

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.018

不同基因型 HBV 感染的慢性乙型肝炎患者
临床与病理改变研究胡金华¹, 程书权², 唐振祥², 冼永超², 黄成军², 蔡毅峰², 张磊¹

(1. 桂林医学院研究生学院, 桂林 541004; 2. 桂林市第三人民医院肝病科, 桂林 541002)

【摘要】目的:探讨不同基因类型的慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)患者在年龄、性别和民族方面的内在关联,比较不同 HBV 基因类型患者的肝组织病理损害程度、HBV-DNA 载量及肝功能改变。方法:荧光定量 PCR 仪检测 94 例行肝活检的 CHB 患者的 HBV-DNA,以限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法进行 HBV 基因分型。结果:本组 94 例 CHB 患者 B 基因型占 74.5%, C 基因型占 25.5%。HBV 基因类型与年龄、性别无关;C 基因型中壮族所占比例明显高于 B 基因型;C 基因型患者 HBeAg 阳性率明显低于 B 基因型患者($P < 0.05$)。CHB 患者肝组织病理损伤程度与 B、C 基因型相关,C 基因型在肝组织炎症及纤维化程度较重组所占的比例高于 B 基因型($P < 0.05$);肝组织病理损伤程度与肝功能指标相关($P < 0.05$),但与 HBV-DNA 水平无关。结论:本组 CHB 患者 HBV 基因类型呈 B、C 2 型,人群分布以 B 型为主,C 型次之,未见其他类型或混合型;汉族患者以 B 基因型为主,壮族则以 C 型为主;相对于 B 基因型,C 型患者肝组织炎症及纤维化程度较重,容易出现严重的肝损害和肝癌等不良预后。

【关键词】肝炎病毒;乙型;基因型;民族;病理学;临床**【中国图书分类法分类号】**R512.62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-09-20Research on clinical and pathological changes of chronic hepatitis B
patients infected with different hepatitis B virus genotypesHU Jinhua¹, CHENG Shuquan², TANG Zhenxiang², XIAN Yongchao²,HUANG Chengjun², CAI Yifeng², ZHANG Lei¹

(1. Graduate College, Guilin Medical University; 2. Department of Hepatitis, the Third People's Hospital of Guilin)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship of ages, genders and nationalities in chronic hepatitis B (CHB) patients infected with different hepatitis B virus, to compare the hepatic tissue damage degree, HBV-DNA load and the liver function change among patients with different genotype. **Methods:** Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) instrument was used to test HBV DNA and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was used to test genotypes. **Results:** Among 94 patients with CHB, B genotype was accounted for 74.5% and C genotype for 25.5%. CHB patients HBV genotype had nothing to do with age and sex. The proportion of Zhuang nationality in C genotype was obviously higher than that in B genotype. The HBeAg positive rate of patients with C genotype was obviously lowered than that of patients with B genotype ($P < 0.05$). The pathological damage degree of the hepatic tissue was correlated with B and C genotype. The proportion of C genotype in the hepatic tissue with serious inflammation and fibrosis was higher than that in B genotype ($P < 0.05$). The hepatic tissue damage degree was correlated with liver function indexes ($P < 0.05$), but not HBV DNA levels. **Conclusion:** The HBV genotypes of enrolled CHB patients is B genotype and C genotype B genotype is mainly distributed among the population, followed by C genotype, other types or mixed types are not found yet. The patients with Han nationality is mainly B genotype and those with Zhuang nationality is primarily C genotype. Patients with C genotype have serious hepatic inflammation and fibrosis and are prone to induce severe liver damage and adverse prognosis such as liver cancer.

