

PBMC 中正链 HCV RNA 阳性率为 60.5% (43 例), 负链 HCV RNA 阳性率为 38.0% (28 例), 与正链同时存在。

表 1 71 例丙肝患者血清与 PBMC 中正链 HCV RNA 的检出 (n)

类别	n	阳性率
血清(+) PBMC(+)	38	53.5%
血清(+) PBMC(-)	14	19.7%
血清(-) PBMC(+)	5	7.0%
血清(-) PBMC(-)	14	19.8%

表 2 15 例干扰素治疗患者治疗前后 HCV RNA 变化情况

HCV RNA	治疗前阳性率	治疗后	
		阳性率	转阴率
血清中正链	100% (15/15)	26.7% (4/15)	73.3% (11/15)
PBMC 中正链	73.3% (11/15)	40.0% (6/15)	45.5% (5/11)
PBMC 中负链	46.7% (7/15)	13.3% (2/15)	71.4% (5/7)

3 讨论

本试验提示丙肝患者血清中可能仅有正链 HCV RNA 存在, 而在患者 PBMC 中既存在正链 HCV RNA 又存在负链 HCV RNA, 说明 HCV 能在 PBMC 中存在与复制, 而肝细胞并非 HCV 感染与复制的唯一场所。PBMC 是 HCV 在肝外复制的重要场所^[3]。另外正链 HCV RNA 在血清中阴性而在 PBMC 中为阳性, 则说明 HCV RNA 可能储存在 PBMC 中, 使病毒感染持续存在。HCV 在 PBMC 中的存在与复制, 可导致慢性丙型肝炎患者的免疫缺陷, 从而引起肝细

胞的损伤, 导致丙型肝炎的慢性化。

本试验结果证明干扰素对抑制病毒复制有一定的效果, 但并不能彻底清除病毒, IFN 可与病毒唑联合用于治疗感染 HCV 的慢肝患者^[4,5], 在用药期间, 有可能血清和 PBMC 中的 HCV RNA 消失, 但是部分患者可能对药物产生耐受性。大约 15% - 20% 的丙肝患者发展成肝硬化和肝细胞肝癌等晚期肝病^[3]。患者 PBMC 中负链 HCV RNA 的存在可能是影响 IFN 治疗效果的因素之一^[6]。

[参考文献]

- [1] 吴海滨, 李智伟, 李颖. 外周血单核细胞中的丙型肝炎病毒 RNA 正负链检测的临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(3): 220-221.
- [2] 刘芳华, 田庚善, 傅希贤. 精细胞及单个核细胞中丙型肝炎病毒 RNA 及其负链的检测[J]. 中华医学杂志, 1994, 74: 284-286.
- [3] Meier V, Milhm S, Braun Wietzke P, et al. HCV RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(2): 228-234.
- [4] Mchutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C [J]. N Engl J Med, 1998, 339: 1485-1492.
- [5] Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon α -2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α -2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus [J]. Lancet, 1998, 352: 1426-1432.
- [6] Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, et al. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(2): 291-294.

武汉地区散发性戊型肝炎流行病学及病毒基因型

陈 焰¹, 田德英¹, 夏宁邵²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科, 湖北 武汉 430030; 2. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

【摘要】 为了解武汉地区戊型肝炎病毒(HEV)流行病学特点及基因型。回顾性分析 2000 年至 2004 年同济医院就诊急性肝炎 916 例流行病学特点, 应用逆转录-套式聚合酶链反应法(RT-nested-PCR), 扩增 HEV 开放读码框架 2(ORF2)的部分序列 120 份, 用 Clustal X 和 Treeview 软件比较武汉地区 HEV 序列与 4 个 HEV 主要代表株序列。发现所扩增的 HEV, 核苷酸同源性为(82.61~98.55)%, 与 iv 型(缅甸株)、①型(墨西哥株)、②型(美国株)、③型(中国/台湾株)核苷酸同源性分别为(76.52~81.74)%, (70.43~73.04)%, (76.52~81.16)% 和(84.35~88.70)%。故认为武汉地区散发性戊型肝炎患者以 HEV ③型感染为主, 其发病率呈上升趋势, 发病年龄以 30~59 岁为主, 全年均可发病, 3~6 月为高峰季节。

