

文章编号 1006-8147(2014)04-0286-03

论著

## 天津地区丙型肝炎病毒基因型与临床的相关性研究

金海涵<sup>1</sup>, 林宝禄<sup>2</sup>, 刘树业<sup>3</sup>

(1.天津医科大学三中心临床学院检验科, 天津 300170; 2.天津市滨海新区塘沽中心血站, 天津 300456; 3.天津市第三中心医院检验科; 天津市人工细胞重点实验室, 天津 300170)

**摘要** 目的:研究丙型肝炎病毒(HCV)基因型,了解天津地区丙型肝炎的分布情况。方法:收集252例丙型肝炎患者的血清标本,采用基因测序法进行HCV基因型的检测,并对基因型与其他临床指标进行分析。结果:252例丙型肝炎患者分别感染1b、1a、1c、2a、2i、3a、3b、4a和6a共9种基因亚型,其中1b型占59.9%,其次是3a型,占12.7%。对1型、2型、3型和4型4种基因型进行肝功能、HCV RNA病毒载量比较,经单因素方差分析有明显统计学差异( $P<0.05$ );对HCV感染的不同肝病程度患者的基因型分布进行分析,无显著性差异( $P>0.05$ )。结论:天津地区丙型肝炎病毒感染以1b型为主,其次为3a型。HCV基因型与HCV RNA病毒载量、肝脏损伤指标有明显统计学差异。

**关键词** 丙型肝炎病毒;基因分型;基因测序;天津地区

中图分类号 R575.1

文献标志码 A

### Correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical index in Tianjin

JIN Hai-han<sup>1</sup>, LIN Bao-lu<sup>2</sup>, LIU Shu-ye<sup>3</sup>

(1. Department of Laboratory, The Third Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Tianjin Binhai Tanggu Blood Station, Tianjin 300456, China; 3. The Third Central Hospital of Tianjin; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China)

**Abstract Objective:** To study the hepatitis C virus(HCV) genotype in chronic hepatitis C patients and explore the distribution of hepatitis C in Tianjin region. **Methods:** Serum specimens from 252 patients hepatitis C were collected for genotype by gene sequencing technique. **Results:** In the 252 specimens with HCV infection, nine gene genotypes were detected, including 1b (59.9%), 1a, 1c, 2a, 2i, 3a (12.7%), 3b, 4a and 6a. Significant difference was observed between HCV genotypes and HCV RNA, liver function ( $P<0.05$ ). No significant difference between HCV genotypes and various liver diseases distribution was found ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** HCV 1b is the most prevalent type in Tianjin, followed by type 3a. HCV genotypes are associated with HCV RNA level and liver function.

**Key words** Hepatitis C virus; genotype; gene sequencing; Tianjin region

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科肝炎病毒属,其基因组为单股正链RNA,易变异,全长基因约9.6 kb。根据全基因组核苷酸序列的差异性,可将HCV分为6种基因型和80多种不同亚型<sup>[1-3]</sup>。根据HCV基因型可以了解不同基因型和亚型的地理分布,明确病毒的种系发育和传播途径,有助于判定治疗的难易程度及制定抗病毒治疗的个体化方案<sup>[4]</sup>。同时HCV基因序列的分析有助于深入了解HCV基因特征,是基因分型、诊断试剂研制及疫苗研究的基础<sup>[5]</sup>。许多学者对当地HCV基因型进行了研究,本文旨在研究天津地区丙型肝炎患者其病毒基因型分布及特点,以及与临床相关指标的关系。

### 1 资料与方法

#### 1.1 病例资料

收集2010年1月-2013年1月天津地区丙型肝炎患者252例,男159例,女93例,年龄10~78岁。诊断符合2010年版《丙型肝炎防治指南》的诊断标准<sup>[6]</sup>。所有患者均接受利巴韦林和聚乙二醇干扰素联合治疗方案。