【Key words】hepatitis virus; B type; genotype; nationality; pathology; clinical

作者介绍: 胡金华(1984-), 女, 硕士,

研究方向: 乙肝基因型研究。

通信作者: 程书权, 男, 教授, Email: csq126@sina.com。

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅资助项目(编号: Z2008241)。

目前, 根据乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)全基因组序列核酸差异度 $\geq 8\%$ 或S区基因序列差异度 $\geq 4\%$ 将HBV分为A~H 8种基因型^[1], 其中A、B、C、D、F、H 6种基因型还存在有不同的亚型, 国外一些地区还发现某些基因的重组体^[1]和I、J 2

种新的基因型^[2]。不同基因型的 HBV 不仅存在明显的人种和地域分布差异^[1,2],且在感染者的临床经过与转归、不同抗病毒药物的治疗应答、远期疗效与预后等方面亦有很大差异^[3,4],因而成为近年临床和基础研究者共同关注的热门课题。我国主要为 B、C 2 型,部分地区有少量的 D 型^[1]。迄今临床有关 HBV 基因型与 HBV 变异的研究较多,但与肝脏组织炎症和纤维化等病理表现的内在关联研究尚少。本文拟以收住我院的慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)患者为受试对象,着重就辖区内汉、壮 2 族常住人口 HBV 感染者的基因型与肝组织病理改变的关系加以探讨。

1 资料与方法

1.1 病例选择

本组纳入研究的病例均为 2007 年 1 月 - 2011 年 5 月在桂林市第三人民医院肝病科住院的 CHB 并做肝活检的汉、壮 2 族患者,共 94 例。临床诊断均符合 2000 年 9 月中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》中慢性乙型病毒性肝炎的诊断标准。全部病例 HBV-DNA 水平均在 10³ 拷贝/ml 以上。94 例患者平均年龄(31.5 ± 9.0)岁,其中男性 71 例,女性 23 例;病史 5 ~ 30 年,平均 16.6 年;汉族 69 例,壮族 25 例;HBeAg 阳性(即 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均 +)58 例,HBeAg 阴性(即 HBsAg、HBeAb、HBcAb 均 +)36 例。所有患者入院时均检查血常规、血凝 4 项、肝功能、HBV 血清标记物(HBV-M)、HBV-DNA、HBV 基因型、腹部 B 超、腹部 CT 等,排除肝硬化。无其它嗜肝病毒(甲、丙、丁、戊、CMV、EBV 等)重叠或合并感染,无合并肝吸虫感染及结核杆菌感染,无酒精性肝病,未进行过抗 HBV 治疗。

1.2 检查设备与方法

1.2.1 实验室检查 HBV-M 定量检测采用时间分辨荧光检测系统,试剂购自上海新波生物技术有限公司,配用美国产 Bio Red 自动洗板机;HBV-DNA 和 HBV 基因型诊断仪器为中山达安 DA-7600 型荧光定量 PCR 仪及其配套设备,HBV-DNA 试剂盒由广州达安基因公司提供,严格按照说明书要求进行规范操作。HBV-DNA 提取按常规的酚/氯仿/异戊醇方法,HBV-DNA 由患者血清经离心去液抽空后,将 DNA

溶于 25 μl TE(pH8.0)备用于 PCR 提取。基因型检测按广州安达基因公司基因型(B、C、D)试剂盒说明书操作,每份按 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 病理检查 肝活检在 B 超定位下,用美国产 Bard MAGNUM 型穿刺枪,16 G 穿刺针实施 1 s 负压法于呼气末快速肝组织穿刺活检,获取肝组织 10 ~ 20 mm,包含 4 个以上可供评价的汇管区,即刻固定于 4% 甲醛溶液中,由高年资病理医师在未知患者疾病状态的情况下对炎症活动、纤维化程度进行分级和分期诊断,其标准严格参照 2000 年《病毒性肝炎防治方案》中的慢性肝炎分级、分期标准,每一份病理标本均经 2 位医师复核,以减少诊断误差。

1.3 统计学分析方法

应用 SPSS17.0 统计软件,正态分布数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 *t* 检验,两样本率的比较采用 χ^2 检验和两总体比例的差异性检验;方差不齐时采用 *t'* 检验,等级资料的相关分析采用 Spearman 等级相关检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 基因型相关因素

本组 94 例 CHB 患者中 B 基因型占 74.5% ,C 基因型占 25.5% ,未发现 BC 混合型及其它基因型,B 基因型所占的比例明显高于 C 基因型,显示基因 B 型 HBV 为本地区优势感染病毒株。2 种基因型 CHB 患者的平均年龄及性别分布差异无统计学意义。C 基因型中壮族所占的比例明显高于 B 基因型;C 基因型在 HBeAg 阴性组所占比例明显高于 B 基因型,差异有统计学意义(见表 1)。

