

• 临床检验研究论著 •

丙型肝炎病毒感染者 17 种自身抗体的检测及其临床意义

钟运华¹, 庄俊华^{2△}, 赵 蓉¹, 张战锋¹

(1. 广州中医药大学, 广东广州 510405; 2. 广东省中医院, 广东广州 510120)

摘 要:目的 观察丙型肝炎病毒(HCV)感染者的自身抗体情况,了解 HCV 感染后疾病严重程度与抗核抗体(ANA)谱阳性率的关系。方法 收集 123 例 HCV 感染患者的血清标本作为 HCV 组,根据病毒感染的严重程度将其分为 3 组:A 组,急性丙型肝炎 17 例;B 组,慢性丙型肝炎 64 例;C 组,肝硬化 42 例。将排除病毒感染的健康者 52 例作为对照组。采用间接酶联免疫吸附测定法检测抗 HCV 抗体,线性免疫印迹法检测 123 例 HCV 感染者血清中抗 dsDNA、核小体、组蛋白、SmD1、增殖细胞核抗原(PCNA)、P0、SSA/Ro60kD、SSA/Ro52kD、SSB/La、CENP-B、Scl70、U1-snRNP、AMA-M2、Jo-1、PM-Scl、Mi-2 和 Ku 抗体。结果 47.2%(58/123)HCV 感染者至少 1 种自身抗体阳性,明显高于对照组的 9.6%,差异有统计学意义($P<0.01$)。ANA 谱 17 种自身抗体阳性率由高到低依次为:抗 SSA/Ro52kD 抗体(23.6%)、抗 SSB/La 抗体(6.5%)、抗 Mi-2 抗体(5.7%)、抗 PCNA 抗体(4.9%)、抗核小体抗体(3.3%)、抗 Ku 抗体(3.3%),抗 dsDNA、SmD1、AMA-M2、PM-Scl 抗体均为 1.6%,抗组蛋白、P0、SSA/Ro60kD、CENP-B、U1-snRNP、Jo-1 抗体均为 0.8%,未发现抗 Scl-70 抗体。ANA 谱阳性率与 HCV 感染者的性别和年龄无关($P>0.05$)。急性丙型肝炎患者、慢性丙型肝炎患者与肝硬化患者的 ANA 谱阳性率分别为 47.1%、40.6%和 57.1%,差异无统计学意义($P=0.25$)。结论 HCV 感染者可检测到多种自身免疫性疾病的特异度抗体,其 ANA 谱阳性率与性别、年龄及 HCV 感染疾病的严重程度均无关。

关键词:肝炎病毒属; 抗体,抗核; 自身免疫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)03-0275-03

17 kinds of auto-antibodies in patients with hepatitis C virus infection

Zhong Yunhua¹, Zhuang Junhua^{2△}, Zhao Rong¹, Zhang Zhanfeng¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 2. Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To assess the prevalence of auto-antibodies in patients with HCV infection and observe the significance of ANA profile prevalence in HCV infected severity. **Methods** Indirect enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) was used to detect anti-HCV antibody. Line immunoassay (LIA) was used to detect 17 auto-antibodies in 123 patients with HCV infection. **Results** 58 of 123 patients with HCV infection had one autoantibody at least, whose prevalence (47.2%) was statistically higher than control group (9.6%). The prevalence of 17 kinds of auto-antibodies in patients respectively showed 29 (23.6%) of HCV infected patients had anti-SSA/Ro52kD, 8 (6.5%) had anti-SSB/La, 7 (5.7%) had anti-Mi-2, 6 (4.9%) had anti-PCNA, 4 (3.3%) had anti-Nucleosome and anti-Ku, 2 (1.6%) had anti-dsDNA, anti-SmD1, anti-AMA-M2, anti-PM-Scl, 1 (0.8%) had anti-CENP-B, anti-SSA/Ro60kD, anti-U1 snRNP, anti-Jo 1, none had anti-Scl 70. The presence of antibodies in ANA profile were not associated with subject's gender or age ($P>0.05$), the prevalence of ANA profile in patients with acute hepatitis C, chronic hepatitis C, cirrhosis were 47.1%, 40.6% and 57.1% respectively, showing no significant differences. **Conclusion** Several specific antibodies in autoimmunity diseases are at present in patients with HCV infection. The prevalence of ANA profile has no correlation with sex, and age, and liver disease severity.

