

## · 临床论著 ·

# 慢性 HBV 感染自然史各期肝组织 HBcAg 演变规律的探讨

艾书玲 何清 唐奇远 吴繁 唐情容 敖飞健 廖雪姣 赵连三

**【摘要】目的** 通过观察肝组织 HBcAg 分布在慢性 HBV 感染自然史各期的演变,进一步揭示 HBV 感染过程中免疫状态的规律。**方法** 按照《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》描述的慢性乙型肝炎自然史分期的血清学特征,将慢性 HBV 感染者分为免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低(非)复制期以及再活动期。分别统计慢性 HBV 感染各个阶段肝组织 HBcAg 分布的情况。**结果** 共纳入 637 例患者,其中男性 501 例(78.6%),女性 136 例(21.4%)。处于免疫耐受期患者 101 例,免疫清除期 248 例,非活动或低(非)复制期 119 例,再活动期 169 例。各阶段患者肝组织 HBcAg 分布差异均具有统计学意义( $\chi^2 = 347.975$ ,  $P < 0.0001$ )。免疫耐受期肝组织 HBcAg 分布以核型与混合型为主(89.1%);免疫清除期以混合型与浆型为主(74.6%);非活动或低(非)复制期以阴性为主(89.1%);再活动期以浆型与阴性为主(73.4%)。**结论** 在慢性乙型肝炎自然史过程中,肝组织 HBcAg 经过了以核型为主→浆型为主→阴性→浆型为主的规律性变化。HBcAg 的分布特征是 HBV 自然史阶段中机体免疫功能与病毒之间相互作用的重要标志。

**【关键词】** 慢性 HBV 感染;自然史;乙型肝炎病毒核心抗原;演变规律

**Study on evolution rules of pattern of intrahepatic HBcAg distribution at different phases of the natural history in HBV infection** AI Shuling, HE Qing, TANG Qiyuan, WU Fan, TANG Qingrong, AO Feijian, LIAO Xuejiao, ZHAO Liansan. Shenzhen The Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China  
Corresponding author: HE Qing, Email: heqingjoe@163.com

**【Abstract】Objective** To study on the changes of the pattern of intrahepatic HBcAg distribution at different phases of patients with chronic HBV infection, and further to reveal the immune rules of the HBV infection. **Methods** Patients with confirmed chronic HBV infection were included in this study. Referring to Guidelines for Chronic Hepatitis B in China (version 2010), participants were classified into four phases, detailed as immune tolerant phase, immune clearance phase, low or non-replicative phase and reactivation phase. The pattern of intrahepatic HBcAg distribution at different phases of chronic HBV infection were analyzed. **Results** Total of 637 patients were recruited, including 501 (78.6%) males and 136 (21.4%) females. There were 101 patients at immune tolerant phase, 248 patients at immune clearance phase, 119 patients at low or non-replicative phase and 169 patients at reactivation phase, respectively. The significant difference was determined in the distribution types of HBcAg among the four phases ( $\chi^2 = 347.975$ ,  $P < 0.0001$ ). The main patterns of HBcAg distribution in the liver were nucleic type plus mixed type (89.1%), cytoplasmic type plus mixed type (74.6%), negative type (89.1%) and cytoplasmic type plus negative type (73.4%) in the four phases, respectively. **Conclusions** The pattern of HBcAg distribution changed from the nucleic to cytoplasmic to negative to cytoplasmic during the natural history of chronic HBV infection. The pattern of HBcAg distribution, in some way, may act as an important indicator of the phase of chronic HBV infection.

**【Key words】** Chronic HBV infection; Natural history; HBcAg; Evolution rules

迄今国内外指南对慢性乙型肝炎自然史的描述中<sup>[1-3]</sup>,较少有肝组织乙型肝炎病毒核心抗原

(HBcAg)变化规律的研究。HBcAg 是乙型肝炎病毒(HBV)的核心成分,包着 HBV 病毒核酸,HBcAg 阳性反映了 HBV 的复制情况<sup>[4]</sup>。在特定的情况下,具有高度的免疫原性<sup>[5]</sup>。本文通过对 637 例慢性 HBV 感染者慢性乙型肝炎自然史过程中肝

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.023

作者单位: 518112 深圳市, 广东医学院附属深圳市第三人民医院(艾书玲、何清、唐奇远、吴繁、唐情容、敖飞健、廖雪姣); 四川大学华西医院(赵连三)

