

武汉地区戊型肝炎病毒基因型及 ORF3 基因序列准种特点

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, 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, 厦门 361005

摘要 目的 研究武汉地区戊型肝炎病毒(HEV)基因型及 HEV 开放读码框架 3(ORF3)基因序列的准种特点。方法 应用逆转录-巢式聚合酶链反应法(RT-nested PCR)扩增 HEV 开放读码框架 2(ORF2)的部分序列,选取其中 25 份进行测序,用 Clustal X 和 Mega 软件比较武汉地区 HEV 序列与 4 个 HEV 主要代表株序列;并扩增其中 2 份 HEV 开放读码框架 3(ORF3)的全部序列,克隆入 pMD18-T Vector,其中 1 例挑选 30 个克隆进行 DNA 测序。结果 25 例 HEV-ORF2 核苷酸同源性为 82.61%~98.55%,与 型(缅甸株)、型(墨西哥株)、型(美国株)、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%。来源于同一患者 ORF3 区全基因组不同克隆之间的碱基序列同源性为 97.97%~99.71%,与 型(中国/台湾株)核苷酸同源性为 89.86%~99.71%。ORF3 区可检出点突变、缺失突变、短序列的插入突变。结论 武汉地区散发性戊型肝炎患者以 HEV 型感染为主。多克隆测序结果提示患者体内 HEV 呈现准种群共存,HEV-ORF3 C 末端第 2 个富含脯氨酸区多有点突变,点突变不影响脯氨酸表达,这些变异的临床意义值得进一步研究。

关键词 肝炎病毒,戊型; 基因型; 准种

中图分类号 R512.6

Genotyping and Heterogeneity of Sporadic Acute Hepatitis E in Wuhan

Chen Yan¹, Tian Deying^{1△}, Xia Ningshao²

¹Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

²The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract Objective To study the genotypes and quasispecies groups of hepatitis E virus ORF3 in the patients with hepatitis E infection in Wuhan. **Methods** The conserved genomic sequences of open reading frame 2 (345 bp) and the whole ORF3 region in the HEV were detected using RT-nested polymerase chain reaction. **Results** Twenty-five isolates shared the same genotype and the similarity of nucleotides was 82.61%–98.55%. Compared with other genotypes in HEV, there were the homologies of 76.52%–81.74%, 70.43%–73.04%, 76.52%–81.16% and 84.35%–88.70% at the nucleotide sequences in the HEV genotypes —, respectively. The homology among the clones from one patient of ORF3 region was 97.97%–99.71%, while there was 89.86%–99.71% at the nucleotide sequences compared with HEV genotype . The substitution, deletion and insertion of short sequence were found in 3 open reading frames. **Conclusion** HEV sequences isolated from patients of Wuhan belong to HEV genotype . There were HEV quasispecies groups in one patient with HEV infection. The substitution in two G-terminal proline-rich regions of HEV-ORF3 could not influence the translation of the proline and the substitutions in amino-acid sequence of viral protein are worthy of further study.

Key words hepatitis E virus; genotype; quasispecies

戊型肝炎在我国及许多发展中国家是一种危害严重的急性传染性疾病,其临床表现与甲型肝炎类似,病死率较高,在孕妇中病死率可高达 20%^[1]。尽管戊型肝炎病毒(HEV)只有一个血清型,但来源不同时间和地区的分离株具有较大的异质性。有实

验证明 HEV 流行时,同一患者体内病毒存在准种^[2]。准种是在宿主免疫选择性压力下动态变化的病毒群体,变异的核苷酸占病毒核苷酸总长度 5% 以下,是病毒在宿主体内逃脱免疫攻击得以生存的重要策略之一,准种反映病毒的变异水平。

