

• 临床检验研究 •

药物治疗过程中乙型肝炎患者血清病毒外膜大蛋白与病毒核酸的检测分析

范公忍,熊锦华,王 帅,胡学玲

(中国人民解放军北京军区总医院肝病研究所,北京 100700)

摘要:目的 探讨阿德福韦酯(ADV)抗病毒治疗慢性乙型肝炎(CHB)过程中,患者血清中乙型肝炎病毒大蛋白(LHBs)和乙型肝炎病毒(HBV)DNA 载量的相关性及其临床意义,评价 LHBs 在 ADV 抗病毒治疗中的应用价值。方法 将 117 例 CHB 患者分为 HBeAg 阳性组 49 例,HBeAg 阴性组 68 例,分别给予 ADV 10 mg,口服,每日 1 次,治疗 96 周。采用 ELISA 法检测 LHBs 和 HBV 免疫标志物(HBV-M);采用实时荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA。结果 抗病毒治疗 24、48、72、96 周后 HBV DNA 和 LHBs 转阴率无明显差别($P>0.05$),LHBs 水平与 HBV DNA 拷贝数对数呈正相关($r=0.827$);LHBs A 值和 HBV DNA 拷贝数随抗病毒治疗时间的延长同步下降;在 HBeAg 阳性组 46 例中 HBV DNA、LHBs 转阳率分别为 58.7%(27/46)、54.3%(25/46),两者差异无统计学意义($P>0.05$);在 HBeAg 阴性组 68 例中 HBV DNA、LHBs 转阳率分别为 48.5%(32/66)、65.2%(43/66),两者差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 LHBs 是判断 HBV 体内复制的可靠指标,尤其对判断 HBeAg 阴性患者体内病毒复制及预后评价具有重要价值。

关键词:肝炎,乙型; 病毒复制; 乙肝病毒外膜大蛋白; 抗病毒治疗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1714-02

Analysis of serum LHBs and HBV DNA in patients with chronic hepatitis B and treated with adefovir dipivoxil

Fan Gongren, Xiong Jinhua, Wang Shuai, Hu Xueling

(Institute of Hepatology, the Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To explore the correlation and clinical significance of serum hepatitis B virus large envelope protein(LHBs) and HBV DNA copies in patients with chronic hepatitis B(CHB) treated by adefovir dipivoxil, and investigate the significance of LHBs in assessing the effect of antiviral therapy with adefovir dipivoxil. **Methods** 117 patients with CHB, including 49 patients positive HBeAg and 68 patients negative with HBeAg, all treated with adefovir dipivoxil 10 mg/d for 96 weeks, were enrolled. Serum LHBs and HBV-M were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and serum HBV DNA level was quantitatively detected by real-time polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** 24, 48, 72 and 96 weeks after treatment, the negative rate of HBV DNA was not significantly different with LHBs and the levels of serum LHBs were positively correlated with the levels of HBV DNA ($r=0.827$). Optical density value of LHBs and levels of HBV DNA decreased simultaneously with antiviral treatment. Positive rates of HBV DNA and LHBs were 58.7%(27/46) and 54.3%(25/46) in 46 patients positive with HBeAg, and 48.5%(32/66) and 65.2%(43/66) in 68 patients negative with HBeAg. **Conclusion** LHBs might be a reliable marker for estimate the replication of HBV in patients with hepatitis B, especially for the evaluation of viral replication and prognosis of patients negative with HBeAg.