通讯作者: 何清, Email: heqingjoe@163.com

组织 HBcAg 的研究, 力求诠释慢性 HBV 感染自然史各个时期的演变规律, 现将结果报道如下。

## 资料和方法

### 一、研究方法

收集广东医学院附属深圳市第三人民医院2000年1月至2011年1月确诊为慢性乙型病毒性肝炎并进行肝组织活检的637例患者的临床及病理资料, 根据《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》<sup>[1]</sup>(以下简称《2010指南》)所描述的自然史分期的血清学标准将入组患者分为4期, 分析各期血清学、病理学以及肝组织免疫组织化学HBcAg分布特点。

### 二、研究对象

选取广东医学院附属深圳市第三人民医院10年来所有进行经皮肝组织活检的慢性HBV感染的患者, 并将其分为免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低(非)复制期、再活动期等4期。

入选标准: 免疫耐受期入选标准: ①血清HBsAg阳性超过6个月, HBeAg阳性。②HBV DNA载量 $> 10^7$ 拷贝/ml。③1年内至少3次检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT) $\leq 40$  U/L。免疫清除期入选标准: ①血清HBsAg阳性超过6个月, HBeAg阳性。②血清HBV DNA载量 $> 10^4$ 拷贝/ml。③ALT $> 40$  U/L。非活动或低(非)复制期入选标准: ①血清HBsAg阳性超过6个月。②HBeAg阴性, 抗-HBe阳性。③HBV DNA $< 500$ 拷贝/ml。④1年内至少3次检测血清ALT $\leq 40$  U/L。再活动期入选标准: ①血

清HBsAg阳性超过6个月, HBeAg阴性, 抗-HBe阳性。②HBV DNA $> 500$ 拷贝/ml。③ALT $> 40$  U/L。

排除标准: ①重叠其他嗜肝病毒感染(如甲型、丙型、丁型、戊型、己型、庚型病毒)和(或)HIV感染; ②合并有其他慢性肝病病史(如肝豆状核变性、药物性肝炎、酒精性肝病以及脂肪肝等); ③原发性肝细胞癌; ④临床资料不全; ⑤1年内服用抗病毒药物超过3个月, 肝组织活检前半年内服用降酶药物。

### 三、血清检查的方法和标准

在肝组织活检前1~2周内检测血清ALT、HBV免疫学标志物及HBV DNA载量。血清ALT检测采用速率法, 仪器使用Beckman生化自动分析仪, ALT正常值为 $\leq 40$  U/L; HBV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ABI7500荧光定量PCR仪, 试剂盒由深圳匹基(PG)公司提供。

### 四、病理资料的获取方法和评估

入组患者肝组织活检前均检查血常规和凝血功能, 合格者在彩色多普勒超声下定位, 用18 G一次性组织活检枪进行1 s肝组织活检, 穿刺出的肝组织至少长12~15 mm, 包含6个以上完整汇管区肝组织。

### 五、病理检查的方法和标准

穿刺所得肝组织立即用10%中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 常规苏木精-伊红染色及嗜银染色。根据2000年中华医学会病毒性肝炎防治方案组织病理学诊断标准<sup>[6]</sup>对肝组织炎症活动度进行分

表 1 637 例患者的一般资料 [例 (%)]

| 基本资料      | 自然史分期     |            |            |            |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|
|           | 免疫耐受期     | 免疫清除期      | 低(非)复制期    | 再活动期       |
| 性别        |           |            |            |            |
| 男         | 55 (54.5) | 187 (75.4) | 102 (85.7) | 157 (92.9) |
| 女         | 46 (45.5) | 61 (25.6)  | 17 (14.3)  | 12 (7.1)   |
| 年龄(岁)     |           |            |            |            |
| $\leq 30$ | 60 (59.4) | 130 (52.4) | 38 (31.9)  | 40 (23.7)  |
| 30 ~ 40   | 32 (31.7) | 79 (31.9)  | 47 (39.5)  | 71 (42.0)  |
| $\geq 40$ | 9 (8.9)   | 39 (15.7)  | 34 (28.6)  | 58 (34.3)  |
| 肝组织炎症分级   |           |            |            |            |
| G0        | 29 (28.7) | 5 (2.0)    | 16 (13.4)  | 3 (1.8)    |
| G1        | 66 (65.3) | 160 (64.5) | 97 (81.5)  | 87 (51.5)  |
| G2        | 4 (4.0)   | 70 (28.2)  | 6 (5.0)    | 66 (39.1)  |
| G3 ~ G4   | 2 (2.0)   | 13 (5.2)   | 0 (0.0)    | 13 (7.7)   |
| 肝组织纤维化分期  |           |            |            |            |
| S0        | 32 (31.7) | 15 (6.0)   | 7 (5.9)    | 6 (3.6)    |
| S1        | 55 (54.5) | 141 (56.9) | 38 (31.9)  | 51 (30.2)  |
| S2        | 8 (7.9)   | 54 (21.8)  | 30 (25.2)  | 56 (33.1)  |
| S3 ~ S4   | 6 (5.9)   | 38 (15.3)  | 44 (37.0)  | 56 (33.1)  |

