DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.022
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
296 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0296-04

丙型肝炎病毒结构区基因变异的研究

陈 嵩,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨丙型肝炎病毒(HCV)结构区变异在HCV感染慢性化中的作用。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增HCV的C、E1及E2/NS1区核苷酸片断(1 kb),扩增产物进行克隆,以单链构象多态性(SSCP)/异质性双体分析(HDA)方法对每份血清中30个克隆的C/E1和E2/NS1区准种(Quasispecies)进行优化筛选,分析HCV急性感染者和持续性感染者血清准种复杂性。结果 HCV的C/E1区和E2/NS1区扩增片段形成的SSCP条带间差异明显,但E2区形成的异质性双体与同源双体之间差距更显著,准确地反映结构区准种的复杂性;HCV持续性感染者比急性感染者血清的E2区准种复杂性明显增加。结论 HCV结构区准种复杂性的增加与病毒持续性感染有关。

关键词:肝炎病毒,丙型;结构区;准种
中图法分类号:R373.21;R394 文献标识码:A

Study of genetic variation of the structural region of hepatitis C virus

CHEN Song, WANG Yu-ming (Center of Infectious Diseases of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the role of the structural gene variation of hepatitis C virus (HCV) in the chronicity of HCV infection. **Methods** Serum samples from four HCV infection acquired during six-month follow up and four patients with chronic hepatitis C type were obtained. A 1-kb fragment containing the 3' half of core, completed E1 and 5' half of E2/NS1 was amplified by nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). For each, 30 cloned cDNAs were examined by a method that combined heteroduplex analysis (HAD) and a single-stranded conformational polymorphisim (SSCP) assay to optimize selection of clones with unique gel shift patterns (clonotypes) as a measure of the quasispecies complexity. **Results** There was obvious difference between the SSCP bands of cloned cDNAs representing core-E1 and E2 region, but more distinct difference between heteroduplex and the homoduplex of clones spanning E2 region which accurately reflected the degree of heterogeneity. Quasispecies complexity was higher in those with persistent viremia than those with acute viremia. **Conclusion** HCV persistence is associated with complex quasispecies in viral structural region.

Key words: hepatitis C virus; structural gene; quasispecies

丙型肝炎病毒(HCV)是输血后和散发性非甲非乙型肝炎的主要病原。HCV易发生变异,其基因组序列呈高度异质性,主要表现为基因型、亚型及准种,尤其是准种的复杂性与HCV致病性、持续性感染及抗病毒治疗耐受的关系密切[1]。一般选择HCV基因组中变异程度大的高变区(HVR1)分析准种特征,但HVR1区仅200 bp,以其为HCV准种代表是不可靠的,可能还存在更多的有意义的变异区位点,其中较重要的依次有包膜2(E2)、E1及核心(C)区,即整个结构区。为此,本研究采用单链构象多态性(Single-stranded conformational polymorphism, SSCP)和异质性双体分析(Heteroduplex assay, HAD)进一步研究了HCV C、E1和E2/NS1区准种特征与感染慢性化的关系。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870694)

作者简介:陈 嵩(1963-),男,贵州省贵阳市人,博士研究生,讲师,主要从事HCV结构区基因变异方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753196

收稿日期:2000-10-08;修回日期:2001-02-05

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集了4例血清抗-HCV及HCV RNA于6个月内转阳的血清标本作为急性感染者,所有病人血清总胆红素均正常,男性3例,女性1例,平均年龄(30.44±3.45)岁。4例慢性丙型肝炎(轻度)血清来自本院感染病科住院患者,有输血或血制品史,男性3例,女性1例,平均年龄(37.75±4.32)岁,诊断均符合1995年5月北京第五次全国传染病寄生虫病学术会议制定的诊断标准。全部标本抗-HAV、抗-HBV及HIV血清标本均阴性。

1.2 主要试剂

T-尾载体 pT-adv及有关酶购自美国CLONTECH公司,逆转录酶(MMLV)、Taq酶、RNA酶抑制剂(RNasin)均为Promega公司产品,Expand™ PCR系统购自Roche公司,*Hae*Ⅲ、*Rsa*Ⅰ、*Bst* UI、*Nci*I内切酶购自上海生工生物工程技术公司,胶纯化试剂盒购自德国QIAGEN公司。

