

• 临床检验研究论著 •

慢性乙型肝炎患者血清补体C3b水平的研究*

蒋 静¹, 刘 斌², 热依汗·谢以提^{1△}, 孟存仁¹

(新疆医科大学第一附属医院:1. 检验科; 2. 输血科, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者血清补体C3b水平及其临床意义。方法 选择乙型肝炎病毒(HBV)感染的慢性乙型肝炎患者140例,据患者血清中HBV e抗原(HBeAg)和丙氨酸氨基转氨酶(ALT)水平,将其分为6组:A组(HBeAg阳性,ALT正常)、B组(HBeAg阴性,ALT正常)、C组(HBeAg阳性,ALT轻、中度升高)、D组(HBeAg阳性,ALT高度升高)、E组(HBeAg阴性,ALT轻、中度升高)、F组(HBeAg阴性,ALT高度或重度升高)。另将20例健康者作为对照组。HBeAg采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法,HBV-DNA采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)法,ALT采用速率法,补体C3b采用ELISA-生物素亲和素夹心法测定。结果 D组与F组患者血清C3b、ALT、天冬氨酸氨基转氨酶(AST)水平显著高于A、B、C、E组($P<0.05$);而D组与F组比较,患者血清C3b、AST水平均无统计学差异($P>0.05$)。对照组受检者血清C3b水平显著低于A、B、C、D、E、F组($P<0.05$)。C3b水平与ALT、AST、HBsAg存在正相关($P<0.05$),而与HBeAg和HBV-DNA无显著相关($P>0.05$)。结论 补体C3b水平与HBV的感染及肝细胞损伤程度有关,而与病毒复制的活跃程度无关,可作为感染和预后的辅助检测指标。

关键词:补体C3b; 肝炎病毒,乙型; 丙氨酸氨基转氨酶类; 天冬氨酸氨基转移酶类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3116-03

A study on serum complement C3b levels of patients with chronic hepatitis B*

Jiang Jing¹, Liu Bin², Reyihan Xyit^{1△}, Meng Cunren¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To investigate serum complement C3b levels of patients with chronic hepatitis B and its clinical significance. **Methods** 140 hepatitis B virus(HBV)-infected patients with chronic hepatitis B were enrolled and divided into 6 groups according to their serum levels of HBV e antigen(HBeAg) and alanine aminotransferase(ALT): group A(HBeAg: positive, ALT: normal), group B(HBeAg: negative, ALT: normal), group C(HBeAg: positive, ALT: mildly or moderately elevated), group D(HBeAg: positive, ALT: highly elevated), group E(HBeAg: negative, ALT: mildly or moderately elevated), group F(HBeAg: negative, ALT: highly or severely elevated). Another 20 healthy people were served as the control group. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was employed to detect HBeAg, fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR) was used to measure HBV-DNA, rate method was adopted to detect ALT and biotin/avidin double-antibody sandwich ELISA was used to measure complement C3b. **Results** Serum C3b, ALT, aspartate aminotransferase(AST) levels of patients in group D and group F were significantly higher than those in group A, B, C, E($P<0.05$). Compared group D with group F, serum C3b, AST levels were not statistically different($P>0.05$). Serum C3b levels of healthy people in control group were markedly lower than those in group A, B, C, D, E, F($P<0.05$). C3b levels was positively correlated to ALT, AST and HBsAg levels($P<0.05$) and showed no significant correlation with HBeAg and HBV-DNA levels($P>0.05$). **Conclusion** Complement C3b is related to degrees of HBV infection and hepatocyte damage rather than activity of viral replication, and can be used as an auxiliary detection indicator of HBV infection and prognosis.

Key words: Complement C3b; hepatitis B virus; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase

血清中补体片段C3b是补体激活过程中产生的重要片段,它是连接3条补体激活途径的中心环节,由 α 、 β 两条肽链组成,两条肽链间以二硫键相连, α 链的半胱氨酸和谷氨酸残基之间有分子内硫酯键^[1]。补体系统在抗病毒感染中处于一线防御地位^[2]。正常人血清中补体含量相对稳定,不随机体的免疫反应增加而升高。肝脏是合成补体C3、C4的主要场所^[3]。对肝病患者检测补体有助于判定肝脏损伤的程度。不同于以往对C3b的检测多为补体致敏酵母菌花环法测定红细胞C3b受体活性或检测C3b受体花环率,来研究乙型肝炎患者红细胞C3b受体的功能,本文根据患者肝功能差异和乙型肝炎“两

