

• 论 著 •

慢性乙型肝炎患者病毒基因组与乙型肝炎病毒 e 抗原、肝功能关系分析

刘振杰¹, 曹永坚¹, 岑子华², 徐 宁^{1△}

(1. 广东省中医院芳村医院检验科, 广州 510370; 2. 中山大学医学院 2008 级医学检验, 广州 510080)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒基因组 (HBV-DNA)、乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg)、肝功能的相关关系, 为临床治疗提供参考。方法 回顾分析 401 例患者的 HBV-DNA、HBeAg、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 对 HBV-DNA 与 HBeAg 进行相关性分析。根据患者的 HBV-DNA、HBeAg 水平进行分组, 比较各组的 ALT、AST 水平差异。结果 (1) HBV-DNA 与 HBeAg 的阳性率存在相关性, 相关系数 $r=0.671(P<0.01)$; (2) HBV-DNA 载量达 10^5 copies/mL 时, 血清 ALT、AST 较 HBV-DNA 阴性组及低载量组显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); (3) 在 HBV-DNA 载量相当时, HBeAg 阳性组与阴性组 ALT、AST 活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 (1) HBeAg 与 HBV-DNA 具有相关性; (2) HBV-DNA 载量较高的患者容易出现肝功能异常; (3) HBeAg 的存在情况与肝功能无显著相关性。

关键词:乙型肝炎病毒基因组; 乙型肝炎病毒 e 抗原; 丙氨酸氨基转移酶; 天冬氨酸氨基转移酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)13-1784-03

Analysis on relation between viral genome with hepatitis B virus e antigen and liver function in chronic hepatitis B patients

LIU Zhenjie¹, CAO Yongjian¹, CEN Zihua², XU Ning^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Fangcun Hospital, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510370, China; 2. Grade 2008, Department of Medical Laboratory, Sun Yatsen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To study the relationship among hepatitis B viral genome (HBV-DNA), hepatitis Be antigen (HBeAg) and liver function in chronic hepatitis B patients, and to provide the reference for clinical treatment. **Methods** The quantitative levels of HBV-DNA, HBeAg, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in 401 patients were analyzed and the correlation analysis between HBV-DNA and HBeAg was performed. The grouping was performed according to the HBV-DNA and HBeAg quantitative levels and the differences of ALT and AST levels were compared among the groups. **Results** (1) The correlation existed between HBV-DNA and HBeAg positive rate, $r=0.671(P<0.01)$; (2) when HBV-DNA load reaching 10^5 copies/mL, serum ALT and AST levels showed significantly increased compared with the HBV-DNA negative group and low load group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); (3) when HBV-DNA load was equivalent, the difference of ALT and AST activity had no statistically significant difference between the HBeAg-positive and HBeAg-negative groups. **Conclusion** (1) HBeAg has a correlation with HBV-DNA; (2) the patients with higher HBV-DNA load are easy to develop the liver function abnormality; (3) the HbeAg existence situation has no obvious relation with the liver function.

Key words: hepatitis B viral genome; HBV e antigens; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase

乙型肝炎是一种常见传染病, 据估计全球 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒 (HBV), HBV 与肝硬化、原发性肝癌密切相关, 每年有一百万人死于有关疾病^[1]。目前, 认为乙型肝炎对肝的损害是由于 HBV 引起细胞免疫针对受感染肝细胞的清除, 病情的转归涉及 HBV 的体内复制情况和机体的免疫状况。HBV 基因组 (HBV-DNA) 载量、HBV 血清标志物和血清转氨酶是监测 HBV 感染情况的常用指标。了解三者之间的相关关系及临床应用的代表性有其意义。本文旨在研究三者慢性乙型肝炎患者中的联系, 为临床提供指导意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 401 例血清标本收集自 2013 年 2 月 1 日至 2013 年 3 月 15 日在广东省中医院系统 (包含大德路总院、芳村分院、二沙岛分院、大学城分院) 同时作 HBV-DNA、乙型肝炎两对半定量、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测的门诊及住院患者, 排除溶血、黄疸、脂血标本。诊断标准参照《慢性乙型肝炎防治指南 (2010 版)》^[2]。其中男

273 例, 女 128 例, 年龄 12~77 岁, 平均 (37±12) 岁。

1.2 仪器与试剂 血清 ALT、AST 由两套检测系统测定: 罗氏 Modular 全自动生化分析仪购自德国罗氏公司, 采用罗氏配套试剂、校准品、伯乐质控品; 罗氏 Cobas 8000 全自动生化分析仪, 采用配套试剂、校准品、伯乐质控品。两套系统均通过室间质评; ABI 7300 自动基因扩增检测仪购自美国 ABI 公司, HBV-DNA 荧光定量试剂盒由广州中山大学达安基因股份有限公司生产; 罗氏 e 601 化学发光分析仪购自德国罗氏公司, 采用罗氏配套试剂、校准品、伯乐质控品。

