

苏南地区 1b 型丙型肝炎病毒包膜区变异进化研究*

许 可¹, 蒋春梅¹, 邓小昭², 丁伟良³, 谈永飞³, 张 云^{1,2**}

(1.南京医科大学流行病学与卫生统计学系, 江苏南京 210029; 2.南京军区军事医学研究所, 江苏南京 210002; 3.宜兴市第一人民医院, 江苏无锡 214200)

Study On the Variation of E2 of 1b Hepatitis C Virus in the South of Jiangsu Province

XU Ke¹, JIANG Chun-mei¹, DENG Xiao-zhao², DING Wei-liang³, TAN Yong-fei³, ZHANG Yun^{1,2**}
(1. Department of Epidemiology in Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. The institute of Military Medicine, Nanjing Command, Nanjing 210002, China; 3. Yixing people's hospital, Wuxi 214200, China.)

Abstract: The aim of this study was to investigate the variation of the second envelope glycoprotein E2 of *Hepatitis C Virus* strains from the south of Jiangsu province and to learn about the relationship between HCV quasispecies and alanine aminotransferase (ALT). Identification genotypes of sera samples obtained from 166 donors who were HCV positive was carried out by the PCR with type specific primers based on the sequence of 5' non-coding region (5' NCR). Forty-three chronic 1b type hepatitis C patients who had not received any antiviral therapy were categorized into two groups according to the ALT level. HCV quasispecies diversity were determined by RT-PCR single-strand conformational polymorphism analysis of E2/NS1. Ten strains of HCV E2 were sequenced. A phylogenetic tree of HCV E2 sequences was constructed by using CLUSTAL W and PHYLIP. Out of total 166 patients, 102 were HCV RNA positive in which 86 patients had genotype 1b(86/102; 84.3%), 6 patients had genotype 2 (6/102; 5.9%), 5 patients was 1b/2 mixed types (5/102; 4.9%) and a genotype could not be determined in 5 patients. Phylogeny confirmed that variation in the HCV E2 region was not random but with several conservative gene sequences and amino acid in fixed sites. The quasispecies bands numbers for 43 strains were significantly different with 2.54 ± 1.05 and 4.48 ± 2.14 , respectively. Logistic regression analysis also found the quasispecies diversity was an influencing factor in ALT level. Type 1b was the predominant HCV genotype in this area. Phylogenetic trees of HCV E indicated that HCV strains in south of JIANGSU province was close to the ones from SHANGHAI and JAPAN. Some conservative sites were fixed in HCV E region. Quasispecies diversity was correlated with ALT level.

Key words: *Hepatitis C virus*; E2; Phylogenetic tree; Quasispecies; ALT

摘要: 本研究旨在了解本地区丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 基因型构成的前提下, 分析 1b 型丙型肝炎病毒包膜 2 (second envelope glycoprotein E2) 区的变异和种系进化, 并研究其准种变异与临床肝病活动度的关系。对宜兴市人民医院收集的抗 HCV 抗体阳性患者 166 名, RT-PCR 方法检测 HCV RNA, HCV RNA 阳性患者采用型特异性引物分型法确定病毒基因型; 选择其中未经干扰素治疗的 43 例 1b 型慢性丙型肝炎患者的血清标本, 扩增 E2 区, 从中选取肝硬化患者 4 例, 慢性非肝硬化患者 6 例的 E2 区 PCR 产物纯化测序, 序列采用 CLUSTALW 与 GENBANK 上多株不同型别的 HCV 序列进行比对分析, 结果采用 Phylip 软件构建遗传进化树; 并观察 E2 区高

收稿日期: 2006-01-09, 修回日期: 2006-02-17

* 基金项目: 江苏省高校自然科学研究指导性计划项目(03KJD330144); 江苏省自然科学基金项目(BK2004011)。

作者简介: 许 可 (1979-), 女, 江苏省籍, 硕士研究生, 从事传染病流行病学研究。

** 通讯作者: 张 云 (1949-), 男, 江苏省籍, 研究员, 硕士, 从事传染病流行病学研究。Corresponding author. Tel: 025-84507094, Email: ZHANGYUN111@sohu.com.

