DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.002

丙型肝炎病毒感染与原发性肝癌的关系

——不同人群血清 HCV RNA 的调查*

杨建民 刘为纹 晋华源 (第三军医大学西南医院消化内科) 630038

提 要 本文以聚合酶链反应(PCR)对重庆地区各种慢性肝病(CLD,$n=182$)和献血员($n=35$)血清 HCV RNA 的存在状况进行了初步调查。结果发现:①HCV RNA 在原发性肝癌(PHC)、肝硬化(LC)、慢性肝炎(CH)及献血员中的检出率分别为 36.6%(34/93)、31.7%(20/63)、15.4%(4/26)和 2.9%(1/35);②多数 HCV RNA 阳性 CLD(41/58)与 HBsAg 或 HBV DNA 双阳性,单纯 HCV RNA 阳性见于 15.1%(14/93)PHC、3.2%(2/63)LC 和 3.8%(1/26)CH。此资料提示约 20% PHC 可能与 HCV-HBV 双重感染有关,约 15% PHC 可能与单独 HCV 感染有关。

关键词 丙型肝炎病毒;乙型肝炎病毒;聚合酶链反应;肝肿瘤

国外资料表明 HCV 感染与 PHC 的发生密切相关[1]。国内血清抗-HCV 调查也提示存在这种相关性[2]。然而,血清抗-HCV 不但未能反映有无病毒血症,而且试剂敏感性和特异性差异较大[3,4]。我们亦曾发现血清抗-HCV 与 HCV RNA 的检测结果并不完全一致[5]。目前国内尚未见以 PCR 检测 HCV RNA 研究 HCV 感染与 PHC 关系的报道。为进一步阐明 HCV 感染与我国 PHC 的相关性,我们应用 PCR 对不同 CLD 及献血员血清 HCV RNA 的存在状况进行了调查。

1 材料与方法

1.1 调查对象

182 例 CLD 均系本院 1991～1992 年的住院患者。其中,PHC93例,男86例,女7例,平均年龄48.5±10.9 岁,有 39 例获病理和/或手术诊断,余 54 例根据典型临床表现、AFP、B 超和 CT 等资料临床确诊。LC 63 例,男 42 例,女 21 例,平均年龄 46.8±11.4 岁。CH26 例,其中慢性迁延型(CPH)6 例,慢性活动型(CAH)20 例,男 21 例,女 5 例,平均年龄 37.3±11.2 岁。ALT 正常且 HBsAg 阴性的健康献血员 35 例,男 18 例,女 17 例,平均年龄 34.5±7.1 岁。血清分离后于－20℃冻存待检。

1.2 试剂

引物:HCV 内外引物的序列起止位点、扩增片段长度及来源同前报道[5]。HBV 引物位于 S 基因保守区,起自 839R 和 427,分别为 21 和 22NT,扩增片段长 413bp,由中科院上海细胞所合成。

其它:AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品,DNA 聚合酶、RNasin、dNTP 及 PCR 缓冲液均由华美公司提供。

1.3 病毒核酸提取

HCV RNA 提取:参照文献方法[3,6]加以改进。待检血清 100μl,加裂解液(0.2mol/L Tirs-HCl,pH 7.5,25mmol/L EDTA,0.3mol/L NaCl,2% SDS)100μl,蛋白酶 K 至终浓度 200μg/ml。37℃温育 45min 后,加入 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)80μl,以酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提一次,氯仿抽提一次。在水相内加入等体积冷异丙醇和 14μg 糖原,－70℃沉淀 30min,4℃ 18 000g 离心 15min,沉淀物以 95%乙醇 400μl 离心洗涤一次,继以半导体冻干机抽干,溶于 10μl 经 DEPC 处理的水中,于－70℃冻存待检。

HBV DNA 提取:与 HCV RNA 相似。血清 100μl 经 SDS 裂解、蛋白酶 K 消化、酚氯仿抽提、乙醇及终浓度为 0.3mol/L 的 NaAC(pH 6.4)沉淀后,重悬于 10μl TE 缓冲液中,－20℃冻存待检。

* 全军"八五"青年基金课题

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

1.4 病毒基因扩增

HCV RNA PCR：采用逆转录-巢式 PCR，以逆转录与第一轮 PCR 同步法进行。见我们以前报道[5]。

HBV DNA PCR：反应体积 20μl，由 15μl 反应混合液（含 10×PCR 缓冲液 2μl、10μmol/L HBV 正负链引物各 1μl，每种 2mmol/L dNTP 2μl、DNA 聚合酶 0.6U）和 5μl 待检样品组成。采用水浴手工操作，循环参数为 93℃ 45s，55℃ 60s，70℃ 130s，反复 35 周。