Key words: hepatitis B; virus replication; HBV large envelope protein; antiviral therapy

阿德福韦酯(ADV)作为新一代抗乙型肝炎病毒(HBV)的核苷类似物,可明显抑制 HBV DNA 的复制,降低血清中 HBV DNA 水平,是目前治疗慢性乙型肝炎(CHB)效果较好的抗病毒药物之一。目前临床上用于判断 CHB 患者体内 HBV 复制情况的常用指标有 HBV DNA 和 HBeAg。近年研究发现由 S 基因编码合成的 HBV 外膜大蛋白(LHBs)与 HBV DNA 及 HBeAg 之间具有良好的相关性,可作为 1 个新的判断病毒复制的诊断指标^[1]。本文通过对 117 例 CHB 患者抗病毒治疗不同时期 LHBs 水平进行动态检测,并与其他指标进行对比分析,评价 ADV 抗病毒治疗的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 5 月至 2008 年 11 月本院门诊及住院的 CHB 患者 117 例,男 73 例,女 44 例,平均年龄(38.2±11.7)岁。抗病毒治疗前,所有患者均符合《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[2]。HBV DNA 均为阳性,大于或等于 1.0×10^5 copy/mL,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT) $\geq 2 \times$ ULN(正常

值上限),其中 HBeAg 阳性 49 例,HBeAg 阴性 68 例。

1.2 方法 LHBs 和 HBV 免疫标志物(HBV-M)检测采用 ELISA 法,LHBs 试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供;HBV-M 检测试剂盒由北京万泰生物药业有限公司提供,使用仪器为伯乐 550 型全自动酶联仪(判断标准:cutoff 值为 0.102,阳性对照 OD ≥ 1.0 ,阴性对照 OD < 0.10);HBV DNA 定量检测采用实时荧光定量 PCR 法,试剂由深圳匹基生物工程股份有限公司提供,HBV DNA $\geq 5.00 \times 10^2$ copy/mL 为阳性,使用仪器为德国罗氏公司 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪;检测步骤均严格按试剂盒说明操作。

1.3 治疗和观察指标 ADV 由葛兰素史克(天津)有限公司提供,给药方式为口服 10 mg,每天 1 次。ALT $\geq 2 \times$ ULN 者加用甘草酸二胺、水飞蓟等保肝药物,受试者分别在治疗前和治疗后 24、48、72、96 周空腹采集外周血 5 mL,检测其 HBV DNA、LHBs、HBV-M 及 ALT。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,

HBV DNA 与 LHBs 阳性率比较用 χ^2 检验,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用率表示,血清 LHBs A 值与 HBV DNA 对数之间采用相关分析。

2 结 果

2.1 治疗前 HBV DNA 及相关指标比较 血清 LHBs 检测阳性 114 例(98.5%),A 值均值为 1.273;HBV DNA 检测阳性 117 例(100.0%),拷贝数对数的均值为 6.06;HBeAg 阳性 47 例(95.9%)。LHBs 检测阳性率与 HBV DNA 检测阳性率之间差异无统计学意义($\chi^2=3.72,P>0.05$),血清 LHBs A 值与 HBV DNA 拷贝数呈正相关($r=0.915$);49 例 HBeAg 阳性组检测 LHBs 与 HBV DNA 阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 68 例 HBeAg 阴性组中 LHBs 与 HBV DNA 阳性率比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 ADV 治疗后 HBV DNA 载量与 LHBs A 值相关性 117 例 CHB 患者抗病毒治疗结束(96 周)后脱落 5 例,其余 112 例患者 LHBs 平均 A 值与 HBV DNA 载量呈正相关($r=0.827,P<0.05$),见表 1。

表 1 112 例患者抗病毒治疗后 HBV DNA 载量与 LHBs A 值相关性

HBV DNA(copy/mL)	n	转阴率(%)	LHBs(A 值)
< 10 ³	63	56.25	0.217±0.160
10 ³ ~10 ⁵	24	21.43	0.628±0.233
<10 ⁵ ~10 ⁷	22	19.64	0.905±0.247
>10 ⁷	3	2.68	1.453±0.268

2.3 治疗期间 HBeAg 阳性患者 HBV DNA、LHBs 及 HBV-M 检测结果比较 49 例 HBeAg 阳性患者在 ADV 治疗期间脱落 3 例,46 例完成了治疗的全过程,结果见表 2。