1.2 主要仪器与试剂 9700型PCR扩增仪、3130型基因测序仪、7500型荧光实时定量PCR仪为美国AB公司的产品;丙型肝炎病毒基因分型检测及测序试剂由上海宝藤生物医药科技有限公司提供;Big-Dye、POP7胶由美国AB公司提供;HCV RNA定量检测试剂由广州达安基因有限公司提供。

1.3 方法  
1.3.1 HCV基因型检测 血清样本处理及逆转录 250  $\mu$ L血清样本加入到750  $\mu$ L裂解液中,进行RNA提取,逆转录反应体系为dNTP 1  $\mu$ L, Oligo DT 1  $\mu$ L, 模板RNA 8  $\mu$ L, 混匀70  $^{\circ}$ C水浴5 min;加入5 $\times$ 反转录buffer 4  $\mu$ L, RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ L, 反转录酶0.3  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 5.2  $\mu$ L, 总反应体积20  $\mu$ L。逆转录

PCR 反应程序:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 保温。

1.3.2 PCR 扩增 利用上述逆转录产物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:2×Master Mix 10 μL、HCV-1 Primer Mix 2 μL、模板 HCV-cDNA 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 3 μL,总反应体积为 20 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 2 min、然后 95 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s 30 个循环;72 ℃ 再延伸 5 min,12 ℃ 恒温。PCR 扩增完毕后,取 6 μL PCR 产物在浓度 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,判断扩增的目的条带。扩增目的条带切胶,将 PCR 产物进行纯化。

1.3.3 测序 将纯化产物进行测序 PCR,反应体系:纯化模板 4 μL,BigDye mix 4 μL,引物 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 1 μL;反应条件:96 ℃ 预变性 1 min;然后 96 ℃ 变性 10 s,50 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 4 min,25 个循环;最后 4 ℃ 保温。用醋酸钠-EDTA 混合物及 70% 冰乙醇纯化后,加 10 μL Hi-Di Formamide 溶解 DNA,95 ℃ 变性 4 min,置冰浴,上机测序。

1.3.4 结果比对 将已检出的 HCV 基因序列打开网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>,与 GenBank 中 HCV 各型分离株序列进行同源性比较,根据比对结果确定 HCV 的基因分型。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析,计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料的比较采用单因素方差分析。所有统计检验采用双侧检验, $P<0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HCV 基因型结果分析 252 例 HCV 患者血清标本中,237 例标本能检出 HCV 基因型,检出率为 94.05%,15 例患者因病毒载量过低无法进行基因分型检测。237 例标本中共检出 5 种基因型和 9 种基因亚型,其中以基因 1 型为主(占 66.7%),1b 型为 142 例,占 59.9%,为本地区的主要基因型;3a 型为 30 例,4a 为 21 例,3b、1a 均为 15 例,2a 型为 8 例,2i 为 4 例,1c、6a 型为 1 例。

2.2 HCV 基因型在性别、年龄上的分布 对 HCV 基因型不同分组进行比较,基因 1 型 158 例,其中男性 94 例(占 59.5%);基因 2 型 12 例,其中男性 6 例(占 50%);基因 3 型 45 例,其中男性 35 例(占 77.8%);基因 4 型 21 例,其中男性 19 例(占 90.5%)。按年龄>50 岁和≤50 岁进行分组比较,其中>50 岁患者 131 例,≤50 岁患者 105 例。>50 岁患者感染基因 1、2、3、4 型分别为 87 例、8 例、21 例及 15 例。≤50 岁患者感染基因 1、2、3、4 型分别为 71 例、4 例、24 例及 6 例。进行组间比较无统计学差异

( $P>0.05$ )。6a 型例数较少,未进行统计学比较。

2.3 HCV 不同基因型与肝脏损伤指标的关系 按基因 1、2、3、4 型分组进行比较,肝脏损伤指标比较结果见表 1。4 种基因型 HCV 感染者血清 ALT/AST、HCV RNA 病毒载量有明显统计学差异( $P<0.05$ )。基因型 1 型的 HCV 患者肝功能、HCV RNA 病毒载量明显高于其他基因型。6a 型例数较少,未进行统计学比较。

