

· 临床论著 ·

慢性乙型肝炎患者肝细胞内 HBcAg 分布与血清病毒学指标的相关性研究

唐奇远 何清 乐晓华 吕德良 张香梅 敖飞健 唐蔚 黄珊

【摘要】 目的 探讨慢性乙型肝炎患者肝细胞内 HBcAg 分布规律与血清病毒学指标的相关性。**方法** 对 958 例慢性乙型肝炎患者的血清学、病毒学、免疫组织化学等资料进行对比分析。**结果** 在肝细胞内 HBcAg 不同分布类型之间,血清 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量均存在显著性差异(χ^2 值分别为 364.01 和 417.41, $P < 0.001$)。其中,此两项指标以 HBcAg 核型和混合型分布组最高,HBcAg 阴性组最低,而 HBcAg 浆型分布组的 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量则介于上述两组之间。**结论** HBcAg 在受染肝细胞内的分布与血清病毒学指标之间具有明显的相关性,随着 HBcAg 分布态势由受染肝细胞核向细胞浆漂移到最终不能检测到,HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量呈逐渐降低的趋势。

【关键词】 乙型肝炎,慢性;肝炎核心抗原,乙型;肝炎 e 抗原,乙型;病毒载量

Relationships between the distribution of HBcAg in hepatocytes and the markers of HBV replication in serum in patients with chronic hepatitis B TANG Qi-yuan,

HE Qing, LE Xiao-hua, LV De-liang, ZHANG Xiang-mei, AO Fei-jian, TANG Wei, HUANG Shan. Shenzhen The Third People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: HE Qing, Email: heqingjoe@163.com; LE Xiao-hua, Email: le.xh@126.com

【Abstract】 Objective To study the relationships between subcellular localization of HBcAg in hepatocytes and markers of HBV replication in serum in patients with chronic hepatitis B. **Methods** All of 958 CHB patients were divided into 4 groups according to the HBcAg subcellular location in hepatocytes. Data of HBeAg positive rates and HBV DNA levels were compared, respectively. **Results** Significant differences of HBeAg positive rates and HBV viral load were determined among 4 groups ($\chi^2 = 364.01$ and 417.41, $P < 0.001$). Higher HBeAg positive rate and HBV DNA level were detected in the groups which HBcAg distributed in nucleus or both nucleus and cytoplasm while the lowest in the group of negative HBcAg. The group which HBcAg distributed in cytoplasm lies between the above groups. **Conclusions** The

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.01.011

作者单位:518020 深圳,深圳市第三人民医院(唐奇远、何清、乐晓华、张香梅、敖飞健、唐蔚、黄珊);深圳市慢性病防治中心(吕德良)

通讯作者:何清,Email:heqingjoe@163.com;乐晓华,Email:le.xh@126.com

subcellular localization of HBcAg in hepatocytes may associate with the markers of HBV replication in serum. With HBcAg shifting from nucleus to cytoplasm and finally being deleted, the HBeAg positive rates and HBV DNA levels decreased gradually.

【Key words】 Hepatitis B, chronic; Hepatitis B core antigen; Hepatitis B e antigen; Viral load

乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)是一种由乙型肝炎病毒 DNA C 区编码的蛋白质,其在慢性乙型肝炎患者肝细胞内的分布状态不尽相同,按病理学及免疫组织化学检查的结果,根据其在肝细胞内分布部位不同分为 4 型,即核型(分布在细胞核)、浆型(分布在细胞浆)和混合型(分布在细胞核以及细胞浆),在部分患者的肝细胞内则表现为 HBcAg 缺如。目前对于不同 HBcAg 分布患者的乙型肝炎病毒血清学指标特点的研究,尚缺乏大样本的文献报道。

本文拟通过对 958 例慢性乙型肝炎行肝组织活检患者的临床及病理资料的统计和分析,深入探讨 HBcAg 在肝细胞内的不同分布与公认的血清病毒学指标(HBeAg 状态、HBV DNA 载量)之间的相关性,进一步阐明 HBcAg 的临床价值。

资料和方法

一、研究对象

选取深圳市第三人民医院 2000 年 1 月至 2009 年 12 月所有临床确诊并经肝组织活检的慢性乙型肝炎病毒感染的患者,研究对象的临床以及病理诊断符合中华传染病与寄生虫病学会、肝病学会 2000 年学术会议修订诊断标准^[1],以及 2005 年慢性乙型肝炎防治指南(北京)的相关标准^[2],均有完整的病史资料。入选标准:(1)年龄 14~70 岁。(2)有 HBsAg 阳性史超过 6 个月,现检查 HBsAg 阳性。排除标准:(1)合并活动性甲型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和(或)HIV 感染。(2)有其他导致慢性肝病的病史或证据。(3)肝细胞肝癌。(4)肝组织活检前 3 个月内曾服用降酶药物,1 年内有抗病毒治疗史。

