

丙型肝炎病毒基因型与慢性丙型肝炎患者病情严重程度之间关系的研究*

乔斌, 汪明, 袁乐永, 熊格, 李艳[△] (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【摘要】目的 分析丙型肝炎病毒(HCV)基因型与慢性丙型肝炎患者病情严重程度之间关系,为慢性丙型肝炎患者的临床诊断和治疗提供依据。**方法** 采用直接测序法对 HCV 进行基因分型,并测量患者未治疗前 HCV-RNA 水平、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、清蛋白(ALB)、血红蛋白(Hb)、血小板计数(PLT)水平。**结果** 共对 321 株 HCV 进行基因分型,其中 1a 型占 1.2%,1b 型占 78.5%,2a 型占 8.7%,3a 型占 2.2%,3b 型占 4.7%,6a 型占 2.8%,6b 型占 1.9%。HCV1 型患者 ALT、HCV-RNA、AST/PLT 比值指数(APRI)水平明显高于非 1 型患者,差异有统计学意义(P 值分别为 0.009, <0.01 , 0.036);而 AST、ALB、Hb、PLT、AST/ALT 水平两者并无明显差异。**结论** HCV1 型患者 HCV-RNA 水平高于非 1 型患者,肝脏功能损害较非 1 型患者严重。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 基因型; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶; 血小板计数

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)01-0004-02

Relationship between HCV genotypes and severity degree of patients with hepatitis C* QIAO Bin, WANG Ming, YUAN Le-yong, XIONG Ge, LI Yan[△] (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】Objective To analyze the relationship between hepatitis C virus(HCV) genotypes and the severity degree of the patients with hepatitis C in order to provide the basis for the diagnosis and treatment of chronic hepatitis C(CHC). **Methods** The genotype of HCV was tested by the direct sequencing method, and the levels of HCV-RNA, ALT, AST, ALB, Hb, PLT, AST/ALT and AST to platelet ratio index(APRI) before treatment were determined. **Results** 321 strains of HCV were performed the genotyping, in which, 1b, 2a, 3b, 6a, 3a, 6b and 1a accounted for 78.5%, 8.7%, 4.7%, 2.8%, 2.2%, 1.9% and 1.2% respectively. The levels of ALT, HCV-RNA, APRI in the patients with HCV genotype 1 were higher than those in the patients with non-genotype 1, the differences had statistical significance($P < 0.01$); while the levels of AST, ALB, Hb, PLT and AST/ALT had no statistical differences between the two groups. **Conclusion** The level of HCV-RNA in the patients with genotype 1 is higher than that with non-genotype 1, and the liver damage is severer

【Key words】 HCV; genotype; ALT; AST; PLT

丙型肝炎是一种呈全球性分布的传染性疾病,2012 年 WHO 统计大约有 1.5 亿人感染丙型肝炎病毒(HCV),其中 75%~85% 发展为慢性感染,每年有超过 35 万人死于 HCV 感染相关的肝脏疾病^[1-2]。我国慢性丙型肝炎感染患者大约有 (2 000~5 000) 万,约占世界所有丙型肝炎患者的 15%~30%^[3]。研究发现,不同基因型的 HCV 感染患者病情严重程度有所差异。本文对慢性丙型肝炎感染患者的病毒基因型及相关指标进行检测分析,为慢性丙型肝炎患者的临床诊断和治疗提供依据。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选择 2011~2013 年武汉大学人民医院收治的 321 例慢性丙型肝炎初治患者,其中男 180 例,平均年龄 (43.96±18.44) 岁;女 141 例,平均年龄 (50.77±12.20) 岁。慢性丙型肝炎的诊断符合 2004 年《丙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[4],所有纳入患者入院之前均无系统的接受抗病毒治疗,并且无其他疾病。

1.2 检测方法

1.2.1 HCV 基因分型检测 HCV-RNA 提取采用乙二胺四

乙酸(EDTA)抗凝血浆 TRIzol LS 提取法,提取后的 RNA 使用 Thermo 公司的 RevertAid 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒进行反转录,反转录引物为随机引物;测序引物 forward primer 5'-TTA ACC ACA TCM RCT CCG TGT G-3', reverse primer 5'-GTA CCT GGT CAT AGC YTC CGT RAA-3',采用 ABI 公司 3130XL 测序仪检测。测序结果与 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 上的参考序列 AF009606、AF271632 和 AF139594 等进行比对分析,确定 HCV 基因型。

