

· 临床论著 ·

南京地区 218 例丙型肝炎患者 HCV 基因分型

常静霞 孟运运 吴亚光 汪茂荣

【摘要】 目的 了解南京地区丙型肝炎病毒(HCV)基因型的分布特点。**方法** 收集 218 份抗-HCV阳性和 HCV RNA 阳性的血清标本,通过基因芯片法进行基因分型研究。**结果** 218 例 HCV 感染者血清中,检出 1b、2a、3a、3b、6 型单基因型(分别为 8.72%、2.29%、5.50% 和 1.83%)和 1b + 2a、1b + 3b、1b + 6 型、2a + 3a 混合基因型共 9 种,其中以 1b 型为主,占 77.06%。**结论** 1b 型为南京地区丙型肝炎患者感染 HCV 的主要基因型,2a、3a、3b、6 型亦占相当比例,提示南京地区 HCV 流行的基因型呈现多样性。

【关键词】 肝炎病毒,丙型;HCV RNA;基因型

Analysis on the genotyping of 218 patients with hepatitis C virus infection in Nanjing CHANG Jing-xia, MENG Yun-yun, WU Ya-guang, WANG Mao-rong. Center of Liver Diseases, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: WANG Mao-rong, Email: maorongwang@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution status of hepatitis C virus (HCV) genotypes in Nanjing. **Methods** Total of 218 cases with serologic anti-HCV and HCV RNA positive were determined for their genotypes by HCV gene chip. **Results** There were 9 different HCV subtypes in the 218 samples, including genotypes 1b, 2a, 3a, 3b, 6 (with the rates of 8.72%, 2.29%, 5.50% and 1.83%, respectively), 1b + 6, 1b + 2a, 1b + 3b, 2a + 3a and 1b was the main genotype (77.06%). **Conclusions** HCV 1b is the predominant genotype patients with HCV infection in Nanjing, and the proportions of genotypes 2a, 3a, 3b, and 6 were 8.72%, 2.29%, 5.50% and 1.83%, indicating the diversity of HCV genotype in Nanjing.

【Key words】 Hepatitis C virus; HCV RNA; Genotype

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科中一个独立种属,为单股正链 RNA 病毒,其基因组全长约 9.4 kb^[1]。HCV 感染可导致慢性丙型肝炎、肝硬化及肝癌的发生。全世界丙型肝炎病毒感染率约为 3%,由此推算全球约有 2 亿人口为丙型肝炎病毒感染者;我国 HCV 感染率约为 3.2%,感染总人数约 4 000 万^[2]。HCV 为 RNA 病毒,其 RNA 聚合酶的低保真性及缺乏校正功能致使 HCV 的基因组呈现高度异质性,根据 HCV 基因组核苷酸序列的差异,可将 HCV 分为 6 种基因型及众多亚型^[3]。研究表明,不同 HCV 基因型的地区分布、致病性及治疗应答均存在差异,可为 HCV 感染者治疗和疗程的确定提供重要依据^[4]。本研究采用基因芯片技术

对所收集的南京地区 HCV 感染者血清中 HCV 进行基因分型研究,以分析南京地区 HCV 基因型的分布特征,为丙型肝炎的科学化治疗提供指导。

资料与方法

一、研究对象

218 份抗-HCV 阳性和 HCV RNA 阳性血清标本收集自 2009 年 3 月~2011 年 7 月本院门诊就诊和住院的患者,其中男性 127 例,女性 91 例,年龄 17~75 岁,平均年龄 33.5 岁。入组患者诊断均符合《丙型肝炎防治指南》和《病毒性肝炎防治方案》中诊断标准。每人抽取外周静脉血 5 ml,2 h 内分离血清,于 -20℃ 贮存备用。

二、试剂与仪器

抗-HCV ELISA 试剂盒购自北京万泰药业股份有限公司,由专业的实验室操作人员按操作说明进行检测,阈值为阴性对照均值 + 0.12;HCV RNA 定量检测试剂购自上海科华生物工程公司,运用

