

衣壳蛋白和甲基转移酶对戊型肝炎病毒的基因分型

胡玲玲, 王跃荣[△] (上海中医药大学附属市中医医院检验科, 上海 200071)

【摘要】 目的 探讨人戊型肝炎病毒(HEV)的部分编码区序列能否作为其基因组分型的依据。**方法** 从 GenBank 中查找并下载全基因组测序完整的能感染人类的 HEV 基因组及蛋白序列共 35 株, 用 Clustal W 程序对 35 株 HEV 全序列以及部分编码区序列进行多序列比对, 并用 treev 32 绘制基因进化树, 研究其进化关系。**结果** HEV 的基因组全长 7.5 kb; 而衣壳蛋白和甲基转移酶的编码序列分别为 1 982 bp 和 545 bp, 这 2 种蛋白的多序列比对和进化分析结果与完整基因组的分型结果相符。**结论** 衣壳蛋白和甲基转移酶可作为 HEV 的分型依据, 且是一种更简便、快捷的方法。

【关键词】 戊型肝炎病毒; 基因型; 衣壳蛋白; 甲基转移酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)11-1545-02

Capsid protein and methyltransferase can be used for genotyping of hepatitis E virus HU Ling-ling, WANG Yue-rong[△] (Department of Laboratory Medicine, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai TCM University, Shanghai 200071, China)

【Abstract】 Objective To understand the part of the coding region can be used as the basis for the genotyping of hepatitis E virus(HEV). **Methods** Thirty-five full-length sequences of HEV currently available in GenBank were download, and sequence alignment and evolutionary analysis of these thirty-five full-length sequences and part of the coding region were done. **Results** The complete genome of HEV was 7.5 kb in length, while Capsid Protein was 1 982 bp, Methyltransferase was 545 bp. The result of sequence alignment and evolutionary analysis of the two kinds of protein were consistent with the complete genome of HEV. **Conclusion** The sequence of Capsid Protein and Methyltransferase is shorter, and can be used as the basis for the genotyping of HEV, which is more simple and rapid.

【Key words】 hepatitis E virus; genotype; capsid protein; methyltransferase

戊型肝炎病毒(HEV)引起的戊型肝炎是一种经粪-口途径传播的传染病, 是发展中国家重要的公共卫生问题之一^[1-2]。孕妇患病率较高, 且病情严重, 常出现流产、死胎或急性肝坏死^[3]。HEV 是单股正链 RNA 病毒, 有 3 个开放读码框(ORF)^[4]。ORF1 主要编码 5 种非结构蛋白: 甲基转移酶、木瓜样半胱氨酸蛋白酶、多聚脯氨酸铰链、解旋酶和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶; ORF2 为病毒的主要结构蛋白编码区, 主要编码衣壳蛋白。

戊型肝炎的诊断和疫苗的研制均涉及 HEV 分型, 有报道显示戊型肝炎发病的严重性及预后与 HEV 基因类型相关。目前能感染人类的 HEV 分为 4 个基因型, 主要是根据各 HEV 分离株全基因序列的核苷酸同源性, 由于采用了全部的基因信息, 因此结果最为准确^[5]。但全基因测序费时费力, 且序列较长, 比较较困难, 甚至无法进行, 所以多数研究人员致力于设计出更为简便和有效的分型方法。国内外研究者大多选取 HEV 部分基因序列替代全基因序列进行基因分型。本研究选取 HEV 部分基因序列探讨能否替代全基因序列进行基因分型, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 HEV 参考株 Chi-XJ1 株(NC_001434)为基因型 4 型, 是 GenBank 中测序最全且准确的。基因 2 型只有墨西哥分离株(MEX-14)的全基因序列收录在 GenBank 中, 在此不列入研究, 主要对基因 1、3、4 型进行探讨。

1.2 多序列比对和系统进化分析 多序列比对是序列分析的基础, 有时用来区分 1 组序列之间的差异, 但其主要用于描述 1 组序列之间的相似性关系, 生成系统树图, 将序列按相似性分组。目前使用最广泛的多序列比对程序是 Clustal W。本组使用 Clustal W 程序对 35 株 HEV 全序列进行多序列比对, 用 treev 32 绘制基因进化树, 研究其进化关系。

