

• 临床检验研究论著 •

兰州地区慢性乙型肝炎患者病毒复制与肝纤维化指标的相关性研究^{*}

吴 斌,李彩东,段正军,田鹏飞,李惠军

(甘肃省兰州市第二人民医院肝病研究所,甘肃兰州 730046)

摘 要:**目的** 探讨兰州地区慢性乙型肝炎(CHB)患者肝纤维化四项指标:层粘连蛋白(LN)、透明质酸(HA)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、Ⅲ型前胶原 N 端肽(PⅢNP)与乙型肝炎病毒(HBV)DNA 复制的相关性。**方法** 分别采用化学发光法和实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测肝纤维化指标和 HBV-DNA,以不同临床分型和自然史分期为背景,对兰州地区 724 例 HBV 感染者的肝纤维化指标和病毒复制量化检测研究。**结果** 在所有临床类型中,肝纤维化指标和 HBV-DNA 数值均高于正常,且最高为乙型肝炎肝硬化组;CⅣ、PⅢNP 均以 HBeAg(+)CHB 组最高。按乙型肝炎自然史分期,PⅢNP、CⅣ在免疫清除期最高且 CⅣ在 HBeAg 及 HBV-DNA(+)组中均值都高于 HBeAg 及 HBV-DNA(-)组。四项指标均为 HBeAg(+)CHB 组高于 HBeAg(-)CHB 组,但仅有 HA 有统计学差异($P<0.01$)。**结论** CⅣ与 HBV-DNA 以及 HBV-M 具有一定相关性,提示其可以间接反映肝损害程度以及病毒复制水平。

关键词:乙型肝炎病毒; 肝纤维化; 临床分型; 自然史分期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1854-03

Study on correlation between viral replication and liver fibrosis indicators in patients with chronic hepatitis B in Lanzhou^{*}

Wu Bin, Li Caidong, Duan Zhengjun, Tian Pengfei, Li Huijun

(Liver Diseases Research Institute, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract:**Objective** To investigate the correlation between the liver fibrosis markers laminin(LN), hyaluronan acid(HA), collagen Ⅳ(CⅣ) and procollagen type Ⅲ N-terminal peptide(PⅢNP) with the replication of hepatitis B virus(HBV) DNA in the patients with chronic HBV in Lanzhou.**Methods** Real-time PCR and chemiluminescent immunoassay(CLIA) were used to quantitatively measure serum HBV-DNA and liver fibrosis markers in 724 cases of HBV infection in Lanzhou with the different clinical classifications and the natural history stage as the background.**Results** The values of the liver fibrosis indicators and HBV-DNA level in all clinical types were higher than normal levels, and reached to maximum in the liver cirrhosis group; CⅣ and PⅢNP were highest in the HBeAg(+) CHB group; according to the hepatitis B natural history stage, the PⅢNP and CⅣ values reached the peak value in the immune clearance phase, moreover the CⅣ mean value in the HBeAg and HBV-DNA(+) group was higher than that in the HBV-DNA and HBeAg(-) group. 4 indicators in the HBeAg(+) CHB group were higher than those in the HBeAg(-) CHB group, but only HA had statistical difference($P<0.01$).**Conclusion** There is certain correlation between CⅣ with HBV-DNA and HBV-M, indicating that which can indirectly reflect the degree of liver damage and viral replication level.

Key words: hepatitis B virus; liver fibrosis; clinical type; natural history stage

乙型肝炎病毒(HBV)感染者从无症状 HBsAg 携带者(ASC)到严重的重型肝炎,最终形成肝硬化(LC)和肝癌(HCC)其实质就是肝纤维不断累积、发展并破坏肝脏正常结构的过程^[1],表现为肝内结缔组织基质沉积和增生,因此定量检测肝纤维化程度对于评估病情和及时治疗,预防和阻断肝硬化的发生就显得极为重要^[2]。目前研究认为,层粘连蛋白(LN)、透明质酸(HA)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、Ⅲ型前胶原 N 端肽(PⅢNP)可反映细胞外基质成分^[3]。HBV 感染的自然史免疫过程一般依次表现为:免疫耐受期-免疫清除期-免疫控制期-免疫逃避期。本研究利用化学发光法检测兰州地区 724 例慢性 HBV 感染者的肝纤维化四项指标,同时联合检测能反映 HBV 复制活跃程度及传染性的最直接指标 HBV-DNA,并对两者的相关性进行研究,探讨在不同临床分型和自然史分期背景下,期望对兰州地区慢性乙型肝炎患者肝纤维化诊断和乙型肝炎的慢性化、肝硬化、肝癌的发生及其临床规律的探索提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2011 年 1~12 月在兰州市第二人民医院就诊的 724 例肝病专家门诊及住院慢性乙型肝炎病