收稿日期: 2004-12-15 修订日期: 2005-03-28

作者简介: 陈焰(1968-), 女, 湖北武昌人, 副主任医师, 在读博士, 研

究方向: 感染性疾病分子生物学研究。

【关键词】肝炎; 戊型; 基因型

【中图分类号】R512.6⁺5

【文献标识码】B

【文章编号】1001-5256(2006)01-0036-03

Epidemiology and the genotypes of HEV isolated from patients with hepatitis E in Wuhan CHEN Yan, TIAN De-ying. Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; XIA Ning-Shao, The Key Laboratory of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract: To investigate the epidemiology and the genotypes of hepatitis E virus existed in Wuhan. 363 serum samples were collected from patients with hepatitis E in Tongji Hospital of Wuhan. The partial genome of open reading frame 2 of 120 HEV was amplified using polymerase chain reaction, 25 of which were sequenced. Clustx and Treeview softwares were used for nucleotide sequences phylogenetic analysis of HEV among genotype iv, ㊶, ㊷, ㊸ and HEV of Wuhan. And enrolled the 916 cases clinically diagnosed as acute hepatitis E during the period of January 2000 to August 2004. The results showed 25 isolates shared the same genotype with nucleotides of 82.61-98.55%. They had 76.52-81.74%, 70.43-73.04%, 76.52-81.16%, and 84.35-88.70% homology at the nucleotide level with HEV genotypes 1-4, respectively. Phylogenetic analysis suggested that these 25 isolates maybe represent 3 different subtypes at least. HEV sequences isolated from patients of Wuhan belong to HEV genotype 4 with different subtypes. The infection rate of HEV is increasing now. Male patients are 3.3 times high than women patients in clinic investigation. Age from 30 to 59 and time from March to June are susceptible factors for patients to take hepatitis E.

Key words: hepatitis E; genotype

自1989年Reyes等^[1]成功地克隆出HEV基因序列,90年代初,已完成10余株全基因序列分析。根据型间核苷酸同源性75%左右^[2],分为不同基因型,到目前为止,国际上已发现和克隆出HEV8个基因型。我国为HEV流行区,曾有流行爆发。武汉地区未发生HEV大流行,但近年散发病例增多。本研究对武汉地区急性散发性戊型肝炎患者血清中分离的25株HEV部分核苷酸序列进行测定,并分析基因型及流行病学特点。

1 材料和方法

1.1 标本来源 2003年8月~2004年8月武汉同济医院门诊和住院急性戊型肝炎363例,诊断符合2000年西安会议修订的诊断标准^[3]。年龄16~81岁,平均52岁,男:女为3.3:1。随机选择抗-HEV IgM和IgG阳性病例120例,发病10天内取静脉血2ml,4000r/min分离血清标本,-70℃冰箱保存。

1.2 主要试剂和仪器 MMV反转录酶、二甲基焦硫酸酯(DEPC)、异硫氰酸胍、水饱和酚购自promega公司;SDS、dNTP、TaqDNA聚合酶、Riboundease Inhibitor、Hind ㊸ EcoRI、DNA Fragment Purification Kit、PMD 18-T Vector、小量质粒纯化试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;PTC-100TM Programmable Thermal Controller为美国MJ公司产品;YTDY-32W型多功能一体化核酸电泳分析系统为北京医科大学人民医院引航医学生物技术研究所产品。

1.3 HEV RNA提取 采用异硫氰酸胍一步法^[4]。

1.4 引物设计 根据已知1-4型HEV病毒序列,设计两对简并引物,目的片段为HEV ORF2部分序

列(nt 5972-6317), Ep1: 5'-GCTTCTAATTATGGCCAGTA-3', Ep2: 5'-TGTTGGTTGTCAATCCTG-3'; Ep3: 5'-GTTATGCITTCITTCATA(T)CATGG-3', Ep4: 5'-CCGACGAAATCAATTCTGT C-3',由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.5 病毒RNA的RT-PCR 在提取的病毒RNA中加入HEV特异引物及反转录酶MMV42℃反转录1h,95℃,5min。PCR循环为:94℃,5min;94℃,1min;52℃,45sec;72℃,45sec;共35个循环,72℃延伸7min。

