

## 不明原因肝病患者肝组织 HBV 及 HCV 抗原的检测及临床和病理特点

李炜 王霞 王琰 朱新宇 王守义 陈常云

**【摘要】 目的** 了解不明原因肝病患者中 HBV 及 HCV 隐匿性感染所占的比例及临床、病理特点。**方法** 对 31 例不明原因肝病患者,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc)及丙型肝炎病毒抗体;血清 HBV DNA 采用荧光定量 PCR 法检测,HCV RNA 采用 RT-PCR 法检测;应用免疫组织化学二步法检测肝组织中的 HBsAg、HBcAg、HCV 抗原,并进行常规病理检查。**结果** 肝组织 HBV 抗原阳性者 11 例(35.5%);HBV、HCV 抗原均阳性者 10 例(32.3%),全阴性者 10 例(32.3%)。存在 HBV 隐匿性感染的 21 例患者中,慢性肝炎患者 7 例,肝硬化患者 12 例,肝细胞性肝癌患者 2 例。**结论** HBV、HCV 感染为不明原因肝病的主要原因,尤其是 HBV 感染。HBV 隐匿性感染与慢性肝炎、肝硬化、肝癌关系密切,应引起重视。

**【关键词】** 不明原因肝病;乙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒;隐匿性感染;免疫组织化学

**Clinical and pathological characteristics of immunohistochemistry staining for HBV and HCV antigen on liver tissue of unknown etiology** LI Wei, WANG Xia, WANG Yan, ZHU Xin-yu, WANG Shou-yi, CHEN Chang-yun. The First Clinical Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: ZHU Xin-yu, Email: zxy6608056@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the incidence of occult hepatitis B virus infection among chronic liver diseases of unknown etiology. **Methods** The serum HBV markers (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc) and anti-HCV were detected by ELISA. Serum HBV DNA was detected by FQ-PCR, HCV RNA with RT-PCR and HBsAg, HBcAg, HCV antigen in liver tissue with immunohistochemistry and some routine pathological examination were carried out. **Results** In 31 patients, 11 cases (35.5%) were positive with HBV antigen, 10 cases (32.3%) were positive with both HBV antigen and HCV antigen, also 10 cases (32.3%) were negative with

基金项目:山西省教育委员会科研基金(2008831)

作者单位:030001 太原市,山西医科大学第一临床医院(李炜、朱新宇、王守义);太原市传染病医院(王霞、王琰);山东日照市中医医院(陈常云)

通讯作者:朱新宇,Email:zxy6608056@163.com

both HBV antigen and HCV antigen. In 21 patients with occult HBV infection, 7 cases were chronic hepatitis, 12 cases were liver cirrhosis, 2 cases were hepatocellular carcinoma. **Conclusions** Occult HBV and HCV infection may account for a high proportion in chronic liver diseases of unknown etiology, especially HBV infection. Occult HBV infection may induce liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, so more attentions should be paid to.

**【Key words】** Chronic liver diseases of unknown etiology; HBV; HCV; Occult infection; Immunohistochemistry

临床上,约5%慢性肝病患者依据临床表现、常规生化和血清学检查仍不能明确病因<sup>[1]</sup>,困扰着临床医师和患者。近年来,随着PCR和免疫组织化学技术的应用,部分患者血清或肝组织HBV DNA阳性和(或)肝组织HBV抗原阳性,为隐匿性HBV感染(occult hepatitis B virus infection)。我国人群HBV感染率高达57.6%,是HBV隐匿性感染的基础,因此应引起重视。为此笔者对一组不明原因肝病患者的肝活检标本进行了病理组织学特征和免疫组织化学研究。

## 资料与方法

### 一、研究对象

31例研究对象均为2004~2007年在山西医科大学第一医院因不明原因肝病住院的患者,其中男性17例,女性14例,年龄9~69( $30.12 \pm 10.02$ )岁;病程1~6年;所有患者血清乙型肝炎病毒标志物及丙型肝炎病毒标志物均为阴性。其中1例患者有输血史,1例患者母亲曾患有急性乙型病毒性肝炎。所有患者排除其他病毒性肝炎、自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝病及代谢性肝病等。所有患者在超声诊断仪引导下采用弹射式组织活检枪进行肝活检。

### 二、研究方法

1. 血清学检查:HBV-M, HCV-M采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测(试剂由美国Abbott公司生产),血清HBV DNA采用荧光定量PCR法检测(试剂盒购自达安公司),HCV RNA采用RT-PCR法检测(试剂盒购自华美公司)。均按试剂盒说明进行操作并判断结果。肝功能采用Olympus AU640型自动分析仪检测。

