肿瘤诊断与治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000806

隐匿性乙肝与肝细胞肝癌关系的系统评价

郑 洁，曾爱中

重庆医科大学附属第一医院感染科、重庆市传染病寄生虫病学重点实验室，重庆 400016）

[摘 要]目的：评估隐匿性乙肝（occult Hepatitis B Virus infection，OBI）是否会增加肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）发生的风险。方法：2 个独立的研究者分别在 Medline、web of science、web of knowledge、cochrane library、Embase、Biomed Central、Elton B. Stephens. Company（EBSCO）、中国生物医学文献数据库、中国学术期刊全文数据库、万方数据库和维普中文科技期刊全文数据库中检索文献，截止搜索日期 2015 年 4 月 14 日，根据纳入、排除标准筛选研究隐匿性乙肝与肝细胞肝癌关系的前瞻性队列研究或病例对照研究，并对纳入文献进行质量评价和数据提取，用 Review manager 5.3 软件对纳入的研究进行 Meta 分析，并进一步分别就 OBI 与隐源性 HCC 和非显性乙肝、丙肝相关性肝细胞肝癌（hepatitis B virus surface antigen negative and anti-HCV negative hepatocellular carcinoma，NBNC-HCC）的关系作了 Meta 分析。结果 本研究最终筛选出 8 个符合条件的研究，有 7 个回顾性研究和 1 个前瞻性研究。回顾性研究的 Meta 分析纳入的 7 个研究总共有 1 945 个对象，其中 HCC 有 561 个，因 7 个研究异质性较大（I^2=60%），排除一个研究后，最终 Meta 分析结果表示 OBI 会增加 HCC 发生的风险，有统计学意义，比值比（odds ratio，*OR*）=9.28，95% 可信区间（confidence interval，*CI*）=7.01~12.29，*P*<0.001，异质性 χ^2=5.61，自由度（degree of freedom，df）=5，*P*=0.35，I^2=11%。结论：本研究发现的情况表明 OBI 会增加 HCC 发生的风险，对临床有一定的指导意义。

[关键词]隐匿性乙肝；肝细胞肝癌；比值比；Meta 分析

[中图分类号]R512.6 [文献标志码]A [收稿日期]2015-05-06

Association between occult hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma：a systematic review

Zheng Jie，Zeng Aizhong

(Department of Infecious Diseases，the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University，Key Laboratory of Infectious and Parasitic Diseases in Chongqing)

[Abstract] ***Objective*** To assess whether occult hepatitis B virus infection (OBI) can increase the risk of hepatocellular carcinoma (HCC). ***Methods*** Literatures in relevant databases：Medline，Web of Science，Web of Knowledge，Cochrane library，Embase，Biomed Central，Ebsco，Chinese Biomedical Literature，China National Knowledge Internet，Wanfang Data and VIP were searched by two independent reviewers. The endline is April 14th，2015. Prospective cohort studies or case-control studies about OBI and HCC were screened out by inclusive and exclusive criteria. Quality of the included literature was evaluated and data were extracted. Review Manager 5.3 software was used for Meta analysis. Further more，Meta analysis of OBI between cryptogenic HCC and HBsAg negative and anti-HCV negative HCC was conducted respectively. ***Results*** Eight researches were screened out in this study finally，including seven retrospective studies and one prospective study. Seven retrospective studies of 1 945 patients were included in our study，and 561 hepatocellular carcinomas were included. Meta-analysis results indicated that OBI can increase the risk of HCC (*OR*=9.28，95%*CI*=7.01 to 12.29，*P*<0.001，heterogeneity χ^2=5.61，*df*=5 (*P*=0.35) I^2=11%) after excluding one study because of heterogeneity. There was no statistical difference in other side effects between the two groups (*P*>0.05). ***Conclusion*** OBI can increase the risk of HCC，which is of clinical guiding significance.

