

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 02. 009

慢性乙型肝炎患者肝功能指标与肝组织免疫组织化学的相关性

赵 棉¹, 赵亚妮^{1△}, 张 力²

(1. 陕西省西安市第一医院检验科 710002; 2. 陕西省友谊医院检验科, 西安 710068)

摘要:目的 分析慢性乙型肝炎(CHB)患者肝功能指标与肝组织免疫组织化学的相关性。方法 选取 2016 年 2 月至 2018 年 2 月在西安市第一医院接受治疗的 148 例患者,依据患者是否进行正规抗病毒治疗将其分成 2 组,86 例未进行正规抗病毒治疗的患者作为对照组,62 例进行正规抗病毒治疗的患者作为观察组。检测 2 组患者的清蛋白(ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBiL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,同时采用荧光定量 PCR 技术检测血清 HBV DNA,实时荧光定量 PCR 检测肝组织内 ccc DNA,分析 2 组患者肝组织免疫组织化学和肝细胞内 ccc DNA、HBV DNA 的相关状况,以及治疗后肝细胞内 HBV 改变状况。**结果** 对照组 HBeAg 阴性患者血清 HBV DNA 及肝细胞 ccc DNA 低于 HBeAg 阳性患者,差异有统计学意义($P<0.05$),HBeAg 阳性和阴性患者血清 ALT 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);对照组患者肝细胞 HBV DNA 及 ccc DNA 与肝组织纤维化程度呈负相关关系($r=-0.213, -0.524, P<0.05$),血清 ALT 水平和肝组织纤维化程度无相关性($r=0.025, P>0.05$),肝细胞 HBV DNA 与 ccc DNA、ALT 无相关性($r=0.066, 0.041, P>0.05$)。治疗后观察组患者肝细胞内 ccc DNA 和 HBV DNA 水平较对照组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 患者肝内病毒复制和其 HBV DNA 水平无相关性,肝细胞内 ccc DNA 水平和肝组织纤维化程度呈负相关关系。

关键词:乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 共价闭合环状 DNA; 肝功能; 肝纤维化
中图分类号:R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)02-0174-04

The correlation between liver function indexes and liver tissue immunohistochemistry in patients with chronic hepatitis B

ZHAO Mian¹, ZHAO Yani^{1△}, ZHANG Li²

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an First Hospital, Xi'an, Shaanxi 710002, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Shaanxi Friendship Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: **Objective** To analyze the correlation between liver function indexes and immunohistochemistry in liver tissue in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** A total of 148 patients with CHB who were treated in our hospital from February 2016 to February 2018 were selected. They were divided into two groups according to whether they had formal antiviral treatment. And 86 patients who were not treated with regular antiviral therapy were selected as control group, 62 patients undergoing regular antiviral therapy were selected as observation group. Albumin (ALB), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBiL) and alanine amino ALT content were analyzed by automatic biochemical detecting, HBV-DNA in serum and ccc DNA in liver tissue were detected by fluorescence quantitative PCR. The correlation between degree of fibrosis in liver tissue and CCC DNA and HBV DNA in liver cells of the two groups was analyzed, and HBV DNA changes in hepatocytes before and after treatment were analyzed. **Results** HBV DNA in serum and hepatocyte ccc DNA of HBeAg-negative patients were significantly lower than those of HBeAg-positive patients in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in ALT levels between HBeAg positive and negative patients, there was negative correlation between liver cell HBV DNA and ccc DNA and liver fibrosis ($r=-0.213, -0.524, P<0.05$). There was no correlation between serum ALT and liver fibrosis ($r=0.025, P>0.05$), and there was no correlation between HBV DNA and ccc DNA and serum ALT in liver cells ($r=0.066, 0.041, P>0.05$); ccc DNA and HBV DNA in liver cells of the observation group after antiviral treatment was significantly lower than the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** There is no correlation between intrahepatic viral replication and HBV DNA content, and

there is a negative correlation between intracellular ccc DNA content and hepatic fibrosis.

