

• 临床探讨 •

内蒙古地区不同民族人群乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义^{*}刘 丽¹, 马 佳², 付建伟¹, 王振飞^{3△}

(1. 内蒙古自治区乌海市人民医院检验科 016000; 2. 内蒙古自治区呼伦贝尔市人民医院检验科 021000; 3. 内蒙古自治区肿瘤医院科研科, 呼和浩特 010020)

摘要:目的 研究内蒙古地区蒙古族及汉族人群中乙型肝炎病毒(HBV)基因型情况及其与疾病预后的关系。方法 选取内蒙古地区 HBV 感染者的血清标本 307 例, 其中蒙古族 161 例、汉族 146 例, 分为无症状 HBV 感染(ASC)组、慢性乙型肝炎(CHB)组和 HBV 所致乙型肝炎肝硬化(LC)组。利用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)熔解曲线法进行 HBV 基因分型。结果 161 例蒙古族标本中, B 型 30 例(占 24.8%), C 型 117 例(占 65.5%), B/C 混合型 14 例(占 8.1%); 146 例汉族标本中, B 型 34 例(占 23.3%), C 型 95 例(占 65.1%), B/C 混合型 17 例(占 11.6%)。在 ASC 组中, B 型所占比例最高; 在 LC 组的感染者中, C 型所占比例最高。结论 内蒙古地区蒙古族及汉族 HBV 基因型均为 B 型、C 型和 B/C 混合型, 均以 C 型占多数; B 型感染者预后较好, C 型感染者预后较差。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因分型; 蒙古族; 汉族

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.034 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)08-1138-02

越来越多的证据表明, 乙型肝炎病毒(HBV)基因型与乙型肝炎的发病、转归、抗病毒疗效均有密切关系^[1-2]。检测感染者血清中 HBV 的基因型, 对于指导临床医师根据不同的基因型制订不同治疗方案和预后判断有重要作用。本实验室前期已自行设计引物成功建立了熔解曲线法用于 HBV 基因分型。该方法具有简便实用的优点^[3]。本研究旨在利用此方法检测内蒙古地区 HBV 的基因型, 了解内蒙古地区蒙古族、汉族人群中的 HBV 易感流行株, 以及感染不同基因型与疾病预后的关系, 为内蒙古地区 HBV 预防控制提供病原学参考依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 12 月至 2015 年 7 月内蒙古地区 HBV 感染者 307 例, HBsAg 均为阳性, 其中蒙古族 161 例, 汉族 146 例, 年龄 20~60 岁。蒙古族标本选择三代以上均是蒙古族且没有与外族通婚的 HBV 感染者, 以肝功能损伤严重程度及病程长短分为无症状 HBV 感染(ASC)组、慢性乙型肝炎(CHB)组和 HBV 所致乙型肝炎肝硬化(LC)组。在同一地区选择相近例数、相同年龄段的 HBV 感染汉族人群, 以肝功能损伤轻重程度及病程长短分为 ASC 组、CHB 组和 LC 组。经知情同意后, 采集患者新鲜外周血 5 mL, 分离血清保存于一 80 ℃。诊断标准参照 2010 年修订的诊断标准^[4], 所有患者均排除其他病毒性肝炎及其他导致肝脏病变的疾病。

1.2 仪器与试剂 采用超微量核酸分析仪(Thermo-Fisher), 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem) 病毒 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 HBV 的 DNA 提取 将冻存于一 80 ℃的血清融化均匀, 采用天根生化科技有限公司生产的病毒 DNA 提取试剂盒抽提 HBV DNA, -20 ℃保存备用。

