维普资讯 http://www.cqvip.com

广州地区急性散发性HEV毒株基因特征和生物学性状的研究*

李庆虹，黄如统**，魏绍静，李德荣

（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100850）

摘要：利用RT-PCR技术对我国广州地区急性散发性戊型肝炎病毒细胞培养分离株G93-1、G93-2、G93-3和G93-4基因组聚合酶区部分核苷酸序列（4 522～4 761 nt）进行检测，PCR阳性产物经纯化、克隆后测序。结果G93-1、G93-3和G93-4株病毒的这段序列完全相同，且与我国新疆暴发流行的HEV 87A株及亚洲HEV代表株的同源性为100%；而G93-2株与它们的差异较大，同源性只有79.9%；但是，它与1997年从厦门地区急性戊型肝炎病人血清中检测的X-S1株同源性很高，达99.2%。并对G93-2株病毒的生物学特性进行了研究，结果与87A株一致。表明我国南方散发性HEV毒株的基因组存在差异，可能同时流行着两种不同的HEV基因型，但生物学性状是相同的。

关键词：戊型肝炎病毒（HEV）；细胞分离株；基因特征；生物学性状

中图分类号：R373.21 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)01－0039－05

戊型肝炎（HE）是一种世界性疾病，在亚洲、非洲和北美洲的一些发展中国家常呈暴发流行或散发传播。我国戊型肝炎流行率为17.2%，仅次于甲型肝炎[1]，严重危害着人类的健康。甲型肝炎病毒（HAV）和戊型肝炎病毒（HEV）同为肠道传播的肝炎病毒，在临床和传播途径上非常相似。已知来自世界不同地区的人类HAV只有一个血清型，但可分成四个不同的基因型[2]。对于HEV，其血清型是否为一个尚不清楚，但从不同地区毒株的核苷酸差异分析，至少存在四个不同的基因型（或亚型）[3～6]。目前国内外关于散发性HEV病原学的报道不多，更缺乏病毒学性质的研究。

本实验室自1988年分离新疆暴发性HEV 87A株后[7]，1993年又与广州市传染病医院合作，从广州地区散发性HE病人急性期粪便标本中分离到四株病毒。近年来，在病毒的形态学、血清学、PCR扩增及核酸杂交方面进行了初步鉴定[8]。最近，我们又利用RT-PCR技术对这四株病毒的ORF1聚合酶区部分基因组进行了扩增和核苷酸序列分析，从而在分子水平上进一步证明它们为HEV，并与我国及亚洲已知的HEV序列进行了比较。然后，我们还对G93-2株病毒的生物学特性进行了研究，包括血清学关系、细胞敏感性及理化性质，这在国内

收稿日期：1999－03－01，修回日期：1999－05－24

* 本课题为院基金资助项目（编号9608056）

第一作者简介：李庆虹（1973－），女，天津市人，研究生，硕士，1996年毕业于南开大学生化专业，同年8月于军事医学科学院微生物流行病研究所病毒室分子病毒学专业就读硕士。

** 通讯作者简介：黄如统（1942－），男，浙江浦江人，副研究员，1966年毕业于复旦大学生物系，主要从事病毒病原的分离鉴定研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

外尚未见有报道。

1 材料与方法

1.1 病毒株 1993年用A549细胞从广州地区四名散发性HE病人急性期粪便标本中分离，分别命名为G93-1、G93-2、G93-3和G93-4株[8]。用2BS细胞从第一代连传三代后用于实验。对照病毒为87A株[7]。

1.2 引物设计与合成 根据已报道的HEV缅甸株序列[3]，于军事医学科学院生物工程研究所合成两对引物，详见文献[7]。

1.3 RNA提取 将病毒液接种2BS细胞后于37℃孵箱培养，CPE达卅时收冻，冻融两次后离心去细胞碎片，常规PEG浓缩100倍后，按说明书操作，用TRIzol试剂(Gibco/BRL)提取RNA。RNA经DNase I(Gibco/BRL)消化后用于RT-PCR。具体方法见文献[9]。