Key words: hepatitis B virus; chronic hepatitis B; covalently closed circular DNA; liver function; liver fibrosis

乙型肝炎病毒(HBV)是临床最多见的双链 DNA 病毒之一,前基因组 RNA 与 mRNA 的合成需要 HBV 复制的中间体,即共价闭合环状 DNA(ccc DNA)提供模板,其也是 HBV 复制的主要标志物^[1-2]。目前由于 HBV 感染造成慢性乙型肝炎(CHB),其诊疗常用指标包含肝功能、血清免疫标志物、HBV 荧光定量 PCR 等。相关研究已经证实,对 CHB 患者治疗主要方法为清除或者抑制 HBV ccc DNA^[3-4]。现分析 CHB 患者 ccc DNA、HBV DNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和肝组织免疫组织化学的相关性,为临床诊疗提供一些借鉴。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 2 月至 2018 年 2 月在西安市第一医院接受治疗的 148 例 CHB 患者。排除标准:药物性肝炎、酒精性肝病、紫衫免疫性肝病及脂肪肝等肝病患者,其他类型的病毒性肝炎(如戊、甲、丁、丙)重叠感染者,多脏器功能衰竭、肝癌、出血倾向明显、黄疸较深、腹水显著、不适宜行肝穿刺活检者。依据患者是否进行正规抗病毒治疗将其分成 2 组,86 例未进行正规抗病毒治疗的患者作为对照组,62 例进行正规抗病毒治疗(采用聚乙二醇化干扰素 α-2a 治疗 48 周)的患者作为观察组。2 组患者的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经该院伦理委员会批准,患者或家属知情并签署同意书。见表 1。

表 1 2 组患者一般资料结果比较

组别	例数 (n)	男/女 (n/n)	体质量指数 ($\bar{x}\pm s$, kg/m ²)	平均年龄 ($\bar{x}\pm s$, 岁)	乙型肝炎 e 抗原	
					阳性(n)	阴性(n)
观察组	62	36/26	23.06±3.12	34.18±4.17	47	15
对照组	86	53/33	22.95±3.14	35.06±4.35	59	27
t/χ^2		0.657	0.714	0.529	0.618	0.713
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

1.2 研究方法

1.2.1 肝功能检测 收集早晨空腹静脉血 6 mL,离心机 2 500 r/min 离心 10 min 取上清液。使用 OLYM-PUS AU400 型全自动生化分析仪检测清蛋白(ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBiL)、ALT 水平,试剂盒购自北京九强生物公司。

1.2.2 病毒学检测 使用荧光定量 PCR 技术检测血清 HBV DNA,阴性参考数值低于 1×10^3 拷贝/毫升,试剂盒购自广州中山达安公司。

1.2.3 HBV 标志物检测 采用 ELISA 法检测血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、核心抗体(抗-HBc)、乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)、e 抗体(抗-HBe)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg),试剂盒购自上海科华生物公司。标准品稀释后加入至酶标板标准品孔内,样品也加入至样品孔内,每个孔内 10 μL,胶纸将反应孔封住,37℃ 孵育 2 h,洗板 5 次,再加入 10 μL 生物素化抗体工作液,37℃ 孵育 1 h,洗板 5 次,加入 10 μL 酶结合物工作液,37℃ 避光孵育 30 min,洗板 5 次,每孔加入 10 μL 显色液,37℃ 避光孵育 20 min,最后加入终止液,混匀后检测 OD450 数值,标准品浓度作为横坐标,OD 数值作为纵坐标,绘制标准曲线,依据样品 OD 数值于标准曲线内查看其浓度。