1.2.2 HCV-RNA 定量检测 HCV-RNA 提取采用凯杰公司的 QIAcube 全自动核酸提取仪及配套试剂(凯杰 careHCV RT-PCR Assay V1 试剂盒),使用罗氏 LighterCycler480 PCR 仪及凯杰 careHCV RT-PCR Assay V2 试剂盒进行 HCV-RNA 定量,线性范围为 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^7$;定量结果超过线性范围($>5 \times 10^7$)以 5×10^7 计算。

1.2.3 相关指标检测 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、清蛋白(ALB)、血红蛋白(Hb)、血小板计数(PLT)水平检测通过检验科常规生化仪(Olympus AU-5400; Si-

* 基金项目:国家重点临床专科建设项目(财社[2010]305号)。

作者简介:乔斌,男,硕士,主要从事感染性疾病的分子诊断工作。△ 通讯作者,E-mail:liyan@whu.edu.cn。

mens ADVIA2400)和血细胞仪(Sysmex XE-2100)测量。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 共对 321 例丙型肝炎患者的 HCV 进行基因分型,其中 1a 型 4 例,占 1.2%;1b 型 252 例,占 78.5%;2a 型 30 例,占

8.7%;3a 型 7 例,占 2.2%;3b 型 15 例,占 4.7%;6a 型 9 例,占 2.8%;6b 型 6 例,占 1.9%。见图 1。

2.2 256 例 HCV 基因型 1 型患者与 65 例基因型非 1 型患者相关指标的比较 两者在 AST、ALB、Hb、PLT 水平上差异无统计学意义(*P* 值分别为 0.471、0.597、0.835、0.378);在 ALT、HCV-RNA、AST/PLT 比值(APRI)水平差异有统计学意义(*P* 值分别为 0.009、 <0.01 、0.036)。见表 1。

表 1 HCV 基因型 1 型与非 1 型相关指标的比较($\bar{x} \pm s$)

HCV 基因型	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (g/L)	Hb (g/L)	PLT ($\times 10^9/L$)	HCV-RNA (IU/mL)	AST/ALT	APRI
基因型 1 型	256	112.71 \pm 108.34	80.20 \pm 75.59	45.74 \pm 12.20	133.24 \pm 31.51	177.21 \pm 77.29	6.41 \pm 1.00	0.90 \pm 5.89	1.24 \pm 1.09
基因型非 1 型	65	84.28 \pm 66.94	72.76 \pm 67.86	46.66 \pm 10.90	134.12 \pm 26.37	167.63 \pm 81.51	5.84 \pm 1.12	1.01 \pm 0.57	1.27 \pm 0.96
<i>t</i>		2.65	0.723	-0.556	-0.209	0.882	4.01	-1.44	-2.17
<i>P</i>		0.009	0.471	0.579	0.835	0.378	<0.01	0.15	0.036

注:HCV-RNA 定量结果以对数值计算 $\log_{10}(\text{HCV-RNA})$ 。APRI:AST/PLT 比值。

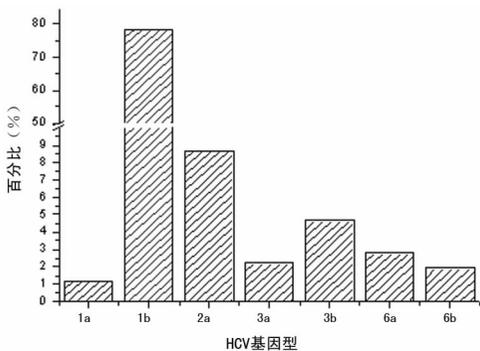


图 1 HCV 基因型分布

3 讨 论

HCV 基因组呈现高度异质性,根据 HCV 基因组序列的差异程度,目前可将 HCV 分为 6 个主要基因型(30%~35%)、68 个基因亚型(20%~25%)及若干分离株(5%~8%)和准种(1%~5%)^[5-6]。我国大部分地区主要流行的 HCV 基因型为 1b 型,其次为 2a 型,南方城市 1b 基因型感染率可达到 90%以上,从南向北 2a 基因型逐渐增多。目前为止,我国尚未发现 HCV 基因型 4 或 5 型感染^[4]。本研究通过对 321 例慢性丙型肝炎 HCV 基因分型发现,1b 型为主要感染基因型,占 78.5%;其次为 2a 型,占 8.7%;向下依次为 3b 型占 4.7%,6a 型占 2.8%,3a 型占 2.2%,6b 型占 1.9%,1a 型占 1.2%。由于不同 HCV 基因型的核苷酸序列存在差异,因此 HCV 不同基因型在感染性、致病力、对抗病毒治疗的反应性和地区群集等方面有着明显的差异。本研究发现 HCV 1 型患者 HCV-RNA 水平明显高于非 1 型患者($P < 0.01$),而两者的基础状态无明显差别,ALB 水平、Hb 水平、PLT 水平均无明显差异。目前研究认为,HCV 1 型病毒载量明显高于非 1 型患者,这可能与 HCV 1 型具有更强的复制能力相关^[7-8]。而病毒载量又与患者的抗病毒治疗效果相关,低病毒载量常常更易获得持续性病毒应答(SVR)^[9]。

