



ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R  
邮发代号: 46-283

# 分子诊断与治疗杂志

FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2019年9月 第11卷 第5期 总第63期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 11 Number 5 September 2019



图(P352) 高值临床样本 10 倍梯度稀释线性范围扩增曲线

Figure(P352) Linear range amplification curve of 10-fold gradient dilution for clinical samples

中山大学 主管

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)  
中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊  
中国期刊全文数据库全文必录期刊  
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊  
中文生物医学期刊文献数据库 CMCC 收录期刊  
中国生物医学期刊引文数据库 CMCI 收录期刊  
中国学术期刊影响因子年报统计源期刊

ISSN 1674-6929



分子诊断与治疗杂志

二〇一九年九月

第十一卷 第五期

中山大学

## 鲁凤民



鲁凤民,《分子诊断与治疗杂志》第二、三、四、五届编辑委员会编委。

1963年4月出生。1992年7月毕业于哈尔滨医科大学医学遗传学系,获得医学遗传学博士学位。1992年10月至1994年10月在北京医科大学公共卫生学院从事博士后研究工作。曾赴瑞典 Karolinska 研究所、美国 MCP-HAMMAN 病毒与肿瘤研究所、美国费

城儿童医院分子与细胞遗传学研究室,以及美国宾夕法尼亚大学细胞生物学系 Abramson 家族肿瘤研究所工作。

北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病研究中心,教授,博士生导师,学系主任。作为学组秘书,全程参与了国家中长期科技发展规划“艾滋病和病毒性肝炎防治重大专项”《病毒性肝炎领域》实施方案的编写和论证工作。担任国务院学位委员会基础医学学组委员,中国医药质量协会转化医学分会主任委员,中国研究型医院分子诊断专业委员会副主任委员,中华医学会医学病毒学分会委员,北京市医学病毒学分会副主任委员,中国微生物学会病毒学工作委员会常委,北京市微生物学会常委等,并担任《中华肝脏病杂志》、《中华预防医学杂志》等杂志常务编委或编委。

鲁凤民教授长期从事病毒性肝炎、肿瘤等相关研究,在肝炎病毒感染相关检测技术及诊断试剂研发方面形成了一定的特色和优势。首次证实慢乙肝患者血清 HBV RNA 为存在于核衣壳内的未经或部分逆转录的病毒前基因组 RNA (pgRNA),并系统性探索了血清 HBV RNA 的存在形式和临床意义。基于血清 GP73 的创新研究发现,首次开发并推广血清 GP73 作为一种无创诊断肝硬化的新指标。作为课题负责人连续主持国家“十一五”、“十二五”和“十三五”“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病”防治科技重大专项课题,已承担或在承担的课题还有北京市科技计划“病毒性肝炎防治关键技术研究”课题、国家自然科学基金、“973”计划、“863”计划等课题。在病毒性肝炎研究方面曾获国家科技进步二等奖二次(参加人)。在 New England Journal of Medicine、Journal of Hepatology、Hepatology、Cancer Research 等杂志发表 120 余篇 SCI 论文(著),他引超过 3 100 次。作为主编、副主编及编委编写了多部国家级规划教材。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

双月刊 2019年9月 第11卷 第5期 总第63期 Bimonthly Volume 11 Number 5 September 2019

主管	中山大学
主办	《中国家庭医生》杂志社有限公司
承办	中山大学达安基因股份有限公司
顾问	申子瑜
主编	李明
编辑部主任	蒋析文
编辑部副主任	刘悦
编辑部	《分子诊断与治疗杂志》编辑部
编辑	李晓兰 李彩珍
出版	《中国家庭医生》杂志社有限公司
地址	广州市天河区天河北路179号祥龙大厦10~11楼(510620)
电话	(020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱	jmdt@vip.163.com
刊号	ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R
邮发代号	46-283
发行单位	广东省报刊发行局
发行范围	国内外公开发行
广告发布登记通知书	440100190057
印刷	天意有福科技股份有限公司
出版日期	2019年9月18日
定价	RMB 15.00元
<b>Responsible Institution</b>	<i>Sun Yat-sen University</i>
<b>Sponsor</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
<b>Organizer</b>	<i>DaAn Gene Co., Ltd. of Sun Yat-sen University</i>
<b>Consultant</b>	<i>SHEN Ziyu</i>
<b>Editor in Chief</b>	<i>LI Ming</i>
<b>Managing Director</b>	<i>JIANG Xiwen</i>
<b>Associate Editor</b>	<i>LIU Yue</i>
<b>Editorial Office</b>	<i>&lt;JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY&gt; Editorial Office</i>
<b>Editors</b>	<i>LI Xiaolan LI Caizhen</i>
<b>Editing</b>	<i>China Family Doctors Magazine Publisher Co., Ltd.</i>
<b>Add</b>	<i>10~11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620</i>
<b>Tel</b>	<i>(020) 32290789-206, 32290789-201</i>
<b>E-mail</b>	<i>jmdt@vip.163.com</i>
<b>CSSN</b>	<i>ISSN 1674-6929 CN 44-1656/R</i>
<b>Printing</b>	<i>TianYi Yofus Technology Co., Ltd.</i>
<b>Publish Date</b>	<i>2019.9.18</i>
<b>Price</b>	<i>RMB 15.00</i>

# 分子诊断与治疗杂志

双月刊 2019年9月 第11卷 第5期

## 目次

### 述评

高灵敏度HBV DNA检测的临床应用及意义 ..... 王杰 于广鑫 鲁凤民(343)

### 论著

乙型肝炎病毒核酸实时荧光PCR超敏检测方法的建立与评价 ..... 夏乔 廖丽丽 董志强 等(348)

高灵敏乙型肝炎病毒核酸检测在术前筛查中的应用价值 ..... 李宝琪 陈培松 黄浩 等(355)

高敏与普通荧光定量PCR技术在慢乙肝患者抗病毒疗效监测中的对比研究  
..... 卢建华 杨莉 赵召霞 等(361)

高灵敏度HBV DNA检测在乙型肝炎相关性肝细胞肝癌中的临床应用价值研究  
..... 周莹 张军霞 黄舒 等(365)

双靶标高敏HBV DNA检测技术在HBeAg阴性患者临床诊断中应用 ..... 冯磊(369)

两种HBV DNA定量检测方法的临床对比研究 ..... 王爽 郭杰 王大刚 等(374)

高灵敏度HCV RNA检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗检测应用  
..... 黄成军 程书权(379)

两种HCV RNA定量检测方法的临床对比研究 ..... 彭亚柏 彭雅兰 管吉鹏 等(383)

HBeAg与抗-HBe双阳性的慢性乙型肝炎患者临床特征分析 ..... 罗琳 张廷超 刘书刚(387)

胱抑素C和肝动脉阻力指数在肝硬化患者中的临床意义 ..... 邵小梅 杨杨 韩丽霞(391)

抗乙肝病毒对肝癌TACE术后复发转移的临床疗效及免疫功能研究 ..... 陈明 曹洋(396)

miR-3182调控肝癌细胞凋亡和放射敏感性机制研究 ..... 于凤芹 徐云芳 张青(401)

外周血细胞因子在慢性乙型肝炎的治疗效果判断的价值研究 ..... 隋佳 于梦 朱淑珍 等(408)

丙型肝炎患者HCV RNA载量与HCV-cAg及SOD、FFA相关性分析  
..... 方伟祯 古文深 房绮梅 等(414)

miR-122、miR-150在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的研究 ..... 马青松 张云芬(418)

### 综述

高灵敏度HBV DNA临床检测应用现状及发展趋势 ..... 里进 李一荣(422)

高敏HCV RNA检测技术的临床应用 ..... 刘娜 李春霞 东冰 等(428)

乙型肝炎病毒耐药性研究进展 ..... 张劲丰 安宏亮 苏荣 等(434)

### 专家风采

鲁凤民 ..... (封二)

### 实验室巡礼

北京大学基础医学院鲁凤民教授实验室 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 5 September 2019

---

## CONTENTS

### COMMENTS

Clinical application and significance of high-sensitivity hepatitis B virus-DNA detection

*WANG Jie, YU Guangxin, LU Fengmin* ..... (343)

### ORIGINAL ARTICLES

Establishment and evaluation of a hypersensitivity method of real-time fluorescent PCR for hepatitis B virus detection

*XIA Qiao, LIAO Lili, DONG Zhiqiang, YANG Honghui, JIANG Xiwen* ..... (348)

The application value of high-sensitivity HBV nucleic acid test in preoperative screening

*LI Baoqi, CHEN Peisong, HUANG Hao, YU Xuegao, HUANG Bin* ..... (355)

Comparative study of high-sensitivity and conventional fluorescence quantitative PCR in the monitoring of antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis B

*LU Jianhua, YANG Li, ZHAO Zhaoxia, LI Qianlin, LI Minran, LIU Yuzhen, DAI Erhei, CHEN Xiuli* ..... (361)

Clinical value of high sensitive HBV DNA detection in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma

*ZHOU Ying, ZHANG Junxia, HUANG Shu, LIU Liming, GUO Wei* ..... (365)

Application of dual-target hyper-sensitivity hepatitis B DNA detection technology in clinical diagnosis of HBeAg negative patients

*FENG Lei* ..... (369)

Clinical comparative study of two quantitative methods for HBV DNA detection

*WANG Shuang, GUO Jie, WANG Dagang, SHI Jingren, PAN Meichen, YIN Shangqi, HE Chaonan,*

*MENG Huan, ZHANG Xiang, WANG Yajie* ..... (374)

The clinical application of high sensitivity HCV RNA detection for diagnosis and treatment in patients with chronic hepatitis C

*HUANG Chengjun, CHENG Shuquan* ..... (379)

Clinical comparative study of two methods for quantitative detection of HCV RNA

*PENG Yabai, PENG Yalan, GUAN Jipeng, WANG Min* ..... (383)

Clinical characteristics of chronic hepatitis B patients with both HBeAg and HBeAb positive

*LUO Lin, ZHANG Tingchao, LIU Shugang* ..... (387)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Bimonthly Volume 11 Number 5 September 2019

---

## CONTENTS

- Clinical significance of cystatin C and hepatic artery resistance index in patients with liver cirrhosis  
*SHAO Xiaomei, YANG Yang, HAN Lixia* ..... (391)
- The clinical effect and immune function of anti HBV on recurrence and metastasis of liver cancer after transarterial chemoembolization  
*CHEN Ming, CAO Yang* ..... (396)
- miR-3182 promotes the apoptosis of hepato-carcinoma cells and enhance the radio-sensitivity of liver cancer cells  
*YU Fengqin, XU Yunfang, ZHANG Qing* ..... (401)
- Study on the value of peripheral blood cytokines in the treatment of chronic hepatitis B  
*SUI Jia, YU Meng, ZHU Shuzhen, WEI Qinzhen* ..... (408)
- Correlation analysis of HCV RNA, HCV-cAg, SOD and FFA in hepatitis C patients  
*FANG Weizhen, GU Wenshen, FANG Qimei, ZENG Wuyi, DING Rui, DUAN Chaohui* ..... (414)
- Study on miR-122 and miR-150 in differential diagnosis of occult hepatitis  
*MA Qingsong, ZHANG Yunfen* ..... (418)

