

慢性乙型肝炎患者的 HCV 重叠感染*

吕 凌 姚集鲁 彭文伟 高志良 黄仰苏

(附属第三医院传染科)

提 要 研究45例慢性乙型肝炎患者的 HCV 重叠感染。病例均为后发抗 HCV 阳性的慢性 HBsAg 携带者,无先抗 HCV 阳性而后 HBsAg 阳性的个案,这可能反映 HBV 和 HCV 两种病毒感染先后次序、不同传播方式及 HBV 对 HCV 易感性的增进作用。用 RT-PCR 检出 30/45 例血浆 HCV RNA 阳性,不仅确证 HCV 重叠感染诊断,还证实 HCV 复制及传染性。23/30 例 HCV RNA 阳性者有输血史,提示输血是其获得 HCV 重叠感染的主要途径。用 PCR 检出 25/45 例血清 HBV DNA 阳性,其中抗 HBe 阳性者的 HBV DNA 检出率为 42.9% (12/18),明显低于 ($P < 0.001$) 我们前文报道,提示重叠 HCV 感染对 HBV 复制有抑制作用。此外有 9 例抗 HBe 阳性者,其 HBV DNA 阴性但 HCV RNA 阳性,反映 HCV 可能已取代 HBV 成为致肝损害的主要病因。

关键词 乙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒;脱氧核糖核酸;核糖核酸;多聚酶链反应;逆转录

中图分类号 R512.62; Q523.1

丙型肝炎病毒 (HCV) 是一种正链极性的单股 RNA 嗜肝病毒,同乙型肝炎病毒 (HBV) 一样,其感染的特点是容易慢性化、容易发展为肝硬化并与肝细胞性肝癌发生密切相关^[1]。

HBV 和 HCV 可以重叠感染。慢性 HBsAg 阳性肝病中抗 HCV 阳性率为 10%~30%,随着慢性肝病的进展,抗 HCV 阳性率逐步升高^[2-3]。HBV 和 HCV 重叠感染可能具协同致病作用^[4]。临床上为数不少的慢性乙肝病人会转变为抗 HCV 阳性,作者在开展抗 HCV 常规检测后,已发现了一些这类病人。本文应用多聚酶链反应 (PCR) 技术对其中的 45 例病人进行了血清 HBV DNA 和血浆 HCV RNA 检测,兹报告如下。

材 料 与 方 法

研究对象 为本科住院或门诊就医的 45 例 HBsAg 阳性慢性肝病病人,病程中常规检测抗 HCV 转阳,抗 HAV (甲型肝炎病毒) IgM、HDV (丁型肝炎病毒)、HEV (戊型肝炎病毒) 标记阴性。平均年龄 40.6 ± 12.5 岁,男女

比为 14:1。每例无菌取新鲜血浆和血清各作检测。阴性对照为 33 例血清 HBsAg 阳性、抗 HCV 阴性和 HCV RNA 阴性的慢性肝病病人。

HBV 血清标记物 HBsAg、抗 HBs、抗 HBe 用北京生化免疫试剂中心的 RIA 试剂盒检测、HBeAg 和抗 HBe 用本室研制的国家试剂评定合格的单克隆 ELISA 试剂盒检测。

血清抗 HCV 用上海科华公司的合成肽抗原检测抗 HCV 的 ELISA 试剂盒检测。待测样本 OD 值/阳性对照截止值 > 5 才确立为本实验的研究对象。

HCV RNA 的 RT-PCR (逆转录-多聚酶链反应) 检测 同文^[5]。

HBV DNA 的 PCR 扩增 同文^[6]。引物为文^[7]中的 C₁ 和 C₂, 5' 末端标有 ³²P 的探针序列为 C₃。

实 验 结 果

1. HCV 的 PCR 产物鉴定 8 例后发抗 HCV 阳性的慢性 HBV 感染者,其血浆 HCV RNA 的 RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后在 EB/UV 下观察,结果如图 1 所示,7 例