1.4 RT-PCR 使用RT-PCR一步法试剂盒(Gibco/BRL)，加入R1、F1外引物，45℃ 30 min逆转录，94℃ 2 min后进入PCR循环，94℃变性30 sec，52℃退火45 sec，72℃延伸1 min，35个循环，最后72℃延伸8 min。取5 μL PCR一扩产物用内引物R2、F2进行二扩。PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶中观察结果。

1.5 克隆与鉴定 阳性PCR产物纯化回收后，与pGEM-T-Easy载体(Promega)连接，并转化JM109菌。阳性菌落经PCR初步鉴定后用EcoRI酶切鉴定，均按分子克隆有关操作进行。

1.6 序列分析与比较 鉴定阳性菌送至军事医学科学院生物工程研究所进行纯化与测序，测序结果与我国87A株[7]及亚洲代表株缅甸株[3]进行同源性比较。

1.7 交叉中和试验 用1:10稀释的抗-87A株病毒的兔免疫血清进行固定血清-稀释病毒微量细胞中和试验，方法按常规。87A株作阳性对照，同时设细胞及血清对照。

1.8 细胞敏感性试验 选择2BS、A549、LLC-MK2三种细胞，病毒接种培养后CPE达卅～卌时收冻，未出现CPE的细胞于接种后第7天收冻。如此连传三代后用微量滴定法测定传代前后的病毒滴度。

1.9 理化性质试验 耐乙醚、耐热、耐酸以及核酸型的测定均按文献[10]。

2 结果

2.1 PCR检测结果

由图1可见，HEV G93-1、G93-2、G93-3和G93-4第五代分别经RT-nPCR后，均可扩增出长约239 bp带，而正常2BS细胞培养物阴性。

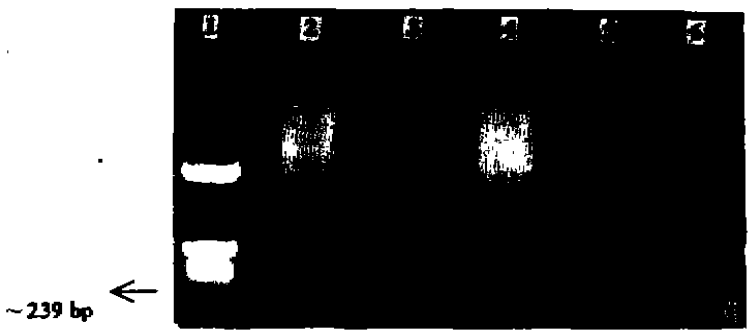

图1 四株散发性HEV毒株的RT-nPCR检测结果
1.pBR322/Msp I DNA分子量标志；2.G93-1株；3.G93-2株；4.G93-3株；5.G93-4株；6.正常细胞对照
Fig.1 Results of four strains of HEV detected by RT-nPCR
1. pBR322/Msp I DNA Markers; 2.G93-1 strain; 3.G93-2 strain;
4.G93-3 strain; 5.G93-4 strain; 6.Normal cells control

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2　核苷酸序列分析

如图 2 所示，RT-nPCR 扩增的 G93-1、G93-3 和 G93-4 的这段核苷酸及推测的氨基酸序列均相同，且与新疆 87A 株及亚洲缅甸株同源性均为 100%，只有 G93-2 株的序列有明显不同，与以上几株病毒的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 79.9% 和 86.3%。

