

• 临床研究 •

乙型肝炎病毒 PreS1Ag、抗 HBe-IgM 和 HBV-DNA
联合监测相关性分析刘勇波¹, 陈燕如²

(广东省佛山市南海经济开发区人民医院:1. 检验科;2. 内科 528237)

摘要:目的 通过联合检测健康体检者和乙型肝炎患者的乙型肝炎两对半、HBV 前 S1 抗原(PreS1Ag)、抗 HBV 核心抗体 IgM(HBe-IgM)、HBV 核酸定量(HBV-DNA)等各项指标,探讨它们之间的相关性及其临床意义。方法 采用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)定量检测“乙型肝炎两对半”,PreS1Ag 与抗 HBe-IgM 检测均采用 ELISA 检测,HBV-DNA 采用实时荧光定量 PCR 方法检测。结果 乙型肝炎组中 PreS1Ag、抗 HBe-IgM、HBV-DNA 的阳性率都明显高于对照组的阳性率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 4 种不同 HBV 感染模式组别中,抗 PreS1Ag 和 HBe-IgM 的阳性率差异均有统计学意义($\chi^2 = 9.469, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.922, P < 0.05$),HBV-DNA 的阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 5.848, P > 0.05$)。114 例乙型肝炎患者中,PreS1Ag 阳性 90 例,阳性率为 78.9%,HBV-DNA 阳性 101 例,阳性率为 88.6%,符合率为 89.1%(90/101),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.451, P > 0.05$),结果呈正相关($r = 0.863$)。结论 PreS1Ag 不仅与 HBV-DNA 检出率高度符合,且是比 HBeAg 更敏感的判断 HBV 感染和复制的重要指标,同时抗 HBe-IgM 与 HBV 的活动性复制呈正相关,抗 HBe-IgM 也是 HBV 在体内复制的重要指标,因此 PreS1Ag、抗 HBe-IgM 以及 HBV-DNA 联合乙型肝炎“两对半”对诊断乙型肝炎具有更好的临床意义。

关键词:乙型肝炎; 乙型肝炎病毒前 S1 抗原; 乙型肝炎病毒核酸定量; 抗乙型肝炎病毒核心抗体 IgM

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.055

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)12-1722-03

目前诊断乙型肝炎最常用的指标是 HBV 血清学标志物,即乙型肝炎两对半检测^[1],而乙型肝炎两对半只能反映人体对 HBV 的免疫反应状态,不能直接反映 HBV 在患者体内的复制情况^[2]。HBV 前 S1 蛋白是 HBV 表面蛋白成分中与乙型肝炎表面抗原(HBsAg)氨基末端相连接的多肽,是 HBV 入侵肝细胞的主要结构成分,在病毒入侵肝细胞过程中起主要作用^[3]。国外研究表明,HBV 前 S1 抗原(PreS1Ag)与病毒复制关系密切^[4]。因此,PreS1Ag 作为 HBV 感染的标志物越来越被临床重视。抗 HBV 核心抗体 IgM(HBe-IgM)出现于 HBV 感染早期,也是慢性肝炎复发之前,故 HBe-IgM 阳性是 HBV 急性感染和复制活跃的指征^[5]。因此,抗 HBe-IgM 的检测在急性乙型肝炎发病机制中起着重要的作用,并可为这些肝病的临床治疗研究提供新的参考数据。HBV 核酸定量(HBV-DNA)是直接反映 HBV 复制状态及传染性的最佳指标,同时也可用于判断乙型肝炎感染的严重程度和传染性,长期以来有不少专家学者认为 HBV-DNA 是诊断乙型肝炎,提示病毒复制的“金标准”^[6-8]。本研究中收集 114 例乙型肝炎患者与 51 例健康患者血清,同时进行 PreS1Ag、抗 HBe-IgM 和 HBV-DNA 的联合检测,探讨乙型肝炎患者各项指标的相关性及临床意义,为临床诊治乙型肝炎患者提供重要实验室依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 4 月至 2015 年 6 月在南海经济开发区医院内科住院及门诊确诊为乙型肝炎患者的 114 例纳入乙型肝炎组,其中男 56 例,女 58 例,年龄 23~79 岁,平均(43.7±6.1)岁;乙型肝炎患者病例的诊断均符合 2000 年中华医学会西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准。另选择该院预防保健科健康体检者 51 例纳入对照组,其中男 26 例,女 25 例,年龄 23~67 岁,平均(39.8±8.2)岁。