毒感染者(包括肝病专家门诊和住院患者),排除甲、丙、丁、戊等肝炎病毒感染,且无其他嗜肝病毒合并感染。年龄为 10~75 岁,724 例慢性 HBV 感染者以男性为主,男女比例为 2.91:1;门诊 424 例(58.56%),住院 300 例(41.44%);男性 539 例(74.44%),女性 185 例(25.56%)。所有患者无系统使用保肝、免疫调节及抗病毒药物的病史,无合并其他肝炎病毒感染,同时排除药物性、酒精性、其他病毒性肝炎,以及糖尿病、甲亢、严重心血管疾病等。患者诊断符合 2010 年中华医学会肝病学会与中华医学会感染病学会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[4]。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 ABI 7300 荧光定量分析仪(美国应用生物系统公司);CHEMCLIN600 全自动化学发光免疫分析仪(北京科美);ADVIA Centaur CP 全自动化学发光免疫分析仪(德国西门子公司)。

1.2.2 试剂 化学发光法检测肝纤维化指标试剂盒(北京科美);HBV 核酸荧光检测试剂盒(上海科华);化学发光免疫分析乙型肝炎血清标志物定量试剂盒(北京科美);血清生化指标

^{*} 基金项目:兰州市科技发展指导性计划项目(2011-ZD-08)。 作者简介:吴斌,男,主任医师,主要从事临床肝病治疗及其发病机制的研究。

检测试剂盒(北京九强),所有操作均严格按说明书进行。

1.3 方法 所有研究对象均于清晨空腹抽取 10 mL 静脉血,3 000 r/min,离心 5 min,后用 RT-PCR 法检测 HBV-DNA 载量,用 CLIA 法检测 HBV-M 的含量和肝纤维化各项指标的含量。HBV-DNA>5.00×10² IU/mL 为阳性;HA 参考值为 0~120 ng/mL, LN 参考值为 0~140 ng/mL, PⅢ NP 参考值为 0~12 ng/mL, CⅣ 参考值为 0~12 ng/mL。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐时采用 *t* 检验,方差不齐时采用校正 *t* 检验。组间比较运用单因素方差分析,组内相关性运用 Pearson 相关分析进行处理,相关系数用 *r* 表示。取 $\alpha=0.05$ 为检验水准,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床分型中肝纤维化血清标志物和 HBV-DNA 的特点 兰州地区慢性 HBV 感染者 HA 在所有临床类型中数值均高于正常值,且最高为乙型肝炎肝硬化组(454.30±271.38)

ng/L;LN 与 HA 类似,最高为乙型肝炎肝硬化组(158.87±120.05)ng/L,其次为 HBeAg(+)CHB 组(144.10±124.23)ng/L;PⅢ NP、CⅣ 均以 HBeAg(+)CHB 组最高,分别为(18.39±17.49)ng/L 和(135.72±132.57)ng/L,其次为乙型肝炎肝硬化组,分别为(16.12±17.35)ng/L 和(108.50±128.11)ng/L,HBeAg(+)CHB 组 HBV-DNA 载量的对数值最高,为(6.02±1.56),差异具有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

2.2 自然史分期中肝纤维化血清标志物的特点 在自然史分期中,HA 在再活动期(401.87±320.70)ng/L 最高,其次为免疫清除期(352.39±309.70)ng/L;LN 亦在再活动期最高(183.80±167.83)ng/L,其次为免疫清除期(162.51±133.18)ng/L;PⅢ NP、CⅣ 指标均在免疫清除期均值最高,分别为(15.76±15.27)ng/L 和(108.25±117.71)ng/L,其次为再活动期,分别为(13.71±17.76)ng/L 和(94.72±90.21)ng/L,HBV-DNA 载量的对数值在免疫耐受期(6.98±1.07)最高,见表 2。

