

南京地区吸毒人群丙型肝炎的 常见基因型分型研究

龚建明^{1,2}, 杨静静¹, 王昊鹏¹, 喻荣彬¹, 邓小昭³, 张云^{1,3}

(1. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏南京 210029; 2. 南京军区联勤部门门诊部, 江苏南京 210002; 3. 南京军区疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

[摘要] 目的 了解南京地区吸毒人群丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)常见基因型分布特点。方法 对南京市强制戒毒所收集提供的198份抗-HCV阳性吸毒人员血清进行HCV RNA检测, 对阳性标本按照Simmonds分型方法, 采用5'非编码区(5'NCR)1、2、3、1b型特异性引物进行PCR扩增与分型, 同时分析不同类型吸毒人员丙型肝炎感染者上述基因型分布差异。结果 198份血清中, 有168份为HCV RNA阳性。单一基因型占77.4%, 其中1b亚型106份(63.1%), 2型15份(8.9%), 3型9份(5.4%); 混合基因型占20.2%, 其中1b/2型25份(14.8%), 1b/3型5份(3.0%), 2/3型4份(2.4%); 未确定基因型4份(2.4%)。静脉和非静脉吸毒人群HCV基因型分布差异无统计学意义($\chi^2 = 3.614, P > 0.05$), 单一基因型和混合基因型分布差异亦无统计学意义($\chi^2 = 0.018, P > 0.05$)。结论 南京地区吸毒人群HCV基因型1b型为主, 其他多种基因型并存, 总体分布特点介于中国南北方之间。

[关键词] 丙型肝炎; 病毒; 基因型; 吸毒

中图分类号: R512.6+3 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)03-0199-03

Genotype Study on Hepatitis C Virus among Drug Users in Nanjing, China

GONG Jian-ming^{1,2}, YANG Jing-jing¹, WANG Hao-peng¹, YU Rong-bin¹, DENG Xiao-zhao³, ZHANG Yun^{1,3}

(1. Public Health College, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Outpatient Department of Combined Service Force, Nanjing Military Region, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 3. Center for Disease Control and Prevention, Nanjing Military Region, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the genotype distribution of HCV in drug users in Nanjing, China. **Methods** 198 anti-HCV positive sera samples from drug users were obtained from Nanjing Compulsory Detoxification Centers. HCV RNA detection was performed and the genotype of HCV was conducted on the positive samples using type specific primers deduced from the 5' NCR region of HCV by RT-PCR. Genotypes distribution was investigated in drug users with different drug-type. **Results** Of total 198 samples, 168 were HCV RNA positive. 77.4% samples were single genotype, in which 106 samples were genotype 1b (106/168, 63.1%), 15 samples were genotype 2 (15/168, 8.9%), 9 samples were genotype 3 (9/168, 5.4%). 20.2% samples were mixture genotype, in which 25 samples were genotype 1b/2 (25/168, 14.8%), 5 samples were genotype 1b/3 (5/168, 3.0%), 4 samples were genotype 2/3 (4/168, 2.4%), and genotype could not be determined in 4 samples (4/168, 2.4%). No significant difference was found in the distribution between intravenous drug users (IVDUs) and Non-IVDUs ($\chi^2 = 3.614, P > 0.05$). Also there was no statistics difference on the infection distribution between the single genotype and commixture genotype ($\chi^2 = 0.018, P > 0.05$). **Conclusion** The predominant genotype of HCV in drug users of Nanjing is 1b, with other genotypes coexisting. The genotype distribution lies between the North and South China. Combining with other similar studies, we suggested that the genotype of HCV has significant relationship with region, but has little relationship with the drug using method. In our study, genotype 1b/3 and indeterminate

基金项目:江苏省高校自然科学基金(03KJD330144)

作者简介:龚建明(1973-),男,江苏南通人,主治医师,硕士在读,主要从事疾病预防与控制研究。

type were only found in intravenous drug users, but further study is needed for the cases of Non-IVDUs included in the present study is deficient.

