

血清 HBV-DNA 载量与转氨酶值及肝纤维化血清学指标相关性研究

李志方, 林 敏, 黄思聪(广州医学院第二附属医院检验科, 广州 510260)

【摘要】 目的 探讨乙肝患者血清 HBV-DNA 的表达与肝纤维化及转氨酶之间的关系。**方法** 对 361 例标本应用荧光定量 PCR 技术检测 HBV-DNA; 放射免疫法检测该批标本血清中透明质酸(HA)、黏层蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)4 项肝纤维化标志物; 对其中 267 例利用连续监测比色法检测血清中的谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)。**结果** 在 HBV 中低复制组中, 随着患者血清 HBV-DNA 对数均值上升, 肝纤维 4 项的水平浓度也随之递增; 而在 HBV 高复制组里, 患者肝纤维 4 项水平随病毒复制量增加而有所降低。各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。AST、ALT 两种转氨酶在 HBV-DNA 阴性对照组与阳性组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), 但在 HBV-DNA 表达阳性的各组中, 乙肝患者血清 HBV-DNA 的载量与 AST、ALT 两种转氨酶的浓度无关($P > 0.05$)。**结论** HBV 复制与肝纤维化血清学指标存在相关性, 但不呈直线相关关系; 乙肝患者的 HBV-DNA 复制状态尚不能与肝转氨酶有密切联系。

【关键词】 HBV-DNA; 乙型肝炎; 肝纤维化; 肝转氨酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.07.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)07-0813-02

The correlation between HBV DNA levels, transaminase contents and liver fibrosis markers LI Zhi-fang, LIN Min, HUANG Si-cong (The Laboratory Department, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260)

【Abstract】 Objective To investigate not only the relativity between the expression of HBV-DNA in serum and liver fibrosis in hepatitis B patients, but also the relationship between transaminase and the two former concepts. **Methods** We investigated the application of nuclear amplification by fluorescence quantitative PCR in detecting HBV-DNA, and the adoption of radioimmunoassay for testing 4 liver fibrosis markers including serum hyaluronic acid (HA), sticky layer protein (LN), Ⅲ procollagen (PⅢNP), Ⅳ collagen (Ⅳ-C) in 362 cases. We also tested the utilization of continuous monitoring method and colorimetric method for measuring serum transaminase in 267 cases. **Results** In the low HBV viral replication group, with the increase of the serum HBV-DNA on the average, the level of concentration of liver fiber index increased; in the high HBV viral replication group, the four index of liver fibrosis in patients decreased when the amount of viral liver replication increased. There was a significant difference between the results in each group ($P < 0.05$). The difference of transaminase including AST, ALT in patients between the HBV-DNA negative control group and positive group was significant ($P < 0.05$), but in each of the HBV-DNA positive expression groups, serum HBV-DNA levels from hepatitis B patients had no relationship with the concentration of the two kinds of transaminase ($P > 0.05$). **Conclusion** Correlation exists between HBV replication and the serology index of liver fibrosis, but it is not a linear correlation; the status of HBV-DNA replication in patients is not yet closely linked to the liver transaminase.

【Key words】 HBV-DNA; hepatitis B; liver fibrosis; liver transaminase

肝纤维化是一种肝内弥漫性细胞外基质(hepatic extracellular matrix, ECM)过度沉积的病理过程。HBV 持续感染是引起肝炎肝硬化的主要原因^[1]。我国 HBV 感染率高, 而 HBV 在肝细胞内复制引起一系列病理损伤是导致肝炎肝硬化的始动因子。乙肝病患者外周血中 HBV-DNA 载量是病毒复制活跃最直接可靠的标志, 其载量能直接代表患者病毒血症水平。因而患者 HBV-DNA 载量与肝损伤的关系一直是学界讨论的一个热门话题。