1.3 HCV引物

根据已发表的6个型别的17条HCV全长基因序列和部分结构区序列设计C/E1、E2区通用引物,见表1;引物位置参照HCV-J6全基因序列,见图1,由上海生工生物技术公司合成。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　HCV 基因组结构区扩增的引物序列

Tab 1　Primers for amplification of the structural region of HCV genome

Signal	Region and position	Sequence(5' ~3')
	C/E2	
P1	837~862	GCAACAGGGAAYYTDCCCGGTTGCTC
P2	2020~1998	TTCATCCASGTRCAVCCRAACCA
P3	846~874	AAYYTRCCCGGTTGCTCYTTYTCTA
P4	1882~1857	GTGAARCARTACACYGGRCCRCANAC
	C/E1	
P3	846~874	AAYYTRCCCGGTTGCTCYTTYTCTA
P5	1333~1311	GTRGGBGACCAGTTCATCATCA
	E2	
P6	1306~1327	GGGAYATGATGATGAACTGGTC
P4	1882~1857	GTGAARCARTACACYGGRCCRCANAC

Y= C or T; D= G or A or T; S= G or C; R= G or A; V= G or C or A; B= G or T or C

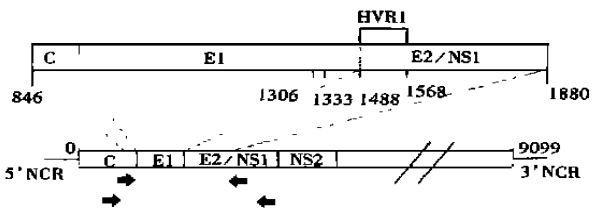


图 1　HCV 部分基因组结构和 PCR 引物位置, 碱基位置参照 HCV-J6

Fig 1　Diagram depicting the studied portion of the HCV genome and locations of the primers (arrow) used in this study. Positions are based on the HCV-J6. 5' NCR and 3' NCR, 5' and 3' noncoding region, respectively

1.4　血清总 RNA 的提取

采用 Trizol 试剂(GIBCO 产品)提取血清总 RNA, 操作按说明。

1.5　HCV 基因分型

方法参照文献[2]并加改进。逆转录-PCR 扩增 HCV 5' 非编码区 (5' UTR)片段: 提取的 RNA 中加入 MMLV 20 U、Rnasin 10 U、Taq 酶 2.5 U、dNTP 2 mmol/L、分型引物 0.4 μmol/L, 反应总体积 50 μl。37 ℃逆转录 50 min 后接第一轮扩增, 取 1 μl 扩增产物再进行第二轮扩增。取第二轮 PCR 产物 10 μl, 分别加入内切酶 *BstU* Ⅰ、*Hae* Ⅲ、*Nci* Ⅰ 及 *Rsa* Ⅰ 5U, 37 ℃水浴 16 h, 溴化乙锭染色后在紫外灯下观察结果。

1.6　HCV 部分结构区片段扩增与克隆

cDNA 合成: 提取的 RNA 中加入引物 P7 1.5 μmol/L、MMLV 20 U、Rnasin 10 U、dNTP 0.2 mmol/L, 反应总体积 20 μl, 37 ℃水浴 1 h。两轮 PCR 扩增条件相同: 0.2 mmol/L dNTP, 0.4 μmol/L 引物, 0.75 U Expand HF 聚合酶, 反应体积为 50 μl。94 ℃预变性 3 min 后, 94 ℃ 1 min, 62 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环, 再于 72 ℃延伸 10 min。0.8% 低溶点琼脂糖凝胶纯化第二轮 PCR 产物后, PCR 产物与 pT-adv 载体按两者摩尔数之比 3∶1 混合, 用 T4 DNA 连接酶于 14 ℃连接过夜。转化 TOP10F' 感受菌 (CLONTECH 公司产品), 挑选白色噬斑, 经 PCR 鉴定含有插入目的片段的克隆。

