维普资讯 http://www.cqvip.com

169-170,173

22

文章编号：0253-3626(2000)02-0169-02

乙肝病毒标志物常见模式与HBV-DNA检出量的比较分析

R512.620.4

严 立[1]，何 芳[2]，张玉洪[1]

(1. 重庆医科大学临床学院检验科 400016; 2. 重庆医科大学临床学院药剂科 400016)

摘 要 目的：探讨乙肝病毒免疫标志物常见模式与HBV-DNA量的关系。方法：采用荧光定量PCR法对150份测定的血清标本进行乙肝病毒标志物与HBV-DNA定量测定。结果：21份HBsAg、HBeAg、HBcAb阳性标本，HBV-DNA全部阳性，平均拷贝数为3.5×10^8；6份HBsAg、HBeAg阳性的标本也均为阳性，平均拷贝数为1.2×10^9；27例HBsAg、HBeAb、HBcAb阳性的标本中HBV-DNA阳性12例，平均拷贝数7.5×10^6；24例HBsAg、HBcAb阳性的模式中阳性8例，平均拷贝数8.5×10^5；其它HBsAb阳性和全阴性血清HBV-DNA都呈阴性。结论：提示FQ-PCR可以检测HBV的真实感染和复制状态，对于乙型肝炎的临床诊断，治疗方案的选择和疗效观察有较大的指导意义。 乙型肝炎 HBV-DNA

关键词 乙型肝炎病毒；标志物；模式；定量聚合酶链反应；荧光光度测量法 血清免疫标志物

中国图书分类法分类号：R446.5 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-12-28

The relationship between the common mode of HBV immunological marker in serum and the quantity of HBV- DNA

YAN Li, et al

Department of Clinical Laboratories, College of Clinical Medicine

Abstract **Objective**: To study the relationship between the common mode of HBV immunological marker in serum and the quantity of HBV-DNA. **Methods**: 150 samples were detected by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and ELISA kit respectively. **Results**: In 21HBsAg+/HBeAg+/HbcAb+samples, the FQ-PCR were all positive with 3.5×10^8copies on average,in 6 HBsAg+/HBeAg+samples,the HBV-DNA were all positive and the mean was 1.2×10^9copies. in 27 HBsAg+/HBeAb+/HBcAb+samples 12 samples were positive tested FQ-PCRwith 7.5×10^6 copies,on average; In 24 HBsAg+/HBcAb+samples , 8 samples were positive and the amount was 8.5×10^5 , the residual HBsAb+and HBsAg -/HBsAb-/HBeAg-/HBeAb-/HBcAb- samples were negative by FQ-PCR.**Conclusion**: This indicates the FQ-PCR can be used to detect the true state of HBV infection and its replication. The FQ-PCR is helpful to diagnose the hepatitis B, and to select the therapeutic project and to monitor the medication.

Key Words Hepatitis B virus; Marker; Mode; Quantitative PCR; Fluorphotimetry

乙型肝炎病毒（HBV）血清免疫标志物检查是目前分析和判断患者病程及传染性的重要标志之一。随着有效治疗慢性乙肝口服抗病毒新药的研制成功，需了解治病过程中HBV量的变化，现有的HBV标志物检查对疗效的观察预后判断存在一定的局限性。聚合酶链反应（PCR）是检测HBV血症的最敏感技术，应用定量PCR技术检测病毒基因水平，国内外已有报道[1,2]，我们运用荧光定量PCR（FQ-PCR）技术测定HBV各种免疫学标志常见模式中的DNA含量。现将结果报道如下。

作者介绍：严 立(1968-05出生)，女，检验师

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本 收集来我科检测HBV标志物血清标本共150份，ELISA法，试剂为上海科华生物公司试剂盒，BIO-RAD3550型酶标仪判定结果。HBsAg、HBeAg、HBcAb阳性21例；HBsAg、HBeAb、HBcAb阳性27例；HBsAg、HBcAb阳性24例；HBsAg，HBeAg阳性6例；HBeAb、HBcAb阳性4例；HBsAb、HBcAb阳性15例；HBsAb阳性18例；标志物全阴性35例。

1.1.2 仪器 PE5700型定量PCR仪(美国Perkin Elmer公司)。

1.1.3 试剂 中山医科大学达安公司的定量试剂盒。

1.2 方法 用常规的碱裂解法从血清中提取HBV-DNA，取

维普资讯 http://www.cqvip.com

2ul上清液于反应试剂管中。各反应管与标准曲线反应管分别放入PE5700自动荧光检测仪，按93℃2min预变性，然后按93℃45s；55℃120s，循环40次。反应结束后，由电脑自动计算结果。