表 1 HCV 不同基因型与肝脏损伤指标的比较

Tab 1 Comparison between HCV different genotypes and liver damage index

基因型	例数	ALT/(IU/L)	AST/(IU/L)	HCV RNA/( $\times 10^5$ )
1 型(1b、1a、1c)	158	202.5±35.6	96.4±28.5	9.32±2.78
2 型(2a、2i)	12	88.3±21.4	48.9±15.3	1.02±0.98
3 型(3a、3b)	45	115.9±30.8	56.4±19.6	2.38±1.77
4 型(4a)	21	99.7±22.1	68.1±15.9	3.45±2.69

2.4 HCV 不同基因型与肝病进展变化的关系 按慢性丙型肝炎组、肝硬化组、肝癌组分 3 组进行比较,不同病变程度的 HCV 基因型比较结果见表 2。经  $\chi^2$  检验,HCV 感染的不同肝病程度患者的基因型分布无显著性差异( $P>0.05$ )。6a 型例数较少,未进行统计学比较。

表 2 HCV 不同基因型与肝病进展情况的比较(n)

Tab 2 Comparison between HCV different genotypes and liver disease progress(n)

基因型	例数	分组		
		慢性丙型肝炎组	肝硬化组	肝癌组
1 型	158	23	95	40
2 型	12	6	3	3
3 型	45	25	13	7
4 型	21	11	6	4

## 3 讨论

丙型肝炎日益受到人们的关注,HCV 基因型作为重要的流行病学指标,对指导 HCV 临床治疗具有十分重要的意义。不同的 HCV 型别之间的核苷酸序列差异很大,不同基因型之间的全基因序列差异大于 30%,同一基因型不同亚型之间的序列差异在 20%~25%。由于 HCV 基因型与慢性丙型肝炎的临床表现、抗病毒治疗的疗程及预后等各方面都有很大的相关性,HCV 基因型的研究一直是丙型肝炎病毒研究的热点。

HCV 病毒基因型呈地域性分布,1a 多见于欧美地区,1b 和 2a 型在亚洲地区分布广泛,3 型主要分布在印度、巴基斯坦、泰国和新加坡等国家,4a 主要分布在中东、埃及和中非地区,约占感染者的

20%~30%。而6a型则更为局限,仅在越南和马来西亚等东南亚国家发现。近年来的研究显示,在我国不同地区HCV基因型存在一定的差异。我国最主要的基因型为1b型,其次为2a型<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,天津地区基因型1b型为主要基因型,占59.9%,3a型为次要基因型,占12.7%,与文献报道不太一致<sup>[9]</sup>,可能与近年来人口流动性较大有关。随着人口流动性的增加及感染途径的多样化,HCV基因型的流行和分布可能会发生变化<sup>[10-11]</sup>。本研究出现了1b、1a、1c、2a、2i、3a、3b、4a、6a共9种基因型,体现天津地区HCV基因分型的多样性。张帆等<sup>[12]</sup>对重庆地区77份HCV感染者血清样本进行序列分析,结果显示重庆地区主要流行的基因型为1b(38%),2a(13%)、3a(16%)、3b(14%)和6a(19%)均占相当比例,呈现了重庆地区基因分型的分布。有研究显示,北方地区2a基因型比例比南方地区高,南方地区1b基因型比北方地区稍高。但是,施行对献血者抗-HCV筛查后,各地区HCV传播方式有了一定的改变,因而各地区HCV基因型分布也有一定的转变<sup>[13]</sup>。

