

庚型肝炎病毒在肝炎及肝癌患者中感染情况

窦亚玲¹ 芮静安¹ 李正谦² 徐素芬¹ 焦平¹
王少斌¹ 马秋燕¹ 李保护¹ 温凤仪¹ 徐道振²

摘要 为研究庚型肝炎病毒在乙型肝炎、丙型肝炎、非甲—戊型肝炎及原发性肝癌患者中的感染情况,选择临床肝炎患者血清及肝癌手术病人的术前血清、肝癌组织及癌旁组织。采用 HGV-RT-PCR 法检测标本中 HGV RNA。结果,在临床乙型肝炎、丙型肝炎、非甲—戊型肝炎及肝癌手术病人中庚型肝炎感染率分别为 9% (12/130)、10% (3/30)、17% (4/24)、0% (0/24)。证明庚型肝炎是普遍存在的一种肝炎病毒,并与乙型肝炎、丙型肝炎有较高的重叠感染率,而与肝癌的相关性不大。

关键词 庚型肝炎 原发性肝癌 RT-PCR 法

Infection of GBV-C Virus Among Hepatitis and HCC Patients Dou yaling^{*}, Rui Jingan, Li Zhengqian, et al. ^{*}Telecommunications General Hospital. The 8th Medical Clinic College, Beijing Medical University, 100032

Abstract To study the infection status of GBV-C virus among HBV, HCV, nonA-E and HCC patients serum of clinical hepatitis patients and HCC patients before operation and the composition in/ beside HCC were collected to examine HGV RNA of the samples using HGV RT-PCR method. Results showed that among the clinical patients with HBV, HCV, nonA-E and HCC, HGV infection rates were 9% (12/130), 10% (3/30), 17% (4/24), 0% (0/24) respectively, suggesting that HGV is a hepatitis virus with pervasive existence and has high superimposition infection rate with HBV and HCV but with little connection with HCC.

Key words Hepatitis G Primary hepatocellular carcinoma RT-PCR

HGV 是一种与人类肝炎相关的正链 RNA 病毒。自从 Simons 及 Linnen 相继报道了 GBV-C、HGV 的基因序列后,世界各地对此病毒的感染进行了广泛的研究。但由于各研究者所采取的研究方法、病例选取及研究地域不同,所得出的结论也有较大的差异。本研究选取了 184 例临床诊断病毒性肝炎患者血清及 24 例原发性肝癌手术病人术前血清及癌组织、癌旁组织,着重研究了 HGV RNA 在临床肝炎及肝癌患者中的感染情况。

材料及方法

一、病例选择:慢性肝炎患者选择北京地坛医院和邮电总医院的住院及门诊病人。肝癌病人选自邮电总医院肝外科手术病人。

HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HBcAb-IgM 采用美国 Abbott 公司 ELISA 试剂盒,抗 HCV 采用第三代美国 Abbott 公司 ELISA 试剂盒。

二、肝组织处理:手术切除的癌组织和癌旁组织,直接放入液氮罐中储存,分离好的血清于 -40℃ 冰柜中存放。

取 10~30mg 液氮冻存的肝癌组织及癌旁组织至研磨器中,加入 5 倍体积硫氰酸胍缓冲液(含 4mmol/L 硫氰酸胍; 0.1mmol/L

1 北京邮电总医院 北京医科大学第八临床医学院 100032

2 北京地坛医院

Triscl(pH7.5); 1%β- 巯基乙醇研磨至裂解液不再粘稠, 移入 1.5ml 离心管中。

加入十二烷基肌氨酸钠至终浓度为 0.5% 充分混匀 12 000 rpm 离心 10min, 上清液移入新的 1.5ml 离心管中。

用酚及酚氯仿提取一次, 异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗沉淀一次后室温凉干。然后同血清一样进行 RT-PCR 扩增。

