

慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 载量与肝组织病理改变的分析

严颖, 麦丽, 郑玉宝, 柯伟民*, 高志良
(中山大学附属第三医院传染病学教研室, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 载量与肝组织病理改变的关系。【方法】158 例慢性乙肝患者根据血清 HBeAg 分为 HBeAg 阳性组和阴性组, 回顾性分析血清 HBV DNA 载量与肝组织病理炎症分级、纤维化分期之间的关系。【结果】HBeAg 阳性组 105 例与 HBeAg 阴性组 53 例血清 HBV DNA 载量(\lg copies/mL)分别为 6.6 ± 1.9 和 4.8 ± 2.5 , 二者相比 $P = 0.000$ 。HBeAg 阳性组肝组织炎症活动度 G_{0-1} 6 例、 G_2 74 例、 G_{3-4} 25 例, 其血清 HBV DNA 载量(\lg copies/mL)分别为 5.6 ± 1.1 、 6.5 ± 2.0 、 7.0 ± 1.5 , 三者血清 HBV DNA 载量无差异($P = 0.250$); 肝组织纤维化程度 S_{0-1} 23 例、 S_2 56 例、 S_{3-4} 26 例, 其血清 HBV DNA 载量(\lg copies/mL)分别为 6.6 ± 1.8 、 6.6 ± 2.0 、 6.6 ± 1.6 , 三者血清 HBV DNA 载量无差异($P = 0.996$)。HBeAg 阴性组肝组织炎症活动度 G_{0-1} 8 例、 G_2 17 例、 G_{3-4} 28 例, 其血清 HBV DNA 载量(\lg copies/mL)分别为 2.1 ± 1.9 、 4.7 ± 2.2 、 5.6 ± 2.3 , G_2 、 G_{3-4} 者血清 HBV DNA 载量较 G_{0-1} 者高($P = 0.001$), G_2 与 G_{3-4} 者血清 HBV DNA 载量无差异($P = 0.332$); 肝组织纤维化程度 S_{0-1} 10 例、 S_2 25 例、 S_{3-4} 18 例, 其血清 HBV DNA 载量(\lg copies/mL)分别为 2.7 ± 3.2 、 5.1 ± 1.8 、 5.4 ± 2.4 , S_2 、 S_{3-4} 者血清 HBV DNA 载量较 S_{0-1} 者高($P = 0.005$), S_2 与 S_{3-4} 者血清 HBV DNA 载量无差异($P = 0.745$)。【结论】HBeAg 阳性乙肝患者血清 HBV DNA 载量与肝组织炎症及纤维化程度无关。HBeAg 阴性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 载量较高者其肝组织炎症及纤维化程度均较高。

关键词: 慢性乙型肝炎; 肝组织病理; HBV DNA; HBeAg

中图分类号: R5 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)04-0486-04

Investigation on Serum HBV Viral Loads and Changes of Liver Pathological Features in 158 Patients with Chronic Hepatitis B