Key words: hepatitis virus; antibodies, antinuclear; autoimmunity

丙型肝炎病毒(HCV)感染是全球第二大多发性病毒性慢性肝病,据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 3%。HCV 是最容易诱发机体自身免疫性反应的病毒之一,HCV 感染与众多自身免疫性疾病有关,本研究通过抗核抗体(ANA)谱的检测,探讨系统性红斑狼疮(SLE)、干燥综合征、硬皮症、混合型结缔组织疾病、原发性胆汁性肝硬化和肌炎 6 种疾病的特异度抗体与 HCV 感染之间的关系,为临床诊治 HCV 相关疾病提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广东省中医院和深圳市第三人民医院 2010 年 10 月至 2012 年 12 月收治的 123 例 HCV 感染患者的血清标本作为 HCV 组,其中男 71 例、女 52 例;年龄 2~80 岁,

平均(41.0±15.0)岁,所有患者的诊断均符合丙型肝炎病毒诊断标准(WS213-2008)。根据病毒感染的严重程度将上述患者分为 3 组:A 组,急性丙型肝炎 17 例;B 组,慢性丙型肝炎 64 例;C 组,肝硬化 42 例。将排除病毒感染的健康者 52 例作为对照组,其中,男 27 例、女 25 例;年龄 22~50 岁,平均 38.7 岁。

1.2 主要仪器与试剂 主要仪器为 Imark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)、Tenfly 免疫印迹分析仪(深圳市亚辉龙生物科技有限公司)。主要试剂为抗 HCV 抗体试剂盒(上海科华生物工程有限公司)、ANA 谱检测试剂盒(德国 IMTEC 公司)。

1.3 方法

1.3.1 间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 所有患者采

集肘静脉血,实验操作和结果判断均参照说明书。

1.3.2 线性免疫印迹法(LIA)检测 免疫印迹膜条包被有 dsDNA、核小体、组蛋白、SmD1、增殖细胞核抗原(PCNA)、P0、SSA/Ro60kD、SSA/Ro52kD、SSB/La、CENP-B、Scl70、U1-snRNP、AMA-M2、Jo-1、PM-Scl、Mi-2 和 Ku 共 17 种抗原,可同时检测相应的抗体。

1.4 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,组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验,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

在 123 例 HCV 患者中,58 例(47.2%)患者至少有一种抗体阳性,其中 44 例(35.8%)患者显示一种自身抗体阳性,11 例(8.9%)患者血清检测到 2 种自身抗体,3 种自身抗体同时阳性的患者只有 3 例,未发现 4 种及以上抗体共同阳性的病例。5 例对照血清均为单一阳性,阳性率为 9.6%(5/52),HCV 组及对照组受检者抗体阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 22.4, P < 0.01$)。

ANA 谱 17 种自身抗体阳性率由高到低依次为:抗 SSA/Ro52kD 抗体(23.6%)、抗 SSB/La 抗体(6.5%)、抗 Mi-2 抗体(5.7%)、抗 PCNA 抗体(4.9%)、抗核小体抗体(3.3%)、抗 Ku 抗体(3.3%),抗 dsDNA、SmD1、AMA-M2、PM-Scl 抗体均为 1.6%,抗组蛋白、P0、SSA/Ro60kD、CENP-B、U1-snRNP、Jo-1 抗体均为 0.8%,未发现抗 Scl-70 抗体,见图 1。对照组健康者抗 SmD1、SSB/La、AMA-M2、PM-Scl、Ku 抗体阳性各 1 例,阳性率均分别为 1.9%。

