

两株猪 HEV 病毒株全基因组序列分析

付红伟 杨桂芳 李昕

作者单位:300052 天津医科大学总医院医学检验科

【摘要】 **目的** 测定两株从新疆地区分离的猪戊型肝炎(hepatitis E, HEV)病毒株全基因组序列,并在全基因组水平上分析猪 HEV 病毒株与人源 HEV 的关系。**方法** 设计 HEV 基因 4 型通用 PCR 引物,用巢式反转录聚合酶链反应法(reverse-transcription-nested polymerase chain reaction, RT-nPCR)分段扩增猪 HEV 病毒株 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 的全基因组序列;用 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA, RACE)扩增其末端序列;对扩增的目的片段进行克隆测序,并对拼接后的基因组进行序列比对和进化分析。**结果** 除 3'polyA 尾外,CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 基因组全长分别为 7241 bp 和 7238 bp,两病毒株均与基因 4 型 HEV 核苷酸同源性最高,为 82.8%~95.5%;与基因 1~3 型 HEV 核苷酸同源型仅为 72.1%~74.9%。CHN-XJ-SW13 与分离自湖南、上海的猪 HEV 病毒株(HC10-44, HC1-88, estw2, ch-shsw1 和 SWXJ03)共同组成新的 HEV 基因亚型:4n 亚型,且该病毒株与香港人 HEV(HK 104-2004)在 ORF1 部分核苷酸序列同源性高达 94.6%。基因进化分析显示 CHN-XJ-SW33 属于 HEV 4a 亚型,在全基因组水平上与 JKO-ChiSai98C 核苷酸同源性高达 95.5%。**结论** 本文研究成功完成了两株猪 HEV 病毒株全基因组序列的鉴定,其中 CHN-XJ-SW13 为我国本土的 HEV 新基因亚型;在全基因组水平上猪 HEV 与人 HEV 高度同源的特性为基因 4 型 HEV 从猪到人传播的可能提供了更可靠的证据。

【关键词】 戊型肝炎病毒;猪;HEV 基因分型;HEV 基因亚型

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.005

The analysis of the complete genome sequence of two swine hepatitis E virus strains isolated from Xinjiang

FU Hong-wei, YANG Gui-fang, LI Xin. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】 **Objective** To determine the complete genome of swine hepatitis E (HEV) isolated from Xinjiang, China, and to analyzed the correlation between swine HEV and human HEV. **Methods** The PCR universal primer of HEV genotype 4 were designed. The complete genome sequence of HEV isolates CHN-XJ-SW13 and CHN-XJ-SW33 were amplified with reverse-transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) and 5' and 3' ends of viral genome were amplified with rapid amplification of cDNA ends(RACE). The PCR products were cloned and sequenced. The sequence and phylogenetic analysis of the two swine HEV isolates were performed. **Results** The full genome of CHN-XJ-SW13 and CHN-XJ-SW33 strains consisted of 7241 bp and 7238 bp nucleotides excluding the polyA tail, respectively. The full-genomic sequencing showed that the CHN-XJ-SW13 and CHN-XJ-SW33 strains shared similarity with all known HEV genotype 1, 2 and 3 isolates by 72.1%~74.9% and with an identity of 82.8%~95.5% among genotype 4 HEV isolates. CHN-XJ-SW13 isolate has formed a new sub-group (4n) with other swine HEV strains (HC10-44, HC1-88, estw2, ch-shsw1 and SWXJ03) isolated from Hunan Province and Shanghai. The partial ORF1 sequencing (145-423nt) showed that CHN-XJ-SW13 shared a high nucleotide identity of 94.6% with the HongKong human strain HK104-2004. CHN-XJ-SW33 shared a high nucleotide identity of 95.5% with JKO-ChiSai98C and located in the branch of HEV subtype 4a. **Conclusion** The full-genomic sequencing of two HEV strains are identified successfully, and CHN-XJ-SW13 is a new sub-group in our country. A high identity of nucleotide sequences between human and swine HEV strains isolated in Xinjiang suggested the possibility of swine to human transmission of sporadic HEV in HEV-endemic regions.

【Key words】 Hepatitis E virus; Pig; HEV genotypes; HEV sub-group

戊型肝炎病毒(hepatitis E, HEV)是我国急性肝炎的最主要致病因素之一,它是单股正链无包膜

RNA 病毒,其基因组全长约 7.2 kb,共包含 3 个开放读码框。其中开放读码框(open reading frame, ORF)

1 编码非结构蛋白, 主要为一些与病毒复制有关的酶; ORF2 编码结构蛋白; ORF3 编码羧基端具有免疫表位的蛋白, 但对其功能仍知之甚少。根据 HEV 核苷酸同源性高低可将其至少分为 5 个基因型, HEV 基因 1~4 型在人或哺乳类动物中存在, 与人源 HEV 关系较为密切, 而 HEV 基因 5 型为禽 HEV, 与人 HEV 进化关系较远, 目前的研究^[1]证实其不能跨物种感染人。此外 HEV 的各基因型具有明显的地域分布特点, 其中 1 型主要分布在亚洲和北非; 2 型主要分布在墨西哥及西非一些国家; 3 型分布范围较广, 主要集中在发达国家; 4 型的分布主要集中在亚洲。

