

• 临床检验研究论著 •

慢性乙型肝炎患者血清诱导型一氧化氮合酶和超氧化物歧化酶检测的临床意义

沈云峰, 张洪波, 吴 瑶
(武汉市第六医院检验科, 湖北武汉 430015)

摘 要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者血清中乙型肝炎病毒 DNA(HBV-DNA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)浓度与一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和超氧化物歧化酶(SOD)水平的相关性。方法 选取轻度(24 例)、中度(30 例)、重度(18 例)慢性乙型肝炎患者和健康体检者(30 例)分别设为 A、B、C、D 组,运用实时荧光定量 PCR 技术和化学酶分析法检测血清 HBV-DNA、ALT、AST、NO、iNOS 和 SOD 水平。结果 D 组与 A、B、C 组之间的 ALT、AST、NO、iNOS 和 SOD 水平存在显著性差异($P<0.05$)。ALT 水平与 NO、iNOS 水平呈正相关(r 分别为 0.487、0.521, $P<0.05$),与 SOD 水平呈负相关($r=-0.574$, $P<0.05$)。AST 水平与 NO、iNOS 水平呈正相关(r 分别为 0.453、0.545, $P<0.05$),与 SOD 水平呈负相关($r=-0.484$, $P<0.05$)。结论 在慢性乙型肝炎患者中,随着 ALT 和 AST 水平升高,NO 和 iNOS 水平也升高,SOD 水平下降,表明与肝细胞受损有关。

关键词:慢性乙型肝炎; HBV-DNA; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 超氧化物歧化酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)22-3055-03

Clinical significance of the detection of serum iNOS and SOD in patients with chronic hepatitis B

Shen Yunfeng, Zhang Hongbo, Wu Yao

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan No. 6 Hospital, Wuhan, Hubei 430015, China)

Abstract:Objective To explore the relationship between the HBV-DNA, ALT, AST and NO, iNOS, SOD levels in serum of patients with chronic hepatitis B(CHB). **Methods** 24 patients with mild CHB, 30 patients with moderate CHB, 18 patients with severe CHB and 30 healthy individuals were selected and set in group A, B, C and D, respectively. The serum levels of HBV-DNA, ALT, AST, NO, iNOS, and SOD were detected by FQ-PCR and chemical analysis respectively. **Results** There were significant difference in the levels of ALT, AST, NO, iNOS and SOD between group D and group A, B and C ($P<0.05$). The serum level of ALT was positive relative to the levels of NO and iNOS($r=0.487, 0.521, P<0.05$), and was negative relative to the level of SOD($r=-0.574, P<0.05$). The serum level of AST was positive relative to the levels of NO and iNOS($r=0.453, 0.545, P<0.05$), and was negative relative to the level of SOD($r=-0.484, P<0.05$). **Conclusion** With the increase of ALT and AST levels, the levels of NO and iNOS increase, and the level of SOD decreases simultaneously in CHB patients. It is suggested hepatocellular injury.

Key words:chronic hepatitis B; HBV-DNA; NO; induced nitric oxide syntheses; superoxide dismutase

在我国乙型肝炎病毒(HBV)的感染率和乙型肝炎的发病率较高,并且 HBV 在体内增殖和致病机制复杂,除对肝细胞有直接损害作用外,还能诱导多种细胞因子和信息分子参与免疫病理损伤,并容易导致慢性迁延不愈。作为信息分子的一氧化氮(NO)和抗氧化剂的超氧化物歧化酶(SOD)参与了多种疾病的调节,它们在血清中水平的高低对于疾病的发生、发展起着一定作用。本文旨在初步探讨不同程度的慢性乙型肝炎患者血清中 HBV-DNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)浓度与 NO、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 SOD 水平的相关性,以探讨它们与 HBV 损伤肝脏细胞的相互关系,为观察、监测和治疗乙型肝炎提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为本院消化科和传染科就诊慢性乙型肝炎患者,其中轻度 24 例、中度 30 例、重度 18 例,平均(44 ± 18)岁,诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南 2010 版》^[1],并排除了甲、丙、丁、戊型肝炎病毒的重叠感染。对照组为 30 例健康体检者,平均(42 ± 8)岁。

