

乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析

刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽

刘成永, 侯远沛, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽, 江苏省徐州市传染病医院检验科 江苏省徐州市 221004

高玉金, 杨友国, 江苏省徐州市传染病医院肝病科 江苏省徐州市 221004

通讯作者: 刘成永, 221004, 江苏省徐州市, 传染病医院检验科. liucy0913@126.com

电话: 0516-83668716 传真: 0516-83668717

收稿日期: 2006-04-15 接受日期: 2006-05-29

Analysis of hepatitis B virus genotypes and gene mutation in patients with family infection

Cheng-Yong Liu, Yu-Jin Gao, Yuan-Pei Hou, You-Guo Yang, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Li Song

Cheng-Yong Liu, Yuan-Pei Hou, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Li Song, Clinical Laboratory of Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Yu-Jin Gao, You-Guo Yang, Department of Hepatology, Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Cheng-Yong Liu, Clinical Laboratory of Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. liucy0913@126.com

Received: 2006-04-15 Accepted: 2006-05-29

Abstract

AIM: To investigate the genotypes and gene mutation of hepatitis B virus (HBV) in family infection.

METHODS: Eighty-four members from 27 families, whose internal genotypes were completely the same, were selected, including 29 cases of asymptomatic HBV carriers (ASC), 23 cases of chronic active hepatitis (CAH), 21 cases of liver cirrhosis (LC) and 11 cases of hepatocellular carcinoma (HCC). Gene chip technique was applied to detect the mutation in HBV pre-core region (nt1896), and basic core promoter (BCP, nt1762, nt1764) and DNA sequencing technique was used to detect the genotypes of HBV. The control group of corresponding genotypes was also designed.

RESULTS: The rate of ASC with genotype B

family infection was significantly higher than that with genotype C infection ($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$), but the rate of BCP1762 and 1764 double mutation was significantly lower than that with genotype C ($\chi^2 = 22.4000$, $P = 0.0000$, $P < 0.001$). The clinical types of patients with genotype B and C family infection were not significantly different from those of the corresponding controls.

CONCLUSION: It is helpful to detect the genotypes and BCP1762, 1764 double mutation of HBV in family infection in the predictive analysis of the disease.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Mutation; Family infection

Liu CY, Gao YJ, Hou YP, Yang YG, Qian XM, Sun Q, Song L. Analysis of hepatitis B virus genotypes and gene mutation in patients with family infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1833-1835

摘要

目的: 研究HBV家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征。

方法: 选择HBV聚集性感染家族成员内部基因型完全相同的共27个家族84人, 其中HBV携带者(ASC)29例; 慢性活动性肝炎(CAH)23例; 肝硬化(LC)21例; 肝细胞癌(HCC)11例; 用基因芯片法检验前C1896和BCP1762, 1764双突变; 用测序法检验HBV基因型, 并设相应基因型的HBV感染对照组。

结果: B型HBV家族聚集感染者ASC率显著大于C型家族($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$); 其BCP1762, 1764双突变的发生率也显著低于C基因型($\chi^2 = 22.4000$, $P = 0.0000$, $P < 0.001$)。两种基因型的家族聚集感染者组与相应的对照组相比在疾病临床类型方面均无显著差异。

结论: 检验HBV家族聚集感染者的基因型和/或BCP区1762、1764基因的双突变可以协助

■背景资料

乙型肝炎病毒基因型是S区基因长期的点突变累积而成的, 并根据其S基因序列的同源性, 分为A、B、C、D、E、F等基因型, 乙型肝炎病毒基因型的分布有独特的地理特征。HBV引起肝损伤的过程受宿主、病毒等多个因素影响。由于病毒基因控制着抗原的表达, 不同毒株出现某些变异的频率不同, 对机体的免疫清除能力也不同。已有许多作者研究证实HBV基因型以及C、P、X读码框架区内其他位点的变异对乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病的预后等都有一定的影响。

■研发前沿

对于乙型肝炎病毒基因型、各种位点变异检测方法的研究是个重点,因为只有方法的更先进、更敏感、更易于操作才能够以多方位、大样本量的数据进一步阐明其意义。对于乙肝病毒基因型和部分位点变异与乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病预后的关系等等,是目前的研究热点,已经有大量的研究报告。

■创新盘点

与其他研究相比较,本文注重于研究HBV家族聚集性感染的基因型和部分重要位点的变异特征,以此方面探讨家族聚集感染者的发病规律和病后转归以及不同临床表现及发生机制,其他的文章未见报道。

疾病的预测分析。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 变异; 家族聚集感染

刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽. 乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1833-1835