2.2 HBV 基因型与肝脏组织病理学的关系

本组肝活检结果依据我国慢性乙型肝炎防治指南中有关肝组织病理学诊断标准,按炎症及纤维化程度进行分级与分期。其中炎症分级:G1 ~ 2 为轻度组,G3 ~ 4 为重度组;纤维化程度分期:S1 ~ 2 为轻度组,S3 ~ 4 为重度组。2 种基因类型患者病例数及炎症和纤维化程度如表 2 所示,C 基因型患者的肝组织炎症程度和纤维化程度轻、重度构成比不同于 B 基因型,C 基因型患者肝组织炎症及纤维化程度重度组的比率高于 B 基因型,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 各因素在 B、C 基因型 2 组中的构成比较[*n*(%)]
Tab.1 Comparison on different constituent ratios of each factor in B,C genotype groups[*n*(%)]

组别	年龄	性别		民族		HBV 血清标志物	
		男	女	汉	壮	HBeAg(+)	HbeAg(-)
B 基因型	31.2 ± 9.5	50(71.4)	20(28.6)	58(82.9)	12(17.1)	48(68.6)	22(31.4)
C 基因型	32.7 ± 7.0	21(87.5)	3(12.5)	11(45.8)	13(54.2)	10(41.7)	14(58.3)
<i>t</i> / χ^2 值	-0.706	2.498		2.549		5.475	
<i>P</i> 值	0.482	0.114		0.000		0.019	

表 2 两种基因型患者的肝组织病理结果比较[*n*(%)]
Tab.2 Comparison on liver tissue pathology results
in both genotypes groups[*n*(%)]

组别	炎症程度		纤维化程度	
	轻度(G1 ~2)	重度(G3 ~4)	轻度(G1 ~2)	重度(G3 ~4)
B 基因型	43(61.4)	27(38.6)	50(71.4)	20(28.6)
C 基因型	9(37.5)	15(62.5)	11(45.8)	13(54.2)
χ^2 值	4.140		5.139	
<i>P</i> 值	0.042		0.023	

2.3 肝脏病理程度与 4 种主要肝功能指标及 HBV-DNA 的关系(表 3、4)

由表 3、4 可见,肝脏炎症程度和纤维化程度与谷丙转氨酶(Alanine aminotrans ferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspertate aminotrans ferase, AST)、血清总胆红素(Total bilirubin, TB)、直接胆红素(Direct bilirubin, DB)等肝功能指标的受损程度呈正相关,与血清白蛋白(Albumin, ALB)水平呈负相关,相关性是显著的(*P* < 0.05),而 HBV-DNA 载量与肝脏病理改变的严重程度无明显相关关系(*P* > 0.05)。

3 讨 论

目前,HBV-DNA 载量作为评价 CHB 疾病状态、基因突变、抗病毒治疗效果的有用指标已获临床公认^[5]。而 HBV 基因型作为另一个客观反映 HBV 自然感染过程中病变特征的“指纹图”,业已发现不同基因型 HBV 感染患者在不同地域、种属、群体乃至致病性、病毒变异、乙肝疫苗的保护效果、临床表现、病变程度、治疗应答、药物耐受、疾病预后与转归等方面存在差异,成为近年新的研究切入点^[6]。就地域而言,我国南方以 B 基因型为主,北方则更多表现

