

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.22.030

乙型肝炎病毒不同基因分型与淋巴细胞亚群分布、肝功能及脂代谢的关系*

王春玮 蔡星焱 郭景景 韩玉珍 李满桂

(青海红十字医院检验科 青海 西宁 810000)

摘要 目的:探讨乙型肝炎病毒(HBV)不同基因分型与淋巴细胞亚群分布、肝功能及脂代谢的关系。**方法:**选择2016年10月-2017年12月在我院治疗的HBV患者130例,将患者进行HBV基因分型检查,根据不同基因分型将患者分为B型组($n=59$)和C型组($n=71$),采用实时荧光PCR法检测血清HBV-DNA载量,采用ADVIA2400全自动生化分析仪测定患者丙氨酸转氨酶(ALT)、白蛋白(ALB)、总胆红素(Tbil)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,采用美国ACL-TOP700血凝仪检测凝血酶原时间(PT)。采用流式细胞仪测定不同基因分型患者 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 水平。**结果:**两组患者HBV-DNA载量、PT比较差异无统计学意义($P>0.05$);B型组患者ALT、ALB、Tbil水平均低于C型组($P<0.05$)。B型组患者 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平均高于C型组, $CD8^+$ 水平低于C型组($P<0.05$)。两组患者TC、TG、HDL-C和LDL-C水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**不同基因分型对HBV患者病毒复制能力及脂代谢无明显影响,但C型HBV对患者免疫功能及肝功能损伤更严重。

关键词:乙型肝炎病毒;基因分型;淋巴细胞亚群;肝功能;脂代谢

中图分类号:R512.62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)22-4334-04

Relationship between Different Genotypes of Hepatitis B Virus and Distribution of Lymphocyte Subsets, Liver Function and Lipid Metabolism*

WANG Chun-wei, CAI Xing-yao, GUO Jing-jing, HAN Yu-zhen, LI Man-gui

(Department of Laboratory Medicine, Qinghai Red Cross Hospital, Xining, Qinghai, 810000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between different genotypes of hepatitis B virus (HBV) and the distribution of lymphocyte subsets, liver function and lipid metabolism. **Methods:** 130 patients with HBV who were treated in our hospital from October 2016 to December 2017 were selected. The patients were examined by HBV genotypes, and according to different genotypes, the patients were divided into type B group ($n=59$) and type C group ($n=71$). The serum HBV-DNA load was measured by real-time fluorescence PCR. The levels of alanine aminotransferase (ALT), albumin (ALB), total bilirubin (Tbil), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) of patients were determined using ADVIA2400 automatic biochemical analyzer, prothrombin time (PT) was detected using US ACL-TOP700 coagulation analyzer, and the levels of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in patients with different genotypes were measured by flow cytometry. **Results:** There was no significant difference in HBV-DNA load and PT between the two groups ($P>0.05$). The levels of ALT, ALB and Tbil in type B group were lower than those in type C group ($P<0.05$). The levels of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in type B group were all higher than those in type C group, and the level of $CD8^+$ was lower than that in type C group ($P<0.05$). There was no significant difference in the levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion:** Different genotypes have no significant effect on viral replication and lipid metabolism in patients with HBV, however, C type HBV is more serious damage to immune function and liver function of patients.

Key words: Hepatitis B virus; Genotyping; Lymphocyte subgroup; Liver function; Lipid metabolism

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)22-4334-04

前言

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)简称为乙肝病毒,是属于DNA病毒的一种类型,其感染人群引发的乙型病毒性肝炎是一类危害性相对严重的慢性传染性疾病^[1,2]。全球至少有

3.5亿人感染HBV,而我国是HBV感染的高流行区,HBV的携带率相对较高,且乙型肝炎发病率为60.5/10万^[3,4]。慢性HBV感染患者将会造成肝细胞炎症损伤,从而导致病情反复迁延,进而导致肝细胞坏死、纤维结缔组织增生,随着病情的不断发展,将会演变为肝硬化、肝细胞癌等,影响患者的健康及生

* 基金项目:青海省卫生计生委指导性基金资助项目(2014RKB368)

