

桂西地区慢性乙型肝炎基因分型及其临床特点^{*}

覃羽华¹, 岑光旅², 王俊利¹, 覃后继¹, 滕元姬¹ (1. 广西壮族自治区右江民族医学院附属医院检验科, 广西百色 533000; 2. 广西壮族自治区百色市人民医院麻醉科 533000)

【摘要】 目的 探讨桂西地区慢性乙型肝炎(CHB)患者乙型肝炎病毒(HBV)基因分型情况及其临床特点。**方法** 采用基因芯片反向斑点杂交技术、实时荧光定量 PCR、时间分辨免疫荧光法和酶法分别对 105 例 CHB 患者的 HBV 基因型、HBV DNA 含量以及 HBV 血清学指标进行检测。**结果** 桂西地区 CHB 患者 HBV 基因分型为 B 型 53 例(50.48%), C 型 27 例(25.71%), D 型 1 例(0.95%), B+C 混合型 17 例(16.19%), B+D 混合型 2 例(1.90%), 未分型 5 例(4.76%)。CHB 组中 B 型所占百分比明显高于 C 型($P<0.05$), 尤其是轻度和中度组($P<0.01$), 而在 CHB 重度组和肝硬化组中 C 型所占百分比明显高于 B 型($P<0.05$)。C 型和 B+C 混合型 HBV DNA 载量和 HBeAg 含量明显高于其他型($P<0.05$); 酶类指标则是 B 型丙氨酸氨基转移酶含量较高, C 型天门冬氨酸氨基转移酶和 γ -谷氨酰转移酶含量较高。**结论** 桂西地区 CHB 患者 HBV 基因型以 B 型为主, C 型次之, D 型极少; C 型及 B+C 混合型较易发展为重度 CHB 和肝硬化, 基因分型与疾病的严重程度有一定关系, 根据基因分型与临床特点可对 CHB 选择合适的治疗方案。

【关键词】 慢性乙型肝炎; 基因型; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)02-0138-02

Genotyping and clinical characteristics of chronic hepatitis B in west region of Guangxi QIN Yu-hua¹, CEN Guang-lv², WANG Jun-li¹, QIN Hou-ji¹, TENG Yuan-ji¹ (1. Affiliated Hospital, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. People's Hospital of Baise City, Baise, Guangxi 533000, China)

【Abstract】 Objective To study the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes in the patients with HBV-related chronic liver disease in Guixi area and its clinical characteristics. **Methods** The genotype, content of DNA and serological indicators of HBV in 105 cases of chronic hepatitis B(CHB) were detected by using gene chip reverse spots hybridization, real-time fluorescent quantitative PCR, time-resolved immunofluorescence and enzyme method respectively. **Results** In the HBV genotyping, there were 53 cases of type B (50.48%), 27 cases of type C (25.71%), 1 case of type D (0.95%), 17 cases of type mixed B+C (16.19%) and 2 cases of type mixed B+D (1.90%). There were 5 cases without typing (4.76%). In CHB group, the percentage of type B was significantly higher than that of type C ($P<0.05$), especially in mild and moderate groups ($P<0.01$), while the percentage of type C was significantly higher than that of type B in severe CHB and liver cirrhosis group ($P<0.05$). In type C and type mixed B+C, HBV DNA and HBeAg content were significantly higher than those in any other type ($P<0.05$); while in the enzyme indicator, type B had high ALT content and type C had high AST and γ -GGT content. **Conclusion**

In west region of Guangxi, the priority genotype of HBV is type B, the following is type C, and type D is rare, type C and type mixed B+C are easily to develop severe CHB and liver cirrhosis. Genotyping has a certain relationship with the severity of the disease. According to its genotyping and clinical characteristics, the right solution may be selected for treating CHB.

