

· 临床论著 ·

哈尔滨某三甲医院丙型肝炎病毒基因分型研究

黄超群¹ 王福祥²

【摘要】目的 分析哈尔滨某三甲医院丙型肝炎患者的HCV基因分型情况,为地区性丙型肝炎的防治提供理论依据。**方法** 收集50例抗-HCV阳性患者血清标本,提取HCV RNA进行核心(core)片段扩增和DNA测序。根据测序结果,采用进化树方法对所得基因序列进行基因分型,获得入组丙型肝炎患者的基因分型情况。**结果** 本研究中42例患者的血清样本成功扩增出HCV core基因部分片段(+328 nt~+726 nt),其中各种HCV基因分型分布如下:基因分型结果1b型12份(28.57%),2a型29份(69.05%),3a型1份(2.38%)。**结论** 哈尔滨某三甲医院丙型肝炎患者HCV的基因型最常见为HCV 2a型,其次为HCV 1b型,偶见HCV 3a型。

【关键词】 肝炎,丙型;基因分型;哈尔滨

Genotype of HCV genes in a tertiary hospital in Harbin Huang Chaoqun¹, Wang Fuxiang². ¹Department of Gastroenterology, the 211 Hospital of PLA, Harbin 150086, China; ²Department of Infectious Diseases, The 4th Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China
Corresponding author: Wang Fuxiang, Email: 343562888@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the HCV genotype of patients with hepatitis C in a tertiary hospital in Harbin, and to provide theoretical basis for the prevention and treatment of regional HCV. **Methods** Serum samples were collected from 50 cases with anti-HCV positive, and HCV RNA was extracted for core fragment amplification and DNA sequencing. The genotype of the DNA sequence was performed by cladogram and then the genotype of HCV were obtained. **Results** The core fragment (+328 nt~+726 nt) of HCV was amplified in 42 cases among the 50 patients. There were 12 patients had genotype 1b (28.57%), 29 patients had genotype 2a (69.05%), 1 patient was 3a (2.38%). **Conclusion** The genotype of HCV 2a was the most common type in HCV patients in this hospital, followed by HCV 1b and occasionally HCV 3a.

【Key words】 Hepatitis C virus; Genotype; Harbin

丙型肝炎是目前慢性肝病中的主要类型之一,能够演变为肝硬化和肝细胞癌,甚至导致死亡,是人类健康杀手之一^[1];近期有研究发现丙型肝炎可导致糖代谢异常^[2]。丙型肝炎由丙型肝炎病毒感染引起(hepatitis C virus, HCV),该病毒为单股正链RNA病毒,基因序列变异度较高^[3]。目前,已经发现HCV病毒有6个基因型,11个基因亚型,其基因型分布具有明显的地域性,我国HCV主要基因型为1、2、3型^[4]。随基因型的变化,感染者的临床表现、抗病毒治疗方案及预后均存在差

异^[5],因此,研究HCV在某一地区的基因分型,对临床工作有重要的指导意义,也是目前HCV研究中的重点内容之一。

我国HCV基因型的地区分布近年来受人口流动及注射毒品等影响,某些地区会发生一些相应的改变,故陆续有研究报道。我国HCV感染者以HCV 1b基因型为主,但南北分布存在差异。东南沿海以HCV 1b型为主^[6-8],但各地区第二大流行株存在差异,如多数南方省份第二大流行株为HCV 2a型,而广东的第二大流行株为HCV 6a型^[9];南方边境省份例如广西壮族、云南省,因吸毒人口较多,存在HCV 6a型和HCV 3a型较多的情况^[10]。东北、华北则以HCV 2a型为主要流行株^[11-12],与全国的整体趋势相符合。西南的流行株为HCV 1b和HCV 3b两种

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.05.012

作者单位: 150086 哈尔滨市,解放军211医院消化内科¹; 150001 哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第四医院感染科²

通信作者: 王福祥, Email: 343562888@qq.com

基因亚型^[13-15]；西北则为HCV 2a和HCV 1b型为主。少数民族聚居地区的基因型亦具有相应的特点^[16]。现对哈尔滨地区某三甲医院收集的42例丙型肝炎患者基因分型进行研究，报道如下。

资料与方法

一、研究对象

收集2012至2013年哈尔滨医科大学附属第四医院感染科所收集的符合入选标准的50例HCV感染者血液样本，入组患者抗-HCV均呈阳性。其中男性22例，女性28例；年龄为20~60岁，平均年龄42岁，均为汉族。平均感染时间为5.3年。感染途径均为医源性传播。

二、研究方法

1. 主要仪器和试剂：详见表1~2。

2. 病毒RNA提取：采用有EDTA的抗凝管采集42例患者的血液标本，分离血浆后，采用QIAamp Blood Mini Kit试剂盒（德国，Qiagen）提取病毒RNA，具体操作参加试剂盒说明书。

