

戊型肝炎病毒基因型与戊型肝炎患者临床表现的分析

徐 斌 惠 威 王 征 何佳丽 魏琳琳 窦爱华 郭新会

摘 要 **目的** 观察不同基因型(1型或4型)的戊型肝炎病毒感染的急性戊型肝炎患者临床表现、血清生化指标以及临床转归是否存在差异。**方法** 收集酶联免疫吸附实验方法检测抗 HEV IgM 阳性,并用简并引物进行反转录巢式 PCR 方法扩增 HEV ORF2 的部分基因序列,经核酸序列分析进行基因型分析的急性戊型肝炎患者病例 92 例。**结果** 92 例 HEV RNA 阳性的急性戊型肝炎患者中感染 HEV1 型 21 例、HEV4 型 71 例。比较两组不同基因型的戊型肝炎患者的临床表现发热、消化道症状等与血清生化检查,均无显著性差异。**结论** 不同基因型的戊型肝炎病毒感染患者临床表现没有差异。

关键词 病毒性肝炎戊型 基因型 核酸 序列

Analysis of Genotype and Clinical Manifestations in Patients with Hepatitis E. Xu Bin, Hui Wei, Wang Zheng, He Jiali, Wei Linlin, Dou Aihua, Guo Xinhui. Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To observe whether the different genotypes (type 1 or type 4) are different in patients with acute hepatitis, such as serum biochemical parameters, clinical performance, and clinical outcomes. **Methods** A total of 92 patients with acute hepatitis by enzyme-linked immunosorbent assay method detect anti HEV IgM positive. HEV ORF2 partial gene sequences was amplified by reverse transcription-nested PCR method using degenerate primers. Nucleic acid sequence analysis was used to genotype analysis. **Results**

Of 92 cases HEV RNA-positive patients with acute hepatitis, 21 cases of the infection HEV1 type, HEV4 71 cases. Compare two groups of different genotypes of hepatitis E in patients with clinical manifestations of fever, gastrointestinal symptoms and serum biochemical tests, there was no significant difference. **Conclusion** No difference in different genotypes of hepatitis E virus infection in patients with clinical manifestations.

Key words Hepatitis E; Genotype; Nucleic acid; Sequence

戊型肝炎病毒是引起戊型肝炎发生的病原体,目前世界报道该病毒主要有 4 个基因型,即以缅甸株为代表的 1 型,以墨西哥株为代表的 2 型,以美国株为代表的 3 型和以中国株为代表的 4 型。已有研究报道我国主要的戊型肝炎病毒感染是 1 型和 4 型^[1,2]。近年各地报道感染 1 型少见,感染 4 型报道较多。对于不同基因型的戊肝病毒感染患者临床表现是否存在差异报道不多。笔者对在北京佑安医院住院的急性戊型肝炎患者中,92 例曾进行过 HEV 基因序列分析患者的临床分析,报道如下。

对象与方法

1. 研究对象:2002~2004 年以及 2008 年笔者医院住院急性戊型肝炎患者中曾进行过 HEV 基因序列分析的 92 例戊型肝炎患者进行回顾性临床分析,男性 69 例,女性 23 例,年龄 25~77 岁。临床诊断根据 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案中

有关急性肝炎诊断指标和戊型肝炎的诊断。急性戊型肝炎诊断根据流行病学史、临床症状、体征、化验及病原学检测结果综合判断,并排除其他疾病。患者持续几天以上但无其他原因可解释的症状,如乏力、食欲减退、恶心等,伴有肝肿大并有压痛、肝区叩击痛,血清化验主要表现为 ALT 升高;血清抗-HEV 阳转或效价由低到高,或抗-HEV 阳型 >1:20,或斑点杂交法或反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测血清和(或)粪便 HEV RNA 阳性。21 例 HEV 1 型感染与 71 例 HEV4 型感染急性戊型肝炎患者进行了 18 项主要反映肝脏功能损伤的指标血清生化检查包括:谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、球蛋白(GLO)、转氨酶(GGT)、碱性磷酸酶(AIP)、胆酸(TBA)、胆碱酯酶(CHE)、前白蛋白(APLA)、尿素(UREA)、尿酸(UA)、肌酐(CREA)、血糖(GLU)、二氧化碳结合力(CO₂CP)、凝血酶原活动度(PTA);应用两组独立样本的 *t* 检验方法进行比较。每次收集患者入院后第 2 天的静脉血 5ml,分离血清。常规检测抗 HAV-IgM、HBV 5 项标志物、抗 HCV 抗体、抗 HEV-IgM 检测及生化检查 ALT、AST、TBIL 等指标。抗 HEV-IgM 阳性的标本,保存血清置于 -80℃ 冰箱冻存,避免反复冻融,分别用于 HEV 基因序列分析。

