

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.012

HBV-DNA 与乙型肝炎血清标志物的相关性分析

汪东剑¹ 张晓云¹ 李志晋¹ 江 丁¹ 韩香妮²

(1 解放军第一八四医院 江西 鹰潭 335000; 2 第四军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨乙型肝炎病毒(HBV)DNA 载量与其血清标志物的相关性。**方法:**运用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)、酶联免疫吸附实验(ELISA)分别检测 503 例患者 HBV-DNA 载量和 HBV 血清标志物。根据 HBV 血清标志物结果分为大三阳组、小三阳组、少见模式组、抗体阳性及全阴组,比较各组间 HBV-DNA 的阳性率及定量值。**结果:**在大三阳组、小三阳组、少见模式组、抗体阳性及全阴组 HBV-DNA 的阳性率分别为 90%、65.1%、65.2%、2.0%,HBV-DNA 的定量结果 (logHBV-DNA) 别为 6.32 ± 1.96 、 2.01 ± 1.68 、 3.48 ± 2.52 (抗体阳性及全阴组阳性例数过低,不纳入统计)。大三阳组 HBV-DNA 的阳性率显著高于小三阳组($P < 0.05$),大三阳组、小三阳组 HBV-DNA 的阳性率与少见模式组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),但大三阳组、小三阳组、少见模式组 HBV-DNA 的阳性率均显著高于抗体阳性及全阴组 ($P < 0.01$)。HBsAg、HBeAg 阳性组 HBV-DNA 的阳性率分别显著高于 HBsAg、HBeAg 阴性组($P < 0.01$)。小三阳组、少见模式组 HBV-DNA 载量均显著低于大三阳组($P < 0.01$),少见模式组 HBV-DNA 载量显著高于小三阳组($P < 0.05$)。**结论:**HBV-DNA 的阳性率与 HBeAg、HBsAg 相关;HBV-DNA 载量与 HBV 血清标志物模式相关。

关键词:HBV-DNA; 乙型肝炎; 乙型肝炎表面抗原; 乙型肝炎 e 抗原

中图分类号:R512.62,R392.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)03-444-04

Analysis of the Correlation between Serum Immune Markers of Hepatitis B Virus and HBV-DNA

WANG Dong-jian¹, ZHANG Xiao-yun¹, LI Zhi-jin¹, JIANG Ding¹, HAN Xiang-ni²

(1 NO.184 Hospital of PLA, Yingtan, Jiangxi, 335000, China;

2 Tang-du Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective:To investigate the correlation of hepatitis B virus (HBV) DNA load with its serum biomarkers. **Methods:** HBV DNA load and immune markers were detected in 503 case of patients by Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). On the basis of the model of hepatitis B virus immune markers, the HBsAg, HBeAg and Anti-HBc positive group, HBsAg, Anti-HBe and Anti-HBc positive group, infrequent model group, antibody positive or negative group were set up. **Results:** The positive rate of HBV DNA in HBsAg, HBeAg and Anti-HBc positive group, HBsAg, Anti-HBe and Anti-HBc positive group, infrequent model group, antibody positive or negative group were respectively 90%, 65.1%, 65.2%, 2.0%, and the HBV DNA quantity (logHBV DNA) were 6.32 ± 1.96 , 2.01 ± 1.68 , 3.48 ± 2.52 (We rejected to analyze the HBV DNA quantity by the course of the positive case in antibody positive or negative group were so deficient.). The positive rate of HBV-DNA in HBsAg, HBeAg, Anti-HBc positive group was higher than that in HBsAg, Anti-HBe, Anti-HBc positive group ($P < 0.05$). The positive rate of HBV-DNA in HBsAg, HBeAg, Anti-HBc positive group and HBsAg, Anti-HBe, Anti-HBc positive group with infrequent model group were compared, no statistical difference was found ($P > 0.05$). But the positive rate of HBV-DNA in HBsAg, HBeAg, Anti-HBc positive group, HBsAg, Anti-HBe, Anti-HBc positive group, and infrequent model group were remarkable higher than those in the antibody positive or negative group ($P < 0.01$). The positive rate of HBV-DNA in HBsAg positive group and HBeAg positive group were remarkable higher than those in the HBsAg negative group and HBeAg negative group ($P < 0.01$). The load of HBV-DNA in HBsAg, Anti-HBe, Anti-HBc positive group and infrequent model group were remarkable lower than that in the HBsAg, HBeAg, Anti-HBc positive group ($P < 0.01$), and the load of HBV-DNA in infrequent model group was remarkable higher than that in the HBsAg, Anti-HBe, Anti-HBc positive group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The positive rate of HBV DNA was related to the HBeAg and HBsAg; the HBV DNA quantity was related to the model of HBV immune markers in serum.