变区 1 (HVR-1) 的氨基酸 (amino acid, aa) 残基序列的变异特征; 采用单链构象多态性垂直电泳检测 43 例患者个体内 HCV E2 区准种的变异情况, 比较不同肝病活动度患者准种变异情况。结果表明本地区 HCV 以 1b 型为主 (84.3%), 对 E2 区基因序列和氨基酸序列变异的分析显示其变异具有一定的规律性, 种系进化树提示本地区 HCV 病毒序列与上海、湖南、日本等地的 HCV 株有较近的亲缘性。43 例患者中 ALT 高于正常的丙型肝炎患者准种复杂程度明显高于 ALT 正常者 ($P < 0.05$)。故本地区 HCV 基因变异符合中国东南部的特点, 基因变异与临床肝病活动度具有相关性。

关键词: 丙型肝炎病毒; 包膜区 2; 进化树; 准种; 丙氨酸转氨酶

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0333-06

丙型肝炎病毒感染者在全球范围内已超过 2 亿, 丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 感染的显著临床特点是 80% 以上的患者转为慢性化。HCV 感染的慢性化机制尚不清楚, 目前人们把研究的重点转向丙型肝炎病毒 (HCV) 本身^[1], 认为可能与 HCV 基因型、易变异的生物特性等相关。尤其是刺激宿主产生中和抗体的包膜区存在核苷酸序列的高变区 (HVR), 此区段的高度变异使得病毒能够逃避宿主的免疫应答, 导致疾病的慢性转归^[2], 故研究 HCV 包膜区准种复杂性及其基因序列和结构变异有重要的意义。本研究从 1b 型丙型肝炎病毒包膜区的基因序列变异、高变区的氨基酸残基、准种的多样性等方面, 研究 HCV 的生物学特点, 试讨论其与临床的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 166 例 HCV 抗体阳性 (上海实业科华生物技术有限公司酶联免疫法 HCV 抗体检测试剂盒检测) 患者作为确定本地区 HCV 主要基因型的基础人群。平均年龄为 49.44 岁, 其中男性 110 人, 女性 56 人; 结合流行病学调查和临床病史, 根据中华医学会传染病与寄生虫分会和肝病分会, 2000 年病毒性肝炎诊治方案中诊断标准慢性丙型肝炎患者 119 人, 急性丙型肝炎患者 26 人, 丙型肝炎肝硬化患者 21 人, 并结合肝脏超声、CT 和核磁共振确诊。选取其中未经抗病毒治疗的慢性丙型肝炎 43 名进行 E 区变异分析。

1.2 HCV RNA 阳性检测

1) 提取 HCV RNA 及逆转录抗 HCV 阳性血清 250 μ L, 采用异硫氰酸胍一步法提取 RNA, TRI reagent BD 为 MRC 产品。取 10 μ L RNA 溶液, 采用六聚体随机引物, 于 20 μ L 体系 37 $^{\circ}$ C 1h 逆转录为 cDNA, RT 试剂盒、dNTP 均为 MBI 产品。2) 巢式 PCR 检测 HCV RNA, 引物根据 5' UTR 设计, PCR 方法为: 取 5 μ L cDNA 于 50 μ L 体系做第一轮 PCR, 步骤为

95 $^{\circ}$ C 5min, 95 $^{\circ}$ C 1min, 40 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 循环; 取第一轮 PCR 产物 3 μ L 做第二轮 PCR, 采用 25 μ L 体系, 步骤同前。扩增产物为 (99~269nt) 171bp。

1.3 HCV 基因分型

选择 HCV RNA 阳性标本, 取巢式 PCR 外引物扩增所得的产物, 采用 1、1b、2、3 型特异性引物分别在 4 个 PCR 体系中进行第二轮扩增, PCR 步骤同前, 产物用 2.5% 的琼脂糖 80V 电泳 1h, 凝胶成像仪观察结果。

