

网络出版时间: 2018-6-22 17:52 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.030.html>

血小板参数在判断慢性丙型肝炎 RNA 水平中的价值

张 夏¹ 杜丹丹² 翟志敏³ 郭进京¹

摘要 以 78 例丙肝抗体阳性患者为研究对象,分析血小板计数(PLT),血小板分布宽度(PDW),平均血小板体积(MPV),血小板压积(PCT)及丙肝 RNA 载量。HCV-RNA 阳性组 PLT 和 PCT 减低,PDW 和 MPV 增高($P < 0.001$);RNA 阳性组中低 HCV-RNA 载量组有更高的 PLT 和 PCT,更低的 PDW 和 MPV ($P < 0.05$);HCV-RNA 的高低和各参数间相关性分析显示 HCV-RNA 载量和 MPV 呈正相关性($r = 0.306$, $P = 0.026$)和 PLT($r = 0.493$, $P < 0.001$),PCT($r = 0.444$, $P = 0.001$)呈负相关性,和 PDW 相关性分析无统计学意义($r = 0.258$, $P = 0.063$)。血小板参数能辅助判断丙肝病毒复制的严重程度。

关键词 丙型肝炎;血小板参数;病毒载量

中图分类号 R 512.6+3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1307-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.030

持续的丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起的丙型肝炎易导致肝脏纤维化,进而发展成肝硬化,约 20% 患者转化为肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。肝炎患者有较高的血小板减少的发生率,由于肝炎病毒感染和血小板的减少密切相关,美国血液学会免疫性血小板减少性紫癜诊疗指南推荐长期血小板减少的患者,应常规检测肝炎病毒^[2]。该研究旨在分析丙型肝炎患者 RNA 的载量和血小板相关参数的关系,为临床治疗方案的选择、病情疗效监测提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2014 年 1 月~2016 年 12 月阜阳市人民医院住院期间检测出丙肝抗体阳性并做丙肝 RNA 检测的患者 78 例。其中男 32 例,女 46 例,年龄 21~82 岁,中位年龄 54 岁,排除能引起三系减低的血液系统疾病及病例资料不完全

2018-04-25 接收

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20103420110001)

作者单位:¹ 阜阳市人民医院检验科,阜阳 236000

² 阜阳市第二人民医院心内科,阜阳 236000

³ 安徽医科大学第二附属医院血液内科,合肥 230601

作者简介:张 夏,女,副主任检验师,本科;

郭进京,男,副主任检验师,硕士,责任作者,E-mail:969521266@qq.com;

翟志敏,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:zzzm889@163.com

A low cost method of retrovirus infection in leukemic cells

Zhang Huijuan¹, Zhang Ling², Hu Rong¹, et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000;

²School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract To reduce experimental cost and solve the problem for hard to transfect vectors in suspension cells, this study takes an experiment for packaging retrovirus and infecting suspension cells such as leukemic cells. The retroviral vectors MSCV-PIG, Gag-pol and VSVG were transfected into 293T cells by calcium phosphate transfection method. Then, the unconcentrated viral liquids were incubated with KG-1a leukemic cells by centrifugation. At last, puromycin was used to screen stable cell lines. Infection of KG-1a cells with retrovirus stock solution for 48 h, the efficiency of infection was about 10%. However, the percentage of KG-1a cells which successfully infected by retrovirus was more than 85% after puromycin screening. The retrovirus is packaged by the low-cost calcium phosphate transfection method and the hard-to-transfected leukemic cells are successfully infected by unconcentrated viral liquids, which offers reference to fundamental researchers.