符合研究标准的病例共 958 例,其中男性 793 例,女性 165 例。年龄为 15~67 岁,平均 34.27 岁。统计 958 例患者的 HBcAg 4 种分布类型(核型、浆型、混合型、阴性表达),分别比较各种类型患者的血清 HBeAg 状态与 HBV DNA 载量,并进行统计学处理。

二、研究方法

采用回顾性研究的方式,收集本院 10 年来接受肝组织活检且符合研究标准的所有慢性乙型肝炎患者的临床及病理资料,根据患者的病史及实验室检查等结果,全面统计分析肝细胞中 HBcAg 分布与临床公认的血清病毒学指标(HBeAg 状态、HBV DNA 载量)之间的相关性。

1. 血清检查方法和标准:在肝组织活检前 7~14 d 内检测血清乙型肝炎病毒免疫学标志及 HBV DNA(PCR 法)。血清乙型肝炎病毒免疫学标志的检测采用爱康全自动酶免仪 ae-150 或雅培 AxSYM 免疫分析仪;HBV DNA 定量检测采用

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,试剂盒由深圳匹基(PG)公司提供。

2. 病理资料的获取方法和评估:所有患者查血常规和凝血酶原时间,合格者在彩色超声引导下用 18 G 一次性穿刺活检枪进行 1 s 肝组织活检,要求穿刺出的肝组织至少有 10 mm,包含 3 个以上完整汇管区肝组织。

3. 病理检查的方法和标准:肝活检标本经 10% 中性甲醛溶液固定、石蜡包埋切片、常规 HE 染色及嗜银染色。全部病例肝组织标本采用 EnVision 免疫组织化学法检测肝组织中 HBcAg 的表达(试剂均购自上海中达公司)。用免疫组织化学法检测肝组织中 HBcAg 时,观察整条肝组织,镜下未见 HBcAg 阳性细胞则判断为 HBcAg 阴性表达;在 HBcAg 阳性表达的肝组织中,超过 95% 的 HBcAg 阳性细胞为细胞核内表达,则结果判断为核型分布;超过 95% 的 HBcAg 阳性细胞在细胞浆内表达,则判断为浆型分布;HBcAg 阳性的细胞数在胞核和/或胞浆中的比例均超过 5%,则结果判断为混合型分布。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,利用卡方检验分析慢性乙型肝炎患者肝细胞 HBcAg 分布与血清病毒学指标的相关性是否存在统计学差异,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。不同 HBcAg 分布类型之间 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量的多重比较,采用 χ^2 分割法(即 Bonferroni 法),将检验水准 α 调整为 $0.05/6$ (即 0.008)。

结 果

一、HBeAg 肝细胞分布与血清乙型肝炎病毒标志物检测

958 例患者中,HBeAg 阳性者 459 例,HBeAg 阴性者 499 例。有 HBV DNA 定量结果的患者为 947 例,其中 HBV DNA 载量 $<5 \times 10^2$ 拷贝/ml 者为 176 例, $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 拷贝/ml 者为 99 例, $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 拷贝/ml 者为 230 例, $>1 \times 10^6$ 拷贝/ml 者为 442 例。HBcAg 表达情况:HBcAg 阴性者 402 例(42.0%),浆型 178 例(18.6%),核型 108 例(11.3%),混合型 270 例(28.2%)。

二、HBcAg 分布规律与 HBeAg 之间的关系

HBcAg 核型与混合型分布的患者 HBeAg 阳性率最高,分别为 88.0% (95/108) 和 80.7% (218/290),浆型分布的患者 HBeAg 阳性率降至 48.9% (87/178),HBcAg 阴性的患者则仅有 14.7% (59/402) 患者 HBeAg 阳性, χ^2 值为 364.01, $P < 0.001$,差异具有统计学意义,说明 HBcAg 不同分布类型的 HBeAg 阳性率不同,HBcAg 与 HBeAg 存在相关性,见表 1。

表 1 958 例患者肝细胞 HBcAg 分布与 HBeAg 状态比较

HBcAg 分布	HBeAg[例(%)]		合计(例)
	阳性	阴性	
核型	95(88.0)	13(12.0)	108
混合型	218(80.7)	52(19.3)	270
浆型	87(48.9)	91(51.1)	178
阴性	59(14.7)	343(85.3)	402
合计	459	499	958

对不同 HBcAg 分布类型患者的 HBeAg 阳性率进行多重比较,采用 χ^2 分割法(即 *Bonferroni* 法),检验水准调整为 0.05/6(即 0.008)。结果显示阴性与浆型、阴性与核型、阴性与混合型、浆型与核型、浆型与混合型之间 HBeAg 阳性率差异有统计学意义(χ^2 值分别为 76.61、216.92、290.95、44.38 和 50.12, P 均小于 0.001);核型与混合型之间 HBeAg 阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 2.826, P = 0.093$)。

