

论著 · 临床研究

自身抗体对乙型肝炎病毒相关性肾炎的诊断和预测价值

耿丽娜, 张璧珠, 李宝亮

(河北北方学院附属第一医院检验科, 河北张家口 075000)

摘要:目的 通过检测乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN)患者血清中的自身抗体,分析自身抗体在 HBV-GN 中的诊断和预测价值,从而为该病的防治提供新的思路。方法 对 23 例 HBV-GN 和 25 例乙型肝炎非肾炎患者进行病例分析,并采用间接免疫荧光法和免疫印迹法分别检测患者血清抗核抗体(ANA)和抗可溶性核抗原(ENA)抗体,比较每组抗核抗体的阳性率和核型以及抗 ENA 抗体谱的阳性率和种类,并对乙型肝炎非肾炎患者进行随访。结果 HBV-GN 患者抗核抗体和抗 ENA 抗体谱阳性率显著增高,其中 ANA 核型以颗粒型为主,抗 ENA 抗体谱中 Ro-52 和 AMA-M2 居多,且自身抗体阳性的乙肝患者更易发生 HBV-GN。结论 自身抗体在乙型肝炎病毒相关性肾炎中有一定的检测价值,可以为疾病的预测和早期诊断提供新的参考指标。

关键词:乙型肝炎病毒相关性肾炎; 抗核抗体; 抗 ENA 抗体谱; 自身抗体
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.017 **中图法分类号:**R512.62;R692.3
文章编号:1673-4130(2019)09-1090-04 **文献标识码:**A

The diagnostic and predictive value of autoantibodies in hepatitis B virus associated nephritis

GENG Lina, ZHANG Bizhu, LI Baoliang

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To provide a new method for prevention and treatment of hepatitis B virus associated glomerulonephritis (HBV-GN) through detecting the serum autoantibodies in patients with HBV-GN and analyzing the diagnostic and predictive value of autoantibodies in HBV-GN. **Methods** Case analysis was performed on 23 patients with HBV-GN and 25 HBV patients without nephritis, and indirect immunofluorescence and immunoblotting were used respectively to detect antinuclear antibodies (ANA) and anti extractable nuclear antigen (ENA) antibody in serum, then the positive rate and karyotype of ANA as well as the positive rate and type of anti ENA antibody were compared in each group, then follow-up was conducted in hepatitis b patients without nephritis. **Results** The positive rate of ANA and anti ENA antibody in patients with HBV-GN increased significantly, and the karyotype of ANA was mainly granular pattern, and there were more Ro-52 and AMA-M2 in anti ENA antibody, and HBV patients with positive autoantibodies were more likely to develop into HBV-GN. **Conclusion** Autoantibodies have a certain value in HBV-GN, which can provide new reference for the prediction and early diagnosis of the diseases.

Key words: hepatitis B virus associated glomerulonephritis; antinuclear antibodies; extractable nuclear antigen; autoantibody

乙型肝炎病毒(HBV)感染在全球范围分布广泛,其中发展中国家感染率较高,据报道我国 HBV 携带率高达 10%~20%^[1]。HBV 感染除了引起肝脏病变外,还可导致全身多器官疾病,其中肾小球肾炎较为常见。1971 年,COMBES 等^[2]首次发现 HBV 感染与膜性肾病有关,掀起了国内外研究 HBV 感染与肾脏疾病关系的浪潮。直到 1989 年在我国召开的乙型肝炎病毒相关性肾炎座谈会上,正式将该病命名为乙型

肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN),是指由 HBV 直接或间接诱发的肾小球肾炎,经血清免疫学及肾活检免疫荧光所证实,并除外与肾脏疾病相关、病因明确的其他继发性肾小球肾炎(如狼疮性肾炎)的一种疾病^[3]。我国 HBV 携带者中 HBV-GN 的发生率较高,约为 6.8%~20%^[4]。已有研究报道在狼疮肾炎中自身抗体具有一定的诊断价值^[5-6],并且另有研究发现在 HBV-GN 中自身抗体有一定的增高,但尚未有研

作者简介:耿丽娜,女,初级检验师,主要从事自身免疫疾病方面的研究。
本文引用格式:耿丽娜,张璧珠,李宝亮.自身抗体对乙型肝炎病毒相关性肾炎的诊断和预测价值[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1090-1092.