目前, 在我国人群或动物中发现的 HEV 基因型主要有 1 型、3 型和 4 型, 其中基因 3 型和 4 型 HEV 被认为是一种人畜共患病^[2], 但由于目前扩增到的 HEV RNA 序列多为 HEV RNA 基因片段, 尚缺乏全基因组水平的证据支持。我国新疆地区曾在 1986 年至 1988 年爆发世界上目前已知规模最大的一次 HEV 疫情, 但目前尚无分离自该地区的 HEV 全基因组序列报道, 因此本文研究对从该地区分离到的两株猪 HEV 进行全基因组序列扩增, 以进一步了解猪 HEV 在当地人 HEV 传播流行中的作用。

1 材料与方法

1.1 病毒株 采集 2007 年自新疆克拉玛依市和且末县的 3 月龄以下猪粪便标本的分离株两株, 经巢式反转录聚合酶链反应法 (reverse-transcription-nested polymerase chain reaction, RT-nPCR) 检测为 HEV RNA 阳性, 分离株编号分别命名为 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33。

1.2 试剂 总 RNA 提取试剂盒、pGEM-T easy 载体及 MMLV 逆转录酶均购自北京 Promega 公司, LA Taq 酶、5'-Full RACE Core Ste 购自日本 Takara 公司, GeneRacer 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品, DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州 Axygen 公司。

1.3 引物设计 用 PrimerPremiers5 软件, 参照 HEV 4 型基因序列, 在保守区分段设计 PCR 引物 (表 1), 其中第 5、6 套引物为 5'-cDNA 末端快速扩增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 和 3'-cDNA RACE 引物。各目的片段相互重叠, 拼接片段全长覆盖 HEV 基因组序列。

1.4 核酸提取 用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 将猪粪便制备成 10% 的悬液, 充分混匀, 然后以离心半径 21 cm, 5000 r/min 于 4 °C 离心 30 min, 收集上清液保存于 -80 °C 备用。取 100 μl 上清, 按总 RNA 提取

试剂盒说明书操作提取 HEV RNA。

1.5 cDNA 的合成 取 HEV RNA 模板 12 μl, 5× Buffer 5 μl, 2.5 mM dNTPs 4 μl, 引物 set4-A2 (表 1, 42 °C 反转录 60 min, 75 °C 10 min 灭活逆转录酶。巢式 PCR 扩增: 第一轮 PCR 扩增: 取 cDNA 模板 4 μl, 10×PCR Buffer 5 μl, 2.5 mM dNTPs 4 μl, 上下游引物 (表 1, 10 pmol/μL) 各 3 μl, LA Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μl, 加水至 50 μl。循环参数: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 (每循环 5 圈降低 2 °C, 降至 52 °C 为止) 30 s, 72 °C 延伸 1 kb/min。最后在 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 kb/min 条件下循环 15 圈。第二轮 PCR 扩增: 取第一轮产物 5 μl, 配制成 50 μl 反应体系, 循环参数同第一轮 PCR 扩增。

1.6 RACE 5'RACE 和 3'RACE 分别按照 Takara 公司 5'-Full RACE Core Ste 和 Invitrogen 公司 GeneRacer 试剂盒说明书要求操作。对于 5' 端 cDNA 序列的扩增采用 RNA 连接酶介导的 cDNA 末端快速扩增 (RLM-RACE)。5'RACE 基因特异性下游内、外引物分别为 5'RACE-A1 和 5'RACE-A2, 3'RACE 基因特异性上游内、外引物分别为 3'RACE-S1 和 3'RACE-S2 (表 1)。

1.7 克隆及测序 对第二轮 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的条带切下后按凝胶回收试剂盒说明书对 PCR 产物进行纯化, 并将其连接入 pGEM-T easy 载体, 筛选出阳性克隆送北京诺赛基因有限公司, 用 ABI3730 测序仪进行序列测定。

1.8 序列及进化分析 用 AlignX 程序 (Vector NTI 软件包 version 9.0; InforMax, Frederick, MD, USA) 计算 HEV 不同分离株之间的相似性。用 MEGA 4.0 软件 (Tempe, AZ, USA) 进行核苷酸序列比对。使用邻接法构建生物进化树, 并用内部枝检验法对其进行评价。用 Kimura 2-参数法计算遗传距离。

2 结果

2.1 基因结构 将用 RT-nPCR 法及 RACE 法扩增获得的 6 个基因片段进行序列拼接, 得到猪 HEV 病毒株 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 的全基因组序列, GenBank 登录号分别为 GU119961 和 GU119960。除 polyA 尾外, CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 基因组全长分别为 7241 bp 和 7238 bp。两病毒株 5' 端非编码区 (untranslated regions, 5' UTR) 的长度均为 26nt, 3' 非编码区 (3' UTR) 长度均为 70nt (除 polyA 尾外)。5' 和 3' UTR 之间有 3 个 ORF。CHN-XJ-SW13 的 ORF1 为 27~5150 位核苷酸, 全长 5124nt, 编码 1707 个氨基酸, CHN-XJ-SW33 的