表 1 慢性 HBV 感染者临床分型中肝纤维化血清标志物和 HBV-DNA 载量比较($\bar{x}\pm s$)

临床分型	<i>n</i>	HA(ng/L)	CⅣ(ng/L)	LN(ng/L)	PⅢNP(ng/L)	HBV-DNA(log ₁₀ IU/mL)
HBeAg(+)CHB	91	415.22±323.46	135.72±132.57	144.10±124.23	18.39±17.49	6.02±1.56*
HBeAg(-)CHB	101	156.71±306.34	102.02±125.81	128.35±183.28	13.73±17.94	4.93±1.14
慢性 HBV 携带者	52	204.65±216.90	47.57±34.94	90.062±44.33	11.45±3.89	5.57±1.98
非活动性 HBeAg 携带者	316	163.18±155.25	54.58±55.01	91.59±49.06	9.72±11.44	0.00±0.00
乙型肝炎肝硬化	164	454.30±271.38	108.50±128.11	158.87±120.05	16.12±17.35	5.15±1.29

*:*P*<0.01,HBeAg(+)CHB 组与其他各组相比。

表 2 慢性 HBV 感染者自然史分期中肝纤维化血清标志物和 HBV-DNA 量值比(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

自然史分期	<i>n</i>	HA(ng/L)	CⅣ(ng/L)	LN(ng/L)	PⅢNP(ng/L)	HBV-DNA(log ₁₀ IU/mL)
免疫耐受期	72	183.83±227.17	56.78±56.46	126.04±119.95	8.31±7.81	6.98±1.07*
免疫清除期	171	352.39±309.70	108.25±117.71	162.51±133.18	15.76±15.27	6.71±1.04
低复制期	241	129.62±123.83	57.52±53.18	90.22±47.14	8.63±9.59	3.64±1.13
再活动期	240	401.87±320.70	94.72±90.21	183.80±167.83	13.71±17.76	5.15±1.16

*:*P*<0.01,免疫耐受期组 HBV-DNA 浓度与其他各组相比。

2.3 慢性 HBV 感染者肝纤维化指标与 HBV-DNA 的相关性 兰州地区 HBV 感染者 HA、LN 含量与 HBV-DNA 无显著相关性(*r*=−0.016,*P*=0.408;*r*=−0.033,*P*=0.314),CⅣ 含量与 HBV-DNA 存在明显的负相关关系,且差异显著(*r*=−0.145,*P*=0.017),PⅢ NP 与 HBV-DNA 存在正相关关系(*r*=0.070,*P*=0.154)。

3 讨 论

慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒持续存在一直被认为是其肝脏纤维化发生、发展的重要原因。但目前 HBV-DNA 水平与肝纤维化的关系尚不明确。既往研究显示 HA 与肝纤维化相关性好,可较准确灵敏地反映肝细胞受损情况和肝内已生成的纤维量。有研究指出 HA 是反映肝纤维化最有价值的血清学标志物^[5]。端肽酶切去经糖化和羟化的Ⅲ型前胶原氨基端和羧基端的球形肽,形成Ⅲ型胶原纤维沉积。因此,血清中 PⅢ NP 可一定程度反映肝纤维化和炎症的程度,间接反映肝脏胶原的合成代谢^[6]。CⅣ反映早期肝硬化,可较灵敏的反映肝纤维化的进程。此外,LN 基底膜中特有的非胶原性糖蛋白,是晚期肝纤维化的有力指标^[7]。本研究利用化学发光法对慢乙肝感染者肝纤维化血清标志物进行检测,研究结果显示:

HA 在所有临床类型中数值均高于正常,且最高为乙型肝炎肝硬化组,部分患者虽为慢性携带状态,但 HA 仍高于正常,与 Salles 等^[8] 研究结果一致,邵健等^[9] 也报道 HBV 携带者血清 HA、PCⅢ 水平显著高于健康对照组(*P*<0.01);本研究中 PⅢ NP、CⅣ 均以 HBeAg(+)CHB 组最高,提示两者与肝炎以及肝纤维化密切相关,与孙亚琴等^[10] 的研究结果一致。本文结果显示血清 LN、HA、CⅣ、PⅢ NP 水平高低与血清 HBV-DNA 载量高低无关。由此提示,肝纤维化的发生可能与入侵机体的 HBV 的数量及病毒复制能力的强弱无关。黄飞等^[7] 的研究显示肝纤维化指标 HA、PCⅢ、CⅣ 和 LN 的血清浓度越高,发生肝硬化的可能性越大,要对四项指标综合分析,才能更准确的判断肝纤维化程度^[11]。

依据慢性乙型肝炎自然史分期,本研究中 CⅣ 和 PCⅢ 均值在免疫清除期最高,其次为再活动期,免疫耐受期;HA 和 LN 二项指标均值在再活动期时最高,其次为清除期,免疫耐受期;HA 在低复制期均值仍高于正常值,所以此类患者应尽早开始抗肝纤维化治疗^[12]。本组进一步分析了 HBV-DNA 与四项肝纤维化指标的相关性,发现 CⅣ 与 HBV-DNA 存在明显的负相关关系,且差异显著(*r*=−0.145,*P*=(下转第 1858 页))

者由大三阳转为小三阳,更趋向 e 抗原阴性。两组在 HBsAg>250 IU/mL 且 HBeAg>1S/CO 中,重叠感染组阳性率明显低于单纯 HBV 组。本文从定性和定量的角度充分证明 HDV 感染后 HBV 病毒复制受到抑制,这与颜卫荣^[12]报道的一致。

根据病程长短,丁型肝炎分为急性和慢性,其中,急性肝炎分为联合感染和重叠感染。前者指同时感染同一人,HBcAb-IgM 可呈阳性,后者指在 HBV 的基础上感染 HDV。慢性 HDV 多由重叠感染发展而来,因为联合感染和重叠感染的预后有别,所以如何区别很关键,除了临床症状、体征等以外,另一个重要指标就是 HBcAb-IgM,如果急性期 HBcAb-IgM 阳性,则判断为联合感染,反之,为重叠感染。本文重叠感染的病例大多数为慢性 HBV 合并 HDV,HBcAb-IgM 在重叠感染中的阳性率明显高于单纯 HBV,说明可能是重叠感染时慢性肝炎患者更容易病情加重反复有关,具体原因还有待讨论。

参考文献

[1] 雷祖才,宋清林.我国九个地区丁型肝炎病毒感染状况及其与乙型肝炎[J].中华实验和临床病毒学杂志,1995,9(1):25-28.

[2] 吴志德,周沛林.丁型肝炎病毒感染标志物在乙型肝炎病毒感染者中的检测研究[J].中华医院感染学杂志,2013,23(13):3294-3295

[3] Rosina F,Saracco G,Rizzetto M. Risk of post-transfusion infection with the hepatitis delta virus: A multicenter study[J]. New England Journal of Medicine.1985,312(23):1488-1691.

[4] 于君,王麟士. HBsAg 阴性及 HBVM 阴性肝炎发生 HDV 感染的探讨[J].河北医学院学报,1995,16(3):131-133.

(上接第 1855 页)

0.017),提示 CⅣ与 HBV-DNA 有一定相关性,可以间接反映肝损害程度以及病毒复制水平。病毒不同水平复制状态下血清肝纤维化指标间差异没有显著性,说明病毒复制程度与肝纤维化程度不是一致的,也就是说病毒复制程度越高肝脏的纤维化程度不一定就越高。可能的原因有二:其一,病毒复制不是病理损伤的唯一因素,还应考虑机体的免疫病理因素,病毒的持续存在及复制只是机体免疫损伤的启动因子;其二,病毒复制与肝纤维化反映了疾病过程和发病机制的不同阶段,比如在免疫耐受期,病毒复制活跃但肝脏损伤不明显,而在免疫清除期,肝脏炎症活动严重,部分病毒被清除,可血清 HBV-DNA 水平却不高,与本研究结果一致。

本文结果表明兰州地区 HBV 感染者在 HBV-DNA 低复制期 HA 高于正常值的患者应尽早开始抗肝纤维化治疗。通过探讨兰州地区慢乙肝患者肝纤维化四项血清学指标水平和 HBV-DNA 数值特点,说明慢性乙型肝炎患者在抗病毒治疗的过程中也应加强抗纤维化的治疗。

参考文献

[1] Kim SU,Seo YS,Cheong JY,et al. Fibrosis Measurement by Fibroscan in Patients with Chronic Hepatitis B[J]. AP&T,2010,32(3):498-505.