YAN Ying, MAI Li, ZHENG Yu-Bao, KE Wei-Min*, GAO Zhi-Liang

(Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the relationship between serum HBV DNA loads and liver pathological changes in the patients with chronic hepatitis B. 【Methods】 The relationship among HBV DNA loads, live histological inflammation grades and fibrosis stages of 158 cases was analyzed. 【Results】 The serum HBV DNA loads (\lg copies/mL) in HBeAg-positive group with inflammation grades G_{0-1} (6 patients), G_2 (74 patients) and G_{3-4} (25 patients) were 5.6 ± 1.1 , 6.5 ± 2.0 and 7.0 ± 1.5 , respectively. There was no significant difference in the patients of three inflammation grades ($P = 0.250$). The serum HBV DNA loads in HBeAg-positive group with liver tissues fibrosis stages of S_{0-1} (23 patients), S_2 (56 patients), S_{3-4} (26 patients) were 6.6 ± 1.8 , 6.6 ± 2.0 , 6.6 ± 1.6 , respectively, the difference was not significant ($P = 0.996$). The serum HBV DNA loads in HBeAg-negative group with inflammation grades G_{0-1} (8 patients), G_2 (17 patients) and G_{3-4} (28 patients) were 2.1 ± 1.9 , 4.7 ± 2.2 and 5.6 ± 2.3 respectively. The serum HBV DNA level in patients with G_2 and $G_3 \sim 4$ inflammation grades was significant higher than in patients with G_{0-1} inflammation grades ($P = 0.001$). The serum HBV DNA loads in HBeAg-negative group with liver tissues fibrosis stages of S_{0-1} (10 patients), S_2 (25 patients), S_{3-4} (18 patients) were 2.7 ± 3.2 , 5.1 ± 1.8 , 5.4 ± 2.4 respectively. The serum HBV DNA level in patients with fibrosis stages of S_2 and S_{3-4} was significant higher than in patients with fibrosis stages of S_{0-1} ($P = 0.005$). 【Conclusions】

收稿日期: 2011-08-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B080701024); 广东省医学科学技术研究基金(B2011101); 广东省自然科学基金(10451008901004818)

作者简介: 严颖, 硕士, 主治医师, E-mail: mf600@126.com; * 通信作者: 柯伟民, E-mail: kwm1999@163.com

The serum HBV DNA level does not correlate with the inflammation grades and fibrosis stages of liver tissues in HBeAg-positive patients. The serum HBV DNA loads display a positive correlation with the inflammation grades and fibrosis stages of liver tissues in HBeAg-negative patients.

Key words: chronic hepatitis B; liver pathology; HBV DNA; HBeAg

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):486-489]

乙型肝炎病毒(HBV)感染时,外周血乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)、HBV DNA载量是病毒复制活动的最直接的标志^[1-2]。目前对慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平与肝脏损害关系的研究较多,但结果不一^[3-4],大多数研究未能考虑血清HBeAg的影响。为探讨慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA载量与肝组织病理改变的关系,我们对158例肝穿刺活检的慢性乙肝患者资料进行分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

158例慢性乙型肝炎(CHB)患者为中山大学附属第三医院感染科2005-2010年的门诊及住院患者,根据2005年慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准^[5],分为HBeAg阳性慢性乙肝105例和HBeAg阴性慢性乙肝53例,排除合并甲型、丙型、戊型肝炎及长期嗜酒、特殊用药者。所有患者均未进行过抗病毒治疗。回顾性分析血清HBV DNA载量与肝组织病理炎症分级、纤维化分期之间的关系。

1.2 检测方法

HBV DNA载量测定采用实时荧光定量PCR法,仪器为美国ABI公司的ABI 5700型荧光定量PCR仪,试剂由中山大学达安基因公司提供,检测下限为 5×10^2 copies/mL。HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe和抗-HBc采用美国Abbott公司

AxSYM全自动快速免疫分析系统检测。标本的采集、运送、保存、操作过程及结果的判定按照试剂的说明书进行。

1.3 病理组织检查

B超引导下肝穿刺活检,穿刺针采用16G Quick-cut针,肝组织长度1.5~2 cm,标本置入40 g/L多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片,常规苏木精-伊红(HE)及网状纤维染色,按2005年慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准^[5]进行病理分级。

1.4 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件。正态分布资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。HBV DNA载量为指数资料,取对数后进行比较分析。通过One-Way ANOVA过程进行比较分析血清HBV DNA载量与肝组织病理炎症分级、纤维化分期之间的关系。

2 结果

2.1 肝组织病理照片

部分肝组织病理照片见图1。其中肝组织炎症活动度G₀₋₁ 14例、G₂ 91例、G₃₋₄ 53例,肝组织纤维化程度S₀₋₁ 33例、S₂ 81例、S₃₋₄ 44例。

