

• 临床检验研究论著 •

甘肃地区藏族丙型肝炎患者的 HCV 基因分型研究

徐 辉, 杨伟国, 李永红

(甘肃省临床检验中心, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 了解甘肃地区藏族丙型肝炎患者的 HCV 基因分型特征。方法 对 HCV 感染的患者样本用实时荧光定量 PCR 进行病毒载量的确定。对病毒载量大于 10^3 copy/mL 的样本用多重 PCR 进行 HCV 基因分型。结果 通过对甘肃地区藏族 HCV 感染者的样本进行基因分型, 发现该民族 HCV 感染以 1b 型(56.6%)为主, HCV 感染 2a 型(23.3%)次之, 再次为 2c 型(10.0%)和 1c 型(3.3%), 未检测到 3a 型。结论 甘肃藏族 HCV 感染以 1b 型为主, 该研究为临床针对不同基因型 HCV 感染者的治疗提供了依据。

关键词: 肝炎, 丙型; 肝炎病毒, 丙型; 聚合酶链反应; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)17-2081-02

Genotyping of HCV DNA in Tibetan nationality patients with hepatitis C in Gansu

Xu Hui, Yang Weiguo, Li Yonghong

(the Center of Clinical Experiment in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate hepatitis C virus (HCV) genotypes in Tibetan nationality of Gansu. **Methods** HCV load was tested by real-time quantitative PCR. Samples of different genotypes with viral load more than 10^3 copy/mL were analyzed by multiplex PCR. **Results** Tibetan ethnic group were mainly infected with HCV type 1b(56.6%), followed by type 2a(23.3%), 2c (10.0%) and 1c(3.3%). However, type 3a could not be identified. **Conclusion** It might be with special feature that the genotypes of Tibetan nationality patients were mainly infected by type 1b HCV. Results of the research could provide theoretical basis for the clinical care of HCV infected individuals with different genotypes.

Key words: hepatitis C; hepatitis C virus; polymerase chain reaction; genotype

HCV 是经血液、体液传播的一种高度异质性的正义单链 RNA 病毒, HCV 感染是导致慢性肝炎、肝硬化及原发性肝癌的重要原因之一。由于 RNA 复制酶的低保真性及缺乏校正功能, HCV 呈高度异质性, 并有明显的地区分布差异。研究发现, HCV 基因分型在 HCV 感染、传播、诊疗及预防等方面均有重要意义, 且我国不同地区 HCV 基因型存在差异。HCV 基因型与干扰素抗病毒治疗的应答密切相关, 是决定丙型肝炎患者干扰素治疗效果的重要因素。

1 资料与方法

1.1 一般资料 由甘肃省临床检验中心、各地州市医院收集的藏族 HCV 感染者血清, -70°C 保存备检。

1.2 仪器与试剂 美国安捷伦 MX-3000P 型荧光定量 PCR 扩

增仪。ELISA 试剂由厦门新创公司提供, 重组免疫印迹实验试剂由新加坡 MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd 公司提供。核酸纯化柱、实时荧光定量 PCR 试剂由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供。基因分型引物、PCR 反应试剂、反转录试剂由达安生物工程公司提供。不同基因型 HCV 的引物见表 1。

1.3 方法

1.3.1 样本的筛查 首先对获取的样本用 ELISA 试剂盒进行抗 HCV 抗体阳性筛查, 用重组免疫印记实验进行确认。对已确诊的 HCV 感染者的样本用荧光定量 PCR 进行病毒载量的确定(病毒载量大于 10^3 copy/mL)。具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。

表 1 不同基因型 HCV 的 PCR 引物

反应	引物编号	引物序列(5'-3')
第 1 次 PCR 反应	HCV-Sc2	GGG AGG TCT CGT AGA CCG TGC ACC ATG
	HCV-Ac2	GAG MGG KAT RTA CCC CAT GAG RTC GGC
第 2 次 PCR 反应	HCV-S11	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
	1b	HCV-G1b
第 2 次 PCR 反应	HCV-S11	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
	2b	HCV-G2b
第 2 次 PCR 反应	HCV-S11	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
	3b	HCV-G3b
第 2 次 PCR 反应	HCV-S12	AAC ACT AAC CGT CGC CCA CAA
	2a	HCV-G2a