## REVIEWS

- Current status, questions and trend of the clinical ultrasensitive hepatitis B virus DNA detection  
*LI Jin, LI Yirong* ..... (422)
- Clinical application of hypersensitive HCV RNA detection technology  
*LIU Na, LI Chunxia, DONG Bing, ZHOU Lulu, ZHANG Ruiqin, XU Guanghua* ..... (428)
- Progress in research on hepatitis B virus resistance  
*ZHANG Jinfeng, AN Hongliang, SU Rong, LV Weifeng* ..... (434)

## 高灵敏度HBV DNA检测的临床应用及意义

王杰 于广鑫 鲁凤民\*

**[摘要]** 定量检测乙型肝炎病毒(HBV)DNA能够有效监测HBV的感染状态和抗病毒疗效,因此在慢性乙型肝炎(慢乙肝)的临床诊断和抗病毒疗效的评价中具有重要的临床价值。相比于普通的HBV DNA检测,高灵敏度HBV DNA检测具有更低的检测下限和较广的线性范围,各国指南将高灵敏度HBV DNA检测作为慢乙肝患者接受核苷(酸)类药物治疗时评价病毒学应答和治疗终点的重要指标。本文将针对高灵敏度HBV DNA检测在筛查隐匿性HBV感染(OBI)者以增强输血安全,术前筛查HBV以降低HBV医源性感染,肿瘤患者放、化疗前筛查HBV以减少HBV再激活的发生,评价抗病毒疗效与治疗终点以减少停药后病毒反弹和疾病复发,以及HBV e抗原(HBeAg)阴性患者HBV耐药突变预测等方面进行评述。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;高灵敏度HBV DNA检测;隐匿性HBV感染;核苷(酸)类药物

### Clinical application and significance of high-sensitivity hepatitis B virus-DNA detection

WANG Jie, YU Guangxin, LU Fengmin\*

(Department of Microbiology & Infectious Disease Center, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing, China, 100191)

**[ABSTRACT]** Quantitative detection of hepatitis B virus (HBV) DNA can effectively monitor the infection status and antiviral efficacy of HBV, thus, it has important clinical significance in the diagnosis and evaluation of antiviral efficacy for chronic hepatitis B (CHB). Compared with the conventional HBV DNA detection, the high-sensitivity HBV DNA detection has lower detection limit and a wider linear range, and has been used as an important indicator for evaluating the virological response and the end point of treatment for CHB patients receiving nucleos(t)ide analogues in the guidelines of CHB management. In this manuscript, we review the applications of high-sensitivity HBV DNA detection in screening for occult HBV infection (OBI) to enhance the safety of blood transfusion, screening for HBV infection before operation to reduce iatrogenic HBV infection, screening for HBV infection before radiotherapy and chemotherapy to reduce the occurrence of HBV reactivation, evaluating antiviral efficacy and treatment endpoints to reduce the viral rebound and CHB relapse after drug withdrawal, and predicting drug resistance mutations in HBeAg negative CHB patients.

**[KEY WORDS]** Hepatitis B virus; High-sensitivity HBV DNA detection; Occult HBV infection; Nucleos(t)ide analogues

基金项目:国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十三五”计划(2017ZX10302201);国家自然科学基金资助项目(81672013)

作者单位:北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病研究中心,北京 100191

\*通信作者:鲁凤民, E-mail: lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性公共卫生问题。据世界卫生组织估计,全球约20亿人感染过HBV,其中2.57亿人为慢性HBV感染者,每年约有65万人死于HBV感染所致的肝硬化和肝细胞癌(Hepatic cell carcinoma, HCC)等终末期肝病<sup>[1-2]</sup>。2016年,我国人群乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)流行率估计为6.1%,慢性HBV感染者约8600万人,接近全球慢性HBV感染的1/3。在这些慢性HBV感染者中,约有2000多万例为慢性乙型肝炎(慢乙肝)患者,约100万例为肝硬化患者,30万例为HCC患者<sup>[3]</sup>。目前,临床上主要通过免疫学检测和HBV核酸(DNA)检测进行HBV感染的诊断和抗病毒疗效的监测<sup>[4]</sup>。在我国,提出高灵敏度HBV-DNA检测试剂这一表述有其特殊性,主要是针对我国早期的HBV DNA定量检测试剂灵敏度相对较低而言。相比于国内传统的HBV DNA检测试剂,高灵敏度HBV DNA检测试剂具有更低的检测下限和更广的线性范围,且特异性好,能够缩短检测的窗口期,更高效地实现对HBV感染的早期诊断,进而更好地实现早期干预治疗和阻断HBV传播的目的。因此,高灵敏度HBV DNA检测在OBI(Occult hepatitis B virus infection, OBI)筛查、术前检查、肿瘤患者放、化疗后HBV再激活风险评估、抗病毒治疗疗效与终点评价以及预测HBV表面抗原(HBeAg)阴性患者HBV耐药突变等方面表现出了突出的临床价值。

## 1 高灵敏度HBV DNA检测与OBI和术前HBV筛查

### 1.1 OBI与输血安全

1978年科学家首次发现HBsAg阴性、核心抗体(抗-HBc)阳性的献血者血液可使受血者感染HBV,并提出了OBI可能会导致HBV传播的观点<sup>[5]</sup>。最初,诊断OBI主要依赖于HBV的血清学抗原、抗体标志物和HBV DNA的检测<sup>[6-8]</sup>。随后,人们发现血清HBV DNA的检测不足以完全判定OBI,而肝组织中HBV DNA的检测可能是判定OBI更可靠的方法<sup>[9-11]</sup>。2007年,Raimondo等提出检测肝组织或血清中HBV DNA的不同区域可提高OBI检测的灵敏度和可靠性<sup>[12]</sup>。

2008年OBI被首次定义为:排除HBV感染窗口期,按照现有血清学检测技术检测血清HBsAg阴性,无论血清中能否检测到HBV DNA,但肝组织中

HBV DNA阳性<sup>[13]</sup>。随着基因扩增技术的发展,巢式PCR、实时荧光定量PCR和液滴数字PCR先后被用于OBI的实验室诊断,并通过对肝组织和血清HBV DNA的多个区域进行特异性检测,以两个及以上区域检出阳性作为诊断OBI的标准<sup>[13]</sup>。众所周知,由共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)转录产生的HBV前基因组RNA(pregenomic RNA, pgRNA)经逆转录合成病毒DNA负链,再经跳转后合成正链,形成不完全闭合的松弛环状双链DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)<sup>[14]</sup>。由于3.5 kb长的pgRNA只能来源于cccDNA,所以pgRNA逆转录产生的rcDNA也只能来源于cccDNA,rcDNA的存在不仅间接反映了cccDNA的存在,更提示其处于转录活跃状态。此外,rcDNA也是cccDNA的唯一来源。因此,cccDNA和/或rcDNA的存在均具有HBV再激活和再感染的潜能。与之不同的是,整合至宿主基因组的HBV DNA片段主要来源于病毒正链DNA合成时错误跳转所形成的双链线性HBV DNA(double strands linear DNA, dslDNA),所以其不具有作为模板转录产生子代病毒的能力<sup>[15-16]</sup>。由于整合的HBV DNA片段的断端主要集中在HBV基因组的直接重复区(direct repeat, DR)1和DR2附近,这一特性使我们能够很好地将具有完整病毒复制潜能的cccDNA和rcDNA与整合的HBV DNA片段区分开来。在排除了整合HBV DNA的干扰之后,rcDNA和/或cccDNA检出阳性,即可被判定为OBI。在此基础上,我们建议OBI应更加严谨地定义为:排除HBV感染的窗口期,按照现有血清学检测技术检测HBsAg阴性,血清HBV DNA低于检测下限或低值阳性(<200 IU/mL),但肝组织中HBV rcDNA和/或cccDNA阳性<sup>[17-18]</sup>。

OBI发生的主要原因是由于肝组织内cccDNA很难被清除,大部分HBV被宿主免疫清除后仍有少量病毒残留,导致HBV低水平复制<sup>[19]</sup>。另外,免疫复合物的形成、S基因变异以及合并其他肝炎病毒感染也是导致OBI发生的原因<sup>[20]</sup>。OBI的流行率与HBV感染率呈正相关<sup>[21]</sup>。我国是乙型肝炎高发区,HBV既往感染人数曾占全人群的50%以上,献血者中OBI检出率约为0.03%~0.2%,也明显高于西方发达国家0.007%~0.05%的水平<sup>[22]</sup>。如何避免感染HBV的供血者的血液造成输血后感染,是输血的各种风险中需要防范的重点之一。尽管随着血清学

检测灵敏度的不断提高,通过 HBsAg 的筛查排除了绝大多数 HBV 感染者,使得输血造成 HBV 感染的风险大大降低,但 OBI 引起的输血后 HBV 感染仍不能被有效排除。HBV 核酸检测(nucleic acid test, NAT)是避免输血后 HBV 感染的筛查手段之一,我国于 2015 年 12 月将 NAT 纳入血液常规检测<sup>[23]</sup>。目前,NAT 的灵敏度已有较大提高,检测下限已由之前的 20 IU/mL 下降至 3.4 IU/mL<sup>[24-25]</sup>。我国输血后 HBV 感染的风险随着 HBV DNA 检测灵敏度的提高日益下降,但输血后 HBV 感染的问题依然存在。根据 Locarnini 等的计算,NAT 的检测下限需要达到 0.15 IU/mL 才能完全避免输血后 HBV 感染<sup>[26]</sup>。由此可见,HBV DNA 检测的灵敏度仍需进一步提高。

### 1.2 术前 HBV 筛查

HBV 是一类具有很高医源性感染风险的病毒,极少量含病毒的血液或血清就可导致该病毒的传播<sup>[27]</sup>。临床上进行手术、侵入性操作、血液透析以及医疗器械未经有效严格消毒等均会增加 HBV 医源性感染的风险。因此,针对手术患者进行术前 HBV 筛查是很有必要的。目前术前 HBV 筛查手段主要有血清学检测技术和分子诊断技术两种,其中血清学检测标志物主要包括 HBsAg、表面抗体(抗-HBs)、HBeAg、e 抗体(抗-HBe)和抗-HBc,即乙肝五项;主要检测方法有胶体金法、酶联免疫吸附试验、化学发光法和重组免疫印迹试验等;分子诊断技术主要指 HBV DNA 的定量检测<sup>[28]</sup>。由于隐匿性感染、病毒感染后的窗口期以及部分患者存在病毒抗原突变等原因,使得血清学标志物的检查容易造成漏诊<sup>[28]</sup>。高灵敏度 HBV DNA 检测试剂的最低检测限可达 10~15 IU/mL,在检测灵敏度和特异性方面有较大优势,可更准确地诊断 HBV 感染,并能够显著缩短检测的窗口期,故可更有效地规避 HBV 医源性感染的风险<sup>[29]</sup>。

## 2 高灵敏度 HBV DNA 检测对肿瘤患者放、化疗后 HBV 再激活的风险评估

恶性肿瘤导致人口死亡约占全球总死亡人数的六分之一。2015 年恶性肿瘤导致全球 880 万人死亡,预计新病例数量将在未来 20 年内增加约 70%<sup>[30]</sup>。除手术和放疗外,化疗仍是最常见的治疗恶性肿瘤的方法。我国的乙肝疫苗接种始于 1992 年,现阶段既往 HBV 感染单核心抗体阳性者(单抗-HBc 阳性)在我国中老年人群中