1.2.4 肝脏组织活检 彩超引导下进行,组织长度约为 1.0~1.5 cm,常规包埋、切片,厚度 4 m。HE 常规染色,网状纤维染色和冰冻切片胶原纤维三色染色,读片使用 CMIAS 多功能真彩色病理图像分析,并进行纤维化及 Knodell HAI 评分。免疫组织化学标记肝组织,试剂盒购自北京中衫生物公司。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 肝组织 ccc DNA 检测,离心管内肝组织使用眼科剪剪碎,10 倍体积抽提缓冲液加入震荡使其在溶液内分散。裂解细胞悬液 50℃ 水浴 3 h。溶液内加入等体积 0.5 mol/L Tris, cl 并将离心管来回颠倒 10 min。乳浊液形成后室温内 5 500 r/min 离心 20 min,分来两相。大口径(出口径 0.3 cm)移液管把黏稠水相移动至干净离心管内,酚抽提 2 次。使用酚提取第 3 次时把水相移动至干净离心管内,室温加入 2 倍体积乙醇和 0.2 体积 10 mmol/L 乙酸铵,混合充分后形成 DNA。DNA 样品在 280、260 nm 位置光吸收,CT 数值由荧光检测仪自动读取,计算出拷贝数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料且符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较应用 χ^2 检验,Spearmen 等级分析行相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组患者血清 ALT、HBV DNA 及 ccc DNA 水平检测结果 对照组 HBeAg 阴性患者血清 HBV DNA 及肝细胞 ccc DNA 低于 HBeAg 阳性患者,差异有统计学意义($P<0.05$),HBeAg 阳性和阴性患者其血清 ALT 水平比较,差异无统计学意义($P>$

0.05)。见表 2。

表 2 对照组 HBeAg 阳性和阴性患者各指标检测结果比较(̄x±s)

组别	例数 (n)	ALT (U/L)	HBV DNA (IU/mL)	ccc DNA (IU/mL)
HBeAg 阳性	59	148.27±38.16	6.83±1.19	5.73±1.18
HBeAg 阴性	27	136.25±38.52	5.08±1.21	4.34±1.20
t		0.721	4.176	4.189
P		>0.05	<0.05	<0.05

2.2 对照组患者肝纤维化分期与各指标的相关性
对照组患者肝细胞 HBV DNA 及 ccc DNA 与肝组织纤维化程度呈负相关关系($r=-0.213$ 、 -0.524 , $P<0.05$),血清 ALT 水平和肝组织纤维化程度无相关性($r=0.025$, $P>0.05$),肝细胞 HBV DNA 与 ccc DNA、ALT 无相关性($r=0.066$ 、 0.041 , $P>0.05$)。

2.3 2 组患者 HBV 标志物水平检测结果 经抗病毒治疗后观察组患者肝细胞内 ccc DNA 和 HBV DNA 水平较对照组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 2 组患者 HBV 标志物水平检测结果比较(̄x±s)

组别	例数(n)	HBV DNA(IU/mL)	ccc DNA(IU/mL)
观察组	62	2.83±1.07	3.20±1.06
对照组	86	5.47±1.38	5.90±1.42
t		5.187	4.962
P		<0.05	<0.05

2.4 患者血清 HBV DNA 和肝细胞 ccc DNA 的相关性 148 例患者血清 HBV DNA 为(6.13±1.27) IU/mL,肝细胞 ccc DNA 为(5.68±1.43) IU/mL,两者无相关性($r=0.081$, $P>0.05$)。

3 讨 论

HBV 感染已成为世界性的公共卫生问题,全球曾感染过 HBV 的例数近 20 亿,其中约有 3.5 亿成为慢性 HBV 感染者,而我国约有 1.2 亿为慢性无症状 HBV 携带者^[5-6]。时间较短或者新发生 CHB 患者其 HBeAg 被检测为阳性,被称作 HBeAg 阳性 CHB,随着时间推移,一些患者发生血清学转换或者 HBeAg 阴转,进而造成阴性 HBeAg 患者比例上升,阳性 HBeAg 比例降低^[7-9]。

患者在 HBeAg 阴性期间,ALT 水平持久正常、HBeAg 检测阴性、肝活检表征肝纤维化程度轻微,与肝脏无炎性坏死或者坏死程度极低、血清 HBV DNA 不可检测或者水平较低、体内病毒复制状态较低,但有 HBeAg 阴性患者可进展成免疫激活状态,其表征是血清 HBV DNA 和 ALT 水平升高^[10-13]。患者慢性

