· 调查报告 ·

武汉地区丙型肝炎病毒基因分型与慢性丙型肝炎患者肝功能和血液指标分析*

周　泉,李　艳△,童永清,汪　明,徐万洲
(武汉大学人民医院检验科,武汉 430060)

摘　要:目的　了解武汉地区慢性丙型肝炎患者基因型分布特点,分析 HCV 不同基因型患者肝功能及血液学指标的变化。**方法**　应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对临床已诊断为丙肝患者(病例组)进行 HCVRNA 载量检测,并使用 PCR 直接测序法进行 HCV 基因分型,同时检测每位患者肝功能和血液学指标。另选 90 例健康体检者(对照组)进行相同检测。**结果**　90 例慢性丙肝患者中以 HCV1b 型和 2a 型为主,分别为 74 例(82%,RNA 载量对数值为 8.19±2.33)和 7 例(7.2%,RNA 载量对数值为 6.12±1.56)。患者肝功能指标高于对照组,血液学指标低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但不同基因型患者肝功能和血液学指标测值未见明显差异($P>0.05$)。**结论**　武汉地区 HCV 基因分型及慢性丙肝患者肝功能、血液学检查对临床治疗有重要意义。

关键词:肝炎,丙型,慢性;　基因型;　RNA,病毒;　逆转录聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.026　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2013)13-1693-03

Patients with hepatitis C for genotyping, liver function and blood analysis in Wuhan area*

Zhou Quan, Li Yan△, Tong Yongqing
(*Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan* 430060, *China*)

Abstract: Objective　To study the distribution characteristics of Wuhan area in patients of hepatitis C, analysis the change of liver function and blood indexes in different HCV genotype. **Methods**　Quantitative detection of HCVRNA for the clinical diagnosis of hepatitis C patients(the case group), and using reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Direct sequencing for HCV genotyping and each patient were detected in liver function and blood analysis. Another 90 healthy subjects(control group) were the same detection. **Results**　In 90 patients, there were HCV1b 74 cases(82%, HCV RNA 8.19±2.33)and 2a 7 cases(7.2%, HCV RNA 6.12±1.56). The liver function of case group was higher than control group and blood indexes were lower($P<0.05$). But the liver function and blood indexes of different HCV genotype had no significant difference($P>0.05$). **Conclusion**　The genotype, liver function and blood indexes in patients of hepatitis C in Wuhan area has important clinical significance in clincal treatment.

Key words: hepatitis C, chronic;　genotype;　RNA, viral;　reverse transcriptase polymerase chain reaction

丙型肝炎病毒(HCV)自 1989 年被美国人发现以来,人类 HCV 感染率的上升逐渐成为世界性公共卫生问题。由于 HCV 编码的病毒 RNA 聚合酶缺乏校对功能,使得 HCV 在复制过程中易产生碱基错配,且其自身在不断的适应环境和逃避宿主的免疫监视,HCV 因而被认为是最易引起变异的肝炎病毒,其每个位点核苷酸变异频率约为 10%[1]。HCV 基因型是影响 α 干扰素治疗效果的主要因素[2]。所以,HCV 基因分型检测对疗效预测、预后判断以及决定疗程长短均有重要意义。HCV 基因分型是根据基因序列差异的多少而定,目前报道的基因型有 1a、1b、1c、2a、2b、2c、3a、3b、4、5 和 6。不同基因型和基因亚型的 HCV 对肝脏的损伤程度不同,但对血液学的损害未见相关报道。本实验对武汉地区 HCV 基因分型并比较慢性丙肝患者与健康人群以及不同基因型丙肝患者的肝功能指标和血液学指标的差异,为临床防治慢性丙肝提供实验室依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选择 2011 年 1 月至 2012 年 7 月在本院就诊的 90 例慢性丙肝患者(病例组),包括男 59 例,平均年龄(43.94±16.49)岁;女 31 例,平均年龄(45.61±13.81)岁。诊断符合 2004 年中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫学分会修订的《丙型肝炎防治指南》的相关标准[3],另外随机选取体检健康者 90 例为对照组,其中男 50 例,年龄平均(40.39±12.69)岁;女 40 例,平均年龄(44.34±15.63)岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2　检测方法　清晨空腹采集静脉血 3 mL 于 EDTA-K_2 抗凝管,3 mL 于枸橼酸钠促凝管。

1.2.1　血液学检查　血液检测使用 Sysmex 公司 XE-2 的血液分析仪(五分类),使用全血检测红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、血红蛋白含量(Hb)、血小板计数(PLT)。质控品测试均在控制范围内进行。

1.2.2　肝功能检测　将促凝管离心后取血浆检测肝功能,采用 HITACH7600-110 全自动生化分析仪,检测谷丙转氨酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶/谷草转氨酶、球蛋白、清蛋白值。质控品测试均在控制范围内进行。

