

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.01.005

## 新疆汉族、维吾尔族丙型肝炎感染者 HCV 基因型研究\*

陈兆云<sup>1</sup>, 谢娜<sup>2</sup>, 张朝霞<sup>1</sup>, 孟存仁<sup>1</sup>, 顾挺<sup>1</sup>, 赵建梅<sup>1</sup>, 张晨<sup>3△</sup>

(1. 新疆医科大学第一附属医院检验中心, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆医科大学第五附属医院, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** **目的** 了解新疆不同地区汉族和维吾尔族(以下简称维族)丙型肝炎感染者丙型肝炎病毒(HCV)基因型的特征, 为新疆丙型肝炎的诊断和治疗提供依据。**方法** 对 380 份汉族和维族丙型肝炎感染者血清样本先进行荧光定量 PCR 检测病毒载量, 载量大于  $1 \times 10^3$  copies/mL 的再采用 PCR-反向点杂交法进行 HCV 基因分型。**结果** 基因分型确定 355 份样本, 成功分型率为 93.4%, 汉族和维族基因型检出率 1b 型分别为 59.91%、69.92%, 2a 型分别为 30.17%、12.20%, 3a 型分别为 5.60%、8.13%, 3b 型分别为 3.88%、8.94%。新疆乌鲁木齐和其他地区丙型肝炎感染者中, 维族、汉族病例分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且乌鲁木齐和其他地区男性、女性病例分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。乌鲁木齐地区病例中, 维族、汉族男性感染者 2a 型和女性感染者 1b、3b 型差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。新疆其他地区, 仅 2a 型男性维族、汉族感染者发病有差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其他基因型差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 新疆地区汉族和维族丙型肝炎感染者 HCV 基因型分布与国内大多数地区不同, 汉族以 1b、2a 型为主, 而维族以 1b 型为主, 其次是 2a、3a、3b 型。

**[关键词]** 新疆; 丙型肝炎; 基因型**[中图分类号]** R512.63**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0014-03

## Hepatitis C virus genotyping of Han and Uygur patients in Xinjiang Uygur autonomous region\*

Chen Zhaoyun<sup>1</sup>, Xie Na<sup>2</sup>, Zhang Zhaoxia<sup>1</sup>, Meng Cunren<sup>1</sup>, Gu Ting<sup>1</sup>, Zhao Jianmei<sup>1</sup>, Zhang Chen<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Center for Diseases Control and Prevention of Xinjiang Uygur, 830011, China; 3. the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the genotyping characteristics of Han and Uygur patients with hepatitis C virus(HCV) in Urumqi and other area of Xinjiang, and provide information for diagnosis and treatment. **Methods** Totally 380 samples of Han and Uygur patients virus load were detected by real-time PCR, with the load greater than  $1 \times 10^3$  copies/mL, HCV genotyping was carried out by PCR-reverse dot blot hybridization. **Results** A total of 355 samples(93.4%) was genotyped successful. Type 1b of Han and Uygur were 59.91%, 69.92%, type 2a were 30.17%, 12.20%, type 3a were 5.60%, 8.13% and type 3b were 3.88%, 8.94%. In Urumqi and other areas, significant difference of patient distribution, male and female were found between Han and Uygur patients(all  $P < 0.05$ ), In Urumqi, type 2a had significant difference between Uygur and Han male patients, type 1b, 3b had significant difference in female patients( $P < 0.05$ ). In other areas except Urumqi, type 2a had significant difference between Uygur and Han man( $P < 0.05$ ), other genotypes were not found difference( $P > 0.05$ ). **Conclusion** HCV genotyping of Uygur and Han patients in Xinjiang is different with the majority areas in China, type 1b and 2a are the main infectious virus in Han, and type 1b is the main infectious virus in Uygur, followed by type 2a, 3a, 3b.

**[Key words]** Xinjiang; hepatitis C; genotype

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄热病毒科, 颗粒外有脂质包膜, 是一种高度异质性的单股正链 RNA 病毒。通过对 HCV 进行基因序列分析发现, 其株间存在很大差异, 因此 HCV 基因分型得到同行的认同<sup>[1-3]</sup>。目前至少有 Kanazawa 系统、Okamoto 系统、Chan 系统、Simmonds 4 种不同的 HCV 基因型命名系统<sup>[4]</sup>, 在第 2 届 HCV 与相关病毒国际讨论会议上制订了统一的命名系统——Simmonds 基因分型系统。按此命名系统目前 HCV 有 6 种基因型(1~6)和 11 种基因亚型(1a~c, 2a~c, 3a~b, 4a, 5a, 6a)<sup>[5]</sup>。HCV 基因型与疾病严重程度存在相关性<sup>[6]</sup>。HCV 基因分型对监测 HCV 基因型的变化、追踪传染源、分析流行趋势, 以及对 HCV 感染、传播、诊疗及预防等方面均有重要意义<sup>[7]</sup>。本文通过对新疆地区

