

广州戊型病毒性肝炎暴发株和散发株部分序列比较

张光文 李建国 封挺 王战会 姜荣龙 马世武 夏宁邵 侯金林

【摘要】 目的 了解广州某部新兵连戊型病毒性肝炎(戊型肝炎)暴发流行的分子病毒学特征,并与当地散发毒株比较,以查找病原可能来源。方法 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法,对抗HEV-IgM阳性的34例暴发性戊型肝炎及46例散发性戊型肝炎患者的血清和粪便标本进行HEV RNA检测,并对HEV RNA阳性标本的基因开放读码框(ORF)2部分片段进行克隆测序分析。结果 34例暴发流行病例标本中检测出12株病毒,46例散发病例标本中检测到2株。经克隆测序分析,各暴发毒株的核苷酸同源性为95.3%~100%;氨基酸同源性为94.0%~100%。且暴发毒株和散发毒株的核苷酸及氨基酸的同源性也较高,分别为95.3%~99.3%和94.0%~100%;暴发毒株和散发毒株与各型中的标准株相比,与Jap1株同源性最高,其核苷酸同源性为92.0%~95.3%,氨基酸同源性为96.0%~100.0%。进化树分析提示本次戊型肝炎暴发流行病毒株与戊型肝炎病毒基因型距离最近。结论 本次戊型肝炎暴发流行的病原可能来自于广州本地;广州地区戊型肝炎流行毒株属戊型肝炎基因型。

【关键词】 肝炎,戊型; 流行病学; 碱基序列; 基因型; 肝炎病毒,戊型

Partial nucleotide acid sequence analysis of hepatitis E virus isolated from epidemic outbreak and sporadic patients with hepatitis E in Guangzhou ZHANG Guang-wen, LI Jian-guo, FENG Ting, et al. Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital of the Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: HOU Jin-lin, Email: jlhou@fimmu.com

【Abstract】 Objective To investigate the genotype and gene mutation of hepatitis E virus isolated from the serum and stool samples of the patients with epidemic outbreak hepatitis E in certain recruit barracks of Guangzhou. **Methods** The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to amplify the partial ORF2 nucleotide acid sequences of hepatitis E virus isolated from 34 and 46 inpatients with epidemic outbreak and sporadic hepatitis E respectively. The PCR products of the positive samples were cloned and sequenced. **Results** The 14 strains, including 12 epidemic strains and 2 sporadic strains, were isolated from the total 80 inpatients. The homology of nucleotide acid and amino acid sequences of 12 epidemic outbreak strains is 95.3%~100% and 94.0%~100%. The homology between epidemic outbreak strains and sporadic strains is 95.3%~99.3% and 94.0%~100%. Compared with the standard different genotypes of HEV, these strains have the highest homology to the Jap1 strain which belongs to genotype , with homology of 96.0%~100%, respectively. Phylogenetic analysis indicated that these the nucleotide acid sequence homology of 92.0%~95.3% and amino acid sequence stains and Jap1 strain share the same cluster. **Conclusion** Epidemic outbreak strains isolated from the patients in recruit barracks of Guangzhou belong to the genotype of HEV and the nucleotide acid sequences had partial mutation.

【Key words】 Hepatitis E; Epidemiology; Base sequence; Genotype; Hepatitis E virus

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学附属南方医院感染内科(张光文、王战会、姜荣龙、马世武、侯金林); 解放军第一五七医院(李建国、封挺); 厦门大学(夏宁邵)

通信作者: 侯金林, Email: jlhou@fimmu.com

2004 年春季广州某部新兵连出现戊型肝炎的小规模暴发流行, 为了解本次发病的病原学特点, 我们采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法扩增病毒基因组第二开放读码框 (ORF) 的部分基因, 并进行克隆测序。对测序结果进行序列同源性比较和基因进化树分析, 并与散发病例进行对比。

材料与方法

一、材料

(一) 标本来源 暴发性戊型肝炎患者的血清和粪便标本来自广州某部新兵连的 34 名男战士, 年龄 18~23 岁, 平均 21 岁。均于 2004 年 3 月至 5 月在广州某中心医院住院治疗。散发患者的标本为我科 -20℃ 保存的 2002 年至 2004 年的住院戊型病毒性肝炎患者的血清, 共 46 例, 以上血清均经戊型肝炎酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂检测证实为抗 HEV-IgM 阳性 (试剂盒为北京万泰公司产品), 其临床诊断符合 2000 年全国病毒性肝炎会议诊断标准^[1], 同时经血清学检查排除甲型、乙型、丙型、丁型病毒性肝炎。

