

· 实验研究 ·

江苏省宜兴地区丙型肝炎病毒基因分型研究

许可 邓小昭 丁伟良 高键 喻荣彬 刁振宇 谈永飞 张云

【摘要】 目的 了解江苏省宜兴地区丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布特征和病毒变异情况。方法 对宜兴市人民医院收治的 158 例 HCV 抗体阳性患者血清进行 HCV RNA 检测,对阳性标本进行 Simmonds 分型,采用 5'非编码区(5'NCR)1、2、3、1b 型特异性引物进行 PCR 扩增,并对 1b 型和 2 型各 1 株的 PCR 产物测序验证。分析不同性别、临床类型的丙型肝炎患者基因型分布差异。结果 158 份血清中,有 95 份为 HCV RNA 阳性,其中 1b 型 80 份(84.2%),2 型 5 份(5.3%),1b/2 型的混合感染 5 份(5.3%),不能分型的 5 份(5.3%),1b 型的序列与 GenBank J-4 株的同源性为 99.2%,2 型与 GenBank J-6 株的同源性为 97.7%。男性和女性在基因型总体分布上存在差异($P < 0.05$),并且在单一型感染和混合型感染的分布上差异亦有统计学意义,不同临床类型的丙型肝炎中 HCV 基因型分布未显示差异。结论 江苏省宜兴地区 HCV 以 1b 型为主,男女患者 HCV 基因型分布差异有统计学意义,而不同临床类型的 HCV 基因型分布无显著差异,基本反映了本地区 HCV 感染的特点。

【关键词】 丙型肝炎病毒;基因分型

Study on hepatitis C virus genotyping in Yixing area, Jiangsu province XU Ke*, DENG Xiao-zhao, DING Wei-liang, GAO Jian, YU Rong-bin, DIAO Zhen-yu, TAN Yong-fei, ZHANG Yun. *Department of Epidemiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: ZHANG Yun, Email: zhangyun111@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes in Yixing, Jiangsu province. Methods Genotypes identification on sera samples were obtained from 158 donors who had already been anti-HCV positive through PCR method with type specific primer designed according to the sequence of 5' non-coding region (5'NCR). 5'NCR was also sequenced and compared with published date. Genotypes distribution was investigated in patients with different sex and clinical types of hepatitis C. Results Of the total 158 patients, 95 were HCV RNA positive in which 80 patients having genotype 1b (80/95; 84.4%), 5 patients having genotype 2(5/95; 5.3%), 5 patients with 1b/2 mixed genotypes (5/95; 5.3%) and another 5 patients whose genotype undetermined. The difference on the distribution of HCV genotypes was significant between female and male patients ($P < 0.05$) but not in different kinds of hepatitis C patients. Conclusion Type 1b was the predominant HCV genotype in Yixing area.

【Key words】 Hepatitis C virus; Genotype

丙型肝炎病毒(HCV)的基因型分布具有明显的地区差别,而不同基因型对于干扰素治疗的反应率差异显著,2 型和 3 型的干扰素治疗反应率达 70%~80%,而 1b 型的反应率仅为 40%~50%^[1]。国内外报道的 HCV 基因分型方法众多,本研究采用了 Simmonds 等^[2]设计的 5'NCR 型特异性引物对 HCV RNA 阳性标本进行分型。因国内报道我国

HCV 以 1b 和 2 型为主,少数为 3 型^[3],故本次分型采用了 1、2、3、1b 型特异性引物。研究江苏省宜兴地区 HCV 的基因分型对本地区丙型肝炎的预防和治疗有重要意义。

材料与方法

1. 研究对象:158 例 HCV 抗体阳性患者,平均年龄为 49.13 岁,其中男性 104 例,女性 54 例;结合流行病学调查和临床病史,根据“中华医学会传染病与寄生虫分会和肝病分会 2000 年病毒性肝炎防治方案”中诊断标准^[4],并结合肝脏超声、CT 和核磁共振诊断,158 例 HCV 抗体阳性者中慢性丙型肝炎患者 113 例,急性丙型肝炎患者 26 例,丙型肝炎肝

基金项目:江苏省高校自然科学研究指导性计划资助项目(03KJD330144);国家自然科学基金青年基金资助项目(30200232);江苏省自然科学基金资助项目(BK2004011)

作者单位:210029 南京医科大学流行病与卫生统计学系(许可、喻荣彬);南京军区军事医学研究所(邓小昭、高键、刁振宇、张云);宜兴市第一人民医院(丁伟良、谈永飞)

通讯作者:张云,Email: zhangyun111@sohu.com

硬化患者 19 例,其中有输血史丙型肝炎患者 46 例。

2. HCV RNA 检测:

(1)HCV RNA 的提取及逆转录:RNA 提取试剂盒 TRI reagent BD 为 MRC 产品,逆转录试剂盒、DNA 聚合酶为 MBI 产品。取抗 HCV 阳性血清 250 μl,采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA,溶于 20 μl DEPC 处理过的双蒸水中,取 5 μl RNA 溶液,采用随机引物,于 20 μl 体系逆转录为 cDNA。