作者简介:王春玮(1981-),女,本科,副主任检验师,从事分子检验医学方面的研究, E-mail: jhfhgp@163.com

(收稿日期:2018-05-14 接受日期:2018-06-10)

活^[5-7]。有研究表明^[8,9],HBV 根据全基因序列差异 >8%或 S 基因片段差异 >4%可以分为 8 个基因型,而我国主要为 B 型和 C 型,北方 C 型相对较高,而南方地区则主要以 B 型为主。相关学者研究表明,HBV 感染是一个多因素过程,感染后常伴有 T 淋巴亚群分布改变,从而影响患者肝肾功能及脂代谢水平^[10]。因此,本研究探讨 HBV 不同基因分型与淋巴细胞亚群分布、肝肾功能及脂代谢的关系,旨在为临床诊断和 HBV 治疗提供数据参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 10 月-2017 年 12 月入院治疗的 HBV 患者 130 例,纳入标准:(1)所有患者均符合中华医学会 2010 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[11];(2)均经过生化指标、腹部超声检查最终得到确诊;(3)遵循医嘱完成相关检查及诊断者,并签署知情同意书;排除标准:(1)合并慢性阻塞性肺疾病、高血压、糖尿病等慢性疾病者;(2)合并肝硬化、肝癌疾病

者。根据不同基因分型将患者分为 B 型组 (n=59) 和 C 型组 (n=71),其中 B 型组男 38 例,女 21 例,年龄 20-67 岁,平均 (45.93±4.61) 岁,病程 1-7 年,平均 (4.51±0.89) 年;C 型组男 42 例,女 29 例,年龄 22-64 岁,平均 (44.76±4.53) 岁,病程 2-9 年,平均 (4.79±0.93) 年。两组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),均衡可比。本研究在医院伦理委员会监督、批准下完成。

1.2 主要仪器和试剂

研究所需仪器与试剂包括:丙氨酸转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白 (Albumin, ALB)、总胆红素 (Total bilirubin, Tbil)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂;HBV-DNA 定量检测试剂盒;HBV 基因分型试剂盒;T 淋巴细胞亚群检测试剂盒;ADVIA2400 全自动生化分析仪;ABI7500 荧光定量扩增仪、贝克曼流式细胞仪、美国 ACL-TOP700 血凝仪等,其厂家见表 1。

表 1 主要仪器、试剂和厂家

Table 1 Main instruments, reagents and manufacturers

Instruments and reagents	Factory
ALT,ALB reagents	Shanghai Huachen Biological Co., Ltd.
Tbil, TG, TC, LDL-C, HDL-C reagents	Ningbo Meikang Biological Co., Ltd.
HBV-DNA quantitative detection kit	Zhongshan Daan Gene Co., Ltd.
HBV genotyping reagent	Hunan Shengxiang Biotechnology Co., Ltd.
T lymphocyte subset detection reagent	Shanghai Jianglai Biological Technology Co., Ltd

1.3 方法

(1)HBV 基因分型及 HBV-DNA 水平检测。所有患者入院后均采用实时荧光 PCR 法检测血清 HBV-DNA 载量,利用荧光 PCR 技术,以 HBV 基因组中相对保守区为靶区域利用特异性引物及荧光探针,将样本核酸纯化后,通过 PCR 对 HBV-DNA 进行定量检测。同时将样本送至金域检验中心进行 HBV 基因分型检测。(2)肝功能水平检测。所有患者入院后次日早晨空腹取静脉血 3 mL,15 min 离心,速度 4500 rpm,完成血清分离后放置在 -20℃ 冰箱中备用。采用 ADVIA2400 全自动生化分析仪测定不同基因分型患者 ALT、ALB、Tbil 水平,采用美国 ACL-TOP700 血凝仪检测凝血酶原时间 (Prothrombin time, PT) 采用法国 STAGO 公司的 STA-R 全自动凝血仪进行检测。(3)淋巴细胞亚群水平检测。将样本送至金域检验中心,

