

乙型肝炎病毒血清标志物、外周血 T 淋巴细胞 与 HBV-DNA 的相关性分析*

王海宁¹, 李万顺², 孙巨军¹

(1. 西电集团医院检验科, 西安 710077; 2. 陕西省千阳县人民医院, 陕西千阳 721100)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒血清标志物、外周血 T 淋巴细胞与 HBV-DNA 的相关性。方法 273 例乙肝患者采用 ELISA 法测定乙肝血清标志物 HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb 和 HBcAb, 采用流式细胞术测定 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺, CD4⁺ 和 CD8⁺, 并采用荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA, 比较不同血清标志物模式间 HBV-DNA 阳性表达情况, 并分析其相关性。结果 HBsAg(+) HBeAg(+) HBcAb(+) 组的 HBV-DNA 阳性率最高, 为 88.9%, HBV-DNA 高浓度组 CD3⁺ CD4⁺ 细胞百分比及 CD3⁺ CD4⁺/CD3⁺ CD8⁺ 比值低于 HBV-DNA 阴性组 ($P < 0.05$), CD3⁺ CD8⁺ 细胞百分比高于 HBV-DNA 阴性组 ($P < 0.05$); HBV-DNA 拷贝数与 CD3⁺ CD8⁺ 细胞百分比及 HBeAg ($r^2 = 0.550, 0.657, P < 0.01$) 呈正相关, 与 CD3⁺ CD4⁺ 细胞百分比 ($r^2 = -0.602, P < 0.05$), HBeAb ($r^2 = -0.473, P < 0.01$), HBcAb ($r^2 = -0.151, P < 0.05$) 呈负相关。结论 HBV-DNA 与 T 淋巴细胞及 HBeAg 检测相关性较好, 联合检测乙肝血清标志物、外周血 T 淋巴细胞及 HBV-DNA 能提高乙肝的检出率, 有助于全面监测乙肝病情及评价药物疗效。

关键词:乙型肝炎病毒; T 淋巴细胞; HBV-DNA; 乙型肝炎血清标志物

中图分类号: R512.62; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-113-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.032

Correlation Study on Serum Markers of Hepatitis B Virus and Peripheral T Lymphocytes as Well as HBV-DNA in Patients with Hepatitis B

WANG Hai-ning¹, LI Wan-shun², SUN Ju-jun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Xidian Group Hospital, Xi'an 710077, China; 2. the People's Hospital of Qianyang County, Shaanxi Qianyang 721100, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlations study on serum markers of hepatitis B virus (HBV) and peripheral T lymphocytes as well as HBV-DNA in patients with hepatitis B. **Methods** For 273 patients with hepatitis B, ELISA assay was used to determine the levels of HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBcAb, flow cytometry was applied to determine peripheral T lymphocytes, and real-time quantitative PCR was used to determine HBV-DNA, the peripheral T lymphocytes and HBV-DNA expression among different serum marker modes were compared. The correlations among different markers were analyzed. **Results** The mode of HBsAg(+) HBeAg(+) HBcAb(+) had the highest HBV-DNA positive rate of 88.9% among all the modes. The CD3⁺ CD4⁺ T cell percentage and CD3⁺ CD4⁺/CD3⁺ CD8⁺ ratio of high concentration of HBV-DNA were significantly lower than those of HBV-DNA negative group ($P < 0.05$), and the CD3⁺ CD8⁺ T cell percentage of high concentration of HBV-DNA was statistically higher than that of HBV-DNA negative group ($P < 0.05$); HBV-DNA copies was positively correlated with CD3⁺ CD8⁺ T cell percentage and HBeAg ($r^2 = 0.550$ and $0.657, P < 0.01$), and was negatively correlated with CD3⁺ CD4⁺ T cell percentage ($r^2 = -0.602, P < 0.05$), HBeAb ($r^2 = -0.473, P < 0.01$) and HBcAb ($r^2 = -0.151, P < 0.05$). **Conclusion** There was a well correlation among HBV-DNA T lymphocytes and HBeAg, combined detection of these serum markers, peripheral T lymphocytes and HBV-DNA can improve the detection rate of hepatitis B, and thus contributes to monitoring patients conditions and evaluating drug effects.