(二) 主要试剂 TRIzol 试剂及逆转录酶购自英韦创津生物公司; Taq 酶为 Promega 公司产品, 连接酶为 TaKaRa 公司产品; 引物由厦门大学的夏宁邵教授惠赠。

二、方法

(一) 总 RNA 提取 采用美国 Invitrogen 公司的 TRIzol Reagent 试剂, 参照说明进行。取约 250 μl 的血清或者 250 μl 的粪便悬液加入 TRIzol 至 1 ml 混匀, 室温静置 10 min。加入 200 μl 氯仿混匀, 室温静置 5 min, 4℃ 12 000 g, 离心 15 min。移上层水相到异丙醇中, 放 4℃ 沉淀 10 min。4℃ 12 000 g, 离心 10 min, 弃去上清液。加入 800 μl 的 70% 乙醇, 滚动洗涤。4℃ 12 000 g, 离心 5 min。弃上清液, 经真空抽干备用。

(二) cDNA 合成 逆转录体系含水 14 μl, RNA 酶抑制剂 1U, 引物 E5: 5'-CTACAGGAAACCGARAGW (R = A 或 G, W = A 或 C) 18 pmol, 置 65~70℃ 水中 5 min。迅速转移到冰水中, 放置 5 min。每管加入 5× 缓冲液 4 μl, 5× 三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTP) 1 μl, RNA 酶抑制剂 0.1 μl 及逆转录酶 0.2 μl。混匀放置 42℃ 40~60 min。

(三) PCR 扩增 取 2 μl 合成的 cDNA 及引物 E1: 5'-CTGTTTAAAYCTTGCTGACAG-3' 和引物 E5 进行第一轮 PCR 扩增。总反应体积为 20 μl, 其中 10× Buffer 2 μl, 10× dNTP 2 μl, 引物 E1 和 E5 各 0.2 μl, Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, 双蒸水 14.6 μl。反应条件为: 94℃ 预变性 1 min, 后 94℃ 15 s, 55℃ 15 s, 72℃ 40 s; 共 35 个循环。取第一轮 PCR 产物 2 μl, 分别用引物 E2: 5'-GACAGAATTGATTTTCGTCG-3' 及引物 E4: 5'-GTCCTAATACTRTTGTTGT-3' (R = A 或 G)-3' 进行第二轮 PCR 扩增, 反应条件同前。

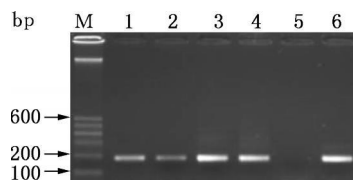
(四) PCR 产物的克隆和序列分析 克隆按文献 [2] 进行, 序列分析由全自动测序仪完成。

(五) 同源性比较 采用 DNASIS (v2.5) 分析软件进行; 序列进化树分析采用 clustalx (1.8) 软件进行分析。

结果

一、HEV RNA RT-PCR 检测结果

见图 1, 用 RT-PCR 法检测了发病 1 至 2 周内留取的 34 例暴发性戊型肝炎患者的血清与粪便标本, 其中血清 HEV RNA 阳性 5 例, 粪便 9 例, 2 例同时在血清与粪标本中检测到病毒; 46 例散发患者血清标本留取在发病后的 2 至 4 周, 仅检测了其血清标本, 共测得 HEV RNA 阳性标本 2 例。扩增片段为 HEV 的 ORF2 区的部分片段 (nt 6513~6525), 大小为 189 bp。阳性对照标本为厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室进行戊型肝炎研究时所留取的猕猴阳性粪便标本。



M. DNA 分子量; 1-3: 暴发株; 4: 散发株; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照

图 1 暴发及散发戊型病毒性肝炎患者 HEV RNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

二、暴发及散发性病毒株与各标准病毒株之间核苷酸、氨基酸序列同源性比较

对血清和粪便检测 HEV RNA 阳性的 12 株暴发性病毒株 (HE1、HE8、HE11、HE12、HE14、HE15、HE16、HE18、HE20、HE30、

