

慢性丙型肝炎患者 HCV 基因分型与 HCV-RNA 浓度和凝血功能关系的探讨^{*}

姜树朋, 李 艳[△], 汪 明, 乔 斌(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨慢性丙型肝炎病毒(HCV)患者基因分型与 HCV-RNA 浓度和凝血功能之间的关系。**方法** 选取该院 HCV 患者 66 例作为慢性 HCV 患者组, 健康人群 20 例作为健康对照组。对该院 66 例 HCV 患者采用 ABI3500dx 基因测序仪进行外周血 HCV-RNA 基因分型检测以及采用罗氏 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪进行外周血 HCV-RNA 定量检测, 对该院 66 例 HCV 患者和 20 例健康体检者进行凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆纤维蛋白原(FIB)检测。**结果** 在 66 例 HCV 患者中, 分别检测出 1a、1b、2a、3a、3b 和 6a 型 6 种病毒基因型, 其中基因 1 型 39 例, 非基因 1 型 27 例。不同 HCV 基因型患者血清 HCV 病毒浓度比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HCV 基因 1 型和非基因 1 型之间比较, 凝血功能差异均无统计学意义($P > 0.05$); HCV 基因 1 型和非基因 1 型分别与健康对照组比较, 凝血功能差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HCV-RNA 浓度与 PT、APTT、TT、FIB 的相关性差异均无统计学意义, 相关系数分别为 0.020、0.002、-0.072、-0.088($P > 0.05$); HCV-RNA 低浓度组($< 5.0 \times 10^5$ U/mL)和高浓度组($\geq 5.0 \times 10^5$ U/mL)之间凝血功能比较差异无统计学意义($P > 0.05$); HCV-RNA 低浓度组和高浓度组分别与健康对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 不同基因型 HCV 感染与血液中 HCV 的病毒浓度相关, 基因 1 型患者 HCV-RNA 浓度高于非 1 型患者; HCV 基因分型和 RNA 病毒浓度与凝血功能各项指标大小无关, 但是 HCV 患者较健康人群凝血功能降低, 对于 HCV 感染者有必要进行凝血功能检查, 以便了解 HCV 患者凝血功能状态, 防止出现严重的出血。

【关键词】 慢性丙型肝炎; HCV 基因分型; HCV-RNA 浓度; 凝血功能

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)08-1027-03

Relationship between HCV genotypes with content of HCV-RNA and coagulation function in chronic hepatitis C patients^{*} JIANG Shu-peng, LI Yan[△], WANG Ming, QIAO Bin (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between HCV genotypes with content of HCV-RNA and coagulation function in chronic hepatitis C patients. **Methods** 66 patients with chronic hepatitis C and 20 healthy control subjects in our hospital were enrolled in this study. The HCV genotypes were determined by ABI3500dx gene sequencing machine and the level of serum HCV-RNA was measured with Roche Light Cycler real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction system. The level of PT, APTT, TT, FIB detection in all cases was examined. **Results** In 66 cases of chronic hepatitis c patients, six virus genotypes were detected which were, 1a, 1b, 2a, 3a, 3b and 6a, respectively. The genotype 1 was 39 cases, and the other of non-genotype 1 was 27 cases. The comparative difference level of serum HCV in patients with different HCV genotypes was statistically significant ($P < 0.05$). As to the coagulation function, no significant difference of the genotype 1 and the non-genotype 1 was found ($P > 0.05$), and the difference between the healthy control and HCV genotype group (the genotype 1 and the non-genotype 1) in the coagulation function was statistically significant ($P < 0.05$). The level of PT, APTT, TT, FIB were not related with HCV-RNA content with coefficient correlation 0.020, 0.002, -0.072, -0.088, respectively ($P > 0.05$). The different of coagulation function between the low HCV-RNA content group ($< 5.0 \times 10^5$ U/mL) and high content group ($\geq 5.0 \times 10^5$ U/mL) had no statistical significance ($P > 0.05$), and the difference of coagulation function between HCV-RNA content group (The low HCV-RNA content group and high content group) and healthy control group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The HCV genotype is associated with HCV-RNA content in the serum, and HCV-RNA content with HCV genotype 1 patients is higher than those with non-genotype 1 patients. The relationship between HCV genotypes, the content of HCV-RNA and coagulation function in chronic hepatitis C patients is not apparent, but compared with healthy people, coagulation function of the patients with chronic hepatitis C decreases. The test of coagulation function is necessary for HCV infection in order to know the state of blood coagulation function in patients with chronic hepatitis C, and prevent severe bleeding.

