

山东地区 153 例汉族丙型肝炎患者 HCV 基因分型研究^{*}

刘义庆¹, 田文君¹, 渠 滕¹, 刘春梅¹, 许 丽², 王盛华¹, 朱之炜³, 张炳昌^{1△} (1. 山东大学附属省立医院检验科, 济南 250021; 2. 山东大学第二医院肝病科, 济南 250033; 3. 山东省济南市体外诊断试剂工程技术研究中心 250101)

【摘要】 目的 了解近年来山东地区汉族丙型肝炎病毒(HCV)感染者基因型的分布特点及与 HCV-RNA 病毒载量的相关性。**方法** 抽取山东省立医院门诊及住院汉族丙型肝炎患者实时荧光定量聚合酶链反应检测 RNA 阳性标本 153 例, 用焦磷酸测序法进行基因分型。**结果** 共检出 5 种基因亚型, 1b、2a、1a、3a、3b 比例依次为 65.36%、28.76%、3.92%、1.32%、0.65%。1b 亚型病毒载量高于 2a, 其他亚型病毒载量之间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 山东地区汉族 HCV 基因型以 1b 为主, 其次为 2a, 且 1b 亚型病毒载量高于 2a。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 基因型; 焦磷酸测序

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.19.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)19-2649-02

Investigation of HCV genotypes in 153 patients with chronic hepatitis C in Shandong Han nationality^{*} LIU Yi-qing¹, TIAN Wen-jun¹, QU Teng¹, LIU Chun-mei¹, XU Li², WANG Sheng-hua¹, ZHU Zhi-wei³, ZHANG Bing-chang^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China; 2. Department of Hepatopathy, the Second Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250033, China; 3. Jinan Vitro Diagnostic Reagents Engineering Technology Research Center, Jinan 250101, Shandong, China)

【Abstract】 Objective To study the latest distribution of hepatitis C genotypes and the correlation between hepatitis C genotypes and viral loads among chronic hepatitis C patients of Han nationality in Shandong region. **Methods** One hundred and fifty three HCV RNA positive cases from inpatients and outpatients of Han nationality in Shandong provincial hospital were detected by real-time fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR), followed by pyrophosphate sequencing method for genotyping. **Results** Five subtypes including HCV 1b, 2a, 1a, 3a, 3b were detected at frequencies of 65.36%, 28.76%, 3.92%, 1.31%, 0.65%. HCV1b was associated with a significantly higher viral load compared to HCV2a($P<0.05$). There was no significant differences among the other subtypes. **Conclusion** HCV 1b is the most predominant subtypes among hepatitis C patients of Han nationality in Shandong, followed by 2a, and the viral load of HCV 1b was higher than 2a.

【Key words】 hepatitis C virus; genotype; pyrophosphate sequencing

丙型肝炎病毒(HCV)感染是一个世界性的传染病, 全球大约有 1.7 亿人被感染, 我国 HCV 感染者约 4 200 万人^[1]。HCV 慢性感染可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化, 部分患者可发展为肝硬化、肝癌等终末期肝脏疾病, 严重威胁人类健康。HCV 是单股正链 RNA 病毒, 极易发生基因变异, 根据其核苷酸序列的差异, 可分为 6 种 HCV 基因型及不同亚型, 根据 2005 年新的 HCV 基因型命名规则, 以阿拉伯数字表示 HCV 基因型, 以小写英文字母表示基因亚型。HCV 基因分型方法主要包括直接测序法、限制性片段长度多态性分析法(RFLP)、特异性引物聚合酶链反应(PCR)法、特异性探针荧光 PCR 法、基因芯片法等^[2]。HCV 基因组的 E1、NS5b、C 区直接测序和树分析是最准确、最经典的检测方法, 为 HCV 基因分型的“金标准”^[3]。为了解近年来山东地区汉族丙型肝炎患者 HCV 基因型分布情况, 本研究通过焦磷酸测序法对 153 例山东地区汉族丙型肝炎患者进行 HCV 基因分型, 以期对山东地区汉族人