3. HCV core 基因部分区段的扩增：采用套式RT-PCR扩增HCV core基因部分区段，该区段位于HCV基因组（+328 nt~+726 nt），引物设计详见表3。

取HCV感染者的外周血，提取其基因组，以P₁、P₂为外引物，以P₃、P₄为内引物进行套式PCR扩增HCV基因组的core区。首轮PCR反应与逆转录在同一体系中，体系和反应条件为：总体积50 μl，10倍PCR反应缓冲液5.0 μl，dNTP（2.5 mmol/L）1.0 μl，MgCl₂（25 mmol）3.0 μl，引物（10 mmol/L）各2.0 μl，Taq酶（5.0 IU）0.3 μl，核酸样品10 μl，莫洛尼鼠白血病毒（moloney murine leukemia virus, MMLV）（200 IU）0.4 μl，RNA酶的蛋白质抑制剂（RNasin）（40 IU）0.25 μl，42 ℃孵育1 h。第一轮反应条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火1 min，72 ℃延伸40 s，共30个循环；72 ℃延伸10 min。

第二轮反应体系和反应条件：总体积50 μl，10倍PCR反应缓冲液5.0 μl，dNTP（2.5 mmol/L）1.0 μl，MgCl₂（25 mmol）3.0 μl，引物（10 mmol/L）各1.0 μl，Taq酶（5.0 IU）0.3 μl，首轮扩增产物2 μl。第二轮反应条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火1 min，72 ℃延伸40 s，共30个循环；72 ℃延伸10 min。

4. DNA测序：首先将扩增后的样本经1%琼脂糖凝胶电泳观察扩增特异性，目的片段与预期大小一致的样本（350~400 bp）可作为送检的样本。将待检测PCR产物送至北京Invitrogen公司进行测序。测序过程中，无论正向或反向测序测序仪读取的序列前几十个碱基不准确，单独单项测序有时得不到360 bp的核心区，故选用双向测序，不准确的碱基位置能够互补，保证能拿到全长准确序

表1 本研究应用主要仪器

仪器名称	产地
Mastercycler gradient PCR仪	德国Eppendorf
恒温水浴箱	北京金达阳光
NN-K563S微波炉	日本Panasonic
凝胶电泳仪	杭州博日公司
EC3凝胶成像系统	美国UVP公司
制冰机	日本三洋公司
高压蒸气灭菌器	日本三洋公司
超低温冰箱	日本三洋公司
普通冰箱	中国海尔公司
可调移液枪	德国Eppendorf
离心机	美国BECKMAN

表3 扩增 HCV core 基因部分片段引物序列

引物名称	引物序列	引物标记
外引物		
上游引物	5'-ACTGCCTGATAGGGTGCTTGC-3'	P ₁
下游引物	5'-ATGTACCCCATGAGGTCGGC-3'	P ₂
内引物		
上游引物	5'-AGGTCTCGTAGACCGTGCA-3'	P ₃
下游引物	5'-CATGTGAGGGTATCGATGAC-3'	P ₄

表2 本研究应用的主要试剂（盒）

试剂名称	产地
QIA amp RNA Blood Mini Kit; Buffer AVL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AVE, Carrier-RNA	德国QIAGEN
普通rTaq酶	大连Takara生物工程有限公司
琼脂糖	大连Takara生物工程有限公司

列。以P₃、P₄为测序引物进行双向测序，所测序列利用Sequcher 4.9清理拼接，随后用Bioedit软件对样本序列及对应的国际标准株序列进行分析。使用ClustalX 2.1对所测出的序列进行多序列比对。用MEGA 5.05软件绘制系统进化树对HCV病毒进行基因亚型分析，参考序列来自HCV Database (<http://hcv.lanl.gov>)，共选择了49条序列作为参考序列（将测序序列与HCV参考基因组进行BLAST比对，确定扩增区域相对于参考基因组的位置）。并用FigTree软件对进化树做进一步处理。

结 果

一、HCV core基因部分区段的扩增

以抗-HCV阳性患者血清中提取的RNA作为模版，经巢式RT-PCR后，取部分产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，42份样品于300~400 bp处显示出特异性条带，与预期片段大小相符合；以部分作为代表条带详见图1：标准（600 bp）；1~6泳道为阳性扩增产物。

部分HCV感染者血样中的病毒载量较低，未能成功扩增其基因区段，故无法测序。在全部收集的50例样本中有42例可成功扩增，扩增成功率为84%，将显示出特异性条带的样本送至公司进行基因测序。此42例患者中男性18例、女性24例，患者年龄20~60岁，平均感染时间为5.3年。感染途径为医源性传播、性传播或不明原因。