1.2.3　HCVRNA 载量检测　取血浆后使用上海科华生物股份有限公司生产的 HCVRNA 定量检测试剂盒(国食药监械(准)字 2009 第 3400677 号),按照 Taqman 探针的原理对 HCV 进行定量检测。采用罗氏生产的 Lightcycler480 荧光定

*　基金项目:国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305 号)。　作者简介:周泉,女,硕士研究生,主要从事个体化医疗分子诊断研究。
△　通讯作者,E-mail:yanlitf@yahoo.com.cn。

量 PCR 仪，空白对照、强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照，临界阳性质控和 HCVRNA4 个标准品对照（浓度分别为 10^7、10^6、10^5、10^4 copies/mL）。根据 HCV 标准品建立的标准曲线由软件自动计算出待测样本中的 HCV RNA 的准确载量。

1.2.4 HCV 基因型检测　提取血浆中 HCV 的 RNA 后使用逆转录酶将 RNA 转化为 cDNA。将 DNA 进行扩增、电泳、胶回收之后，采用 ABI 公司生产的 ABI3130 仪器使用 Sanger 测序法直接碱基测序，并对测出的序列进行丙肝基因分型。

1.3 统计学处理　使用 SPSS17.0 统计学软件包进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组均值比较采用 t 检验；以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 武汉地区慢性丙肝患者 HCV 基因型分布　90 例患者中 88 例为单基因型，2 例为混合基因型，分别为 1b2a 和 6d6k。6a、6b、1b2a、6d6k 的例数均小于 3 例，因此无法用 $\bar{x}\pm s$ 表示 HCV RNA 载量值。其中不同基因型性别、年龄分布见表 1。数据显示武汉地区以 HCV 1b 型和 2a 型为主，分别为 74 例（82%，RNA 载量对数值为 8.19±2.33）和 7 例（7.2%，RNA 载量对数值为 6.12±1.56）。因此针对这两种基因型的 81 例患者，HCV RNA 结果显示 1b 型和 2a 型的 HCV-RNA 载量之间有明显的统计学差异（$P=0.009$）。

2.2 慢性丙肝患者肝功能部分检查结果　慢性丙肝患者组的 ALT、AST、GLB、ALB 检测结果均高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

2.3 慢性丙肝患者血液学部分指标检测结果　慢性丙肝患者组 RBC、WBC、Hb 和 PLT 结果均显著低于对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

2.4 不同基因型丙肝患者肝功能及血液学指标的比较　慢性丙肝患者不同基因型的肝功能及血液学部分指标结果比较无统计学差异（$P>0.05$），见表 4。其中 6b、1b2a、6d6k 型仅有 1 例，6a 仅有 2 例，不参与比较。

表 1　基因型与性别年龄分布

基因型	HCV RNA 对数值	比例（%）	性别（n）		年龄分布（n）		
			男	女	<30	30～60	>60
1b	8.19±2.33	82.0	47	27	18	46	10
2a	6.12±1.56	7.8	5	2	0	4	2
3b	3.23±1.98	5.6	5	0	2	4	0
6a	—	2.2	1	1	0	1	1
6b	—	1.1	1	0	0	1	0
1b2a	—	1.1	1	0	0	0	1
6d6k	—	1.1	0	1	0	1	0

—：无法用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。

表 2　两组实验对象生化指标的检测结果对比（$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	GLB(g/L)	ALB(g/L)
病例组	76.39±82.31#	56.96±49.77#	32.46±25.24*	48.04±11.86*
对照组	29.62±18.56	23.77±13.58	22.23±16.32	38.23±21.26

*：$P<0.05$；#：$P<0.01$，与对照组比较。

表 3　两组血液学部分指标检测结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	RBC (10^9/L)	WBC (10^9/L)	Hb (g/L)	PLT (10^9/L)
病例组	4.29±0.90*	4.72±2.17#	128.28±24.09*	152.27±63.42#
对照组	5.35±1.42	6.38±1.76	282.45±30.89	182.89±44.27

*：$P<0.05$；#：$P<0.01$，与对照组比较。

表 4　不同基因型丙肝患者肝功能及血液学指标

基因型	ALT (U/L)	AST (U/L)	GLB (g/L)	ALB (g/L)	RBC (10^{12}/L)	Hb (g/L)	WBC (10^{12}/L)	PLT (10^9/L)
1b	76.65±84.90	59.09±53.73	32.46±22.14	49.04±12.66	4.25±0.93	135.18±20.09	4.58±2.17	149.53±65.02
2a	75.00±92.61	48.45±24.16	24.49±15.54	46.92±10.44	4.27±0.80	149±36.23	4.53±1.50	177.33±63.24
3b	93.60±73.41	51.44±19.28	47.46±32.24	53.37±32.32	4.68±0.74	120±28.76	5.95±2.79	145.40±47.17
t	0.516	0.754	1.387	2.245	1.456	1.998	1.581	2.516