肝脏代谢酶水平是反映肝脏组织损害的最灵敏指标之一,其中 ALT、AST 是应用最多的两个肝脏代谢酶,水平越高,肝脏组织损害程度越严重。本研究通过对 HCV 基因型 1 型和非 1 型患者血清 ALT、AST 水平进行比较分析,发现 HCV 基因型 1 型患者 ALT 水平明显高于非 1 型患者,差异有统计学

意义($P = 0.009$),而 AST、AST/ALT 水平差异无统计学意义(*P* 值分别为 0.471、0.15)。这可能由于 ALT 存在胞质内,肝细胞受到破坏更易进入血液循环中而检测到,而 AST 位于线粒体内,需要进一步的破坏尚可释放入血循环,并且慢性丙型肝炎患者肝脏损伤是慢性持续性的,这也可能导致 ALT 水平升高明显,而 AST 水平升高不明显。HCV 基因型 1 型感染与肝炎的慢性化进程和严重的肝脏疾病有关,推测这与型特异性基因编码的蛋白有较强的细胞毒作用有关。相关研究也表明,基因型 1b 在慢性肝炎、肝硬化和肝癌中占绝大多数,同时多表现为血清 ALT 升高,提示易导致肝细胞损伤^[10-11]。

APRI 作为一个简单、非侵入性指标用来反映慢性丙型肝炎患者肝脏纤维化及肝硬化程度。研究发现,APRI > 1.5 ,肝脏呈现严重的纤维化改变;APRI > 2.0 ,肝脏呈现肝硬化改变^[12]。本试验对发现 HCV 基因型 1 型患者 APRI 水平高于非 1 型患者,也从侧面反映出基因型 1 型患者肝脏损害程度更加严重。

另外,有研究表明,HCV 基因型 1a、2a 合并 HBV 感染的发生率较高,大部分急性肝炎患者为基因型 1a;基因型 3a 感染与肝脏脂肪变的关系较为密切;基因型 4 感染易引起失代偿性肝脏并发症^[13]。因此,丙型肝炎防治指南中推荐对丙型肝炎患者治疗前,应进行 HCV 基因分型,评估患者的病情,为患者制订合适的治疗方案,而且可以预测治疗效果^[14]。

参考文献

- [1] Wise M, Bialek S, Finelli L, et al. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995-2004 [J]. Hepatology, 2008, 47(4): 1128-1135.
- [2] Tian ZG. Outflanking HCV [J]. Nat Immunol, 2014, 15(1): 6-8.
- [3] 陈园生, 李黎, 崔富强, 等. 中国丙型肝炎血清流行病学研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(9): 888-891.
- [4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194-198.
- [5] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on [J]. J Gen Virol, 2004, 85(11): 3173-3188.
- [6] Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Con-(下转第 8 页)

谱峰分离度差,影响准确定量且方法过程相对复杂^[10]。

本研究证明,HPLC 法可检测坐骨神经中山梨醇的浓度。糖和糖醇的柱前衍生化可增加 HPLC 检测糖醇的灵敏度。其中苯甲酰化法已被应用于 HPLC 检测红细胞中山梨醇的浓度^[4],故本研究采用苯甲酰化方法检测坐骨神经中山梨醇的浓度。

高效液相色谱分析一般不要求复杂的样品预处理过程,但对于生物样品,则要求它的预处理过程具有富集药物,降低干扰物浓度的能力。因此,本研究采用蛋白沉淀法对坐骨神经进行生物样品前处理,以达到净化样品的目的,蛋白沉淀法是在满足分析条件的情况下的首选方法^[11],其操作简单,并且本研究采用的蛋白沉淀试剂三氯乙酸有利于山梨醇的定量回收^[11],确保了加样回收率的准确度。