[Key words] Hepatitis C virus; Drug use; Genotype

目前吸毒人群丙型肝炎病毒(HCV)感染率远远高于一般人群,是重要的传染源^[1]。鉴于HCV感染的危害,在我国人群尤其是吸毒这一高危人群中开展HCV方面的研究,显得尤为迫切。本研究对南京市强制戒毒所收集提供的南京地区吸毒人群抗-HCV阳性血清标本进行HCV常见基因型分型检测,以了解南京地区吸毒人群HCV常见基因型分布特点,为预防和控制丙型肝炎的传播提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 198例抗-HCV阳性吸毒人员血清标本由本市强制戒毒所2006~2007年收集提供(经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)。吸毒人员年龄20~50岁,平均(33.63±6.28)岁,吸毒时间0.17~16.67年,平均(7.05±4.17)年。其中静脉吸毒者(全部具有合用注射器或稀释液经历)156人,非静脉吸毒者(包括口服、鼻吸、烟枪吸、烫吸、其他方式吸毒等)42人。

1.2 研究方法

1.2.1 HCV RNA 检测 ①HCV RNA 提取:取抗-HCV阳性血清250 μl,采用异硫氰酸胍一步法提取RNA并溶于20 μl DEPC水中;②逆转录:取上述RNA 5 μl,采用MBI公司的RT试剂盒,引物使用六聚体随机引物,进行逆转录获得cDNA;③HCV RNA检测:内外两对通用引物巢氏PCR获得(99~296 nt)171 bp片段产物,琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2 HCV 基因分型 采用Simmonds分型法,根据5'NCR序列变异,对HCV RNA阳性标本进行PCR外引物扩增,用型特异性内引物的反义引物进行第二轮扩增,从而获得各型不同产物,2.5%琼脂糖电泳凝胶成像分析仪观察结果,判断基因型。

1.2.3 引物设计 国内文献报道我国丙型肝炎病毒以1、2、3和1b型分布较广^[2],故本次分型采用了1、2、3、1b型特异性引物。参照文献[3],根据GENBANK提供的HCV1a、1b、2、3型5'NCR基因序列比对后,设计出保守区通用引物(P1、P2、P3、P4)和型特异性引物(P5、P6、P7、P8)。引物序列见表1。

表1 HCV RNA分型引物的核苷酸序列

区段	引物名称	序列(5'-3')	核苷酸位置(nt)
5'NCR	P1(外正义引物)	5'-GCCATGGCGTTAGTAYGACT-3'	82~101
	P2(外反义引物)	5'-TTTCGCRACCCAACRCTACT-3'	257~276
	P3(内正义引物)	5'-AGTGTCTRTCAGCCTCCAGG-3'	99~118
	P4(内反义引物)	5'-ACCCAACRCTACTMGGCTAG-3'	250~269
	P5(内反义引物1)	5'-GGGGCAGCCCAAATCTCCA-3'	220~239
	P6(内反义引物2)	5'-CAAATGACCGRCATAGAGT-3'	210~229
	P7(内反义引物3)	5'-GCACGCCCAAATTTCTGGGT-3'	217~236
	P8(内反义引物1b)	5'-ACTACTCGGCTAGCAGTCTC-3'	243~262

(Y=C或T,R=G或A)

1.3 材料和试剂来源 引物由上海博亚生物公司合成, RNA提取试剂盒TRI reagent BD为MRC产品,逆转录RT试剂盒、DNA聚合酶、dNTP等主要试剂均为MBI产品。

1.4 统计学处理 计数资料用 χ^2 检验或Fisher精确检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 基因型 检测198份抗HCV阳性血清,其中HCV RNA阳性标本为168份,阳性率84.8%,基因分型结果1b亚型106份(63.1%),2型15份(8.9%),3型9份(5.4%),1b/2型25份

(14.8%),1b/3型5份(3.0%),2/3型4份(2.4%),未确定基因型4份(2.4%)。

2.2 静脉与非静脉吸毒人群HCV常见基因型分布 见表2。静脉与非静脉吸毒人群HCV基因型总体分布差异无统计学意义($\chi^2 = 3.614, P > 0.05$),两组人群均以1b型为主(63.6%、61.1%),其次为1b/2型(14.4%、16.7%)、2型(8.3%、11.1%),3型(4.5%、8.3%),2/3型(2.3%、2.8%),静脉吸毒人群中存在少量1b/3及未确定基因型,而非静脉吸毒者中未检测到。其次两组人群单一基因型和混合基因型感染分布差异亦无统计学意义($\chi^2 = 0.018, P > 0.05$)。

表2 吸毒人员 HCV 基因型分布

吸毒类型	例数	HCV 基因型(例)						
		1b	1b/2	1b/3	2	2/3	3	未确定
静脉吸毒者	132	84	19	5	11	3	6	4
非静脉吸毒者	36	22	6	0	4	1	3	0

