

乙型肝炎病毒基因分型的临床意义及基因分型方法

彭 锐 综述, 张 洪[△]审校(武汉大学人民医院药学部, 武汉 430060)

【关键词】 乙型肝炎病毒; 基因分型; 地域分布; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.19.054 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)19-2764-02

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的大国,据研究表明全球有 3.5 亿 HBV 携带者,我国占三分之一,每年发病率达 6 000 万人次以上。不同 HBV DNA 基因型之间存在着致病性的差异,因此,HBV 基因分型对快速了解患者感染病毒状况具有十分重要的作用。HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科,部分双链环形 DNA 病毒,基因组长约 3.2 kb,基因组中包含 4 个开放区:前 S/S、前 C/C、X 和 P 区^[1]。由于缺乏校对功能的酶,HBV DNA 复制过程容易发生碱基错配,从而发生基因突变形成不同基因型。

1 HBV 基因多态性

1.1 地域分布 目前根据全基因序列异质性大于或等于 8%,将 HBV 基因型分为 A~J 10 种不同类型,并且每种基因型分布存在地域差异现象^[2]。基因型 A 包含 A1~A7 七种亚型;B 型有 B1~B9 九种亚型;基因型 C 有 12 种亚型 C1~C12;D 型有 8 种亚型 D1~D8;基因型 F 只有 4 种亚型 F1~F4;其他基因型目前还未发现亚型存在。有关 HBV 基因型研究表明,B 和 C 基因型主要分布在亚洲;而欧洲最常见的基因型是 A 和 D 型^[3]。雷延昌等^[4]研究湖北省 190 例 HBV DNA 阳性血清标本研究发现,B 基因型 140 例(73.7%),C 基因型 42 例(22.1%),BC 混合型 8 例(4.2%),未发现 A、D 和 E 基因型;新疆地区 B 型占 5.56%,C 基因型也占据 5.56%,BC 杂合型有 22.22%,而 D 基因型高达 66.67%。说明 HBV 基因型在我国的地域分布存在明显差异,见表 1。

1.2 HBV 基因型与肝病演化的关系 研究表明基因 B 型通常引发轻微肝纤维化;C 型易引起侵害性的严重肝脏疾病,可发展为肝硬化和肝癌;A 基因型携带者比 D 基因型更易发展为慢性肝炎,D 基因容易诱导急性肝炎^[5]。因此,临床治疗前 HBV DNA 基因型检测具有十分重要的作用,对临床抗病毒治疗方法的选择、预后判断都有指导意义。

1.3 慢性乙型肝炎(CHB) CHB 表现出明显的地域分布多态性,在亚洲和非洲发病概率较高,而在北美和欧洲发病概率相对较低。目前,世界上超过 3.5 亿人是 HBV 慢性感染者,60% 肝癌患者通过 CHB 演化而来。CHB 感染者乙型肝炎表面抗原(HBsAg)比健康个体含量高 1.5%。HBV 存在多种传播途径,包括输血、子宫内、性关系、家族之间和医院内传播等^[6]。HBV 感染后的临床治疗结果高度可变,遗传和环境因素对肝脏疾病的进展起着重要的调节作用。人口统计学变量阐述了感染者的年龄、性别、生活习惯、伴随疾病(如慢性酒精疾病、其他肝病毒感染等)都会影响 HBV 持续性感染^[7-9]。CHB 会发展为其他肝脏疾病,像肝纤维化、肝硬化和肝癌等,紧密依赖于与疾病相关基因型。

表 1 中国部分省份 HBV 基因型分布差异

省份	基因型(%)				
	B	C	B+C 杂合	D	其他
新疆	5.56	5.56	22.22	66.67	—
吉林	8.20	88.70	3.10	—	—
山西	8.90	82.60	8.50	—	—
陕西	13.60	79.20	7.20	—	—
宁夏	—	86.70	—	10.00	3.30
青海	—	3.70	—	—	96.30(C+D)
山东	9.30	84.50	6.20	—	—
西藏	17.80	24.70	4.10	53.40	—
河南	28.60	70.20	—	1.20	—
江苏	33.50	61.40	5.10	—	—
安徽	64.30	30.10	5.60	—	—
四川	86.70	12.60	—	0.70	—
重庆	45.60	53.90	—	—	0.50
浙江	36.00	47.00	11.00	—	6.00
湖南	57.46	2.99	2.99	—	36.57
江西	73.10	10.40	2.30	3.10	11.10
云南	41.00	54.70	1.71	0.86	1.71
贵州	64.79	33.62	—	0.72	0.87
福建	63.80	23.20	—	11.80	1.20
广东	52.50	47.00	—	0.50	—
内蒙古	2.17	93.48	—	4.35	—
海南	25.48	60.19	5.10	6.02	3.19
湖北	73.70	22.10	4.20	—	—

