

延边地区朝鲜族乙型肝炎病毒感染者病毒基因型的检测与分析

韩学吉, 许顺姬, 倪光华, 崔鹤松, 朴红心

韩学吉, 朴红心, 崔鹤松, 延边大学医院感染科 吉林省延吉市 133000

许顺姬, 延边大学附属医院检验科 吉林省延吉市 133000

倪光华, 延边大学附属医院肝胆外科 吉林省延吉市 133000

留学回国博士启动基金资助项目, No. 教外司留[2004]527

作者贡献分布: 韩学吉与许顺姬对此文所作贡献均等; 此课题由韩学吉与许顺姬设计; 研究过程由韩学吉, 许顺姬, 倪光华, 崔鹤松及朴红心操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许顺姬提供; 数据分析由韩学吉与倪光华完成; 本论文写作由韩学吉与许顺姬完成。

通讯作者: 许顺姬, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学附属医院检验科. xsj1218@yahoo.com.cn

电话: 0433-2670803

收稿日期: 2008-01-20 修回日期: 2008-07-08

接受日期: 2008-07-10 在线出版日期: 2008-08-08

Inspection and analysis of hepatitis B virus genotypes among the korean nationality of Yanbian area in China

Xue-Ji Han, Shun-Ji Xu, Guang-Hua Xie, He-Song Cui, Hong-Xin Piao

Xue-Ji Han, He-Song Cui, Hong-Xin Piao, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Shun-Ji Xu, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Guang-Hua Xie, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Supported by: the the Returned Overseas Chinese Doctors Start-up Funds from Education Ministry of China, No. [2004]527

Correspondence to: Shun-Ji Xu, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China. xsj1218@yahoo.com.cn

Received: 2008-01-20 Revised: 2008-07-08

Accepted: 2008-07-10 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the distribution and clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes among the Korean Chinese of Yanbian area in China.

METHODS: A total of 215 Korean Chinese with HBV infection in Yanbian area included symptomatic carrier (SC, $n = 36$), acute hepatitis B

(AHB, $n = 5$), chronic hepatitis B (CHB, $n = 106$), hepatitis-induced cirrhosis (HC, $n = 50$), and primary hepatic carcinoma (HCC, $n = 18$). Specific primer-polymerase chain reaction was used to detect the HBV genotypes in this cases.

RESULTS: Of the 215 cases, genotype B and C were found in 61 (28.0%) and 154 (72.0%) cases, respectively. The ratio of genotype C was markedly higher in CHB (79.0%), HC (84.0%), HCC (89.0%) than that in SC (25.0%) and AHB (60.0%), respectively ($P < 0.05$). In SC, the proportion of genotype B was significantly higher than that of genotype C (75.0% vs 25.0%, $P < 0.01$). The rate of genotype C was higher in the HBeAg-positive cases than that in the HBeAg-negative cases (73.0% vs 54.0%, $P < 0.05$), but the rate of genotype B was the other way around (46.0% vs 27.0%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Genotype C HBV infection is predominant in the Korean Chinese of Yanbian area in China, and genotype B is the second. Genotype C is mostly found in CHB, HC and HCC.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Chronic hepatitis B; Hepatitis-induced cirrhosis; Primary hepatic carcinoma

Han XJ, Xu SJ, Xie GH, Cui HS, Piao HX. Inspection and analysis of hepatitis B virus genotypes among the korean nationality of Yanbian area in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(22): 2529-2532

摘要

目的: 分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布及其临床意义。

方法: 延边地区朝鲜族HBV感染者215例分为无症状携带者36例, 急性乙型肝炎5例, 慢性乙型肝炎106例, 肝炎肝硬化50例, 原发性肝癌18例。利用特异性引物聚合酶链反应法(PCR), 对患者血清标本进行基因型检测。

■背景资料

目前研究表明HBV各地病毒株有差异并根据核苷酸序列的差异分为A-H 8个基因型。另外, 有研究表明, HBV基因型与感染途径、感染谱和疾病进展有一定相关性。本文分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布, 这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者的HBV基因类型的分布情况, 以及判断病情发展及预后, 推测抗病毒疗效提供理论依据, 具有重要意义。

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■相关报道

目前已有报道肝病发生、发展与患者的遗传基因、病毒的基因类型有密切关系。HBV基因类型有高风险地区分布特异性。另外, HBV基因类型与肝病的临床类型、病情发展经过、病情轻重、抗病毒疗效有密切联系。

