

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.04.003

# HBV 感染患者氧化应激状态与病毒基因型和耐药突变的相关性<sup>\*</sup>

杨渝伟, 陈小红, 彭 玲, 唐 洁, 俸家富<sup>△</sup>

(四川省绵阳市中心医院检验科 621000)

**摘 要:**目的 探讨慢性乙型肝炎患者氧化应激(OxS)状态和疾病严重程度与乙型肝炎病毒(HBV)基因型和耐药突变的相关性。方法 2014 年 2 月至 2016 年 4 月该院确诊的乙型肝炎病毒感染患者 296 例,其中慢性乙型肝炎(CHB)145 例,肝硬化(HBC)101 例,CHB 相关原发性肝癌(HCC)50 例。采用 PCR-反向点杂交法检测 3 种 HBV 基因型(B、C、D 型)和 8 种耐药突变基因(rt180L、rt204M、rt207V、rt236N、rt250M、rt181A、rt184T、rt202S);同时,检测总氧化态(TOS)和总抗氧化态(TAS),并计算 OxS 指数(OSI)。比较不同肝病、不同基因型及有无耐药突变患者之间 TOS、TAS、OSI 的差异,并分析 HBV 基因型、耐药突变、患者 OxS 与肝病严重程度的相关性。结果 CHB、HBC 和 HCC 患者血清 TOS 和 OSI,以及 C 型比值和耐药突变率依次增高(均  $P < 0.05$ );血清 TAS 则依次降低,但 CHB 患者和 HBC 患者之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。除 HBC 患者 TAS 水平外,耐药突变患者的 TOS 和 OSI 水平升高,而 TAS 水平降低,与无突变患者比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且耐药突变发生与血清 TOS( $r = 0.476, P < 0.01$ )和 OSI( $r = 0.441, P < 0.01$ )水平呈正相关,与 TAS( $r = -0.249, P < 0.01$ )水平呈负相关;突变位点数与 HBV 感染后病情严重程度呈正相关( $r = 0.614, P < 0.01$ )。结论 HBV 感染患者存在不同程度的氧化损伤,其程度随病毒基因型和耐药突变不同而有所差异。因此,OxS 参数可能是反映 HBV 感染患者疾病进展的有用指标。

**关键词:**乙型肝炎病毒感染; 氧化应激; 基因型; 耐药突变

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)04-0439-05

## Relationship between oxidative stress in patients with HBV-induced liver disease and HBV genotype/drug-resistant mutation<sup>\*</sup>

YANG Yuwei, CHEN Xiaohong, PENG Ling, TANG Jie, FENG Jiafu<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**Abstract: Objective** To explore the correlation of oxidative stress in patients with chronic hepatitis B and degree of severity of the disease with HBV genotype and drug-resistant mutation. **Methods** A total of 296 patients with diagnosed chronic hepatitis B were selected from Feb. 2014 to Apr. 2016 in Mianyang Central Hospital, included 145 patients with chronic hepatitis B(CHB), 101 patients with hepatitis B cirrhosis(HBC) and 50 patients with CHB-related hepatocellular carcinoma(HCC). Three HBV genotypes(B, C and D) and eight drug-resistant mutation genes(rt180L, rt204M, rt207V, rt236N, rt250M, rt181A, rt184T, rt202S) were detected by PCR-reverse dot blot method. In addition, total oxidative stress(TOS), and total antioxidant status(TAS) were measured, on the basis of which oxidative stress index(OSI) was calculated. Furthermore, then the differences of TOS, TAS and OSI levels were compared between different liver diseases, different genotypes or drug-resistant mutation, and also the correlations were analyzed between HBV genotype, drug-resistant mutation, patient's oxidative stress status and disease severity. **Results** Serum TOS and OSI levels, HBV-C ratios and drug-resistant mutation rates were increased gradually with the severity of liver disease( $CHB < HBC < HCC, P < 0.05$ ). Serum TAS levels decreased with degree of severity of the disease, but there was no statistical difference between CHB group and HCC group( $P > 0.05$ ). Except TAS levels in patients at HBC group, compared with patients without mutation in HBV, the patients with drug-resistant mutation had higher TOS and OSI levels, but lower serum TAS levels( $P < 0.05$ ). Drug-resistant mutation rate positively correlated with TOS( $r = 0.476, P < 0.01$ ) and OSI( $r = 0.441, P < 0.01$ ), but negatively correlated with TAS( $r = -0.249, P < 0.01$ ), except TAS level in patients at HBC group. In addition, the number of mutation sites was

