DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.018

应用竞争性 PCR方法探讨血清 HBV DNA浓度与 HBV免疫标志的关系

刘重阳* 周子成 杨建民 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,400038

提 要 目的: 探讨血清 HBV DNA浓度与 HBV免疫学标志的关系。方法: 应用竞争性 PCR方法,检测 HBV免疫标志不同背景的原发性肝癌 (n = 38),肝硬化 (n = 36),慢性肝炎 (n = 51)共125例的血清 HBV DNA浓度。结果: HBV DNA浓度与血清 HBV免疫标志有关,而与慢性肝病类型无关;五项免疫标志均阴性或抗-HBs阳性的慢性肝病患者中,约有三分之一病例存在低水平 HBV感染; HBeAg阳性病例的 HBV DNA浓度总体上明显高于抗 HBe阳性组,但后者中部分病例的 HBV DNA浓度也较高。结论: 血清 HBV DNA浓度与 HBV免疫标志有一定的对应关系,但存在个体差异。

关键词 竞争性聚合酶链反应;乙型肝炎病毒;慢性肝病
中图法分类号 R512.62

乙型肝炎病毒 (HBV)感染后的临床表现形式十分复杂,仅常用的 HBV五项免疫标志,表现模式就有15种以上,其内在原因至今仍不十分清楚。为此我们应用竞争性 PCR方法测定125例不同慢性肝病患者血清中的 HBV DNA浓度,以探讨其与 HBV免疫标志的关系。

1 材料与方法

1.1 血清标本

选择不同慢性肝病患者血清标本125例,均系本院1993~1994年的住院患者,其中慢性肝炎 (51)例,肝硬化 (LC) 36例,原发性肝癌 (PHC) 38例,年龄31~74(49.3±10.7)岁,血清以经高压灭菌的1.5 ml新 Eppendorf管分装,采用酚-氯仿抽提法提取 DNA。

1.2 寡核苷酸引物

扩增片段位于 HBV S基因保守区,正链引物 a对应于427-448位碱基区段,负链引物 c对应于822-842位碱基区段,缺失引物 bc是根据在引物的5'端外接序列并不影响 PCR扩增特异性的原理,将引物 c连接于687-701位碱基片段的5'端而成,共36bp。

1.3 竞争模板的制备

应用引物 a与 bc扩增 HBV全基因质粒,扩增产物用冻融回收法收集后,紫外分光光度计定量。

1.4 血清 HBV DNA的定性检测

常规 PCR-EB法,使用引物 a与 c。

1.5 血清 HBV DNA的定量检测

按前已报道的方法[1],将10倍梯度稀释的竞争模板 2μl分别加入6支 0.5 ml Eppenderf管中,使每管含竞争模板 (双链)分别为 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3拷贝。各管中再加入等量的定性 PCR阳性的待检样品和反应混合液,使用引物 a与 c进行扩增。扩增产物电泳后在296 bp和416 bp处同时出现两条亮度近似的扩增条带,认为扩增前竞争模板与待检基因的起始量相等。

血清 HBV五项免疫标志 (HBsAg抗 HBs HBeAg抗 HBe及抗 HBc)以上海科华公司 EIA试剂盒测定。

2 结果

2.1 不同慢性肝病患者血清 HBV DNA的检出率,见表1

表1 125例不同慢性肝病患者血清 HBV DNA的检出率

Tab 1 Detection rate of HBV DNA in 125 cases of different chronic hepatic disease

	Serum HBV immunological markers				Total
	HBsAg and HBeAg(+)	HBsAg and anti-HBe(+)	Anti-HBs(+)	Five markers(-)	
CH	16/17	10/13	3/10	4/11	33/51(64.7%)
LC	9/9	8/10	4/8	4/9	25/36(69.4%)
PHC	10/10	8/10	2/6	4/12	24/38(63.2%)
Total	35/36(97.2%)	26/33(78.8%)	9/24(37.5%)	12/32(37.5%)	82/25(65.6%)

表1中 HBsAg与 HBeAg均阳性组, HBV DNA阳性检出率显著高于 HBsAg与抗 HBe同时阳性组 (P < 0.05);而抗

* 刘重阳,男,29岁,主治医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HBs(+)组与全阴性组的检出率无明显差别,均显著低于 HBsAg(+)的两组($P < 0.01$)。不同类型的慢性肝病组间比较则检出率均无显著差别($P > 0.05$)。

