文章编号:1000-5404(2007)13-1305-03

论著

HBV标志物定量与病毒载量关系探讨

田 沂,唐晓鹏,杨 旭,罗开忠,黄 力 (中南大学湘雅二医院肝病研究中心,长沙 410011)

提 要:目的 研究乙型肝炎病毒各血清标志物含量与HBV-DNA含量的关系。**方法** 采用时间分辨免疫荧光分析法(TRIFA)和实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)分别测定1 486例乙肝患者血清中乙型肝炎病毒抗原抗体定量和病毒含量。**结果** 不同HBV标志物阳性模式的HBsAg定量存在显著差异,相同模式的HBsAg定量也差异极大。HBeAg(+)模式的HBV-DNA显著高于HBeAb(+)模式及HBeAg(-)HBeAb(-)模式($P<0.01$),而后两者间无显著差异($P>0.05$)。HBsAg、HBeAg含量与HBV DNA正相关(r值分别为0.383、0.635,$P=0.01$),HBeAb含量与HBV DNA负相关($r=-0.563$,$P=0.01$)。HBsAg定量与HBeAg定量正相关($r=0.466$,$P=0.01$),与HBeAb定量负相关($r=-0.524$,$P=0.01$)。**结论** HBV标志物定量之间及与HBV DNA含量间存在一定相关性,但个体差异极大。全面了解HBV标志物含量及HBV DNA定量可更准确判断病毒复制、状态,为临床决策提供可靠依据。

关键词: HBV;DNA,肝炎病毒,乙型;PCR,荧光定量;免疫荧光分析,时间分辨
中图法分类号: R373.21; R446.62; R512.620.4 **文献标识码:** A

Correlation of virus load to contents of serologic markers in HBV patients

TIAN Yi, TANG Xiao-peng, YANG Xu, LUO Kai-zhong, HUANG Li (Liver Diseases Research Center, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between HBV load and the contents of serologic markers. **Methods** Time-resolved immunofluorometric assay (TRIFA) was used to detect the contents of HBV immunological markers and real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) was used to measure the HBV DNA of 1 486 clinical serum samples. The data was analyzed by SPSS11.0. **Results** The HBsAg contents were extremely different in the same or different models of serologic markers. The HBV copies of HBeAg(+) patients were significantly more than HBeAb(+) and HBeAg(-)HBeAb(-) patients ($P<0.01$), but without statistical significance between HBeAb(+) and HBeAg(-)HBeAb(-) patients ($P>0.05$). The contents of both HBsAg and HBeAg were positively correlated with the load of HBV DNA ($r=0.383$, 0.635, $P=0.01$), while HBeAb negatively correlated to it ($r=-0.563$, $P=0.01$). Direct correlation existed between the contents of HBsAg and HbeAg ($r=0.466$, $P=0.01$) while inverse correlation was observed between the contents of HBsAg and HbeAb ($r=-0.524$, $P=0.01$). **Conclusion** A certain correlation exists between the contents of serologic markers and DNA of hepatitis B but the great variance exists among individuals. Combining FQ-PCR with TRIFA method is profitable for judging the state of HBV viral replication roundly and provides scientific and reliable evidences for clinical decisions.

Key words: hepatitis B virus; HBV DNA; polymerase chain reaction, fluorescence ration; fluoroimmunoassay, time-resolved

临床研究显示,根据乙型肝炎病毒(HBV)抗原抗体模式,难以准确地判断病毒复制程度及其传染性的强弱[1]。时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved immunofluorometric assay,TRIFA)是新一代超微量分析技术,具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、重复性好等特点[2],可定量检测血清中乙肝病毒抗原抗体的浓度,准确评估乙肝病毒蛋白合成水平。我们收集了1 486例HBV感染者病毒标志物的定量测定及HBV DNA含量检测结果,发现乙肝病毒表面抗原、e抗原及e抗体含量与HBV-DNA含量间有一定相关性,但个体