注:—表示未发现基因型分布。

1.4 HBV 基因型对药物使用的影响 HBV 基因突变会产生病毒耐药现象,比如:拉米夫定是抗 HBV 治疗的一线药物,耐药的主要机制是 HBV-DNA 聚合酶基因突变引发病毒 DNA 与药物的结合力减弱,主要是 rtL180M+rtM204V 和 rtM204I 突变。另外一个研究说明,阿德福韦耐药菌株的位点是 rtN236T and rtA181^[10]。HBV 基因 C 型患者比 B 型基因突变更易产生耐药性,但是其机制并没有完全阐明。可能是由于不同 HBV 基因型结构差异编码出不同蛋白质,以至于对拉米夫定产生了不同耐药反应。另一原因也许是在服用拉米夫定后,基因 C 型相对基因 D 型更容易出现 YMDD 突变^[11]。所以更

[△] 通讯作者, E-mail:zhzx8888@163.com。

应注意对基因 C 型乙型肝炎患者的关注,无论在抗病毒治疗过程还是对常见耐药位点的监测。对长期服用核苷酸类似药物的患者,对耐药突变和基因检测显得尤为重要,有助于了解不同基因型乙型肝炎患者相关耐药基因,帮助选择抗病毒药物、对个体化抗病毒治疗提供科学依据^[12]。HBV 基因型差异对干扰素的反应也存在区别,干扰素对基因 B 型和 C 型的患者治疗效果更好;基因 D 型比混合基因型有更好的治疗效果。主要是因为 HBV 基因 C 区启动子 C 遗传变异的分子特征决定。携带基因 A 型患者对干扰素治疗效果较好,因为 HBV 基因 C 区容易发生启动子突变和更少核衣壳蛋白变异。而且前 C 区终止密码子突变会导致干扰素疗效的下降。

2 HBV-DNA 基因型检测

HBV 耐药基因突变和基因型检测对指导临床治疗具有潜在价值,寻找一种适合临床检测的方法非常必要。研究表明,近年来许多方法用于检测 HBV 耐药基因和进行基因分型。比如基于测序的方法[克隆测序和聚合酶链反应(PCR)产物直接测序];限制性片段长度多态性(RFLP)^[13-14];PCR 特异性引物测序;基于杂交的方法[寡核苷酸芯片、INNO-LiPA 分型和 PCR 微型板块杂交-酶联免疫吸附(ELISA)技术]等。

2.1 PCR 产物直接测序方法 此方法主要包括 HBV-DNA 全基因测序和 S 基因测序,直接测序方法是目前临床上最常见的检测方法,通过测序来检测病毒基因型和直观的变异,是 HBV 基因型检测的金标准,但是存在许多缺陷,如操作繁琐、耗时、高成本和较难改进等,而且只能检测出突变大于或等于 20% 的基因型。有关研究说明,S 基因测序与全基因测序有着同样的准确性,HBV-NA S 基因区由 S 基因、前 S1 基因和前 S2 基因组成,它们能够分别编码 HBsAg 的小蛋白、大蛋白和中间蛋白。但是 S 基因测序也是种昂贵、耗劳动力的方法,不适合大范围临床和流行病学研究工作。

2.2 PCR-RFLP 此方法是结合 PCR 技术和 RFLP 技术,使来源于 PCR 扩增的目的片段在合适的限制性内切酶水解作用后,通过琼脂糖凝胶电泳,不同的基因型片段呈现出不同长度的条带^[15],从而加以区分,是临床上一种有效的检测方法。

2.3 INNO-LiPA 分型和寡核苷酸芯片法

2.3.1 INNO-LiPA 分型 作用原理为生物素标记的 HBV-DNA 扩增产物与以平行方式固定在尼龙膜上的寡核苷酸探针杂交,未杂交的 DNA 被冲洗掉;然后,加入的碱性磷酸酶标记的链霉菌亲和素与生物素标记的杂交产物结合;最后,将 BCIP/NBT 加入到尼龙膜上观察颜色的变化。

2.3.2 寡核苷酸芯片法 此法是基于反相杂交的原理,使 Cy5 标记的扩增子与固定在微板上的特异性类型寡核苷酸杂交。

2.4 PCR 微型板块杂交-ELISA 技术 PCR 提取血清样品中 HBV-DNA,然后与两个特异性探针杂交。其中一个探针用于捕获 HBV-DNA,另一种是 5'端生物素标记的基因分型探针。此技术灵敏性和特异性和 S 基因直接测序法相同,可适用于大范围的临床检测和流行病学研究。