1.6 重组质粒的构建与克隆基因DNA序列的测定 DNA片段纯化试剂盒纯化PCR产物,连入pMD18-T载体,转化于感受态大肠杆菌JM109,取多个菌落,经EcoRI和Hind ㊸酶切及PCR扩增鉴定阳性质粒。小量纯化重组质粒,送上海博亚生物技术有限公司测序,测序仪型号为ABI3700。

1.7 回顾性分析 复习2000年8月至2004年8月武汉同济医院感染科就诊急性肝炎4920人,其中抗-HEV IgG阳性916人,分析发病年龄、性别、季节及重叠感染率。

2 结果

2.1 流行病学分析 武汉地区戊型肝炎发病率有上升趋势,从2000年14.3%升至2004年33.4%,重叠感染率高,有双重、三重,甚至四重病毒感染,重叠感染率在35%-37%之间。

2.2 HEV RNA RT-nPCR检测结果 检测抗-HEV IgM和抗-HEV IgG阳性标本120例,扩增出HEV RNA ORF2(345bp)60例。

2.3 重组质粒 PCR 鉴定及酶切鉴定 重组质粒, 以 Ep3、Ep4 引物扩增, 得到 345bp 目的基因; 质粒小量提取后, 经 Hind Ⅲ和 EcoR1 酶切, 得到 2692bp 载体和 345bp HEV ORF2 目的基因。

2.4 克隆基因核苷酸序列及序列同源性分析 将 PCR 阳性产物进行纯化、克隆并进行序列分析, 结果显示 25 例 HEV RNA 阳性样品均为 HEV 的基因序列并均属于 Ⅴ型 暂分为 1、2 和 3 三个亚型。将各型和各亚型之间的核苷酸序列的同源性进行了比较, 结果显示在该地区 Ⅴ型与 iv、Ⅴ₁、Ⅴ₂型的同源性分别为 77%~82%, 70%~73%, 77%~81%; Ⅴ₁型与 Ⅴ₂、Ⅴ₃的同源性分别为 84%~88% 和 83%~85%。Ⅴ₁内部的同源性为 87%~89%, Ⅴ₂内部的同源性为 90%~92%, Ⅴ₃内部的同源性为 97%~98%。

2.5 基因进化树分析 应用 Clustal X 和 Mega 软件, 对所得序列进行基因进化树分析并作基因进化树图。将本研究获得的 HEV ORF2 部分核苷酸序列 (nt5972-nt6317) 分别与下列 HEV 代表株进行同源性比较 (GenBank 号): 缅甸株 (D10330), 墨西哥株 (M74506), 美国株 (AF060669), 中国 Ⅴ型 (AJ272108, AF151963, AF103940)^[11]。结果 25 例均与已报道的 HEV Ⅴ型株关系较近, 属于 HEV Ⅴ型, 从 HEV Ⅴ型株可见, 3 例序列 (10.2, 58.3, 13.1) 与 AJ272108, AF103940 关系较近, 暂定为 Ⅴ₁亚型, 15 例序列 (85-2.2, 55.3, 82-2.1, 88-2.3, 71.3, 31.2, 70.3, 73.1, 25.3, 72.3, 52.3, 81-2.2, 26.2, 49.1, 22.1) 与 AF15963 关系较近, 暂定为 Ⅴ₂亚型; 7 例序列 (67.4, 7.1, 4.1, 19.1, 61.3, 16.1, 64.4), 暂定为 Ⅴ₃亚型。其中 Ⅴ₁、Ⅴ₂近似 Ⅴ₁、Ⅴ₂亚型^[5]。