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家科技部“863”计划课题(2006AA020905); 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(130444); 四川省绵阳市卫生和计划生育委员会科研课题(201221)。

作者简介: 杨渝伟, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断学研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: jiafufeng@aliyun.com。

positively correlated with disease severity( $r=0.614, P<0.01$ ). **Conclusion** There are different degrees of oxidative damage in patients with HBV-induced liver disease, and the degree of the damage depends on HBV genotypes and drug-resistant mutations. Therefore, oxidative stress parameters might be useful indicators of progression of HBV-induced liver disease in patients.

**Key words:** HBV infection; oxidative stress; genotype; drug-resistant mutation

据 2013 年流行病学调查显示, 中国有乙型肝炎病毒(HBV)感染携带者约 1 亿人, 其中至少 20 000 000 为慢性活动性 HBV 感染患者, 包括慢性乙型肝炎(CHB)、乙型肝炎肝硬化(HBC)、CHB 相关肝细胞癌(HCC)<sup>[1]</sup>。有研究证实, 约 60% 肝硬化患者和 80% HCC 患者由 HBV 持续感染所致, 是中国 HBC 和 HCC 发病的主要原因<sup>[2]</sup>。据 WHO 报道, 全世界每年约 650 000 例死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化、HCC<sup>[3]</sup>。有许多研究表明 HBV 基因变异与 HCC 发病风险密切相关。但迄今为止, 有关 HBC 和 HCC 的发生、发展与 HBV 基因组之间的作用机制尚不十分清楚<sup>[4]</sup>。目前, HBV 基因分型和耐药突变基因检测已在中国广泛用于指导临床对 HBV 感染所致肝病的抗病毒药物治疗。但是, HBV 耐药突变基因是否与 HBC、HCC 发病风险和疾病发展(疾病严重程度)有关, 至少少有报道。

氧化应激(OxS)是机体抗氧化物质消耗和/或氧化物质生成过多, 引起机体氧化与抗氧化平衡失调所致的一种疾病。因此, OxS 和炎症反应密切相关。HBV 感染不同肝病状态下, OxS 状态与 HBV 病毒基因型和耐药突变基因是否存在某种必然的相关性, 也少有研究报道。

现检测 HBV 感染不同肝病状态下, 病毒基因型和耐药突变率, 以及患者血清总氧化态(TOS)、总抗氧化态(TAS)、OxS 指数(OSI)水平, 分析 HBV 基因变异与患者 OxS 之间的相关性, 以了解不同基因型 HBV 感染后, 其耐药突变率与患者 OxS 状态和病情严重程度的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2014 年 2 月至 2016 年 4 月该院经乙型肝炎血清学标志物和/或 HBV DNA 检测, 确诊的 HBV 感染肝病患者 296 例, 男 232 例, 女 64 例, 平均年龄( $42.4 \pm 13.5$ )岁。CHB 患者 145 例(CHB 组), HBC 患者 101 例(HBC 组), HCC 患者 50 例(HCC 组)。所有病例诊断均符合 WHO 2015 版 CHB、APASL 2012 版肝纤维化和/或 NCCN 2016 版肝胆肿瘤诊疗指南标准<sup>[5]</sup>。所有患者在 OxS 相关参数检测的前 1 周, 均停止使用抗氧化治疗药物, 如螺旋藻、维生素 E、维生素 C、多烯磷脂、肌苷片、辅酶 Q10 等。

**1.2 仪器与试剂** 血清 TOS 和 TAS 检测试剂由本研究通过方法学改良研制, 均在 LST008 型全自动生化分析仪(日本, HITACHI)上测定; TOS 试剂制备

的主要化学试剂为二甲酚橙四钠盐(CAS:3618-43-7, Cat. No.:398187)和六水硫酸亚铁铵(CAS:7783-85-9, Cat. No.:215406), 均购自 Sigma-Aldrich 公司; TAS 试剂制备的主要化学试剂为 ABTS(CAS:30931-67-0, Cat. No.:11557), 购自 Sigma-Fluka 公司。HBV 基因型及耐药突变基因试剂盒购自亚能生物技术有限公司(深圳, 中国), 严格按照说明书操作程序进行测定; 聚合酶链式反应(PCR)扩增反应采用 ABI7500 Real Time PCR System(AB 公司, 美国); 杂交反应使用 YN-H16 型恒温杂交仪(中国, 深圳亚能)。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 用 2 支不含任何添加剂的 Vacutainer 真空采血普通管(BD 公司, 美国), 各抽取患者静脉血约 5 mL, 待血块自然收缩后, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。其中 1 管 4 h 内用于血清 TOS 和 TAS 检测; 另 1 管血清用于 HBV 基因分型及耐药突变基因检测, 按试剂盒说明书, 未检测前置 -20℃ 冰冻保存。

