DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.015

肝炎病人血清 外周血单核细胞及肝脏中GBV-C/HGV负链RNA的检测

聂青和* 李梦东 胡大荣 朱永红 陈国致 (第三军医大学附属西南医院全军传染病专科中心) 重庆,400038

提 要 **目的**:研究27例肝炎病人血清、外周血单核细胞(PBMC)及肝脏中GBV-C/HGV正链及负链RNA(复制中间体)的存在状况。**方法**:应用逆转录-巢式多聚酶链反应技术检测GBV-C/HGV正、负链RNA。**结果**:27例病人中21例病人血清、7例PBMC、10例肝组织中检测到GBV-C/HGV正链RNA,其中2例单一GBV-C/HGV感染者肝组织中检测到负链RNA,在27例病人血清及PBMC中均未检测到负链RNA。**结论**:GBV-C/HGV是一种嗜肝病毒,肝脏可能是其复制的主要场所之一,但GBV-C/HGV与HCV混合感染时,在PBMC及肝脏中尚未发现该病毒复制的证据。

关键词 GB病毒C型;庚型肝炎病毒;逆转录-巢式多聚酶链反应;外周血单核细胞;病毒复制
中图法分类号 R394;R512.6

庚型肝炎病毒(GBV-C/HGV)是否有致病性的研究是十分重要的课题。目前对GBV-C/HGV的寄居部位及复制场所也尚未阐明。资料表明,GBV-C/HGV与HCV均为单股正链RNA病毒,其复制过程相似。因此,检测病毒负链RNA可以作为细胞内病毒复制的指标[1,2]。我们检测同一患者血清、外周血淋巴-单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)及肝组织中GBV-C/HGV正、负链RNA,力求探讨GBV-C/HGV的组织亲和性,试图为其致病性的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择经RT-nPCR试验检测血清GBV-C/HGV RNA阳性肝炎病人21例,其中单一GBV-C/HGV感染者8例;另选慢性丙型肝炎6例(血清GBV-C/HGV RNA阴性,抗HCV及HCV RNA阳性)。本组研究对象共27例,为血清、PBMC及肝组织3种标本齐全的病人,年龄18~39岁,男性19例,女性8例。

1.2 RT-nPCR引物序列

参照Saito等[3]报道的引物序列。

外引物 HG166 5′-CCACTATAGGTGGGTCTTAA-3′

外引物 HG380R 5′-CCACTGGTCCTTGTCAACTC-3′

内引物 HG166 5′-CCACTATAGGTGGGTCTTAA-3′

内引物 HG341R 5′-TGGTCAAGAGAGACATTGAA GGG-3′

第二次巢式PCR扩增产物长度为210 bp。

1.3 肝组织中总RNA的提取

参照Chomzynski等[4]介绍的异硫氰酸胍:酚:氯仿提取法,略有改动。具体操作过程如下:①取40 mg肝组织,用无菌生理盐水冲洗3次后,置于无菌玻璃匀浆管中;②加入600μl变性母液(4 mol/L异硫氰酸胍,25 mmol/L柠檬酸钠;pH7.0,0.5%十二烷基磺酸钠和6 μl β-巯基乙醇),电动匀浆3次,每次30 s;③匀浆后在冰水中超声震荡1 min;④将此匀浆液移至1.5 ml Eppendorf管中,加入2 mol/L NaAc(pH4.0)60 μl,饱和酚600 μl,氯仿:异戊醇(49:1)400 μl,混匀后置冰浴15 min,4 ℃ 10 000×g离心15 min,取上清加等体积氯仿再提取一次。再取水相加等体积异丙醇-20 ℃沉淀过夜;⑤-70 ℃沉淀30 min,4 ℃ 10 000×g离心20 min,弃去液体,以75%冰冷乙醇600μl漂洗沉淀,同上离心10 min,弃去乙醇;⑥沉淀物以半导体冻干机抽干,溶于焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate,DEPC)处理的水中,于-70 ℃冻存作为统一待检样品。

