

上海部分地区戊型肝炎病毒(HEV)基因型的分析

蓝海云¹, 王佑春^{1**}, 张华远¹, 彭惠利², 林京香¹, 辜文洁¹, 吴星¹, 李河民¹

(1. 中国药品生物制品检定所疫苗二室, 北京 100050; 2. 上海市传染病医院, 上海 200083)

The Analysis of HEV Genotypes Isolated from Sporadic
Acute Hepatitis E in ShanghaiLAN Hai-yun¹, WANG You-chun^{1**}, ZHANG Hua-yuan¹, PENG Hui-li², LIN Jing-xiang¹,
GU Wen-jie¹, WU Xing¹, LI He-min¹(1. Department of Hepatitis, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;
2. Infections Hospital, Shanghai 200083, China)

Abstract: In order to analyze HEV genotypes isolated from sporadic acute hepatitis E in Shanghai, HEV RNAs were detected with RT-nPCR and the positive PCR products were cloned and sequenced. The genotypes of the isolated sequences were analyzed with the molecular biological software. The results showed that 9 of 35 sera from patients diagnosed as acute sporadic hepatitis E were positive for RT-nPCR. 8 of 9 PCR positive products were confirmed to be related to HEV sequence by sequencing. 1 of 8 sequences belongs to HEV genotype 1 and 7 of 8 sequences belongs to HEV genotype 4. This indicates that the infection rate of HEV genotype 4 is higher than that of HEV genotype 1 among the patients with the diagnosis of acute sporadic hepatitis in Shanghai.

Key words: Hepatitis E virus; Genotype; Polymerase chain reaction

摘要: 为了解戊型肝炎病毒(HEV)在上海部分地区流行的基因型, 采用 RT-nPCR 的方法检验 35 例急性散发性戊型肝炎患者中 HEV RNA, 并对阳性产物进行克隆测序, 然后对其基因型进行分析。结果显示在 35 例急性散发性戊型肝炎患者中 PCR 阳性为 9 例, 测序证实 8 例为 HEV 的基因序列; 其中 1 例为 HEV 1 型, 7 例为 HEV 4 型。提示在上海部分地区的急性散发性戊型肝炎中以 HEV 4 型感染为主。

关键词: 戊型肝炎病毒; 基因型; 聚合酶链式反应

中图分类号: Q373.2 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)02-0106-04

戊型肝炎病毒(HEV)是肠道传播非甲非乙型肝炎的主要病因, 主要经污染的水源传播, 也可通过饮食传播。目前国际上将该病毒分为 8 个基因型^[1-6], 1 型主要分布在亚洲和欧洲, 2 型分布在墨西哥, 3 型分布在美国, 4 型分布在中国, 5-8 型主要分布在欧洲。目前国际上已完成 1-4 型的全基因序列的分析^[1-3, 12], 其全基因序列的核苷酸的同源性在 75% 左右。该病毒既能引起大规模的爆发流行, 也可引起急性散发型病毒性肝炎。在以往报道中, 我国戊肝病毒的感染以 HEV 1 型为

主^[7, 8], 最近我国多位学者自散发性戊肝病人血清中分离出 HEV4 型^[9-11], 并发现在部分地区散发性戊型肝炎病人中以 HEV4 型感染为主。为了解 HEV 1 型和 4 型在上海地区中的分布, 本研究对上海地区 35 例急性散发性戊型肝炎患者血清进行了 HEV RNA 的检测, 对阳性产物进行克隆测序, 并对基因序列进行分析, 现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 血清

收稿日期: 2001-08-01, 修回日期: 2001-09-10

作者简介: 蓝海云(1972-), 女, 技师, 从事乙型和戊型肝炎的分子生物学研究。

** 通讯作者: 王佑春(1964-), 男, 博士, 研究员, 主要从事乙、戊和庚型肝炎病毒和 TTV 的分子生物学的研究。Correspondence author.

35 例临床初步诊断为急性戊型肝炎病人的血清收集于上海地区, -70℃ 保存备用。

1.2 酶、克隆载体

Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶、EcoR I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 pGEM-T easy 克隆载体均为 Promega 公司产品。