为调查武汉地区急性散发性戊型肝炎基因型及基因异质性,本研究对急性散发性戊型肝炎患者血

陈 焰,女,1968 年生,副主任医师

△ 通讯作者,Corresponding author

清中分离的25株HEV部分核苷酸序列进行测定,并对其中1例患者全部ORF3序列30个克隆进行分析。

1 材料和方法

1.1 标本来源

随机选择2003年8月~2004年8月武汉同济医院门诊和住院患者中血清抗HEV IgM和抗HEV IgG同时阳性者120例,诊断符合病毒性肝炎防治方案^[3]。年龄16~81岁,平均52岁,男:女为3.3:1。发病10 d内留取静脉血2 ml,4 000 r/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、二乙基焦硫酸酯(DEPC)、异硫氰酸胍、水饱和酚购自Promega公司;SDS、dNTP、TaqDNA聚合酶、核酸酶抑制剂(riboinhibitor)、Hind、EcoR、脱氧核糖核酸纯化试剂盒(DNA Fragment Purification Kit)、pMD18-T Vector、小量质粒纯化试剂盒购自大连宝生物工程技术有限公司。

1.3 引物设计

根据已知~型HEV病毒序列,设计2对简并引物,目的片段为HEV ORF2部分序列(nt 5972~6317),Ep1:5'-GCTTCTAATTATGCCAGTA-3',Ep2:5'-TGTTGGTTGTCATAATGCTG-3';Ep3:5'-GTTATGCTTTGCTTTGCATA(T)CATGG-3',Ep4:5'-CCGACGAAATCAAT-TCTGTG-3'。HEV ORF3开放读码框区上游引物为:5'-AAGCCTGTCCTTGA CCTTAG-3',下游引物为:5'-CAAATTGTACTGGCGGCGTA-3',目的片段长度为493 bp。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 目的片段扩增

采用异硫氰酸胍一步法提取HEV RNA。在提取的HEV RNA中加入HEV特异引物及反转录酶MMV,42℃反转录1 h,95℃5 min。ORF2 PCR循环为:94℃5 min,94℃1 min,52℃45 s,72℃45 s,共35个循环,72℃延伸7 min。ORF3 PCR循环为:94℃5 min;94℃30 s,58℃45 s,72℃50 s,共30个循环,72℃延伸7 min。

1.5 ORF2克隆的DNA序列的测定

DNA片段纯化试剂盒纯化PCR产物,连入pMD18-T Vector,转化于感受态大肠埃希菌JM109,挑取多个菌落,经EcoR和Hind酶切及PCR扩增鉴定阳性克隆,送上海博亚生物技术有限

公司,用ABI 3730测序仪测序。

1.6 ORF3目的片段的克隆与DNA序列的测定

ORF3 PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳,切胶回收PCR产物,与pMD18-T Vector连接。转化大肠埃希菌JM109,氨苄青霉素和Xgal蓝白筛选阳性克隆。分别挑选30个克隆进行序列测定。

2 结果

2.1 HEV RNA RT-nested-PCR检测结果

HEV ORF2片段的扩增长度为345 bp,HEV ORF3片段的扩增长度为493 bp。

2.2 克隆鉴定

ORF2重组质粒和ORF3重组质粒,分别以Ep3、Ep4引物扩增,得到345 bp目的基因,以HEV3.1、HEV3.3引物扩增,得到493 bp目的基因。重组质粒纯化后,经Hind和EcoR酶切,分别得到2 692 bp载体和345 bp HEV ORF2目的基因,2 692 bp载体和493 bp HEV ORF3目的基因。

2.3 克隆基因核苷酸序列比较

将所测得的序列进行比较,结果显示25例HEV RNA阳性样品均为HEV的基因序列,25个克隆ORF2核苷酸同源率为82.61%~98.55%。与型、型、型、型的同源性分别为76.52%~81.74%,70.43%~73.04%,76.52%~81.16%,84.35%~88.70%,25例均属于基因型。来源于同一患者ORF2和全基因组ORF3的DNA序列,与基因型相比,氨基酸同源性分别为86.35%~88.70%和89.86%~99.71%,ORF3不同克隆氨基酸同源性为97.97%~99.71%,应用Mega软件比较各克隆的测序结果,并进行遗传树分析,结果提示来自同一患者的HEV序列多被归纳到同一分支中。