表 2 不同 HBcAg 分布肝组织炎症程度的比较 [例 (%)]

| HBcAg 分布 | 肝组织炎症分级   |            |           |         | 合计  |
|----------|-----------|------------|-----------|---------|-----|
|          | G0        | G1         | G2        | G3 ~ G4 |     |
| 核型       | 14 (16.1) | 59 (67.8)  | 11 (12.6) | 3 (3.4) | 87  |
| 混合型      | 19 (9.3)  | 117 (57.1) | 60 (29.3) | 9 (4.4) | 205 |
| 浆型       | 4 (3.5)   | 66 (57.4)  | 38 (33.0) | 7 (6.1) | 115 |
| 阴性       | 16 (7.0)  | 168 (73.0) | 37 (16.1) | 9 (3.9) | 230 |
| 合计       | 53        | 410        | 146       | 28      | 637 |

级(G)及对纤维化程度进行分期(S)。

全部肝组织标本采用EnVision免疫组织化学法检测肝组织中HBcAg的表达(试剂购于上海中达公司)。显微镜下观察整条肝组织,①未见HBcAg阳性细胞则判断为HBcAg阴性;②超过95%的HBcAg阳性细胞在细胞核内表达,则结果判断为核型分布;③超过95%的HBcAg阳性细胞在细胞浆内表达,则为浆型分布;④HBcAg阳性的细胞数在胞核和(或)胞浆中的比例均超过5%,则判断为混合型分布。所有肝组织标本都由独立的两位病理科医生单独阅片得出结论。如果两位医生得出的结论不同时,则两位医生再次阅片,经讨论得出一致的结论,或由第3位病理科医生帮助作出最终判断。

#### 六、统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行分析,用卡方检验分析HBcAg分布与肝组织炎症、纤维化以及自然史分期是否存在统计学差异,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。不同分期间HBcAg分布的多重比较采用 $\chi^2$ 分割法(即Bonferroni法),将检验水准 $\alpha$ 调整为0.05/6(即0.008)。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 结 果

#### 一、患者的一般资料

本研究共有637例患者符合入选标准,其中男性501例(78.6%),女性136例(21.4%)。免疫耐受期患者101例,年龄15~43岁,平均年龄( $30.1 \pm 5.3$ )岁, $\geq 40$ 岁患者9例,占8.9%;免疫清除期患者248例,年龄17~62岁,平均年龄( $31.7 \pm 7.5$ )岁, $\geq 40$ 岁患者39例,占15.7%;非活动或低(非)复制期患者119例,年龄21~63岁,平均年龄( $35.7 \pm 8.6$ )岁, $\geq 40$ 岁患者34例,占28.6%;再活动期患者169例,年龄21~64岁,平均年龄( $37.0 \pm 8.2$ )岁, $\geq 40$ 岁患者58例,占34.3%,见表1。

#### 二、HBcAg分布与肝组织炎症程度的比较

将肝组织HBcAg不同分布的患者按肝组织炎症

水平G分为4组(见表2),经 $\chi^2$ 检验,4组间总的肝组织炎症程度差异具有统计学意义( $\chi^2 = 34.195$ ,  $P < 0.001$ )。

对不同HBcAg分布的肝组织炎症程度进行 $\chi^2$ 分割法(即Bonferroni法)比较,检验水准 $\alpha$ 调整为0.05/6(即0.008),核型与浆型、混合型与阴性、浆型与阴性之间肝组织炎症程度不同( $\chi^2$ 分别为18.907、13.445和15.290,  $P$ 分别为0.000、0.004、0.002)。核型与混合型、核型与阴性、混合型与浆型之间肝组织炎症程度差异均无统计学意义( $\chi^2$ 分别为10.760、6.338和4.205,  $P$ 分别为0.013、0.096和0.240)。

#### 三、HBcAg分布与肝组织纤维化分期的比较

将HBcAg分布不同的患者按肝组织纤维化分期S分为4组(见表3),经卡方检验,4组间总的肝组织纤维化分期差异具有统计学意义( $\chi^2 = 110.218$ ,  $P < 0.001$ )。