Keywords: hepatitis B virus; T lymphocytes; HBV-DNA; hepatitis B serum markers

乙型病毒性肝炎(乙肝)是我国重点防控的传染病之一,根据国家卫生和计划生育委员会发布的病毒性感染发病及死亡数据分析,2013 年我国乙肝的发病率约为 12%^[1],近 5 年乙肝的发病率呈波动性下降趋势,但仍然维持在较高的发病水平,乙肝仍是我国病毒性肝炎的主要死因,也是我国面临的主要公共卫生问题之一。目前多数学者认为乙肝发病的主要原因之一是机体不能有效清除入

侵的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV),使病毒在肝内持续复制^[2],而 T 淋巴细胞在维持机体免疫功能方面具有重要作用。HBV-DNA 检测是 HBV 复制和有传染性的最直接的证据^[3],但该检测较复杂,目前部分基层医疗机构无法开展该项检测方法,乙肝血清标志物检测可以更好地反映机体感染 HBV 后的免疫状态。本研究旨在探讨乙肝血清标志物检测、外周血 T 淋巴细胞与 HBV-

* 作者简介:王海宁(1984—),女,硕士,主管检验师,研究方向:分子生物学, E-mail: 44799852@qq.com。

DNA 载量之间的相关性,解决部分医疗机构不能检测 HBV-DNA 的现状,为乙肝的诊断、选择治疗方法及判断预后提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2014 年 3 月~2015 年 8 月在西电集团医院行 HBV-DNA 检测的 273 例门诊及住院患者,均符合 2000 年第十次全国病毒性肝炎及肝病会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[4] 中的诊断标准,其中男性 155 例,女性 118 例;年龄 12~69 岁,平均年龄 38.6 ± 2.4 岁。

1.2 试剂和仪器 主要仪器:Labsystems Dragon 酶标仪,美国 Beckman EPICS XL 分析型流式细胞仪,罗氏 LightCycler II 型荧光定量 PCR 扩增仪;主要试剂:HBsAg,HBsAb,HBeAg,HBeAb,HBcAb 检测试剂盒购自万泰生物工程有限公司,HBV-DNA 检测试剂盒购自达安基因股份有限公司,美国 Beckman 公司进口原装三色标记单克隆抗 CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ 抗体。

1.3 检测方法

1.3.1 乙肝血清标志物检测:采用 ELISA 法测定乙肝血清标志物 HBsAg,HBsAb,HBeAg,HBeAb 和 HBcAb,试剂盒均在有效期内使用,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.2 T 淋巴细胞测定:采用原装三色标记单克隆抗 CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ 抗体,均在有效期内使用,严格按照试剂盒说明书操作,用 Simulset 软件分析 T 细胞亚群,并获得 CD3⁺ 数及 CD4⁺ 和 CD8⁺ 占总淋巴细胞百分比。

1.3.3 HBV-DNA 检测:采用荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 水平,试剂盒均在有效期内使用,严格按照试剂盒说明书操作。操作方法:取 100 μ l 血清标本加入 50 μ l 标本处理液中,在 96 $^{\circ}$ C 下加热 10 min 后,以 12 000 r/min 离心 10 min,取 10 μ l 上清液加入 10 \times PCR 扩增系统,加入 20 μ l 稀释液并振荡摇匀,以 5 000 r/min 离心 2 s 后放于 PCR 扩增仪内进行扩增:90 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 90 $^{\circ}$ C 15 s,52 $^{\circ}$ C 40 s,共循环 40 次,反应结束后分析计

算结果。以 HBV-DNA $< 5 \times 10^2$ copies/ml 为阴性,HBV-DNA $\geq 5 \times 10^2$ copies/ml 为阳性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,计量资料多组间比较经正态性检验后采用方差分析,两两比较采用 LSD 法;采用 Spearman 等级秩相关分析评价乙肝血清标志物与 HBV-DNA 之间的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同乙肝血清标志物模式间 HBV-DNA 阳性率 见表 1。HBsAg 阳性的 243 例患者中,HBV-DNA 阳性率为 64.6%;HBsAg 阴性的 30 例患者中,HBV-DNA 阳性率为 56.7%。HBeAg 阳性的 81 例患者中,HBV-DNA 阳性率为 88.9%;HBeAg 阴性的 192 例患者中,HBV-DNA 阳性率为 53.1%。由以上结果可知,HBeAg 作为 HBV 病毒复制标志的敏感性较 HBsAg 更高。

