

• 论 著 •

HCV RNA 含量与肝脏组织病理学损伤之间的关系

谭龙益^{1*}, 张莉², 王皓¹, 何金¹, 陈洁¹, 胡海清¹, 侯晓菁¹, 何洁兰¹, 袁媛¹, 冀俊峰¹

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 长征医院药材料科)

[摘要] **目的:**探讨丙型肝炎病毒感染患者血清 HCV RNA 含量和 ALT 浓度与肝脏组织病理学损伤之间的关系。**方法:**应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术检测 681 例 HCV 感染患者血清 HCV RNA, 电化学发光分析技术检测 HBsAg, ELISA 检测抗 HAV IgM、抗 HCV IgG 和抗 HEV IgM, Bayer 全自动生化分析仪检测 ALT 浓度。H-E 染色, 光学显微镜观察组织病理损伤程度。**结果:**681 例血清标本中, HCV RNA 和抗 HCV 抗体均阳性和均阴性者分别是 150 例和 420 例, HCV 抗体阴性而 HCV RNA 阳性 40 例, HCV RNA 阴性而 HCV 抗体阳性 71 例。在排除了甲型、乙型和戊型肝炎病毒感染后, 190 例 HCV RNA 阳性患者中, 36 例患者在 HCV RNA 检测前后 7 d 内, 曾进行过肝脏组织病理学检测, 轻度、中度和重度肝脏病理学损伤患者血清中, HCV RNA 浓度及 ALT 浓度相差均不显著。**结论:**血清学标志物和病毒核酸都是监测 HCV 感染的重要指标。HCV RNA 浓度、血清 ALT 浓度与肝脏病理损伤相关性不显著, HCV RNA 水平不能反映肝脏病理损伤程度。

[关键词] HCV RNA; 丙氨酸氨基转移酶; 病理学

[中图分类号] R 575.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1307-03

Correlation between HCV RNA titer and severity of hepatic damage

TAN Long-Yi^{1*}, ZHANG Li², WANG Hao¹, HE Jin¹, CHEN Jie¹, HU Hai-Qing¹, HOU Xiao-Qing¹, HE Jie-Lan¹, YUAN Yuan¹, JI Jun-Feng¹ (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Medicinal Materials, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate whether HCV RNA levels can be used as a predictors for hepatocellular injury in patients with chronic hepatitis C, and whether aminotransferase levels can serve as a marker for liver damage. **Methods:** HCV RNA titers were determined by reverse transcription and TaqMan real time polymerase chain reaction; HBsAg was determined by electrochemiluminescence immunoassay. Anti-HAV IgM, Anti-HCV IgG and Anti-HEV IgM were detected by ELISA; ALT levels were detected by enzymatic kinetic assay. The liver damage was observed under light microscope and quantified using the histology activity. **Results:** Of 681 serum 150 were both positive of HCV RNA and Anti-HCV IgG, 420 were both negative, 40 were only HCV RNA antibody positive, and 71 were only Anti-HCV IgG positive. Thirty-six liver biopsies of 190 HCV RNA positive patients had no marker of HAV, HBV and HEV infection being detected. No significant correlation was noted between liver damage and HCV RNA titer ($\gamma=0.15$ $P=0.22$) and ALT level ($\gamma=0.09$ $P=0.12$). **Conclusion:** There is no significant correlation between severity of hepatic injury, HCV RNA and serum ALT level. Hepatic histological evaluation is always required for clinical assessment of patients with chronic hepatitis C.