1.3 核苷酸序列比对和系统进化分析 从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 GenBank 中查找并下载全基因组测序完整的、能感染人 HEV 基因组及蛋白序列共 35 株, 其中 1 型有 12 株, 3 型有 9 株, 4 型有 14 株。利用 Clustal W 和 treev 32 软件对 HEV 的全基因组以及 HEV 编码的蛋白质基因片段分别进行多序列比对, 进行基因进化树和同源性分析。

2 结果

2.1 35 株 HEV 的全基因组多序列比对结果 将测序完整的 35 株 HEV 基因组用 Clustal W 进行多序列比对, treev 32 进行进化树分析。如不考虑测序误差, 图 1 显示全基因序列的多序列比对将 35 株 HEV 分成 3 个基因型, 每株病毒的分型结果都与 GenBank 一致。基因 1 型的 HEV 集中在右支, 基因 3 型集中在左支, 而基因 4 型集中在上支, 提示 HEV 全基因组的多序列比对及进化树分析可用于基因分型。见图 1。

2.2 衣壳蛋白的基因序列对 HEV 的基因分型 本组从 GenBank 中查找的 35 株人 HEV 几乎都有其编码的核衣壳蛋白序列(除 D、Chi-HB)。将编码这些衣壳蛋白的基因序列用 Clust-

al W 进行比对,并用 treev 32 进行进化分析。图 2 和图 1 进行比较,提示编码 HEV 病毒衣壳蛋白的基因序列和全基因序列的多序列比对,在 HEV 的分型取得了一致的结果,同时也将 35 株 HEV 分成了 3 个基因型,且每株病毒都被正确地归类到该基因型中。但比对的基因序列长度,前者只有 2 kb 左右,而后者却有 7.5 kb,极大地节约了测序成本,也减少了操作时间,表明 HEV 的衣壳蛋白的基因序列也可作为 HEV 的分型依据。见图 2。

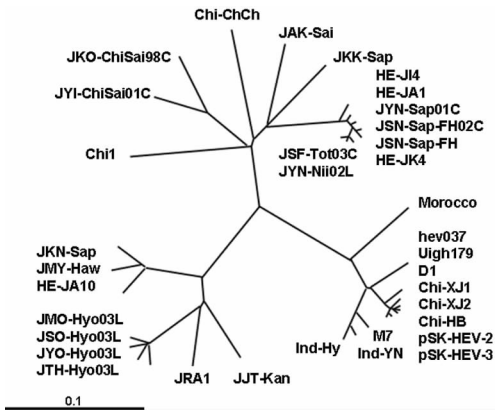


图 1 35 株 HEV 全基因组进化树

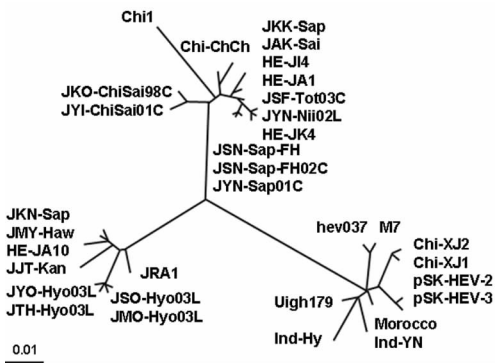


图 2 33 株 HEV 衣壳蛋白基因序列进化树

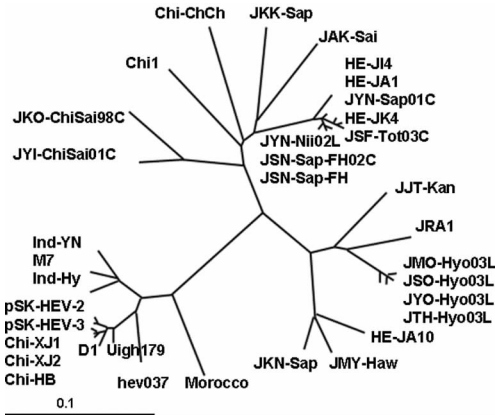


图 3 35 株 HEV 甲基转移酶基因序列进化树

2.3 甲基转移酶的基因序列可用于 HEV 的基因分型 甲基转移酶是 HEV 的非结构蛋白之一,与病毒 RNA 复制相关,长度仅为 545 bp。本组用同样的方法将甲基转移酶的基因序列也进行多序列比对和系统进化树分析,显示编码 HEV 病毒甲基转移酶的基因序列和全基因序列的多序列比对在 HEV 的分型也取得了一致结果,均将 35 株 HEV 准确地分成了 3 个

