光探针,PCR扩增程序为:50 ℃,2 min→94 ℃,5 min→(93 ℃,15 s→60 ℃,45 s)循环40次,以Ct值判断乙型肝炎病毒的基因型(表1)。

表1 乙型肝炎病毒的基因型结果判断标准

B管	C管	结果判断
Ct≤36	Ct=40	B型
Ct=40	Ct≤36	C型
Ct≤36	Ct≤36	B/C混合型
Ct=40	Ct=40	非B非C型

[作者简介] 曹军皓(1959-),女,陕西省西安市人,副主任技师,学士,主要从事临床检验及病毒性肝炎的实验研究。

[收稿日期] 2010-04-15 [修回日期] 2010-05-20

1.2.2 HBV-M血清标志物的检测 采用ELISA法检测,试剂购自上海科华生物技术有限公司,按说明书操作。

1.2.3 ALT、TBL的检测 使用美国生产Beckman Coulter Unicel D×C8000全自动分析仪测定,试剂由上海复星长征医学科学有限公司提供。

1.2.4 HBV血清YMDD突变检测 采用荧光PCR法,试剂盒由上海复星公司提供,按说明书处理标本及配制反应体系后分别加入C、V、I荧光探针,各代表着YMDD野生株、YVDD突变、YIDD突变,PCR扩增程序为:50 ℃,2 min→94 ℃,5 min→(94 ℃,20 s→53 ℃,30 s)循环40次,以Ct值判断YMDD的突变类型(表2)。

表2 YMDD突变结果判断标准

Ct值	结果判断
Ct-c=40	HBV阴性
Ct-C<36且Ct-I=40且Ct-V=40	YMDD野生株
Ct-C<36且Ct-I<36且Ct-V=40	YIDD突变
Ct-C<36且Ct-I=40且Ct-V<36	YVDD突变
Ct-C<36且Ct-I<36且Ct-V<36	YIDD+YVDD共生突变

1.2.5 统计方法 组间比较采用方差分析或t检验,$P<0.05$具有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV基因分型结果

125例标本中HBV基因分型以B型为主,占71.2%(89/125),C型占24.0%(30/125),BC混合型占2.4%(3/125),非B非C型占2.4%(3/125),因BC混合型和非B非C型各仅3例,只将B型和C型病例进行比较研究。

2.2 HBV基因型临床资料比较

B基因型血清ALT、TBL水平,HBeAg和HBeAb阳性率与C基因型存在显著差异($P<0.01$),HBV-DNA水平差异不显著($P>0.05$),见表3。

2.3 B基因型HBV-DNA水平与HBeAg系统、TBL、ALT的相关性

66例高复制组(5.0~8.0 log10copies/mL)与23例低复制组(3.0~5.0 log10copies/mL)HBeAg系统、TBL、ALT存在显著差异($P<0.01$),见表4。

表3 HBV基因型临床资料

基因型	例数(n)	HBV-DNA(log10copies/mL)	TBL(mol/L)	ALT(U/L)	HBeAg阳性率(%)	HBeAb阳性率(%)
B型	89	5.87±1.72	105.1±59.1	297.3±193.6	9.0	91.0
C型	30	6.01±1.91*	53.1±22.7#	158.1±107.5#	76.7#	23.3#

*:与B型比较,$P>0.05$;#:与B型比较,$P<0.01$

表4 B基因型HBV-DNA水平与HBeAg系统、TBL、ALT的相关性

HBV-DNA	例数(n)	HBeAg阳性率(%)	HBeAb阳性率(%)	TBL(n)		ALT(n)	
				3.42~82.08 mol/L	82.08~64.16 mol/L	<160.0 U/L	>160.0 U/L
低复制组	23	15	8	20	3	18	5
高复制组	66	5*	61*	15*	51*	17*	49*

*:与低复制组比较,$P<0.01$

2.4 B基因型HBV-DNA水平与YMDD突变

66例B基因型高复制组中YMDD突变率为90.5%,23例低复制组中YMDD突变率为13.0%,差异有统计学意义($P<0.01$),见表5。

表5 B基因型HBV-DNA水平与YMDD突变

HBV-DNA	例数(n)	YMDD突变(n)		
		YVDD	YIDD	YVDD+YMDD
低复制组	23	2	1	0
高复制组	66	33*	6*	21*

*:与低复制组比较,$P<0.01$

3 讨论

乙型肝炎病毒感染后的临床表现十分复杂,不同的个体,不同的病期可能出现不同的临床表现,目前认为这与病毒本身的基因序列存在差异有一定的联系。依据HBV全基因核苷酸序列异源性大于等于8%或者S基因区核苷酸序列异源性大于等于4%的HBV基因型分型标准,至少存在8个乙型肝炎病毒的基因型,即A~H型。乙型肝炎病毒的基因型呈现一定的地理区域性分布,在中国大陆地区,主要为B和C基因型,其中南方以B基因型为主,北方以C基因型为主[5]。