[KEY WORDS] HCV RNA; alanine transaminase; pathology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1307-1309]

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染严重影响人类健康, 是人类慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌发生的重要病因^[1]。抗 HCV 和 HCV RNA 的定性和定量检测已经成为 HCV 感染诊断和疗效监测的主要依据^[2], 但血清 HCV RNA 水平与肝细胞损伤的主要指标如丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量以及肝脏组织病理变化之间的关系尚不清楚^[3,4], 本研究主要探讨这三者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源 1999 年 5 月至 2004 年 2 月长征医院住院及门诊患者, 无甲、乙、戊型肝炎病毒感染

指标者, 且无肝脏肿瘤、无非特异性免疫原性肝病等。无菌采集外周静脉血 3 ml, 分离血清, 立即检测或 -70℃ 储存备用。肝脏活检标本: 对同期 HCV RNA 或(和)抗 HCV 检测阳性患者的肝脏活检标本进行回顾性研究。

1.2 HCV RNA 定量分析 反转录和 TaqMan 实时定量多聚酶链反应(RT-TaqMan PCR)检测 HCV RNA 含量, HCV 核酸扩增(PCR)荧光检测试

[基金项目] 国家自然科学基金(30471542)。

[作者简介] 谭龙益(1957-), 男(汉族), 博士, 副教授。

*Corresponding author. E-mail: tanlongyi@sohu.com

试剂盒由中山医科大学达安基因股份有限公司提供。GeneAmp 5700 序列测定系统(美国 ABI 公司生产),按操作说明书进行。将扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色,凝胶成像系统处理。

1.3 血清 ALT 检测 BayerADVIA1650 全自动生化分析仪(酶法)检测 ALT,ALT 检测试剂盒由 Bayer 公司提供。

1.4 肝炎病毒感染血清学标志物检测 HBsAg 的测定:电化学发光免疫测定法(ECL)检测 HBsAg,电化学发光分析仪 Elecsys 2010 和 Elecsys HBsAg 检测试剂盒均由 Roche 公司提供。ELISA 检测抗 HAV IgM、抗 HCV IgG 和抗 HEV IgM,甲型肝炎病毒 IgM 抗体诊断试剂盒由上海科华实业生物工程有限公司生产,丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)、戊肝病毒抗体(IgM)酶联免疫测定试剂盒均由华美生物工程有限公司提供。本研究所有阴性对照、阳性对照由试剂生产厂家提供,室内质量控制由上海市临床检验中心提供,所有结果均符合实验要求。

1.5 组织病理学检测 甲醛固定、石蜡包埋,H-E 染色,光学显微镜观察,按 1995 年中华肝病学会确定的慢性病毒性肝炎病理学诊断标准分为轻、中和重度肝炎。

1.6 统计学处理 应用 Spearman rank-order 相关系数分析组织损伤程度和血清 HCV RNA 浓度、ALT 水平的相关性。

2 结果

2.1 HCV RNA 产物扩增结果 将扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色,结果如图 1,扩增产物长度与预期结果一致。

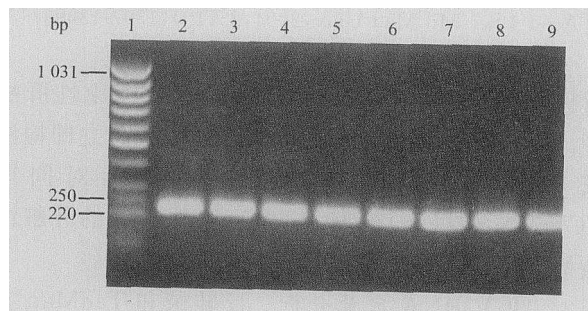


图 1 HCV RNA 扩增产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of HCV RNA amplification product

1:Generuler™ 50 bp DNA ladder;

2-9:HCV RNA amplification product,230 bp

2.2 HCV RNA 与 ELISA 检测 HCV 抗体之间在诊断 HCV 感染中的一致性 应用 TaqMan 实时荧

光定量 PCR 和 ELISA 分别检测 681 例血清标本测定 HCV RNA 和抗 HCV 抗体,两个指标均阳性和均阴性者分别是 150 例和 420 例,HCV 抗体阴性而 HCV RNA 阳性 40 例,HCV RNA 阴性而 HCV 抗体阳性 71 例。两种方法分别检测患者血清中 HCV RNA 和抗 HCV 诊断 HCV 感染符合率达 83.2%(570/681)。

