

广州地区丙型肝炎患者病毒基因分型 及其与临床病情的关系

安 阳 杨绍基 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科; 广州, 510630)

摘 要 目的: 探讨广州地区丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布的特点以及 HCV 基因型与临床病情的关系。方法: 病例选自广州居民, 基因分型使用 Okamoto 的“型特异性引物 PCR 法”, 并加以改进, 基因型的命名采用国际上统一的 Simmonds 两级命名体系。结果: 广州 HCV 基因型分布 1a 占 7.6%、1b 占 49.5%、2a 占 23.8%、2b 占 1.9%、3a 占 2.9%、1b+2a 混合型占 9.5%、未定型占 5%, 同国内其它地区一些学者所报道的结果相似。结论: HCV 基因型分布不存在先前认为的地理上的南北差异。不同基因型传播途径没有差异, 均以血液传播为主(82.9%)。1 型及混合型感染病情较重, 干扰素疗效较差。

主题词 肝炎, 丙型/遗传学; 基因型; 聚合酶链反应; 干扰素类/治疗应用

中图分类号 R 512.6

The Genotypes of Hepatitis C virus in Patients with Hepatitis C in Guangzhou and the Relationships Between Genotypes and Clinical Features

An Yang Yang Shaoji Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Abstract Objective: The distribution of HCV genotypes in Guangzhou and the relationships between HCV genotypes and clinical features were studied. Cases were selected from the patients hospitalized in our department from 1994 to 1997. All of them are Guangzhou residents. **Methods:** HCV RNA and genotypes were detected by RT-PCR with a pair of primers according to the sequence of 5'-NCR and with genotyping primers according to the sequence of C region originally proposed by Okamoto *et al.* **Results:** 8 (7.6%) of 105 patients with hepatitis C in Guangzhou were identified as 1a, 52 (49.5%) were 1b, 25 (23.8%) were 2a, 2 (1.9%) were 2b, 3 (2.9%) were 3a, 10 (9.5%) were 1b+2a and 5 (5.0%) were unidentified. The distribution of HCV genotypes is similar to those reported by other authors in China, with 1b as the predominant type, followed by 2a and other genotypes. **Conclusions:** The distribution of HCV genotypes has no geographical distinction between northern China and southern China previously proposed by some researchers. There is no evident relationship between HCV genotypes and different transmission routes. Blood transfusion was found to be the major transmission route (82.9%) for all HCV genotypes. Infection with 1b or 1b+2a tends to lead a more severe liver disease and poorer response to interferon therapy.

Subject headings hepatitis C/genetics; genotype; polymerase chain reaction; interferons/therapeutic use

本研究采用基因分型常用方法“型特异性引物 PCR 法”, 并加以改进, 探讨了广州地区 HCV 1a、1b、2a、2b、3a 5 个亚型所占比例, 并同国内其他地区的同类报道加以比较, 以期发现基因型分布上的特点。并且探索了不同基因型与临床的关系, 以便

检测 HCV 基因型以指导丙型肝炎的防治。

1 材料与方法

1.1 病例选择

以1994年8月~1997年5月在我科住院的广州地区丙型肝炎病例105例为观察对象,急性丙型肝炎25例,慢性丙型肝炎66例,丙型肝炎后肝硬化14例。诊断标准按1995年5月北京第5次全国传染病寄生虫病学术会议诊断标准^[1]。全部病例HCV RNA和抗-HCV阳性,均无甲、乙、戊型肝炎病毒感染血清学证据。其中男性80例,平均年龄40.1岁,女性25例,平均年龄36.8岁。

1.2 HCV RNA检测及基因型

在5'NC区设计引物,用逆转录巢式聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测HCV RNA。外引物:正义: TG TGAGGAACTACTGTCTTC,反义: TG GTGCACGGT-CTACGAG;内引物:正义: TTCACGCAGAAAGCG-TCTAG,反义: AACACTACTCGGCTAGCAGT。终产物长度为203 bp。

根据Okamoto报告的在C区设计的型特异性引物扩增分型,模板制备及PCR反应条件见参考文献[2][3]。第2次PCR复性温度改良为60℃(1b和2a)或58℃(1a和2b)或56℃(3a)40 s,并对所有标本都分别使用5个亚型的引物分型,以期得出精确的结论。PCR终产物检测采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB染色,紫外线灯下观察,HCV各基因型电泳条带分别为1a 53 bp、1b 114 bp、2a 174 bp、2b 123 bp、3a 88 bp。

2 结果

2.1 广州地区HCV基因型分布

105例HCV RNA阳性、临床诊断为丙型肝炎的广州地区患者之中,HCV基因型分布为1a 8例(7.6%)、1b 52例(49.5%)、2a 25例(23.8%)、2b 2例(1.9%)、3a 3例(2.9%)、1b+2a 10例(9.5%)、未定型5例(4.8%)。

