

丙型病毒性肝炎基因分型及临床意义

黄艳秋, 史昌河

(青岛大学医学院传染病学教研室, 山东 青岛 266071)

[摘要] 丙型病毒性肝炎病原体为丙型肝炎病毒(HCV),以输血为主要传播途径。HCV基因组为单股正链RNA病毒,有较高的复制率及变异率,在人体内呈准种分布。目前根据 Simmonds 命名系统可将其分为 6 个基因型。HCV 基因分型在丙型肝炎的流行病学研究、病毒载量、病情转归及抗病毒治疗等方面均有重要意义。特别在抗病毒治疗方面,HCV 基因分型是制定抗病毒治疗方案,预测抗病毒疗效的重要依据。

[关键词] 肝炎,丙型;基因分型;综述

[中图分类号] R512.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2012)05-0468-03

丙型肝炎是临床工作中较为常见的一种病毒性肝炎,病原为丙型肝炎病毒(HCV),感染后可引起肝脏急、慢性炎症,极少数发展为重症肝炎。输血及血制品曾是丙型肝炎最重要的传播途径,但近年来,随着筛查方法的改进,此种传播方式已得到明显控制,目前注射、器官移植、血液透析、性传播及母婴传播亦较常见。人类对 HCV 普遍易感,而且感染后高达 80% 的病人转为慢性感染,如果不进行及时和正确的抗病毒治疗,有相当比例的病人会发展为肝硬化、肝癌和肝衰竭,产生严重的临床后果。丙型肝炎在全球感染率为 3%,因此全世界约有 1.7 亿人曾感染过 HCV^[1],但各国的感染率不尽相同,我国 HCV 感染率约为 3.2%,属于高流行区。

1 HCV 基因组的结构和功能

1.1 HCV 基因组的基本结构

HCV 基因组为单股正链 RNA,可分为 3' 非编码区、5' 非编码区及编码区(ORF)3 个区域,ORF 可编码一个病毒蛋白前体,在宿主和蛋白酶裂解的共同作用下该蛋白前体可生成至少 10 种蛋白。根据所编码蛋白的功能不同,编码区又分为结构基因和非结构基因,其中结构基因编码的 4 种蛋白包括核心蛋白、包膜蛋白 1(E1)、E2、P7,这些蛋白参与病毒的组装,又被称为结构蛋白。非结构基因翻译编码的蛋白有非结构蛋白 2(NS2)、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B,这些蛋白主要参与病毒复制,故又称非结构蛋白或功能蛋白。HCV 基因组的变异率高,这一特点使之在人体内呈现准种分布,基因组中 E1 和 E2 区是变异率最高的区域,而 5' 及 3' 非编码区则是最保守的区域。

1.2 HCV 各区段基因组的结构和功能

①5'UTR:它是 HCV 基因组中最保守的区域。HCV 5' UTR 包括 4 个保守的结构区域,其中结构域 II~IV 构成内部核糖体进入位点(IRES),IRES 能够在不依赖于 HCV 蛋