表 2 抗病毒治疗期间 HBeAg 阳性患者 HBV DNA、LHBs、HBV-M 转阴率比较[n(%)]

治疗时间(周)	n	HBV DNA 转阴率	LHBs 转阴率	HBeAg 转阴率	HBeAb 转阴率
0	49	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
24	49	6(12.2)	5(10.2)	4(8.2)	2(4.1)
48	48	9(18.8)	7(14.6)	7(14.6)	4(8.3)
72	48	20(41.7)	19(39.6)	10(20.8)	6(12.5)
96	46	27(58.7)	25(54.3)	12(26.1)	9(19.6)

表 3 抗病毒治疗期间 HBeAg 阴性患者 HBV DNA、LHBs 及 ALT 检测结果比较[n(%)]

治疗时间(周)	n	HBV DNA 转阴率	LHBs 转阴率	ALT 复常率
0	68	0(0.0)	0(0.0)	6(8.8)
24	68	8(11.8)	7(10.3)	31(45.6)
48	67	11(16.4)	13(19.4)	56(83.6)
72	66	25(37.9)	28(42.4)	60(90.0)
96	66	32(48.5)	43(65.2)*	63(95.5)

* : $P<0.01$,与 HBV DNA 转阴率比较。

2.4 治疗期间 HBeAg 阴性患者 HBV DNA、LHBs 及 ALT 检测结果比较 68 例 HBeAg 阴性患者在 ADV 治疗期间脱落 2 例,66 例完成了治疗的全过程,结果见表 3。

3 讨 论

HBV 感染在中国具有较高的发病率^[3]。临床试验证实,持续高载量 HBV DNA 者发生肝硬化和肝癌的相对危险性明显升高^[4]。HBV DNA 和 HBeAg 是目前临床用于反映 HBV 感染、复制的重要标志^[5-6],但临床上确实存在 HBeAg 阴性患者 HBV 感染与复制的直接证据。肝脏病理组织学检查证实,肝细胞内共价闭合环状 DNA(cccDNA)明显高于循环血清中 HBV DNA 水平^[7]。目前临床上使用的抗病毒药物只能抑制循环中 HBV DNA 复制,对肝细胞内存在的处于基因整合状态的 DNA 不起作用。另外,由于 HBV 突变株不断增加,HBV DNA 检测方法学与灵敏度缺陷等使 HBV DNA 阴转不能真实、准确地反映肝组织内 HBV 感染及复制的情况。寻找新的能反映肝细胞内 HBV DNA 复制的指标成为研究的热点。

HBV S 基因编码合成的 LHBs 存在于感染性颗粒(Dane 颗粒)和亚病毒颗粒上,具有独特的双重跨膜拓扑结构,与 HBV 复制关系密切^[8-9]。过量 LHBs 在肝细胞内质网积聚是导致内质网应激反应的关键因素^[10]。本研究结果显示,CHB 患者治疗前 LHBs A 值与 HBV DNA 拷贝数之间呈正相关($r=0.915$)。表明 LHBs 的表达水平能反映出 HBV 的复制,与 HBV DNA 及 HBeAg 一样具有相似的临床价值。112 例患者在 ADV 治疗过程中不同时间点 HBV DNA 与 LHBs 水平均呈现同步下降趋势,HBeAg 阳性患者在 ADV 治疗 96 周后 HBV DNA 转阴 27 例(58.7%),LHBs 转阴 25 例(54.3%);HBeAg 阴性患者在 ADV 治疗 96 周后 HBV DNA 转阴 32 例(48.5%),LHBs 转阴 43 例(65.2%),提示 HBeAg 阴性的 CHB 患者中确实有很大一部分患者体内仍然存在 HBV 的复制,检测 LHBs 能够反映 HBeAg 阴性患者体内 HBV 的复制情况。动态观察显示,ADV 治疗后患者血清 LHBs 转阴时间略晚于 HBV DNA,这可能是由于抗病毒治疗中已形成的 LH-Bs 不受核苷类似物抗病毒药物的影响。故血清中 LHBs 水平下降速度晚于 HBV DNA 所致。HBeAg 阴性患者病毒载量与 LHBs 水平及 ALT 变化趋势呈正相关,表明肝功能损害程度在逐渐减轻。有专家指出 HBV DNA、HBeAg 转阴已不能作为治疗的终点,而是考虑将 HBsAg 的阴转作为治疗的终点^[11]。最近的研究证实:只有当血清中 HBV DNA 和 LHBs 均检测不到时,才意味着病毒核酸复制、外膜蛋白的表达均处于停止状态,提示抗病毒治疗达到了理想的治疗终点^[12]。