1.2 仪器与试剂 按常规方法抽取患者静脉血,尽快分离出

血清,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存待测。HBV-DNA 载量的检测采用荧光定量 PCR 技术,检测试剂盒由上海复星生物工程股份有限公司提供,实验仪器为上海宏石公司的 SLAN 实时荧光 PCR 检测仪。NO、iNOS、SOD 试剂盒由南京聚力生物医学工程研究所提供,方法为化学比色法。ALT、AST 试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供,方法为连续监测法。检测仪器均为西门子公司出产的全自动生化分析仪 ADVIA2400。

1.3 方法 所有慢性乙型肝炎患者病例按标准分为轻度、中度、重度。具体标准为^[2]:(1)轻度指临床症状、体征轻微或缺如,肝功能指标仅 1 或 2 项轻度异常;(2)中度指症状、体征、实验室检查居于轻度和重度之间;(3)重度指有明显或持续的肝炎症状,如乏力、食欲缺乏、腹胀、尿黄、便溏等,伴有肝病面容、肝掌、蜘蛛痣、脾大并排除其他原因,且无门脉高压症者,实验室检查 ALT 和(或)AST 反复或持续升高,清蛋白降低或 A/G 比值异常、丙种球蛋白明显升高。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行统计分析,计量资料符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验;应用 Pearson 相关

比较血清 ALT 和 AST 的水平与 NO、iNOS 和 SOD 水平的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 HBV-DNA、NO、iNOS、SOD、ALT 和 AST 水平的

表 1 4 组 HBV-DNA、NO、iNOS、SOD、ALT 和 AST 的水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HBV-DNA ($\times 10^3$ copy/mL)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	iNOS (U/mL)	SOD (nU/mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
A 组	24	4.36 $\pm$ 1.36 Δ	48.5 $\pm$ 11.3 Δ	16.5 $\pm$ 5.4 Δ	89.6 $\pm$ 10.9 Δ	45.0 $\pm$ 10.0 Δ	55.0 $\pm$ 11.0 Δ
B 组	30	4.85 $\pm$ 1.47 Δ	108.5 $\pm$ 10.5 Δ	28.6 $\pm$ 10.9 Δ	78.7 $\pm$ 9.8 Δ	75.0 $\pm$ 12.0 Δ	78.0 $\pm$ 14.0 Δ
C 组	18	5.13 $\pm$ 1.52 Δ	138.5 $\pm$ 20.3 Δ	36.7 $\pm$ 9.6 Δ	63.7 $\pm$ 10.2 Δ	175.0 $\pm$ 39.0 Δ	186.0 $\pm$ 38.0 Δ
D 组	30	<1.00	33.5 $\pm$ 9.75	10.3 $\pm$ 3.7	103.5 $\pm$ 15.7	25.0 $\pm$ 9.0	19.0 $\pm$ 10.0

Δ : $P<0.05$,与 D 组比较。

2.2 相关分析结果 HBV-DNA 水平(对数值)与 NO、iNOS 和 SOD 水平无相关性($r=0.127,0.156,-0.137,P>0.05$)。ALT 水平与 NO、iNOS 水平呈正相关($r=0.487,0.521,P<0.05$),与 SOD 水平呈负相关($r=-0.574,P<0.05$),AST 水平与 NO、iNOS 水平呈正相关($r=0.453,r=0.545,P<0.05$),与 SOD 水平呈负相关($r=-0.484,P<0.05$),结果见表 2。

表 2 慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA、ALT 和 AST 与 NO、iNOS、SOD 的相关性分析(r)

指标	NO	iNOS	SOD	<i>P</i>
ALT	0.487	0.521	-0.574	<0.05
AST	0.453	0.545	-0.484	<0.05