表 1 PCR 反应扩增引物及 RACE 反应引物

Set	引物	引物序列(5'-3')	TM	引物位置(nt)	产物(bp)
1	Set1-S1	AGGCTCCTGGCRTYACTACTG	61.7	52-72	1163
	Set1-S2	GCCYTGCCGAATGCTGTG	60.5	108-125	
	Set1-A1	GGCCRGGGAATGTAATCACC	60.9	1305-1287	
	Set1-A2	CCGGCACTGGGCRTAAAACT	62.5	1334-1315	
	Set2-S1	ATGACATAYCTYCGTGGYATTAG	60.9	1050-1072	
2	Set2-S2	GTCGCCAACGARGGYTGAA	65.3	1098-1117	2386
	Set2-A1	TWGTAGTCTCAGTRAATGTAGCRCCT	62.5	3528-3502	
	Set2-A2	CAGCCGTRGCAATAATWGTAGTCTC	60.9	3543-3519	
	Set3-S1	GGTTGCAGCYTAYACACCHCACAC	62.9	3094-3118	
3	Set3-S2	CGYAGGCTTGTATTGAYGAGGC	62.9	3141-3163	1711
	Set3-A1	GBCACACRAACCTAACRACAT	63.9	4893-4873	
	Set3-A2	CACACAVACYTGACCCACATTCGT	66.0	5000-4977	
4	Set4-S1	CCTGGYACTYTGCTCTGGAAYAC	65.8	4629-4561	1503
	Set4-S2	TGGGCTRTATGCTGGTGTGTTCT	66.3	4823-4843	
	Set4-A1	CDGCCGACGAAATYAATTCTG	60.7	6365-6345	
	Set4-A2	CCCTTRTCCTGCTGAGCRTT	62.5	6462-6443	
5	5'Race-A1	GCAGTGARTARAGYGCAAYCCCHGTCT	72.4	528-502	501
	5'Race-A2	CGRGCCATYGCCTCNGCRACATC	75.8	568-546	
6	3'Race-S1	ACYACNACTGCTGCYACACGBTTYATGA	70.9	6215-6242	936
	3'Race-S2	CTYTGTYYAAYCTTGCTGAYACGCTKCTC	67.5	6303-6331	

ORF1 为 27~5147 位核苷酸,全长 5121nt,编码 1706 个氨基酸;两株病毒株的 ORF2 分别为 5147~7171 和 5144~7168 位核苷酸,全长均为 2025nt,编码 674 个氨基酸;ORF3 分别为 5175~5519 和 5172~5516 为核苷酸,全长均为 345nt,编码 114 个氨基酸。其中 ORF1 与 ORF2 重叠 4 个碱基,ORF3 起始于 ORF2 5' 端下游第 29 位核苷酸,包含在 ORF2 中。该结构特征与已报道^[3]的 HEV 基因 4 型的基因组结构相同,不同于基因 1~3 型 HEV。见表 2。

2.2 核苷酸序列同源性及进化分析 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 全基因组序列与 HEV 基因 4 型全基因组参照序列的核苷酸同源性最高,为 82.8%~95.5%;与基因 1~3 型 HEV 全基因组参照序列的核苷酸同源性仅为 72.1%~74.9%;该两病毒株间的全基因组核苷酸同源性为 83.0%。经基因进化树分析发现两株病毒株均位于 HEV 基因 4 型的分支上(图 1)。

通过进一步对 CHN-XJ-SW13、CHN-XJ-SW33 和其他基因 4 型 HEV 病毒株的 ORF2 部分核苷酸序列进行同源性和进化树分析发现,自南疆且末地区分离的 CHN-XJ-SW33 病毒株在 ORF1 或 ORF2 部分核酸序列上与 HEV4a 基因亚型参考株同源性最高,达 91.8%~97.8%,而与 HEV 4b~4g 亚型参考

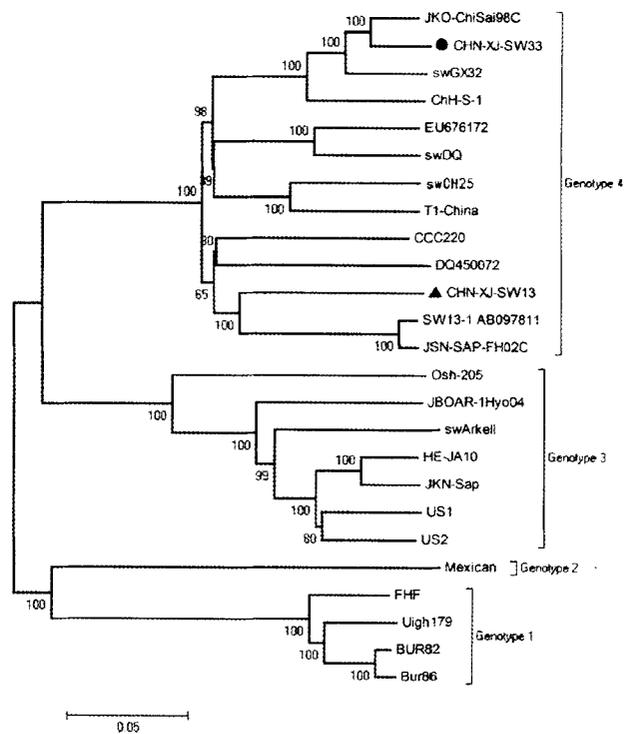


图 1 HEV 全基因组序列生物进化树

注:自南疆和北疆分离的猪 HEV 株分别以“●”和“▲”标记

株在该区域的同源性仅为 83.4%~87.3%, 基因进化树进一步分析显示该病毒株位于 4a 亚型分支上(见图 2)。由此可知自南疆分离的 CHN-XJ-SW33 属于

