

原发性胆汁性肝硬化血清学抗体与戊型肝炎病毒抗体间的相关性分析

邢雪梅, 李艳琴, 沈 钢, 张 军, 祝力琦(西安交通大学医学院附属 3201 医院检验科, 陕西汉中 723000)

【摘要】 目的 回顾性研究 127 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)相关血清学自身抗体与戊型肝炎病毒(HEV)抗体之间的相关性。**方法** 与 PBC 相关自身抗体:抗线粒体抗体 M2 亚型(AMA-M2)、重组 M2 融合蛋白抗体(M2-3E/BPO)、抗核点型靶抗原蛋白 100(抗-sp100)、抗核孔复合物 210 跨膜糖蛋白抗体(抗-gp210)、抗着丝粒蛋白 B 抗体(CENP B),以上抗体中单一或多抗体阳性血清 127 例与 93 例系统性红斑狼疮(SLE)患者、92 例类风湿性关节炎(RA)患者和 122 例健康人血清样本同期分别采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 HEV IgG/IgM 抗体。**结果** PBC 相关自身抗体阳性组、健康人对照组、SLE 和 RA 组的 HEV-IgG 抗体阳性率分别是 55.9%、27.0%、23.7%、40.2%,经 χ^2 检验 PBC 相关自身抗体阳性组与其他三组差异有统计学意义($P < 0.05$)。PBC 相关单一自身抗体阳性组和多抗体阳性组之间 HEV-IgG 抗体阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.319, P > 0.05$)。性别差异无统计学意义($\chi^2 = 0.281, P > 0.05$)。**结论** PBC 相关自身抗体阳性血清存在 HEV 抗体高阳性率。PBC 相关自身抗体和 HEV-IgG 抗体的实验室检测可能存在相互干扰。

【关键词】 原发性胆汁性肝硬化; 自身抗体; 戊型肝炎病毒抗体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.023 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)17-2540-03

Correlation between serological antibody and hepatitis E virus antibody in primary biliary cirrhosis XING Xue-mei, LI Yan-qin, SHENG Gang, ZHANG Jun, ZHU Li-qi (Department of Clinical Laboratory, Affiliated 3201 Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

【Abstract】 Objective To retrospective study the correlation between serological antibody and hepatitis E virus (HEV) antibody in 127 cases of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** 127 cases of single or multiple PBC related autoantibody positive serum samples, including anti-mitochondrial antibodies-M2 (AMA-M2), anti-BCOADC-E2 PDC-E2 OGDC-E2(M2-3E/BPO), anti-sp100 antibodies (anti-sp100), anti-gp210 antibodies (anti-gp210), anti-centromere-associated proteins B (CENP B), were detected the IgG and IgM antibody of HEV by ELISA. Meanwhile 93 cases of systemic lupus erythematosus(SLE), 92 cases of rheumatoid arthritis(RA) and 122 healthy adult serum samples were selected as control group for detecting HEV-IgG/IgM antibody. **Results** The seroprevalence of HEV-IgG antibody in the PBC group, healthy adults control group, SLE and RA groups were 55.9%, 27.0%, 23.7% and 40.2% respectively. The statistically significant difference between PBC group and other three groups was noticed ($P < 0.05$). It demonstrated no significant difference between PBC related single-antibody positive group and multi-antibody positive group($\chi^2 = 0.319, P > 0.05$). No sex difference was found ($\chi^2 = 0.281, P > 0.05$). **Conclusion** The high seroprevalence of HEV-IgG antibody exists in the PRB related autoantibody positive serum. There may be mutual interference between PBC related autoantibody and HEV-IgG antibody.

