

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

林 江, 温先勇, 唐 敏(西南医科大学附属医院检验科, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 了解丙型肝炎病毒(HCV)基因型在川南地区汉族丙型肝炎患者中的分布特点及其与丙型肝炎临床病变的关系。方法 采用焦磷酸测序法对 89 例来该院就诊的丙型肝炎患者进行 HCV 基因分型, 探讨不同基因型丙型肝炎患者之间病毒载量、肝功能损害指标[丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)]及使用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗后的疗效差异。结果 (1) 89 例川南地区 HCV-RNA 阳性的丙型肝炎患者成功分型 86 例, 共发现 4 种基因型 7 种亚型, 按照 1a、1b、2a、2b、3a、3b、6a 的顺序, 所占的比例依次是: 2.4%、53.5%、3.5%、2.3%、3.5%、24.4%、10.5%, 急性丙型肝炎、慢性丙型肝炎和丙型肝炎后肝硬化均以 1b 亚型为主, 其次是 3b、6a 亚型; 本试验敏感度为 96.6%, 特异度为 100.0%; (2) 丙型肝炎患者中, 1b 亚型 HCV-RNA 的载量、ALT、AST、ALP、GGT 水平均明显高于其他亚型患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (3) 1b 亚型对干扰素联合利巴韦林药物治疗应答效果最差, 6a 亚型效果最好, 与其他亚型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 川南地区 HCV-RNA 阳性的汉族 HCV 感染者以 1b 亚型为优势基因, 3b、6a 亚型也占有相当高的比例, 其中 1b 亚型造成的临床损害较其他亚型严重, 对抗病毒药物治疗的疗效也明显较其他亚型差。

【关键词】 丙型肝炎; 基因型; 焦磷酸测序

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1359-03

Hepatitis C viral genotyping and its relation with clinic among Han population in southern Sichuan area LIN Jiang, WEN Xian-yong, TANG Min (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 **Objective** To understand the distribution characteristics of hepatitis C virus(HCV) genotypes among the Han patients with hepatitis C in southern Sichuan area and its relation with the clinical diseases of hepatitis C. **Methods** Totally 89 cases of hepatitis C in our hospital were performed the HCV genotyping detection by pyrophosphate sequencing method, then the differences in the viral load, liver function indexes (ALT, AST, GGT, TBIL, etc.) and treatment efficacy after the therapy of pegylated interferon and ribavirin were investigated among the patients with different genotypes of hepatitis C. **Results** (1) In 89 cases of HCV-RNA positive hepatitis C in southern Sichuan area, 86 cases were successfully genotyped, 4 genotypes and 7 subgenotypes were found. According to the 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 6a order, their proportions were 2.4%, 53.5%, 3.5%, 2.3%, 3.5%, 24.4% and 10.5% respectively; 1b was main subtype in acute hepatitis C, chronic hepatitis C and liver cirrhosis after hepatitis C, followed by 3b and 6a. The test sensitivity was 96.6% and specificity was 100.0%; (2) In the patients with hepatitis C, the 1b subgenotypes HCV-RNA load, ALT, AST, ALP and GGT levels were significantly higher than those in other types, the difference were statistically significant ($P < 0.05$); (3) after interferon and ribavirin therapy, the response efficacy of 1b was worst and which of the 6a type was best in all subtypes ($P < 0.05$). **Conclusion** HCV 1b is the most predominant subtypes among hepatitis C Han nationality patients in southern Sichuan area, 3b and 6a subtypes also occupy a very high proportion, among them, the clinical damage caused by the 1b is more severe and the efficacy of antiviral therapy is poorer than other subtypes.

【Key words】 hepatitis C; genotype; pyrophosphate sequencing

丙型肝炎病毒(HCV)的 RNA 聚合酶缺乏校对功能, 容易引起变异, 根据 HCV 基因序列的差异可将 HCV 分为不同的基因型和基因亚型^[1-2], 不同基因型可能引起丙型肝炎不同的临床表现和转归。本文采用焦磷酸测序法对来自川南地区 89 例不同临床类型的汉族丙型肝炎患者进行 HCV 基因分型, 并比较不同亚型之间的临床差异, 旨在为丙型肝炎的诊断和治疗提供依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 89 例研究对象来自 2014 年 6 月至 2015 年 5