对半”结果,对慢性乙型肝炎患者进行分组,用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测健康人及患者血浆C3b含量,初步分析C3b在乙型肝炎病毒(HBV)感染中的意义,探讨C3b水平和病毒感染、天冬氨酸氨基转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)和病毒复制水平的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HBV感染者来自本院2010年1月至2011年1月诊治的140例患者,符合HBV感染诊断标准[HBV表面抗原(HBsAg)、HBV-DNA阳性],排除:(1)恶性肿瘤、自身免疫病;(2)梅毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染;(3)上呼吸

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660718),新疆维吾尔自治区病原生物学重点学科资助项目(BYX11001)。 作者简介:蒋静(1982~),女,主管技师,主要从事临床感染免疫学检验工作。 △ 通讯作者, E-mail:1055034235@qq.com。

道感染等炎症性疾病; (4) 甲、丙、丁、戊、庚型肝炎及与补体成分相关的其他疾病等。将于本院进行健康体检的 20 例健康者作为对照组, 各型肝炎病毒血清标志均为阴性, AST、ALT 正常, 未感染其他病毒。

1.2 乙型肝炎患者的分组 参考卫生部修订的《乙型肝炎防治方案》^[4], 主要依据患者血清中 HBeAg 表达和 ALT 水平, 将乙型肝炎患者分为 6 组: A 组(免疫耐受, HBeAg 阳性, ALT 正常)、B 组(无症状 HBV 携带, HBeAg 阴性, ALT 正常)、C 组(HBeAg 阳性, ALT 轻、中度升高)、D 组(HBeAg 阳性, ALT 高度升高)、E 组(HBeAg 阴性, ALT 轻、中度升高)、F 组(HBeAg 阴性, ALT 高度或重度升高)。

1.3 主要仪器与试剂 主要设备为奥地利 TECAN sunrise 酶标仪。主要试剂: 美国 R&D 公司生产的 C3b ELISA 检测试剂盒; 美国雅培公司生产的 HBV ELISA 试剂盒; 上海玉兰生物技术有限公司生产的 ALT 试剂盒; 中山大学达安基因股份有限公司生产的 HBV-DNA 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 试剂盒。

1.4 实验方法 HBeAg 水平采用 ELISA 法, 并根据标本吸光度(S)与临界值(CO)的比值(S/CO)判定阴、阳性。HBV-

DNA 水平采用荧光定量 PCR 法。ALT 水平采用速率法, 根据《乙型肝炎防治方案》, 以本院的 ALT 参考值范围和实际情况为依据, 将 ALT 高于临界值 5 倍以内定义为轻、中度异常; 将 ALT 高于临界值 5 倍以上定义为高、重度异常。对照组健康者及患者血浆中 C3b 水平用 ELISA-生物素亲和素抗体夹心法测定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 如组间差异有显著意义时则进一步用最小显著差法(LSD)分析法进行两两比较, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 在相关性分析中, C3b 与定性数据采用秩相关系数, C3b 与定量数据采用 Pearson 相关系数。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组受检者血清 C3b、ALT 及 AST 水平比较 D 组与 F 组患者血清 C3b、ALT、AST 水平高于 A、B、C、E 组($P<0.05$); 而 D 组与 F 组比较, 患者血清 C3b、AST 水平均无统计学差异($P>0.05$)。对照组受检者血清 C3b 水平低于 A、B、C、D、E、F 组($P<0.05$); 其血清 ALT、AST 水平低于 C、D、F 组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同组受检者血清 C3b、HBsAg、ALT、AST 水平的比较

组别	n	C3b(ng/mL)	HBsAg S/CO 值	ALT(U/L)	AST(U/L)
A 组	20	4.65±2.58*△#	200.54±101.47	27.31±8.82	35.21±20.26#△
B 组	20	5.72±2.20*△#	121.26±106.03	18.50±8.22	78.95±47.99#△
C 组	30	5.20±1.80*△#	132.84±124.05	93.56±41.86	92.10±60.94*#△
D 组	20	7.56±1.07*	109.84±72.34	492.46±286.07	222.05±28.29*
E 组	30	5.46±1.15*△#	135.73±124.36	86.08±41.47	76.46±73.61#△
F 组	20	7.07±1.25*	117.76±102.88	454.49±218.66	212.97±23.87*
对照组	20	3.12±1.62	0.88±0.29	17.05±6.53	21.48±7.36#△

*: $P<0.05$, 与对照组比较; △: $P<0.05$, 与 D 组比较; #: $P<0.05$, 与 F 组比较。

2.2 C3b 水平与 ALT、AST、HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 的相关性分析 C3b 水平与 ALT、AST、HBsAg 存在正相关($P<0.05$), 而与 HBeAg 和 HBV-DNA 无显著相关($P>0.05$), 见表 2。