2 结 果

HBV-DNA定量阳性标准品经FQ-PCR，以起始拷贝数的自然对数为横坐标，以循环阈值为纵坐标，得到的回归直线为标准曲线对待测标本进行定量，定量结果采用几何平均值的方法来计算HBV-DNA平均拷贝数，阴性结果不参加平均值统计。统计结果见下表：

表 FQ-PCR对HBV 的检测结果与ELISA检测结果的比较

ELISA阳性			例数	阳性数	阳性样品定量平均值(/ml)
HBsAg	HBeAg	HBcAb	21	21	3.5×10^{8}
HBsAg	HBeAb	HBcAb	27	12	7.5×10^{6}
HBsAg	HBcAb		24	8	8.5×10^{5}
HBsAg	HBeAg		6	6	1.2×10^{9}
HBeAb	HBcAb		4	1	2.3×10^{5}
HBsAb			18	0	0
HBsAb	HBcAb		15	0	0
全阴性			35	0	0

3 讨 论

PCR是研究肝炎病毒的重要方法，由于常规PCR不能进行精确的病毒基因定量，其应用受到限制。本文采用一种新型的荧光定量PCR方法。在该反应体系中，除有两条普通的引物外，还有一条荧光标记的的基因探针。这条探针的5端和3端分别标记了一个特殊基团，5端的基团称为荧光指示基团(R)，3端的基团称为淬灭基团(Q)。当这条探针保持完整时，Q基团将抑制R基团的荧光信号，一旦探针被切断抑制作用消失，R基团的荧光信号可以被检测。PCR反应开始后，随着链的延伸，Taq酶沿着DNA模板移动到荧光标记的探针结合位置，发挥它的5→3外切核酸酶活性，将荧光探针切断，释放出R基团的荧光信号。被释放的游离R基团的数目和PCR的产物数量是一对一的关系。FQ-PCR技术融汇了PCR和DNA探针杂交技术的优点，直接探测PCR过程中荧光信号的变化，根据PCR反应酶动力学特点，获得DNA模板的定量结果。由于整个实验过程均在完全闭管的状态下进行，不需要PCR的后处理和电泳检测，解决了PCR定量和防污染等问题，成为常规PCR的更新换代技术。

本研究显示，21例HBsAg、HBeAg、HBcAb三项均阳性时FQ-PCR检测HBV DNA均阳性，平均拷贝数为3.5×10^{8}，6例HBsAg、HBeAg二项阳性FQ-PCR也均为阳性，平均拷贝数1.2×10^{9}说明HBeAg阳性的病人HBV具有较高的复制水平，是传染性的重要标志。标志恢复期或长期乙肝病毒携带者的血清HBsAg、HBeAb、HBcAb阳性的27份血清中也检测出12份HBV-DNA阳性，平均拷贝数7.5×10^{6}说明抗HBe的阳转只能代表HBV复制水平的下降，部份患者仍具有传染性。

24例HBsAg、HBcAb阳性模式中，HBV-DNA阳性8例，平均拷贝数8.5×10^{5}，此种模式DNA持续阳性可能为前C区突变类型。最多见的是位于前C区末端1896位点发生G→A的突变，这使原来编码色氨酸的TGG转变为终止码TAG使得HBeAg合成终止[3]。其次是1762点A突变为T，1764点G突变为A的联合突变也是常见的变异类型[4]，其突变可影响HBV的转录活性，导致前C区mRNA的转录效率明显下降，造成乙肝e抗原阴性的感染，从而逃避机体的免疫清除作用，作为一种新型的稳定病毒株在体内长期存在。在HBV编码包膜蛋白的表面抗原基因突变中有研究表明[5]第587位核苷酸碱基因鸟嘌呤变为腺嘌呤（587ntG→A）导致HBsAg“α”抗原决定族的145位氨基酸由甘氨酸→精氨酸（GGA→AGA）的变异株最多见。该突变改变“α”决定簇的构型，使变异株与HBsAb的结合力降低，现用的诊断试剂不能有效地检出变异株的HBsAg。在本文4例单独HBeAb、HBcAb阳性的血清中发现一例是DNA阳性，病人是感染恢复期还是突变有待进一步增加病历数和延长随访时间可最终阐明这一问题。

本报告中18份单纯HBsAb和15份HBsAb、HBcAb阳性的模式中DNA均为阴性，表示接种疫苗或病人获得免疫。因HBcAg的抗原性要强于其它系统的抗原，产生最早消失最晚，所以HBsAb和HBcAb阳性的这种模式应该是自然感染过程的最终趋向，从我们的实验中也证明HBsAb是一种保护性抗体。接种疫苗后应该是单纯HBsAb这种模式，此模式和全阴性血清未能检出DNA说明了FQ-PCR的高度特异性。

