

## 南京地区戊型肝炎病毒基因型鉴定和变异分析\*

程险峰<sup>1</sup>, 戴星<sup>2</sup>, 孟继鸿<sup>1\*\*</sup>, 张红梅<sup>1</sup>, 周镇先<sup>3</sup>, 丁福<sup>1</sup>, 梁久红<sup>1</sup>, 耿全林<sup>3</sup>

(1. 东南大学医学院病原生物学与免疫学系, 江苏南京, 210009; 2. 东南大学医学院附属中大医院皮肤科, 江苏南京, 210009; 3. 东南大学医学院附属南京市第二医院检验科, 江苏南京, 210003)

### Genotype Identification and Variation Analysis of Hepatitis E Virus Isolated in Nanjing, China

CHENG Xiaofeng<sup>1</sup>, DAI Xing<sup>2</sup>, MENG Ji-hong<sup>1\*\*</sup>, ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, ZHOU Zhen-xian<sup>3</sup>, DING Fu<sup>1</sup>, LIANG Jiu-hong<sup>1</sup>, GENG Quan-lin<sup>3</sup>

(1. Department of Microbiology and Immunology, Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Zhongda Hospital, Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, China; 3. The Affiliated Second Hospital of Nanjing, Medical College, Southeast University, Nanjing 210003, China)

**Abstract:** The objective of this study was to identify and analyze genotype distribution and genetic variation of *Hepatitis E virus* (HEV) isolated in Nanjing, China. RT-nPCR based on universal primers for multiple HEV genotypes was used to detect HEV RNA in 40 samples collected from patients with acute sporadic hepatitis E. PCR products were sequenced and analyzed with the LASERGENE and PHYLIP softwares. Fourteen out of the 40 samples were positive for RT-nPCR. The positive rate was 35%. All of the fourteen isolates were clustered into HEV genotype IV and were separated into two different subgenotypes. The nucleotide sequences of the HEV isolates of genotype IV presented higher variability when compared with the sequences of the Chinese isolates of HEV genotype I. Moreover, a new subtype of HEV genotype IV was discovered in this study.

**Key words:** Hepatitis E virus; Genotype; Sequence analysis; RT-nPCR

**摘要:** 为了解南京地区戊型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus*, HEV) 基因型的分布以及变异状况, 本研究采用逆转录套式聚合酶反应 (RT-nPCR) 的方法检测南京地区 40 份急性散发性戊型肝炎患者的粪便标本, 对 PCR 产物进行测序, 利用生物信息学软件比较核苷酸的同源性、遗传距离, 进行基因型和变异分析。40 份粪便标本中检测到 14 份阳性 HEV RNA, 检出率为 35%, 基因型均为 HEV IV 型, 且分属 2 个不同的亚型; 利用生物信息学软件对国内 I 型和 IV 型毒株加以比较, 发现 HEV IV 型毒株比 I 型变异程度高, 不同年份的 HEV IV 型毒株变异更大, 有新的亚型出现, 且变异有随时间推移而增大的趋势。

**关键词:** 戊型肝炎病毒; 基因型; 序列分析; 逆转录套式聚合酶链反应

中图分类号: R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)04-0468-04

戊型肝炎是一种经粪-口途径传播的急性传染病, 主要在一些发展中国家暴发流行或散发, 严重危害人类的健康。1986~1988 年我国新疆曾经发生戊型肝炎暴发流行<sup>[1]</sup>。

戊型肝炎病毒 (*Hepatitis E virus*, HEV) 是戊型

肝炎的病原体, 在全世界主要有 4 个基因型<sup>[2]</sup>: 以缅甸株为代表的第 1 基因型、以墨西哥株为代表的第 2 基因型、以美国株为代表的第 3 基因型和以中国株为代表的第 4 基因型。在以往的研究中, 庄辉等<sup>[3]</sup>发现我国戊型肝炎主要由 HEV 1 型引起。但近年王佑春等<sup>[4]</sup>

收稿日期: 2005-03-21, 修回日期: 2005-05-18

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30271231, 30271212); 江苏省自然科学基金 (KB2002053); 江苏省社会发展科技指导性计划 (BS2004506) 资助项目

作者简介: 程险峰 (1979-), 男, 安徽绩溪籍, 在读硕士, 研究方向为病毒感染与免疫。

\*\* 通讯作者: 孟继鸿 (1958-), 男, 江苏苏州籍, 教授, 博士生导师, 研究方向为病毒感染与免疫。

Corresponding Author. Tel: 025-83272454, E-mail: jihongmeng@263.net

分别从北京、河南、辽宁收集的急性戊型肝炎病人血清中分离出了 I 型病毒,并可分成 4 个基因亚型,提出目前我国散发性戊型肝炎的病原以 HEV I 型为主、II 型为辅的观点。