2. 试剂:①以万泰生物药业有限公司的戊型肝炎病毒

基金项目:首都医科大学基础和临床课题(2010JL10)

作者单位:100069 首都医科大学附属北京佑安医院肝病内分泌科

通讯作者:郭新会,电子信箱:xinxin0797@sina.com

IgM 抗体诊断试剂(酶联免疫法);②甲型肝炎抗 HAV-IgM 诊断试剂;罗氏药业有限公司产品;③乙型肝炎 5 项检测试剂;ELISA 法检测乙型肝炎病毒 5 项标志物;④丙型肝炎抗体检测试剂;意大利索林生物药业有限公司产品,以上检测严格按照使用说明书进行操作。AMV 反转录酶、Taq、dNTP、pMD18-T 载体为 TaKaLa 公司产品,购自大连宝生物工程有限公司。

3. HEVRNA 提取:在 1.5ml 离心管中先后加入 120μl 裂解液,加入 100μl 血清样本,剧烈震荡 2min,室温静置 10min。pH 4.2 乙酸钠 12μl,苯酚-氯仿-异戊醇 120μl,颠倒混匀。12000r/min 离心 20min 取上清液体,加入等体积异丙醇,-70℃ 沉淀 30min,离心 12000r/min 离心 4℃ 20min,弃上清,用-20℃ 预冷的 75% 乙醇洗 1 次,14000r/min 离心 2min,倒掉管中的液体,室温干燥 10min。加入含有 RNASin 的双蒸水 30μl 溶解 RNA 沉淀,备用。

4. 方法:反转录巢式 PCR 方法扩增 HEV ORF2 的部分基因序列,延用 PCR 简并引物外引物为:F1:5'-aag tat gcg cag tac cgg gtt gac-3';R1:5'-ccc tta tcc tgc tga gca ttc gtc-3';内引物为:F2:5'-gtg atg tgg tgc ata cat ggc-3', R2:5'-agc cga cga aat gaa ttc tgt-3'^[3]。巢氏 PCR 反应条件取 HEV RNA 纯化液 8μl,外反向引物 1μl,70℃ 水浴 10min,转入冰浴 5min。20μl 反转录反应体系包括:5×AMV Buffer 4μl,10mmol/L dNTP 1μl,Rnasin 20U,AMV 20U,补 DEPC 水至 20μl,42℃ 水浴 1h,95℃ 煮沸 5min,立即置冰浴中。第 1 次 PCR 反应:反转录反应液 5μl,10×PCR Buffer 5μl,10mmol/L dNTP 0.5μl,外向引物 F1,R1 各 0.5μl,Taq DNA 聚合酶 2U,加水至 50μl。进入 PCR 循环,95℃ 1min,50℃ 45s,72℃ 1min,35 个循环后 72℃ 反应 7min。第 2 次 PCR 反应:取第 1 次 PCR 反应物 5μl 做为模板,利用内引物 F2、R2 进行第 2 次扩增,反应体系与第 1 次 PCR 相同,仍按上述条件进行 PCR 循环。反应结束时 72℃ 延伸 7min。

5. 目的基因的克隆及测序:内引物扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切下将预计大小的目的电泳条带(348bp),并用北京鼎国生物技术发展中心的 DNA 凝胶回收试剂盒按说明书进行纯化,将纯化产物克隆到 pMD18-T 载体然后转化到大肠杆菌感受态细胞大肠杆菌 JM109 内,少量提取质粒,酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆,送北京鼎国、利嘉泰成科技有限公司测序,测序仪为 ABI 3730XL。

6. 统计学方法:资料分析采用 SPSS 11.0 统计分析软件,两组独立样本的 *t* 检验、 χ^2 方法进行数据分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:92 例急性戊型肝炎患者,其中男性 69 例,女性 23 例,年龄 25~77 岁,平均年龄 43 岁,职业分布:农民 5 例,工人 17 例,干部教师 18 例,自由职业 26 例,其他 26 例。入院时 85 例患者自诉有发热,尿黄症状,7 例没有上述症状。92 例急性戊型肝炎