仍占有较大的比例。随着预期寿命的不断延长和全球恶性肿瘤新病例的不断增长,化疗引起的 HBV 再激活将是一个更加严重的公共卫生问题。

HBV DNA 从一定的水平或检测不到发展至显著增加的状态,即高于基线水平 2 log 或新出现的 HBV DNA 水平达到 100 IU/mL 以上,被定义为 HBV 再激活<sup>[31]</sup>。HBV 再激活的主要因素是宿主失去对 HBV 复制的免疫控制。在化疗期间,当免疫系统被抑制时,HBV 复制显著增加,并引起肝细胞的广泛感染。化疗停止后,免疫功能恢复,感染 HBV 的肝细胞可触发强烈的免疫反应,并导致较为严重的肝损伤<sup>[32]</sup>。

预防 HBV 再激活的重要措施是对高危人群进行早期识别,在病毒激活之前加以预防。研究表明,每月监测血清 HBV DNA 的水平(最低检测下限为 11 IU/mL)能够有效地预防既往感染过 HBV 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤患者发生 HBV 再激活<sup>[33]</sup>。美国临床肿瘤协会在 2015 年的“暂行临床意见”中指出,对于 HBsAg 阴性/抗-HBc 阳性人群,应定期监测其血清 HBV DNA 和 ALT 水平,若发生 HBV 再激活,应立即进行抗病毒治疗<sup>[34]</sup>。同样,我国的慢乙肝防治指南中也要求对于所有因其他疾病而接受放疗、化疗、免疫抑制剂治疗的患者,在治疗前都应常规筛查 HBsAg、抗-HBc 和 HBV DNA<sup>[2]</sup>。这说明,无论是 HBV 再激活高危人群的早期筛查还是肿瘤患者放化疗后监测 HBV 再激活的风险,高灵敏度 HBV DNA 检测均具有重要的临床意义。

## 3 高灵敏度 HBV DNA 检测评价抗病毒治疗的疗效与终点

目前,各国(地区)的慢乙肝防治指南根据高灵敏度检测试剂的检测能力对 HBV DNA 检测下限进行了设定,并以此指导抗病毒疗效的评价以及抗病毒治疗终点建议的评估。亚太肝病研究学会(Asia Pacific association for the study of liver, APASL)2015 年版慢乙肝防治指南中将 HBV DNA < 12 IU/mL 设定为低于检测下限<sup>[35]</sup>;美国肝病研究学会(American Association for the study of liver disease, AASLD)2018 年版慢乙肝防治指南中则分别对恩替卡韦、替诺福韦和替诺福韦艾拉酚胺(二代替诺福韦)完全病毒学应答时的 HBV 检测下限进行了设定,分别为 60 IU/mL、60 IU/mL 和 29 IU/mL<sup>[36]</sup>;欧洲肝脏研究协会(European Associ-

ation for the Study of the Liver, EASL)2017年版慢乙肝防治指南中将HBV DNA<10 IU/mL设定为抗病毒治疗的完全病毒学应答<sup>[37]</sup>;世界卫生组织(WHO)2015年版慢乙肝防治指南中则将检测下限设定为15 IU/mL<sup>[38]</sup>;我国2015年版慢乙肝防治指南中虽然没有明确给出HBV DNA的检测下限,但仍规定非活动性HBV携带者必须满足HBV DNA低于检测下限或<200 IU/mL<sup>2</sup>。这说明,相对于国内传统的检测下限较高的HBV DNA定量检测试剂而言,高灵敏度HBV DNA检测可更好地评价慢乙肝抗病毒疗效以及评估抗病毒治疗的终点。

#### 4 高灵敏度HBV DNA检测预测HBeAg阴性患者HBV耐药突变

HBeAg是反映HBV复制和感染能力的一个重要指标,临床上常用HBV复制抑制、ALT水平恢复正常、HBeAg血清学转换来评估慢乙肝患者抗病毒治疗的效果。但值得注意的是,HBeAg阴性并不能完全代表HBV处于复制抑制状态。虽然HBeAg阴性慢乙肝患者中HBV载量较低,但HBeAg转阴可能是由于HBV基因变异引起的,此时的病毒仍处于活跃复制状态,并更容易对抗病毒药物产生耐药<sup>[39]</sup>。此外,对于此部分HBV耐药突变患者,传统的灵敏度较低的HBV DNA检测无法为血清HBV DNA是否真正转阴提供可靠参考。研究表明,对于HBeAg阴性慢乙肝患者进行高灵敏度HBV DNA检测,可更好地观察抗病毒疗效和优化抗病毒治疗方案<sup>[40]</sup>。由此可见,高灵敏度HBV DNA检测能够更加有效地判断HBeAg阴性患者的抗病毒疗效,并为HBV耐药突变的预测及治疗方案的调整提供可靠参考。

#### 5 总结

高灵敏度HBV DNA检测以其检测下限低和线性范围广等优势,已逐步应用于慢乙肝的临床诊断和抗病毒疗效评价的各个环节中,并且更符合“精准医学、精准治疗”的要求。然而,高灵敏度HBV DNA检测仍存在一些亟需解决的问题。首先,高灵敏度HBV DNA检测的灵敏度仍有待进一步提高,如输血筛查理论上需要检测试剂的最低检测下限达到0.15 IU/mL才能完全避免HBV感染,这是现阶段难以企及的高度。其次,极高的检测灵敏度意味着检测结果更容易受核酸污染的影响,

这要求更加严格的操作环境和更加规范的标准操作规程。此外,现阶段高灵敏度HBV DNA检测的标准化尚不健全,这导致不同厂家、不同机构所生产和使用的仪器和试剂所表达的“高灵敏度”参差不齐,检验效能上存在较大差异。虽然现阶段高灵敏度HBV DNA检测面临这些问题,但其在OBI筛查、术前HBV筛查、肿瘤患者放、化疗前HBV筛查、评价慢乙肝患者抗病毒治疗的疗效与终点、以及预测HBeAg阴性慢乙肝患者发生HBV耐药突变风险等方面具有难以替代的优势。相信未来随着科学技术的发展以及相关机构的逐步重视,高灵敏度HBV DNA检测会更加快速地发展,并在临床上得到更加广泛的应用。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet (Updated 2019).
- [2] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J].中国病毒病杂志,2015,31(6):1941-1960.
- [3] 崔富强,庄辉.中国乙型肝炎的流行及控制进展[J].中国病毒病杂志,2018,4:257-264.
- [4] Lai MW, Lin TY, Tsao KC, et al. Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination[J]. Gastroenterology, 2012,143(2):400-407.
- [5] Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, et al. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen[J]. N Engl J Med, 1978, 298(25):1379-1383.
- [6] Wang JT, Wang TH, Sheu JC, et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen[J]. J Infect Dis, 1991,163(2):397-399.
- [7] Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, et al. "Occult" hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients[J]. Lancet, 1994, 343(8890):142-146.
- [8] Villa E, Grottola A, Buttafoco P, et al. Evidence for hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C with and without serological markers of hepatitis B[J]. Dig Dis Sci, 1995, 40(1):8-13.
- [9] Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis

- C liver disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(1): 22-26.
- [10] Raimondo G, Balsano C, Craxi A, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. *Dig Liver Dis*, 2000, 32(9): 822-826.
- [11] 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]. *Hepatology*, 2001, 34(1): 194-203.
- [12] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2007, 46(1): 160-170.
- [13] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(4): 652-657.
- [14] Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis [J]. *Cell*, 1992, 71(4): 663-670.
- [15] Li X, Zhang J, Yang Z, et al. The function of targeted host genes determines the oncogenicity of HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 975-984.
- [16] Yang W, Summers J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor [J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 9710-9717.
- [17] Liu Y, Zeng W, Xi J, et al. Over-gap PCR amplification to identify presence of replication-competent HBV DNA from integrated HBV DNA: An updated occult HBV infection definition [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3): 557-559.
- [18] 鲁凤民, 廖昊, 刘永振, 等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染再认识 [J]. *中华预防医学杂志*, 2019, 53(5): 445-449.
- [19] De La Fuente RA, Gutierrez ML, Garcia-Samaniego J, et al. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12): 1543-1548.
- [20] Ponde RA. Molecular mechanisms underlying HBsAg negativity in occult HBV infection [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(9): 1709-1731.
- [21] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2007, 46(1): 160-170.
- [22] Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, et al. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7152-7168.
- [23] Li L, Li KY, Yan K, et al. The History and Challenges of Blood Donor Screening in China [J]. *Transfus Med Rev*, 2017, 31(2): 89-93.
- [24] Li WJ, Xu HX, Wu DS, et al. A novel fully automated system for quantification of Hepatitis B virus DNA using magnetic bead-based method combined with real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2017, 248: 130-135.
- [25] Candotti D, Assennato SM, Laperche S, et al. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose [J]. *Gut*, 2019, 68(2): 313-321.
- [26] Locarnini S, Raimondo G. How infectious is the hepatitis B virus? Readings from the occult [J]. *Gut*, 2019, 68(2): 182-183.
- [27] 王桂茹, 李玉华. 加强感染管理控制乙肝病毒医源性传播 [C]. 全国第六届口腔医院管理研讨会论文集, 2000.
- [28] Mortensen E, Kamali A, Schirmer P L, et al. Are current screening protocols for chronic hepatitis B virus infection adequate [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(2): 159-167.
- [29] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- [30] WH Organization. Fact sheet on cancer. [EB/OL] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (accessed February 2018).
- [31] Bessone F, Dirchwolf M. Management of hepatitis B reactivation in immunosuppressed patients: an update on current recommendations [J]. *World J Hepatol*, 2016, 8(8): 385-394.
- [32] Bessone F. Re-appraisal of old and new diagnostic tools in the current management of chronic hepatitis B [J]. *Liver Int*, 2014(9), 34:991-1000.
- [33] Chen KL, Chen J, Rao HL, et al. Hepatitis B virus reactivation and hepatitis in diffuse large B-cell lymphoma patients with resolved hepatitis B receiving rituximab-containing chemotherapy: risk factors and survival [J]. *Chin J Cancer*, 2015, 34(5): 225-234.
- [34] Hwang JP, Somerfield MR, Alston-Johnson DE, et al. Hepatitis B Virus Screening for Patients With Cancer Before Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(19): 2212-2220.
- [35] Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1): 1-98.