完成血清分离后采用流式细胞仪测定不同基因分型患者 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 水平。(4)脂代谢水平检测。取上述采集的血清标本,采用 ADVIA2400 全自动生化分析仪测定不同基因分型患者 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件处理,计数资料行 χ^2 检验,采用 [n(%)] 表示,计量资料行 t 检验,采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者肝功能水平及 HBV-DNA 载量比较

两组患者 HBV-DNA 载量、PT 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);B 型组患者 ALT、ALB、Tbil 水平均低于 C 型组 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组患者肝功能水平及 HBV-DNA 载量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of liver function levels and HBV-DNA load of patients in two groups ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	ALT (U/L)	ALB (g/L)	Tbil (μ mol/L)	PT (s)	HBV-DNA load (lg copies/mL)
Type B group	59	150.27±21.58	21.25±3.26	67.39±21.95	18.23±5.64	5.89±1.17
Type C group	71	190.21±19.63	30.31±3.05	110.38±19.38	17.98±6.23	5.63±1.29
t		11.040	16.343	8.483	0.238	1.295
P		0.000	0.000	0.000	0.812	0.226

2.2 两组患者淋巴细胞亚群水平比较

CD8⁺水平低于C型组($P<0.05$),见表3。

B型组患者CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平均高于C型组,

表3 两组患者淋巴细胞亚群水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of T lymphocyte levels of patients in two groups($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Type B group	59	65.46± 8.31	30.23± 7.85	13.45± 3.41	0.87± 0.24
Type C group	71	31.84± 6.78	10.51± 6.42	34.59± 7.41	0.78± 0.21
t		9.835	15.791	10.946	2.280
P		0.000	0.000	0.000	0.024

2.3 两组患者脂代谢水平比较

学意义($P>0.05$),见表4。

两组患者TC、TG、HDL-C和LDL-C水平比较差异无统计

表4 两组患者脂代谢水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of lipid metabolism levels of patients in two groups($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
Type B group	59	1.25± 0.26	4.01± 0.79	1.33± 0.23	2.16± 0.31
Type C group	71	1.18± 0.19	3.92± 0.65	1.26± 0.18	2.09± 0.27
t		1.770	0.713	1.946	1.376
P		0.079	0.477	0.054	0.171

3 讨论

HBV是临床上常见的致病病毒,是引起乙型肝炎重要的病原体,属于嗜肝DNA病毒科,具有顽强的抵抗力、明显的嗜肝性,并且还有轻度的返嗜性^[12,13]。HBV感染属于全球性的公共卫生问题,全世界慢性乙型肝炎患者约有3.5亿,而我国HBV感染患者为7-8亿人次,且慢性感染者达到1.2亿^[14,15]。因此,临床上如何积极采取有效的措施预防、降低HBV感染对改善患者预后具有重要的意义。有学者研究表明^[16,17],HBV基因型不仅与临床转归有关,还与患者治疗方案的制定有关,其分布具有一定的地域性,且在亚洲大洋洲地区主要以B型和C型为主,不同地区优势基因能反应HBV自然感染史变异情况,是HBV变异后的进化结果。

本研究结果发现,B型与C型HBV患者HBV-DNA载量、PT比较差异无统计学意义,但B型HBV患者ALT、ALB、TbIL水平均低于C型HBV患者。分析原因可能为C型病毒株的致病性、复制性更强,病毒在复制过程中更加活跃,能引起相对严重的肝脏疾病,并且不容易发生抗原抗体的血清转换^[18,19]。有研究表明^[20,21],C基因型患者肝功能指标更差,对于肝脏的损害更加严重,因此,在慢性肝衰竭患者中基因分型中多以C型为主。HBV感染人体后机体免疫水平会发生不同程度的变化,并且引起的肝脏疾病与人体免疫状态存在紧密的联系^[22,23]。淋巴细胞是人体重要的防御系统,在抵抗HBV病毒中发挥了重要的作用,不同的淋巴亚群细胞在病毒的抵抗中发挥了重要的作用^[24,25]。既往研究表明^[26],细胞毒性T淋巴细胞CD8⁺介导的免疫反应能清除HBV与损伤肝脏细胞。本研究中,B型HBV患者CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平均高于C型HBV患者,CD8⁺水平低于C型HBV患者,由此看出,C型乙型肝炎能引

