

• 论 著 •

# 乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 水平与肝纤维化指标的相关性分析

胡 凯, 邓 文

(景德镇第二人民医院检验科, 江西 333000)

**摘 要:**目的 分析乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒(HBV)DNA 水平与肝纤维化指标之间的相关性。方法 采用实时荧光定量 PCR 法、化学发光法分别检测乙型肝炎患者和健康体检者血清 HBV-DNA 载量和肝纤维化指标:透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原 N 端肽(PⅢNP)、层粘连蛋白(LN)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C),并统计分析 HBV-DNA 载量和肝纤维化指标的相关性。结果 血清 HBV-DNA 载量取对数值(lg)后平均水平为  $5.49 \pm 1.39$ , HA 为  $(166.95 \pm 148.20)$  ng/mL, PⅢNP 为  $(12.14 \pm 7.37)$  ng/mL, Ⅳ-C 为  $(65.29 \pm 45.48)$  ng/mL, LN 为  $(59.52 \pm 35.67)$  ng/mL。患者组肝纤维化指标与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),血清 HBV-DNA 载量只与 LN 呈正相关性( $r = 0.284, P = 0.015$ )。结论 乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 水平与多数肝纤维化指标没有直线相关关系,但乙型肝炎患者在抗病毒治疗的同时应加强抗纤维化的治疗。

**关键词:**乙型肝炎; HBV-DNA; 肝纤维化; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.017 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2015)03-0326-03

## Analysis of the relationship between serum HBV-DNA And hepatic fibrosis

Hu Kai, Deng Wen

(Department of Clinical Laboratory, Jingdezhen Second People's Hospital, Jingdezhen, Jiangxi 333000, china)

**Abstract:**Objective To analyze the relationship between serum HBV-DNA and hepatic fibrosis in patients with hepatitis B. **Methods** Serum HBV-DNA load and hepatic fibrosis hyaluronic acid (HA), Ⅲ procollagen N terminal peptide(PⅢNP), laminin (LN), Ⅳ collagen(Ⅳ-C) of 154 cases were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and chemiluminescence method. Statistical analysis of the correlation between HBV-DNA load and hepatic fibrosis indicator was performed. **Results** The data of HBV-DNA load after taking lg value was  $5.49 \pm 1.39$ ; The serum concentration of hepatic fibrosis HA was  $(166.95 \pm 148.20)$  ng/mL, PⅢNP was  $(12.14 \pm 7.37)$  ng/mL, Ⅳ-C was  $(65.29 \pm 45.48)$  ng/mL, LN was  $(59.52 \pm 35.67)$  ng/mL. The difference between experimental group and control group in hepatic fibrosis was significant( $P < 0.05$ ). Serum HBV-DNA only correlated with LN( $r = 0.284, P = 0.015$ ). **Conclusion** There is no significant correlation between serum HBV-DNA and hepatic fibrosis in hepatitis B patients. Anti-fibrosis treatment should also be strengthened for hepatitis B patients in the course of antiviral treatment.

**Key words:** hepatitis B; HBV-DNA; hepatic fibrosis; relationship

中国是乙型肝炎病毒(HBV)感染大国,乙型肝炎在长期病毒感染的慢性发展中部分会演变为肝硬化,进一步发展形成肝癌。众多研究资料表明,肝纤维化是慢性乙型肝炎向肝硬化发展的必经之路<sup>[1]</sup>,如能早期发现并及时合理治疗,使病情得到有效的控制,尚有逆转的可能。肝纤维化指标血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、层粘连蛋白(LN)能反映肝纤维化及肝细胞实质性损伤程度,有利于全面反映乙型肝炎的诊断、肝纤维化的发展变化及治疗效果的监测;血清 HBV-DNA 水平是乙型肝炎患者 HBV 感染的直接证据,也是反映体内 HBV 复制增殖水平的可靠指标和评估临床治疗效果的重要依据<sup>[2]</sup>。因此,笔者对血清 HBV-DNA 与肝纤维化指标之间的相关性进行了分析,旨在为乙型肝炎的临床诊断、治疗和预后观察等提供参考依据,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 7 月至 2013 年 4 月于景德镇第二人民医院就诊的门诊及住院乙型肝炎患者 99 例作为患者组,其中男 54 例、女 45 例,平均年龄为  $(50.4 \pm 14.5)$  岁,均由感染科医生以 2000 年 9 月西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的病毒性肝炎防治方案中的诊断标准<sup>[3]</sup>经综合分析后确诊,排除其他脏器有急慢性病史的患者。根据 HBV-DNA 水平将患者分为 HBV-DNA  $< 10^3$  IU/mL 组( $n =$