表 1 不同乙肝血清标志物模式 HBV-DNA 阳性率

血清标志物模式	n	HBV-DNA	
		阳性例数	阳性率(%)
HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBeAb(+)	81	72	88.9
HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)	133	67	50.4
HBsAg(+)/HBeAb(+)	29	18	62.1
HBsAb(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)	11	1	9.1
HBsAb(+)/HBcAb(+)	7	6	85.7
HBeAb(+)/HBcAb(+)	12	10	83.3

2.2 不同 HBV-DNA 水平 T 淋巴细胞亚群检测结果 见表 2。随着 HBV-DNA 水平逐渐升高,CD3⁺ 细胞百分比稍升高,但组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CD3⁺ CD4⁺ 细胞百分比及 CD3⁺ CD4⁺ /CD3⁺ CD8⁺ 比值逐渐降低,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),HBV-DNA 高浓度组与 HBV-DNA 阴性组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);CD3⁺ CD8⁺ 细胞百分比逐渐升高,组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),HBV-DNA 高浓度组与 HBV-DNA 阴性组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 不同 HBV-DNA 水平 T 淋巴细胞亚群检测结果比较

T 淋巴细胞亚群	HBV-DNA 阴性组 (n=99)	HBV-DNA 低浓度组 (n=123)	HBV-DNA 高浓度组 (n=51)	F 值	P 值
CD3+(%)	68.95 \pm 7.04	71.30 \pm 9.55	70.02 \pm 8.81	0.09	>0.05
CD3+ CD4+(%)	39.97 \pm 9.46	37.72 \pm 8.80	31.97 \pm 6.56	12.55	<0.05
CD3+ CD8+(%)	22.49 \pm 6.23	27.05 \pm 8.33	32.48 \pm 9.06	9.74	<0.05
CD3+ CD4+/CD3+ CD8+	1.96 \pm 0.73	1.70 \pm 0.65	1.03 \pm 0.44	9.21	<0.05

注:HBV-DNA 低浓度组:HBV-DNA $< 1 \times 10^6$ copies/ml;HBV-DNA 高浓度组:HBV-DNA $\geq 1 \times 10^6$ copies/ml。

2.3 HBV-DNA 拷贝数与乙肝血清标志物及 T 细胞亚群的相关性 HBV-DNA 拷贝数取对数后与各指标进行 Spearman 等级分析,结果显示,

HBV-DNA 拷贝数与 CD3⁺ CD8⁺ 细胞百分比及 HBeAg 呈明显正相关 ($r^2 = 0.550, 0.657, P < 0.01$),与 CD3⁺ CD4⁺ 细胞百分比 ($r^2 = -0.602, P$

<0.05), HBeAb($r^2 = -0.473, P < 0.01$), HBcAb($r^2 = -0.151, P < 0.05$)呈负相关,与 HBsAg 及 HBsAb 无明显相关性($r^2 = 0.220, 0.164, P > 0.05$)。

3 讨论 HBV-DNA 检查是判断如何治疗乙肝的参考依据,同时也对传染性有一定的参考意义,一般 HBV-DNA 越高,传染性越强。本研究中,HBsAg(+)HBeAg(+)HBcAb(+)模式的患者 HBV-DNA 阳性率明显高于其他血清标志物模式,提示这种感染模式为 HBV 复制活跃期、急性期,传染性强,说明 HBV-DNA 与 HBeAg 呈高度相关,能够较好地评价乙肝患者传染性和 HBV 复制情况^[5]。

本研究结果显示,HBV-DNA 拷贝数与 HBsAg 无明显相关性,这与龚杰等^[6]的研究结果一致。HBeAg 是乙肝患者最主要的血清学检测指标,HBeAg 阳性是乙肝患者具有较强传染性的标志。既往研究表明,乙肝患者血清 HBeAg 含量与 HBV-DNA 载量有较好的相关性,其含量可以反映机体内病毒的复制状态。本研究结果显示,HBV-DNA 拷贝数与 HBeAg 水平呈明显正相关,提示 HBsAg 不能作为评价 HBV 复制和传染性的指标,而 HBeAg 可以作为 HBV-DNA 检测的补充指标。