1.3 简并引物

ORF2 外引物:正向引物 SEBO1:5'-AA(CT)TATGC(AC)CAGTACCGGGTTG-3', 反向引物 SEE01:5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'; ORF2 内引物:正向引物 SEB11:5'-GT(CT)ATG(CT)T(CT)TGCATACATGGCT-3'; 反向引物 SEE11:5'-AGCCGACGAAAT(CT)AATTCTGTC-3'。

1.4 HEV RNA 的提取及 RT-PCR 检测

用上海华顺公司的小量柱式病毒 RNA 抽提试剂盒按说明书操作从 250 μ L 血清中提取 HEV RNA, 获 30 μ L 纯化的 HEV RNA 水溶液。反转录和第一轮 PCR 在同一反应体系中进行, 具体的反应液的组成为: 纯化的 RNA 10 μ L, 内外引物各 25pmol, 10xPCR buffer 5 μ L, 0.1M DTT 0.5 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 反转录酶 AMV 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, dNTP 1 μ L, MgCl(25mmol/L) 4 μ L, 最后用超纯水调整终体积至 50 μ L; 其反应程序为: 42℃ 孵育 45min 进行反转录, 然后采用 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min 扩增 30 个循环。第二轮反应液的组成为: 第一轮 PCR 扩增产物 3 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl 2(25mmol/L) 4 μ L, dNTP (10mmol/L) 1 μ L, 内外引物各 25pmol, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 最后用超纯水调整终体积至 50 μ L, 其反应程序为: 94℃ 45s, 50℃ 45s, 72℃ 45s 扩增 30 个循环。

1.5 克隆及测序

对阳性的反应产物进行纯化并将纯化的产物克隆到 pGEM-T easy 载体, 然后对插入片段进行测序, 具体方法见参考文献^[5]。

1.6 序列分析

采用 Clustal IW 对所分析的基因序列进行对准比较, 并按 Treeview 画出基因进化树; 用 Genedoc 软件计算核苷酸序列的同源性。序列分析所用的 ORF2 参照序列: HEV 1 型代表序列为 B1 (M73218)、B2 (D10330)、C1 (L25547)、C2 (M94177)、C3(D11093)、P1(M80581); I1(X98292)

和 I2(X99441); 2 型为 M1(M74506); 3 型 US1(AF060668)和 US2(AF060669); 4 型中 T1(AF272108)为 4A 亚型; 4 型中 HF-044(AF134812)和 T21(AF151963)为 4B 亚型; 4 型中 LZ-105(AF103940)为 4C 亚型。

2 结果

2.1 HEV RNA 的检测结果及 HEV cDNA 序列分析

采用 RT-PCR 的方法对 35 例急性散发性戊型肝炎病人血清进行了检测, 结果有 9 例为 HEV RNA 阳性, 将 PCR 阳性产物纯化、克隆并进行序列分析, 结果显示 9 例 HEV RNA 阳性样品中 8 例为 HEV 的基因序列, 1 例为非特异性扩增。

