

· 论 著 ·

广西桂北地区慢性 HBV 感染不同免疫状态与 HBV 基因型关系研究*

吴淋玲¹, 杨丽莎^{2△}, 蒋冬香³, 王继业⁴, 黄亚琴¹

(桂林医学院附属医院:1. 消化内科;2. 中西医结合科;3. 检验科;4. 传染教研室, 广西桂林 541001)

摘要:目的 了解广西桂北地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型分布情况及探讨慢性 HBV 感染不同免疫状态与基因型的关系。方法 将 120 例慢性 HBV 感染者按其免疫应答情况分为免疫耐受、免疫清除(应答)和免疫不全(病毒残留)3 种免疫状态,各状态 40 例,运用实时荧光定量 PCR 法检测其 HBV 基因型。结果 B 型 86 例,C 型 24 例,B+C 混合型 6 例,非 B 非 C 型 4 例;3 种免疫状态均 B 型占多数,分别为 70%、77.5%、67.5%,不同免疫状态基因型构成比差异无统计学意义($P>0.05$);免疫状态与基因型相关性无统计学意义($P>0.05$);B 型 HBV-DNA 载量高于 C 型($P<0.05$),大于或等于 30 岁组 C 型显著多于小于 30 岁组,差异有统计学意义($P<0.05$);各基因型间 ALT、AST、TBil、HBeAg 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$);男女基因型分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 广西桂北地区 HBV 基因型以 B 型为主,C 型占部分比例,少量 B+C 混合型,偶有未能分型;还不能认为慢性 HBV 感染不同免疫状态间基因型分布不同及免疫状态与基因型相关。

关键词: 肝炎,乙型,慢性;免疫耐受;免疫清除状态;免疫不全状态;乙型肝炎病毒基因型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1249-03

A study on relationship between different immune states of hepatitis B virus chronic infection and genotypes of hepatitis B virus in northern Guangxi

Wu Linling¹, Yang Lisha^{2△}, Jiang Dongxiang³, Wang Jiye², Huang Yaqin¹

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Combined Traditional Chinese and Western Medicine; 3. Clinical Laboratory; 4. Department of Infection, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: **Objective** To study the hepatitis B virus(HBV)genotypes distribution and to investigate the the relationship between the different immune states of HBV chronic infection and the genotypes of HBV in northern Guangxi. **Methods** The patients of HBV chronic infection were divided into three groups, immune tolerance, immune clearance and immunodeficiency, 40 cases in each group. Using the real-time PCR to detected HBV genotypes. **Results** There were genotype B in 86 cases, genotype C in 24 cases, B+C mixed genotype in 6 cases, nor B nor C genotype in 4 cases. Genotype B was mainly in the three different immune states, at 70%, 77.5% and 67.5%. No significant difference was found in genotypes distribution of three different immune states and the relationship between immune states and genotypes($P>0.05$). The level of HBV-DNA in genotype B was higher than that of genotype C($P<0.05$). Genotype distribution showed no significant difference between different genders($P>0.05$), but showed significant difference between different ages($P<0.05$). The proportion of genotype C in the patients of ≥ 30 years old was higher than that in the patients of <30 years old($P<0.05$). The level of ALT, AST, TBil and HBeAg(+) had no significant difference($P<0.05$). **Conclusion** The HBV genotypes distribution in northern Guangxi is major genotype B, partial genotype C, a little B+C mixed genotype and little nor B nor C genotype. It is not sure that genotypes distribution is different in three different immune states and immune states is related with genotypes.