3 讨　论

大量研究表明中国大部分地区 HCV 主要基因型是 1b 型，其次为 2a 型，同时有少量 1a、3b 型以及混合感染[4]。国内一项研究报告 202 例丙型肝炎患者中 1 型 158 例，占 78.2%，非基因 1 型 44 例，占 21.8%[5]。本次研究由表 1 可见湖北地区 90 例丙型肝炎患者中，病毒感染以 1b 型为主，74 例，占 82%；其次是 2a 型，7 例，占 7.8%。与国内相关报道基本符合。其中男性感染丙型肝炎居多，占 66%，且感染者大多数在 30～60 岁之间。

通过本次针对慢性丙型肝炎患者血液学部分指标及生化检查项目结果的分析显示，慢性丙肝患者的 WBC、PLT 的结果均显著低于正常水平，而肝功能检测结果均显著高于正常水平。

肝炎病毒在对肝脏造成损害的同时，也对全身器官造成损害，甚至会出现骨髓造血功能抑制[6]。因此血小板减少是慢性丙型肝炎患者较为常见的病理表现。丙肝病毒可使得骨髓干细胞中染色体出现损伤，引起异常分化；当慢性丙型肝炎发生发展为肝硬化时也可对骨髓干细胞的增殖、分化阶段造成严重破坏。本次研究中，由于肝炎病毒对骨髓造血器官长期的严重损害，使得结果中血常规项目中红细胞计数和白细胞计数显著低于对照组。

病例组中 ALT，AST，ALB 和 GLB 的值明显异常，实验组与对照组肝功能指标具有明显统计学意义（$P<0.05$），说明慢性丙肝患者存在不同程度的肝损伤。相关研究[7]表明 ALT 水平特别是 AST 与肝损伤程度有关，而 HCV RNA 含量仅与肝损伤相关，但是不能反映肝损伤的程度。

表 4 中不同丙型肝炎基因型的肝功能及血常规的数据显示这几组基因型之间并无统计学意义，因此不同种基因型与肝功能及血常规之间并无直接联系。

根据表 1 可见，HCV RNA 载量的高低与基因型有关。1b 型丙型肝炎病毒的拷贝数显著高于 2a 型，提示治疗前 HCV 基因型与体内病毒的含量密切相关[8]。但是有研究表明治疗

前血清 HCV RNA 载量与 HCV 基因型无关[9]。

一般认为,1b 型感染患者血清中病毒含量高,病毒复制活跃,干扰素反应差,临床疗效低于 2a 型。有报道[10]称,104 例丙型肝炎患者接受治疗后持续应答者多为 2a 型患者(38%),1b 型患者仅为 7%。提示丙型肝炎患者在治疗前对病毒基因进行分型可以对合理用药提供可靠地依据。近年来发现 HCV 基因型对影响干扰素的应答较为重要,不同基因型的 HCV 对治疗药物如聚乙二醇干扰素、利巴韦林的敏感程度不同,例如,HCV 基因 1 型的患者需用聚乙二醇干扰素加标准剂量的利巴韦林治疗 48 周;而 HCV 基因 2、3 型的患者需用聚乙二醇干扰素加低剂量的利巴韦林治疗 24 周。所以确定 HCV 感染者基因型有助于临床治疗和合理用药。因此,对 HCV 基因型继续深入研究可以为明确 HCV 感染的发病机制与防治提供有效的方案。

总之,HCV 分型对临床医师治疗丙型肝炎用药有重要的临床指导意义。丙型肝炎不同基因型与药物疗效之间的关系被逐渐发现并应用于临床治疗中,对于不同患者根据丙型肝炎基因型采用相应有效的药物治疗方案将成为大趋势。个体化医疗已经逐渐替代了传统医疗模式,在改善治疗效果与降低药物毒性方面具有显著优势。

参考文献

[1] Cheng H,Johann S,Howe AY,et al. Molecular machanism of hepatitis C virus replicon variants with reduced susceptibility to a benzofuran inhibitor,HCV-796[J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(9):3327-3328.

[2] Fried MW,Shiffman MF,Reddy KR,et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection[J]. N Engl J Med,2002,347(10):975-982.

[3] 中华医学会肝病学分会.中华医学会传染病与寄生虫学分会丙型肝炎防治指南[J].中华肝脏病杂志,2004,12(4):194-198.

[4] 胡志军,丁辉,汪晓军.69 例慢性丙型肝炎患者基因型与肝功能指标、HCV RNA 及中医证型的相关性分析[J].北京中医药,2012,31(3):166-168.

