

# 慢性丙型肝炎患者病毒基因分型及 HCV RNA 相关性研究\*

张红梅<sup>1</sup>, 张小玉<sup>1</sup>, 李红艳<sup>2</sup>, 马莹<sup>1</sup>, 倪俊明<sup>1</sup>, 王建芳<sup>1</sup>, 王雷<sup>1</sup> (1. 东南大学附属第二医院  
临床科研中心, 南京 210003; 2. 江苏省南京市疾病预防控制中心 210003)

**【摘要】** 目的 探讨江苏地区慢性丙型肝炎患者病毒基因分型特点及其与患者年龄、性别和丙型肝炎病毒(HCV)RNA 水平的关系。方法 收集抗 HCV 阳性血清 1 032 份, 采用荧光定量 PCR(Q-PCR)法检测患者血清 HCV RNA 水平, HCV 基因分型芯片进行基因分型检测, 应用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析。结果 检测出 HCV RNA 阳性样本 704 份, 其中 HCV 单基因型 674 份, 1b、2a、3b、3a、1a 和 6 型分别占 75.71%、7.95%、7.95%、1.99%、0.99% 和 1.14%; 混合基因型 30 份, 1b/2a、1b/3b、1b/3a 和 2a/3b 型分别占 2.27%、1.56%、0.28% 和 0.14%。不同基因型均以男性和青壮年居多, 且病毒载量差异有统计学意义: 1b 和 3a 相近, 都高于 2a 和 1b/2a 病毒载量。结论 江苏地区 HCV 基因型以 1b 型为主, 其次是 2a、3b 型。慢性丙型肝炎患者以中青年男性居多, 而且不同 HCV 基因型间病毒载量有差异。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒; 基因分型; 病毒载量

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.24.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)24-3395-03

**Relationship between HCV genotypes and HCV RNA in patients with chronic hepatitis C\*** ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yu<sup>1</sup>, LI Hong-yan<sup>2</sup>, MA Ying<sup>1</sup>, NI Jun-ming<sup>1</sup>, WANG Jian-fang<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1</sup> (1. Clinical Research Center, Affiliated the Second Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210003, China; 2. Nanjing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210003, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes in Jiangsu Province, and the relationship between HCV genotypes and HCV viral loads. **Methods** Serum specimens, collected from 1 032 anti-HCV positive samples, were detected for HCV RNA by using fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) and for HCV genotypes by using gene chips. The distribution and characterization of HCV genotypes as well as the relationship between genotypes and HCV RNA content were analyzed by SPSS19.0 software.

**Results** A total of 704 HCV RNA positive serum samples were collected, among which 674 cases were found to be single genotype, including 1b, 2a, 3b, 3a, 1a and 6, accounting for 75.71%, 7.95%, 7.95%, 1.99%, 0.99% and 1.14%, respectively, and 30 cases of mixed genotypes, including 1b/2a, 1b/3b, 1b/3a and 2a/3b, accounting for 2.27%, 1.56%, 0.28% and 0.14%. The difference of viral loads among different HCV genotypes was significant.

**Conclusion** Genotype 1b might be the most prevalent genotype in Jiangsu, followed by 2a and 3b. HCV genotype 1b and 3a could be with similar viral loads, which is higher than genotype 2a and 1b/2a significantly.

**【Key words】** hepatitis C virus; genotype; viral loads

我国约 3 800 万人感染丙型肝炎病毒(HCV), 每年 HCV 感染者人数急速上升, 丙型肝炎(丙肝)已成为乙型肝炎之后我国第二大类病毒性肝病, 是发展为肝硬化和肝癌的主要因素<sup>[1]</sup>。HCV 基因型与丙肝的病程和治疗效果密切相关, 本文旨在分析江苏地区 HCV 基因型分布特点及其与 HCV 病毒血症水平之间的相关性, 以期有助于判定治疗的难易程度及构建合理的丙肝防治方案。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 1 032 份 HCV 抗体阳性血清来自 2007 年 6 月至 2013 年 10 月在东南大学附属第二医院肝病科门诊及住院部就诊的江苏地区慢性丙肝患者, 采血后 2 h 内分离血清, -80 ℃ 冰箱保存。所有病例排除了甲、乙、丁、戊型肝炎病毒的感染, 慢性丙肝诊断标准符合 2004 年《丙型肝炎防治指南》。