白作用的前提下启动下游 HCV 编码区基因的翻译,因而抗病毒药物的靶向定位点常为丙型肝炎病毒的 IRES。②3'UTR:3'UTR 位于 HCV 3' 末端,由 200~235 个核苷酸组成。其中可变区具有基因型的特异性,在此区域内不同基因型之间存在核苷酸序列的差异。不同的基因型其 HCV 多聚 U 区的长度亦不相同。部分研究结果显示,不同的 HCV 型甚至同型不同株型之间 3'UTR 的交换都会导致 HCV 不能复制。因而得出结论,只有当病毒具有完整的 3'UTR 才能发挥其正常的作用。另有研究结果显示,宿主细胞内部所固有的多聚嘧啶束结合蛋白或自身抗原若与 HCV 基因组中的 3'UTR 结构部分(尤其是 X 尾)结合,丙型肝炎病毒核糖核酸的翻译效率和稳定性均可增强。③核心蛋白:丙型肝炎病毒基因组的 342~914 核苷酸位点系核心蛋白基因的位点。编码核心蛋白,核心蛋白的功能之一是糖蛋白作用组装出完整的 HCV 病毒颗粒。在核心蛋白的氨基端内,高度保守的抗原表位含量非常丰富。核心蛋白在与病毒 RNA 靶向结合的前提下可调节 HCV 基因组的翻译,并且核心蛋白的基因调节作用与原发肝癌的发生关系密切,主要因为核心蛋白可抑制 P53 启动因子这一重要肿瘤抑制基因的活性。核心蛋白在人体感染 HCV 后通过对大量基因的调控作用抑制了机体的免疫应答,从而促进了 HCV 对肝细胞及外周血单核细胞等人体细胞的持续感染,此外核心蛋白能加速感染细胞内脂质小体的形成,诱导肝细胞变性。④包膜区:在 HCV 结构中,病毒的外膜常由包膜蛋白构成。第 915~1490nt 位点和 1491~2789 位点共同构成了包膜区基因,分别编码 E1 和 E2 蛋白。其中,E2 氨基端具有高度变异性,HVR1 和 HVR2 均为 E2 氨基端的两个高变区。丙型肝炎病人的 E2 突变增加常由于干扰素治疗诱发,HVR1 序列也会在慢性感染的形成过程中不断改变。E2 结构中还含有若干个中和抗体表位,至少有一个中和抗体表位位于 HVR1。由此可知,免疫反应常以 E2 为主导靶向目标。此外,病毒受体、CD81、低密度脂蛋白等物质的受体均可与 E2 蛋白发生相互作用,故 E2 蛋白具备的另一个重要作用就是介导病毒附着和进入感染细胞内部。因此,在研究和开发 HCV 疫苗这一方向上,深入地研究膜

[收稿日期] 2012-04-12; **[修订日期]** 2012-08-09

[基金项目] 青岛市卫生科技发展计划资助项目(2010WSZD08)

[作者简介] 黄艳秋(1979-),女,硕士研究生,主治医师。

[通讯作者] 史昌河(1963-),男,副主任医师,硕士生导师。

蛋白的抗原变异及宿主应答规律是一个重要的切入点。

⑤非结构区: NS2、NS3、NS4 和 NS5 这 4 个共计可编码 6 种 NS 蛋白的区段构成了非结构基因。NS2 基因编码 217 个氨基酸,在非结构区中比较,各分离株间 NS2 区同源性最低,其具体的生物学效应不明。631 个氨基酸由 NS3 基因编码,同时具有多种酶的活性,如 NS2-3 蛋白酶活性、丝氨酸蛋白酶活性等,其中,RIG-1a 和 TLR3 信号系统可被 NS3 的丝氨酸蛋白酶有效抑制,使宿主细胞的防御反应受到严重影响,故丙型肝炎病人应用丝氨酸蛋白酶抑制剂可有效抑制病毒的复制。由此可知,这一靶位的发现为抗病毒药物研发提供了强大的助力。HCV 基因组的 5313~5474nt 位点是 NS4A 蛋白的基因位点,NS4A 蛋白与 NS3 可形成稳态的复合蛋白,这样可调节丝氨酸蛋白酶的活性。NS5 基因编码蛋白为 NS5a 及 NS5b,在 HCV 多种蛋白的成熟和 RNA 复制中 NS5a 发挥了重要作用,同时对宿主细胞的多种基因表达加以调控,并影响干扰素的疗效,这就是为什么干扰素治疗丙型肝炎病毒成功率低的原因之一。