**1.3.2 OxS 指标测定** 血清 TOS 测定采用改良二甲酚橙法: 血清中氧化物质可使酸性环境中的亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )氧化成高铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ ), 后者使二甲酚橙溶液颜色改变, 颜色变化强度与血清 TOS 水平呈正比, 以  $100.0 \mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$  作为标准, 结果以  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{Eq./L}$  表示。血清 TAS 测定采用改良 ABTS 法<sup>[10]</sup>: 血清中抗氧化物质可将蓝绿色的激活态 ABTS 还原, 颜色变化程度与血清 TAS 水平呈正比, 以 5 mmol/L 水溶性维生素 E 类似物(Trolox)作标准, 结果以 mmol TroloxEq./L 表示。OSI 根据两者检测结果按公式计算<sup>[6]</sup>:

$$\text{OSI}[\text{arbitrary unit (AU)}] = \frac{\text{TOS}(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{Eq./L})}{\text{TAS}(\mu\text{mol TroloxEq./L})} \times 100\%$$

**1.3.3 HBV 基因型及耐药突变基因检测** 患者血清标本、阳性和阴性质控品用病毒 DNA 提取纯化试剂同步处理(离心柱法)后, 采用 PCR-反向点杂交法检测 3 种 HBV 基因型(B、C、D 型)和 8 种耐药突变基因(t180L、rt204M、rt207V、rt236N、rt250M、rt181A、rt184T、rt202S)。

**1.4 统计学处理** 计量资料采用单样本 Kolmogorov-Smirnov 分析方法进行正态性检验, 同时以  $\bar{x} \pm s$  和  $M(\text{min}, \text{max})$  表示; 计数资料以  $n$  或  $n(\%)$  表示。组间差异分析: 计量资料多组间采用 Kruskal-Wallis

检验(非正态分布资料)或单因素方差分析(正态分布资料),两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验之平均秩和多重比较(非正态分布资料)或方差分析的 LSD 检验(正态分布资料);计数资料多组间采用列联表  $\chi^2$  检验,两两比较采用连续校正  $\chi^2$  检验;相关关系采用 Gamma 等级相关或 Spearman 相关分析。采用 SPSS 19.0 和 MedCalc12.7 软件对数据进行统计学处理,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组患者实验室检测结果比较 各组患者的性别、年龄、OxS 参数和基因检测结果比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。经单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验分析显示,患者 OxS 参数 TOS( $Z=1.547, P=$

$0.017$ )、TAS( $Z=1.702, P=0.006$ )和 OSI( $Z=2.034, P=0.042$ )检测结果均非正态分布。本组 296 例肝病患者感染 HBV 分为 B 型 213 例(72.0%)和 C 型 83 例(28.0%);HBV 发生耐药突变 89/296 例(30.1%),其中 B 基因型占 64/296 例(21.6%),C 基因型占 25/296 例(8.5%)。各组患者随疾病的严重程度加深(CHB 组<HBC 组<HCC 组),其耐药突变发生率增大,CHB、HBC、HCC 组的发生率分别为 11.7%、41.6%、60.0%。除外性别,采用 Spearman 或 Gamma 等级相关分析其余各观察指标与 HBV 感染后疾病严重程度之间的关系,结果显示均有明显的相关关系( $P<0.05$ ),其中 TAS 呈负相关,其他各指标呈正相关。见表 1。