【Key words】 primary biliary cirrhosis; autoantibody; hepatitis E virus antibody

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种原因不明的以肝内中、小胆管进行性、非化脓性炎症为特征,以慢性肝内胆汁淤积为主要临床表现的自身免疫性疾病。戊型病毒性肝炎(HE)是由戊型肝炎病毒(HEV)感染导致的急性传染病,主要经消化道传播,是我国乙类法定传染病之一。一般认为原发性胆汁性肝硬化和戊型肝炎是两类独立疾病,目前国内外文献亦未见两者的相关性报道。笔者在实验室工作中发现 PBC 相关自身抗体阳性血清存在 HEV 抗体高阳性率,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 PBC 相关自身抗体阳性组:收集 2010 年 8 月至 2014 年 7 月在本院住院及门诊就诊的肝功能异常患者和住院患者常规检查抗核抗体(ANA)阳性者中,与 PBC 相关自身抗体 AMA-M2 和/或 sp100、gp210 及 CENP B 抗体阳性血清

127 例。其中男性 23 例,女性 104 例,男女比例为 1:5.5。年龄结构:男性 36~83(63.61±11.17)岁;女性 33~84(58.74±11.35)岁。127 例 PBC 相关自身抗体阳性血清中 19 例生化指标正常,108 例碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转氨酶、总胆汁酸等生化指标异常,排除甲、乙、丙型肝炎病毒感染。对照组:同期选取系统性红斑狼疮(SLE)患者 93 例,其中男 4 例,女 89 例,平均年龄(35.02±13.95)岁。诊断符合 SLICC 和 EULAR 2009 年修订的 SLE 诊断标准^[1-2]。类风湿性关节炎(RA)患者 92 例,其中男 31 例,女 61 例,平均年龄(53.03±12.96)岁。诊断符合 2010 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟(ACR/EULAR)修订的 RA 分类标准^[3-4]。以上两组排除合并其他结缔组织病。健康对照组:另取健康成人 122 例,来自健康体检人群,男 35 例,女 87 例,平均年龄(49.36±9.65)岁。肝功能正常,排

除结缔组织病。三组均排除甲、乙、丙型肝炎病毒感染。PBC 相关自身抗体阳性血清与 SLE、RA 患者血清-80℃冰冻保存备用,健康人为新鲜分离血清。

1.2 方法

1.2.1 间接免疫荧光法 检测抗线粒体抗体(AMA)和抗核抗体(ANA)。采用德国欧蒙公司间接免疫荧光法试剂盒,ANA 选用 HEP-2 细胞和猴肝两种组织细胞基质;AMA 选用 HEP-2、猴肝、猴心肌、猴髂腰肌、大鼠肾和大鼠胃 6 种组织细胞基质。组织细胞的冰冻切片作为抗原,采用生物薄片技术组合成一个反应区。待检血清自 1:100(体积比)起稀释,与组织细胞孵育 30 min,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的免疫球蛋白 G(IgG)抗体结合 30 min,洗片、封片后奥林巴斯 BX-51 荧光显微镜观察结果,出现特异性绿色荧光、血清稀释度大于 1:100 为阳性。

1.2.2 欧蒙印迹法 采用德国欧蒙免疫印迹试剂盒,免疫印迹膜条上事先包被丙酮酸脱氢酶复合物(AMA-M2)、重组 M2 融合蛋白(BCOADC-E2 PDC-E2 OGDH-E2, M2-3E/BPO)、可溶性酸性磷酸化核蛋白(sp100)、核孔复合物 210×10³ 跨膜糖蛋白(gp210)、着丝粒蛋白 B(CENP B)等纯化抗原。实验严格按照试剂说明书使用欧蒙全自动免疫印条仪 EUROBlotMaster II 进行操作,膜条自然干燥后用系统自带 EUROLinScan 软件判读结果,根据条带色度深浅反应血清中抗体浓度。