三、HBcAg 分布与 HBV DNA 之间的关系

HBcAg 核型及混合型分布的患者 HBV DNA 载量最高,分别有 86.0% (92/107) 及 77.4% (206/266) 的患者 HBV DNA $> 1 \times 10^6$ 拷贝/ml,而分别只有 1.9% (2/107) 及 2.3% (6/266) 的患者 HBV DNA $< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml;HBcAg 浆型分布的患者有 54.3% (95/175) HBV DNA $> 1 \times 10^6$ 拷贝/ml,有 8.0% (14/175) HBV DNA $< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml;HBcAg 阴性分布患者的病毒载量最低,只有 12.3% (49/399) HBV DNA $> 1 \times 10^6$ 拷贝/ml,而 38.6% (154/399) HBV DNA $< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml。经 χ^2 检验, χ^2 值为 417.41, $P < 0.001$,有统计学意义,说明不同 HBcAg 分布患者的 HBV DNA 载量有差异,HBcAg 分布与 HBV DNA 载量存在相关性(表 2)。

表 2 947 例患者肝细胞 HBcAg 分布与 HBV DNA 载量的比较[例(%)]

HBcAg 分布	HBV DNA(拷贝/ml)				合计
	$< 5 \times 10^2$	$5 \times 10^2 \sim 10^4$	$10^4 \sim 10^6$	$> 10^6$	
核型	2(1.9)	2(1.9)	11(10.3)	92(86.0)	107
混合型	6(2.3)	5(1.9)	49(18.4)	206(77.4)	266
浆型	14(8.0)	16(9.1)	50(28.6)	95(54.3)	175
阴性	154(38.6)	76(19.0)	120(30.1)	49(12.3)	399
合计	176	99	230	442	947

对不同 HBcAg 分布类型患者的 HBV DNA 载量进行多重比较,采用 χ^2 分割法(即 *Bonferroni* 法),检验水准 α 调整为 0.05/6(即 0.008)。结果显示阴性与浆型、阴性与核型、阴性与混合型、浆型与核型、浆型与混合型之间的 HBV DNA 载量差异有统计学意义, (χ^2 分别为 132.00、230.31、311.49、30.23、32.51, P 均小于 0.001);核型与混合型之间的 HBV DNA 载量差异无统计学意义, ($\chi^2 = 3.893, P = 0.273$)。

讨 论

HBcAg 为乙型肝炎病毒的结构蛋白,是病毒核壳的结构成分,由 HBV 基因的 C 区编码合成。HBcAg 对包装 RNA、反转录和病毒装配是必需的^[3],其阳性结果能够反映乙型肝炎病毒的复制情况。但是通常血清中难以测知,一般只有直接从 Dane 颗粒中提取和在肝细胞内才能检出^[4]。国内外大量研究证明,肝组织中

HBcAg 表达强度与乙型肝炎病毒的复制水平呈正相关。如厉新妍等^[5]在 248 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝组织 HBcAg 表达的相关性研究中报道,肝组织 HBcAg 表达强度与血清 HBV DNA 含量呈显著的正相关。乐晓华等^[6]在观察 196 例慢性乙型肝炎患者血清指标及肝组织病理后报道,肝组织 HBcAg 表达强度与血清乙型肝炎病毒载量呈正相关。Ozer 等^[7]也曾报道,血清 HBV DNA 载量越高,患者肝细胞内 HBcAg 的阳性率明显升高。将肝组织中 HBcAg 的表达结合 HBV DNA 载量作为抗病毒治疗指标更可靠^[8]。董晓锋等^[9]通过对 72 例慢性乙型肝炎患者的观察发现,血清 HBeAg 阳性者的肝组织 HBcAg 阳性率显著高于血清 HBeAg 阴性者。然而,HBcAg 在肝细胞内的分布特征与乙型肝炎病毒血清学指标(包括血清 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 水平)之间的关系却罕有报道。

国内外多个研究涉及到 HBcAg 的肝细胞分布特征与肝组织炎症之间的关系,Chu 等^[10]在 30 例患者的小样本研究中曾指出,与 HBcAg 核型表达为主的患者相比,HBcAg 浆型表达的患者生化学及组织学炎症水平均明显升高。王功遂等^[11]在 351 例患者的研究中亦指出,HBcAg 浆膜型和胞核型表达分别见于肝脏炎症较活跃和相对静止的慢性乙型肝炎患者。本课题组通过大样本研究发现,HBcAg 的肝细胞表达方式与肝脏炎症指标之间存在显著的相关性^[12]。这可能是因为 HBcAg 在特定的情况下具有高度的免疫原性,特别是在肝细胞浆表达的 HBcAg 被认为是宿主细胞毒性 T 细胞作用的主要靶抗原,可迅速启动细胞免疫反应的结果。据此推测,乙型肝炎病毒感染的肝细胞在机体不断活跃的免疫攻击下被破坏消耗,可能伴随血清 HBeAg 低于检测下限以及病毒载量逐渐降低。