[Key words] occult hepatitis B virus infection；hepatocellular carcinoma；odds ratio；Meta analysis

作者介绍：郑 洁，Email：1024625292@qq.com，

研究方向：乙肝的相关性研究。

通信作者：曾爱中，Email：aizhong9@sina.com，

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30972587）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151026.1056.004.html（2015-10-26）

隐匿性乙肝（occult Hepatitis B Virus infection，OBI）是指外周血中乙肝表面抗原（hepatitis B virus surface Antigen）阴性者血清或肝组织中持续存在乙肝病毒脱氧核糖核酸（hepatitis B virus deoxyribonucleic acid，HBV-DNA）。首例 OBI 是 1979 年在一位接受输血的患者中报道的，随着高灵敏度检测方法的出现临床中发现越来越多的病例。

慢性显性 HBV 感染与肝硬化、肝衰竭和肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）有关这是确认的。然而，OBI 的临床意义尚有争议。据报道，在被土拨鼠肝炎病毒感染的土拨鼠模型中，肝组织中持续低水平的 HBV 存在可以逐渐引起肝脏损伤和促进 HCC 的发展[1]。有许多探讨 OBI 和 HCC 的关系的前瞻性和回顾性研究。但结论仍有争议。因此，本研究就符合条件的研究做了一个 Meta 分析来评估是否 OBI 会明显增加 HCC 发生的风险。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 文献类型 前瞻性队列研究或病例对照研究。

1.1.2 研究对象 结合病史、体征、影像学、生化临床诊断的肝细胞肝癌或手术后病理确诊的肝细胞肝癌患者和血液 $HBsAg$ 阴性而血液/肝组织中有 HBV-DNA 的对象。

1.1.3 暴露因素 血液或肝组织中有 HBV-DNA。暴露组定义为血液 $HBsAg$ 阴性而血液/肝组织中 HBV-DNA 阳性的对象，非暴露组定义为血清 $HBsAg$ 及血液/肝组织中 HBV-DNA 均阴性的对象。病例组定义为 HCC 患者，对照组定义为非肝癌患者。

1.1.4 结局指标 临床诊断 第八届全国肝癌学术会议上正式通过的《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》）或病理诊断的 HCC。

1.1.5 排除标准 缺乏对照组，合并丙肝病毒（hepatitis C virus，HCV）感染，研究未提供计算 HCC 与非 HCC 中 OBI 存在的风险评估的数据，研究未提供计算 OBI 和非 OBI 发生 HCC 的风险评估的数据，不全报道，研究不是中文或者英文发表的。

1.2 文献检索

参考 Cochrane 协作网制定的 RCTs 检索策略，以“occult HBV infection”、“hepatocellular carcinoma”、“隐匿性乙肝”、“肝细胞肝癌”为检索词并合并不同的检索方式，检索 Medline、web of science、web of knowledge、cochrane library、Embase、Biomed Central、Elton B. Stephens. Company（EBSCO）、中国生物医学文献数据库、维普中文科技期刊全文数据库、中国学术期刊全文数据库、万方数据库搜索文献。截止搜索日期 2015 年 4 月 14 日。2 个研究者间的所有分歧最终都达成了一致意见。

1.3 文献质量评价和资料提取

用一个 7 点评分系统来评定所纳入研究的方法的质量（见表 1），包括研究设计，样本大小，HBV-DNA 试验的设计，病例的匹配和对照。HBV-DNA 试验基于 3 个方面：第一，在扩增试验中至少使用两套来自 HBV 基因不同区段的引物，第二，包括合适的阴性对照，第三，检测下限的敏感性。把 5 分及以上的研究归类为高质量研究，3~4 分为中等质量研究，3 分以下为低质量研究。由 2 名评价员独立对文献进行质量评价，交叉核对确保结果一致性，通过协商或由第 3 位研究者解决分歧。资料提取表主要包括：每个研究的年份，地点，参与对象的数量和特征，风险评估或有可计算风险评估的数据，样本的类型，HBV-DNA 检测方法（见表 2）。