1.2.3 酶联免疫吸附(ELISA)试验 采用北京万泰生物药业有限公司诊断试剂盒(同批号),间接法检测戊型肝炎病毒 IgG 抗体;捕获法检测戊型肝炎病毒 IgM 抗体。帝肯 Sunrise 全自动酶标仪测定各反应孔吸光度(A)值,以样品 A 值大于或等于临界值(HEV-IgG 临界值 cut off=0.16+阴性对照孔 A 值均值,HEV-IgM 临界值 cut off=0.26+阴性对照孔 A 值均值)者为 HEV-IgG/IgM 抗体有反应性。同期使用北京万泰诊断试剂盒检测甲、乙、丙型肝炎病毒抗体,试验步骤及结果判读严格按照试剂说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,各组抗体阳性率的比较采用 χ^2 检验,检验水平取 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBC 相关自身抗体阳性组和健康人群、SLE 组、RA 组的 HEV 抗体阳性率 127 例 PBC 相关自身抗体阳性组中 HEV 抗体阳性 71 例(55.9%,其中 HEV-IgG 抗体阳性 69 例,2 例 HEV-IgG/IgM 抗体均阳性)。122 例健康人中 HEV-IgG 抗体阳性 33 例(27.0%)。93 例 SLE 中 HEV-IgG 抗体阳性 22 例(23.7%)。92 例 RA 中 HEV-IgG 抗体阳性 37 例(40.2%),对照各组 HEV-IgM 抗体均阴性。经 χ^2 检验 PBC 抗体阳性组与其他三组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组 HEV 抗体阳性率[n(%)]

组别	n	HEV-IgG(+)	HEV-IgM(+)
PBC 抗体阳性组	127	71(55.9)	2(1.6)
健康对照组	122	33(27.0) ^a	0(0.0)
SLE 组	93	22(23.7) ^b	0(0.0)
RA 组	92	37(40.2) ^c	0(0.0)

注:与 PBC 抗体阳性组比较, $\chi^2=21.303$,^a $P=0.000$; $\chi^2=22.881$,^b $P=0.000$; $\chi^2=5.253$,^c $P=0.022$ 。

2.2 PBC 相关单一抗体阳性组与多抗体阳性组间 HEV 抗体

阳性率 PBC 相关单一抗体阳性组:患者血清中仅存在 AMA-M2(和/或 M2-3E/BPO)、gp210、sp100 三者之一的共 69 例(CENP B 抗体单一阳性的不在 127 例统计范围),其中 HEV 抗体阳性 37 例(53.6%,HEV-IgG 抗体阳性 36 例,1 例 HEV-IgG/IgM 抗体均阳性)。多抗体阳性组:患者血清中同时存在 AMA-M2(和/或 M2-3E/BPO)、GP210、sp100、CENPB 4 种抗体中的两种或两种以上的 58 例,HEV 抗体阳性 34 例(58.6%,HEV-IgG 抗体阳性 33 例,1 例 HEV/IgM 抗体均阳性)。两组间差异无统计学意义($P=0.572>0.05$),见表 2。

表 2 PBC 相关单一/多抗体阳性组间 HEV 抗体阳性率[n(%)]

组别	n	HEV-IgG(+)	HEV-IgM(+)
PBC 相关单一抗体阳性组	69	37(53.6)	1(1.4)
PBC 相关多抗体阳性组	58	34(58.6) ^a	1(1.7)

注:与 PBC 相关单一抗体阳性组比较, $\chi^2=0.319$,^a $P=0.572$ 。

2.3 不同性别 PBC 相关自身抗体阳性组患者的 HEV 抗体阳性率比较 127 例 PBC 相关自身抗体阳性组患者中女性 104 例,其中 57 例 HEV 抗体阳性(54.8%,HEV-IgG 抗体阳性 56 例,1 例 HEV-IgG/IgM 抗体均阳性)。23 例男性患者中 14 例 HEV 抗体阳性(60.9%,HEV-IgG 抗体阳性 13 例,1 例 HEV-IgG/IgM 抗体均阳性)。两组间比较差异无统计学意义($P=0.596>0.05$),见表 3。

表 3 不同性别 PBC 相关自身抗体阳性组患者的 HEV 抗体阳性率的比较[n(%)]

组别	n	HEV-IgG(+)	HEV-IgM(+)
男性	23	14(60.9)	1(4.3)
女性	104	57(54.8) ^a	1(0.9)