3 讨 论

机体复杂的生命活动依赖于带有化学信号的特定化学物质即信息分子来完成各种生命信息的准确传导。NO 是作为气体信息分子的一种,是一种难溶于水的脂溶性气体,具有不配对电子,是一种自由基,由 L-精氨酸经 NO 合酶催化而生成的,是体内产生的最强的舒张血管因子,主要通过刺激鸟苷酸环化酶,使细胞内 Ca^{2+} 浓度增高,影响 Na^{+} - Ca^{2+} 交换;且调节细胞活动,参与多种疾病的病理生理过程,与病毒性肝炎的病情密切相关^[3-5]。NOS 是合成 NO 的唯一限速酶,现已克隆出 3 种 NOS 基因,Ⅰ型为结构型(cNOS),Ⅱ型为诱导型(iNOS),Ⅲ型为内皮细胞型(eNOS)。内源性 NO 由 NOS 催化左旋精氨酸末端胍基中的氮原子结合氧分子形成^[6]。肝脏作为人体代谢的重要器官也能合成 NO,且存在 NOS 酶,能释放少量 NO,维持血管正常舒张,肝脏是体内 NO 的重要来源之一。肝脏中的 NOS 为内皮型 NOS 和诱导型 NOS。前者存在于肝内血管内皮及血窦内皮中;后者存在于肝细胞和枯否细胞中。在生理条件下,肝脏仅有 eNOS 表达,其产生的低水平 NO 调节肝脏灌注,防止血小板黏附及血栓形成。iNOS 在正常情况下不表达,在内毒素血症、失血性休克、缺血再灌注损伤、感染等病理状态下,iNOS 被诱导,持续产生大量 NO,影响各种肝病的病理生理过程^[7-8]。当 HBV 通过皮肤、黏膜进入机体后,HBV 不直接引起肝细胞的损害,而刺激肝枯否细胞或巨噬细胞释放出激活剂使肝细胞的 iNOS 表达,催化生成较多量的 NO,介导免疫性肝损害,抑制肝细胞蛋白合成,生成过氧化亚硝酸盐离子,产生肝细胞毒性,从而导致肝细胞破坏以及肝组

比较 将轻度、中度、重度慢性乙型肝炎患者分成 A、B、C 3 组,D 为对照组,检测各组血清中的 HBV-DNA、NO、iNOS、SOD、ALT 和 AST 的水平,进行比较,结果见表 1。

织损伤^[9-10]。

SOD,是生物体内重要的抗氧化酶,广泛分布于各种生物体内,如动物,植物,微生物等。SOD 具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基(OFR)的首要物质。SOD 是机体内源性物质,广泛存在于人体真核细胞和体液中,含有金属离子的酶蛋白,抗氧化能力最大,为需氧组织生存所必需,它能快速清除 O_2^- ,减少 O_2^- 触发其他活性氧,特异清除 OFR,防御 OFR 对细胞的损伤^[11]。自由基是机体正常代谢产物,超氧自由基是其中一种重要的自由基,可诱导细胞分裂,调节正常生理功能,也可导致细胞凋亡。SOD 能催化超氧自由基和氢离子生成氧分子和过氧化氢,从而清除自由基,对机体起到稳定和保护的作用^[12]。在正常情况下,自由基危害不大,在慢性乙型病毒性肝炎发展过程中,氧化应激是一种重要的影响因素。一方面自由基产生过多或机体抗氧化防御作用减弱,SOD 水平减少,酶活性降低,抗氧化能力下降,打破了机体正常氧化还原动态平衡,产生的过多自由基不能被有效地清除,从而导致线粒体氧化性损伤,造成细胞凋亡^[13-14];另一方面 NO 的氧化产物亚硝酸盐与过氧化氢共存时,在过氧化物酶的催化下,活性氧容易与 NO 结合生成 NO_2 及 ONOO^- 等物质,直接损伤肝细胞^[15]。因此,通过测定 iNOS 和 SOD 的水平,可以间接反映体内细胞受氧自由基损害的程度。