2. 肝组织免疫组织化学及常规病理学检查:肝组织经10%甲醛固定、脱水、石蜡包埋、5  $\mu\text{m}$ 厚连续切片,每例切片分别作HE染色及免疫组织化学检查。鼠抗-HBsAg单克隆抗体、兔抗-HBcAg多克隆抗体、鼠抗-HCV抗原多克隆抗体及免疫组织化学PV-9000试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。抗-HBs、抗-HBc和抗-HCV抗体工作浓度分别为1:100、1:100和1:1000。按说明书进行操作和结果判断。HBsAg阳性细胞为细胞膜或胞浆棕黄色染色。HBcAg阳性细胞为胞浆见棕黄色着色或伴有细胞核阳性着色。HCV抗原阳性细胞为细胞膜或胞浆棕黄色染色。阴性对照为正常肝组织,其血清学病毒标记物及肝组织免疫组织化学检测均阴性;另外,用兔血清及PBS液代替一抗以确保特异性及可靠性。组

织学诊断,慢性肝炎炎症分级(G)和纤维化分期(S)划分依据2000年第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的病毒性肝炎防治方案。

## 结 果

### 一、血清学检查

血清 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 及抗-HCV 均阴性。HBV DNA、HCV RNA 均阴性。

### 二、肝活检结果

1. 免疫组织化学结果:HBV 抗原阳性患者 11 例;HBV 抗原、HCV 抗原均阳性患者 10 例,全阴性患者 10 例。肝组织 HBsAg 表达形式有胞浆均匀型及胞浆包涵体型,未见胞膜型,呈弥漫、散在性或集落性分布;HBcAg 多数呈胞浆表达,少数呈胞核表达,分布同 HBsAg;HCV 抗原为胞浆表达,表达形式及分布同 HBsAg(见图 1~3)。

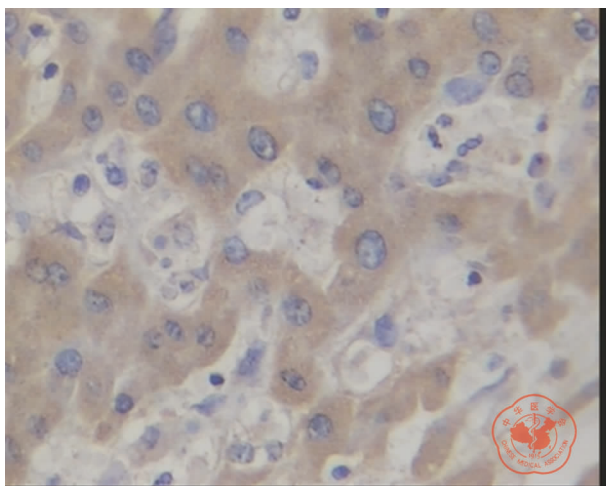


图1 HBsAg 胞浆均匀型,弥漫性分布(DAB 染色,PV-9000,200×)

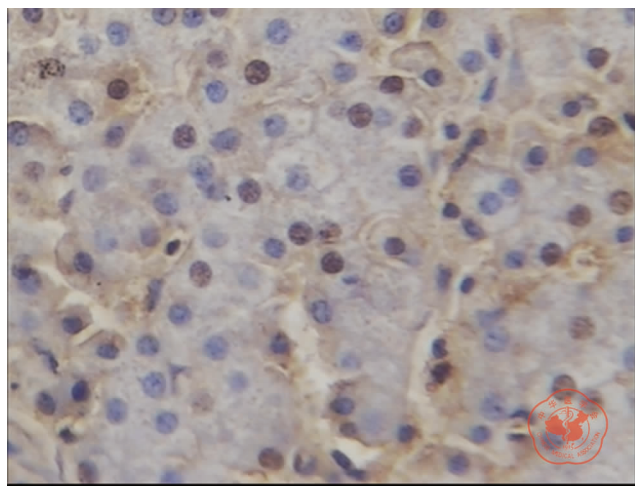


图2 HBcAg 胞核型,散在性分布(DAB 染色,PV-9000,200×)

2. 组织学特征:存在 HBV 隐匿性感染的 21 例患者中,7 例为慢性肝炎轻度至中度,炎症分级为 G1~G3,纤维化分期 S0~S3;有 12 例患者表现为肝硬化,炎症分级为 G3~G4;纤维化分期 S3~S4;2 例患者经病理组织学诊断为肝细胞性肝癌(见图 4~6)。