注:与 PBC 抗体阳性组男性患者的 HEV-IgG 抗体阳性率比较, $\chi^2=0.281$,^a $P=0.596$ 。

3 讨论

HEV 是 HE 的病原体,多见于青壮年男性,主要通过粪-口途径经肠道传播,即可引起暴发流行,也可呈散发,我国是戊型肝炎的流行区。戊型肝炎的诊断依据包括流行病学史、临床症状和体征以及实验室病原学检测。其中病原学检测异常重要,HEV-IgM 阳性、HEV-IgG 阳性或含量 4 倍及以上升高,血清和(或)粪便 HEV-RNA 阳性,3 项指标的任何一项阳性都可作为 HEV 急性感染的临床诊断依据,如同时 2 项指标阳性则可确诊^[4]。HEV-IgM 在患者出现症状时大多能检出,恢复期迅速消退。IgG 抗体紧随 IgM 抗体出现且浓度迅速升高,并将持续数十年。本次试验中仅 2 例 HEV-IgM 阳性,差异无统计学意义($P>0.05$),本文着重探讨 PBC 相关自身抗体阳性血清中 HEV-IgG 阳性率。

PBC 是一种慢性自身免疫性肝脏疾病,多见于中老年女性,初起时可无症状或症状隐匿,病情进展个体差异大,易于误诊。随着国内外对该病研究和诊断技术的不断提高,PBC 在我国肝病患者中的检出率也逐渐提高。PBC 患者血清中可出现多种特征性自身抗体,本次纳入研究的 4 种自身抗体均是 PBC 患者血清中的较特异抗体,这些自身抗体的检出对该病发病机制、诊断、治疗及预后均有重要意义。2009 年美国肝病学会(AASLD)与 2010 年欧洲肝病研究学会(EASL)推荐的 PBC 诊断标准中,AMA-M2 已直接作为 PBC 的一个诊断标

准^[5-6]。并且高滴度的 AMA 可在 PBC 临床表现、生化指标和组织学改变之前就出现。Jiang 等^[7]研究发现抗 M2-3E/BPO 在 PBC 的诊断中敏感度与特异度分别为 80.2% 和 98.8%，与 AMA-M2 联合检测阳性预测值可达 62.5%。抗-gp210 抗体阳性的患者有更严重的胆汁淤积和肝功能损害，提示预后不佳。抗-sp100 对诊断 PBC 特异性高达 94%，尤其对 AMA 阴性 PBC 患者，并且更易出现在老年人^[8-9]。本次统计 CENP B 合并上述 3 种抗体的 17 例，约占 13.4%，与王雪松和李永哲^[10]报道抗着丝点抗体阳性率在 PBC 约为 12.14% 相近。127 例血清中 70 例 ANA 阳性，主要是核膜型（抗-gp210）、核点型（抗-sp100）和着丝点型（CENP B），约占 55.1%，与闫惠平等^[11]报道有 50% PBC 患者 ANA 阳性率相近。本次研究中上述抗体无论单一抗体阳性还是合并多抗体阳性，虽然在 PBC 中表现的临床意义不尽相同，但在血清 HEV 抗体检测中均呈现较高的阳性率。

目前国内外 HEV 血清学检测试剂的质量差别较大，但本试验使用的北京万泰 ELISA 诊断试剂盒阳性和阴性总符合率最高，也被用作试剂质量考核的参比试剂^[12-14]。试验中 PBC 相关自身抗体阳性组 HEV 抗体阳性病例为 71 例，其中 38 例以 SS、SLE、RA、间质性肺炎、蛋白尿等疾病就诊，31 例以肝功能异常原因待查入院。另 2 例 HEV-IgM/IgG 均阳性患者，1 例为十二指肠球部溃疡穿孔，1 例为心包积液、高血压病就诊。所有病例均非戊型肝炎就诊，流行病学调查及临床症状和体征亦不支持戊型肝炎诊断（因是回顾性研究未做双份 HEV-IgG 抗体检测和 HEV-RNA 检测）。而 PBC 相关自身抗体 AMA-M2、gp210、sp100 及 CENP B 滴度均大于或等于 1:1 000（欧蒙滴度），是否高滴度 PBC 相关自身抗体的阳性可引起 ELISA 检测 HEV 抗体试验假阳性，相反，HEV 抗体的存在是否会造成 PBC 相关自身抗体的滴度增高^[15]。