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.05.002

基金项目:国家十一五科技重大专项课题(No.2008ZX10002-014)

作者单位:210002 南京市,南京军区解放军第八一医院全军肝病中心

通讯作者:汪茂荣,Email:maorongwang@126.com

Roche 公司的 Light cycle PCR 扩增仪,按操作说明进行检测,检测值 > 500 拷贝/ml 判断为阳性;丙型肝炎病毒基因分型检测芯片购自中国科学院上海微系统与信息技术研究所和瑞芯生物科技有限公司。

三、方法

1. HCV 基因分型检测芯片试剂盒基本原理:根据 HCV 基因核酸一级结构设计相应的探针,合成后固定于特殊处理的玻璃载体上从而构成基因芯片,荧光标记的 PCR 产物与之特异结合,杂交后经过扫描,在相应的基因型特异性探针位置上出现荧光点,根据点位置确定 HCV 的基因型和基因亚型。

2. HCV RNA 分型检测步骤:(1)血清标本 HCV RNA 的提取与逆转录:取血清 50 μ l 与 150 μ l Trizol 试剂旋涡混匀,加入 50 μ l 氯仿(-20°C 预冷),振荡混匀后,13 000 r/min 离心 10 min;吸取上清,加入等量异丙醇(-20°C 预冷),混匀后室温下放 10 min,然后 13 000 r/min 离心 15 min;弃上清,加入 300 μ l 75% 乙醇(-20°C 预冷),颠倒混匀数次后 13 000 r/min 离心 10 min;吸干上清,空气中干燥 5 min;然后加入 10 μ l RT-Mix、0.4 μ l RT 酶于沉淀中,混合均匀后,42 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 60 min。

(2)巢式 PCR 扩增 cDNA:第 1 次 PCR 反应:1.5 μ l cDNA 模板,1 μ l Taq 酶,13 μ l PCR Mix 1,反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 30 次后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;第 2 次 PCR 反应:1 μ l 尿嘧啶 N 糖基化酶(UNG)加入 27.5 μ l Mix 2 后经 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,97 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,再加入 2 μ l Taq 酶及 0.5 μ l 第 1 次 PCR 的产物,反应

条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

(3)基因芯片进行基因分型:将 2 μ l 扩增产物与 10 μ l 杂交液充分混匀,置 98 $^{\circ}\text{C}$ 中变性 5 min,然后迅速转移至冰浴中放置 5 min,充分混匀后滴于芯片的点样区,盖上盖玻片,置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 预热的杂交盒中杂交 30 min(42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱);洗涤 2 次,于芯片的点样区滴加抗-地高辛标记,盖上盖玻片,置湿盒中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中静置 30 min;洗涤两次,显色 10~20 min,观察结果并进行扫描分析。

四、统计学处理

本研究数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HCV 基因分型的检测结果

218 份抗-HCV 阳性和 HCV RNA 阳性血清标本中,基因芯片分型率为 100%。共检测出 1b、2a、3a、3b、6 型、1b+6 型、1b+2a、1b+3b、2a+3a 共 9 种单基因型和混合基因型。其中 1b 型患者 168 例(77.06%),为本组患者 HCV 感染的主要基因型;其次为 2a 型者 19 例,占 8.72%;其余基因型则占较少比例,分别为 3a 型 5 例(2.29%),3b 型 12 例(5.50%),6 型 4 例(1.83%),1b+2a 型 4 例(1.83%),1b+3b 型 2 例(0.92%),1b+6 型 1 例(0.46%),2a+3a 型 3 例(1.38%),本组患者中未检出 1a 和 2b 基因型。单基因型酶显色结果见图 1。

