

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.08.013

慢性乙型肝炎患者自身抗体与 HBV 基因分型及耐药突变相关因素研究

陈韧刚¹, 鲁艳^{2△}, 魏三舟¹, 孙飞¹, 李敏¹

(1. 湖北省孝感市孝昌县第一人民医院检验科 432900; 2. 湖北省孝感市中心医院检验科 432100)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者自身抗体与乙型肝炎病毒(HBV)基因分型及耐药突变相关因素。方法 选取 2015 年 4 月至 2017 年 4 月孝昌县第一人民医院的慢性乙型肝炎患者 216 例,进行自身抗体、HBV 基因分型和耐药突变位点检测。结果 216 例患者中自身抗体检测阳性 89 例,其中以抗核抗体(ANA)阳性为主。自身抗体在两种基因型中分布差异无统计学意义($P>0.05$);总耐药位点在两个基因型中分布差异无统计学意义($P>0.05$);各个位点在两个基因型中分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 自身抗体与慢性乙型肝炎患者的病程发展有一定联系,不同基因型产生自身抗体和耐药位点突变在基因型中的分布须进一步研究。

关键词:慢性乙型肝炎; 自身抗体; 基因分型; 耐药

中图法分类号:R575.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)08-1095-03

Study on the relationship between autoantibody and HBV genotype and drug resistance mutation in patients with chronic hepatitis B

CHEN Rengang¹, LU Yan^{2△}, WEI Sanzhou¹, SUN Fei¹, LI Min¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Xiaochang County, Xiaogan, Hubei 432900, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xiaogan Central Hospital, Xiaogan, Hubei 432100, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between autoantibody and HBV genotype and drug resistance in patients with chronic hepatitis B. **Methods** A total of 216 cases of chronic hepatitis B in our hospital from April 2015 to April 2017 were tested for autoantibodies, HBV genotyping and detection of drug-resistant mutation sites. **Results** In 216 cases, 89 cases were positive for autoantibodies, especially ANA positive. The distribution of autoantibodies in the two genotypes was not statistically significant different ($P>0.05$). The total drug resistance sites were distributed in two genotypes, and there was no significant difference between them. The distribution of each locus in the two genotypes was not statistically significant different ($P>0.05$). **Conclusion** Autoantibodies are associated with the progression of chronic hepatitis B patients, and the distribution of autoantibodies and resistance loci in genotypes should be further studied.

Key words: chronic hepatitis B; autoantibody; genotype; drug resistance

乙型肝炎是全世界常见的传染病之一,如今我国仍是感染乙型肝炎病毒(HBV)最多的国家,据统计有 9 000 万人感染 HBV,其中的 1/4 发展成慢性乙型肝炎,与 HBV 感染相关的肝硬化和肝癌严重威胁患者的生命安全^[1-2]。乙型肝炎患者的病程进展受多阶段、多因素综合影响,有研究表明乙型肝炎的发展与患者的自身免疫应答、肝细胞损伤和炎性反应有关。感染 HBV 的患者体内出现多种自身抗体,如抗核抗体(ANA)、抗平滑肌抗体(ASMA)、抗肝肾微粒体(LKM)等^[3]。在肝炎患者治疗过程中,一些患者会出现耐药突变情况,这影响了治疗效果^[4]。本研究主要选取慢性乙型肝炎患者,探讨其自身抗体与基因分型及耐药突变的相关因素的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 4 月至 2017 年 4 月孝昌县第一人民医院慢性乙型肝炎患者 216 例,其中男 164 例,女 52 例,平均年龄 44.6 岁。纳入标准:患者诊断符合慢性乙型肝炎防治指南(2014 年版)的标准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者入院次日清晨空腹采集静脉血 3 mL,离心分离血清-20℃保存备用。

1.2.2 标本检测 (1)自身抗体检测:ANA、ASMA 和 LKM 检测采用间接免疫荧光法,待检血清起始稀释浓度为 1:100,将稀释血清与生物载片共同孵育 30 min,洗涤后加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人免疫球蛋白抗体孵育 30 min,洗片、封片后荧光显

显微镜观察结果。抗可溶性肝抗原/肝-胰抗体(抗 SLA/LP)、抗肝细胞溶质抗原 I 型抗体(抗 LC-1)和抗线粒体抗体 II 型(AMA-M2)采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测,将待测血清 1:100 稀释后加入印迹膜条,室温摇床 30 min,洗膜后加酶标记二抗,室温摇床 30 min,洗膜后显色 10 min,终止观察结果。试剂盒购自德国(欧蒙)医学实验诊断有限公司。

(2) HBV 基因分型检测:采用聚合酶链反应(PCR)和 Taqman 荧光探针技术(FAM 标记的 B 型特异性探针和 HEX 标记的 C 型特异性探针)同时检测标本基因 B 型和 C 型。