## 乙型肝炎病毒核酸实时荧光 PCR 超敏检测方法的建立与评价

夏乔 廖丽丽 董志强 杨鸿辉 蒋析文\*

**[摘要]** 目的 应用 Taq-man 实时荧光 PCR 技术,建立一种超敏检测乙型肝炎病毒 DNA (HBV DNA) 载量的方法(以下简称超敏试剂),并对其临床应用进行评价。方法 对比 GeneBank 中 HBV DNA 基因组序列,使用 Primer 5.0 软件在其 S 区和 C 区分别设计一对特异性的引物和探针,应用 Taq-man 探针技术,优化反应体系和反应条件。并收集 195 例临床样本与某国产试剂进行平行检测,采用相关性分析和 Bland-Altman 等方法对检测结果进行分析。结果 建立的 HBV DNA 超敏检测方法灵敏度达 10 IU/mL,线性范围 20 ~ 1×10<sup>9</sup> IU/mL,准确性为 100%,覆盖型别为 A、B、C、D、E、F、H,批内和批间变异系数在 5% 以内。195 例临床样本检测结果显示,与某国产试剂相比,超敏试剂的阳性符合率为 99.45%,阴性符合率为 91.67%,总符合率为 98.97% (Kappa 值为 0.911 2,  $P < 0.05$ )。超敏试剂与某国产试剂具有很强的相关性 ( $r = 0.979 1, P < 0.000 1$ )。结论 本研究成功建立了一种 HBV DNA 实时荧光 PCR 检测方法,具有很高的临床应用价值。

**[关键词]** HBV DNA; Taq-man; 实时荧光 PCR; 相关性

### Establishment and evaluation of a hypersensitivity method of real - time fluorescent PCR for hepatitis B virus detection

XIA Qiao, LIAO Lili, DONG Zhiqiang, YANG Honghui, JIANG Xiwen\*

(Research Center of Medical and Pharmaceutical Bioengineering; Ministry of Health, National and Regional Joint Engineering Laboratory for Clinical Medical Molecular Diagnostics; Guangdong Province Nucleic Acid Molecular Diagnostics Engineering Technology Research Center; Guangdong Provincial Clinical Medical Molecular Diagnostics Engineering Technology Center; DAAN Gene Co., Ltd. Of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510665)

**[ABSTRACT]** Objective Taq-man real-time fluorescent PCR was used to establish a method for hypersensitivity detection of hepatitis B virus DNA (HBV DNA) load (hereinafter referred to as a hypersensitivity reagent), and its clinical application was evaluated. **Methods** Based on the analysis of the HBV DNA genome sequence in GeneBank, a pair of specific primers and probes were designed in the S and C regions of HBV viral genome using Primer 5.0 software, and the reaction system and reaction conditions were optimized by Taq-man probe technique. **Results** The established HBV DNA hypersensitivity detection method has a sensitivity of 10 IU/mL, a linear range of 20 to 1×10<sup>9</sup> IU/mL, and an accuracy of 100%. The coverage types are A, B, C, D, E, F, and H. The intra- and inter-assay coefficient of variation between batches is within 5%. The results of 195 clinical samples showed that compared with a domestic reagent, the

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10732401);国家科技重大专项(2018ZX10306414)

作者单位:卫生部医药生物工程技术创新研究中心;临床医学分子诊断国家地方联合工程实验室;广东省核酸分子诊断工程技术研究中心;广东省临床医学分子诊断工程技术中心;中山大学达安基因股份有限公司,广东,广州 510665

\*通信作者:蒋析文, E-mail: simonxiwenjiang@163.com

positive coincidence rate of hypersensitivity reagent was 99.45%, the negative coincidence rate was 91.67%, and the total coincidence rate was 98.97% (Kappa value was 0.911 2,  $P < 0.05$ ). The hypersensitive reagent has a strong correlation with a domestic reagent ( $r = 0.979 1$ ,  $P < 0.000 1$ ). **Conclusion** This study successfully established a real-time fluorescent PCR detection method for HBV DNA, which has high clinical application value.

[KEY WORDS] HBV DNA; Taq-man; Real-time fluorescent PCR; Correlation

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球发病率最高的传染病之一<sup>[1]</sup>,全球的乙肝患者多达3.5~4亿。我国是乙肝高发国,约有9 300万左右的乙肝病毒携带者,约占我国总人口数的8%~10%<sup>[2]</sup>。目前,临床上主要使用抗体、抗原和核酸联合检测的方法对乙型肝炎患者进行诊断和治疗管理<sup>[3]</sup>。其中HBV DNA载量的检测在HBV感染的早期诊治,判断疾病活动性、制定抗病毒治疗方案、疗效检测以及判断治疗终点中均起着至关重要的作用<sup>[4]</sup>。我国发布的慢性乙型肝炎防治指南推荐使用高敏检测方法检测HBV DNA载量,亚太肝病研究学会和欧洲肝病研究学会均明确要求检测方法的灵敏度应达到10~15 IU/mL,高灵敏度检测方法能够确诊低病毒载量的乙肝患者和抗病毒治疗过程中的病毒清除速率,也有助于发现隐匿性乙肝感染<sup>[5-6]</sup>。因此,建立一种灵敏度高、特异性强的HBV DNA检测方法,对临床上乙型肝炎的预防和控制具有重要的应用价值和社会意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 标准品或参考品

乙肝标准品和国家参考品购自中国食品药品检定研究院;乙肝分型参考品HBV Worldwide AccuSet™ Performance Panel 购自美国 Sera Care Life Science公司。

#### 1.1.2 临床样本

样本收集自昆明市第三人民医院完成日常检测项目后的剩余样本。使用无菌注射器进行采集后,收集于无菌离心管中,室温放置不超过4 h,待样本自行析出血清,完成检测后的剩余样本保存在-20℃待测。主要为乙型肝炎患者或其核酸检测阳性样本,HBV DNA浓度在0~ $1 \times 10^9$  IU/mL范围内均匀分布。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

引物、探针、热启动Taq DNA聚合酶、病毒核酸提取或纯化试剂盒和Smart32核酸提取仪均由

中山大学达安基因股份有限公司提供;UDG酶、dNTPs购自Promega公司;实时荧光定量PCR仪(ABI Prism 7500)购自美国ABI公司。

临床评价对比试剂(以下简称某国产获证试剂)灵敏度10 IU/mL,线性范围 $30 \sim 1 \times 10^9$  IU/mL。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 引物与探针的设计

应用Bioedit软件对GenBank中登录的HBV乙型肝炎病毒的S区段和C区段序列进行比对分析,使用Primer 5.0软件分别在各自的高度保守序列内进行引物和探针设计。S区段的上游引物HBV S-F:5'-GTCCTGGCTATCGCTGGATGTG-3',下游引物HBV S-R:5'-CCAACAAGAAGATGAGGCA-TA GCA-3',探针HBV S-P:5'-CCTCTTCATCCT-GCTGCTATGCCT-3';C区段的上游引物HBV C-F:5'-TTCGCACTCCTCCTGCTT-3',下游引物HBV C-R:5'-CACCTTATGAGTCCAAGGGA-3',探针HBV C-P:5'-ACTCCCTCGCCTCGCAGAC-GAAGGTC-3'。引物和探针均由中山大学达安基因股份有限公司合成。

#### 1.2.2 核酸提取

标准品、参考品和临床样本的核酸提取,均使用中山大学达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂盒(粤穗械备20170583号),提取步骤参照试剂盒说明书。

#### 1.2.3 PCR反应体系与反应条件的优化

荧光定量PCR反应体系如下:1×PCR Buffer、热启动Taq酶5 U、UDG酶5 U、上下游引物(20~30 μM)、探针(2~5 μM),配制成20 μL的PCR mix,加入40 μL提取后的HBV DNA模板,总体积60 μL。反应程序:50℃ 2 min;95℃ 15 min;94℃ 15 s,退火45 s,45个循环;40℃ 20 s。退火延伸时检测荧光信号。以收集到HBV阳性临床样本所提取的核酸为模板,不同退火温度52℃~60℃下进行实时荧光PCR反应,同时应用矩阵优势法对荧光RT-PCR体系中探针浓度和引物浓度进行优化,得到实时荧光PCR的最佳反应条件和反应参数。

#### 1.2.4 定量参考品的制备

选取临床上收集的乙型肝炎病毒阳性血清或血浆,使用中国食品药品检定研究院的乙型肝炎病毒核酸国家标准品对其进行标定。用阴性血清或血浆根据标定浓度将收集的源浆分别稀释到 $5.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$  IU/mL,制备成定量参考品,检测其相关系数,要求相关系数 $r^2 \geq 0.98$ 。

#### 1.2.5 最低检出限的确定

使用阴性血清或血浆稀释中国食品药品检定研究院的乙型肝炎病毒核酸国家灵敏度参考品到20、10、5、2.5 IU/mL,然后分别检测各浓度阳性检出率,用Origin的Sigmoidal Fit的方法拟合成曲线,根据软件给出的曲线公式计算本试剂盒的最低检出限。

#### 1.2.6 最低定量限的确定

使用阴性血清或血浆稀释中国食品药品检定研究院的乙型肝炎病毒核酸国家灵敏度参考品到20 IU/mL,重复20次实验,计算检测结果浓度对数值与理论对数值的差异,要求所有样本实测值与理论值的对数值差值在 $\pm 0.5 \text{ Log}_{10}$  IU/mL以内。

#### 1.2.7 线性范围的确认

选取临床上收集的HBV高值样本( $1 \times 10^9$  IU/mL以上),使用本超敏试剂对其进行标定。用小牛血清将标定的源浆10倍梯度稀释到 $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 20 IU/mL,计算检测浓度对数值其与理论浓度对数值的相关系数,以确定本试剂盒的线性范围,相关系数 $r^2 \geq 0.98$ 则合格。

#### 1.2.8 批内和批间精密度检测

将临床上收集的高值混合样本( $1 \times 10^8$  IU/mL以上)混匀后制备成精密度参考品Hc1( $1 \times 10^8$  IU/mL左右),Mc1( $1 \times 10^3$  IU/mL左右),Lc1(使用小牛血清稀释HBV标准品到200 IU/mL),每个参考品重复20次测试,计算检测浓度对数值的变异系数(CV值), $CV \leq 5\%$ 则批内精密度合格。

将临床上收集的另一份高值混合样本( $1 \times 10^8$  IU/mL以上)混匀后制备成精密度参考品Hc2( $1 \times 10^8$  IU/mL左右),Mc2( $1 \times 10^3$  IU/mL左右),Lc2(使用小牛血清稀释HBV标准品到200 IU/mL),每个参考品重复5次实验,每次实验三个参考品各重复4次测试,计算检测浓度对数值的变异系数, $CV \leq$

5%则批间精密度合格。

#### 1.2.9 检测型别的确认

将购自美国Sera Care Life Science公司的乙型肝炎分型参考品HBV Worldwide AccuSet™ Performance Panel(包含A、B、C、D、E、F、H,7种型别)使用小牛血清稀释100倍后进行检测,确定不同型别的阴阳性。

#### 1.2.10 准确度的确定

使用HBV国家参考品中的阳性参考品P1-P9,阴性参考品N1-N8,检测其阴阳性,确定本试剂盒的准确度。

#### 1.2.11 临床样本评估试验

收集自昆明市第三人民医院完成日常检测项目后的195例剩余样本。分别使用本研究的超敏试剂和某国产获证试剂进行平行检测,操作方法参照试剂盒说明书。

### 1.3 统计分析

使用Microsoft Excel 2010对数据进行整理,通过SPSS 19.0软件和Bland-Altman模型分析两组数据的阴阳性符合率及检测结果的相关性和一致性,统计结果使用Medcalc软件进行绘制两种方法差值对均值的散点图,并用Medcalc软件的Passing-Bablok回归法作两种检测结果的散点线性回归分析,用回归分析验证两种试剂结果的一致性。

## 2 结果

### 2.1 PCR反应体系与反应条件的优化

以收集到HBV阳性临床样本所提取的核酸为模板进行荧光PCR扩增,经矩阵法优化筛选,以获得最佳引物和探针浓度。引物探针的最佳浓度为:S基因上下游引物25  $\mu$ M,探针3  $\mu$ M,C基因上下游引物25  $\mu$ M、探针2  $\mu$ M,总体系60  $\mu$ L。最佳扩增条件确定为:50℃ 2 min,95℃ 15 min;94℃ 15 s,55℃ 45 s,45个循环;40℃ 20 s。退火延伸时收集荧光信号。

### 2.2 定量参考品的制备

选取临床上收集的乙型肝炎病毒阳性血浆,用HBV国家标准品对其进行标定后,使用阴性血浆根据标定浓度将其分别稀释到 $5.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$  IU/mL,制备成定量参考品,检测结果见图1所示,标准曲线相关系数 $r^2=0.999$ ,斜率 $slope=-3.328$ 。