表 1 Meta 分析中纳入研究的质量评价标准

Tab.1 Quality criteria of studies included in the Meta-analysis

质量参数		分值	
		1	0
研究设计		队列	病例-对照
病例数或暴露者数量		≥ 50	<50
HBV基因引物		≥ 2 个不同基因区引物	1 个基因区引物
检测方法中阴性对照		有	无
检测下限		≤ 50 拷贝/ml	>50 拷贝/ml
病例-对照组/暴露-非暴露组匹配	性别	匹配	不匹配
	年龄	匹配	不匹配

1.4 统计学分析

回顾性研究的有效评估值是比值比（odds ratio，OR），前瞻性研究的有效评估值是相对危险度（relative risk，RR），还有各自相应的 95%可信区间（confidence interval，CI）。用国际 Cochrane 协作中心提供的 Review manager 5.3 软件对纳入的研究进行定量的 Meta 分析。用 Cochrane's Q-test 和 I^2 值评估研究的异质性。P 值小于等于 0.10 或者 I^2 大于等于 50%就表明有异质性。因所纳入研究存在较大异质性，异质性来源有研究间研究方法学质量差异、研究地域差异、研究对象匹配差异等，选择了随机效果模型。用漏斗图来检测发表偏倚的潜在风险，不对称表示存在发表偏倚。

2 结 果

2.1 检索结果纳入研究的特征

初检出相关文献 812 篇，经阅读文题、摘要，根据纳入排除标准，排除 HCV 相关、显性 HBV 感染、无对照组、综述、与 HCC 无关、去重，对剩余 20 篇文献查找原文，根据纳入排除标准，最后有 8 个研究符合条件（见图 1）。表 2 中显示了所纳入研究的基本特征。在这些研究中，6 个来自于亚洲，2 个

来自意大利。前瞻性研究只有 1 个，回顾性研究有 7 个。Meta 分析纳入的 7 个研究总共有 1 945 个对象，其中 561 例（36.86%）有 HCC，863 例（28.84%）有 OBI。所有研究均来源于医院。本研究用我们预先确定的标准来评估所纳入研究的方法学质量，2 个是高质量研究，3 个是中等质量研究，2 个是低质量的研究。