Key words: hepatitis B chronic; immune tolerance; immune clearance; immunodeficiency; hepatitis B genotypes

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染不仅可引起急、慢性乙型肝炎,而且与肝硬化和肝癌的发生关系密切。HBV 通过宿主免疫反应引起肝脏损害,其机制主要取决于病毒本身与宿主免疫的相互作用。一方面宿主免疫应答情况决定慢性 HBV 感染后的转归,免疫状态不同则其临床表现不同;另一方面 HBV 基因型地域分布不同,HBV 基因型异质性导致临床意义不同。所以尝试性将慢性 HBV 感染免疫状态与 HBV 基因型结合在一起研究,探讨桂北地区慢性 HBV 感

染不同免疫状态下,HBV 基因型的分布情况及两者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 9 月至 2010 年 9 月桂林医学院附属医院慢性 HBV 感染不同免疫状态患者 120 例,3 种状态各 40 例,男 98 例,女 22 例,中位年龄 29 岁(14~60 岁),均为桂林籍。诊断符合 2005 年“慢性乙型肝炎防治指南”的标准,并排除其他肝炎患者,患有心脑血管病、糖尿病等重大疾病者,

患非重大疾病但需用药维持者。留取清晨空腹血清标本, -70℃冻存备检。

1.2 方法

1.2.1 肝功能检测 由 AEROSSET 全自动生化仪测定。

1.2.2 HBV 血清标记物 (HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb) 检测 采用时间分辨免疫荧光分析法, 试剂盒由苏州新波生物技术有限公司提供, 仪器为上海新波生物技术有限公司 ANYTEST 2000 时间分辨仪。

1.2.3 HBV-DNA 定量及 HBV 基因型检测 采用实时荧光定量 PCR 法, 仪器为 MJ Opticon Monitor 荧光 PCR 检测仪。DNA 提取试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供, 基因型检测试剂盒由广州华银医药科技有限公司提供, 检测值大于或等于 1×10^3 拷贝/毫升为阳性, 2 次均为阳性者作为研究对象。

1.2.4 重复实验 随机抽取 15 份基因型阳性样本重复实验, 对比前后分型结果, 符合率为 100%; 对 B+C 混合型及非 B 非 C 型结果者均行重复实验以确认。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用非参数检验法, 统计学显著性检验水准为 0.05 (双侧)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同免疫状态患者临床资料及血清资料比较 120 例慢性 HBV 感染者性别差别无统计学意义 (P > 0.05)。免疫耐受状态患者年龄较免疫不全状态轻, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。ALT、AST、TBIL 在免疫耐受状态最低, 免疫清除状态最高, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。DNA 载量免疫耐受状态最高, 免疫不全状态最低, 差异有统计学意义 (P < 0.05),

但免疫耐受状态与免疫清除状态 DNA 载量差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2.2 HBV 基因型分型结果 120 例 HBV 基因型分布为: B 型 86 例 (71.1%), C 型 24 例 (20%), B+C 混合型 6 例 (5%), 非 B 非 C 型 4 例 (3.3%)。

2.3 不同免疫状态基因型分布情况 慢性 HBV 感染各免疫状态基因型构成比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 8.552, P = 0.2$), 同一基因型在各免疫状态下分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 5.018, P = 0.285$), 见表 1。

表 1 120 例慢性 HBV 感染者基因型检测结果

免疫状态	n	基因型 [n(%)]			
		B	C	B+C	非 B 非 C
免疫耐受	40	28(70.0)	7(17.5)	4(10)	1(2.5)
免疫清除	40	31(77.5)	7(17.5)	2(5)	0
免疫不全	40	27(67.5)	10(25)	0	3(7.5)
合计	120	86(71.7)	24(20)	6(5)	4(3.3)

2.4 不同基因型患者临床资料及血清资料比较 116 例可分型的慢性 HBV 感染者, 男女基因型分布差异无统计学意义 (P > 0.05), B 型、C 型、B+C 型者 ALT、AST、TBiL、HBeAg 阳性率差异无统计学意义 (P > 0.05)。B 型 DNA 载量高于 C 型, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。C 型患者年龄较 B 型大 (P < 0.05), 以 30 岁为界, 大于或等于 30 岁组 C 型显著多于小于 30 岁组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.643, P = 0.000$), 见表 2。