【Key words】 chronic hepatitis C; HCV genotypes; HCV-RNA content; coagulation function

^{*} 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: 姜树朋, 男, 在读硕士研究生, 主要从事个体化医疗与分子诊断方面的研究。

[△] 通讯作者, E-mail: yanlitf1120@163.com。

肝脏不仅是人体代谢的重要器官,同时也是合成多种凝血因子的重要场所,当肝脏受损(如肝炎、肝脏纤维化、肝癌等)时,凝血因子合成减少,造成凝血时间延长,容易发生内脏出血,是导致患者死亡的重要原因之一。丙型肝炎病毒(HCV)感染是导致慢性肝病、肝脏纤维化、肝癌的常见原因。HCV 由于其基因的高度变异,根据病毒株核苷酸序列的同源性差异,可将其分为不同的基因型。目前已知 HCV 至少可分为 6 型(HCV 1~6 型),各型又分为许多亚型(如 1a、1b、2a、2b、3a 等)。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,确定 HCV 感染者基因型有助于临床治疗和合理用药^[1-2]。但是,关于 HCV 基因分型及病毒浓度与肝损伤之间关系不同的研究尚未得出统一的结论。本研究分析 66 例慢性丙肝患者 HCV 基因分型与 HCV-RNA 浓度、基因分型和凝血功能的关系,以及 HCV-RNA 浓度和凝血功能的相关性,进一步探讨 HCV 基因分型、病毒浓度和肝组织损伤之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 慢性 HCV 患者组:选取 2013 年 8 月至 2014 年 8 月于本院住院诊治的慢性 HCV 患者 66 例,男 36 例,女 30 例;年龄 20~70 岁,平均 35 岁,诊断符合 2010 年版《丙型肝炎防治指南》的标准。健康对照组:选取本院同时期健康体检人群 20 例作为对照组,男 10 例,女 10 例;年龄 20~70 岁,平均 39 岁。

1.2 方法

1.2.1 HCV-RNA 基因分型检测 对慢性 HCV 患者 HCV-RNA 提取采用 EDTA 抗凝血浆 TRIzol LS 试剂提取法,提取后的 RNA 使用 Thermo 公司的 RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒进行逆转录,逆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',使用 ABI3500dx 基因测序仪测序,并将所测序列与 HCV-RNA 参考序列 AF009606、AF271632 和 AF139594 等(NCBI GenBank)进行比对分析,得出检测结果。

1.2.2 HCV-RNA 浓度的测定 采用凯杰生物工程(深圳)有限公司提供的 HCV 核酸定量检测试剂盒(定量检测线性范围:1.0×10³~5.0×10⁷ U/mL),在提取 HCV-DNA 后,使用罗氏 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪进行检测。当被测样本中 HCV-RNA 浓度 1.0×10³~5.0×10⁷ U/mL,则测定结果有效,可直接报告相应的 RNA 浓度;当被测样本中 HCV-RNA>5.0×10⁷ U/mL 时,结果报告为大于 5.0×10⁷ U/mL,本研究 HCV-RNA>5.0×10⁷ U/mL 时,按 5.0×10⁷ U/mL 记录;当被测样本中 HCV-RNA<1.0×10³ U/mL 时,结果报告为小于 1.0×10³ U/mL,本研究 HCV-RNA<1.0×10³ U/mL 时,按 1.0×10³ U/mL 记录;当被测样本结果无循环阈值,即 Ct 值时,结果报告为 0.0 U/mL。

1.2.3 凝血功能检测 采集慢性丙型肝炎患者及健康对照组枸橼酸钠抗凝血后,立即轻轻颠倒混匀,离心后,使用日本 SYSMEX 公司全自动凝血分析仪 CA-7000 及配套试剂进行凝血功能测定,即凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆纤维蛋白原(FIB)4 项。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用独立样本 *t* 检验,HCV-RNA 浓度与凝血功能指标的相关性分析采用 Pearson 相关分

析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 基因分型与 HCV-RNA 浓度 在 66 例慢性 HCV 患者中,分别检测出 1a、1b、2a、3a、3b 和 6a 型 6 种病毒基因型,其中基因 1 型 39 例,非基因 1 型 27 例。不同 HCV 基因型患者血清病毒浓度(Ig U/mL)比较:基因 1 型患者 HCV-RNA 浓度为 6.83±0.84,非 1 型患者 HCV-RNA 浓度为 6.24±1.33, $P<0.05$,两者差异具有统计学意义,不同基因型 HCV 感染与血液中 HCV 的病毒浓度相关,基因 1 型患者 HCV-RNA 浓度高于非 1 型患者。