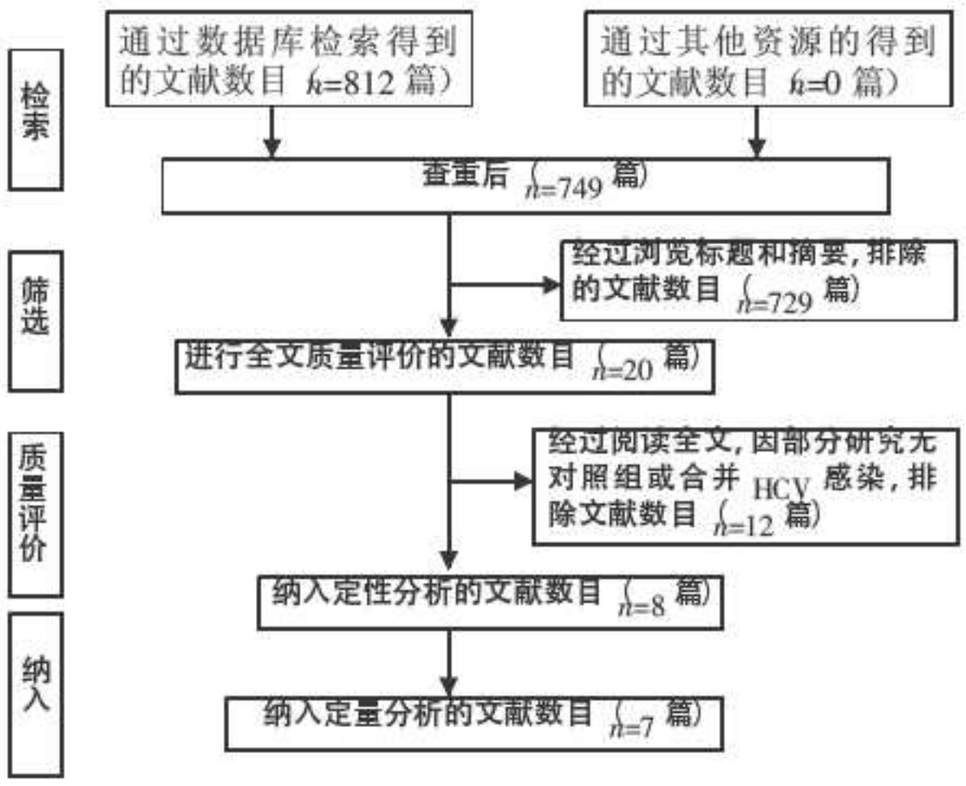


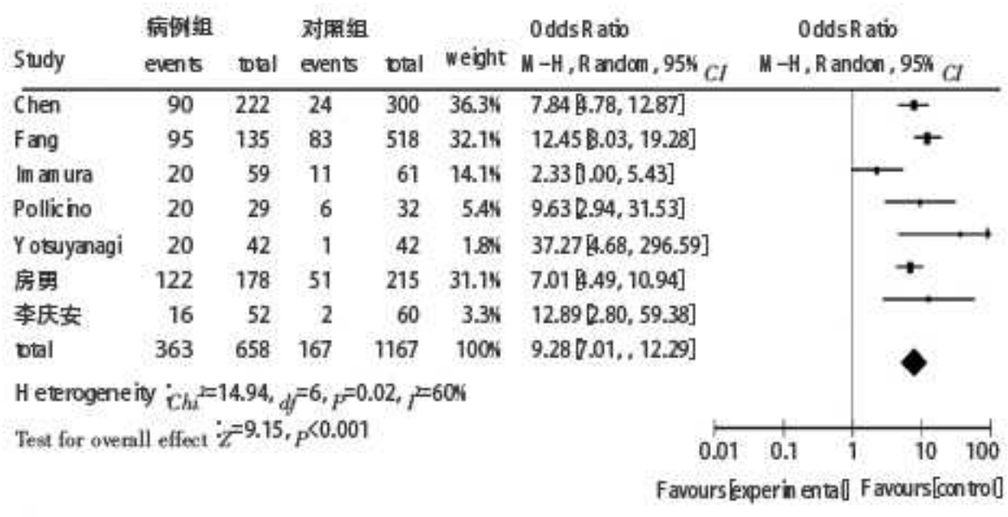
图 1 文献筛选流程图

Fig.1 Flow chart of article selection

2.2 Meta 分析结果

2.2.1 前瞻性研究 只有 1 个研究符合纳入标准，*RR*=5.21（95%*CI* =3.15~8.61），表明 OBI 有发生 HCC 的高风险。

2.2.2 回顾性研究 在回顾性研究（χ^2=14.94，*df*=6（*P*=0.02）；I^2=60%）中存在大量的异质性（见图 2）。本研究在排除了一篇方法学质量稍低的研究后[4]，异质性明显减小（χ^2=5.61，*df*=5（*P*=0.35）；I^2=11%），*OR* 上升，总 *OR*=9.28，95%*CI*=7.01~12.29，*P*<0.001）（见图 3）。另外，HCC 的病因较多，但临床研究中单因素变量几乎不存在，只能尽量排除 HCC 的其他非研究病因后纳入，分析此次纳入的 7 个回顾性研究，有 4 个为隐源性 HCC，有 3 个为非显性乙肝、丙肝相关性肝细胞肝癌（hepatitis B virus surface antigen negative and anti-HCV negative hepatocellular carcinoma，NBNC-HCC），故分别就隐源性 HCC 和 NBNC-HCC 作了亚组 Meta 分析（见图 4、5）。



注：比较 HCC 与对照组 OBI 暴露的情况差异，95%可信区间横线、菱形图位于垂直线右侧，表示病例组效应量大于对照组

图 2 总体森林图

Fig.2 Forest polt of the overall studies (comparing OBI risk in HCC with that in control group)