点突变是HEV DNA序列变异的主要突变类型之一。与HEV基因型(AJ272108)相比,ORF3区测序的30个克隆中,均有不同程度的点突变,第1、2、3位核苷酸都有发生突变的现象,以末位核苷酸突变率最高,每个克隆核苷酸序列存在2处缺失突变,2株颠倒缺失突变,共缺失3 bp,其中颠倒5 bp核苷酸,缺失、颠倒发生在相同位置,且不影响读码顺序。

2.4 氨基酸序列

ORF3区的30个克隆中,在第26~51位氨基酸间,即N末端第2个疏水区,有7个相同氨基酸变异,在第80~93位氨基酸间,有5个相同氨基酸变异,成为2个高变异区。在C末端第2个富含脯氨酸区,第64~75位氨基酸间,散在氨基酸变异,但

未影响脯氨酸表达。根据 ORF3 核苷酸序列可分为 11 个准种, 见图 1。测序结果已提交 NIH GenBank,

可按下列序列号查询: DQ022751 至 DQ 022754, DQ068209 至 DQ068214。

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|------------|---|---------------------|-------------|-------------------------|-----|----------|
| | * | * | * | * | * | * |
| AJ272108-p | MEMPPCALGLFCFCSSCFCLCCPRHRPVSRLAVAAGKRGAA--AVVSGVTGLILSPSPSPI | | | | | |
| 94-1-p | . A . S | | | VV . GAA . VP | | PS . . . |
| 94-3-p | . A | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-4-p | . A . . R | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-5-p | . A . S | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-8-p | . A | | G | VV . GAA . VP | | |
| 94-10-p | . A | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-14-p | . A | | | VV . GAT . VP | | |
| 94-19-p | . A | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-23-p | . A | | | VV . GAA . VP | | |
| 94-24-p | . A | Y | | VV . GAT . VP | | |
| 94-30-p | . A | | | VV . GAA . VP | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | |
| | * | * | * | * | * | |
| AJ272108-p | FIQPTPSHLTFQPPGLELALGSQSVHSAPLGVTSAPPLPPVVDLPQLGLRR | | | | | |
| 94-1-p | M | DN . A . V | N | | | |
| 94-3-p | E | DN . A . V | N | | | |
| 94-4-p | | DN . A . V | N | | | |
| 94-5-p | M | DN . A . V | N | | | |
| 94-8-p | | DN . A . V | N | | | |
| 94-10-p | | DN . A . V | N | | | |
| 94-14-p | | DN . A . V | N | | | |
| 94-19-p | Y | DN . A . V | N | | | |
| 94-23-p | Y | DN . A . V | N | A | | |
| 94-24-p | | DN . A . V | N | | | |
| 94-30-p | | DN . PA . V | N | | | |

图 1 HEV-ORF3 氨基酸变异比较

3 讨论

我国学者王佑春等^[4]统计中国 18 个城市 HEV 基因型分布, 发现中国存在 HEV 型和 型, 部分城市这两种基因型共存。从武汉地区 120 例血清抗 HEV IgM 和抗 HEV IgG 同时阳性者中, 挑选 25 例 HEV RNA 阳性病毒, 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 型核苷酸序列同源性 84.35%~ 88.70%, 25 个克隆 ORF2 核苷酸同源性为 82.61%~ 98.55%, 可

能分 3 个亚型。提示武汉地区散发性戊型肝炎以 型为主, 未发现 HEV 基因亚型与患者年龄、性别及病情严重程度有关。

HEV 流行主要是通过粪-口途径, 因此认为是一次流行, 起源于同一病毒株。分析印度 HEV 流行中病毒分离株序列, 支持以上推论^[5]。然而, 采用限制性长度多态性(RFLP)分析法发现流行病例中, 个体间及个体内病毒存在细小差异^[2]。HEV 感染时, 病变的发生和进展主要取决于宿主的免疫应答, 但免疫应答不仅由宿主的遗传素质决定, 也由病