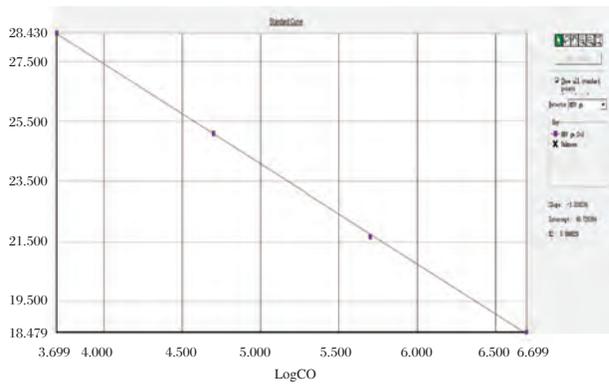


图1 定量标准品扩增结果

Figure 1 The results of quantitative standard amplification linear curve

### 2.3 最低检出限的确定

使用小牛血清稀释中国食品药品检定研究院的乙型肝炎病毒核酸国家灵敏度参考品到20、10、5、2.5 IU/mL,分别检测各浓度阳性检出率,见表1。用Origin的Sigmoidal Fit的方法拟合成曲线,根据软件给出的曲线公式计算本试剂盒的最低检出限,见图2。确定本试剂盒的灵敏度为10 IU/mL。

表1 HBV灵敏度的确定试验检测结果 [n(%)]

Table 1 The results of sensitivity determination test [n(%)]

样本浓度 (IU/mL)	阳性数/样本数 (n)	阳性率 (%)
20	20/20	100
	20/20	100
	20/20	100
	20/20	100
10	20/20	100
	20/20	100
	16/20	80
5	15/20	75
	16/20	80
	2/20	10
2.5	3/20	15
	3/20	15
	0/20	0
阴性	0/20	0
	0/20	0

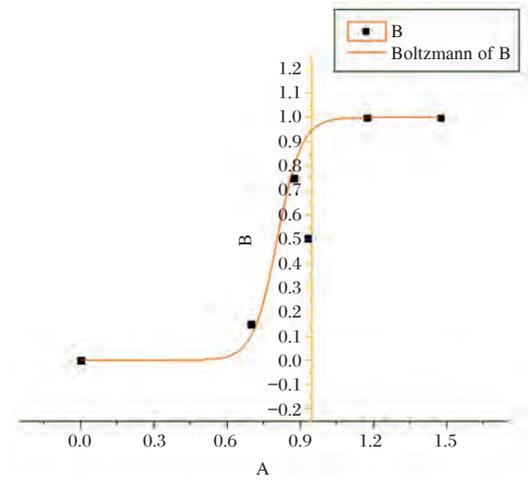


图2 HBV灵敏度的确定试验曲线拟合结果

Figure 2 Sensitivity determination test curve fitting result

### 2.4 最低定量限的确认

使用小牛血清稀释HBV国家参考品中的灵敏度参考品到20 IU/mL,重复20个测试,定量结果对数值在(1.3±0.5)Log<sub>10</sub> IU/mL范围内,检测结果平均值为15.41 IU/mL,确定本试剂盒的最低定量限为20 IU/mL,见图3。

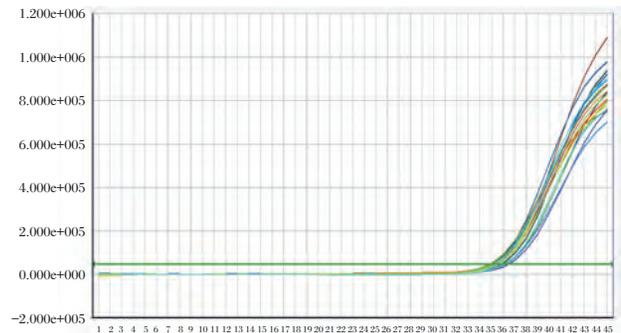


图3 最低定量检测限的确定扩增曲线

Figure 3 Determination of the minimum quantitative detection limit

### 2.5 线性范围的确认

选取临床上收集的HBV高值样本(1×10<sup>9</sup> IU/mL以上),使用本超敏试剂对其进行标定后,使用小牛血清将其10倍梯度稀释到1×10<sup>9</sup>、1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>3</sup>、1×10<sup>2</sup>、20 IU/mL,检测结果的对数值分别为8.817、7.874、6.977、5.812、4.973、3.881、2.597、2.110、1.424 Log<sub>10</sub> IU/mL。检测浓度对数值其与理论浓度对数值的相关系数r<sup>2</sup>=0.994,确定本试剂盒的可测定线性范围为20~1×10<sup>9</sup> IU/mL,见图4。

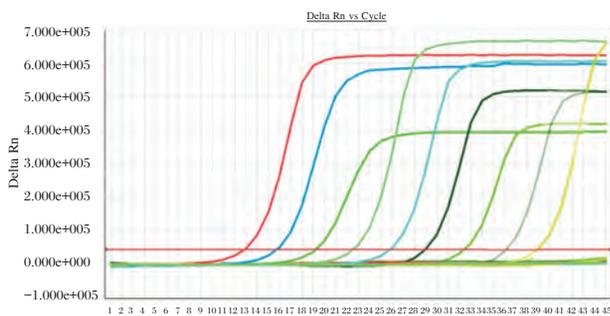


图4 高值临床样本10倍梯度稀释线性范围扩增曲线  
Figure 4 Linear range amplification curve of 10-fold gradient dilution for clinical samples



图7 批内精密度样本Lc1扩增曲线  
Figure 7 Intra-assay precision amplification curve of Lc1 sample

### 2.6 批内与批间精密度的确定

将三个批内精密度参考品(Hc1, Mc1, Lc1)各重复20个测试,检测结果对数值的CV值分别为0.88%, 2.53%和3.86%,见图5、图6、图7。批内重复性良好。

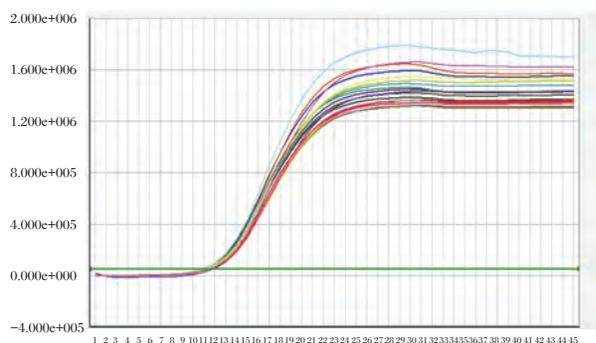


图5 批内精密度样本Hc1扩增曲线  
Figure 5 Intra-assay precision amplification curve of Hc1 sample

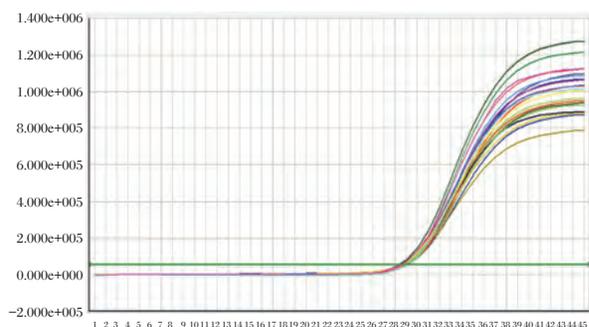


图6 批内精密度样本Mc1扩增曲线  
Figure 6 Intra-assay precision amplification curve of Mc1 sample

将3个批间精密度参考品(Hc2, Mc2, Lc2)重复5次实验,每次实验3个参考品各重复4个测试,每个参考品检测浓度对数值的CV值分别为2.10%, 3.70%和4.22%,批间重复性良好,见表2。

### 2.7 不同基因型的覆盖

将乙肝分型参考品HBV Worldwide Accu-Set™ Performance Panel中的7种基因型参考品用小牛血清稀释100倍后使用超敏试剂进行检测, A、B、C、D、E、F、H, 7种亚型检测结果全部为阳性。

### 2.8 准确度的确认

使用超敏试剂检测HBV国家参考品中的9份阳性参考品检测结果全为阳性;8份阴性参考品全部为阴性,见表3。本研究的超敏试剂的准确度为100%。

### 2.9 临床样本评估试验

使用超敏试剂与某国产获证试剂平行检测临床收集的195例样本,其中,超敏试剂检测出183例阳性、12例阴性;某国产获证试剂检测183例阳性、12例阴性。两者阴阳性不符合样本数2例。与某国产获证试剂相比,超敏试剂检测结果的阳性符合率为99.45%,阴性符合率为91.67%,总符合率为98.97%。Kappa检验一致性分析结果显示, Kappa值为0.911 2 ( $P < 0.05$ ),一致性较好,见表4。

对符合2个检测试剂线性范围内168例样本的检测结果取对数后进行相关性分析,相关系数  $r = 0.979 1$ ,  $P < 0.000 1$ ,表明两者具有很强的相关性(图9)。定值差异分析结果显示,超敏试剂与某国产获证试剂定量值差值的平均值为  $0.256 \text{ Log}_{10}$

表2 批间精密度检测结果及变异系数

Table 2 Inter-assay precision test results and coefficient of variation

批间精密度 编号	Lc2		Mc2		Hc2	
	定量值	对数值	定量值	对数值	定量值	对数值
1	3.48E+02	2.54	2.72E+03	3.43	2.93E+09	9.47
2	3.97E+02	2.60	1.91E+03	3.28	2.49E+09	9.40
3	3.34E+02	2.52	2.15E+03	3.33	2.47E+09	9.39
4	3.91E+02	2.59	2.72E+03	3.43	2.59E+09	9.41
5	3.37E+02	2.53	4.40E+03	3.64	1.08E+09	9.03
6	2.37E+02	2.37	3.89E+03	3.59	1.02E+09	9.01
7	2.26E+02	2.35	4.49E+03	3.65	1.01E+09	9.00
8	2.88E+02	2.46	5.60E+03	3.75	9.86E+08	8.99
9	2.19E+02	2.34	3.04E+03	3.48	4.02E+09	9.60
10	2.22E+02	2.35	2.84E+03	3.45	3.35E+09	9.53
11	2.86E+02	2.46	3.33E+03	3.52	3.31E+09	9.52
12	1.80E+02	2.26	3.82E+03	3.58	3.36E+09	9.53
13	2.25E+02	2.35	3.58E+03	3.55	3.41E+09	9.53
14	2.14E+02	2.33	3.09E+03	3.49	2.91E+09	9.46
15	3.30E+02	2.52	3.45E+03	3.54	3.27E+09	9.51
16	2.08E+02	2.32	3.73E+03	3.57	2.47E+09	9.39
17	2.15E+02	2.33	3.03E+03	3.48	2.60E+09	9.41
18	2.32E+02	2.37	2.03E+03	3.31	2.84E+09	9.45
19	2.51E+02	2.40	2.20E+03	3.34	2.48E+09	9.39
20	2.17E+02	2.34	1.99E+03	3.30	1.84E+09	9.26
AVG	267.85	2.42	3200.50	3.49	2.52E+09	9.37
STD	-	0.10	-	0.13	-	0.20
CV%	-	4.22%	-	3.70%	-	2.10%

表3 HBV 国家参考品检测结果

Table 3 HBV national reference test results

阳性参考品	检测结果	阴性参考品	检测结果
P1	阳性	N1	阴性
P2	阳性	N2	阴性
P3	阳性	N3	阴性
P4	阳性	N4	阴性
P5	阳性	N5	阴性
P6	阳性	N6	阴性
P7	阳性	N7	阴性
P8	阳性	N8	阴性
P9	阳性		