Key words leukemic cells; retroviral vector; calcium phosphate transfection method

表1 HCV-RNA 阴性组和 HCV-RNA 阳性组各血小板参数的比较

参数	HCV-RNA 阴性(n=25)	HCV-RNA 阳性(n=53)	t 值	P 值
年龄(岁)	51.28 ± 13.79	56.96 ± 12.19	1.842	0.069
PLT(×10 ⁹)	235.28 ± 130.74	130.74 ± 56.19	7.430	<0.001
PDW(%)	15.87 ± 0.27	16.34 ± 0.38	5.538	<0.001
MPV(fl)	9.03 ± 0.79	10.73 ± 1.31	5.98	<0.001
PCT(%)	0.21 ± 0.06	0.14 ± 0.06	5.203	<0.001

表2 低载量 HCV-RNA 组和高载量 HCV-RNA 组各血小板参数的比较

参数	低 HCV-RNA(n=29)	高 HCV-RNA(n=24)	t 值	P 值
年龄(岁)	56.90 ± 13.32	57.13 ± 10.20	0.069	0.945
PLT(×10 ⁹)	153.62 ± 55.27	103.08 ± 44.29	3.618	0.001
PDW(%)	16.24 ± 0.41	16.47 ± 0.31	2.263	0.028
MPV(fl)	10.41 ± 1.08	11.13 ± 1.48	2.039	0.047
PCT(%)	0.16 ± 0.05	0.11 ± 0.06	2.909	0.005

的患者。按照参考文献^[3] HCV-RNA 载量高低分为三组: <500 IU/ml 定义为 HCV-RNA 阴性组, 500 ~ 10⁵ IU/ml 定义为低载量组, ≥10⁵ IU/ml 为高载量组, 低载量组和高载量组定义为 HCV-RNA 阳性组。

1.2 试剂和仪器 血小板计数(platelet count, PLT), 血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW), 平均血小板体积(mean platelet volume, MPV) 及血小板压积(platelet volume, PCT) 由 BC-6800 血细胞分析仪测试, 仪器及配套试剂均购自中国深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; HCV-RNA 载量由 LineGene I 基因扩增仪检测, 其配套检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.3 方法 以乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂) 抗凝用于血小板参数检测, HCV-RNA 载量采用 RT-PCR 法, 严格按照实验室标准操作程序(SOP) 规范操作完成各参数测试。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验; 受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) 下面积判断血小板的各参数对 HCV-RNA 阴性的预测价值; 两变量相关性分析应用 Pearson 相关性分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV-RNA 阴性组和 HCV-RNA 阳性组血小板参数的比较 HCV-RNA 阴性组和 HCV-RNA 阳性组相比年龄差异无统计学意义, 有可比性。与 HCV-RNA 阴性组比较, HCV-RNA 阳性组 PLT 和 PCT 水平明显减低, PDW 和 MPV 水平明显增高(P < 0.01), 见表 1。

2.2 血小板的 PLT、PDW、MPV、PCT 参数判断 HCV-RNA 阴性情况 由于 PDW、MPV 和 HCV-RNA 阴性呈负相关性, 故在做 ROC 曲线时, 取其倒数。PLT 判断 HCV-RNA 阴性的 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC) 为 0.903(95% CI: 0.837 ~ 0.970, P < 0.001); PDW 判断 HCV-RNA 阴性的 ROC 曲线的 AUC 为 0.847(95% CI: 0.763 ~ 0.913, P < 0.001); MPV 判断 HCV-RNA 阴性的 ROC 曲线的 AUC 为 0.888(95% CI: 0.817 ~ 0.960, P < 0.001); PCT 判断 HCV-RNA 阴性的 ROC 曲线的 AUC 为 0.821(95% CI: 0.792 ~ 0.913, P < 0.001)。见图 1。