1.4 淋巴-单核细胞分离及总RNA的提取

1.4.1 淋巴-单核细胞的分离 按文献[5]的方法略有改动。具体操作过程如下:①取抗凝静脉血5 ml,用RPMI 1640液将之1:1稀释。②取比重为1.077±0.001的聚蔗糖-泛影葡胺分层液4 ml,放入15 mm×150 mm试管中。③用毛细吸管吸取稀释血液,在离分层液面上1 cm处,沿试管壁慢慢加入8 ml左右。④用水平离心机500×g离心30 min,将毛细吸管轻轻插到血浆与分离液界面的白膜状层,沿试管壁周缘吸出界面层细胞,移入另一无菌试管中。⑤加5倍左右的RPMI 1640液,充分混匀,200×g离心15 min,弃去RPMI 1640液,将沉淀细胞用RPMI 1640液重悬后反复洗涤4次。将最后一次洗涤液留取,-70 ℃贮存统一待检。⑥加500 μl重蒸水后,冰浴条件下用MSE超声波粉碎仪振动1 min。在4 ℃下20 000×g离心15 min,吸去上清液400 μl后-70 ℃贮存统一待检。

1.4.2 GBV-C/HGV RNA的提取 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法。

1.5 血清中RNA的提取

取待检血清100 μl加300 μl裂解液(4.2 mmol/L异硫氰酸胍;0.5%十二烷基磺酸钠;2.5 mmol/L Tris,25 mmol/L柠檬酸钠,0.1 mmol/L β-巯基乙醇)混匀,置45 min,然后加入2 mmol/L醋酸钠50 μl,酚500 μl和氯仿:异戊醇(24:1)100 μl,混匀,静置10 min,取上清,移置另一离心管中,并加入等体

* 聂青和,男,37岁,副主任医师,博士,现在第四军医大学附属唐都医院传染科 西安,710038

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

积的异丙醇，置－20 ℃过夜。然后 10 000×g 离心 20 min，沉淀物用真空干燥备用。

1.6 GBV-C/HGV 负链 RNA 的检测

参照 Saito 等[3]和 Takehara 等[6]介绍的方法，略有改动。具体操作过程如下：

1.6.1 逆转录反应 反应体积 20 μl。将待检样品和不含酶、RNasin 的反应混合液分别先在 93 ℃变性 6 min，再将此待检样品 10 μl 加入到含 10 μl 反应混合液（含 10×PCR 缓冲液 2 μl、4 种 2 mmol/L dNTP 4 μl、与负链 GBV-C/HGV RNA 互补的有义外引物10 pM、RNasin 20U 及 AMV 逆转录酶 5U）的反应管中，盖上石蜡油，离心混匀集中。于 42 ℃反应 40 min，接着于 95 ℃变性 20 min，使逆转录酶充分灭活。

1.6.2 第 1 轮 PCR 反应体积 40 μl。在上述逆转录反应产物管中加入反应混合液 20 μl（含 10×PCR 缓冲液 2 μl、与正链 GBV-C/HGV RNA 互补的反应外引物 10 pM 及 Taq DNA 聚合酶 2U），离心混匀，进入 PCR 循环。参数为：①94 ℃ 1 min，50℃ 1 min，72 ℃ 2 min，循环 3 周；②继之 94 ℃ 30 s，50 ℃ 40 s，70 ℃ 40 s（每周递增 1 s），循环 37 周；③最后于 72 ℃延伸 6 min。

1.6.3 第 2 轮 PCR 反应体积 40 μl。由 4 μl 第 1 轮 PCR 产物和 36μl 反应混合液（含 10×PCR 缓冲液 4 μl、每种 2 mmol/L dNTP 4 μl、两条内引物各 10 pM、Taq DNA 聚合酶 2U）组成。参数为：①94 ℃ 1 min，50 ℃ 1 min，70 ℃ 2 min，循环 3 周；②继之 94 ℃ 30 s，50 ℃ 40 s，70 ℃ 40 s（每周递增 1 s），循环 37 周；③最后于 72 ℃延伸反应 6 min 结束。以上温育反应均在 Bransteadl Thermolyne 公司出品的自动化热循环仪上进行。