26), HBV-DNA:  $10^3 \sim < 10^6$  IU/mL 组( $n = 47$ ), HBV-DNA  $\geq 10^6$  IU/mL 组( $n = 26$ )组。另外,选取同期于景德镇第二人民医院进行健康体检且合格者 55 例作为对照组(HBV-DNA  $< 10^3$  IU/mL),男 29 例、女 26 例,平均年龄  $(40.4 \pm 11.7)$  岁,均无急慢性肝病及其他脏器急慢性病史。

**1.2 方法** 上述人群于清晨空腹抽取静脉血 5 mL,离心分离后取血清于  $-20^\circ\text{C}$  保存待检。采用实时荧光定量 PCR 法检测血清 HBV-DNA 载量,仪器为美国 ABI 公司 PE-5700 自动荧光定量 PCR 仪,试剂由广州中山医科大学达安基因诊断中心提供。采用化学发光法检测反映肝纤维化程度的指标,仪器为郑州安图生物工程有限公司 LUMO 化学发光仪,试剂由郑州安图生物工程有限公司提供。操作严格按照仪器标准化操作规程和试剂说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件包进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用成组设计的双侧  $t$  检验,多组均数比较采用单因素方差分析,相关性分析采用直线相关系数  $r$ 。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1 2 组间检测指标总体水平的比较** 将 HBV-DNA 检测的原始数据进行对数处理,反映肝纤维化程度的指标 HA、PⅢNP、LN、Ⅳ-C 的水平见表 1,患者组与对照组比较差异有统计

学意义( $P<0.05$ )。

2.2 不同 HBV-DNA 载量的患者间 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 水平的比较 不同 HBV-DNA 载量患者组间 HA、PⅢ NP、LN、

Ⅳ-C 水平进行比较三组同时比较,经方差分析,除Ⅳ-C 外,其余各项指标的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),两两比较中见表 2。

表 1 2 组间 HBV-DNA 载量、HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 水平的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	HBV-DNA(对数值)	HA(ng/mL)	PⅢ NP(ng/mL)	LN(ng/mL)	Ⅳ-C(ng/mL)
患者组	99	5.49±1.39	166.95±148.20	12.14±7.37	59.52±35.67	65.29±45.48
对照组	55	1.23±0.02	60.20±25.85	8.34±2.80	32.12±19.70	34.76±18.08
<i>t</i>		6.663	7.883	5.152	8.024	7.485
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 患者组组间 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 水平的比较( $\bar{x}\pm s$ )

HBV-DNA 水平分组	<i>n</i>	HA(ng/mL)	PⅢ NP(ng/mL)	LN (ng/mL)	Ⅳ-C(ng/mL)
<10 <sup>3</sup> IU/mL 组	26	155.22±59.42	16.46±5.71 <sup>△</sup>	75.99±36.96 <sup>#</sup>	66.35±28.37
10 <sup>3</sup> ~<10 <sup>6</sup> IU/mL 组	47	242.50±184.14 <sup>*</sup>	12.83±6.21	75.92±39.42 <sup>#</sup>	103.21±38.56
≥10 <sup>6</sup> IU/mL 组	26	267.95±266.12 <sup>*</sup>	18.61±11.64 <sup>△</sup>	105.55±56.16	80.32±38.42
<i>F</i>		4.169	3.764	3.956	1.003
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

\*:  $P<0.05$ ,与<10<sup>3</sup> IU/mL 组比较;<sup>△</sup>:  $P<0.05$ ,与 10<sup>3</sup>~<10<sup>6</sup> IU/mL 组比较;<sup>#</sup>:  $P<0.05$ ,与≥10<sup>6</sup> IU/mL 组比较。

2.3 血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 的相关性

血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 的相关系数  $r$  见表 3,HBV-DNA 与 LN 呈正相关( $r=0.284,P<0.05$ ),HBV-DNA 载量与 LN 水平存在直线相关关系。血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、Ⅳ-C 不存在直线相关关系。

表 3 血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 的相关性分析

统计值	HA	PⅢ NP	LN	Ⅳ-C
<i>r</i>	0.149	0.327	0.284	0.214
<i>P</i>	0.208	0.060	0.015	0.170

2.4 血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 散点图

血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、LN、Ⅳ-C 相关性分析的散点图见附图 1~4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。附图 1、2、4 表明血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、Ⅳ-C 散点图近似圆形,血清 HBV-DNA 载量与 HA、PⅢ NP、Ⅳ-C 水平间不存在直线相关关系。图 3 表明血清 HBV-DNA 载量与 LN 散点图趋近椭圆形,两者间存在直线相关关系,但不是很明显。