Key words: HBV-DNA; Hepatitis B; Hepatitis B surface antigens; Hepatitis B e antigens

Chinese Library Classification(CLC): R512.62, R392.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)03-444-04

前言

慢性乙型肝炎是一类严重影响人类健康的慢性疾病,目前

我国约有 1.3 亿乙型肝炎病毒(HBV)携带者。临床常依据酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测乙型肝炎血清标志物来判断是否存在乙型肝炎病毒感染,依据 HBV-DNA 载量来评价 HBV 感染者体内病毒复制情况、传染性及治疗效果。本研究旨在探讨 HBV-DNA 与乙型肝炎血清标志物表达模式的关系,以期对乙型肝炎的诊断、治疗检测、预防提供更多的参考数据。

作者简介:汪东剑(1977-),男,学士,主治医师,主要研究方向:基因诊断,电话:13870172833, E-mail: w2013wdj184@163.com

(收稿日期:2013-06-18 接受日期:2013-07-12)

1 材料与方法

1.1 标本来源

随机收集西安唐都医院 2010 年 8 月至 2010 年 12 月门诊、住院患者 503 例,其中男性 298 例,女性 205 例,年龄 1-74 岁,分别检测 HBV-DNA、HBV 血清标志物(HBsAg、Anti-HBs、HBeAg、Anti-HBe、Anti-HBc)。将 503 例病人按照乙型肝炎血清标志物分为大三阳组 20 例;小三阳组 43 例;少见模式组 23 例(除外大小三阳的 HBsAg 阳性表型);抗体阳性及全阴组 417 例。

1.2 方法与试剂

1.2.1 HBV-DNA 定量检测 采用 FQ-PCR 法,利用美国 ABI-7300 基因荧光定量分析仪,试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供,严格按照标准操作程序进行测定。

1.2.2 乙型肝炎血清标志物检测 采用酶联免疫吸附试验,乙型肝炎血清标志物诊断试剂盒均由潍坊 3V 生物工程有限公司提供,严格按说明书进行操作。

1.3 统计学分析

用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验,相关性分析采用 Kendall 等级相关分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HBV-DNA 阳性率的分布

根据实验结果,大三阳组 HBV-DNA 阳性率最高,达 90%;小三阳组、少见模式组分别为 65.1%、65.2%;而抗体阳性组与全阴组阳性率分别为 1.8%和 2.2%。结果见表 1。

表 1 各组 HBV-DNA 的阳性率

Table1 The positive rates of HBV-DNA in different groups

Groups	n	HBV-DNA positive ($>1.0E+02$)	HBV-DNA negative ($<1.0E+02$)	Positive rate(%)
HBsAg, HBeAg and Anti-HBc positive group Δ	20	18	2	90.0
HBsAg, Anti-HBe and Anti-HBc positive group Δ	43	28	15	65.1
Infrequent model group Δ	23	15	8	65.2
Antibody positive or negative group $\Delta\Delta$	417	8	409	2.0
Total	503	69	434	13.7

* 注: Δ HBsAg 阳性, $\Delta\Delta$ HBsAg 阴性。

*Note: Δ HBsAg positive, $\Delta\Delta$ HBsAg negative.

2.2 乙型肝炎血清标志物与 HBV-DNA 检测的关系

大三阳组 HBV-DNA 的阳性率显著高于小三阳组,差别有统计学意义($\chi^2=4.29$, $P < 0.05$)。

大三阳组、小三阳组 HBV-DNA 的阳性率与少见模式组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。但大三阳组、小三阳组、少见模式组 HBV-DNA 的阳性率显著高于抗体阳性及全阴组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。由此推测,HBV-DNA 的阳性率可能与乙型肝炎血清标志物的具体模式无关,而与是否表达 HBsAg

或者 HBeAg 有关。

分别比较 HBsAg 阳性组与阴性组、HBeAg 阳性组与阴性组间 HBV-DNA 阳性率,结果见表 2。HBsAg 阳性组与阴性组 HBV-DNA 的阳性率比较差别有统计学意义($\chi^2=8.76$, $P < 0.01$),HBeAg 阳性组与阴性组 HBV-DNA 阳性率进行比较差别有统计学意义($\chi^2=36.75$, $P < 0.01$)。HBsAg 阳性组与 HBeAg 阳性组 HBV-DNA 的阳性率比较,差别无统计学意义($\chi^2=3.56$, $P > 0.05$)。