通常 HBeAg 阳性提示 HBV 在体内复制活跃,检测出的 HBV-DNA 阳性率及拷贝数会很高,然而本研究显示,HBeAg 阳性的 81 例患者中,HBV-DNA 检测阳性率为 88.9%,与 Gu 等^[7]报道的血清 HBeAg 阳性者中 HBV-DNA 阳性率为 92%基本一致;另外 9 例 HBV-DNA 显示阴性,其可能原因为尽管 HBV 复制活跃,但其释放入血的量较少;或者是因为 HBV-DNA 载量已经低于检测下限,但 HBeAg 尚未完全降解所致。此外,HBeAg 阴性组 192 例患者中,102 例(53.1%)HBV-DNA 检测提示阳性,可能是因为 HBV 前 C 区基因发生突变,使机体发生特异性免疫耐受,导致 HBeAg 阴性而体内 HBV 复制仍然活跃^[8]。

在乙肝患者体内,HBV 通过 T 细胞介导的细胞毒性作用或者免疫复合物作用而引起细胞损害^[9]。既往研究显示,乙肝患者在 HBV 感染的不同阶段,其血清 HBV-DNA 水平存在显著差异,并与患者机体的免疫功能和疾病进展具有密切的关系^[10]。CD3⁺CD4⁺细胞在乙肝患者的免疫中起到核心作用。本研究中,随着患者 HBV-DNA 病毒载量不断升高,CD3⁺CD4⁺细胞百分比明显下降,HBV-DNA 高浓度组与 HBV-DNA 阴性组 CD3⁺CD4⁺细胞百分比比较,差异有统计学意义,与丁兆

明^[11]的研究结果一致。结合 Spearman 相关分析结果发现,HBV-DNA 水平与 CD3⁺CD8⁺细胞百分比呈正相关,而与 CD3⁺CD4⁺细胞百分比呈负相关,上述研究结果提示,随着患者 HBV-DNA 水平不断升高,患者体内 CD3⁺CD4⁺细胞不断减少,CD3⁺CD8⁺细胞不断增加,进而使机体不能产生有效的免疫应答,并导致 CD3⁺CD4⁺细胞清除 HBV 的效力大大减弱,引起 HBV-DNA 不断复制,如此引起恶性循环。

总之,HBV-DNA,外周血 T 淋巴细胞及乙肝血清标志物检测在诊断乙肝中各有优势,明确各指标与 HBV-DNA 检测结果之间的关系能够提高上述检测指标的价值,为临床诊断、治疗及判断预后提供依据,各指标联合检测能提高乙肝的检出率,并客观地反映乙肝病情及评价药物疗效。

参考文献:

- [1] 张敏娜,袁月,貌盼勇,等.中国 2004~2013 年病毒性肝炎发病与死亡趋势分析[J].中华流行病学杂志,2015,36(2):144-147.
Zhang MN, Yuan Y, Mao PY, et al. Analysis on morbidity and mortality of viral hepatitis in China, 2004~2013[J]. Chin J Epidemiol, 2015, 36(2): 144-147.
- [2] 游晶,庄林,陈红英,等.国人慢性 HBV 携带者 HBV 复制水平与 T 细胞亚群变化的关系[J].世界华人消化杂志,2007,15(35):3722-3727.
You J, Zhuang L, Chen HY, et al. Relationship between variations in peripheral T-lymphocyte subsets and viral replication levels in Chinese[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2007, 15(35): 3722-3727.
- [3] 何涛君,吴正林,钟小强,等.乙肝患者 HBV 载量与 IgA, IgG, IgM 及 C3, C4 相关性研究[J].现代检验医学杂志,2015,30(4):67-70.
He TJ, Wu ZL, Zhong XQ, et al. Study on the relationship between patients with hepatitis B viral loads and immunoglobulin A, G, M and complement C3, C4[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(4): 67-70.
- [4] 中华医学会肝病学分会传染病与寄生虫病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
Chinese Medical Association of Infectious Diseases and Parasitic Epidemiology Study Group, Liver Cancer Study Group. Prevention and treatment of viral hepatitis[J]. Chin J Hepatol, 2000, 8(6): 324-329.
- [5] Yan LB, Chen EQ, Bai L, et al. Efficacy of entecavir treatment for up to 96 weeks in nucleoside-naive HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with high viral load[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(3): 366-372.
- [6] 龚杰,刘柏林,方艳秋,等.乙肝病毒外膜大蛋白、前