三、引物设计及 RT-PCR 扩增条件: AMV 逆转录酶及 Taq 酶均为 Promega 公司产品。引物设计参考已发表的 HGV 序列 (GenBankV44402), 选择 NS5 区的高保守区段, 计算机辅助设计, 由赛百盛公司合成, 扩增产物为 200bp。

HGV RNA 提取参照文献^[1]的方法, 提取后的 RNA 直接溶于反转录-扩增缓冲液中, 加入 3^UAMV 逆转录酶及 1U Taq DNA 聚合酶, 42℃ 30min 逆转录成。DNA, 94℃ 4min 灭活 AMV 后直接进入第一次 PCR 扩增, 扩增条件为: 94℃30s, 55℃30s, 72℃30s。扩增 32 个循环后取第一次 PCR 扩增产物 2^μl 进行第二次 PCR 扩增, 最终 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

结 果

HGV RNA 阳性检出率: 乙肝为 9% (12/130)、丙肝为 10% (3/30)、非甲-戊型肝炎为 17% (4/24)。24 例肝癌患者术前血清及癌组织、癌周组织为 0% (0/24)。

讨 论

庚型肝炎病毒是 1995 年下半年 Simons JN^[2] 和 Lecry TP^[3] 两家实验室相继报告的一种新型与人类肝炎相关的 RNA 病毒基因。美国 Lecry TP^[4] 等报告, HGV 阳性率在慢性肝炎中 7.9%, 爆发性肝炎中 9.1%, 非甲-戊型急性肝炎中 8.7%, 肝细胞癌中 3.4%。Linnen J 等^[5] 研究表明, HGV 的感染分布较广泛, 乙肝中 HGV 阳性率为 9.72%, 丙肝阳性率为 18.75%, HGV 不但

与 HBV 和 HCV 重叠感染, 同时是非甲-戊型肝炎及多次输血者, 自身免疫性肝炎及血友病, 酒精性肝炎患者血清中也可检出 HGV RNA。在我国 HGV 与 HBV、HCV 重叠感染及在非甲-戊型肝炎中的感染率各家报告不一。关于 HGV 与肝癌组织及癌旁组织之间的相关性尚无满意报道。本实验 HGV 检出率乙肝为 9% (12/130), 丙肝为 10% (3/30)。非甲-戊型肝炎 17% (4/24); 24 例原发性肝癌病人术前血清及癌组织、癌旁组织 HGV RNA (-)。说明庚型肝炎病毒是普遍存在的一种肝炎病毒常与乙肝、丙肝重叠感染, 这可能 HGV 与 HBV、HCV 传播途径相似有关, 是非甲-戊型肝炎中病源之一。本实验显示 HCV、非甲-戊型肝炎中 HGV RNA 检出率与上述报告^[4~5] 有差异, 可能与感染人群的选择, 地域差别及所取的例数有关。24 例原发性肝癌病人 HGV 感染率为 0%, 提示 HGV 与肝细胞癌相关性不大, 可能在肝细胞癌中不是重要的致癌因子。本实验也显示原发性肝癌病人中 19/24 例 HBsAg (+), 2/24 例抗 HCV (+)。说明在我国肝癌仍主要与乙肝、丙肝病毒感染有关, 其中乙肝更为重要。

参 考 文 献

- 1 Chomezynskip suchin single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal biochem*, 1987, 162:156.
- 2 Simons JN, Lecry TP, Darrson GJ, et al. Isolation of novel Vims-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1995, 1:564.
- 3 Lecry TP, Muerhoff AS, Simons JN, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C A novel member of the flaviviridae associated with human nonA-E hepatitis. *J Ned Virol*, 1996, 48:60.
- 4 Lecry TP, Muerhoff AS, Simons JN, et al. Molecular diagnostic assays for the detection of GB virus infection. *J Ned Virol*, 1996, 48:23.
- 5 Linnen J, Wages J, Zhong-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion transmissible agent. *Science* 1996, 271:505.