DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.002
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000 

文章编号:1000-5404(2000)08-0717-03

论著

# HGV/GBV-C感染在肝细胞损伤中的作用探讨

聂青和[1],胡大荣[1],李梦东[1],谢 青[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038;[2]附属新桥医院病理科,重庆 400037)

提 要:目的 研究单一HGV/GBV-C感染者肝组织中该病毒核酸定位及相关抗原表达,探讨HGV/GBV-C感染在肝细胞损伤中的作用。方法 12例单一HGV/GBV-C感染者经肝穿获取肝组织常规病理诊断,采用地高辛标记探针原位杂交法检测病毒RNA,并用免疫组织化学法检测病毒相关抗原表达。结果 病理诊断急性肝炎8例,慢性肝炎4例。HGV/GBV-C NS5抗原检出阳性率为66.67%(8/12),阳性信号主要位于肝细胞胞浆中;HGV/GBV-C RNA检出阳性率为58.33%(7/12),阳性信号位于胞浆,分布无一定规律,阳性细胞与肝细胞变性、淤胆、炎性细胞浸润、细胞坏死程度等并无相关联系。单一HGV/GBV-C感染者临床表现轻,不易被发现。结论 HGV/GBV-C RNA并不直接损害肝细胞;肝细胞中存在HGV/GBV-C相关抗原表达,其编码产物可能作为一种靶抗原,诱发免疫病理反应。

关键词:庚型肝炎病毒;GB病毒C型;原位杂交;免疫组织化学;病理诊断
中图法分类号:R392.11;R512.6 文献标识码:A

# Study of the mechanism of liver cells injury after HGV/GBV-C infection

NIE Qing-he, HU Da-rong, LI Meng-dong, XIE Qing (Department of Infectous Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To study the exppression of hepatitis G virus or GB virus C (HGV/GBV-C) RNA and virus-related antigens in the liver of patients with HGV/GBV-C infection, and the mechanisms of liver cells injury induced by HGV/GBV-C. Methods The expression of HGV/GBV-C RNA in the liver tissues were detected with digoxigenin labeled probe with *in situ* hybridization, and the distribution of HGV/GBV-C related antigens in the liver tissues was detected with immunohistochemistry. Results HGV/GBV-C RNA was detected in 58.33%, and HGV/GBV-C NS5 antigen in 66.67% of 12 liver samples of hepatitis patients with HGV/GBV-C infection alone. Positive staining signal of hybridization and HGV/GBV-C NS5 antigen was only seen in the cytoplasm. Positive cells of hybridization was not related to hepatocyte degeneration, cholestasis, inflammatory cell infiltration, degrees of cell necrosis, etc. Eight cases of acute hepatitis and 4 of chronic hepatitis were diagnosed in 12 liver tissue samples. Conclusion It seems that HGV/GBV-C does not damage hepatocytes directly, and HGV/GBV-C-related antigens may exist in hepatocytes; HGV/GBV-C might exert its role as a target antigen in the course of liver injury.

**Key words**: hepatitis G virus (HGV); GB virus C (GBV-C); *in situ* hybridization; immunohistochemistry; pathologic diagnosis

庚型肝炎病毒(HGV/GBV-C)是1995年底美国科学家Linnen等[1]从1名输血后肝炎病人血清中克隆出的一株新的黄病毒样RNA,称之为HGV(庚型肝炎病毒)。同时Abbot实验室Simons等[2]从1名西非肝炎病人血标本中分离出一株黄病毒样RNA序列,称之为GVB-C。进一步的研究表明,HGV、GBV-C是同一病毒的不同分离株[3],故以HGV/GBV-C表示。该病毒的发现研究至今仍未得到国际病毒分类与命名委员会的最后承认,其主要原因是HGV/GBV-C对人体肝脏是否有致病性,目前争论较大。多数学者认为HGV/GBV-C可能不是一个肝炎致病因子,而可能是偶尔与其它尚未鉴定的非甲~非戊型肝炎病毒一起感染机体的偶然"旅行者"[4,5],但目前尚无足够的证据说明它不致病。我们收集单一HGV/GBV-C感染者的血清、肝组织标本观察其肝组织中病毒相关抗原表达状况,核酸定位与肝细胞损伤的相关性。