3 讨论

HCV 基因型的分布有明显的地区差异。南方城市 1b 亚型占 90% 以上,其他基因型少见,而北方城市以 1b 型为主,但 2a 亚型逐渐增多,占 46% ~ 70%^[4-5]。本组资料显示,南京地区吸毒人群 HCV 常见基因型分布以 1b 亚型占优势(包括 1b/2 和 1b/3 型,占 81%),2 型比例次之(包括 1b/2、2/3 型,占 26.2%),混合基因型占 20.2%。表明此组患者丙型肝炎基因型分布既同南方城市有区别,又与北方城市不同^[6],这可能是南京处于我国中部,兼有南北方特点缘故。

2007 年沈玲等^[7]检测 104 例南京籍非献血员 HCV 基因型为 1b、2a、6 型及 3a/3b 和 1b/2a 混合型,其中 8 名吸毒者中 1b 型 4 人、2a 和 3a/3b 型各 2 人。2004 年张永祥等^[8]检测 76 例江苏地区(南京、常州、淮阴三个地区)HCV 基因型为 1a、1b、2a、3b、6a 型,其中 1a、3b、6a 型为江苏地区首次报道,6a 型仅 1 例为静脉吸毒者。本研究检出 1b、1b/2、1b/3、2、2/3、3 型等,其中 1b/3、2/3 型为首次检测到,混合基因型占 20.2%。可以看出南京地区吸毒人群 HCV 感染呈现基因混合之趋势,这可能因为吸毒人员之间关系的复杂性,导致人员之间反复感染、重复感染所致。这给临床治疗以及疫苗的研制带来更多的困难。本次调查中仍有分型不明确者,可能会有其他亚型等存在,也预示着该人群 HCV 基因型更趋复杂。

目前一些研究结果显示,中国大陆地区静脉吸毒者中 HCV 基因型的流行情况与正常人群基本一致,其他邻近国家的静脉吸毒者中 HCV 感染亚型及其所占比例也与正常人群大体一致^[9]。虽然 HCV

的感染率在吸毒人群尤其是静脉吸毒人群中较高^[10],但本次研究中,南京地区静脉与非静脉吸毒人群的 HCV 常见基因型分布以及单一基因型和混合基因型感染分布的相似,可能提示 HCV 基因型的传播与感染方式关系不大,而与地域关系密切。另外此次研究只在静脉吸毒人群中检测到少量 1b/3 型和未确定基因型,而非静脉吸毒人群中未检测到,可能与非静脉吸毒组样本较少有关,需进一步研究。

参考文献

- [1] 陈 嵩,王宇明,李成明,等. 静脉药瘾者丙型肝炎病毒感染的分子流行病学[J]. 世界华人消化杂志,2001,9(5):526-528.
- [2] 王 静,王露楠. 丙型肝炎基因型定量检测及分型检测方法的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(27):2897-2902.
- [3] Simmonds P, Mc Omish F, Yap PL, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity[J]. J Gen Virol, 1993,74(4):661-668.
- [4] Nguyen MH, Keffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005,3(10):97-101.
- [5] Suh DJ, Jeong SH. Current status of hepatitis C virus infection in Korea[J]. Intervirology, 2006, 49(1-2):70-74.
- [6] 吴立平,刘玉萍,王乃昌,等. 山西省吸毒人员丙型肝炎病毒的基因型和序列分析[J]. 中国预防医学杂志,2002,3(1):35-38.
- [7] 沈 玲,顾小军,刘新钰,等. 南京地区丙肝基因型、HCV RNA 与临床预后[J]. 江苏医药,2007,33(10):1050-1051.
- [8] 张永祥,孙南雄,黄祖瑚,等. 江苏地区丙型肝炎病毒基因型分型研究[J]. 江苏医药,2004,30(6):463-464.
- [9] krekulova L, Rehak V, Madrigal N, et al. Genotypic and epidemiologic characteristics of hepatitis C virus infections among recent injection drug user and nonuser populations[J]. Clin Infect Dis, 2001,33(8):1435-1438.
- [10] 骆 峻,夏 娟,喻荣彬. 静脉注射吸毒人群丙型肝炎病毒感染研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(28):2966-2971.

(收稿日期:2008-10-15;修回日期:2008-12-01)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)