

基因芯片法检测乙肝相关性肝硬化患者 HBV感染血清标志物

高春明, 陈家盛

[摘要]目的: 探讨乙型肝炎相关性肝硬化患者乙肝五项 (HBV-M) 不同模式及乙肝病毒 DNA (HBV DNA) 阳性的临床意义。方法: 64例肝硬化患者用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 HBV-M 基因芯片法检测 HBV DNA 全自动生化分析仪检测肝功能。结果: 64例肝硬化患者中, HBV-M 模式有 4种, HBsAg HBeAg HBeAb 阳性者 15例, HBV DNA 阳性率 100.00%; HBsAg HBeAb HBeAb 阳性者 22例, HBV DNA 阳性率 68.18%; HBsAg HBeAb 阳性者 24例, HBV DNA 阳性率 70.83%; 单纯 HBsAb 阳性者 3例, HBV DNA 均阴性。肝硬化患者各种 HBV-M 中 HBV DNA 总阳性率为 73.44%。HBV DNA 阳性组与阴性组间 ALT 总胆红素差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 半数以上 HBV 相关肝硬化患者有活动性复制, 有必要对 HBV DNA 阳性的肝硬化患者进行抗病毒治疗, 改善预后。

[关键词] 肝硬化; 基因芯片法; HBV 血清标志物

[中国图书资料分类法分类号] R 575.2 [文献标识码] A

Detecting hepatitis B virus infection markers in cirrhosis related to HBV by gene chip

GAO Chunming CHEN Jia sheng

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the clinical significance of HBV DNA positive and different HBV-M in HBV-cirrhosis patients. Methods: The antigen antibody of HBV was detected by ELISA, HBV DNA by gene chip and liver function by complete automatic biochemistry analyzer. Results: There were four modes of HBV-M in 64 patients with cirrhosis. The positive rate of HBV DNA was 100% among 15 patients with positive HBsAg, HBeAg and AntiHBe; the positive rate of HBV DNA was 68.18% among 22 patients with positive HBsAg, HBeAb and AntiHBe; the positive rate of HBV DNA was 70.83% among 24 patients with positive HBsAg, HBeAb and AntiHBe; there was no positive HBV DNA in 3 patients with AntiHBe. The total positive rate of HBV DNA was 73.44% in the cirrhosis patients. Conclusion: HBV reactive duplication is common in more than half HBV-related cirrhosis patients. It is essential for HBV DNA-positive cirrhosis patients to undertake antiviral therapy to improve prognosis.

[Key words] cirrhosis; gene chip; serum HBV markers

HBV感染是我国肝硬化的最主要原因, 对乙肝相关性肝硬化患者 HBV 感染病毒血清标志物及 HBV DNA 的检测有助于了解 HBV 复制状况及选择抗病毒治疗。我们采用基因芯片法检测 64 例肝硬化血清 HBV-M 及 HBV DNA 以探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HBV 相关肝硬化 64 例, 均来自我院感染病科住院和门诊, 其中男 60 例, 女 4 例; 年龄 20~74 岁。均符合 2000 年 9 月西安病毒性肝炎防治方案诊断标准^[1], 均未进行正规抗病毒治疗。

1.2 试剂和仪器 肝功能检测采用全自动生化分析仪, HBV-M 采用 ELISA 试剂盒为上海荣盛生物有限公司产品, HBV DNA 检测仪为 Caliper 1000 基因芯片分析仪, 试剂盒为基因芯片法 HBV DNA 定量检测试剂盒, 均为上海浩源生物科技有限公司产品。

1.3 方法

- 1.3.1 HBV 抗原抗体检测 按试剂盒说明书操作。
- 1.3.2 基因芯片法 (1) 样品处理: 吸取 20 μl 待测血清和 20 μl HBV 阳性对照加入已经分装了 20 μl HBV 病毒裂解液和内对照混合液的小管中, 加盖混匀; 然后小管 37℃ 保温 1 h 完成后在每管中加 40 μl HBV 样品中和液, 加盖混匀, 离心数秒; 吸取 5 μl 处理好的样品、HBV 阳性对照、HBV 阴性对照加到已经分装了 25 μl HBV 反应的 PCR 薄壁反应管中, 加盖混匀。(2) PCR 扩增: 将 PCR 薄壁反应管移入 PCR 扩增仪, 93℃ 35 s; 55℃ 35 s; 72℃ 3~40 个循环。(3) 加样和上机分析。
- 1.4 统计学方法 采用方差分析和 χ^2 检验、t 检验及多样本比较的秩和检验。

2 结果

2.1 血清 HBV 感染抗原抗体模式 64 例肝硬化患者 HBV-M 主要表现为 4 种形式, HBsAg HBeAg HBeAb 阳性者 15 例 (23.44%), HBsAg HBeAb HBeAb 阳性者 22 例 (34.38%), HBsAg HBeAb 阳性者 24 例 (37.50)%, HBsAb 阳性者 3 例

[收稿日期] 2005-11-02

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 感染病科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 高春明 (1971-), 女, 主治医师, 讲师。

(4.69%), 未见其他类型感染模式。

2.2 64例乙肝相关性肝硬化患者 HBV感染抗原抗体模式与 HBV DNA的检测 HBeAg(+)组 HBV DNA阳性率 100%与 HBeAg(-)组差异无统计学

