乙型肝炎病毒核酸荧光定量及血清标志物与肝功能检测的临床意义

彭红波¹, 刘亚丽², 陈旭姿³ (1. 广州市番禺区何贤纪念医院检验科 511400; 2. 广州市民政局精神病院老人区 510430; 3. 广西壮族自治区桂林市 75660 部队门诊部 541002)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染者 HBV DNA 检出情况及其与血清病毒标志物及肝功能在临床应用的意义。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 296 例不同血清学类型的 HBV 感染者血清中的 HBV DNA, 同时检测 HBV 血清标志物与肝功能。**结果** 99 例 HBeAg(+) 标本中 HBV DNA 阳性率为 100%, 平均 HBV DNA 含量为 1.21×10^7 copy/mL, 其 HBV DNA 检出率和含量与 HBeAg(-) 模式的检出情况比较差异有统计学意义($P < 0.01$); HBsAg(+) 与 HBsAg(-) 模式比较, HBV DNA 检测结果差异有统计学意义($P < 0.01$); 肝功能正常组与肝功能异常组 HBV DNA 检出率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。58 例 HBsAg(-) 且肝功能又正常的标本中检出了 4 例 HBV DNA 阳性。**结论** 实时 FQ-PCR 定量检测 HBV DNA 与 HBV 血清标志物及肝功能指标联合应用可使诊断更准确, 治疗更合理。

【关键词】 乙型肝炎病毒; HBV DNA; 血清标志物; 实时荧光定量聚合酶链反应; 肝功能

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.18.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)18-2260-02

The clinical significance of HBV-DNA combine with liver function and HBV serm makers PENG Hong-bo¹, LIU Ya-li², CHEN Xu-zi³ (1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital, Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China, 2. Mental Hospital of Civil Affairs Bureau in Guangzhou, Guangdong 510430, China, 3. Out-Patient Department of 75660 Troop, Guilin, Guangxi 541002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the positive rat of HBV DNA, and the value of detection with HBV DNA, sera viral marker, five index of hepatitis B and hepatic function in clinical. **Methods** 296 cases with HBV were detected about HBV-DNA, sera viral markers and hepatic function by real-time fluorescence quantitative PCR(FQ-PCR). **Results** 99 cases were diagnosed as HBeAg(+) carrying HBV-DNA(1.21×10^7 copy/mL), and the positive rat of HBV-DNA was 100%. 4 of 58 cases with HBsAg(-) were found to be positive HBV-DNA infection. The positive rat of HBV-DNA in the patients with HBeAg(-) was significantly lower than t patients with HBeAg(+)($P < 0.01$). The positive rat of HBV-DNA in the patients with normal hepatic function was significantly lower than patients with abnormal hepatic function($P < 0.01$). **Conclusion** FQ-PCR is a valuable tool for the detection of HBV in the clinical, and it can be used to detect the status of HBV-DNA in a short time. It is better to diagnose type B hepatitis by HBV-DNA combined other detections, such as sera viral marker, five index of hepatitis B and hepatic function at the same time.

【Key words】 hepatitis virus; HBV-DNA; five index of hepatitis B; FQ-PCR; hepatic function

在我国 60% 的人感染过乙型肝炎病毒(HBV), 在现患慢性肝炎患者中约 80% 以上为慢性乙型肝炎患者, 而受 HBV 慢性感染的人群患原发性肝癌(HCC)的相对危险性至少增加 300 倍。所以, 对 HBV 的防治仍然是我国健康与传染病控制中的首要问题。目前临床多用 HBV 血清标志物和 HBV DNA 的定量检测来反映 HBV 的复制情况, 为判断病情和评价抗病毒药物疗效提供依据^[1]。本文对荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 HBV DNA, 与 HBV 血清标志物[乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe)、乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc)]不同模式及肝功能检测结果进行对比分析探讨, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 296 例 HBV 感染者血液标本, 来自本院 2008 年 1~6 月传染科门诊及住院患者以及无症状体检者。

1.2 试剂与仪器 FQ-PCR 检测试剂盒为上海科华生物技术有限公司产品。乙型肝炎血清标志物检测试剂盒由英科新创

公司生产的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒。仪器: BIOER MiniOpticon 基因扩增仪, MK3 酶标分析仪, Beckman 全自动生化分析仪。