HE33、HE46) 和 2 例血清检测阳性的散发病毒株 (HE1s、HE21s) 的 PCR 产物分别进行了克隆、测序。其基因测序结果与各型 HEV 标准株的核苷酸及氨基酸序列同源性进行了比较, 见表 1。所使用的 HEV 标准株引自基因库, 其录入号分别为型的缅甸株 (Bur1 M 73218)、(Bur2 D10330)、中国新疆株 (Chi-xinjianG D11092)、印度株 (Ind1 x98292)、巴基斯坦株 (Pas1 M 80581); 基因型的墨西哥株 (Mex-o M 74506); 基因型的美国株 (US1 AF060668); 基因型的日本株 (Jap1 AB074915)、中国变异株 (Chi4 AJ272180)。

三、暴发病毒株和散发毒株各株之间核苷酸及氨基酸序列同源性比较

本次暴发流行各毒株之间核苷酸同源性极高, 在 95.3% ~ 100%, 氨基酸同源性在 94.0% ~ 100%。两株散发毒株之间核苷酸同源性为 96%; 氨基酸同源性为 98%。暴发毒株与散发毒株之间核苷酸同源性在 95.3% ~ 99.3%; 氨基酸同源性

在 94.0% ~ 100%。

四、进化树分析结果

将测得的暴发、散发戊型肝炎病毒株序列与基因库中的标准序列作进化树分析见图 2, 可以看出本次暴发性戊型肝炎患者及散发患者感染的 HEV 均为基因型 型, 但本次测到的病毒株与我国以前报道的基因型 (Chi4) 进化距离较远, 而与型中的日本株 (Jap1) 进化距离较近。

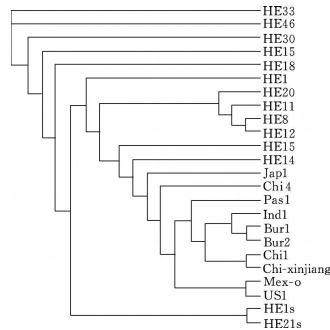


图 2 12 株暴发毒株、2 株散发毒株及各标准株 ORF2 部分序列进化树分析结果

表 1 测得的各种病毒株与各标准株之间核苷酸、氨基酸序列同源性比较 (%)

病毒株	Bur1	Bur2	Chi1	Chi4	Chi-xinjiang	Ind1	Jap1	Mex-o	Pas1	US1
HE1	83.2	82.6	85.9	85.9	85.9	84.6	94.0	84.6	86.6	78.0
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE8	83.9	83.2	87.2	87.2	87.2	83.9	95.3	83.2	87.2	78.7
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE11	83.9	83.2	87.2	87.2	87.2	83.9	95.3	83.2	87.2	78.7
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE12	83.2	82.6	86.6	86.6	86.6	83.2	94.7	82.6	86.6	78.0
	98.0	96.0	98.0	94.0	98.0	98.0	98.0	94.0	98.0	94.0
HE14	82.7	82.0	85.3	88.0	85.3	84.0	93.3	82.7	86.0	77.9
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE15	83.9	83.2	86.6	85.2	86.6	85.2	93.3	84.6	85.9	77.3
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE16	83.2	82.6	85.9	84.6	85.9	84.6	92.7	83.9	85.2	76.7
	98.0	96.0	98.0	94.0	98.0	98.0	98.0	94.0	98.0	94.0
HE18	82.6	81.9	85.2	83.9	85.2	83.9	92.0	83.2	84.6	76.0
	96.0	94.0	96.0	92.0	96.0	96.0	96.0	92.0	96.0	92.0
HE20	83.9	83.2	87.2	87.2	87.2	83.9	95.3	83.2	87.2	78.7
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE30	83.9	83.2	86.6	85.2	86.6	85.2	93.3	84.6	85.9	77.3
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE33	83.9	83.2	86.6	85.2	86.6	85.2	93.3	84.6	85.9	77.3
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE46	83.9	83.2	86.6	85.2	86.6	85.2	93.3	84.6	85.9	77.3
	100.0	98.0	100.0	96.0	100.0	100.0	100.0	96.0	100.0	96.0
HE1s	81.9	81.2	84.6	86.6	84.6	83.2	93.3	83.2	85.2	76.7
	96.0	94.0	98.0	94.0	98.0	98.0	98.0	94.0	98.0	94.0
HE21s	83.9	83.2	86.6	83.9	86.6	85.2	92.0	84.6	85.9	77.3
	98.0	96.0	98.0	94.0	98.0	98.0	98.0	94.0	98.0	94.0