3 讨论

武汉地区自 2000 年 1 月至 2004 年 8 月, 抗-HEV IgG 阳性病例 916 份, 戊型肝炎发病率呈增高趋势, 尤其是 2003 年以后, 其发病率超过 20%, 年龄分布为 16~81 岁, 其中 10~29 岁 171 人; 30 岁~59 岁 554 人; 60 岁以上 191 人。可见本病患者年龄略大于青壮年, 可能与社会老龄化, 老年人免疫功能下降, 戊型肝炎反复感染^[6]有关。发病性别比文献报道各异, 如男女之比 3:1.3^[7], 1:1^[8]。本文男女之比为 3.3:1, 支持男性患者多于女性患者的结论。武汉地区戊型肝炎病例全年散发, 以 3~6 月为高峰季节, 发病例数占该年总数的 (40~45)%。戊型肝炎常与其他病毒性肝炎重叠感染, 如重叠甲肝、乙肝、丙肝、庚肝, 在观察病例中尚有少数四重感染者, 但重叠感染率近 5 年波动在 35%~37% 之间。

王佑春^[8]等统计中国 18 个城市 HEV 基因型分

布, 发现 11 个城市只发现 iv 型, 7 个城市有 Ⅴ型分布, 其中只有 4 个城市以 Ⅴ型为多数。从武汉地区 120 例 HEV RNA 阳性者中, 选择 25 例, 对其 ORF2 部分序列进行克隆、测序, 结果表明它们同属一个基因型, 与中国株 Ⅴ型核苷酸序列同源性 > 84.35%。与我国绝大多数戊型肝炎患者为典型中国株 HEV (iv 型) 感染^[9]结论不同, 武汉地区急性戊型肝炎以 Ⅴ型为主。结合我国周边地区常有戊肝爆发流行, 型别多样, 而中部地区未出现爆发流行, 其型别是否更能代表中国本土株型, 有待进一步研究。

在 HEV iv~Ⅴ型及武汉地区病毒株中比较 ORF2 部分核苷酸同源性、基因进化图, 表明 HEV ORF2 中短片段核苷酸可替代全基因组序列区分型别, 其同源性界限约在 82% 左右。武汉地区的 25 个 HEV-ORF2 序列间, 同源性在 82.61%~98.55% 之间不等。基因进化距离分析显示: 该区域基因型与 iv、Ⅴ₁、Ⅴ₂型之间进化距离分别为 0.21~0.27, 0.24~0.28, 0.22~0.28, 与 Ⅴ₃型进化距离在 0.00~0.17; Ⅴ₁亚型与 Ⅴ₂亚型、Ⅴ₃亚型的基因进化距离为 0.13~0.19 和 0.15~0.16。可以看出, 不同基因型之间基因进化距离型在 0.22 以上。武汉地区 HEV 型各株序列之间进化距离为 0.00~0.19, 推测可以基因进化距离 0.13 为界, 分不同亚型。

[参考文献]

- [1] Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis [J]. Science, 1990, 247: 1335-1339.
- [2] Youchun Wang, Roger Ling, James C. Erker, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis [J]. Journal of General Virology, 1999, 80: 169-177.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329.
- [4] Li F, Zhuang H, Kolivas S, et al. Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by western immunoblot using open reading frame 2 and 3 and glutathione S-transferase fusion proteins [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 2060-2066.
- [5] Haiyun Lan, Youchun Wang, Zhuo Li, et al. The distribution of HEV genotype Ⅴ among 300 cases of patients with sporadic acute hepatitis in Beijing [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2002, 22: 276-278.
- [6] Zhuang H. Hepatitis E in China [J]. J Gastroenterol Hepatol 2000, 15 (suppl): 72-73.
- [7] 董红军. 戊型肝炎研究进展. 中国公共卫生 [J]. 1993, 9(3): 124.
- [8] 王庆礼. 急性散发性病毒性肝炎病例中戊型肝炎流行病学分析 [J]. 中国公共卫生, 1997, 13: 141-142.
- [9] Li Kui, ZHUANG Hui, ZHUWanfu. Partial nucleotide sequencing of hepatitis E viruses detected in sera of patients with hepatitis E from 14 cities in China [J]. Chinese Medical Journal. 2002, 115: 1058-1063.