1.7　HCV C/E1 和 E2 区片段扩增

取转化菌液 3 μl, 加入无菌纯水 100 μl 及 1 mol/L NaOH 10 μl, 37 ℃保温 1 h, 再加入 1 mol/L HCl 中和。取 1 μl 反应液为模板, PCR 反应总体积为 25 μl (0.2 mmol/L dNTP, 0.4 μmol/L 引物 P3、P5 或 P6、P4, 2.5 U Taq 酶)。94 ℃预变性 3 min 后, 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环, 再于 72 ℃延伸 5 min。溴化乙锭染色后在紫外灯下观察结果。

1.8　SSCP/HAD 分析准种复杂性

SSCP/HDA 按照王宇明[3]建立的方法: 每份标本挑选 30 个克隆, 随机选取一个克隆的扩增产物 5 μl 作为驱动子(driver), 加入 5 μl 每个克隆的扩增产物及 2 μl 裁样液, 94 ℃变性 3 min, 迅速置于冰浴 10 min, 取 5 μl 进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶(含 15% 尿素)电泳 24 h(140 V 电压), 1/10 000 SYBR Green Ⅰ染色至少 30 min, 在凝胶成像分析仪下观察结果。准种复杂性分析= 克隆型数量/检测的克隆数[4], 比值范围应为 0.03(同源性) ~ 1 (高度复杂性)。

1.9　统计学分析方法

采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　PCR 扩增产物电泳结果

HCV 结构区经通用外引物 P1、P2 及通用内引物 P3、P4 扩增, 得到片段包含部分 C 区、全部 E1 及 E2 区氨基末端片段, 长度为 1 036 bp。HCV 经引物 P3、P5 扩增, 得到片段包含 C 区羧基端及全部 E1 区片段, 长度为 459 bp。HCV 经引物 P4、P6 扩增得到长度为 570 bp 的 E2 区氨基端片段, 见图 2。

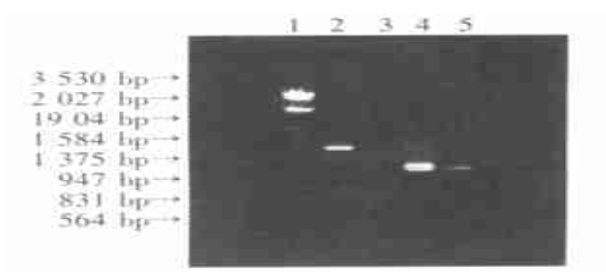


图 2　HCV 部分结构区 RT-PCR 扩增产物电泳结果

Fig 2　1.7% agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplicons of HCV structural gene

1: λDNA/*EcoR*Ⅰ+*Hind* ⅢMarker; 2, 3: 1 036 bp fragments of HCV core-E1-E2; 4, 5: 570 bp fragments of HCV-E2

2.2　HCV 结构区准种的优化筛选

对同一份标本中 HCV 的 C/E1 区、E2 区扩增产物的 30 个克隆进行 SSCP/HD 分析, C/E1 区的克隆序列形成 2 ~ 4 条 SSCP, 但异质性双体(He)与同源双体(Ho)之间差距很小, 表明 C/E1 区变异的差异不明显, 很难反映结构区变异株群体的差异性; E2 区的所有克隆序列不仅形成 2~5 条 SSCP, 而且 He 与 Ho 之间差距显著, 以此能准确反映准种的变异株数量和差异性, 见图 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

