

合并感染 HIV 对 1b 型 HCV E2/NS1 包膜区基因影响*

黄璜, 李军, 张卫东

摘要:目的 研究人类免疫缺陷病毒(HIV)感染对 1b 型丙型肝炎病毒(HCV) E2/NS1 包膜区基因变异的影响,探讨 2 组间 E2/NS1 区基因序列同源性差异,为 HCV/HIV 合并感染者中 HCV 的治疗提供依据。方法 对河南省某有偿献血村进行随访,将得到的所有 HCV 阳性病例 255 例根据合并 HIV 感染的情况分成 2 组,并对其基因分型,然后进行逆转录(RT)-巢式 PCR 扩增 1b 型 HCV E2/NS1 包膜区基因,继而进行单链构象多态性分析(SSCP)、纯化后测序。结果 HCV 单纯感染组和 HIV/HCV 合并感染组 SSCP 平均条带数分别为(3.4±0.55)、(2.6±0.55)条,差异有统计学意义($t=2.32$, $P=0.049$);HCV 单纯感染组和 HIV/HCV 合并感染组 HCV E2/NS1 包膜区同源性分别为 76.7% 和 87.6%,差异有统计学意义($\chi^2=20.13$, $P<0.001$);2 组第一高变区(HVR-1)同源性分别为 59.3% 和 81.9%,差异有统计学意义($\chi^2=10.39$, $P=0.001$);2 组第 3 高变区(HVR-3)同源性分别为 71.7% 和 83.9%,差异有统计学意义($\chi^2=4.60$, $P=0.03$);单纯 HCV 组中变异性较高的氨基酸位点在 HCV/HIV 合并感染组中表现出较高的保守性。结论 HIV 感染对 1b 型 HCV E2/NS1 包膜区基因变异具有抑制作用,且其主要体现在 HVR-1 和 HVR-3 区。

关键词: 丙型肝炎病毒;人类免疫缺陷病毒;逆转录聚合酶链反应;E2/NS1 包膜区;基因变异

中图分类号: R 181

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0778-03

Effects of HIV/HCV con-infection on E2/NS1 of HCV 1b genotype HUANG Huang, LI Jun, ZHANG Wei-dong. Department of Epidemiology and Health Statistics, College of Public Health, Zhengzhou University (Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Objective To study the change of E2/NS1 area of hepatitis C virus (HCV) caused by human immunodeficiency virus (HIV) /HCV co-infection and homologous differences between the two groups and to provide evidence for the treatment of HCV/HIV co-infection. **Methods** Totally 255 HCV positive cases were divided into two groups according to their HIV infection status and the HCV genotypes of the cases were identified. The E2/NS1 of HCV was amplified with reverse transcription-PCR (RT-PCR) for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and sequenced after purification. **Results** There were statistical differences between the HCV/HIV co-infection group and the HCV mono-infection group in genotype of HCV ($\chi^2=35.4$, $P<0.001$). There were statistical differences between the HCV/HIV co-infection group and the HCV mono-infection group in SSCP strip number ($t=2.32$, $P=0.049$). The homology of E2/NS1 of HCV for HCV mono-infection and HIV/HCV co-infection was 76.7% and 87.6%, respectively, with a significant difference ($\chi^2=20.13$, $P<0.001$). The variation in the two groups comes from HVR-1, HVR-2, and HVR-3. The homologous differences of the two groups are HCV E2/NS1, HVR-1, and HVR-3. The amino acid sites have high mutation in HCV mono-infection group but are more conservative in the HCV/HIV co-infection group. **Conclusion** HCV 1b is the main genotype in HCV mono-infection and HIV/HCV co-infection groups, but there are significant differences in HCV genotype distribution between the two groups. HIV can reduce the gene variant of 1b HCV E2/NS1, mainly in HVR-1 and HVR-3 area.