(2)巢式 PCR 检测 HCV RNA:依据 1、2、3、1b 型 5'非编码区(5'NCR)的碱基序列设计保守区通用引物:外正义引物 5'-GCCATGGCGTTAGTAYGAGT-3'(82~101 nt),外反义引物 5'-TTTCGRACCCAAACRCTACT-3'(257~276 nt);内正义引物 5'-AGTGTCTRTRCAGCCTCCAGG-3' (99~118 nt),内反义引物 5'-ACCCAAACRCTACTMGCTAG-3'(250~269 nt)。取 5 μl cDNA 于 50 μl 体系做第一轮 PCR,反应为 95℃ 预变性 5 min、95℃ 1 min、40℃ 1 min、72℃ 1 min,35 循环;取第一轮 PCR 产物 3 μl 做第二轮 PCR,采用 25 μl 体系,扩增片段为(99~269 nt)171 bp。

3. HCV 基因分型:选择 HCV RNA 阳性标本,取巢式 PCR 外引物扩增产物,采用下列型特异性引物再次扩增:内正义引物 5'-AGTGTCTRTRCAGCCTCCAGG-3' (99~118 nt);内反义引物 1 5'-GGGGCAGCCCCAAATCTCCA-3' (220~239 nt) 141 bp;内反义引物 2 5'-CAAATGACCGGRCATAGAGT-3' (210~229 nt) 131 bp;内反义引物 3 5'-GCACGCCCAAATTTCTGGGT-3' (217~236 nt) 138 bp;内反义引物 1b 5'-ACTACTCGGCTAGCATGTCTC-3' (243~262 nt)164 bp; PCR 方法同上。

4. PCR 产物测序:将分型结果为 1b 型和 2 型的样本,取阳性 PCR 产物,送上海博亚生物技术有限公司测序。

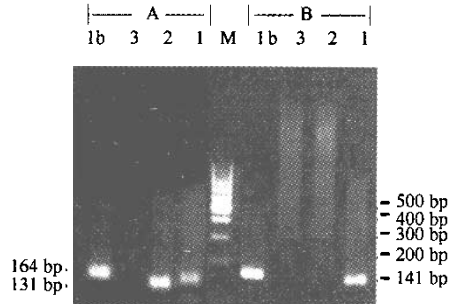
5. 统计学分析:用 Stata 7.0 统计软件进行分析,计数资料采用精确概率法分析 HCV 基因型分布差异。

6. 基因序列比对:采用 Multalin version 5.4.1 版软件在线进行。

结 果

1. HCV 基因分型结果:检测 158 份抗 HCV 阳性血清,其中 HCV RNA 阳性标本为 95 份,阳性率为 60.1%,1b 型 80 份(84.2%),2 型 5 份(5.3%),1b/2 型

混合感染 5 份(5.3%),分型不明确者 5 份(5.3%)。



A:1b 和 2 型的混合感染; B:1b 型感染

图1 基因分型 PCR 产物电泳图

2. HCV 基因型在不同性别患者中的分布:各型在不同性别患者中的分布见表 1,男性和女性基因型总体分布差异有统计学意义($P < 0.05$);1b(包括 1b/2 型混合感染)与非 1b 型的分布差异无统计学意义($P > 0.05$),男性和女性在单纯型感染与混合型感染的分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 HCV 基因型不同性别患者中的分布

性别	HCV RNA 阳性例数	1b 型 (%)	2 型 (%)	1b/2 型 (%)	不能分型 (%)
男	68	60(88.2)	5(7.4)	1(1.5)	2(2.9)
女	27	20(74.0)	0(0.0)	4(14.8)	3(11.1)
合计	95	80(84.2)	5(5.3)	5(5.3)	5(5.3)

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比

3. HCV 基因型在不同临床类型丙型肝炎中的分布:HCV 基因型在急、慢性丙型肝炎和肝硬化患者中的分布差异没有统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

表2 HCV 基因型在不同临床类型丙型肝炎中的分布

临床分类	HCV RNA 阳性例数	1b 型 (%)	2 型 (%)	1b/2 型 (%)	不能分型 (%)
急性丙肝	7	7(100)	0	0	0
轻度慢性丙肝	49	43(87.8)	3(6.1)	1(2.0)	2(4.1)
中重度慢性丙肝	26	20(76.9)	2(7.7)	3(11.5)	1(3.8)
肝硬化	13	10(76.9)	0	1(7.7)	2(15.4)

注:同表 1

4. 有输血史及无明确输血史患者 HCV 基因型的分布:有明确输血史患者与无明确输血史患者 HCV 基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$);这两组单纯型感染和混合感染的分布差异亦无统计学意义(表 3)。

5. 测序结果:本研究基因分型结果为 1b 型的样本测得 5' NCR 区扩增片段序列与 GenBank 上 HC-J4 株相应序列同源率为 99.2%,仅 1 个碱基不同,即 98G→T;分型结果为 2 型的样本与 HC-J6 株相