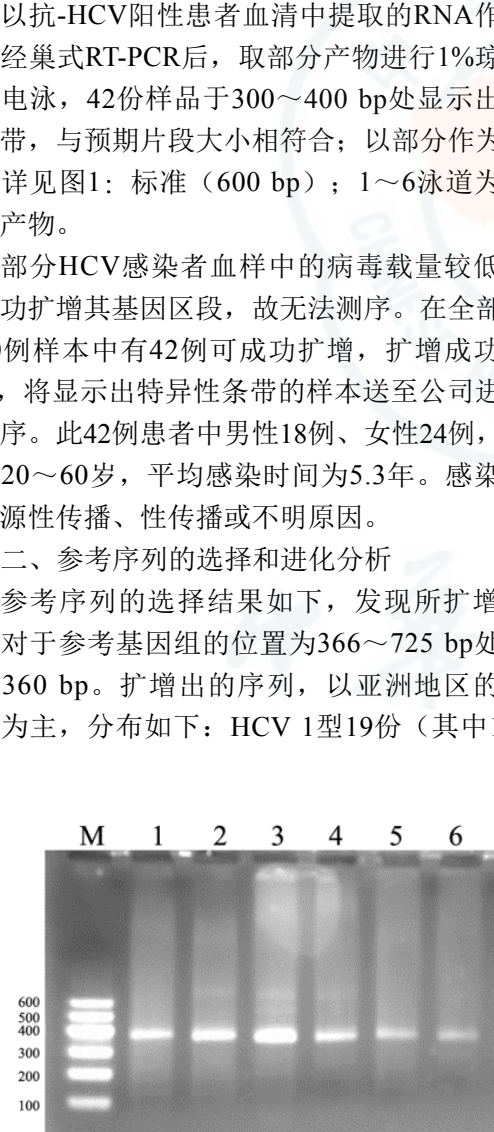
二、参考序列的选择和进化分析

参考序列的选择结果如下，发现所扩增的区域相对于参考基因组的位置为366~725 bp处，长度为360 bp。扩增出的序列，以亚洲地区的来源序列为主，分布如下：HCV 1型19份（其中1a型5

份、1b型13份、1c型1份）；HCV 2型11份（其中2a型6份、2b型2份、2c型3份）；HCV 3型9份（3a型6份、3b型3份）；HCV 4a型4份；HCV 5a型3份，HCV 6a型3份。使用MEGA5构建最大似然进化树，详见图2。从参考序列的进化树可以看出，序列之间进化关系与基因分型标准非常接近，故可以代表HCV全基因用于HCV分型参考以及描述各株序列之间的进化关系。

三、测序序列与参考序列的进化分析

将42条测序序列与参考序列合并，使用ClustalX 2.1进行多序列比对，使用GeneDoc处理比对结果，去掉两端高变异的区域，然后将处理后的序列导入MEGA 5，使用最大似然法计算进化树，