IU/mL, 95%界值为(-0.665~1.177) Log<sub>10</sub> IU/mL。95% (161/168)的样本检测结果在95%可信区间内,表明本研究的超敏试剂与某国产获证试剂具有较高的一致性,见图8。

### 3 讨论

本研究在 GeneBank 上进行序列对比,在 HBV 基因组的 S 区和 C 区两个高度保守的区域,分别设计一对特异性的引物和探针,应用 Taq-man 荧光 PCR 技术建立了一种 HBV DNA 超敏检测的方法,与其他国产试剂的单靶标设计相比,本研究的双靶标设计能有效防止因基因突变导致的漏检,同时加入内标设计,防止假阴性结果的

表4 超敏试剂与某国产获证试剂的临床样本评估试验结果

Table 4 Evaluation of clinical samples of hypersensitive reagents and a domestic certified reagent

试验	某国产试剂		合计
	阳性	阴性	
超敏试剂	182	1	183
阳性	1	11	12
阴性	183	12	195
总数			

出现。与此同时,本研究还采用了达安独有的Dprobe 探针技术,与普通的Taq-man 探针技术相比,Dprobe 探针的本底信号更低,信噪比更高,能有效提高试剂盒的检测灵敏度。本研究的超敏试剂的灵敏度达到10 IU/mL,线性范围20~2×10<sup>8</sup> IU/mL,批内和批间精密度变异系数在5%以内,检测型别包含A、B、C、D、E、F、H,其检测灵敏度等性能指标已经达到国际同类试剂盒水平。本研究还收集了195临床样本对其临床应用进行评价,

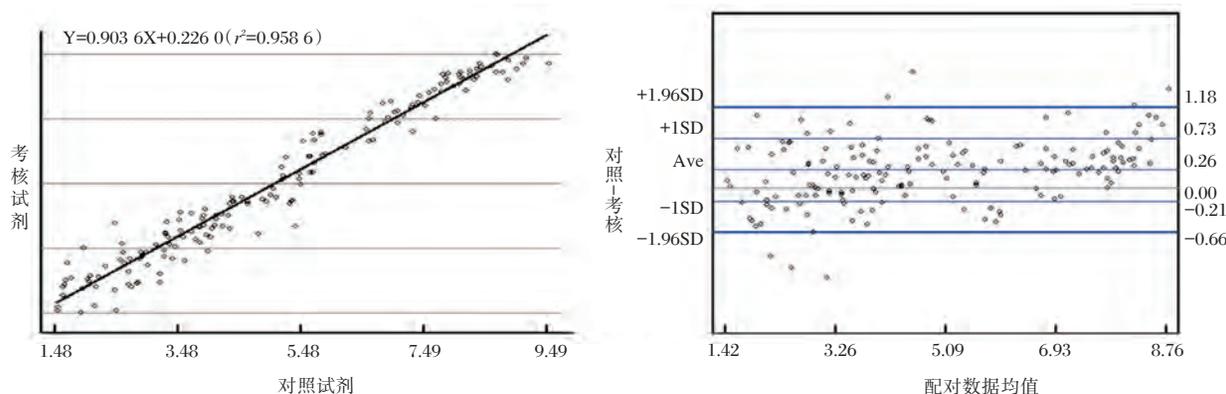


图8 超敏试剂与某国产获证试剂相关性和一致性分析结果

Figure 8 Correlation and consistency analysis results of hypersensitive reagents and a domestic certified reagent

与某国产获证试剂相比,超敏试剂的阳性符合率为99.45%,阴性符合率为91.67%,总符合率为98.97%,Kappa 检验一致性分析表明,超敏试剂与某国产获证试剂检测结果一致性较好(Kappa 值为0.911 2,  $P < 0.05$ , 95%置信区间为0.789 1~1.033 3)。相关性分析结果显示,本方法与某国产获证试剂具有显著相关性(相关系数  $r=0.979 1$ , 回归方程:  $Y=0.903 6X+0.226 0$ )。

以上结果表明,本研究成功建立了一种HBV 高敏检测的方法,其性能指标达到国际先进水平,具有很高临床使用价值。

虽然HBV-DNA 和/或HBsAg 是评价病毒复制的金标准,也是乙型肝炎患者安全停药的重要指标<sup>[7]</sup>。在抗病毒治疗过程中,由于核苷(酸)类药物[nucleot(s)ide analogues, NUCs]不能清除共价闭合环状DNA(cccDNA)<sup>[8]</sup>,因此很难实现慢性乙肝的临床治愈,而且患者停药后往往发生病毒学反弹和疾病复发。北京大学医学部基础医学院病原生物学系鲁凤民团队成功研制出国内首

个血清HBV RNA 荧光定量(TaqMan 探针法)检测试剂<sup>[9]</sup>,将cccDNA 产生的基因组RNA 前体(pgRNA)作为新的检测靶点,用于评估肝细胞内HBV cccDNA 的存在和转录活性,作为抗病毒治疗疗效判定及停药复发风险预判的新指标。

未来,以HBV DNA 和HBV RNA 联合检测的方法,将可能成为临床乙型肝炎诊断和治疗的新模式,为我国消灭乙型肝炎病毒及提升我国乙型肝炎的诊断水平做出重大贡献。

参考文献

[1] Meryem Jefferies, Bisma Rauff, Harunor Rashid, et al. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies [J]. World J Clin Cases, 2018, 6(13): 589-599.  
 [2] 中华医学肝病学分会, 中华医学会感染分会. 中国慢性乙型肝炎防治指南(2015版). 中国肝脏病杂志, 2015, 3: 1-18.

# 高灵敏乙型肝炎病毒核酸检测在术前筛查中的应用价值

李宝琪<sup>1,2</sup> 陈培松<sup>1</sup> 黄浩<sup>1</sup> 余学高<sup>1</sup> 黄彬<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨高灵敏乙型肝炎病毒(HBV)核酸检测在术前筛查中的应用价值。方法 收集术前筛查患者的血清标本,分别采用高灵敏荧光定量PCR法(高敏PCR)和化学发光微粒子免疫分析法(CMIA),检测血清中的HBV DNA和HBsAg,两方法结果不一致的标本采用Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan全自动核酸检测系统检测HBV DNA。结果 519例血清标本中,HBsAg阳性标本90例(17.3%),按HBsAg定量结果分为5组:I组(>5 000 IU/mL)、II组(1 000~5 000 IU/mL)、III组(500~1 000 IU/mL)、IV组(100~500 IU/mL)和V组(0.05~100 IU/mL),I组HBV DNA高于II、III、IV、V组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。90例HBsAg阳性标本中有13例标本的HBV DNA低于高敏PCR法的最低检测限,占阳性标本的14.4%。HBV DNA阳性标本79例(15.2%),其中2例标本HBsAg为阴性,CMIA法的漏检率为2.5%。15例定性结果不一致的标本经Roche全自动核酸检测系统复核后,13例HBV DNA阴性而HBsAg阳性标本的HBV DNA均低于该方法的最低检测限,2例HBV DNA阳性而HBsAg阴性标本的HBV DNA高于该方法的最低检测限。与金标准相比,高敏PCR法检测HBV DNA的灵敏度、特异度、阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)均为100.0%;CMIA法检测HBsAg的灵敏度、特异度、PPV、NPV分别为97.5%、97.0%、85.6%、99.5%;高敏PCR法检测HBV的特异度和PPV高于CMIA法( $P<0.05$ )。结论 高敏荧光定量PCR检测HBV DNA可用于术前筛查,优于目前常规使用的CMIA法,能准确反映患者体内HBV的复制情况和传染性,及时发现隐匿性感染,有效防止医源性传播。

**[关键词]** 高敏荧光定量PCR法; HBV DNA; 化学发光微粒子免疫分析法; 术前筛查

## The application value of high-sensitivity HBV nucleic acid test in preoperative screening

LI Baoqi<sup>1,2</sup>, CHEN Peisong<sup>1</sup>, HUANG Hao<sup>1</sup>, YU Xuegao<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080, 2. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510180)

**[ABSTRACT]** Objective To explore the application value of high-sensitivity Hepatitis B virus (HBV) nucleic acid detection in preoperative screening. Methods Serum samples were collected before surgery, and HBV DNA and HBsAg in serum were detected by high-sensitivity fluorescence quantitative PCR (high-sensitivity PCR) and chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). Specimens with inconsistent results from both methods were tested for HBV DNA using the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan automated nucleic acid detection system. Results Among 519 serum samples, 90 cases (17.3%) of HBsAg-positive specimens were divided into 5 groups according to the quantitative results of HBsAg: group

基金项目:国家自然科学基金(81572058)

作者单位:1. 中山大学附属第一医院检验医学部, 广东, 广州 510080

2. 广州医科大学金城检验学院, 广东, 广州 510180

\*通信作者:黄彬, E-mail: hb906@163.com

I (>5 000 IU/mL), group II (1 000~5 000 IU/mL), group III (500~1 000 IU/mL), group IV (100~500 IU/mL) and group V (0.05~100 IU/mL). The viral load of HBV DNA in group I was higher than that in II, III, IV and V, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Among the HBsAg-positive specimens, there were 13 specimens with which the viral load of HBV DNA were lower than the minimum detection limit of the high-sensitivity PCR. 79 specimens were positive for HBV DNA by high-sensitivity PCR, and the positive detection rate was 15.2%, of which 2 cases were negative for HBsAg, and the missed detection rate of CMIA method was 2.5%. 15 cases with inconsistent qualitative results were reviewed by Roche's automatic nucleic acid detection system, the HBV DNA of 13 specimens with HBV DNA negative but HBsAg positive were lower than the detection limit of the method. 2 cases with HBsAg negative but HBV DNA positive were higher than the detection limit of the method. Compared with the gold standard, the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of high-sensitivity PCR were 100.0%, and the sensitivity, specificity, PPV and NPV of CMIA was 97.5%, 97.0%, 85.6%, and 99.5% respectively. The specificity and PPV of high-sensitivity PCR was higher than that of CMIA and the difference between them was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusions** High-sensitivity fluorescence quantitative PCR detection of HBV DNA can be used for preoperative screening, which is superior to the conventionally used CMIA method, which can accurately reflect the replication and contagiousness of HBV in patients, detect occult infections in time, and effectively prevent iatrogenic transmission.