2.2 HCV 基因分型与凝血功能 见表 1。HCV 基因 1 型与非基因 1 型之间比较,即不同 HCV 基因型之间凝血功能的差异无统计学意义($P>0.05$)。在 20 例健康对照组中,凝血功能检测结果:PT 为(10.72±0.50)s,APTT 为(24.30±2.13)s,TT 为(18.0±1.09)s,FIB 为(3.03±0.51)g/L。HCV 基因 1 型和非基因 1 型两组分别与健康对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 HCV 基因 1 型与非基因 1 型凝血功能比较($\bar{x} \pm s$)

基因分型	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	FIB(g/L)
1 型	12.13±1.14	28.35±4.17	20.00±3.54	2.28±0.75
非 1 型	12.67±1.47	30.59±6.59	21.30±2.84	2.57±0.78
<i>t</i>	-1.666	-0.156	-1.587	-0.895
<i>P</i>	0.101	0.125	0.117	0.374

2.3 HCV-RNA 浓度与凝血功能 HCV-RNA 浓度与 PT、APTT、TT、FIB 的相关性差异均无统计学意义,相关系数分别为 0.020、0.002、-0.072、-0.088($P>0.05$)。见表 2。HCV-RNA 高、低浓度组比较,即不同 HCV-RNA 浓度组之间凝血功能的差异无统计学意义($P>0.05$)。HCV-RNA 低浓度组(<5.0×10⁵ U/mL)和高浓度组(≥5.0×10⁵ U/mL)与健康对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 不同 HCV-RNA 浓度组之间凝血功能的差异($\bar{x} \pm s$)

RNA 浓度	<i>n</i>	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	FIB(g/L)
<5.0×10 ⁵ U/mL	16	12.13±1.16	27.93±4.25	21.00±2.85	2.60±0.66
≥5.0×10 ⁵ U/mL	50	12.42±1.35	29.70±5.65	20.38±3.46	2.33±1.42
<i>t</i>		-0.779	-1.149	0.648	0.730
<i>P</i>		0.439	0.255	0.519	0.468

3 讨论

由于 HCV 病毒基因的高度变异,不同基因分型 HCV 病毒表现出了不同的生物学特性,包括病毒的复制能力和致病能力,在本研究 66 例慢性 HCV 患者中,基因 1 型 39 例,非基因 1 型 27 例,基因 1 型和非 1 型患者血清中 HCV-RNA 浓度差异有统计学意义,不同基因分型 HCV 感染与血液中 HCV 的病毒浓度相关,基因 1 型患者 HCV-RNA 浓度高于非 1 型患者。本研究结果与其他学者的研究结果一致^[3-6]。

PT 主要反映外源性凝血系统状况,PT 延长主要见于凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ减少,FIB 缺乏,维生素 K 缺乏,DIC 等;APTT 主要反映内源性凝血系统状况,见于凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ减低,纤维蛋白原缺乏,抗凝物质存在等;TT 主

要反映纤维蛋白原(即凝血因子 I)转为纤维蛋白的时间,TT 延长见于低纤维蛋白原血症、异常纤维蛋白原血症。FIB 主要反映纤维蛋白原的浓度,FIB 减少见于肝损伤,低纤维蛋白原血症,异常纤维蛋白原血症等。

肝脏是产生凝血因子 I、II、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII 和 XIII 的场所。当肝脏受损,这些凝血因子减少,从而影响机体凝血功能。本研究显示,HCV 基因 1 型与非基因 1 型之间、HCV-RNA 高浓度组和低浓度组之间凝血功能的差异无统计学意义($P>0.05$),表明 HCV 病毒基因分型、浓度不能反映肝脏组织的损伤程度,这可能与丙型肝炎的发病机制有关。有研究提出,HCV 感染后即开始复制,在感染后的第 1、2 周可检测到病毒血症,感染后前 4 周病毒载量迅速可达 10^7 U/mL,感染后 5~6 周病毒血症达到恒定水平,而感染后 6~8 周,随着免疫反应被检测到时,肝炎症才出现,这充分说明 HCV 不会直接造成细胞病变^[7-8]。众多学者亦指出免疫反应介导的肝损伤是 HCV 感染发病机制中的重要因素,由于 HCV 的高度变异性,HCV 对免疫系统细胞的侵犯,HCV 蛋白与宿主分子之间的相互作用,以及 HCV 感染后机体体液和细胞免疫的异常反应等机制导致了丙型肝炎患者肝脏和肝外组织的损伤^[9-10]。

