

· 临床论著 ·

徐州地区丙型肝炎病毒基因分型研究

方圆 戴明佳 张言超 颜学兵

【摘要】目的 了解徐州地区丙型肝炎病毒(HCV)的基因型构成状况,分析HCV不同基因型感染患者之间肝功能以及病毒载量是否存在差异。**方法** 对116例抗-HCV及HCV RNA阳性的患者,采用实时荧光PCR产物测序法检测HCV基因分型;同时检测血清肝功能的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBil),采用荧光定量PCR方法检测血清HCV RNA水平。**结果** 116例患者共检测出8种基因型,主要为1型63例(54.31%),其中1a型1例,1b型61例,1c型1例;2型48例(41.38%),其中2a型40例,2i型8例;3型(3a)1例(0.86%);6型4例(3.45%),6a型1例,6h型3例。1型、2型和6型患者之间的肝功能以及病毒载量,显示各型之间差异无统计学意义(P 均 >0.05)。**结论** 徐州地区HCV感染以基因1、2型为主,也存在一定数量的6型和3型;不同基因型HCV感染者肝功能及病毒载量差异无统计学意义。

【关键词】 肝炎病毒, 丙型; 基因型; HCV RNA

Investigation on the genotypes of hepatitis C virus in Xuzhou FANG Yuan, DAI Mingjia, ZHANG Yanchao, YAN Xuebing. Department of Infection Diseases, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: YAN Xuebing, Email: yxbxuzhou@126.com

【Abstract】Objective To investigate on the genotypes of hepatitis C virus (HCV) in Xuzhou, and to analyze the differences in virological load and liver function among patients with different genotypes. **Methods** Total of 116 patients with hepatitis C virus antibody (HCV-Ab) positive serum samples were enrolled and serum hepatitis C virus RNA (HCV RNA) level was detected by using FQ-PCR. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil) were detected, respectively. HCV was genotyped by real-time PCR products. **Results** There were 8 different HCV subtypes found among 116 patients, mainly 1 type with 63 (54.31%) cases, among which 1 case for 1a type, 61 cases for 1b type, 1 case for 1c type. There were 48 (41.38%) cases for type 2, among which 40 cases for 2a type, 8 cases for 2i type. There was 1 (0.86%) case for type 3 (3a). There were 4 (3.45%) cases for type 6, among which 1 case for 6a type, 3 cases for 6h type. There were no significant differences among the patients with type 1, type 2 and type 6 in liver function and virological load (P all >0.05). **Conclusions** HCV genotypes 1 and 2 are the predominant genotype in patient with HCV infection in Xuzhou, while genotype 3 and 6 were also found. There are no significant differences among various genotypes of hepatitis C virus infection in liver function and viral load.

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

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链RNA病毒,属于黄病毒科。由于HCV为RNA病毒,容易发生变异,根据核苷酸序列同源性分析,将HCV分为6个基因型和多种基因亚型^[1]。中国大陆流行最广泛的HCV基因亚型为1b及2a型,

且分布地区差异较大,随着时间的推移,基因型分布产生较大变化^[2]。HCV不同基因亚型病毒所引起的病情进展不同并可能影响到干扰素对丙型肝炎治疗的疗程和效果。目前HCV基因型检测方法主要有直接测序法、限制性片段长度多态性分析法、特异性引物PCR法以及特异性探针荧光PCR法^[3-5]等,其中,由于PCR产物测序法简便易行,快速灵敏,适用于临床操作,因此,本研究采用PCR产物测序法对徐州地区HCV感染者的HCV进行基因分型分析,进一步了解徐州地区不同人群的基因型构成

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.004

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81371867); 2011年江苏省“科教兴卫”医学重点人才培养基金(No. RC2011117); 2011年江苏省“六大人才高峰”项目; 2011年江苏省“333高层次人才培养工程”第三层次培养对象