究揭示自身抗体在 HBV-GN 中的诊断和预测价值。由于感染 HBV 的患者中 HBV-GN 发病率较高,目前可预测疾病的指标较少,所以本研究着眼于探索有助于预测 HBV-GN 发病的免疫学指标——自身抗体,为此病的早期诊断和预防提供有价值的信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入研究者 为 2015 年 8 月至 2017 年 7 月于河北北方学院附属第一医院首次就诊患者,分组及入选标准如下。(1)HBV-GN 组:23 例,诊断标准依据 1989 年 HBV-GN 座谈会上制定的标准^[3]。血清 HBV 抗原阳性;患肾小球肾炎,并排除狼疮性肾炎等继发性肾小球疾病;肾切片上找到 HBV 抗原。入组的所有患者临床症状和实验室诊断均未达到自身免疫病的诊断标准:首先患者病史无自身免疫病,其次患者均未表现出自身免疫病的临床症状,再次患者外周血免疫球蛋白、红细胞沉降率(ESR)和 C-反应蛋白(CRP)结果均未表现出异常,但部分患者补体水平降低,可能与形成的免疫复合物有关。(2)HBV 非 GN 组:25 例,血清乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性,经病理切片检查和血清学检测已排除相关肾小球肾炎。(3)健康对照组 25 例,血清 HBsAg 阴性,无肾小球肾炎和其他相关自身免疫性疾病的体检健康者。HBV-GN 组男 19 例、女 4 例;平均年龄 25 岁;经实验室检查所有患者血清 HBsAg 均为阳性,24 h 尿蛋白均在 3.5 g 以上,且肾组织切片中乙肝抗原(HB-sAg 或 HBcAg)阳性;病理类型显示其中膜性肾病 17 例,膜增生型肾小球肾炎 5 例,系膜增生型肾小球肾炎 1 例。HBV 非 GN 组男 19 例、女 6 例,平均年龄为 28 岁;经实验室检查所有病例血清 HBsAg 均为阳性且 24 h 尿蛋白均低于 3.5 g,肾组织切片乙肝抗原为阴性。健康组男 18 例、女 7 例,平均年龄为 26 岁;经实验室检查血清 HBsAg 均为阴性,24 h 尿蛋白均低于 3.5 g,肾组织切片乙肝抗原均为阴性。

本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者在研究开始前签署知情同意书。

1.2 主要仪器 全自动间接免疫荧光操作/酶联免疫一体机:Sprinter XL;全自动免疫印迹仪:EUROB-lotMaster II -50;荧光显微镜:EUROStar III Plus。

1.3 方法 临床上检测自身抗体有多种方法,其中最重要和最常用的是间接免疫荧光法检测抗核抗体和免疫印迹法检测抗可溶性核抗原(ENA)抗体谱。采用间接免疫荧光法检测血清抗核抗体(ANA),滴度>1:100 为阳性,具体操作步骤如下:(1)将血清样本稀释 100 倍,滴加 25 μL 稀释后样本至加样板,与载片覆有生物薄片的一面接触,室温温育 30 min;(2)用 PBS 吐温缓冲液流水冲洗载片,立即将其浸入装有 PBS 吐温缓冲液的烧杯中浸泡至少 5 min;(3)滴加 20 μL FITC 标记的抗人 IgG 至洁净的加样板,将浸泡后的载片盖在加样板上与抗人 IgG 接触,室温温育 30

min;(4)重复步骤(2);(5)滴加约 10 μL 封片介质至盖玻片,将浸泡后的载片盖在盖玻片上,显微镜下观察荧光模型。

免疫印迹法检测血清自身抗体谱,包括 nRNP、Sm、SS-A、Ro-52、SS-B、Scl-70、PM-Scl、Jo-1、CENP B、PCNA、dsDNA、核小体、组蛋白、核糖体 P 蛋白和 AMA-M2 等 14 种不同抗原的 IgG 类抗体。具体操作步骤如下:(1)将膜条放入温育槽内,加入 1.5 mL 样本缓冲液,在摇床上温育 5 min 后吸去温育槽中的液体;(2)在温育槽中加入 1.5 mL 稀释 100 倍的血清样本,在摇床上室温温育 30 min;(3)吸去槽内液体,用 1.5 mL 清洗缓冲液清洗膜条 3 次,每次 5 min;(4)在槽内加入 1.5 mL 酶结合物,摇床上室温温育 30 min;(5)重复步骤(3);(6)在槽中加入 1.5 mL 底物液,摇床上室温温育 10 min;(7)吸去槽内液体,用蒸馏水清洗膜条 3 次,每次 1 min;(8)将膜条放在结果判定模板中,风干后判断结果。