同时由于 HBV 复制会启动或激发肝脏组织炎症反应, 而造成肝细胞的损害。而目前常规的肝功能检查仍以谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)为常用指标, 探讨转氨酶的水平是否较好的反应这一过程的进行, 对于临床的决策会有良好的诊断指向性。为寻找能动态观察肝纤维化及损害程度的指标, 作者选择 362 例临床确诊为乙型肝炎患者为研究对象, 同时检测各个患者血清标本中透明质酸(HA)、黏层蛋白(LN)、

Ⅲ型前胶原氨端肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、HBV-DNA 的含量以及其中 275 例标本的 AST、ALT 两种转氨酶, 来观察其相互之间的关系。

1 材料与方

1.1 研究对象 标本来自 2008 年 3 月至 2009 年 7 月期间本院门诊及住院患者 362 例; 所选病例均符合 2000 年 9 月西安会议病毒性肝炎防治方案修订的诊断标准^[2], 排除其他内外科疾病及非 HBV 混合或重叠感染及其他肝脏疾病的乙肝病患者。

1.2 检测方法 HBV-DNA: 采用荧光定量 PCR 技术检测, 仪器为美国 PE 公司的 PE7700 定量 PCR 仪, 试剂由深圳匹基生物有限公司提供。肝纤维 4 项(PⅢNP、Ⅳ-C、LN、HA)采用放射免疫技术检测, 仪器为 SN-67 全自动双探头放射免疫 γ 计数仪, 其中 PⅢNP 检测试剂购自北京北方生物技术研究所, 其余由上海海军研究所提供。ALT、AST 检测用连续监测比

色法,仪器为日立 7600 生化仪,试剂购自中生北控生物科技股份有限公司。所有操作均严格按照试剂说明书及仪器标准操作规程进行。

1.3 统计学方法 针对患者测定血清 HBV-DNA 所得结果,按血清 HBV-DNA 水平分为 5 组,分别是:阴性 A 组(<3)、低效价 B 组(≤3~<5)、中效价 C 组(≤5~<6)、中高高效价 D 组(≤6~<8)、高效价 E 组(≥8),各项指标间应用 SPSS11.5 统计软件进行结果分析。

2 结 果

2.1 患者血清 HBV-DNA 与肝纤维 4 项的关系 见表 1。在中低效组(A、B、C 组)里,随着患者血清 HBV-DNA 对数均值上升,患者肝纤维 4 项的水平浓度也随之递增,而在病毒中高复制组(D、E 组)里,患者肝纤维 4 项水平反而随病毒复制量增加而出现相对降低的现象,各组 HA、LN、PⅢNP、Ⅳ-C 经秩和检验差异均有统计学意义($P<0.05$)。

其中在 HA、LN、Ⅳ-C 3 项指标中,D 组与 E 组,D 组与 A 组,E 组与 A 组的两两比较差异无统计学意义($P>0.05$);而在 PⅢNP 指标里,D 组数值比较高,D 组与 A 组,D 组与 E 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),D 组与 C 组之间则差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 血清 HBV-DNA 各组与血清肝纤维化 4 项指标之间的关系

组别	n	平均秩和(ng/mL)			
		HA	LN	Ⅳ-C	PⅢNP
A—	130	166.07	159.92	163.40	140.35
B+	108	195.43	197.03	186.48	187.99
C+	30	230.72	227.88	224.23	225.82
D+	75	148.72	160.66	168.49	201.26
E+	18	151.13	126.69	128.88	169.94

注:—表示阴性,+表示阳性。

2.2 病毒复制水平与转氨酶的关系 见表 2,患者 ALT 在 HBV-DNA 阴性组(A 组)与阳性组(B、C、D、E 组)之间差异有统计学意义($P<0.05$),A 组与其他各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。而 HBV-DNA 表达阳性的各组中,乙肝患者 ALT 之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

