255-257,30

维普资讯 http://www.cqvip.com

重型肝炎患者血清 HCVRNA的“巢式”PCR研究

第二医院病毒性肝炎研究所 黄爱龙 张定凤

提 要 采用逆转录和“巢式”PCR技术检测36例重型肝炎患者血清中丙肝病毒RNA，发现7例慢性重型肝炎检出3例（43%），28例亚急性重型肝炎中检出19例（68%）、急重肝1例为阴性，HCVRNA阳性率平均为61%、因此丙肝病毒感染可能和肝炎的重症化有密切关系。HCVRNA（+）组乙肝病毒复制率较HCVRNA(－)组低，可能提示丙肝病毒在体内能干扰乙肝病毒的复制。单纯HCV感染或HCV合并HBV感染重肝患者的病死率明显高于仅由HBV引起的重型肝炎、表明感染HCV后，预后较差，易于慢性化、应及早进行抗病毒治疗

关键词 重型肝炎；“巢式”PCR；丙型肝炎
中图分类号 R512.6

自1988年美国Chiron公司发现丙型肝炎病毒以来，研究进展十分迅速[1]。目前认为，丙型肝炎为波及全球的传染病，易于慢性化、重症化。在血清中存在量较少，至今未观察到完整的病毒颗粒，传播方式与HBV相似。以前多采用血清学方法检测抗-HCV进行诊断，存在灵敏度低，特异性较差以及检出时间较晚等缺点[2,3]。近年来，由于PCR技术的进步，国内外相继报道采用逆转录和“巢式”PCR技术（RT-PCR）检测HCVRNA[4,5]。因采用二次PCR扩增，灵敏度和特异性都得到进一步提高，下面报道的是我们采用此技术检测重症肝炎患者血清中HCVRNA的结果。

材料和方法

1. 研究材料

（1） RT-PCR试剂盒购自北医肝病所。外引物序列为(+)链5′ CTGTGAGGAACTACTGTCTT 3′（28-47位），(－)链5′ AACACTACTCGGCTAGCAGT 3′（229-248位），内引物序列为(+)链5′ TTCACGCAGAAAGCGTCTAG 3′（46-65位），(－)链5′ GTTGATCCAAGAAAGGACCC 3′（171-190位）。

（2） 小分子量核酸标准：PGEM-7zf（+）DNA-HaeⅢ，购自华美生物工程公司。

（3） PCR扩增仪Perkin-Elmer公司480型PCR反应仪。

（4） 核酸电泳装置Bio-Rad公司产品。

（5） 标本来源主要采用数年来我所收治的重肝患者留置血清及门诊住院病人，包括慢重肝7例，亚重肝28例和急重肝1例，所有病例均经肝穿证实，诊断符合1990年上海第六次全国病毒性肝炎会议讨论修订标准。

2. 方法

（1） 血清HCVRNA提取

血清100μl加裂解液（含SDS和蛋白酶K）150μl，混匀，65℃，作用40min后，加入酚提取液640μl，混匀约5min，然后10000g离心15min；取水相加入等体积异丙醇，－70℃，30min或－20℃过夜，再14000g离心15min，用微量真空泵吸去上清，沉淀溶于15μlTE缓冲液（含1URNasin/μl），10000g离心5min，上清液作为逆转录样品。

（2） 逆转录（20μl体系）

取上清样品12μl，加入逆转录反应混合液（含PCR缓冲液、dNTP和HCV引物）8μl，37℃，60min后，95℃ 5min处理，供PCR反应使用。

（3） “巢式”PCR实验

第一次PCR扩增（50μl体系）：取10μl逆转录产物，加入PCR反应混合液（含dNTP、外引物和

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.25u Taq聚合酶）40ul和2滴液体石蜡，循环参数为94℃、1min，55℃、1.5min，72℃、2min，30循环后进行第二次PCR。

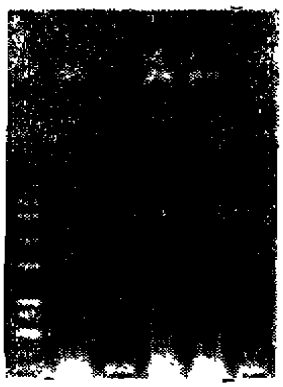
第二次PCR扩增(50μl体系)：取50μl PCR-1产物，加PCR反应混合液（含dNTP、内引物及1.25μ Taq聚合酶）45μl和2滴液体石蜡，循环参数同前，最后72℃延伸10min为PCR-2产物，取10μl进行电泳检测。