本文研究显示轻、中、重度慢性乙型肝炎患者血清 NO 水平、iNOS 显著高于对照组,SOD 显著低于对照组;并且不同程度的慢性乙型肝炎患者,随着 ALT 和 AST 的水平升高,其血清内 NO、iNOS 的水平相应升高,SOD 的水平也相应降低。证实 HBV 感染导致肝脏发生炎症时,NO 合酶被诱导生成增多,炎症及细胞因子又可刺激巨噬细胞生成 NO,从而产生大量的 NO 和高浓度的自由基,肝细胞产生毒性作用而损伤肝细胞。本研究结果还显示,不同程度慢性乙型肝炎患者中,HBV-DNA 水平无显著性差异,而且 HBV-DNA 水平变化与 NO、iNOS 和 SOD 指标间无相关性,提示慢性乙型肝炎患者体内 NO 和 SOD 水平不受 HBV-DNA 的影响。在临床工作中,应将 NO、iNOS 和 SOD 指标作为乙型肝炎患者相对独立的检查指标,不能用 HBV-DNA 代替,与文献^[16]报道一致。

综上所述,在不同程度的慢性乙型肝炎患者中 NO、iNOS 和 SOD 水平高低的变化,与肝细胞病变程度密切相关,所以在监测慢性乙型肝炎患者血清中的 HBV-DNA、ALT 和 AST 指标的同时,连续监测患者 NO、iNOS 和 SOD 水平对了解乙型肝炎患者病情的演变、预后及治疗有一定意义。(下转第 3058 页)

液标本中, C 多糖抗原阳性率为 30. 1%(112/372)。在病例组 119 例患者中, 有 75 例 C 多糖抗原检测阳性者, 敏感率为 63. 0%; 在对照组 253 例患者中, 有 37 例 C 多糖抗原检测阳性者, 特异度为 85. 3%。病例组亚组分析发现, 在 A 组 25 例确诊为肺炎链球菌感染的患者中, 有 21 例 C 多糖抗原检测阳性者, 阳性率为 84. 0%, 另外 4 例 C 多糖抗原检测阴性者, 血培养呈阳性; 在 B 组 94 例疑似肺炎链球菌性肺炎患者中, 有 54 例 C 多糖抗原检测阳性者, 阳性率 57. 4%。

3 讨 论

肺炎链球菌性肺炎的临床诊断依据主要包括临床表现、下呼吸道标本细菌培养结果、降钙素原或者 C 反应蛋白检测结果^[5]。肺炎链球菌引起的感染尤其是肺炎的明确诊断比例有所下降, 可能与误诊为其他病原体、患者入院前服用抗菌药物以及肺炎链球菌疫苗的使用相关^[5]。C 多糖抗原检测可提高肺炎链球菌感染的诊断阳性率^[6]。

本研究结果显示, 尿液 C 多糖抗原试剂盒的特异度较好, 与常见尿路感染病原菌无交叉反应, 在 A 组确诊肺炎链球菌感染患者中的 C 多糖抗原阳性率明显高于 B 组疑似肺炎链球菌感染患者, 与 Selickman 等^[7]报道的结果一致。A 组中有 4 例患者血培养呈阳性, 但 C 多糖抗原却为阴性, 可能与 C 多糖抗原浓度较低有关, 也可能是血液中 C 多糖抗原与抗体形成复合物影响其在尿液中的浓度^[8]。在 B 组中, 有 42. 6% 的患者 C 多糖抗原呈阴性, 可能是由于分离肺炎链球菌是定植菌而非真正的感染病原菌, 也可能是由于该类患者在入院治疗前服用过抗菌药物。对照组有 14. 7% 的假阳性率, 可能是由于该类患者肺炎链球菌感染症状不典型, 常规培养方法未检出真正的病原体, 只有少量肺炎链球菌混合感染, 从而导致 C 多糖抗原试验结果阳性。Ploton 等^[9]发现在 15 例 C 多糖抗原阳性、有肺炎症状的患者中, 痰标本培养结果为阴性, 但 PCR 检测肺炎链球菌呈阳性。Klugman 等^[1]发现 C 多糖抗原假阳性结果可能与缓症链球菌和口腔链球菌有交叉反应, 但此类菌很少出现在尿液中。

总之, 尿液 C 多糖抗原可以辅助临床建立可靠的肺炎链

球菌感染诊断, 尽量避免不恰当的经验性治疗, 合理使用抗菌药物。

参考文献

[1] Klugman KP, Madhi SA, Albrich WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(Suppl 3): 202-206.