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1833.asp>

0 引言

HBV引起肝损伤的过程受宿主、病毒等多个因素影响。由于病毒基因控制着抗原的表达,不同毒株出现某些变异的频率不同,对机体的免疫清除能力也不同。已有许多作者研究证实HBV基因型以及C, P, X读码框架区内其他位点的变异对乙型肝炎病毒(HBV)感染后的自然病史、疾病的严重程度^[1]、抗病毒药物的敏感程度^[2-3]、病毒标志物的血清学转换^[4]以及疾病的预后等都有一定的影响^[5],被证实是病毒与宿主相互作用的重要影响因素。我们用这些成果来研究HBV家族聚集性感染,期望能够解释一些家族聚集性感染的不同临床表现及发生机制如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择具有家族聚集感染特征家族30个,所谓家族聚集性乙型肝炎,是指乙肝患者的父亲或母亲以及同胞中有2个以上感染了HBV,并包括家庭内水平传播和垂直传播,且HBV DNA结果 $\geq 1.00 \times 10^7$ copies/L,去除基因型或基因变异检测失败的病例,共94例,其中HBV携带者(ASC) 30例;慢性活动性肝炎(CAH) 27例;肝硬化(LC) 29例;肝细胞癌(HCC) 8例;所选病例无急性肝炎,故不列表分析。选择无明显家族聚集性的B和C型HBV感染者各50例做对照分析,其诊断均符合2000年第10次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案^[6]。取新鲜或-20℃冰冻贮存血清。

1.2 方法

HBV DNA定量检查用Roche Lightcycler荧光定量扩增仪,试剂由深圳匹基公司提供,结果 $\geq 1.00 \times 10^7$ copies/L为阳性;HBV基因分型方法用测序的方法,分析步骤:(1)抽提核酸,取血清标本50 μ L,加入50 μ L核酸提取液,振荡10 s,99℃干浴或水浴10 min,13 000 r/min离心10 min,保留上清备用;(2)PCR扩增,以上述抽提的核酸为模板,分别加入引物B61, B62和PCR mix反应液进行扩增;(3)测序, B61作为测

表 1 B型和C型家族84人临床类型分析n (%)

类别	n	ASC(n: 29)	CAH(n: 23)	LC(n: 21)	HCC(n: 11)
B型家族	21	12(57.1)	5(23.8)	3(14.3)	1(4.8)
C型家族	63	17(27.0)	18(28.6)	18(28.6)	10(15.9)
B型对照	50	24(48.0)	11(22.0)	9(18.0)	6(12.0)
C型对照	50	7(16.0)	12(24.0)	22(44.0)	9(18.0)

表 2 前C区1896和BCP1762, 1764双突变状况n (%)

类别	n	前C区1896	1762和1764双突变
B型家族	21	12 (57.1)	4 (19.0)
C型家族	63	42 (66.7)	50 (79.4)
B型对照	50	32 (64.0)	13 (26.0)
C型对照	50	33 (66.0)	38 (76.0)

序引物,用测序仪Mgeabace-500进行测序;(4)分析,测序分析软件为Chromas,序列比对软件为Clustalx,由上海之江生物科技有限公司协助完成。HBV基因变异的检测用基因芯片的方法,HBV基因多态性分析芯片由宁波瑞芯生物科技有限公司提供。

统计学处理 用PEMS 3.1软件统计分析。

2 结果

家族成员内部基因型完全相同的共27个家族84人;其中B型和C型(表1)分别为21人和63人(25.0%和75.0%),其余3个家族均检出不同基因型。B型家族ASC率大于C型家族($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$);B型家族LC率和CAH率均小于C型家族($\chi^2 = 1.0370$ 和 0.0200 , $P = 0.3085$ 和 0.8877 ; $P > 0.05$)。B型家族与B型对照组相比,其ASC, CAH, LC率均无显著性差异($\chi^2 = 0.1964$, 0.0209 和 0.0021 , $P = 0.6576$, 0.8850 和 0.9727 , P 值均 > 0.05)。C型家族ASC率和CAH率均大于C型对照组($\chi^2 = 2.0868$ 和 0.1103 , $P = 0.1486$ 和 0.7398 , $P > 0.05$);LC率小于对照组($\chi^2 = 2.2663$, $P = 0.1322$, $P > 0.05$)。B型对照ASC率大于C对照组($\chi^2 = 11.9682$, $P = 0.0005$, $P < 0.001$),差异显著;而LC率小于对照组($\chi^2 = 6.7321$, $P = 0.0095$, $P > 0.05$)。

1762和1764双突变两种基因型家族与对照组相比均无显著差异($\chi^2 = 0.1036$ 和 0.0400 , $P = 0.7476$ 和 0.8416 , P 值均 > 0.05)。而两种家族之间和两组对照之间相比差异显著($\chi^2 = 22.4000$ 和 23.0492 , $P = 0.0000$ 和 0.0000 , $P < 0.001$, 表2)。前C区1896变异率各组相近。