汉族和维吾尔族(以下简称维族)丙型肝炎感染者 HCV 基因型进行分析, 以期为今后新疆地区丙型肝炎的治疗提供有价值的参考。

**1 资料与方法****1.1 一般资料**

**1.1.1 临床资料** 收集 2013 年 7 月至 2014 年 7 月在乌鲁木齐 3 所三级甲等医院就诊的来自全疆的丙型肝炎感染者血清 380 例, 分型确定 355 份样本, 其中, 汉族男 111 例, 年龄 19~85 岁, 汉族女 121 例, 年龄 19~78 岁; 维族男 62 例, 年龄 20~72 岁, 维族女 61 例, 年龄 12~76 岁; 乌鲁木齐地区的汉族和维族感染者分别为 110 例和 30 例, 新疆其他地区的汉族和维族感染者分别为 122 例和 93 例。纳入标准: 感染者有详细的

家庭住址,无其他病毒性肝炎感染或携带,且经 HCV 荧光定量 PCR 检测,病毒载量大于  $1 \times 10^3$  copies/mL。标本的处理:非抗凝真空负压采静脉血 2~3 mL 于 30 min 内 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清, -80 °C 冻存备用。

**1.1.2 仪器和试剂** 伯乐 iCycler iQ 型荧光定量 PCR 扩增仪。HCV-RNA 定量检测试剂(YZB/国 5567-2011)和基因分型试剂(YZB/国 5573-2011)均由达安生物工程公司提供。引物序列如下,外侧上游引物:5'-TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A-3';外侧下游引物:5'-GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA-3'。扩增的片段长度为 401 bp。内侧上游引物:5'-CTC AAC CGT CAC TGA GAG AGA CAT-3';内侧下游引物:5'-GCT CTC AGG TTC CGC TCG TCC TCC-3'(杂交引物)。扩增的片段长度为 339 bp。

**1.1.3 感染者分组** 慢性丙型肝炎、中重度肝炎、丙型肝炎肝硬化、丙型肝炎相关性肝癌分别为 45、272、26、12 例,临床诊断均依照《中华人民共和国卫生行业标准》丙型肝炎病毒学诊断标准(WS213-2008)<sup>[8]</sup>。

**1.2 方法**

**1.2.1 HCV-RNA 定量检测** 的所有操作按照试剂盒使用说明书进行,主要包括以下过程。

**1.2.1.1 RNA 提取** 采用离心柱提取方法 将待测样本与阴性质控品、HCV 强阳性质控品、HCV 临界阳性质控品进行同步处理。

**1.2.1.2 扩增** 逆转录体系:0.5 mmol/L dNTPs,1 μmol/L oligo-dT 引物,Rnase 抑制剂 10 U,逆转录酶 4 U;扩增体系:加入探针和引物的反应缓冲液(DNA 聚合酶,UNG,dNTP);提取的 RNA,总体积一般为 20~50 μL。

**1.2.2 丙型肝炎基因分型检测** 丙型肝炎基因分型检测严格按照基因分型检测试剂盒说明书进行杂交、洗膜。

**1.2.3 结果判定** 杂交膜条采用扫描仪采集实验数据,并以 JPEG 格式输出结果。探针阴阳性判定:肉眼观察杂交膜条或扫描结果,明显可见蓝色的探针,判定为阳性;不显色或显色极淡的探针,判定为阴性。

**1.2.4 质量控制** 基因分型检测时,随标本同时加入 1 个阴性对照,1 个阳性对照,阳性对照为 1b 型。显色反应控制点 CC:信号值应大于或等于临界值,且为边缘清晰的蓝色圆点,

表示杂交过程正常。否则需要重新进行杂交显色过程。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,计量资料多组比较采用方差分析,计数资料以率表示,比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 民族差异** 基因分布结果显示,1b 型为新疆丙型肝炎发病的基因型,355 例 HCV 感染者中,225 例为 1b 型,占 63.38%。2a 型所占比例也较高,且汉族、维族之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他各基因型也占有一定比例,汉族、维族差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。新疆地区汉族和维族 HCV 基因型构成比见表 1。