以上试剂均来自于德国欧蒙医学实验诊断有限公司,所有步骤均根据说明书严格执行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,多组计数资料比较用 χ^2 检验,疾病发生率分析用 Kaplan-Meier 法,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV-GN 组、HBV 非 GN 组及健康组间 ANA 和抗 ENA 抗体谱阳性率分析 检测 HBV-GN 组、HBV 非 GN 组及健康组血清中 ANA 和抗 ENA 抗体谱,分别对 3 组间 ANA 和抗 ENA 抗体谱阳性率进行比较。结果显示,与 HBV 非 GN 组和健康组相比,HBV-GN 组 ANA 以及抗 ENA 抗体谱阳性率均显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中 HBV-GN 组 ANA 和抗 ENA 抗体谱双阳性的样本为 8 例,HBV 非 GN 组 ANA 和抗 ENA 抗体谱双阳性的样本为 2 例,见表 1。

表 1 3 组 ANA 和抗 ENA 抗体谱阳性率分析[n(%)]			
分组	n	ANA(+)	抗 ENA 抗体谱(+)
HBV-GN 组	23	17(73.9) ^{ab}	10(43.5) ^{ab}
HBV 非 GN 组	25	7(28.0) ^b	2(8.0)
健康组	25	1(4.0)	0(0.0)
χ^2		26.718	18.384
P		<0.01	<0.01

注:HBV-GN 组与 HBV 非 GN 组比较,^a $P < 0.01$;HBV-GN 组与健康组比较,^b $P < 0.01$

2.2 ANA 核型及抗 ENA 抗体谱分析 经过分析实验数据,本文发现 HBV-GN 组 ANA 核型主要为核颗粒型(47.8%),其次为胞浆颗粒型(13.0%),抗 ENA 抗体谱主要为 Ro-52(17.5%)和 AMA-M2(17.5%);HBV 非 GN 组 ANA 同样以核颗粒型为主(16%),见

表 2。

表 3 HBV-GN 和 HBV 非 GN 组 ANA 核型和抗 ENA 抗体谱阳性率分析[n(%)]

分组	HBV-GN 组 (n=23)	HBV 非 GN 组 (n=25)
核均质型	2(8.7)	1(4.0)
核颗粒型	11(47.8)	4(16.0)
核仁型	2(8.7)	1(4.0)
核点型	1(4.3)	0(0)
胞浆颗粒型	3(13.0)	1(4.0)
SS-A	2(8.7)	1(4.0)
SS-B	1(4.3)	0(0)
nRNP	1(4.3)	0(0)
Ro-52	4(17.5)	1(4.0)
AMA-M2	4(17.5)	1(4.0)

2.3 HBV 非 GN 组自身抗体阳性更易发生 HBV-GN 为研究自身抗体与乙肝患者发生 HBV-GN 的关系,本文对 HBV-非 GN 组进行了为期 12 个月的随访,结果发现 7 例自身抗体阳性患者中有 5 例发生了 HBV-GN,而自身抗体阴性患者中无 1 例发生(图 1, $P=0.000$)。