2.2 HBeAg表达与HBV DNA载量的、年龄的关系

HBeAg阴性组与HBeAg阳性组比较,患者的年龄偏大,HBV DNA载量较低($P = 0.000$,表1)。

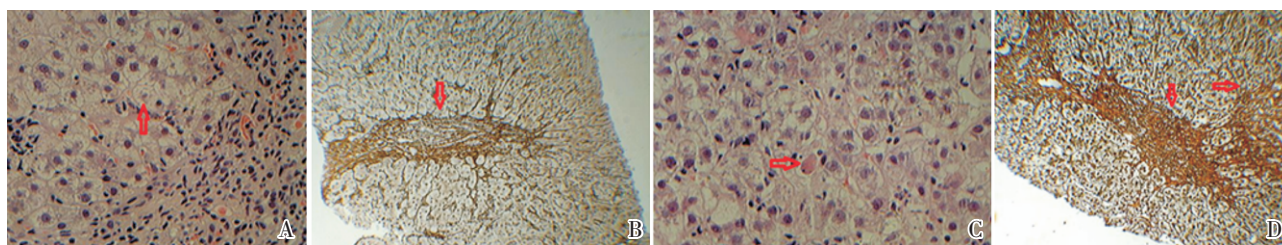


图1 肝组织病理图片

Fig.1 Liver tissue specimens

A: Hepatocyte swelling, intralobular focal necrosis (HE stain, $\times 160$); B: Expanded portal area (Reticular fibers silver stain, $\times 100$); C: Hepatocyte swelling, acidophilic body (HE stain, $\times 200$); D: Significant expanded portal area, fibrous septum form (Reticular fibers silver stain, $\times 100$)

2.3 HBeAg 阳性患者肝组织学炎症分级、纤维化分级与血清 HBV DNA 含量关系

HBeAg 阳性组肝组织炎症活动度 G₀₋₁ 6 例、G₂ 74 例、G₃₋₄ 25 例, 其血清 HBV DNA 载量 (lg copies/mL) 分别为 5.6 ± 1.1、6.5 ± 2.0、7.0 ± 1.5, 三者血清 HBV DNA 载量无差异 (P = 0.250); 肝组织纤维化程度 S₀₋₁ 23 例、S₂ 56 例、S₃₋₄ 26 例, 其血清 HBV DNA 载量分别为 6.6 ± 1.8、6.6 ± 2.0、6.6 ± 1.6, 三者血清 HBV DNA 载量无差异 (P = 0.996, 表 2)。

2.4 HBeAg 阴性患者肝组织学炎症分级、纤维化分级与血清 HBV DNA 含量关系

HBeAg 阴性组肝组织炎症活动度 G₀₋₁ 8 例、G₂ 17 例、G₃₋₄ 28 例, 其血清 HBV DNA 载量 (lg copies/mL) 分别为 2.1 ± 1.9、4.7 ± 2.2、5.6 ± 2.3,

表 1 HBeAg 表达与 HBV DNA 载量的、年龄的关系
Table 1 Correlation between the expression of HBeAg, HBV DNA loads and age

Group	n	Age	HBV DNA loads (lg copies/mL)
HBeAg-positive	105	29.1 ± 7.3	6.6 ± 1.9
HBeAg-negative	53	34.8 ± 7.6	4.8 ± 2.5
P		0.000	0.000

G₂、G₃₋₄ 者血清 HBV DNA 载量较 G₀₋₁ 者高 (P = 0.001), G₂ 与 G₃₋₄ 者血清 HBV DNA 载量无差异 (P = 0.332); 肝组织纤维化程度 S₀₋₁ 10 例、S₂ 25 例、S₃₋₄ 18 例, 其血清 HBV DNA 载量分别为 2.7 ± 3.2、5.1 ± 1.8、5.4 ± 2.4, S₂、S₃₋₄ 者血清 HBV DNA 载量较 S₀₋₁ 者高 (P = 0.005), S₂ 与 S₃₋₄ 者血清 HBV DNA 载量无差异 (P = 0.745, 表 3)。