作者简介:聂青和(1961—),男,江西省进贤县人,博士,副主任医师,主要从事传染病临床与实验研究,发表论文75篇。电话:(029)3577595

收稿日期:1999-10-09;修回日期:2000-04-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 1 材料与方法

### 1.1 病例选择

18例单一HGV/GBV-C感染者血清抗-HGV和HGV/GBV-C均阳性，男13例，女5例，平均年龄(35.2±16.8)岁。本组18例是从136例非甲~非戊型肝炎中筛选而来。临床诊断分型急性肝炎11例，慢性肝炎7例，其中12例进行了经皮肝穿刺。

### 1.2 方法

1.2.1 逆转录巢式PCR检测HGV/GBV-C PCR引物序列见表1。巢式PCR扩增后产物长度为169 bp。阳性对照血清由军事医学科学院五所王海涛教授惠赠(此血清已经反复检测阳性并对其PCR产物测序)。

表1 HGV/GBV-C PCR引物序列

Tab 1 The primer sequences of HGV/GBV-C in PCR

| Primers | Sites(NS5) | Nucleotide sequences |
|---|---|---|
| Sense(G1) | 23~42 | 5′-AAGCCCCAGAAACCGACGCC-3′ |
| Antisense(G2) | 311~350 | 5′-TGAAGGGCGACGTGGACCGT-3′ |
| Sense(G3) | 83~102 | 5′-CGGCCAAAAGGTGGTGGATG-3′ |
| Antisense(G4) | 268~285 | 5′-TGAACGGGCTCGGTTTAACG-3′ |

1.2.2 肝炎病毒标志物的血清学检测 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc、抗-HCV、抗-HDV、抗-HEV、抗-CMV及抗-EBV均用商品试剂盒检测，严格按说明书在有效期内操作使用(HBV-M试剂盒购自上海科华生物技术公司，抗-HCV、抗-HDV及抗-HEV试剂盒购自山东3V生物试剂公司)。

1.2.3 HBV DNA、HCV RNA检测 方法为PCR技术，试剂盒购自北京医科大学肝病研究所。

1.2.4 肝功能临床生化指标检测 均由本院检验科常规操作检测。

1.2.5 病理学诊断 肝穿术获取的肝组织经10%甲醛固定，及时送病理科进行常规病理诊断。

1.2.6 肝组织中HGV/GBV-C相关抗原检测 应用免疫组织化学方法检测，S-P试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司，产品编号KIT-9710按说明书进行操作。鼠抗HGV/GBV-C NS5单克隆抗体由北京解放军302医院免疫研究室程云主任、罗清华副主任医师惠赠(工作效价1∶200)，液体DAB酶底物显色。同时分别用兔血清和磷酸盐缓冲液代替第一抗体，以确定其特异性和可靠性。

1.2.7 肝组织中HGV/GBV-C RNA检测 采用地高辛标记HGV/GBV-C cDNA探针原位杂交法检测，标记试剂盒购自德国宝灵曼公司，按说明书进行操作。石腊包埋肝组织切片经脱蜡脱水后，蛋白酶K(Merch′s公司产品)消化，多聚甲醛固定后用地高辛标记探针HGV/GBV-C RNA，探针浓度为2 μg/ml，杂交分子采用NBT显色后甲基绿复染，明胶甘油封片，显微镜下观察。设对照试验以确定其特异性。

## 2 结果

### 2.1 肝炎病毒标志物检测结果

18例患者血清检测甲、乙、丙、丁、戊型5种肝炎病毒标志物均阴性。抗-CMV和抗-EBV均阴性。HVB DNA和HCV RNA(PCR法)结果均阴性。而抗-HGV和HGV/GBV-C RNA结果均阳性。