3 讨 论

肝纤维化表现为肝内结缔组织增生和肝脏弥漫性,过量的细胞外基质沉积,是对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应,将改变正常肝组织的结构和功能<sup>[4]</sup>。HA、PⅢ NP、LN 及Ⅳ-C 均为细胞外基质,PⅢ NP、Ⅳ-C 是参与组成胶原原纤维的成分,HA 及基质成分 LN 在肝纤维化的发展过程中均有明显增加。本研究中,99 例乙型肝炎患者血清肝纤维化指标与对照组比较有明显的增高。有研究表明,HA、PⅢ NP、LN 及Ⅳ-C 水平变化可以密切反映肝纤维化的活动水平及肝损伤程度<sup>[5]</sup>。

HBV 感染慢性化是导致肝纤维化的重要原因,病毒的持续复制增殖可以是肝纤维化的诱因,然而,HBV-DNA 复制水平降低并不能阻止肝纤维化的持续进行,因为机体通过免疫系

统对病毒的清除,同样也引发了机体的免疫病理反应,导致肝细胞损伤、破坏,随之发生的是肝脏组织的修复及纤维化<sup>[6]</sup>。本研究显示:血清 HBV-DNA 水平与 HA、PⅢ NP、Ⅳ-C 并无明显相关性,与蔡文品等<sup>[7]</sup>的报道结果相一致。而血清 HBV-DNA 水平与 LN 存在直线相关性,但不明显,与蔡文品等<sup>[7]</sup>的报道结果不符,可能与实验条件或样本量有关,还有待于进一步实验分析。

HBV-DNA 水平高低与肝纤维化指标水平的相关性并不十分明显。其原因可能是:乙型肝炎发病机制很复杂,病毒复制不是病理损伤的唯一原因,还应考虑机体自身免疫因素、肝功能以及肝炎标志物的转变等。病毒复制和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。蔡文品等<sup>[7]</sup>指出,某些因素导致肝星状细胞活化及肝脏细胞外基质合成增加和降解减少从而引起细胞外基质过度沉积是肝纤维化的关键步骤。可见,HBV 的持续复制可能只是肝脏炎症、损伤、纤维化的始动因子,与纤维化进程无明显相关性。

HBV 所致的肝脏炎症坏死及其所致的肝纤维化是疾病进展的主要病理学基础<sup>[8]</sup>。慢性乙型肝炎治疗的最终目的是控制 HBV 的复制,诱导 HBeAg 血清转换,使肝功恢复正常,改善肝组织学,缓解症状和体征,防止向慢性化发展<sup>[9]</sup>。随着慢性乙型肝炎联合治疗临床证据的不断增加,联合治疗由抗病毒药物间的联合逐步扩展到抗病毒药物与抗纤维化药,抗病毒药物与免疫调节药物间的联合。有研究表明,经 IFN-或核苷(酸)类似物抗病毒治疗后,从肝组织病理学可见纤维化甚至肝硬化有所减轻。因此,抗病毒治疗是抗纤维化治疗的基础<sup>[10]</sup>。

通过临床治疗追踪发现,对于满足抗病毒治疗且超声提示肝组织受损的早期乙型肝炎患者,给予一定疗程的抗病毒联合抗纤维化药物后,定期检测 HbsAg 定量、ALT、HBV-DNA、肝纤维化指标均有明显降低,超声也显示肝组织稍有改善。可见,有效控制乙型肝炎患者 HBV-DNA 病毒(下转第 330 页)

荧光的细胞即转染阳性细胞占总细胞的比例),与脂质体相比,一定 N/P 比值的 PEI 转染同样具有较好转染效果。携带 VEGF165 基因的质粒转染入 293T 细胞,培养后转染细胞可表达 VEGF165 相应蛋白,并分泌入细胞上清中,使得细胞上清中 VEGF165 的含量增加,增加程度与荧光结果相一致。本研究显示,加入适当 N/P 比值的 PEI 后,两种方法转染后细胞上清液中的 VEGF165 水平与未转染组比较,均显著提高,再次验证了 PEI 与脂质体转染具有较高的转染效率,且转染效果相似。

目前,PEI 及其相关复合试剂广泛应用于医学的各个领域<sup>[7]</sup>,Liang 等<sup>[8]</sup>认为 PEI 与普流尼克通过表面交联可以达到更好的转染效果;Shao 等<sup>[9]</sup>学者则利用 PEI 包裹病毒样颗粒介导 isRNA 用于治疗乳腺癌研究;Liu 等<sup>[10]</sup>利用 PEI-PEG 将 DNA 及药物特异性导入肿瘤细胞;傅晓源等<sup>[11]</sup>制备了 PEI 载基因纳米颗粒并研究其理化性质及体外活性。本文的研究也提示,在适合的比例下 PEI 可以替代脂质体,作为新型有效的转染试剂用于实验研究中。

PEI 作为新型转染试剂,其细胞毒性一定程度上制约了其的应用,因此,有更多的研究者提出对 PEI 的加入量加以控制(N/P 比值)或对其进行重新构建,以减少其对细胞活性的影响<sup>[12]</sup>。

综上所述,通过比较阳性聚合物 PEI 与脂质体 2000 两种转染试剂分别介导 VEGF165 质粒的转染效率,说明 PEI 在适当的 N/P 比值时,可以达到与脂质体同样或更好的转染效果,如将 PEI 加以改造,构建新的复合转染试剂,可有效降低 PEI 的生物毒性,使其应用更为广泛。由于 PEI 较脂质体而言具有转染效率高且经济实惠的优势,提示其可作为新型的转染试剂广泛应用于医疗领域。

参考文献

[1] Yan X, Zhang Y, Zhang H, et al. Amphiphilic polyethylenimine (PEI) as highly efficient non-viral gene carrier[J]. Org Biomol Chem, 2014, 12(12): 1975-1982.

