

慢性乙型肝炎病毒感染患者血清 HBV-LP 水平与 HBV-DNA 及 HBeAg 的关系及临床意义

董博¹, 胡海石¹, 王德景¹, 苏亚娟², 杜文功³

1. 廊坊市人民医院, 河北 廊坊 065000; 2. 廊坊市开发区人民医院, 河北 廊坊 065001;

3. 廊坊市中心血站, 河北 廊坊 065000

摘要: **目的** 研究慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染患者血清乙肝病毒外模大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP)水平与乙型肝炎病毒 DNA(hepatitis B virus DNA, HBV-DNA)及乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)的关系以及临床意义。 **方法** 选取 2016 年 2 月-2017 年 10 月廊坊市人民医院收治的慢性 HBV 感染患者 200 例为研究对象。对所有患者分别采用酶联免疫吸附法检测血清 HBV-LP 水平,采用荧光定量 PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)测定 HBV-DNA 水平,采用时间分辨仪通过乙肝五项定量检测 HBeAg 水平。分析 HBV 感染患者血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 的关系,比较 HBV 感染患者 HBV-LP 阳性率、HBV-DNA 阳性率及 HBeAg 阳性率,并通过 Pearson 作相关性分析。 **结果** 随着 HBV-DNA 拷贝数的对数值不断升高,患者血清 HBV-LP 中位数呈逐渐升高趋势,且与上一个对数值下的 HBV-LP 中位数相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HBV 感染患者 HBV-LP 阳性率为 84.00% (168/200),高于 HBV-DNA 的阳性率 63.50% (127/200)与 HBeAg 的阳性率 44.00% (88/200),差异有统计学意义($\chi^2 = 21.708, 69.444$, 均 $P < 0.001$)。经 Pearson 相关性分析可得,HBV 感染患者血清 HBV-LP 水平($r = 0.598, P < 0.001$)与 HBV-DNA 拷贝数的对数值及 HBeAg 均呈正相关($r = 0.523, P = 0.012$)。 **结论** 慢性 HBV 感染患者的血清 HBV-LP 水平随 HBV-DNA 拷贝数的升高而升高,且与 HBeAg 呈正相关,临床工作中可通过检测血清 HBV-LP 水平,从而有效监测患者体内的病毒复制情况及预后情况。

关键词: 慢性; 乙型肝炎病毒; 乙肝病毒外模大蛋白; 乙型肝炎病毒 DNA; 乙型肝炎病毒 e 抗原; 相关性

中图分类号: R373.2⁺1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)04-0490-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.030

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一种导致慢性肝炎发生的较为常见的病毒感染,研究报道显示,在所有慢性 HBV 感染患者中约有 15.00%~25.00%患者死于与 HBV 感染相关的肝病^[1]。因此,对慢性 HBV 感染患者进行早期有效的诊断显得尤为重要。迄今为止,临床上针对慢性 HBV 感染患者的病情严重程度以及抗病毒治疗效果的观测主要是通过观察患者肝功能改善情况、乙型肝炎病毒 DNA(hepatitis B virus DNA, HBV-DNA)转阴率以及乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)血清转换实现的^[2]。然而,对于低水平病毒复制的 HBeAg 阴性慢性 HBV 感染患者而言,上述观察指标存在一定的局限性。随着近年来相关研究的不断深入,乙肝病毒外模大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP)作为一种有效的监测指标开始被应用于临床的诊疗过程中^[3]。鉴于此,本研究通过探讨慢性 HBV 感染

患者血清 HBV-LP 水平与 HBV-DNA 及 HBeAg 的关系并予以分析,旨在为慢性 HBV 感染患者的早期诊断以及疾病进展的观察提供一种敏感的检测指标,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 2 月-2017 年 10 月廊坊市人民医院收治的慢性 HBV 感染患者 200 例为研究对象。纳入标准:(1)所有患者均符合 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学、肝病学会联合制定的《病毒性肝炎防治方案》中关于慢性 HBV 感染的相关诊断标准^[4];(2)年龄>18 岁;(3)临床病历资料完整者;(4)无嗜肝病毒感染。排除标准:(1)合并心、肾等脏器功能严重障碍者;(2)存在神经系统疾病或沟通障碍者;(3)伴有恶性肿瘤疾病者;(4)妊娠期或哺乳期妇女;(5)依从性较差者。其中男性 142 例,女性 58 例,年龄 19~68 岁,平均(28.52±7.42)岁。所有患者及其家属均签署知情同意书,廊坊市人民医院伦理委员会已批准此次研究。

1.2 研究方法 所有患者入院后均采集清晨空腹静脉血 5 ml,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清保