2.2 不同慢性肝病患者血清 HBV DNA的浓度,见表2

表2 82例 HBV DNA阳性肝病患者血清 HBV DNA浓度的对数均值表(Log_{10} HBV DNA拷贝/50μl)

Tab 2 The mean logarithm of HBV DNA concentration in 82 cases of HBV DNA positive hepatic disease

	Serum HBV immunological markders				Mean value
	HBsAg and HBeAg(+)	HBsAg and anti-HBe(+)	anti-HBs(+)	Five markers(-)	
CH	5.88	4.6	3.33	3.75	4.39
LC	6	4.875	3.33	4	4.55
PHC	5.7	5	3	4	4.43
Mean value	5.86	4.83	3.22	3.92	

双因素方差分析结果表明:血清 HBV DNA浓度水平与免疫学标志物有显著的相依关系($P < 0.01$),而与慢性肝病类型则无显著相依关系($P > 0.05$),免疫学标志与慢性肝病类型两因素对血清 HBV DNA浓度无交互影响。

比较不同免疫状态下血清 HBV DNA浓度发现,HBsAg与 HBeAg均阳性组的血清 HBV DNA浓度明显高于 HBsAg与抗 HBe均阳性组($P < 0.05$)。而 HBsAg阳性的两组,血清 HBV DNA浓度显著高于抗 HBs阳性组和两对半全阴性组($P < 0.05$),但抗 HBs阳性组与五项标志全阴性组血清 HBV DNA浓度水平无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

在 HBV五项免疫标志均阴性的慢性肝病患者中可检出 HBV DNA已为许多学者的研究所证实。骆抗先等[2]报道,15例 HBV免疫标志均阴性的慢性活动性肝炎患者中有9例 HBV DNA阳性,阳性率高达60%,本组32例 HBV免疫标志均阴性的慢性肝病患者中12例阳性,占37.5%。关于这些免疫学标志物阴性的原因,有人推测可能与体内病毒的数量,核酸序列的变异及宿主的免疫状态有关[3]。另外,由于 ELASA法敏感性有限,可能造成低滴度的标志物漏检。本组五项标志均阴性者 HBV DNA浓度为10^3–10^5拷贝/50μl,平均$10^{3.86}$拷贝/50μl,显著低于 HBsAg阳性组,也表明体内病毒数量少确可能是导致 HBV标志物阴性的一个主要原因。

一般认为抗 HBs是一种中和抗体,对 HBV具有保护性免疫作用,常做为机体获得对 HBV免疫力及乙型肝炎患者痊愈的重要标志。但近来的研究发现抗 HBs阳转者仍可能携带 HBV[4,5],本文中24例抗 HBs阳性慢性肝病患者中,9例 HBV DNA阳性(37.5%),提示抗 HBs阳转并不意味着体内 HBV的完全清除。定量检测发现这些病例的血清 HBV DNA浓度为10^3–10^4拷贝/50μl,平均为$10^{3.22}$拷贝/50μl,说明这些病例仍存在低水平 HBV感染。

传统的观点认为 HBeAg是 HBV复制活跃及传染性强的指标,而抗-HBe意义基本与 HBeAg相反,它的出现表明病毒复制减少,传染性减弱。国外学者采用斑点杂交方法分析 HBV DNA,发现大多数 HBeAg阳性患者存在高水平的 HBV复制[6,7],而在抗 HBe阳性组仅能检测到18%–40%的患者 HBV DNA阳性[8,9],本研究中 HBeAg阳性组 HBV DNA阳性检出率为97.2%,HBV DNA浓度均值$10^{5.86}$拷贝/50μl,均明显高于抗 HBe阳性组,支持前述观点。但考察个体时可以发现,抗 HBe(+)组有许多病例其 HBV DNA浓度高于 HBeAg(+)组的平均值。这种情况是否与机体的免疫状态及 HBV基因序列的变异有关有待进一步研究。

参考文献

1 刘重阳,周子成,杨建民等.竞争性聚合酶链反应定量检测血清 HBV DNA.第三军医大学学报,1995,17(3):241

2 骆抗先,周 荣,梁炽森等.聚合酶链反应鉴定 HBsAg阴性慢性活动性肝炎中乙型肝炎病毒感染.中华内科杂志,1991,30(4):21

3 Brocchot G, Kermsdorf D, Paterlini P. Hepatitis B virus DNA in HBsAg-negative patients. J Hepatol, 1991, 13(suppl 4): S49