感染基础为肝细胞核内存在稳定 ccc DNA,临床使用核苷类抗病毒无法将 cccDNA 清除,所以造成患者停药后复发,因此,只有将肝细胞中 ccc DNA 完全清除才能起到根治 HBV 感染的目的。肝组织病理切片检测为肝脏纤维化诊断的金标准,但在实际操作中有一定风险,目前肝脏纤维化诊断研究重点为高敏感性、高特异性血清学指标^[14]。相关研究显示,CHB 患者肝细胞内检测 cccDNA 水平较高^[15]。另外,一些动物试验也显示肝细胞内 ccc DNA 水平和肝组织受损程度相关^[16]。

本研究结果显示,CHB 患者肝细胞 HBV DNA 及 ccc DNA 与肝组织纤维化程度呈负相关关系,血清 ALT 水平和肝组织纤维化程度无相关性,肝细胞 HBV DNA 与 ccc DNA、ALT 无相关性。关于血清和肝细胞内 ccc DNA 水平与肝组织内纤维化程度之间的联系还需大样本量试验以验证。

综上所述,患者肝内病毒复制和其 HBV DNA 水平无相关性,肝细胞内 ccc DNA 水平和肝组织纤维化程度呈负相关关系。

参考文献

[1] 鲁凤民,王杰,陈香梅,等.乙型肝炎病毒 RNA 病毒样颗粒的发现及其对抗病毒治疗临床实践的潜在影响[J].中华肝脏病杂志,2017,25(2):105-110.

[2] LAI C L, WONG D, IP P, et al. Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2017,66(2):275-281.

[3] 万漠彬.乙型肝炎病毒感染新型生物学标志物的临床意义解析——2017 年版欧洲肝病学会《慢性乙型肝炎病毒感染管理临床实践指南》解读[J].中国病毒病杂志,2017,7(5):328-329.

[4] LUO X, HUANG Y, CHEN Y M, et al. Association of hepatitis B virus covalently closed circular DNA and human APOBEC3B in hepatitis B Virus-Related hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2016,11(6):708-712.

[5] 李春艳,陈延平,徐光华,等.慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒 cccDNA 和血清病毒学标志物相关性的研究[J].肝脏,2017,22(5):442-444.

[6] KUMAR R, PREZ-DEL-PULGAR S, TESTONI B, et al. Clinical relevance of the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. Liver Int, 2016,36(Suppl 1):72-77.

[7] 朱园飞,李改云,常豪,等.应用微环 DNA 技术体外诱导和制备重组的乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA[J].微生物与感染,2017,12(4):229-234.

[8] QI Y H, GAO Z C, XU G W, et al. DNA polymerase kappa is a key cellular factor for the formation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus [J]. PLoS Pathog, 2016,12(10):893-896. (下转第 179 页)

的基因分型,提高了梅毒的检测手段,成为近期梅毒流行病研究的热门方向。本研究探讨先天性梅毒的基因型,主要是通过研究珠海口岸地区的孕妇人群及其新生儿中的梅毒流行性情况,回顾性发现梅毒阳性孕妇,大部分是外地流动人口,未参加孕前或孕期间相关传染病的检查。在普及优生优育的时代,孕前和孕期的相关检查非常必要,因为梅毒及时检查发现,及时治疗,可以治愈。另外,虽然目前母婴阻断技术方面比较成熟,但还是有一定的感染概率。本研究结果表明,胎传的先天性梅毒可能与梅毒的基因亚型相关:珠海地区孕妇及先天性梅毒的基因型主要是 14d 型。与其他研究一致^[3-7]。可能与 14d 型梅毒株的梅毒血清固定(赖药性),毒力及传染性都较强有关^[8]。其次,本研究还发现 13d 型和 14a 型,其中 14a 国外多报道为欧洲(主要葡萄牙)流行广泛亚型株^[9-10]。珠海地区的出现可能原因:珠海地区为开放城市,且地处出入境口岸地区,外来国外人员(主要葡萄牙人)出入频繁,或国人出入澳门地区,很有可能将此亚型梅毒株带入珠海。