[KEY WORDS] High-sensitivity fluorescence quantitative PCR; HBV DNA; Chemiluminescence microparticle immunoassay; Preoperative screening

乙型病毒性肝炎(viral hepatitis B)简称乙肝,是世界性重大卫生问题。乙肝由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起,可表现为急性肝炎、慢性肝炎和重型肝炎,甚至可演变成肝硬化、肝癌。尽管近年来预防和控制工作取得很大成效,但我国人口基数大,乙肝患者人群庞大,防治形势依然严峻。据报道,目前中国大约有9 300万人感染HBV,其中2 000万是慢性乙肝患者<sup>[1]</sup>。根据2006年全国人群乙肝血清学调查显示,一般人群乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性率为7.18%,相比于1992年的9.75%虽有所下降,但是,成人HBsAg阳性率仍高于8%,因此对乙肝的防控仍不容松懈<sup>[2]</sup>。

HBV可经血液或血制品传播,并且医源性传播风险较高,包括使用未经严格消毒的医疗器械、不安全进行注射、手术、侵入性操作及血液透析等。因此,为了有效防范、避免和减少手术过程中HBV的院内交叉感染和传播,以及防范医疗风险和医疗纠纷的发生等,HBV感染筛查被列为术前筛查的必检项目。目前临床上主要通过免疫学方法检测HBV血清标志物。该方法虽可反映患者HBV感染的免疫状态,但易漏检隐匿性感染或感染初期机体未产生特异性抗体的窗口期感染者。若患者感染未知的病毒亚型,该方法也难以检出<sup>[3]</sup>。

高敏HBV DNA检测技术灵敏度高、特异性好,缩短了检测的窗口期,能直接反映体内病毒的复制状况,因而在临床上应用越来越广泛。为了提高术前筛查中乙肝的检出率,准确反映患者体内HBV的复制情况和传染性,有效避免医源性传播,本研究将高敏PCR法用于术前筛查,并与临床常用的化学发光微粒子免疫分析法(chemiluminescence microparticle immunoassay, CMIA)进行比较,两者定性结果不一致的采用Roche全自动核酸检测系统进行验证,探讨高敏HBV DNA检测在术前筛查中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床样本

收集2019年1月至4月间中山大学附属第一医院术前筛查患者的血清标本519例,剔除患者的重复标本,避免脂血、溶血等。将每例血清标本分为两份,一份用于血清学检测,当天进行;另一份用于核酸检测,离心分离血清后保存于-80℃备用,避免反复冻融。

### 1.2 主要仪器与试剂

ABI ViiA7型荧光定量PCR扩增仪购自美国ThermoFisher公司,Smart32半自动核酸提取仪购自中山大学达安基因股份有限公司,Architect-

i2000SR 免疫分析仪购自美国 Abbott 公司, Cobas AmpliPrep 全自动核酸提取仪和 Cobas TaqMan 48 全自动病毒载量检测仪购自瑞士 Roche 公司, 高灵敏乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒和核酸提取纯化试剂购自中山大学达安基因股份有限公司, Architect HBsAg 试剂盒购自美国 Abbott 公司, 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(内标法)购自瑞士 Roche 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 高敏 PCR 法检测 HBV DNA

在核酸提取试剂盒的预封装 96 孔板中加入 4  $\mu$ L 内标液、20  $\mu$ L 蛋白酶 K、200  $\mu$ L 血清样本和阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品及 4 个阳性定量标准品, 将其放入 Smart32 半自动核酸提取仪, 按核酸提取试剂盒说明书设置提取程序。运行结束后, 将所得核酸(40  $\mu$ L/孔)加入 PCR 反应管中(含配置好的反应液 20  $\mu$ L)。将 PCR 反应管放入 ABI ViiA7 型荧光定量 PCR 扩增仪, HBV DNA 扩增程序为: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 45 个循环。

所采用的高敏 HBV DNA 检测试剂盒的检测下限为 10 IU/mL, 若 FAM 检测通道无明显对数增长期, 且 VIC 检测通道有对数增长期, 或定量结果低于相应试剂盒检测下限, 则判定该标本核酸检测阴性; 若 FAM 检测通道和 VIC 检测通道均有对数增长期, 且 Ct 值小于 45, 定量结果大于相应试剂盒检测下限, 则判定该标本核酸检测阳性。

#### 1.3.2 CMIA 法检测 HBsAg

在每日常规质控通过后, 将待检标本放入 Architect-i2000SR 免疫分析仪进行检测, 严格按照试剂说明书操作, 记录仪器最终检测结果。HBsAg 正常参考范围为 0.00~0.05 IU/mL, HBsAg > 0.05 报告为阳性。

#### 1.3.3 Roche 全自动核酸检测系统检测 HBV DNA

对于上述核酸检测方法与血清学检测方法定性结果不一致的标本, 进一步采用 Roche Cobas AmpliPrep/Cobas 全自动核酸检测系统检测 HBV DNA。血清标本经 Cobas AmpliPrep 全自动核酸提取仪提取核酸, 将配好的 PCR 反应体系转移到 Cobas TaqMan 48 全自动病毒载量检测仪进行高敏荧光定量 PCR。

所采用的 HBV DNA 定量检测试剂盒的检测下限为 20 IU/mL, 结合 PCR 扩增曲线与 Ct 值综合判断, 若定量结果低于 20 IU/mL, 则判定该标本 HBV DNA 阴性; 若定量结果大于 20 IU/mL, 则判定该标本 HBV DNA 阳性。

以 2 方法一致的结果和 Roche 全自动核酸检测系统复核的结果为这批标本的最终结果(金标准结果), 用以评价高敏 PCR 法和 CMIA 法的检测性能。

#### 1.3.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析, 计量资料以  $P50(P25, P75)$  表示, 行 Kruskal & Wallis H 检验和 Mann-Whitney U 检验分析; 计数资料以 % 表示, 行  $\chi^2$  检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高敏 PCR 法与 CMIA 法的检测结果比较

519 例患者标本中, HBsAg 阳性标本 90 例, 阳性率为 17.3%, 其中 13 例标本(占阳性样本的 14.4%)的 HBV DNA 低于高敏 PCR 法的最低检测限; HBV DNA 阳性标本 79 例, 阳性率为 15.2%, 其中 2 例标本 HBsAg 阴性, CMIA 的漏检率为 2.5%。有 15 例标本的定性检测结果不一致。经  $\chi^2$  检验分析, 高敏 PCR 法与 CMIA 法对 HBV 的检出率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 HBV DNA 与 HBsAg 检测结果比较

Table 1 Comparison the results of HBV DNA and HBsAg

CMIA 法 (HBsAg)	高敏 PCR 法(HBV DNA)		合计
	+	-	
+	77	13	90
-	2	427	429
合计	79	440	519

+代表阳性; -代表阴性。

### 2.2 HBsAg 阳性标本的 HBV DNA 定量

90 例 HBsAg 阳性标本按 HBsAg 定量结果分为 5 组, 经 Kruskal-Wallis H 检验得到 5 组间 HBV DNA 载量差异, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 经 Mann-Whitney U 检验两两比较, I 组 HBV DNA 高于 II、III、IV、V 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其余各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表2 HBsAg阳性标本的HBV DNA定量结果比较

Table 2 Comparison of HBV DNA quantitative results in

HBsAg-positive samples			
分组	例数	HBsAg (IU/mL)	HBV DNA (IU/mL)
I	8	>5 000	2 235 288.55(94 590.82, 7 853 008.00)
II	35	1 000~5 000	1 504.16(72.23, 69 965.06)*
III	12	500~1 000	81.68(6.13, 40 625.57)*
IV	15	100~500	67.40(8.93, 2 721.74)*
V	20	0.05~100	112.70(15.54, 1 149.78)*

\*表示与I组(HBsAg>5 000 IU/mL)比较, P<0.05。

表3 15例结果不一致标本乙肝两对半检查结果

Table 3 Serum markers for HBV infection of 15 samples with inconsistent results

标本编号	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HbCAb
B138	+	-	-	-	+
B180	+	-	-	-	+
B190	+	-	-	-	+
C111	+	-	-	-	+
C139	+	-	-	+	+
C155	+	-	-	-	+
D56	+	-	-	-	+
D60	+	-	-	-	+
D67	+	-	-	-	+
D69	+	-	-	-	+
D77	+	-	-	-	+
D78	+	-	+	+	+
D80	+	-	-	-	+
D64	-	+	-	+	-
D85	-	+	-	-	+

+代表阳性; -代表阴性。

### 2.3 检测结果不一致标本的复核

15例定性检测结果不一致的标本经Roche全自动核酸检测系统复核后, 13例HBV DNA阴性

表4 15例结果不一致标本的复核情况

Table 4 Redetection of 15 samples with inconsistent results

标本编号	HBsAg (IU/mL)	HBV DNA(国产) (IU/mL)	HBV DNA(进口) (IU/mL)
B138	20.02	<10	<20
B180	968.59	<10	<20
B190	968.60	<10	<20
C111	100.20	<10	<20
C139	667.16	<10	<20
C155	63.40	<10	<20
D56	25.18	<10	<20
D60	560.51	<10	<20
D67	195.24	<10	<20
D69	360.53	<10	<20
D77	978.21	<10	<20
D78	1720.96	<10	<20
D80	431.76	<10	<20
D64	0.00	75.64	21.7
D85	0.00	14.05	176

而HBsAg阳性标本的HBV DNA均低于该方法的最低检测限, 仍为阴性。这13例标本的两对半结果中11例为HBsAg、HbCAb阳性, 1例为HBsAg、HBeAb和HbCAb阳性, 1例为HBsAg、HBeAg、HBeAb和HbCAb阳性, 结果见表3。2例HBV DNA阳性而HBsAg阴性标本的HBV DNA高于该方法的最低检测限, 仍为阳性, 见表4。

### 2.4 高敏PCR法与CMIA法的检测性能比较

高敏PCR法的灵敏度、特异度、阳性预测值(positive predict value, PPV)和阴性预测值(negative predict value, NPV)均为100.0%; CMIA法检测HBsAg的灵敏度、特异度、PPV、NPV分别为97.5%、97.0%、85.6%、99.5%。高敏PCR法检测HBV的特异度和PPV高于CMIA法(P<0.05), 其他指标的差异无统计学意义(P>0.05), 见表5。

表5 高敏PCR法与CMIA法的检测性能 [n(%)]

Table 5 The performance of high-sensitive PCR and CMIA [n(%)]

检测方法	金标准				灵敏度	特异性	PPV	NPV
	S+T+	S+T-	S-T+	S-T-				
高敏PCR法	79	0	0	440	100.0	100.0*	100.0*	100.0
CMIA	77	2	13	427	97.5	97.0	85.6	99.5

S代表金标准法; T代表检测方法; +代表阳性; -代表阴性, \*表示与CMIA法比较, P<0.05。

### 3 讨论

HBV 主要通过输注血液、血制品,皮肤黏膜破损和不安全注射等途径传播,其医源性传播风险较高,使用未经严格消毒的医疗器械、手术、侵入性操作以及血液透析等均有感染风险。有研究表明,维持性血液透析患者的肝炎病毒感染率比一般人群高,可能与反复输注血液及血制品、透析用品消毒不严格和院内交叉感染有关<sup>[4]</sup>。因此把控血液安全、严格做好术前筛查是阻断 HBV 传播的关键环节。

目前,临床上检测 HBV 感染的方法主要有血清学检测技术和分子诊断技术两种。血清学检测是利用病毒抗原或针对病毒抗原的特异性抗体检测患者体内血清标志物的方法,HBV 血清学检测指标主要包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb;主要检测方法有胶体金法、酶联免疫吸附试验、化学发光法和重组免疫印迹试验等,其中化学发光法具有较高灵敏度与特异性<sup>[9]</sup>,且适用于自动化仪器检测,在临床上得到广泛应用。然而血清学检测存在缺陷,易漏检感染窗口期、病毒隐匿性感染或者血清中病毒拷贝数极低的患者<sup>[5-6]</sup>。因此为了实现对 HBV 感染的早期诊断,有效防范和避免医疗过程中的交叉感染及医疗纠纷等,需要更为灵敏且能反映病毒传染性的检测方法。高敏 PCR 法灵敏度高、特异性好通过设计针对病毒保守序列的特异性引物扩增病毒及其变异株核酸,并将检测信号放大,显著提高了检出率,很好地解决了血清学检测的缺陷。并且可进行高灵敏度病毒载量检测,操作简便,在临床上应用广泛。高敏 HBV DNA 定量检测(最低检测限 10~15 IU/mL)已被美国肝病学会、欧洲肝病学会及 2015 年中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会出台的慢性乙型肝炎防治指南推荐使用<sup>[7-9]</sup>。

