

中国庚型肝炎病毒(HGV)全基因结构特点及其感染地理分布

周育森¹ 王海涛¹ 何玉先² 赵惠柳³ 王槐春¹ 陈薇¹ 徐静¹

摘要 分析和讨论了中国人庚型肝炎病毒(HGV)的基因结构特点及我国 HGV 感染的地理分布状况。中国庚型肝炎病毒株(HGVC964)基因全长 9128 个核苷酸, 编码一个长度为 2870 个氨基酸残基的多聚前体蛋白。5' 端有一个 367bp 的非翻译区, 3' 端非编码区为 147 个核苷酸。基因组中 G+C 占 59.9%。该株病毒与国外报道的三株 HGV 序列比较, 核苷酸同源性为 82.0%~86.2%, 氨基酸同源性均大于 90%。对我国部分地区的某些人群进行的分子流行病学研究表明, 在我国北方、南方及广西少数民族地区也存在 HGV 感染。HCV 自然感染者中, HGV RNA 阳性率为 6.7%; HC 病人中, HGV RNA 阳性率为 9.6%; 非甲—非戊型肝炎病人中, HGV RNA 阳性率为 5.0%。这表明, 在我国 HGV 感染分布广泛, 不同地理区带均有可能存在该型病毒感染。

关键词 庚型肝炎病毒, cDNA 序列, 反转录聚合酶链反应, 地理分布

庚型肝炎病毒是 1995 年下半年刚刚发现的人类致肝炎病毒。在此之前, 虽有特异而敏感的方法检测已知的病毒性肝炎, 但仍有 10%~20% 的病毒性肝炎不能分型。流行病学调查及实验研究提示存在新的肝炎病毒。近年来国内外不少研究人员都在积极从事新型肝炎病原体的研究。1995 年 Simmons 等率先报道了两种病毒样序列。他们用代表性差异分析的差式 PCR 技术从感染 GB 因子的绢毛猴急性期血浆中克隆两株 RNA 病毒。种系进化分析表明, 它们与黄病毒属关系密切, 与 HCV 相距较远; 与人类、绢毛猴、酵母菌和大肠杆菌的 DNA 之间无任何同源性。这两株病毒被分别命名为 GBV-A 和 GBV-B^[1]。Simmons^[2] 等用 GBV 重组蛋白建立的 ELISA 试剂检测了美国和西非的部分 HNA-E 病人血清标本, 其中一例西非患者抗-GBV-A 和抗-GBV-B 均阳性, 用 RAD 技术扩出一段 322bp 的基因片段。Leary^[3] 在此基础上克隆测定了该株病毒(GBV-C, GenBank 号 HGU36380)的全基因, Linnen^[4] 于同年又克隆和测定了 HGV 的

基因(GenBank 号 HGU44402 和 HGU45966)序列。Leary 测定的 GBV-C 株病毒和 Linnen 克隆的病毒 HGV 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 85% 和 95%。目前认为二者为庚型肝炎病毒的不同分离株。最近的研究认为, GBV-A 和 GBV-B 可能不是人类致肝炎病毒, 而是猴类本身携带的病毒^[5]。今年初, 本研究室从河北固安某献血员血清标本中克隆出 HGV 的部分基因^[6], 证实我国存在 HGV 感染。

为建立适合我国国情的 HGV 诊断及进一步研制预防 HG 的疫苗, 我们克隆和测定了中国人庚型肝炎病毒(HGV)全基因^[7], 并对我国部分地区的某些人群进行了分子流行病学研究, 结果报告如下。

1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所(北京 100071)
2. 北京地坛医院肝病研究室(北京 100011)
3. 广西医科大学进修研究生(南宁 530027)