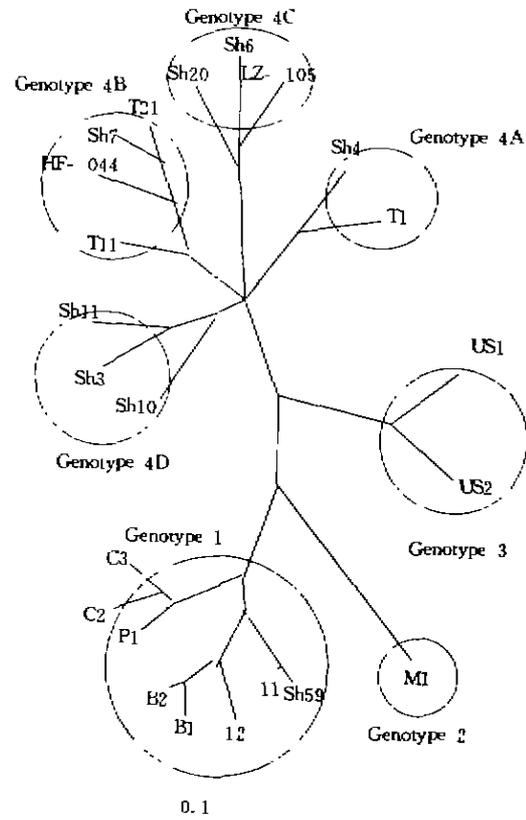


图 1 无根基因进化树

Fig.1 Unrooted phylogenetic tree

2.2 基因进化树分析

采用 Clustal IW 和 Treeview 软件对 8 例基因序列及国内外已发表的 1、2、3 和 4 型的基因序列进行基因进化树的分析(HEV 5-8 基因型未对该序列片段进行分析), 结果显示 1 例(sh59)与 HEV1 型形成

一个分支,说明该序列属于 HEV1 型;其它 7 例与 HEV4 型形成一个大的分支,说明该 7 例序列属于 HEV4 型;在以前的分析中将 HEV 4 型又分成三个亚型,即 4A 亚型,代表株为 T1 (af272108);4B 亚型,代表株为 T11 (af151962)、HF-030 (af134916);4C 亚型,代表株为 LZ-105 (AF103940)。基因进化树分析显示 sh4 与 T1 形成一个分支,属 4A 亚型;sh7 与 T11、T21 和 HF-044 形成一个分支,属 4B 亚型;sh6 和 sh20 与 LZ-105 形成一个分支属 4C 亚型;sh3、sh10 和 sh11 单独形成一个亚型分支,可能为一个新的亚型,定为 4D (图 1)。

2.3 核苷酸同源性的分析

将 8 例基因序列与 HEV 1、2、3、4A、4B 和 4C 之间的核苷酸序列的同源性进行了比较,结果显示在该区域 1 型与 2 型、3 型、4 型的同源性分别为 75%~77%,74%~76% 和 74%~78%;4A 型与 4B

型、4C 型的同源性分别为 82%~87%、83%~89%;1 型内部的同源性为 89%~100%;3 型内部的同源性为 90%;4 型各亚型之间的同源性为 82%~89%,而各亚型内部之间的同源性则高于 89%。由表可见 sh59 与 1 型的同源性在 89%~92% 之间,属于 1 型;sh4 与 4A 亚型的同源性最高,为 92%、属于 4A 亚型;sh7 与 4B 亚型的同源性在 90%~97% 之间,属于 4B 亚型;sh6 和 sh20 与 4C 亚型的同源性在 90%~91% 之间,属于 4C 亚型,而 sh3、sh10 和 sh11 与 1、2 和 3 型的同源性均在 80% 以下,不属于 1、2 和 3 型,而与 4 型之间的同源性在 84%~87% 之间,属于 4 型,但不属于已报道的 4A、4B 和 4C 亚型,可能为一个新的亚型,定位 4D 亚型 (表 1);而且从表 1 可见 4 型的变异程度较其他基因型大。

表 1 核苷酸序列同源性的比较 (%)

Table 1 The comparison of nucleotide identity (%)

	1	2	3	4A	4B	4C	Sh59	Sh11	Sh10	Sh3	Sh20	Sh6	Sh7
Sh4	76~78	76	77~78	92	85~87	87	78	84	84	86	85	86	86
Sh7	78~80	76	77	85	90~97	86	78	86	86	85	85	85	
Sh6	76~77	72	75~76	84	84~88	91	76	84	83	83	90		
Sh20	76~78	73	77~79	86	84~88	90	78	85	84	86			
Sh3	76~78	74	75~79	86	85~87	86	78	90	87				
Sh10	76~78	75	77~78	85	84~84	83	76	85					
Sh11	76~78	74	75~77	75	77~78	76	76						
Sh59	89~92	75	75~77	75	77~78	76							
4C	75~78	71~74	75~79	83~89	82~87	89~99							
4B	76~78	75~79	74~78	82~87	89~99								
4A	74~77	74~75	75~78	93~99									
3	74~76	72~73	90										
2	75~77												
1	89~100												