1.2 仪器与试剂 乙型肝炎两对半诊断试剂盒购于苏州新波生物技术有限公司,HBe-IgM 检测试剂盒和 PreS1Ag 检测试剂盒购于上海科华生物工程有限公司,HBV-DNA 检测试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司。检测仪器包括时间分

辨荧光免疫分析仪(ANYTEST-2000,上海新波生物技术有限公司)、全自动酶标洗板机(Egate-2310,上海新波生物技术有限公司)、酶标变频振荡器(新波 2510,上海新波生物技术有限公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 “乙型肝炎两对半”定量检测 分别加入 100 μ L 阴性、阳性对照和待检血清到反应孔,加完后用封口膜封板。在振荡仪慢速振荡孵育 40 min(室温 20~25 $^{\circ}$ C)。揭下封口膜并弃掉,用洗板机洗涤 4 次,最后扣干。每孔加入已稀释的标记物 100 μ L,用封口膜封板。然后置于振荡仪慢速振荡孵育 40 min(室温 20~25 $^{\circ}$ C)。揭下封口膜并弃掉,用洗板机洗涤 6 次。每孔加入增强液 100 μ L,慢速振荡孵育 5 min。用时间分辨荧光测定仪测定各孔的荧光读数。

1.3.2 HBV-DNA 定量检测 用无菌的干燥玻璃管采静脉血 2 mL,1 500 r/min 离心 5 min,吸取上层血清,转移至 1.5 mL 灭菌离心管。取 100 μ L 血清加入等量 DNA 浓缩液,振荡混匀 5 s;12 000 r/min 离心 10 min;去上清,沉淀中加入 20 μ L DNA 提取液,振荡混匀 5~10 s,瞬时离心数秒,100 $^{\circ}$ C 恒温处理(10±1)min;12 000 r/min 离心 5 min。取 PCR 反应管若干,分别加入处理后的样品上清液 2 μ L,8 000 r/min 离心数秒,放入 PCR 扩增仪样品槽。将各反应管放入 ABI Prism 7300 PCR 仪器的微孔反应槽内,在电脑上按对应顺序设置阴性、阳性质控品以及未知标本,并设置样品名称、标记荧光基因种类和循环条件,2 h 扩增结束后,在电脑的分析菜单下选择自动分析。

1.3.3 PreS1Ag 和抗 HBe-IgM 定性检测 待测孔加入标本、阴阳性对照各 50 μ L,封板,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。使用洗板机洗涤 5 次后拍干。接着每孔加酶结合物 50 μ L(空白对照孔不加),充分混匀,再次封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。再用洗板机洗涤 5 次后拍干。每孔加显色剂 A、B 各 50 μ L,充分混匀后封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。每孔加终止液 50 μ L,混匀。立即用酶标仪读数(波长 450 nm),读取各孔吸光度(OD)值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行数据处理及统计学分

析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。所有统计检验均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 3 项指标阳性率比较 与对照组比较,乙型肝炎组中抗 HBeAg、PreS1Ag 及 HBV-DNA 的阳性率均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 2 组 3 项指标阳性率比较[n(%)]

组别	n	HBeAg	PreS1Ag	HBV-DNA
对照组	51	1(1.9)	12(23.5)	7(13.7)
乙型肝炎组	114	36(31.6)*	90(78.9)*	101(88.6)*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 乙型肝炎患者不同 HBV 感染模式与 3 项指标的相关性 在 114 例乙型肝炎患者中“大三阳”,“小三阳”,HBsAg 与 HBeAg 阳性、HBsAg 与 HBeAb 阳性 4 种不同的感染模式组中,PreS1Ag 和 HBV-DNA 的阳性率呈正相关。在 4 种不同 HBV 感染模式组别中,通过 χ^2 检验,抗 HBeAg 和 PreS1Ag 的阳性率差异都具有统计学意义($\chi^2 = 9.922, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.469, P < 0.05$),表明抗 HBeAg 和 PreS1Ag 在 4 种不同 HBV 感染模式组别中阳性检出率差异明显。4 种不同 HBV 感染模式组别中,HBV-DNA 的阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 5.848, P > 0.05$),说明 HBV-DNA 的阳性检出率没有明显差异。