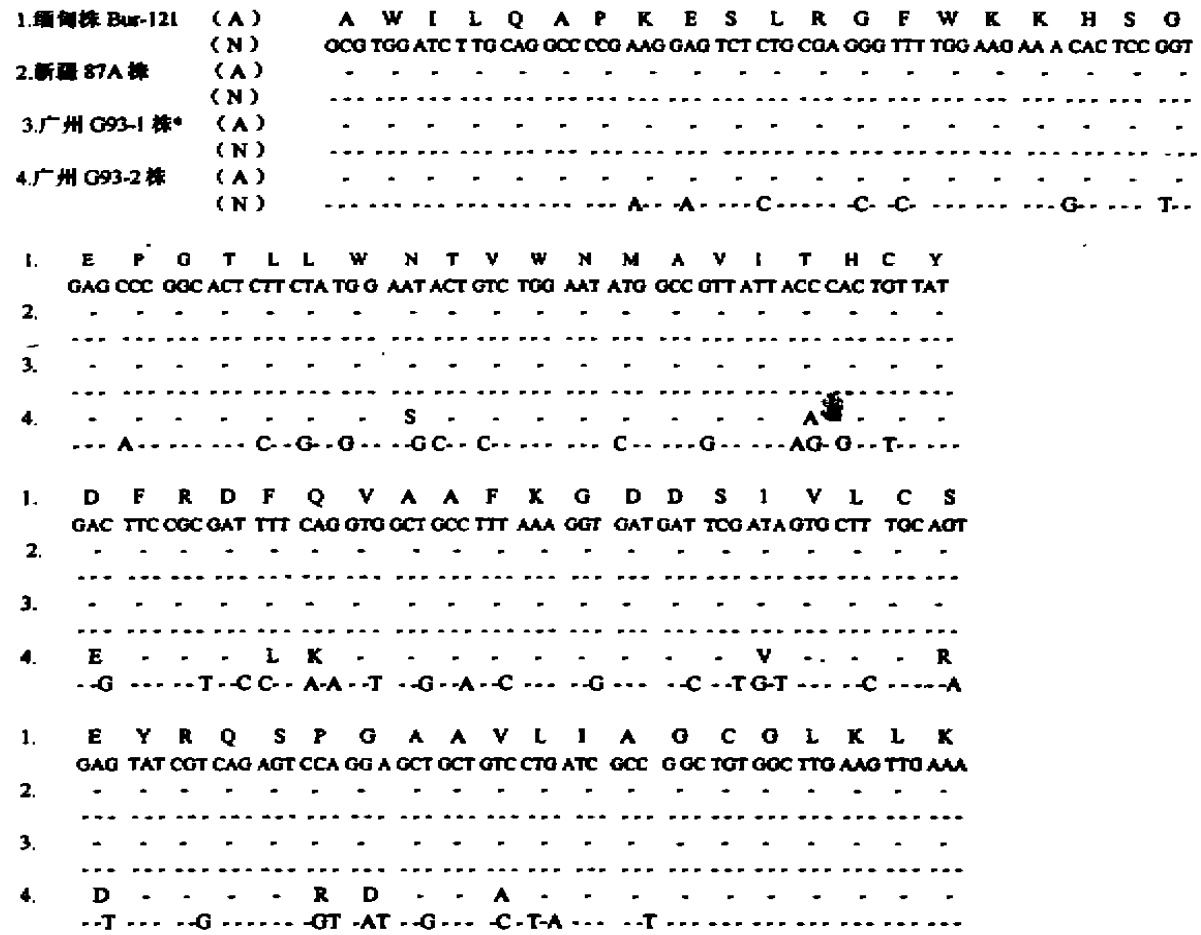

图 2　6 株 HEV 的核苷酸和氨基酸序列

Fig.2　The nucleotide (N) and amino acid (A) sequences of six strains of HEV

*G93-3 和 G93-4 序列与 G93-1 完全相同，仅以 G93-1 表示。

The sequences of G93-3 and G93-4 are the same as that of G93-1 expressing as sequence of G93-1.