续表 1 不同基因型 HCV 的 PCR 引物

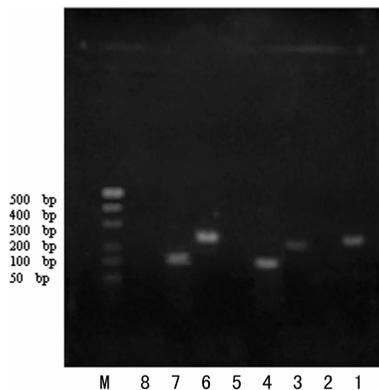
反应	引物编号	引物序列(5'-3')
第 2 次 PCR 反应	HCV-S2	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
1a	HCV-G1a	GGA TAG GCT GAC GTC TAC CT
第 2 次 PCR 反应	HCV-S2	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
3a	HCV-G3a	GCC CAG GAC CGG CCT TCG CT
第 2 次 PCR 反应	HCV-S2	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
4	HCV-G4	CCC GGG AAC TTA ACG TCC AT
第 2 次 PCR 反应	HCV-S2	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
5	HCV-G5a	GAA CCT CGG GGG GAG AGC AA
第 2 次 PCR 反应	HCV-S2	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
6	HCV-G6a	GGT CAT TGG GGC CCC AAT GT
第 2 次 PCR 反应	HCV-S31	AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC
1c	HCV-G1c	GAA TAG GCT GRC GCC TTC CG
第 2 次 PCR 反应	HCV-S32	AAC ACT AAC CGT CGC CCA CAA
2c	HCV-G2c	AGT GGT GCG CCG RTC TTT AGG G

1.3.2 利用多重 PCR 进行 HCV 的基因分型 样本核酸(HCV RNA)纯化采用二氧化硅吸附分离技术,具体步骤严格按照核酸纯化柱提取说明书进行。纯化后的核酸按以下程序进行反转录反应:30 °C 10 min,42 °C 20 min,85 °C 5 min,4 °C 5 min,反转录完成获得产物。取反转录产物 11 μL 按以下条件反应获得第 1 次 PCR 反应产物:94 °C 3 min,94 °C 1 min,45 °C 1 min,72 °C 1 min,20 个循环,94 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 1 min,20 个循环,4 °C 5 min。取第 1 次 PCR 反应产物分 3 管进行第 2 次 PCR 扩增(每管 0.5 μL),反应条件为 94 °C 3 min,94 °C 1 min,62 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环,获得第 2 次 PCR 反应产物。

1.3.3 第 2 次 PCR 反应产物用 3% 凝胶电泳观察结果 产物长度如下:管 1 中 1b 型 234 bp,2a 型 139 bp、190 bp(有一些 4 型也会出现 190 bp 条带);2b 型 337 bp,3b 型 176 bp;管 2 中 1a 型 208 bp,3a 型 232 bp,4 型 99 bp,5 型 320 bp,6 型 336 bp;管 3 中 1c 型 104 bp,2c 型 251 bp 或 300 bp、117 bp。

2 结 果

通过对甘肃地区藏族 HCV 感染者利用多重 PCR 进行分型,发现 HCV 感染以 1b 型为主,占 56.6%(n=17),其次是 2a 型,占 23.3%(n=7),未检测到 3a 型。除以上 2 个型别外,还发现在中国其他地区少有的 1c 型,占 3.3%(n=1),以及 2c 型,占 10%(n=3),见图 1。



M: 标记物;1~3: 分别表示 1 号样本的第 1、2、3 管;4~6: 分别表示 2 号样本的第 1、2、3 管;7~8: 分别表示 3 号标本的第 1、2 管。

