

福建省慢性丙型肝炎患者丙型肝炎病毒基因分型的分析*

陈荣华, 李勤光, 潘 晨, 周 锐, 张启云, 郑 玲[△](福建省福州市传染病医院 350025)

【摘要】 目的 观察福建省慢性丙型肝炎患者基因型分布特点以及与患者性别、年龄、丙型肝炎病毒(HCV) RNA 之间的关系。**方法** 应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 SANGER 测序法对 155 例慢性丙型肝炎患者的 HCV 进行基因分型。**结果** 在 155 例标本中, HCV 基因 1 型占 55.48%, 基因 2 型占 18.71%, 基因 3 型 13.51%, 基因 6 型 12.26%, 未见基因 4、5 型; 男女慢性 HCV 感染均以 1 型为主要基因型, 在其他基因型中, 男性 3 型、6 型多于 2 型, 女性则以 2 型为主, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 基因 2 型平均年龄为(49 岁), 3 型平均年龄为(35 岁), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 福建地区 HCV 基因型以 1b 型为主, 其次是 2a 型, 未见基因 4、5 型; 基因 2 型的感染者平均年龄较基因 3 型大。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 基因型; 流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.19.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)19-2506-02

Genotyping of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C in Fujian* CHEN Rong-hua, LI Qin-guang, PAN Chen, ZHOU Rui, ZHANG Qi-yun, ZHENG Ling[△] (Infectious Diseases Hospital of Fuzhou, Fuzhou, Fujian 350025, China)

【Abstract】 Objective To study the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes in patients with chronic hepatitis C (CHC) in Fujian and the relationship with gender, age and serum HCV RNA level. **Methods** HCV genotypes were detected 155 CHC patients by using reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) and SANGER sequencing. **Results** The percentages of HCV genotype 1, 2, 3 and 6 were 55.48%, 18.71%, 13.51% and 12.26%. Genotype 1 was the most common genotype in both male and female CHC patients. Percentages of genotype 3 and 6 were higher than genotype 2 in male patients, and genotype 2 was more common in female patients ($P < 0.05$). The average age of patients with genotype 2 or 3 were 49 and 35 years old, with statistical difference between them ($P < 0.05$). **Conclusion** HCV genotype 1b could be the most common genotype in CHC patients of Fujian, followed by genotype 2a, and the average age of patients with genotype 2 infection might be younger than patients with genotype 3 infection.

【Key words】 hepatitis C virus; genotype; epidemiology

丙型肝炎病毒(HCV)的基因型与肝病严重程度、干扰素应答等关系密切, 可为 HCV 感染者的诊断和治疗提供重要的科学依据^[1-2]。大量的临床实验表明, HCV 基因 1 型和基因 6 型比 HCV 基因 2 型或 3 型对干扰素治疗的持续病毒学应答(SVR)更差^[3]。通过研究福建省 HCV 的基因特点, 初步探讨福建省丙型肝炎病毒流行株的流行特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 1 月至 2010 年 8 月在本医院就诊并检测 HCV RNA 高于 10^4 copy/mL 的慢性 HCV 感染者血浆标本共 155 例。其中男 96 例, 女 59 例。年龄 15~70 岁, 平均(42.53±13.93)岁。患者来自福建省九地市, 其中福州 71 例, 厦门 3 例, 宁德 8 例, 莆田 43 例, 泉州 4 例, 漳州 3 例, 龙岩 12 例, 三明 5 例, 南平 6 例。所有患者均排除甲、乙、丁、戊型肝炎病毒感染, 均未接受过抗病毒治疗。

1.2 方法

1.2.1 HCV RNA 定量检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法, 试剂由深圳凯杰基因股份有限公司提供。检测灵敏度为(5.0E+2)~(5.0E+8) copy/mL。定量 PCR 仪为

ABI-7500。

1.2.2 引物 引物由上海申友公司提供。外扩增上游引物: 5'-CACTCCACCATGATCACTC-3'; 外扩增下游引物: 5'-CATGATGCACGGTCTACGAGAC-3'; 内扩增上游引物: 5'-GCGTCTAGCCATGGCGT-3'; 内扩增下游引物: 5'-GCACG-GTCTACGAGACCTC-3'。

1.2.3 HCV 基因测序 分离柱提取法(北京天根)抽提血浆中病毒 RNA 后, 以 RT-PCR 方法扩增 HCV 5'UTR 区基因片段, 试剂由上海申友公司提供, 扩增仪为 ABI-7500。RT-PCR 条件: 42℃ 45 min; 94℃ 5 min; 94℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 25 个循环; 72℃ 5 min。对第一轮 PCR 产物纯化后, 用特异性引物及 ABI Big-dye 进行第 2 次 PCR, 反应条件: 42℃ 45 min; 94℃ 5 min; 94℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 5 min。扩增产物经纯化后进行序列分析, 检测仪器为 ABO-310。分析后的碱基序列大约 200 bp, 在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/form-page.cgi>) 进行比对后得出分型结果。