HEV 4a 亚型。

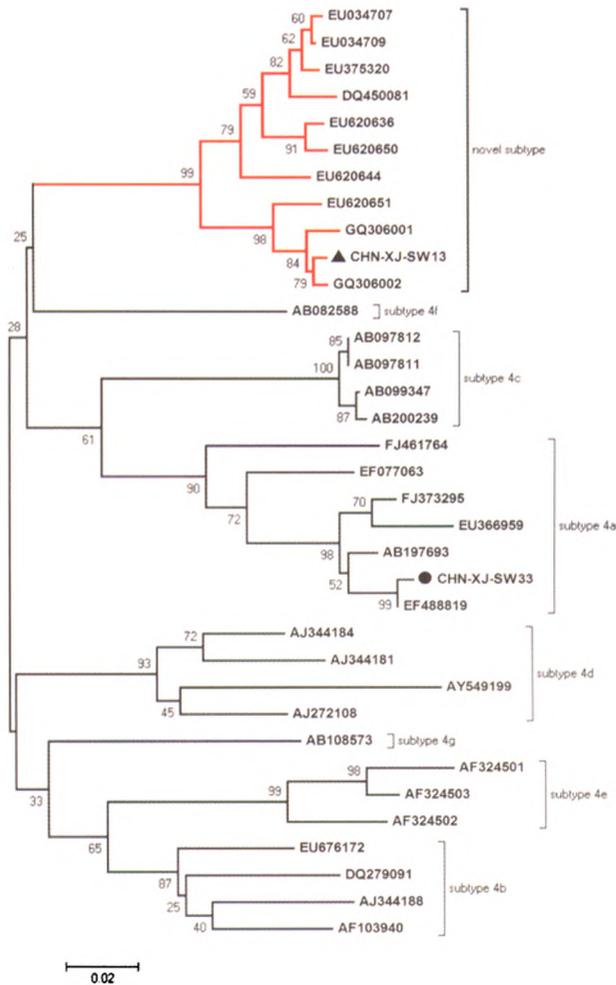


图 2 基因 4 型 HEV ORF2 部分核苷酸序列(281nt)生物进化树

注:自南疆和北疆分离的猪 HEV 株分别以“●”和“▲”标记

CHN-XJ-SW13 与自湖南、上海等地分离的猪 HEV 病毒株 (HC10-44, HC1-88, estw2, ch-shsw1 和 SWXJ03) 同源性较高, 并组成了新的亚型分支 (图 2-4), 在此新分支内部, 它们之间的同源性为 92.4%~99.6%, 而与 Lu 等^[4]报道的 4a~4g 亚型同源性仅为 80.7%~88.2%, 在全基因组水平上 CHN-XJ-SW13 与现有已知 HEV 基因组全序列核苷酸的同源性均低于 90%, 最高为 85.3%。按照 ZHAI 等^[5]基于部分核苷酸序列分析确定 HEV 的分型和分亚型标准, 同源性小于 90%即可划分为不同的基因亚型, 因此可将该新分支确定为新的基因亚型。

2.3 两病毒株的全基因组序列与 HEV 参考株的比较

2.3.1 5'UTR CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 病毒株的 5'UTR 区核苷酸长度均为 26 nt, 与多数已知 HEV 基因组全序的病毒株长度相当, 但较

swCH25 和 US2 分别短 7 和 9 个核苷酸 (表 2)。对 5'UTR 区进行核苷酸序列比对分析发现: 此区域高度保守, 去除长度差异后与已报道的 HEV 参考株间仅有两个核苷酸位点的变异。其中在第 11 位核苷酸位点处基因 3 和 4 型 HEV 株均为 G, 而基因 1 型病毒株则为 A 或 C, 在第 23 位核苷酸位点处基因 4 型 HEV 株均为 C, 而基因 1~3 型 HEV 株则均为 T (如图 3 中红色框内所示)。

2.3.2 ORF1 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 的 ORF1 区分别编码 1707 和 1706 个氨基酸, 与其他基因 4 型 HEV 参考株 ORF1 区氨基酸序列同源性分别为 92.9~94.8%和 92.5~98.1% (表 3、表 4)。多数 HEV 基因 4 型病毒株 ORF1 区编码 1705~1707 个氨基酸, 而基因 1 型和 2 型病毒株则仅编码 1692~1694 个氨基酸 (表 2)。不同 HEV 分离株 ORF1 编码氨基酸长度的差异主要是由在 HEV 高变区 (686aa~798aa) 发生的氨基酸插入或缺失导致的。其中 CHN-XJ-SW13 作为新的基因亚型的代表株与现有 HEV 基因 4 型病毒株在 ORF1 区氨基酸的同源性最高仅为 94.8%, 经氨基酸序列比对发现, 该新亚型病毒株发生了许多特有的氨基酸置换, 其中最为明显的发生在甲基转移酶区: 195aa~199aa, 此处 CHN-XJ-SW13 的氨基酸序列为 RSAAS, 而其他已知的 HEV 参考株在此位点的氨基酸序列均为 EVLLP; 此外, 该病毒株还发生了多达 11 个单个位点的氨基酸置换, 如: L75H、E401X、S1485P 等。CHN-XJ-SW33 作为 4a 基因亚型的一员与其它该亚型病毒株有着共同的特性, 如在高变区 (686aa~798aa) 788 位点发生了 4a 亚型病毒株所共有的氨基酸缺失 (S788 缺失), 该缺失使其编码的氨基酸序列长度较 CHN-XJ-SW13 短一个。除与 4a 亚型共有的氨基酸置换外, CHN-XJ-SW33 病毒株也发生了 5 个自身特有的氨基酸置换, 如 D1171G、P1312H 等。