试验组选取了同期临床确诊的 SLE 和 RA 患者血清设置对照组。SLE、RA 患者血清均存在高滴度的自身抗体，其中 ANA $\geq$ 1:1 000（欧蒙滴度）；ds-DNA（抗双链 DNA 抗体）、AKA（抗角蛋白抗体） $\geq$ 1:10（欧蒙滴度）；CCP（抗环瓜氨酸肽抗体） $\geq$ 20 U/mL（正常参考 0~5 U/mL，德国欧蒙 ELISA 检测试剂盒）；类风湿因子（RF）-IgG $\geq$ 150 U/mL（正常参考 0~20 U/mL，德国欧蒙 ELISA 检测试剂盒）。经统计学分析 SLE 及 RA 组 HEV 抗体阳性率并没有表现增高趋势。尽管 RA 组 HEV 抗体阳性率略高，但与 PBC 组间差异仍有统计学意义（ $P<0.05$ ），分析认为与 RF 因子为变性 IgG 干扰 ELISA 有关^[15]。

本组数据表明在不同性别间 HEV 抗体的阳性率差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。127 例血清中男女性别比为 1:5.5，与既往国内报道 PBC 性别比 1:8~1:10 有差异，可能本研究仅是抗体阳性而非 PBC 确诊病例，样本量也有限，或是存在地区差异，男性所占比例偏大可能造成 HEV 抗体阳性比例增高，尚需扩大样本。

通过本次试验证明，PBC 相关自身抗体阳性血清存在 HEV 抗体高阳性率，目前国内外鲜有报道。PBC 发病率低，样本量积累有限，目前仅通过小样本回顾性研究 PBC 相关自身抗体与 HEV-IgG 间关联，也可能是由于存在试验方法之间的干扰，还需继续复习临床资料，扩大样本，结合组织病理学，寻求两者间是否相关的依据。

参考文献

- [1] Schneider M. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus[J]. Z Rheumatol, 2009, 68(7): 578-583.
- [2] Amezcua-Guerra LM, Higuera-Ortiz V, Arteaga-Garcia U, et al. Performance of the 2012 SLICC and the 1997 ACR classification criteria for systemic lupus erythematosus in a real-life scenario[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2014, 29(6): 833-836.
- [3] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [4] Zhang J, Li SW, Wu T, et al. Hepatitis E virus: neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity[J]. Rev Med Virol, 2012, 22(5): 339-349.
- [5] Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2009, 50(1): 291-308.
- [6] EASL Clinical Practice Guidelines. Management of cholestatic liver diseases[J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 237-267.
- [7] Jiang XH, Zhong RQ, Yu SQ, et al. Construction and expression of a humanized M2 autoantigen trimer and its application in the diagnosis of primary biliary cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1352-1355.
- [8] Muratori P, Muratori L, Cassani F, et al. Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-SP100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 127(1): 172-175.
- [9] Granito A, Muratori P, Quarneti C, et al. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(1): 65-74.
- [10] 王雪松, 李永哲. 原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 3(14): 245-249.
- [11] 闫惠平, 庄辉, 刘燕敏, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者的免疫学特点分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 1(13): 12-16.
- [12] 周诚, 黄维金, 姚昕, 等. 几种戊型肝炎试剂的比较及 IgG 抗体定量方法的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 9(29): 854-857.
- [13] 江永珍, 田瑞光, 鲁建, 等. 我国戊型肝炎 ELISA 诊断试剂的质量比较[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 1(21): 59-61.
- [14] 李宏峰, 赵红. 戊型肝炎病毒抗体检测试剂盒临床考核数据分析[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 34(17): 3550-3552.
- [15] Kragstrup TW, Vorup-Jensen T, Deleuran B, et al. A simple set of validation steps identifies and removes false results in a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay caused by anti-animal IgG antibodies in plasma from arthritis patients[J]. Springerplus, 2013, 2(1): 263-270.