为 C 基因型^[1],可能主要与宿主的遗传背景分布差异有关。如 B 基因型多存在于汉族,而 C、D 型更多的存在于藏族中,西藏拉萨地区即以 D 基因型为主^[1];新疆维吾尔族以 D 型为主而其汉族人群则 B、C 混合型多见,占 43.8%;宁夏回族以 C 型为主,可见 B 型、D 型及 C、D 混合型。本研究以汉、壮 2 族分组,发现 C 基因型中壮族所占的比例明显高于 B 基因型,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。桂林是我国壮族人口集中居住地的代表地域之一,如能就此壮、汉 2 族 HBV 基因类型间的这一差异做进一步深入探讨,势必对阐明 HBV 在本地区不同民族间的生存与衍化历史,探究其发展与演变进程大有裨益。在性别方面, Mota 等^[7]报告在北葡萄牙 HBV 感染者中, A 基因型以男性感染者为主,而 D 基因型则多见于女性,认为可能与男性过量饮酒者较女性明显为多有关。国内的研究基因型分布在男女性别方面无差异,本组亦未显示性别差异。在年龄方面, Kumar 等^[8]比较印度 HBV 感染者发现, A 基因型最常见于 25 岁以上年龄,在 ALT 水平、HBeAg 阳性率和肝硬化的发生率均比 D 型者高。 Chan 等^[9]报告香港 1 106 例 CHB 者中, B 基因型(49%)与 C 基因型(51%)感染接近。但 C 基因型患者的平均年龄比 B 基因型(41 岁比 36 岁)高。 Maeshiro 等^[10]在日本的研究亦发现不同基因型的感染者在 30 岁以上存在这一年龄差异,且随着年龄的增长基因 C 型较 B 型发生肝硬化的风险递增。本研究未发现 2 基因型在年龄上的差异。

表 3 肝组织炎症程度与 HBV-DNA(log 值)及肝功能的关系
Tab.3 Relationship between liver tissue inflammation degree, HBV DNA and liver function

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μ mol/L)	DB(μ mol/L)	ALB(g/L)	HBV-DNA(log 值)
轻度组	127.62 \pm 189.89	71.71 \pm 115.53	16.42 \pm 8.58	6.51 \pm 3.40	41.85 \pm 4.61	5.85 \pm 1.32
重度组	355.02 \pm 386.35	231.67 \pm 249.72	49.91 \pm 63.24	30.80 \pm 50.83	38.40 \pm 5.69	5.71 \pm 1.33
相关系数	0.429	0.490	0.415	0.392	-0.287	-0.052
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.617

表 4 肝组织纤维化程度与 HBV-DNA(log 值)及肝功能的关系
Tab.4 Relationship between liver tissue fibrosis degree, HBV DNA and liver function

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μ mol/L)	DB(μ mol/L)	ALB(g/L)	HBV-DNA(log 值)
轻度组	130.36 \pm 184.26	73.46 \pm 111.46	16.67 \pm 9.78	6.40 \pm 3.85	41.61 \pm 4.72	5.87 \pm 1.36
重度组	411.36 \pm 412.30	272.06 \pm 264.68	58.59 \pm 68.56	37.61 \pm 55.54	37.91 \pm 5.75	5.76 \pm 1.41
相关系数	0.485	0.524	0.494	0.485	-0.289	-0.042
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.687

近年对 B、C 2 种不同基因型的临床表现比较颇多,如 Molina-Pérez 等^[11]在西班牙对 89 例不同基因型 CHB 患者临床资料进行分析发现,D 基因型患者肝组织学损害程度相对于 A、B 与 C 基因型感染者最轻;B 基因型相对于 C 基因型则较早出现 HBeAg 血清转换,肝纤维化进展较慢,肝癌发生率较低。倘有不同基因型的 HBV 混合感染致病性还可能有叠加作用,国内已有研究发现同时有 2、3 个基因型混合感染则表现为更高的 HBV-DNA 载量和更严重的疾病过程^[12]。本组抗-HBe 阳性多见于与 C 基因型,HBeAg 阳性多见于 B 基因型,与 Westland 等^[13]报道一致。94 例 CHB 患者中 B 基因型占有明显优势,符合葛宪民等报道的广西桂北以 B 基因型为主,桂南以 C 基因型为主的特点^[4]。国内有关基因型和肝组织病理相关性研究尚未取得一致意见,何卫平等^[14]报道北京 92 例 CHB 患者的研究结果,认为 B 基因型和 C 基因型慢性肝炎患者在 ALT、病毒复制、HBeAg 表达水平及肝脏病理程度间的差异均无统计学意义。本组由表 2 资料可见,肝组织炎症及纤维化程度的轻重构成在 B、C 基因型中有明显差异,肝组织的炎症程度较重组(G3-4)C 基因型的比率明显高于炎症程度较轻组(G1-2)C 基因型的比率;肝纤维化程度的比较结果亦然。据 Choi 等^[15]对 300 例 B、C 基因型 HBV 感染患者按病情分组研究发现,C 基因型 HBV 感染者易于发生前-S 区基因突变,尤其前 S2 缺失和前 S2 起始密码子的突变,C 基因型均明显高于 B 基因型者;C 基因型患者具有高年龄、高病毒复制、肝病的高活跃和肝癌的高发生率的特点。提示不同基因类型的 HBV 感染对宿主的致病性存在颇大差异,C 基因型患者更易出现严重的肝损害和肝癌等不良预后。