* 为 1992 年广东省科委重点基金资助

为阳性, 阳性带都为单一的核酸带, 分子量大小一致, 与123bp的DNA分子量标准参比, 位于492bp和369bp之间, 同引物对设计时计算的产物大小458bp大小一致。转印至尼龙膜后与5'末端标有³²P的HCV特异寡聚核苷酸探针杂交, 结果如图2所示, 图1中的阳性者在图2中亦全部阳性, 证实该PCR产物确为HCV特异序列。相反, 同步电泳的阴性对照在图1和图2中均呈阴性, 且无非特异扩增带, 所有33例阴性对照病例的检测结果均如此。

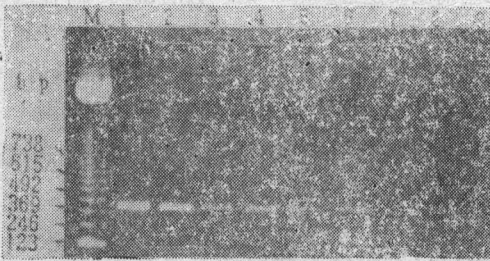


图1 HCV之PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果
M: 123 bp的DNA分子量标准。1~8: 8例后发抗HCV阳性的慢性HBV感染者。9: 阴性对照者

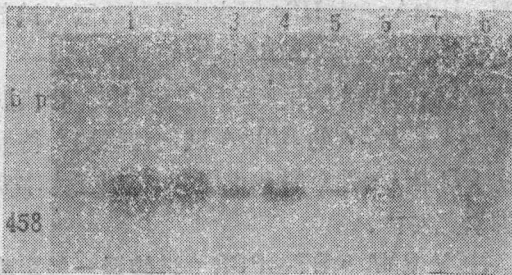


图2 HCV之PCR产物的Southern杂交结果

2. HBV的PCV产物鉴定 上述同样的8例病人, 其血清HBV DNA的PCR扩增产物经电泳后观察, 结果如图3所示, 也有7例出现阳性带, 但阳性病例与HCV RNA阳性者不全然相同。阳性带也是单一的核酸带, 分子量大小一致, 与123bp的DNA分子量标准参比, 位于738bp和615bp之间, 同引物设计时与5'末端标有³²P的HBV特异序列C₃探针

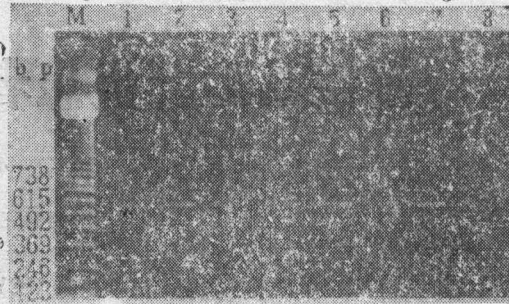


图3 HBV之PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果
M: 123bp的DNA分子量标准。1~8: 同图2

计算的产物大小664bp一致。经转印至尼龙膜杂交, 结果如图4所示, 与图3完全一致, 证实该PCR产物确为HBV特异序列。相反, 同步电泳的阴性对照在图3和图4中均阴性, 并无非特异扩增带。

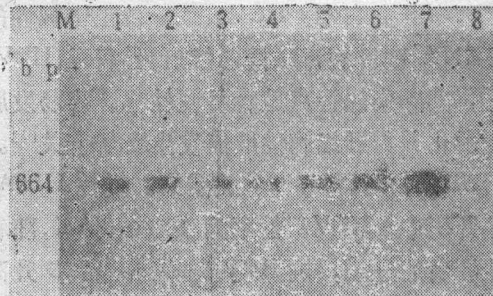


图4 HBV之PCR产物的Southern杂交结果

3. HCV RNA检测结果 如表1所示。可见45例抗HCV阳性的慢性HBV感染者, 检出HCV RNA阳性者30例, 阳性率为66.7%。阳性者中有输血史者9例, 占30.0% (9/30), 有输血浆史者14例, 占46.7% (14/30), 两者共23例, 占76.7% (23/30)。有输血史的9例HCV RNA阳性者, 3例是因支持治疗、3例是因肝硬化脾切除、2例是因上消化道大出血、1例是因胃癌根治术而输注鲜血。有输血浆史的14例HCV RNA阳性者, 除1例是因胃镜检查而予以输血浆外, 其余13例均是对低白蛋白血症的支持治疗而输注新鲜血浆多次。可见医源性因素对重叠HCV感染的作用。