2.3　交叉中和试验

从表 1 可见，G93-2 株病毒与 87A 株一样，均可被抗-87A 株病毒的免疫血清所中和，二者属同一个血清型。

2.4　细胞敏感性试验

结果如表 2。G93-2 株病毒在 2BS 细胞和 A549 细胞中连传三代后，病毒滴度均较稳定并有所增高，可见这两种细胞对 G93-2 株病毒是敏感的。但是，该株病毒在 LLC-MK2 细胞中连

维普资讯 http://www.cqvip.com

传三代后，病毒滴度明显降低，故该细胞对 G93-2 株病毒是不敏感的。结果与 87A 株相同。

表1 HEV G93-2 株与抗-87A 株病毒血清交叉中和试验的结果

Table 1 Results of cross-neutralization between G93-2 strain and anti-87A serum

病毒株(代次) Virus strain (Passage)	与抗-87A 株病毒血清(1:10)的中和试验结果 Results of cross-neutralization between G93-2 strain and anti-87A serum ($TCID_{50}$/0.025 mL)		中和指数 Neutralization index
	中和组 Neutralization	病毒对照组 Virus control	
G93-2(5)	0	5.5	3.16×10^{5}
87A(13)	0	6.5	3.16×10^{6}

表2 G93-2 株病毒的细胞敏感性试验

Table 2 Results of cell sensitivity of G93-2 strain

毒株(代次) Virus strain (the passage)	病毒滴度 ($TCID_{50}$/0.025 mL*) Viral titers			
	试验前 Pre-passage	连传三代后 After three passages		
		2BS	A549	LLC-MK2
G93-2(5)	4.7	5.3	5.7	0
87A(13)	5.3	6.0	5.5	2.5

*A549 细胞测定 Determined in A549 cell

2.5 理化性质试验

用接种了 G93-2 株第五代病毒的 2BS 细胞培养液作耐乙醚、耐酸(pH 3.0)、耐热(56℃，30 min)、病毒核酸型试验，结果显示 G93-2 株病毒是耐乙醚、不耐酸、不耐热的，且不受 5-IUDR 的抑制，见表3。说明该株病毒与 87A 株一样属无包膜、不耐酸和不耐热的 RNA 病毒。

表3 G93-2 株病毒的理化性质试验

Table 3 Results of physical-chemical character of G93-2 strain

试验组 Test group	病毒滴度* ($TCID_{50}$/0.025ml) Viral titers	
	G93-2(5)	87A(13)
耐乙醚 Ether	6.2	6.0
耐酸(pH3.0) Acid	<1.0	1.3
耐热(56℃ 30 min) Heat	<1.0	<1.0
核酸型 Nucleic acid	6.2	5.5
病毒对照 Virus control	6.0	5.5

*A549 细胞测定 Determined in A549 cell

4 讨论

一般来说，RNA 病毒有较高的变异性，其中的一个原因是这种 RNA 的复制中缺乏校正功能。这种 RNA 病毒高度变异的特点在人免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV)基因组中表现得最为充分。但是，HEV 不象 HIV 和 HCV 那样容易形成慢性感染，它与 HAV 一样，仅限于急性感染的模型。在 HAV 基因克隆成功后的最初几年，对克隆的 HAV 株间比较显示有很高的同源性，但最近几年来，又新分离出不同的 HAV 株。现已将人源 HAV 分为四个基因型，同型内有≥85%的同源性；异型间有>15%的差异性[2]。但人源 HAV 的抗原结构非常保守，目前认为只有一个血清型。随着对 HEV 的不断深入研究，虽然其血清型尚不清楚，就不同地区获得的毒株的核

维普资讯 http://www.cqvip.com

苷酸差异进行分析,至少存在四个不同的基因型(或亚型),即亚洲的缅甸株[3]、北美的墨西哥株[4]、我国广州地区G-20株[5]和美国的US-1株[6]。HEV cDNA核苷酸的高度保守区位于ORF2和ORF3区域,而ORF1的变异性最大,且变异多发生于密码的第三个位置,对转译的氨基酸的组成影响较小。这次对我国广州四株散发性HEV的细胞分离株进行了较详尽的研究,结果发现,对于ORF1 ET1.1区段的这段核苷酸序列,其中三株与我国新疆87A株[7]及亚洲代表株缅甸株[3]完全相同,但G93-2株具有较大的变异,同源性只有79.9%。有趣的是,该株的这段核苷酸序列与1997年我室从厦门HE病人血清中检测到的X-S1株[11]却有着惊人的相似,同源性达到了99.2%。因此我们认为在我国南方急性散发性HEV毒株中,可能还存在着一种不同于新疆和北京HEV毒株[5]的基因亚型。这与本室研究的结果[5]以及最近台湾学者的报道是一致的[12]。