2.5 微阵列 它是基于杂交的一种方法,能同时检测多个样品。但是其灵敏性并不高,因此相关研究通过增强信号的方法解决此问题。采用两种信号增强的办法来增加微阵列 DNA 的荧光信号强度,即多标记侧链引物和多检测点引物。前种方法是同时增加特异性扩增的靶标产物荧光标记分子的数量;后

者是增加每个杂交位置可检测的荧光分子。

2.6 HiSeq 测序 上述方法在操作过程都存在各种缺陷,因此 Han 等^[16]改进成新技术 HiSeq 测序。此测序首先将经过剪切的 DNA 片段两端加上接头并通过碱基互补结合固定在芯片表面,使用引物扩增后将双链变性为单链后该单链的一端就固定在芯片上,另一游离端可随机与附近另外一个引物互补结合,也被固定形成一个桥。用引物 PCR 后每个 DNA 片段大约获得 1 000 倍扩增,形成单克隆的 DNA 簇群。HiSeq 测序对 HBV 基因型的检测有较高的灵敏性、精确性、高通量和自动化,是检测 HBV DNA 基因突变和分型的好方法。桥式 PCR 的设计采用一个引物连接标记序列的末端。在 PCR 循环反应中,桥式引物将标记片段串联起来,是一种能高通量的将标记序列进行简单、有效的扩增。

3 结 论

HBV 基因型呈现出明显的域分布差异,研究不同基因型间的不同致病性对疾病演进、传播方法和抗病毒的治疗有着重要的意义。即使现在 HBV-DNA 检测技术和分型方法得到了改进,但是一种更适合大样本基因型分析和低成本、低耗时的方法还有待探索。希望通过不断探索,将这些成果运用到 HBV 预防、治疗和乙型肝炎患者临床类型检测,实现真正的个体化用药。

参考文献

- [1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical Consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.
- [2] Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(5): 7-8.
- [3] Lazarevic I, Cupic M, Delic D, et al. Distribution of HBV genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes among chronically infected patients in Serbia[J]. Arch Virol, 2007, 152(11): 2017-2025.
- [4] 雷延昌, 郝友华, 田拥军, 等. 湖北地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(2): 35-38.
- [5] World Health Organization. Hepatitis B vaccines[J]. Reactions Weekly, 2009, 126(31): 20-23.
- [6] Ezzikouri S, Chemin I, Chafik A, et al. Genotype determination in Moroccan hepatitis B chronic carriers[J]. Infect Genet Evol, 2008, 8(3): 306-312.
- [7] Kao PC, Wu JF, Ni YH, et al. Tumour necrosis factor- α promoter region polymorphisms affect the course of spontaneous HBsAg clearance[J]. Liver Int, 2010, 30(10): 1448-1453.
- [8] Zhou J, Huang JD, Poon VK, et al. Functional dissection of an IFN- α /beta receptor 1 promoter variant that confers higher risk to chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 322-332.
- [9] Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(1): 144-150.
- [10] 卜范峰, 鲁艳芹, 韩金祥, 等. 实时定量(下转第 2785 页)

保温措施,有效提高患者手指温度,并提前做好手术探查的准备。如患者出现皮肤呈深紫色、毛细血管充盈和肿胀等静脉回流受阻的表现,应当首先排除患者手指受压的因素,如血痂或纱布过紧等,其次对患者进行指端向心方向的按摩运动。一旦患者出现血管危象,应当立即对患者补液,防止患者出现电解质、水和酸碱平衡紊乱等现象^[13]。(5)静脉滴注护理。断指再植患者术后 7 d 需 24 h 静脉滴注以减轻患者疼痛及促进再植指血管扩张,静脉滴注速度应控制在每分钟 30 滴,还可对患者皮肤进行热敷以促进血管扩张,从而减少患者血管危象的发生率。由于断指再植老年患者在药物吸收、分布及体内代谢等方面与年轻患者有较大差异,因而,在对老年患者给予药物治疗时,应遵循个体化、小剂量化、慎多药联用的原则,从而避免不良反应的发生。此外,应加强对患者病情的评估工作,给予不同患者有针对性的个体治疗,可适当使用维生素 C 和糖皮质激素防止脂肪血栓的形成。(6)康复训练。患者在断指再植手术 3 周后,可在医护人员的指导下进行康复训练。首先可进行一些简单的屈伸练习,逐步增加锻炼时间,3~6 周时可进行一些指关节的活动,7~12 周时,可以适当进行一些抗阻锻炼,逐步恢复手部功能。此外,在康复锻炼过程中为减少患者对疼痛的恐惧,促进患者积极配合康复锻炼,可采用播放患者喜欢的音乐以分散患者注意力,指导患者做好疼痛管理等方式,提高患者配合度^[14]。(7)出院指导。为巩固治疗效果,应在患者出院时发放手指功能训练手册,并予以适当讲解和演示,使患者把握康复训练的要领。术后第 2 周至第 3 周进行“放置-保持”训练;第 4 周,若创口愈合,则可行瘢痕按摩,并进行保护性关节活动度和被动关节活动度训练;第 5 周,可行屈曲练习,并予弹性自粘带和向心性按摩,促进肿胀部位恢复。经一系列功能训练后,可进行模拟工作训练,并结合感觉测试对训练方案进行适当调整。积极动员患者家属督促患者进行手指功能锻炼,提高自理能力,减少对他人的依赖性。医护人员对出院患者进行定期随访。

