短篇论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412017

69例不明原因肝功异常患者血清HBV痕量基因检测及其阳性结果分析

袁 琴[1*],刘飞飞[2*],罗 旗[1],刘何蕾[3],李成敏[1],郑 洁[1],曾爱中[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院感染科[1];618000 四川 德阳,德阳市人民医院感染科[2];402360 重庆,大足县人民医院感染科[3])

[摘要] **目的** 检测不明原因肝功能异常患者(伴各型乙型肝炎病毒抗体阳性)的隐匿性乙型肝炎病毒感染情况,探讨其临床特征。**方法** 用巢式PCR扩增69例不明原因肝功异常患者的血清HBV C、S、X基因片段,并分析与总结隐匿性乙型肝炎病毒感染的临床、生化和血清学特点。**结果** 69例不明原因肝损害患者隐匿性乙型肝炎病毒感染检出13例,检出率为18.84%,以大于40岁的男性为主。在检出的13例患者中,10例(76.92%)仅有轻微乏力、食欲减退症状,9例(69.23%)总胆红素值正常或轻度升高,丙氨酸氨基转移酶有不同程度的异常,10例(76.92%)隐匿性乙型肝炎病毒感染的血清学模式为HBsAb(-)/HBcAb(+)/HBeAb(±)。**结论** 乙型肝炎病毒的隐匿性感染是不明原因肝功异常的原因之一,其所致的肝炎临床症状轻微,血清学模式呈多样性,生化以不同程度的转氨酶升高为主。

[关键词] 肝功能异常;乙型肝炎病毒;隐匿性;巢式PCR

[中图法分类号] R446.6;R512.62 [文献标志码] A

目前所知的导致肝损害的原因很多,但由于各种原因的限制,临床上仍有5%~10%的病例不能用现有的病因来解释,即所谓的"不明原因肝损害"[1]。随着高灵敏聚合酶链式反应技术的广泛应用,有研究证实隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult HBV infection, OBI)是不明原因肝损害的病因之一,其不仅可导致输血、移植及透析感染HBV[2-4],还与隐匿性肝硬化、肝癌密切相关[5-7]。目前对于该病因所致肝功能异常的临床特点的研究甚少,临床实践对此认识不足。本研究采用巢式PCR对不明原因肝功异常患者中的OBI进行检测,总结分析其临床特征,以期为该病的临床诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年3月至2014年9月于重庆医科大学附属第一医院感染科就诊,并通过详细询问病史,进行血液生化、病毒学及免疫学、腹部B超(或腹部CT)等检查,考虑诊断为不明原因肝炎的门诊或住院患者69例,其中男性39例,女性30例;年龄为(48.7±12.5)岁;病程7 d至10年不等。所有入选病例均满足HBsAg阴性、HBV-DNA定量$<10^3$ IU/mL,既往无急、慢性乙型肝炎病毒感染发作的病史,同时排除甲、丙、戊、EB和CMV等病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、自身免疫性肝病、遗传代谢性肝病、药物性肝炎、胆道梗阻、重症感染等可能引起肝损害的疾病。所有入选患者知情,征得其同意并签署知情同意书。该组患者丙氨酸氨基转移酶(ALT)为192(63~967)U/L,天门冬氨酸氨基转移酶(AST)为127(21~695)U/L,总胆红素(TBiL)为21.1(5.4~222.0)μmol/L,直接胆红素(DBiL)为7.8(1.2~195.1)μmol/L,谷氨酰转肽酶(GGT)为41(10~438)U/L,白蛋白(ALB)为40.94(19~49)g/L。

1.2 方法

1.2.1 血清留取及HBV DNA提取 留取入选患者清晨空腹静脉血4 mL,置于台式离心机中以3 000 r/min离心15 min,上清液于-70 ℃冰箱中保存。采用High Pure Viral Nucleic Acid Kit(购于德国Roche Diagnostics GmbH公司)提取血清HBV DNA,以上操作均按严格按照说明书进行。

1.2.2 引物设计 据HBV基因组C、S及X区保

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30972587)

*: 同等贡献者

[通信作者] 曾爱中,E-mail:aizhong9@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0953.018.html(2015-03-19)