图 1 藏族 HCV 分型凝胶电泳图

3 讨 论

HCV 是一种由 HCV 感染引起的肝脏急、慢性炎症性疾病。目前,全世界有 1.7 亿~20 亿人为 HCV 感染者^[1],每年新增感染者约 350 万人。在我国,HCV 主要通过输血传播^[2],感染总人数超过 5 000 万,属 HCV 的中高度感染区。HCV 基因组呈现高度异质性,根据 HCV 基因组核苷酸序列的差异程度,目前将 HCV 分为 6 个基因型及不同的亚型^[3-4]。HCV 基因型分布存在地理性差异。1a 型是第 1 个被鉴定的 HCV 基因型,多见于美国,1b 型广泛分布于亚洲各国,同时在美国、欧洲、中国和日本的感染病例也较多。2a 型和 2b 型占全球 HCV 基因型的 10%~30%,主要分布在北美、欧洲、中国和日本等地^[5-7],HCV 在我国大陆 6 种基因型都有分布,但大部分地区以 1b、2a 型最常见,其中 1b 型占 70%~80%,在南方城市占 90%以上,2a 型从南向北逐渐增多。近年来,由于国外移民和人口流动,我国 HCV 基因型分布情况也逐步发生改变。熊瑜琳等^[8]报道各 HCV 基因型感染的患者比例和 HCV 基因型在患者中的分布,包括单基因型和混合基因型 HCV 感染率,在南北地区之间差异无显著性。这与本研究检测结果相吻合。本研究通过对藏族的 HCV 感染者进行基因分型,发现该民族 HCV 感染者同样以 1b 型为主,其次是 2a 型,但未检测到 3a 型,可能与样本量较少有关。HCV 的混合基因型感染多见于反复接受输血者和共用针头的静脉注射毒品者中,在我国最常见为基因型 1b/2a 混合感染^[9]。从本研究结果看,没有检出有混合基因型感染的患者,这可能与样本的来源有关(采集的样本主要来源为献血者,而非固定人群),但本次研究发现了在中国其他地区较少发现的 1c 型和 2c 型,初步说明藏族 HCV 基因型呈现多样性。HCV 感染的临床症状较轻,但其极易演变成慢性化^[10]。国内外研究表明,不同基因型和基因亚型的 HCV 对肝脏损伤的程度不同。HCV RNA 载量反映了病毒复制的活跃程度和病情变化,1、2 型感染者血清 HCV RNA 载量显著高于 3 型感染者,病毒复制活跃,病情易为慢性化^[11]。本研究所检测的结果是以 1b 型为主,2a 型次之,而所采用的是病毒载量大于 10³ copy/mL 的样本,这可能与 1、2 型常见于病毒载量高的样本有关。α 干扰素(IFN-α)是 HCV 抗病毒治疗的首选药物,在其临床应用过程中,人们发现 IFN-α 的临床疗效与 HCV 基因型有密切关系。NH2002 研究组总结指出,确定 HCV 基因型对于选择治疗的方法和周期(下转第 2084 页)

2.2 112 例验证组标本中,3 例 HbA2 检测结果低于参考范围下限,经地贫基因分析确诊为 α 地贫;1 例 HbA2 检测结果大于参考范围上限,经地贫基因分析确诊为 β 地贫;108 例 HbA2 检测结果处于参考范围内,仅 1 例 HbA2 检测结果正常(2.4%)但地贫基因分析确诊为 α 地贫。

3 讨论

血液成分检测参考范围受地域、民族、年龄等因素影响较大,因此,建立不同地区参考范围十分必要^[1-4]。Hb 电泳是地贫筛查手段之一,其中 HbA2 检测结果最具有诊断价值^[5-7]。建立合适的 HbA2 参考范围对地贫的防治具有重要意义。毛细管电泳分析仪 CapillaryS2 可用于血液 Hb 成分分析,成人静脉血和脐带血均可用于检测,且分辨率高,比高效液相色谱法具有更多的优势^[8-12]。

本研究调查了广西南宁地区 810 例健康成人 Hb 电泳检测结果,证实 HbA2 水平存在性别差异($P < 0.01$),HbA 水平不存在性别差异($P > 0.05$),且 HbA2 和 HbA 水平均无年龄差异($P > 0.05$)。由于 CapillaryS2 仅能定量至小数点后 1 位,因此,笔者认为以 2.3%~3.3%作为本地区 CapillaryS2 检测 HbA2 参考范围较为合适。以 HbA 检测筛查地贫的灵敏度较 HbA2 低,因此临床多以 HbA2 作为地贫筛查的关键指标。结合本研究结果,笔者建议以 96.4%~97.9%作为本地区 CapillaryS2 检测 HbA 的参考范围。验证试验中(结果未显示),99.1%(111/112)的验证组受试对象适用于本研究建立的 HbA 参考范围,有 1 例检测结果在该参考范围内,但地贫基因筛查为阳性,考虑可能与以下因素有关:(1)受试者纳入样本量不够大,可能会存在数据偏差;(2)血常规及 Hb 电泳检测均存在漏诊静止型 α 地贫的可能,这与患者珠蛋白肽链功能存在异质性有关。但即使存在漏诊风险,本研究所建立的参考范围仍能筛查出绝大部分地贫基因携带者,具有一定的应用价值。

参考文献

[1] 夏曙华,丛硕,莫非,等.苗族、布依族、汉族中学生血液分析仪各参数调查[J].临床检验杂志,2004,22(4):305-306.