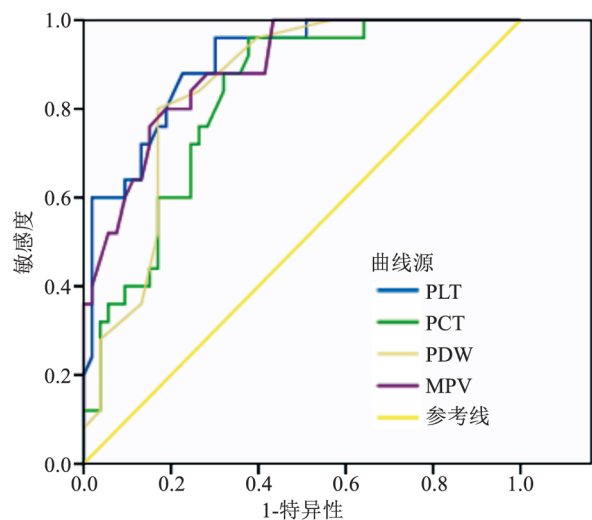


图1 PLT、PDW、MPV、PCT 判断 HCV-RNA 阴性的 ROC 曲线

2.3 HCV-RNA 阳性组中 HCV-RNA 低载量组和高载量组血小板的 PLT、PDW、MPV、PCT 参数的比较 低 HCV-RNA 载量组和高 HCV-

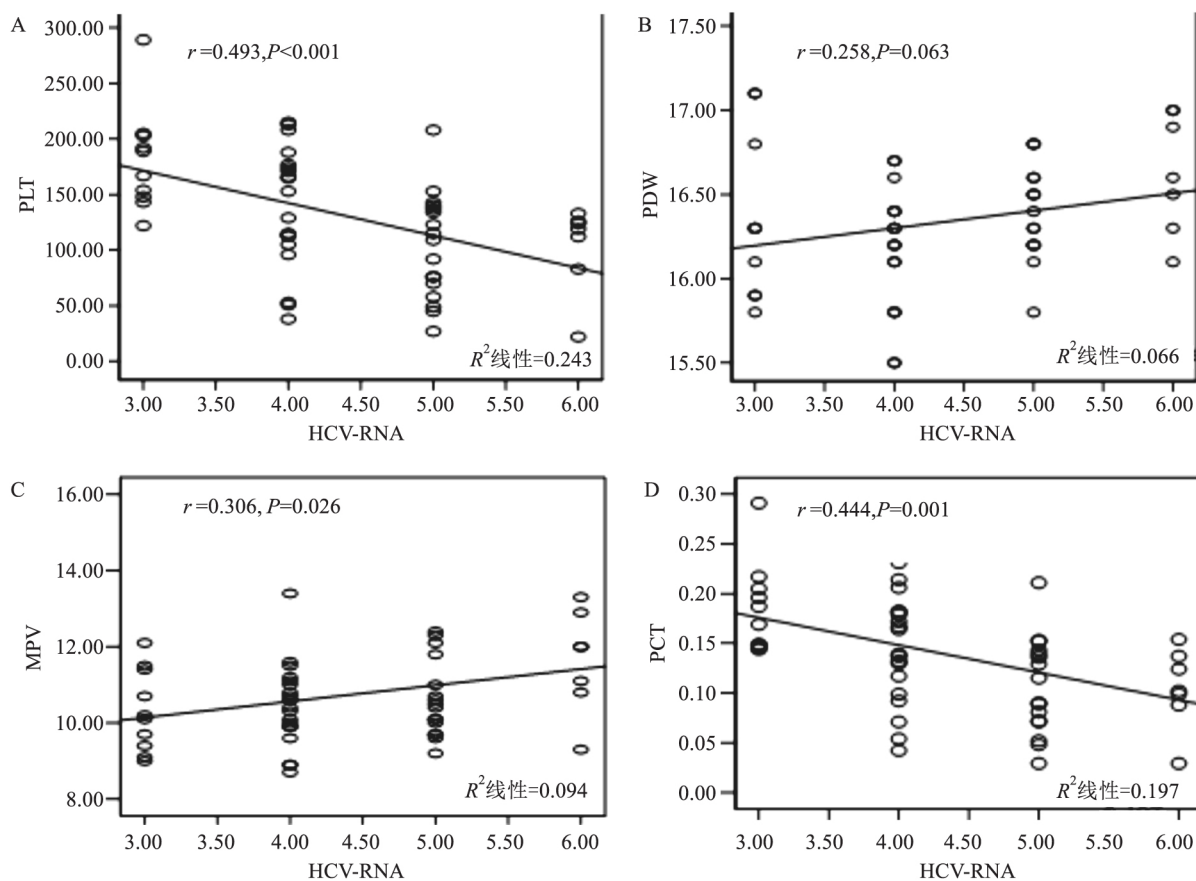


图2 PLT、PDW、MPV、PCT 和 HCV-RNA 载量的线性分析

A:PLT; B:PDW; C:MPV; D:PCT

RNA 载量组相比年龄差异无统计学意义,有可比性。与高 HCV-RNA 载量比较,低 HCV-RNA 载量组有着更高的 PLT 和 PCT 水平,差异有统计学意义($P = 0.001$, $P = 0.005$),同时低 HCV-RNA 载量组有着更低的 PDW 和 MPV 水平,差异有统计学意义($P = 0.028$, $P = 0.047$),见表 2。

2.4 HCV-RNA 载量和血小板的 PLT、PDW、MPV、PCT 参数相关性分析 以 HCV-RNA 载量科学计数法数量级为自变量,血小板的 PLT、PDW、MPV、PCT 参数分别为因变量,在 53 例 HCV-RNA 阳性的患者中,与 HCV-RNA 载量呈正相关且有统计学意义的参数为 MPV ($r = 0.306$, $P = 0.026$),呈负相关且有统计学意义的指标有:PLT ($r = 0.493$, $P < 0.001$)、PCT ($r = 0.444$, $P = 0.001$)。