表 2 Meta 分析所纳入研究的特征

Tab.2 Characteristics of the studies included in the Meta-analysis

研究及年份	国家	研究类型	暴露组或病例组 例数	年龄（岁）	性别	处理方式	对照组 例数	年龄（岁）	性别	处理方式	样本	检测方法 2个及以上引物	阴性对照组	检测下限（拷贝/毫升）	质量分层
Ikeda et al 2009[5]	日本	队列研究	9	和对照组年龄、性别无统计学差异		HBV-DNA+	73	和暴露组年龄、性别无统计学差异		HBV-DNA-	血清	+			
Imamura et al 2013[4]	日本	病例对照	58	中位年龄 65（43~86）	女:7，男:51	HCC	61	中位年龄 69（46~83）	女:32，男:29	其他原因	肝组织	+	+	不详	高
房勇等 2013[5]	中国	病例对照	178	中位年龄 43（25~74）	女:90，男:125	HCC	215	中位年龄 54（35~70）	女:63，男:115	CLD	血清	-	+	>50	中
李庆安等 2012[6]	中国	病例对照	52	中位年龄 66（47~74）	女:21，男:31	HCC	60	和病例组无统计学差异	女:23，男:37	非肝病	血清	-	+	>50	低
Chen et al 2009[7]	中国	病例对照	222	中位年龄 61（46~75）	女:51，男:171	HCC	300	和病例组无统计学差异		CLD	血清	+			
Fang et al 2009[8]	中国	病例对照	135	中位年龄 59（35~70）	女:43，男:92	HCC	518	中位年龄 40（15~82）	女:240，男:278	CLD和非肝病	血清	+	+	≤50	高
Pollicino et al 2004[9]	意大利	病例对照	29	和对照组无统计学差异	和对照组有统计学差异	HCC	32	和病例组无统计学差异	和病例组有统计学差异	CLD	肝组织	+	+	≤5	中
Yotsuyanagi et al 2000[10]	意大利	病例对照	42	中位年龄 59（55~77）	女:7，男:35	HCC	42	中位年龄 64（53~75）	女:8，男:34	CLD	血清	+	+	≤5	中

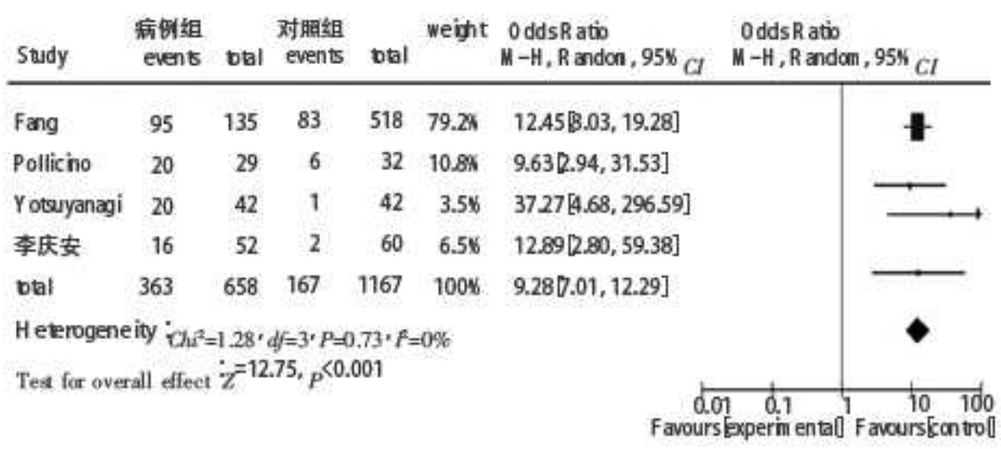
注：CLD：慢性疾病；有的研究原文未提供组别年龄、性别具体数据，只提及说明病例组或暴露组与对照组年龄、性别有无统计学差异