[2] 郭纯.肝纤维化患者临床检验血清学检测指标分析[J].中国当代医药,2011,9(27):18.

[3] 罗国庆,王康敏,蔡亚君,等. HBeAg 阴性乙型肝炎病毒携带者血

[5] 许正锯,王崇国.丁型肝炎病毒单独感染一例[J].中华传染病杂志,2000,18(2):113-115.

[6] Liaw YF,Dong JT,Chiu KW,et al. Why most patients with hepatitis delta virus infection are seronegative for hepatitis B e antigen: A prospective controlled study[J]. Hepatol, 1991, 12(1): 106-109.

[7] 顾小红,李奇芬,王宇明. 丁型肝炎病人肝组织 HDAg 与 HBsAg/HBeAg 和 HBV-DNA 表达及关系[J]. 第三军医大学学报,2000,22(3):227-230.

[8] Ho E,Deltenre P,Nkuize M,et al. Coinfection of hepatitis B and hepatitis delta virus in Belgium a multicenter BASL study: Prospective epidemiology and comparison with HBV mono-infection[J]. J Med Virol,2013 85(9):1513-1517.

[9] 张建良,骆成榆,韩妙通,等. 乙丁型肝炎病毒重叠感时 HDV 与 HBV-DNA 定量的相关性研究[J]. 中西医结合肝病杂志,1999,9(3):10-11.

[10] Romeo R, Foglieni B, Casazza G, et al. High Serum Levels of HDV RNA Are Predictors of Cirrhosis and Liver Cancer in Patients with Chronic Hepatitis Delta[J]. PloS one, 2014, 9(3): e92062.

[11] 方晔,徐小燕,吴春萍. 乙肝重叠丁肝感染对乙肝患者血清标志物模式的影响初探[J]. 实用医技杂志,2004,11(8):1570-1571.

[12] 颜卫荣. 丁型肝炎病毒与乙型肝炎病毒感染关系的探讨[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(12):2929-2931.

(收稿日期:2014-01-08)

清 HBV-DNA 水平与肝纤维化指标相关性研究[J]. 实用肝脏病杂志,2008,11(5):317-318.

[4] 中华医学会肝病学分会,感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.

[5] 邵祥强,肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2011,3(5):268-274.

[6] 张红春,吴月平,韩刚,等. 慢性 HBV 感染患者治疗前后外周血 HBV 特异 CTL、HBV-DNA、ALT 比较[J]. 临床检验医学,2013,31(3):226-228.

[7] 黄飞,倪正平. 血清肝纤维化指标联合测定在肝病中的临床价值[J]. 医学信息,2012,25(3):143-144.

[8] Salles N,Dussarat P,Foucher J,et al. Non-invasive evaluation of liver fibrosis by transient elastography and biochemical markers in elderly inpatients[J]. Gastroenterol Clin Biol, 2009, 2(33): 126-132.

[9] 邵健,董翠英. HBV 携带者血清 HA、PCⅢ、CⅣ、LN 水平分析[J]. 放射免疫学杂志,2005,18(5):371-372.

[10] 孙亚琴,李东红,张崇芳,等. 病毒性肝炎患者血清中肝纤维化标志物的联合测定[J]. 中国实验诊断学,2008,22(8):1022-1023.

[11] 李杰,陈茂伟,周怡,等. 早期肝纤维化外周血清标志物筛选的初步研究[J]. 内科,2011,1(5):9-11.

[12] 岳晓粉,陆伟,侯伟,等. 肝脏炎症及胆红素对 Fibro Scan 诊断慢乙肝肝纤维化的影响[J]. 天津医药,2013,5(3):426-429.

(收稿日期:2014-02-11)