表 2 HBV-DNA 检测结果比较

Table 2 The comparison of the detect of HBV-DNA

Groups	Number of the positive HBV-DNA	Number of the negative HBV-DNA	Total	Positive rate (%)	Negative rate (%)	χ^2	P
HBsAg positive group	61	25	86	70.9	29.1		
HBsAg negative group	8	409	417	2.0	98.0	8.76 Δ	$<0.01\Delta$
HBeAg positive group	24	3	27	88.9	11.1		
HBeAg negative group	45	431	476	9.5	90.5	36.75 $\Delta\Delta$	$<0.01\Delta\Delta$

* 注: Δ HBsAg 阳性组与阴性组相比较, $\Delta\Delta$ HBeAg 阳性组与阴性组相比较。

*Note: Δ Comparison between the HBsAg positive group and HBsAg negative group, $\Delta\Delta$ Comparison between the HBeAg positive group and HBeAg negative group.

2.3 乙型肝炎血清标志物模式与 HBV-DNA 载量的关系

各组 HBV-DNA 定量检测结果分布情况及比较见表 3。小三阳组、少见模式组 HBV-DNA 载量均显著低于大三阳组,差别有统计学意义(P 均 <0.01);少见模式组 HBV-DNA 载量显著

高于小三阳组($P<0.05$),差别有统计学意义。对三组数据进行 Kendall 等级相关分析, $Kendall's W=0.318$, $\chi^2=12.70$, $P=0.002$, 由以上分析可知 HBV-DNA 载量与 HBV 血清模式相关。

表 3 各组 HBV-DNA 定量结果比较

Table 3 Comparison of the HBV-DNA loads among different groups

Groups	n	HBV-DNA(IU/ml)				$\bar{x} \pm SD$ (logHBV-DNA)	t	P
		$>10^7$	$10^7 \sim 10^5$	$10^5 \sim 10^2$	$<10^2$			
HBsAg, HBeAg and Anti-HBc positive group	20	10	8	0	2	6.32 ± 1.96		
HBsAg, Anti-HBe and Anti-HBc positive group	43	0	2	26	15	2.01 ± 1.68	8.880^Δ	$<0.01^\Delta$
Infrequent model group	23	1	8	6	8	3.48 ± 2.52	3.387^Δ	$<0.01^\Delta$
Antibody positive or negative group	417	0	0	8	409		$2.683^{\Delta\Delta}$	$<0.05^{\Delta\Delta}$
Total	503	11	18	40	434			

*注: $^\Delta$ 与大三阳组比较, $^{\Delta\Delta}$ 与小三阳组比较。

*Note: $^\Delta$ Compared with the HBsAg, HBeAg and Anti-HBc positive group, $^{\Delta\Delta}$ Compared with the HBsAg, Anti-HBe and Anti-HBc positive group.

3 讨论

乙型肝炎血清标志物检测是目前诊断乙肝最常用的指标,反映了人体对乙肝病毒的免疫反应状态和病程转化过程。HBV-DNA 检测常用于观察 HBV 抗病毒治疗的效果^[1]及传染性强弱。从定性角度而言,HBV-DNA 结果与是否表达 HBsAg、HBeAg 相关,而与具体血清学模式无关。本研究 503 例标本中,HBsAg 阳性共 86 例,HBV-DNA 阳性共 69 例,依据乙型肝炎诊断标准^[2],本次研究感染乙肝病毒的人数应为 94 例,HBsAg 对于乙肝病毒的检出率为 91.5%,HBV-DNA 对于乙肝病毒的检出率为 73.4%,与王晓东等^[3]报道结果基本一致。虽然血清中存在 HBV-DNA 是诊断 HBV 感染最直接的证据,但 HBV-DNA 对 HBV 的检出率不如 HBsAg,传统 HBsAg 仍是诊断 HBV 感染最敏感的指标。单纯依靠 HBsAg 判断是否存在乙肝病毒感染,将有 9.5%的受检者被错误地诊断为无乙肝病毒感染,在临床工作中应联合检测 HBsAg 与 HBV-DNA,以提高乙肝病毒的检出率,减少漏诊。值得注意的是,本次研究中,有 4 例 Anti-HBs 阳性标本、1 例单纯 Anti-HBc 标本、3 例全阴中检测出 HBV-DNA,占本次研究人群的 1.6%,虽然其载量均处于 $10^2 \sim 10^3$ 之间,研究这部分人群是否具有传染性在输血安全中有着一定意义。