1.4 序列分析和进化树构造

Nested RT-PCR 扩增 E2 高变区, PCR 步骤除退火温度为 48 $^{\circ}$ C 外其余同上, 6 名非肝硬化慢性丙型肝炎患者和 4 名肝硬化丙型肝炎患者的 E 区扩增产物用 1.5% 琼脂糖胶切割回收, 经纯化 (上海华舜生物纯化试剂盒), 送 invitrogen 公司测序, 序列采用 CLUSTAL W 程序进行比对分析, Phylip 软件 neighbor-joining 距离法构建进化树, 各株 HCV 来源在进化树中标明。采用 DNASTAR 预测 HVR-1 的蛋白序列, 比较不同来源的 HCV 株 HVR-1 蛋白序列差异。

用于 HCV RNA 检测的引物为:

F1: 5'-GCCATGGCGTTAGTAYGAGT-3'

R1: 5'-TTTCGCRACCCAACRCTACT-3'

F2: 5'-AGTGTCTRCAGCCTCCAGG-3'

R2: 5'-ACCCAACRCTACTMGGCTAG-3'

用于基因分型的引物序列为:

F3: 5'-AGTGTCTRCAGCCTCCAGG-3'

R3(1): 5'-GGGGCACGCCCAAATCTCCA-3'

R3(2): 5'-CAAATGACCGGRCATAGAGT-3'

R3(3): 5'-GCACGCCCAAATTTCTGGGT-3'

R3(1b): 5'-ACTACTCGGCTAGCAGTCTC-3'

用于包膜区扩增的引物序列为:

F4: 5'-GCCATTTATCAGGTCACCGCATGGC-3'

R4: 5'-GCTCCGGGCACCCGACGAGTTGAA-3'

F5: 5'-GCTTGGGATATGATGATGAACTGGTC-3'

R5: 5'-GGTGTGGAGGGAGTCATTGCAGTT-3'

1.5 准种分析

E2 区引物扩增的 PCR 产物经变性成单链, 上样于 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 低于 25℃ 条件下电泳 5 人, 在含 0.5% 的溴化乙锭的 TBE 缓冲液中染色 30min。凝胶成像分析仪观察结果, 获得准种条带数目。由于单链加样, 条带数>2 为复杂准种。

1.6 统计方法

使用 SPSS11.5 统计软件, 对 ALT 正常和异常的两组病例的性别、年龄采用 X² 和两样本 t 检验进行均衡性检验, 多因素 Logistic 回归分析准种复杂情况与丙型肝炎患者肝病活动度的关系。以 ALT 是否在正常范围为二分类结局变量, 以患者性别, 年龄, 准种变异数目的复杂与否, 是否存在肝硬化为自变量进行 Logistic 回归分析, 考察准种变异情况对丙型肝炎患者的肝脏损害有无作用及影响程度。

2 结果

2.1 HCV 基因分型结果

166 份血清中, 有 102 份为 HCV RNA 阳性。HCV 基因分型采用 simmonds 型特异性引物分型法, 根据型引物扩增的相应产物判断 HCV 基因型别。结果 1b 型 86 份占 84.3%, 2 型 6 份占 5.9%, 1b/2 型的混合感染 5 份占 4.9%, 不能分型的 5 份占 4.9%。故本地区 HCV 以 1b 型为主。