表 2 乙型肝炎患者不同 HBV 感染模式与 3 项指标的阳性率比较[n(%)]

模式	n	HBeAg	PreS1Ag	HBV-DNA
大三阳	51	20(39.2)	38(74.5)	46(90.2)
小三阳	24	7(29.2)	17(70.8)	19(79.2)
HBsAg(+)HBeAg(+)	18	2(11.1)	17(94.4)	17(94.4)
HBsAg(+)HBeAb(+)	21	7(33.3)	18(85.7)	19(90.5)

2.3 乙型肝炎患者 PreS1Ag 与 HBV-DNA 相关分析 PreS1Ag 与 HBV-DNA 结果比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.451, P > 0.05$),两者呈显著正相关($r = 0.863, P < 0.05$)。表明在 114 例乙型肝炎患者中 PreS1Ag 及 HBV-DNA 检测结果有较高的符合率,PreS1Ag 与 HBV-DNA 高度相关。

表 3 乙型肝炎患者 PreS1Ag 与 HBV-DNA 检测结果[n(%)]

指标	阳性	阴性
PreS1Ag	90(78.9)	24(21.1)
HBV-DNA	101(88.6)	13(11.4)

3 讨论

HBV 是一种嗜肝细胞病毒,完整的 HBV 颗粒呈球形,直径为 42 nm,具有双层衣壳蛋白,由外壳蛋白和核心成分组成。外壳蛋白即囊膜由脂质双层与蛋白质构成,由 S、前 S1 和前 S2 组成,包膜内部包裹的是二十面立体对称的内核,内核表面含有乙肝病毒核心抗原(HBcAg)和乙肝病毒 e 抗原(HBeAg),内核核心成分包括双股 DNA 和 DNA 多聚酶^[9]。相关研究表明,PreS1Ag 已成为感染、复制和乙型肝炎患者诊断、治疗和预

后的一项重要指标^[10-12]。

本文通过对 114 例乙型肝炎患者血清检测结果分析发现,PreS1Ag 在乙型肝炎组血清中阳性率为 78.9%,提示 PreS1Ag 在一定程度上可作为 HBV 感染的又一血清标志物。本研究结果显示,乙型肝炎组中抗 HBeAg、PreS1Ag 及 HBV-DNA 的阳性率都明显高于对照组的阳性率。检测中出现少数 HBsAg 阴性而 PreS1Ag 阳性的情况,经过分析主要原因可能是 HBsAg 浓度过高引起的钩状效应、HBV 处于潜伏期或者 HBsAg 分泌量不足,同时也可因为编码 HBsAg 的 HBV 中 S 区发生基因变异。本研究中还出现 HBsAg 阳性而 PreS1Ag 阴性的现象,因为 PreS1Ag 是 HBsAg 的组成成分之一,可作为 HBV 感染的标志,但 HBsAg 不仅存在于完整的病毒颗粒表面,还存在于小球颗粒及管型颗粒,而 PreS1Ag 只能在完整病毒颗粒表面有效表达,因此可出现 HBsAg 阳性而 PreS1Ag 阴性的现象^[13]。PreS1Ag 阳性率为 78.9%,HBV-DNA 阳性率为 88.6%,两者符合率为 89.1%(90/101),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.451, P > 0.05$),提示呈正相关($r = 0.863$),因此 PreS1Ag 与 HBV-DNA 是检测率高度符合的重要病毒复制指标,与邹伟等^[14]的研究结果一致。