江苏各地 HEV 基因型的分布状况至今未有报道。我们利用逆转录-套式聚合酶链反应 (RT-nPCR) 对南京地区 40 例急性散发性戊型肝炎患者的粪便标本进行 HEV RNA 检测,对其中的 14 份 RT-nPCR 阳性产物进行测序,并与已知的基因型代表株进行比较,发现南京地区急性散发性戊型肝炎均由 HEV I 型引起,而且 HEV I 型之间变异较大,出现了新的亚型。

## 1 材料与方法

### 1.1 HEV 代表株和序列

HEV 缅甸株 (Bur)、巴基斯坦株 (Pak) 为基因型 I,墨西哥株 (Mex) 为基因型 II,美国株 (US) 为基因型 III,得自法国巴斯德研究所和美国疾病控制和预防中心<sup>[5]</sup>。另外从 GenBank 中获取 20 株 HEV 基因序列,11 株为全基因序列,包含 I 型;9 株 II 型毒株 (Cl-C9) 为部分基因序列,来源于北京。

### 1.2 临床标本来源

自 2001 年 6 月至 2003 年 9 月,从南京市第二人民医院收集临床诊断为急性戊型肝炎患者的粪便标本 40 份。患者入院后血清中 HEV IgM 抗体阳性,其他肝炎病毒感染的血清学标志均为阴性。

### 1.3 引物的设计

根据 GenBank 中已知的 HEV 核苷酸序列,利用不同的基因型以及亚型的保守区合成的一组通用性

引物,位于 HEV ORF2 区域,能有效的扩增 HEV I、II、III 型的基因片段,引物序列见文献<sup>[6]</sup>。

### 1.4 RNA 抽提及 RT-nPCR 检测

粪便标本制成 10% PBS 悬液,用震荡器使其充分混匀,4℃ 14 000 r/min 离心 15 min 后弃沉渣。具体抽提和检测方法参见文献<sup>[7]</sup>。

### 1.5 序列的测定和分析

将 PCR 阳性产物用 QIA GEN 公司的纯化试剂盒纯化后进行测序,由美国疾病控制和预防中心肝炎部和上海申能博彩生物公司完成序列的测定。采用分子生物学软件 LASERGENE 和 PHYLIP 软件包进行序列的同源性比较、遗传距离计算以及基因进化树的绘制。

## 2 结果

### 2.1 HEV RNA 的检测

应用基于 HEV 不同基因型通用性引物的 RT-nPCR 方法对 HEV 不同基因型代表株 Bur、Pak、Mex、US 毒株以及南京地区 40 例急性散发性戊型肝炎患者的粪便标本进行检测,结果 HEV I、II、III 型代表株均阳性;南京地区标本 14 份阳性,阳性率为 35%,其中 3 份标本 (NJ32、NJ35、NJ37) 采集于 2003 年,1 份 (NJ27) 采集于 2002 年,其余 10 份均为 2001 年标本。

### 2.2 基因分型

将 14 份南京阳性标本的核苷酸序列与 HEV 各基因型代表株以及 GenBank 中 11 例登录全基因序列的 HEV 毒株的相应区段比较。从基因进化树 (图 1) 可以看到,本实验中所得的 14 例阳性标本与

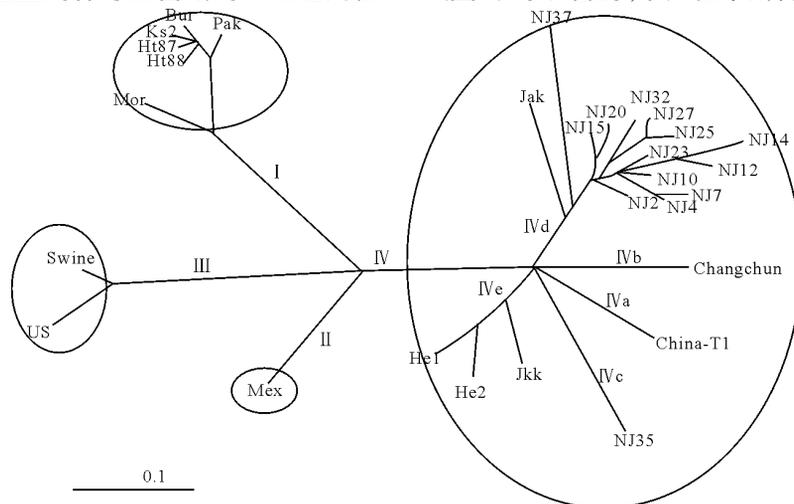


图 1 基于 HEV ORF2 区域的基因进化树及基因分型

Fig 1 Phylogenetic tree and genotyping of HEV based on an ORF2 fragment

Note: Ks2 (L25595), Ht87 (D11092), Ht88 (L08816), Mor (A Y230202), Swine (AF082843), He-1 (AB097812), He-2 (AB080575), Jak (AB074915), Jkk (AB074917), Changchun (AB018537), China-T1 (AJ272108)