结果: 215例HBV感染者中检出B基因型61例(28.0%), C基因型154例(72.0%), 未检出其他基因型。在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中, C基因型比例(79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(25.0%、60.0%, $P<0.01$), 在无症状携带者中, B基因型比例高于C基因型(75.0% vs 25.0%, $P<0.01$)。HBeAg阳性组C基因型比例高于HBeAg阴性感染组(73.0% vs 54.0%, $P<0.05$), HBeAg阴性组的B基因型比例高于HBeAg阳性组(46.0% vs 27.0%, $P<0.01$)。

结论: 延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型, 其次为B基因型。C基因型在临床上以慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌多见, 其发生率显著高于B基因型。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 慢性乙型肝炎; 肝炎肝硬化; 肝细胞癌

韩学吉, 许顺姬, 倪光华, 崔鹤松, 朴红心. 延边地区朝鲜族乙型肝炎病毒感染者病毒基因型的检测与分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2529-2532

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2529.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个全球性问题, 严重影响我国人民的健康, 目前研究表明HBV各地病毒株有差异并根据核苷酸序列的差异分为A-H共8个基因型。另外, 有研究表明, HBV基因型与感染途径、感染谱和疾病进展有一定相关性^[1-4]。本研究利用特异性引物聚合酶链反应法(PCR)分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布, 这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型的分布情况, 以及判断病情发展及预后, 推测抗病毒疗效提供理论依据, 具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 采集2005-07/2007-11延边大学附属医院收治的延边地区朝鲜族HBV感染者血清标本215例, 男164例, 女51例, 年龄19-72岁。按2000年[病毒性肝炎防治方案]^[5]将215例分为无症状携带者36例, 急性乙型肝炎5例, 慢性乙型肝炎106例, 肝炎肝硬化50例, 原发性肝癌18例。ELISA试剂盒由上海华美生物技术有限公司生产。

1.2 方法 应用ELISA试剂盒检测HBeAg, 操作严格按说明书进行。用多对引物和巢式PCR法对HBV基因分型。将50 μ L待检血清加入到60 μ L裂

解液中, 混匀, 37℃水浴10 min, 加入30 μ L的Tris饱和酚和30 μ L的氯仿: 异戊醇(49: 1)溶液, 充分混匀后, 14 000 g 离心10 min, 取上清液, 加入等体积的异戊醇和10 μ L的醋酸钠溶液, -20℃沉淀2 h, 14 000 g 离心15 min, 弃上清液, 加入750 mL/L预冷乙醇500 μ L, 14 000 g 离心10 min, 弃上清液, 沉淀于50℃干燥后, 溶于20 μ L的DEPC水中, 保存在-20℃备用, 作为PCR反应的模板。采用40 μ L的反应体系(10 \times 缓冲液4 μ L, dNTP 4 μ L, MgCl₂ 2.4 μ L, p1 0.8 μ L, S4R 0.8 μ L, HBV DNA模板10 μ L, Taq酶 0.2 μ L, H₂O 17.8 μ L), 按95℃, 10 min; 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 1 min, 进行40个循环, 72℃延伸7 min, 然后取第一轮PCR产物作为模板进行第二轮扩增: 40 μ L的反应体系(10 \times 缓冲液4 μ L, dNTP 4 μ L, MgCl₂ 2.4 μ L, B2 0.8 μ L, BA1R 0.8 μ L, BB1R 0.8 μ L, BC1R 0.8 μ L, 或B2R 0.8 μ L, BD1 0.8 μ L, BE1 0.8 μ L, BF1 0.8 μ L, 第一轮PCR产物5 μ L, Taq酶0.4 μ L, H₂O 21 μ L), 按95℃, 10 min, 94℃ 20 s, 65℃ 20 s, 72℃ 30 s, 进行40个循环, 72℃延伸7 min, 然后取10 μ L的第二轮PCR产物在100 V电压下, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳20 min, 用凝胶成像仪观察电泳条带的大小, 以确定其基因型, A型为68 bp, B型为281 bp, C型为122 bp, D型为119 bp, E型为167 bp, F型为97 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 序列见表1。