表 2 HBeAg 阳性患者肝组织学炎症分级、纤维化分级与血清 HBV DNA 含量关系

Table 2 Correlation between the HBV DNA loads and the inflammation grades and fibrosis stages in liver tissue of HBeAg positive patients (lg copies/mL)

Inflammation grades	n	HBV DNA loads	fibrosis stages	n	HBV DNA loads
G ₀₋₁	6	5.6 ± 1.1	S ₀₋₁	23	6.6 ± 1.8
G ₂	74	6.5 ± 2.0	S ₂	56	6.6 ± 2.0
G ₃₋₄	25	7.0 ± 1.5	S ₃₋₄	26	6.6 ± 1.6
P		0.250			0.996

表 3 HBeAg 阴性患者肝组织学炎症分级、纤维化分级与血清 HBV DNA 含量关系

Table 3 Correlation between the HBV DNA loads and the inflammation grades and fibrosis stages in liver tissue of HBeAg negative patients (lg copies/mL)

inflammation grades	n	HBV DNA loads	fibrosis stages	n	HBV DNA loads
G ₀₋₁	8	2.1 ± 1.9	S ₀₋₁	10	2.7 ± 3.2
G ₂	17	4.7 ± 2.2	S ₂	25	5.1 ± 1.8
G ₃₋₄	28	5.6 ± 2.3	S ₃₋₄	18	5.4 ± 2.4

The serum HBV DNA levels in patients with inflammation grades of G₂ and G₃₋₄ were significant higher than in patients with inflammation grades of G₀₋₁ (P = 0.001) and there was no significant difference between that of G₂ and G₃₋₄ (P = 0.332). The serum HBV DNA levels in patients with fibrosis stages of S₂ and S₃₋₄ were significant higher than in patients fibrosis stages of S₀₋₁ (P = 0.005) and there was no significant difference between that of S₂ and S₃₋₄ (P=0.745).

3 讨 论

HBeAg阳性和 HBV DNA 升高被认为是反映 HBV 复制最敏感的检测指标^[1-2], 当 HBeAg 由阳转阴时, 多认为是 HBV 复制减少, 传染性减弱或病变静止。在本研究中, 血清 HBeAg 阳性组 HBV DNA 定量水平明显高于 HBeAg 阴性组, 血清

HBV DNA 载量与 HBeAg 的表达有显著相关性, 提示血清 HBeAg 水平与病毒复制密切相关。但 HBeAg 消失并不能完全代表 HBV 的复制停止或疾病恢复。慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染后经过较长的自然病程, 每年有 10% ~ 15% 的患者 HBeAg 自然消失, 并产生 HBeAb。同时部分患者因病毒基因前 C 区或 C 区启动子区域发生变异而不能产生 HBeAg, 但这种 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎

患者的HBV复制仍活跃,肝脏有明显的炎症改变,其临床特点、自然史、治疗及预后有别于HBeAg阳性乙型肝炎^[3]。在本研究中亦可见,HBeAg阴性组患者中部分HBV DNA载量颇高,最高达 1.2×10^9 copies/mL,与HBeAg阳性的慢性乙型肝炎相比,HBeAg阴性慢性乙型肝炎的病人年龄偏大,HBV DNA载量稍低但水平容易波动。

一般认为,CHB的发病机制主要为病毒复制通过免疫介导病理损伤,缺乏HBV直接致病作用。HBeAg为免疫耐受因子,可阻断细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒作用,产生免疫耐受,因而HBeAg阳性CHB患者血清HBV DNA水平与肝脏损害程度并不相关。在本组中,HBeAg阳性组肝脏的炎症程度、纤维化程度与HBV DNA载量无明显相关性($P > 0.05$),提示HBeAg阳性CHB肝脏的损伤并不是HBV复制的直接结果,而是不同患者对HBV感染产生的复杂的机体免疫反应体现。