本研究采用内标法对大鼠坐骨神经中山梨醇进行测定,可以减少由仪器系统或操作过程产生的误差,提高分析的准确度。由于使用 HPLC 法测定山梨醇浓度的报道很少,曾有报道用半乳糖醇为内标^[12-13],应用 HPLC 法检测坐骨神经和晶体中的山梨醇浓度,故试验初期选择了半乳糖醇为内标物质,但预试验结果显示山梨醇与半乳糖色谱峰分离度较差。本研究选择动物体内不存在的 L-鼠李糖作为内标,经预试验发现 L-鼠李糖与山梨醇达到很好的分离,且坐骨神经匀浆中内源性物质不干扰测定。经过系统的方法学考察,本研究所建立的 HPLC 测定方法灵敏度高、重复性好,方法简便易行,为坐骨神经中山梨醇浓度的准确测定提供了依据,进而为糖尿病周围神经病变的防治提供了较好的测定手段。

参考文献

[1] Stavniichuk R,Shevalye H,Hirooka H,et al. Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism,12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Biochem Pharmacol*,2012,83(7):932-940.

[2] Li G,Sun C,Wang Y,et al. A clinical and neuropathological study of Chinese patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. *PLoS One*,2014,9(3):e91772.

[3] Sim HJ,Jeong JS,Kwon HJ,et al. HPLC with pulsed amperometric detection for sorbitol as a biomarker for diabetic neuropathy [J]. *J Chromatogr B*,2009,877(14):1607-1611.

[4] Kwang-Hyok S,Ui-Nam P,Sarkar C,et al. A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography:potential for diagnostic evaluation of diabetes [J]. *Clin Chim Acta*,2005,354(1):41-47.

[5] 张焯,谢小青,刘婷立,等. 内源性物质药物的定量测定及生物等效性评价研究进展 [J]. *中国新药杂志*,2011,20(22):2221-2228.

[6] 钟大放,李高,刘昌孝. 生物样品定量分析方法指导原则(草案)[J]. *药物评价研究*,2011,34(6):409-414.

[7] 杨智,阳利龙,祝文兵,等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生 RP-HPLC 法测定人血浆中 10 种氨基酸的浓度 [J]. *中国临床药理学与治疗学*,2011,16(5):549-552.

[8] 于敏,张双庆,李佐刚. 生物样品中化学药物定量分析方法验证的进展与解读 [J]. *药物分析杂志*,2013,33(11):2019-2024.

[9] 张亚超,王仁杰,王红,等. 山梨醇的测定方法与其应用 [J]. *河北医药*,2000,22(11):852-853.

[10] Kiyoshima A,Kudo K,Hino Y,et al. Sensitive and simple determination of mannitol in human brain tissues by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*,2001,758(1):103-108.

[11] 戴国梁,居文政,谈恒山. 生物样品前处理研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*,2013,33(6):484-487.

[12] 胡惠民,何成,毛晓明,等. 高效液相色谱法测定组织中山梨醇含量[J]. *第二军医大学学报*,1992,13(1):84-87.

[13] Dethy JM,Callaert-Deveen B,Janssens M,et al. Determination of sorbitol and galactitol at the nanogram level in biological samples by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*,1984,143(1):119-124.

(收稿日期:2014-04-28 修回日期:2014-09-12)

(上接第 5 页)

sensus proposals for A unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology*,2005,42(4):962-973.

[7] Yoo TW,Donfield S,Lail A,et al. Effect of hepatitis C virus(HCV) genotypes on HCV and HIV-1 disease[J]. *J Infect Dis*,2005,191(1):4-10.

[8] Nabi SG,Zaffar G,Sheikh NI,et al. Hepatitis C virus genotypes:a plausible association with viral loads[J]. *Indian J Pathol Microbiol*,2013,56(4):384-387.

[9] Ali A,Nisar M,Ahmad H,et al. Determination of HCV genotypes and viral loads in chronic HCV infected patients of Hazara Pakistan[J]. *Virology*,2011,8(466):2-6.

[10] Dong ZX,Zhou HJ,Wang JH,et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Chinese patients with chronic hepatitis C:Correlation with patients' characteristics and

clinical parameters[J]. *J Dig Dis*,2012,13(11):564-570.

[11] Raimondi S,Bruno S,Mondelli MU,et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development:a meta-analysis[J]. *J Hepatol*,2009,50(6):1142-1154.

[12] Chun-Tao Wai,Greenon JK,Robert J,et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*,2003,38(2):518-526.

[13] Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes[J]. *Clin Microbiol Rev*,2000,13(2):223-235.

[14] Ghany MG,Strader DB,Diagnosis DL. Management and treatment of hepatitis C:an update[J]. *Hepatology*,2009,49(2):1335-1373.

(收稿日期:2014-03-13 修回日期:2014-08-01)