统计学处理 应用统计分析软件进行 χ^2 检验。

2 结果

PCR产物在100 V电压下, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳20 min, 用凝胶成像仪观察电泳条带的大小, 以确定其基因型, B型为281 bp, C型为122 bp(图1)。215例延边地区朝鲜族HBV感染者中检出B基因型61例(28.0%), C基因型154例(72.0%), 未检出其他基因型。HBV基因型在不同类型HBV感染者中的分布差异有统计学意义, 在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中, C基因型比例(79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(25.0%、60.0%, $P<0.01$), 在无症状携带者中, B基因型比例(75.0%)高于C基因型(25.0%, $P<0.01$, 表2), HBeAg阳性组C基因型比例(73.0%)高于HBeAg阴性感染组(54.0%, $P<0.05$), HBeAg阴性组的B基因型比例(46.0%)高于HBeAg阳性组(27.0%, $P<0.01$, 表3)。

3 讨论

HBV是急、慢性肝炎, 肝硬变以及肝癌的主要

表 1 引物序列

| 基因型 | PCR | 正义链 | 反义链 |
|-----|--------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| A-F | 1stPCR | P1: 5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3' | S4R:5'-AGAAGATGAGGCATAGCAGC-3' |
| A | 2ndPCR | B2: 5'-GGCTCMAGTTCMGGAACAGT-3' | BA1R:5'-CTCGCGGAGATTGACGAGATGT-3' |
| B | | B2: 5'-GGCTCMAGTTCMGGAACAGT-3' | BB1R:5'-CAGGTTGGTGAGTGACTGGAGA-3' |
| C | | B2: 5'-GGCTCMAGTTCMGGAACAGT-3' | BC1R:5'-GGTCCTAGGAATCCTGATGTGT-3' |
| D | | BD1: 5'-GCCAACAAGGTAGGAGCT-3' | B2R:5'-GGAGGCGGATYTGTGGCAA-3' |
| E | | BE1: 5'-CACCAGAAATCCAGATTGGGACCA-3' | B2R:5'-GGAGGCGGATYTGTGGCAA-3' |
| F | | BF1: 5'-GYTACGGTCCAGGGTTCACA-3' | B2R:5'-GGAGGCGGATYTGTGGCAA-3' |

M: A或C; Y: C或T.

表 2 不同类型HBV感染者中HBV基因型分布 *n*(%)

| 分组 | <i>n</i> | B型 | C型 |
|--------|----------|----------|----------|
| 无症状携带者 | 36 | 27(75.0) | 9(25.0) |
| 急性乙型肝炎 | 5 | 2(40.0) | 3(60.0) |
| 慢性乙型肝炎 | 106 | 22(21.0) | 84(79.0) |
| 肝炎肝硬化 | 50 | 8(16.0) | 42(84.0) |
| 肝细胞癌 | 18 | 2(11.0) | 16(89.0) |

致病原^[6],肝病发生、发展与患者的遗传基因,病毒的基因类型有密切关系^[7]. 目前报告,HBV基因类型有高地区分布特异性^[8]. 另外,HBV基因类型与肝病的临床类型、病情发展经过、病情轻重、抗病毒疗效有密切联系^[9-13]. 既往研究表明,我国主要以HBV C和B基因型感染为主,也存在D基因型及B和C基因型混合感染^[14-19],在韩国研究发现,C型占99.5%,A型占0.5%^[20-21]. 本研究发现,215例延边地区朝鲜族HBV感染者中,72.0%为C基因型,28.0%为B基因型感染.提示延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型,其次为B基因型,未检出其他基因型.与韩国相比B基因型占的比例高于韩国^[20-21],可能与HBV基因类型有高地区分布特异性及本研究检测例数少有关.

对不同类型HBV感染者的基因型分布表明,在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中,C基因型比例(分别为79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(分别为25.0%、60.0%, $P<0.01$),在无症状携带者中,B基因型比例(75.0%)高于C基因型(25.0%, $P<0.01$).C基因型在临床上以慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌多见,其发生率显著高于B基因型与目前报道一致^[22-23]. 另外,本研究表明,HbeAg阳性组C基因型比例(73.0%)高于HbeAg阴性感染组(54.0%, $P<0.05$),但HbeAg阴性组的B基因型