[2] 刘涛,马栋,王蓉,等. 叶酸靶向 PEG-PEI-Alg-氧化铁磁性纳米基

因载体的构建及鉴定[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(19): 12-17.

[3] 陈智毅,谢明星,王新房,等. 超声辐照联合 PEI 增强体外基因转染的实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2009, 25(1): 1-4.

[4] Chen XA, Zhang LJ, He ZJ, et al. Plasmid-encapsulated polyethylene glycol-grafted polyethylenimine nanoparticles for gene delivery into rat mesenchymal stem cells[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6(6): 843-853.

[5] Opanasopit P, Paecharoenchai O, Rojanarata T, et al. Type and composition of surfactants mediating gene transfection of polyethylenimine-coated liposomes[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6(7): 975-983.

[6] 韩伟,胡勤刚,王志勇,等. 两种转染方法介导质粒转染人舌鳞癌细胞的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2008, 24(4): 575-578.

[7] 彭健,刘桦,刘路,等. PEG-PEI/Fe3O4 纳米磁流体-TK 对裸鼠移植性肝癌细胞靶向杀伤作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(9): 1162-1166.

[8] Liang W, Gong H, Yin D, et al. High-molecular-weight polyethylenimine conjugated pluronic for gene transfer agents[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2011, 59(9): 1094-1101.

[9] Shao W, Paul A, Abbasi S, et al. A novel polyethylenimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast Cancer therapy: preparation and in vitro analysis[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7(9): 1575-1586.

[10] Liu C, Liu F, Feng L, et al. The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles[J]. Biomaterials, 2013, 34(10): 2547-2564.

[11] 傅晓源,张浩伟,谢灏,等. 聚乙烯亚胺载基因纳米颗粒的制备及其相关特性的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(24): 3570-3572.

[12] Huang X, Hartley AV, Yin Y, et al. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications[J]. J Virol Methods, 2013, 193(2): 270-277.

(收稿日期:2014-12-08)

(上接第 327 页)

载量可能是控制肝纤维化进展的重要因素<sup>[11]</sup>,但在使用抗病毒药物抑制 HBV 复制改善患者肝功能的同时,如何尽早发现肝纤维化并及时合理地选择抗纤维化治疗,将肝纤维化在早期逆转从而阻断肝硬化的形成,是保护肝脏功能,改善乙型肝炎患者的生活质量及预后的重要手段。因此,血清 HBV-DNA 与肝纤维化指标相关性分析提示慢性乙型肝炎患者在抗病毒治疗的同时也应加强抗纤维化的治疗,对早期肝纤维化患者显得尤为重要。

参考文献

[1] 曾小辉,沙卫红,李瑜元,等. 血清肝纤维化指标对慢性肝病的临床价值[J]. 中国临床实用医学, 2010, 4(2): 87-88.

[2] 张泓. 乙型肝炎血清标志物模式及 HBV-DNA 与肝纤维化指标的关系[J]. 中国民康医学, 2009, 21(16): 1916.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华内科杂志, 2001, 40(1): 62-68.

[4] 陈洪涛,贺春民,赵翠林,等. 血清肝纤维化指标在慢性肝病中的应用研究[J]. 河南医学研究, 2003, 12(1): 28-29.

[5] 李文全,曹春晓,杨琦,等. 血清肝纤维化指标在慢性肝病中的临床分析[J]. 中国当代医药, 2009, 16(14): 50-51.

[6] 杨绍基,任红. 病毒性肝炎的发病机制与病理解剖[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 30-31.

[7] 蔡文品,赵春,吴惠洁,等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝纤维化指标的相关性[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(1): 72-73.

[8] 甘平,彭芳. 乙型肝炎治疗研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(5): 720-721.

[9] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 2010 年更新版[J]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(1): 79-100.

[10] 慢性乙型肝炎联合治疗专家委员会. 慢性乙型肝炎联合治疗专家共识[J]. 中国肝脏病杂志:电子版, 2012, 4(1): 39-46.

[11] 王远驰,黄金伟. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 病毒载量与血清肝纤维化指标变化[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(3): 222-224.

(收稿日期:2014-11-08)