[5] 谢尧,徐道振,陆志檬.HCV 基因型对慢性丙型肝炎干扰素疗效的影响[J].中华肝脏病杂志,2004,12(11):72-75.

[6] 蒋孝华,谢玉桃,谭明德.病毒性肝炎血小板减少症影响因素的研究[J].中华肝脏病杂志,2004,12(12):734-736.

[7] Tremlett H,Oger J. Hepatic injury,liver monitoring and the beta-interferenrons for multiple sclerosis[J]. Neurol,2004,251(23):1297-1303.

[8] 张立新,安勇,张孝国,等.山东地区慢性 HCV 感染者病毒的基因型分布[J].中国病原生物学杂志,2011,6(2):567.

[9] 周友乾,尹凤鸣,冯经华.丙型肝炎病毒载量与基因型和抗病毒疗效的关系研究[J].实用肝脏病杂志,2011,14(4):340-343.

[10] 王法治.治疗前血清 HCV RNA 水平和 HCV 基因型是 α 干扰素治疗慢性丙型肝炎持续应答的住哟预测因素[J].国外医学流行病传染病分册,1996,25(3):79-80.

(收稿日期:2012-12-17)

(上接第 1692 页)

有文献报道[7],对血清分型阳性的 EPEC 菌株检测 eaeA 和 bfpA 这 2 个毒力基因,携带毒力基因的菌株阳性率为 46.85%。其中,(eaeA+bfpA)阳性占 26.13%,eaeA 阳性占 14.41%,bfpA 阳性占6.31%。该文献还报道有 11.71%的 EPEC 菌株经过毒力基因检测,鉴定为 STEC,通过这个报道,也证明了单独依靠血清学诊断会造成部分病例误诊。而文献报道[8]的研究是先检测大肠埃希菌毒力基因 escV 和 bfpB,再进行血清分型,15 株携带毒力基因的 EPEC 中,有 11 株 O 抗原不能分型,这也证明了单独依靠血清学诊断会造成部分病例漏检。

本研究检测 EPEC 的毒力基因并没有涵盖全部。EPEC 除了比较重要的 eaeA、bfpA、escV 和 bfpB 等毒力基因外,可能还有其他罕见的未知致病因子。早在 1998 年,毕振强等[9]就报道了 eaeA 和 bfpA 2 个毒力基因阴性的 131 株 EPEC 中,有 1 株 EPEC 表现为 LA/AE(局灶性黏附/黏附性和致黏附脱落病变效应)阳性,提示可能有其他未知因素参与 EPEC 的 LA 黏附和致 AE 病变效应,说明了 EPEC 致病因子的复杂性和多样性。反过来分析,没有携带 eaeA 和 bfpA 这 2 个毒力基因的 EPEC 菌株中,有 99.28% 菌株表现为 LA/AE 阴性,就可以排除绝大多数 EPEC 的致病性。

综上所述,EPEC 血清学分型与毒力因子携带有差异,有条件的实验室可以直接检测大肠埃希菌的毒力基因,为临床提供更准确的诊断依据。

参考文献

[1] Müller D,Hagedom P,Brast S,et al. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC),atypical EPEC,and Shiga toxin-producing Escherichia coli by a one-step multiplex PCR method[J]. J Med Microbiol,2006,44(7):2626-2629.

[2] Amisano G,Fornasero S,Migliaretti G,et al. Seasonality of diarrheagenic Escherichia coli pathotypes in the US students acquiring diarrhea in Mexico[J]. J Travel Med,2011,18(2):121-125.

[3] Ochoa TJ,Mercado EH,Durand D,et al. Frequency and pathotypes of diarrheagenic Escherichia coli in Peruvian children with and without diarrhea[J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica,2011,28(1):13-20.

[4] Ramer SW,Bieber D,Schoolnik GK. BfpB,an Outer Membrane Lipoprotein Required for the Biogenesis of Bundle-Forming Pili in Enteropathogenic Escherichia coli[J]. J Bacteriol,1996,178(22):6555-6563.

[5] Gauthier A,Puente JL,Finlay BB. Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type Ⅲ secretion system requires components of the type Ⅲ apparatus for assembly and localization[J]. Infect Immun,2003,71(6):3310-3319.

[6] 杨琴,阎有功,曹军皓.肠出血性大肠杆菌Ⅲ型分泌系统及其转位效应器蛋白质[J].生命的化学,2008,28(4):468-471.

[7] Alikhani MY,Mirsalehian A,Aslani MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli(EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea[J]. J Med Microbiol,2006,55(9):1159-1163.

[8] 孔海深.致泻大肠埃希菌的分子分型和流行病学研究[D].杭州:浙江大学,2011.

[9] 毕振强,永山宪市,本田武司.致病性大肠杆菌致病因子的研究[J].中国公共卫生学报,1998,17(4):209-211.

(收稿日期:2012-12-28)