Key words: HCV; HIV; RT-PCR; E2/NS1 envelope; gene variant

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)和人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是当今世界性的公共卫生问题,因传播途径相同,常合并感染^[1]。而 HIV 感染可改变机体的免疫状态,影响 HCV E2/NS1 包膜区基因序列及结构变化,进而可能改变慢性 HCV 感染进程^[2]。为研究 HIV/HCV 合并感染对包膜区基因的影响,为 HIV/HCV 合并感染中 HCV 的治疗提供依据,本研究于 2009 年 8 月对河南省王营村有有偿献血史的所有 HCV 阳性病例 255 例进行随访,采集血样,并根据是否合并 HIV 进行分组,进行分子生物学实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血样来源 本课题组于 2009 年 8 月对河南省有有偿献血村王营村进行随访,在 2005 年《河南省艾滋病综合防治项

目》普查的基础上筛选该村 HCV 感染者和 HIV/HCV 合并感染者为调查对象,所有研究对象均在调查前签署知情同意书,由护士空腹采集其静脉血 5ml,并对 CD4⁺ T 细胞计数检测。根据合并 HIV 感染情况的不同将全部随访的样本分为 HCV/HIV 合并感染组 106 例和单纯 HCV 感染组 149 例,在符合条件的 2 组中随机抽取 10 例 HCV 基因分型为 1b 的感染者,组成 HCV E2/NS1 包膜区基因变异性研究的样本。HCV 检测采用酶联免疫试剂盒(北京万泰生物药业有限公司),抗-HCV 抗体阳性者诊断为 HCV 感染。HIV 检测采用 HIV 1+2 型抗体诊断试剂盒(北京金豪制药有限公司)。筛查阳性患者由护士再采 5mL 静脉血,分离血浆,用 HIV1/2 抗体诊断试剂盒(杭州澳亚生物技术有限公司)进行确认试验,确认阳性者诊断为 HIV 感染。所有检测均参照试剂盒说明书。

1.1.2 主要试剂与仪器 HCV 巢式引物(上海博大生物有限责任公司);RNA 酶抑制剂(北京 Promega 公司);病毒 DNA/RNA 快速纯化试剂盒(大连 TaKaRa 宝生物工程公司)。台式水平离心机(德国 Eppendorf 公司);DYY-8C 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);基因凝胶成像系统(美国 Syngene 公司)。

* 基金项目: 国家“十一五”科技重大专项(2008ZX10002-013)

作者单位: 郑州大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室,河南 郑州 450001

作者简介: 黄璜(1986-),女,河南济源人,硕士在读,研究方向: 流行病学。

通讯作者: 张卫东, E-mail: imooni@163.com

1.2 方法

1.2.1 HCV 基因分型 参照文献(3-5)提取血浆中病毒 RNA,PCR 扩增 HCV 核心区特异性片段,根据 Simmonds 命名系统确定样本的基因分型,其中 1a 型(57 bp),1b 型(144 bp) 2a 型(174 bp) 2b 型(123 bp) 3a 型(98 bp) (6-7)。

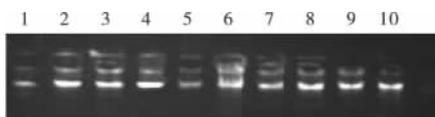
1.2.2 HCV E2/NS1 包膜区基因变异性 由于是来自同一地区同一基因型的样本,且所有 HCV 感染者均未接受过干扰素治疗,故认为在符合条件下随机抽取每组中分型结果为 HCV 1b 型的样本能够反映当地 HCV 1b 基因型 E2/NS1 包膜区基因的变异情况。对上述入选样本重新提取核酸 RNA,继而进行逆转录,PCR 取第二次 PCR 产物作电泳和纯化,单链构象多态性分析(single strand conformation polymorphism, SSCP) 对结果进行数据分析,应用 DNAMAN 和 MEGA4.1 软件构建 2 组的系统发生树(6-7)。

1.3 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验和 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 基本情况 255 例 HCV 患者中,男性 119 例,女性 136 例;年龄为 15~78 岁,平均为(46.82 ± 5.36) 岁。单纯 HCV 感染组与 HIV/HCV 混合感染组的性别构成差异有统计学意义($\chi^2 = 4.72, P < 0.05$)。