对 ORF1 部分核苷酸序列进行同源性和基因进化分析显示: CHN-XJ-SW13 在 ORF1 (145~423nt) 区与香港人源 HEV 病毒株 HK104-2004 核苷酸和氨基酸同源性分别为 94.6%和 97.8%。CHN-XJ-SW33 与日本人源中国输入型 HEV 病毒株 JKO-Chi-Sai98C 在整个 ORF1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 95.1%和 98.1%。

2.3.3 ORF2 该区域较 ORF1 和 ORF3 更为保守, 两株病毒株与 HEV 基因 4 型参考株的氨基酸同源性分别为 94.6%~98.0%和 94.8%~99.5% (见表 3、4)。未发现两病毒株在该区域有氨基酸插入或缺

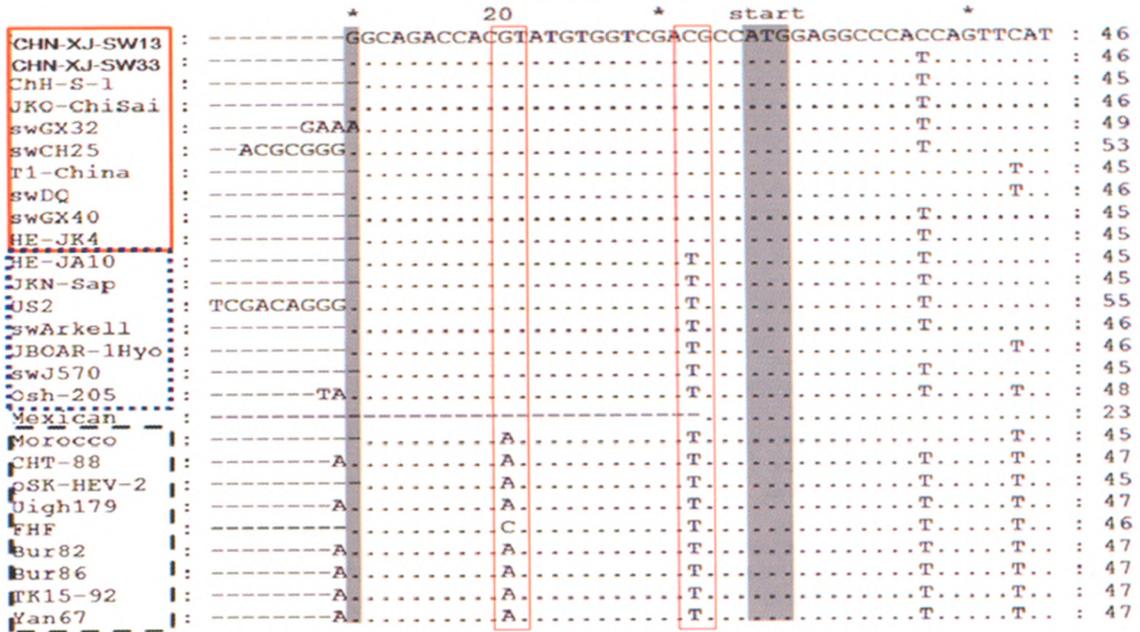


图 3 HEV 病毒株 5'UTR 区核苷酸序列比对分析

注:Start 代表 ORF1 的起始密码子位置,两灰色条框之间为排除长度差异后各不同 HEV 病毒株的 5'UTR 区

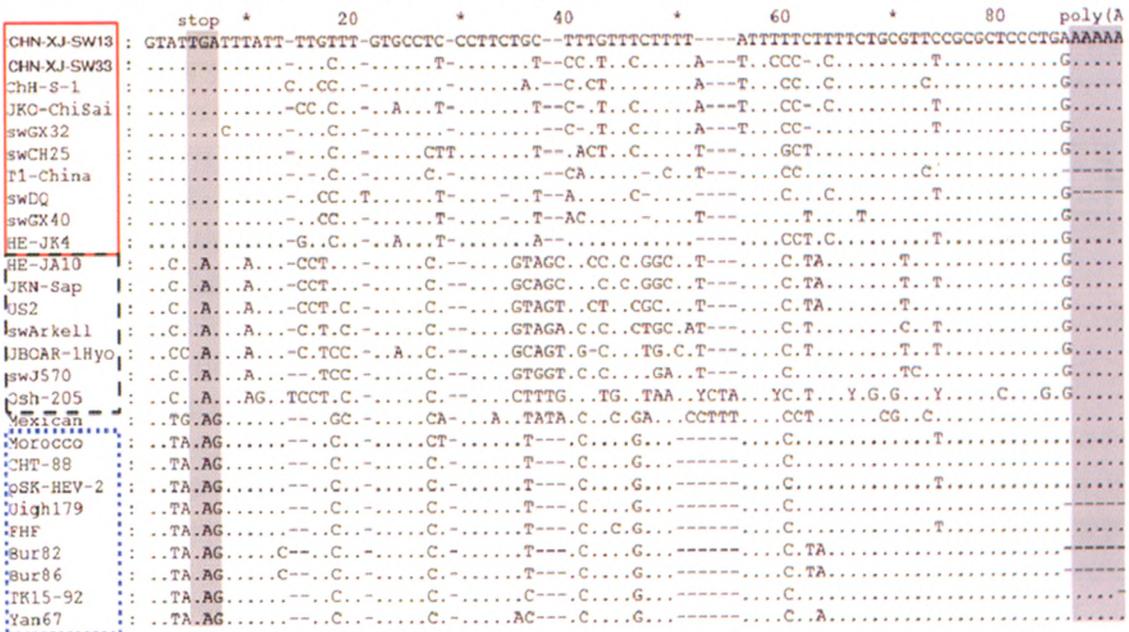


图 4 HEV 病毒株 3'UTR 区核苷酸序列比对

注:Stop 代表 ORF2 终止密码子位置,基因 3 型和 4 型 HEV 病毒株 ORF2 终止密码子分别为 TAA 和 TGA,基因 1 型和 2 型为 TAG