表 2 C3b 与 ALT、AST、HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 的相关性

与 C3b 的相关性	ALT	AST	HBsAg		HBeAg		HBV-DNA
			定量	定性	定量	定性	
r	0.475	0.380	0.193	0.407	0.047	0.087	0.017
P	0.000	0.000	0.014	0.000	0.554	0.275	0.838

3 讨 论

HBV 呈世界性分布, 且危害严重^[5], 全球感染 HBV 者约 20 亿人, 其中, 慢性 HBV 感染约 3.5~4.0 亿人, 约占全球人口的 6%^[6], 中国是乙型肝炎的高发区, 人群中 HBsAg 阳性率高达 10%~15%^[7]。由于 HBV 感染, 机体产生抗原-抗体复合物, 激活补体系统, 引发多种生物学效应, 导致补体消耗, 同时肝脏合成补体的功能下降, 不能及时合成, 造成体内补体含量下降。目前关于 HBV 感染的研究中, 免疫学的研究报道很多, 笔者研究了红细胞 C3b 受体功能在感染程度存在差异的乙型肝炎患者中的不同表达情况, 及其与 ALT、AST、HBsAg

的相关性, 分析 C3b 与肝细胞损伤、病毒复制之间的关系。

C3 被 C3 转化酶裂解成 C3a、C3b 片段, C3b 是补体系统最重要的活性片段, 在补体 3 条活化途径中扮演枢纽角色, 其在经典途径和甘露聚糖结合凝集素(MBL)途径中构成 C5 转化酶(C4b2b3b), 在旁路途径中构成 C3 转化酶(C3bBb)和 C5 转化酶(C3bBbC3b); C3b 在补体系统中也是重要的调节成分, 补体通过 C3b 对其活化进行正反馈调节, 放大和加速其免疫功能。另外, C3b 也通过免疫调理作用和免疫黏附作用清除循环和组织中的微生物抗原或抗原-抗体复合物, 是机体防御屏障的要素。新生 C3b 可固定在微生物表面, 同时又作为配体与吞噬细胞或红细胞上的补体受体结合, 触发细胞对异物的消除功能^[8]。

本研究是以临床对乙型肝炎的防治方案为依据, 同时兼顾考虑 ALT、HBeAg 水平, 将患者分为不同的组, 探讨不同感染程度乙型肝炎患者的血清 C3b 水平, 分析在乙型肝炎疾病的发展过程中, C3b 所起的作用和其可能发挥的抗病毒免疫功能。研究发现, 对照组健康者血清 C3b 水平低于其余 6 组($P<0.05$), 提示 C3b 水平在乙型肝炎患者中增高, 这可能是由于 HBV 感染激活补体, 补体活化后裂解出更多的 C3b 片段。乙型肝炎病变严重的 D 组(HBeAg 阳性, ALT 高、重度升高)和 F 组(HBeAg 阴性, ALT 高、重度升高)患者血清 C3b 水平高于其余 5 组($P<0.05$), 而 D 组与 F 组比较, C3b 水平无

显著差异($P>0.05$)；对比 ALT 轻、中度升高的 C 组和 E 组、以及 ALT 正常的 A 组和 B 组的 C3b 水平,发现差异无统计学意义($P>0.05$),但这 4 组患者血清 C3b 水平均高于对照组($P<0.05$),提示 C3b 可能与肝细胞的损伤有关,可作为慢性乙型肝炎患者疾病预后的一个监测指标。其可能通过直接活化补体导致感染病毒的肝细胞死亡,而引起 ALT、AST 升高,也可通过调理作用活化巨噬细胞等免疫细胞,导致更严重的肝细胞损伤；而且,由于 HBV 活跃复制,在患者体内产生抗病毒抗体,继而在循环中形成特异性免疫复合物,大量免疫复合物沉积于肝内,导致毛细胆管栓塞、激活补体、趋化炎症细胞、激活多种炎症因子,导致更广泛的细胞损伤或坏死,免疫复合物引起Ⅲ型超敏反应所致的组织损伤在慢性乙型肝炎的发病机制中也不容忽视^[9]。