意义 ($P > 0.05$)。HBeAg(+)组 HBV DNA值与 HBeAb(+)组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与 HBeAg HBeAb组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 乙肝相关性肝硬化患者 HBV感染抗原抗体模式与 HBV DNA的关系

HBV感染抗原抗体模式	n	HBV DNA		Hc	P	$\bar{x}_{\pm s}$	F	P	MS _{组内}
		阳性	阳性率 (%)						
HBeAg HBeAb HBeAb	15	15	100.00			6.37 ± 0.70			
HBeAg HBeAb HBeAb	22	15	68.18			5.80 ± 1.07			
HBeAg HBeAb ^b	24	17	70.83	13.89	< 0.005	5.52 ± 0.78 [△]	46.28	< 0.01	0.748
HBeAb ^b	3	0	0.00 ^{**}			0.00 ± 0.00 ^{△△}			
合计	64	47	73.44			—			

两两比较秩和检验: 与 HBeAg(+)组 HBV DNA阳性率比较 ** $P < 0.01$; ^a检验: 与 1 比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 HBV DNA水平与 ALT总胆红素 (TBIL)的关系 HBV DNA阳性组与阴性组间 ALT(148.26 ± 188.97, 114.82 ± 84.08) $\mu\text{mol/L}$ TBIL(100.22 ± 114.57, 172.71 ± 166.95) $\mu\text{mol/L}$ 差异均无统计学意义 ($t = 0.98$ 和 $t = 1.97$, $P > 0.05$)。

3 讨论

基因芯片分析仪主要利用毛细管电泳技术, 具有先进有效的内对照系统, 能够确保定量准确, 高效的防污染系统有助于排除假阳性。Caliper1000基因芯片分析仪由于芯片的高通量, 多信息, 灵敏、准确、菜单式操作系统, 已在许多国家广泛应用。

HBeAg阳性往往表示活跃的病毒复制和较强的传染性^[2]; 而 HBeAb阳性患者血清中较高的 HBV DNA检出率表明其仍具有传染性和病毒复制, 且与病情发展及预后有密切的关系。有学者认为, HBeAb阳性患者中检出 HBV DNA, 肝脏疾病更严重, 肝硬化和肝癌发生率更高, 其发生机制可能为:

(1)前 C区 1896位终止变异, 前 C区密码 28位由色氨酸变成终止密码, 使 HBeAg合成提前终止, 但不影响病毒的复制和 HBeAg合成; (2)信号肽酶切位点附近第 15位氨基酸的变异, 信号肽内切酶不能裂解 HB蛋白, 使 HB蛋白分泌受阻; (3)前 C区插入、缺失变异使读框移位或 C区基因变异, 改变了 HBeAg的抗原性, 常规试剂盒检测为阴性; (4) X基因区 C基因启动子变异, 在转录水平影响 HBeAg前体表达, 导致血清 HBeAg水平下降或缺失; (5) HBV低水平复制, 使 HBeAg少量分泌而低于检测极限, 或 HBeAb生成超过 HBeAg分泌, 使血清 HBeAg检测阴性^[3]。HBeAg HBeAb阳性患者比例最高, 占 37.50%, HBV DNA检出率为 70.83%, 值得关注。HBeAg HBeAb阳性患者血清中检出 HBV DNA可能为血清转换期或前 C区突变, 若经

过动态的观察, 仍表现为 HBeAg HBeAb阳性及 HBV DNA阳性, 可能为前 C区突变^[4]。

ALT是肝脏炎症的反映, 而 TBIL则是肝脏损害严重程度的表现, 本文显示 HBV DNA阳性组与阴性组间 ALT TBIL差异无统计学意义, 说明 HBV DNA可能与肝脏病变严重程度无直接关系, 而与 HBV诱导机体免疫反应有关。

以往认为肝硬化患者的 HBV复制处于低水平, 不需要抗病毒治疗, 但本资料统计显示 73.44%乙肝相关性肝硬化患者 HBV DNA阳性, 因此对于肝硬化患者进行有效的抗病毒治疗十分重要。近年来, 许多学者对乙型肝炎肝硬化患者抗病毒治疗进行研究, 发现拉米呋定在 HBV DNA HBeAg阴转和 ALT改善方面效果明显^[5~7]。由于拉米呋定耐受性优于干扰素, 因此, 目前治疗主要选择拉米呋定, 其对促进肝脏炎症稳定、提高肝脏储备功能、延缓病情发展、降低肝癌的发生、推迟向肝衰竭进展有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324—329

[2] 许礼发, 项桂菊, 钱中清, 等. 乙型肝炎患者 HBV-DNA与血清 e系统的关系 [J]. 蚌埠医学院学报, 2001, 26(2): 163—164

[3] 邱望龙, 李福元. 抗 HBe阳性慢性乙型肝炎的治疗策略 [J]. 临床肝胆病杂志, 1999, 15(1): 9—12

[4] Rodriguez-Frias FF, Buti M, Jardi R, et al. Hepatitis B virus infection [J]. Hepatology, 1995, 22(6): 1641—1647

[5] Hann HW, Fontana RJ, Wright T, et al. A United States compassionate use study of lamivudine treatment in nontransplantation candidates with decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis [J]. Liver Transpl, 2003, 9(1): 49—56

[6] Villeneuve JP, Condeelis LJ, Wilkens B, et al. Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2000, 31(1): 207—210

[7] Kapoor D, Gupta RC, Wakil SM, et al. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis [J]. J Hepol, 2000, 33(2): 308—312