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(编号:201501239);廊坊市科学技术研究与发展计划自筹经费项目(编号:2017013140)

作者简介:董博(1985-),女,河北省廊坊市人,本科学历,主管检验师,主要从事免疫学相关检验方面的研究工作。

存于-80℃冰箱中待检。采用酶联免疫吸附法检测血清HBV-LP水平,具体方式如下:定量时采用定值标准品0、10、25、50、100、200 ng/ml,经由4-Paeameter model采用ETI-max3000全自动酶免分析仪(购自德国Diasorin公司)自动检测,并获取结果,试剂盒购自北京热景生物技术有限公司。采用荧光定量PCR(fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)测定HBV-DNA水平,具体通过PE 5700自动荧光PCR仪进行检测,其中HBV-DNA荧光定量试剂盒购自广州中山大学达安基因股份有限公司。采用EASYSATAMINI时间分辨仪检测乙肝五项,并采用雅培i2000 SR的Architect系统检测血清HBeAg水平,其中HBeAg试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司。上述操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 评价标准 (1)血清HBV-LP检测结果判读标准如下^[5],若定量时样品OD值 \geq 阴性对照均值(0 ng/ml标准品) $\times 2.1$ 即为阳性,若定性时样品OD值 $<$ 阴性对照均值(0 ng/ml标准品) $\times 2.1$ 即为阴性。(2)HBV-DNA检测结果判读标准如下^[6]:样品HBV-DNA含量 $< 1.0 \times 10^3$ 拷贝/ml时即为阴性,反之则为阳性。(3)血清HBeAg检测结果以S/CO ≥ 1 为阳性,反之则为阴性。

1.4 统计学方法 本研究数据均采用SPSS 20.0软件进行分析。偏态数据以中位数描述,组间比较实施秩检验。趋势分析则先将数据进行两分类转换,而后行Cochran Armitage趋势检验。其它计数资料以(n,%)表示,实施 χ^2 检验。此外,HBV感染患者血清HBV-LP与HBV-DNA及HBeAg的关系予以Pearson相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HBV感染患者血清HBV-LP与HBV-DNA的关系分析 趋势分析:随着HBV-DNA拷贝数的对数值不断升高,患者血清HBV-LP中位数呈逐渐升高趋势。经Cochran Armitage趋势检验差异有统计学意义($\chi^2 = 96.746, P < 0.001$),见表1。差异分析:各层组(不同的HBV-DNA拷贝数的对数值)与上一个对数值层组相比,Wilcoxon秩检验显示差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表1。

2.2 HBV感染患者HBV-LP、HBV-DNA及HBeAg阳性率比较 HBV感染患者HBV-LP阳性率为84.00%(168/200),高于HBV-DNA的阳性率63.50%(127/200)与HBeAg的阳性率44.00%(88/200),差异有统计学意义($\chi^2 = 21.708, 69.444$,均 $P < 0.001$)。

见表2。

表1 HBV感染患者血清HBV-LP与HBV-DNA的关系分析

HBV-DNA 拷贝数的对数值	例数	HBV-LP (ng/ml) M(P ₂₅ , P ₇₅)
<3	73	8.76(4.72, 43.26)
3~4	34	14.37(5.35, 51.52) ^a
5~6	31	21.53(10.32, 80.57) ^{bc}
>6	62	129.38(9.58, 128.73) ^{abc}

注:1趋势分析:为进行Cochran Armitage趋势检验,HBV-LP数据均行两分类资料转化,转化方法采用相关统计专家建议:按全部200例样本的中位数几何均值(24.334),对各样本数据赋值:1= ≥ 24.334 , 0= < 24.334),而后行Cochran Armitage趋势检验。2差异分析:采用Wilcoxon秩和检验,与HBV-DNA拷贝数的对数值 < 3 相比, $aP < 0.05$;与HBV-DNA拷贝数的对数值为3~4相比, $bP < 0.05$;与HBV-DNA拷贝数的对数值为5~6相比, $cP < 0.05$ 。

表2 HBV感染患者HBV-LP、HBV-DNA及HBeAg阳性率比较(n,%)

HBV-LP	HBV-DNA		HBeAg		合计
	阳性	阴性	阳性	阴性	
阳性	116(58.00)	52(26.00)	82(41.00)	86(43.00)	168(84.00)
阴性	11(5.50)	21(10.50)	6(3.00)	26(13.00)	32(16.00)
合计	127(63.50)	73(36.50)	88(44.00)	112(56.00)	200(100.00)

2.3 HBV感染患者血清HBV-LP与HBV-DNA及HBeAg的相关性分析 经Pearson相关性分析可得,HBV感染患者血清HBV-LP水平与HBV-DNA拷贝数的对数值及HBeAg均呈正相关(分别 $r = 0.598, P < 0.001$; $r = 0.523, P = 0.012$),见图1。