乙肝患者 AST 在 HBV-DNA 阴性组(A 组)对照组与阳性对照组(B、C、D、E)之间的对比中,其中 A 组与 E 组差异无统计学意义($P>0.05$),与 B、C、D 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。而在阳性各组中,AST 两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 HBV-DNA 各组与肝转氨酶的关系($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AST(U/L)	ALT(U/L)
A	100	23.81+10.98	25.90+14.03
B	92	29.20+10.98	37.89+16.53
C	20	30.00+8.18	42.10+18.92
D	46	32.80+16.87	41.54+26.04
E	17	32.00+11.99	41.86+28.20

3 讨 论

肝纤维化形成多在慢性肝病的基础上发生,发病机制复杂。已有研究表明肝纤维化的关键步骤为某些因素导致肝星状细胞活化及随之发生的肝脏细胞外间质(ECM)合成增加和(或)降解减少从而导致 ECM 过度沉积^[3]。而作为肝纤维化

的诊断指标,现仍以组织病理学检查为最可靠,但由于肝活检为创伤性检查,所取标本有其局限性,难以常用于随访和动态观察;再者就临床决策而言,一个能反映纤维化发生的检验比仅仅体现纤维化沉积的检验更具有临床指导意义。因此,关键在于多少纤维化已经出现,而在于纤维化是否仍在形成发展中。现已有相当研究说明血清肝纤维化指标能很好反映肝纤维化的发生与发展^[5-7]。故作者试图通过对乙肝患者血清标本中 HA、LN、PⅢNP、Ⅳ-C 的检测,作为评价其肝纤维化的标准。

普遍认为,引起肝功能损害肝炎肝硬化的原因主要是由于 HBV 的持续感染。而患者血清中 HBV-DNA 定量 PCR 法则可真实反映 HBV 感染、复制及病程变化。病毒在复制过程中会激发机体免疫系统对病毒的清除,同时也引发了机体的免疫病理反应,导致肝细胞损伤、破坏,随之发生的是肝脏组织的修复及纤维化,这一过程呈波动性或持续进行性^[8],可以解释为病毒复制水平与肝脏损伤、修复间的动态平衡。而对于乙肝患者,其纤维化程度是否与病毒的复制量有关,迄今为止国内外学者仍然持不同意见^[9-12]。

本研究发现 362 例乙肝患者血清 HBV-DNA 水平与血清肝纤维化指标之间存在一定的相关性,但不存在明显直线趋势的相关关系。在 HBV 低复制组中,随着患者血清 HBV-DNA 对数均值上升,肝纤维 4 项的水平浓度也随之递增;而在病毒中高复制组里,患者肝纤维 4 项水平随病毒复制量增加而有所降低。

出现上述结果,可能原因为:(1)病毒复制与肝纤维化反映了疾病过程和发病机制的不同阶段,例如在免疫耐受期,病毒复制活跃但肝脏损伤不明显,而在免疫清除期,肝脏炎性反应活动严重,部分病毒被清除,可血清 HBV-DNA 载量却不高。(2)由于肝细胞反复感染,肝细胞被破坏导致数量减少,HBV 失去部分复制有关场所;或者由于早期纤维化阶段因机体免疫清除作用,HBV 复制已经不再活跃。(3)病毒复制不是肝脏损伤的惟一因素,还应该考虑机体的其他免疫病理因素,病毒的存在及其复制仅仅只是免疫病理损伤的启动因子,两者并不存在明显的直线正相关关系。

作为肝功能评价,ALT、AST 是现阶段临床应用最广的指标;ALT 主要存在于肝细胞浆中,AST 则主要存在于肝细胞线粒体内,两者在正常血清中含量均较少。目前认为在排除肝外脏器官病变的情况下,两种血清转氨酶的升高可直接反映肝细胞的损伤情况。

本次研究对 265 例患者进行血清 HBV-DNA 载量和 ALT 及 AST 水平联合检测,结果显示患者 ALT、AST 两种转氨酶在 HBV-DNA 阴性对照组与阳性组之间存在显著性差异,但在 HBV-DNA 表达阳性的各组中,乙肝患者血清 HBV-DNA 载量与转氨酶的浓度无关。表明肝细胞的损害程度与 HBV 在宿主体内复制水平并无直接正相关关系。