（4） 产物鉴定

采用12%聚丙烯酰胺电泳检测，电泳缓冲液TAE，pH7.8，PCR-2产物HCVCDNA片段大小为145bp。

结　果

采用RT-PCR方法共检测36例重肝患者血清标本，年龄范围19-67岁，平均32.5岁，包括慢重肝7例，亚重肝28例和急重肝1例。和小分子量核酸比较，PCR产物位于条带7-8之间，经计算与设计值完全相符，未见有非特异性扩增条带出现、试剂对照和阴性对照（鸭血清）均未出现相应扩增条带，因此具有明显特异性（见附图）。



附图　HCV"巢式"PCR扩增图谱

——扩增条带

1. S.M.W.DNA Marker(PGEM7zf(+) DNA-HaeⅢ)
2. 阳性对照
3. 阴性对照（鸭血清）
4. 阳性标本
5. 阴性标本
6. 试剂对照

根据我所张定凤等[5]采用美国Ortho一代抗HCV诊断药盒（C100-3）检出的结果，重症肝炎阳性率较高，大于50%，因此认为HCV感染与肝炎的重症化有密切的关系。通过PCR检测我们得到与此相似的结果。36例重肝患者中，有22例检出HCVRNA，占61%，抗HCV阳性的23例中，HCVRNA阳性19例，阴性4例，抗HCV阴性13例中，HCVRNA阳性有3例，其余仍为阴性，说明抗HCV阳性大部分能反映丙型肝炎病毒的复制状况，但由于抗C100-3抗体出现较迟，少数抗C100-3阴性者也出现HCVRNA阳性，提示HCV感染在本地区重型肝炎发病中有重要意义，见表1。

表1　两种方法检测重型肝炎患者体内丙肝病毒的比较（符合率58.6%）

	HCVRNA（+）	HCVRNA（−）	总计
C100−3(+)	19	4	23(63%)
C100−3(−)	3	10	13
总　计	22(61%)	14	36

表2　丙肝病毒感染与重肝预后的关系

	例数	存活率	病程(d)
HCVRNA(+) C100−3(+)	19	26.3%(5)	96.4
HCVRNA(+) C100−3(−)	3	33.3%(1)	96.5
HCVRNA(−) C100−3(+)	4	75%(3)	87.7
HCVRNA(−) C100−3(−)	10	70%(7)	876

从表2可看出，不管丙肝抗体阳性与否，HCVRNA阳性重肝患者的存活率均较低，病程一般较短，多为亚重肝。因此，感染HCV后，病情加重，预后较差。HCVRNA（−）组存活率高，病程较长，多为慢重肝，但其中C100-3阳性的4例重肝患者病程较短，是否与抗体阳性有关，目前还不清楚。

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCVRNA阳性重肝患者中，约有50%的病例可检出乙肝病毒的复制标志，此类双重感染的患者肝损害严重、存活率低，而HCVRNA阴性患者大多带有乙肝病毒复制指标，存活率高，病情较缓和，因此丙肝病毒在体内可能干扰乙肝病毒的复制，多重感染则易于重症化，结果见表3。

表3 丙肝病毒感染对乙肝病毒复制及预后的影响

	乙肝病毒复制阳性率	HBsAg阳性存活率
HCVRNA(+)	50%(11/22)	27%(3/11)
HCVRNA(−)	79%(11/14)	73%(8/11)