1.5 扩增产物分析

取产物 10μl 在含溴乙锭的 2%琼脂糖凝胶中电泳后，紫外灯下观察荧光条带。

1.6 准确性监控

严格参照 Kwok 等[7]提出的防污染措施进行操作。每批实验自血清处理至 PCR 结束均设立阴阳性对照。

2 结果

2.1 方法敏感性和特异性

HCV RNA PCR：分别取 HCV RNA 阳性血清 15μl、30μl、60μl、80μl 和 100μl，以水补足 100μl，经提取 RNA 后检测，15μl 血清即可检出，与文献（5μl 血清中可检出 HCV RNA）[3]相似。以水代替血清抽提，则结果阴性。电泳位置符合理论值。

HBV DNA PCR：以 1ng 重组 HBV DNA 加入 100μl 正常血清抽提，沉淀以 TE 缓冲液 10 倍梯度稀释，使每 5μl 待检样品依次含初始重组 HBV DNA 量 100pg、10pg、1pg、100fg、10fg、1fg 和 100ag，结果敏感性可达初始量 1fg，与国内外同类方法敏感性相同。阴性对照阴性，电泳位置符合 413bp。

2.2 HCV RNA 在不同人群中的检出

35 例献血员中检出 1 例，阳性率为 2.9%。26 例 CH 中检出 4 例，其中 6 例 CPH 检出 1 例，20 例 CAH 检出 3 例，总阳性率 15.4%。63 例 LC 检出 20 例，阳性率 31.7%。93 例 PHC 检出 34 例，阳性率 36.6%。PHC 组与献血员或 CH 组比较及 LC 组与献血员组比较均有显著差异（$P<0.001\sim0.05$），但 PHC 组与 LC 组比较或 LC 组与 CH 组比较，则均无明显差异（$P>0.05$）。其中，分别有 15.1%PHC、3.2% LC 和 3.8%CH 表现为单项 HCV RNA 阳性，PHC 组与 LC 组比较有显著差异（$P<0.05$）。HBsAg 和 HBV DNA 均阴性的 PHC 中，则 HCV RNA 阳性率达 56%(14/25)，见附表。

附表 217 例不同人群血清 HCV 和 HBV 感染标志的检出情况

Table Detection rate of HCV RNA and HBV replicating markers in different groups of population

Group	No. of cases	Positive to HCV RNA	Positive to HBV-M	Positive to both HCV RNA & HBV-M	Negative to both HCV RNA & HBV-M
B donors	35	1 (2.9)	1 (2.9)	0 (0.0)	33 (94.3)
CH	26	1 (3.8)	20 (76.9)	3 (11.5)	2 (7.7)
LC	63	2 (3.2)	34 (54.0)	18 (28.6)	9 (14.3)
PHC	93	14 (15.1)	48 (51.6)	20 (21.5)	11 (11.8)

Positive HBV-M means that the sample was positive to HBsAg or HBV DNA and Negative HBV-M means that the sample was negative to both HBsAg and HBV DNA

2.3 HBV 标志在不同人群中的检出

本组 182 例 CLD 中，有 162 例做过 HBV 血清五项免疫学标志检查，其中 HBsAg 等一项以上标志阳性者 111 例，将这些病例视作存在 HBV 感染。为了明确隐匿性及不确定的 HBV 感染，便于进一步了解 HCV 和 HBV 单独和双重感染情况，对 51 例 HBsAg 阴性和 20 例未作 HBV 五项标志检查的 CLD 及 35 例献血员作了 HBV DNA 测定。在此 71 例 CLD 中，PHC 和 LC 占 66 例，单项抗-HBs 阳性占 7 例，五项标志全阴性占 37 例。结果，HBV DNA 在此 71 例 CLD 中共检出 32 例，35 例献血员中检出 1 例。结合 HBsAg 和 HBV DNA 测定，本组 217 例中有 68 例 PHC（73.1%）、52 例 LC（82.5%）、23 例 CH（88.5%）和 1 例献血员（2.9%）存在 HBV 感染，见附表。

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

3 讨论

国外流行病学调查、临床随访和实验研究均一致提示，丙型肝炎不仅与肝癌的发生密切相关，而且是发达国家中肝癌、肝硬化和慢性肝炎的主要病因[1]。我国血清抗-HCV 的调查也表明 HCV 感染与我国肝癌和肝硬化的发生有关。北京地区报告抗-HCV 在肝癌、肝硬化和慢性肝炎中的检出率分别高达 38.5%、42.6%和 10.5%～12.1%[2]。但由于抗-HCV 的存在不能直接反映有无病毒血症，而且试剂敏感性和特异性差异较大，以致难以确切说明 HCV 感染与我国肝癌的关系。因此，本文应用 PCR 方法对重庆地区不同人群血清 HCV RNA 和 HBV DNA 的存在状况进行了调查。

根据本文资料，HCV 在肝癌、肝硬化、慢性肝炎及献血员中的感染率分别为 36.6%、31.7%、15.4%和 2.9%。值得注意的是，这些人群中分别有15.1%、3.2%、3.8%和 2.9%表现为单独HCV感染，21.5%、28.6%、11.5%和 0%表现为 HCV 与 HBV 双重感染。这些资料表明，重庆地区的肝癌、肝硬化和慢性肝炎，虽以 HBV 感染占多数，但 HCV 感染也占相当的比重，这种感染多以与 HBV 双重感染的形式存在。同时也提示确有约 15%肝癌的发生可能与单独 HCV 感染有关。