月本院就诊的汉族丙型肝炎患者, 来自泸州、宜宾、自贡等川南地区, 其中男 51 例, 女 38 例; 年龄 17~76 岁, 平均(48.30±15.75)岁; 病程 1 个月至 16.2 年, 平均(8.6±3.3)年; 均符合 2004 年中华医学会肝病学会、中华医学会传染病与寄生虫病学会制订的诊断标准^[3], 包括急性丙型肝炎 2 例, 慢性丙型肝炎 71 例, 丙型肝炎后肝硬化 16 例。排除其他亚型的病毒性肝炎及其他导致肝脏病变的疾病, 分型前所有患者未接受过抗病毒治疗。20 例健康对照者来自本院健康体检者, 其中男 12 例, 女 8 例, 年龄 15~77 岁, 平均(50.95±13.48)岁, 经病毒

性肝炎标志物、血压、血液生化、腹部B超、心电图、X线片检查,排除肝、肾、心、脑等重要器官病变及血液、免疫、内分泌系统疾病。健康对照者与丙型肝炎患者的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 清晨采集空腹静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,在收集后 2 h 内,室温下离心 1 600×g 离心 20 min,离心分离血浆, -70 °C 保存备检。

1.2.2 HCV-RNA 提取 取上述备检血浆 200 μL,采用柱式提取法在 QIA cube 核酸提取仪上进行(德国 QIAGEN 公司),试剂由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供,操作严格按照说明书执行。

1.2.3 HCV-RNA 扩增 采用实时荧光定量反转录 PCR (RT-PCR)技术,在 ABI7500fast Real-time PCR 荧光定量扩增仪上进行患者 HCV-RNA 扩增(美国 Applied Biosystems 公司),试剂盒由凯杰(深圳)有限公司提供,操作由本科基因扩增实验室工作人员严格按照说明书操作,每次实验中均设置阴性、临界阳性、强阳性对照和低值和高值质控。

1.2.4 HCV 基因测序和分型 采用德国 QIAGEN 公司 Pyro-Mark Q24 型焦磷酸测序遗传分析系统对 HCV-RNA 检测结果 $>5.00 \times 10^4$ IU/mL 的标本进行基因测序和分型:将 1.2.3 操作中的扩增产物在 Pyro-Mark Q24 序列分析仪上测序,再用 Pyro-Mark Q24 分析软件对测序结果进行分析,把患者的碱基序列与标准基因型的碱基序列比较,得到被检样品的基因型别。相关试剂由 QIAGEN 公司提供,操作严格按说明书进行。

1.2.5 治疗方法 患者给予聚乙二醇干扰素(派罗欣,上海罗氏制药有限公司)180 μg 或 135 μg 皮下注射,1 次 /周;利巴韦林胶囊(浙江诚意药业有限公司)900~1 200 mg/d,口服。疗程 48 周。

1.3 疗效判定 完全应答:治疗结束时,丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)恢复正常和血中 HCV-RNA $<5.00 \times 10^2$ IU/mL;部分应答:治疗结束 ALT、AST、ALP、GGT 或 HCV-RNA 其中之一恢复正常;无应答:治疗结束时 ALT、AST、ALP、GGT 仍高于参考值上限和 HCV-RNA $\geq 5.00 \times 10^2$ IU/mL;有效率 = (完全应答例数 + 部分应答例数) / 总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理和分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 89 例丙型肝炎患者基因分型结果 89 例标本中有 86 例完成分型(3 例未能分型者为慢性丙型肝炎),在已分型的 86 例 HCV-RNA 阳性的汉族丙型肝炎患者中,1b 亚型比例高达 53.5% 居首位,其次是 3b 亚型(24.4%)和 6a 亚型(10.5%),3 种基因型占到总数的 88.4%。在各临床类型丙型肝炎患者中,急性丙型肝炎患者 2 例全部为 1b 亚型,慢性丙型肝炎和丙型肝炎后肝硬化患者位居前 3 位的均是 1b、3b 和 6a 亚型。见表 1。本研究明确检测基因亚型 86 例,灵敏度达到 96.6%;而 20 例健康对照者血清检测均为阴性,特异度为 100.0%。

表 1 86 例不同类型丙型肝炎患者基因分型结果[n(%)]