本研究发现HCV基因型在性别、年龄分布无显著差异。严艳等<sup>[14]</sup>对北京地区310例HCV RNA阳性血清基因分型发现,基因型分布以1b(70%)为主,其次为2a(23.9%)。研究基因型的临床特点时发现,HCV基因型与性别之间的相关性分析无明显统计学意义,HCV各基因型间的首次HCV RNA定量之间的差异有统计学意义。

为了进一步探讨HCV基因型与其他临床指标的相关性,本研究探讨了HCV基因型与肝脏损伤指标的关系,结果显示基因型1型的HCV患者肝功能、HCV RNA病毒载量明显高于其他基因型,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这与严艳等<sup>[14]</sup>报道一致。沈玲等<sup>[15]</sup>对南京地区104例慢性丙型肝炎患者研究发现,基因型分布主要有1b、2a、3a、3b、6a,比较各基因型的HCV RNA定量之间的差异无统计学意义。HCV基因型与HCV病毒载量之间的相关性目前仍存在争议。有研究认为不同基因型HCV感染者间的病毒载量存在明显差异<sup>[4]</sup>,但也有研究认为HCV基因型与HCV RNA载量间无明显相关性<sup>[5]</sup>。各研究中HCV基因型与HCV RNA之间的关系存在不一致性,考虑原因可能有以下几个方面:(1)各地区的HCV基因型分布有差异;(2)各实验室HCV RNA定量检测方法有差异;(3)HCV RNA检测的时间段不一样。

表2中,根据临床诊断标准,将病例分为3组,

其中慢性丙型肝炎65例,肝硬化117例,肝癌54例,本研究发现HCV感染的不同肝病程度患者的基因型分布并无显著性差异( $P>0.05$ )。目前关于HCV基因型与病情进展程度尚存在争议。据报道,与其他亚型相比,1b型与重型肝炎和病情进行性发展有关<sup>[16-17]</sup>。但是,另一些学者并没有发现基因1型与2型在致病性方面的差异。Nousbaum等<sup>[18]</sup>对法国和意大利的200例HCV感染者研究表明,1b型与下列因素相关:年龄偏大、病程较长、肝硬化或合并肝癌,而1a、2a、2b、3a型则更多见于慢性肝炎且不合并肝硬化和肝癌患者。Yotsuanagi等<sup>[19]</sup>认为HCV基因型不是引起肝病严重程度的病程的重要因素,肝功能的受损情况可能由感染方式、再感染、宿主免疫、年龄、病毒合并感染及饮酒等多因素引起。产生争议的原因尚不明确,有可能是一些干扰因素起了作用,有待进一步研究。

综上所述,天津地区丙型肝炎病毒感染以1b型为主,其次为3a型。HCV基因型在性别、年龄以及不同肝病程度上分布无显著性差异,而与HCV RNA病毒载量、肝脏损伤指标有明显统计学差异。通过基因测序法对天津地区丙型肝炎病毒基因分型的测定,了解了天津地区HCV基因型分布的现状,为临床治疗提供一定参考。

#### 参考文献:

- [1] Ashfaq U A, Javed T, Rehman S, et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses[J]. J Virol, 2011,8(6):161
- [2] Wang Y, Xia X S, Li C H, et al. A new HCV genotype 6 subtype designated 6v was confirmed with three complete genome sequences [J]. J Clin Virol, 2009,44(3):195
- [3] Xia X, Lu L, Tee K K, 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
- [4] Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes [J]. Hepatology, 2005,42(4):962
- [5] Van Soest H, Gij B, Van Erpecum K J. Hepatitis C:changing genotype distribution with important implications for patient management[J]. Neth J Med, 2006,64(4):109
- [6] Ghany M G, Strader D B, Thomas D L, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. an update[J]. Hepatology, 2009,49(4):1335
- [7] 魏来, Yang R F. 丙型肝炎病毒实验室诊断的现状与存在的问题[J]. 中华检验医学杂志, 2008,31(8):845
- [8] Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection[J]. Liver Int, 2011,31(2):1
- [9] 聂红明,陈建杰,汪蓉,等. 中国汉族人群慢性丙型肝炎病毒基因型分布规律研究[J]. 中华流行病学杂志, 2012,33(5):501

