

• 临床检验研究论著 •

## 乙型肝炎病毒 DNA 与“乙肝两对半”模式关系的临床研究

靳礼松

(济源市人民医院, 河南济源 454690)

**摘要:**目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)DNA 与“乙肝两对半”模式的关系。方法 选择 240 例乙型病毒性肝炎患者为研究对象,分别采用酶联免疫吸附测定(ELISA)及荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测“乙肝两对半”及 HBV-DNA,并对二者的相关性进行分析。结果 不同“乙肝两对半”模式的患者 HBV-DNA 阳性率及含量不同,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。HBsAg(阳性)、HBeAg(阳性)和 HBeAb(阳性)模式的患者 HBV-DNA 阳性率及含量最高,分别为 95.68%、(6.72 ± 1.56) pg/mL。两两比较,HBeAg(阳性)模式的患者 HBV-DNA 阳性率及含量均高于 HBeAg(阴性)模式( $P < 0.05$ )。“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 阳性率有明显相关性( $\chi^2 = 36.78, r = 0.30, P < 0.05$ )。结论 “乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 相互弥补,可作为乙型病毒性肝炎早期诊断、疗效评估的可靠指标。

**关键词:**肝炎病毒,乙型; DNA; 生物学标记

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.021

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)21-2837-03

## A clinical research of relationship of hepatitis B virus DNA and the “two and a half pairs of hepatitis B”

Jin Lisong

(Jiyuan People's Hospital, Jiyuan, Henan 454690, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship of hepatitis B virus(HBV) DNA and the “two and a half pairs of hepatitis B” models. **Methods** Two hundred and forty patients with hepatitis B were enrolled as study object. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and fluorescent quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR) were employed to detect the “two and a half pairs of hepatitis B” and HBV-DNA, respectively, and their correlation were analyzed. **Results** Patients with different “two and a half pairs of hepatitis B” models showed different positive rates and contents of HBV-DNA with statistically significant difference( $P < 0.05$ ). The positive rate and content of HBV-DNA in patients with HBsAg(positive), HBeAg(positive) and HBeAb(positive) models were the highest, which were 95.68%, (6.72 ± 1.56) pg/mL, respectively. According to pair-wise comparison, the positive rates and contents of HBV-DNA in patients with HBeAg(positive) model were both higher than those with HBeAg(negative) model( $P < 0.05$ ). The “two and a half pairs of hepatitis B” models markedly correlated with the positive rates of HBV-DNA( $\chi^2 = 36.78, r = 0.30, P < 0.05$ ). **Conclusion** The “two and a half pairs of hepatitis B” model and HBV-DNA may complement each other and act as reliable indicators of early diagnosis and curative effect evaluation of hepatitis B.

**Key words:** hepatitis B virus; DNA; biomarkers

“乙肝两对半”是国内临床最常用的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染检测的血清标志物,包括 HBV 表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg)和抗 HBV 表面抗体(anti-HBV surface antibody, HBsAb)、HBV e 抗原(HBV e antigen, HBeAg)和抗 HBV e 抗体(anti-HBV e antibody, HBeAb)、HBV 核心抗原(HBV core antigen, HBcAg)和抗 HBV 核心抗体(anti-HBV core antibody, HBcAb)<sup>[1]</sup>。“乙肝两对半”检查可判断是否感染乙型病毒性肝炎或粗略估计病毒复制水平。HBV-DNA 阳性率可直接反映 HBV 的存在,HBV-DNA 定量检测指标降低是乙型病毒性肝炎转阴的前奏<sup>[2]</sup>,也是患者康复最关键的一步,患者体内 HBV-DNA 降低反映 HBV 的复制水平下降。“乙肝两对半”及 HBV-DNA 检查均是对 HBV 感染的测定,但这 2 种检测方法的意义不同<sup>[3]</sup>。笔者分析了本院 2011 年 1 月至 2012 年 6 月收治的 240 例乙型病毒性肝炎患者的 HBV-DNA 和“乙肝两对半”检验结果的相关性,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择本院 2011 年 1 月至 2012 年 6 月收治的 240 例乙型病毒性肝炎患者为研究对象,其中,男 147 例,女 93