基于以上核苷酸序列的分析结果,我们特别对这株ORF1变异较大的G93-2株病毒进行了进一步生物学性质的研究,包括血清学、细胞敏感性以及理化性质三个方面,并与我国新疆87A株进行比较。结果发现,该株病毒在血清学关系方面,与87A株无明显的抗原性差异,二者均可被抗-87A株的免疫血清完全中和,可见该两株病毒属于同一血清型,这为我国HE疫苗的研究提供了资料;细胞敏感性方面,二者均对2BS和A549细胞敏感,对LLC-MK2细胞不敏感;理化性质方面,二者均为无包膜、不耐酸、不耐热的RNA病毒,均符合嵌杯状病毒科的性质。可见二者在上述生物学性质方面未见有差异,这可能与该病毒的抗原性质是由结构区基因决定有关,尚待进一步证明。

参 考 文 献

[1] 刘宗柏.我国病毒性肝炎人群流行病毒特征及流行因素研究[J].中华肝脏病杂志,1998,6(2):67

[2] Lemon SM, Jansen RW, Bravn EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus [J]. Vaccine, 1992,10(suppl 1):S40

[3] Tam AW, Smith MM, Guerra M *et al*. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome [J]. Virology, 1991,185:120~124

[4] Huang CC, Nguyen D, Fernandez J *et al*. Molecular cloning and seqauencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus [J]. Virology, 1992,191:550~558

[5] Huang, RT, Nakazono N, Ishii K *et al*. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus from some regions of China [J]. J Med Virol, 1995,47:303~308

[6] Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC *et al*. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States [J]. J Gen Virol, 1998,79:447~456

[7] Huang RT, Li DR, Wei J *et al*. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China [J]. J Gen Virol, 1992, 73:1143~1148

[8] 苑锡同,李晓英,黄如统等.我国散发性戊型肝炎病毒细胞培养分离株的鉴定[J].解放军医学杂志,1996,21(4):284~285

[9] 李庆虹,王建军,黄如统等.戊型肝炎病毒(HEV)F86株的某些生物学及分子生物学特征的鉴定[J].军事医学科学院院刊,1999,23(2):97~100

[10] 卫生部防治慢性气管炎办公室编.慢性支气管炎实验方法汇编(一)[C].北京:人民卫生出版社.1973.182

[11] 黄如统,廖绵初,李晓英等.我国厦门地区散发性戊型肝炎病毒部分核苷酸序列分析[J].军事医学科学院院刊,1998,22:236~237

[12] Wu JC, Sheen IJ, Chiang TY *et al*. The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analyses [J]. Hepatology, 1998,27(5):1415~1420

维普资讯 http://www.cqvip.com

Study on Genetic and Biological Character of Sporadic Strains of Acute HEV in Guangzhou

LI Qing-hong, HUANG Ru-tong, WEI Shao-jing, LI De-rong

(*Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing* 100850, *China*)

Abstract: Partial nucleotide sequences (location 4522 – 4761) from ORF1 of sporadic strains (G93-1, G93-2, G93-3 and G93-4) of acute HEV in Guangzhou were detected, the positive PCR products were purified, cloned and sequenced. In the result, the nucleotide sequences of G93-1, G93-3 and G93-4 strain are all the same to each other, and have a homology of 100% with the Xin Jiang 87A and Burma strain respectively. The G93-2 strain is different, the homology of this part of sequence with them is only 79.9%, but it has a homology of 99.2% with X-S1 strain obtained from the acute phase serum of a patient with hepatitis E in Xiamen. In addition, the biological character of the G93-2 strain was studied, the result was as same as the 87A strain's. All the results show there is a variant subgenotype of HEV in the South of China besides the similar strain with Xinjiang, but they have the same biological character.

Key words: Hepatitis E virus; Isolated strain; Genetic character; Biological character