【Key words】 chronic; hepatitis B; genotype; polymerase chain reaction

慢性乙型肝炎(CHB)是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的一种世界性疾病,可发展为肝硬化、肝衰竭以及肝细胞癌等。HBV 属嗜肝 DNA 病毒科,基因组长约 3.2 kb,为部分双链环状 DNA。目前 HBV 病毒株可分为 A~H 8 个基因型^[1-2],不同地区分布特征存在地域性差异。国内外研究表明,不同的基因型具有不同的致病性,桂西地区是乙型肝炎的高发地区,对其进行相应的研究具有重要意义。为此,本文对该地区 CHB 患者的基因型、HBV DNA 载量和 HBV 血清学指标进行检测,探讨各项指标之间的临床特点及相互关系,以便更好地指

导临床进行病情诊断分析和治疗方法的选择。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血清标本选取 2010 年 1 月至 2011 年 3 月桂西地区临床诊断为 CHB 的住院及门诊患者 105 例(轻度 26 例,中度 34 例,重度 32 例,肝炎后肝硬化 13 例),其中男 63 例,女 42 例,年龄 26~68 岁,平均(47.2±10.8)岁。诊断标准符合 2000 年西安中华医学会传染病与寄生虫病学会和肝病学会学术会议制定的标准^[3]。所选病例均未合并其他病毒感染,如甲、丙、戊、庚型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)感

^{*} 基金项目:广西壮族自治区百色市科学研究与技术开发计划项目(百科计 1005004)。

染等。

1.2 试剂与仪器 基因分型试剂盒选用深圳亚能生物技术有限公司产品,HBV DNA 定量试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,免疫诊断试剂盒由上海新波公司提供,生化试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供。所采用的仪器分别为 ABI7500 实时荧光定量扩增仪、ANYTEST-NZ 时间分辨荧光分析仪、日立 7600 全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 HBV 基因分型检测 采用聚合酶链反应(PCR)和 DNA 反向点杂交原理,从患者血清中提取 HBV DNA 进行 PCR 扩增,然后放入杂交箱 47 ℃ 杂交 1.5 h,阴、阳性质控品同步处理、洗膜和显色后,根据膜条特定位置显色(蓝色)与否来判断 HBV 的基因型。具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.3.2 HBV DNA 定量测定 采用实时荧光定量 PCR-荧光探针法检测血清 HBV DNA 含量。

1.3.3 HBV 免疫指标测定 采用时间分辨荧光(TRF)分析法检测 CHB 患者血清免疫学指标乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)含量。

1.3.4 HBV 酶类指标测定 采用酶法、速率分析法检测 CHB 患者血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和 γ -谷氨酰转移酶(γ -GGT)

的含量。

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组计量资料的显著性检验用 t 检验,多组计量资料的显著性检验用单因素方差分析(one-way ANOVA)和两两比较(LSD 法)。计数资料的显著性检验用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计处理均采用 SPSS 10.0 软件完成。

2 结果

2.1 HBV 基因分型结果 在 105 例桂西地区 CHB 患者共检测出 5 种基因型,其中 B 型 53 例(50.48%),C 型 27 例(25.71%),D 型 1 例(0.95%),B+C 型 17 例(16.19%),B+D 型 2 例(1.90%),基因未分型 5 例(4.76%)。轻度和中度 CHB 患者以 B 基因型为主,而重度 CHB 和肝炎后肝硬化患者则以 C 基因型为主,B+C 型的临床表现主要是重度 CHB 和肝炎后肝硬化,其余基因型均表现为轻度和中度。见表 1。

2.2 不同基因型免疫、生化指标及病毒含量检测结果 对 CHB 患者进行 HBV DNA 载量和 HBeAg 含量检测,C 型和 B+C 型明显高于其他基因型($P < 0.05$);ALT 在 B 型和 B+C 型明显高于其他型($P < 0.05$);AST 和 γ -GGT 在 C 型、B+C 型和 B+D 型中的含量高于 B 型($P < 0.05$);ALP 在各基因型中的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 105 例 HBC 患者 HBV 基因型分布[n(%)]

HBV 基因型	轻度慢性乙型肝炎	中度慢性乙型肝炎	重度慢性乙型肝炎	肝炎后肝硬化	合计
B 型	19(35.85)	25(47.17)	7(13.21)	2(3.77)	53
C 型	2(7.41)	3(11.11)	16(59.26)	6(22.22)	27
D 型	—	1(100.00)	—	—	1
B+C 型	1(5.88)	2(11.76)	9(52.94)	5(29.41)	17
B+D 型	1(50.00)	1(50.00)	—	—	2
基因型未检出	3(60.00)	2(40.00)	—	—	5