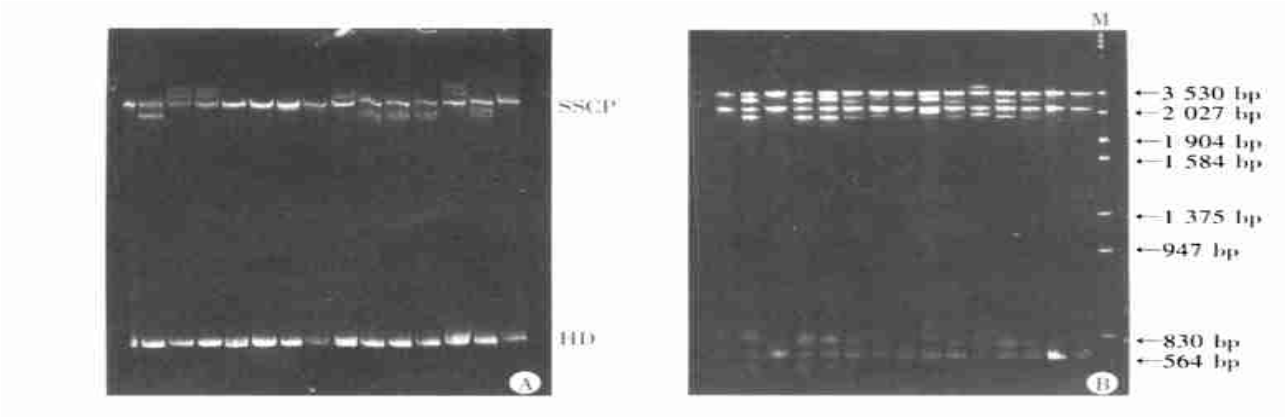


图3 HCV C/E1, E2区扩增产物的SSCP/HAD分析结果, 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 3 8% Polyacrylamide gel electrophonesis of the SSCP/HDA method as a measure of the number of clonotyes electrophoretically inditinguishable cloned cDNAs

A: Fourteen cloned cDNAs of HCV core-E1; B: Fifteen cloned cDNAs of HCV-E2; M: λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ Marker

2.3 急性和持续性HCV感染者血清准种复杂性分析

持续性感染者HCV的平均克隆型比值(0.56)明显高于急性感染者克隆型比值(0.19)($P<0.01$),两者的准种分布见表2。

表2 各例血清标本的SSCP/HDA分析结果

Tab 2 Characteristics of samples and results of SSCP/HDA*

Group	Genotype	Clonotype distribution**	No. of clonotypes	Clonotype ratio(%)
Acute-infection				
	2a	15,10,2,1,1,1	6	0.20
	2a	12,7,5,2,1,1,1,1	8	0.26
	1b	18,7,2,1,1	5	0.17
	1b	22,4,1,1,1,1	6	0.20
Viral persistance				
	1b	11,7,4,3,1,1,1,1,1,1,1	11	0.37
	2a	5,4,4,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1	18	0.60
	1b	7,4,4,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1	17	0.56
	1b	6,2,2,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1	21	0.70

*: Clonotype, a group of electrophoretically indistinguishable cloned cDNAs; clonotype ratio, the number of clonotypes divided by 30, the number of clones examined; **: Each number represents a clonotype, the number indicates the clonotype isolated by the SSCP/HAD method

3 讨论

准种的研究应包括基因的复杂性(变异株数目)和基因的差异性(变异株差异),两者反映准种的复杂性[5]。目前最实用的准种检测手段有SSCP或HDA两种分析。前者通过单链构象差异检出变异,可以比较准确的估计变异株数量,但并不能反映变异株间差异;后者则通过异源性双链DNA的构象差异检出变异,但难以区分1~2个核苷酸不同的序列,使其检出劣势序列的灵敏度较差[6]。本研究采用王宇明等[3]建立的SSCP/HDA分析法,可使DNA单链、异源性双链和同源性双链同时顺序分布在凝胶板上,与SSCP或HDA比较能够更灵敏地检出同一血清标本的变异株群体,即准种。同时,本研究以SSCP/HDA分析HCV的C、E1和E2区准种特征,从中优化筛选准种复杂性高的E2区氨基端约570bp片段,以此扩大准种的筛选范围。另外,本研究均采用多克隆(每份标本30个克隆)的分析方法,避免了以往研究中因克隆数少带来的偏倚,能够更准确地反映准种的分布,即克隆型。