注：M：Marker，为DNA分子量

图1 HCV core区基因扩增产物电泳图

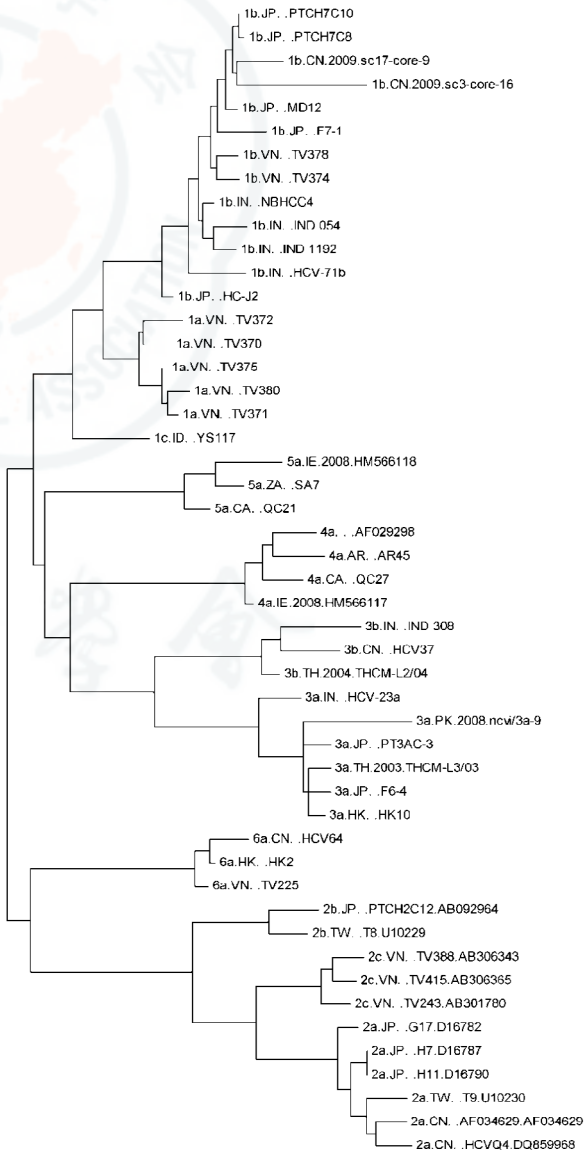


图2 参考序列最大似然进化树

详见图3~7。

该进化树非常明确的显示, 42份测序序列中12份与HCV 1b参考序列属于同一分枝, 属于1b型; 29份序列与HCV 2a参考序列属于同一分枝, 属于2a型; 1份样本序列与HCV 3a参考序列在同一分枝, 属于3a型。

4. 序列比对结果: 使用Clustal X 2.1对42条测序序列进行多序列比对, 结果如下(图8)。基因离散率计算结果: 进化分析结果表明, 42条序列分为1b(12条序列)、2a(29条序列)和3a(1条序列)共3个基因型。使用MEGA 5 Distance工具计算其组间和组内离散率, 计算模型为Kimura 2参数模型, Bootstrap法1 000次, 计算结果为: HCV 1b型序列组内平均离散率为(4.4 ± 0.7)%; 2a型序列组内平均离散率为(3.9 ± 0.6)%; 1b和2a序列组间平均离散率为(20.0 ± 2.3)%; 1b和3a序列组间平均离散率为(18.7 ± 2.4)%; 2a和3a序列组间平均离散率为(23.1 ± 2.8)%。