2.5 慢性 HBV 感染免疫状态与 HBV 基因型相关性 慢性 HBV 感染免疫状态与 HBV 基因型相关性无统计学意义 (P > 0.05)。

表 2 116 例不同 HBV 基因型患者临床资料及血清资料比较

基因型	n	男/女	年龄(岁)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(umol/L)	HBeAg 阳	LgDNA(LGC/mL)
			中位数	中位数	中位数	中位数	阳性率(%)	中位数
B	86	70/16	27.500	71.600	64.750	16.250	68.600	6.670
C	24	21/3	40.000	67.530	48.500	16.125	58.300	5.830
B+C	6	4/2	32.000	55.950	49.400	14.200	100.000	7.370
合计	116	95/21	28.500	70.100	61.000	16.200	38.100	6.580

3 种基因型年龄比较, $\chi^2 = 24.5, P = 0.000$, B 型与 C 型比较, $P = 0.000$, 但 B 型与 B+C 型比较, $P = 0.35$, C 型与 B+C 型比较, $P = 0.186$; ALT 比较, $P = 0.399$; AST 比较, $P = 0.415$; TBiL 比较, $P = 0.719$; HBeAg 阳性率比较, $\chi^2 = 3.875, P = 0.144$; LgDNA 比较, $P = 0.06$, 但 B 型与 C 型比较, $P = 0.049$; 男女基因型分布比较, $\chi^2 = 1.57, P = 0.666$ 。LGC/mL 为 lgcopies/mL。

3 讨论

HBV 本身并无致病性, HBV 感染后的组织损伤是由一系列宿主免疫反应造成。为更好地对慢性 HBV 感染者实行相应的干预, 按宿主免疫应答情况分为免疫耐受、免疫清除(应答)和免疫不全(病毒残留)3 种不同免疫状态。

免疫耐受状态是指免疫系统对 HBV 不能识别, 因而不发生对病毒的免疫清除。特点为 HBV 复制活跃, HBV-DNA 滴度大于 10^5 拷贝/毫升, 血清 HBsAg、HBeAg 阳性, ALT 水平正常或轻度异常, 肝组织学无明显异常。年龄较轻的患者, 无临床症状, 但可能有躯体、心理、情感等方面亚健康各种

表现。

免疫清除(应答)状态是指免疫系统逐渐成熟, 对 HBV 的识别能力逐渐增强, 机体针对病毒的免疫清除作用反复进行, 肝脏炎症活动迁延持续。患者 HBV-DNA 复制水平逐渐下降, 但滴度仍大于 10^5 拷贝/毫升, 血清 HBeAg 阳性, ALT 或 AST 水平不断高低波动, 肝组织学有坏死炎症等表现, 经正确治疗可以出现临床好转, 也有少部分患者可能出现 HBeAb 自然转阳, 自发的 HBsAg 清除率增加。

免疫不全(病毒残留)状态是指机体持续免疫应答, 对病毒持续清除, 表现为无病毒复制或病毒残留。若肝脏基础病变较

轻,患者病情稳定,进入非活动性 HBsAg 携带状态,出现血清 HBeAb 转阳,HBV-DNA 检测不到(PCR 法),ALT 或 AST 水平正常。但仍有部分患者由于经历了较长时期的免疫清除和炎症活动,自发或免疫抑制等导致 HBV-DNA 复制,HBV-DNA 滴度升高,伴或不伴出现血清 HBeAg 转换和 ALT 升高,若肝脏基础病变严重,可进展到肝硬化或出现肝脏失代偿,甚至发展成肝细胞癌^[1-3]。

根据 HBV 全基因序列的异质性大于或等于 8% 或 S 基因序列的异质性大于或等于 4%,将其分为 A~I 9 个基因型^[4-7]。HBV 基因型呈不同地理区域性分布。在我国内地主要流行 A、B、C、D 4 种 HBV 基因型,其中以 B、C 型为主。各地区流行的基因型存在较大差异,北方以 C 型为主,南方以 B 型为主,C 型也占相当比例,各省之间并不完全相同。另有少量的 C+D/B+C 基因型混合感染。A、D 型主要见于部分少数民族地区如新疆、西藏及沿海地区^[7-11]。本研究以 B 型为主,C 型占相当比例,少量 B+C 混合型,与文献报道相符。同时还提示,慢性 HBV 感染各免疫状态基因型构成比差异无统计学意义,同一基因型在各免疫状态下分布差异无统计学意义。对于 4 例患者未能分型,考虑研究对象为我国少数民族地区人群,A 或 D 型可能性大,可考虑用全基因序列测定法进行分型。目前 HBV 基因型测定的方法还未统一,各种检测方法各有利弊。本研究采用的实时荧光定量 PCR 法快速、方便、阳性率高,适合大规模的临床和流行病学调查,但是由于试剂盒引物的限制,本研究只能检测 B、C 型及 B+C 混合型。全基因序列测定法是金标准,但是实际操作困难、费用较高。

