湖北地区慢性丙型肝炎患者 HCV 基因分型结果分析*

吴泽刚，李 艳，郑红云 （武汉大学人民医院检验科，武汉 430060）

摘 要：目的 应用基因测序技术检测分析湖北地区慢性丙型肝炎患者的 HCV 基因型及其分布特点。**方法** 收集 2013 年 2 月～2015 年 7 月武汉大学人民医院感染科 447 例 HCV-RNA 阳性的慢性丙型肝炎患者血浆标本，通过 Sanger 测序法测定 HCV 基因的 NS5B 区基因序列，然后与 NCBI genebank 数据库中 HCV 基因型数据进行比对，分析患者 HCV 基因型。**结果** 研究检测的慢性丙型肝炎患者血浆中，共检测出 11 种 HCV 基因型，分别是 1a，1b，2a，3a，3b，6a，6b，1b/2a 混合型，1b/2k 混合型，6a/1b 混合型和 6d/6k 混合型。其中，HCV1a 型为 7 例（1.57%），1b 型 325 例（72.71%），2a 型 67 例（14.99%），3a 型 7 例（1.57%），3b 型 20 例（4.47%），6a 型 14 例（3.13%），6b 型 2 例（0.45%），1b/2a 混合型 2 例（0.45%），1b/2k 型 1 例（0.22%），6a/1b 混合型 1 例（0.22%）和 6d/6k 混合型 1 例（0.22%）。**结论** 湖北地区慢性丙型肝炎患者的 HCV-RNA 基因型以 1b 型为主，其次为 2a 型，亦可见其他型别，提示湖北地区 HCV 流行的基因型呈多样性。

关键词：丙型肝炎病毒；基因测序；基因分型
中图分类号：R512.63；Q786 **文献标志码：**A **文章编号：**1671-7414(2016)01-038-03
doi：10.3969/**j. issn.** 1671-7414.2016.01.010

Analysis on HCV Genotype of Patients with Chronic Hepatitis C in Hubei

WU Ze-gang, LI Yan, ZHENG Hong-yun
(*Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan* 430060, *China*)

Abstract: Objective To detect the genotype of hepatitis C virus(HCV) in chronic hepatitis C(CHC) infection patients using gene sequence method and observe the distributive characteristic of HCV genotype in Hubei. **Methods** A total of 447 HCV-RNA-positive plasma samples were collected from chronic hepatitis C patients in Infectious Diseases Department of Renmin Hospital of Wuhan University from February 2013 to July 2015. Then NS5B region gene sequence of HCV genome were detected by Sanger sequencing method and compared with HCV genotype in NCBI genebank database for analyzing HCV genotype. **Results** A total of 11 kinds of genotypes were detected, including genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 6a, 6b, 1b/2a, 1b/2k, 6a/1b and 6d/6k, respectively. Detection cases of various genotypes were respectively 7 cases (1.57%), 325 cases (72.71%), 67 cases (14.99%), 7 cases (1.57%), 20 cases (4.47%), 14 cases (3.13%), 2 cases (0.45%), 2 cases (0.45%), 1 case (0.22%), 1 case (0.22%) and 1 case (0.22%). **Conclusion** Genotype 1b was the major type of HCV-RNA genotype, followed by 2a, also other genotypes existed, which prompted that the prevalence of HCV genotype was diversity in Hubei.

Keywords: hepatitis C virus; gene sequence; genotype

丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus，HCV）感染是一个全球性的健康问题，目前全世界有超过 1.15 亿人感染 HCV[1]，感染率约 1%～3%，并且有增高的趋势。HCV 感染与慢性肝炎、肝硬化、肝癌等疾病密切相关[2]，HCV 感染已成为世界性的公共卫生难题之一。欧洲肝脏研究学会发布的最新丙型肝炎病毒感染诊治指南中提到[3]，HCV 基因型对治疗方案的选择、药物的剂量和治疗的持续时间有指导意义，HCV 治疗前必须首先检测 HCV 的基因型。因此，本研究通过基因直接测序法对 447 例 HCV 感染患者的 HCV-RNA 基因序列进行分析，以探讨湖北地区慢性丙型肝炎患者的 HCV 基因型分布特点，为临床制定治疗方案提供一定的支持依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究的实验对象为 2013 年 2 月～2015 年 7 月间来我院就诊的慢性丙型肝炎 HCV-RNA 阳性患者 447 例，其中男性 294 例，女性 153 例，年龄 15～72 岁。入院后采集外周静脉血 2～3 ml（采血管为 EDTA-K_2 抗凝管），4 h 内离心分离血浆，于－20℃保存备用。检测前患者均签署了知情同意书。入选患者慢性丙型肝炎的诊断符合《中国丙型病毒性肝炎医院感染防控指南》[4]的诊断标准。

* **基金项目：**国家临床重点专科建设项目（财社[2010]305 号）。
作者简介：吴泽刚（1985－），男，硕士，医师，研究方向为感染性疾病的分子诊断，E-mail：wuzegang1234@163.com。
通讯作者：李 艳，E-mail：yanlitf1120@163.com。