2 HCV 的基因分型及命名

我国于 2004 年颁布的《丙型肝炎防治指南》中明确指出^[2],在制定抗病毒治疗个体化方案以及判定治疗难易程度时,HCV-RNA 的基因分型有着重要的意义。由于 HCV 的高复制率以及复制时的高突变率,因而不同 HCV 毒株间基因组有较高的变异。这也是 HCV 基因组分型的基础^[3]。HCV 基因组呈现高度异质性,当不同的 HCV 基因组间的核苷酸变异率大于 28% 时,可将其分为不同的型,当不同的 HCV 基因组间的核苷酸序列变异率在 10%~28% 之间时,则将其归为不同的亚型,而准种则是由同一亚型内的病毒基因组的微小差异造成的^[4]。目前 Simmonds 命名系统较为普遍接受。对来自全球的所有 HCV 毒株基因序列进行比较分析,可将它们分为 6 个基因型及至少 80 多个基因亚型^[5]。我国存在 1a、1b、2a、2b、3a 等基因型,以 1b 和 2a 为主,占 70%~80%。

3 HCV 基因型的地理分布特征

HCV 基因型分布有显著的地域性差异^[6]。基因型 1a 是首先被鉴定出核苷酸序列的 HCV 基因组。常经由输血传播的基因型 1b 是现阶段最常见的基因型别,在亚洲大部(如中国、日本等)和欧美国家,70% 以上的 HCV 感染病例均为 1b 型,而 2a 和 2b 这两种基因型在上述地区所占比例仅在 10%~30% 左右。基因型 3 在印尼、印度及东南亚等地区占有较高比例。在南非丙型肝炎人群中基因型 5 所占比例接近 40%。部分东南亚地区国家、中国大陆西南边境和港澳台地区以基因型 6 为主体。在我国南方地区基因型 1b 的感染率占总感染人群的 90% 以上,自南向北感染 2a 型人群呈递增趋势。不过,近年来我国的 HCV 基因型感染分布态势有了新的变化。谢尧等^[7]调查了我国南北地区 9 个城市 219 例慢性丙型肝炎病人,对这些病人所感染的

HCV 进行分型后表明,HCV 基因型在我国南北地区的分布和流行无显著性差异。张帆等^[8]对重庆地区 77 例丙型肝炎病人的采血样品进行 Core/E1 区的测序和进化树分析,结果显示,基因型 1b 在重庆地区广为流行(38%),并按照比例递减排列依次检测出基因型 6a(19%)、3a(16%)、3b(14%)和 2a(13%),未发现 1b 与 2a 型。张立新等^[9]对山东地区 96 例慢性丙型肝炎病人的血清 HCV 基因分型检测结果显示,山东地区 HCV 感染以非 2(1b)型占优势,2(2a)型感染较少,分析还显示不同的感染途径之间基因型分布没有差异。LU 等^[10]对中国昆明、广州等 9 个地区共 148 例丙型肝炎病人血液样本进行多基因区段测序并予以进化树分析,结果表明,在珠三角地区范围内 1b 仍是主要流行基因型,6a 型检出率上升,成为该地区第二位流行基因型,而 2a 型则下降至第三位。此外,昆明和广州的相关部门还相继发现了基因型 6 的亚型(6v)感染人群。而西南地区基因型分布特点则表现为以 1b 型为主,2a、3a、3b、6a 等多种基因型共存。雷华等^[11]进行了昆明地区病毒基因分型研究,其研究共选取了 176 份 HCV-RNA 阳性血清标本,结果显示,3b(43.18%)、3a(22.73%)、1b(18.75%)为昆明地区 HCV 感染的主要基因型,且基因型 3b 感染居主体地位。叶莺^[12]对福建省丙型肝炎流行特征研究显示,福建省 HCV 流行型主要为 6a 及 1b 型,其次为 2a 及 3b 型,但不同人群间流行型别有差异,吸毒人群中 3b 亚型占有较大比例,无偿献血人群前两位也是 6a 及 1b 型,但第三位由 2a 型取代 3b 型。临床病例中流行主要型别为 1b 型。这种地域分布特征并不是一成不变的,受到感染率的增加、传播途径的改变、移民等相关因素的影响,一些国家和地区的病毒基因型和亚型的分布亦会随之而发生改变。