来自日本、长春(Changchun)、北京(China-T1)等地的6例基因型毒株形成一个较大分支,提示这14份标本均属于HEV型。在HEV型这一主分支中还可以分为5个亚分支,代表5个不同的基因亚型,其中China-T1、Changchun、NJ35各形成一个亚分支,分别为a、b、c亚型;南京其余13例与日本1例(Jak)归为d亚型,日本的3例毒株(Jkk、He1、He2)形成一个亚分支,为e亚型,比以往报道的4个亚型又增加了1个新的亚型。

### 2.3 序列分析

我们进一步将毒株序列进行了核苷酸同源性和遗传距离的分析(表1)。南京14例型毒株序列的同源性为82.3%-98.3%,遗传距离为0.017-0.229,说明南京IV型毒株的变异程度较高。此外,通过对新疆(Ks2、Ht87、Ht88)与北京(C1-C9)的I型毒

株比较,发现这12例毒株虽然分离时间相隔14年,但两地毒株之间的同源性仍在90%左右,遗传距离为0.074-0.110;而北京(China-T1)、长春(Changchun)和南京型毒株尽管分离年代均在2000-2003年之间,但北京与南京的毒株的同源性在83.4%-89.7%,遗传距离为0.112-0.195;长春与南京的同源性为82.9%-89.7%,遗传距离0.113-0.192;北京与长春的同源性为85.7%,遗传距离为0.163。说明分布于我国不同地域的HEV IV型毒株变异较大。即使在同一地区,南京2001年10例毒株之间大部分的同源性均在90%以上,遗传距离小于0.100;而仅2年以后,南京2003年的3例毒株间的同源性就降低至82.3%-92.6%,遗传距离增至0.079-0.229。说明HEV IV型毒株的变异有随时间变迁而增加的趋势。

表1 16株中国型HEV毒株的核苷酸同源性和遗传距离的比较

Table 1 Comparison of nucleotide homology and genetic distance of 16 Chinese isolates of HEV genotype

		Nucleotide homology (%)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Genetic distance	1	-	96.0	95.4	94.3	93.7	98.3	93.1	93.1	92.6	92.0	94.3	93.7	85.1	92.6	88.0	86.9	NJ2
	2	0.041	-	94.9	96.0	94.3	95.4	93.7	91.4	94.3	93.7	94.9	94.3	85.7	91.4	89.7	89.1	NJ4
	3	0.047	0.054	-	94.3	94.9	94.9	94.3	92.0	92.6	90.9	95.4	94.3	85.1	92.0	88.0	88.6	NJ7
	4	0.060	0.041	0.060	-	94.9	93.7	96.6	93.1	94.9	92.0	96.6	93.1	88.6	91.4	86.9	86.3	NJ10
	5	0.066	0.060	0.054	0.054	-	93.1	94.9	93.1	93.1	93.7	97.1	92.6	88.6	90.3	87.4	89.1	NJ12
	6	0.017	0.047	0.054	0.066	0.072	-	93.7	94.9	92.0	91.4	94.9	94.3	85.7	93.1	87.4	87.4	NJ14
	7	0.078	0.066	0.060	0.034	0.054	0.066	-	93.1	91.4	90.0	95.4	93.1	88.0	91.4	88.9	87.4	NJ15
	8	0.078	0.094	0.085	0.078	0.072	0.054	0.078	-	91.4	90.3	94.9	94.3	89.1	92.6	85.1	87.4	NJ20
	9	0.078	0.060	0.079	0.054	0.072	0.085	0.093	0.093	-	91.4	93.7	92.6	88.6	89.1	86.3	85.7	NJ23
	10	0.085	0.066	0.099	0.085	0.066	0.092	0.103	0.106	0.092	-	93.1	90.3	88.0	88.0	89.7	89.7	NJ25
	11	0.060	0.054	0.046	0.034	0.023	0.054	0.046	0.054	0.066	0.072	-	93.1	89.7	90.9	88.0	88.6	NJ27
	12	0.066	0.060	0.060	0.072	0.080	0.060	0.072	0.060	0.080	0.099	0.072	-	86.3	92.6	86.3	88.6	NJ32
	13	0.169	0.159	0.169	0.127	0.153	0.159	0.138	0.119	0.127	0.138	0.113	0.152	-	82.3	83.4	86.9	NJ35
	14	0.079	0.092	0.085	0.092	0.111	0.085	0.092	0.079	0.113	0.117	0.097	0.079	0.229	-	86.3	82.9	NJ37
	15	0.133	0.112	0.133	0.148	0.141	0.140	0.148	0.171	0.154	0.113	0.133	0.154	0.195	0.145	-	85.7	C-T1
	16	0.149	0.120	0.127	0.156	0.120	0.141	0.141	0.141	0.163	0.113	0.127	0.126	0.148	0.192	0.163	-	Ch