例;年龄 29~76 岁,平均(45.6 ± 5.2)岁。诊断标准<sup>[4]</sup>:(1)患者临床表现为不明原因的明显乏力和消化道症状,甚至出现黄疸;(2)肝功能检查异常,主要包括血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)升高,和(或)血清胆红素升高;(3)HBsAg 阳性;(4)HBeAb IgM 阳性,抗体滴度超过 1:1 000;(5)肝组织学符合病毒性肝炎改变。排除标准:合并心、脑、肝、肾等重要脏器功能障碍者。

**1.2 主要试剂** HBV 诊断试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司,批号:国药准字 S20090008;HBV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒,购自艾康生物技术(杭州)有限公司,批号:国药准字 S20000059。

## 1.3 检验方法

**1.3.1 “乙肝两对半”的酶联免疫吸附测定**(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)将待检血清按 1:1 的稀释比率稀释后加入板孔中,每孔加 100  $\mu$ L。同样按 1:1 的稀释比率稀释阴、阳性对照血清,阴、阳性对照各设 1 孔,每孔 100  $\mu$ L;另设一空白对照孔,空白对照孔加 100  $\mu$ L 稀释液。轻轻振荡孔中样品,置 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min。甩掉板孔中的溶液,每孔加入

稀释好的洗涤液 200  $\mu$ L, 静置 3 min 后弃去洗涤液, 再用吸水纸吸干, 重复 3 次。每孔加酶标单克隆抗体 100  $\mu$ L, 置 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min, 洗涤 3 次, 吸水纸吸干。每孔顺序加入底物 A、B 液各 1 滴 (50  $\mu$ L), 混匀。室温 (18~25  $^{\circ}$ C) 避光显色 10 min 后, 每孔加终止液 1 滴 (50  $\mu$ L) (0.25% 氢氟酸), 终止反应。采用波长 630 nm 的酶标仪测定光密度 (optical density, OD) 值。设检测样本 OD $\geq$ 0.35 为阳性。

**1.3.2 HBV-DNA 的荧光定量聚合酶链反应 (fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)** 从试剂盒中取出 HBV PCR 反应液、Taq DNA 聚合酶及嘧啶 N-糖基化酶 (uracil-N-glycosylase, UNG)。室温融化后, 离心 10 s (离心半径 8 cm, 2 000 r/min), 设需要的管数为  $n$  ( $n$ =样本数+阴性对照 1 管+强阳性对照 1 管+室内质控 1 管+试剂空白 1 管+阳性参控品 4 管), 40  $\mu$ L 反应体系如下: PCR 反应液 37.6  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L、UNG 0.06  $\mu$ L。计算各试剂的使用量, 加入试管中, 充分混匀, 向设定的  $n$  个 PCR 反应管中分别加入 38  $\mu$ L, 转移至样本处理区。取  $n$  个 0.5 mL 灭菌离心管, 做好标记。首先加入 100  $\mu$ L DNA 提取液 1, 再分别加入待测血清或血浆样本以及各种对照品各 100  $\mu$ L, 振荡混匀, 离心 10 min (离心半径 8 cm, 13 000 r/min), 吸弃上清液; 再加入 25  $\mu$ L DNA 提取液 2, 振荡 10 s, 100  $^{\circ}$ C 干浴, 离心 10 min (离心半径 8 cm, 13 000 r/min), 保留上清液备用。将样本及对照品的裂解产物用前置室温解冻, 离心 5 min (离心半径 8 cm, 13 000 r/min)。在设定的  $n$  个反应管中分别加入处理过的样本、阴性对照、强阳性对照、室内质控血清、灭菌去离子水以及阳性参控品各 2  $\mu$ L, 密封 PCR 反应管, 并记录样本信息。按设置装载反应管, 选择或设置扩增和检测条件: 选择预设的程序文件或设置为: 37  $^{\circ}$ C 处理 3 min; 94  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环, 荧光信号采集设在 60  $^{\circ}$ C。设置孔位及荧光。保存数据, 绘制标准曲线图。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 将“乙肝两对半”检查结果分为常见的 9 种模式, 不同“乙肝两对半”模式间 HBV-DNA 阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验, 不同“乙肝两对半”模式间 HBV-DNA 拷贝数的比较采用方差分析, “乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 阳性率的相关分析应用 Pearson 相关系数法, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