(3) 耐药突变位点检测:HBV P 区扩增在 PCR 扩增引物下完成,将扩增产物纯化处理后进行测序和基因分型、耐药突变位点检测。测序后突变应用 BLAST、DNASTar GeneBank 等软件来确定突变位点。主要对 rt204、rt181、rt236 等耐药位点进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件处理本研究所有数据,计数资料以 *n* 或 % 表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 自身抗体检测结果 216 例患者自身抗体检测结果,见图 1。216 例患者中至少检测出 1 种的患者有 89 例,总阳性率为 41.2%。其中以 ANA 阳性为主,有 58 例,以低滴度 1:100 为主;LKM 阳性 13 例;AMA-M2 阳性 12 例;ASMA 阳性 7 例;抗 SLA/LP 阳性 3 例;抗 LC 阳性 4 例。

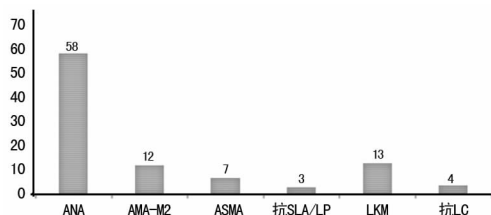


图 1 自身抗体检测结果

表 1 自身抗体在两种基因型中分布

项目	<i>n</i>	基因型(<i>n</i>)		χ^2	<i>P</i>
		B 型(<i>n</i> =30)	C 型(<i>n</i> =186)		
总阳性	89	11	78	0.296	0.368
ANA	58	8	50	0.001	0.587
AMA-M2	12	2	10	0.082	0.675
ASMA	7	1	6	0.001	0.654
抗 SLA/LP	3	0	3	0.491	0.637
LKM	13	1	12	0.444	0.437
抗 LC	4	0	4	0.657	0.547

2.2 HBV 基因分型结果及自身抗体分布 HBV 分型结果显示,216 例患者中 B 型有 30 例(13.9%),男 18 例,女 12 例;C 型有 186 例(86.1%),男 128 例,女

58 例。自身抗体在两种基因型中分布见表 1。在自身抗体总阳性对比中,基因型 B 型和 C 型比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);各种类型自身抗体比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 HBV P 区基因逆转录酶区的序列突变及耐药情况 216 例患者中共发现耐药突变的患者有 39 例,变异率为 18.1%。各耐药相关位点突变基因型分布见表 2。总耐药位点在两个基因型中分布差异无统计学意义($P > 0.05$);各位点在两个基因型中分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各耐药相关位点突变基因型分布

基因位点	基因型[<i>n</i> (%)]		χ^2	<i>P</i>
	B 型(<i>n</i> =30)	C 型(<i>n</i> =186)		
LAM 耐药相关位点				
M204I	2	5	0.292	0.624
M204V	2	7	0.010	0.625
L180M	1	4	0.004	0.721
ADV 耐药相关位点				
N236T	3	6	1.070	0.275
A181T	1	8	0.701	0.375
A181V	1	4	0.004	0.721
总耐药率	9	30	3.359	0.064

3 讨 论

HBV 感染后患者出现急性肝炎的可能性低,患者极易慢性化,随着慢性乙型肝炎的发展,患者逐渐转变成肝硬化,更严重的转变为肝癌^[5]。HBV 在感染患者的同时,也会通过多种反应来影响机体的免疫系统,损害机体的免疫耐受性,诱导发生自身免疫反应,加剧肝细胞损坏,使病情迁延不愈,增加治疗难度^[6-7]。之前,关于慢性乙型肝炎患者出现自身抗体的报道较多,本研究结果显示,216 例慢性乙型肝炎患者中自身抗体阳性的患者有 89 例,占 41.2%,其中 ANA 阳性的最多,有 58 例,阳性率为 26.9%,之后依次是 LKM 阳性 13 例;AMA-M2 阳性 12 例;ASMA 阳性 7 例;抗 SLA/LP 阳性 3 例;抗 LC 阳性 4 例。这说明,自身抗体的出现是造成慢性乙型肝炎患者肝细胞损伤的机制之一。故而慢性乙型肝炎患者检测自身抗体有助于治疗和对疾病的了解,还对探讨 HBV 致病机制具有十分重要的指导意义。

在我国,HBV 基因型以 B 型和 C 型为主,不同的基因型,因基因的差异可造成致病性的差异,从而影响病情的发生、发展,以及自身机体的反应^[8-9]。HBV 基因型一直是乙型肝炎的研究热点,自身抗体在不同基因型的 HBV 患者中分布是否也有差别?本研究基因分型结果表明,B 型 HBV 有 30 例患者,C 型 HBV 有 186 例,自身抗体在两种基因型中的分布 C 型高于