1.3 方法 HBV 血清标志物用 ELISA 法测定, 按试剂盒说明操作, 结果由酶标仪判定。肝功能用 Beckman 全自动生化分析仪测定。HBV DNA 用 FQ-PCR 检测。HBV DNA 定量以 1.00×10^3 copy/mL 为判定阳性的标准, $< 1.00 \times 10^3$ copy/mL 判为阴性, $> 1.00 \times 10^3$ copy/mL 判为阳性。

1.4 统计学处理 数据采用 PEMS3.1 统计分析软件处理。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同血清学模式 HBV DNA 检出结果 296 例标本中, HBsAg 阳性 238 例, HBeAg 阳性 99 例, HBV DNA 阳性 179 例。99 例 HBeAg 阳性标本 HBV DNA 阳性, 平均 HBV DNA 含量为 1.21×10^7 copy/mL, 其 HBV DNA 检出率与 HBeAg 阴性模式比较差异有统计学意义($\chi^2 = 94.7597, P < 0.01$);

HBsAg、HBeAg 阳性标本中 HBV DNA 平均含量与 HBsAg、抗 HBe、抗-HBc 阳性标本中 HBV DNA 平均含量比较, 差异有统计学意义($t=27.9419, P<0.01$)。238 例 HBsAg 阳性标本中 HBV DNA 检出率与 HBsAg 阴性模式比较差异有统

计学意义($\chi^2=86.6223, P<0.01$)。HBsAg、抗-HBc 阳性标本中 HBV DNA 平均含量与仅抗-HBc 阳性标本中 HBV DNA 平均含量比较, 差异有统计学意义($t=340.5369, P<0.01$), 见表 1。

表 1 不同 HBV 感染模式与 HBV DNA 定量结果比较

HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc	n	HBV-DNA			
						阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	平均值(copy/mL)
+	-	+	-	+	77	77	0	100.0	(1.23±0.18)×10 ⁷
+	-	+	-	-	22	22	0	100.0	(1.19±0.16)×10 ⁷
+	-	-	+	+	98	61	37	62.2	(2.35±0.21)×10 ⁶
+	-	-	-	+	41	15	26	36.6	(1.21±0.22)×10 ⁵
-	-	-	-	+	28	2	26	7.1	(3.60±0.15)×10 ³
-	+	-	-	+	30	2	28	6.7	(3.20±0.24)×10 ³

注: +表示阳性; -表示阴性。

2.2 HBV DNA 检出率与肝功能关系 肝功能正常与异常患者血清标本均可检出 HBV DNA 阳性, 但两组检出率相比较差异有统计学意义($\chi^2=112.0152, P<0.01$), 见表 2。58 例 HBsAg 阴性, 且肝功能又正常的标本中检出了 4 例 HBV DNA 阳性。

表 2 肝功能与 HBV DNA 检出率

肝功能	n	HBV DNA		
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
正常	110	23	44	20.9
异常	186	156	12	83.9

3 讨 论

研究表明, FQ-PCR 测定的 HBV DNA 的阳性率和含量与 HBV 标志物的不同血清学模式和肝功能结果有关, 但有时并不一致。过去, ELISA 检测 HBV 血清学标志物被广泛地应用于诊断 HBV 的感染状况^[2]。以往的经验以为, 血清 HBeAg 阳性是 HBV 复制活跃、传染性强的标志, HBeAg 的阴转或抗-HBe 出现表示 HBV 感染的缓解或 HBV 的清除^[3]。本研究结果表明, HBeAg 阳性患者血清中 HBV DNA 阳性率及含量显著高于其他患者($P<0.01$); 但 HBeAg 阴性时, 抗-HBe 阳性或阴性组也检出了高水平的 HBV DNA。HBeAg 阳性组的 HBV DNA 水平显著高于其阴性组, 证实了 HBeAg 阳性是病毒在体内高度复制的指标之一。本研究中 HBsAg 阴性组检出了 4 例 HBV DNA 阳性, 也可能是由于 HBV 新近感染或 HBV 隐性感染的恢复期。此种情况往往反映机体免疫力较强, 有较好的转归。另外也说明, HBsAg 与 HBeAg 阴性并不意味着病毒复制的停止, 只能说明病毒复制水平极低。肝炎患者出现抗-HBs 阳性, 未必说明病情好转或 HBV 已被清除。病毒在复制过程中, 同时也表达包装蛋白, 这些异源蛋白激发机体免疫系统, 产生相应的抗体。因此, 抗原抗体反映了病毒的表达水平, 也间接反映了病毒复制水平。但是由于 HBV 的表达和机体免疫反应的强弱受多种因素的影响^[4], 因此免疫学指标在反映患者体内病毒复制情况时也有一定局限性。但免疫学指标与 HBV DNA 含量相结合, 并结合临床资料, 将能很好地判断 HBV 感染及其阶段。