本研究由于缺少梅毒 Nichols 株作对照,通过电泳图像分析片段大小,但得出的模式与 PILLAY 等^[2]提出的梅毒螺旋体的基因分型一致。其次本研究采用血液标本,阳性率只有 63%(32/51),可能比其他标本类型(皮损分泌物等标本)要低,导致阳性标本数量不多,分类统计数据不全,但对梅毒流行性研究还是有一定的临床价值^[11-12]。

参考文献

[1] KINGSTON M, FRENCH P, HIGGINS S, et al. UK national guidelines on the management of syphilis 2015[J]. International Journal of STD&AIDS, 2015, 27(6): 421-447.

(上接第 176 页)

[9] 唐慧嫻. CRISPR/Cas9 技术用于清除乙型肝炎病毒的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(8): 865-868.

[10] WONG D K, SETO W K, CHEUNG K S, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA [J]. Liver Inter, 2017, 37(7): 995-1001.

[11] 于乐成, 侯金林. 乙型肝炎病毒感染抗病毒治疗临床转归评估指标现状及展望[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(7): 162-166.

[12] 李春艳, 陈延平, 徐光华, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织中 HBV cccDNA 定量检测方法的建立[J]. 肝脏, 2017, 22(10): 930-933.

[13] HONG X P, KIM E S, GUO H T. Epigenetic regulation

[2] PILLAY A, LIU H, CHEN C Y, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* [J]. Sex Transm Dis, 1998, 25(8): 408-414.

[3] 曾铁兵, 吴移谋, 黄澍杰, 等. 衡阳和江门地区梅毒螺旋体基因分型的初步研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(12): 692-694.

[4] 郑和平, 欧志英, 胡玉山, 等. 梅毒螺旋体的巢式 PCR 检测与基因分型[J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38(9): 408-414.

[5] 曾铁兵, 吴移谋, 黄澍杰, 等. 巢式 PCR 扩增梅毒螺旋体 *pol Ae* 及其临床应用的研究[J]. 中国皮肤性病杂志, 2004, 18(2): 74-76.

[6] 吴奇, 王丽, 季灵婷, 等. 上海闸北地区妊娠梅毒分子流行病学特征分析[J]. 检验医学杂志, 2016, 31(6): 486-490.

[7] 汤镇. 梅毒螺旋体基因分型及临床相关性研究进展[J]. 临床医学与临床杂志, 2016, 13(3): 420-422.

[8] 杨文生, 杨文林, 杨健, 等. 梅毒血清固定与梅毒螺旋体 *trp* 基因亚型关系的初步研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(16): 1821-1825.

[9] FLORINDO C, REIGADO V, GOMES J P, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(11): 3802-3803.

[10] CASTRO R, PRIETO E, AGUAS M J, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum* in Lisbon, Portugal [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2510-2512.

[11] 王林娜, 樊硕, 郑和义, 等. 外周血检测梅毒螺旋体 DNA 及其分子亚型的初步观察[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(12): 928-931.

[12] 杨文生, 杨文林, 杨健. 梅毒 PCR 诊断与梅毒螺旋体基因分型研究进展 [J]. 广东医学杂志, 2010, 31(19): 2597-2599.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-09-03)

of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2017, 66(6): 2066-2077.

[14] 叶爱珠, 刘灿, 欧启水. 乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 检测技术的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(2): 155-160.

[15] 毛水燕, 王晨, 杨悦. 慢性乙型肝炎的抗病毒药物及靶点的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 9(17): 1973-1978.

[16] 董晓琴, 张英俊, 任青云, 等. 甲磺酸莫非赛定抑制 Hep-AD38 细胞内乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 转录活性的研究[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(5): 216-219.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-28)