[2] 刘文,李君安,胡先华,等.某地区老年人血常规各参数参考值范

围的调查分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(21):2494-2495.

[3] 徐燕,朱宝香,刘书鹏,等.不同民族儿童红细胞体积分布宽度参考值探讨[J].国际检验医学杂志,2011,32(16):1896-1897.

[4] 郭健,蒋琳.参考区间与医学检验[J].中华检验医学杂志,2008,31(11):1316-1319.

[5] Mais DD, Gulbranson RD, Keren DF. The range of hemoglobin A (2) in hemoglobin E heterozygotes as determined by capillary electrophoresis[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 132(1): 34-38.

[6] Higgins TN, Khajuria A, Mack M. Quantification of HbA (2) in patients with and without beta-thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab hemoglobin variants: comparison of two systems[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(3): 357-362.

[7] Yang Z, Chaffin CH, Easley PL, et al. Prevalence of elevated hemoglobin A2 measured by the CAPILLARYS system[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(1): 42-48.

[8] Cotton F, Malaviole X, Vertongen F, et al. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies[J]. Clin Lab, 2009, 55(5-6): 217-221.

[9] Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, et al. Comparison of Sebia CapillaryS capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies [J]. Am J Clin Pathol, 2008, 130(5): 824-831.

[10] Liao C, Zhou JY, Xie XM, et al. Cord blood analysis for rapid prenatal confirmation of Hb Bart's disease using the Sebia Capillary Electrophoresis System[J]. Hemoglobin, 2012, 36(2): 186-191.

[11] Tang HS, Zhou JY, Xie XM, et al. Screening for common nondeletional α -thalassemias in Chinese newborns by determination of Hb Bart's using the Sebia CapillaryS 2 electrophoresis system[J]. Hemoglobin, 2012, 36(2): 196-199.

[12] Li DZ, Zhou JY, Xie XM, et al. Association of Hb New York with Hb E and $\alpha(0)$ -thalassemia in a Chinese woman identified by Sebia CapillaryS2 system[J]. Hemoglobin, 2012, 36(2): 157-160.

(收稿日期:2012-01-30)

(上接第 2082 页)

很重要^[12]。因此,HCV 基因分型有重要的临床意义,研究藏族 HCV 各基因型的临床差别以及引起差别的机制,将为 HCV 的诊断、治疗和预防以及患者的预后判断提供强有力的依据。

参考文献

[1] Alberti A, Benvegnu L. Management of hepatitis C[J]. Hepatol, 2003, 38(Suppl 1): 104-118.

[2] 刘姐姐,王全楚.输血后丙型肝炎患者的临床特点及自然病程[J].实用肝脏病杂志,2008,11(6):410-411.

[3] 刘剑荣,黄永建,夏洪娇,等.丙型肝炎基因型分布特点及流行病学分析[J].国际检验医学杂志,2010,32(12):1347-1348.

[4] Hionk, Yamaguchi Y, Fujiwara D, et al. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon[J]. J Viral Hept, 2000, 7(1): 36-42.

[5] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus 15 years on[J]. Gen Virol, 2004, 85(P11): 3173-3188.

[6] 徐皖苏,刘靛雯,秦晓华,等.山东地区丙型肝炎病毒基因型及相

关因素分析[J].山东大学学报:医学版,2010,48(2):140-41.

[7] Nguyen MH, Keeffe EB. Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9[J]. Clin Liver Dis, 2005, 9(3): 411-426.

[8] 熊瑜琳,张长江,王小红,等.中国人 HCV 标本库的建立[J].免疫学杂志,2008,5(24):568-571.

[9] Yuen MF, Lai CL. Response to combined in terferon and ribavirin is better in patients in fected with hepatitis C virus genotype 6 than genotype 1 in HongKong[J]. Intervirology, 2006, 49(1/2): 96-98.

[10] 张学文.不同类型肝病患者血清抗-HCV 检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1394-1396.

[11] Raghuraman S, Shaji RV, Sridharan G, et al. Distribution of the different genotypes of HCV among patients attending a tertiary care hospital in south India[J]. J Clin Virol, 2003, 26(1): 61-69. f

[12] Seeff LB, Hoofnagle JH. Appendix the national institutes of health consensus development conference management of hepatitis C 2002 [J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(1): 261-278.

(收稿日期:2012-03-29)