### 2.2 HGV/GBV-C感染者肝组织病理学表现

12例病理诊断急性肝炎8例，慢性肝炎4例，其病理改变见表2。

表2 单一HGV/GBV-C感染者肝组织病理改变

Tab 2 Pathologic changes of patients with HGV/GBV-C infection alone

| Pathologic changes | Cases | Percentage(%) |
|---|---|---|
| Spotty necrosis | 12 | 100.00 |
| Hydropic denaturation | 5 | 41.67 |
| Fatty denaturation | 4 | 33.33 |
| Piecemeal necrosis | 4 | 33.33 |
| Bridging necrosis | 1 | 8.33 |
| Lymphocyte gathering in portal area | 5 | 41.67 |

### 2.3 HGV/GBV-C NS5抗原在肝组织中的表达

12例单一HGV/GBV-C感染者肝组织中病毒相关抗原阳性8例，阳性率为66.67%。阳性信号位于肝细胞胞浆，呈均质棕黄色颗粒状，未见细胞核着色。染色阳性细胞可成散在、簇状或弥散性分布。阳性细胞周围可无明显炎性浸润及坏死，阳性表达的肝细胞也可位于坏死灶中或灶旁，碎屑样坏死处可见该病毒相关抗原表达。对照实验结果阴性。

### 2.4 HGV/GBV-C RNA在肝组织中的定位

单一HGV/GBV-C感染者肝细胞中HGV/GBV-C RNA阳性者7例，阳性率为58.33%。阳性信号呈蓝紫色颗粒状位于肝细胞胞浆中，在肝组织中散在、随意分布，无一定规律，阳性信号仅见于肝实质细胞内，门管区的单核细胞、胆管细胞等均未见阳性信号。阳性细胞与肝细胞变性、淤胆、炎性细胞浸润、坏死均无相关联系。阳性细胞及其周围肝细胞未见特殊病理改变。

### 2.5 单一HGV/GBV-C感染者血清肝功能生化检测，见表3

表3 单一HGV/GBV-C感染者血清肝功能检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Results of liver function tests in patients with HGV/GBV-C infection alone($\bar{x}\pm s$)

| Detective index($n$=18) | Results |
|---|---|
| ALT(U/L) | 208.4±173.7 |
| AST(U/L) | 184.4±169.1 |
| γ-GT(U/L) | 108.6±57.2 |
| ALP(U/L) | 168.8±74.2 |
| TB(μmol/L) | 102.6±85.8 |

## 3 讨论

由于HGV/GBV-C与HCV、HBV具有相似的传播途径，所以临床上多以两种或两种以肝炎病毒混合感

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

染者为主[1~4], 单一 HGV/GBV-C 感染者临床上较少见。

关于 HGV/GBV-C 的实验诊断标准, 研究起始主要应用 ELISA 检测血清中 HGV/GBV-C 抗体。随着研究的深入, 发现抗-HGV/GBV-C 仅能代表 HGV/GBV-C 感染的一种标志, 不能代表该病毒的现行感染[6]。PCR 技术检则能够反映病毒血症期的感染[7], 故目前 HGV/GBV-C 病原学的实验诊断主要依靠 RT-nPCR 技术检测病人血清中 HGV/GBV-C RNA。本组 18 例患者血清中均检测出 HGV/GBV-C RNA, 同时排除了 HAV、HBV、HCV、HDV、HEV、CMV 及 EBV 感染, 故诊断为单一 HGV/GBV-C 感染。病理诊断中仅有急、慢性肝炎, 并无重型肝炎、肝硬化, 病理改变以点灶状坏死为主, 碎屑样坏死、架桥样坏死很少, 说明 HGV/GBV-C 感染者症状轻, 而不易发现。单一 HGV/GBV-C 感染者肝组织中原位杂交检测该病毒核酸, 结果显示该病毒核酸定位主要在肝细胞胞浆中, 分布无规律, 阳性信号细胞与肝细胞变性、淤胆、炎性细胞浸润、坏死均无关联, HGV/GBV-C RNA 的存在、表达与肝细胞的损伤似无直接相关性, 提示 HGV/GBV-C RNA 并不直接损害肝细胞。