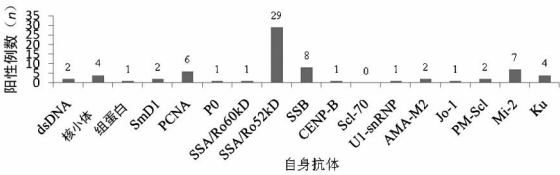


图 1 123 例 HCV 感染者 17 种自身抗体检测结果

ANA 谱阳性的 HCV 感染者中,23 例女性 ANA 谱阳性,占女性患者的 44.2%(23/52),35 例男性 ANA 谱阳性,占男性患者的 49.3%(35/71),不同性别感染者的 ANA 谱阳性率差异无统计学意义($P = 0.578$)。抗体阳性组与阴性组受检者年龄差异无统计学意义($P = 0.495$)。见表 1。

表 1 HCV 感染者性别、年龄与 ANA 谱的关系

组别	n	男(n)	女(n)	年龄(岁)
ANA 谱抗体阳性组	58	35	23	42.0 ± 16.0
ANA 谱抗体阴性组	65	36	29	40.0 ± 15.0

HCV 抗体阳性而转氨酶正常者、慢性肝炎患者和肝硬化患者的 ANA 谱阳性率分别为 47.1%(8/17)、40.6%(26/64)和 57.1%(24/42)。3 组患者 ANA 谱阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 2.77, P = 0.25$)。

3 讨 论

至今已发现至少 36 种疾病与 HCV 感染有关,其中大部分为自身免疫性紊乱相关性疾病,如自身免疫性甲状腺炎、干燥综合征和唾液腺炎等。慢性丙型肝炎患者血清中常发现 ANA、抗平滑肌抗体、抗线粒体抗体、类风湿因子、抗心磷脂抗体、抗 DNA 抗体等自身抗体。

本实验使用 LIA 膜条检测 17 种抗体,其中 47.2%(58/123)HCV 感染者至少 1 种自身抗体阳性,高于深圳地区周厚清等^[1]报道的丙型肝炎患者 ANA 阳性率(25.6%),由于他们使用荧光免疫技术,与 LIA 方法学原理不同,而且使用基质抗原不同,因此,检测结果有差别。数据显示,HCV 感染者中,不同性别和年龄患者的 ANA 谱阳性率差异无统计学意义,HCV 感染的严重程度与 ANA 谱阳性率也无关。

抗 SSA/Ro52kD 抗体检出率(23.6%)最高,其中女性 10 例,男性 19 例,二者的差异无统计学意义($P = 0.331$)。24.4%的 HCV 感染者发现抗 SSA/Ro 抗体(包括 SSA/Ro52kD 和 SSA/Ro60kD),与早期 D'Amico 等^[2]报道的阳性率[23.1%(22/96)]相近,但其报道的抗 SSB/La 抗体的阳性率(20.2%)明显高于本实验的 6.5%。抗 SSA/Ro 抗体与干燥综合征或 SLE 密切相关,根据免疫印迹法统计的资料,抗 Ro52 抗体与干燥综合征有更强的联系,而抗 Ro60 抗体与 SLE 相关性更密切。早期研究发现,干燥综合征与 HCV 感染有关,在 HCV 感染相关 II 型冷球蛋白血症中干燥综合征发生率仅 6%^[3]。虽然在有 HCV 感染干燥综合征患者涎腺上皮细胞检测出 HCV,而在不伴有涎腺上皮炎症的 HCV 感染者涎腺上皮中未检测出 HCV。因此,HCV 感染并非干燥综合征发生的必要或充分条件^[4]。