1.6.4 GBV-C/HGV 负链 RNA 的 RT-nPCR 扩增产物分析 取第 2 轮 PCR 扩增产物 10μl 加入含溴乙锭的 2%琼脂糖凝胶中电泳。

2 结果

2.1 GBV-C/HGV 负链 RNA 检测的特异性

为防止假阳性的出现，每次试验中均随机插入 2 例正常人血清或 PBMC。18 例正常人血清、PBMC 均按实验组病人血清、PBMC 一样提取 RNA，然后进行 RT-nPCR 检测，结果未发现有非特异性扩增带出现。检测肝组织时取 2 例正常人肝组织同实验组病人肝组织进行 RNA 提取及 RT-nPCR 检测，结果为阴性。

2.2 检测结果见表 1

2.3 重复性试验

将 10 例肝组织中检出 GBV-C/HGV RNA 的提取液，冰壶内存放迅速移置本院消化内科实验室，按原实验方案及实验条件进行 RT-nPCR 检测，以上温育反应均在美国 PE 公司 480 型自动化热循环仪上进行。检测结果同前，10 例肝组织中 GBV-C/HGV RNA 阳性和 2 例单一感染组病人肝组织中 GBV-C/HGV 负链 RNA 阳性。

2.4 PBMC 最后一次洗涤液检测

将最后一次冲洗 PBMC 的 RPMI 1640 液体，按上述方法提取 RNA、RT-nPCR 检测，结果未检出 GBV-C/HGV RNA。

表 1 肝炎病人 GBV-C/HGV 负链 RNA 检测结果

Tab 1 Results of GBV-C/HGV RNA detection in hepatitis patients

Type of infection	Case	Serum		PBMC		Liver	
		Plus	Minus	Plus	Minus	Plus	Minus
Co-infection	13	13	0	4	0	6	0
Single-infection	8	8	0	3	0	4	2
Chronic hepatitis C	6	0	0	0	0	0	0
Total	27	21	0	7	0	10	2

3 讨论

自从肝炎病人血清中克隆成功 GBV-C 及 HGV 以来，该病毒的定居及复制场所已成为病毒学专家们感兴趣的课题。Karayiannis 等[7]于 1997 年初报道了在 GBV-C/HGV RNA 阳性病人 PBMC 中检测到该病毒 RNA，并提出了 HGV 可能类似 CMV 或 EBV，肝脏不是其特定寄居及侵袭场所，只是在某种条件下可致肝脏损害而已。继而，Madejon 等[8]报道，在慢性肝病患者的血清，外周血单核细胞和肝脏内均检测到正链 GBV-C/HGV RNA，但仅在肝脏检测到负链 RNA。Saito 等[3]从 6 例肝炎病人肝脏检测到 HGV 负链 RNA，其中 2 例病人的血清和 1 例病人的外周血单核细胞也检测到 HGV 负链 RNA。上述两篇报道的作者们认为 GBV-C/HGV 是在肝脏复制的嗜肝病毒。但 Laskus 等[9]的研究得出完全相反的结论，10 例血清 HGV RNA 阳性慢性肝病患者中，9 例 HCV RNA 也为阳性，6 例在肝脏检测到正链 HGV RNA，均未检测到负链 HGV RNA。与此同时，9 例均在肝脏检测到正链 HCV RNA 者，其中 7 例也检测到负链 HCV RNA，提示至少在与 HCV 合并感染者中，肝脏不是 HGV 复制部位。Laskus 等[10]继续报道在美国不明原因肝硬化病人中检测到 6 例血清 HGV RNA 阳性，其中 5 例在肝脏中检测到正链 HGV RNA，6 例均未检测到负链 HGV RNA，再次证明肝脏不是 HGV 的复制场所的观点。最近，Radkowski 等[11]报道 9 例血清 GBV-C/HGV RNA 阳性病人中，5 例病人外周血单核细胞中检测到正链 GBV-C/HGV RNA，病人 PBMC 中均未检测到负链 GBV-C/HGV RNA，结论认为 PBMC 不是 GBV-C/HGV 的复制场所。上述 3 篇论文[9~11]的报道均出自美国匹兹堡医学中心同一实验