2.2 10 株不同来源的 HCV E2/NS1 包膜区基因 SSCP 结果(图 1) 在 5 例 HCV/HIV 的合并感染者条带数分别为 3、2、2、3、3,平均为(2.6 ± 0.55) 条;5 例单纯 HCV 组条带数分别为 3、4、3、3、4,平均为(3.4 ± 0.55) 条。单纯 HCV 感染组平均的 SSCP 的条带数多于 HCV/HIV 合并感染组的平均 SSCP 的条带数。在 HCV/HIV 合并感染组中 2 例未经高效抗逆转录病毒疗法(highly active antiretroviral therapy, HARRT) 治疗者的平均 SSCP 的条带数平均为 3.0,而 3 例接受 HARRT 治疗者的平均 SSCP 的条带数平均为 2.3,未接受 HARRT 治疗者的平均 SSCP 的条带数更接近单纯 HCV 感染组($t = 2.32, P = 0.049$)。



注:1、9、10:3 例接受抗 HIV 治疗者 SSCP 条带;4、5:2 例未接受抗 HIV 治疗者 SSCP 条带;2、3、6、7、8:5 例单纯 HCV 感染者 SSCP 条带。

图 1 HCV E2/NS1 包膜区扩增片段的 SSCP 图

2.3 2 组间 HCV E2/NS1 包膜区核苷酸序列比较(表 1) 2 组组内核苷酸同源性较低的区域集中在高变区(hyper variant region, HVR) HVR-1、HVR-2、HVR-3,而 2 组间在 HCV 整个 E2/NS1 包膜区核苷酸同源性差异有统计学意义($\chi^2 = 20.13, P < 0.001$),在 HVR-1($\chi^2 = 10.39, P = 0.001$),HVR-3($\chi^2 = 4.60, P = 0.03$) 2 组间同源性差异也有统计学意义,而在 HVR-2 及其他核苷酸区 2 组间核苷酸同源性差异无统计学意义($P > 0.05$),提示组间差异主要来自于 HVR-1、HVR-3。

2.4 2 组间 HCV E2/NS1 包膜区内 HVR-1 氨基酸序列比较

2 组间 HCV E2/NS1 包膜区内的 HVR-1 区第 2、6、23、24、26、27 位氨基酸位置全为保守序列,不同来源的 HCV E2/NS1 包膜区在这些位置上完全一致;脯氨酸只出现在 23 位甘氨酸的两侧;第 7 位氨基酸中,5 例 HCV/HIV 合并感染者全部为甘氨酸,而在单纯 HCV 感染组中,编号为 6、7、8 的 3 例

为甘氨酸,但编号为 9、10 的 2 例却为丙氨酸和谷氨酸,且为非同义突变;第 25 位的氨基酸在 5 例 HCV/HIV 合并感染者中高度保守为丝氨酸,而在 5 例单纯 HCV 感染者中却呈现高度变异,分别为 2 例脯氨酸,1 例丙氨酸,1 例天冬酰胺,1 例天冬氨酸,且均为非同义的变异;第 12 位氨基酸在 5 例 HCV/HIV 合并感染者中高度保守为苏氨酸,但在 5 例单纯 HCV 感染者中,只有 2 例为苏氨酸,其他 3 例中 2 例为丙氨酸,1 例为丝氨酸,且均为非同义突变。

表 1 2 组间 HCV E2/NS1 包膜区及各个高变区组间同源性比较(%)

Table with 6 columns: 分组, E2/NS1 区, HVR-1, HVR-2, HVR-3, 其他. Rows: 单纯 HCV 感染组, HCV/HIV 合并感染组.

2.5 2 组间的系统发生树(图 2) 2 组间核苷酸、氨基酸变异性存在差异,为研究组间进化趋势是否会因为这些差异而不同,因此选择上述方法构建 2 组间的系统发生树。