自 1980 年以来,HBV-DNA 在急慢性感染中已得到广泛研究,虽然 HBV-DNA 半寿期仅为 1~2 d,但其复制能力强大,24 h 可复制 10^{11} 拷贝,故被作为 HBV 复制的直接标志,但血清 HBV-DNA 含量与 CHB 活动的关系一直存在争议^[16]。本研究结果表明,HBV-DNA 水平与肝脏病理改变之间无相关关系,而 ALT、AST、TB、DB 等 4 项常规肝功能指标与肝脏病理程度间有一致的正相关,而与 ALB 呈负相关,显示肝功能指标的异常能够客观反映肝组织的损害程度。

总之,HBV 基因类型的区别亦可能是造成不同的肝组织学改变的原因之一。C 基因型较 B 型可带

来相对严重的肝组织学改变,肝脏的炎症及纤维化程度更高。HBV 基因 B、C 分型及肝穿刺病理组织检查的结合有助于判断疾病的轻重及预后。由于本研究的样本量较小,结论有待大样本数据的进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 胡金华,程书权. HBV 基因分型的研究与应用进展[J]. 国际病毒学杂志,2010,17(4):102-105.
- [2] Hu J H, Cheng S Q. Research and application progress of HBV genotypes [J]. International Journal of Virology, 2010, 17(4):102-105.
- [3] 黄亚琴,杨丽莎,吴淋玲. 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[J]. 第三军医大学学报,2011,33(12):1258-1261.
- [4] Huang Y Q, Yang L S, Wu L L. Distribution of HBV genotype in HBV infectious liver cancer and chronic HBV natural history in different phases [J]. Journal of Third Military Medical University, 2011, 33(12):1258-1261.
- [5] 程书权,胡金华,倪辉,等. 不同基因类型慢性乙型肝炎患者对 α 干扰素联合甘露聚糖肽治疗的临床研究[J]. 临床荟萃,2010,25(20):1749-1754.
- [6] Cheng S Q, Hu J H, Ni H, et al. Clinical analysis of α -interferon combined with mannan peptide treatment of chronic hepatitis B in different genotypes [J]. Clinical Focus, 2010, 25(20):1749-1754.
- [7] 葛宪民,李丹亚,方钟燎,等. 广西乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2003,17(2):174-179.
- [8] Ge X M, Li D Y, Fang Z L, et al. Research Guangxi hepatitis B virus genotype and clinical significance [J]. China Experimental and Clinical Virology Journal, 2003, 17(2):174-179.
- [9] Dény P, Zoulim F. Hepatitis B virus; from diagnosis to treatment [J]. Pathol Biol, 2010, 58(4):245-253.
- [10] Pujol F H, Navas M C, Hainaut P, et al. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2009, 286(1):80-88.
- [11] Mota A, Guedes F, Areias J, et al. Epidemiological and genotypic profile of hepatitis B virus infection in Northern Portugal [J]. Rev Saude Publica, 2010, 44(6):1087-1093.
- [12] Kumar S I, Pandey R, Naik S, et al. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D [J]. Indian J Gastroenterol, 2005, 24(1):19-22.
- [13] Chan H L, Wong G L, Tse C H, et al. Hepatitis B virus genotype C is associated with more severe liver fibrosis than genotype B [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009, 7(12):1361-1366.
- [14] Maeshiro T, Arakaki S, Watanabe T, et al. Different natural courses of chronic hepatitis B with genotypes B and C after the fourth decade of life [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(34):4560-4565.
- [15] Molina-Pérez E, Castroagudín J F, Aguilera-Guirao A, et al. Viral and host factors related with histopathologic activity in patients with chronic hepatitis B and moderate or intermittently elevated alanine aminotransferase levels [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2010, 102(9):519-525.
- [16] Yin J, Zhang H, Li C, et al. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with