1.3 方法

1.3.1 ALT 活性测定 以速率法测定。ALT 催化 L-丙氨酸和 2-酮戊二酸产生丙酮酸, 丙酮酸在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 存在下生成 L-乳酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD), NADH 的反应速率与 ALT 的活性成正比, 在 340 nm 波长处可检测到吸亮度的降低。测试系统以测定值大于 50 IU/L 为阳性。

1.3.2 AST 活性测定 以速率法测定。AST 催化 L-精氨酸与天门冬氨酸产生 L-谷氨酸与草酰乙酸,草酰乙酸在苹果酸脱氢酶存在下与 NADH 反应生成 L-乳酸和 NAD,反应速率和 AST 的活性成正比,在 340 nm 波长处检测到吸亮度的降低。AST 测试系统以测定值大于 40 IU/L 为阳性。

1.3.3 血清 HBVe 抗原(HBeAg)定量测定 用电化学发光法测定。测试原理利用双抗体夹心法,先将待测血清、生物素化抗 HBeAg 单克隆抗体、钆标记抗乙型肝炎 e(HBe)混合,形成夹心复合物,再加入链霉素亲和素微粒,通过生物素-亲和素结合使微粒结合在复合物上,在测量池中用磁铁吸附复合物,同时洗去未形成复合物,加电压发光并由光电倍增管检测,通过计算器运算结果,以 cut-off 值大于或等于 1 判为阳性。

1.3.4 乙型肝炎 DNA 定量测定 用荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定。严格按照试剂盒说明书进行操作,主要技术步骤为血清中 HBV-DNA 提取,PCR 反应条件为 93 °C 2 s→93 °C 45 s→55 °C 60 s 进行 10 次循环,再以 93 °C 30 s→55 °C 45 s 进行 30 次循环。以 HBV-DNA ≥ 500 copies/mL 作阳性判断临界值。以 HBV-DNA 载量分为 3 个水平:DNA 阴性组(HBV-DNA < 500 copies/mL)、DNA 低载量组(500 copies/mL ≤ HBV-DNA < 10⁵ copies/mL)、DNA 高载量组(HBV-DNA ≥ 10⁵ copies/mL);同时以 HBeAg 定性结果分为 HBeAg 阳性组(S/CO ≥ 1)和 HBeAg 阴性组(S/CO < 1),共 6 组。

1.3.5 数据查询 登录怡捷实验室数据处理系统,以 1.1 中标准查询并记录患者的 ALT、AST、HBeAg 定量及 HBV-DNA 定量检测结果。

1.3.6 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,两者绝对值相关关系用 Pearsons 相关系数分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBeAg 阳性率与 HBV-DNA 阳性率的关系 HBeAg 阳性 200 例,其中 HBV-DNA 阳性 121 例,HBV-DNA 阴性 79 例;HBeAg 阴性 201 例,其中 HBV-DNA 阳性 69 例,HBV-DNA 阴性 132 例。两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 27.54, P < 0.01$),两者的阳性率相关。

2.2 HBeAg 定量与 HBV-DNA 定量的相关关系 为进一步研究两者间的相互关系,以 HBV-DNA 定量和 HBeAg 定量作统计量,计算两者 Pearsons 相关系数。结果显示两者之间相关系数 *r* = 0.671 (*P* < 0.01)。

2.3 ALT、AST 与 HBeAg、HBV-DNA 载量关系分析 经 *t* 检验后,无论 HBeAg 阳性或阴性,HBV-DNA 低载量与 HBV-DNA 阴性组相比,ALT、AST 差异均无统计学意义 (*P* > 0.05);HBV-DNA 高载量与 HBV-DNA 阴性组、HBV-DNA 低载量组相比,ALT、AST 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。在 HBeAg 定性结果不同但同等病毒载量下,各组相比,ALT、AST 差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 不同载量 HBV-DNA 及 HBeAg 组 ALT、AST 的水平 ($\bar{x} \pm s, IU/L$)

不同载量	<i>n</i>	ALT	AST
HBeAg 阳性组			
HBV-DNA 阴性	79	24.8 ± 10.5	23.4 ± 8.1
HBV-DNA 低载量	68	27.8 ± 15.1	25.2 ± 9.7

续表 1 不同载量 HBV-DNA 及 HBeAg 组 ALT、AST 的水平 ($\bar{x} \pm s, IU/L$)

不同载量	<i>n</i>	ALT	AST
HBV-DNA 高载量	53	108.9 ± 88.0	65.8 ± 58.3
HBeAg 阴性组			
HBV-DNA 阴性	132	24.8 ± 13.0	24.0 ± 9.6
HBV-DNA 低载量	53	29.6 ± 16.1	25.3 ± 10.0
HBV-DNA 高载量	16	57.8 ± 47.5	47.1 ± 29.1