**1.2 主要试剂和仪器设备** HCV 核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法), 购自上海科华生物工程股份有限公司。

HCV 基因分型检测芯片购自中科院上海微系统与信息技术研究所, LightCycler480 实时荧光定量 PCR 系统, 购自德国罗氏诊断产品有限公司。核酸提取和反转录试剂购自德国 Qiagen 公司。

**1.3 HCV RNA 定量检测** 参照上海科华生物工程股份有限公司试剂盒说明, 采用荧光定量 PCR(Q-PCR)法, 在罗氏 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 系统上检测样本 HCV RNA 载量。

**1.4 HCV 基因分型** 采用 Qiagen 病毒 RNA 提取试剂盒抽提样本 RNA, 置于恒温器上 42 ℃ 反转录 1 h。套式 PCR 扩增条件: 循环程序 1 采用 37 ℃ 10 min, 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。循环程序 2 采用 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物变性后滴于芯片点样区, 42 ℃ 恒温杂交 30 min, 膜显色后采用光学扫描仪扫描, 采用 HCV

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81300323)。

作者简介: 张红梅, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事分子遗传学研究。

基因分析软件进行结果判读。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两者均值比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。不同基因型间的 HCV RNA 载量进行对数转换后,计算均值,并采用单因素方差分析间差异,其两两均数间比较用 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 患者性别、年龄分布及 HCV 基因分型结果** 在 1 032 份 HCV 抗体阳性血清中检测到 HCV RNA  $\geq 500$  IU/mL 患者样本 704 份,占 HCV 阳性血清的 68.22%。其中男 398 份(56.53%),女 306 份(43.47%),患者年龄分布于 7~89 岁。对 704 份样本进行基因分型,533 份是 1b 型,56 份是 2a 型,56 份是 3b 型,14 份是 3a 型,8 份是 6 型,7 份是 1a 型;另外还有混合型共 30 份,包括 16 份 1b/2a 混合型,11 份 1b/3b 混合型,2 份 1b/3a 混合型和 1 份 2a/3b 混合型。各基因型所占百分比(%)及性别和年龄分布如表 1 所示,其中 1b/3b 型(1.56%),6 型(1.14%),1a 型(0.99%),1b/3a 型(0.28%)和 2a/3b 型(0.14%)因例数较少,将其合并为其他基因型进行统计分析。

表 1 慢性丙肝患者 HCV 基因型及性别、年龄分布[n(%)]

HCV 基因型	性别		年龄分布		合计
	男	女	<50 岁	$\geq 50$ 岁	
1b	302(56.7)	231(43.3)	316(59.3)	217(40.7)	533(75.71)
3b	33(58.9)	23(41.1)	49(87.5)	7(12.5)	56(7.95)
2a	25(44.6)	31(55.4)	36(64.3)	20(35.7)	56(7.95)
1b/2a	9(56.3)	7(43.8)	10(62.5)	6(37.5)	16(2.27)
3a	11(78.6)	3(21.4)	13(92.9)	1(7.1)	14(1.99)
其他	18(62.1)	11(37.9)	19(65.5)	10(34.5)	29(4.11)
合计	398(56.5)	306(43.5)	443(62.9)	261(37.1)	704(100.00)

在患者性别分布上,男性患者明显多于女性患者,经卡方检验,不同基因型患者性别构成比差异无统计学意义( $\chi^2 = 6.485, P = 0.262$ )。另外,虽然 10 种不同 HCV 基因型患者年龄分布于 7~89 岁,但是由表 1 可以看出,把患者分为两个年龄组, <50 岁年龄组人数明显多于大于或等于 50 岁的年龄组,基因型在两个年龄组中的分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 23.026, P = 0.000$ ),3a 型和 3b 型更多见于小于 50 岁的患者,更趋向于年轻化。