讨 论

戊型肝炎主要流行于发展中国家,但近来在发达国家也逐渐有散发的报道^[3, 4]。根据 HEV 毒株核苷酸序列同源程度,可将 HEV 分为 4 个主要的基因型(~)^[5]。以往,我国散发或流行的毒株主要为基因 型,而美国主要为 型,日本流行的基因型主要为基因 、 型,但近年我国不断有基因 型的报道^[6]。研究发现 HEV 在核苷酸和氨基酸水平上高度同源性的基础上,具有一定的遗传异质性,且 HEV 流行株和散发株的核苷酸序列也存在若干差异^[7]。

在我们的调查中发现,暴发流行初期住院的 34 例戊型肝炎患者中血清阳性者 5 例(14.4%),而同一时间点的粪便标本阳性者 9 例(26.8%);46 例散发病例血清中仅 2 例阳性(4.3%)。这一结果进一步说明戊型肝炎患者病毒血症持续时间可能短于粪便的病毒排放时间。散发病例血清检测 HEV RNA 阳性率较低,可能与暴发患者相比采集标本较晚或血清保存较久有关。

对 HEV RNA 阳性标本的 PCR 产物进行克隆、测序分析与 4 个基因型中各标准株核苷酸及氨基酸同源性比较,可以看出:尽管各株与 Bur1、Bur2、Chi1、Chi4、Chi+xinjiang、Mex-0 等株在核苷酸、氨基酸同源性高达 81.9%~86.6%和 92.0%~100%,但与 Jap1 株之间同源性更高,所有暴发性毒株和散发性毒株均与 Jap1 株同源性较高,分别达到 92.0%~95.3%和 96%~100.0%。而与我国以往报道的 Chi4 核苷酸同源性相对略低(83.9%~88.0%),这些结果均提示本次暴发性毒株、广州地区散发性毒株与 Jap1 毒株有更近的亲缘关系。进化树分析也进一步证明本次测得的这些病毒株与 Jap1 株距离更近,同属于 HEV 基因型 型。这与魏绍静等^[8]报道结果明显不同,提示广州地区近年感染 HEV 基因型可能有所变迁。

调查结果也提示各暴发性戊型肝炎病毒株之间,核苷酸及氨基酸同源性极高,分别达到 95.3%~100%和 94.0%~100%,充分说明本次测得的各暴发性毒株来源于同一病毒株。此外暴发性毒株与散发性毒株之间核苷酸同源性也在 95.3%~99.3%之间,氨基酸同源性在 94.0%~100%之间,进一步提示本次暴发性戊型肝炎的病原体可能来自于本地。经调查本次新兵患者发病时间发生在入伍集训后 3 个月,远远超出了戊型肝炎的潜伏期,因此本次戊型肝炎暴发流行由新兵从外地带入广州地区的可能性较小。

参 考 文 献

- 1 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志, 2001, 19: 56-62.
- 2 Hou J, Wang Z, Cheng J, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen-negative Chinese carriers. *Hepatology*, 2001, 34: 1027-1034.
- 3 Yamamoto T, Suzuki H, Toyota T, et al. Three male patients with sporadic acute hepatitis E in Sendai, Japan, who were domestically infected with hepatitis E virus of genotype or . *J Gastroenterol*, 2004, 39: 292-298.
- 4 Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, et al. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1687-1693.
- 5 Worm HC, van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect*, 2002, 4: 657-666.
- 6 Wang Y, Zhang H, Ling R, et al. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1675-1686.
- 7 Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*, 2001, 65: 282-292.
- 8 魏绍静, Peter Walsh, 唐漾波, 等. 广州地区散发性戊型肝炎病毒基因片段序列分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1998, 18: 92-95.

(收稿日期: 2005-04-16)

(本文编辑 李欣)