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

室的结果，其可信程度有待证实。国内目前尚未见关于 GBV-C/HGV 复制研究的报道。

由于 PCR 技术具有极高的灵敏度，只要肝组织中存在微量来自血液的病毒就可能出现阳性反应。Takehara 等[6]应用 RT-PCR 技术研究 9 例慢性肝炎、肝硬化患者的肝组织、血清和 PBMC 中负链 HCV RNA，发现它只存在于肝组织中，而血清、PBMC 中则为阴性，说明这种技术可以避免肝组织中的 HCV RNA 是来自血液的污染。实践证明，检测负链 HCV RNA 能较准确地反映受检组织中 HCV 的存在与复制状况。HCV 负链 RNA 检测的成功，给我们的研究带来启示。单纯检测肝组织中正链 GBV-C/HGV RNA 的方法，难以确切反映肝组织中 GBV-C/HGV 的存在与复制状况。从理论上讲，与正链 GBV-C/HGV RNA 相互补的负链 RNA(复制中间体)只存在于有病毒复制的组织和细胞，检测患者肝组织中的负链 GBV-C/HGV RNA 可以避免肝组织来自血液循环毒粒的污染，能够准确地反映受检患者肝组织中 GBV-C/HGV RNA 的复制状况。

我们参照 Takehara 等及 Saito 等介绍的方法，在逆转录反应时仅加入与负链 GBV-C/HGV RNA 互补的有义外引物，等逆转录反应结束，将逆转录酶变性灭活后再加入反义外引物，然后进行巢式 PCR 扩增。结果发现 2 例单一 GBV-C/HGV 感染者肝组织中存在 GBV-C/HGV 负链 RNA，而对照血清及正常人肝组织检测均阴性。这 2 例病人血清、PBMC 及肝组织中 GBV-C/HGV 正链 RNA 均为阳性，但未能从血清、PBMC 中检出负链 RNA。如用血液污染来解释这个结果显然是不合适的。由于从单一 GBV-C/HGV 感染者获得肝组织标本十分困难，虽然本研究例数太少，难以得出肯定性结论，但重复性试验证实确实在单一 GBV-C/HGV 感染者肝组织中检出负链 RNA，提示肝脏可能是 GBV-C/HGV 复制的场所之一，至少在单一 GBV-C/HGV 感染病人中如此，也说明 GBV-C/HGV 对肝脏是有亲和性的。

RT-nPCR 的技术要求相对较高，操作过程中要谨防污染，实验过程应随时插入至少 2 例阳性对照，以保证实验的特异性。本组实验在同时检测丙型肝炎病人的血清、PBMC 及肝脏标本时，均未检出 GBV-C/HGV RNA，加之 18 例正常人对照以及 PBMC 洗涤液的检测结果均为阴性，为本实验的特异性提供了保证。

从目前资料分析，多家报道了 GBV-C/HGV RNA 阳性病人 PBMC 中可检测到 GBV-C/HGV RNA[3,7~12]。这些研究结果如象 Alter[13]所言检测病人 PBMC 及肝脏中的 GBV-C/HGV RNA 均采用 RT-PCR 法，PCR 反应阳性有可能来源于污染的血或肝细胞外的其它组织细胞，这一论断似难以令人信服，何况上述研究均进行了特异性确证实验。至于 GBV-C/HGV 感染者 PBMC 中有 GBV-C/HGV RNA 存在究竟有何意义，尚值得进一步探讨。

参考文献

1 Lanford R E, Chavez D, Chisari F V, *et al*. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. J Virology, 1995, 69(12): 8079

2 Lanford R E, Sureau C, Jacob J R, *et al*. Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. Virology, 1994, 202(2): 606

3 Saito S, Tanaka K, Kondo M, *et al*. Plus-and minus-stranded hepatitis G virus RNA in liver tissue and in peripheral blood mononuclear cells. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(2): 288

4 Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156

5 Yoffe B, Noonan C A, Melnick J L, *et al*. Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA. J Infect Dis, 1986, 153(3): 471

6 Takehara T, Hayashi N, Mita E, *et al*. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: Implications of hepatitis C virus replication in infected tissue. Hepatology, 1992, 15: 387