1.3.2 引物设计 根据文献报道的 B、C 型 HBV 特异性引物, 委托上海生物工程有限公司合成^[3]。

1.3.3 HBV 的基因分型 每批次试验分别用 1 000 倍稀释的 B(FMU009)、C(FMU011)型质粒 DNA 作为阳性对照, ddH₂O 作为阴性对照, 与待测标本一起上机试验。反应体系合计 20 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq(2×) 10 μL, BF(10 mmol/L) 0.33 μL, BR(10 mmol/L) 0.33 μL, CF(10 mmol/L) 0.40 μL, CR(10 mmol/L) 0.40 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7.54 μL。在荧光定量聚合酶链式反应(PCR)扩增仪上进行扩增, 扩增条件设置如下: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 58 ℃ 30 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 1 个循环。试验完成后经 StepOne Plus 软件对结果进行分析, 得到熔解曲线图, 图中波峰所对应的温度代表双链 DNA 分子(扩增产物)的 T_m 值(熔点温度)。T_m 值的大小取决于 DNA 分子的长度及其序列中 G/C 水平, 不同 DNA 分子序列对应的 T_m 值不同。本试验的 B、C 两型特异性引物扩增产物 DNA 分子序列不同, 对应的 T_m 值亦不同。根据各对照管的 T_m 值, 即可判断出各待测标本的基因型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。计数资料采用例数或率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。双侧检验以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 熔解曲线法检测 HBV 基因型图谱 B、C 及 B/C 混合型的典型图谱中, 峰值更高且在左侧的为 B 型(T_m 值 80.79±0.35), 峰值更低且在右侧的为 C 型(T_m 值 85.75±0.33); 在 1 例标本的熔解曲线图中, 2 个 T_m 值处均有峰值出现, 为 B/C 混合型, 说明通过扩增产物 T_m 值的差异, 可以清楚地对 HBV 基因型进行分型。

2.2 内蒙古地区 HBV 基因分型情况 161 例蒙古族标本中, B 型占 24.8%, C 型占 65.5%, B/C 混合型占 8.1%; 146 例汉族标本中, B 型占 23.3%, C 型占 65.1%, B/C 混合型占 11.6%。2 组中均以 C 型占大多数。在蒙古族、汉族人群之间, 对 HBV 各基因型所占比例进行比较, 差异无统计学意义。

^{*} 基金项目: 内蒙古自治区乌海市科技计划资助项目(2013150305000023); 内蒙古自然科学基金资助项目(2016MS0824); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划资助项目(NMGIRT-A1604); 内蒙古医科大学科技百万工程资助项目(YKD2015KJBW008)。

[△] 通信作者, E-mail: ndwzf2013@126.com。

($P>0.05$),表明内蒙古地区蒙古族和汉族人群对各基因型乙型肝炎病毒的感染谱一致。见表 1。

表 1 蒙古族与汉族 HBV 感染者的 HBV 基因型状况[n(%)]

族别	n	B 型	C 型	B/C 型
蒙古族	161	40(24.8)	107(66.5)	14(8.7)
汉族	146	34(23.3)	95(65.1)	17(11.6)
合计	307	74(24.1)	202(65.8)	31(10.1)

2.3 HBV 基因型与临床表型的关系 将 307 例感染者分为 ASC、CHB 和 LC3 组,分析 HBV 基因型在 3 组间的分布情况。ASC 组与 CHB 组比较,基因型分布差异无统计学意义($\chi^2=1.45, P>0.05$);ASC 组与 LC 组比较,基因型分布差异有统计学意义($\chi^2=11.42, P<0.01$);CHB 组与 LC 组比较,基因型分布差异有统计学意义($\chi^2=5.46, P<0.05$)。从 ASC 组到 LC 组,B 型比例递减,C 型比例递增,这说明 HBV 基因型可作为内蒙古地区 HBV 感染者预后判断的一个重要指标,B 型指示较好预后,C 型则指示很可能向 LC 发展。见表 2。

表 2 3 组肝脏疾病患者中 HBV 基因型分布的比较[n(%)]

组别	n	B 型	C 型	B/C 型
ASC 组	135	42(31.1)*#	79(58.5)*#	14(10.4)*#
CHB 组	100	24(24.0) Δ	65(65.0) Δ	11(11.0) Δ
LC 组	72	8(11.1)	58(80.6)	6(8.3)
合计	307	74(24.1)	202(65.8)	31(10.1)

注:与 CHB 组比较,* $P>0.05$;与 LC 组比较,# $P<0.05, \Delta P<0.05$ 。

3 讨 论

HBV 是导致 CHB、肝纤维化、肝细胞癌的一个主要病因。HBV 至少有 10 个基因型(A-J)^[5],我国主要有 A、B、C、D 等 4 个基因型,不同地区的 HBV 基因型状况存在较大的差异^[6-10]。本研究旨在探讨内蒙古地区基因型分布特点及其与临床的关系,结果显示:内蒙古地区 307 例标本中,B 型 74 例,占 24.1%;C 型 202 例,占 65.8%;B/C 混合型 31 例,占 10.1%。表明内蒙古地区 HBV 基因型以 C 型为主,与我国北方其他地区的感染情况类似^[6,8]。本试验中蒙古族和汉族患者基因型的比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示内蒙古地区蒙古族和汉族人群对同一基因型的 HBV 易感性无差别。

