

昆明市静脉注射吸毒人群丙型肝炎病毒基因型分析

陈敏 马艳玲 罗红兵 陈会超 卢冉 戴洁 宋丽军 杨朝军 梅静远 贾曼红

【摘要】 目的 研究云南省昆明市静脉注射吸毒人群(IDUs)中丙型肝炎病毒(HCV)基因型的流行特点。**方法** 2014年4—7月在昆明市连续收集276份IDUs的血浆,其中199份样品为HCV抗体阳性,提取RNA后用巢式PCR对E1E2基因和NS5B基因的部分片段进行扩增。扩增产物经基因序列测定,所得序列通过构建系统进化树确定HCV的分子亚型。**结果** 结合2个基因片段,共有125份样品获得了分型结果,3b为主要的亚型,占48.8%(61/125);其他亚型按照比例依次为3a(30.4%,38/125)、6n(14.4%,18/125)、6a(3.2%,4/125)和1b(3.2%,4/125)。各HCV亚型按性别、婚姻、民族和HIV-1抗体是否阳性差异无统计学意义,按年龄分布差异有统计学意义,45岁以下组亚型多样化。分别计算不同亚型在E1E2和NS5B基因区的基因距离,结果显示3a、3b和6a亚型的基因距离大于1b和6n亚型的基因距离。3a、3b、6a 3种亚型中3b亚型毒株的基因距离大于3a亚型毒株。**结论** 昆明市IDUs人群中HCV存在5种亚型,3b和3a是主要毒株且在该人群中具有较长的流行时间。

【关键词】 丙型肝炎病毒;基因型;静脉注射吸毒者;昆明

Analysis on genotypes of hepatitis C virus among intravenous drug users in Kunming, Yunnan

Chen Min, Ma Yanling, Luo Hongbing, Chen Huichao, Lu Ran, Dai Jie, Song Lijun, Yang Chaojun, Mei Jingyuan, Jia Manhong. Institute of AIDS/STD Control and Prevention, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China

Corresponding author: Jia Manhong, Email: jiamanhong@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of hepatitis C virus (HCV) subtypes among intravenous drug users (IDUs) in Kunming, Yunnan province, in 2014. **Methods** A total of 276 plasma samples were collected from IDUs in Kunming during April 2014 – July 2014, in which 199 plasma samples were tested to be HCV antibody positive. For the HCV antibody positive samples, HCV E1E2 genes and NS5B genes were amplified by using nested-polymerase chain reaction (PCR). After sequencing, the HCV subtypes were determined through phylogenetic analysis. **Results** Based on the phylogenetic trees of E1E2 gene and NS5B gene fragments, a total of 125 samples were genotyped. 3b was the predominant subtype (48.8%, 61/125), followed by 3a (30.4%, 38/125), 6n (14.4%, 18/125), 6a (3.2%, 4/125) and 1b (3.2%, 4/125). The distributions of HCV subtypes by sex, marital status, ethnic group and HIV-1 infection status showed no statistical differences. However, the distribution of HCV subtypes by age showed statistical difference, the diversity of HCV subtypes was found in age group <45 years. The genetic distances of 3a, 3b and 6a on E1E2 and NS5B were larger than those of 1b and 6n. For genotype 3, the genetic distances of 3b on E1E2 and NS5B were larger than those of 3a. **Conclusion** Five HCV subtypes were found among IDUs in Kunming, HCV subtypes 3b and 3a were predominant, which have circulated in this population for long time.