1.2　试剂与仪器　HCV-RNA提取试剂盒QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN公司)，RT-PCR逆转录试剂盒(Thermo Scientific公司)，凝胶成像系统(BioSpectrum公司)，DNA凝胶回收试剂盒(Axygen公司)，Sub-Cell GT Cell型水平电泳系统(BIO-BAD公司)，9700型PCR仪和3500dx型测序仪(ABI公司)。

1.3　方法

1.3.1　引物设计：本研究针对HCV-RNA非结构蛋白5B(NS5B)区和NCR保守区域设计了2对PCR引物，所用软件为Primer 5.6。针对NS5B区的引物用于确定HCV基因型别，针对NCR保守区域的引物用于保证扩增片段为HCV，见表1。

表1　HCV-RNA NS5B区和NCR保守区引物

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增子长度(bp)
NS5B	F：TTAACCACATCMRCTCCGTGTG	693
	R：GTACCTGGTCATAGCYTCCGTRAA	
NCR	F：GCGGAACCGGTGAGTACA	151
	R：CCTATCAGGCAGTACCACAAGG	

注：F为上游引物，R为下游引物。

1.3.2　HCV-RNA提取：用HCV-RNA提取试剂盒QIAamp Viral RNA Mini Kit从待测血浆标本中提取RNA，－20℃保存备用，严格按说明书操作。

1.3.3　逆转录：样本5 μl，无RNA酶水6 μl，1 μl random primer放入PCR扩增仪内65℃5 min，然后立即冰浴5 min；再加入Reaction Buffer 4 μl，逆转录酶RT 1 μl，逆转录酶抑制剂RI 1 μl，dNTP Mix 2 μl，反应总体积为20 μl，在PCR扩增仪内进行扩增；扩增循环条件：25℃ 5 min，42℃ 60 min，70℃ 10 min，结束后4℃保存。

1.3.4　目的基因片段扩增及验证：目的基因片段PCR扩增的反应体系为：Premix 10 μl，引物1 μl，cDNA 2 μl，灭菌去离子水补至体积为20 μl。扩增循环条件：42℃ 5 min，95℃ 3 min；94℃ 30 s，56℃ 50 s，72℃ 1 min，35个循环；72℃ 10 min，扩增结束后置4℃保温。PCR扩增产物经2 g/dl琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像系统拍照成像，验证PCR扩增产物是否含有NS5B区和NCR保守区目的片段。

1.3.5　回收扩增后目的片段：切下目的DNA条带，采用Axygen DNA凝胶回收试剂盒回收DNA后，－20℃保存备用，严格按说明书操作。

1.3.6　测序反应及产物纯化：取BigDye缓冲液1.15 μl，BigDye 0.3 μl，待测DNA 1 μl，正反向引物各1 μl，灭菌去离子水补体积为6 μl。扩增条件：98℃变性2 min后；96℃ 10 s，50℃ 5 s，60℃ 4 min，25个循环，结束后置4℃保温。将测序反应产物加16 μl醋酸钠/乙醇混合液，充分振荡，4℃离心后弃上清液；加70%(v/v)的乙醇70 μl洗涤沉淀2次。室温干燥沉淀后加10 μl的甲酰胺充分溶解DNA，在PCR仪上95℃热变性2 min，冰中骤冷，待用。

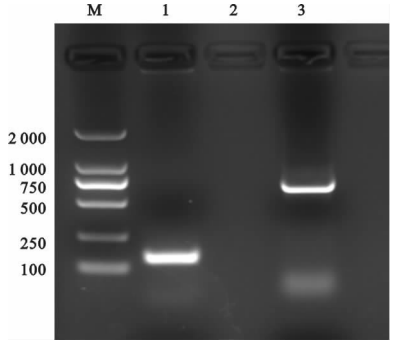
1.3.7　上机测序：将纯化后的测序反应产物在ABI3500dx型测序仪上进行测序，按仪器说明书操作。电泳结束后仪器自动分析彩色测序图谱，其DNA最低检出浓度为20～40 ng/L。