[2] 颜善活, 孙雷, 符可鹏, 等. Taqman 实时荧光定量 PCR 检测肺炎链球菌[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 140-141.

[3] 李红娟, 王沛. 支气管肺泡灌洗液中肺炎链球菌抗原快速检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(13): 1752-1753.

[4] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 651-655.

[5] Monno R, Fumarola L, Mercadante G, et al. Evaluation of a rapid test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(2): 127-131.

[6] Matta M, Kernéis S, Day N, et al. Do clinicians consider the results of the BinaxNOW *Streptococcus pneumonia* urinary antigen test when adapting antibiotic regimens for pneumonia patients[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(9): 1389-1393.

[7] Selickman J, Paxos M, File TJ, et al. Performance measure of urinary antigen in patients with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 67(2): 129-133.

[8] Zalacain R, Capelastegui A, Ruiz LA, et al. *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine: Diagnostic usefulness and impact on outcome of bacteraemic pneumococcal pneumonia in a large series of adult patients[J]. Respirology, 2014, 19(6): 936-943.

[9] Ploton C, Freydiere AM, Benito Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* thoracic empyema in children: rapid diagnosis by using the Binax NOW immunochromatographic membrane test in pleural fluids[J]. Pathol Biol (Paris), 2006, 54(8/9): 498-501.

(收稿日期: 2014-04-16)

(上接第 3056 页)

参考文献

[1] 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]. 中华内科杂志, 2011, 50(2): 168-179.

[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2004, 9(1): 62-70.

[3] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L, et al. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 1019-1025.

[4] 范桂玲, 朱成宝, 赵秀红. iNOS 在乙型肝炎肝硬化组织中的表达及与肝细胞增殖凋亡的关系[J]. 山东医药, 2007, 47(23): 63-64.

[5] 谭波涛. 一氧化氮在病毒性肝炎病理生理过程中的作用[J]. 现代预防医学, 2008, 35(20): 4079-4080.

[6] 洗珍勇, 郑青. 慢性肝病患者血清一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平检测[J]. 中国热带医学, 2011, 11(10): 1197-1198.

[7] 钟慈孙, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学[M]. 上海医科大学出版社, 1997: 27.

[8] Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(8): 1397-1406.

[9] 曲正, 杨耀炯, 曲伟, 等. 慢性乙肝和肝硬化患者血清一氧化氮水平变化的临床意义[J]. 包头医学院学报, 2007, 23(3): 251-253.

[10] 秦佑娟, 尉希清. 慢性肝炎、肝硬化患者血清一氧化氮水平及其变化规律的临床研究[J]. 中国全科医学, 2005, 8(1): 22-24.

[11] 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 氧自由基与临床[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 15-24.

[12] Vozenin-Brottons MC, Sivan V, Gault N, et al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(1): 30-42.

[13] Dikici I, Mehmetoglu I, Dikici N, et al. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-α treatment[J]. Clin Biochem, 2005, 38(12): 1141-1144.

[14] 高爱武, 孟连柱, 周蕾, 等. 慢性乙型病毒性肝炎患者血清 MnSOD 和 NT 水平的变化[J]. 疑难病杂志, 2011, 10(1): 58-59.

[15] 吴娜, 蔡光明, 何群. 氧化应激与肝脏损伤[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(29): 3310-3315.

[16] 周天彤, 何生松. 肝炎患者血清一氧化氮和一氧化氮合酶水平变化及其临床意义[J]. 临床内科杂志, 2007, 24(5): 313-315.

(收稿日期: 2014-04-10)