基因型,虽然各个基因型内部的进化树有所不同,但每株病毒都被正确地归类到该基因型中,所以可以把甲基转移酶也作为 HEV 的分型依据。见图 3。

3 讨论

我国是戊型肝炎的主要流行区之一,自 20 世纪 50 年代被首次报道以来,由于实验室检测技术的局限,其发病率和感染率一直被低估。近几年来,戊型肝炎患者例数逐渐上升,严重危害人们的健康,降低其生活和工作质量,因此对 HEV 的研究尤其重要^[6-7]。

免疫学诊断是目前我国临床戊型肝炎诊断的主要手段,用 HEV 重组抗原检测 HEV 抗体是主要方法之一,但受包被抗原的特异性和敏感性限制;也可同时进行 HEV RNA 的 PCR 检测,但不同 HEV 基因型常对引物有一定的选择性,不易找到具有普遍、通用性的高灵敏引物,目前应用较多的是 HEV ORF2 区域内 150 nt 片段。

戊型肝炎发病的严重性还受到 HEV 基因类型的影响,虽然其一直被认为是急性自限性疾病,一般无慢性病患者。但已有的研究却发现一些服用免疫抑制剂的器官移植患者、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者等出现慢性 HEV 感染,并被确诊为基因 3 型 HEV 感染^[8-11]。而 HEV 的持续感染在基因 1、2 型感染者还未见报道。也有研究显示感染 HEV 基因 4 型感染患者比 3 型患者发病更严重^[12]。因此,为了更好地判断戊型肝炎的病情及预后,需快速、准确地对 HEV 进行基因分型。

传统的 HEV 分型是基于全基因序列的比对分析,虽然准确性较高,一旦序列比较长,待比较的序列数目较多时,比对时间延长,甚至无法进行,改进的方法是可以选取全序列的某一片段来替代全基因组序列进行比对。本研究从 GenBank 中下载 35 株测序完整的、能感染人类的 HEV 基因组及蛋白序列,其中 1 型有 12 株,3 型有 9 株,4 型有 14 株(由于基因 2 型只有墨西哥分离株 MEX-14 的全基因序列收录在 GenBank 中,在此没有列入研究)。

本组对 35 株 HEV 的衣壳蛋白和甲基转移酶分别用 Clustal W 进行多序列比对,并用 treev 32 绘制进化树,描述各病毒株之间的亲缘关系,发现结果与全基因序列的比对结果一致,皆可分为 1、3、4 型,虽然各型内的进化关系稍有不同,但基因型的分类与 GenBank 中的报道一致。HEV 基因组全长为 7.5 kb,与其相比,本组选取的片段具有更大的优势,其中衣壳蛋白编码序列为 1 982 bp,甲基转移酶仅为 545 bp。

综上所述,通过本研究发现,对 HEV 进行基因分型,可以不对病毒全部基因组序列进行测序,只需设计合适的引物扩增出衣壳蛋白或甲基转移酶,并将 PCR 产物测序作进化树分析即可,从而为 HEV 的分型找到了一种更简便、更快速的方法。当然这只是从生物信息学的角度探讨 HEV 的初步分型,至于临床的具体应用还有待于进一步的探讨和研究。

参考文献

[1] Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E; current status[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(9): 1484-1493.
[2] Xu B, Yu HB, Hui W, et al. Clinical features and risk factors of acute hepatitis E with severe jaundice[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(48): 7279-7284. (下转第 1549 页)

栓形成中发挥着重要作用。

Sakai 等^[2]对 AMI 患者的冠状动脉血栓进行细胞学检查,发现 64% 的血栓标本中有 EOS 浸润,从病理学角度证实了 EOS 参与炎症反应,促进血栓形成。目前关于 EOS 导致血栓事件的研究多集中于嗜酸性粒细胞增多症(HES)。有研究报道,特发性 HES 患者约 25% 可发生血栓栓塞事件,其包括冠状动脉栓塞、脑血管栓塞、主动脉栓塞、腹部脏器及周围动脉栓塞或血栓形成。田庄等^[6]对 HES 患者心脏受累的情况进行研究,发现有大量 EOS 浸润心肌,并发现有冠状动脉受累情况。