免疫组化检测显示单一 HGV/GBV-C 感染者肝组织中确有 HGV/GBV-C 相关抗原表达, 阳性率为 66.67%(8/12), 明显高于各种肝病患者肝组织中 HGV/GBV-C 相关抗原表达阳性率(25.0%)和血清学 HGV/GBV-C RNA 阳性病人肝组织中 HGV/GBV-C 相关抗原表达阳性率(38.30%)[8,9], 这可能与本组 12 例为单一 HGV/GBV-C 感染有关, 病例少也是其高阳性率的原因之一, 但实验结果显示感染者肝组织中确有 HGV/GBV-C 相关抗原表达, 病理学检测报告显示这类病人肝组织中有门管区淋巴细胞聚集现象(41.67%), 临床生化检测结果提示这类病人有肝细胞损害表现。综合上述结果分析认为 HGV/GBV-C RNA 并不直接损害肝细胞, 而是通过其编码产物作为靶抗原, 诱发免疫病理瓜, 免疫损伤可能是其发病机制之一, 但从临床表现及转归上看, 这种免疫损伤对机体肝脏的损害并不严重。

参考文献:


[1] Linnen J, Wages J Jr, Zhang K Z, *et al*. Molecular cloning and diseases association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent[J]. Science, 1996, 271(1): 505—508.

[2] Leary T P, Muerhoff A S, Simons J N. Consensus oligmuleotide primers for the detection of GB virus C in human crypotogenic hepatitis[J]. J Virol Methods, 1996, 56(1): 119—121.

[3] 聂青和. 己型、庚型及其它新型肝炎病毒研究概况[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 1997, 24(1): 19—23.

[4] Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis G virus-A true hepatitis virus or an accidental tourist[J]? N Engl J Med, 1997, 336(11): 795—796.

[5] Pessoa M G, Terrault N A, Detmer J, *et al*. Quantitation of hepatitis G and viruses in the liver: Evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic[J]. Hepatology, 1998, 27(3): 877—880.

[6] 李　玲, 聂青和, 陈国致, 等. 庚型肝炎病毒抗体在不同人群中的检测及意义[J]. 实用肝脏病杂志, 1998, 3(1): 9—11.

[7] 聂青和. 多聚酶链反应技术诊断病毒性疾病的研究进展[J]. 国外医学: 病毒学分册, 1994, 1(4): 117—120.

[8] 聂青和, 谢　青, 胡大荣, 等. 庚型肝炎病毒感染者肝组织中庚型肝炎病毒相关抗原的表达[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(5): 394.

[9] 聂青和, 胡大荣, 李梦东, 等. HGV/GBV-C 与 HCV 混合感染者肝组织中相关病毒抗原表达[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(1): 114—115.


(编辑　陈聪连)

# 《组织工程基础与临床》新书征订

书讯

组织工程学是应用工程学和生物学的基本理论、原理及技术, 在体外预先构建有生命的种植体, 植入体内修复组织缺损, 重建功能, 或构建体外装置, 替代组织(器官)一部分或全部功能的新兴研究领域。由于这一研究对生命科学的巨大影响和潜在的经济效益, 已被世界各国所重视。在这一领域的研究中, 我国与世界研究水平的时间差距较小, 若能进行有效的组织, 更多的经费投入, 在某些领域有可能赶上或超过国外研究水平。然而有关组织工程研究的中文专著很少。在华西医科大学有关领导的支持下, 由杨志明教授组织了一批实际从事组织工程学研究的青年学者, 编写了《组织工程基础与临床》一书, 全书大约 53 万字, 90 幅图。已经由四川科技出版社正式出版发行。书中介绍了"组织工程学"的发展、基础理论、最新研究进展、临床应用前景及尚需解决的问题等。适合于临床医生、研究生及科研工作者阅读, 欢迎广大读者踊跃订购。该书每册定价 138 元(含邮购费)。

联系人: 俞　军、张元芬　　地址: 四川成都华西医科大学附属第一医院,《中国修复重建外科杂志》编辑部

邮政编码: 610041　　电话: 028—5422431, 028—5422432

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net