起T淋巴细胞水平异常,加剧疾病的发生、发展,进而形成一种恶性循环。C型HBV感染患者T细胞容易受到的攻击,其表达水平会随着病毒含量的上升而升高,从而增加免疫应答反应,加剧干细胞损伤,引起肝功能的异常^[27]。此外,由于C型病毒HBV-DNA复制相对较快,对于HBV外来病毒会产生更强的免疫应答,导致机体免疫功能下降^[28]。本研究结果还显示,B型与C型HBV患者TC、TG、HDL-C和LDL-C水平比较差异无统计学意义,说明HBV不同基因分型患者脂代谢水平未见明显差异,可能与本课题纳入病例数较少有关,以后的研究需要大样本容量进一步验证。因此,临床上对于HBV患者治疗过程中应首先确定基因类型,并根据检测结果制定相应的治疗方案,使得患者的治疗更具科学性^[29,30]。

综上所述,HBV感染主要以B型、C型为主,且与淋巴细胞亚群分布、肝功能存在紧密的联系,但是与脂代谢未见明显联系,需要进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Tang J, Fei J, Gu C, et al. The Influence of B and T Lymphocyte Attenuator Genetic Variants on Susceptibility to Chronic Hepatitis B Virus Infection[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(6): 2540-2547
- [2] Ogura N, Ogawa K, Watashi K, et al. Novel stable HBV producing cell line systems for expression and screening antiviral inhibitor of hepatitis B virus in human hepatoma cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1): 64-71
- [3] 余真君,朱坚胜.TIM-3在慢性HBV感染中的免疫调节作用[J].中国免疫学杂志, 2016, 32(2): 267-270
Yu Zhen-jun, Zhu Jian-sheng. Immunomodulatory effect of TIM-3 in chronic HBV infection [J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32 (2): 267-270
- [4] Chung HJ, Chen X, Yu Y, et al. A critical role of hepatitis B virus