目前对慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平与肝脏损害关系的研究较多,但结果不一^[3-4]。大多数研究未能考虑血清HBeAg的影响,将HBeAg阳性与HBeAg阴性CHB患者混同讨论,认为血清HBV DNA水平与肝脏炎症和纤维化程度无明显相关性^[6-7]。近年来研究表明^[3],HBeAg阴性与HBeAg阳性CHB患者在机体免疫状态、HBV致病力、肝脏损害等方面存在较大差异,认为血清HBV DNA水平与肝脏损害相关。HBeAg阴性、HBV DNA(+)的CHB患者多系机体感染HBV突变株所致,这种HBV前C/C基因突变,导致HBeAg合成受阻或不能分泌,如前c区nt1896和1899G→A点突变、C区启动子突变nt1762A→T点突变、nt1764G→A点突变。此种突变株逃避宿主免疫清除,使感染持续存在,血清HBV DNA持续高水平,病变趋于进展加重^[8]。与HBeAg阳性的慢性乙型肝炎相比,HBeAg阴性慢性乙型肝炎的发病率近年有逐步增加的趋势,HBV DNA载量稍低但水平容易波动,肝病更容易出现活动,与肝组织炎症坏死的活动程度呈正相关,发生肝硬化和肝细胞癌更常见^[9]。

本研究结果显示,HBeAg阴性组中炎症G₂、G₃₋₄级患者血清HBV DNA载量明显高于G₀₋₁级患者($P = 0.001$),纤维化S₂、S₃₋₄级患者血清HBV DNA载量亦明显高于S₀₋₁级患者($P = 0.005$)。可见HBeAg阴性CHB患者肝脏炎症和纤维化程度

与血清HBV DNA载量水平相关。提示在HBeAg表达减少或停止的同时,机体的免疫耐受亦有可能被打破,而此类患者多处于疾病的较晚阶段,HBV复制激发的病变再活动可能使患者病情加重和进展。而G₂与G₃₋₄级患者血清HBV DNA载量无差异($P = 0.332$),S₂与S₃₋₄级患者血清HBV DNA载量无差异($P = 0.745$),考虑与除了存在HBV的直接致病作用外,可能还同时存在免疫介导病理损伤有关。

因此,对HBeAg阴性CHB患者,HBV-DNA $> 10^4$ lg copies/mL时建议抗病毒治疗^[5]以减慢肝脏病变进展。

参考文献:

- [1] Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008, 2(4): 553-562.
- [2] Post A, Nagend S. Reactivation of hepatitis B: pathogenesis and clinical implications [J]. Curt Infect Dis Rep, 2009.11(2): 113-119.
- [3] Yuen MF, Ng IO, Fan ST, et al. Significance of HBV-DNA levels in liver histology of HBeAg and anti-HBe positive patients with chronic hepatitis B [J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(10): 2032-2037.
- [4] Feld JJ, Wong DK, Heathcote EJ. Endpoints of therapy in chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl): 96-102.
- [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. 中华肝病杂志, 2005, 13(12): 881-891.
- [6] 张玲, 朱江华, 马韵, 等. 乙型肝炎病毒核酸定量检测与临床的关系 [J]. 中华肝病杂志, 2002, 10(1): 49-51.
- [7] Gayno S, Marcellin P, Lioriot MA, et al. Detection of serum HBV-DNA by polymerase chain reaction (PCR) in patients before reactivation of chronic hepatitis B. [J]. J Hepatol, 1992, 14(2-3): 357.
- [8] Nakashima H, Furusyo N, Kubo N, et al. Double point mutation in the core promoter region of hepatitis B (HBV) genotype C may be related to liver deterioration in patients with chronic hepatitis B infection [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(5): 541-550.
- [9] Lindh M, Horal P, Dhillion AP, et al. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B [J]. J Viral Hepat, 2000, 7(4): 258-267.