4. HBV DNA检测结果 如表2所示。可

表1 血浆 HCV RNA 的阳性情况

诊 断	有输血史	无输血或		合 计
		有输血 浆 史	无输血或 血 浆 史	
CPH	1/1	2/2	1/3	4/6
CAH	2/2	8/9	2/5	12/16
肝硬化	5/7	4/7	4/5	13/19
慢重肝	1/1	0/1	0/2	1/4
合 计	9/11	14/19	7/15	30/45

表2 血清 HBV DNA PCR 检测结果

HBV 标记物	例数	HBV DNA HCV RNA		P*
		阳性(%)	阳性(%)	
HBeAg 阳性	6	6(100.)	4(66.7)	
抗 HBe 阳性	28	12(42.9)	16(57.1)	<0.001
e 系统阴性	11	7(63.6)	10(90.1)	
合 计	45	25(55.6)	30(66.7)	

* 与前文^[6]比较

叠HCV感染对HBV复制有抑制作用。

5. HCV RNA 同 HBV DNA 的关系 如

表3所示。可见45例病人,为两种病毒核酸均阳性者19例(42.2%)、均阴性者9例(20.2%)、只一种阳性者17例(37.8%)。显然有病毒复制受抑的可能。

见45例抗HCV阳性的慢性HBsAg携带者, HBeAg阳性6例全部检出HBV DNA, 抗HBe阳性28例只有12例检出HBV DNA, HBe系统阴性11例有7例检出HBV DNA。后两种情况的HBV DNA检出率低于前文^[6]结果,提示重

表3 HCV RNA 同 HBV DNA 的关系

诊 断	HCV RNA(+)		HCV RNA(-)		合 计
	HBV DNA(+)	HBV DNA(-)	HBV DNA(+)	HBV DNA(-)	
CPH	3	1	1	1	6
CAH	6	5	3	2	16
肝硬化	9	5	2	3	19
慢重肝	1	0	0	3	4
合 计	19	11	6	9	45

讨 论

近年来,分子病毒学的重要进展就是发现并阐明了HCV。HCV为一正链极性的单股RNA病毒,归黄病毒科丙型肝炎病毒属。HCV是90%的输血后非甲非乙型肝炎(PT-NANBH)和70%的散发型NANBH及大部分隐源性慢性肝病的病原^[1]。此外,不少HBV感染者也发现有HCV重叠感染。一般报道认为慢性HBV感染者抗HCV阳性率为10%,最高为30%^[2,3]。HBV与HCV重叠感染比单一病毒种感染更易引起严重肝损害^[4]。

PCR是一种体外高效扩增特定DNA的技术,几乎能扩增任何目的基因并能在普通实验室内进行,因此广被应用以检测各种病毒感

染。RT-PCR是将RNA逆转录为cDNA而后进行PCR扩增的方法,是检测HCV感染的最敏感手段^[8]。套式PCR是用内外两对引物分两步连续扩增某一基因的方法^[7],可用以提高HCV RNA的检出极限。

本文应用这种PCR技术检测45例对象,HCV RNA阳性30例,阳性率达66.7%,结果证实HCV重叠感染存在,还证实HCV复制和传染性。所测阳性病例中有输血或输血浆史者占76.7%(23/30),提示这是获得HCV重叠感染的主要途径。其中6例是因手术或大出血必须输血,余17例(73.9%)则不是非输不可,有医源性因素参予。鉴于HCV在被感染者血内浓度极低($10^2 \sim 10^3$ CID/ml),低于常规方法检测的敏感度极限^[1],不能用目前的献血员筛