7 Karayiannis P, Hadziyannis S J, Kim J, *et al*. Hepatitis G virus infection: Clinical characteristics and response to interferon. J Viral Hepatitis, 1997, 4(1): 37

8 Medejon A, Fogeda M, Bartolome J, *et al*. GB virus C RNA in serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B, C and D. Gastroenterology, 1997, 113(2): 573

9 Laskus T, Radkowski M, Wang L F, *et al*. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfected with hepatitis C and G viruses. J Virol, 1997, 71(10): 7804

10 Laskus T, Wang L F, Radkowski M, *et al*. Hepatitis G virus infection in American patients with cryptogenic cirrhosis: No evidence for liver replication. J Infect Dis,

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

1997,176(6):1491

11 Radkowski M, Wang L F, Vargas H, *et al*. Lack of evidence for GB virus C/hepatitis G virus replication in peripheral blood mononuclear cells. J Hepatol,1998,28(2):179

12 Sheng L, Soumillon A, Peerlinck K, *et al*. Hepatitis G virus RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells and its relation to HCV-RNA in patients with lotting disorders. Thromb Haemost,1997,77(5):868

13 Alter H J. G-pers, where'd you get those papers? A reassessment of the literature on the hepatitis G virus. Transfusion,1997,37(6):569

(收稿:1998-06-01;修回:1998-12-29)

(编辑 刘 鹏)

Detection of minus-stranded GBV-C/HGV RNA in the serum, liver and peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis

Nie Qinghe, Li Mengdong, Hu Darong, Zhu Yonghong, Chen Guozhi (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the presence of plus- and minus-stranded HGV RNA in the serum, liver and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Methods: Plus- and minus-stranded HGV RNA was detected with reverse-transcription nested polymerase chain reaction in 27 patients with hepatitis. Results: Plus-stranded HGV RNA was found in 21 cases in serum 10 cases in liver sample and 7 cases in PBMC. No minus stranded HGV RNA was found in serum and PBMC. Minus-stranded HGV RNA was detectal in 2 cases infected only with GBV-C/HGV in the liver sample. Plus-stranded HGV RNA was found in 10 of 21 liver samples from the patients with positive detection of HGV RNA in the serum and 2 of minus-stranded positive samples. No minus-stranded HGV RNA was found in the serum and PBMC. Conclusion: GBV-C/HGV is a hepatotropic virus that replicates in the human liver.

Key words GB virus C; hepatitis G virus; RT-nPCR; viral replication

ELISA 法初筛献血员 anti-HIV(1/2 型)初探

Priliminary investigation on the early screening of anti-HIV (1/2) of blood donors by ELISA

秦水春* 李忠俊 滕本秀 (第三军医大学附属新桥医院输血科) 重庆,400037

我科用4种不同厂家生产的酶联免疫吸附(ELISA)试剂2 277人次献血员初筛anti-HIV(1/2型)抗体,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本的采集与处理

于献血前采集小标本,空腹肘静脉血2 ml,不抗凝;采血后留取2 ml不抗凝标本。标本充分吸收后,离心得到血清,以消除纤维蛋白的干扰。检测在4 h内进行完毕。

1.2 方法

1.2.1 试剂 ELISA法试剂:卫生部规定anti-HIV检测试剂必须使用经卫生部药品生物制品检定所每批检定合格的产品(《关于对四种体外免疫诊断试剂生产、销售、使用、管理的补充通知》卫药发(1995)第32号文)。我们使用的4种ELISA试剂分别由:上海实业科华生物技术有限公司、珠海丽珠医药集团股份有限公司、华美生物工程公司、厦门新创科技有限公司所生产。试剂盒经卫生部药品生物制品检定所每批检定都合格。

每次实验都设空白对照、阴性对照、anti-HIV(1型)、anti-HIV(2型)阳性对照,以消除实验系统误差。实验由专人操作、固定加样器、水浴箱温度恒定37℃。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2 仪器 微量加样器定期进行校正,酶标仪使用DG3022A型单孔酶标仪。D_λ值测定取单波长450 mm。

结果判定:D_λ值≥cut off值为阳性,否则为阴性。

(下转506页)

* 秦水春,女,43岁,主管技师

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