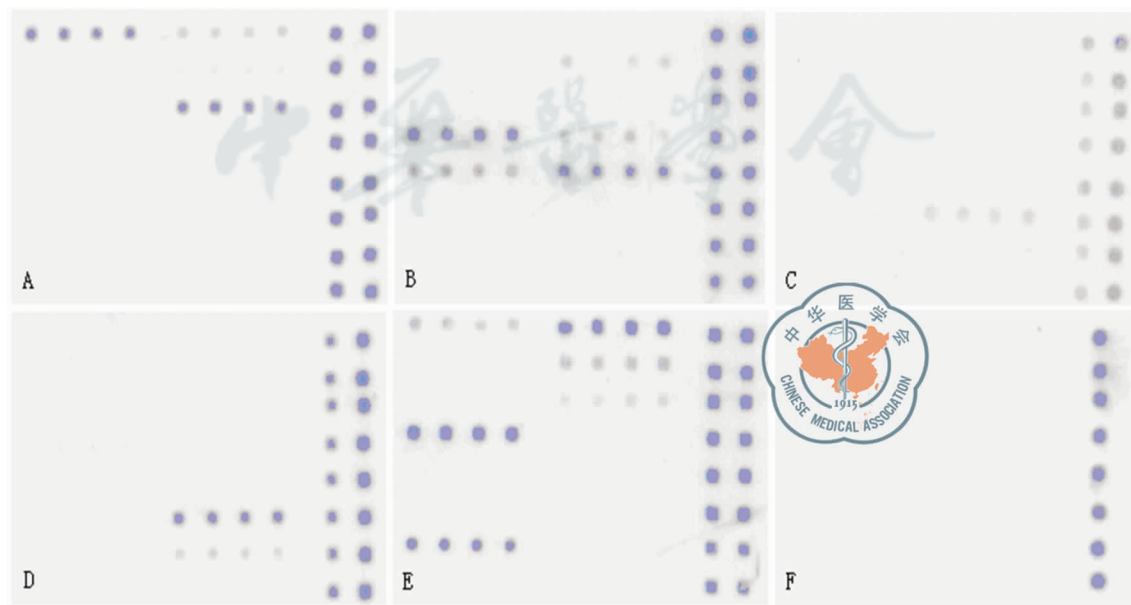


图 1 HCV 基因分型杂交结果

注:A:1b B:2a C:3a D:3b E:6 型 F:阴性

二、患者 HCV 基因型与性别相关性

208 例单基因型标本中,1b 型基因型为 168 例,其中男性 99 例,女性 69 例,非 1b 型基因型患者 40 例,其中男性 22 例,女性 18 例。卡方检验分析结果显示,HCV 基因型与性别无显著相关性($\chi^2 = 0.857, P > 0.05$)。

讨 论

丙型肝炎病毒(HCV)是严重影响人类健康的常见病原,其中约 80% 以上的急性患者转变为慢性持续性感染,慢性丙型肝炎患者中约 20% 进展为肝硬化,而肝硬化患者中每年约 1%~4% 进展为原发性肝癌^[5]。而 HCV 基因型与肝病严重程度、干扰素应答等均密切相关,可为 HCV 感染者的诊断和治疗提供重要的科学依据^[6]。目前根据 Simmonds 分型系统可分为 6 个基因型和 68 个基因亚型^[7]。