本实验发现,SLE 特异度抗体在 HCV 感染者中的检出率,抗 PCNA 抗体最高,可能与抗 PCNA 抗体具 HCV 抗体的共同表位有关。抗 dsDNA、核小体、组蛋白、SmD1、PCNA 和 P0 抗体 6 种 SLE 特异度抗体在 HCV 感染者的检出率,依次为 1.6%、3.3%、0.8%、1.6%、4.9%和 0.8%,都是单一抗体阳性,而这些是已排除 SLE 的 HCV 患者。抗 dsDNA 抗体对 SLE 诊断的灵敏度为 52.4%,特异度为 94.2%;抗核小体抗体对 SLE 诊断的灵敏度为 59.9%,特异度为 94.9%^[5];抗 PCNA 抗体对 SLE 诊断的灵敏度仅为 3%~5%,特异度为 95%,抗 dsDNA 抗体和抗核小体抗体的灵敏度比抗 PCNA 抗体好,而特异度略差。Hsu 等^[6]报道 163 例 HCV 感染者中有 27 例(16.6%)PCNA 抗体阳性,而这些 PCNA 抗体阳性的 HCV 患者不符合 SLE 的诊断标准,推测 PCNA 抗体与 HCV 抗体有共同的表位。

抗 Jo-1、PM-Scl、Mi-2 和 Ku 抗体的检测用于辅助诊断多肌炎/皮肌炎(PM/DM)疾病,其中抗 Jo-1 抗体是标志性抗体。抗 Jo-1 抗体比抗 Mi-2 抗体对 PM/DM 的灵敏度高,特异度较低,在 HCV 患者中,抗 Jo-1 抗体阳性率(0.8%)比抗 Mi-2 抗体阳性率低约 5%。迄今尚无直接证据表明 HCV 感染会导致皮肌炎,但有研究发现皮肌炎和 HCV 感染存在偶然的联系^[7],HCV 是已经被确证与某些自身抗体的产生有关,而 20%~31%的皮肌炎患者可检测到抗 Mi-2 抗体^[8-9],一个 169 bp 的 cDNA 产物与人类 Mi-2 β 抗原有 88.8%的同源性,蛋白水平的同源性达 100%,由此,形成这样的假说:抗 HCV 抗体或者 HCV 酶复合物可能会与宿主蛋白的同源区域发生交叉反应导致自身免疫性疾病,慢性 HCV 感染是通过自身免疫机制导致皮肌炎的^[10]。本文 123 例 HCV 感染者中抗 Mi-2 抗体的阳性率为 5.7%(7/123),为假说提供了实验依据。

硬皮症、混合型结缔组织疾病和原发性胆汁性肝硬化各自的特异度抗体也同样可以在 HCV 感染者发现,但检出率都较低,至于这几种自身免疫性疾病是否与 HCV 感染相关,有待进一步研究。

(下转第 279 页)

化具有协调作用。

在真核生物中, DNMT1 是维持 DNA 甲基化的关键酶, 其表达与基因印记、细胞分化和发育、肿瘤形成等密切相关, HDAC1 是乙酰化过程的关键酶。本研究中, DNMT1 和 HDAC1 在卵巢癌组织中高表达, 提示 DNMT1 和 HDAC1 表达增强是卵巢癌发生的早期事件。二者高表达率随组织异型程度的增加而逐渐增高, 具有一致的表达趋势, 说明 DNMT1 和 HDAC1 在诱导基因转录抑制、最终导致肿瘤形成的机制中具有协同作用的分子基础, 提示二者共同促进了卵巢癌的进展。针对 DNMT1 和 HDAC1 的肿瘤治疗研究证实, 二者的抑制剂能有效抑制肿瘤细胞生长, 提示 DNMT1 和 HDAC1 可能成为卵巢癌早期诊疗的新靶点^[16-17]。深入研究甲基化和去乙酰化在肿瘤形成中的机制, 将有助于克服卵巢癌诊疗的难关。