不同“乙肝两对半”模式的患者 HBV-DNA 阳性率不同, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=36.78, P<0.05$ )。HBsAg (阳性)、HBeAg (阳性) 和 HBeAb (阳性) 模式的患者 HBV-DNA 阳性率最高, 为 95.68%。两两比较, HBeAg (阳性) 模式的患者 HBV-DNA 阳性率均高于 HBeAg (阴性) 模式, 差异均有统计学意义 ( $\chi^2_{1\sim5}=16.28, \chi^2_{1\sim8}=15.06, \chi^2_{1\sim9}=12.82, \chi^2_{2\sim5}=5.22, \chi^2_{2\sim8}=10.14, \chi^2_{2\sim9}=8.05, \chi^2_{3\sim5}=3.88, \chi^2_{3\sim8}=8.84, \chi^2_{3\sim9}=6.83, \chi^2_{4\sim5}=5.72, \chi^2_{4\sim8}=10.47, \chi^2_{4\sim9}=8.38, \chi^2_{5\sim8}=3.72, \chi^2_{5\sim9}=6.84, \chi^2_{6\sim8}=4.98, \chi^2_{6\sim9}=5.14, \chi^2_{7\sim8}=7.30, \chi^2_{7\sim9}=5.37, P<0.05$ ), 见表 1。

不同“乙肝两对半”模式的患者 HBV-DNA 含量不同, 差异有统计学意义 ( $F=41.81, P<0.05$ )。HBsAg (阳性)、HBeAg (阳性) 和 HBeAb (阳性) 模式的患者 HBV-DNA 含量最高, 为  $6.72 \pm 1.56$ 。两两比较, HBeAg (阳性) 模式的患者 HBV-DNA 含量均高于 HBeAg (阴性) 模式, 差异均有统计学意义 ( $q_{1\sim5}=21.47, q_{1\sim8}=16.79, q_{1\sim9}=16.96, q_{2\sim5}=5.38, q_{2\sim8}=5.53, q_{2\sim9}=6.30, q_{3\sim5}=5.19, q_{3\sim8}=5.33, q_{3\sim9}=6.14, q_{4\sim5}=9.18, q_{4\sim8}=8.93, q_{4\sim9}=9.61, q_{6\sim5}=6.21, q_{6\sim8}=6.21, q_{6\sim9}=7.01, q_{7\sim5}=5.05, q_{7\sim8}=5.27, q_{7\sim9}=5.94, P<0.05$ ), 见表 1。“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 阳性率有明显相关性 ( $\chi^2=36.78, r=0.30, P<0.05$ )。

表 1 “乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 的关系

| 组别 | $n$ | “乙肝两对半”模式 |       |       |       |       | HBV-DNA 定性 |                      | HBV-DNA 定量                     |
|----|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|------------|----------------------|--------------------------------|
|    |     | HBsAg     | HBsAb | HBeAg | HBeAb | HBeAb | 阳性 ( $n$ ) | 阳性率 (%)              | (pg/mL)                        |
| 1  | 65  | 阳性        | 阴性    | 阳性    | 阴性    | 阳性    | 62         | 95.38 <sup>abc</sup> | 6.72 $\pm$ 1.56 <sup>abc</sup> |
| 2  | 10  | 阳性        | 阳性    | 阳性    | 阴性    | 阳性    | 9          | 90.00 <sup>abc</sup> | 5.07 $\pm$ 0.82 <sup>abc</sup> |
| 3  | 12  | 阳性        | 阴性    | 阳性    | 阳性    | 阳性    | 9          | 75.00 <sup>abc</sup> | 4.89 $\pm$ 1.13 <sup>abc</sup> |
| 4  | 11  | 阳性        | 阴性    | 阳性    | 阴性    | 阴性    | 10         | 90.91 <sup>abc</sup> | 6.12 $\pm$ 0.92 <sup>abc</sup> |
| 5  | 71  | 阳性        | 阴性    | 阴性    | 阳性    | 阳性    | 20         | 28.17                | 3.42 $\pm$ 1.49                |
| 6  | 14  | 阳性        | 阳性    | 阳性    | 阴性    | 阴性    | 8          | 57.14 <sup>abc</sup> | 5.07 $\pm$ 0.74 <sup>abc</sup> |
| 7  | 11  | 阳性        | 阳性    | 阳性    | 阳性    | 阳性    | 7          | 63.64 <sup>abc</sup> | 5.37 $\pm$ 0.91 <sup>abc</sup> |
| 8  | 21  | 阳性        | 阴性    | 阴性    | 阴性    | 阳性    | 1          | 4.76                 | 3.20 $\pm$ 0.83                |
| 9  | 21  | 阳性        | 阴性    | 阴性    | 阴性    | 阴性    | 2          | 9.52                 | 2.87 $\pm$ 0.45                |