失突变,除 T1 和 swCH31 外所有的 HEV 基因 4 型病毒株 ORF2 区均编码 674 个氨基酸(表 2)。由于基因 4 型较基因 1~3 型 HEV 株发生了 ORF2 起始密码子前移,导致其较基因 1~3 型 HEV 株多编码 14~15 个氨基酸序列^[3]。此外所有的 HEV 基因 4 型病毒株的 ORF2 的终止密码子均为 TGA,而 HEV 基因 1 和 2 型病毒株均为 TAG,HEV 基因 3 型病毒株则均为 TAA(如图 4 中灰色阴影框所示),此现象与 Li 等^[6]报道的一致。这不仅可以帮助我们简单有效的进行型别鉴定,而且终止密码子的不同是否与不

同基因型的致病性特点有关值得我们进一步研究探讨。

2.3.4 ORF3 CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 ORF3 核苷酸长度均为 345nt,编码 114 个氨基酸,与除 T1 和 swCH31 外的多数 HEV 基因 4 型病毒株编码的氨基酸长度一致,较基因 1~3 型 HEV 株少编码 9 个左右的氨基酸(表 2)。与其他基因 4 型 HEV 病毒株的氨基酸同源性分别为 83.6~96.4%和 80.3~98.2%(表 3,4)。CHN-XJ-SW13 在此区域内无特异性的氨基酸置换现象,而 CHN-XJ-SW33 则既有自

表 2 不同 HEV 病毒株全基因组结构的比较

病毒株	长度(nt)	5'UTR(nt)	ORF1(aa)	ORF2(aa)	ORF3(aa)	3'UTR(nt)
Bur82	7194	27	1694	660	123	65
Uigh179	7194	27	1694	660	123	65
Mexican*	7170	3	1692	659	123	74
Us1*	7186	0	1699	660	123	72
Us2	7251	35	1709	660	123	72
T1	7232	25	1707	672	112	68
SwCH25	7243	33	1707	674	114	72
SwCH31	7235	26	1707	660	115	68
Ch-s-1	7239	25	1706	674	114	72
SwGX32	7240	29	1706	674	114	69
SwGX40	7233	25	1705	674	114	69
swDQ	7234	26	1705	674	114	69
CCC220*	7193	9	1706	674	114	42
Swj13-1	7240	25	1707	674	114	70
JKO-Chi-Sai98C	7237	26	1706	674	114	69
CHN-XJ-SW33	7238	26	1706	674	114	70
CHN-XJ-SW13	7241	26	1707	674	114	70

注:不完整的 HEV 全基因组序列以“*”标记

表 3 CH-XJ-SW13 与 11 株基因 4 型 HEV 参考株核苷酸和氨基酸序列同源性比较

病毒数	来源	全序同源性 %(nt)	ORF1		ORF2		ORF3	
			%(nt)	%(aa)	%(nt)	%(aa)	%(nt)	%(aa)
JSN-SAP-FHO2C	人	85.7	85.0	94.7	88.0	97.9	95.9	96.4
SW13-1	猪	85.8	85.4	94.8	88.3	98.0	96.5	96.4
Ch-S-1	人	83.7	82.1	92.9	86.6	97.3	93.3	89.4
SwCH31	猪	84.2	83.8	93.9	84.0	94.6	85.0	83.6
CCC220	人	83.7	83.5	93.6	87.3	98.2	95.9	94.7
SwGX32	猪	83.0	82.1	93.2	86.1	96.8	93.3	88.5
SwGX40	猪	83.3	82.0	92.9	87.2	97.7	96.5	95.6
SwDQ	猪	82.9	81.9	92.9	86.8	97.4	94.7	93.8
T1	人	83.3	82.6	93.2	88.3	96.2	92.4	89.4
JKO-ChiSai98C	人	83.3	82.3	93.4	86.3	97.3	93.9	90.3
swCH25	猪	83.7	82.8	93.5	86.2	97.3	94.7	93.8

表 4 CH-XJ-SW33 与 11 株基因 4 型 HEV 参考株核苷酸和氨基酸序列同源性比较

病毒株	来源	全序同源性 %(nt)	ORF1		ORF2		ORF3	
			%(nt)	%(aa)	%(nt)	%(aa)	%(nt)	%(aa)
JKO-ChiSai98C	人	95.5	95.1	98.1	96.8	99.5	98.2	98.2
SwGX32	猪	92.7	92.5	97.9	94.2	99.1	97.6	95.6
Ch-S-1	人	82.8	89.8	96.7	92.4	99.4	93.3	93.8
SW13-1	猪	83.5	82.2	93.4	87.0	97.9	94.2	90.3
CCC220	人	82.8	82.2	93.6	87.5	98.2	94.2	90.3
SwCH31	猪	83.3	82.3	92.5	84.6	94.8	83.7	80.3
SwGX40	猪	83.2	82.5	93.7	88.0	98.2	94.2	89.4
SwDQ	猪	83.6	82.5	94.0	87.7	97.9	93.0	89.4
T1	人	83.2	82.3	93.6	87.0	96.1	91.0	86.8
JSN-SAP-FHO2C	人	83.5	82.3	93.4	87.2	98.0	94.2	90.3
swCH25	猪	83.8	82.3	93.9	87.9	98.0	93.9	89.4