作者单位: 221002 徐州市, 徐州医学院附属医院感染性疾病科

通讯作者: 颜学兵, Email: yxbxuzhou@126.com

以及血清 HCV RNA 水平与患者肝功能指标的关系。

资料与方法

一、病例资料

116例抗-HCV阳性及HCV RNA阳性血清标本收集自2011年3月至2012年11月本院门诊及住院的患者,其中男性83例,女性67例,平均年龄(43.95 ± 16.59)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,并签署知情同意书。本研究为回顾性研究,并获得徐州医学院附属医院医学伦理委员会批准。分别抽取患者外周静脉血2 ml,经1 600 r/min离心20 min(离心半径 $r = 9.5$ cm),分离血清至 -20 °C贮存备用。

二、肝功能生化指标检测

检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBil)。数据由徐州医学院附属医院检验科提供。

三、血清 HCV RNA 定量检测

采用上海科华生物科技有限公司 HCV 核酸检测试剂盒,操作按说明书和实验室操作规程进行。

四、HCV 基因型的检测

采用上海申友生物科技有限公司丙型肝炎分型检测试剂盒,具体操作步骤如下。

1. 样本处理:取血清 100 μ l 与 200 μ l RNA 提取液混匀,加入 100 μ l 氯仿震荡混匀,12 000 r/min 离心 2 min;吸取 140 μ l 上清,加入 140 μ l 异丙醇,混匀,12 000 r/min 离心 8 min,加入 300 μ l 预冷无水乙醇,混匀,12 000 r/min 离心 4 min;弃上清,风干数秒;加入 30 μ l DEPC 水溶解,低速离心数秒,冰上保存。(离心机型号: Eppendorf 5804R, 离心半径 $r = 9.5$ cm)。

2. 巢氏反应 I:取 9 μ l HCV 反应液 I、1 μ l 混合酶液、5 μ l RNA 溶液,反应条件为 42 °C 30 min,

94 °C 3 min, 94 °C 10 s、55 °C 20 s、72 °C 30 s 循环 25 次,37 °C 恒温保温。

3. 巢氏反应 II:取 14 μ l DEPC 水、8 μ l HCV 反应液 II、1 μ l 巢氏反应 I 产物,反应条件为 42 °C 5 min, 94 °C 5 min, 94 °C 10 s、55 °C 20 s、72 °C 30 s 循环 25 次,37 °C 恒温保温。

4. 验证产物:反应完毕后,观察荧光定量 PCR 仪上的探针是否起跳,起跳为阳性样品。

5. PCR 产物酶解:取阳性样品的 PCR 产物 1 μ l,加入 2 μ l SAP 混合物,混匀。37 °C 60 min, 80 °C 15 min, 4 °C 保存。

6. 测序 PCR 反应:取阳性 PCR 酶解产物 3 μ l、测序试剂 1 μ l、测序引物 2 μ l,反应条件为 96 °C 1 min 变性,96 °C 10 s、50 °C 5 s、60 °C 4 min 循环 25 次,4 °C 恒温保温。

7. 测序产物纯化:离心管中加入 16 μ l 醋酸钠-乙醇混合物,剧烈震荡,避光静置 15 min, 4 °C, 11 000 r/min 离心 30 min,吸去上层液体;加入 70 μ l 70%预冷乙醇,剧烈震荡,4 °C, 11 000 r/min 离心 15 min,吸去上层液体;加入 70 μ l 70%乙醇,温和颠倒数次,4 °C, 11 000 r/min 离心 5 min,吸去上层液体,让乙醇挥发干净,加入 10 μ l Hi-Di Formamide 以溶解 DNA;PCR 仪上变性:95 °C 4 min、4 °C 4 min,上机电泳。在自动化基因分析仪上进行测序。

8. 测序及分析:将测得的序列置于 NCBI 的病毒分型窗口,点击确定后出现的结果即为该血清标本的 HCV 亚型。

五、统计学处理

应用 Excel 录入数据,运用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计数资料采用卡方检验;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析。检验水准: $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 徐州地区 HCV 基因分布情况

HCV 基因型	例数	百分比 (%)
1a	1	0.86
1b	61	52.59
1c	1	0.86
2a	40	34.48
2i	8	6.90
3a	1	0.86
6a	1	0.86
6h	3	2.59