本研究为“九五”全军医药卫生科学研究基金面上课题
1996-10-15 收稿

1 材料与方法

1.1 HGV 全基因的克隆及 cDNA 序列测定

编码病毒结构和非结构蛋白区的基因的克隆及序列测定方法见文献[7]。5' 和 3' 末端的克隆采用 RACE 法^[4]。其简要步骤如下：利用随机引物和 SuperScriptII 反转录酶 (Gibco / BRL) 合成第一链 cDNA，用 PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化后，按照 5' / 3' RACE Kit (Boehringer Mannheim) 提供的试剂及程序进行 Poly(A)“加尾”，用 Oligo d(T)-anchor 引物 5'-GACCACGCGTATCGATGTGCGACTT-TTTTTTTTTTTTTT-3' 及特异引物 SP1(729-749)5'-CTGATACAGTGGCCAGCATTG-3' 和 anchor 引物 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3' 及特异引物 SP2 (161-182) 5'-AGACCCAGCTATAGTGGCTACC-3' 进行“巢式”PCR 扩增，获得相应的基因片段。3' 末端应用“锚定 RT-PCR”法，利用 Poly(A) 多聚酶 (Gibco / BRL) 在提取的总 RNA 加 Poly(A) 尾，并用 Oligotex (QIAGEN) 将 Poly(A)+mRNA 从总 RNA 中提纯，用 Oligo d(T)-anchor 引物合成第一链 cDNA，再用 anchor 引物及特异引物 SP3 (8231-8255) 5'-TGCTCGACCTGCTACATCAAAGTG-3' 和特异引物 SP4 (9024-9046) 5'-AGTCGCTGGCGGTGGTTGGGGTT-3' 进行“半巢式”PCR，获得相应的基因片段。所获得 5' 和 3' 基因片段的克隆及测序与前述方法相同。

1.2 HGV 感染的地理分布研究

研究对象及标本来源：分别从南京、上海、广西及河北采集献血员、HCV 感染者、HC 病人和非甲-非戊病人的血清标本作流行病学调查。采用 RT-PCR 法检测血清标本 HGV RNA：外引物：P1(sense)5'-CGCTCAA GCCAGCCTAAGCA-3'；P2(antisense)5'-CAATACCTCTCACCGACGGG-3'。内引物：P3(sense)5'-GGACTTCCGGATAGCTGA (A/G) AAGCT-3'；P4(antisense)5'-GCGTCCACACAGATGGCGCA-3'。从血清标本

中提 RNA，用随机引物反转录成 cDNA 后扩增：第一轮取 cDNA 5 μ l 作模板，p1 / p2 为 0.05 μ m / L，94 $^{\circ}$ C 180 s 预变性后，94 $^{\circ}$ C 40 s，52 $^{\circ}$ C 40s，72 $^{\circ}$ C 50s，25 个循环。第一轮：取第一轮 PCR 产物 3 μ l 作模板，p3 / p4 分别为 0.05 μ m / L，94 $^{\circ}$ C 180s 后，94 $^{\circ}$ C 40s，55 $^{\circ}$ C 40s，72 $^{\circ}$ C 50s，30 个循环。取第二轮产物 10 μ l 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察结果，扩增片段约 170bp。

1.3 不同地理株的变异研究

对南京及河北等地克隆的 HGV 株的部分区段进行 cDNA 序列测定，分析其不同地理株的变异情况。

1.4 序列分析方法

用军事医学科学院 Goldkey 软件进行分析。

2 结果

2.1 中国大陆庚型肝炎病毒 (HGVC964) 的基因结构特点

对 45 份献血员标本进行检测，其中一例 PCR 阳性，PCR 产物约为 170bp，纯化后与 T 载体连接转化后测定了该片段的序列。该序列与国外克隆的 3 株 HGV 对应位置的核苷酸同源性均在 88% 以上^[6]，而与其它病毒的同源性均低于 45%。以该份标本为材料克隆和测定 HGV 全基因，并称该株为庚型肝炎病毒中国株 (HGVC964)。其基因序列全长 9128 个核苷酸，编码一个长度为 2870 个氨基酸残基的多聚前体蛋白 (见 GenBank U75356 及文献 [7])。5' 端有一个 367bp 的非翻译区，3' 端非翻译区为 147 个核苷酸。基因组中 G+C 占 59.9% (G 占 31.5%，C 占 27.4%)，A 为 18.6%，T 占 22.4%。中国庚型肝炎病毒 HGVC964 株与国外株 HGU4402、HGU45966 和 HGU36380 (GenBank 注册号) 比较，核苷酸序列同源性分别为 84.0%、86.2% 和 82.0%，氨基酸序列同源性均大于 90%。