守区段各设计 2 对巢式引物[6]。引物序列见表 1。

表 1 巢式 PCR 检测 HBV 基因 C、S、X 区的引物序列

引物	序列(5′→3′)	位置(nt)	产物大小(bp)
C 基因			
C1s	CTGGGAGGAGTTGGGGG	1 730 – 1 747	774
C2a	GTAGAAGAATAA AGCCC	2 503 – 2 487	
C3s	GGTCTTTGTACTCGGAGGCTG	1 763 – 1 783	693
C4a	ATACTAACATTGACATTCCC	2 455 – 2 436	
S 基因			
S1s	AGA ACATCGCATCAGGACTC	159 – 178	484
S2a	CATAGGTATCTTGCGAAAGC	642 – 623	
S3s	AGGACCCCTGCTCGTGTTAC	181 – 200	439
S4a	AGATGATGGGATGGGAATAC	619 – 600	
X 基因			
X1s	CTAGCCGCTTGTTTTGCTCG	1 282 – 1 301	385
X2a	TTATGCCTACAGCCTCCTAG	1 666 – 1 647	
X3s	GGTCTT ACATAAGAGGACTC	1 518 – 1 537	108
X4a	GTTCACGGTGGTCTCCAT	1 625 – 1 606	

1s、2a:外侧引物;3s、4a:内侧引物

1.2.3 巢式 PCR 扩增 50 μL 总体积反应体系包括:双蒸水 18 μL,上下游引物(华大基因提供)各 1.0 μL,Prime STAR™HS(大连宝生物工程有限公司生产)25 μL,模板 DNA 5.0 μL。第 2 轮 PCR 的 DNA 模板为第 1 轮的产物 5.0 μL,引物为 2 条内引物,其余成分同前。第 1(2)轮反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 45 s,55 ℃(57 ℃) 1 min,72 ℃ 90 s,循环 10 次,94 ℃ 45 s,53℃(55 ℃) 1 min,72 ℃ 90 s,循环 15(25)次,72 ℃ 7 min。分别以双蒸水及血清 HBV DNA 定量阳性的慢性乙肝患者的血清为模板,在 HBV 基因的 C、S、X 区分别进行扩增,其产物分别作阴、阳性对照。

1.2.4 电泳及成像 第 2 次 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,电泳结束后置于凝胶成像分析系统成像,C、S、X 区扩增产物的大小分别为 693、439、108 bp,出现特异长度的扩增条带为阳性。

1.2.5 OBI 的诊断 同一血清标本中有 2 个或者以上区段的扩增条带同时阳性则判定为 OBI[7]。

2 结果

2.1 基本特征

69 例不明原因肝损害患者有 13 例 OBI,感染率为 18.84%。13 例 OBI 中男性占 69.23%(9/13),女性占 30.77%(4/13);年龄(51.69 ± 15.887)岁,大于 40 岁 的 OBI 占 76.92%(10/13)。

2.2 临床表现

13 例 OBI 患者中,10 例(76.92%)仅有轻微乏力、食欲减退症状;2 例患者(15.38%)出现较重的乏力、纳差、厌油及轻微的巩膜黄染;仅有 1 例患者(7.69%)出现明显尿黄、皮肤巩膜黄染;无患者出现皮肤黏膜出血、双下肢水肿、发热及腹胀。

2.3 生化指标

ALT 轻度升高(≤正常 3 倍)6 例(46.15%),中、重度升高(>正常 3 倍)7 例(53.85%);TBiL 正常者(3.4 ~20.5 μmol/L)6 例(46.15%),轻度升高(≤正常 2 倍)3 例(23.08%),中度升高(>正常 2 ~5 倍)3 例(23.08%),重度升高(>正常 5 倍)1 例(7.69%);10 例(76.93%)ALB≥35 g/L,1 例(7.69%)ALB 介于 32 ~35 g/L,2 例(15.38%)ALB≤32 g/L。

2.4 血清学指标

13 例 OBI 患者的血清学模式以 HBsAb(–)/HBcAb(+)/HBeAb(±)为主,占 76.92%(10/13),而在血清学模式表现为 HBsAb(+)/HBcAb(+)/HBeAb(±)的患者中依然可检出 OBI,占 23.08%(3/13,表 2)。

表 2 13 例 OBI 患者的血清学模式

血清学模式(+)	*n*	HBV DNA(+)[例(%)]
HBcAb	23	4/13(30.77%)
HBeAb/HBcAb	20	6/13(46.15%)
HBsAb	1	0(0)
HBsAb/HBcAb	11	2/13(15.39%)
HBsAb/HBeAb/HBcAb	14	1/13(7.69%)