3 讨 论

目前,HBV-DNA 检测是最特异的针对 HBV 在体内复制情况的指标,但由于其成本较高,对仪器设备要求苛刻的关系,部分医疗机构难以推广。血清转氨酶和乙型肝炎血清标志物均是乙型肝炎密切相关的指示物,方法学上更简单,应用较广,但两者代替 HBV-DNA 的监察作用的合理性则存在疑问。本文对 HBeAg 与 HBV-DNA 的相互关系作出分析,发现 HBV-DNA 检测结果为阳性的患者,其 HBeAg 检测阳性率高于 HBV-DNA 检测结果为阴性的患者,两者间差异有统计学意义 (*P* < 0.01),说明 HBV-DNA 与 HBeAg 的发生率具有相关性。在进一步的相关性检验中,以两者的绝对数量为坐标轴作散点图,统计后得出两者的 Pearsons 相关系数 *r* = 0.671 (*P* < 0.01),说明两者在数量上呈正相关。有报道指出,高病毒负荷的患者易转慢性化^[3-4],而 Milich 等^[5]的研究指出,HBeAg 的存在能干扰 CD8-CTL 的细胞毒作用,诱导机体对 HBV 的免疫耐受,两者指出 HBV-DNA 和 HBeAg 对乙型肝炎慢性化都具有预警作用,而此结果显示以 HBeAg 作为 HBV-DNA 复制的指标的确有一定根据,在缺乏其他资料支持下,HBeAg 具有提示的作用。纵然如此,建立 HBeAg 与 HBV-DNA 的关系仍有不少问题目前难以克服,从相关性分析中可得知两者数量不构成平行关系。本研究中发现,79 例 HBeAg 阳性患者 HBV-DNA 水平为阴性,可能与慢性乙型肝炎的自然病史有关,在免疫清除期后期或低活动期前期机体免疫系统被激活,开始清除病毒颗粒,结果是病毒载量的减少。同时,血清转换在该时期尚未完成,患者仍然表达 HBeAg^[6]。利用 HBeAg 的另一盲点是无法评估 HBeAg 阴性乙型肝炎患者。由于 HBV 转录酶缺乏修饰功能,翻译中易发生突变。HBeAg 可有数种途径,主要的有:(1)前 C 区的 1 896 位的 G-A 变异,使终止子抗胸腺球蛋白出现,病毒不能表达 HBeAg,但并不影响 DNA 的复制^[7];(2)HBeAg 表达水平降低,核心启动子区存在 T1462A 和 T1464A 突变,使 HBeAg 表达水平大幅下降。以上突变只影响 HBeAg 的表达,并不影响 HBV 的复制,无法以 HBeAg 来说明 HBV 的复制情况^[8]。有报道指出,HBeAg 的阴性化有利于 HBV 逃过免疫机制^[9]。一项流行病学调查指这类患者占总体患者 21%~40%^[7]。

另外,临床常用酶联免疫吸附试验(ELISA)大规模筛查可疑人群,而并非本文所用的电化学发光法。有报道指出,以电化学发光对 HBeAg 的最低检测限可达比 ELISA 高 10 倍以上^[10],可预期以 ELISA 作大规模筛查,其漏检情况更为普遍,失去提示作用,值得留意。

有关肝功能与乙型肝炎血清标志物及 HBV-DNA 之间的关系,不少数据曾对此作出分析,但结论分歧。本文中亦以 HBV-DNA 的绝对数量及 HBeAg 的定性检测结果分组,以便

观察各基因组水平及同等基因组水平下肝损伤的情况。结果显示不论基因组载量的高低,在相同 HBV-DNA 水平下, HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组的血清 ALT、AST 均差异无统计学意义($P>0.05$),说明 HBeAg 不影响血清 ALT、AST 水平,没有反映肝细胞的实质损伤作用。究其原因,据文献[11-12]的报道,人体对 HBV 的免疫作用主要为细胞免疫,主要作用细胞是 CD4Th 细胞和 CD8-CTL 细胞,虽然 HBeAg 能成为 CTL 的靶抗原,但其不是结构蛋白,因此其作用主要是免疫耐受调节因子,不直接导致肝细胞损伤^[13-15]。因此,HBeAg 并非血清转氨酶异常升高的主因。文中同时研究 HBV-DNA 载量对肝功能的影响,结果说明在 HBeAg 定性检测结果一致的情况下,不论在 HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组里,都存在同样现象:在 HBV-DNA 为阴性或水平较低($<10^5$ copies/mL)时,HBV-DNA 与肝损害致 ALT、AST 在血中存在的关系不明显($P>0.05$);当 HBV-DNA 达到一定水平($>10^5$ copies/mL)时,基因组复制水平与肝功能之间有关($P<0.05$),HBV-DNA 载量较高时,肝损害亦会加重,这与文献[16-18]报道一致。