Note: C-T1: China-T1(AJ272108), Ch: Changchun(AB108537)

### 3 讨论

本研究采用RT-nPCR法对40例急性散发性戊型肝炎病人粪便进行了HEV的检测,结果显示仅有14例为HEV RNA阳性,其阳性率为35%。这是因为戊型肝炎患者病毒血症持续时间较短,至病后2周,仅少部分患者病毒血症持续至病后3周

以上,且HE患者粪便HEV RNA阳性率与抗-HEV IgM阳性率成反比。发病后第4周抗HEV IgM阳性率达到93.8%,而HEV RNA阳性率仅有9.4%<sup>[8]</sup>。本实验中采用的样本均来自抗HEV IgM阳性病人,因此造成了HEV RNA检出率较低。

HEV基因组全序列测定费时费力,目前普遍采用RT-nPCR扩增HEV基因组部分区段进行基

因分型。但由于不同实验室设计的 PCR 引物不同,导致用于基因型分型的扩增序列的长度和位置不同,致使不同实验室的分型结果难以比较。在本研究中,我们虽然对南京的测序标本按现行方法进行了基因型分型,但我们明显感到 HEV 基因型分型缺乏统一的标准。这是 HEV 研究中亟待解决的一个重要问题。

我国新疆 1986 年暴发的戊型肝炎大流行,其病原体均属于 HEV I 型<sup>[1]</sup>;1996 年庄辉等<sup>[4]</sup>对我国 14 个城市急性散发性戊型肝炎的调查发现主要为 HEV I 型感染,但存在变异株;2001 年王佑春等<sup>[4]</sup>对中国北京和上海的急性散发性戊型肝炎的基因型分布调查发现:急性散发性戊型肝炎中 HEV I 型感染占较大比例, II 型毒株感染的比例已有很大的下降。我们利用 HEV 基因型通用性引物对南京 40 份标本进行基因片段扩增,获得 14 份阳性标本。通过分析发现,我们所分离的这 14 例毒株均属于 HEV I 型,无一例基因 II 型毒株,表明南京地区戊型肝炎均由 HEV I 型引起。随着时间的推移,II 型毒株是否会在我国逐渐消失值得引起大家的关注。

各国学者在对 HEV 基因型分型研究的同时,曾注意到 HEV 基因型具有地域分布的特征,认为同一地区的 HEV 较保守<sup>[2]</sup>。但随着越来越多 II 型毒株的被分离,我们发现这种现象发生了改变。我们在南京所分离的 14 例毒株,就同时存在 2 个亚型,尤其是 NJ35 号标本,与其它 13 例标本的同源性只有 82.3%,遗传距离达 0.229,说明同一地区的 HEV 毒株同样存在较大变异。同时我们还通过对

南京不同年代毒株序列的比较,发现 2001 年 10 例标本内部同源性较高,在 92%以上,均属于同一个亚型;而 2003 年 3 例毒株之间同源性较低,形成了 2 个亚型,提示 HEV II 型的变异可能有随时间推移而增大的趋势。因此对 II 型 HEV 基因序列的变异状况以及抗原表位特点的进一步探讨,对研制灵敏度高、特异性强的诊断试剂以及开发 HEV 疫苗均有很重要的意义。

## 参考文献

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, *et al.* Epidemiology of hepatitis E in China[J]. *Gastroenterol Jap*, 1991, 26:135-138.
- [2] Worm H C, van der Poel W H, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview[J]. *Microbes Infect*, 2002, 4: 657-666.
- [3] 庄辉,李奎,朱万孚,等. 我国 14 个城市散发性戊型肝炎病毒部分核苷酸序列分析[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80: 893-896.
- [4] 蓝海云,王佑春,李卓,等. 戊型肝炎病毒 II 型在 300 例急性肝炎中的感染比例[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22: 276-278.
- [5] Meng J H, Pillot J, Dai X, *et al.* Neutralization of different geographic strains of the hepatitis E virus with anti-hepatitis E virus-positive serum samples obtained from different sources [J]. *Virology*, 1998, 249: 316-324.
- [6] 张兰芳,丁福,孟继鸿,等. 大学新生戊型肝炎病毒现/近期隐性感染的筛查[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(2):108-110.
- [7] 周镇先,戴星,孟继鸿. 通用性引物 RT-nPCR 扩增不同基因型戊型肝炎病毒基因组的探讨[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2004, 23:141-144.
- [8] 王占英,鲁学恒,庄辉,等. 戊型肝炎血清 HEV-RNA 的动态变化及其意义[J]. *中国医科大学学报*, 2000, 29: 137-139.