2.2 不同地区几种人群 HGV RNA 阳性率

HC 病人及非甲-非戊病人标本分别为采自上海宝山传染病院和南京八一医院住院病人

表1 中国 HGV(HGVC964)与已发表的病毒株基因结构的比较

	基因全长 (nt)	5' 非翻译区 (nt)	3' 非翻译区 (nt)	多聚前体 蛋白(aa)
HGVC964	9128	367	147	2870
HGU36380	9125	442	61	2906
HGU44402	9393	458	315	2873
HGU45966	9103	275	93	2910
GBV-A	9494	7	35	2972
GBV-B	9143	445	50	2864

表2 HGV 中国株(HGVC964)与国外株核苷酸序列及氨基酸序列同源性比较

	HGU44402		HGU36380		HGU45966	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
HGVC964	84.0	94.9	82.0	91.0	86.2	95.2
HGU44402			85.0	94.7	88.8	98.0
HGU36380					81.2	91.0

的血清标本。广西的 HCV 感染者为从一少数

民族自然村人群中筛选出的抗-HCV 阳性者。HGV RNA 阳性率结果见表 3。

表3 我国不同地区人群中 HGV RNA 阳性率(%)

	献血员	HCV 感染者	HC 病人	NA-NE 病人
南京			10.0(4/40)	6.7(2/30)
上海			8.7(1/12)	3.3(1/30)
广西		6.7(4/60)		
河北	2.2(1/45)			
合计	2.2(1/45)	6.7(4/60)	9.6(5/52)	5.0(3/60)

2.3 不同地理株的变异

对 HGV 南京和河北株部分核苷酸序列进行了测序, 两株间同源性为 93.79%, 与国外株相对应部分序列(HGU44402 的 7868-8032nt

表4 HGV 国内株部分核苷酸与国外株相对应部分序列同源性比较(%)

	南京株	HGU44402	HGU45966	HGU36380
河北株	93.79	86.06	87.88	89.09
南京株		89.09	92.12	87.27

处)的同源性见表 4。

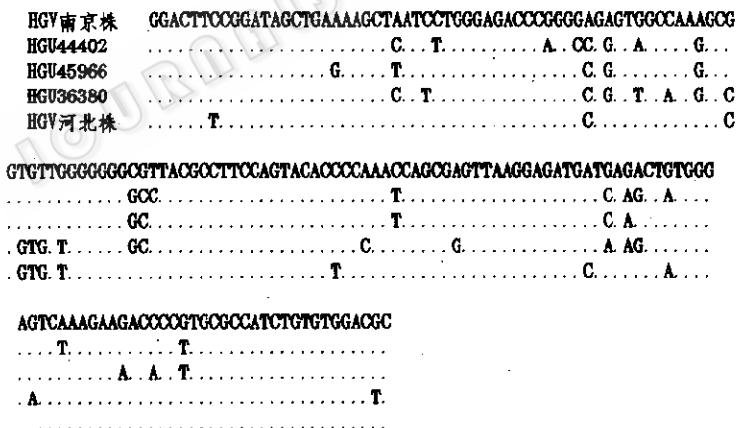


图1 HGV 国内株部分 cDNA 序列(165bp)与已发表 HGV 株序列比较

3 讨论

HGV 为单股正链 RNA 病毒, 基因全长约 9.1 ~ 9.4kb, 有一个大的编码前体蛋白的读码框架。编码的前体蛋白的氨基端为结构蛋白, 羧基端为非结构区。非结构区的丝氨酸蛋白酶、RNA 螺旋酶和 RNA 依赖 RNA 聚合酶

区较保守。国外已报道了三株 HGV 的全基因序列^[3,4]。我们克隆测定的 HGV 全基因序列为我国北方地区 HGV 株的序列。该株病毒与国外株比较, 其核苷酸和氨基酸同源性分别在 84% 和 91% 以上。这表明 HGV 感染虽呈全球性分布, 但在进化上较为保守。至于国内是否存在不同的地理株以及不同地理株 HGV 的

变异等需作进一步的研究。

现有资料表明, HGV 感染地理分布广泛。在 HGV 未发现前的流行病学调查就已表明, 在世界许多地区存在着已知病原体之外的新型肝炎。目前, 美国、澳大利亚、南美及法国等欧洲国家和非洲部分国家已有 HGV 感染的报告。我国北京及河北等地区均存在庚型肝炎病毒感染。我们的研究表明, 我国南方地区(南京、上海)及广西少数民族地区也存在 HGV 感染。这表明, 在我国 HGV 感染分布广泛, 不同地理区带均有可能存在该型病毒感染。我国属肝炎高发区, 存在着引起肝炎病毒感染传播的许多高危因素, 如献血员管理不力, 血源质量差及血液制品管理混乱和院内交叉污染等。因此, 与 HCV 感染一样, HGV 感染的防治将是我们今后面临的一大艰巨任务。