综上所述,HBV-DNA、HBeAg 和血清转氨酶三者分别从病毒的复制水平、免疫应答和肝细胞损伤反映机体感染 HBV 后的状况。随着 HBeAg 阴性乙型肝炎的发现和乙型肝炎患者肝细胞损害的机制的了解,对三者之间是否存在紧密联系提出了质疑。本研究结果显示,用血清转氨酶和 HBeAg 代替 HBV-DNA 作为检测 HBV 的活动指标并不是完全没有依据,但临床应用中具有很大的局限性,并不能如实反映 HBV 的复制情况及传染性,因此同时作 3 种检查有其必要性。

参考文献

[1] Wm L. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 1997,337(24):1733-1745.
 [2] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
 [3] Mahmood S,Niiyama G,Kamei A,et al. Influence of viral load and genotype in the progression of hepatitis B-associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int,2005,25(2):220-225.
 [4] Suzuki Y,Kobayashi M,Ikeda K,et al. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan[J]. J Med Virol,2005,76(1):33-39.
 [5] Milich DR,Chen MK,Hughes JL,et al. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune re-

sponse to the nucleocapsid: a mechanism for persistence [J]. J Immunol,1998,160(4):2013-2021.
 [6] 苏秋东,毕胜利.慢性乙型肝炎感染自然史[J].中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(6):494-496.
 [7] Funk ML,Rosenberg DM,Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants[J]. J Viral Hepat, 2002,9(1):52-61.
 [8] 张敏,辛绍杰,貌盼勇.乙型肝炎病毒 e 抗原结构、功能及变异的临床意义[J].国际流行病学传染病学杂志,2007,34(1):52-54.
 [9] 高尚秀.乙型肝炎病毒 e 抗原的研究进展[J].医学综述,2011,17(14):2151-2153.
 [10] 吴健郎,蔡丽清,柯吴坚,等.电化学发光定量检测乙肝血清标志物的观察[J].放射免疫学杂志,2006,19(3):253-254.
 [11] Rosenberg SA,Yang JC,Schwartzentruber DJ,et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma[J]. Nat Med,1998,4(3):321-327.
 [12] Dick HM. Monoclonal antibodies in clinical medicine[J]. Br Med J,1985,291(6498):762-764.
 [13] 张国庆,白娜,田巧. HBV DNA 定量与乙肝病毒标志物及肝功能的相关性分析[J].中外医疗,2011,30(3):57-58.
 [14] 蒋永芳,唐伟,马静,等.乙型肝炎病毒 e 抗原对人外周血淋巴细胞的影响[J].医学临床研究,2012,29(7):1264-1266.
 [15] 王建军,赵平,成军,等.乙型肝炎病毒 e 抗原与核心抗原调节靶基因的比较[J].胃肠病学和肝病杂志,2005,14(6):581-583.
 [16] 杨创国,于乐成,陈金军,等.1 686 例慢性乙型肝炎中 HBeAg 阴性与阳性患者临床和病毒学特点比较分析[J].中华内科杂志,2005,44(9):648-651.
 [17] 曾钢,吴斌,李彩东,等.308 例慢性乙肝患者血清 HBV DNA 载量与肝功能及 HBV-M 检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(14):1908-1910.
 [18] 邵咏,袁磊,邢志广.乙肝 HBeAg 与 HBV DNA 载量和血清 ALT 关系及临床意义[J].现代预防医学,2013,40(13):2518-2519.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-30)

(上接第 1783 页)

治疗神经衰弱 320 例[J].中国药业,2012,21(12):97-98.
 [4] 寻知元,杨建立,陈玉辉,等.重度抑郁患者血浆催产素、皮质醇水平与抑郁严重程度关系的初步研究[J].中华行为医学与脑科学杂志,2012,21(2):152-154.
 [5] 翁深宏,王高华.抑郁患者血清皮质醇与血压在应激前后的变化[J].中国行为医学科学,2004,13(5):524-525.
 [6] 周涵辉,高镇松,钟滂江.创伤后应激障碍患者的焦虑抑郁与血浆皮质醇水平观察[J].精神医学杂志,2009,22

(3):201-202.
 [7] 池洪治,李庆禄,姜玉荣,等.神经衰弱与血清微量元素的相关性研究[J].中国医药,2006,1(10):599-600.
 [8] 肖旭曼,梁卫峰,雷素珍.综合疗法治疗神经衰弱临床效果分析[J].中国医药导报,2012,9(8):166-167.
 [9] 简毅荣.神经衰弱患者的心理特征及护理对策[J].临床合理用药杂志,2013,6(31):156-157.

(收稿日期:2016-02-04 修回日期:2016-04-18)