PDW 和 HCV-RNA 载量相关性分析无统计学意义 ($r = 0.258$, $P = 0.063$)。见图 2。

3 讨论

血小板是血细胞中最小的细胞,其大小数量及分布宽度与骨髓中巨核细胞的增生速度、代谢情况、

促血小板生成素等因素有关^[4]。血小板相关参数 PLT、PDW、MPV、PCT 可反应血小板的生成及功能状态。PDW 反应血小板体积大小的离散程度。MPV 即血小板平均体积,MPV 增大,提示血小板内致密颗粒增多,是巨核细胞增生及血小板活化的标志,可辅助鉴别血小板减低的原因及评估骨髓造血功能;其增高和骨髓受到抑制、血小板破坏过多、机体高代偿状态有关,与 PLT 呈负相关。PCT 可间接反应血小板活性物质及所含颗粒的多寡,与 PLT 呈正相关性^[5]。丙肝病毒感染除引起肝脏的损害,也能引起肝外组织的损伤^[6],肝炎患者有较高的血小板减低的发生率,研究^[7]表明 HCV 比 HBV 更易发生血小板的减低。其引起血小板减低的机制可能如下:HCV 感染可导致全身免疫系统的紊乱,产生自身抗体导致血小板的破坏^[8];慢性 HCV 感染患者往往伴有不同程度的脾功能亢进,尤其是发生肝硬化时,脾功能亢进时能分泌某些激素,影响骨髓的造血同时加速血细胞的破坏^[9];血小板生成素主要由肝细胞合成,HCV 感染所致的肝功能受损会导致血小板生成素水平的下降,进一步加速血小板的减少