表 1 各组患者实验室检测结果比较

| 项目                                                                               | 总体                                  | CHB 组( $n=145$ )                    | HBC 组( $n=101$ )                    | HCC 组( $n=50$ )                     | $\chi^2/F,P$ | $r,P$       |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|-------------|
| 男/女( $n/n$ )                                                                     | 232/64                              | 108/37                              | 88/13                               | 36/14                               | 7.062,0.029  | —           |
| 年龄[ $\bar{x}\pm s, M(\min, \max)$ , 岁]                                           | 42.4 $\pm$ 13.5<br>42.0(15.0, 73.0) | 39.5 $\pm$ 15.0<br>40.0(15.0, 72.0) | 46.6 $\pm$ 11.4<br>45.0(21.0, 73.0) | 42.3 $\pm$ 10.7<br>43.0(20.0, 62.0) | 8.804,<0.01  | 0.181,0.01  |
| TOS[ $\bar{x}\pm s, M(\min, \max)$ , $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq./L}$ ] | 25.2 $\pm$ 5.8<br>24.7(15.4, 38.5)  | 23.9 $\pm$ 4.8<br>23.5(15.8, 36.6)  | 25.4 $\pm$ 5.75<br>25.3(15.4, 35.3) | 28.9 $\pm$ 6.8<br>29.9(16.1, 38.5)  | 17.384,<0.01 | 0.251,<0.01 |
| TAS[ $\bar{x}\pm s, M(\min, \max)$ , mmol TroloxEq./L]                           | 1.33 $\pm$ 0.27<br>1.33(0.82, 1.86) | 1.37 $\pm$ 0.25<br>1.39(0.82, 1.83) | 1.33 $\pm$ 0.28<br>1.31(0.86, 1.86) | 1.23 $\pm$ 0.26<br>1.15(0.89, 1.86) | 21.407,<0.01 | −0.172,0.03 |
| OSI[ $\bar{x}\pm s, M(\min, \max)$ ]                                             | 1.98 $\pm$ 0.64<br>1.92(0.89, 3.69) | 1.81 $\pm$ 0.52<br>1.79(0.91, 3.45) | 2.00 $\pm$ 0.64<br>1.95(0.89, 3.64) | 2.49 $\pm$ 0.86<br>2.40(0.91, 3.69) | 21.753,<0.01 | 0.250,<0.01 |
| B/C 型( $n/n$ )                                                                   | 213/83                              | 121/24                              | 72/29                               | 20/30                               | 34.818,<0.01 | 0.539,<0.01 |
| 耐药突变[ $n(\%)$ ]                                                                  | 89(30.1)                            | 17(11.7)                            | 42(41.6)                            | 30(60.0)                            | 50.879,<0.01 | 0.668,<0.01 |

注:—表示无数据

2.2 各组患者 HBV 感染状况及 OxS 结果比较 TAS 在 CHB、HBC 组之间差异无统计学意义( $Z=1.135, P=0.152$ ),但在 CHB、HCC 组( $Z=2.611, P<0.01$ )和 HBC、HCC 组( $Z=1.980, P=0.001$ )之间比较,差异有统计学意义;TOS 和 OSI,以及 HBV 基因型分布和耐药突变率在任意 2 组患者之间比较,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 各组患者之间的结果比较( $\chi^2/Z,P$ )

| 项目    | CHB vs. HBC  | CHB vs. HCC  | HBC vs. HCC  |
|-------|--------------|--------------|--------------|
| TOS   | 1.513,0.021  | 2.569,<0.01  | 1.694,0.006  |
| TAS   | 1.135,0.152  | 2.611,<0.01  | 1.980,0.001  |
| OSI   | 1.409,0.038  | 2.679,<0.01  | 1.967,0.001  |
| B/C 型 | 4.514,0.034  | 32.915,<0.01 | 12.469,<0.01 |
| 耐药突变  | 27.500,<0.01 | 44.764,<0.01 | 4.547,0.033  |

2.3 各组患者 HBV 耐药基因突变结果比较 8 种耐药突变基因在 CHB 患者中的突变率相近(2.1%~5.5%);HBC 患者以 rt207V(13.9%)和 rt250M(13.9%)突变率最高;HCC 患者以 rt204M(36.0%)突变率最高,其次为 rt180L(16.0%)。3 组患者 rt180L、rt204M、rt207V、rt236N、rt250M 突变率比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),rt181A、rt184T、rt202S 突变率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。Gam-

ma 相关分析显示,rt180L、rt184T、rt204M、rt207V 突变率与病情严重程度相关,其中 rt180L( $r=0.494, P=0.009$ )、rt204M( $r=0.790, P<0.01$ )和 rt207V( $r=0.373, P=0.047$ )突变率呈明显的正相关,rt184T 呈负相关( $r=-1.000, P=0.013$ )。89 例 HBV 耐药突变患者中,突变位点数在 1~7 个,将其按 0、1、2 个或多个( $\geq 3$ )突变位点进行分组,经 Gamma 相关分析显示,突变位点数与 HBV 感染后病情严重程度呈正相关( $r=0.614, P<0.01$ )。见表 3。