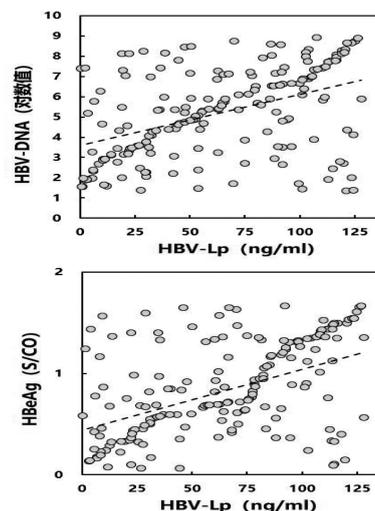


图1 HBV感染患者血清HBV-LP与HBV-DNA及HBeAg的相关数据散点图

3 讨论

我国乙型肝炎的发病率高,且绝大部分患者病程呈慢性持续化进展,从而增加了乙肝肝硬化、肝癌等疾病的发生风险^[7-8]。目前,临床上诊断HBV主要是通过检测HBV血清标志物以及HBsAg、HBV核心抗体(hepatitis b core antibody, HBcAb)等实现^[9]。然而,上述检测方式仅能反映患者既往感染情况,难以准确反

映病毒复制及活动情况。临床上主要通过检测患者 HBV-DNA 病毒复制水平,作为抗病毒治疗的适应症及疗效评判,但该方法仍存在一定缺陷,部分 HBeAg 阳性的患者,e 抗原转阴后,血清学 HBV-DNA 检测阴性,肝穿检测或肝功能异常提示患者 HBV 病毒仍处于活动期,其原因可能是 HBV 患者经抗病毒治疗后,体内 HBV-DNA 载量下降至检测限以下 ($<10^3$ 拷贝/ml),另外 HBV 病毒发生突变,常规检测方法无法反映真实病毒复制水平。另有文献报道,血清 HBV-DNA 检测阴性时,并不能真实反映肝内的 cccDNA 复制水平,在血清 HBV-DNA 水平较低时,患者肝脏组织中的 HBV-DNA 仍可保持在一定的水平^[10-11]。因此,单纯检测 HBV 患者血清学 DNA 复制水平并不能完全反映患者真实的病情进展情况。

HBV-LP 作为导致干细胞毒性以及双重跨膜拓扑结构的 HBV 包膜蛋白之一,由 PreS1、PreS2 及 S 结构域组成,部分研究报告表明,慢性 HBV 患者血清感染性可能与 Dane 颗粒的含量以及富含大蛋白的亚病毒颗粒数量存在一定相关性^[12-13]。目前临床上的抗病毒治疗只能针对 cccDNA 的再复制产生一定的抑制作用,对已经形成的病毒表达蛋白却无抑制作用,富含大蛋白的亚病毒颗粒仍存在于人体内,通过反式激活导致病毒的持续复制,继续致肝细胞液泡化及凋亡^[14-15]。血清 HBV-LP 检测是判断 HBV 完整外膜存在情况的重要指标,代表着病毒基因以及亚病毒颗粒存在^[16-17]。研究结果发现,随着 HBV-DNA 拷贝数的对数值不断升高,患者血清 HBV-LP 中位数呈逐渐升高趋势($P<0.05$),经 Pearson 相关性分析可得,HBV 感染患者血清 HBV-LP 水平与 HBV-DNA 拷贝数的对数值及 HBeAg 均呈正相关($P<0.05$),提示血清 HBV-LP 表达水平与 HBV-DNA 在机体内的复制水平存在密切相关性。此外,本研究还发现 HBV 感染患者 HBV-LP 阳性率为 84.00% (168/200),高于 HBV-DNA 阳性率 63.50% (127/200) 与 HBeAg 阳性率 44.00% (88/200),血清 HBV-LP 诊断 HBV 感染的阳性率相比 HBV-DNA 与 HBeAg 更高。其可能是由于 HBeAg 阴性的乙肝患者,其由于 HBV-DNA 前 C 区出现突变,无法合成相关 HBeAg,HBV-DNA 检测及血清学检测均为阴性,但病毒仍处于活动期,蛋白表达仍存在,HBV-LP 仍可在血清中被检出。且 HBV-DNA 前 C 区突变率远高于前 S 区,所以 HBV-LP 表达水平较 HBeAg 表达水平更为稳定,HBV-LP 表达水平较 HBV-DNA 复制水平在评估 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者体内病毒复制、疾病发展以及抗病毒治疗效果中更