在乙型肝炎两对半中,HBeAg 是 HBV 核心内部成分,是 HBV 处于复制状态的标志,但 HBeAg 阴性并不意味着 HBV 复制的完全终止或病毒血症的消失,可能是 HBV 基因组的前 C 区发生变异而导致 HBeAg 表达障碍,这时 PreS1Ag 检测阳性比 HBeAg 更能反映 HBV 复制情况,因此,PreS1Ag 作为 HBV 病毒感染、复制的指标比 HBeAg 更敏感,有独立检测的价值,对乙型肝炎两对半检测起重要的补充作用。表 2 显示,HBV-DNA 和 PreS1Ag 在 4 种不同 HBV 感染模式组别的阳性率都较高,并且 HBV-DNA 和 PreS1Ag 的阳性率在 HBeAg 阳性组明显高于 HBeAg 阴性组,提示 PreS1Ag、HBV-DNA 和 HBeAg 三者关系密切,在 HBV 复制时表达最多,可作为 HBV 存在及病毒复制和有传染性的指标^[15]。

HBV 感染机体后,体液免疫反应首先产生以抗 HBeAg 为主的免疫球蛋白,随后 IgM 抗体滴度下降,而 IgG 效价迅速上升。因此,抗 HBeAg 可以作为 HBV 感染早期诊断的指标,以往认为抗 HBeAg 可作为 HBV 近期感染的血清学标记,但后来发现在慢性乙型肝炎中也有较多阳性者。因此,抗 HBeAg 阳性是 HBV 在体内复制的重要指标,提示患者近期有 HBV 感染或慢性乙型肝炎患者的 HBV 有活动性复制,患者有很强的传染性。本研究结果显示,在 4 种不同 HBV 感染模式组别中,抗 HBeAg 的阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 9.922, P < 0.05$),表明抗 HBeAg 在 4 种不同 HBV 感染模式组别中阳性检出率具有明显差异。本研究中,抗 HBeAg 在“大三阳”和“小三阳”中的阳性率分别为 39.2%和 29.2%。表明抗 HBeAg 与 HBV 的活动性复制呈正相关。

外周血清中 HBV-DNA 的检测反映完整 HBV 颗粒的释放,是检测病毒复制最直接可靠的指标。本研究中,HBV-DNA 在“大三阳”组的检出率为 90.2%,但同时也存在 HBV-DNA 阴性的患者,其原因可能为药物抑制 HBV-DNA 复制,但仍存在低水平病毒复制的可能,只是浓度低于检测下限(< 500),也可能标本内含有抑制扩增反应的物质,如含有 Taq DNA 聚合酶抑制物。在 4 种不同 HBV 感染模式组别中 HBV-DNA 的阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 5.848, P > 0.05$),说明 HBV-DNA 的阳性检出率没有明显差异。荧

光定量 PCR 对实验室要求条件较高,一般基层医疗单位还很难开展。相关研究报道,PreS1Ag 与 HBV-DNA 有较好的一致性,但又存在一定的交叉阳性和交叉阴性^[16]。因此,PreS1Ag 不能等同或替代 HBV-DNA 的检测,在临床诊断中应充分依据两种指标的独立性和互补性来诊治患者。

综上所述,PreS1Ag 是比 HBeAg 更敏感的判断 HBV 感染和复制的重要指标,能够弥补由于 HBeAg 阴性情况下给临床诊断和治疗带来的“误导”,抗 HBe-IgM 与 HBV 的活动性复制呈正相关,可以作为乙型肝炎检查的常规项目,因此抗 HBe-IgM、PreS1Ag 及 HBV-DNA 联合乙型肝炎“两对半”对诊断乙型肝炎具有更好的意义。

参考文献

[1] 孙春霞,任原珍. 前 S1 抗原及乙型肝炎两对半与 HBV-DNA 的相关性分析[J]. 医学理论与实践,2013,26(19): 2621-2623.

[2] 张兆勤,胡礼仪,宁良,等. 乙型肝炎病毒 Pre-S1 蛋白与“两对半”、HBV-DNA 的相关性[J]. 中国现代药物应用, 2009,18(3):36-37.

[3] 曾显坤,扈瑞平. 乙型肝炎病毒入侵肝细胞的研究现状 [J]. 生物技术世界,2014,8(12):143-144.

[4] 刘鲁宏,彭玉玲,孔令斌,等. 乙型肝炎病毒前 S1 抗原与其病毒复制关系分析[J]. 中国医药科学,2013,3(2):119-120.

[5] 徐如梅,沈菁. 乙型肝炎病毒核心 IgM 抗体检测在乙型肝炎患者中的意义[J]. 检验医学与临床,2012,9(7):825-826.