2.4 HBV 基因分型或耐药突变各组患者血清 OxS 结果比较 C 基因型与 B 基因型 HBV 感染患者比较,TOS 水平在肝病各组,即 CHB 组( $Z=1.691, P=0.007$ )、HBC 组( $Z=1.461, P=0.028$ )、HCC 组( $Z=1.443, P=0.031$ )均升高;OSI 水平在 CHB 组( $Z=2.019, P=0.001$ )和 HBC 组( $Z=1.431, P=0.033$ )升高,但在 HCC 组差异无统计学意义( $Z=1.155, P=0.139$ );TAS 水平仅在 CHB 组降低( $Z=1.586, P=0.013$ ),在 HBC 组( $Z=1.124, P=0.160$ )和 HCC 组( $Z=0.693, P=0.723$ )间差异无统计学意义( $P<0.05$ )。有突变患者与无突变患者比较,TOS、OSI 水平在各组均明显升高,其中 TOS 结果显示:CHB 组( $Z=1.605, P=0.012$ )、HBC 组( $Z=1.845, P=0.002$ )、HCC 组( $Z=2.309, P<0.01$ );OSI 结果显示:CHB 组( $Z=1.997, P=0.0011$ )、HBC 组( $Z=$

1.711,  $P=0.006$ )、HCC 组 ( $Z=2.021, P=0.001$ ); 各组 TAS 水平仅在 CHB 组降低 ( $Z=1.467, P=0.027$ ), 而在 HBC 组 ( $Z=1.083, P=0.191$ ) 和 HCC 组 ( $Z=1.212, P=0.106$ ) 差异无统计学意义 ( $P<0.05$ )。

2.5 HBV 基因耐药突变与患者 OxS 参数的相关

表 3 不同肝病患者 HBV 感染 8 个耐药基因突变率 [ $n(\%)$ ]

| 项目     | 总例数( $n=296$ ) | CHB( $n=145$ ) | HBC( $n=101$ ) | HCC( $n=50$ ) | $\chi^2, P$   | $r, P$        |
|--------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| 基因位点   |                |                |                |               |               |               |
| rt180L | 21(7.1)        | 5(3.4)         | 8(7.9)         | 8(16.0)       | 8.412, 0.012  | 0.494, 0.009  |
| rt181A | 14(4.7)        | 3(2.1)         | 7(6.9)         | 4(8.0)        | 4.968, 0.081  | 0.446, 0.054  |
| rt184T | 6(2.0)         | 6(4.1)         | 0(0.0)         | 0(0.0)        | 5.020, 0.061  | -1.000, 0.013 |
| rt202S | 14(4.7)        | 8(5.5)         | 4(4.0)         | 2(4.0)        | 0.342, 0.933  | -0.142, 0.574 |
| rt204M | 29(9.8)        | 3(2.1)         | 8(7.9)         | 18(36.0)      | 38.706, <0.01 | 0.790, <0.01  |
| rt207V | 23(7.8)        | 5(3.4)         | 14(13.9)       | 4(8.0)        | 8.871, 0.009  | 0.373, 0.047  |
| rt236N | 18(6.1)        | 4(2.8)         | 10(9.9)        | 4(8.0)        | 6.002, 0.044  | 0.397, 0.058  |
| rt250M | 19(6.4)        | 3(2.1)         | 14(13.9)       | 2(4.0)        | 13.099, 0.001 | 0.389, 0.055  |
| 突变位点数  |                |                |                |               |               |               |
| 0 个    | 207(69.9)      | 128(88.3)      | 59(58.4)       | 20(40.0)      | 60.176, <0.01 | 0.614, <0.01  |
| 1 个    | 63(21.3)       | 12(8.3)        | 31(30.7)       | 20(40.0)      |               |               |
| 2 个    | 12(4.1)        | 1(0.7)         | 3(3.0)         | 8(16.0)       |               |               |
| ≥3 个   | 14(4.7)        | 4(2.7)         | 8(7.9)         | 2(4.0)        |               |               |