EOS 参与炎症反应、促进血栓形成的病理机制目前尚不清楚,可能原因:EOS 通过脱落颗粒,释放主要的碱性蛋白和嗜酸性阳离子蛋白而发挥作用。带阳离子基团的碱性蛋白与凝血调节蛋白中的阴离子基团结合,损害其抗凝血活性,从而促进血栓形成。阳离子蛋白能够激活血小板促进血栓形成。并且 EOS 本身可以释放血小板活化因子及白三烯,促进其聚集,增强血管通透性,破坏血管内皮,导致血栓形成^[7-10]。

综上所述,AMI 患者外周血中 EOS 含量及百分比健康对照组明显减少,且与 hs-CRP 呈负相关,分析 EOS 可能参与了炎症反应,促进血栓形成。但是 hs-CRP 不具有特异性,急性感染、创伤或系统性炎症疾病均可导致其水平升高,应用具有局限性。外周血中 EOS 有昼夜周期性波动,且其含量受到血液中肾上腺皮质释放糖皮质激素含量有关,这些因素均可导致研究结果的偏差。故证实 AMI 患者外周血中 EOS 的变化及其与 hs-CRP 的关系尚需更深入的研究。

参考文献

[1] Virmani R,Burke AP, Farb A, et al. Pathology of the vulnerable plaque[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(8): 13-18.
[2] Sakai T, Inoue S, Matsuyama TA, et al. Eosinophils may

be involved in thrombus growth in acute coronary syndrome[J]. Int Heart J, 2009, 50(3): 267-277.
[3] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(9): 1135-1143.
[4] 倪梅, 张运. 动脉粥样硬化易损斑块的基础与临床[J]. 心脏病学实践, 2011, 20(11): 9-19.
[5] 韦波, 赵寒冰. 白细胞及血脂异常与急性心肌梗死发病的关系[J]. 山东医药, 2011, 51(33): 1846-1847.
[6] 田庄, 方全, 赵大春, 等. 嗜酸性粒细胞增多症患者心脏受累的临床和病理表现[J]. 中华内科杂志, 2010, 49(8): 684-687.
[7] Yamada Y, Hoshino K, Shimojima N, et al. Idiopathic hypereosinophilic syndrome in a case with ABO-incompatible liver transplantation for biliary atresia complicated by portal vein thrombosis [J]. Pediatric Transplantation, 2010, 14(5): 149-153.
[8] Lin CH, Chang WN, Chua S. Idiopathic hypereosinophilia syndrome with loeffler endocarditis, embolic cerebral infarction and left hydranencephaly: a case report[J]. Acta Neurologica, 2009, 18(3): 207-212.
[9] Grigoryan M, Gelsler SD, Louis EK. Cerebral arteriolar thromboembolism in idiopathic hypereosinophilic syndrome[J]. Archives of Neurology, 2009, 66(4): 528-531.
[10] Maino A, Rossio R, Cugno M, et al. Hypereosinophilic syndrome, Churg-Strauss syndrome and parasitic diseases: possible links between eosinophilia and thrombosis [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5): 670-675.

(收稿日期: 2014-12-25 修回日期: 2015-02-15)

(上接第 1546 页)

[3] Shinde N, Patil T, Deshpande A, et al. Clinical profile, maternal and fetal outcomes of acute hepatitis e in pregnancy [J]. Ann Med Health Sci Res, 2014, 4 (Suppl 2): S133-139.
[4] Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. Virus Res, 2011, 161(1): 47-58.
[5] Yang D, Jiang M, Jin M, et al. Full-length sequence analysis of hepatitis E virus isolates: showing potential determinants of virus genotype and identity[J]. Virus Genes, 2013, 47(3): 414-421.
[6] Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, et al. Chronic hepatitis E: a review of the literature[J]. J Viral Hepat, 2014, 21(2): 78-89.
[7] Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients[J]. Liver Transpl, 2010, 16(1): 74-82.
[8] Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus

and chronic hepatitis in organ-transplant recipients[J]. N Engl J Med, 2008, 358(8): 811-817.
[9] Hagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients [J]. Liver Transpl, 2008, 14(4): 547-553.
[10] Vassallo D, Husain MM, Greer S, et al. Hepatitis e infection in a renal transplant recipient[J]. Case Rep Nephrol, 2014, 64(34): 5865-5869.
[11] Hoerning A, Hegen B, Wingen AM, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in pediatric solid organ transplant recipients-a single center experience [J]. Pediatr Transplant, 2012 16(7): 742-747.
[12] Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, et al. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan[J]. Hepatol Res, 2006, 36(4): 301-307.

(收稿日期: 2014-12-25 修回日期: 2015-02-18)