- polymerase in cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and steatosis [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 8(1): 130-145
- [5] Li F, Li X, Yan T, et al. The preS deletion of hepatitis B virus (HBV) is associated with liver fibrosis progression in patients with chronic HBV infection[J]. *Hepatol Int*, 2018, 12(2): 107-117
- [6] Boni C, Vecchi A, Rossi M, et al. TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus-Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos (T)ide Analogues[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6): 1764-1777.e7
- [7] Cheng ST, Yuan D, Liu Y, et al. Interleukin-35 Level Is Elevated in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(2): 188-194
- [8] de Pina-Araujo IIM, Spitz N, Soares CC, et al. Hepatitis B virus genotypes A1, A2 and E in Cape Verde: Unequal distribution through the islands and association with human flows[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192595
- [9] 王珊,陈伟琴,王蕾,等.B和C基因型HBsAg+/HBsAb+双阳性患者S区基因的抗原表位及相关基因的突变[J].*检验医学*, 2016, 31(8): 697-702
- Wang Shan, Chen Wei-qin, Wang Lei, et al. S region gene epitope and gene mutation of HBsAg and HBsAb coexistence patients with genotype B and C[J]. *Laboratory Medicine*, 2016, 31(8): 697-702
- [10] Yuan W, Zhang YY, Zhang ZG, et al. Risk Factors and Outcomes of Acute Kidney Injury in Patients With Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure [J]. *Am J Med Sci*, 2017, 353(5): 452-458
- [11] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].*中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24
- Chinese society of Hepatology, Chinese society of infectious diseases, Chinese Medical Association.Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (2010 Edition)[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2011, 19(1): 13-24
- [12] Chopra B, Sureshkumar KK. Outcomes of Kidney Transplantation in Patients Exposed to Hepatitis B Virus: Analysis by Phase of Infection [J].*Transplant Proc*, 2017, 49(2): 278-280
- [13] 杨伟国,李永红,徐辉,等.ER α -29位基因多态性与HBV相关原发性肝癌易感性的关系分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(30): 5908-5910, 5903
- Yang Wei-guo, Li Yong-hong, Xu Hui, et al. The Relationship between ER α -29 Gene Polymorphisms and HBV-related Hepatocellular Carcinoma[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(30): 5908-5910, 5903
- [14] Wu YS, Zhang WW, Ling XM, et al. Efficacy and Safety of Tenofovir and Lamivudine in Combination with Efavirenz in Patients Co-infected with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus in China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(3): 304-308
- [15] 王琳,樊耀昕,丁洋,等.乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒慢性感染者肝组织病理学炎症及纤维化对比分析[J].*中华肝脏病杂志*, 2017, 25(6): 419-423
- Wang Lin, Fan Yao-xin, Ding Yang, et al. The comparison of liver inflammation and fibrosis between chronic HBV and HCV infection [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2017, 25(6): 419-423
- [16] Diarra B, Yonli AT, Sorgho PA, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection and Associated Genotypes among HBsAg-negative Subjects in Burkina Faso [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2018, 10(1): e2018007
- [17] Gori A, Gheorgita S, Spinu C, et al. Hepatitis B, C and D virus genotypes detected in HBsAg- or anti-HCV-positive people from the Republic of Moldova[J].*Arch Virol*, 2018, 163(2): 431-438
- [18] Chang Y, Choe WH, Sinn DH, et al. Nucleos (t)ide Analogue Treatment for Patients With Hepatitis B Virus (HBV) e Antigen-Positive Chronic HBV Genotype C Infection: A Nationwide, Multicenter, Retrospective Study [J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(11): 1407-1414
- [19] Biswas B, Kandpal M, Vivekanandan P. A G-quadruplex motif in an envelope gene promoter regulates transcription and virion secretion in HBV genotype B[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(19): 11268-11280
- [20] Baclig MO, Reyes KG, Liles VR, et al. Untypable genotype restriction patterns and surface gene variants of hepatitis B virus isolates[J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2017, 8(3): 19-26
- [21] Liu T, Wang F, Zhang S, et al. Whole-gene analysis of two groups of hepatitis B virus C/D inter-genotype recombinant strains isolated in Tibet, China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179846
- [22] Wang G, Liu Y, Huang R, et al. Characteristics of regulatory B cells in patients with chronic hepatitis B virus infection in different immune phases[J]. *Discov Med*, 2017, 23(128): 295-304
- [23] 王亚东,王玮,申川,等.慢性乙型肝炎病毒感染者不同免疫状态下自然杀伤细胞G2D表达及其活化意义[J].*中华传染病杂志*, 2017, 35(1): 5-10
- Wang Ya-dong, Wang Wei, Shen Chuan, et al. Significance of natural killer cell G2D expression and activation in patients with different immune status of chronic hepatitis B virus infection [J].*Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2017, 35(1): 5-10
- [24] Tang J, Fei J, Gu C, et al. The Influence of B and T Lymphocyte Attenuator Genetic Variants on Susceptibility to Chronic Hepatitis B Virus Infection[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2540-2547
- [25] Gong J, Liang YL, Zhou W, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio associated with prognosis in HBV-infected patients[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(4): 730-735
- [26] Ma XJ, Chen XF, Chen WL, et al. Study on the distribution of CD8+ memory T cell subsets and IFN- γ level during the spontaneous clearance of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(20): 4675-4679
- [27] 陈爱英. 太原地区乙肝患者HBV基因分型与细胞免疫功能研究 [J].*微生物学杂志*, 2013, 33(4): 62-65
- Chen Ai-ying. HBV Genotyping & Cellular Immune Function of Hepatitis B Patients in Taiyuan Area [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(4): 62-65
- [28] Yokoyama Y, Miyagi T, Hikita H, et al. The Hepatitis B Virus Genotype Affects the Persistence of Viral Replication in Immunodeficient NOG Mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144775
- [29] Wu Q, Xu C, Li J, et al. Evolution and mutations of hepatitis B virus quasispecies in genotype B and C during vertical transmission [J].*J Med Virol*, 2016, 88(6): 1018-1026
- [30] Thedja MD, Muljono DH, Ie SI, et al. Genogeography and Immune Epitope Characteristics of Hepatitis B Virus Genotype C Reveals Two Distinct Types: Asian and Papua-Pacific [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132533