[6] 湛昌文. 乙型肝炎病毒标志物定量检测的临床价值分析 [J]. 内蒙古中医药,2013,32(16):80-81.

[7] 靳礼松. 乙型肝炎病毒 DNA 与“乙型肝炎两对半”模式关

系的临床研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(21): 2837-2839.

[8] 龚杰,刘柏林,方艳秋,等. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白、前 S1 抗原、HBV-DNA 与血清标志物之间相关性分析[J]. 中国实验诊断学,2013,17(9):1634-1637.

[9] 梁晓兰. 定量 PCR 检测慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA 及其诊断意义[J]. 中国医药指南,2013,11(20):614-615.

[10] 孙传俊. 乙型肝炎病毒 Pre-S1 检测在乙型肝炎患者临床诊断中的应用[J]. 中国民康医学,2015,27(18):73.

[11] 黄青平,李娟,张文梅. 基层医院乙型肝炎病毒前 S1 抗原检测的必要性及临床意义[J]. 青海医药杂志,2015,45 (2):69-70.

[12] 李彩东,吴斌,陈锡莲,等. 乙型肝炎病毒前 S1 抗原与 HBV DNA 和 HBV-M 及肝功能的相关性探讨[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(7):936-938.

[13] Davaaalkham D, Ojima T, Namadawa P, et al. Prevalence and risk factors for hepatitis C virus infection in Mongolian children: Findings from a nationwide survey[J]. J Med Virol, 2006,78(4):466-472.

[14] 邹伟,李功军. 乙型肝炎前 S1 抗原与 HBV-DNA 检测相关性分析[J]. 数理医药学杂志,2015,28(2):222-223.

[15] Hu WG, Wei J, Yang XX, et al. Expression of overlapping PreS1 fragment recombinant proteins for the determination of immunogenic domains in HBsAg PreS1 region[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2004,36(6):397-404.

[16] 张逸,苏瑞文,陈景连. 乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 含量与 HBV 前 S1 抗原、HBV-M 和肝功能的关系[J]. 广东医学院学报,2014,32(4):458-460.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-03-18)

总胆汁酸、尿酸和胆碱酯酶检测在乙型肝炎肝硬化中的意义

徐 贵¹, 张晓艳², 杨伟霞^{3△}

(1. 江苏省淮安市盱眙县中医院检验科 211700; 2. 江苏省淮安市盱眙县中医院传染科 211700; 3. 苏北人民医院医学检验科, 江苏扬州 225001)

摘要:目的 探讨血清总胆汁酸(TBA)、尿酸(UA)和胆碱酯酶(CHE)在乙型肝炎肝硬化中的变化及意义。方法 选取 126 例乙型肝炎肝硬化患者,按照 Child-Pugh 分级标准评分为代偿期组 80 例,失代偿期组 46 例,选择同期住院的慢性乙型肝炎患者 58 例纳入慢性乙型肝炎组,另选择住院的非慢性乙型肝炎患者 51 例纳入对照组。采用全自动生化分析仪测定各组血清 TBA、UA 和 CHE 的水平。结果 代偿期组血清中 TBA 较对照组明显升高($P < 0.01$),且失代偿期组明显高于代偿期组($P < 0.01$);而 UA 和 CHE 较对照组减低($P < 0.01$),且失代偿期组明显低于代偿期组($P < 0.01$);慢性乙型肝炎组与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 血清 TBA、UA 和 CHE 水平变化对乙型肝炎肝硬化患者病情诊断、疗效观察和预后判断有一定的临床价值。

关键词:乙型肝炎肝硬化; 总胆汁酸; 尿酸; 胆碱酯酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.056

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)12-1724-03

肝脏是机体消化系统的重要器官,是蛋白质和多种凝血因子的合成场所。在糖、脂和激素等代谢中起重要作用。乙型肝炎肝硬化是一种慢性进行性肝病,其特点是弥漫性肝损伤,并

发症多,常导致多系统受累,严重威胁患者生命。总胆汁酸(TBA)是胆固醇在肝脏中分解代谢的产物,可反映肝脏合成、分泌与损伤三种状态的血清学指标^[1];尿酸(UA)是嘌呤代谢

△ 通讯作者, E-mail: 2232721573@qq.com.