作者简介:田 沂(1974-),男,湖南省安化县人,硕士研究生,主治医师,主要从事病毒性肝炎及肝干细胞移植方面的研究。电话:(0731)5292105,E-mail:doctortianyi@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-06-12;修回日期:2006-10-10

间存在极大差异,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 标本来源

血清标本取自我院2003－2005年肝病专科门诊及住院的乙型肝炎患者共1 486例,其中男性1 072例,女性414例,年龄5～82(28.73±11.59)岁。同时检测其HBV-M定量及HBV DNA含量。

1.2 方法

1.2.1 HBV抗原抗体定量测定 时间分辨荧光免疫分析法,乙型肝炎抗原抗体定量诊断试剂盒及检测用的Anytest2000型时间分辨荧光免疫检测系统均由上海新波生物有限公司提供,由专职医师严格按产品说明书操作。结果判断:HBsAg大于0.50 ng/ml为阳性,HBeAg大于0.03 NCU/ml为阳性,HBeAb大于1.50 NCU/ml为阳性。

1.2.2 HBV DNA测定 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法,HBV荧光定量PCR诊断试盒由中山医科大学达安基因诊断中心出品。仪器为PE5700自动荧光PCR仪(美国Perkin Elmer公司),由专职检验师按产品说明书操作。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件进行方差分析,3组病毒模式间HBV DNA载量构成分布比较用Kruskal-Wallis H检验,组间两两比较用Nemenyi法检验,并进行Pearson相关分析。

2 结果

2.1 不同HBV标志物模式及HBV DNA含量HBsAg定量的比较

3种病毒模式HBsAg定量的分布差异显著($H_C=365.65$, $P<0.01$),HBeAg(+)组与HBeAg(－)HBeAb(－)组、HBeAb(+)组间有显著差异(χ^2分别为46.94、363.23,$P<0.01$),后两组间亦有差异($\chi^2=7.62$,$P<0.05$);3种病毒模式间HBsAg定量均数均存在显著差异:HBeAg(+)模式 > HBeAg(－)HBeAb(－)模式 > HBeAb(+)模式($F=125.180$,$P=0.01$)。同种病毒模式患者的HBsAg定量可相差数百倍;不同级别HBsAg定量的HBV DNA水平构成也有显著差异($H_C=416.47$,$P<0.01$)。见表1、2。

表1 不同HBV标志物模式HBsAg定量的比较

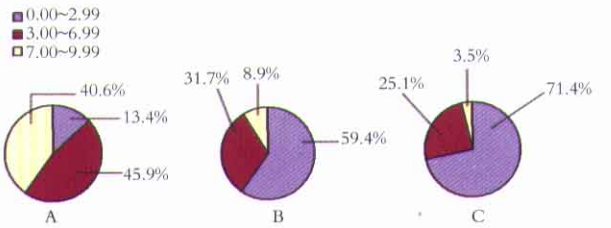
HBsAg定量(ng/ml)	HBV标志物模式		
	HBeAg(+)	HBeAg(－)HBeAb(－)	HBeAb(+)
0.51～9.99	9	4	122
10.00～99.99	13	18	173
100.00～199.99	61	24	160
200.00～299.99	290	42	198
300.00～350.00	237	13	85
>350.00	30	0	7
HBsAg($\bar{x}\pm s$)	284.78±66.89	221.93±92.91	168.06±114.96
HBsAg范围	0.53～405.69	1.27～345.90	0.51～380.18

表2 不同级别HBsAg定量的HBV NDA水平构成比较

HBsAg定量(ng/ml)	log HBV DNA		
	0.00～2.99	3.00～6.99	7.00～9.99
0.51～9.99	131	4	0
10.00～99.99	157	46	1
100.00～199.99	157	68	20
200.00～299.99	144	265	121
300.00～350.00	80	120	135
>350.00	9	10	18