1.3 观察指标 包括基因型、HCV RNA 含量、年龄和性别。

* 基金项目: 福州市科技发展基金资助项目(2008-S-73)。△ 通讯作者, E-mail: 13328851608@126.com。

1.4 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用数量及百分数表示。患者 HCV RNA 水平(copy/mL)转化为对数结果(\log_{10} copy/mL)进行分析。正态分布的计量资料采用成组设计资料 *t* 检验和 one-way ANOVA 检验,非正态分布的资料采用非参数检验;计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 福建省 HCV 基因型的分布情况 155 例标本中, 55.48%(86/155) 为基因 1 型,其余为 2、3、6 型[分别为 18.71%(29/155)、13.55%(21/155)、12.26%(19/155)],未见基因 4、5 型。基因 1 型和 3 型又以 b 亚型多见,分别占 89.53%(77/86)和 61.90%(13/21); 2 型、6 型均以 a 亚型为主,分别占 93.10%(27/29)和 94.74%(18/19),见图 1。

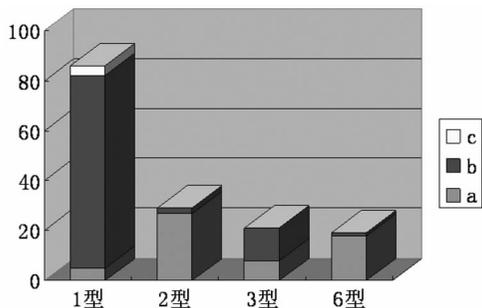


图 1 HCV 基因各亚型分布情况

2.2 HCV 基因型在性别中的分布 155 例标本中,男 96 例(61.94%),女 59 例(38.06%),在男女慢性 HCV 感染者中,1 型均为主要基因型,男性占 56.25%(54/96),女性占 54.24%(32/59),差异无统计学意义,在其他基因型中,基因 6 型男性多于女性,基因 2 型女性明显多于男性,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各基因型在性别中的分布比例[% (n/n)]

性别	1 型	2 型	3 型	6 型
男	56.25(54/96)	10.42(10/96)	16.67(16/96)	16.67(16/96)
女	54.24(32/59)	32.20(19/59)	8.47(5/59)	5.08(3/59)
χ^2	0.807	0.001	0.148	0.033

2.3 HCV 基因型与年龄之间的关系 对 155 例患者不同基因型平均年龄进行统计分析发现,基因 2 型平均年龄最大(49.00±2.25)岁,基因 3 型平均年龄最小(35.43±1.94)岁,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

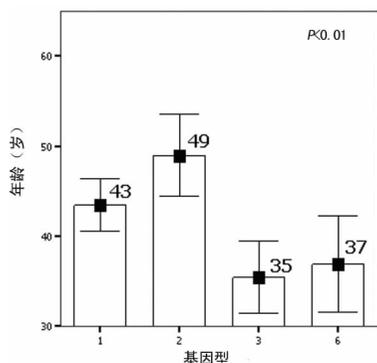


图 2 HCV 基因型与年龄之间的关系

2.4 不同基因型的 HCV RNA 水平 HCV RNA 在各基因型中的平均水平分别为基因 1 型(6.24±0.87) \log_{10} copy/mL,基因 2 型(6.09±0.76) \log_{10} copy/mL,基因 3 型(6.61±0.59) \log_{10} copy/mL,基因 4 型(6.21±1.08) \log_{10} copy/mL,不同基因型的 HCV RNA 平均水平差异无统计学意义($P = 0.227$)。

3 讨论

本研究用于基因分型所采用的 5'UTR 区,是整个基因组中高度保守部分,种系变化程度及进化率都很低,能代表全基因组序列所做的遗传进化分析。

目前国际上大致将 HCV 分成 6 个主要的基因型(HCV1~6 型),包含超过 100 个基因亚型(1a、1b、1c、2a、2b 等),各型核酸序列之间相差 31%~34%,而亚型序列之间相差 20%~23%,准病毒株序列之间相差 1%~10%[4]。各基因型分布存在某些地域特征。如基因 4 型主要分布在北非和中东国家,基因 5 型主要分布在南非[5]。作者对 155 例慢性 HCV 感染者的病毒核苷酸序列分析发现,福建省 HCV 的流行株以基因 1 型为主,占 55.48%,在基因 1 型中又以 1b 为主,占 89.53%;其次为基因 2 型,占 18.71%,在 2 型中又以 2a 为主,占 93.10%;未见基因 4、5 型感染,与文献[6-7]一致。本研究发现 HCV 各基因型间年龄分布有显著差异,基因 2 型患者平均年龄相对高(49 岁),而 3 型患者平均年龄较低(35 岁)。

丙型肝炎病毒感染是发展成为慢性肝炎、肝硬化和肝癌的主要因素。HCV 基因分型与慢性丙型肝炎感染预后及治疗都有密切的关系。因此检测 HCV 分型将有助于 HCV 感染临床诊断并预测治疗效果,为调整用药剂量及治疗时间,制订个性化的治疗方案提供指导。

参考文献

- [1] Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24(1): 77-88.
- [2] Hrabec PT, Fischer W, Bruno WJ, et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions; the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes[J]. Virol J, 2006, 3: 103.
- [3] Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications[J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(1): 45-66.
- [4] Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(2): 223-235.
- [5] Tanaka Y, Agha S, Saady N, et al. Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt[J]. J Mol Evol, 2004, 58(2): 191-195.
- [6] 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): 76-77.
- [7] 张帆,王小红,王宇明,等.重庆地区 HCV 基因亚型的分布状态[J].第四军医大学学报, 2005, 26(14): 1253-1256.