对不同HBcAg分布的肝组织纤维化分期进行 $\chi^2$ 分割法(即Bonferroni法)比较,检验水准 $\alpha$ 调整为0.05/6(即0.008),核型与混合型、核型与浆型、核型与阴性、混合型与浆型、混合型与阴性之间的肝组织纤维化分期差异均具有统计学意义( $\chi^2$ 分别为18.200、68.301、58.937、44.428和28.973,  $P$ 均 $< 0.001$ )。浆型与阴性之间肝组织纤维化分期差异无统计学意义( $\chi^2 = 6.560$ ,  $P = 0.087$ )。

#### 四、不同自然史分期患者肝组织免疫组织化学HBcAg分布的比较

将自然史不同分期的患者按肝组织免疫组织化学HBcAg分布分为4组(见表4),经卡方检验,4组间肝组织免疫组织化学HBcAg分布差异具有统计学意义( $\chi^2 = 347.975$ ,  $P < 0.001$ )。

对不同自然史分期的患者肝组织HBcAg分布进行 $\chi^2$ 分割法(即Bonferroni法)比较,检验水准 $\alpha$ 调整为0.05/6(即0.008),免疫耐受期与免疫清除期、免疫耐受期与非活动或低(非)复制期、免疫耐受期与再活动期、免疫清除期与非活动或低(非)复

表3 不同HBcAg分布肝组织纤维化分期的比较[例(%)]

| HBcAg 分布 | 肝组织纤维化分期  |            |           |           | 合计  |
|----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----|
|          | S0        | S1         | S2        | S3 ~ S4   |     |
| 核型       | 24 (27.6) | 50 (57.5)  | 8 (9.2)   | 5 (5.7)   | 87  |
| 混合型      | 23 (11.2) | 112 (54.6) | 45 (22.0) | 25 (12.2) | 205 |
| 浆型       | 2 (1.7)   | 33 (28.7)  | 37 (32.2) | 43 (37.4) | 115 |
| 阴性       | 11 (4.8)  | 90 (39.1)  | 58 (25.2) | 71 (30.9) | 230 |
| 合计       | 60        | 285        | 148       | 144       | 637 |

表4 自然史各阶段肝组织HBcAg分布的比较[例(%)]

| 自然史分期   | 肝组织HBcAg 分布 |            |           |            | 合计  |
|---------|-------------|------------|-----------|------------|-----|
|         | 核型          | 混合型        | 浆型        | 阴性         |     |
| 免疫耐受期   | 44 (43.6)   | 46 (45.5)  | 4 (4.0)   | 7 (6.9)    | 101 |
| 免疫清除期   | 31 (12.5)   | 124 (50.0) | 61 (24.6) | 32 (12.9)  | 248 |
| 低(非)复制期 | 0 (0.0)     | 2 (1.7)    | 11 (9.2)  | 106 (89.1) | 119 |
| 再活动期    | 12 (7.1)    | 33 (19.5)  | 39 (23.1) | 85 (50.3)  | 169 |
| 合计      | 87          | 205        | 115       | 230        | 637 |



制期、免疫清除期与再活动期、非活动或低(非)复制期与再活动期之间的肝组织HBcAg分布差异均具有统计学意义( $\chi^2$ 分别为51.222、174.027、104.549、203.306、77.814和50.281,  $P$ 均 $<0.001$ )。

## 讨 论

慢性HBV感染自然史是机体免疫与HBV相互作用的过程,随着慢性乙型肝炎自然史不同阶段的进展,肝组织炎症及纤维化发生规律性的变化<sup>[3]</sup>。肝组织HBcAg作为机体免疫活性细胞,识别被HBV感染肝细胞的重要抗原,在肝脏反复炎症变化中发挥重要作用。其在慢性HBV感染自然史的过程中又将是怎样变化的呢?

近年对肝组织HBcAg的研究较为活跃,Chu等<sup>[7]</sup>研究表明,HBcAg呈浆型表达的患者生化学及组织学炎症水平均显著升高,而与HBcAg呈核型表达的程度呈显著负相关。唐奇远等<sup>[8]</sup>研究发现,肝细胞HBcAg呈混合型分布和浆型分布的病例,其机体的免疫状况更为活跃,HBcAg由细胞核向细胞浆漂移过程是肝组织炎症趋于活跃的重要标志。本研究观察到肝组织HBcAg的分布与肝组织炎症程度存在相关性,核型分布患者肝组织以轻微炎症为主( $\leq G1$ 占83.9%),浆型分布的患者肝组织炎症明显活跃,与上述观点一致。