ADV 是单磷酸腺苷类似物,在人体内被磷酸化为二磷酸盐,后者可通过竞争脱氧腺苷三磷酸底物,使 HBV DNA 链延长中止而抑制 HBV DNA 复制^[13]。本研究结果证实,在 ADV 抗病毒治疗过程中检测 LHBs 水平也能间接反映病毒复制程度,是判断 HBV 复制的新的血清学指标,对疾病的诊断、疗效判断及预后评价具有重要的意义。

参考文献

[1] 范公忍,韩聚强,任永强,等.乙型肝炎包膜大蛋白检测与病毒复制的相关性研究[J].胃肠病学和肝病杂志,2010,19(10):880-882.

[2] 中华医学会肝病学分会、感染学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华传染病杂志,2005,23(6):421-432.

[3] 梁晓峰,陈国生,王晓军,等.中国 3 岁以上人群(下转第 1717 页)

表 1HIE 组与对照组新生儿脐血铅和 S100B 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血铅($\mu\text{g/L}$)	S100B 蛋白($\mu\text{g/L}$)
HIE 组	59	72.9 $\pm$ 5.29	4.56 $\pm$ 2.20
对照组	30	70.4 $\pm$ 7.98	1.06 $\pm$ 0.32
<i>t</i>	—	1.12	12.62
<i>P</i>	—	>0.05	<0.01

—:无数据。

表 2高血铅 HIE 组与低血铅 HIE 组 DQ 和 S100B 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DQ(分)	S100B 蛋白($\mu\text{g/L}$)
高血铅 HIE 组	21	35 $\pm$ 5	4.23 $\pm$ 1.9
低血铅 HIE 组	38	65 $\pm$ 7	4.06 $\pm$ 2.3
<i>t</i>	—	9.95	1.09
<i>P</i>	—	<0.01	>0.05

—:无数据。

3 讨 论

新生儿 HIE 是引起新生儿死亡和导致永久性神经系统后遗症的主要原因之一。有研究显示,新生儿缺氧缺血后到永久性脑损伤发生之前存在一个治疗的时间窗,在此时间窗内给予神经保护措施,可阻断缺氧缺血后神经元凋亡的级联反应,防止出现永久性脑损伤^[3]。S100B 蛋白是一种特异性较高的反映脑损伤的神经生化标志物。有研究认为,S100B 蛋白是迄今为止最能反映脑损伤程度的特异性蛋白^[4-5]。S100B 蛋白在中枢神经系统中的水平远较其他组织丰富^[6],当中枢神经系统细胞损伤时,S100B 蛋白从细胞中渗出并进入脑脊液(CSF),经受损的血脑屏障进入血液,因此 S100B 蛋白在 CSF 和血中水平的变化可反映脑损伤的严重程度,并已成为判断和评估脑损伤预后的特异性指标。国内外研究发现,足月新生儿在发生窒息后 24 h 内血清 S100B 蛋白水平升高,且达到高峰^[7]。本研究结果显示,HIE 组血清 S100B 水平显著高于健康对照组($P<0.01$),高血铅 HIE 组和低血铅 HIE 组 S100B 与 DQ 均呈负相关。提示 S100B 可反映 HIE 患儿脑损伤的程度,对病

