

乙型肝炎患者血清中抗原与病毒 DNA 关系探讨

张高明, 张国明, 马小波, 葛林, 李明安, 胡礼仪 (江苏省沭阳县人民医院检验科 223600)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎(下称乙肝)患者血清中乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)、乙肝病毒表面抗原(HBsAg)与乙肝病毒(HBV)DNA 之间的关系。方法 选取 723 例 HBsAg 阳性的乙肝患者血清标本, 分别用微粒子酶免疫分析法(MEIA)检测 HBeAg、HBsAg, 用核酸扩增荧光定量聚合酶链反应法检测 HBV-DNA。结果 HBeAg 阳性标本中, HBV-DNA 阳性率为 60.9%; HBeAg 阴性标本中, HBV-DNA 阳性率为 37.19%, 二者差异有统计学意义($\chi^2 = 19.11, P < 0.01$)。不同浓度组 HBeAg 和 HBV-DNA 检测结果比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 36.67, P < 0.01$)。不同载量 HBV-DNA 组 HBeAg 含量相差显著, HBV-DNA 载量高, HBeAg 含量也高, 但 HBsAg 量差异无统计学意义。结论 HBsAg 的浓度对乙肝的诊断治疗价值, HBeAg 仍是反映乙肝复制活跃的一个可靠的指标, 但是 HBeAg 阴性组 HBV-DNA 的阳性率为 37.19%, 说明仅检测 HBeAg 还是不够的, 同时检测 HBeAg、HBV-DNA 对乙肝患者的判断、治疗方案的选择和疗效判断有一定的指导意义。

【关键词】 乙型肝炎; 乙型肝炎病毒 e 抗原; HBV-DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.20.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)20-2462-02

The relationship between serum HBeAg and HBV-DNA in the patients infected HBV ZHANG Gao-ming, ZHANG Guo-ming, MA Xiao-bo, GE Lin, LI Ming-an, HU Li-yi (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Shuyang County, Jiangsu 223600, China)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between serum HBeAg and HBV-DNA contents. Methods The HBeAg, HBsAg levels of 723 serum samples with positive HBsAg were tested by microparticle enzyme immunoassays (MEIA) and HBV-DNA was tested by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). Results In the HBeAg positive samples, the positive percentage of HBV-DNA was 60.9%, and in the HBeAg negative samples, the positive percentage of HBV-DNA was 37.19%, which showed significant difference ($\chi^2 = 19.11, P < 0.01$) between HBeAg and HBV-DNA. The differences between HBeAg in a series of concentration and the test results of HBV-DNA were also significant ($\chi^2 = 36.67, P < 0.01$). Conclusion Compared with HBeAg, HBV-DNA is a better marker for detecting the replication of HBV, which would be helpful for the HBV clinical therapy.

【Key words】 hepatitis B virus; HBeAg; HBV-DNA

乙型肝炎(下称乙肝)病毒(HBV)是一种嗜肝病毒, 目前我国有乙肝病毒携带者约 1.2 亿人, 其传染性和病死率均居高不下, 严重危害人们的健康^[1], 给家庭带来沉重的经济负担。如何诊断与疗效观察成为临床最关心的问题, 现在用定量的方法测乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)、乙肝病毒表面抗原(HBsAg)与 HBV-DNA 的定量进行比较, 以探讨它们之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月至 2010 年 6 月本院门诊和住院乙肝病例 723 例, 并符合 2000 年 9 月中华医学会肝病学会和中华医学会感染学会联合制定的《慢性乙型肝炎诊治指南》^[2] 中的诊断标准, 其中男 561 例, 女 162 例, 年龄 12~83 岁, 平均 (37±12.96) 岁。

1.2 检测方法 微粒子酶免疫分析法采用美国 Abbott 公司生产 AXSYS SYSTEM 全自动免疫分析仪, 试剂由该公司配套提供, 结果判定时 HBeAg ≥ 1 S/CO 为阳性。荧光定量 PCR (FQ-PCR) 法采用枫林公司生产 FTC-200 型实时荧光 PCR 系统, 试剂由上海复星有限公司提供, 结果判定时 HBV-DNA ≥ 1 000 IU/mL 为阳性。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计学软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析, 化疗前后比较用 Wilcoxon 配对秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBeAg 与 HBV-DNA 之间的关系 HBeAg 阳性组与阴