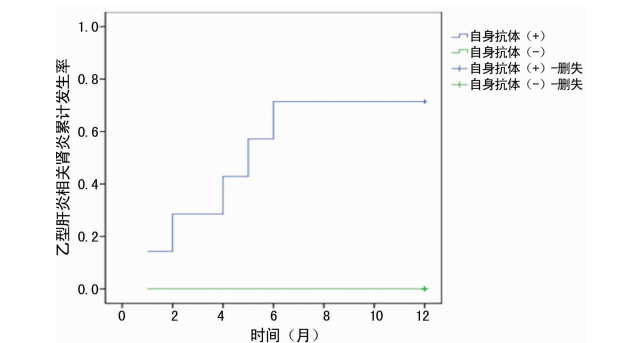


图 1 HBV-GN 发生率曲线

3 讨 论

多数肾小球肾炎是由免疫介导的炎症疾病,其中继发性肾炎最常见的是 HBV-GN 和系统性红斑狼疮肾炎。许多研究已发现系统性红斑狼疮的病理性自身抗体参与了狼疮肾炎的发病,且有助于疾病的诊断^[5-6],但目前尚未有研究报道自身抗体在 HBV-GN 的临床应用,笔者在本研究中首次探讨了自身抗体在乙型肝炎相关性肾炎中的预测和早期诊断价值。自身抗体现已广泛应用于多种自身免疫性疾病或自身免疫功能紊乱相关性疾病的临床诊断及预后判断^[7-9]。CACOUB 等^[10]发现 HBV 感染人体细胞后可以诱发自身免疫反应,继而产生多种自身抗体,LEI 等^[11]发现慢性 HBV 感染患者 ANA 和 ENA 阳性率达 65%,张晓红等^[12]发现慢性乙肝患者血清 ANA 阳性率为 16.7%,以上研究表明有相当一部分乙肝患者体内存在自身抗体,但有很少研究关注增高的自身抗体对乙肝患者的预后产生哪些影响。

本研究发现 HBV-GN 患者与 HBV 非 GN 患者相比,血清抗核抗体和抗 ENA 抗体谱阳性率显著增高,分别高达 73.9%和 43.5%,于是本文认为自身抗体是否与乙肝患者发生肾炎有关。肾脏可以通过多种机制成为自身抗体的受害者,自身抗体可损伤肾小球或肾组织特异性抗原,如膜性肾病^[13],抗肾小球基底膜肾炎^[14]和 IgA 肾病^[15]等。有研究发现^[16],免疫复合物可以改变肾脏基底膜的结构,激活补体的经典路径,加剧 C3a 和 C5a 等趋化因子的炎症过程,另外由于 C5b-9 复合物的细胞溶解作用,补体末端通路也会导致细胞损伤。以上研究表明增高的自身抗体可致肾脏损伤,引起一系列肾脏疾病。

本实验发现,有 28%的乙肝非肾炎患者血清自身抗体阳性,本文认为可能这部分患者尚未发生 HBV-GN 或因其他某些原因尚未致病。为了证实乙肝患者发生 HBV-GN 是否与自身抗体有关,本文对 25 例乙肝非肾炎患者进行了为期 1 年的随访,发现 7 例自身抗体阳性的乙肝患者在 1 年内有 5 例发生了 HBV-GN,并且自身抗体阴性的患者无 1 例发生 HBV-GN。以上结果均表明自身抗体在 HBV-GN 的预测和早期诊断中可能具有重要的意义,故对自身抗体阳性的乙肝患者进行定期监测或提早干预,有利于预防乙肝患者 HBV-GN 的发生。另外 2 例自身抗体阳性的乙肝患者可能因随访时间较短或自身抗体转阴而未发生肾炎,笔者将对病例继续跟踪。

4 结 论

综合本次研究的结果,HBV-GN 患者比 HBV 非 GN 患者自身抗体阳性率增高,且自身抗体阳性的乙肝患者比自身抗体阴性的乙肝患者更易发生 HBV-GN,说明自身抗体在 HBV-GN 疾病中有一定的预测价值。对自身抗体阳性的乙肝患者进行早期干预,可能会减少 HBV-GN 的发生,具体干预方法有待进一步研究。

参考文献

[1] 张国山,王芳,安爽,等.乙型肝炎病毒相关性肾炎的研究进展[J].中国老年学杂志,2015,4:35.

[2] COMBES B, SHOREY J, BARRERA A. Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen- antibody complexes in glomerular basement membrane [J]. Lancet, 1971, 2(7718): 234-237.

[3] 中华内科杂志编委会.乙型肝炎病毒相关性肾炎座谈会纪要[J].中华内科杂志.1990,29(9):519-521.

[4] 周长华,居建忻,朱月文.乙肝相关性肾炎 20 例临床与病理分析 [J].浙江实用医学,2009,14(2):115-116.

[5] WALDMAN M. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis[J]. Lupus, 2005, 14(1): 19-24.

[6] HIRABAYASHI Y, OKA Y, TADA M, et al. A potential trigger of nephritogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1108: 92-95. (下转第 1097 页)

此外,根据本研究对安全性的分析结果,两组患者治疗期间不良反应发生率不存在显著差异,这一结果说明阿托伐他汀钙的联用并未增加不良反应的发生,安全性较高。

4 结 论

综上所述,非洛地平缓释片联合阿托伐他汀钙能够有效改善患者血管内皮细胞炎性反应,降低血脂水平,进而使患者血清 VCAM-1、HSP70 表达水平明显下降,具有较高的安全性,值得在临床工作中进行推广。

参考文献

[1] 曹平良,李年娥,程晓曙,等.硝苯地平控释片对清晨血压和动态血压季节性变异的影响[J].中华高血压杂志,2016(12):1161-1165.