4 HCV 基因型与 HCV-RNA 载量

HCV 基因型与 HCV-RNA 载量间的关系目前还存在争议。研究显示,非 1 型病人的血清 HCV-RNA 含量低于 1 型^[13]。BLATT 等^[14]研究了美国 6 807 例丙型肝炎病人的基因型及血清 HCV-RNA 含量,结果显示,2 型和 3 型感染者其血清 HCV-RNA 含量低于基因型 1 型感染者。该研究还发现,基因型 3b、3a 感染者体内病毒含量低于 1b 型。但同时也有研究结果表明,基因 3 型丙型肝炎病人血清中的病毒含量显著高于其他基因型^[15]。在前文所述雷华等^[11]对昆明地区丙型肝炎病人基因分型及其临床意义研究中,除了进行病毒基因分型研究外,还定量检测了基因型为 3b、3a 和 1b 病人血清中 HCV-RNA 含量,并将其进行分组比较,结果表明,基因型 1b 具有较高的病毒载量,基因型 3b 次之,基因型 3a 含量最低,3 组间病毒载量差异具有统计学意义。但也有学者认为 HCV 基因型与 HCV-RNA 载量间无明显相关性^[16]。周友乾等^[17]对 113 例分别感染 1b、2a、3a、3b 和 6a 共 5 种基因亚型的病人进行 HCV-RNA 载量与基因型和抗病毒疗效的关系研究表明,治疗前血清 HCV-RNA 载量与 HCV 基因型无关,治疗前高血清 HCV-

RNA 载量者与低 HCV-RNA 载量者完成治疗后获得 SVR 的比例,无论在所有病人,还是在 HCV 1 型或非 1 型感染者中均无统计学差异,血清 HCV-RNA 载量对聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的疗效无明显影响。刘志英等^[18]对北京地区慢性丙型肝炎和肝硬化病人进行了病毒基因型的分布及病毒载量的比较,结果表明,基因型 1 型的病毒载量较非 1 型高,提示治疗前病人体内的病毒载量与 HCV 的基因型有一定关系,但不一定是其主要的影响因素。

5 HCV 基因型与病情转归及抗病毒疗效的关系

目前,针对 HCV 基因型与肝损伤、丙型肝炎病程和转归的关联,相关学者都有着独到的研究结果。但多数的研究结果支持 1b 型 HCV 感染与肝脏病变的严重程度有着确切的关联。慢性丙型肝炎病人 30%~70% 伴有肝脂肪变性,并且肝脂肪变性与肝纤维化、肝硬化和肝癌的发生有一定关系。普遍认为肝细胞内过量的脂质堆积是诱发肝纤维化,进而导致肝硬化的重要因素之一,并且肝脏脂质化改变是导致肝癌发生的重要危险因素之一。CONJEEVARAM 等^[19]研究 HCV 1 型感染者时发现,和不存在肝脂肪变性的病人相比,并发肝脂肪变性的病人其肝组织炎症坏死及纤维化评分均升高,因此可以预测并发肝脂肪变性的丙型肝炎病人更易进展为重症肝炎、肝硬化或肝癌等严重肝脏疾病。

我国丙型肝炎防治指南指出,丙型肝炎抗病毒治疗的目的是清除或持续抑制体内的 HCV,以改善或减轻肝损害,阻止进展为肝硬化、肝衰竭或肝癌,并提高病人的生活质量。2011 年欧洲肝病研究学会丙型肝炎防治指南指出,目前对于初治病人而言,基因 1 型 HCV 感染者采取批准剂量的聚乙二醇干扰素(PEG-IFN)与利巴韦林联合治疗 48 周后,40%~54% 可获得 SVR;基因 2 或 3 型 HCV 感染者给予批准剂量的 PEG-IFN 与利巴韦林联合治疗后 65%~82% 可获得 SVR,在获得的持续病毒学应答率上,HCV 2 型感染者高于 3 型^[20]。马明磊等^[21]研究结果显示, α -干扰素对 1 型、2 型病人均有良好疗效,不同剂量治疗组间比较,疗效无显著性差异。