情监测和判断预后有一定的意义。

出生后早期是中枢神经系统发育最迅速,也最易受损害的时期,由于这一时期婴儿的血脑屏障发育尚不完善,使其对铅毒性特别敏感,血铅极易透过血脑屏障沉积于大脑之中,阻碍和破坏大脑的发育和功能活动,从而导致婴儿智能发育不良^[8]。铅是无任何生理功能的有害元素,铅对儿童健康的损害无安全的临界水平。但本研究结果显示,高血铅 HIE 组比低血铅 HIE 组 6 月龄 DQ 显著降低($P<0.01$),可见脐血铅含量增高可对婴儿神经行为发育产生不良影响,影响 HIE 患儿的预后。

参考文献

[1] 田恬,周宏艳,李改莲,等.尿 S100B 蛋白和乳酸/肌酐比值对新生儿缺氧缺血性脑病预后判断的价值[J].中国新生儿科杂志,2008,23(3):141-144.

[2] 肖昕,王冬菊.新生儿缺氧缺血性脑病国内外诊断标准的比较[J].实用儿科临床杂志,2006,21(2):127-128.

[3] 齐正,高宝勤.亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病研究进展[J].实用儿科临床杂志,2008,23(14):1118-1121.

[4] 贾翠英.HIE 患儿血浆 SOD、S100B 蛋白测定的临床意义[J].放射免疫学杂志,2009,22(1):29.

[5] Foerch C,Singer OC,Neumann-Haefelin T,et al. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction[J]. Arch Neurol,2005,62(7):1130-1134.

[6] 曹俊艺,方成志.尿 S100B 在新生儿缺氧缺血性脑病早期诊断中的价值[J].中外医疗,2009,28(35):1-3.

[7] 陈志坚.颅脑损伤患者血清 S100B 蛋白检测的临床意义[J].广西医科大学学报,2008,25(6):921-922.

[8] 潘丽明,黄庆生.子宫内低铅暴露对婴儿早期神经行为影响的研究[J].广东微量元素科学,2009,16(4):41-43.

(收稿日期:2011-03-24)

(上接第 1715 页)

乙型肝炎血清流行病学研究[J].中华流行病学杂志,2005,26(9):655-658.

[4] 唐跃华,谢健敏,梁玉全,等.慢性乙型肝炎血清 HBeAg、HBV DNA 与肝组织炎症关系的探讨[J].中华传染病杂志,2005,23(6):338-342.

[5] 范公忍,屠玉玲,李娟,等.荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎患者血清 HBV DNA 及其临床意义[J].实用肝脏病杂志,2007,10(1):16-18.

[6] 胡学玲,陈天宝,范公忍,等.拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者定量检测 HBeAg 的意义[J].实用肝脏病杂志,2010,13(3):183-184.

[7] 盛慧萍,杨岩,赖雅芳,等.慢性乙型肝炎患者肝组织中 HBV cccDNA 定量与病情的相关性分析[J].山东医药,2010,50(7):12-14.

[8] Lambert C,Mann S,Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol,2004,85(Pt 5):1221-1225.

[9] Bang G,Kim KH,Guarnieri M,et al. Effect of mutating the two cysteines requolived for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. Virology,2005,332(1):

216-224.

[10] Chua PK,Wang PY,Lin MH,et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus(HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus[J]. J Virol,2005,79(21):13483-13496.

[11] Chen CH,Lee CM,Wang TH,et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2004,16(11):1213-1218

[12] Fan X,Fang D,Bin D,et al. Serum levels of surface large envelope proteins:prognostic marker for hepatitis B e antigen-negative patients with adefovir dipivoxil treatment[J]. Antivir Ther,2009,14(8):1149-1156.

[13] Marcellin P,Chang TT,Lim SG,et al. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B[J]. Hepatology,2008,48(3):750-758.

(收稿日期:2011-03-16)