3. 肝组织 HBsAg、HBcAg、HCV 抗原表达与病理组织学特征的关系(见表 1)。

### 三、临床特点

存在 HBV 隐匿性感染的 21 例患者,临床表现各异,有乏力、纳差、肝区不适者 7 例,呕血、黑便者 11 例,上腹部疼痛不适 4 例,黄疸 2 例,移动性浊音阳性 6 例,腹壁静脉曲张 2 例,双下肢水肿 4 例,肝掌阳性 2 例,出现肝大者 5 例。所有

患者肝功能均异常,见表2。

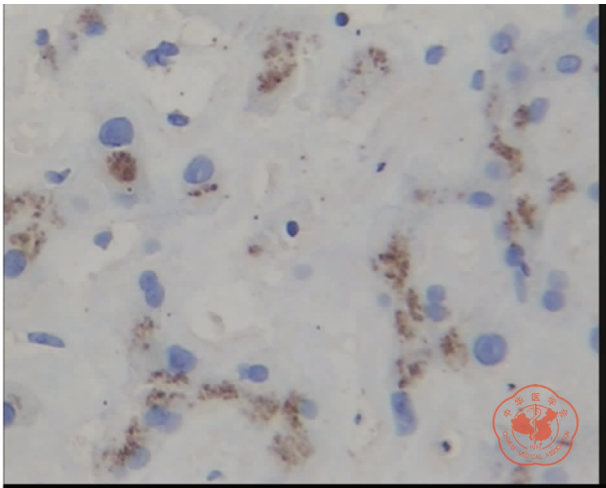


图3 HCV Ag 胞浆包涵体型,散在性分布 (DAB 染色,PV-9000,200 ×)

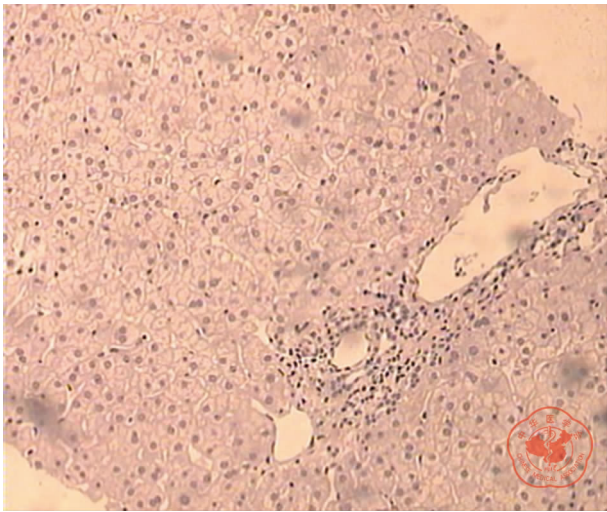


图4 汇管区炎性细胞浸润,小叶界板完整,肝细胞有水样变性。G1S0 (HE 染色,100 ×)

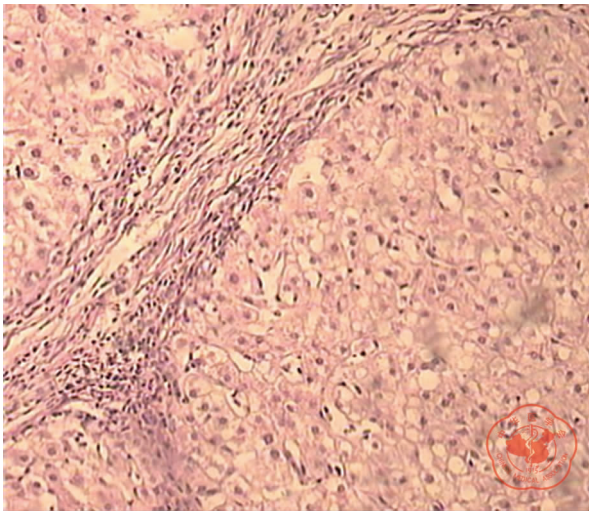


图5 汇管区炎性细胞大量浸润,纤维组织增生,向小叶内伸展,形成假小叶。G3S4 (HE 染色,100 ×)

表1 肝组织 HBsAg、HBcAg、HCV 抗原表达与病理组织学特征的关系(例)