在不同血清标志物模式中,HBV-DNA 在大三阳模式中阳性率最高,达 90%,且其载量多数处于高水平($>10^5$ IU/mL);在小三阳组中,HBV-DNA 的检出率达到 65.1%,其定量测定结果主要分布于低于检测下限 $\sim 10^2$ IU/mL,占 95.3%,其中 $10^2 \sim 10^3$ IU/mL 占 60.5%,低于检测下限占 34.9%。小三阳组与大三阳组 HBV-DNA 载量差异具有统计学意义,小三阳组中 HBV 复制不如大三阳组活跃,这与传统的血清学解释相一致。Keffe 等认为,HBV-DNA 载量水平是评估 HBV 复制水平的直

接方法^[4],本研究同时将其余各组与大三阳组相比,HBV-DNA 载量均有显著差异,HBV-DNA 载量是反映病毒复制水平的良好指标,HBV-DNA 作为 HBV 的基因组成和复制模板被认为是乙型肝炎病毒复制和传染的最直接的病原学依据^[5]。长久以来,HBeAg 被认为是乙型肝炎患者具有传染性的标志,认为血液中 HBeAg 阳性,患者体内乙型肝炎病毒处于不停的复制状态,HBV-DNA 具有高的载量^[6],本研究 HBeAg 阴性患者中有 45 例 HBV-DNA 检测阳性,且其中 7 例(15.6%)HBV-DNA 载量处于较高水平 ($10^5 \sim 10^6$ IU/mL),说明部分发生了 HBeAg 血清学转变的病人体内存在一定程度的 HBV 复制^[7],特别是由于抗病毒药物的广泛使用,血清 HBeAg 已不能如实反映体内病毒复制的变化^[8]。有研究报道亚洲平均 50%的 HBeAg 阴性慢性乙肝患者存在前 C 区与 C 区基因的突变^[9],从而阻断 HBeAg 的形成,但并不影响 HBV 的复制。在 HBV-DNA 高水平患者 ($>10^5$ IU/mL)中,HBV-DNA 载量与 HBeAg 具有良好的相关性,同时 HBV-DNA 载量又能反映 HBeAg 阴性患者体内 HBV 复制的情况。我们分析 23 例少见模式,从血清学角度看,少见模式组各种表达模式处于 HBV 感染免疫应答初期或者转归期,而 HBV-DNA 载量的分布情况与之相符,在典型的大三阳组与小三阳组中,HBV-DNA 载量的分布也与期血清学解释相一致。因而,我们认为 HBV-DNA 载量与 HBV 血清标志物的表达模式相关。以往研究侧重讨论 HBV-DNA 与 HBsAg、HBeAg 的相关性以及治疗监测中的价值^[10-15],而 HBV-DNA 载量与 HBV 不同感染阶段的血清标志物模式的关系、肝脏受损情况及是否需要接受抗病毒治疗方面还缺乏系统性的研究。李学俊等^[16]提出不同肝纤维化分期中相同肝实质细胞体积分摊的血清 HBV-DNA 载量水平与肝炎炎症分级有关。而对于病程漫长的慢性乙肝患者反复进行肝细胞活检存在许多不可预知的风险,因而我们渴望寻找更多的血清学指标与 HBV-DNA 载量联合

使用,使其能够有效的反映肝脏 HBV 感染及炎症、纤维化程度,便于更好的治疗和控制慢性乙肝患者的病情,降低发生肝硬化甚至转化为肝癌的风险。

总之,HBV-DNA 载量不仅在反映 HBV 复制情况中比血清学 HBeAg 检测更优越,配合 HBV 血清标志物检查更能在判断产生免疫应答的 HBV 感染患者的转归方面起到重要作用。

参考文献(References)