和影响巨核细胞的分化^[10];此外,丙肝病毒对骨髓的抑制作用和血管内皮功能障碍也可导致血小板减少^[11]。

丙肝病毒感染主要依赖血清学抗体的检测,但由于“窗口期”使得抗体检测有一定的假阴性的可能,另一方面丙肝抗体阳性不代表病毒是否复制,而HCV-RNA的检测是诊断丙肝是否复制的有力证据,其载量的高低和肝功能的损伤程度有一定的相关性。本研究证明PLT和PCT水平的减低、PDW和MPV的增高在判断HCV-RNA是否阴性的ROC AUC均大于0.5,对HCV-RNA是否复制的判断有着积极的意义,同时本研究也证实上述4个参数在判断HCV-RNA载量的高低中也有一定的预测价值,与HCV-RNA载量的线性分析提示除PDW外,PLT、MPV、PCT水平均和HCV-RNA载量的高低相关。血小板参数是血常规中的常规检测项目,经济、简便、易得是其特点,在有些无分子生物学实验室的地方,血小板4个参数可作为辅助判断丙肝病毒复制和病毒载量高低。临床医师在抗病毒治疗的同时动态监测丙肝患者血小板水平及其参数能更有效的判断病毒复制的严重程度,及时为患者制定最佳的治疗方案,同时和HCV-RNA载量监测相互补充。

参考文献

[1] Polenakovik H. New therapies for hepatitis C virus [J]. Pril

(Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki) 2015, 36(2):119-32.
[2] Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The american society of hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia [J]. *Blood* 2011, 117(16):4190-207.
[3] 宋培新,李雷,陶月,等. 丙型肝炎病毒感染者病毒载量与血脂代谢指标的相关性分析 [J]. *实用临床医药杂志* 2015, 19(11):32-5.
[4] 肖明锋,刘基铎,吴培洁,等. 血小板参数在血小板减少性疾病中的应用 [J]. *国际检验医学杂志* 2013, 34(4):418-20.
[5] 于春晓,高胜海. 血小板参数和骨髓巨核细胞对血小板增多症鉴别诊断的价值 [J]. *中国当代医药* 2012, 19(12):71-2.
[6] Agnello V, De Rosa F G. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues [J]. *J Hepatol* 2004, 40(2):341-52.
[7] 王兆钺. 病毒性肝炎血小板减少的发病机制与治疗进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(7):667-9.
[8] Hamaia S, Li C, Allain J P. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines [J]. *Blood* 2001, 98(8):2293-300.
[9] 覃祖云. 病毒性肝炎肝硬化合并脾功能亢进的治疗研究进展 [J]. *医学理论与实践* 2016, 29(8):1009-10.
[10] Al-Qtaitat A, Al-Dalaen S, Mahgoub S, et al. Plasma thrombopoietin level in thrombocytopenic patients with or without liver cirrhosis chronically infected by the hepatitis C virus [J]. *Br J Med Res* 2015, 5(7):864-71.
[11] 史陇珍,肖萍,张立婷. 丙型肝炎后肝硬化失代偿期、脾功能亢进、血小板减少的治疗研究进展 [J]. *中国综合临床* 2017, 33(6):568-72.

The value of platelet parameters in determining the level of chronic hepatitis C RNA

Zhang Xia¹, Du Dandan², Zhai Zhimin³, et al

¹Dept of Laboratory Medicine, Fuyang People's Hospital, Fuyang 236000;

²Dept of Cardiology, The Second People's Hospital of Fuyang City, Fuyang 236000;

³Dept of Hematology, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract The blood platelet count (PLT), platelet distribution width (PDW), mean platelet volume (MPV), platelet volume (PCT) and hepatitis C RNA load were analyzed in 78 cases of hepatitis C antibody positive patients. Compared with HCV-RNA negative group, HCV-RNA positive group of PLT and PCT decreased significantly, PDW and MPV were significantly increased ($P < 0.001$); low HCV-RNA load group had higher PLT, PCT and lower PDW, MPV ($P < 0.05$); HCV-RNA load was positively correlated with MPV ($r = 0.306, P = 0.026$), and negatively correlated with PLT ($r = 0.493, P = 0.000$) and PCT ($r = 0.444, P = 0.001$), the correlation analysis between PDW and HCV-RNA was not statistically significant ($r = 0.258, P = 0.063$). Monitoring platelet parameters in patients with hepatitis c can help determine the severity of virus replication.

Key words hepatitis C; platelet parameters; viral load