河北株是从自然人群中的献血员血清中克隆的病毒株, 南京株是从临床肝炎病人血清标本中克隆的病毒株。该两株部分核苷酸序列与国外株 HGU44402、HGU45966 株和 GBV-C 相应区段的序列同源性为 86.06% ~ 92.12%, 提示分布于我国的 HGV 株与国外已确认的 HGV 株有一定的差异。至于国内不同地理株间及国内株与国外株间核苷酸序列的变异程度如何, 是否存在不同的基因型, 需要进一步的研究。

庚型肝炎是以输血和经肠道外感染为主的

病毒性肝炎。在 HCV 和 HBV 高感染区的人群中 HGV 感染率较高^[4]。在西非某肝炎高发区, 人群中抗-GBV 阳性率高达 19.9%(259/1300), 从 259 例抗-GBV 阳性者中任选 42 例检测 HGV RNA, 7 例为阳性。美国供血员的调查表明, 796 例 ALT 正常的供血员中, HGV RNA 阳性率为 1.7%; 709 例 ALT 异常的供血员中为 1.5%。我们检测了南京地区、广西及上海的 HCV 感染者血清标本, HCV 自然感染者中, HGV RNA 阳性率为 6.7%; HC 病人中 HGV RNA 阳性率为 9.6%; 河北固安献血员中 HGV RNA 阳性率为 2.25%。这表明, 我国某些特殊人群中 HGV 感染率较高, 是一个不容忽视的问题。

参 考 文 献

- [1] Muerhoff S A, Leary T P, Pilot-Matias T J, et al. *J Virol*, 1995, 69(9): 5621 ~ 5630.
- [2] Simmons J N, Pilot-Matias T J, Leary T P, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 3401.
- [3] Leary T P, Muerhoff S A, Simons J N, et al. *J Med Virol*, 1996, 48: 60.
- [4] Linnen J, Jr Wages J, Zhang-Keck Z Y, et al. *Science*, 1996, 271: 505 ~ 508.
- [5] Schlauder G G, Pilot-Matias T J, Gabriel G S, et al. *Lancet*, 1995, 346: 447 ~ 448.
- [6] 周育森, 王海涛, 唐时幸等. 军事医学科学院院刊, 1996, 20(2): 160.
- [7] 周育森, 陈薇, 赵秋敏等. 军事医学科学院院刊, 1996, 20(4): 249 ~ 253.

GENOMIC ORGANIZATION OF CHINESE HEPATITIS G VIRUS (HGV) AND DISTRIBUTION OF HGV INFECTION IN CHINA

Zhou Yusen* Wang Haitao* He Yuxian** Zhao Huiliu
Wang Huaichun* Chen Wei* Xu Jiag*

(* Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing, 100071)

(** Research Center of Beijing Diton Hospital, Beijing, 100011)

Abstract The full HGV genome from Chinese was cloned and sequenced from the serum of a blood donor in Hebei province of China. The sequence of 9128bp indicated that it contains a continuous open reading frame (ORF) which could encode a viral polyprotein of 2870 amino acids.

The 5' and 3' untranslated regions are 367bp and 147bp, respectively. Compared with published HGV sequences, Chinese HGV shows 84% ~ 89% identity at the nucleotide, and 91% ~ 94% at the amino acid, levels.

In order to understand the distribution of HGV infections and molecular characteristics of HGV isolates from China, serum samples were detected by RT-PCR for HGV RNA and the PCR products were sequenced. The serum samples were collected from Hebei province, Nanjing, Guangxi and Shanghai city, respectively. The results showed that HGV infection existed both in northern and southern China. The positive rate of HGV RNA in population with HCV infection was about 6.7%, the positive rate in patients with hepatitis C was 9.6% and the positive rate in blood donors was 2.2%. The nucleotide identity between the two isolates (Nanjing and Hebei isolate) is 93.7%, while the two isolates showed 86.06 ~ 92.12% nucleotide identity over the corresponding region of isolates in America.

Key word Hepatitis G virus, cDNA sequencing, RT-PCR, Geographic distribution