不同基因型 HBV 的临床感染特点、致病性、疾病预后等并不相同。本研究的结果显示,对于 ASC、CHB 和 LC3 组患者,其 HBV 基因型分布情况存在差异。B 基因型在 ASC 组中比例最高,C 基因型在 LC 组中比例最高,提示 B 基因型感染者临床症状较轻,而 C 基因型感染者更易发展成 LC。目前研究认为,HBV 基因型影响 HBeAg 血清学转换、肝病的进展及肝癌的发生。与 C 基因型感染者比较,B 基因型感染者 HBeAg 血清学转换率更高,肝脏病变活动较轻,疾病进展较慢^[11];与 B 基因型比较,C 基因型 HBV 的基因 C 区基本核心启动子(BCP)T1762/A1764 具有更高的双突变率,而(BCP)T1762/A1764 双突变则是促进肝病进展性的重要因素,这是 C 基因型指示较差预后的一个重要原因。此外,研究表明,B 基

因型 HBV 感染者对于干扰素(IFN)- α 治疗的应答率高于 C 基因型感染者^[12],因此对于 C 基因型感染者应给予重点针对性的治疗。

目前,我国 HBV 基因分型的研究虽然较多,但对内蒙古地区蒙古族、汉族人群 HBV 的感染状况和基因型分布状况还知之甚少。本研究结果丰富了我国 HBV 感染的分子流行病学资料,明确了内蒙古地区蒙古族、汉族人群中 HBV 基因型与疾病预后的关系,为针对性制订内蒙古地区乙型肝炎预防措施和指导临床治疗提供了有益参考。

参考文献

[1] 陈韧刚,胡汉国,魏三舟. 乙肝患者 HBV 基因型及 P 区耐药突变特点分析[J]. 临床医学研究与实践,2016,1(15): 137-139.

[2] 郑卫波,许文芳,李烨佳. HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布及其与抗病毒治疗疗效的关系[J]. 检验医学,2015,30(4):349-352.

[3] 商红艳,程祖建,欧启水. 建立 PCR 熔解曲线法检测 HBV 基因型[J]. 临床检验杂志,2011,29(3):225-227.

[4] 中华医学会肝病学会与感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 版)病毒性肝炎防治方案[J]. 实用肝病杂志,2011,14(2):81-89.

[5] Xiao Z, Min D, Hao Y, et al. A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidicchip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 54(54C):372-377.

[6] 张红梅,杨柳,桂俊豪,等. 新疆维族、汉族人群 HBV 基因型的分布与特点[J]. 现代预防医学,2013,40(7):1339-1342.

[7] 周莲莲,沈默,周平,等. 浙南地区 HBV 基因型分布特征及其与慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平和 HBeAg 表达的关系[J]. 临床肝胆病杂志,2014(10): 1039-1041.

[8] 张爽,沈立萍,缪宁,等. 辽宁省乙型肝炎监测病例 HBV 基因型分布及主蛋白抗原主要亲水区变异特点分析[J]. 中华流行病学杂志,2015,36(2):148-152.

[9] 涂东晋,赵亮,林授,等. 福州地区献血者人群隐匿性乙型肝炎病毒感染及其基因型与 S 区突变的研究[J]. 中国输血杂志,2015,28(5):523-527.

[10] 曹占良,高英堂,吉宗,等. 西藏拉萨地区乙型肝炎病毒基因型分布及与肝病的关系[J]. 世界华人消化杂志,2009, 17(1):49-52.

[11] Zeng AZ, Deng H, Yang C, et al. Hepatitis B virus genotypes-associated variability in antiviral response to adefovir dipivoxil therapy in Chinese han population[J]. Tohoku J Exp Med, 2008, 216(3):205-211.

[12] 江杰,黄新颜,王利红,等. HBV 感染者病毒基因型分布特点及其与干扰素疗效的关系[J]. 实用肝病杂志, 2014, 17(3):299-300.