毒的异质性所决定。我们对武汉地区散发性戊型肝炎,同一个体30个HEV ORF3克隆核苷酸序列测序分析,其总核苷酸同源率为97.97%~99.71%,高度同源又有差异,核苷酸变异可分11种类型,以94-10株类型占主要类型,30个克隆中有9个该类型(30.0%);94-3,94-4,94-5株类型各有4例,各占13.3%;94-1株类型有3例,占10.0%;其余6种类型各1例,各占3.3%。病毒变异可以不同程度地逃避宿主的免疫攻击,导致病毒长期在宿主体内存活。据报道慢性乙型肝炎患者体内病毒呈高度准种分布,是病情迁延不愈和慢性化的标志之一。HEV变异的临床意义有待进一步研究。

对HEV变异的研究中,从未有关于HEV-ORF3变异的报告,我们选择ORF3为HEV准种研究的靶区域,是因为HEV-ORF3功能不明,患者血清针对ORF3蛋白的抗体IgM存在型特异性,它的变异与病情延长有关。另一方面,该段序列富含脯氨酸,可能参与病毒蛋白转录调控,含有2个疏水区,在HEV生活史中有未明了的重要意义。我们采用PCR扩增靶序列,克隆至pMD18-T Vector后随机选择克隆测序。之所以采用这种方法是因为目前应用的研究基因突变的方法,如错配PCR法等,不能精确、全面地展示变异的程度,而只是解释了一些热点突变的情况。随机克隆测序法则可比较精细地反映不同克隆株之间的差异,即准种之间的差异。

经PCR扩增靶片段后,TA克隆法将获得的克隆均存储在载体中。分别随机抽取了30个克隆进行测序分析。测序结果发现30个序列可分11个类

型,序列间的同源性在97.97%~99.71%,提示急性HEV感染者体内HEV存在状态具有准种特点。实验结果展示了检测样本中HEV准种的组成特性。发现HEV准种复杂性不高,但遗传差异性较大,整个HEV准种群体呈现11种准种病毒株,彼此遗传差异程度小的特点。普通Taq酶的错配率为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$,本研究靶片段长度仅493 bp。因此,可排除在PCR扩增过程中因错配而导致的突变。这证明了HEV准种在急性感染者中真实存在。

HEV基因型和准种特点也为HEV感染的诊断及免疫预防提出了新的挑战。由于HEV准种的形成及优势种群的漂变(shift),造成HEV感染检测漏诊,供血员筛选也将受到影响。因此,对HEV基因型和准种特点的研究意义深远。

参 考 文 献

- [1] JAMEEL S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus[J]. *Expert Rev Mol Med*, 1999, 12(6): 1-16.
- [2] GRANDADAM M, TEBBAL S, CARON M, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 11): 3189-3194.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫学会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324-329.
- [4] 王佑春. 中国戊型肝炎病毒4型的流行病学、分子生物学和家畜感染研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(7): 618-622.
- [5] ARANKALLE V A, PARANJAPPE S, EMERSON S U, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993) [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 7): 1691-1700.

(2005-08-29 收稿)

• 期刊文摘 • 超声组织同步显像技术评价肥厚性心肌病患者心肌收缩协调性的初步研究

[熊润青, 谢明星, 王新房等. *中华超声影像学杂志*, 2006, 15(3): 164~167]

为探讨超声组织同步显像技术评价肥厚性心肌病心肌收缩协调性的临床价值。对14例肥厚性心肌病(HCM)患者和20例正常人,采用实时三平面组织同步显像技术,同步实时获取心尖四腔观、左室心尖两腔观和左室心尖长轴观,通过绿黄红三种颜色半定量显示局部心肌收缩达峰时间(TTP)。采用牛眼图模式分别定量测量HCM组和正常组左室6个壁12个心肌节段的纵轴收缩达峰时间,分别比较: HCM组与正常组室间隔中段TTP; HCM组与正常组左室后壁TTP; HCM组肥厚节段和非肥厚节段TTP。发现HCM组室间隔中段TTP较正常组室间隔中段TTP明显延迟($P < 0.01$), HCM组左室后壁TTP较正常组左室后壁TTP明显延迟($P < 0.05$), HCM组肥厚节段TTP较非肥厚节段明显延迟($P < 0.05$)。结果表明: HCM患者肥厚心肌与非肥厚心肌收缩不协调,组织同步显像技术能对其进行准确评价。