注:—表示无数据。

表 2 不同基因型患者的血清 ALT、AST、ALP、 γ -GGT、HBeAg 及 HBV DNA 载量($\bar{x} \pm s$)

项目	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	γ -GGT(U/L)	HBeAg(PEIU/mL)	HBV DNA 载量(log ₁₀ copy/mL)
B 型	283.7±205.6 [△]	162.3±136.4	168.2±68.2	170.2±133.6	15.2±14.7	4.58±1.63
C 型	154.3±122.1	253.4±189.8*	155.6±60.3	287.9±195.4*	36.9±15.2*	6.74±2.05*
D 型	86.3	67.1	122.5	73.2	14.9	4.97
B+C 型	334.8±296.2 [△]	280.7±194.5*	176.6±90.7	312.5±203.6*	33.8±11.6*	6.88±1.77*
B+D 型	136.6±28.7	275.3±201.2*	160.4±74.8	289.8±210.9*	9.9±8.9	5.12±1.36

注:与 C 型比较,△ $P < 0.05$;与 B 型比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来在分子生物学发展基础上的研究发现,HBV 基因型的分布存在种族和地理区域差异,不同的基因型其流行病学和临床特点也不相同,且与肝脏病变程度以及药物治疗效果存在一定的相关性^[4-5]。我国 HBV 基因型主要为 C 型和 B 型,北方地区以 C 型为主,南方地区以 B 型为主。本研究结果显示,桂西地区 105 例 CHB 患者 HBV 基因型主要是以 B 型为主,占 50.48%,C 型次之,占 25.71%,B+C 型也占有一定的比例,约 16.19%,其他基因型较少,与郭瑜等^[6]报道一致。HBeAg 为可溶性蛋白质,传染性强,其含量的多少与 DNA 滴

度具有高度的相关性,是乙型肝炎预后估计和衡量传染性的一个重要标志。HBV DNA 载量水平的高低与病毒活动性复制能力及致病力的高低密切相关。实验发现,在 C 型和 B+C 型的 CHB 患者中,HBV DNA 水平和 HBeAg 含量显著高于其余基因型患者,且在重度 CHB 和肝硬化组中,C 和 B+C 基因型的检出率亦高于其他各组,B 型则在轻度和中度 CHB 患者中具有较高的检出率。说明 B 型患者常见于较轻的肝脏疾病;C 型和 B+C 型患者体内病毒复制活跃,极易形成持续性肝脏损害,最终发展成为较重的肝脏疾病^[7-8]。研究中还发现,C 型 CHB 患者 HBeAg 的阳性率高于 B 型患(下转第 141 页)

部分是引起器械外部冲突的主要原因^[10]。另一因素是相邻的器械转轮和手柄。为此,选用底座外径小的套管,并使 3 个套管的底座交错分布不在同一平面;并定制加长的器械和近手柄处向外弯的抓钳或使用可弯曲手术械件,可较好地克服这种外部冲突,降低操作难度^[11]。

本组病例效果良好,初步显示了 TUES 的优越性,分析有以下特点:(1)脐部是腹壁最薄弱的部位,神经纤维稀疏,穿刺时对腹壁损伤轻,手术伤口疼痛不明显,脐部缝合后瘢痕隐蔽,美容效果好^[12]。(2)与 NOTES 相比,TUES 风险较小,通过手术械件的改进可降低操作难度,不需额外复杂、昂贵的设备,是现阶段探索 NOTES 的可行技术。(3)同常规腹腔镜手术相比,TUES 毕竟是难度比较大的手术,且作为一项新技术,目前仍处在探索时期。作者体会本术式开展初期应选择操作难度不大的患者,待积累经验后再逐步扩大手术范围。(4)本术式的操作体会:①向上牵引胆囊,从胆囊两侧开始游离至胆囊底。②向左上方牵引分离后三角。③向右下方牵引分离前三角。④常规处理胆囊管、胆囊动脉后逆行切除胆囊。

总之,TUES 是安全可行的,操作难度较常规腹腔镜胆囊切除术大,通过熟练的操作及器械的改进,与常规腹腔镜胆囊切除术手术时间接近,具有更微创性和更好的美容效果,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 朱江帆,胡海,马颖璋,等. 经脐入路腹腔镜手术的初步临床报告[J]. 中国微创外科杂志,2008,8(1):75-77.
- [2] 姚健,罗黔. 悬吊式经脐入路腹腔镜胆囊切除术的临床研究[J]. 西部医学,2010,22(8):1422-1423.