表 3 HbeAg阳性与阴性HBV感染者中基因型分布 *n*(%)

| 分组 | <i>n</i> | B型 | C型 |
|---------|----------|----------|----------|
| HbeAg阳性 | 125 | 34(27.0) | 91(73.0) |
| HbeAg阴性 | 90 | 41(46.0) | 49(54.0) |

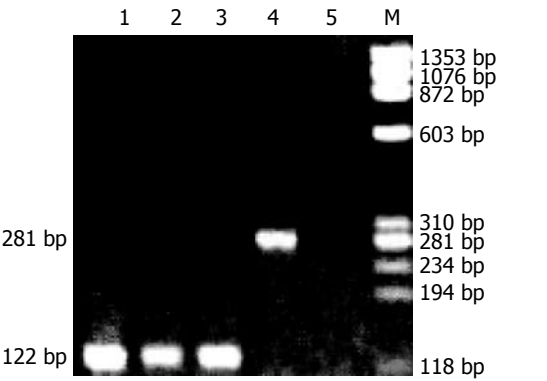


图 1 HBV基因分析PCR结果. M: Marker; 1-3: C基因型; 4: B基因型; 5: PCR阴性对照.

比例(46.0%)高于HbeAg阳性组(27.0%, $P<0.01$).进一步表明了C基因型感染时免疫清除期长,而B基因型易发生HbeAg血清转化的可能^[22]. 尽管对HbeAg阴性或阳性状态与基因型的相关性目前还存在不同看法,但无论C基因型或B基因型感染患者,都必须严密随访,合理、适时地选择抗病毒治疗,延缓或减少肝纤维化和肝癌的发生率. 延边地区是一个朝鲜族居住的少数民族地区,肝炎发病率高,病情比较重,抗病毒疗效不佳.这可能与延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型有关.

4 参考文献

1 Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, Ohmori T, Suzuki S, Kurita M, Ohashi Y. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J*

■创新盘点
本文丰富了国内各地区HBV基因型分布的数据,即延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布,这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型的分布情况,以及判断病情发展及预后,推测抗病毒疗效提供理论依据,具有重要意义.

■同行评价

本研究统计学处理方法恰当,结果可靠,结论可信,具有一定的科学性、创新性和可读性。

- 2 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 3 Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-174
- 4 Du H, Li T, Zhang HY, He ZP, Dong QM, Duan XZ, Zhuang H. Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/ precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Int* 2007; 27: 240-246
- 5 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 6 World Health Organization. Executive Summary: The World Health Report 1988: Life in the 21st century a vision for all. <http://www.oms.ch/whr/1998/exsum98e.htm>, [Accessed 1999, May 26]
- 7 Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1340
- 8 Norder H, Courouche AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 9 Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and precore region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996; 48: 8-16
- 10 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559
- 11 Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000; 7: 258-267
- 12 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33: 998-1002
- 13 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 14 Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47
- 15 Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002; 22: 37-44
- 16 Ding X, Gu H, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li TC, Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 19-22
- 17 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 类国强, 马廷贤. 我国八城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. 中华微生物和免疫学杂志 1998; 18: 88-92
- 18 阎丽, 侯金林, 王战会, 牛贞玉, 郭亚兵, 骆抗先. 宁夏地区乙型肝炎病毒基因型分布及D基因型的测定鉴定. 解放军医学杂志 2000; 25: 4-7
- 19 夏国良, Omana V Nainan, 贾志远, 刘洪斌, 罗述斌, 李荣成, 曹慧霖, 刘崇柏, Harold S Margolis. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. 中华流行病学杂志 2001; 22: 348-351
- 20 Seng Wook Oh, Seng Gyu Hwang, Kwang Hyun Ko, Eun Mi Jung, Hyung Tae Kim, Sung Pyo Hong, Pil Won Park, Gyu Sung Rim, Nam Geun Kim, Wk Seop Hyun, Tae Kyu Lee. Hepatitis B Virus Genotype in Kyunggi and Seoul Provinces. *Korean J Gastroenterol* 2002; 40: 46-52
- 21 Soong Hwan Lee, Sung Hee Han, Seung Chul Cho, Byung Joo Roh, Joo Hyun Sohn, Duck An Kim, Dong Hoo Lee, Choon Suhk Kee. Distribution of HBV Genotypes in Patients With Chronic HBV Infection in Korea. *Korean J Hepatol* 2001; 7: 373-380
- 22 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559
- 23 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26

编辑 李军亮 电编 郭海丽