2.2 测序结果

HCV E2 区的 PCR 扩增产物为 351bp。因样本为同一地区同一基因型的患者, 且均未接受过抗病毒治疗, 故认为可从中随机选取其中 10 例患者的 HCV E1 区进行测序, 基本能够反映本地区 HCV 的序列变异特征, 被选测序的患者具体情况见表 1, HCV E2 区测序的结果经序列比对如图 2 所示; 可以看到不同患者来源的 HCV E2 区的核苷酸差异较大, 变异度较大的区域集中在 HVR-1(1491-1573nt), 但从这十株不同来源的 HCV 序列变异可以看到很多位点的保守性, 保守碱基序列占 64.8% (204/质 315); 而 HVR-1 的蛋白序列比较发现第 2 位苏氨酸 (T)、6 位甘氨酸 (G)、23 位甘氨酸 (G)、24 位脯氨酸 (P)、26 位谷氨酰胺 (Q)、27 位赖氨酸 (K) 均为保守序列, 不同来源的 HCV 株完全一致, 7 位甘氨酸 (G)、18 位丝氨酸 (S)、20 位苯丙氨酸 (F) 也高度保守, 而脯氨酸 (P) 只出现在 23 位甘氨酸的两侧, 见图 1。

2.3 进化树分析结果

虽然 E2 区为 HCV 核酸序列变异最大的区段, 但以此区和不同来源的 HCV 株 E2 区序列构建系统进

化树, 仍然可以看到亲缘关系最近的序列是中国东南部城市以及日本所研究的 HCV 1b 株, 见图 3。

表 1 测序的 10 例患者基本情况

Table1 Details of ten HC patients who's HCV E2 were sequenced

No.	Sex	Age	Genotype	ALT	Quasispecies	Cirrhosis(Y/N)
1	M	39	1b	32.50	4	N
2	M	66	1b	145.50	3	N
3	F	55	1b	31.60	5	N
4	F	55	1b	31.60	5	N
5	F	55	1b	118.20	2	Y
6	F	72	1b	32.20	2	Y
7	M	57	1b	59.00	9	Y
8	M	39	1b	119.80	4	N
9	M	66	1b	145.50	3	N
10	M	84	1b	164.70	2	Y

```

1  RTHTVGGTQGHTTRGLTSLFSLGPSQK
2  RTHTVGGTQGHTTRGLTSLFSLGPSQK
8  QTRVSGGTQGYTTRGLVLSLFSFGPSQK
9  TTHVSGGSAAYTRGFTHFFTSGPSQK
3  TTYTTGGAQGLNLSFMSLFTPGPAQK
4  TTYTTGGAQGRSILSLTFFSVGPNQK
5  DTIVTGGAQSRALQRFTSFFSPGPTQK
7  TTHVTGGALGRFTFSLTSLFSPGPAQK
6  HTHVTGAAQGRATAGLASLFSFGPSQK
10 RTILSGEYVGRRLTGLSSLFSTGPDQK
    *  *          # ##### **  **
    
```

图 1 10 例患者 HCV HVR-1 氨基酸序列

Fig.1 HCV HVR-1 amino acid of the 10 HC patients

*conservative site; #relative conservative site

2.4 准种分析结果

每个样本均获得清晰的准种条带, 条带数为 2~10 条, 但每个样本仅有 1 株为主序列。按照 ALT 正常与否分为两组, 比较这两组的基本情况如表 2; Logistic 回归分析结果显示, 年龄、性别、基因型与 ALT 指标没有相关性, 准种的复杂与否对 ALT 有显著影响, OR 值为 11.429, 可信区间为 2.449~53.342, 具有统计学意义。

表 2 不同肝损害程度的 43 例未经干扰素治疗的丙型肝炎患者组成情况

Table2 Dates of 43 HC patients without γ -IFN treatment

	ALT≤40U/L	ALT>40U/L	
Number of patients	13	31	
Age	55.3±17.1	53.9±14.7	P>0.05
Sex (M/F)	7/6	22/9	P>0.05
Genotype (1b/2a/1b*2a/?)	10/0/2/1	28/3/0/0	
Quasispecies (x±s)	2.54±1.05	4.48±2.14	P<0.05
Percentage of patients (quasispecies>2)	23.07%	77.42%	P<0.05
Percentage of cirrhosis patients	7.69%	19.35%	