- [1] 李明慧,谢尧,邱国华,等.慢性乙型肝炎 HBsAg、HBeAg 和 DNA 变化的相关性研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2011,25(1): 26-28
Li Ming-hui, Xie Yao, Qiu Guo-hua, et al. The study of the relevance between the vary of HBsAg、HBeAg and DNA in chronic Hepatitis B [J]. Chinese journal of experimental and clinical virology, 2011, 25 (1): 26-28
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝脏病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝病杂志,2000,8(6): 1522-1527
Infectious diseases and parasitology section、Hepatology branch of the Chinese medical association,Viral hepatitis prevention and control plan[J]. Chinese journal of liver disease, 2000, 8(6): 1522-1527
- [3] 王晓东,李秀全,李凤焕,等.慢性乙肝血清标志物与 HBV-DNA 水平的关系[J].国际检验医学杂志,2006,27(12): 1070-1072
Wang Xiao-dong, Li Xiu-quan, Li Feng-huan, et al. Relationship between the chronic Hepatitis B virus immune markers and the HBV-DNA load [J]. International Journal of laboratory medicine, 2006, 27(12): 1070-1072
- [4] Keffe E B, Diterich D T, Han S H, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States.2008 update[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6(12):1315-1341
- [5] 吴晓英,喻剑华,施军等.慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 水平与 HBeAg、HBV-DNA 载量的关系[J].中国医刊,2011,46(6): 47-49
Wu Xiao-ying, Yu Jian-hua, Shi Jun, et al. Relationship between the local of HBsAg、HBeAg and HBV-DNA in the serum of chronic Hepatitis B patients [J]. Chinese Journal of Medicine, 2011, 46(6): 47-49
- [6] Xie Y, Zhao H, Dai WS, et al. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(3): 418-422
- [7] Pichoud C, Berby F, Stuyver L, et al. Persistence of viral replication after anti-HBe seroconversion during antiviral therapy for chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2000, 32(2): 307-316
- [8] 郑专,董学军.e 抗原阳性慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 与 HBsAg、HBeAg 的相关性分析 [J]. 放射免疫学杂志,2012,25(3): 284-286
Zheng Zhuan, Dong Xue-jun. Analysis of the correlation between HBV-DNA and HBsAg、HBeAg in the serum of e antigen positive chronic Hepatitis B patients [J]. Journal of Radioimmunology, 2012, 25(3): 284-286
- [9] 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
- [10] 任伟宏,赵素玲,李延卿,等.乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 与 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 定量关系的分析[J].检验医学,2010,25(6): 438-441
Ren Wei-hong, Zhao Su-ling, Li Yan-qing, et al. Analysis of the relationship of the cccDNA between HBV DNA、HBsAg and HBeAg in the serum of Hepatitis B patients[J]. Laboratory medicine, 2010, 25 (6): 438-441
- [11] Zheng Qi, Jiang Jia-ji, Chen Jing. Serum HBV DNA level at week 24 as a proper predictor for the effect of 2-year lamivudine treatment[J]. Chinese Medical Journal(English edition), 2011, 124(8): 1257-1260
- [12] 裴彦贞,韩涛,马晓艳,等.HBsAg 及 HBV DNA 定量水平在慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者中的变化[J].中华肝病杂志,2011,19(10): 743-746
Pei Yan-zhen, Han Tao, Ma Xiao-yan, et al. Variation of the load of HBsAg and HBV DNA in the chronic hepatitis B、cirrhosis and cancer of the liver patients [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2011, 19(10): 743-746
- [13] 沈云岳,宁小晓,王蕾. HBV DNA 不同载量的 CHB 患者的 HBeAg 和 ALT 水平比较[J].检验医学,2011,26(12): 823-825
Shen Yun-yue, Ning Xiao-xiao, Wang Lei. Contrast the level of HBeAg and ALT in different HBV DNA load CHB patients [J]. Laboratory medicine, 2011, 26(12): 823-825
- [14] 谢而付,黄珮琚,陈丹,等.慢性 HBV 感染患者血清中 HBV-DNA 与 HBsAg、HBeAg 的关系[J].实用医学杂志,2010,26(19): 3627-3629
Xie Er-fu, Huang Pei-jun, Chen Dan, et al. The relationship of HBV-DNA、HBsAg、HBeAg in chronic HBV infect patients' serum [J]. Practical medical journal, 2010, 26(19): 3627-3629
- [15] 李筠竹,张振华,张亚飞,等.慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 与 HBsAg 和 HBeAg 水平的相关性分析[J].实用肝病杂志,2012,15(3):48-50
Li Jun-zhu, Zhang Zhen-hua, Zhang Ya-fei, et al. Analysis of the correlation between the level of the HBV-DNA、HBsAg and HBeAg in the serum of chronic Hepatitis B patients [J]. Practical journal of liver disease, 2012, 15(3): 48-50
- [16] 李学俊,谢仕斌,张晓红,等.免疫清除期相同肝实质细胞体积分摊的血清 HBV DNA 载量与肝组织炎症分级的关系[J].中华肝病杂志,2009,10(17): 740-744
Li Xue-jun, Xie Shi-bin, Zhang Xiao-hong, et al. The relationship between serum's HBV DNA local which proportion in the same volume of hepatic parenchymal cells and liver tissue inflammation grades in the immune clearance [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2009, 10(17): 740-744