本研究自 2012 年 3 月对断指再植老年患者采取有针对性的护理以来,对患者的再植指康复起到了积极的作用,其经验值得其他临床工作者借鉴。

参考文献

[1] 陈淑琴.断指再植术后血管危象多因素分析及预防[J].中华护理杂志,2009,44(12):1076.
 [2] 傅玉红,高慧秋,徐敏.45 例老年人断指再植的不利因素

分析及护理[J].中华护理杂志,2012,47(01):30-32.

[3] 严士海,朱萱萱,陈晓虎,等.黄芪注射液载入修饰胶原促进血管再生的研究[J].中国中药杂志,2009,34(4):464-467.
 [4] Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, et al. Studies of ischemia reper fusion injury in skeletal muscle: efficacy 21-minosteroids on microcirculation and muscal contraction after an extended period of warm ischemia[J]. J Orthop Res, 2007, 15(4): 512-513.
 [5] 陆征峰,张全荣,魏苏明,等.60 岁以上老年人断指再植体会(附 45 例报告)[J].中国现代医学杂志,2010,20(19): 2994-2996.
 [6] 杨庆民,王晨霖,毕卫伟,等.老年断指再植临床体会[J].中国骨与关节损伤杂志,2008,23(11):949-950.
 [7] 袁卓,张军平,张仁岗.四妙勇安汤的有效成分对血管内皮细胞增殖的影响[J].上海中医药大学学报,2008,22(4):69-71.
 [8] 李红霞,崔立敏,胡立霞.小儿断指再植术后的护理[J].中国实用医刊,2013,40(10):3.
 [9] 林大木,吴志鹏,褚庭纲.辗转撕脱性断指再植的临床及治疗特点[J].中华显微外科杂志,2013,36(4):379-380.
 [10] 吴艳玲.断指再植术护理现状与进展[J].中外健康文摘,2013,19(17):375-376.
 [11] 刘丽芬,陈瑜,邱春妹,等.延续性护理在断指再植术后患者中的应用[J].中国医疗前沿,2013,8(13):100.
 [12] 刘涛涛,李新军,吕景波.中西医结合治疗断指 143 例临床观察[J].中国中医急症,2013,22(6):996-997.
 [13] SAmbiru, NFuruyama, Kimura, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on Patients with adhesive intestinal obstruction associated with abdominal surgery who have failed to respond to more than 7 days of conservative[J]. HePato-gastroenterology, 2008, 55(3): 491-496.
 [14] Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, et al. Peak cyclosporine levels correlated with freedom from liver graft rejection: Results of a prospective, randomized comparison of neural and sandmen for liver transplantation[J]. Transplantation, 2007, 67(8): 1133-1137.

(收稿日期:2014-02-22 修回日期:2014-05-12)

(上接第 2765 页)

PCR 检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变及其与临床指标的相关性[J].中国生物制品学杂志,2008,21(9): 806-809.
 [11] 邓乐.乙型肝炎病毒基因型与抗病毒药物疗效关系的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2012,28(6):469-473.
 [12] 刘艾芹,唐曙明,陈卫布,等.深圳地区乙型肝炎病毒基因分型与耐药性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(14):1787-1788.
 [13] Toan NL, Song le H, Kremsner PG, 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.

[14] Pas SD, Tran N, De Man RA, et al. Comparison of reverse hybridization, microarray, and sequence analysis for genotyping hepatitis B virus [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4):1268-1273.
 [15] 李穗雯.单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J].国际检验医学杂志,2013,34(12):1559-1561.
 [16] Han Y, Zhang Y, Mei Y, et al. Analysis of hepatitis B virus genotyping and drug resistance gene mutations based on massively parallel sequencing [J]. J Virol Methods, 2013, 198(2): 341-347.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-06-15)