(下转第292页)



制仍不能得到详细的阐述,仍需进一步大量的相关研究。

总之,本研究发现 Th 细胞的新亚群--Th17 细胞在 ITP 患者中数量增加且功能亢进,经过免疫抑制治疗后这种增高趋势较前明显减低,且 Th17 细胞与相关临床指标具有相关性,提示 Th17 细胞在 ITP 发病中发挥重要作用,且与疾病严重程度具有相关性。因此对 Th17 细胞及 IL-17 的研究,有望成为治疗 ITP 及判断预后的新目标和新靶点。

#### 参考文献:

- [1] Provan D, Stasi R, Newland A C, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2010, 115(2): 168
- [2] 季丽莉. 免疫性血小板减少性紫癜的免疫学发病机制[J]. *血栓与止血*, 2010, 16(5): 228
- [3] Bi Y, Yang R. Direct and indirect regulatory mechanisms in Th17 cell differentiation and functions[J]. *Scand J Immunol*, 2012, 75(6): 543
- [4] Jennifer L, Katia B, Rene de W M. Development and function of TH17 cells in health and disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(5): 1004
- [5] Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(5): 625
- [6] 胡锦涛, 毕胜利, 吕元. Th17 细胞—正逐步获得深入研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(4): 372
- [7] Ma D, Zhu X, Zhao P, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(11): 899
- [8] Guo Z X, Chen Z P, Zheng C L, et al. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. *Eur J Haematol*, 2009, 82(6): 488
- [9] Rocha A M, Souza C, Rocha G A, et al. The levels of IL-17A and of the cytokines involved in Th17 cell commitment are increased in patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(10): 1560
- [10] Hu Y, Ma D X, Shan N N, et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Plos One*, 2011, 6(10): e26522
- [11] Hu Y, Li H Y, Zhang L, et al. Elevated proles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Human Immunol*, 2012, 73(6): 629
- [12] Ji L L, Zhan Y X, Hua F L, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia [J]. *Plos One*, 2012, 7(12): e50909

(2014-01-10 收稿)

(上接第 288 页)

- [10] 周友乾, 尹凤鸣, 冯经华. 湘南地区住院患者丙型肝炎病毒感染方式的特征分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(6): 443
- [11] 张立新, 安勇, 张孝国, 等. 山东地区慢性 HCV 感染者病毒的基因型分布[J]. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(8): 567
- [12] 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
- [13] Dieterich D T, Rizzetto M, Manns M P. Management of chronic hepatitis C patients who have relapsed or not responded to pegylated interferon alfa plus ribavirin[J]. *J Viral Hepat*, 2009, 16(12): 833
- [14] 严艳, 李卓, 郭向华, 等. 北京地区慢性丙型肝炎患者血清 HCV-RNA 定量检测与基因分型的研究[J]. *医学理论与实践*, 2007, 20(7): 756
- [15] 沈玲, 顾小军, 刘新钰, 等. 南京地区丙肝基因型、HCV RNA 与临床预后[J]. *江苏医药*, 2007, 33(10): 1050
- [16] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. *J Med Virol*, 2005, 75(4): 538
- [17] Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, et al. Influence of hepatitis C virus subtype on hepatocellular carcinogenesis: A multivariate analysis of a retrospective cohort or 593 patients with cirrhosis[J]. *Inter-virology*, 2002, 45(1): 71
- [18] Noursbaum J B, Pol S, Nalpas B, et al. Hepatitis C virus type 1b(II) infection in France and Italy[J]. *Ann Intern Med*, 1995, 122(3): 161
- [19] Yotsuanagi H, Koike K, Yasuda K, et al. Hepatitis C virus genotype and development of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1995, 76(8): 1352

(2014-02-21 收稿)