讨 论

HCV是一种经血液传播的肝炎病毒, 现已经发

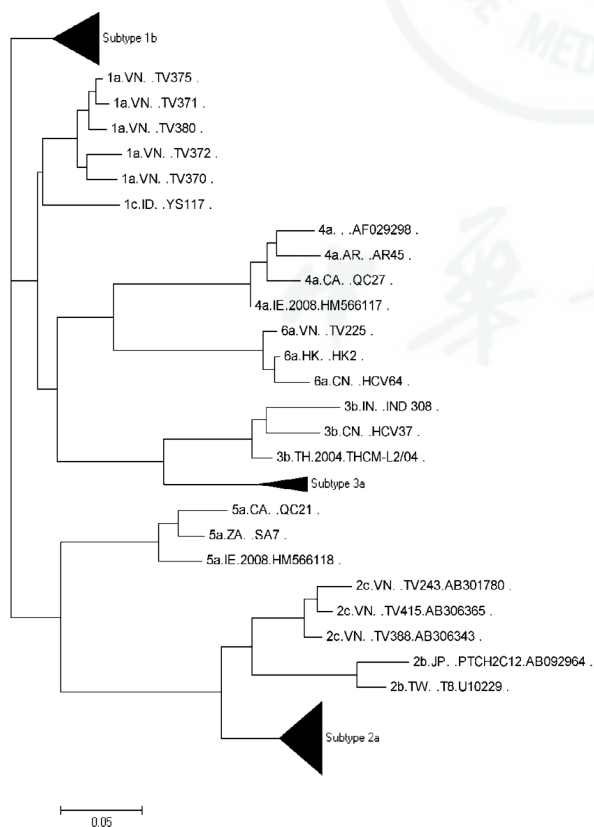


图3 测序序列在进化树中分属的三个基因型

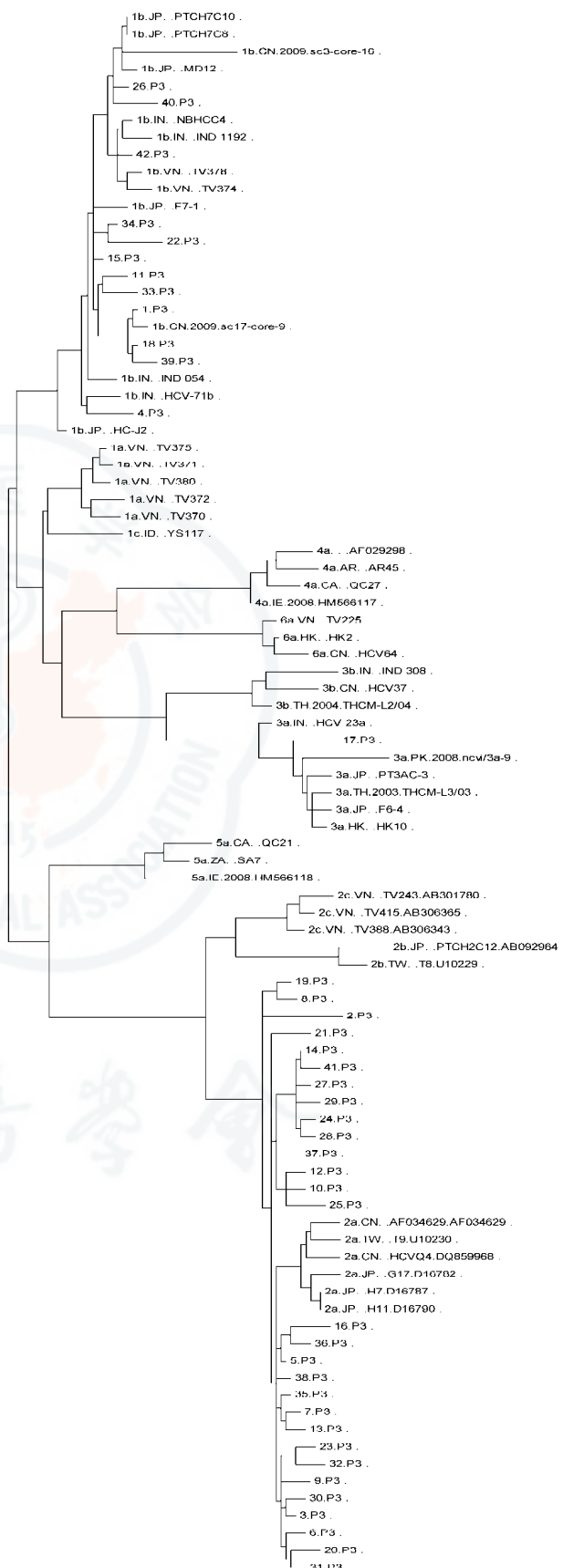


图4 测序序列和参考序列的完整最大似然进化树

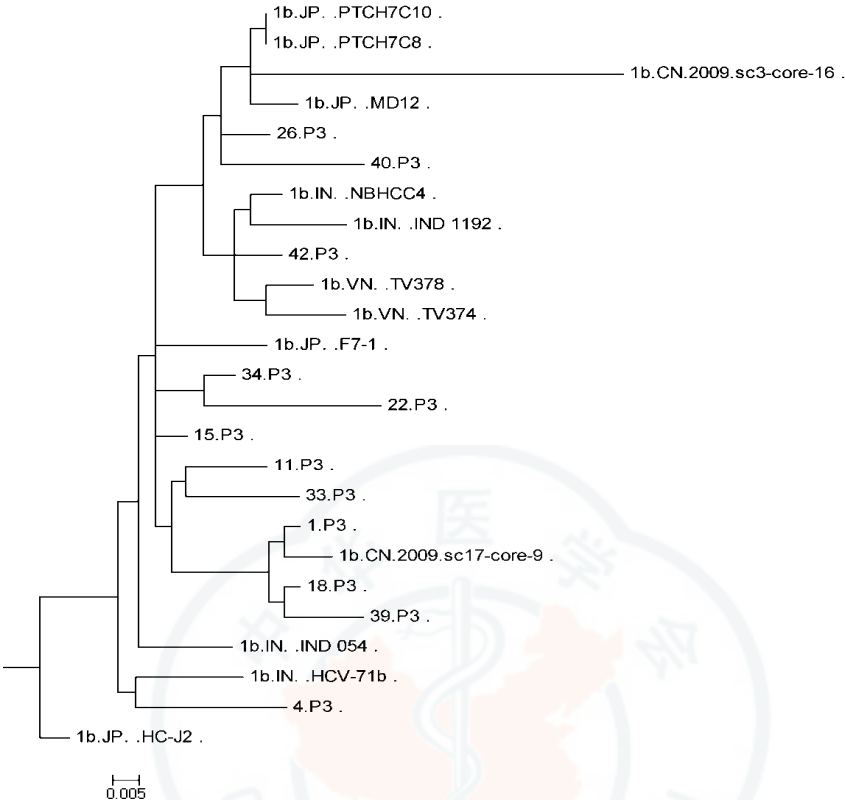


图 5 HCV 1b 子树

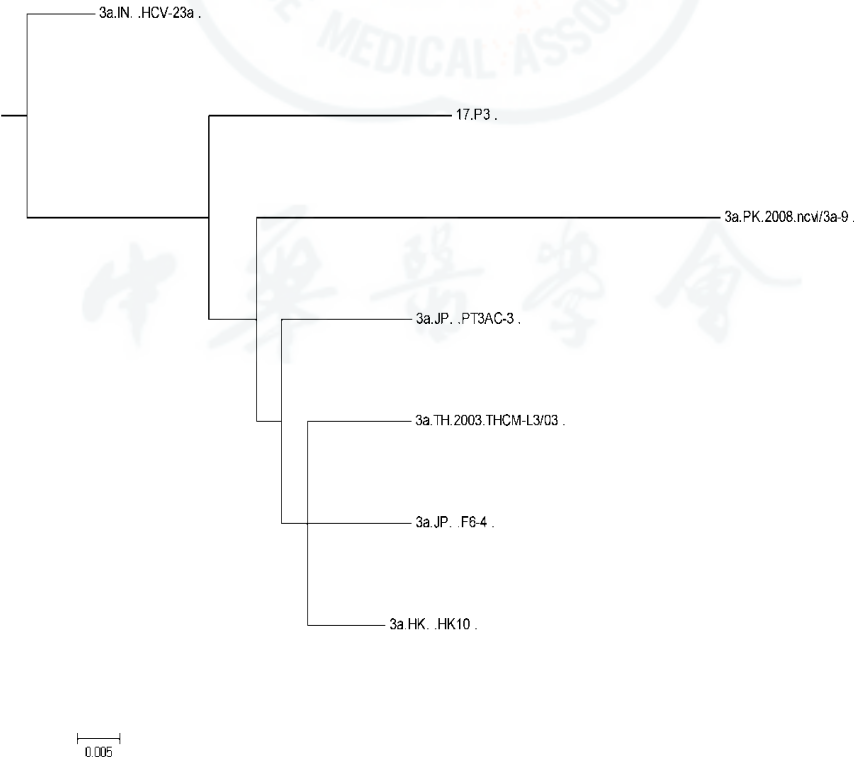


图 7 HCV 3a 子树

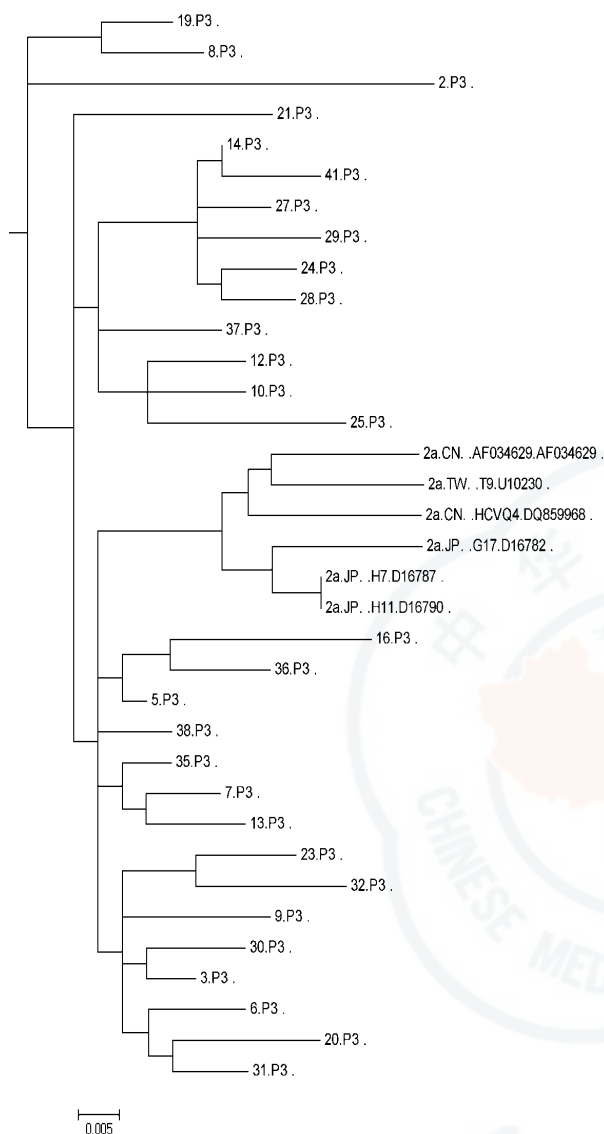


图6 HCV 2a子树

展为主要的肝炎病毒之一。而HCV感染者极易发展为慢性,甚至会进一步发展为肝硬化、甚至肝细胞癌^[17]。另有研究表明,HCV的基因型分部具有明显的地域差别,其基因型不同也对抗病毒治疗的应答、疾病的转归等有重要影响,故研究HCV病毒基因型分布,对指导临床治疗方案有重要意义。国内有大量学者研究丙型肝炎的基因分型,多数研究均为地区性研究,多中心研究较少^[18]。本研究结合临床工作,选择哈尔滨地区感染HCV患者50例,以其血液标本作为研究对象,分析哈尔滨地区的HCV病毒基因分型情况。虽然样本较小,但较以往报道以及近年来HCV病毒基因分型的流行病学调查,本研究结果符合一般规律。