**2.2 地区分布** 乌鲁木齐地区和新疆其他地区丙型肝炎感染者中,汉族、维族病例分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且两地男性、女性病例分布差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。乌鲁木齐病例中,汉族、维族男性感染者 2a 型差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),女性感染者 1b、3b 型有差异,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。新疆其他地区病例中,仅 2a 型男性汉、维族感染者发病差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他基因型差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 4。

表 1 新疆地区汉族和维族 HCV 基因型构成[n(%)]

基因型	汉族	维族	$\chi^2$	P
1b	139(59.91)	86(69.92)	2.198	0.138
2a	70(30.17)	15(12.20)	9.765	0.002
3a	13(5.60)	10(8.13)	0.307	0.579
3b	9(3.88)	11(8.94)	2.057	0.152
6a	1(0.43)	0	—	—
1b/2a	0	1(0.81)	—	—
合计	232	123	—	—

—:未做统计学处理。

**2.3 不同疾病 HCV 基因型差异** 在中重度肝炎、丙型肝炎肝硬化、丙型肝炎相关性肝癌患者中,分析显示 1b、2a 型在 3 种疾病中分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。但是合计 310 例,所占比例远高于慢性丙型肝炎的例数(45 例)。见表 5。

表 2 不同地区维族、汉族 HCV 基因型性别差异[n(%)]

地区	n		汉族		维族		$\chi^2$		P	
	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女
乌鲁木齐	72	68	57(51.35)	53(43.80)	15(24.19)	15(24.59)	15.552	7.988	0.000	0.005
新疆其他	101	114	54(48.65)	68(56.20)	47(75.81)	46(75.41)	—	—	—	—
合计	173	182	111	121	62	61				

—:未做统计学处理。

表 3 乌鲁木齐地区男性、女性中汉族和维族 HCV 基因型差异[n(%)]

基因型	汉族		维族		$\chi^2$		P	
	男	女	男	女	男	女	男	女
1b	30(52.63)	33(62.26)	9(60.00)	11(73.33)	0.997	4.978	0.318	0.026
2a	17(29.82)	13(24.53)	1(6.67)	0(0.00)	17.543	—	0.000	—
3a	4(7.02)	6(11.32)	2(13.33)	2(13.33)	2.000	0.189	0.157	0.663

续表 3 乌鲁木齐地区男性、女性中汉族和维族 HCV 基因型差异[n(%)]

基因型	汉族		维族		$\chi^2$		P	
	男	女	男	女	男	女	男	女
3b	6(10.53)	1(1.89)	3(20.00)	2(13.33)	3.092	8.871	0.079	0.003
合计	57	53	15	14	—	—	—	—

—:未做统计学处理。

表 4 新疆其他地区男性、女性中汉族和维族 HCV 基因型差异[n(%)]

基因型	汉族		维族		$\chi^2$		P	
	男	女	男	女	男	女	男	女
1b	61(60.40)	46(67.65)	31(65.96)	35(76.09)	0.772	1.587	0.380	0.208
2a	27(26.73)	19(27.94)	6(12.77)	8(17.39)	6.125	3.470	0.013	0.063
3a	5(4.95)	2(2.94)	4(8.51)	2(4.35)	1.229	0.000	0.268	1.000
3b	7(6.93)	1(1.47)	6(12.77)	0(0.00)	2.000	—	0.157	—
6a	1(0.99)	0	0	1(2.17)	—	—	—	—
合计	101	68	47	46	—	—	—	—

—:未做统计学处理。

表 5 不同疾病 HCV 基因型比较[n(%)]

基因型	n	中重度肝炎	丙型肝炎肝硬化	丙型肝炎相关性肝癌
1b	225	193(70.96)	23(88.46)	9(75.00)
2a	85	79(29.04)	3(11.54)	3(25.00)
$\chi^2$		2.943	3.597	0.000
P		0.086	0.058	1.000

### 3 讨论

丙型肝炎是一种由 HCV 感染引起,主要经血液、性、母婴等方式传播。近年来,我国丙型肝炎的诊断率在不断提高,丙型肝炎新报告病例也不断增加<sup>[9]</sup>。2010 年全国丙型肝炎发病数约为 15 万,比 2009 年增加近 15.50%,2011 年又比 2010 年增长 20.00%以上<sup>[10]</sup>。