身特异性氨基酸置换(如 P102L),又有 4a 亚型所共有的氨基酸置换,如:A33V,A34V,G82D 和 S83N。

2.3.5 3'UTR 区 除去 polyA 后,多数 HEV 株 3'UTR 区核苷酸长度在 65~74nt 之间,两病毒株的 3'UTR 区长均为 70 nt(表 2)。经核苷酸序列比对发现:3'UTR 区(尤其 3' 末端区域)变异较大,有大量核苷酸的插入或缺失(图 4)。此外据目前实验方法检测到的 polyA 尾的长度与实验本身所采用的含锚定引物的 Oligo dT 反转录引物中 dT 的长度有关,并不能真实反应 HEV 株 polyA 尾的长度。

3 讨论

本文研究采用 RNA 连接酶介导的 RACE 法(RLM-RACE),由于该方法充分利用了 HEV 基因组 5' 端甲基帽的结构特点,因此与传统的 cDNA 文库克隆及经典的 RACE 方法相比,能充分避免因截断 5' 端序列而造成的信息丢失,可更真实的反应 HEV 基因组 5' 端的序列信息^[7]。CHN-XJ-SW13 和 CHN-XJ-SW33 的 5' 端序列信息显示其 5'UTR 区核苷酸长度均为 26nt,与多数已知 HEV 基因组全序的病毒株长度一致,但较 swCH25 和 US2 分别短 7 和 9 个核苷酸(表 2)。由于 5'UTR 区序列十分保守,这种 5'UTR 区的长度差异可能与应用不同检测方法有关。另外,目前我国多数研究者^[8-10]是采用 15~20 段 RT-nPCR 反应来完成 HEV 的全序列测定,而本文研究是通过 4 段 RT-nPCR 扩增及 2 段 5' 和 3'RACE 扩增来获得 HEV 全基因组序列,这在技术上更为简便,且随着拼接序列的减少,极大地提高了全基因组序列信息的准确性。

我国新疆南部地区曾爆发世界规模最大的戊型肝炎疫情,现在仍是我国戊型肝炎的主要流行区^[11]。然而近年来尚无从该地区分离的猪 HEV 株全基因组序列的报道。CHN-XJ-SW33 是本文研究从我国新疆南都地区扩增到的全基因组序列的猪 HEV 株,通过对其进行核苷酸同源性和进化分析发现,CHN-XJ-SW33 为 HEV 4a 亚型,这与梁靖瑞等^[12]报道的南疆地区猪 HEV 为 4a 亚型的结果一致。迄今,HEV 4a 亚型病毒株已在广西、北京、上海、湖南、浙江、江苏等全国多个省市或地区被广泛分离。由于这些病毒株的分离地点相距较远,他们之间是否具有相同的猪种来源,各地间的生猪贸易和频繁的人员往来是否是其广泛分布的内在因素,仍需进一步探讨。

在全基因组水平上 CHN-XJ-SW33 与 JKO-ChiSai98C 的核苷酸同源率为 95.1%,ORF2 区氨基

酸的同源性更高达 99.5%。JKO-ChiSai98C 是 1998 年从日本一名急性戊型肝炎患者血清标本中分离的,其在发病前有到中国西安旅游史,因此,该病毒株被确定为中国输入型日本人 HEV 株。通过全基因组同源性分析发现,该两病毒株之间的核苷酸差异率为 4.9%,根据 HEV 株在自然状态下每个核苷酸位点的突变概率为 1.40~1.72×10⁻³/年^[13],经过 10 年时间的遗传进化,其至少可发生 2%的突变,由此可以推测,10 年前 CHN-XJ-SW33 的祖先病毒株可能与 JKO-ChiSai98C 有着更为接近的生物进化关系。

分离自北疆克拉玛依的猪 HEV 病毒株 CHN-XJ-SW13 与分离自上海、湖南的猪 HEV 病毒株及香港的人 HEV 病毒株共同组成了基因 4 型 HEV 新的亚型。考虑到香港毗邻中国大陆,且大陆是香港的主要食物供应地,据统计在香港有超过 80%的生猪/猪肉是从大陆(特别是从湖南、广西等地区)进口的^[14]。最近报道^[15,16]显示猪是中国大陆 HEV 感染的主要源头,且在市售猪肝中检测到了 HEV RNA 的存在。由于香港的华裔居民经常有进食热狗、香肠、涮锅等容易未完全熟的猪肉食品的习惯,且香港人群中流行的 HEV 基因型和亚型与大陆地区十分相似^[14],因此香港的戊型肝炎散发病例很可能与大陆的猪输入有关。

CHN-XJ-SW33 与从南疆汉族散发性戊型肝炎患者分离的 HEV 株 CHN-XJ-HE29 同属于 HEV 4a 基因亚型(图 2),而与 1986 年至 1988 年南疆戊型肝炎流行的 HEV 株分属于不同的基因型。由此可知猪 HEV 株可能与当地汉族人群中散发性戊型肝炎有关,而与人群中的戊型肝炎流行无关。CHN-XJ-SW33 与 3 年前本研究组在南疆地区分离到的猪 HEV 株 XJ3-2 在 ORF1 部分区域同源性为 100%,在 ORF2 部分区域仅有 1 个核苷酸的差异,同源性为 99.7%。提示猪 HEV 株 CHN-XJ-SW33 可能至少已在当地猪群中存在 3 年以上。