常见的HCV分型方法中,按照Simmonds分型方

法,可分为1~6型,各不同基因型以及基因亚型的患者,临床治疗方案以及干扰素的使用均有不同^[19]。以往研究表明,我国1b和2a两种基因型较为常见;而在不同地域HCV的流行株存在一定差异,如美国以HCV 1a型和HCV 1b最常见^[20],尼泊尔最常见的是HCV 3型^[21],北非最常见的为HCV 4型^[22];这种不同基因型在不同地区流行的情况可能原因有HCV病毒来源、HCV病毒传播途径、人群的流动性以及感染人群的遗传背景^[23]。

本研究中42份RT-PCR阳性样本中,通过进化研究发现2a型在哈尔滨地区的HCV感染者中比例最高,其次为1b型,仅1例3a型(由于该型在本地区属罕见,经流行病学调查后,确定患者非外地流动人口)。HCV 2a、1b亚型较多,与全国的流行趋势相符合^[24]。但过去研究中,有研究表明,国内的主要流行株为HCV 2a、1b,以HCV 1b型为主要流行株,本研究结果发现HCV 2a型是哈尔滨地区的主要流行株,但是2a型与1b型的总比例几乎达100%,因此与以往的结论并不矛盾。另外,有1例HCV 3a型患者,考虑HCV 3a型最可能来自于静脉吸毒人群^[25],故不排除患者有吸毒史的可能。近年来,由于人口流动加之生活方式的改变,病毒性肝炎的传播方式产生一定的变化,从医源性传播向注射吸毒传播转变,而本研究调查结果与以往本地区流行病学调查结果有所不同^[11]。且近2年来并无关与本地区的类似报道,故本研究在流行病学调查方面具有一定意义。以上结果可为哈尔滨地区制定人群HCV预防与治疗方案以及公共卫生投入方案制定提供一定的参考。

参 考 文 献

- [1] Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies[J]. *J Viral Hepat*,2006,13(1):34-41.
- [2] 康姚洁. 丙型肝炎病毒感染致糖代谢异常的相关机制研究进展[J]. *实用肝脏杂志*,2014,7(1):102-105.
- [3] 周一萌, 窦晓光, 张琳, 等. 丙型肝炎病毒基因分型检测方法研究进展[J]. *中国实用内科杂志*,2014,34(8):819-822.
- [4] Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment[J]. *Adv Pharmacol*,2013,67:169-215.
- [5] Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C[J]. *Hepatology*,2002,36(5 Suppl 1):S121-S127.
- [6] 方圆, 戴明佳, 张言超, 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*,2014,8(3):317-320.
- [7] 张宇, 柳丽娟, 张启云. 福建地区慢性丙型肝炎患者丙型肝炎病毒基因分型研究[J]. *福建医药杂志*,2016,38(2):91-94.
- [8] 胡大山, 赵伟, 薛蓉, 等. 南京与广东两地丙型肝炎215例2基因分型