3 讨论

本研究有如下特点:①入选病例不包括隐匿性肝硬化、隐匿性肝癌;②入选患者均同时满足 HBsAg/HBeAg 阴性、HBV DNA 定量 $< 10^3$ IU/mL;③设计有 3 对特异性引物。巢式 PCR 检测结果显示:不明原因肝炎患者中 OBI 的感染率为 18.84%,与国内文献[1,8]所报道的 12.5% ~28.3% 基本一致。而国外文献[7,9]报道的感染率为 1.9% ~30%,造成这些差异的原因可能与乙肝病毒感染的地方流行性、研究对象纳入标准及 HBV DNA 检测方法的迥异有关。

本研究对 13 例 OBI 所致肝损害的临床资料的分析显示:此类患者主要以 >40 岁男性多见,其临床症状一般较轻微,肝功指标中 ALT 有不同程度升高,TBiL、ALB 以正常或轻中度升高为主,这与李凌华等[10]对 45 例 OBI 所致肝损害的临床分析结果一致。李炜等[11]研究了不明原因肝病患者中隐匿性 HBV 感

染的病理特点,14 例在临床上符合 OBI 相关性肝炎诊断的患者肝组织病理检查结果显示:1 例为早期肝硬化,11 例为明显肝硬化,2 例为肝细胞性肝癌,提示 OBI 所致的肝脏疾病起病及进展隐匿,在临床实践中应对此给予足够的重视。

本研究结果显示:不明原因肝损害中,OBI 的血清学模式表现形式多样,HBeAb 和/或 HBcAb 阳性的患者 OBI 感染率为 76.92%,较 HBsAb/HBcAb 和/或 HBeAb 阳性者更易出现。值得注意的是,即使 HBsAb 阳性,当联合其他乙肝抗体阳性时仍需警惕 OBI 的可能。OBI 是不明原因肝功能损害的原因之一,HBsAg 阴性时不能除外 HBV 相关性肝损伤。学者们认为肝组织中 HBV DNA 阳性是诊断 OBI 的金标准,结合我国情况,当肝功损害原因不明而肝组织难以获得时,可采用巢式 PCR 或荧光定量实时 PCR 方法检测血清 HBV DNA 基因组 C、S、X 区基因成分,但由于其操作过程复杂、费用高的限制,临床实践中尚未普及,有待针对 HBV C、S、X 区的快速检测基因芯片的研发成功。

本研究再次证实 OBI 是不明原因肝功能损害的重要病因之一,且通过对 OBI 所致肝损害的临床资料分析发现:OBI 所致的肝炎临床症状轻微,胆红素及白蛋白的变化不明显,主要以不同程度的转氨酶升高;OBI 的血清学模式呈多样性,在 HBeAb 和/或 HBcAb 阳性的患者中更易出现。OBI 所致的肝功损害不容忽视,但当其所致肝功损害明显时,是否需要启动抗病毒治疗尚无循证学依据,有待于更多研究证实。本研究属于横断面研究,样本量小,尚缺乏对患者长期随访资料的分析,因此,研究结果尚需大样本、队列研究证实。

参考文献:

[1] 王霞, 陈常云, 张加军, 等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染的检测及临床特点分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(4): 243-245.

[2] Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, *et al*. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients [J]. J Hepatol, 2008, 48(6): 1022-1025.

[3] Hollinger F B, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation [J]. J Viral Hepat, 2010, 17(1): 1-15.

[4] Di-Stefano M, Volpe A, Stallone G, *et al*. Occult HBV infection in hemodialysis setting is marked by presence of isolated antibodies to HBcAg and HCV [J]. J Nephrol, 2009, 22(3): 381-386.

[5] Said Z N. An overview of occult hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(15): 1927-1938.

[6] Hassan Z K, Hafez M M, Mansor T M, *et al*. Occult HBV infection among Egyptian hepatocellular carcinoma patients [J]. Virol J, 2011, 8: 90.

[7] Kitab B, Ezzikouri S, Alaoui R, *et al*. Occult HBV infection in Morocco: from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma [J]. Liver Int, 2014, 34(6): e144-e150.

[8] Fang Y, Shang Q L, Liu J Y, *et al*. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China[J]. J Infect, 2009, 58(5): 383-388.

[9] Kaviani M J, Behbahani B, Mosallaii M J, *et al*. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(31): 5048-5050.

[10] 李凌华, 唐小平, 石裕明. 45 例 HBsAg 阴性乙型肝炎的临床分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2007, 10(5): 301-302, 308.

[11] 李炜, 王霞, 王琰, 等. 不明原因肝病患者肝组织 HBV 及 HCV 抗原的检测及临床和病理特点[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2009, (4): 5-8.

(**收稿**:2014-12-02;**修回**:2015-01-05)

(编辑 王 红)