2.2 不同HBV标志物模式HBV DNA含量的比较

HBeAg(+)模式HBV DNA含量明显高于HBeAg(－)HBeAb(－)和HBeAb(+)模式($\chi^2=88.96$,533.18,$P<0.01$),后两者间无显著性差异($\chi^2=4.90$,$P>0.05$)。见图1。



A:HBeAg(+)($n=640$);B:HBeAg(－)HBeAb(－)($n=101$);C:HBeAb(+)($n=745$)

图1 不同HBV标志物模式HBV DNA载量构成分布

2.3 乙肝病毒标志物含量之间及与HBV DNA含量的相关分析

HBsAg定量与HBeAg定量呈正相关($r=0.466$,$P=0.01$);与HBeAb定量呈负相关($r=-0.524$,$P=0.01$)。HBsAg定量、HBeAg定量与HBV DNA含量呈正相关(r值分别为0.383、0.635,$P=0.01$)。HBeAb定量与HBV DNA含量呈负相关($r=-0.563$,$P=0.01$)。

3 讨论

荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)能直接检测血液中HBV的核酸含量,是反映HBV复制的较为特异性指标,且敏感性高[3-6];TRIFA法则可精确测定乙肝病毒抗原抗体含量,评估病毒蛋白合成水平。两者相结合,可从不同的角度验证乙肝病毒复制状态。相关分析显示HBsAg、HBeAg定量与HBV DNA之间均呈正相关,且HBeAg定量与HBV DNA的相关性更大。这可能是由于HBV复制时,编码C蛋白的3.5 kb mRNA同样也是子代病毒DNA的模板,而S蛋白由2.1 kb mRNA编码,故HBeAg与病毒体的消长更一致,和HBV DNA复制的关系更加紧密。此外,HBV在肝组织中整合并非稀有事件[7],整合的HBV大多有基因组

的缺失，保留最多的是 X 基因和 S 基因，可表达完整或截短的 X 蛋白或 S 蛋白[8]，合成分泌仅含 HBsAg 的病毒外壳，使得部分 HBV 感染者中虽无病毒复制，但都长期产生 HBsAg，这也降低了其与 HBV DNA 的相关性。HBsAg 定量与 HBeAg 定量正相关，而与 HBeAb 定量负相关，说明血清学的转换确实表明病毒复制减弱。而且 HBeAb 定量与 HBV DNA 含量负相关，研究中 HBV DNA 定量 $<10^3$/ml 的患者占 HBeAb(+)者的 71.4%，也提示 HBeAb 与病毒清除有关，其含量增长反应了机体对病毒的免疫清除增强。当然乙肝病毒前 C 区变异是一种例外，但其所占患者比例并不高，对本研究结果影响不大。至于乙肝病毒抗原抗体模式与病毒载量的关系，与以往报道类似[1]，这里不再赘述。