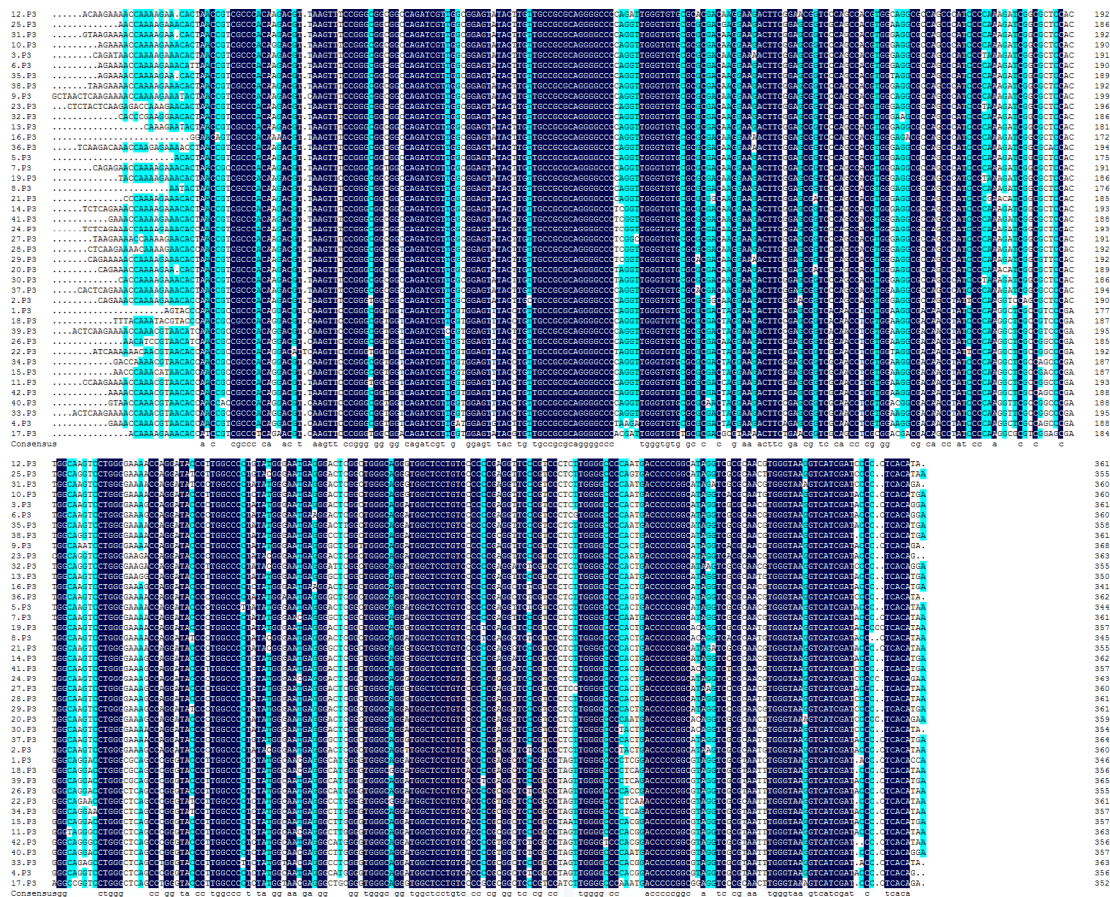


图8 序列比对结果

- 与感染途径分析[J]. 江苏医药,2014,40(5):597-598.
- [9] 肖桂娥,魏绍静,张复春,等. 广州地区丙型肝炎患者基因分型研究[J]. 热带医学杂志,2014,14(5):589-594.
 - [10] 唐维,苏明华,江建宁,等. 广西地区丙型肝炎病毒的基因型分布与流行病学特征[J]. 世界华人消化病杂志,2014,22(9):1300-1306.
 - [11] 毕蔓茹,王晓初,王威,等. 黑龙江地区丙型肝炎病毒性肝炎病毒基因型与亚型的分布特点及临床意义[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版),2014,6(9):30-32.
 - [12] 金海涵,林宝禄,刘树业. 天津地区丙型肝炎病毒基因型与临床的相关性研究[J]. 天津医科大学学报,2014,20(4):286-292.
 - [13] 林将,温先勇,唐敏. 川南地区汉族人群丙型肝炎病毒基因分型及其与临床关系[J]. 检验医学与临床,2016,13(10):1359-1361.
 - [14] 周召刚,曾藤,徐华. 重庆地区丙型肝炎病毒基因分布及临床意义[J]. 重庆医科大学学报,2015,40(3):383-387.
 - [15] 杨跃东,杨兴林,张流,等. 贵阳地区丙型肝炎患者病毒基因型与血清病毒载量及血液生化细胞学指标相关性研究[J]. 贵州医药,2015,39(1):14-17.
 - [16] 陈兆云,刘继文,孟存仁,等. 新疆地区汉族,维吾尔族,哈萨克族丙肝患者基因型研究[J]. 新疆医科大学学报,2015,38(7):855-861.
 - [17] Pearlman BL. Hepatitis C treatment update[J]. Am J Med,2004,117(5):344-352.
 - [18] 包叶江,陈卫平,方认华,等. 2004-2012年丙型肝炎的流行特性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(19):4469-4471.
 - [19] 张泽敏,于兰芳,李一鸣,等. 聚乙二醇干扰素-2a联合利巴韦林联合熊去氧胆酸治疗慢性丙型肝炎的临床疗效评价[J]. 世界华人消化病杂志,2014,22(7):1005-1007.
 - [20] Zein NN, Persing DH. Hepatitis C genotypes: current trends and future implications[J]. Mayo Clin Proc,1996,71(5):458-462.
 - [21] Tokita H, Shrestha SM, Okamoto H, et al. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group[J]. J Gen Virol,1994,75(Pt 4):931-936.
 - [22] Abdulkarim AS, Zein NN, Germer JJ, et al. Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes[J]. Am J Trop Med Hyg,1998,59(4):571-576.
 - [23] Nakano T, Lu L, Liu P, et al. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries[J]. J Infect Dis,2004,190(6):1098-1108.
 - [24] 赵璐,冯悦,夏雪山. HCV基因型的差异性流行与进化[J]. 遗传,2012,34(6):666-672.
 - [25] Mathe C, Wollants E, Verbeeck J, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C among drug users in Flanders, Belgium: association of genotype with clinical parameters and with sex- and drug-related risk behaviours[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2005,24(8):514-22.

(收稿日期: 2016-11-28)

(本文编辑: 孙荣华)

黄超群, 王福祥. 哈尔滨某三甲医院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), 2017,11(5):483-489.