群丙型肝炎的诊治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 5 月至 2013 年 10 月山东省立医院门诊及住院的 153 例丙型肝炎患者, 均为山东地区汉族且均未接受过抗病毒治疗。其中男 71 例, 女 82 例, 年龄 16~93 岁, 平均年龄(46.17±18.37)岁。

1.2 方法 无菌采集外周静脉血 5 mL, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-K₂)抗凝, 在收集后 2 h 内, 室温下 3 000 r/min 离心 8 min, 将血浆转移到无菌离心管中, -70 ℃ 保存留做 HCV-RNA 检测。RNA 检测结果大于 10³ IU/mL 的标本进一步做焦磷酸测序并做 HCV 基因分型。

1.2.1 HCV-RNA 检测 采用实时荧光定量逆转录 PCR(FQ-RT-PCR)技术, HCV 核酸定量检测试剂盒由罗氏诊断产品有限公司(上海)提供, 仪器为 COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan48。由基因扩增实验室工作人员严格按照说明书操

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102220); 山东省科学技术发展计划资助项目(2010G0020225);

山东省自然科学基金资助项目(ZR2011HM019); 山东省临床重点专科建设项目经费资助。

作者简介: 刘义庆, 男, 临床检验诊断学博士在读, 主治医师, 主要从事分子生物学和免疫学检验研究。

[△] 通讯作者: E-mail: zhangbingchangb@163.com。

作,每次实验中均设置临界阳性、强阳性对照和质控,HCV-RNA 检测的线性反应范围为 $43\sim 6.9\times 10^7$ IU/mL,检测下限为 15 IU/mL。

1.2.2 HCV 基因测序和分型 采用德国 Qiagen 公司 PyroMark Q24 型焦磷酸测序—遗传分析系统对 RNA 检测结果大于 10^3 IU/mL 的标本进行基因测序和分型,该系统包括序列分析仪 PyroMark Q24、用于制备单链 DNA 的 PyroMark Q24 真空工作站、分析用的 PyroMark Q24 软件以及相关试剂,严格按照说明书进行操作。

1.3 统计学处理 首先对 HCV-RNA 病毒载量数据进行对数转换(log10),再用 SPSS21.0 软件对数据进行统计分析处理,运用单因素方差分析比较 HCV 各亚型之间病毒载量是否有统计学差异;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCV 基因分型结果 本次研究共检出 5 种 HCV 基因亚型,分别为 1a、1b、2a、3a、3b,所占比例依次为 3.92%(6/153)、65.36%(100/153)、28.76%(44/153)、1.31%(2/153)、0.65%(1/153)。以 1b 为主,其次为 2a、1a、3a、3b 少见,未检出其他基因亚型。

2.2 HCV 基因亚型病毒载量分析 运用单因素方差分析,对 HCV 基因亚型之间病毒载量是否存在差异进行统计学分析,结果 $F=4.376,P=0.006$,即各 HCV 基因亚型之间病毒载量不全相同。多重比较(LSD 方法)表明 1b 亚型病毒载量明显高于 2a 亚型,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 1a 与 1b、2a、3a 之间,1b 与 3a 之间,2a 与 3a 之间病毒载量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见表 1。

表 1 各 HCV 基因亚型病毒载量水平($\bar{x}\pm s$)

分型	HCV-RNA	
	单因素方差分析(IU/mL, $\times 10^6$)	LSD 法(log10)
1a	2.54±3.06	5.91±0.86
1b	3.08±4.79	5.91±0.98 ^a
2a	7.48±9.54	5.28±0.96
3a	2.05±2.69	5.89±1.00
3b	—	—

注:—表示无数据;与 2a 亚型比较,^a $P<0.05$ 。

3 讨 论

HCV 感染主要通过输血或血液制品传播,目前 HCV 在全世界的感染率约为 2%,我国约为 3.2%。对于 HCV 感染目前还无有效的疫苗和治疗方法,不同的 HCV 基因型生物活性不同,病情进展和抗病毒治疗时间和疗效也不尽相同。HCV 基因分型检测有助于了解地域分布,探讨其传播途径和发展。