应序列同源率为 97.7%，有 3 个碱基不同，98G→T，107A→G，223T→C(图 2)。

表3 有输血史及无明确输血史患者 HCV 基因型的分布

	HCV RNA 阳性例数	1b 型 (%)	2 型 (%)	1b/2 型 (%)	不能分型 (%)
有输血史者	40	32(80.0)	4(10.0)	2(5.0)	2(5.0)
无明确输血史者	55	48(87.3)	1(1.8)	3(5.5)	3(5.5)

注:同表 1

讨 论

HCV 基因型分布的差异在流行病学调查中有特殊意义,我们分析了不同基因型在人群中的分布,发现 HCV 基因型在男性和女性的总体分布差异有统计学意义($P < 0.05$);在单一型感染与混合感染的分布上,差异亦有统计学意义($P < 0.05$);而在 1b(包括混合感染)与 2 型的分布上无差异。

另外,我们分析了基因型在不同临床类型丙型肝炎中的分布,差异无统计学意义。国内外众多文献报道 HCV 1b 型在中、重度慢性丙型肝炎、肝硬化中的比例比急性、轻度慢性丙型肝炎要高,肝硬化中 HCV 基因型以 1b 为主^[5],这与我们的结果相一致,提示 1b 型可能在丙型肝炎的不良预后中有一定作用。

我们分析了基因型分布在不同感染途径患者中的分布,结果显示总体分布的差异无统计学意义,在

单一型和混合型感染上也没有发现分布差异。有文献报道,输血途径感染者发生混合感染较非输血途径感染者比例高^[6],但本研究并未发现,有文献报道可能与输血次数有关^[7]。本研究的病例多因意外事故或手术需要进行输血,输血次数为 1~2 次,病例中没有血友病患者;患者中有 1 例血液透析者,1 例肾移植者,均为 1b 型;不同传染途径与感染 HCV 基因型的关系仍需进一步研究,以明确其相关性。其余的患者中 37 例有手术或注射史,5 例有献血史,可能与丙型肝炎的医源性传播有关。尚有 70 例不明确其感染途径,可能存在一定的回忆偏倚。

Simmonds 等^[2]所采用的核苷酸序列多元分析法提供了较好的 HCV 基因分型方案。根据基因变异程度及核苷酸同源性分析比较结果,将核苷酸序列同源性在 88%~100% 之间的归于同一型。我们随机选择分型结果明确的标本,对 PCR 产物进行测序,序列与 GenBank 上提供的标准株比较,结果发现,标准株基因序列与本地区 HCV RNA 5'NCR 同源性达 97.6%~99.2%,符合此片段的保守性特点,同时也证明分型结果比较可靠。对于分型不明确者,可进一步通过其他分型方法加以确定,但也可能本地区除 1、2、3 型以外,还存在其他的型别,这有待于进一步研究。

	98	107	119	163
J1	gagtgtcgtgcagcctccaggacccccctcccgggagagccatagtggtctgoggaaccggtgag			
J4	g-----g-----a-----			
J6	g-----a-----c-----			
J8	g-----a-----c-----			
1b	t-----g-----a-----			
2	t-----g-----c-----			
	164	176 179 181 183	187	204 210 214 218 220 223 224 227
J1	tacaccggaattgccaggacgaaccgggtcctttcttggataaacccgcctcaatgcoctggagatt			
J4	-----g--a-g-c--c-----c-----g--a--c-t--ag---			
J6	-----g--g-g-a--t-----a-----a--t--c-c--tc---			
J8	-----a--g-a-a--t-----a-----a--t--t-c--tc---			
1b	-----g--a-g-c--c-----c-----g--a--c-t--ag---			
2	-----g--g-g-a--t-----a-----a--t--c-c--cc---			

图2 1b,2 型 HCV 5'NCR 区 PCR 产物测序结果比对

参 考 文 献

- Orlent H, Vrolijk JM, de Man RA, et al. The treatment of hepatitis C. Ned Tijdschr Geneesk, 2003, 147: 1208-1213.
- Simmonds P, McOmish F, Yap PL, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of new virus type and restriction on sequence diversity. J Gen Virol, 1993, 74: 661-668.
- 杜绍财, 陶其敏, 朱凌, 等. 丙型肝炎病毒基因 5' 末端非编码区酶切分型研究. 中华医学杂志, 1993, 73: 7-9.
- 中华医学会传染病与寄生虫学分会和肝病分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329.

- Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatol, 1997, 27: 959-965.
- Matsubara, Takako, Sumazaki, et al. Genotyping of hepatitis C virus: coinfection by multiple genotypes detected in children with chronic posttransfusion hepatitis C. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1996, 22: 79-84.
- Tuveri R, Rothschild C, Pol S, et al. Hepatitis C virus genotypes in French haemophiliacs: kinetics and reappraisal of mixed infection. J Med Virol, 1997, 51: 36-41.

(收稿日期: 2005-01-24)
(本文编辑: 孙强正)