本研究结果显示,HCV持续性感染者比急性感染者的准种复杂性明显增加。现已证明,E2包膜区内的HVR1是产生中和抗体的关键部位,包膜区的高度变异导致病毒准种逃避株的产生[7]。慢性肝炎HCV准种的复杂性增加可能是受到机体的免疫压力造成的,而HCV急性感染者免疫压力作用对准种演变的影响可能相对较弱。但是,本实验研究的慢性丙型肝炎均为输血后感染者,而HCV急性感染者为静脉药瘾者。Pawlotsky等[8]报道,输血后肝炎早期感染的病毒数量明显高于静脉药瘾者,导致前者体内的变异株数量高于后者。这是否为输血后肝炎病人血清中HCV准种复杂性高的原因有待进一步研究。

参考文献:

[1] Forns X, Purcell R H, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus[J]. Trends Microbiol, 1999, 7(10): 402-410.

[2] Park Y S, Lee K O, Oh M J, *et al*. Distribution of genotypes in the 5' untranslated region of hepatitis C virus in Korea[J]. J Med Microbiol, 1998, 47(3): 643-647.

[3] Wang Y M, Ray S C, Laeyendecker O, *et al*. Assessment of hepatitis C virus sequence complexity by electrophoretic mobilities of both single-and double-stranded DNAs[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(10): 2 982-2 989.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] Ray S C, Wang Y M, Laeyendecker O, *et al*. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy[J]. J Virol, 1999, 73(4): 2 938—2 946.

[5] Polyak S J, Faulkner G, Carithesr R L, *et al*. Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy[J]. J Infect Dis, 1997, 175(5): 1 101—1 107.

[6] Wilson J J, Polyak S J, Day T D, *et al*. Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasispecies by heteroduplex gel shift analysis: correlation with nucleotide sequencing[J]. J Gen Virol, 1995, 76(7): 1 763—1 771.

[7] Farci P, Shimoda A, Wong D, *et al*. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of envelop 2 protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26): 15 394—15 399.

[8] Pawlotsky J M, Pellerin M, Bouvier M, *et al*. Genetic complexity of the hypervairable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): Influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C[J]. J Med Virol, 1998, 54(4): 256—264.

（编辑　陈聪连）

（上接 295 页）

史。正常对照组 35 例。男性 23 例, 女性 12 例; 平均年龄 40.3 岁。为本院工作人员或献血员, 无消化系统或其它系统疾病。54 例大肠癌中高分化癌 20 例、中分化癌 23 例低分化癌 11 例; 有淋巴结转移的 23 例; DuksA、B、C、D 期分别为 10、17、19、8 例。

标本收集及处理: 血标本收集及处理, 受试者于术前抽取空腹静脉血 2 ml, 注入干燥试管及装有 EDTA-2Na 和抑肽酶的试管中各 1 ml, 离心后提取血清或血浆, 封存－20 ℃待测。腹腔渗液收集及处理, 开腹后用注射器于盆腔抽取腹腔渗液, 如果腹腔渗液少无法抽取时, 用等渗盐水 20 ml 注入腹腔, 然后用体位引流到盆腔, 用注射器抽取 5 ml 装入干燥试管内待测。组织匀浆制备, 手术标本离体后, 切取肿瘤组织 200 mg, 用组织匀浆器将癌组织制成匀浆, 经离心后取上清液 2 ml 装入试管内, 所有标本均－20 ℃封存, 供胃泌素测定时应用。

胃泌素测定采用 RIA 法, 药盒由北京北方免疫试剂研究所提供, 采用双管测定, 取均值, 单位 pg/ml。对于腹腔胃泌素大于 100 pg/ml 的 15 例行腹腔灌洗化疗加静脉化疗, 而 39 例腹腔胃泌素小于 100 pg/ml 仅行静脉化疗。

2　结果

结果显示: 胃泌素含量以癌组织最高, 其次为腹腔渗液, 而术前空腹血含量最低, 但是, 3 组均较正常人空腹血含量高。从病理类型分析, 发现高分化型癌较低分化型癌胃泌素含量高。腹腔渗液胃泌素的含量与癌浸润肠壁深度有关, 即癌浸润肠壁越深胃泌素含量越高。胃泌素含量与年龄、性别无关。15 例腹腔化疗加静脉化疗组 2 年后发现 1 例腹腔内复发, 1 例肝转移; 39 例静脉化疗组 5 例腹腔内复发, 4 例肝转移。