HCV 基因型分布呈现地区性差异,欧美各国流行株大多数为 1a 型;亚洲地区以 1b 型为主,其次为 2a 型;HCV 3 型基因型则在印度半岛、东南亚和印度尼西亚较为突出,而中东、南非和香港地区常见的 HCV 基因亚型分别为 4a、5a 和 6a 型^[8]。我国大部分地区以 HCV 1b 和 2a 型最常见,其中 1b 型占 70%~80%,在南方城市其感染率达 90% 以上,自南向北 2a 型患者逐渐增多^[9]。但近年来所报道的基因型分布情况逐渐改变,我国 HCV 基因分型仍以 1b 为主,但无明显数据提示由南向北的改变,且可测出的基因型及亚型类别增多和混合感染增多^[10]。本研究结果与国内报道相似^[11],南京地区 HCV 基因型的流行优势株为 1b 型,占 77.06%,2a 型次之,占 8.72%;其次是 3a、3b 和 6 型,并检出 1b+2a、1b+3b、1b+6 和 2a+3a 共 4 种混合型基因型。国内研究报道在珠江三角洲地区,6a 型已取代 2a 型成为该地区流行株,为仅次于 1b 型的基因型^[12],在该地区还检出了基因 6 型的新亚型,提示基因 6 型并不仅限于港澳地区,且在我国南部也有检出。本研究与胡婷等^[13]研究结果相比,另外检测出了 3 型、6 型以及多种混合基因型,提示南京地区的基因型呈现多样化趋势,可能与目前人群流动性增加、静脉吸毒人数增加以及血液透析等治疗措施的普及和现在检测方法改善、灵敏度及特异性的提高等因素有关。本研究结果显示,HCV 基因型性别分布差异无统计学意义,与郭风彩等^[14]研究结果相符。

干扰素是目前丙型肝炎抗病毒治疗的首选药物。临床研究发现干扰素的疗效与 HCV 基因型密切相关,HCV 1b 型对干扰素的持续病毒学应答(sustained viral response,SVR)相对较低,约为 20%,而 2 型和 3 型 SVR 率却可达 67%^[15]。因此,了解 HCV 基因分型具有重要的临床意义,有助于判定治疗的难易程度及制定抗病毒治疗的个体化方案^[6]。今后研究中,本课题组将就 HCV 基因型、病毒载量以及干扰素的疗效进行更深入的探讨。

参 考 文 献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
- 2 王青,梁晓峰,陈园生. 丙型肝炎的研究近况. 国际检验医学杂志,2006,27(4):349-351.
- 3 Simmonds P, Bukh I, Combet C, et al. Consensus proposals for a system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology,2005,42(4):962-973.
- 4 徐少保,熊自忠,高人煮,等. 丙型肝炎病毒基因型的研究进展. 安徽医药,2009,13(8):869-871.
- 5 李小宁,黄升海. 丙型肝炎基因型研究新进展. 国际检验医学杂志,2009,30(5):479-480.
- 6 中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华预防医学杂志,2004,38(3):210-215.
- 7 谢莹,谢晨. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展. 大连医科大学学报,2010,32(4):470-474.
- 8 周君霞,梁宁. 丙型肝炎病毒不同分型方法的分析及分型意义. 标记免疫分析与临床,2007,14(3):190-192.
- 9 王琳,徐东平,张玲霞. 丙型肝炎病毒基因型分型及临床意义. 肝脏,2006,11(6):416-417.
- 10 李伟琴,袁致海,徐光华,等. 丙型肝炎基因分型进展及其临床意义. 世界华人消化杂志,2009,17(6):589-593.
- 11 谢尧,徐道振,陆志檬,等. HCV 基因型对慢性丙型肝炎干扰素疗效的影响. 中华肝脏病杂志,2004,12(2):72-75.
- 12 Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. J Med Virol,2005,75(4):538-549.
- 13 胡婷,沈传来,郑杰. 南京地区丙型肝炎病毒基因分型的研究. 现代检验医学杂志,2009,24(2):72-75.
- 14 郭风彩,钱梅云,史建国,等. 不同基因型慢性丙型肝炎患者血清 HCV RNA 与载脂蛋白 B 的关系. 胃肠病学和肝病杂志,2008,17(11):914-915.
- 15 池肇春. 新编实用肝病学. 北京:中国医药科技出版社,1992:168

(收稿日期:2011-11-28)

(本文编辑:孙荣华)

常静霞,孟运运,吴亚光,等. 南京地区 218 例丙型肝炎患者 HCV 基因分型[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(5):381-383.