病理诊断	总例数	肝组织阳性表达				炎症分期,纤维化分期
		HBsAg 和 ( 或 ) HBcAg	HCV 抗原	HBsAg 和 ( 或 ) HBcAg、 HCV 抗原	HBV 抗原阳 性比例	
慢性肝炎	8	2	0	5	7/8	G1 ~ G2,S0 ~ S3
肝硬化	19	7	0	5	12/19	G3 ~ G4,S3 ~ S4
肝细胞癌	4	2	0	0	2/4	
合计	31	11	0	10	21/31	



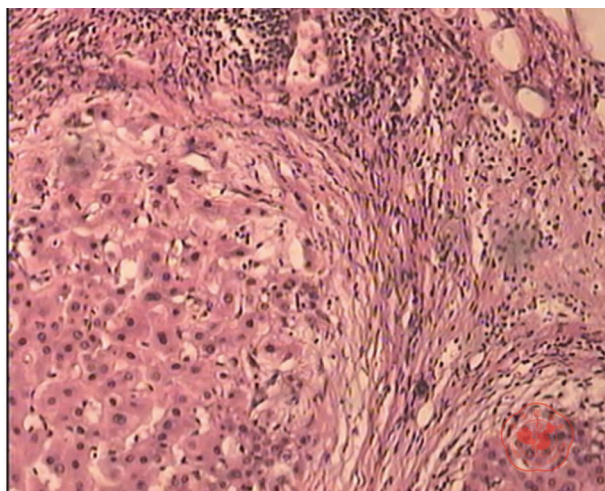


图6 肝细胞癌,胞质较丰富,嗜酸性。(HE染色, 100×)

表2 21例HBV隐匿性感染患者肝功能水平

肝功能指标	水平
ALT	(227 ± 94.6) U/L
AST	(103.5 ± 80.2) U/L
A/G	(1.40 ± 0.25)
TBil	(20.1 ± 4.4) $\mu$ mol/L
DBil	(19.6 ± 2.7) $\mu$ mol/L

## 讨 论

一般而言,HBsAg消失意味着病毒血症的清除。然而,近年来越来越多的研究表明,部分HBsAg自然转阴的急、慢性乙型肝炎患者,或经过抗病毒治疗后HBsAg转阴的患者,其血清中仍可以检测到低水平的HBV DNA。随着对HBV更敏感检测方法<sup>[2]</sup>的应用以及对HBV基因变异的深入认识,发现很多HBsAg阴性患者的血清、肝组织和外周血单个核细胞仍可检出HBV,说明血清HBsAg阴性并不能排除HBV隐匿性感染。据报道<sup>[3]</sup>,在原因不明的慢性肝病中,隐匿性HBV感染占较高的比例,约为30%~35%,抗-HBc阳性的患者中,比例更高,最高达60%。本组31例不明原因肝病者中,21例肝组织中可检出血清HBsAg和(或)HBcAg,其中10例同时检出HCV抗原。因此对不明原因肝病者仍应考虑肝炎病毒感染,尤其是HBV感染。

已有研究表明HBV隐匿性感染与慢性肝炎、肝硬化、肝癌的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>,但临床仍有因对此类病例认识不充分,治疗不及时而导致预后不良的报道。本组病例通过病理检查,发现存在HBV隐匿性感染的21例患者中,7例符合慢性轻至中度肝炎表现,炎症分级为G1~G3,纤维化分期S0~S3;本组不少患者临床上诊断为不明原因肝炎,但病理检查结果显示肝硬化早期(G3,S3)患者1例,11例患者表现为明显的肝硬化,炎症分级为G4,纤维化分期S4,2例为肝细

胞性肝癌。本组资料进一步说明 HBV 隐匿性感染与慢性肝炎、肝硬化、肝癌关系密切,应引起重视。免疫组织化学结果发现:肝组织 HBsAg 表达形式有胞浆均匀型及胞浆包涵体型,未见胞膜型,呈弥漫、散在性或集落性分布;HBcAg 多数呈胞浆表达,少数呈胞核表达,分布同 HBsAg;HCV 抗原为胞浆表达,表达形式及分布同 HBsAg。以往研究报道:稳定的慢性 HBV 感染肝组织,HBsAg 阳性细胞多表现为胞浆包涵体型,呈集落型分布,HBsAg 阳性细胞常含整合型 HBV DNA,无病毒活跃复制,炎症轻微。在病毒复制活跃时期,多表现为胞浆均匀型或胞膜型,呈弥散性分布。HBcAg 是 HBV 持续、活跃复制的组织标志物,在肝细胞内有胞核型和胞浆型表达,活动性肝病变时 HBcAg 多呈胞浆优势表达<sup>[5]</sup>。因此对肝组织通过免疫组织化学检测 HBsAg、HBcAg 不仅可以进行病原学诊断,而且可以通过 HBsAg、HBcAg 在肝细胞中的定位分布了解肝病的活动性,再结合组织学诊断指导临床治疗。