过去常以 HBeAg 的阴转和肝功能恢复正常作为乙型肝炎临床治疗结束的标准^[5]。本研究发现, 虽然 HBV DNA 检出率的高低与肝功能是否正常有关, 但当肝功能正常时, HBV DNA 的检出率仍达 23%, 说明 HBeAg 的阴转和肝功能恢复正常并不代表体内病毒已清除, 乙型肝炎已治愈。本研究结果表明, HBsAg 阳性标本的 HBV DNA 阳性率及含量显著高于 HBsAg 阴性标本($P<0.01$)。

综上所述, 在乙型肝炎的诊断方面, 单纯依靠 HBV 血清标志物的检测结果来进行诊断和判断病情是不够的, 应结合 HBV DNA 的检测和临床来进行综合分析, 才能准确反映患者体内 HBV 复制的真实情况, 从而为临床诊断和选择更合理的治疗方案提供可靠依据^[6-7]。HBeAg 的阴转和肝功能恢复正常也不能代表 HBV 已经清除^[8]。又由于 HBV 的表达和机体免疫反应的强弱受多种因素的影响, 因此在反映患者体内病毒复制情况时有很大的局限性。FQ-PCR 能快速、准确定量测定 HBV DNA, HBV DNA 能准确地反映 HBV 在体内存在和复制情况。因此, FQ-PCR 测定 HBV DNA 与 HBV 血清学标志物和肝功能检查相结合, 在乙型肝炎病情诊断和监测治疗效果及预后判断方面具有重要作用。

参考文献

- [1] 童红莉, 田亚平, 邓心新. 实时荧光定量 PCR 检测乙型肝炎病毒 DNA 的临床应用[J]. 军医进修学院学报, 2005, 26(5): 344-345.
- [2] Kwok S, Hignchi R. Avoiding false positives with PCR [J]. Nature, 1989, 339(6221): 237-238.
- [3] 朱平. 实时荧光定量聚合酶链反应技术开始用于临床常规基因诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(8): 778-778.
- [4] 吴晓蔓, 郭海波, 列海涛. HBV-DNA 定量和定性聚合酶链反应及其临床实用性的探讨[J]. 临床肝胆病杂志, 2000, 16(4): 226-227.
- [5] 肖艳群, 陈慧英, 张锦锋, 等. 实时荧光定量 PCR 与 PCR-ELISA 在乙型肝炎病毒 DNA 定量检测中的应用比较[J]. 检验医学, 2005, 20(4): 319-320.
- [6] 陶敏, 李玉, 秦良谊. 血清 HBV-DNA(下转第 2263 页)

2.2 自身抗体阳性组与抗体阴性组 FPG、PBG 及 HbA1c 比较,两组差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 抗体阳性组与阴性组生化指标检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FPG(mmol/L)	PBG(mmol/L)	HbA1c(%)
抗体阳性组	86	7.19±2.01	12.11±2.09	6.86±0.87
抗体阴性组	126	7.01±1.62	11.56±1.94	6.61±0.76

3 讨 论

糖尿病是一种代谢综合征,胰岛自身抗体作为胰岛 β 细胞免疫损伤的标志性的特异指标,是区别 1 型糖尿病和 2 型糖尿病的重要标志^[2]。目前发现的胰岛自身抗体有 GAD-Ab、ICA、IAA、IA-2-Ab 等。

谷氨酸脱羧酶(GAD)中谷氨酸转化过程中的限速酶,其中 GAD65 主要在人类胰岛 β 细胞上表达,血清中如果出现 GAD 的自身抗体 GAD-Ab,就会诱发胰岛 β 细胞的自身免疫性炎症,导致 β 细胞功能衰竭^[3]。近年研究发现胰岛 β 细胞的水平与糖尿病的发生、进展以及病情的演变有密切的关系,尤其是 GAD65-Ab 在整个糖尿病的病程中的敏感性和稳定性更好,在指导对糖尿病患者进行早期免疫干预治疗方面有重要意义^[4-6]。目前 GAD-Ab 被认为是 1 型糖尿病患者标志性抗体,而且与病情的严重程度、病程的进展和治疗药物的选择都有密切关系。