HBcAg分布与肝组织纤维化具有相关性,呈核型分布的肝组织纤维化程度较轻,而浆型分布的患者肝组织纤维化明显加重,推测浆型分布的HBcAg作为HBV攻击的靶抗原,容易受到杀伤性T淋巴细胞的攻击,从而导致肝纤维化进展,而核型分布HBcAg表现则相反。

本研究显示,HBV感染自然史不同分期肝组织HBcAg分布是有区别的。免疫耐受期患者HBcAg分布以核型和混合型为主(分别占43.6%和45.5%);免疫清除期以混合型和浆型为主(分别占50.0%和24.6%);非活动或低(非)复制期以阴性最多(89.1%);再活动期以浆型和阴性为主(分别占23.1%和50.3%)。

本研究观察到HBV感染自然史存在如下现象,从免疫耐受期到免疫清除期,随着肝脏炎症程度逐渐加重,HBcAg分布表现为逐渐以核型为主到以浆型为主的特点。到非活动或低(非)复制期时,肝脏炎症静止,HBcAg分型则表现为以阴性为主。再活动期时,HBV重新复制,肝脏炎症又复活跃,此时HBcAg浆型分布增多。肝组织HBcAg分布在HBV感染自然史的发展过程中表现出特有的演变规律。

本研究也注意到,处于HBV感染自然史各阶

段的肝组织HBcAg分布存在相互交叉重叠的现象,免疫耐受期的患者也有4例(4%)为HBcAg浆型分布,而免疫清除期呈现为核型分布的也有34例(12.5%)。

通常认为,临床医生一般选择慢性乙型肝炎自然史阶段处于免疫清除期与再活动期作为抗病毒治疗的最佳时期。然而,目前有学者认为部分免疫耐受期患者仍然需要抗病毒治疗<sup>[9-11]</sup>。肝组织HBcAg分布能够预测抗病毒治疗的反应性<sup>[12]</sup>,本研究也提示,处于免疫耐受期的部分患者仍然存在应答较好的HBcAg浆型分布<sup>[13-14]</sup>,临床可据此作为选择治疗的重要补充指标。

综上所述,随着慢性乙型肝炎自然史的进展,机体免疫系统与HBV相互作用,慢性HBV感染表现出由免疫耐受期→免疫清除期→非活动或低(非)复制期→再活动期的自然过程,在这个过程中,肝组织HBcAg经过了以核型为主→浆型为主→阴性→浆型为主的规律性变化。HBcAg的分布特征是HBV自然史阶段中机体免疫功能与病毒之间相互作用的重要标志。

## 参 考 文 献

- 1 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(2010年版)[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 9-23.
- 2 Liaw YE. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment[J]. Liver Int, 2009, 29(Suppl 1): S100-S107.
- 3 McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2009, 49(Suppl 5): S45-S55.
- 4 Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum MR, et al. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature[J]. Hepatology, 2003, 37(6): 1309-1319.
- 5 Maini MK, Boni C, Lee CK, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection[J]. J Exp Med, 2000, 191(8): 1269-1280.
- 6 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[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- 7 Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, et al. Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B[J]. Gastroenterology, 1995, 109(6): 1926-1932.
- 8 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[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(4): 204-206.
- 9 Wang C, Deubner H, Shuhart M, et al. High prevalence of significant fibrosis in patients with immunotolerance to chronic hepatitis B infection[J]. Hepatology, 2005, 42(Suppl 1): S73A.
- 10 李嘉, 赵桂鸣, 朱理珉, 等. 免疫耐受期和非活动复制期乙型肝炎病毒感染者的肝脏病理与临床特征[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(5): 326-329.
- 11 黄珊, 何清, 唐奇远, 等. 112例慢性HBV感染免疫耐受期患者肝组织病理学特点[J/CD]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2011, 3(4): 16-21.
- 12 Uzun Y, Bozkaya H, Erden E, et al. Hepatitis B core antigen expression pattern reflects the response to anti-viral treatment[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(6): 977-981.
- 13 李慧娟, 王松, 何清, 等. PEG-干扰素-2a治疗低转氨酶乙型肝炎患者的回顾性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(2): 28-31.
- 14 唐奇远, 何清, 艾书玲, 等. 干扰素治疗丙氨酸氨基转移酶轻度升高的HBcAg阳性慢性乙型肝炎的回顾性研究[J]. 中国病毒病杂志, 2013, 3(3): 213-218.

(收稿日期: 2013-11-26)

(本文编辑: 孙荣华)