表 4 各组患者血清 OxS 参数和耐药突变发生与否的相关性 ( $r, P$ )

| 组别    | TOS          | TAS           | OSI          |
|-------|--------------|---------------|--------------|
| 总计    | 0.476, <0.01 | -0.249, <0.01 | 0.441, <0.01 |
| CHB 组 | 0.310, <0.01 | -0.176, 0.034 | 0.328, <0.01 |
| HBC 组 | 0.391, <0.01 | -0.143, 0.154 | 0.314, 0.001 |
| HCC 组 | 0.661, <0.01 | -0.280, 0.049 | 0.613, <0.01 |

3 讨 论

HBV 感染是一个世界性公众健康问题,其感染机体后,HBsAg 持续保存 6 个月及以上即为 CHB<sup>[3]</sup>。CHB 反应促进肝纤维疤痕形成,肝纤维化从门管区轻度纤维增生到周围星芒状纤维条束,桥样纤维化,直至肝硬化。因此,炎性反应伴随 CHB 发展的一切病理过程。很多研究证实,HBV 持续感染可促进患者的 OxS 反应,从而引起患者基因改变及表达异常,进一步导致患者氧化/抗氧化平衡破坏,致使疾病恶化向 HBC 和/或 HCC 发展<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,CHB、HBC、HCC 组患者 OxS 状态比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),且随疾病的严重程度加深(通常情况下,按 CHB<HBC<HCC 顺序,疾病加重)而加大,提示 OxS 反应与慢性肝病的发展密切相关。

目前共发现 A、B、C、D、E、F、G、H、I 共 9 种 HBV 基因型<sup>[8]</sup>。流行病学调查显示中国已发现 A~H 共 8 种基因型,其中以 B、C 型为主,其次为 D 型,其极

性 Spearman 相关分析结果显示,各组患者 HBV 感染后耐药突变与 TOS ( $r=0.476, P<0.01$ ) 和 OSI ( $r=0.441, P<0.01$ ) 呈正相关,与 TAS ( $r=-0.249, P<0.01$ ) 呈负相关(除外 HBC 组)。见表 4。

少<sup>[9]</sup>。本组 296 例 HBV 感染患者,仅检出 B、C 型 2 种基因型,未发现其他类型,可能与选择的病例多为较严重的慢性肝病有关,但提示四川地区与我国 HBV 基因型分布特征基本一致。大量研究表明,B、C 型与重症肝病有关,且 C 型较 B 型更加严重<sup>[10]</sup>。这也可能是本研究仅检出 B、C 型 2 种基因型的原因。本组研究结果显示,按疾病严重程度 CHB<HBC<HCC 顺序,C 型所占比例逐渐增加,证实本实验结果与实际相吻合。C 型 HBV 感染患者,其血清 TOS 水平在所有疾病阶段均明显高于 B 型,而血清 TAS 水平仅在 CHB 阶段明显低于 B 型,同时 HBV 基因型分布与病情程度相关 ( $P<0.01$ ),说明 C 型 HBV 感染患者,机体 OxS 状态改变更加明显,即氧化物质产生更多,抗氧化物质消耗更大,导致 OxS 反应更活跃,这可能也是 C 型 HBV 感染者更易发生 HBC 和/或 HCC 的重要原因。

HBV 感染后可通过多种途径逃逸免疫系统的免疫应答,使之在体内长期存在,导致 CHB 发生。基因突变是 HBV 引起免疫逃逸最主要和最根本的原因。本研究 296 例 HBV 感染患者,按不同疾病分组后发生突变的患者,其血清 TOS 水平均高于未发生突变患者;TAS 水平均低于未发生突变患者,虽然仅 CHB 患者差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),但 OSI 水平均高于未发生突变的患者,而且从 CHB 经 HBC 到 HCC 发展过程中,患者的耐药突变均与血清 TOS、OSI 水

平呈正相关,与血清 TAS 水平呈负相关(HBC 患者差异无统计学意义,可能与样本数和/或抽样有关)。研究结果表明,HBV 感染患者氧化物质积累和/或抗氧化物质消耗,与 HBV 基因变异密切相关。推测其原因,可能感染 HBV 后,因免疫防护激活 OxS 反应,在其炎性状态下,一方面通过氧化损伤引起 HBV 耐药基因突变发生,以逃逸机体免疫应答;另一方面,可增强其对药物的抵抗,以达到自由复制并长期存在的目的<sup>[11]</sup>。结果是进一步加剧患者氧化/抗氧化平衡破坏,加大 OxS 反应,加重对组织细胞的氧化损伤,进而促进疾病加重,即向 HBC 和/或 HCC 发展<sup>[12-14]</sup>。