4 Kaneko S, Miller R H, Feinstone S M *et al*. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain rection assay. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86(1): 312

5 张永新,杜绍财,陈 苹等.肝炎恢复期乙型肝炎表面抗体阳性者血清中的乙型肝炎病毒 DNA.中华内科杂志,1992,31(10):629

6 Scotto J, Hadchouel M, Hery C *et al*. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a single spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. Hepatology, 1983, 3(3): 279

7 Lieberman H, Labreque D, Kew M *et al*. Detection of hepatitis B virus directly test: comparison to HBeAg/anti-HBr

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

status. Hepatology, 1983, 3(3): 279
8 Chemin I, Baginski I, Petit M A *et al*. Correlation between HBV DNA detection by polymerase chain reaction and presl antigenemia in symptomatic and asymptomatic hepatitis B virus infection. J Med Virol, 1991, 33(1): 51
9 Baker B L, Dibisceglie A M, Kaneko S *et al*. Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction clinical significance and correlation with biochemical and serological markers. Hepatology 1991; 13(4): 632

(收稿: 1997-03-15;修回: 1997-08-20)
(编辑 刘 鹏)

Relationship between serum HBV DNA concentration and HBV immunological markers

Liu Chongyang, Zhou Zicheng, Yang Jianmin (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the relationship between serum HBV DNA concentration and HBV immunological markers. **Methods**: Serum HBV DNA concentration was examined with competitive polymerase chain reaction in 38 cases of primary hepatic carcinoma, 36 liver cirrhosis and 51 chronic hepatitis with different backgrounds for serum HBV immunological markers. **Results**: Serum HBV DNA concentration was correlated with HBV immunological markers but not with the type of chronic liver diseases and the level of serum alanine aminotransferase. About one third of the cases negative to all five HBV immunological markers or positive to anti HBs had low level of viral replication. In general, the serum HBV DNA concentration was significantly higher in the cases positive to HBeAg than in those positive to HBe. But high concentration was also found in some of the cases positive to HBe. **Conclusion**: Serum HBV DNA concentration is correlated to HBV immunological markers but there still exists difference among individuals.

Key words competitive polymerase chain reaction; hepatitis B virus; chronic liver disease

留置胆导管不同部位细菌污染及消毒效果的调查分析

个案与短篇

Investigation on the bacterial pollution and the effect of different disinfectants of different parts of the delayed biliary drainage tube

杨 辛* 蔡又贤 余红岚 (第三军医大学附属西南医院检验科) 重庆, 400038

留置胆导管引起的胆道感染是医院感染的常见因素。本研究于1995年4月~10月随机抽样留置胆导管患者120例,进行相关部位的细菌学调查及常用消毒液杀菌效果的观察,观总结如下。

1 材料与方法

1.1 病例选择

随机选本院因患胆道结石、炎症、息肉等病人术中放留置胆导管者120例,其中男67例,女53例,全身均用抗菌素治疗。胆导管留置时间2~30 d,平均8.5 d 安置导管时以0.5% PVP-碘擦洗插管周围,0.1% 洗必泰消毒导管口。导管留置期每日用0.5% PVP-碘擦洗插管周围,隔日更换闭式一次性塑料引流管袋。

1.2 标本采集

插管周围清洗消毒后,取患者胆导管口,导管内壁及中段胆汁,分别于2 d内、3~6 d及8 d以上各取一次。导管口采样以无菌棉拭子沿导管口擦一周;导管内壁采样先夹闭导管,以碘酒、酒精消毒导管与引流管加接处后脱开,以无菌拭子伸入导管内1 cm,在内壁转动一周;中段胆汁采样从导管留取中段胆汁3~5 ml,采集的胆汁分别进行细菌培养,阳性则作细菌学鉴定。

1.3 消毒液杀菌试验

消毒液用0.5% PVP-碘、0.1%醋酸洗必泰。取消毒液4.9 ml加入菌悬液0.1 ml,对照组以0.03 mol/L磷酸盐缓冲液代替,混匀分别作用0.5 1 2分钟,取0.1 ml加入1.0 ml相应中和剂液,取0.5 ml作平血琼脂倾注培养,经37培养24h计数菌液,计算杀菌率。

2 结果

本组120例患者分别从胆导管三个部位采集360份胆汁,经

(下转533页)

* 杨 辛 男, 33岁, 技师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net