本文统计观察发现,HBcAg 不同分布特征的患者,其血清 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 水平明显不同。HBcAg 免疫组织化学检测结果依次表现为核型及混合型、浆型分布和阴性的患者,其 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量逐渐降低;这种不同 HBcAg 分布形式表现出来的血清 HBeAg 及 HBV DNA 特点的结果验证了 HBcAg 肝细胞内分布与机体免疫清除状态有关的观点。有研究显示经 α 干扰素治疗后,处于免疫清除状态的慢性活动性乙型肝炎患者,HBcAg 发生从核内向胞质的转换^[13],这与本文的观点类似。

HBV 高复制期的 HBcAg 以胞核表达为主^[14],高载量的 HBV DNA 在临床上往往伴随较高的免疫耐受,而 HBV DNA 载量的降低一般与机体免疫清除过程相关。本文 HBcAg 核型及混合型分布的患者,可能处于较高的免疫耐受状态,大部分病例血清 HBeAg 阳性率以及 HBV DNA 载量处在较高的水平。随着 HBcAg 由细胞核向细胞浆漂移过程(HBcAg 的表达逐渐由核型→混合型→浆型→阴性的形式过度)的发生,免疫耐受逐渐被打破,HBV 感染的肝细胞逐步被 T 细胞清除,因此 HBV DNA 载量呈现进行性下降。随着免疫清除的持续进行,HBcAg 最终检测结果为阴性,同时患者的血清 HBV DNA 载量亦渐渐消耗至低水平。

因此,本研究可以得出结论,不同 HBcAg 表达形式的血清 HBeAg 及 HBV

DNA 载量表现出显著的差异。其中,HBcAg 核型以及混合型表达患者 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量最高,HBcAg 浆型分布患者的 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量开始下降,HBcAg 检测阴性患者的 HBeAg 阳性率及 HBV DNA 载量最低。

参 考 文 献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
- 2 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 实用肝脏病杂志,2006,9(1):8-18.
- 3 骆抗先主编. 乙型肝炎基础和临床. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:54-55.
- 4 Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA. J Clin Microbiol,2003,41(5):1901-1906.
- 5 厉新妍,雷瑞祥. 248 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝组织 HBsAg/HBcAg 表达的相关性研究. 实用肝脏病杂志,2009,12(2):98-100.
- 6 乐晓华,陈心春,林巧,等. 慢性乙型肝炎患者肝组织中 HBV 抗原表达特征及其临床意义. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(1):41-43.
- 7 Ozer E, Helvacl M, Yapark I. Hepatitic expression of viral antigens, hepatocytic proliferative activity and histologic changes in liver biopsies of children with chronic hepatitis B after interferon-alpha therapy. Liver,1999,19(2):369-374.
- 8 盛慧萍,杨岩,刘娅,等. 慢性乙型肝炎肝组织 HBsAg 和 HBcAg 的表达. 宁夏医学杂志,2009,31(3):198-200.
- 9 董晓锋,王全楚,张燕. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV 复制标志物与肝组织 HBsAg 和 HBcAg 抗原表达的相关性研究. 实用肝脏病杂志,2007,10(3):178-179.
- 10 Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, et al. Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B. Gastroenterology,1995,109(6):1926-1932.
- 11 王功遂,王曼曼,谢秋里,等. HBsAg、HBcAg 在慢性乙型肝炎肝细胞内的表达及临床意义. 中华肝脏病杂志,2004,12(5):287-289.
- 12 唐奇远,何清,乐晓华,等. 958 例慢性乙型肝炎患者肝细胞内 HBcAg 分布规律的研究. 中西医结合肝病杂志,2010,20(4):204-206.
- 13 Vrettou E, Tzioufa V, Raptopoulou M, et al. Changes of hepatitis B core antigen (HBcAg) in liver biopsies of patients with chronic active hepatitis B treated with interferon. J Investig Allergol Clin Immunol,1995,5(2):108-112.
- 14 Chu CM, Yeh CT, Chien RN, et al. The degrees of hepatocyte nuclear but not cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. J Clin Microbiol,1997,35(1):102-105.

(收稿日期:2010-07-02)

(本文编辑:孙荣华)

唐奇远,何清,乐晓华,等. 慢性乙型肝炎患者肝细胞 HBcAg 分布与血清病毒学指标的相关性研究 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(1):67-72.