患者肝细胞损害程度主要取决于机体对肝炎病毒及其抗原的异常免疫反应^[13]。宿主的免疫反应减弱,对肝细胞的损害也就相应较轻,在某些诱因下,宿主的免疫应答加强,以攻击患者肝细胞内的病毒,肝细胞也随之受到损害,这个过程中宿主的免疫能力起决定性作用,病毒的存在及其复制仅是引起宿主免疫应答的启动因子。因此,临床上不能仅靠血清 ALT、AST 来判断 HBV 复制程度,而应结合 HBV-DNA 含量水平综合分析,以指导治疗。

本研究表明,HBV 复制与肝纤维化血清学指标存在相关性,但不呈直线相关关系;而患者 AST、ALT 两种转氨酶分析结果提示慢性乙肝患者肝功能状态与血清(下转第 816 页)

病,以女性多见^[3]。自身免疫性疾病中存在一些对疾病诊断具有高度特异性的自身抗体,ANA 是以哺乳动物的细胞核成分为靶抗原的自身抗体的总称,是风湿免疫性疾病的重要血清学指标。ENA 是可提取核抗原的总称,主要包括抗-Sm、抗-nRNP、抗-SS-A、抗-SS-B、抗-Scl-70、抗-Jo-1 等 6 种,不同特性的抗 ENA 抗体在各种自身免疫性疾病种的阳性率有明显差异^[4]。

本文统计结果显示,在 ANA 的核型与抗-ENA 抗体的关系方面,抗-ENA 抗体类型同 ANA 荧光核型之间没有绝对的规律可言。尽管荧光染色模型具有一定的提示作用,但一种自身抗体可以出现不同的荧光染色模型,不同的自身抗体也可以出现相同的荧光染色模型,仅根据荧光染色模型特点来推断自身抗体的特异性是出现错误判断的重要原因^[5]。本次统计,抗-SS-A 和抗-SS-B 阳性时,ANA 荧光核型主要为颗粒型,其他核型如均质型、胞浆型也占较高比例,与邻近地区报道基本一致^[6]。其中有 15 例 ANA 阴性。这可能与 SS-A 抗原在细胞内的浓度较低有关^[7]。抗-Sm、抗-nRNP 阳性时,ANA 荧光核型也主要集中在颗粒型,且在猴肝与 Hep-2 两种抗原基质中反应强度一致^[8],作者观察发现根据具体情况具有一定差异。抗-Scl-70 阳性在核仁型的表达中较高,这是由于 Scl-70 抗原是 DNA 拓扑异构酶,其在核仁中的浓度较高。抗-Jo-1 阳性时 ANA 的核型比较分散,并且漏检率为 25%,说明 ANA 在此方面的敏感性较低。另外,在本次研究中统计了 124 例 ANA 阳性的病例,其中抗-ENA 抗体阳性率为 71.8%,说明抗-ENA 抗体谱中包含的项目还不够完善,还有待扩展。以上结果显示,抗-ENA 抗体类型与 ANA 荧光核型之间没有绝对的规律,不能单纯依据荧光核型来推断抗-ENA 抗体的具体类型。在检测 ANA 的基础上,有必要进行抗-ENA 抗体的检测和分析,有益于自身免疫性疾病的诊断、分型和治疗。总之,

ANA 和抗-ENA 抗体联合检测为临床提供了可靠的鉴别依据^[9]。

参考文献

[1] 朱洪,巫翠萍,黄丽云. 自身免疫疾病中多种自身抗体的检测及分析[J]. 海南医学院学报,2009,15(3):211-214.

[2] 周薇,李建新,杜静,等. 自身抗体多项联合检测对自身免疫性疾病诊断的意义[J]. 实验与检验医学,2009,14(2):120-148

[3] 张毅,储以微. Th17 与自身免疫病[J]. 复旦学报,2008,35(1):145-147.