注：比较 HCC 与对照组 OBI 暴露的情况差异，95%可信区间横线、菱形图位于垂直线右侧，表示病例组效应量大于对照组

图 3 总体森林图

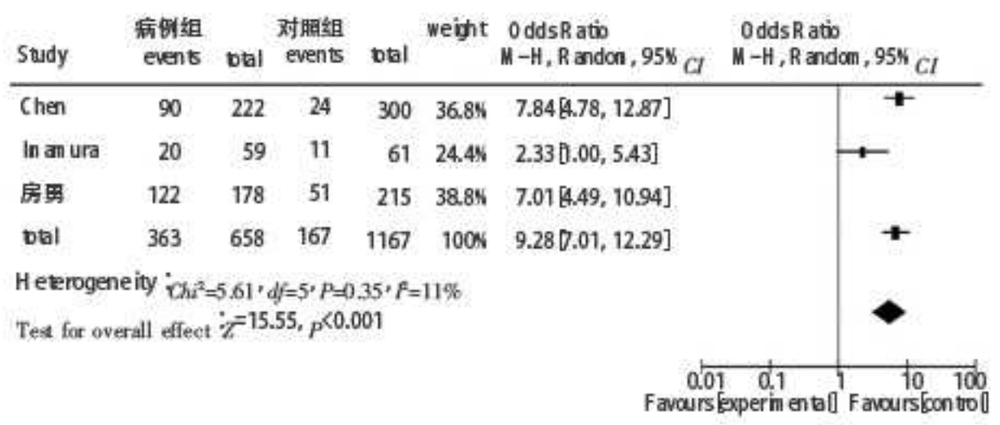
Fog.3 Forest polt of the overall studies(comparing OBI risk in HCC with that in control group)



注：比较隐源性 HCC 与对照组 OBI 暴露的情况差异，95%可信区间横线、菱形图位于垂直线右侧，表示病例组效应量大于对照组

图 4 亚组森林图

Fig.4 Forest polt of the subgroup(comparing OBI risk in cryptogenic HCC with that in control group)



注：比较 NBNC-HCC 与对照组 OBI 暴露的情况差异，95%可信区间横线、菱形图位于垂直线右侧，表示病例组效应量大于对照组

图 5 亚组森林图

Fig.5 Forest polt of the subgroup(comparing OBI risk in NBNC-HCC with that in control group)

2.2.3 敏感性分析 Imamura 等的研究方法学质量稍低，因此，剔除该文献进行敏感性分析，得到合并效应值为 $Z=15.55$，$P<0.001$，异质性为 $I^2=11\%$，$P=0.35$，这些结果表明剔除 Imamura 等的研究后，合并效应值没有明显变化，但异质性显著下降。