**2.2 不同 HCV 基因型患者占比变化** 近 7 年来不同基因型所占比例有所变化,1b 基因型占比 55.26%~86.07%,2a 型占比 4.10%~13.11%,3b 型占比 0~23.68%,1b/2a 混合基因型占比 0~6.38%,3a 型占比 0%~10%,1b/3b 混合基因型占比 0%~6.37%,6 型占比 0%~4.12%,1a 型占比 0%~6.18%。与往年比,1b 基因型比例有所下降,而 3b 基因型有所上升,2012 年占比约 24%,但 1b 基因型仍具有不可替代的优势,其余几种基因型的比例在不同年份,均在 15% 以下低幅波动(见图 1,因 1b/3a 和 2a/3b 混合型例数太少,未列入)。

**2.3 不同 HCV 基因型患者 HCV RNA 定量检测结果比较**

**2.3.1** 以对数形式表示 HCV RNA 载量,不同基因型 HCV RNA 定量结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同基因型之间 HCV RNA 定量结果的比较采用单因素方差分析(2a/3b 混合基因型因例数太少除外),见表 2。

不同基因型患者 HCV RNA 载量最小值介于 2.98~7.00 IU/mL( $9.70E+2 \sim 1.00E+7$  IU/mL),最大值介于 7.46~

9.18 IU/mL( $2.9E+7 \sim 1.5E+9$  IU/mL),均值为(5.81  $\pm$  1.83)~(6.94  $\pm$  1.46),不同基因型之间病毒载量均值比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

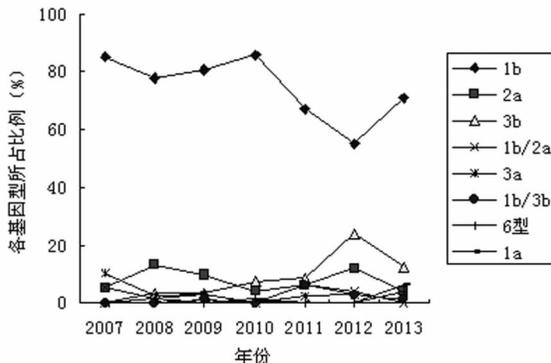


图 1 近 7 年 HCV 不同基因型百分比变化

表 2 不同基因型 HCV RNA 载量(lg IU/mL)比较

HCV 基因型	例数	病毒载量区间	病毒载量均值( $\bar{x} \pm s$ )
1b	533	2.98~9.18	6.61 $\pm$ 1.24
2a	56	3.11~8.20	6.15 $\pm$ 1.31
3b	56	3.36~8.68	6.53 $\pm$ 1.22
3a	14	5.79~8.53	6.89 $\pm$ 0.83
1b/2a	16	3.76~7.99	5.89 $\pm$ 1.12
1b/3b	11	3.38~7.96	5.98 $\pm$ 1.39
6 型	8	3.65~8.51	6.94 $\pm$ 1.46
1a	7	3.23~8.48	5.81 $\pm$ 1.83
1b/3a 型	2	7.00~7.46	7.23 $\pm$ 0.33

注:  $F = 2.327, P = 0.01$ 。

**2.3.2** 进一步对不同基因型病毒载量进行两两均数间比较,结果 1b 和 2a 之间( $P = 0.009$ ),1b 和 1b/2a 之间( $P = 0.024$ ),2a 和 3a 之间( $P = 0.048$ ),1b/2a 和 3a 之间( $P = 0.029$ ),差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),因此 1b 和 3a 型具有较高的病毒载量,高于 2a 和 1b/2a 混合基因型的病毒载量。