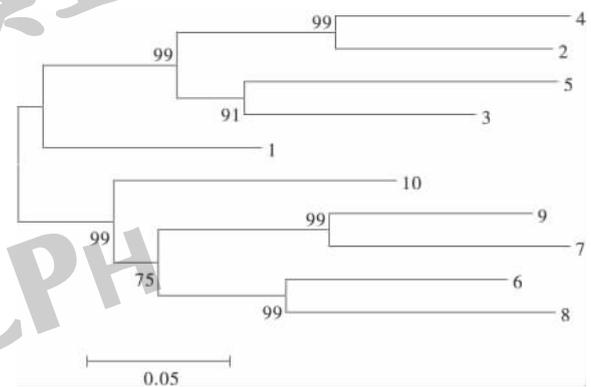


图 2 2 组间 HCV E2/NS1 包膜区系统发生树

3 讨论

本研究结果文献(8-9)结果一致,表明 2 组之间存在着基因的变异程度不同,HCV/HIV 合并感染组基因位点的变异性较大,存在较少的点突变;在合并 HIV 感染但未接受 HARRT 治疗的情况下,HIV 能够降低 HCV E2/NS1 包膜区基因的变异性,但在接受 HARRT 治疗后,会增加这种趋势,与国外的研究结果一致(10-12)。

HVR-1 具有多种生物学功能,其中最为重要的是抗 HVR-1 能中和 HCV,但是在高免疫压力下,该区处在动态的变化中,清除 HCV 的能力下降,导致 HCV 在体内持续存在,影响疾病的进程和转归(13),且 HCV/HIV 混合感染者更易发展为肝纤维化(14)。本研究发现脯氨酸只出现在 23 位甘氨酸的两侧,与国内外大多数研究结果一致,提示不论是否合并 HIV 感染,该区的变异都不是完全随机的,而是一种半保留的变异(15-16)。而在单纯 HCV 感染组中却呈现出氨基酸的复杂性,保守程度较低。在单纯 HCV 感染组中,由于该氨基酸位置改变,使得机体内原有抗体无法与该抗原氨基酸位结合,清除变异了的 HCV 能力降低,进而导致 HCV 变异的积累,当变异积累到一定程度时,就会引起上述 SSCP 条带数、核苷酸同源性的改变。进化树显示,变异趋势并未因组内的变异而产生不同,但合并 HIV 却引起了 HCV 变异趋势的改变。HCV/HIV 合并感染组该区基因的同源性较 HCV 单纯感染组高,提示 2 组间 HCV E2/NS1 包膜区的进化无趋同性,且 HCV/HIV 合并感染组变异性较低,进一步表明 HIV 感

染降低了 HCV 该区基因的变异性^[17]。本研究结果表明, HIV 感染降低了 1b 型 HCV E2/NS1 包膜区基因的变异, 此情况主要集中在 HVR-1 区和 HVR-3 区。HVR-1 区第 2、6、23、24、26、27 位氨基酸位置全为保守序列, 而第 7、12、25 位氨基酸位置, 在 HCV/HIV 合并感染组中表现相对保守, 但在单纯 HCV 感染组中却呈现出氨基酸的复杂多样性, 保守程度较低。