参考文献

- [1] 杨新苗. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂与蛋白酶体抑制剂协同抑制乳腺癌细胞及分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [2] 穆玉兰, 刘鸣, 汤春生, 等. 卵巢癌筛查研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(10): 804-805.
- [3] 韩艳, 张美花, 金铁峰, 等. HDAC1 和 HDAC6 蛋白过表达在卵巢浆液性癌中的临床病理学意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(4): 394-396, 401.
- [4] 贾妍, 邹颖刚, 陈军, 等. 组蛋白去乙酰化酶 1 在人上皮性卵巢癌组织中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(2): 256-258.
- [5] Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, et al. Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III - IV ovarian cancer patients[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(8): 1144-1149.
- [6] Singal R, Ginder GD. DNA methylation[J]. Blood, 1999, 93(12): 4059-4070.
- [7] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 168-174.
- [8] Lo KW, Cheung ST, Leung SF, et al. Hypermethylation of the p16

- gene in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(12): 2721-2725.
- [9] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases[J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 219-220.
- [10] Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases(DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(11): 2291-2298.
- [11] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia[J]. Blood, 2001, 97(5): 1172-1179.
- [12] 林洁, 来茂德. DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化与基因表达抑制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006, 22(3): 353-357.
- [13] Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? [J]. J Cell Biochem, 2002, 87(2): 117-125.
- [14] Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(24): 3156-3165.
- [15] Chen D, Ma H, Hong H, et al. Regulation of transcription by a protein methyl transferase[J]. Science, 1999, 284(5423): 2174-2177.
- [16] Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, et al. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway[J]. Oncogene, 2005, 24(1): 199-211.
- [17] Kouraklis G, Misiakos EP, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors as a potential therapeutic agent for human cancer treatment[J]. Target Oncol, 2006, 1(1): 34-41.

(收稿日期: 2013-10-08)

(上接第 276 页)

目前, 较少关于多种自身免疫性疾病与 HCV 感染关系的报道, 特别是多肌炎/皮肌炎特异性抗体与 HCV 感染相关的研究。本研究发现, HCV 感染者中可检测到多种自身免疫性疾病的特异性抗体。检测 HCV 患者血清中自身抗体水平, 有利于临床医生正确区分伴随自身免疫反应的 HCV 感染与单纯 HCV 感染, 而 ANA 阳性的 HCV 感染患者也容易被误诊为风湿性疾病或者其他自身免疫性疾病, 因此, 建议临床医生多参考关于 HCV 感染和自身抗体之间关系的研究。

参考文献

- [1] 周厚清, 董敏. 丙型肝炎患者血清自身抗体检测的临床研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 131-132.
- [2] D'Amico E, Palazzi C, Cacciatore P, et al. Anti-ENA antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47(4): 755-759.
- [3] Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, De Vita S, et al. Sjögren syndrome associated with hepatitis C virus: a multicenter analysis of 137 cases[J]. Medicine, 2005, 84(2): 81-89.
- [4] Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues[J]. J Hepatol, 2004, 40(2): 341-352.

- [5] Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis[J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 97-106.
- [6] Hsu TC, Tsay GJ, Chen TY, et al. Anti-PCNA autoantibodies preferentially recognize C-terminal of PCNA in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(1): 110-116.
- [7] Kee KM, Wang JH, Lee CM, et al. Chronic hepatitis C virus infection associated with dermatomyositis and hepatocellular carcinoma[J]. Chang Gung Med J, 2004, 27(11): 834-839.
- [8] Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis[J]. Arthritis Rheum, 1985, 28(7): 796-803.
- [9] Roux S, Seelig HP, Meyer O. Significance of Mi-2 autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis[J]. J Rheumatol, 1998, 25(2): 395-396.
- [10] Toshikuni N, Torigoe R, Mitsunaga M, et al. Dermatomyositis associated with hepatocellular carcinoma in an elderly female patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(10): 1641-1644.

(收稿日期: 2013-11-06)