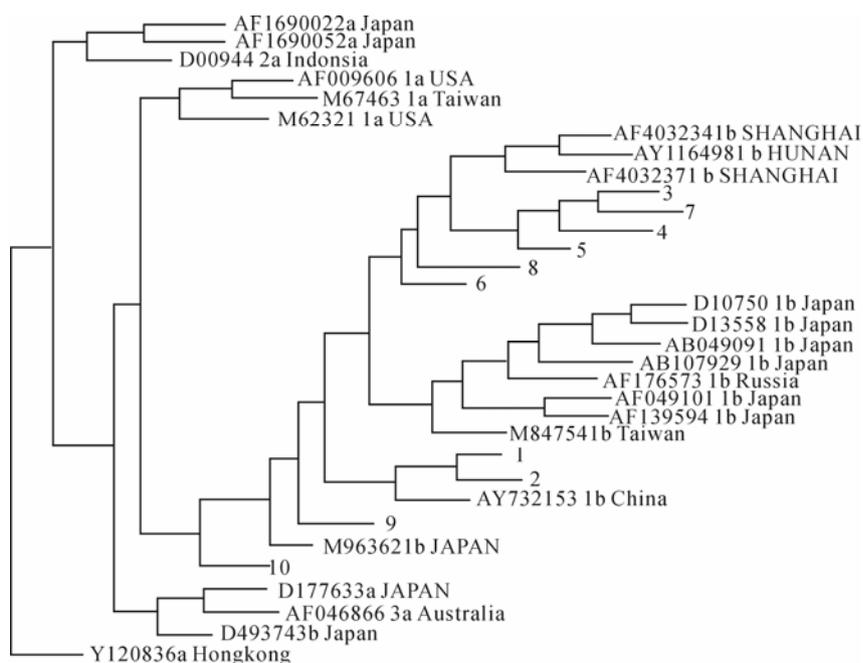


图 3 不同型别和亚型的 HCV 株构建的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree constructed by E2 of different genotype and subtype HCV sequences using CLUSTAL W and PHYLIP

3 讨论

我们首先对本地区收集的166份抗HCV阳性的血清进行了HCV RNA检测, 对HCV RNA阳性的标本进行基因分型, 明确本地区HCV以1b型为主, 占到84.6%, 仅有少量的2型, 符合中国东南部地区的HCV特征。国内外大量临床试验已证实, 1b型是抗病毒治疗中持续有效应答率最低的基因型^[3], 对HCV 1b型的生物学特性亟待深入研究。

E 蛋白是细胞免疫和体液免疫的重要靶抗原, 编码包膜糖蛋白的 E 区是 HCV 基因组中变异最大的部位; 其中 E2 区 N 端的 HVR-1 含有产生中和抗体的表位所以我们对 1b 型 HCV 的 E2 区进行了序列分析。对十例患者的 HCV E2 区的测序结果显示此区段序列虽高度变异, 但仍存在一定程度的稳定性, 64.8%的碱基位点仍然保守, 非高变区的变异度仅为 25.5%, 而在 HVR-1 的 N 端也是相对稳定的。在 1590-1598 碱基位点是糖基化位点所在, 本研究中此段序列虽不完全保守, 但均为同义突变, 氨基酸序列高度保守为 N-G-S, 推测与 HVR₁ 内抗原修饰有关, 推测这些保守序列对包膜区的结构形成、识别受体、刺激产生机体的免疫反应等环节存在重要的意义; 同时, 我们对包膜区的 HVR-1 进行了蛋白序列的预测, 发现氨基酸残基变异程度也是不同的, 除了公认的保守位点第 2 位 Thr、6 位 Gly、23 位 Gly^[4]外, 我们发现本地区的 HCV 在