由于巢式 PCR 测定 HCV RNA 较抗-HCV 敏感和特异，故本资料基本上能反映重庆地区不同慢性肝病及献血员中的 HCV 感染状况。值得指出，不同 HCV 株基因序列变异较多，日本毒株与我国毒株序列较接近，由于目前尚未弄清中国毒株保守区的序列，国内均采用日本毒株序列的引物进行检测。应用此组根据日本毒株保守区序列设计的引物检测，HCV RNA 的阳性率在输血后丙型肝炎只有 76%[6]。故上述慢性肝病中 HCV 的实际感染率可能高于本文结果。可以推测，随着乙型肝炎防治水平的不断提高，今后乙型肝炎的发病率将会趋于下降，而丙型肝炎的相对患病率则可能会上升。因此，丙型肝炎与肝癌的关系及其防治研究值得引起重视。

参考文献

1. 杨建民 刘为纹。丙型病毒肝炎与肝细胞癌。国外医学：消化系疾病分册，1992；12(1)：34
2. 北京医科大学肝病研究所，日本红十字中央血液中心，北京医科大学血液病研究所，等。北京地区不同人群血清抗-HCV 研究。中华医学杂志，1992；72(1)：18
3. Garson JA，Tedder RS，Briggs M，et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. Lancet，1990；335(8703)：1419
4. McFarlane IG，Smith HM，Johnson PJ，et al. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis：Pathogenetic factor or false-positive result? Lancet，1990；335(8692)：754
5. 杨建民 刘为纹 罗元辉。逆转录-聚合酶链反应同步法检测血清 HCV RNA 方法的建立与应用。第三军医大学学报，1992；14(3)：278
6. 周 荣 梁炽森 骆抗先。聚合酶链反应对输血后丙型肝炎的诊断研究。第一军医大学学报，1991；11(3)：181
7. Kwok S，Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. Nature，1989；339(6221)：237

(收稿：1992-07-15；修回：1992-10-16)

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

The relationship between hepatitis C virus infection and primary hepatic carcinoma: An investigation on serum HCV RNA in different populations

Yang Jianmin, Liu Weiwen, Jin Huayuan (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract A preliminary investigation on the serum HCV RNA in 182 patients with different chronic liver diseases and 35 blood donors was performed with "nested" polymerase chair reaction. The findings were as follows: ① Serum HCV RNA was detected in 36.6% (34/93) cases of primary hepatic carcinoma (PHC), 31.7% (20/63) cases of liver cirrhosis (LC), 15.4% (4/26) cases of chronic hepatitis (CH) and 2.9% (1/35) blood donors. ② Most of the HCV RNA positive cases were accompanied with positive serum HBsAg/HBV DNA. 15.1% (14/93) of PHC, 3.2% (2/63) of LC and 3.8% (1/26) of CH was positive only for HCV RNA. The findings suggest that about 20% of PHC are related to the coinfection of HCV and HBV, while 15% of PHC are related to HCV infection only.

Key words hepatitis, viral, human; hepatitis B virus; hepatoma; polymerase chain reaction

个案与短篇

胰头癌合并十二指肠不转位 2 例

孙文兵 何振平 李云山* 何 云* (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

例 1 男,46 岁。主诉:上腹部胀痛 3 月余,皮肤、巩膜黄染 2 月余。发育正常无畸形。B 超及 CT 均提示胰头占位,胆道一致性扩张。手术探查证实为胰头癌晚期合并十二指肠不转位。行胆囊空肠袢式内引流术,术后恢复顺利,出院。

例 2 男,54 岁。主诉:间歇性右上腹痛 8 月余,皮肤、巩膜进行性黄染 2 月余。发育正常无畸形。B 超及 CT 提示胰头占位,胆道一致性扩张。手术探查证实为胰头癌晚期合并十二指肠不转位。行胆总管空肠袢式内引流术,术后恢复顺利,出院。

讨论

十二指肠不转位是一种少见的先天性十二指肠形态变异,因其往往不伴有病理生理改变,较少引起人们的重视。复习我科 15 年来 82 例胰头癌病例资料,未见有合并十二指肠不转位的记载,本组 2 例病人系我科一月之内所收治,从此情况看,两者合并率可能比记载的要高,两者之合并率尚需进一步临床观察。

胰头癌和十二指肠不转位的内在联系未见有报道,胰头和十二指肠在胚胎发育上关系密切,胰头癌常常合并十二指肠不转位对于胰头癌发生学的遗传因素是一个较好的佐证[1],有待进一步探索。

关键词 胰腺肿瘤;十二指肠疾病

参考文献

1. Berlin NI, Walter, Hall E, et al. Pancreatic cancer: An epidemiologic approach and model. JAMA, 1981; 245(2): 171

(收稿:1992-06-06;修回:1992-10-15)

* 进修生

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