1.3.8　测序结果的处理：将HCV-RNA序列分析的结果与NCBI genebank数据库中HCV基因型数据进行比对，得到每位受检者的HCV基因型。

1.4　统计学分析　根据序列分析的结果在Microsoft Excel计算本研究中得到的各种基因型的比例。

2　结果

2.1　凝胶电泳法检测PCR产物　NS5B区和NCR保守区序列基因目的片段结果见图1。



注：M为标准带；2为空白孔；1，3分别为NCR保守区和NS5B区；

图1　NS5B区和NCR保守区序列基因扩增后凝胶电泳图

2.2　HCV靶基因片段测序结果　ABI3500dx基因测序仪测定的HCV-RNA逆转录后的靶基因片段序列结果见图2。

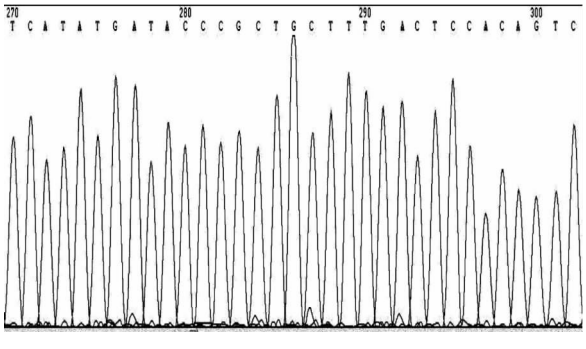


图2　不同颜色的波形峰分别代表A，T，G，C 4种不同的碱基

2.3 基因分型检测结果 447例慢性丙型肝炎患者中共检测出11种基因型，各种基因型的检出例数和检出率：1a型为7例(1.57%)，1b型325例(72.71%)，2a型67例(14.99%)，3a型7例(1.57%)，3b型20例(4.47%)，6a型14例(3.13%)，6b型2例(0.45%)，1b/2a混合型2例(0.45%)，1b/2k型1例(0.22%)，6d/6k型1例(0.22%)，6a/1b型1例(0.22%)。

3 **讨论** 丙型病毒性肝炎(HCV)是一种对患者的健康及生命危害较大的疾病，50%～80%的HCV感染者进展为慢性状态，其中20%～30%的患者发展为肝硬化或肝癌[4]。目前，干扰素联合利巴韦林是目前公认治疗慢性丙型肝炎有效的治疗方案，能有效抑制患者HCV复制，减轻肝脏炎症坏死和肝纤维化。美国肝病学会2015年的指南中指出[5]，所有计划给予以干扰素为基础的抗病毒治疗患者，治疗前均应检测HCV基因型，以确定患者的药物剂量以及疗程，并且预测应答。HCV基因分型对丙型肝炎患者的治疗方案选择及预测应答意义重大，因此，临床医生在治疗前均需要检测患者的HCV基因型。

本研究中，由于同一基因型、不同亚型HCV5'非编码区序列的差异度仅为1%～3.3%，而NS5B基因序列的差异度为16.5%～20.1%，NS5B基因更适合用于HCV的基因分型[6]。根据HCV NS5B区基因序列而进行的基因分型被公认为HCV基因分型的"金标准"。因此，本研究通过基因直接测序法检测NS5B和NCR区的靶片段序列来分析HCV患者的基因型。目前已确定的基因型有1～7型共7种基因型别，其基因亚型确定的有67种，另外还有20种具有完整序列未确定的亚型[7]。HCV基因型分布复杂，不同的地区型别分布不同，我国以及东南亚地区主要以1和2型为主[8]。本研究的结果表明湖北地区慢性丙型肝炎患者的分布特点主要为1b型(72.71%)，其次为2a型(14.99%)，与江苏地区Qi等[9]的报道相似。但另外也有与本研究报道不一致的，Zhang等[10]人报道的云南地区主要为6n型，可能与地区以及人员的流动性差异有关，另外注射毒品成为影响亚型分布的重要原因之一[9]。此外，本研究的结果显示湖北地区HCV感染的基因型有多样性趋势，一些常见的单基因型被检测出，另外也有1b/2a混合型，1b/2k混合型，6a/1b混合型，6d/6k混合型基因型，这可能与近年来中部地区发展加速，人口流动性加大以及注射毒品有关。

随着国内外研究的不断深入，对HCV基因型的认识在慢性丙型肝炎感染的临床类型、疾病过程、治疗方法及预后判断等方面将发挥越来越重要的作用。临床医生应该把HCV基因型检测列为慢性丙型肝炎患者治疗前的常规检测项目之一。本研究通过基因测序法可明确检测出HCV基因型，对临床治疗及预后提供了依据。

参考文献：

[1] Gower E, Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection[J]. Journal of Hepatology, 2014, 61(1 Suppl): S45-S57.

[2] Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1333-1342.

[3] European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2015 [J]. Journal of Hepatology, 2015, 63(1): 199-236.

[4] 中华预防医学会医院感染控制分会. 中国丙型病毒性肝炎医院感染防控指南[J]. 传染病信息, 2013, 26(2): 71-75.
Nosocomial Infection Control Branch of Chinese Pre. China's guideline on nosocomial infection prevention and control of viral hepatitis C[J]. Infectious Disease in Formation, 2013, 26(2): 71-75.

[5] AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus[J]. Hepatology, 2015, 62(3): 932-954.

[6] 包安裕，李 艳，童永清，等. 湖北地区慢性丙型肝炎患者HCV RNA基因测序分型及疗效评估[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 13-16.
Bao AY, Li Y, Tong YQ, et al. Gene sequence-based genotyping and therapy evaluation of hepatitis C virus in 168 patients with chronic hepatitis C infection in Hubei province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 13-16.

[7] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource[J]. Hepatology, 2014, 59(1): 318-327.

[8] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes[J]. Hepatology, 2015, 61(1): 77-87.

[9] Qi Y, Chen Q, Hao F, et al. Subtype distribution of hepatitis C virus in jiangsu, china[J]. Journal of Medical Virology, 2015, Aug19[Epub ahead of print].

[10] Zhang Z, Yao Y, Wu W, et al. Hepatitis C virus genotype diversity among intravenous drug users in Yunnan Province, Southwestern China [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82598.

收稿日期：2015-08-04 **修回日期：**2015-09-15