【Key words】 Hepatitis C virus; Genotype; Intravenous drug user; Kunming

丙型肝炎病毒(HCV)是造成慢性肝炎、肝硬化及肝癌的重要原因之一。HCV的传播途径和HIV类似,静脉注射吸毒是一个重要的传播途径。云南

省处在从东南亚“金三角”毒品基地通往中国内地的陆上毒品运输线路上,由于贩毒和自身吸毒的存在,有大量的注射吸毒人员。相关研究显示云南省静脉注射吸毒人群(intravenous drug users, IDUs)中HCV的感染率接近80%。HCV基因组为单股正链RNA,易变异,目前可分为7个基因型及不同亚型。HCV基因型的研究对于了解HCV的疫情发展和地区分

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.09.018

作者单位:650022 昆明,云南省疾病预防控制中心性病艾滋病预防所

通信作者:贾曼红, Email: jiamanhong@hotmail.com

布具有重要的意义,此外HCV基因型还影响着丙型肝炎的临床发展,与抗病毒治疗的疗效和肝细胞癌的发生密切相关,并有助于HCV疫苗的研究。昆明市作为云南省会,流动人口数量大,有必要对HCV的变异趋势进行追踪,指导丙型肝炎的防治。本文对昆明市的IDUs开展了HCV的分子流行病学研究。

对象与方法

1. 研究对象:2014年4—7月在昆明市连续收集276份IDUs的血浆,通过两种HCV抗体酶联免疫试剂检测,199份样品为HCV抗体阳性。同时收集相关的流行病学资料。

2. 病毒RNA提取:使用Qiagen公司QIAamp Viral RNA试剂盒,根据标准操作程序从140 μl样品中提取HCV RNA,在-80℃条件下保存。

3. 序列扩增和测定:采用巢式PCR扩增HCV的E1E2基因片段(H77:933~2 060)和NS5B基因片段(H77:8 340~9 233),所用引物和条件参见文献[1]。使用TaKaRa公司One Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒,进行反转录及第1轮PCR扩增,反应体系为25 μl;使用Tiangen公司2×Taq PCR MasterMix试剂盒,进行第2轮PCR扩增,取第1轮反应产物5 μl,反应体系为50 μl。第2轮PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定,阳性样品送北京梓熙生物公司纯化和测序。

4. 亚型分析:序列测定后使用Gene Codes公司的Sequencher 5.1软件进行拼接,然后用Bioedit软件进行多序列比对和序列清理。获得的E1E2和NS5B基因区序列与HCV国际参考株比对后,用Mega 6.0软件构建neighbor-joining进化树分别确定不同基因的亚型,结合2个基因片段的结果确定亚型。

5. 统计学分析:应用SPSS 19.0软件进行统计学分析,采用χ²检验和Fisher精确概率法进行统计学分析。

结果

1. 一般人口学特征:2014年4—7月,在昆明市的IDUs中收集HCV抗体阳性样品199份。经扩增和测序,获得E1E2基因序列108条,NS5B基因序列101条。结合两个基因区序列,通过构建系统进化树,125个样品获得基因分型结果,其中84个样品同时获得E1E2和NS5B基因区的分型,24个样品仅获得E1E2基因区的分型,17个样品仅获得NS5B基因区的分型。见图1、2。

获得基因分型的125名研究对象的年龄在25~60岁间,平均44.2岁,性别比为2.9:1。民族分布以汉族(91.2%, 114/125)为主,其他民族占8.8%(11/125)。婚姻状况方面,已婚或同居占44.8%(56/125),未婚占36.0%(45/125),离异或丧偶占19.2%(24/125)。其中10.4%(13/125)的研究对象HIV-1抗体阳性。

2. HCV基因型:在获得基因分型的125个样品中,3b是主要的亚型,占48.8%(61/125);其他亚型依次为3a(30.4%, 38/125)、6n(14.4%, 18/125)、6a(3.2%, 4/125)和1b(3.2%, 4/125)。各HCV亚型按