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与第 5 组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与第 8 组比较; <sup>c</sup>:  $P<0.05$ , 与第 9 组比较。

**3 讨 论**

HBeAg 是 HBV 中含有的一种可溶性蛋白, 一般仅见于 HBsAg 阳性的患者, 是 HBV 在体内复制的标志之一<sup>[5]</sup>。HBeAg 阳性说明 HBV 在体内复制活跃, 传染性很强。HBV-DNA 是 HBV 的脱氧核糖核酸 (即 HBV 基因)。HBV-DNA 是 HBV 感染最直接、特异性强和灵敏性高的指标, HBV-DNA 阳性提示 HBV 复制和有传染性<sup>[6]</sup>。HBV-DNA 含量越高, 表示

病毒复制力及传染性越强。目前 HBeAg 和 HBV-DNA 是临床上常用的判断 HBV 复制程度的重要指标。本研究结果显示, 不同“乙肝两对半”模式的 HBV-DNA 阳性率不同, HBeAg (阳性) 模式的 HBV-DNA 阳性率均高于 HBeAg (阴性) 模式; 不同“乙肝两对半”模式的 HBV-DNA 含量也不同, HBeAg (阳性) 模式的 HBV-DNA 含量均高于 HBeAg (阴性) 模式。

因为 HBV 前 C 编码区和 (或) CP 区基因组的变异, 导致

HBeAg 蛋白表达缺失,临床表现为 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,HBeAg 阴性的 HBV-DNA 阳性率最高达 28.17%,提示虽然 HBeAg 检测为阴性,但 HBV-DNA 检测仍可为阳性,此时,HBV 仍处于复制活跃状态;HBeAg 阴性并不能作为 HBV 复制终止的判断依据。而 HBV-DNA 定量检测可灵敏地反映 HBV 的复制水平,对评估抗病毒治疗的疗效有重要意义。但是,有研究指出部分病毒复制不活跃的乙型肝炎患者,其血清 HBV-DNA 测定结果为阴性<sup>[9]</sup>,提示单独检测 HBV 载量判断患者体内 HBV 复制状况具有一定的局限性,仍需要血清免疫标志物检测来反映机体对 HBV 的免疫状况<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 阳性率有明显相关性。“乙肝两对半”检测与 HBV-DNA 水平测定应相互弥补才可准确反映患者体内 HBV 的复制状况。

综上所述,“乙肝两对半”模式与 HBV-DNA 有明显相关性,HBV-DNA 可反映 HBV 的感染及其活动水平,“乙肝两对半”测定可反映患者对 HBV 的免疫状况,二者相互弥补,可作为乙型肝炎早期诊断、疗效评估的可靠指标。

参考文献

[1] 黄长武,谢礼琼,张明. 乙肝血清学标志物定量检测的临床意义[J]. 吉林医学,2010,31(18):2814-2815.  
 [2] Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 141(4): 1240-

1248.  
 [3] Han GR, Cao MK, Zhao W, et al. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1215-1221.  
 [4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2010 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(2): 121-122.  
 [5] Lang T, Lo C, Skinner N, et al. The hepatitis B e antigen(HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway[J]. J Hepatol, 2011, 55(4): 762-769.  
 [6] Vivekanandan P, Daniel HD, Kannangai R, et al. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA[J]. J Virol, 2010, 84(9): 4321-4329.  
 [7] 温洪周, 黄震, 束振华, 等. 乙肝“两对半”检验模式变迁分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4): 263-265.  
 [8] 应晟, 杨美云. 对 138 例 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者血清学指标的探讨[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 418-419.  
 [9] 郑春梅, 邓巧娟, 龙尧. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎 HBV-DNA、ALT 水平与病理关系的探讨[J]. 山东医药, 2010, 50(16): 57-58.  
 [10] 黄华泥, 张业久, 徐五星. HBV-DNA 定量检测结果与乙肝两对半模式相关性分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(31): 3459-3460.