(下转第173页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

率降低50%左右，严重度下降，认为睡眠可显著性减少功能性心律失常的发生。本文30例中，13例日间型VPC(12例属交感性VPC),白天活动时,心率增快,有3例呈成对VPC,2例呈短阵室速,5例呈联律性,夜间消失。10例夜间型VPC(均属迷走性VPC)中，夜间睡眠时，心率减慢,1例呈短阵室速，3例呈联律性,2例呈成对VPC，2例伴有Ⅰ°、Ⅱ°房室性阻滞，白天活动时消失。说明，日间型VPC，在夜间时VPC的频率，严重度下降；而夜间型则相反，本组资料提示夜间型迷走神经张力过高所致VPC频率与心率呈反比关系。其机理可能是，白天活动时交感神经活动增强，心率增快，儿茶酚胺分泌增加，使心肌细胞钙慢通道开放增多，心肌细胞内Ca^{2+}内流增加，自动去极化加速，自律性增高诱发VPC；夜间睡眠时，迷走神经兴奋增强，释放乙酰胆碱，心率减慢，心室动作电位振幅降低，易诱发异位搏动。因此，我们认为小儿无症状性VPC的昼夜频率改变,符合自主神经功能特点。

3.3 预后及临床意义

Yabek[6]对未发现器质性心脏病的室性期前收缩17例患儿进行了远期随访，平均7年(1～19年)，其中9例消失，8例未消失，认为只要经过认真检查，如无其他方面异常，且期外收缩为单源的，则预后良好。Paul等[7]报道，22例心脏正常的成对室性期前收缩及多形性室性期前收缩与单源性者同样预后良好。本组30例中，20例作心室晚电位检查均阴性，经随访23例日夜间型VPC,平均6年,有12例(50%)早搏消失，未消失者，个别小儿诉心悸，多数无症状，除心电图有VPC外，无其他异常发现。说明无症状性VPC，可存在数年及数十年，其远期预后较好。因此,我们认为对小儿原因不明,且无明显症状的VPC,必须除外心脏自主神经调节失衡的影向因素,必要时需作DCG监测,自主神经功能及心室晚电位检查，除外器质性心脏病,也避免将单纯性VPC误诊为心肌炎，而长期不恰当地使用抗心律失常药物，导致副作用。

参 考 文 献

[1] Irwin JM, MC Carthy EA , Wilkinson WE.et al Circadian occurence of symptomatic paroxysmal super-ventricular tachycardia in untreated patients [J] .Circulation,1988;77(2):298-

[2] 矢永尚. 长时间心电图治疗[J]， 1981;63:87

[3] Winkle RA. The relationship between ventricular ectopic beat frequency and heart rate [J].Circulation,1982;66(2):439~446

[4] Jokinen E、Vatilmaki I. Children in sauna electrocardiographic abnormalities[J].Acta Paediatr Scand .1991: 80(3):370~374

[5] Eckenhoff RG, Knight DR .Cardiac arrhythmias and heart rate changes in prolonged hyperbaric air exposures [J].Undersea Biomed Res Des, 1984;11(4):355~367

[6] Yabek SM.Ventricular arrhythmias in children with an apparently normal heart [J]. J Pediatr, 1991;119(1):1~11

[7] paul T, Machal C,Garson A Jr. Ventricular couplets in the young:prognosis related to underlying substrate [J]. Am Heart J , 1990;119(3,part1):577~582

(上接第170页)

目前以拉米呋定为代表的一类核苷酸衍生物已成功地应用于慢性HBV病人的治疗，有报道[6]拉米夫定能显著降低HBV的复制，从而反映在血清HBV-DNA达到可测出的水平以下，其累积有效率达到92.2%，在HBV-DNA消失或降低的同时伴有ALT的逐渐恢复。为了协助临床医生正确使用拉米呋定，FQ-PCR作为一种新的定量PCR技术可以检测HBV的真实感染和复制情况，对于治疗方案的选择和疗效观察有较大的意义。

参 考 文 献

[1] Luneberg E,Jensen JS,Frosch M. Detection of mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates[J].J Clin Microbiol. 1993:31: 1040~1047

[2] Livak j,Flood SJA,Marmaro j,et al .Oligonucletides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Methods Applic. 1995;4:357~362

[3] Rodriguez EF,Buti M,Jardi r,et al. Hepatitis Virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations[J]. Hepatology.1995;22:1641~1647

[4] 候金林，闵 佳，王战会，等. 乙型肝炎病毒X基因/C基因启动子变异株在中国重肝病 人中的发生率[J]. 中华肝脏病杂志，1997;5:204~206

[5] 何建文，闻玉梅. 聚合酶链反应结合酶切检测乙型肝炎表面抗原变异[J]. 中华肝脏病杂志，1997；5：149

[6] 姚光弼，王宝恩，崔振宇，等. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的多中心、随机双盲、安慰剂对照研究[J]. 中国新药与临床杂志，1999；18；131~134