**3 讨 论**

我国《丙型肝炎防治指南》中明确指出,在制订抗病毒治疗个体化方案以及判定治疗难易程度时,HCV 基因分型有着重要的意义。HCV 基因分型方法较多,国内外在抗病毒疗效考核研究中,应用 Simmonds 1~6 型分型法最为广泛。HCV 基因型、亚型的分布与流行具有明显地域特性:1 型、2 型呈全球流行态势,3 型主要流行于亚洲、北美及欧洲部分地区,4 型主要流行于中非、中东和欧洲地区,5 型主要发现于非洲和欧洲部分国家,6 型则主要在东南亚和北美地区流行。我国存在丰富的 HCV 基因型和亚型,HCV 基因型分布有其自身演变的特点<sup>[2]</sup>。近 20 年来,流行的 HCV 主要有 1、2、3 和 6 四种基因型,其演变规律表现为仍然以 1b 型为主,北方 2a 型为仅次于 1b 型的主要流行基因型,在南部地区 3 型和 6 型高于全国平均<sup>[3]</sup>。

有研究发现,在我国江苏地区已有 6 种基因型(1b、2a、3a、3b、6a、6e、6n),主要流行基因型为 1b 和 3a<sup>[4]</sup>。本研究中,对 704 份慢性丙肝血清样本进行基因分型,发现有 10 种 HCV 基因型和亚型,其中 1b 型 533 份(75.71%),为首要基因型,2a 型 56 份(7.95%),比北方城市 2a 比例低而比南方城市高,与我国大部分地区以 HCV 1b 和 2a 型最常见,自南向北 2a 型患者逐渐增多的国内外报道一致。本次研究还检测到 3b 型 56 份(7.95%),3a 型 14 份(1.99%),6 型 8 份(1.14%),1a 型 7

份(0.99%),以及多种混合基因型 30 份,1b/2a、1b/3b、1b/3a 和 2a/3b 型分别占比 2.27%、1.56%、0.28% 和 0.14%,这可能与检测方法灵敏有关,同时也说明江苏地区的 HCV 基因型分布既有和全国相一致的特征,又有其自身特点,与以往研究相比基因型种类在增多,基因型更加多样和复杂。本研究检出的 1a 型、1b/3a 型和 2a/3b 型在江苏地区较为罕见,3 型比例呈上升趋势,3 型和 6 型在我国华南、西南和港澳地区较为普遍,也是静脉吸毒人群的主要流行基因型,说明静脉吸毒人群所流行的 HCV 基因型正在向普通人群扩散<sup>[5]</sup>。本研究中慢性丙肝患者男性多于女性,年龄以小于 50 岁的青、中年居多,提示现代社会中青年人流动增加、社会活动复杂性增加、HCV 传播方式呈现多元化等多种因素导致了江苏地区基因型的多样化和复杂化。

HCV RNA 含量反映了病毒复制的活跃程度和患者的病程变化,是衡量抗病毒疗效的病毒学应答指标,而基因分型检测在决定疗程方面有特殊价值,因此监测 HCV 基因型和血清病毒载量对慢性丙肝治疗有重要的临床意义。对不同基因型病毒载量取对数值进行两两均数间比较,显示 1b 和 2a 之间,1b 和 1b/2a 之间,3a 和 2a 之间,3a 和 1b/2a 之间,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),1b 型病毒载量明显高于 2a 基因型和 1b/2a 混合基因型的病毒载量。聚乙二醇化干扰素联合利巴韦林是目前慢性丙肝抗病毒治疗的标准方案。从我国流行的基因型 1b 和 2a 来看,1b 基因型属于难治型,对于干扰素的应答率低,易复发,疗程长,而基因 2a 型对干扰素的应答好,复发率低,抗病毒疗效理想。基因 1b 型的病毒含量水平明显高于 2a 型,这可能是基因 1b 型患者对于干扰素应答不良的原因之一<sup>[6]</sup>。