选方法排除,国内还未实行抗HCV的强制检测以及PCR检测和抗HCV检测技术本身的局限,因此首先应严格掌握输血和输血浆的适应征,以减少输血后HCV感染。

本文45例对象皆为后发抗HCV阳性的慢性HBsAg携带者,未见先抗HCV阳性而后发HBsAg阳性的个案,反映HBV和HCV两种病毒感染的传播方式不同,HBV母婴传播占重要位置,感染者多在30岁以前即受感染;HCV则在感染前多有输血史;因此两者感染多先后有序。还反映慢性HBV感染致机体免疫失衡和抵抗力低下,从而对HCV易感性增高。HCV和HBV重叠感染后可能有协同致病作用,本文病例CPH只有6例,余39例(86.7%)皆属CAH、肝硬化或慢重肝,反映重叠感染比单一感染的肝损害更为严重^[4]。

前文报道用PCR检测单HBV感染者的血清HBV DNA,结果HBeAg阳性、抗HBe阳性和HBe系统阴性样本的HBV DNA检出率分别为97%、82%和83%^[6]。本文结果分别为100%、42.9%和63.6%,其中抗HBe阳性病例的HBV DNA检出率显著低于前文($P < 0.001$),提示重叠HCV感染后HBV复制受抑,这可能与丁型肝炎病毒(HDV)感染情况类似。HDV是缺损病毒,不能自身复制,HCV所知虽不全面,但突出之处是易有基因序列变异^[9],不能除外因此发生自身缺损的可能。

本文有16例抗HBe阳性、HBV DNA阴性的病例,其中9例(56.3%)可检出HCV RNA,提示在这些病例,HCV已取代HBV成为致肝损害的主要原因,这显然与Fattovich等人的观点^[10]一致。

参 考 文 献

1. Choo QL, et al. Hepatitis C virus: the

- major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990;46:423
2. Hess G, et al. Diagnosis of hepatitis C virus infection: diagnosis value of the anti-HCV test. *Z Gastroenterol* 1990;28:251
3. Chen DS, et al. Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease: the Taiwan experience. *J Infect Dis* 1990;162:817
4. Yuki N, et al. Expression of hepatitis B virus markers in chronic liver disease positive for antibody to hepatitis C virus. *Nippon-Shokakibyō-gakkai-Zasshi (in MEDLINE)* 1990;87:2466
5. 吕凌,等. 检测HCV RNA的RT-PCR技术改进与应用. *中山医科大学学报* 1993;14(3):75
6. 吕凌,等. 建立检测血清HBV DNA的多聚酶链反应技术. *中山医科大学学报* 1992;13(2):49
7. 卢红艳,等. Nested PCR检测血清HBV DNA技术的应用. *中山医科大学学报* 1992;13(2):53
8. Weiner AJ, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1
9. Houghton M, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14:381
10. Fattovich G, et al. Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1991;163:400
- (1992-11-21收稿 1993-04-05修回)

THE SUPERINFECTION OF HEPATITIS C VIRUS IN CHRONIC HEPATITIS B: A STUDY BY REVERSE TRANSCRIPTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Lu Ling Yao Jilu Peng Wenwei Gao Zhiliang Huang Yangsu

(Department of Infectious Diseases, the 3rd Affiliated Hospital)

The superinfection of HCV in chronic hepatitis B was studied. Forty-five chronic HBsAg carriers were found to be anti-HCV positive. No initially anti-HCV positive then HBsAg positive observed reflecting the time order of HBV and HCV infection, the difference of the transmission, possibly the promotion HBV exerts to HCV. By RT-PCR to detect plasma HCV RNA, 30/45 were positive that verified the HCV superinfection, replication and infectivity. Among the RNA positive, 23 have history of blood or plasma transfusion indicating the transfusion is the course acquiring HCV superinfection. By PCR to detect serum HBV DNA, 25/45 were positive, among them 6 were HBeAg positive, 12 anti-HBe positive and 7 HBeAg and anti-HBe negative. The positivity of HBV DNA in the anti-HBe positive was significantly less than that previously reported, which suggests that HCV superinfection possibly inhibits HBV replication. There were 9 anti-HBe carriers who were HBV DNA negative but HCV RNA positive, in them HCV possibly replaced HBV to be the main pathogen responsible for the liver damage.

Key words hepatitis B virus; hepatitis C virus; deoxyribonucleic acid; ribonucleic acid; polymerase chain reaction; reverse transcription