目前研究表明,B 型与较轻的病变相关,如慢性 HBV 携带;C 基因型致病能力强,预后差,多与较重的肝脏病变相关,易于发生肝硬化和肝癌。B 型患者较 C 型 HBeAg 血清转换早,HBeAg 阳性率低,C 型感染者年龄较 B 型大,并随着年龄增长,人群中 C 型比率增加,B 型则减少。男女基因型分布未见明显差异^[9-15]。本研究表明,大于 30 岁组 C 型显著多于小于 30 岁组,男女基因型分布差异无统计学意义,与以往报道基本相符。但除 B 型 HBV-DNA 载量高于 C 型差异有统计学意义外,各基因型间肝功能、HBeAg 阳性率差异无统计学意义,与以往研究不符合,还提示慢性 HBV 感染免疫状态与 HBV 基因型相关性无统计学意义,考虑可能与观察对象人种学特征、病例选择差异及样本例数太少有关。

虽然本研究对 HBV 基因进行分型和探讨了慢性 HBV 感染不同免疫状态与 HBV 基因型关系,但由于基因分布不均衡、检测方法未统一及样本大小的影响,还需要作多中心、检测方法同一大样本研究,方能进一步了解广西桂北地区 HBV 基因型分布情况及慢性 HBV 感染不同免疫状态与基因型的关系。

参考文献:

[1] 杨丽莎,王秋萍,周劲刚,等. HBV 携带不同免疫状态中医证候的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(5):

337-338.

- [2] 吴林玲,杨丽莎. HBV 感染免疫状态与 HBV 基因型关系研究思路[J]. 现代生物医学进展,2010,10(19):3729-3731.
- [3] 中华医学会肝病分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(12):881-899.
- [4] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes [J]. J Gen Virol, 1988, 69(10):2575-2583.
- [5] Arauz Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in central American [J]. Clin Microbiol, 2002, 83: 2059-2064.
- [6] Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in vietnam [J]. J Virol, 2008, 82(11):5657-5663.
- [7] 游晶,庄林,陈红英,等. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(9):921-928.
- [8] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution on virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China [J]. J Viral Hepat, 2005, 12(6):609-617.
- [9] 魏来. 乙型肝炎病毒的基因型:研究的进展,临床的方向 [J]. 中华医学杂志,2005,85(17):1160-1162.
- [10] 刘旭锦,王凯,范玉琛. HBV 基因型研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(4):402-403.
- [11] 陈科伟,熊自忠. 乙肝病毒基因型研究进展[J]. 安徽医药,2010,14(4):385-386.
- [12] 秦波,陈秋云,黄爱龙,等. 慢性重型肝炎患者乙肝病毒 C 基因变异的初步研究[J]. 重庆医学,2004,33(5):728-729.
- [13] Lin CL, Chen JD, Liu CJ, et al. Clinicopathological differences between hepatitis B viral genotype B and C related resectable hepatocellular carcinoma [J]. J Viral Hepat, 2007, 14:64-69.
- [14] Viana R, Wang R, Yu MC, et al. Hepatitis B viral loads in Southern African Blacks with hepatocellular carcinoma [J]. J Med Virol, 2009, 81(9):1525-1530.
- [15] Sheu MJ, Lin CY, Sun CS, et al. Nonresponse to 18-month lamivudine monotherapy in chronic hepatitis B patients with dual genotype Band C infection and acute exacerbation [J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105(7):588-593.

(收稿日期:2010-11-10)