炎患者中 21 例是 1 型 HEV 感染,71 例是 4 型 HEV 感染。不同 HEV 基因型感染患者临床症状比较,没有显著性差异(表 1)。

表 1 92 例急性戊型肝炎患者临床症状比较[n(%)]		
HEV 基因型 临床症状	HEV1 型 (n = 21)	HEV4 型 (n = 71)
发热	20(95.23)	68(91.54)
头痛	8(38.09)	26(36.62)
恶心	20(95.23)	67(94.37)
呕吐	18(85.71)	60(84.51)
乏力	21(100)	71(100)
纳差	21(100)	71(100)
尿黄	20(95.23)	68(91.54)
灰白便	0(0)	0(0)

2. 血清生化检查:21 例 HEV 1 型感染与 71 例 HEV4 型感染急性戊型肝炎患者进行了 18 项主要反映肝脏功能损伤的指标血清生化检查,应用两组独立样本的 *t* 检验方法进行比较(表 2)。

表 2 两组急性戊型肝炎患者血清 18 项 肝功能血清生化检查比较				
生化指标	HEV 基因型	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i>
ALT(U/L)	1 型	1319.06 ± 392.89	0.161	0.873
	4 型	1276.59 ± 916.97		
AST(U/L)	1 型	938.99 ± 739.93	0.459	0.648
	4 型	817.15 ± 856.15		
TBIL(μmol/L)	1 型	160.78 ± 127.21	0.467	0.643
	4 型	140.72 ± 136.24		
DBIL(μmol/L)	1 型	101.34 ± 79.26	0.733	0.467
	4 型	82.23 ± 82.14		
TP(g/L)	1 型	62.62 ± 5.94	0.199	0.843
	4 型	67.02 ± 6.04		
ALB(g/L)	1 型	36.83 ± 4.18	0.952	0.346
	4 型	38.53 ± 5.73		
GLO(g/L)	1 型	29.79 ± 7.33	0.783	0.437
	4 型	28.51 ± 4.01		
GGT(U/L)	1 型	244.42 ± 114.26	0.191	0.849
	4 型	253.14 ± 129.28		
ALP(U/L)	1 型	154.31 ± 58.69	-1.71	0.095
	4 型	193.89 ± 62.01		
TBA(μmol/L)	1 型	241.42 ± 124.57	0.841	0.406
	4 型	204.03 ± 116.06		
PALB(g/L)	1 型	122.66 ± 62.56	1.103	0.277
	4 型	100.00 ± 52.19		
CHE(U/L)	1 型	5588.66 ± 1626.79	0.494	0.624
	4 型	5931.34 ± 1887.78		
PTA(%)	1 型	79.94 ± 26.79	1.352	0.183
	4 型	90.13 ± 20.56		

每项检验两个独立样本的均数的 *t* 值比较均没有统计学差异

3. 入院后临床治疗比较:戊型肝炎是一种自限性疾病,但是由于急性肝炎患者入院时肝损伤较严重,本观察两组平均 ALT 水平为 1319.06U/L、1276.59U/L,高于正常 30 倍以上;TBIL 水平为 160.78U/L、140.72U/L,高于正常 8 倍以上。住院患者进行常规的保肝治疗和休息,92 例患者血清 PTA 在住院治疗期间未出现明显下降情况。

4. 急性戊型肝炎患者(1 型与 4 型)住院时间及恢复情况比较:21 例 HEV1 型和 71 例 HEV4 型急性戊型肝炎患者平均住院 45.65 天、46.80 天,出院时血清生化指标检测 ALT、AST、TBIL 和 DBIL 恢复正常,达到临床痊愈诊断标准出院(痊愈指标为血清 ALT 水平到正常值 2 倍以下,TBIL 微量)(表 3)。