(收稿日期:2013-05-20)

(上接第 2836 页)

为中国汉族人群的稀有等位基因。本研究还发现该检测系统 Ladder 中,很多等位基因在本地区的汉族人群中并未检出,如 FGA 基因座的一些等位基因(如 33.2, 42.2, 43.2, 46.2, 48.2, 50.2)。此研究提示这些以欧美人群的资料制作的 Ladder 并非完全适合中国人群使用。稀有等位基因的出现,给检测结果的判读带来一定困难。而本研究认为稀有等位基因的存在及其确定,有助于提高各 STR 基因座的 DP、PPE 等,同时也提示各试剂公司应制备更加完善的、适合中国人群的 Ladder 以分析这些数据,尤其在试剂国产化的过程中更要注重这方面数据的收集,并将其放在 Ladder 中,使 DNA 个体识别和亲权鉴定的试剂更加符合中国人群。

参考文献

[1] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats[J]. Am J Hum Genet, 1991, 49(4): 746-756.  
 [2] 薛天羽, 成建定, 张晋湘, 等. 华南地区汉族群体 15 个 STR 基因座的遗传多态性调查[J]. 中山大学学报, 2009, 30(3S): S45-50.  
 [3] 陈伟. 重庆汉族、土家族群体 STR 基因座遗传多态性研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2005.  
 [4] Khodjet-el-Khil H, Fadhlaoui-Zid K, Gusmão L, et al. Allele frequencies for 15 autosomal STR markers in the Libyan population[J]. Ann Hum Biol, 2012, 39(1): 80-83.  
 [5] Gaibar M, Esteban E, Moral P, et al. STR genetic diversity in a Mediterranean population from the south of the Iberian Peninsula[J]. Ann Hum Biol, 2010, 37(2): 253-266.  
 [6] 张红岩, 万加华, 高自华, 等. 青岛地区汉族群体 15 个 STR 基因

座的遗传多态性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(7): 24-26.  
 [7] Shriver MD, Jin L, Bocerwinkle E, et al. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci[J]. Mol Bio Evol, 1995, 12(5): 914-920.  
 [8] Gill P. A new method of STR interpretation using inferential logic development of a criminal intelligence database[J]. IN J Leg Med, 1996, 109(1): 14-22.  
 [9] 中华人民共和国司法部, 司法鉴定管理局. 亲权鉴定技术规范[S]. 2010-04-07.  
 [10] 潘猛, 陈子庆, 丁小健, 等. 江苏汉族群体 15 个 STR 基因座遗传多态性分析[J]. 中国法医学杂志, 2012, 38(5): 561-564.  
 [11] 李成涛, 郭宏, 赵珍敏, 等. 亲权鉴定中常用 STR 基因座的基因组学和遗传学分析[J]. 中国法医学杂志, 2008, 24(3): 214-218.  
 [12] Crouse CA, Rogers S, Amriott E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(1): 87-94.  
 [13] 图尔逊·尼亚孜比力盖, 古力娜尔·库尔班, 张丽萍. 新疆维吾尔族 20 个 STR 基因座遗传多态性[J]. 中国法医学杂志, 2012, 27(2): 138-140.  
 [14] 李成涛, 郭宏, 赵珍敏, 等. 亲权鉴定中常用 STR 基因座的基因组学和遗传学分析[J]. 中国法医学杂志, 2008, 24(3): 214-218.  
 [15] Crouse CA, Rogers S, Amriott E, et al. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems[J]. J Forensic Sci, 1999, 44(1): 87-94.

(收稿日期:2013-06-29)