HCV 基因分型不但与聚乙二醇干扰素的抗病毒疗效相关,而且与肝脏组织的病理损伤相关,如 1b 型多见于失代偿期肝硬化和原发性肝癌的患者,1a、2a、2b、3a 型则多见于慢性 HCV 不合并肝硬化和肝癌患者,基因 3a 型与肝脏脂肪病变的关系比较密切^[11]。刘志英等^[12]对 92 例北京地区肝硬化和慢性 HCV 患者进行的基因型分布比较结果表明,尚未发现 HCV 基因型因肝病严重程度而有所不同。本研究显示,基因 1 型和非 1 型患者之间的凝血功能 4 项指标的差异无统计学意义,但 HCV 基因型是否与肝脏的组织损伤相关需要进行肝组织病理学检查进一步明确。

虽然 HCV 特异性的细胞免疫可造成肝细胞的损伤,但更主要的是干扰细胞的代谢,同时,病毒蛋白直接刺激成纤维细胞产生纤维组织,从而造成在多数慢性 HCV 肝炎患者的 PT、APTT、TT 和 FIB 常在相对低水平波动^[13-16]。说明凝血功能指标变化虽可反映肝细胞损害程度,但该指标与 HCV 感染引起的肝组织炎症反应程度和病情的严重程度不一定平行。其他学者的研究也显示,HCV 感染者中肝组织的损伤和 HCV-RNA 的病毒浓度无关,不能以病毒浓度来判断肝组织的炎症反应活动程度^[17-19]。

综上所述,慢性 HCV 患者不同基因分型 HCV 感染与 HCV 的病毒浓度相关,基因 1 型患者 HCV-RNA 浓度高于非 1 型患者。HCV 基因分型和 RNA 病毒浓度与凝血功能各项指标大小无关,但是慢性 HCV 患者较健康人群,凝血功能降低。因此,对于 HCV 感染者有必要进行凝血功能检查,以便了解慢性 HCV 患者凝血功能状态,防止出现严重的出血。

参考文献

- [1] Pol S, Corouge M. Treatment of hepatitis C: current status and perspectives[J]. Rev Prat, 2014, 64(5): 605-612.
- [2] Alexopoulou A, Papatheodoridis GV. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(42): 6060-6069.

- [3] 严艳, 李卓, 郭向华, 等. 北京地区慢性丙型肝炎患者血清 HCV-RNA 定量检测与基因分型的研究[J]. 医学理论与实践, 2007, 20(7): 756-757.
- [4] Yoo TW, Donfield S, Lail A, et al. Effect of hepatitis C virus(HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease[J]. J Infect Dis, 2005, 191(1): 4-10.
- [5] Marrone A, Sallie R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: the clinical significance of genotypes and quasispecies behavior[J]. Clin Lab Med, 1996, 16(2): 429-449.
- [6] Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes[J]. Semin Liver Dis, 1995, 15(1): 41-63.
- [7] Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence[J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1745-1754.
- [8] Zeisel MB, Fafi-Kremer S, Robinet E, et al. Adaptive immunity to the hepatitis C virus[J]. Viruses, 2009, 1(2): 276-297.
- [9] Heim MH. Innate immunity and HCV[J]. J Hepatol, 2013, 58(3): 564-574.
- [10] 高得勇, 张欣欣. 丙型肝炎免疫发病机制的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(1): 61-64.
- [11] 解莹, 谢晨. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2010, 32(4): 470-474.
- [12] 刘志英, 魏红山, 戴旺苏, 等. 北京地区丙型肝炎患者的丙型肝炎病毒基因分型[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(2): 148-149.
- [13] Felmlee DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins—impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease[J]. Viruses, 2013, 5(5): 1292-1324.
- [14] Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, et al. Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection[J]. Oncology, 2010, 78(1): 24-30.
- [15] Koike K. Steatosis, liver injury, and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection[J]. J Gastroenterol, 2009, 44(19): 82-88.
- [16] Domitrovich AM, Felmlee DJ, Siddiqui A. Hepatitis C virus nonstructural proteins inhibit apolipoprotein B100 secretion[J]. J Biol Chem, 2005, 280(48): 39802-39808.
- [17] 李蕴铄, 凌伟, 陈凤新, 等. 慢性丙型肝炎患者脂类代谢与丙型肝炎病毒复制以及肝脏病理的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(17): 1820-1823.
- [18] 王敏乐, 晓华, 韩红星, 等. HCV-RNA 病毒载量和肝脏病理的关系[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(13): 1513-1514.
- [19] Rodriguez-Inigo E, López-Alcorocho JM, Bartolomé J. Percentage of hepatitis C virus-infected hepatocytes is a better predictor of response than serum viremia levels[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(4): 535-543.