1, 2, 3 and 4 stand for genotypes 1, 2, 3 and 4; 4A, 4B and 4C stand for subgenotypes 4A, 4B and 4C; Sh4, Sh7, Sh6, Sh20, Sh3, Sh10, Sh11, Sh59 stand for HEV strains isolated from Shanghai infectious hospital

3 讨论

本文采用 RT-PCR 法对 35 例急性散发性戊型肝炎病人血清进行了 HEV RNA 的检测,并对阳性产物进行了基因序列的分析,结果显示仅有 8 例为 HEV RNA 阳性,其阳性率为 23%。HEV RNA

极易降解,只有在 -70℃ 或液氮的情况下才能长期保存,不能反复冻溶,可能是由于样品在运输过程中样品的融化时间较长,造成了 HEV RNA 的检出率较低。

通过序列分析显示在 8 例 HEV RNA 阳性的戊型肝炎病人中,1 例为 HEV 1 型感染;7 例为 HEV 4

型感染,其中1例为4A亚型,1例为4B亚型,2例为4C亚型,另外3例虽属4型,但不属于已报道的4A、4B和4C亚型,可能为一个新的亚型。戊型肝炎病毒是经肠道传播的非甲—非乙型肝炎的病原,1989年国外首先发现。我国新疆也曾发生过大流行,并对其病原进行了测序分析,显示病原与缅甸流行株HE-1相同,属于HEV 1型,随后的研究显示在内地的散发性急性肝炎中也为HEV 1型感染,但本研究和最近的研究显示在内地急性散发性肝炎病人中的感染以4型为主,1型仅占少部分。这一结果与以往报道不同,这是由于以前序列分析所用引物的序列来自于1型的保守区,该类引物在一般情况下只能扩增1型,而本研究采用简并引物,可扩增HEV1、2、3和4型。

最近的研究显示1型蛋白的抗原性与4型蛋白的抗原性可能存在一定的差异,在抗-HEV抗体的诊断试剂中仅用1型抗原容易造成对4型病毒感染的漏检^[13]。因此,了解HEV 4型在我国各地区中的分布,对今后开发戊肝诊断试剂和疫苗均有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Aye T, Uchida T, Ma X Z, *et al.* Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986 - 1988) of China[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 3512.
- [2] Huang C C, Nguyen D, Fernandez J, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV)[J]. *Virology*, 1992, 191: 550 - 558.
- [3] Schlauder G G, Dawson G J, Erker J C, *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.
- [4] Wang Y C, Ling R, Erker J C, *et al.* A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 169 - 177.
- [5] Schlauder G G, Desai S M, Zanetti A R, *et al.* Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV[J]. *J Med Virol*, 1999, 57: 243 - 251.
- [6] Schlauder G G, Frider B, Sookoian S, *et al.* Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina[J]. *J Infect Dis*, 2000, 182: 294 - 297.
- [7] Yin S, Tsarev S A, Purcell R H, *et al.* Partial sequence comparison of eight new Chinese strains of hepatitis E virus suggests the genome sequence is relatively stable[J]. *J Med Virol*, 1993, 41: 230 - 241.
- [8] Yin S, Purcell R H, Emerson S U. A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions[J]. *Virus Genes*, 1994, 9: 23 - 32.
- [9] Huang R T, Nakazono N, Ishii K, *et al.* II. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China[J]. *J Med Virol*, 1995, 47: 303 - 308.
- [10] 王佑春, 庄辉, 张华远, 等. 血清学标志阴性的非甲-戊型肝炎的病原学研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19: 109 - 112.
- [11] 李奎, 庄辉, 王佑春, 等. 从抗-HEV阴性的戊型肝炎病人血清中检测到1株HEV变异株[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20: 164 - 166.
- [12] Wang Y C, Zhang H Y, 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]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1675 - 1686.
- [13] Wang Y C, Zhang H Y, Li Z, *et al.* Detection of sporadic hepatitis E in China using immunoassays based on ORF2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4[J]. *J Clin Micro*, 2001, 39: 4370 - 4379.