本研究通过对 704 例江苏地区慢性丙肝患者 HCV 进行基因分型发现,目前江苏地区 HCV 分型呈多样化,以 1b 型占主导地位,其次是 2a、3b 型等多种单基因型,并且存在多种混合基因型。HCV 基因型和血清病毒载量之间存在相关性,1b 型和 3a 型病毒载量明显高于 2a 型和 1b/2a 混合基因型。HCV 基因型与 HCV RNA 载量是影响抗病毒疗效的最重要的指标<sup>[7]</sup>。将继续深入研究,以期对本地区 HCV 的治疗策略

提供帮助。

参考文献

[1] Xia X, Luo J, Bai JL, et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection among injection drug users in China: systematic review and meta-analysis [J]. Public Health, 2008, 122(10):990-1003.

[2] Fu Y, Wang Y, Xia W, et al. New trends of HCV infection in China revealed by genetic analysis of viral sequences determined from first time volunteer blood donors [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(1):42-52.

[3] 饶慧琰,李洪,魏来,等.中国汉族人群慢性丙型肝炎患者病毒基因型和传播高危因素的演变[C].中华医学会第十六次全国病毒性肝炎及肝病学术会议论文汇编,2013,267.

[4] Zhang CY, Wu NN, Liu J, et al. HCV subtype characterization among injection drug users; implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China [J]. PLoS One, 2011, 6(2):e16817.

[5] Xia XS, Lu L, Tee KK, et al. The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China [J]. J Med Virol, 2008, 80(7):1142-1152.

[6] Dieterich DT, Rizzetto M, Manns MP. Management of chronic hepatitis C patients who have relapsed or not responded to pegylated interferon alpha plus ribavirin [J]. J Viral Hepat, 2009, 16(12):833-843.

[7] Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence [J]. Hepatology, 2013, 57(4):1333-1342.

(收稿日期:2014-04-14 修回日期:2014-07-25)

(上接第 3394 页)

时,其检测的敏感度可达 84%,特异度可达 82%,均高于各单项检测,但与文献[8,10]报道的临界值有一定的差异,可能与本实验测量误差及研究例数不足有关,有待于完善实验方法进一步研究。

综上所述,联合检测为 PHC 的早期诊断提供了参考,但还需结合病理、CT 等结果综合考虑,提高准确率。

参考文献

[1] Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, et al. Prognostic value of pretreatment levels of tumor markers for hepatocellular carcinoma on survival after curative treatment of patients with HCC [J]. J Hepatol, 2008, 49(2):223-232.

[2] Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC [J]. J Gastroenterol, 2010, 45(12):1272-1282.

[3] 韩鹏,褚瑞海,张彩彩,等. AFP-L3 在肝细胞癌诊断中的临床价值 [J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(2):26-27.

[4] 原永明,张菁,周雪颖,等. 肝癌患者血清铁含量检测的临

床意义 [J]. 检验医学, 2013, 28(6):534-535.

[5] 杨秉辉,夏景林. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准 [J]. 肿瘤防治研究, 2002, 9(1):83.

[6] 李润青,姜菲菲,赵秀英,等. Logistic 回归及 ROC 曲线综合评价 AFP、AFU、VEGF 联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 北京医学, 2010, 32(12):961-964.

[7] 范海燕,孟凡云,章阳,等. 应用 ROC 曲线分析评价肿瘤标志物糖类抗原 15-3、癌胚抗原在乳腺癌诊断与术后监测中的价值 [J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2010, 4(6):676-682.

[8] 董怀平,王力,赵歧刚,等. AFU、AFP-L3、HCY 联合检测对原发性肝癌早期诊断临床价值的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(6):573-576.

[9] 刘磊,刘彬,朱莉莉,等. 肺鳞癌患者血清 CYFRA21-1 和 SCC 检测及 ROC 曲线和截断点的理论分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(4):280-283.

[10] 王健,张慧,吴月平. 多指标联合检测对原发性肝癌的诊断价值分析 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(11):1379-1380.

(收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-06-26)