项目	n	基因亚型						
		1a	1b	2a	2b	3a	3b	6a
急性丙型肝炎	2	0(0.0)	2(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
慢性丙型肝炎	68	2(2.9)	37(54.4)	3(4.4)	1(1.5)	2(2.9)	17(25.0)	6(8.9)
丙型肝炎后肝硬化	16	0(0.0)	7(43.8)	0(0.0)	1(6.3)	1(6.3)	4(25.0)	3(18.6)
合计	86	2(2.4)	46(53.5)	3(3.5)	2(2.3)	3(3.5)	21(24.4)	9(10.5)

2.2 不同基因亚型丙型肝炎患者 HCV-RNA 载量比较 将丙型肝炎患者 HCV-RNA 浓度取常用对数,不同亚型之间治疗前 HCV 载量比较,1b 亚型患者体内 HCV-RNA 浓度高于 3b、6a 及其他亚型($P<0.05$),但 3b、6a 及其他亚型之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2

表 2 不同基因亚型丙型肝炎患者 HCV-RNA 载量比较[$\bar{x} \pm s, \lg(\text{IU/mL})$]

基因亚型	n	HCV-RNA
1b	46	6.59 ± 0.71
3b	21	6.05 ± 0.74*
6a	9	5.68 ± 0.70*
其他	10	6.03 ± 0.75*

注:与 1b 亚型比较,* $P<0.05$ 。

2.3 不同基因亚型丙型肝炎患者肝功能损害指标比较 86 例完成分型的丙型肝炎患者治疗前主要肝功能指标 ALT、

AST、ALP、GGT 水平比较,1b 亚型患者以上指标水平均高于其他型别的丙型肝炎患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 不同基因亚型丙型肝炎患者肝功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

基因亚型	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)
1b	46	72.21 ± 18.36	56.48 ± 17.59	102.77 ± 29.13	51.06 ± 20.54
3b	21	48.86 ± 16.93*	41.11 ± 15.25*	73.51 ± 27.37*	31.66 ± 18.48*
6a	9	43.62 ± 18.05*	42.84 ± 16.59*	67.52 ± 25.98*	30.19 ± 17.37*
其他	10	45.25 ± 17.92*	45.64 ± 17.56*	50.58 ± 20.67*	33.81 ± 18.20*

注:与 1b 亚型比较,* $P<0.05$ 。

2.4 不同基因亚型丙型肝炎患者抗病毒药物疗效比较 86 例完成分型的丙型肝炎患者中,有 69 例完成 48 周聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗,1b 亚型患者对聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗的效果明显比其他亚型差,差异有统计学意义($P<0.05$);6a 亚型疗效最好,但与其他亚型差异无统计学意

义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 不同亚型丙型肝炎患者抗病毒治疗疗效比较[n(%)]

基因亚型	n	完全应答	部分应答	无应答	总有效率
1b	35	9(25.7)	5(14.3)	21(60.0)	14(40.0)
3b	17	8(47.1)	4(23.5)	5(29.4)	12(70.6)*
6a	8	5(62.5)	2(25.0)	1(12.5)	7(87.5)*
其他	9	4(44.5)	3(33.3)	2(22.2)	7(77.8)*

注:与 1b 亚型比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

HCV 基因组序列的异质性体现在 4 个层次:基因型、基因亚型、分离株和准种,其中基因型和基因亚型最具流行病学和临床价值。HCV 各基因型在不同地域分布存在一定差异。1b 是亚洲、欧洲普遍的型别,流行率超过 HCV 感染病例的 70%^[4],非洲以 4、5、6 型为主,拉美国家以 2a 和 2b 亚型为主,4 型在地中海东部国家比例较高。我国大部分地区流行的 HCV 型别为 1b,其次为 2a,在南方城市 1b 亚型感染率占 90% 以上,从南向北 2a 亚型逐渐增多。但近几年所报道的基因型分布情况正在改变^[5]。

本研究经过焦磷酸测序法分型,89 例来自川南地区的汉族丙型肝炎患者中有 86 例被成功分型,共检出 1、2、3、6 共 4 种基因型和 1a、1b、2a、2b、3a、3b、6a 共 7 种基因亚型,未发现 4a、5a 亚型,患者以 1b 亚型(46 例,53.5%)为主,其次是 3b 亚型(21 例,24.4%)和 6a 亚型(9 例,10.5%),其他少见型别共 4 型 10 例(11.6%)。其 1b 亚型占优的情况与全国大部分地域的基因型分布相似。有关四川地区基因分布的文献报道较少,川南地区 1b、3b 亚型为优势基因型的现象与重庆、贵州、云南等四川周边地区报道基本相似^[6-8],同时也表现出 1b 亚型优势显著、3a 亚型比例低、6a 亚型比例较高,亚型种类丰富的突出特点。