由于人群遗传背景、人员流动性等不同,HCV 基因型分布呈明显的国籍和地域差异^[4]。美国、巴西和欧洲西北部以 1a 型占绝大多数;亚洲、远东、欧洲东西部以 1b 型为主;2a 和 2b 型多分布于亚洲和欧洲;新加坡、泰国 3a 型多见;4a 多见于中东和北非;5a 局限于南非;6a 常见于香港、越南等亚洲南部。中国大陆大部分地区 HCV 基因型以 1b 和 2a 型为主,其中 1b 型占 70%~80%,在部分南方城市甚至高达 90%,自南向北 2a 型所占的比例逐渐增多。本研究表明,近年来山东地区汉族丙型肝炎患者 HCV 基因分型以 1b 为主,2a 型次之,与吉林、上

海、福建等中国大部分地区报道相似^[5-7],与甘肃地区 2a 型较 1b 型更常见不同^[8],也与广东地区 6a 型高于 2a 型成为仅次于 1b 型的常见亚型不同^[9-10],说明中国大陆地区的 HCV 基因型存在区域性分布。

现有研究表明 HCV 基因型与疾病进展、干扰素治疗效果密切相关^[11]。本文研究发现 1b 亚型组病毒载量明显高于 2a 组,差异有统计学意义($P<0.05$),这与前期研究结论一致。1b 型病毒复制能力较强,对干扰素的持续病毒学应答(SVR)较低,仅为 20%左右,更易发展为慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌。干扰素对 2a 型治疗效果要明显好于 1b 型,其 SVR 率可达 67%^[5]。可以看出,HCV 基因分型有利于临床医师针对患者感染的基因型制定个体化治疗方案,提高治疗效果。本研究中其他亚型之间病毒载量未发现统计学差异,可能与其他亚型例数较少有关。

本文采用焦磷酸测序法对山东地区 153 例汉族丙型肝炎患者进行 HCV 基因分型,并对不同基因型之间的病毒载量进行了分析,发现山东地区汉族丙型肝炎患者基因型以 1b 和 2a 为主,且病毒载量 1b 明显高于 2a,这为山东地区汉族人群丙型肝炎的预防、诊断和治疗提供理论依据和帮助。

参考文献

- [1] Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(17): 2436-2441.
- [2] 濮翔科,杭双熊,申红玉,等.常州地区丙型肝炎病毒基因分型及临床分析[J].放射免疫学杂志,2012,25(6):663-665.
- [3] Zekri AR, El-Din HM, Bahnassy AA, et al. TRUGENE sequencing versus INNO-LiPA for sub-genotyping of HCV genotype-4[J]. J Med Virol, 2005, 75(3): 412-420.
- [4] 黄超群,王福祥.丙型肝炎病毒基因分型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2012,20(35):3529-3535.
- [5] 李晓峰,马寅芙,杨广民.吉林地区丙型肝炎病毒基因分型及临床意义的研究[J].中国实用医药,2011,6(23):33-34.
- [6] 吴红岩,陆一涵,朱渭萍,等.上海市浦东新区丙型肝炎病毒感染者基因分型与危险因素分析[J].中国预防医学杂志,2012,13(11):839-843.
- [7] 陈荣华,李勤光,潘晨,等.福建省慢性丙型肝炎患者丙型肝炎病毒基因分型的分析[J].检验医学与临床,2013,10(19):2506-2507.
- [8] 彭雪彬,毛小荣,陈红.甘肃地区汉族 HCV 基因分型相关分析[J].临床肝胆病杂志,2013,29(11):828-831.
- [9] 蔡庆贤,洪春霞,张晓红,等.基于核心基因、非结构基因 5B 序列的丙型肝炎病毒基因分型法与线性探针技术对广东地区慢性丙型肝炎患者基因分型的比较[J].中华传染病杂志,2012,30(9):542-547.
- [10] 廖峭,许茹,王敏,等.广州无偿献血人群中丙型肝炎抗体阳性者 HCV 基因型与病毒载量的关系[J].中国免疫学杂志,2012,28(3):242-245.
- [11] 朱胜,石兰珍,陈慧青,等.浙江口岸出入境人员丙型肝炎病毒基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2013,23(16):3840-3842.