机体免疫反应介导的免疫病理反应是慢性病毒肝炎的发病机制。本组资料在肝组织中检测出病毒抗原,并且肝组织有不同程度的损害,也进一步说明肝组织损伤与肝细胞内病毒复制及病变激活有关,因此抗病毒治疗是控制病情发展的重要措施。

本组病例中 21 例存在 HBV 隐匿性感染的患者,临床表现各异,有乏力、纳差、肝区不适、呕血、黑便、移动性浊音阳性、双下肢水肿等肝硬化的症状及体征。不少患者初次发病即表现为肝硬化的症状,说明隐匿性 HBV 感染比较隐袭。其中有输血史的 1 例患者经检测,存在 HBV 感染,提示 HBV 隐匿性感染可通过输血传播,与以往研究一致。1 例患者母亲患过急性乙型病毒性肝炎,提示可能其母亲也存在 HBV 隐匿性感染,通过垂直传播使其子感染。

HBV 隐匿性感染的发病机制可能有:HBV 低水平复制;HBV 发生变异如 S、X、前-C 等基因区;检测试剂的灵敏度低;整合到宿主染色体,影响 HBsAg 表达;外周血单个核细胞(PBMC)感染 HBV;受其他病毒的干扰如 HCV 等<sup>[6,7]</sup>。张继明等<sup>[8]</sup>研究报道:5 例隐匿性乙型肝炎中,1 例患者 HBsAg“ $\alpha$ ”决定簇基因发生变异;1 例患者 S 基因的第 74 位密码子出现终止变异,导致 HBsAg 表达缺陷;另外 3 例 HBsAg“ $\alpha$ ”决定簇内未发现变异,“ $\alpha$ ”决定簇外存在多个位点变异。提示 HBV 隐匿性感染的原因部分归因于 S 基因的变异。本课题组前期通过对 HBV 隐匿性感染患者的血清进行 HBV DNA 扩增阳性产物测序发现:X 基因区及重叠核心启动子区,增强子 II 区存在多位点变异,而 S 基因区未发现有义突变,提示 X 基因区及重叠核心启动子区,增强子 II 区多位点变异可能是 HBV 隐匿性感染的分子基础<sup>[9]</sup>。HBV 隐匿性感染的发病机制有待进一步研究。

总之,在我国 HBV 隐匿性感染是不明原因肝病的主要原因之一,可引起不同程度的肝组织损害,与慢性肝炎、肝硬化、肝癌关系密切,应引起重视。对不明原因肝病者,仍应考虑肝炎病毒感染,建议采用灵敏的套式 PCR 方法,并结合肝组织病理及免疫组织化学检查进行病原学诊断及病情判断,指导进一步治疗。

## 参 考 文 献

- 1 Chemin I, Zoulim F, Merle P, et al. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown etiology. *J Hepatol*, 2001, 34:447-454.
- 2 Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *J Hepatol*, 2001, 34:194-203.
- 3 Chan HL, Tsang SW, Leung NW, et al. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97:1211-1215.
- 4 Chemin I, Jeantet D, Kay A, et al. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease. *J Ati-viral Res*, 2001, 52:117-123.
- 5 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 2001. 327.
- 6 Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implication. *J Viral Hepatitis*, 2002, 9:243-257.
- 7 Cacciola I, Pollicino T, Squadro G, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*, 1999, 341:22-26.
- 8 张继明, 尹有宽, 卢清, 等. 隐匿性乙型肝炎: 免疫组织化学和 S 基因序列分析. *肝脏*, 2002, 7:229-232.
- 9 陈常云, 朱新宇, 周永安, 等. 乙型肝炎病毒隐匿性感染的分子机制研究. *国际流行病学传染病学杂志*, 2006, 33:229-231.

(收稿日期:2008-12-04)

(本文编辑:孙荣华)

李炜, 王霞, 王琰, 等. 不明原因肝病患者肝组织 HBV 及 HCV 抗原的检测及临床和病理特点[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2009, 3(4): 372-378.