本研究结果显示,1 型(1a、1b)和 3 型(3a、3b)在慢性丙型肝炎和丙型肝炎后肝硬化患者分别占到了 79.4% 和 68.8%,提示基因 1 型和基因 3 型较其他基因型更易导致丙型肝炎的慢性化和患者肝脏硬化,与国内文献^[9]报道的结果相似。

本试验中使用的焦磷酸测序分型法敏感度和特异度分别达到了 96.6% 和 100.0%,分型效果理想。研究表明,不同基因型的致病性存在较大差异,对肝脏的损伤和治疗药物的敏感性也不尽相同^[10-11]。本研究结果也证实了这一点。1b 亚型患者体内 HCV-RNA 水平明显高于其他亚型($P<0.05$),其他亚型之间差异无统计学意义($P>0.05$);未经治疗的丙型肝炎患者中,1b 亚型患者肝功能脏损害指标高于其他亚型患者,说明 1b 亚型患者较其他型别的患者体内的 HCV 水平更高,对肝脏损害程度也较其他亚型患者更为严重。

干扰素联合利巴韦林是目前丙型肝炎治疗的公认方案^[12]。本研究观察了丙型肝炎患者的治疗情况,有 69 例丙型肝炎患者完成了 48 周的聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒

治疗,结果显示不同 HCV 亚型患者治疗效果也存在明显差异,其中 6a 亚型有效率最高(87.5%),1b 亚型患者有效率仅为 40.0%,疗效差异比较有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,川南汉族丙型肝炎患者中,基因型以 1b 亚型为主,3b、6a 亚型也占有相当高的比例,亚型表现丰富。不同的基因型可导致不同的临床表现和转归。HCV 基因分型可以在了解丙型肝炎的流行病学特点、临床特征、疗效及判断预后等诸多方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 杨锡琴,修冰冰,王国华,等. HCV 血清分型方法的建立及其评价[J]. 传染病信息,2012,25(2):91-93.
- [2] 周一萌,窦晓光,张琳. 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.
- [3] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(4):194-198.
- [4] Davidson F, Simmonds P, Ferguson C, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region[J]. J Gen Virol, 1995, 76(8):1197-1199.
- [5] 何平,陈春勇. 丙肝基因分型研究[J]. 医药论坛杂志,2010,31(2):10-12
- [6] 周召刚,曾藤,徐华,等. 重庆地区丙型肝炎病毒基因型分布及临床意义[J]. 重庆医科大学学报,2015,40(3):383-387.
- [7] 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
- [8] 普冬,汪亚玲,赵勤,等. 昆明地区 HIV 和 HCV 共感染者丙型肝炎病毒基因型特征[J]. 中国热带医学,2011,11(6):662-664.
- [9] 毕蔓茹,王晓韧,王威,等. 黑龙江地区丙型肝炎病毒基因型与亚型的分布特点及临床意义[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2014,6(9):30-32.
- [10] 李伟琴,袁致海,徐光华,等. 丙型肝炎基因分型进展及临床意义[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(6):549-554.
- [11] Elahi E, Pourmand N, Chaung R, et al. Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing[J]. J Virol Methods, 2003, 109(2):171-176.
- [12] 张泽敏,于兰芳,李一鸣,等. 聚乙二醇干扰素-2 α 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]. 世界华人消化杂志,2014,22(7):1005-1007.

(收稿日期:2015-11-25 修回日期:2016-01-24)

(上接第 1358 页)

较[J]. 中国实用医药,2013,8(19):94-95.

- [11] 梁义安,黄金环,农媛,等. 储存前去白细胞悬浮红细胞质量监测结果分析[J]. 中国输血杂志,2014,27(6):652-653.

- [12] 徐忠,邱颖婕,龚裕春,等. 去白细胞悬浮红细胞与悬浮红细胞储存期内溶血率的比较[J]. 检验医学与临床,2013,10(2):219-220.

(收稿日期:2015-10-20 修回日期:2015-12-28)