2.3 血清 HCV RNA 浓度与肝脏炎症损伤之间的关系 在排除了甲型、乙型和戊型肝炎病毒感染和其他非感染性肝病后,190 例 HCV RNA 阳性患者中,36 例患者在 HCV RNA 检测前后 7 d 内,曾进行过肝脏组织病理学检测,肝脏损伤程度与血清 HCV RNA 浓度关系见表 1。轻度、中度和重度肝脏病理学损伤患者血清中 HCV RNA 浓度无显著差异($P=0.22$)。

表 1 血清 HCV RNA 浓度、ALT 浓度与肝脏组织病理损伤的相关性

Tab 1 Correlation between HCV RNA titer and degree of hepatic injury

(x±s)			
Degree of injury	n	HCV RNA (copy/ml)	ALT (μg/U·L ⁻¹)
Slight	15	1 992 310±5 889 152	107±244
Moderate	14	2 003 409±3 671 327	118±222
Severe	7	2 645 613±10 194 228	137±241

2.4 血清 ALT 浓度与肝脏病理损伤的相关性

血清 ALT 浓度与肝脏病理学损伤程度之间的关系见表 1,患者肝脏损伤程度与血清中 ALT 浓度无显著相关性($P=0.12$)。

2.5 血清 HCV 感染对患者血清 ALT 浓度的影响 190 例 HCV RNA 阳性患者和 491 例 HCV RNA 阴性患者血清 ALT 浓度分别为(74.1±189.2)和(98.5±178.2) U/L。HCV RNA 阳性患者血清 ALT 显著高于 HCV RNA 阴性者($P<0.05$)。

2.6 血清 HCV RNA 含量与 ALT 浓度的相关性 190 例 HCV RNA 阳性患者血清 HCV RNA 含量与 ALT 浓度弱相关($r=0.214,P<0.05$),当把 HCV RNA 阳性组区分为免疫抑制组(接受肾透析或肾移植患者)和其他患者组时,免疫抑制组($n=124$)中 HCV RNA 水平与 ALT 浓度相关性极弱($r=0.102,P<0.05$),而其他患者组($n=66$)中,血清 HCV RNA 浓度与 ALT 水平显著相关($r=0.412,P<0.01$)。

3 讨论

本研究分别应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测患者血清 HCV RNA 和应用 ELISA 检测抗 HCV,结果显示两种诊断方法的一致性达 89.7%。但有 71 例患者抗 HCV 阳性,但 HCV RNA 阴性,其可能原因包括^[1,2]:(1)慢性 HCV 感染时,血清中 HCV RNA 波动,低于检测下限时;(2)急性 HCV 感染的恢复期,HCV 复制停止,HCV RNA 消失,但抗 HCV 持续存在;(3)患者接受抗病毒免疫,HCV 复制受限;(4)抗 HCV 假阳性;(5)患者血清中存在 PCR 抑制剂或低于检测下降而造成假阴性。另一方面,在 HCV RNA 阳性患者中,有 40 例患者血清中未能检测到抗 HCV,其可能原因是:(1)虽然抗 HCV 试剂盒历经几代的更新,使抗 HCV 的检测窗口期由急性感染后的 16 周减少至目前第 3 代试剂盒的 7~8 周,而 RT-PCR 可使 HCV RNA 检测时间减少至急性感染后 10 d 以内,使检测窗口期大大缩短。(2)部分患者由于免疫抑制或免疫缺陷,即使有大量病毒复制,机体无法产生足以被检测的抗 HCV;(3)由于检测方法并不绝对准确,可能存在抗 HCV 假阳性或 HCV RNA 假阴性。以上资料提示,在 HCV 感染诊断过程中,免疫学血清学方法对不同指标进行定性或定量分析能够相互补充,缺一不可。