讨 论

HEV 感染引起患者发生病毒血症,随后机体发生细胞免疫与体液免疫反应以清除病毒。由于 HEV 尚未被成功培养,所以对 HEV 的发病机制研究受到一定的限制。

表 3 92 例急性戊型肝炎患者临床转归的分析

年份(年)	病例数		住院时间(天)		临床转归	
	1 型	4 型	1 型	4 型	1 型	4 型
2002	9	15	43.3	44.7	痊愈	痊愈
2003	8	6	46.6	47.8	痊愈	痊愈
2004	4	6	46.8	47.9	痊愈	痊愈
2008	0	44	45.9	46.8	痊愈	痊愈
合计	21	71	45.6	46.8	痊愈	痊愈

戊型肝炎病毒是单股正链 RNA 病毒,基因组全长 7500bp,全基因组含有 3 个互相重叠的开放阅读框(ORF);ORF1 主要编码与病毒 RNA 复制有关的非结构蛋白,ORF2 编码病毒衣壳蛋白,ORF3 的产物即 HEV 的结构支架与病毒特异性免疫反应有关,HEV 的主要抗原表位均位于 ORF2 和 ORF3 区域。根据戊型肝炎病毒全基因组序列差异,将 HEV 分为 4 个主要的基因型;但是戊型肝炎病毒只有 1 个血清型。现阶段戊型肝炎的实验室诊断多根据肝功能检查和酶联免疫法检测抗 HEV-IgM/IgG。现有的抗 HEV 抗体诊断试剂可以检测各型 HEV 基因型感染的血清抗体,也可以用 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法检测 HEV RNA^[3,4]。已有报道通过上述检查对戊型肝炎病毒感染进行明确的临床诊断,通过 PCR 扩增产物进行 HEV 基因序列分析可以明确感染 HEV 的基因型。

已有的报道显示 HEV1 型和 2 型多引起 HE 的

流行或暴发,HEV3 型和 4 型主要是引起散发性戊型肝炎发生。Ohnishi 等^[5]报道了 1994 年 1 月~2003 年 12 月间 9 名 HEV3 型和 7 例 HEV4 型感染的急性患者,发现 HEV4 型感染患者 ALT 峰值高,凝血酶原活动度低,病毒载量高,住院时间长,并发肝性脑病率高。Inoue 等^[6]对引起急性重型和急性自限性戊型肝炎患者血清进行了病毒全基因序列分析,结果显示:从重型戊型肝炎患者中分离的 4 型 HEV 病毒株,均有在开放读码框架 1 的 3148 位点的变异;该位点的变异有可能增加了 mRNA 的转录,导致 HEV 载量高。

在我国戊型肝炎病毒感染人类主要报道为 1 型与 4 型,不同的基因型是否可能引起患者临床表现的差异尚无报道。由于近年来戊型肝炎病毒 1 型感染在我国报道不多,笔者今年的研究也未发现 HEV1 型感染的临床病例,因此,应用回顾性研究方法对 2002 年以来于笔者医院住院的戊型肝炎患者中曾经进行过 HEV 基因序列分析的 92 例病例进行临床分析。其中 21 例 HEV1 型、71 例 HEV4 型感染的急性戊型肝炎患者的临床表现、血清生化分析、住院后的疾病进展情况等进行分析,均未见存在差异,尚不能得到两种 HEV 基因型病毒感染存在差异的证据。但是,在本研究中,所有的病例均为急性肝炎患者,没有重型戊型肝炎病例,可能与 Inoue 报道的引起急性重型戊型肝炎 HEV 病毒株均有在开放读码框架 1 的 3148 位点的变异存在差异有关。对于重型戊型肝炎临床病例发生比较少见,是否在不同基因型感染患者中存在差异仍有待研究。

参考文献

- 王佑春,庄辉,张华远,等.戊型肝炎病毒变异株的血清学特征[J].中华肝脏病杂志,1999,7(1):24-25
- Wang Y, Zhang H, Li Z. Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using Immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4 [J]. Journal of Microbiology, 2001, 39(12):4370-4379
- Zhao C, Li Z, Yan B, et al. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China [J]. J Med Virol, 2007, 79(12):1966-1973
- Zhang F, Li X, Li Z, et al. Detection of HEV as a novel marker for the diagnosis of hepatitis [J]. J Med Virol, 2006, 78(11):1441-1448
- Ohnishi S, Kang JH, Maekubo H, et al. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan [J]. Hepatol Res, 2006, 36(4):301-307
- Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E [J]. J Med Virol, 2006, 78(4):476-484

(收稿日期:2012-09-20)

(修回日期:2012-11-13)