参考文献

- (1) 张旻, 胡清海, 赵飞, 等. 不同地区及途径 HCV/HIV 合并感染状况调查[J]. 中国公共卫生 2008 24(12): 1409-1411.
- (2) Pisani G, Cristiano K, Saldanha J, et al. External quality assessment for the detection of blood-borne viruses in plasma by nucleic acid amplification technology: the first human immunodeficiency virus and hepatitis B virus studies (HIV EQA/1 and HBV EQA/1) and the fifth hepatitis C virus study (HCV EQA/5) [J]. Vox Sang 2004 87(2): 91-95.
- (3) 崔之础, 张东雷, 施建, 等. 双探针实时荧光定量检测 HCV RNA [J]. 现代诊断与治疗 2006 17(6): 334-337.
- (4) Mine H, Emura H, Miyamoto M, et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan [J]. J Virol Methods 2003 112(2): 145-151.
- (5) Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, et al. Implications for screening of blood and tissue donors [J]. Microbial Immunol, 2004 45(9): 667-672.
- (6) Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes [J]. Hepatology 2005 42: 962-973.
- (7) 张瑞, 杜绍财. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展 [J]. 中华检验医学杂志 2006 29: 469-471.
- (8) Fried MW, Shiffman ML, Reddy RK, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection [J]. N Engl J Med 2005 347(13): 975-982.
- (9) Barnes E, Lauer G, Walker B, et al. T cell failure in hepatitis C virus infection [J]. Viral Immunol 2006 15(2): 285-293.
- (10) Puig M, Major ME, Mihalik K, et al. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection [J]. Vaccine 2006 22(8): 991-1000.
- (11) Zhao LJ, Wang L, Ren H, et al. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors [J]. Exp Cell Res 2005 305(1): 23-32.
- (12) Moratorio G, Martinez M, Gutierrez MF, et al. Evolution of naturally occurring 5' non-coding region variants of hepatitis C virus in human populations of the South American region [J]. Virol J, 2007 4(1): 79.
- (13) 房恩贞, 夏雪山. 丙型肝炎病毒基因突变与免疫逃避 [J]. 综述与专论 2008 5: 45-59.
- (14) 刘秀玮, 袁媛, 王长双, 等. HCV 感染患者肝脏纤维化 255 例队列研究 [J]. 中国公共卫生 2012 28(1): 12-14.
- (15) Zhou YH, Takekoshi M, Maeda F, et al. Recombinant antibody Fab against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus blocks the virus adsorption to susceptible cells *in vitro* [J]. Antiviral Res, 2006 56: 51-59.
- (16) 王迅, 郑岚, 许莉萍, 等. 献血者体内携带的 HCV 包膜区基因同源性分析 [J]. 临床输血与检验 2002 4(4): 15-17.
- (17) Wu C, Tao Q. Comparison between homologies of E2/NS1 gene from genotype 1b Chinese isolates of hepatitis C virus and that from report-ed isolates [J]. Chin Med J, 2007 111(9): 807-809.

收稿日期: 2012-02-07

(王奕编辑 刘铁校对)

【实验研究】

Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达在燃煤型砷中毒肝损伤中作用*

胡勇¹, 张爱华¹, 黄晓欣²

摘要:目的 探讨 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用。方法 选择贵州省燃煤污染型砷中毒病区 133 例砷暴露者为砷暴露组(包括病区非病人组、无明显肝病组、轻度和中重度肝病组), 以非砷污染村 34 名健康居民为对照组; 实时荧光定量 PCR 检测外周血 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达, 化学法检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活力和丙二醛(MDA)含量。结果 对照组、病区非病人组、无明显肝病组、轻度和中重度肝病组 Nrf2 mRNA 表达量分别为 0.650 5、0.690 4、0.877 8、1.283 4 和 1.393 5, Keap1 mRNA 表达量分别为 1.569 1、1.451 0、1.395 4、1.048 9 和 0.882 0; 与对照组、病区非病人组和无明显肝病组比较, 轻度和中重度肝病组 Nrf2 mRNA 表达上调, Keap1 mRNA 表达下调, SOD 活力降低($P < 0.05$); 中重度肝病组 GSH-Px 和 TrxR 活力降低, MDA 含量升高($P < 0.05$)。Nrf2 mRNA 表达与酶活力呈负相关、与 MDA 含量呈正相关, Keap1 mRNA 表达与酶活力呈正相关($P < 0.05$)。结论 燃煤砷可能通过调控 Nrf2 和 Keap1 mRNA 表达量, 调节机体氧化应激水平, 参与砷中毒肝损伤的发生发展。

关键词: 砷中毒; 煤; 肝损伤; Nrf2; Keap1; 转录表达; 氧化应激

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0780-03

Effects of Nrf2 mRNA and Keap1 mRNA expressions on arsenism liver injury caused by coal-burning HU Yong, ZHANG Ai-hua, HUANG Xiao-xin. Department of Toxicology, Guiyang Medical College (Guiyang 550004, China)

* 基金项目: 国家自然科学基金(81172603); 贵州省科技计划课题(黔科合重大专项[2006]6016号)

作者单位: 1. 贵阳医学院毒理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国人民解放军第 44 医院

作者简介: 胡勇(1979-), 男, 湖北仙桃人, 讲师, 博士, 研究方向: 砷中毒发病机制研究。

通讯作者: 张爱华, E-mail: aihuag@yaho.com.cn