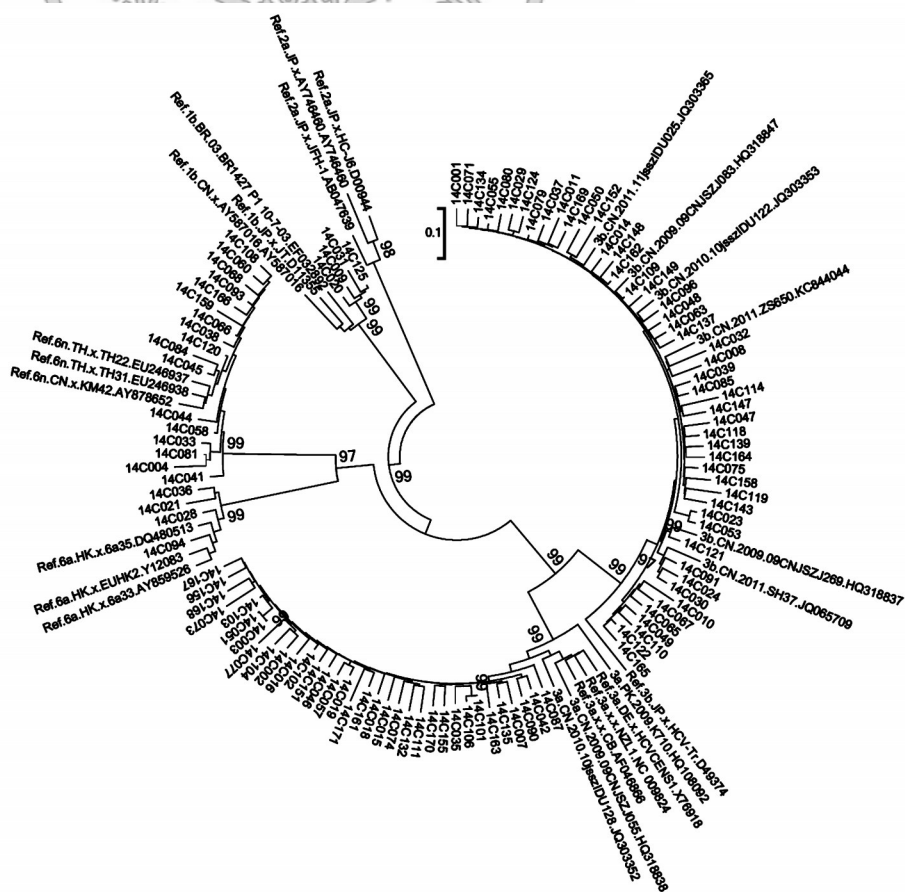


图1 E1E2基因区系统进化树

表2 昆明市IDUs中HCV不同亚型的基因距离

基因区	基因距离 ($\bar{x} \pm s$)				
	1b	3a	3b	6a	6n
E1E2	0.058 3 ± 0.006 5	0.088 5 ± 0.000 9 ^{a,b}	0.095 0 ± 0.000 8 ^{a,b,c}	0.104 7 ± 0.007 6 ^{a,b}	0.073 6 ± 0.002 1
NS5B	0.019 5 ± 0.001 4	0.032 8 ± 0.000 5 ^a	0.035 4 ± 0.000 3 ^{a,b,c}	-	0.029 4 ± 0.001 7

注:^a与1b亚型的同一基因区比较, $P < 0.05$; ^b与6n亚型的同一基因区比较, $P < 0.05$; ^c与3a亚型的同一基因区比较, $P < 0.05$

疆地区向国内其他地区传播^[9];但3a在云南地区的起源,可能直接来源于巴基斯坦,也可能从巴基斯坦通过我国云南周边国家进入,因为中亚的毒品基地“新月湾”和东南亚的毒品基地“金三角”存在着人员往来,但目前还没有明确的证据。而基因进化分析表明3b在国内的起源比较单一,即从西南地区向西北和国内其他地区传播^[8],这与国内陆上毒品运输路线一致,也与IDUs中HIV-1的CRF07_BC的传播方向一致^[10]。最近的研究提示,6a可能起源于越南,分别进入我国云南省和广西壮族自治区,云南省6a主要在IDUs中传播,经广西壮族自治区6a进入了周边省份,由于尚未明确的原因在广东地区形成了流行^[11]。针对6n的进化分析表明,6n可能起源于泰国和缅甸,通过IDUs经云南省向国内其他地区传播^[12]。基因距离在一定程度上可以提示某亚型的流行时间长短,本研究中昆明地区IDUs中3a、3b和6a亚型的基因距离大于1b和6n亚型的基因距离,提示3a、3b和6a在该人群中流行时间较长,而1b和6n可能较晚进入。