2.2.4 发表偏倚 总体研究的漏斗图不对称（图 6），可能存在一定的发表偏倚，可能是阴性结果的实验未发表所致。

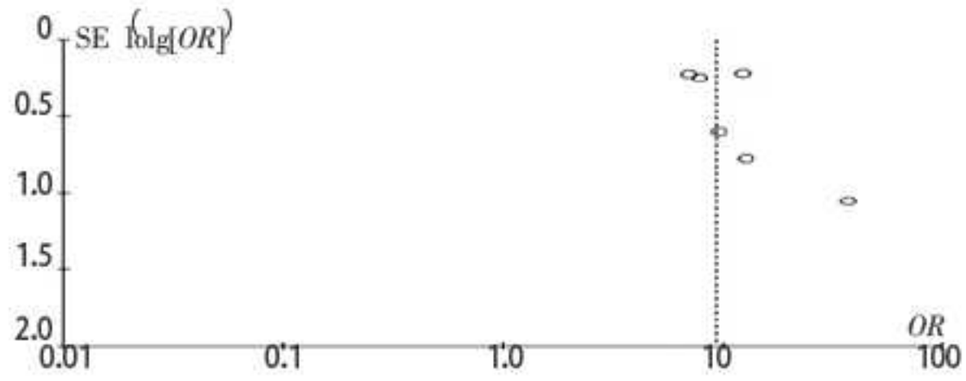


图 6 最终所纳入研究的漏斗图

Fig.6 Funnel plot of the finally included study

3 讨 论

随着 PCR 技术的进步，OBI 的研究越来越多，OBI 与临床各科室均密切相关，如血液透析、器官移植、肝病病人、妇产科等，故明确 OBI 是否有致癌性有重大意义，这个研究评估了医院就诊人群中 OBI 和 HCC 的关系。本研究的 Meta 分析最终合并了 6 个回顾性研究的 OR，表明 OBI 发生 HCC 的风险是对照组的 9.28 倍，分组分析的 OBI 与隐源性 HCC 关系中 $OR=12.61$，进一步直接证明了 OBI 的致癌性，故临床工作中 OBI 不容忽视。但是该分析纳入的研究多为回顾性研究，缺乏大样本的 RCTs，OBI 的致癌性还需要更多的单因素的标准化 RCTs 来明确。

OBI 导致 HCC 的机制很多。首先，间接机制：通过免疫介导的机制，细胞毒性 T 淋巴细胞特异性直接杀伤表面有病毒抗原的肝细胞，也有自然杀伤细胞、中性粒细胞、活化的淋巴细胞炎症趋化的固有免疫作用，同时这些炎症细胞释放细胞因子和趋化因子。隐匿性乙肝引起的轻微但持续的炎症会导致反复的细胞死亡和再生，打破了肝细胞增生、分化、凋亡之间的生理平衡，这会增加肝细胞增殖（高细胞增殖指数是 HCC 发生的危险因素）和不典型增生，因此导致纤维化、肝硬化和产生一个致突变的环境[11-12]。直接机制：OBI 是 HBV 感染后自然病程之一，一些 HCC 患者肝内总的 HBV DNA、共价闭环 DNA（covalently closed circle DNA，cccDNA）和 HBV 转录活性与一些乙肝 e 抗原（hepatitis B virus e antigen，HBeAg）阴性乙肝相关性 HCC 没有明显差别。OBI 保留了经典 HBV 感染后致癌机制[13-18]，如整合进宿主基因组，顺式激活相关基因或合成蛋白后反式作用于基因组或相关蛋白质，如合成乙肝病毒 X 蛋白即 HBxAg（hepatitis B x antigen）、前 S 蛋白和 HBsAg，这些蛋白可使肝细胞发生转化，影响信号通

路，使细胞增殖、凋亡失衡。其次，持续存在的低载量病毒可导致轻微但持续的炎症坏死，肝细胞循环坏死、再生，加速肝硬化进程，最终导致 HCC。最后，病毒突变及甲基化修饰在 HCC 发生中也有重要作用。

这个 Meta 分析有几个局限。第一，有的研究民纳入的样本量较少，不具有代表性。第二，所纳入研究大多数是亚洲的，因此结论可能不能推广到其他人群。第三，由于观察性研究本身的性质所导致的不知道的混杂因素。例如纳入研究中只有 4 个是隐源性 HCC，其余 3 个是 NBNC-HCC，可能存在影响结论的因素，如有酒精性、脂肪性、淤胆性、淤血性、药物性、自身免疫性等，只有排除这些因素，这样才能确定 OBI 在导致肝癌中的直接作用。第四，该 meta 分析符合纳入标准的研究多为回顾性研究，不是 RCTs。第五，此次纳入研究多以血清作为标本，这样会漏掉一部分 OBI，因为如果以肝组织作为检测标本，OBI 阳性率会升高。第六，最后分别合并回顾性研究中未经校正的 OR 值（对比 OBI、对照组与隐源性/NBNC-HCC 发生风险的关系）时，组别研究个数较少，可能降低了研究的可信度。第七，所纳入研究对象均源于医院，可能存在选择偏倚。最后，将所纳入文章限制在有全文和以中文或英文发表，这样可能排除了以其他语言发表的高质量研究。

总之，Meta 分析表明 OBI 增加 HCC 发生的风险。然而，这个结论需要更多前瞻性研究来证实，且需要更多关于 OBI 与隐源性 HCC 关系的研究。

参 考 文 献

[1] Mulrooney-Cousins PM，Chauhan R，Churchill ND，et al.Primary seronegative but molecularly evident hepadnaviral infection engages liver and induces hepatocarcinoma in the woodchuck model of hepatitis B[J].Plos Pathogens，2014，10（8）：e1004332.