一般认为,血清中 ALT 含量高,HCV RNA 水平高,说明病毒在肝脏中大量复制,可能有持续肝脏损伤危险^[3~11]。ALT 作为肝脏组织学损伤程度的标志,已经作为临床抗病毒疗效判定指标。但最近已经有许多有关血清 ALT 和 HCV RNA 浓度与肝脏组织学损伤程度之间关系相互矛盾的报道^[8~10]。本研究对这三者之间的关系进行了研究。结果显示,血清 HCV RNA、ALT 浓度与肝脏病理损伤相关性不显著。部分患者血清 RNA 含量高,但肝脏组织损伤仅呈轻度或中度损伤。但也有个别 HCV RNA 很低,但确出现严重的肝脏组织损伤。非免疫抑制组患者血清 HCV RNA 浓度与 ALT 相关,但接受免疫抑制治疗的肾透析或接受肾移植患者,HCV RNA 浓度与 ALT 不相关,提示 HCV 对肝脏的损伤可能是由于免疫应答所造成,免疫应答反应在 HCV 感染的发病机制具有重要作用。

有关血清 HCV RNA 含量与肝脏病理损伤程度之间的关系的报道,其结果不一致,可能原因^[9~11]包括:第一,各实验室所使用的 HCV RNA 测定技术不同,个别技术线性范围小,对高拷贝和很低浓度的

HCV RNA 定量困难,本研究使用的 TaqMan 实时荧光定量 PCR,线性范围较广,特异性和敏感度都较高,有作者甚至建议作 HCV RNA 检测的“金标准”,使 HCV 检测标准化。第二,血清 HCV RNA 浓度易受到多种因素的影响,很不稳定,不能确切反应肝脏组织损伤程度。第三,HCV 主要在肝脏中复制,但也能在肝外复制,所血清中出现的高拷贝 HCV RNA,并不意味着就有大量病毒在肝脏中复制或肝脏损伤就越严重。第四,也可能由于肝脏活检、血清 ALT 和 HCV RNA 测定之间有一个时间差。

参考文献

- [1] Tamim H, Irani-Hakime N, Aoun JP, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus (HCV) infection among blood donors: a hospital-based study[J]. *Transfus Apheresis Sci*, 2001, 24(1): 29-35.
- [2] Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy[J]. *J Clin Virol*, 2001, 21(3): 271-281.
- [3] Ribeiro RM, Layden-Aicher J, Powers KA, et al. Dynamics of alanine aminotransferase during hepatitis C virus treatment[J]. *Hepatology*, 2002, 38(2): 509-517.
- [4] Silva JS, Ferraz ML, Perez RM, et al. Role of gamma-glutamyl transferase activity in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(3): 314-318.
- [5] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [6] da Silva Cardoso M, Koerner K, Epple S, et al. Prevalence of HCV-RNA-positive blood donors and correlation to ELISA and RIBA status[J]. *Ann Hematol*, 1993, 66(3): 147-151.
- [7] Lee YS, Yoon SK, Chung ES, et al. The relationship of histologic activity to serum ALT, HCV genotype and HCV RNA titers in chronic hepatitis C[J]. *J Korean Med Sci*, 2001, 16(5): 585-591.
- [8] Brouwer JT, Hansen BE, Niesters HG, et al. Early prediction of response in interferon monotherapy and in interferon-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C: HCV RNA at 4 weeks versus ALT[J]. *J Hepatol*, 1999, 30(2): 192-198.
- [9] Miller ER, Hiller JE, Shaw DR. Quality of life in HCV-infection; lack of association with ALT levels[J]. *Aust N Z J Public Health*, 2001, 25(4): 355-361.
- [10] McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL, et al. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C[J]. *Am J Gastroenterol*, 1996, 91(8): 1516-1522.
- [11] Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, et al. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C[J]. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(8): 1677-1683.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-10-15

[本文编辑] 曹 静