[4] 胡坚. 原发性免疫缺陷病与自身免疫现象[J]. 实用儿科临床杂志,2007,23(21):1605-1607.

[5] 王兰兰. 自身抗体检测的应用与质量保障原则[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(10):987-990.

[6] 黄雪梅,蒲泽晏,刘方久. ANA、ENA、dsDNA 抗体在自身免疫性疾病中的敏感性及相关性分析[J]. 西部医学,2010,22(3):534-537.

[7] 邓学新,曲吕华. 818 例自身免疫病抗 ENA 抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 临床检验杂志,2005,23(4):302-303.

[8] 马东来,张少静,文夫瑞德·斯特克. 自身抗体及其免疫荧光模式[M]. 北京:北京科学技术出版社,2000.

[9] 陈滢,张迎梅,陆俊忠,等. 自身抗体联合检测在自身免疫性疾病诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2008,12(5):24-26.

(收稿日期:2010-12-19)

(上接第 814 页)

HBV-DNA 载量并不直接相关。这更加突显出对患者进行首次全面评价的重要性。我国 HBV 感染率高,且每年慢性乙型肝炎患者发展为肝硬化的发生率高达 14%;在临床治疗中应该正确理解患者外周血 HBV-DNA、转氨酶与血清肝纤维指标的的内涵和他们之间的关系,不能仅凭病毒复制水平高低而进行单一的抗病毒治疗,应该联合转氨酶,肝纤维 4 项等检查进行综合考虑患者病程,在抗病毒治疗的过程中注意加强护肝处理及抗纤维化的治疗,以改善患者病情。

参考文献

[1] 程明亮,陈永平. 传染病学[M]. 北京:科学出版社,2008:80-81.

[2] 中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.

[3] 姜春萌,刘成,刘平. 肝纤维化过程中肝星状细胞的进展[J]. 中华消化杂志,2000,20(4):258-260.

[4] 张文胜,王宝恩,王泰龄,等. 慢性乙型肝炎肝纤维化无创性诊断模型的建立[J]. 中华肝脏杂志,2006,7(2):86-88.

[5] 刘杰,王吉耀,陆晔. 血清纤维化指标对肝纤维化诊断价值的研究[J]. 中华内科杂志,2006,45(6):475-477.

[6] 江湘宁,王功遂,尹建军. 慢性乙型肝炎患者血清 HBeAg 和 HBV-DNA 水平与肝组织病理关系探讨[J]. 实用肝脏病杂志,2004,7(2):86-88.

[7] 吴艾萌,周曙岚,汤红,等. 慢性乙型肝炎、肝硬化患者的多普勒超声和血清肝纤维化标志物检测的临床研究[J]. 安徽医药,2006,10(10):768-770.

[8] 蔡文品,赵春,吴慧洁,等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝纤维化指标的相关性[J]. 实用医学杂志,2009,25(1):72-73.

[9] Wong DK, Yuan MF, Tse E, et al. Related Articles, Detection of intrahepatic hepatitis B virus DNA and correlation with hepatic necroinflammation an fibrosis[J]. J Clin Microbiol,2004,42(9):3920-3924.

[10] 陈然峰,陈国军,黄晓文,等. HBVDNA 的表达与肝纤维化形成的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志,2002,18(6):354-355.

[11] Heo JH, Heo J, Kwon DS, et al. Relationship between serum HBV-DNA levels and histology in chronic hepatitis B [J]. Korean J Gastroenterol,2003,42(3):220-225.

[12] 曾碧红,温帆渊,叶彩丽,等. 慢性肝炎患者乙型肝炎病毒复制与肝纤维化标志物的关系[J]. 检验医学与临床,2008,7(5):398-399.

[13] 刘伟,赵伟,罗婵. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 负荷与其肝组织炎症活动度的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志,2002,18(1):26-27.

(收稿日期:2010-12-19)