总之,HCV 基因分型检测,对于丙型肝炎的流行病学研究、病情的转归及应用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗疗效的预测均有重要的临床指导意义。

[参考文献]

- [1] ALBERTI A, BENVENIGNU L. Management of hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2003,38 (Suppl 1):S104-118.
- [2] 中华医学会肝病学会,中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南[J]. *中华预防医学杂志*, 2004,38(3): 210-215.
- [3] 彭翼飞. 丙型肝炎病毒基因分型研究进展[J]. *国外医学:分子生物学分册*, 2000,22(5):312-316.
- [4] SIMMONDS P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on[J]. *J Gen Virol*, 2004,85(Pt 11):3173-3188.
- [5] HINO K, YAMAGUCHI Y, FUJIWARA D, et al. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study[J]. *J Viral Hepat*, 2000,7(1):36-42.
- [6] NGUYEN M H, KEEFFE E B. Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9[J]. *Clin Liver Dis*, 2005,9(3):411-426.
- [7] 谢尧,赵辉,邬蔚妮,等. 不同感染途径慢性丙型肝炎病人 HCV 基因型分布的差异[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004,18(3):247-250.
- [8] 张帆,王小红,王宇明,等. 重庆地区 HCV 基因亚型的分布状态[J]. *第四军医大学学报*, 2005,26(14):1253-1256.
- [9] 张立新,王磊,徐皖苏,等. 山东地区丙型肝炎病毒的基因型及血清学分型的研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 2005,21(4):215-216.
- [10] LU L, NAKANO T, HE Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. *J Med Virol*, 2005,75(4):538-549.
- [11] 雷华,戴静毅,柏保利,等. 昆明地区丙型肝炎病人基因分型及其临床意义[J]. *肝脏*, 2011,16(1):48-49.
- [12] 叶莺. 福建省丙型肝炎流行特征及体外细胞培养模型的构建与应用[D]. 福州:福建医科大学, 2011.
- [13] YOO T W, DONFIELD S, LAIL A, et al. Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease[J]. *J Infect Dis*, 2005,191(1):4-10.
- [14] BLATT L M, MUTCHNICK M G, TONG M J, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6 807 patients with chronic hepatitis C in the United States[J]. *J Viral Hepat*, 2000,7(3):196-202.
- [15] SARACCO G, SOSTEGNI R, GHISSETTI V, et al. Hepatitis C virus genotypes in a non-cirrhotic Italian population with chronic hepatitis C: correlation with clinical, virological and histological parameters. Results of a prospective multicentre study[J]. *J Viral Hepat*, 2000,7(2):124-129.
- [16] KUCKOZTAS M F, OZGUNES N, YAZICI S. Investigation of the relationship between hepatitis c virus (HCV) genotypes with HCV-RNA and alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis c patients[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2010,44(1):111-115.
- [17] 周友乾,尹凤鸣,冯经华. 丙型肝炎病毒载量与基因型和抗病毒疗效的关系研究[J]. *实用肝脏病杂志*, 2011,14(5):340-343.
- [18] 刘志英,魏红山,戴旺苏,等. 北京地区丙型肝炎病人的丙型肝炎病毒基因分型[J]. *中华流行病学杂志*, 2005,26(2):148-149.
- [19] CONJEEVARAM H S, KLEINER D E, EVERHART J E, et al. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2007,45(1):80-87.
- [20] 游宏声,金生. 2011 年欧洲肝病研究学会丙型肝炎防治指南推荐意见介绍[J]. *实用肝脏病杂志*, 2011,14(4):307-308,320.
- [21] 马明磊,薛卫东,孙伟,等. 两种剂量 IFN α -1b 治疗慢性丙型肝炎的效果观察[J]. *齐鲁医学杂志*, 2001,16(3):241.