表 2 不同基因型患者年龄、性别和血清病毒载量的比较

分组	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	HCV RNA (\log_{10} 拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)	F	P
1 型	63	44/19	42.14 \pm 17.27	6.66 \pm 1.09	3.040	0.052
2 型	48	24/24	46.54 \pm 16.27	6.13 \pm 1.18		
6 型	4	2/2	43.50 \pm 6.19	6.23 \pm 1.52		

表3 不同基因型患者血清 ALT、AST 和 TBil 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	AST (U/L)	ALT (U/L)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)
1 型	62.54 \pm 86.84	60.73 \pm 61.02	18.22 \pm 8.40
2 型	85.78 \pm 111.53	76.56 \pm 93.12	23.03 \pm 40.03
6 型	79.25 \pm 81.82	58.50 \pm 49.70	14.68 \pm 13.55
F	0.778	0.620	0.525
P	0.462	0.540	0.593

结 果

一、HCV 基因分型检测结果

116 例抗-HCV 阳性及 HCV RNA 阳性样本中, 共检测出 3 种基因型: 1、2、3 型, 8 种基因亚型: 1b、2a、2i、6h、1a、1c、3a、6a, 详见表 1。同时为更直观的表现出结果, 将数据绘制成图, 如图 1 所示, 其中 1b 型为主要基因型, 共 61 例 (52.59%), 其次为 2a 型 40 例 (34.48%)、2i 型 8 例 (6.90%)、6h 型 3 例 (2.59%)、1a 型 1 例 (0.86%)、1c 型 1 例 (0.86%)、3a 型 1 例 (0.86%) 和 6a 型 1 例 (0.86%)。

二、患者血清 HCV RNA 及 ALT、AST 和 TBil 的检测结果

在 116 例 HCV RNA 阳性标本中, 1 型、2 型、6 型患者年龄、性别、血清病毒学及肝功能指标的检测结果, 如表 2~3 所示。同时, 比较 1 型、2 型和 6 型患者之间的肝功能以及血清病毒载量, 在除外性别、年龄等干扰因素后, 显示各型患者差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。由于 3 型样本数仅 1 例, 因此, 其转氨酶指标不足以代表其基因型的肝功能受损情况, 故未将这种基因型的肝损伤情况进行统计分析。

讨 论

HCV 含有一个开放的编码区, 可编码产生 3

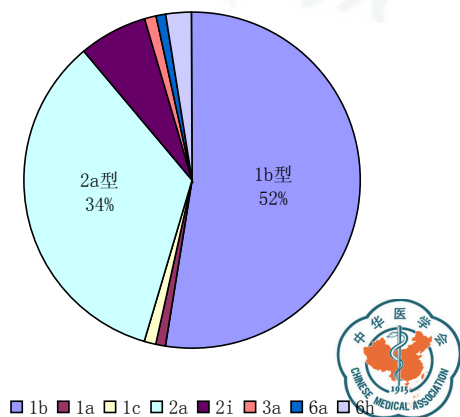


图1 徐州地区 HCV 基因型分布

个结构蛋白和 6 个非结构蛋白。由于 HCV 呈高度异质性, 根据 Simmonds 等^[1]方法, 将 HCV 基因分为 6 型, 不同基因型与 HCV 感染后的病情变化以及干扰素的疗效有一定相关性, 并且 HCV 的基因型能影响抗病毒治疗的效果^[6-7]。因此, HCV 基因分型结果有助于判定病情治疗难易程度及制定抗病毒治疗的个体化方案^[8-10]。