[2] 陈文发,叶志荣,张吟,等.不同时间服用坎地沙坦对老年高血压患者动态血压的影响[J].中华高血压杂志,2016(9):874-876.

[3] 戴伦.钙拮抗剂与利尿剂联合作用的利弊[J].中华高血压杂志,2016(6):509-514.

[4] 中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南 2010[J].中国医学前沿杂志(电子版),2011,3(5):42-93.

[5] 刘晓亮,刘金洪,胡姣姣.慢性肾病高血压患者合用非洛地平与培哚普利的药代动力学与药效学观察[J].中国医药导报,2016,13(30):41-44.

[6] 杨晓莉,李敏,罗涛,等.非洛地平联合洛伐他汀对高血压病人血清胱抑素 C 及同型半胱氨酸的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(23):2794-2797.

[7] 崔纳,白慧芙,王蕾,等.非洛地平缓释片治疗社区高血压的临床效果及可行性分析[J].国际心血管病杂志,2017,

1(1):165-166.

[8] 韦瑞斌,冯颖青.血压的季节性变异相关因素分析及其与终点事件的关系[J].中华高血压杂志,2016(4):383-386.

[9] ANSARI N H, NASEER N, NOOR V, et al. Cardiovascular risk reduction comparison of felodipine and propranolol in patients of essential hypertension[J]. Medical Forum Monthly, 2016, 27(1): 37-40.

[10] ROLAND E, SCHMIEDER. Telmisartan and a fixed combination S-amlodipine/atorvastatin in the treatment of essential hypertension[J]. Expert Opin pharmacother, 2016, 3(47): 11.

[11] 吴芳,羿风云,刘祖德,等.非洛地平并阿托伐他汀对单纯收缩期高血压的疗效[J].心血管康复医学杂志,2016,25(2):188-191.

[12] KWON S S, KIM J H, JEONG H U, et al. Inhibitory effects of aschantin on cytochrome P450 and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase enzyme activities in human liver microsomes[J]. Molecules, 2016, 21(5): 554-566.

[13] SLÍVA J. Current position of a fixed combination telmisartan with amlodipine in treatment of essential arterial hypertension[J]. Vnitr Lek, 2016, 62(9): 699-709.

[14] 赵定学,苗云凤,龚必锋.高血压合并糖尿病患者黏附分子与炎症因子水平变化[J].中国循证心血管医学杂志,2016,8(1):72-74.

[15] 唐小平,杨颖丞,万沁,等. HSP70-hom 单核苷酸多态性与高血压的关系[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(2):163-166,186.

(收稿日期:2018-10-14 修回日期:2018-12-02)

(上接第 1092 页)

[7] HIGASHI N, NIIMI Y, AOKI M, et al. Clinical features of antinuclear antibody-positive patients with atopic dermatitis[J]. J Nippon Med Sch, 2009, 76(6): 300-3007.

[8] EISSFELLER P, STICHERLING M, SCHOLZ D, et al. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases[J]. Ann N Y Acad, 2005, 1050: 327-39.

[9] DAMOISEAUX J G, TERVAERT J W. From ANA to ENA: how to proceed[J]. Autoimmun Rev, 2006, 5(1): 10-17.

[10] CACOUB P S D, BOURLIERE M. Hepatitis B virus genotypes and extrahepatic manifestation [J]. J Hepatol, 2005, 43(5): 764-770.

[11] LEI Y, HU T, SONG X, et al. Production of autoantibodies in chronic hepatitis B virus infection is associated with the augmented function of blood CXCR5⁺ CD4⁺ T cells

[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162241.

[12] 张晓红.慢性病毒性肝炎患者 120 例抗核抗体检测的临床意义[J].转化医学电子杂志,2014,1(3):56-57.

[13] PIERRE R, DEBIEC H. Membranous nephropathy: a fairy tale for immunopathologists, nephrologists and patients[J]. Mol Immuno, 2015, 68 (2015): 57-62.

[14] CUI Z, ZHAO M H. Advances in human anti-glomerular basement membrane disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 697-705.

[15] HOLDSWORTH S R. Biologics for the treatment of autoimmune renal diseases[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(4): 217-31.

[16] SUAREZ-FUEYO A, BRADLEY S J, KLATZMANN D, et al. T cells and autoimmune kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(6): 329-343.

(收稿日期:2018-10-10 修回日期:2019-01-13)