具优势^[18-19]。

综上所述,慢性 HBV 感染患者的血清 HBV-LP 水平与 HBV-DNA 复制水平及 HBeAg 表达水平存在密切关系,且血清 HBV-LP 检测可在一定程度上弥补 HBV-DNA 评估抗病毒治疗效果以及评估治疗预后方面的不足之处,同时有利于了解 HBeAg 阴性慢性 HBV 感染患者体内的 HBV 复制情况,从而制定具有针对性的干预措施,达到降低肝硬化或肝癌发生的风险,具有一定的临床治疗指导价值。

参考文献

- [1] 王亚东,王玮,申川,等.慢性乙型肝炎病毒感染者不同免疫状态下自然杀伤细胞 G2D 表达及其活化意义[J].中华传染病杂志,2017,35(1):5-10.
- [2] Zhao Q, Sun X, Liu C, et al. Expression of the microRNA-143/145 cluster is decreased in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and may serve as a biomarker for tumorigenesis in patients with chronic hepatitis B[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5):6115-6122.
- [3] 杜景华,张宇,郝祯卓,等.慢性乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒表面大蛋白水平检测意义探讨[J].实用肝脏病杂志,2016,19(5):599-600.
- [4] 张大驰,王振坤.慢性 HBsAg 携带者的诊断和转归[J].中国误诊学杂志,2005,5(11):2029-2030.
- [5] 王山军,赵文轩,张瑞,等.HBV-LP 与 HBV 复制的相关性研究[J].肝脏,2016,21(10):855-857.
- [6] 贺超奇,覃江凤,梁友芳,等.血清乙型肝炎病毒包膜大蛋白检测与病毒复制的相关性研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(1):23-25.
- [7] Choi JW, Kim SH, Seo JH, et al. Real world experience of telbivudine versus entecavir in patients with chronic hepatitis B, including long-term outcomes after treatment modification[J]. Yonsei Med J, 2018, 59(3):383-388.
- [8] 奚经巧,林枝,赵春,等.肝功能正常慢性乙肝患者肝组织 GP73 表达与纤维化及炎症分级关系[J].实用预防医学,2018,25(9):1125-1128.
- [9] Mozessohn L, Chan KK, Feld JJ, et al. Hepatitis B reactivation in HBsAg-negative/HBeAb-positive patients receiving rituximab for lymphoma: a meta-analysis[J]. J Viral Hepat, 2015, 22(10):842-849.
- [10] Feng J, Huang J, Li Z. Kusehin combined with adefovir dipivoxil affects the HBV-DNA load in serum, immune functions and liver functions of patients with chronic hepatitis B[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6):5837-5842.
- [11] 程振波,谭黎明,李建英,等.乙型肝炎病毒感染者血清 HBV-LP 检测意义及其与 PreS1 抗原、HBV DNA 之间关系的研究[J].实用预防医学,2016,23(4):487-489.
- [12] 黄象艳,石庆芬,刘超,等.隐匿性感染的慢性乙型肝炎患者 HBV S 基因分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(6):512-515.
- [13] 呼巧玲,杨鹏飞.不同临床类型老年慢性乙型肝炎患者的 HBsAg、HBV DNA 水平及与肝功能的的关系[J].中国老年学杂志,2014,34(3):674-676.
- [14] Liu H, Li F, Zhang X, et al. Differentially expressed intrahepatic genes contribute to control of hepatitis B virus replication in the inactive carrier phase[J]. J Infect Dis, 2018, 217(7):1044-1054.
- [15] Godon O, Evlachev A, Bourguin M, et al. Recognition of core-derived epitopes from a novel HBV-targeted immunotherapeutic by T-cells from patients infected by different viral genotypes[J]. Vaccine, 2015, 33(36):4548-4553.
- [16] 夏芳,徐元宏,郑美娟,等.乙型肝炎病毒外膜大蛋白、DNA、前 S1 抗原检测用于评价乙型肝炎病毒复制状况的对比分析[J].中华预防医学杂志,2017,51(6):501-505.
- [17] 龚杰,刘柏林,方艳秋,等.乙型肝炎病毒外膜大蛋白、前 S1 抗原、HBV-DNA 与血清标志物之间相关性分析[J].中国实验诊断学,2013,17(9):1634-1637.
- [18] 张苏贞,张杰,余算,等.血清乙型肝炎病毒大蛋白与乙肝前 S1 抗原联合检测在 HBeAg 阴性乙肝患者诊断中的意义[J].中国微生态学杂志,2017,29(8):935-938.
- [19] 尹凌凡,唐景云,张日妹,等.乙型肝炎病毒外膜大蛋白意义分析及与慢性乙型肝炎患者病毒复制的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2016,37(23):3271-3273.