本研究进一步分析,所检测的 8 个耐药基因位点中,rt180L、rt204M、rt207V、rt236N、rt250M 突变率在各组之间的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 rt180L、rt204M、rt207V 位点突变率与病情严重程度呈正相关,其中 rt204M 的相关系数  $r$  高达 0.790,提示 HBV 位点突变,特别是 rt204M 位点突变,是否有可能是 HBV 感染患者致 HBC 和/或 HCC 发生的潜在因素,值得进一步研究证实。对耐药突变位点个数的统计分析表明,HBV 感染后其突变位点数与病情发展程度呈明显正相关( $r = 0.614, P < 0.001$ ),说明随 CHB 向 HBC 和/或 HCC 发展,患者 OxS 反应逐渐增强,以应答 HBV 感染所致炎性反应,而 HBV 为逃逸机体免疫应答,其基因组不稳定性更加突出,基因位点随之发生多元化突变<sup>[15-19]</sup>。

综上所述,OxS 反应可能是 CHB 患者病情发展及 HBV 基因在感染者体内变异的重要机制。但 OxS 与 HBV 基因突变之间的原因和结果,或者两者兼而有之,以共同促进 HBV 感染后肝病的发生与发展,因未连续观察患者的疾病进程,以致本研究对此问题难以解答,需进一步的实验研究。

## 参考文献

- [1] CUI Y, JIA J. Update on epidemiology of hepatitis B and C in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1):7-10.
- [2] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6):2099-2108.
- [3] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection[M]. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [4] DONG H, QIAN Z, ZHANG L, et al. Genomic and transcriptome profiling identified both human and HBV genetic variations and their interactions in Chinese hepatocellular carcinoma[J]. Genomics Data, 2015, 6(6):1-3.
- [5] LEE D, LYU H, CHUNG Y H, et al. Genomic change in hepatitis B virus associated with development of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22

- (23):5393-5399.
- [6] ZHANG X, DING H G. Key role of hepatitis B virus mutation in chronic hepatitis B development to hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2015, 7(9):1282-1286.
- [7] WANG Y, ZENG L I, CHEN W. HBV X gene point mutations are associated with the risk of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(6):1045-1051.
- [8] RUNYON BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: update 2012[M]. Alexandria (VA): American Association for the Study of Liver Diseases, 2013.
- [9] BENSON A B, MALAFA M P, SINGH G, et al. Hepatobiliary cancers, Version 2. 2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[S]. NCCN, 2016.
- [10] FENG J F, LU L, DAI C M, et al. Analysis of the diagnostic efficiency of serum oxidative stress parameters in patients with breast cancer at various clinical stages[J]. Clin Biochem, 2016, 49(9):692-698.
- [11] SHOMALI S, AVVAL F Z, BOOSTANI R, et al. Serum total antioxidant capacity status of HTLV-1 infected patients[J]. Acta Virol, 2015, 59(2):199-203.
- [12] LEE H, KIM H, LEE S A, et al. Upregulation of endoplasmic reticulum stress and reactive Oxygen species by naturally occurring mutations in hepatitis B virus core antigen[J]. J Gen Virol, 2015, 96(Pt 7):1850-1854.
- [13] SUKOWATI C H, EL-KHOBAR K E, IE S I, et al. Significance of hepatitis virus infection in the oncogenic initiation of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(4):1497-1512.
- [14] BELL T G, YOUSIF M, KRAMVIS A. Bioinformatic curation and alignment of genotyped hepatitis B virus(HBV) sequence data from the GenBank public database[J]. Springerplus, 2016, 5(1):1896.
- [15] SONG J E, KIM D Y. Diagnosis of hepatitis B[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(18):11-15.
- [16] SU C, LIN Y, CAI L, et al. Association between mannose-binding lectin variants, haplotypes and risk of hepatocellular carcinoma: A case-control study[J]. Sci Rep, 2016, 6(3):321-330.
- [17] TAROCCHI M, POLVANI S, MARRONCINI G, et al. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(33):11630-11640.
- [18] HOLLINGWORTH R, GRAND R J. Modulation of DNA damage and repair pathways by human tumour viruses[J]. Viruses, 2015, 7(5):2542-2591.
- [19] TAN L, MEIER T, KUHLMANN M, et al. Distinct set of chromosomal aberrations in childhood hepatocellular carcinoma is correlated to hepatitis B virus infection[J]. Cancer Genet, 2016, 209(3):87-96.