HVR-1 的 24 位脯氨酸 (P)、26 位谷氨酰胺 (Q)、27 位赖氨酸 (K) 氨基酸残基亦为高度保守, 此外 20 位苯丙氨酸 (F)、7 位甘氨酸 (G)、18 位丝氨酸 (S)、也相对保守, 而脯氨酸 (P) 只现于 23 位甘氨酸 (G) 的两侧, 这与 Jackson 等^[5]报道一致, 而脯氨酸与多肽转角的形式有关, 推测这些保守位点为抗原构成提供了基本框架。Cys、Trp 在本区极为稀少, Asp、Met 出现频率也较低, 但富含 Gly、Thr、Ser 等极性氨基酸, 分析可能与此区内含有抗原表位有关。可见 HCV 的变异并不是完全随机的, HVR1 各位点某种氨基酸的出现有特定概率, HCV 的生存存在一些生物学限制, 即能够逃避机体免疫选择的不同序列的 HCV 数目是有限的。Shang 等报道在 2、23、26 位氨基酸保守的 HVR1 多肽具有毒株交叉抗原性^[6], 提示本区内有保守的抗原表位, 如果这些推测得到证实, 就可为设计含有限数目的不同 HVR-1 序列的基因疫苗提供了可能。

系统进化树是近年来在分子生物学研究中广泛应用的生物信息学手段, 能够较好地根据同源性来评估物种或分子之间的进化关系^[7]。我们从 GENBANK 上获取了多株不同来源, 不同型别的 HCV 基因序列, 和我们测序所获得的 10 株 HCV E2 片段, 采用 Phylip 软件, Neighbor-joint 算法, 对 HCV 的 E 区进行系统进化树分析, 结果显示本地区 HCV 株与上海、湖南等地的株型亲缘性较接近, 证实了 E 区的变异并非随机, 仍然能够显示型别和

地区的特异性。

国内外众多研究认为 HCV 变异的原因是“免疫逃避”，HCV 以序列变异但又高度同源的准种 (quasispecies) 形式存在，通过序列变异导致中和表位的抗原性改变而逃避机体的免疫清除。所以我们对 HCV 的 EI 区变异作了进一步研究，未经抗病毒治疗的患者 HCV 为自然状态下的毒株变异，本研究对其包膜区准种的研究提示准种的复杂性与患者肝病活动度相关，ALT 超过正常值的患者组准种复杂性显著高于 ALT 在正常范围内的患者组。多因素分析也显示肝病活动度与准种复杂与否有关。国内外研究均提示准种的复杂性受到宿主的免疫压力等因素的影响，免疫压力较大的宿主体内 HCV 准种较复杂^[8]，而较强的免疫反应必然导致肝损害较严重，但究竟孰因孰果，需要进一步的随访资料。对包膜区的基因序列变异的分析。有待进一步加强同临床关系的研究，以获取更多的信息，为感染 HCV1b 型的丙型肝炎治疗提供基础研究资料。

Reference

- [1] Li Men-dong, Nie Qin-he (李梦东, 聂青和). Further clinic pragmatic research should be emphasized on chronic hepatitis C [J]. World J Gastroenterol (世界华人消化杂志), 2004, 12:2365-2368.
- [2] Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, *et al.* Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection [J]. J Gen Virol, 2004, 85: 39-46.
- [3] Orlent H, Vrolijk JM, de Man RA, *et al.* The treatment of hepatitis C [J]. Ned Tijdschr Geneesk. 2003, 147 (25): 1208-1213.
- [4] Puntoriero G, Meola A, Lahm A, *et al.* Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants [J]. EMBO J, 1998, 17 (13): 3521-3533.
- [5] Jackson P, Petrik J, Alexander G S M. Reactivity of synthetic peptide representing selected sections of hepatitis C virus core and envelope protein with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma [J]. J Med Virol, 1997, 51: 67-79.
- [6] Shang D, Zhai W, Allain J P. Broadly cross-reactive, high-affinity antibody to hypervariable region 1 of the hepatitis C virus in rabbits [J]. Virology, 1999, 258: 396-405.
- [7] Zhao Guo-ping (赵国屏). Bioinformatics (生物信息学) [M]. Beijing: Science press. 2002, 104-105.
- [8] Cabot B, Martell M, Esteban JI, *et al.* Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver [J]. J Virol, 2000, 74: 805-811.