[2] Shi Y，Wu YH，Wu W，et al.Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma：a meta-analysis[J].Liver Int，2012（32）：231-240.

[3] Ikeda K，Kobayashi M，Someya T，et al.Occult hepatitis B virus infection increases hepatocellular carcinogenesis by eight times in patients with non-B，non-C liver cirrhosis：a cohort study[J].J Viral Hepat，2009（16）：437-443.

[4] Imamura1 H，Yamada N，Yotsuyanagi H，et al.Moderately causative role of occult hepatitis B virusinfection（occult HBV）in the development of non-hepati-tis B virus（HBV）infection，non-hepatitis C virus（HCV）infection（NBNC）hepatocellular carcinoma（HCC）[J].Hepatology，2013，58（4）：1260A-1261A.

[5] 房 勇，梁 爽，陈思佳，等.中国北方地区隐源性肝炎及乙型肝炎表面抗原阴性肝癌患者中隐匿性 HBV 感染流行状况分析[J].国际免疫学杂志，2013，36（6）：472-475.

[6] 李庆安，肖清华，刘建湘.隐源性 HCC 肝硬化与隐匿型乙型肝炎感染关系比较[J].中国医药导刊，2012，14（10）：1672-1675.

[7] Chen CH，Changchien CS，Lee CM，et al.A study on sequence variations in pre-S/surface，X and enhancer II/core promoter/precore regions of occult hepatitis B virus in non-B，non-C hepatocellular carcinoma patients in Taiwan[J].Int J Cancer，2009，125（3）：621-629.

[8] Fang Y，Shang QL，Liu JY，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] Pollicino T，Squadrito G，Cerenzia G，et al.Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection[J].Gastroenterology，2004，126（1）：102-110.

[10] Yotsuyanagi H，Shintani Y，Moriya K，et al.Virologic analysis of non-B，non-C hepatocellular carcinoma in Japan：frequent involvement of hepatitis B virus[J].J Infect Dis，2000，181（6）：1920-1928.

[11] Covolo L，Pollicino T，Raimondo G，et al.Occult hepatitis B virus and the risk for chronic liver disease：A meta-analysis[J].Digestive and Liver Disease，2013，45（3）：238-244.

[12] Kondo R，Nakashima O，Sata M，et al.Pathological characteristics of patients who develop hepatocellular carcinoma with negative results of both serous hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody[J].Hepatol Res，2014，44（11）：1039-1046.

[13] Morales-Romero J，Vargas G，Garcia-Roman R.Occult HBV infection：a faceless enemy in liver cancer development[J].Viruses，2014，6（4）：1590-1611.

[14] Chen L，Zhao H，Yang X，et al.HBsAg-negative hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma[J].Discov Med，2014，18（99）：189-193.

[15] Lee JJ，Kwon OS.Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma[J].Korean J Gastroenterol，2013，62（3）：160-164.

[16] Pollicino T，Cacciola I，Saffioti F，et al.Hepatitis B virus PreS/S gene variants：pathobiology and clinical implications[J].J Hepatol，2014，61（2）：408-417.

[17] Kondo R，Nakashima O，Sata M，et al.Pathological characteristics of patients who develop hepatocellular carcinoma with negative results of both serous hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody[J].Hepatol Res，2014，44（11）：1039-1046.

[18] Hashemi SJ，Hajiani E，Masjedizadeh A，et al.Occult hepatitis B infection in patients with cryptogenic liver cirrhosis in southwest of iran.Jundishapur J Microbiol，2015，8（3）：e16873.

（责任编辑：冉明会）