- [3] 罗黔,姚健,赖俊渝. 经脐入路腹腔镜胆囊切除术 25 例临床分析[J]. 西部医学,2011,23(3):501-502.
- [4] Kalloo AN, Singh VK, Jagannath SB, et al. Flexible trans-gastic peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity[J]. Gastrointest Endosc, 2004, 60(1): 114-117.
- [5] 姚健,朱敏,罗黔,等. 经阴道联合经脐腹腔镜胆囊切除 2 例[J]. 重庆医学,2010,39(13):1783-1784.
- [6] 姚健,罗黔,杨景芳,等. 国内首例经阴道腹腔镜胆囊切除术[J]. 检验医学与临床,2010,7(12):1169-1170.
- [7] 姚健,罗黔,朱敏. 悬吊式经脐入路腹腔镜手术 20 例报告[J]. 腹腔镜外科杂志,2011,16(2):107-109.
- [8] Podolsky ER, Curcillon PG, Rottman SJ, et al. Single port access (SPA) surgery initial experience of a novel minimal access approach applied across surgical specialist[J]. Surg Endosc, 2008, 22(1): 172-177.
- [9] 张忠涛,韩威,李建设,等. 经脐单孔腹腔镜胆囊切除术 1 例报告[J]. 腹腔镜外科杂志,2008,13(4):314.
- [10] 朱江帆. 经脐入路内镜手术腹壁无瘢痕手术的另一途径[J]. 腹腔镜外科杂志,2009,14(1):5-7.
- [11] Zhu JF, Ma YZ. Totally transumbilical endoscopic cholecystectomy without visible abdominal scar using improved instruments[J]. Surg Edosc, 2009, 23(8): 1781-1784.
- [12] 马颖璋,朱江帆. 经脐入路内镜手术[J]. 中国微创外科杂志,2008,8(8):759-761.

(收稿日期:2011-07-05)

(上接第 139 页)

者,但差异无统计学意义($P>0.05$),与文献[9-10]报道不尽相同,可能与地域和民族的差异,以及部分 C 型 CHB 患者发生了 C 区变异有一定关系。本研究对血清酶学的检测结果表明,B 型和 B+C 型 CHB 患者 ALT 含量较高,AST 和 γ -GGT 含量在 C 型、B+C 和 B+D 型中高于 B 型。ALT 是反映肝细胞损伤较早的指标,在肝脏损伤早期或轻度损伤时 ALT 比 AST 上升要快而且幅度大,当肝脏损伤达重度时肝细胞线粒体中的 AST 释放入血,浓度迅速上升,ALT 上升幅度减小甚至降为正常,提示了 C 型和混合型 CHB 患者的肝细胞损伤程度比 B 基因型要严重。当慢性肝炎有活动性病变时,诱导微粒体酶合成增加, γ -GGT 含量随即也增加,提示 C 型、B+C 型和 B+D 型患者病变处于活动期,应积极地进行抗病毒治疗。

基因型是影响疾病进程的重要因素之一,进行 CHB 患者 HBV 基因型和临床特点的深入研究,可以了解疾病的发展和预后,在选择合理、有效的治疗方法以及评估疗效等方面发挥了积极的作用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Arauzruiz P, Norder H, Robertson H, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America[J]. J Gen Virol, 2002, 83(8): 2059-2073.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒

- 性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
- [4] 张智,张珍,李楠,等. 185 例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药基因检测[J]. 广东医学,2008,29(1):97-98.
- [5] Chu CJ, Keffe EB, Han SH, et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study [J]. Gastroenterology, 2003, 125(2): 444-451.
- [6] 郭瑜,刘晓燕,胡惠梅,等. 山西省乙型肝炎病毒基因型的初步研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2006,20(4): 361-363.
- [7] Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2004, 53 (10): 1494-1498.
- [8] 谭文婷,邓国宏,王宇明,等. 重庆地区乙型肝炎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.
- [9] Fang SK, Chen HB, Fontana RJ, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2006, 44(2): 283-290.
- [10] 李卓,李洪权,李俊红,等. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(24): 2823-2827.

(收稿日期:2011-07-02)