- SI 抗原、HBV-DNA 与血清标志物之间相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(9): 1634-1637.
- Gong J, Liu BL, Fang YQ, et al. Correlation analysis between hepatitis B virus large surface protein: pre-S1 antigen, HBV-DNA and serum markers[J]. Chin J Lab Diagn, 2013, 17(9): 1634-1637.
- [7] Gu J, Sun R, Shen S, et al. The curative effect of adefovir dipivoxil treating HBeAg negative chronic hepatitis B and treating HBeAg positive chronic hepatitis B combining interferon α -2b[J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(4 Suppl): 1493-1497.
- [8] 刘志勇, 王娜, 刘浩, 等. 乙肝血清学标志物定量检测与 HBV-DNA 定量检测结果的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 233-235.
- Liu ZY, Wang N, Liu H, et al. Correlation between serum markers of hepatitis B virus infection and quantitative determination of HBV-DNA[J]. Int J Lab Med, 2014, 35(2): 233-235.
- [9] 王卫国, 张夏, 黄传荣, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的变化[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(6): 135-136.
- Wang WG, Zhang X, Huang CR, et al. Change of peripheral blood lymphocyte subpopulation in chronic hepatitis B patients[J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(6): 135-136.
- [10] Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection[J]. J Gen Virol, 2006, 87(pt6): 1439-1449.
- [11] 丁兆明. 乙肝相关疾病 HBV-DNA 含量与细胞免疫功能相关性研究[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(3): 28-29, 49.
- Ding ZM. Study on the correlation between HBV-DNA of hepatitis B related disease and cellular immunity function[J]. Medical Laboratory Science and Clinics, 2008, 19(3): 28-29, 49.
- 收稿日期: 2016-04-31 修回日期: 2016-05-08
-
- (上接 112 页)
- Zeng FS, Lu XD, Wang Q, et al. Detection of common virus in children's respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2009, 32(8): 877-878.
- [6] 秦茵茵, 吴国锋, 秦笙. 九项呼吸道联检试剂对多种呼吸道感染病原体检测的临床意义[J]. 中华生物医学工程杂志, 2012, 18(2): 124-127.
- Qin YY, Wu GF, Qin S. Clinical significance of nine-item combined reagent for detection of pathogens in various respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2012, 18(2): 124-127.
- [7] Watanabe H, Uruma T, Nakamura H, et al. The role of *Mycoplasma pneumoniae* infection in the initial onset and exacerbations of asthma[J]. Allergy Asthma Proc, 2014, 35(3): 204-210.
- [8] 赵岩, 谢珊辉, 卢丽萍. 儿童肺炎支原体感染 IgM 抗体和 DNA 检测结果的应用分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 80-82, 86.
- Zhao Y, Xie SH, Lu LP. Application analysis of IgM antibody and DNA test results in children *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 80-82, 86.
- [9] 陈瑞海, 李坤. 1 771 例呼吸道感染患儿肺炎支原体抗体检测[J]. 检验医学, 2008, 23(4): 443, 446.
- Chen RH, Li K. Detection of antibody against *Mycoplasma pneumoniae* in 1 771 cases of children with respiratory infection[J]. Laboratory Medicine, 2008, 23(4): 443, 446.
- [10] Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1): 95-133.
- [11] Wong VW, Cowling BJ, Aiello AE. Hand hygiene and risk of influenza virus infections in the community: a systematic review and meta-analysis[J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(5): 922-932.
- [12] 黄小琴. 小儿呼吸道感染多病原的检测及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 3078-3079.
- Huang XQ. Detection and analysis on pathogens in children with respiratory tract infection[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(22): 3078-3079.
- [13] 单咏梅, 周宏, 杨凡, 等. 呼吸道非典型病原体抗体实验室检测及病原分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2297-2299.
- Shan YM, Zhou H, Yang F, et al. Laboratory tests and the analysis of antibody against atypical pathogens in Respiratory tract[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(17): 2297-2299.
- [14] Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, et al. Q fever in Japan: an update review[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 149(3/4): 298-306.
- [15] Goutaki M, Haidopoulou K, Pappa S, et al. The role of TLR4 and CD14 polymorphisms in the pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis in greek infants[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2014, 27(4): 563-572.
- [16] 马志超, 黄白丽, 阮和球, 等. 降钙素原联合呼吸道病原体抗体检测在小儿肺炎的诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 144-145, 148.
- Ma ZC, Huang BL, Ruan HQ, et al. Diagnosis value of PCT combined with respiratory pathogen detection in pneumonia in children[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 144-145, 148.
- 收稿日期: 2015-10-15 修回日期: 2016-06-30