HCV 基因型及亚型在不同地区存在很大差异, 我国大部分地区以 HCV 1b 型及 2a 型常见, 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^[11]。本研究结果同苏迎盈等^[12]报道相似, 目前徐州地区主要流行优势株为 1b 型, 其次为 2a 型, 同时也有 3a 型和 6h 型检出。同南京地区相比^[12], 因南京与徐州同属于华东地区, 其主要流行株相同, 均为 1b 型及 2a 型。同 10 年前报道的徐州地区基因型研究结果相比^[13], 目前采用荧光 PCR 产物测序方法替代酶切法进行检测, 操作更为简便, 结果更为准确, 并且更为精确的分出亚型。1b 型取代 2a 型成为主要优势株, 本文仅有报道 1 例, 未检测出混合型。HCV 的混合基因型感染多见于静脉药瘾以及反复输血患者, 此次并未对患者感染途径进行统计, 可在今后进行更为深入的研究。本研究在徐州地区也检测到了 3 型及 6 型, 6 型中两种亚型 6a 1 例、6h 3 例。6 型以前为港澳地区常见基因型, 虽然 HCV 基因型分布有地域差异, 但随着交通发达, 人群流动性加快, 加上静脉吸毒、纹身人数增多, 同一个地区的 HCV 基因型分布随着时间的推移基因型的构成也会发生改变。

有学者认为, 肝病严重程度与基因型无关^[14], 本文也未发现 1 型、2 型、6 型 HCV 感染者之间 HCV RNA 载量和肝功能指标有差异。血清转氨酶水平以及 HCV RNA 载量是评估肝脏损伤程度的重要指标。Yotsuanagi 等^[15]认为 HCV 基因型不是引起肝病严重程度和病程的重要因素, 肝功能的受损情况可能由感染方式、再感染、宿主免疫、年龄、病毒合并感染及饮酒等多因素共同引起。本研究对徐州地区丙型肝炎病毒的型别分布情况进行了初步的分析, 为今后该地区丙型肝炎的预防以及治疗提供了一定的资料。但由于本研究采用测序分型方法纳入病例相对较少, 研究指标相对单一, 加大样本

量、多重指标分析对 HCV 基因亚型与临床特点的研究有重要意义。

参考文献

- 1 Simmonds P, Bukh I, Combet C, et al. Consensus proposal for a system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology*, 2005, 42(4):962-973.
- 2 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.
- 3 濮翔科, 杭双熊, 申红玉, 等. 常州地区丙型肝炎病毒基因型及临床分析[J]. *放射免疫学杂志*, 2012, 25(6):663-665.
- 4 王静, 王露楠. 丙型肝炎基因型定量检测及分型检测方法的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(27):2897-2902.
- 5 高丽, 杨绍敏. HCV 基因分型进展及临床意义[J]. *传染病信息*, 2013, 26(2):122-125.
- 6 Jessner W, Watkins-Riedel T, Müller C, et al. Comparison of the Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 and the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor, Version 2.0, assays in HCV genotype 4 infection[J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(11):775-781.
- 7 李小宁, 黄升海. 丙型肝炎基因型研究新进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(5):479-481.
- 8 黄敬彬, 柯楚琴. 粤东地区丙型肝炎患者的HCV基因型分型研究[J]. *新医学*, 2012, 43(2):109-111.
- 9 孙长华. 丙型肝炎患者基因分型与干扰素治疗疗效分析[J]. *医学检验与临床*, 2010, 21(3):75-76.
- 10 郭振华, 陈青锋, 肖萍, 等. HCV基因分型与干扰素疗效相关性探讨[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(4):306-307.
- 11 王琳, 徐东平, 张玲霞. 丙型肝炎病毒基因型分型及临床意义[J]. *肝脏*, 2006, 11(6):416-417.
- 12 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.
- 13 颜学兵, 吴文漪, 魏来, 等. 不同基因型丙型肝炎病毒感染的临床分析[J]. *临床内科杂志*, 1999, 16(3):324.
- 14 刘志英, 魏红山, 戴旺苏, 等. 北京地区丙型肝炎患者的丙型肝炎病毒基因分型[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(2):148-149.
- 15 Yotsuanagi H, koike K, Yasuda K, et al. Hepatitis C viruses genotypes and development of hepameellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1995, 76(8):1352-1355.

(收稿日期: 2013-11-09)

(本文编辑: 孙荣华)

方圆, 戴明佳, 张言超, 等. 徐州地区丙型肝炎病毒基因分型研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(3): 317-320.

中华医学会