2.2 HCV基因型与临床关系

2.2.1 基因型与感染途径的关系 见表1。 χ^2 检验表明1、2型和混合型(1b+2a)之间传播途径没有差别($\chi^2=0.4375$, $\gamma=2$, $0.75 < P < 0.9$),都是以血液传播途径为主,即82.9%的病人有输入血液及血液制品(血浆、白蛋白、丙种球蛋白)的历史。3a亚型及未定型病例数少,传播途径有否差别有待于深入研究。

表1 HCV基因型与感染途径的关系

Genotypes	n	routes of infection	
		blood transfusion	others
1a	8	6(75.0)	2(25.0)
1b	52	43(82.7)	9(17.3)
2a	25	20(80.0)	5(20.0)
2b	2	2(100.0)	0(0.0)
3a	3	2(66.7)	1(33.3)
1b+2a	10	9(90.0)	1(10.0)
unidentified	5	5(100.0)	0(0.0)
total	105	87(82.9)	18(17.1)

2.2.2 基因型与病情关系 见表2。丙型肝炎诊断标准按1995年5月北京第5次全国传染病寄生虫病学术会议诊断标准^[1]。3a亚型和未定型病例数少,以1、2型和混合型中各病情所占比例数为依据进行“行×列表 χ^2 检验”和“ χ^2 分割检验”探讨各基因型间病情构成比是否存在差别。 χ^2 检验表明各基因型间病情构成存在差别($\chi^2=18.43$, $\gamma=8$, $0.01 < P < 0.025$)。分割法表明,1型和混合型(1b+2a)之间病情构成不存在差别($\chi^2=3.09$, $\gamma=4$, $P > 0.5$),1型、混合型(1b+2a)和2型之间病情构成存在显著差别($\chi^2=14.99$, $\gamma=4$, $P < 0.005$)。结合本资料分析表明:1型和混合型(1b+2a)感染所致疾病严重程度相同;1型及混合型(1b+2a)感染较2型所致疾病严重。

2.2.3 基因型与干扰素疗效关系 干扰素治疗丙型肝炎疗效观察指标文献报道不尽相同。由于丙型肝炎肝脏损害程度与病毒复制水平密切相关,且随着病变向晚期发展,病毒复制并不减低,甚至更活跃,因此我们选择疗程结束后HCV RNA是否清除为疗效观察指标。41例经干扰素治疗的丙型肝炎患者,HCV各基因型RNA清除率见表3。由于样本例数较少,无法作 χ^2 检验,但根据有关文献报道结合本资料数据以及临床观察,提示2型HCV感染者干扰素治疗效果优于1型及混合感染者。

表2 HCV 基因型与病情关系

Table 2 Relationships between HCV genotypes and severity of liver disease n (%)

Liver disease	n	HCV genotype							
		1a	1b	2a	2b	3a	1b+2a	unidentified	
AH	25	0	15(28.8)	8(32.0)	0	0	1(10.0)	1	
	mild	20	1	5(9.6)	9(36.0)	1	1	1(10.0)	2
CH	24	2	12(23.1)	5(20.0)	1	2	1(10.0)	1	
	severe	22	5	10(19.2)	2(8.0)	0	0	4(40.0)	1
LC	14	0	10(19.2)	1(4.0)	0	0	3(30.0)	0	
Total	105	8	52	25	2	3	10	5	

Note: AH; Acute Hepatitis; CH; Chronic Hepatitis; LC; Liver Cirrhosis

表3 HCV 基因型与干扰素疗效关系

Table 3 Relationships between HCV genotypes and response to interferon therapy n (%)

HCV genotypes	HCV RNA		total
	undetectable	detectable	
1	13(52.0)	12(48.0)	25
2	11(84.6)	2(15.4)	13
1b+2a	1(33.3)	2(66.7)	3
total	25(61.0)	16(39.0)	41

3 讨论

HCV 基因型具有显著的异质性,存在不同的基因型及亚型。根据 Simmonds 命名系统,可将现有 HCV 分离株分为 6 个基因型及至少 36 个亚型。不同基因型的 HCV 株有明显的生物学差异,包括地域分布,致病强弱,病情演变,干扰素疗效以及与肝癌的关系等^[4]。因此 HCV 基因分型的研究受到很大重视。

本研究所得的广州地区 HCV 基因型分布同国内其它地区一些学者所报道的结果相似,即主要基因型为 1b,约占 40%~60%;2a 次之,约占 20%~30%;混合型感染约占 8%~20%;1a、2b 与 3a 的比例多低于 10%。认为我国 HCV 基因型不存在先前所认为的地理上的南北差别,分析原因如下:

1. HCV 感染以血液传播途径为主(82.9%)。血液制品如血浆、丙种球蛋白、白蛋白为多个献血员血液成分的混合制品,由多个生物制品研究所,广泛采集原料,制备后发售全国使用,不存在地区差异。

2. 职业献血人群为血液的主要提供者,公民无偿献血比率低。

3. 国内人口流动的加快以及贫困地区的人口流向各地城市,作为职业献血员的比例高,比如,广州地区职业献血员就可能来自全国各地的流动人口为主,而非本地居民。

HCV 不同基因型的传播途径没有明显区别,我国丙型肝炎患者主要通过血液及血液制品感染 HCV。因此,大力推广公民义务献血及严格筛查血液制品是降低丙型肝炎发病率的主要途径。