HCV 基因型分布呈现明显的地域差异<sup>[11]</sup>,亚洲的香港以 1、2 和 6 型为主,台湾以 2 型为主,南亚以 1 型为主,欧洲国家以 1 型为主,且 3 型流行率高于非洲和亚洲,而非洲以 4 和 5 型为主<sup>[12]</sup>。而在我国以往的学者研究报告中,也存在地域差异,南方沿海城市以 1b 为主(占 90.00%以上),北方城市以 2a 为主(占 46.00%~70.00%),虽然南北方差异不大,但总体上南方 1b 多于东北地区<sup>[13]</sup>。本研究中,1b 基因型比例最高,为 225 例(63.38%),这与之前的研究不一致。其次为 2a 型为 85 例(23.94%),且维、汉族之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),新疆是少数民族聚居的地区,其中维族占 47.50%,这一民族分布特征与其他北方内陆城市有一定差异,这可能是导致 HCV 基因型分布与以往报道的流行病学分布特征不一致的原因之一。

从地区分布来看,乌鲁木齐和新疆其他地区 HCV 感染者基因型比较,维族、汉族男性、女性差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。乌鲁木齐病例中,维族、汉族男性感染者 2a 型差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),女性感染者 1b、3b 型差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。新疆其他地区病例中,仅 2a 型男性维、汉族感

染者发病差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他基因型差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。此外,本研究经过细致分析,发现性别对 HCV 基因型分布有一定影响,乌鲁木齐地区 2a 型汉族与维族之间存在差异,汉族男性以 2a 型所占比例较高;女性感染者中,维、汉族 1b、3b 型有差异。新疆其他地区病例中,仅 2a 型男性维、汉族感染者发病差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其他基因型差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。可见不同地区,影响疾病发生的因素有所不同,乌鲁木齐是新疆省会,卫生资源相对其他地区较丰富,医疗机构相对集中,疾病严重感染者多在当地无法医治时转往乌鲁木齐就诊,血液使用量远高于其他地区,由输血所导致的 HCV 感染可能占一定比例。此外,吸毒行为造成反复感染可能也是原因之一。

迄今为止,HCV 感染和肝脏疾病的严重程度尚无确凿证据。而有研究表明,1b 感染者体内 HCV-RNA 明显高于其他型感染者,这也符合基因型与临床表现关系的规律,因为病毒载量越高,肝细胞损伤程度越重,临床表现也越严重<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,1b、2a 型在中重度肝炎、丙型肝炎肝硬化、丙型肝炎相关性肝癌中分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这与之前的研究结果不同,但是 3 种重度肝病合计 310 例,数例远高于慢性丙型肝炎的 45 例。

鉴于新疆地区多民族的特殊情况,本文详细分析了两个民族 HCV 基因分型与地区、性别之间的关系,对了解新疆地区丙型肝炎感染者的 HCV 基因分型情况提供了重要资料,同时对于判断病情、预后提供资料。

### 参考文献

- [1] 解莹,谢晨.丙型肝炎病毒基因分型的研究进展[J].大连医科大学学报,2010,32(4):470-474.
- [2] Dale MN, Wang XH, Shruti HM, et al. Hepatitis C virus (HCV) core antigen assay to detect ongoing HCV infection in Thai Injection drug users[J]. J Clin Microbiol, 2004,42(4):1631-1636.

(下转第 18 页)

凝血因子处于部分活化状态,血液呈高凝或易于形成血栓。APTT 反映血浆中凝血因子 II、V、VIII、IX、X、XI、XII 和 PK 的活性,是内源性凝血过程的筛选试验。TT 的延长反映血浆中类肝素样物质和(或)纤维蛋白原降解产物增多<sup>[4]</sup>。FIB 在凝血酶的作用下,FIB 自 N 端脱下 4 段小肽(2 个 A 肽和 2 个 B 肽),生成纤维蛋白单体参与止血<sup>[5]</sup>。妊高征患者血浆凝血因子激活使 PT、APTT、TT 水平缩短,FIB 显著升高,提示妊高征患者机体处于血栓前状态,应警惕子痫等并发症的发生。

D 二聚体的增高提示体内凝血和纤溶系统的双重激活,是体内血栓形成的特异性指标<sup>[6]</sup>。FDP 是纤维蛋白(原)由纤溶酶分解产生的分子大小、结构不同的降解产物,生成增多反映体内纤溶活性亢进,对诊疗纤溶系统疾病和溶栓治疗的监测有重要意义<sup>[7]</sup>。妊高征患者血浆 D 二聚体和 FDP 水平升高提示患者体内血栓形成,以及存在原发性和继发性纤溶亢进,导致凝血因子的消耗,增加了产后出血的风险,产后出血是重度妊高征患者肾衰竭的重要原因<sup>[8-10]</sup>。