ICA 是最早证实存在于患者血清中的一种免疫球蛋白,为针对胰岛自身细胞的抗体,当胰岛细胞抗体和胰岛细胞的表面抗原结合后引起免疫反应,激活补体系统,对胰岛细胞的胞浆成分产生细胞毒效应,引起细胞的溶解和死亡而导致糖尿病^[7]。但 ICA 也可同时存在于其他自身免疫性疾病,单独 ICA 阳性预测糖尿病的发生价值有限。

IAA 是一组能与胰岛素结合的抗体,它不是 DM 患者体内的特异性抗体,其阳性率不及 GAD-Ab 和 ICA,IAA 绝大部分与胰岛素结合成复合物而使其失去生物活性,因此 IAA 的测定能为 DM 的治疗提供重要依据。

IA-2 是继相对分子质量为 65×10^3 的谷氨酸脱羧酶(GAD65)后发现的又一个重要的胰岛细胞自身抗原,是先前发现的胰岛细胞 40×10^3 胰蛋白消化片段抗原的前体,其抗原决定簇局限于胞内结构域中。IA-2 自身抗体(IA-2-Ab)不仅是 1 型糖尿病诊断分型的一个佐证;还是 1 型糖尿病发病前的一个重要免疫学指标,在高危个体的预测筛查方面起积极作用。

本研究结果表明,虽然为发病时间不长的青壮年糖尿病患者,但 4 项自身免疫抗体均有不低的阳性率,4 项自身免疫抗

体全阴性患者占总患者数的 59.4%,明显高于老年糖尿病患者的 37.6%,说明青壮年糖尿病患者是以自身免疫抗体阴性的型糖尿病居多^[8]。4 项自身免疫抗体全阴性患者和有 1 项以上阳性患者比较空腹血糖、餐后 2 h 血糖和 HbA1c 水平差异无统计学意义,与陈刚等^[9]报道相仿。青壮年糖尿病患者发病较早,以后的治疗过程还很长,选择更加合理的治疗方案尤其重要,联合检测自身免疫性抗体 GAD-Ab、ICA、IAA 和 IA-2-Ab 对青壮年糖尿病患者的诊断和疗效观察及治疗方案的制定和调整有重要意义;采用免疫印迹法在同一膜条上进行检测,方法简便,特异性和重复性高。

参考文献

- [1] Pietropaolo M, Hutton JC, Eisenbarth GS. Protein tyrosine phosphatase-like proteins; link with IDDM[J]. Diabetes Care, 1997, 20(2): 208-214.
- [2] 董喜环. 自身抗体在成人隐匿性自身免疫性糖尿病中的诊断价值[J]. 中国现代医生, 2009, 47(15): 49-50.
- [3] Bonfaccio E, Lampaon V, Bernasconi L. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2000, 49(2): 202-208.
- [4] Luyckx FH, Delcour S, Philips JC. The dosage of anti-GAD and Anti IA2 autoantibodies an aid to the early diagnosis of type 1 diabetes[J]. Rev Med Liege, 2005, 55(2): 169-175.
- [5] Borg H, Marcus C, Sjöblad S, et al. Islet cell antibody frequency differs from that of glutamic acid decarboxylase antibodies/IA2 antibodies after diagnosis of diabetes[J]. Acta Paediatr, 2000, 89(1): 46-51.
- [6] 姜海红, 刘海彤, 习迎斌, 等. 初发 2 型糖尿病检测胰岛自身抗体的临床意义[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(19): 28-29.
- [7] 赵成玉. 谷氨酰脱羧酶抗体和胰岛细胞抗体测定的临床意义[J]. 青海医药杂志, 2005, 35(5): 62-63.
- [8] 周细国, 杨一波, 杨伟平. 老年糖尿病患者血清 GAD-Ab、ICA、IAA 和 IA-2-Ab 联合检测的临床应用价值[J]. 医学临床研究, 2011, 28(10): 1909-1911.
- [9] 陈刚, 俞茂华, 夏燕萍, 等. 老年糖尿病患者 GAD 抗体检测的意义[J]. 中国老年保健医学, 2007, 5(4): 5-7.

(收稿日期: 2012-02-23)

(上接第 2261 页)

定量检测的临床应用价值[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(9): 61-69.

[7] 徐伟帆. 420 例乙型肝炎病毒 DNA 定量检测临床分析[J]. 中国医药指南, 2011, 9(29): 135-136.

[8] Chemin I, Zoulim F, Merle P, et al. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology[J]. J Hepatol, 2001, 34(3): 447-454.

(收稿日期: 2012-05-16)