本研究结果显示本地区基因型存在B、C和BC混合基因型，其中B基因型为优势基因型，占71.2%(89/125)，C型占24.0%，BC混合型占2.4%(3/125)，由于本实验所采用的试剂盒仅能检测基因B和C型，故有3例尚未分型。本组资料中B、C基因型感染患者HBV-DNA水平无明显差异，这与张华等的研究相同[6]，而与郭晓凤等的实验结果不一致[7]。此外，数据显示B基因型ALT和TBL水平显著高于C基因型，提示B基因型对肝脏的损害性可能强于C基因型。HBV基因分型与HBV-DNA复制水平和病情有无相关性，目前尚存争议。Sumi等认为正在医院治疗的HBV感染者与体检偶然发现的HBV感染者的HBV基因型分布是不同的，这也许是造成不同实验室、不同地区上述检测结果出现差异的原因。这一观点提示HBV基因型在我国确切的地域性分布尚须大样本、多中心临床研究进一步明确[8-9]。既往研究表明，B基因型感染后导致HBeAb阳性率高于C基因型，这与作者的检测结果相一致，但HBeAb阳性与疾病活动性的关系上存在着争议[9-10]。因此，本文对该问题进行了探讨，将B基因型样本分为了低复制组和高复制组，比较两组标本HBeAg、HBeAb的阳性率，及TBL和ALT的水平。结果显示高复制组中TBL和ALT的水平及HBeAb的阳性率显著高于低复制组，而HBeAg的阳性率则显著低于低复制组。推测低复制组HBeAb阳性可能属于正常的血清转换，而高复制组则可能是YMDD突变所致。进一步对高复制组和低复制组同时检测YMDD突变显示，高复组YMDD突变率达到90.9%，而低复制组突变率仅13.0%。这一结果提示B基因型乙肝患者肝功能显著异常，并且血清标志物HBeAb阳性(小三阳)时YMDD突变的可能性大。可见，单凭肝功能、乙肝血清标志物及病毒载量的检测还不能准确判断乙肝患者的病情，结合乙肝病毒基因分型的检测将有助于患者的诊断、治疗和预后判断[11-12]。

[参考文献]

[1] 蒋 音，簧上雅史，蔡 枫，等. 乙型肝炎病毒基因分型与临床意义[J]. 中华传染病杂志，2006，24(6)：417-419.

[2] Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact[J]. J Clin Virol, 2005, 32(2): 102-112.

[3] 杨秀珍. 100例乙型肝炎病毒基因分型的探讨[J]. 中国卫生检验杂志，2008，18(12)：2658-2660.

[4] 任星峰，李敬安，杨 群，等. 慢性乙型肝炎肝组织B7-1、Fas的表达[J]. 华南国防医学杂志，2006，20(4)：1-2.

[5] 周 霞，王宇明. 乙型肝炎病毒基因分型研究进展[J]. 重庆医学，2008，37(1)：91-93.

[6] 张 华，温志立，叶 倩，等. 江西乙型肝炎病毒基因型分布及其与临床的相关性[J]. 实用肝脏病杂志，2009，12(3)：184-186.

[7] 郭晓凤，卢德荣，梁伟峰，等. 乙型肝炎病毒基因型与血清病毒载量的关系[J]. 现代实用医学，2009，21(7)：773.

[8] Sumi H, Yokosuka O, Seki N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 19-26.

[9] Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan[J]. Hepatology, 2001, 34(3): 590-594.

[10] 孔祥平，吴庆洲，尤玉琴，等. shRNA表达质粒对转基因小鼠HBV的抑制作用[J]. 华南国防医学杂志，2009，23(2)：33-37.

[11] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 2000, 118(3): 554-559.

[12] 艾军华，郑树国，曾永毅，等. 血管内皮生长因子受体-1对肝癌侵袭转移的影响[J]. 中华消化外科杂志，2008，7(2)：123-125.

(编辑：蒋登金)

(上接第294页)

处于空腹状态)，推注完毕即出现胸闷、气紧、心悸、面色苍白、大汗、全身颤抖，立即予10%葡萄糖50 mL口服后症状稍微减轻，继续予10%葡萄糖500 mL静脉滴注，30 min后上述症状消失。

2 讨论

地塞米松有较强的抗炎作用，可抑制纤维结缔组织增生，稳定细胞膜，降低血管通透性，减少炎症介质释放，减少渗出过敏介质，加强细胞对各种刺激的耐受性，对抗各种原因如物理、化学和免疫所引起的炎症反应。地塞米松本身过敏出现较少[2-3]。当患者在空腹状态下静脉推注地塞米松时，可出现胸闷、气紧、心悸、面色苍白、大汗、全身颤抖等症状。患者既往无药物过敏史，给予糖水后症状消失，首先应该考虑的就是空腹状态所致过敏反应[4]。其具体机理目前不清楚，但在临床工作中，不管是输液还是静脉推药或肌注之前尽量不要让患者处于空腹状态，且在注射过程中要密切观察患者反应，发现问题及时处理。

[参考文献]

[1] 池淑宁，易秀梅. 地塞米松在早产孕妇产前治疗的疗效分析[J]. 局解手术学杂志，2004，13(5)：311-312.

[2] 孔 琼，余英莉，刘细云，等. 护士应重视地塞米松过敏反应[J]. 中华护理杂志，2000，35(11)：691.

[3] 戴自英. 实用内科学[M]. 第9版. 北京：人民卫生出版社，1993. 2383.

[4] 吴虎平. 地塞米松早期不良反应180例分析[J]. 陕西医学杂志，2010，39(2)：256-257.

(编辑：周小林)