本研究发现妊高征组 PT、APTT、TT 水平明显缩短,FIB、D 二聚体、FDP 水平显著高于健康孕妇及健康体检人群,提示妊高征患者血液处于高凝状态,有血栓形成倾向及继发纤溶亢进。因此妊娠期监测凝血功能的变化同时进行 D 二聚体、FDP 联合监测,对于预防产时出血、血栓形成,及时行抗凝治疗等有关键的作用。常规凝血功能检测基础上联合进行血浆 D 二聚体和 FDP 纤溶指标检测,对于已确诊的妊高征患者的早期诊断、疗效和病情发展的评估、预后判断有一定的临床意义。

## 参考文献

- [1] 吴杰,曾海燕.不同妊娠时期孕妇血浆 D 二聚体及凝血四项变化分析[J].中国医药科学杂志,2014,19(4):103-105.
- [2] 李雅丽,苏兆娟,葛月萍.妊高征患者血小板激活功能及

血液纤溶状态的变化[J].中华妇产科杂志,1999,34(7):426-427.

- [3] Cramer TJ,Gale AJ. The anticoagulant function of coagulation factor V[J]. Thromb Haemost,2012,107(1):15-21.
- [4] Persson E,Olsen OH. Allosteric activation of coagulation factor VIIa[J]. Front Biosci,2011,16:3156-3163.
- [5] Caballo C,Escolar G,Diaz-Ricart M,et al. Impact of experimental haemo dilution on platelet function,thrombin generation and clot firmness:effects of different coagulation factor concentrates[J]. Blood Transfus,2012,19:1-10.
- [6] Dinisio M,Squizzato A,Rutjes AW,et al. Diagnostic accuracy of D-Dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review [J]. J Thromb Haemost,2007,5(2):296-304.
- [7] Moresco RN,Halla-junior R,Vargas LCR,et al. Association between plasma levels of D-Dimer and fibrinogen/fibrin degradation products(FDP) for exclusion of thromboembolic disorders[J]. J Thromb Thrombolysis,2006,21(14):199-202.
- [8] 高劲松,边旭明.妊娠高血压疾病治疗中应注意的问题[J].中国医刊,2009,43(9):17-18.
- [9] 韦柳宏,范微,谢智光.检测妊高征患者 D-二聚体与血液黏度的临床意义[J].海南医学,2011,22(24):110-111.
- [10] 何洪玲.妊高征患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 D-D 检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2010,23(6):619-620.

(收稿日期:2015-08-18 修回日期:2015-09-25)

(上接第 16 页)

- [3] Martró E,González V,Buckton A J,et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' Noncoding and nonstructural 5b genomic regions[J]. J Clin Micro,2008,46(1):192-197.
- [4] Li B,Feng DY,Cheng RX,et al. The effects of hepatitis C viruscore protein on biological behaviors of human hepatocytes[J]. Natl Med J China,2009,85(18):1243-1248.
- [5] Simmonds P,Holmes EC,Cha TA,et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of NS5 region[J]. Gen virol,1993,74(Pt 11):2391-2399.
- [6] Brok J,Gluud LL,Gluud C. Effects of adding ribavirin to interferon to treat chronic hepatitis C infection[J]. Arch Intern Med,2008(165):2206-2212.
- [7] 王文,博任浩.丙型肝炎病毒 F 蛋白在病毒复制和致病中的作用[J].中国生物制品学杂志,2011,24(3):349-353.
- [8] 中华人民共和国国家标准委.WS213-2008 中华人民共和国行业标准备案公告 2009 年(第 02 号)[S].北京:中华

人民共和国国家标准委员会,2009.

- [9] 石爽,庄辉.重视丙型肝炎的筛查[J].肝脏,2007(12):333-335.
- [10] 任红.丙型肝炎防治,任重道远[J].中华肝脏病杂志,2013,21(6):401-402.
- [11] Yen T,Keefe EB,Ahmed A. The Epidemiology of hepatitis C virus infection[J]. J Clin Gastroenterol,2003,36(1):47-53.
- [12] Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes[J]. Clin Microbiol Rev,2000,13(2):223-235.
- [13] Seeff LB,Hoofnagle JH. Appendix:the national institutes of health consensus development conference management of hepatitis C 2002[J]. Clin Liver Dis,2003,7(1):261-287.
- [14] Lo KY,Chen CY, Lee CS. Hepatitis C virus-associated type II mixed cryoglobulinemia vasculitis complicated with membranous proliferative glomerulonephritis[J]. Ren Fail,2009,31(2):149-152.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-09-20)