3 讨论

乙型肝炎病毒基因型是S区基因长期的点突变累积而成的, 并根据其S基因序列的同源性, 分为A、B、C、D、E、F等基因型, 许多研究表明, 基因型对乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病的预后等都有一定的影响^[8]; 乙型肝炎病毒基因型的分布也有独特的地理特征^[7], 我国大部分地区以B和C型为主, 例如作者所处徐州地区主要为B、C型, 且有部分D型和由B、C、D组成的混合型^[9]. 目前认为, 不同地区的优势基因型反映了HBV自然史发生的变异特点, 是病毒变异后进化的结果. 根据HBV基因型和一些重要位点变异的不同, 许多作者进行了对乙型肝炎的诊断和治疗的个性化的论述^[10]. 本文对HBV家族聚集感染的基因型特征以及部分重要位点的基因变异特征^[13-14]进行研究, 发现在30个家族中有27个家族的HBV基因型是相同的, 说明了家族聚集感染的特征途径, 从其中84个成员的基因型检测结果来看, B型者25%, 而C型者75%, 与本地域的报道相近, 但可能因病例的选择问题, 未检出其他型. B型家族聚集感染者ASC率显著大于C型家族, 较严重的肝脏损害低于C型者, B和C型对照组情况也类似, 这与两种基因型的致病特征有关, B基因型与C型相比更倾向于温和的感染^[11], 其BCP1762, 1764双突变的发生率也显著低于C基因型, C基因型更易于向严重方向发展, 而双突变发生后复制能力增强, HBeAg表达减少, HBeAg和HBcAg有共同的表位^[12], 后者在体内更易诱发强烈的免疫反应, 加重肝脏损害^[15]. 因此基因型C和BCP1762, 1764双突变相辅相成, 加重肝脏损害.

两种基因型的家族聚集感染者组与相应的对照组相比在疾病临床类型方面均无显著差异, 以C型家族聚集感染者与对照组相比, 虽然其ASC率高于和HLC率低于对照组, 但并不能说明家族聚集感染HBV能有更稳定的感染状态和更不易于肝损害严重化. 这从BCP1762, 1764双突变的发生率来看, 也只有基因型的差异, 而无聚集感染与否的差异.

总之, 家族性聚集感染和非家族性聚集感染临床类型差异不大, B基因型HBV家族聚集感染者发病情况和肝损害程度显著低于C型者, 因此对于HBV家族聚集感染者, 检查基因型和/或BCP区1762, 1764基因的双突变可以协助疾病的预测分析.

4 参考文献

- 1 许军, 王齐欣, 蒋栋, 杨柳明, 赵延龙, 陈红松, 魏来, 王宇. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 11-13
- 2 许正锯, 杨红, 张启华, 陈先礼, 李树清, 王崇国. 乙型肝炎病毒基因型与拉米夫定疗效关系的研究. 临床肝胆病杂志 2005; 21: 157-158
- 3 周建良, 吴诗品. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒B、C基因型疗效比较. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 489-490
- 4 徐蓓, 姚光弼, 程新建, 朱玫. 乙型肝炎病毒基因型对拉米夫定长期疗效影响的评估. 肝脏 2005; 10: 76-78
- 5 侯金林, 曾国兵. 乙型肝炎病毒基因型流行病学与临床. 中华内科杂志 2005; 44: 707-708
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案(2000年西安). 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 7 Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 50-57
- 8 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 刘芳, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉. 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. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2823-2827
- 9 刘成永, 杨友国, 梅存金, 钱秀梅, 宋丽, 孙庆. 徐州地区乙型肝炎病毒基因型分布及其意义. 中华微生物学和免疫学杂志 2004; 24: 432
- 10 许红梅, 任红. 乙型肝炎病毒基因型的分子生物学及临床意义. 国外医学·流行病学与传染病学分册 2003; 30: 20-22
- 11 魏来. 乙型肝炎病毒的基因型: 研究的进展, 临床的方向. 中华医学杂志 2005; 85: 1160-1162
- 12 房继莲, 丛旭, 李若冰, 许军, Sablon E, 孙焱, 王豪, 王宇, 魏来. 乙型肝炎病毒基本核心启动子及前C区突变对疾病进展的影响. 中国实用内科杂志 2005; 25: 233-235
- 13 Fang ZL, Yang J, Ge X, Zhuang H, Gong J, Li R, Ling R, Harrison TJ. Core promoter mutations (A(1762)T and G(1764)A) and viral genotype in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Med Virol* 2002; 68: 33-40
- 14 Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002; 37: 355-363
- 15 Nishizono A, Kohno K, Takita-Sonoda Y, Hiraga M, Terao H, Fujioka T, Nasu M, Mifune K. Sequential analyses of the mutations in the core upstream and precore regions of hepatitis B virus genome in anti-HBe positive-carriers developing acute exacerbation. *J Med Virol* 1997; 53: 266-272

■应用要点

本研究发现家族性聚集感染和非家族性聚集感染临床类型差异不大, B基因型HBV家族聚集感染者发病情况和肝损害程度显著低于C型者, 因此对于HBV家族聚集感染者, 检查基因型和/或BCP区1762, 1764基因的双突变可以协助疾病的预测分析.

■同行评价

本文提出了乙型肝炎家族聚集倾向, 分析有科学性.

电编 张敏 编辑 潘伯荣