研究者注意到各病毒标志物含量与 HBV DNA 含量间的相关系数并不高(决定系数 R^2 为 14.7% ~ 40.3%)，而且同一 HBV DNA 数量级或相同病毒模式的 HBsAg 含量也差异极大。这一方面是由于人群对乙肝病毒特异性免疫应答水平存在极大的个体差异，不同的感染方式和年龄有不同的自然过程[9,10]。机体对乙肝病毒的免疫应答水平随年龄、遗传因素不同而差异很大。另一方面，使用抗病毒药物或患者处在免疫清除阶段时，血清中病毒抗原与 HBV DNA 水平的变化速度是不一致的，后者清除速度较快，根据最近对 HBV 在人体内动力学研究，HBV 的半衰期为 26.4 h，病毒存活期为 36.6 h，日更新率为 48%。而当血清 HBV DNA 降至检测水平以下时，肝内仍可有 HBV 复制[11]，感染肝细胞仍可合成病毒抗原，因此，病毒抗原的下降、血清学转换与 HBV DNA 变化不同步；而在免疫耐受期，病毒标志物水平与病毒载量相关性相对较高。此外，血清中乙肝病毒抗原是由肝细胞合成分泌，其含量与肝细胞内 HBV cccDNA 水平及转录水平有关，与血清 HBV DNA 含量并非直接因果关系。而肝细胞内 HBV cccDNA 水平相对比较稳定，血清 HBV DNA 受药物、机体免疫状态的影响，更易波动。文献[12]报道肝组织 HBV cccDNA 与组织 HBV DNA 定量呈高度相关($r=0.837$)，而与血清 HBV DNA 水平相关性较低($r=0.627$)，因此，血清 HBV DNA 不能真实反映肝组织内 HBV 感染及复制情况。这也可能是造成病毒蛋白与血清 HBV DNA 水平相关性不高的缘由之一。可见，TRIFA 法测定乙肝病毒标志物定量，是对 FQ-PCR 法的有益补充，有助于了解患者病毒抗原的合成与释放水平，判断患者肝细胞内病毒复制程度。尤其适应于经抗病毒治疗后 HBV DNA 转阴者，监测 eAg/eAb 的动态消长过程，观察 HBsAg 含量的变化，有助于判定治疗终点或调整治疗方案[13]。研究表明，采用 TRIFA 法测定乙肝病毒标志物含量，与 FQ-PCR 法测定 HBV DNA 含量相结合，全面地掌握患者乙肝病毒复制程度及病毒蛋白合成水平，能为临床决策个体化提供更加科学可靠的依据。

参考文献：

[1] 杨　旭，罗红雨，张永红，等. 乙型肝炎病毒载量与抗原抗体模式的关系[J]. 中华肝脏病杂志，2002，10(4)：269－271.

[2] Meurman O H, Hemmila I A, Lovgren T N, *et al*. Time-resolved fluoroimmunoassay: a new test for rubella antibodies[J]. J Clin Microbiol, 1982,16(5): 920 - 925.

[3] 刘敬忠，谭淑珍，吴　燕，等. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 DNA[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2001，21(6)：690－692.

[4] 万宝美，刘淑君，柳新军，等. 荧光定量聚合酶链反应检测 HBV-DNA 的意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2004，18(2)：162－164.

[5] 黄燕萍，王宇明. 荧光定量 PCR 与普通 PCR 检测 HBV DNA 的对照分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(8)：992－993.

[6] 曹红卫，卫　国，冯文曦，等. 乙肝病毒 DNA 荧光定量 PCR 检测及其意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：866－868.

[7] Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, *et al*. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging [J]. Oncogene, 2001, 20 (43): 6233－6240.

[8] 张利宁，曹英林，宋　静，等. 原发性肝细胞癌中 HBV 各基因片段整合与癌基因、抑癌基因表达的相关研究[J]. 中华肝脏病杂志，1999，7(3)：138－139.

[9] 毛国强，朱朝敏，许红梅. 慢性乙肝病毒 B 亚型感染儿童不同 HBeAg 状态下 CP 基因变异测定[J]. 郑州大学学报，2006，41(2)：251－253.

[10] 赵国强，张世杰，刘全离，等. HBsAg 和 B19 VP2 复合抗原的基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 郑州大学学报，2005，40(3)：387－390.

[11] 吕　卉，马立宪，徐皖苏，等. 定量检测慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒 DNA 的临床价值[J]. 中华肝脏病杂志，2003，11(3)：173－175.

[12] 马艳丽，任万华，董振芳，等. 乙型肝炎病毒 cccDNA 定量与乙型肝炎临床及病理关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2005，14(6)：584－586.

[13] 谢士达，刘成永，高玉金，等. HBeAg 和抗-HBe 血清学转换的动态变化对拉米夫定疗效的评价[J]. 肝脏，2005，10(4)：305，317.

(编辑　汪勤俭)