讨 论

目前认为，在正常人群中，丙型肝炎病毒平均带毒水平较低，美国、英国、日本等发达国家的感染率在0.23—1.2%不等，我国北京地区感染率较高为2.9%，因交叉感染，河北固安等县单献浆者抗-HCV阳性率高达56%，输血后肝炎中有80%以上为丙型肝炎病毒所引起，因此应及早进行预防和治疗。抗C100-3诊断虽然在丙肝病毒的发现和流行病学调查方面起过重要作用，但近来发现其存在特异性较差，检出率较低和不能进行早期诊断等特点，正逐步为包括有结构区和非结构区合成多肽的抗HCV检测药盒和重组免疫印迹实验(4-RIBA)所取代[7,8]，巢式PCR技术的出现，进一步增强了丙型肝炎诊断的灵敏度和特异性。据报道血清内HCVRNA浓度虽较低，但PCR的灵敏度为对黑猩猩感染剂量的10倍。因此可作为有无传染性的标志和抗病毒疗效的依据。采用此法我们检测了36例重肝患者血清中HCVRNA，检出率高达61%，表明HCV感染可引起严重肝损害，我们采用PCR技术检测重肝患者血清中HBVDNA，发现大部分病例存在HBV复制，并且此类患者血清TNF水平明显高于单一病毒感染患者，说明病毒感染及其活跃程度仍然是引起重症肝炎的重要原因。HCVRNA(+)组乙肝病毒复制率较HCVRNA(−)组低，可能提示丙肝病毒在体内能干扰乙肝病毒的复制，单纯HCV感染或HCV合并HBV感染重肝患者的死亡率明显高于仅由HBV引起的重型肝炎，表明感染HCV后，预后较差，易于重症化，应及早进行抗病毒治疗。北医杜绍财等采用限制性内切酶降解上述扩增片段进行分型，发现重肝患者HCV病原体以Ⅱ型为主（75%），Ⅲ型较少（25%），无混合型，与其它地区，其它类型的丙型肝炎相似，从而排除重型肝炎由特殊型别HCV感染所致的可能。至于重型肝炎的发作，可能和内毒素血症及激发的肿瘤坏死因子有关，后者可在原有肝损害基础上，形成大块或亚大块坏死[9]。

参 考 文 献

[1] Choo QL, et al. Science 1989; 244: 359.

[2] Kuo G, et al. Science 1989, 244:362.

[3] MacFar lane IG,et al. Lancet 1990, 335:754.

[4] Okamoto H, et al Japan J exp Med 1990; 60(4):215.

[5] 杜绍财，等. 北京医科大学学报 1991; 23(6):429.

[6] 张定凤，等. 中华实验和临床毒毒学杂志 1991; 5(4):494.

[7] Okamoto H, et al. Hepatology 1992; 15(2):180.

[8] Van der poel CL,et al. Lancet 1991; 1991; 337:317.

[9] Cristiano K,et al. Hepatology 1991; 14(1):51.

（收稿日期 1993-05-07）

（下转306页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

[7] 徐叔云. 临床药理学 第一版 北京人民卫生出版社1991; 202

(收稿日期 1993-04-06)

CLINICAL ANALYSIS OF THIRTEEN CASES OF NEWBORN HIE

Zhou Lin

Chongqing Municipal Materity and Children Hospital

This paper reported thirteen cases of newborn HIE who were treated in newborn warb of our hospital in 1992. There were three mild cases, six moderate cases and four severe cases in this study. The clinical characteristics of HIE were discussed. The mechanism of action of mannitol and the significance of its early use were explained. In the meantime, we had some suggestions for the prevention and treatment of HIE and its complications

KEY WORDS Newborn, HIE, Mannitol, OFR

(上接257页)

DETECTION OF SERUM HEPATITIS C VIRAL RNA IN PATIENTS WITH HEPATIC FAILURE BY "NESTED" POLYMERASE CHAIN REACTION

Huang Ainong, et al

Viral Hepatitis Institiute

A RT-PCR method was developed for serological diagnosis of hepatitis C virus RNA in 36 patients with hepatic failure. Preliminary studies showed that 3 of 7 patients with chronic hepatic failure and 19 of 28 patients with subacute hepatic failure were positive for HCVRNA. HCVRNA was not detected in one case of acute hepatic failure. The positive rate of HCVRNA was 61% on the average. All these data strongly suggested that HCV infection was the important reason of hepatic failure. The lower HBV replicating levels in HCVRNA-positive patients as compared with those without detectable HCVRNA indicated that HCV could interfere with the replication of HBV in vivo. The higher mortality rate of hepatic failures caused by HCV infecton or co-infection with HBV showed that prognosis of HCV infection was very poor and might lead to severe liver damage, it should be considered earlier for anti-viral therapy

KEY WORDS hepatic Failure "Nested"PCR Hepatitis C Virus