性组 HBV-DNA 阳性率及 HBV-DNA 含量的对数差异 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性血清 HBV-DNA 之间的关系

HBeAg	n	HBV-DNA			
		阳性	阳性率(%)	P	含量(对数)
阳性	602	367	60.90	0.000	5.89±1.71
阴性	121	45	37.19		4.99±1.54

2.2 HBV-DNA 和 HBsAg、HBeAg 量之间的关系 在 HBV-DNA 含量对数大于 6 组与 3~6 组、小于 3 组 HBsAg 含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 后两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HBeAg 的含量在 3 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 HBV-DNA 和 HBsAg、HBeAg 之间的关系

HBV-DNA	HBsAg 均值	HBeAg 均值
含量(对数)	n	
>6	192	161.52
3~6	268	183.18
<3	263	189.62

2.3 不同浓度组 HBeAg 与 HBV-DNA 检测结果的关系见表 3。

表 3 不同浓度组 HBeAg 与 HBV-DNA 检测结果的关系

HBeAg 含量	n	HBV-DNA 含量(对数)[n(%)]			HBV-DNA		
		<3	3~6	>6	阳性	阳性(%)	含量(对数)
<1	132	75(56.8)	32(24.2)	18(13.6)	46	34.85	4.99±1.54
1~10	195	111(56.9)	58(29.7)	29(14.9)	78	40.00	5.01±1.32
10~100	162	63(47.7)	59(36.4)	33(20.4)	87	53.70	5.29±1.59
>100	234	34(14.5)	66(28.2)	137(58.5)	201	85.89	6.47±1.66

注: HBeAg 组 P 值为 0.0001。

3 讨论

HBV 慢性感染的自然病程一般是感染人体后血清 HBeAg 和 HBsAg 阳性, HBV-DNA 水平较高即免疫耐受期; 随着宿主免疫活性的激活, 血清 HBV-DNA 水平逐渐降低, HBeAg 慢慢消失, 抗-HBe 出现丙氨酸氨基转移酶(ALT)波动较剧烈, 肝组织病变最明显即免疫清除期; 而后病毒水平进一步降低, 最后低于检测水平, ALT 稳定正常, 肝组织非活动病变成成为携带者即病毒残留期。然而随着自然与药物的影响, 病毒发生了变异, 与肝细胞染色体整合。

HBV-DNA 的复制分成两个阶段, 第一阶段, 在肝细胞核内, 以复制中间体 cccDNA 为模板转录 3.5 kb 前基因组 RNA (pgRNA) 和 mRNA, 然后转运至胞质。第二阶段, mRNA 转译病毒蛋白和乙肝核心抗原(HBcAg)、HBeAg、HBsAg、P 蛋白、X 蛋白。pgRNA 反转录为负链 DNA 再合成正链 DNA 形成双链 rcDNA, 部分 rcDNA 进入内织网与蛋白一起组装成 Dane 颗粒被转运出细胞, 部分 rcDNA 进入细胞核成为 cccDNA 维持“cccDNA 池”, 因此在肝内就形成了 cccDNA 的“稳态”结构, 平均每个受感染的肝细胞含有 5~50 个 cccDNA 分子^[3-5]。

HBeAg 的产生是先由前 C 基因与 C 基因一起产生的一个 p25 前体多肽链, 作为 HBeAg 的前体; 再经转膜作用及自身消化剪去头尾的两段, 最后形成 HBeAg。HBeAg 是一种分泌性蛋白, 并不参与病毒的复制、包装、传染, 但能阻断 CTL 对 HBV 相关表位的免疫活性, 将免疫攻击由感染的肝细胞转移开促使病毒的持续感染。它伴随着乙肝的复制产生, 是乙肝复制的指标。本文中 HBeAg 阳性组 HBV-DNA 阳性率 60.9%, 平均含量为 (5.89±1.71) Log₁₀(copy/mL), 高于阴性组阳性率 37.19%, 平均含量 (4.99±1.54) Log₁₀(copy/mL)。从 HBeAg 的定量来看, 随 HBeAg 浓度的增加, HBV-DNA 的阳性率、含量也相应的增加, 提示 HBeAg 的含量与 HBV-DNA 含量呈正相关, 与文献报道^[6]相符, 符合慢性乙肝的自然病程。然而, 在 HBeAg<1 组与 1<HBeAg<10 的低浓度组分别出现 11.6%、12% 的标本, 其 HBV-DNA 拷贝数大于 6 与其乙肝的自然病程不符, 其原因可能为: (1) 前 C 区变异, 特别是 G1896A 的点突变, 使 AA28 的色氨酸转换为终止密码子, 从而停止 HBeAg 的合成。(2) 基本 C 启动子变异, BCP/ntA1762T、ntG1764A 的双变异可使 HBeAg 的表达减少约 70%, 同时可能增加病毒的复制。由于病毒的变异导致慢性乙肝患者体内缺乏可溶性 HBeAg 的干扰或抑制致敏 TC 细胞更容易识别肝细胞膜上的 HBcAg 靶位, 产生较强的免疫攻击引起较重的肝细胞损伤, 有研究发现 HBeAg 阴性, 其病毒水平越高病变越重。因此, HBeAg 阴性者更应引起临床的注意并