不同 HCV 基因型感染所致疾病的严重程度不同,1 型及混合型较重,2 型较轻。由于 HCV 存在直接致病作用,考虑不同基因型复制能力及血清浓度水平应有所差别,但文献报道结论不一,值得进一步探讨。

不同 HCV 基因型感染对干扰素治疗的反应不同。由于本研究收入样本例数较少,无法进行统计学处理。以现有资料及临床观察看,2 型疗效要优于 1 型及混合型,与有关文献报道的结果相似。因此,检测病人感染 HCV 的基因型对于预测干扰素疗效具有一定意义,可作为选择治疗的依据。但在临床实践中,由于 HCV 感染转为慢性过程的比例高、与肝癌的关系密切以及具有直接致病作用等原因,所有符合干扰素治疗条件,经济条件又许可者,均可试用干扰素抗病毒治疗。

参 考 文 献

- 1 病毒性肝炎防治方案(试行). 1995 年北京第 5 次传染病寄生虫病学术会议讨论修订. 中华传染病杂志, 1995, 13(4): 241
- 2 Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, *et al*. Typing hep-

atitis C virus by polymerase chain reaction with typing-specific primers: application to clinical surveys and tracing infection sources. *J Gen Virol*, 1992, 73(3): 673

- Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, *et al*. Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol*, 1993, 74(11): 2385

- Simmonds P, Holmes EC, Cha T A, *et al*. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol*, 1993, 74(11): 2391

(1997 - 11 - 07 收稿 1998 - 11 - 05 修回)

(上接第 55 页)

特异的反义寡核苷酸处理后 K562 细胞的增殖及其活性情况,发现 AS-b3a2 处理后 24 h 内对 K562 的细胞增殖并无影响,而细胞的存活率从 8 h 开始即有明显下降,提示这种作用主要对细胞的生存有明显抑制作用,即处理后细胞的存活期明显缩短。我们还从 DNA 水平观察到无血清培养下,序列特异的寡核苷酸处理后 8 h 即出现细胞的凋亡,在 48 h 达高峰,而未处理组的 K562 细胞在 24 h 后才有少量细胞凋亡。通过电镜及流式细胞仪检测,我们观察到这种细胞凋亡的改变^[9],从而提示反义 BCR/ABL 寡核苷酸确有诱导细胞凋亡的作用,即 BCR/ABL 致 CML 作用可能在于抑制髓系细胞的凋亡,而反义 BCR/ABL 寡核苷酸抑制 Ph⁺克隆的机制在于它诱导髓系细胞凋亡。支持 1994 年 Bedi 等^[7]的报道,提示 BCR/ABL 基因与 BCL-2 基因一样,也是一种抗细胞凋亡基因。

从我们的结果可以看出,这种反义基因体外抑制细胞的作用有重要意义,用反义 BCR/ABL 体外净化 Ph⁺克隆细胞后实施自体骨髓移植将为许多无 HLA 配型及 Allo-BMT 机会的 CML 病人提供了一种更有意义的根治措施,而这种方法或可与高温、单克隆抗体或 INF 及其它化疗药物联合应用来净化骨髓中微量残留 Ph⁺白血病细胞,因而具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- Butturini A, Gale R P. Chronic myelogenous leukemia as a

model of cancer development. *Semin Oncol*, 1995, 22(4): 374

- 戴木水,洪文德. Molecular biological aspects of evolution of chronic myelogenous leukemia to blast crisis. *实验血液学杂志*, 1995, 3(1): 33
- McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, *et al*. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptosis cell death. *Blood*, 1994, 83(5): 1179
- 戴木水,洪文德,庞国元,等. 用 PCR 技术评价微量残留白血病细胞体外净化的效果. *中华血液学杂志*, 1995, 16(1): 23
- 戴木水,洪文德. 慢性粒细胞白血病的现代治疗及其分子生物学基础. *国外医学内科学分册*, 1996, 23(4): 156
- Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis N C, *et al*. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR/ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science*, 1991, 253(5019): 562
- Bedi A, Zehnbauser B A, Barber J P, *et al*. Inhibition of apoptosis by BCR/ABL in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1994, 83(8): 2038
- Smeters T F, Skorski T, Van de Locht L T, *et al*. Antisense BCR-ABL oligonucleotides induce apoptosis in the philadelphia chromosome-positive cell line BV173. *Leukemia*, 1994, 8(1): 129
- 戴木水,罗绍凯,戴丽君,等. 反义 bcr/abl 寡核苷酸诱导 K562 细胞凋亡的研究. *中华血液学杂志*, 1997, 18(5): 264

(1998 - 03 - 25 收稿 1998 - 08 - 25 修回)