3　讨论

随着饮食习惯和生活环境的变化, 大肠癌的发病率有逐年增高的趋势, 近年来人们发现大肠癌细胞中有胃泌素基因表达, 大肠癌细胞表面存有特异的胃泌素受体[1]。胃泌素不仅刺激正常胃肠粘膜组织的生长, 而且能刺激胃肠癌细胞的增生, 其机制是胃泌素与其受体结合后, 通过后者细胞内信号传导途径调节胃肠癌细胞的生长, 由于一些大肠癌细胞表面存在特异的胃泌素受体, 胃泌素与受体结合后刺激细胞膜上的磷脂酶 C, 进一步激活蛋白激酶 C, 使细胞内钙离子释放, 钙离子浓度瞬间增高, 随即激活 I 型 CAMP 依赖型蛋白激酶, 鸟氨酸脱羧酶活性等信息最终传入细胞内, 促进细胞迅速增殖[2]。

我们应用放免法测定正常人血清、大肠癌组织、腹腔渗液及术前血清胃泌素含量, 结果显示癌组织胃泌素含量最高, 其次是腹腔渗液, 大肠癌术前血清胃泌素含量最低, 较正常人明显增高。分化程度越高胃泌素含量越高, 腹腔渗液胃泌素含量还与癌浸润肠壁深度有关, 即癌浸润肠壁越深胃泌素含量越高。高分化癌胃泌素含量高的原因可能是[3], 大肠癌细胞形成分泌颗粒释放胃泌素, 高分化癌细胞内胃泌素胶体金颗粒主要为 A 类分泌颗粒, 低分化癌胃泌素胶体金颗粒主要为 B 类分泌颗粒, A 类分泌颗粒主要含 G17, B 类分泌颗粒主要含 G34, G17 的生物活性较 G34 要大数倍, 而且, 分化程度差的癌胃泌素前体加工不完全, 某些酶或辅助因子功能低下, 以致癌细胞内胃泌素前体蓄积, 成熟胃泌素产生不足, 而分化良好的癌细胞具有较完善的酶系统, 致成熟胃泌素产生增加, 因此, 分化好的癌较分化差的癌胃泌素含量高。腹腔渗液胃泌素较血清高的原因可能是, 癌细胞直接将自身合成的胃泌素释放到腹腔, 加之腹腔具有的吸收功能使腹腔胃泌素浓缩。据此我们在临床治疗大肠癌工作中, 选择腹腔渗液胃泌素含量大于 100 pg/ml 的病人作为腹腔复发的高危人群, 进行术后腹腔灌洗化疗, 用于防止术后腹腔内复发取得了满意的效果。国外也有人利用血清胃泌素含量的测定预测大肠癌肝脏转移的报告[4], 我们认为大肠癌细胞能合成并分泌胃泌素, 以维持癌细胞的生长繁殖, 利用腹腔渗液胃泌素和血清胃泌素的测定, 预测大肠癌术后腹腔内复发和肝脏转移有重要参考价值, 对指导大肠癌术后治疗有重要意义。

关键词: 胃泌素; 结直肠癌
中图法分类号: R347.921　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Niv Y, Heizelracht N, Lamprecht S A, *et al*. Gastrin levels in colorectal cancer[J]. ISr J Med Sci, 1997, 33(3): 186—189.

[2] Iishi H, Tatsuta M, Baba M, *et al*. Enhancement by peptide histidine is oleucine of experimental carcinogenesis in the colon of rats induced by azoxymethane[J]. Cancer Lett, 1995, 94(1): 49—54.

[3] Singh P, Xu Z, Dai B, *et al*. Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cell: role of noncarboxyamidate gastrins[J]. Am J physiol, 1994, 266: (3 pl): G459—461.

[4] Kameyama M, Fukuda I, Imaoka S, *et al*. Level of serum gastrin as a predictor of liver metastasis from colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 1993, 36(5): 497—500.

（编辑　谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net