B 型,但差异无统计学意义($P>0.05$),这表明自身抗体的出现与基因型可能没有关联,C 型更容易产生自身抗体有待于证实。

在过去的报道中,HBV DNA 可自然地发生耐药位点的突变,在使用抗病毒药物之后,通过免疫、药物和自然突变多种因素的影响产生耐药的 HBV,这给治疗难度带来巨大的挑战。在治疗过程中对耐药位点突变进行检测,有助于评估药物疗效,从而更好地选择治疗方案和预防处理耐药问题^[10]。本研究选取 LAM 耐药相关位点(M204I、M204V、L180M)和 ADV 耐药相关位点(N236T、A181T、A181V),基因位点在 B 型和 C 型中的分布差异无统计学意义($P>0.05$),与孙丽娜等^[11]研究中 M204V、N236T、A181T、A181V 4 个位点在 B 型和 C 型中的分布存在差异,这可能是由于此次标本量较少所导致的,应增加患者例数再做分析。

综上所述,自身抗体与慢性乙型肝炎患者的病程发展有一定联系,不同基因型产生自身抗体和耐药位点突变在基因型中的分布须进一步进行研究。

参考文献

[1] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD].中国肝病杂志(电子版),2015,19(3):1-18.

[2] ZOULIM F,LOCARNINI S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5):1593-1608.

(上接第 1094 页)

[2] 王庆玲,梁冰. Versa TREK 血培养系统的临床应用及评价[J]. 实用医药杂志,2017,34(2):116-118.

[3] 林广城,聂署萍,谭燕清,等. 汇征吉礼需氧血培养瓶与 BD Bactec 需氧瓶的对比分析[J]. 中国热带医学,2015, 15(7):878-880.

[4] 胡珊,康海全,马萍,等. 重点科室宣讲推进血培养规范送检效果分析[J]. 临床与病理杂志,2016,36(12):1991-1995.

[5] 黄春红,王云英. BacT/Alert 3D 型全自动血培养仪性能评价[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2421-2422.

[6] LYNN L H, BEBJAMIN J G, CLINTON K M, et al. Direct comparison of the BACTEC9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture medium[J]. J Clin Microbiol, 1998(36):3731-3733.

[7] 黄梅,王颖,王卫萍,等. 两种吸附抗生素血培养瓶对血流感染检测能力的比较[J]. 东南国防医药,2014,16(2): 117-120.

[8] FLAYHART D, BOREK A, WAKEFIELD T, et al. Abil-

[3] AGMON-LEVIN N, RAM M, BARZILAI O, et al. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2009, 32(3/4):261-266.

[4] 谢巧灵,丛庆伟,吴凌虹,等. 耐核苷(酸)类药物慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 HBV 基因型和 P 区耐药突变位点分析[J]. 实用肝脏病杂志,2016,19(1):60-63.

[5] 林芳,冯霞,张国元,等. 慢性乙型肝炎细胞免疫研究动态[J]. 北京医学,2011,33(6):494-496.

[6] 刘宁,徐杰,刘金花,等. 慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎患者 Th1/Th2 型细胞因子水平变化研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(2):158-161.

[7] SHELDON J, RODÈS B, ZOULIM F, et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(7):427.

[8] 郑卫波,许文芳,李焯佳. HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布及其与抗病毒治疗疗效的关系[J]. 检验医学,2015,30(4):349-352.

[9] 叶扬,张芳,马玲. 慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 定量和 HBV-DNA 检测在 HBV 基因型与耐药变异中的临床研究[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2015,15(3):7-8.

[10] 谢巧灵,丛庆伟,吴凌虹,等. 耐核苷(酸)类药物慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 HBV 基因型和 P 区耐药突变位点分析[J]. 实用肝脏病杂志,2016,19(1):60-63.

[11] 孙丽娜,孙剑,刘学恩,等. 乙型肝炎病毒耐药相关位点变异模式与基因型的相关性[J]. 中国病毒病杂志,2012,2 (2):102-106.

(收稿日期:2017-09-17 修回日期:2017-11-27)

ity of BD BACTEC Plus blood culture bottles versus BacT/Alert FAN blood culture bottles to detect bacterial pathogens samples containing vancomycin[J]. The 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2005(23):123-131.

[9] 曹珂,万霞. 两种不同血培养系统对模拟菌血症抗生素吸附能力的研究[J]. 航空航天医学杂志,2014,25(1):5-7.

[10] 栗方,曹彬. 两种血培养系统对细菌与真菌检测能力比较[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(2):473-474.

[11] 费志伟. 不同血培养系统对模拟菌血症抗生素吸附能力的研究[J]. 中国医药指南,2015,13(30):67.

[12] MERMEL L A, MAKI D G. Detection of bacteremia in adults consequences of culturing an inadequate volume of blood[J]. Ann Intern Med, 1993, 119(4):270-272.

[13] 马楠,李国智,马俊. 全自动血液培养系统在血流感染诊断中的价值及影响因素[J]. 检验医学与临床,2014,11 (11):1253-1255.

(收稿日期:2017-09-14 修回日期:2017-11-24)