本研究发现,C3b 的水平分别与 ALT、AST 及 HBsAg 水平呈正相关($P<0.05$),而与 HBeAg、HBV-DNA 水平无显著相关性($P>0.05$),进一步提示 C3b 的升高与病毒感染有关,与肝细胞损伤程度有关,但与病毒复制的水平无关。这可能是由于病毒复制和 DNA 合成是在肝细胞内完成,HBeAg 在血液中属于游离的可溶性抗原,其并不是病毒体的结构蛋白,即使可以活化补体也难以形成稳定的 C3b 产物,C3b 容易灭活；而 HBsAg 是 HBV 的重要结构蛋白,且位于 HBV 表面,病毒复制后大量病毒颗粒从肝细胞内释放,激活补体后容易形成稳定的 C3b,并继续活化补体的其他成分,最终清除抗原并导致超敏反应。研究说明,补体,尤其是补体 C3,参与了 HBV 的抗感染免疫和由其导致的肝细胞损伤。C3b 虽与 ALT、AST、HBsAg 存在正相关,但相关系数并不高,最大 r 值仅为 0.475。分析其原因可能是由于 C3b 属于补体,其水平相对较为恒定,个体间的变异度较小,且导致补体的活化和 C3b 水平变化的原因很多,与特异性抗体相比,研究的干扰因素复杂。

综上所述,很多学者都认为慢性感染的乙型肝炎与 C3b 表达水平高度相关,但是慢性 HBV 的不同感染程度与 C3b 的

表达水平之间的相关性还需要进一步的研究来验证,本研究认为乙型肝炎病变程度的加重可促进病毒抗原或特异性免疫复合物激活补体系统,促进 C3 被 C3 转化酶裂解成 C3b 片段,使 C3b 的水平增高并结合到病毒上,引起一系列肝组织损害的免疫效应。高表达的 C3b 与肝细胞损伤有关,也与 HBV 的病变程度的加重和疾病不良预后有关系,有关 C3b 表达和肝细胞受损程度之间的关系还需要进行更多的研究。

参考文献

- [1] 余新沛,陈政良. C3 研究进展[J]. 免疫学杂志,2004,20(6):483-486.
- [2] 韩根成. 补体受体与病毒感染[J]. 国外医学: 免疫学分册,2000,23(5):257-259.
- [3] 陈小韧. 细胞因子对补体急性时相蛋白合成调控的分子机制[J]. 国外医学: 免疫学分册,1999,22(1):21-22.
- [4] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- [5] 苏成豪,许龙善. 乙型肝炎流行病学研究进展[J]. 旅行医学科学,2008,14(1):5-8.
- [6] Van Damme P, Van Herck K. A review of the efficacy, immunogenicity and tolerability of a combined hepatitis A and B vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2004,3(3): 249-267.
- [7] Kane MA. World-wide status of hepatitis B vaccination 1998[J]. Soz Praventivmed, 1998,43 Suppl S1:S44-46.
- [8] 安云庆. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 北京大学医学出版社,2009.
- [9] Miyake J, Iwasaki Y, Takahashi A, et al. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases[J]. Gut, 2002,51(4):591-596.

(收稿日期:2013-07-16)

(上接第 3115 页)

- IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus—implications for inter-laboratory testing[J]. Clin Chim Acta, 2011,412(11-12): 1076-1080.
- [7] Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, et al. Diagnostic accuracy of currently available anti-double-stranded DNA antibody assays. An Italian multicentre study[J]. Clin Exp Rheumatol, 2011, 29(1): 50-56.
- [8] Tong DW, Zhang SL, Li YZ, et al. The comparison of the three anti-dsDNA antibody detecting test[J]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2009,23(1): 74-75.
- [9] Villegas-Zambrano N, Martinez-Taboada VM, Bolivar A, et al. Correlation between clinical activity and serological markers in a wide cohort of patients with systemic lupus erythematosus: an eight-year prospective study[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1173 (1):60-66.
- [10] Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, et al. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end[J]. Rheumatology (Oxford), 2007,46(7):1052-1056.
- [11] Munoz LE, Gaipol US, Herrmann M. Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay[J]. Autoimmun Rev,

2008,7(8): 594-597.

- [12] Ceribelli A, Andreoli L, Cavazzana I, et al. Complement cascade in systemic lupus erythematosus: analyses of the three activation pathways[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1173:427-434.
- [13] Kallel-Sellami M, Laadhar L, Zerzeri Y, et al. Complement deficiency and systemic lupus erythematosus: consensus and dilemma [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2008,4(5): 629-637.
- [14] Nasiri S, Karimifar M, Bonakdar ZS, et al. Correlation of ESR, C3,C4,anti-DNA and lupus activity based on British Isles Lupus Assessment Group Index in patients of rheumatology clinic[J]. Rheumatol Int, 2010,30(12):1605-1609.
- [15] Yang DH, Chang DM, Lai JH, et al. Usefulness of erythrocyte-bound C4d as a biomarker to predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology, 2009, 48 (9): 1083-1087.
- [16] Liu CC, Kao AH, Hawkins DM, et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. Clin Transl Sci, 2009,2(4):300-308.

(收稿日期:2013-06-14)