HCV基因型与丙型肝炎的预后和治疗密切相关。根据2009年美国肝病研究学会(AASLD)的《丙型肝炎的临床实践指南》,HCV感染者在开始抗病毒治疗前应检测HCV的基因型^[13]。在以干扰素为基础的 治疗中,不同的基因型治疗效果有较大的差异。1型的持续病毒学应答最差,4型次之;而2、3型的持续病毒学应答较好。此外,HCV基因型对抗病毒治疗的疗程和药物剂量的选择也有指导作用。相比1型,2和3型的治疗疗程较短,利巴韦林的剂量较小。在昆明市IDUs中,3型是主要的基因型,相对来说属于治疗效果比较好的,积极开展筛查和治疗可收到很好的效果。

综上所述,IDUs推动了HCV在云南省的传播,由于特殊的地理位置,使得流行于周边国家的HCV基因型进入我国云南省,形成明显区别于其他地区的HCV基因型分布特征。今后,还需在云南省其他人群中监测HCV基因型的分布及变化特征,进一步明确HCV的传播趋势,找到控制HCV传播的有效途径。

参 考 文 献

- [1] Tian D, Li L, Liu YJ, et al. Different HCV genotype distributions of HIV-infected individuals in Henan and Guangxi, China [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50343.
- [2] Gower E, Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection [J]. J Hepatol, 2014, 61(1 Suppl): S45-57.
- [3] Pybus OG, Barnes E, Taggart R, et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia [J]. J Virol, 2009, 83(2): 1071-1082.
- [4] Pybus OG, Markov PV, Wu A, et al. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus [J]. Int J Parasitol, 2007, 37(8/9): 839-849.
- [5] Smith DB, Pathirana S, Davidson F, et al. The origin of hepatitis C virus genotypes [J]. J Gen Virol, 1997, 78 (Pt 2): 321-328.
- [6] Su YY, Liu HX, Wang N. Hepatitis C virus genotypes in China: a systematic review [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(1): 80-84. (in Chinese)
苏迎盈, 刘慧鑫, 汪宁. 中国丙型肝炎病毒基因型分布 [J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(1): 80-84.
- [7] Liu J, Yang Y, Gong JL, et al. The prevalence of hepatitis C virus (HCV) subtypes in Chinese HIV-1/HCV co-infected individuals [J]. Chin J Epidemiol, 2009, 30(7): 663-667. (in Chinese)
刘静, 杨洋, 宫菊丽, 等. HIV-1/HCV合并感染者中HCV基因亚型流行情况调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(7): 663-667.
- [8] Lu L, Wang M, Xia WJ, et al. Migration patterns of hepatitis C virus in China characterized for five major subtypes based on samples from 411 volunteer blood donors from 17 provinces and municipalities [J]. J Virol, 2014, 88(13): 7120-7129.
- [9] Liu J, Zhang CY. Phylogeographic analyses reveal a crucial role of Xinjiang in HIV-1 CRF07_BC and HCV 3a transmissions in Asia [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23347.
- [10] Meng ZF, Xin RL, Zhong P, et al. A new migration map of HIV-1 CRF07_BC in China: analysis of sequences from 12 provinces over a decade [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52373.
- [11] Fu YS, Qin WB, Cao H, et al. HCV 6a prevalence in Guangdong province had the origin from Vietnam and recent dissemination to other regions of China: phylogeographic analyses [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e28006.
- [12] Zhang CY, Wu NN, Liu J, et al. HCV subtype characterization among injection drug users: implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16817.
- [13] Puoti C, Guarisco R, Bellis L, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C [J]. Hepatology, 2009, 50(1): 322.

(收稿日期: 2015-02-23)

(本文编辑: 王岚)