综上所述,两株猪 HEV 病毒株全基因组序列的完成与生物进化分析,可为追踪散发性戊型肝炎的传染源及制订防控措施提供理论依据。此外本文研究也为基因 4 型 HEV 从猪到人传播的可能性提供了全基因组分析的证据。

4 参考文献

1 Chang Y, Wang L, Geng J, et al. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepato Res*, 2009, 39: 1153-1158.
2 Guo QS, Ge SX, Xiong JH, et al. The molecular differences between

- genotype 1 and genotype 4 of HEV in their neutralization region. *Bing Du Xue Bao*, 2007, 23: 454-458.
- 3 Wang Y, Zhang H, Ling R, et al. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1675-1686.
- 4 LU L, LI C, HAGEDORN CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in medical virology*, 2006, 16: 5-36.
- 5 ZHAI L, DAI X, MENG J. Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus research*, 2006, 120: 57-69.
- 6 LI L, ZHU Y, FU H, et al. Full-genome nucleotide sequence and analysis of a Chinese swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 identified in the Guangxi Zhuang autonomous region: evidence of zoonotic risk from swine to human in South China. *Liver Int*, 2009, 29: 1230-1240.
- 7 郝敏,谷守芹,韩建民,等. cDNA 末端扩增技术的研究进展. *河北林果研究*, 2006, 21: 157-161.
- 8 马勋,路程平. 猪戊型肝炎病毒株 swCH25 全基因序列的分析. *中国农业科学*, 2005, 38: 1669-1674.
- 9 吉彦莉,李凌君,韦献飞,等. 猪戊型肝炎病毒株 swGX32 全基因组序列分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28: 421-425.
- 10 SI FS, ZHU YM, DONG SJ, et al. Full genomic sequence analysis of swine genotype 3 hepatitis E virus isolated from Shanghai. *Virus research*, 2009, 144: 290-293.
- 11 邹林樾,廖立夫,赵素元. 新疆南部戊型肝炎疫区间隔 20 年后局部再爆发的调查. *微生物学免疫学进展*, 2004, 32: 14-16.
- 12 梁靖瑞,韦献飞,薛城,等. 猪 HEV 基因型和亚型的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27: 747-750.
- 13 TAKAHASHI K, TOYOTA J, KARINO Y, et al. Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol Res*, 2004, 29: 212-215.
- 14 LAM WY, CHAN RC, SUNG JJ, et al. Genotype distribution and sequence variation of hepatitis E virus, Hong Kong. *Emerging infectious diseases*, 2009, 15: 792-794.
- 15 ZHENG Y, GE S, ZHANG J, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *The Journal of infectious diseases*, 2006, 193: 1643-1649.
- 16 王娜,陆一涵,郑英杰,等. 山东省某地屠宰场猪肝内戊型肝炎病毒感染状况研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28: 1013-1019.

(收稿日期:2012-04-20)

(本文编辑:陈淑莲)

(上接第 127 页)

分,因此,血管内外的白蛋白梯度可以反映门静脉压力。近年来,SAAG 这一概念的引入提高了腹水病因诊断的准确性^[4]。本文通过对 212 例腹水患者的研究结果表明,SAAG 诊断门脉高压性腹水的敏感性为 94.12%,特异性为 95.58%,准确率为 94.27%,明显高于传统的鉴别渗、漏出液的方法,与近年来文献^[5,6]报道结果类似。

早在 1978 年,Hoefs 就提出了 SAAG 的概念,他发现了 SAAG 与门脉压力呈正相关,SAAG 越高,说明门脉压就越高。同一患者的门脉压力是保持稳定的,所以在患者摄入含盐食物,输注白蛋白及使用利尿剂或治疗性腹穿前后,SAAG 没有或仅有极其细微的改变。近几十年的研究证实,SAAG 对腹水病因的鉴别诊断意义已经远远优于传统的由腹水总蛋白定义的渗、漏出液的概念,故已经取代腹水总蛋白对腹水的分类,被写入希氏内科学。SAAG 检测在国内特别是基层医院近年来才引起重视。检测 SAAG 仅需在抽取腹水当天加抽静脉血,而检查白蛋白的仪器及试剂在最基层的一级医院也具备,该方法适宜在基层医院推广。

4 参考文献

- 1 Park HC, Seong J, Han KH, et al. Dose-response relationship in local radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 54: 150-155.
- 2 Chou CH, Chen PJ, Lee PH, et al. Radiation-induced hepatitis B virus reactivation in liver mediated by the bystander effect from irradiated endothelial cells. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 851-857.
- 3 Runyon BA. Management of adult patients with ascite caused by cirrhosis. *N Eng J Med*, 1994, 330: 337.
- 4 Hoefs JC. Serum protein concentration and portal pressure determine the ascites fluid protein concentration in patients with chronic liver disease. *J Lab Clin Med*, 1983, 102: 260.
- 5 刘方旭,谢鹏雁.血清腹水白蛋白梯度与渗漏出液概念临床价值比较. *中华消化杂志*, 2002, 22: 175.
- 6 张滔,赵新颜,贾继东,等.血清-腹水白蛋白梯度在鉴别门脉高压性与非门脉高压性腹水中的临床意义. *实用临床医药杂志*, 2007, 11: 25-26.

(收稿日期:2012-02-17)

(本文编辑:张志成)