定期检查, 若发现病毒量较高应及时治疗, 以免贻误病情。

在 HBeAg 阳性组, 仍有 35.4% 的患者 HBV-DNA 低于检测下限, 其原因可能为: (1) 病毒的复制分成两个阶段, 第一阶段, 在肝细胞核内, 以复制中间体 cccDNA 为模板转录 3.5 kb 前基因组 RNA (pgRNA) 和 mRNA, 然后转运至胞质。第二阶段, mRNA 转译病毒蛋白如 HBcAg、HBeAg、HBsAg、P 蛋白、X 蛋白^[6]。pgRNA 反转录为负链 DNA 再合成正链 DNA, 形成双链 rcDNA, 部分 rcDNA 进入内织网与蛋白一起组装成 Dane 颗粒被转运出细胞, 部分 rcDNA 进入细胞核成为 cccDNA 维持“cccDNA 池”。药物如核苷类的作用机制是通过影响病毒聚合酶的合成, 从而抑制 DNA 的合成, 然而这些药物并不能进入肝细胞核, 因此病毒的第一步复制无效, 同时也不影响 mRNA 对蛋白的转译, 因此出现 HBeAg 与 HBV-DNA 分离的现象。实际上肝细胞核内的病毒仍在不停地复制, 一旦停药, 又可出现高浓度的 HBV-DNA, 这也许是核苷类药物一个缺点, 不能从根本上停止复制, 因此 HBeAg 更能从根本上反映 HBV 的转归。(2) 病毒 DNA 与宿主肝细胞基因^[7]整合, 整合后不仅分泌 HBsAg, 也分泌 HBeAg。(3) 病毒残留的早期, 仅有少部分病毒复制, 由于检测方法的差异, 血清中病毒检测不到, 而 HBeAg 能检出, 呈弱阳性。

HBsAg 随 HBV-DNA 拷贝数的增加其浓度降低, 与报道的不符^[8], 其原因可能为随着乙肝的感染, 病毒不断与肝细胞整合, 这时肝内有复制型与整合型的病毒, 整合型的病毒也可以分泌 HBsAg。

综上所述, 临床上仅以 HBV-DNA 来判断慢性乙肝的疗效是有缺陷的, 对于 HBeAg 阳性者同时检测 HBeAg 更有意义。

参考文献

- [1] 杨广辉, 谭明德, 谢玉桃, 等. 干扰素及拉米夫定抗乙型肝炎病毒的体外实验研究[J]. 疾病控制杂志, 2004, 8(3): 209-211.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫学会、肝脏学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [3] Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells[J]. Cell, 1986, 47(3): 451-460.
- [4] Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis Blike virus by reverse transcription of an RNA intermediate [J]. Cell, 1982, 29(2): 403-415.
- [5] Wu TT, Coates L, Aldrich CE, et al. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway [J]. Virology, 1990, 175(1): 255-261.
- [6] 秦梅, 陆贵兰. 乙肝两对半与 FQ-PCR 的联合检测结果相关性探讨[J]. 医学导刊, 2008, 5(1): 97-99.
- [7] 王小飞, 刘华瑞, 王锦蓉, 等. 乙型肝炎和肝癌患者乙型肝炎病毒前 C 区 1896 位点突变的研究[J]. 中华传染病杂志, 1996, 14(1): 11-14.
- [8] 张正国. 乙肝病毒血清标志物与 HBV-DNA 定量检测的相关性分析[J]. 中国现代医生, 2007, 45(19): 130-131.