本研究中 90 例 HBsAg 阳性标本按 HBsAg 定量结果被分为 5 组, I 组(HBsAg>5 000 IU/mL)标本的 HBV DNA 显著高于 II、III、IV 和 V 组,但 II、III、IV、V 组之间的 HBV DNA 定量结果差异并无统计学意义,提示当血清标本 HBsAg 定量水平处于 0.05~5 000 IU/mL 间时,它们的 HBV DNA 定量结果没有显著差异。目前血清 HBsAg 与血清 HBV DNA 定量之间的相关性仍存在争议<sup>[10-12]</sup>,有报道指出在慢性 HBV 感染过程中两者之间是否存在相关性与患者所处的感染阶段有关<sup>[13]</sup>。另有报道指出

HBeAg 阳性患者中血清 HBsAg 与血清 HBV DNA 定量之间存在良好相关性,而在 HBeAg 阴性患者中两者不存在相关性<sup>[14]</sup>。

90 例 HBsAg 阳性标本中 HBV DNA 阳性率为 85.56%,有 13 例标本经高敏 PCR 法检测低于最低检测限,为阴性。查询病历得知这 13 名患者均为慢性乙肝患者,12 例为 HBeAg 阴性患者。研究报道,慢性乙肝患者用药治疗后,HBV 的复制可被抑制,不具有传染性,但 HBV S 区基因可整合至宿主肝细胞基因组中持续表达 HBsAg,因而血清中 HBsAg 可长期阳性,但此时血清中 HBV DNA 可低于高敏 PCR 法的最低检测限而检测不到<sup>[15-16]</sup>。该 13 例标本的 HBsAg 平均含量为(543.10±487.48) IU/mL,12 例标本均为较低水平<sup>[17-18]</sup>,含量介于(20.02~978.21) IU/mL,另 1 例标本的 HBsAg 含量为 1 720.96 IU/mL,两对半为 HBsAg、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 阳性。高敏 PCR 法均检测不到这 13 例患者血清标本中的 HBV DNA,这与黄劲松等的研究结果一致<sup>[19]</sup>,低水平 HBsAg 不足以评价 HBV 的复制情况和传染性,需结合核酸检测结果。因此,相比于血清学检测,尤其是血清 HBsAg 处于较低水平时,高敏 HBV DNA 检测更能准确反映患者体内病毒的复制情况和传染性。

519 例血清标本中,79 例 HBV DNA 阳性标本中有 2 例 HBsAg 阴性,CMIA 法的漏检率为 2.5%。查询病历得知,该 2 例患者均为肾移植术后患者。其中 1 例患者乙肝两对半检测无异常,HBsAb 滴度处于较低水平,另外 1 例患者 HBcAb 阳性。这 2 例患者可能为 HBV 窗口期感染或隐匿性 HBV 感染(occult hepatitis B virus infection, OBI),需随访跟踪调查。有学者对 HBsAg 阴性血液进行高敏 PCR 确认,发现 0.07%为假阴性,且造成假阴性的主要原因是 OBI<sup>[20]</sup>,OBI 患者血清中 HBsAg 含量低于血清学试剂盒检测下限,可能是由于 HBV PreS/S 区突变导致抗原变异或表达减少,也可能与患者免疫状态有关,从而表现为血清中 HBsAg 检测阴性而血清或肝组织中有低载量 HBV DNA<sup>[21-22]</sup>。OBI 可导致不明原因肝癌、输血感染、器官移植感染和慢性肝炎等,且血清学筛查难以发现,而高敏 HBV DNA 检测可弥补这一缺陷。

本研究中 15 例高敏 PCR 法与 CMIA 法定性结果不一致的样本采用 Roche 全自动核酸检测系统复核后,高敏 PCR 法的检测结果与 Roche 全自动

核酸检测系统的结果完全一致。高敏PCR法的结果与金标准结果相比,灵敏度、特异度、PPV、NPV均为100%,提示研究中所用的国产高敏PCR试剂检测性能优良,能达到优异的检测效果<sup>[23]</sup>。且与进口试剂相比,能大大降低检测成本,造福广大患者。

综上所述,高敏HBV DNA定量检测可用于术前筛查乙肝患者,能准确反映患者体内HBV的复制情况和传染性,及时发现隐匿性感染,有效防止医源性传播。

### 参考文献

- [1] Soriano V, Young B, Reau N, et al. Report from the International Conference on Viral Hepatitis - 2017 [J]. *AIDS Rev*, 2018, 20(1): 58-70.
- [2] 徐爱强, 张丽. 中国病毒性肝炎血清流行病学调查的回顾与意义 [J]. *中华预防医学杂志*, 2017, 51(6): 457-461.
- [3] Seo DH, Whang DH, Song EY, et al. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(3): 600-606.
- [4] Malhotra R, Soin D, Grover P, et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection in hemodialysis patients: A retrospective study from a tertiary care hospital of North India [J]. *J Nat Sc Biol Med*, 2016, 7(1): 72-74.
- [5] 叶贤林, 李活, 许晓绚, 等. 核酸扩增技术在献血者血液HBV DNA、HCV RNA及HIV-1 RNA筛查中的应用研究 [J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(1): 6-10.
- [6] 李仲平, 王淩, 郑优荣, 等. 广州地区HBsAg阴性无偿献血血液传播HBV残余风险评估 [J]. *广东医学*, 2014, 35(3): 442-445.
- [7] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. *HEPATOLOGY*, 2018, 67(4): 1560-1599.
- [8] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- [9] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015更新版) [J]. *中华肝病杂志*, 2015, 23(12): 888-905.
- [10] Karra VK, Chowdhury SJ, Ruttala R, et al. Clinical Significance of Quantitative HBsAg Titres and its Correlation With HBV DNA Levels in the Natural History of Hepatitis B Virus Infection [J]. *Clin Exp Hepatol*, 2016, 6(3): 209-215.
- [11] Zhang P, Du HB, Tong GD, et al. Serum hepatitis B surface antigen correlates with fibrosis and necroinflammation: A multicentre perspective in China [J]. *Viral Hepat*, 2018, 25(9): 1017-1025.
- [12] Martinot-Peignoux M, Carvalho-Filho R, Lapalus M, et al. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naïve, e antigen-positive patients [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(6): 1089-1095.
- [13] Cai D, Wang X, Yan R, et al. Establishment of an inducible HBV stable cell line that expresses cccDNA-dependent epitope-tagged HBeAg for screening of cccDNA modulators [J]. *Antiviral research*, 2016, 132: 26-37.
- [14] Yang N, Feng J, Zhou T, et al. Relationship between serum quantitative HBsAg and HBV DNA levels in chronic hepatitis B patients [J]. *Med Virol*, 2018, 90(7): 1240-1245.
- [15] Yotsuyanagi H, Hashidume K, Suzuki M, et al. Role of Hepatitis B Virus in Hepatocarcinogenesis in Alcoholics [J]. *Alcoholism Clinical & Experimental Research*, 2010, 28(s2): 181S-185S.
- [16] Saitta C, Tripodi G, Barbera, et al. Hepatitis B virus (HBV) DNA integration in patients with occult HBV infection and hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2015, 35(10): 2311-2317.
- [17] 刘立, 刘春云, 王霖, 等. 低水平HBsAg患者肝脏组织病理学变化及其相关因素分析 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(7): 526-528.
- [18] 史罗明, 周根法, 孙冬林. 聚乙二醇干扰素- $\alpha$ -2a治疗血清低水平HBsAg阳性的慢性乙型肝炎患者临床结局预测研究 [J]. *实用肝病杂志*, 2018, 21(4): 565-568.
- [19] 黄劲松, 张军霞, 刘世国, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原低水平阳性血清的病毒核酸载量分析 [J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(6): 782-783.
- [20] 周怡, 史恩溢, 曹谊, 等. HBsAg阴性献血者隐匿性HBV感染的血清学特征及其与病毒载量的关系 [J]. *临床输血与检验*, 2017, 19(6): 570-573.
- [21] Coppola N, Onorato L, Iodice V, et al. Occult HBV infection in HCC and cirrhotic tissue of HBsAg-negative patients: a virological and clinical study [J]. *Oncotarget*, 2016, 38(7): 62706-62714.
- [22] Terry Cheuk-Fung Yip, Grace Lai-Hung Wong. Current Knowledge of Occult Hepatitis B Infection and Clinical Implications [J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(2): 249-260.
- [23] 余学高, 邓间开, 何小洪, 等. HBV DNA高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(2): 111-116.

## 高敏与普通荧光定量PCR技术在慢乙肝患者抗病毒疗效监测中的对比研究

卢建华 杨莉 赵召霞 李芊璘 李敏然 刘玉珍 戴二黑 陈秀丽\*

**[摘要]** **目的** 比较高灵敏度与普通荧光定量PCR技术在慢性乙型肝炎(CHB)患者抗病毒疗效监测中的区别。**方法** 对49例CHB患者141份采用普通PCR检测结果为阴性(<500 IU/mL)标本,采用高敏PCR试剂进行复查。**结果** 根据高敏PCR血清HBV DNA定量检测结果,141份采用普通PCR检测结果阴性标本存在以下5种状况,即>500、20~500、10~20、<10 IU/mL和阴性,比例分别为13.5%、31.9%、18.4%、30.5%和5.7%。随着血清HBV DNA水平的逐渐增高,各组ALT、AST水平和异常升高率也存在逐渐增加的趋势,但是仅仅各组AST水平差异有显著意义( $P<0.05$ )。随着血清HBV DNA水平逐渐降低,各组血清HBeAg阳性率和水平也存在逐渐降低的趋势。其中,HBV DNA阴性组血清HBeAg阳性率显著低于10~20 IU/mL组和>500 IU/mL组( $P<0.05$ )。**结论** 与普通PCR技术相比,高灵敏度的HBV DNA荧光定量PCR技术在CHB患者抗病毒治疗监测中准确性更高。

**[关键词]** 慢性乙型肝炎; 抗病毒治疗; 疗效监测; HBV DNA; 高敏荧光定量PCR

### Comparative study of high-sensitivity and conventional fluorescence quantitative PCR in the monitoring of antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis B

LU Jianhua, YANG Li, ZHAO Zhaoxia, LI Qianlin, LI Minran, LIU Yuzhen, DAI Erhei, CHEN Xiuli\*

(Department of Laboratory Medicine, the Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei, China, 050021)

**[ABSTRACT]** **Objective** To compare the difference between high sensitivity and conventional fluorescence quantitative PCR in the monitoring of antiviral efficacy in patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** A total of 141 samples of 49 patients with CHB were negative (<500 IU/mL) specimens with common PCR and were reviewed with high-sensitivity PCR reagents. **Results** Based on the quantitative results of serum HBV DNA using high-sensitivity PCR, 141 negative samples with common PCR results existed in the following five conditions, namely: >500 IU/mL, 20~500 IU/mL, 10~20 IU/mL, <10 IU/ and negative. The proportions were 13.5%, 31.9%, 18.4%, 30.5%, and 5.7%, respectively. With the gradual increase of serum HBV DNA level, the level of ALT, AST levels and abnormal elevated rates in each group also showed a gradually increasing trend. However, only the AST levels of each group were significantly different ( $P<0.05$ ). As serum HBV DNA levels gradually decreased, the positive rate and level of serum HBeAg in each group also gradually decreased. Among them, the HBeAg positive rate of HBV DNA negative group was significantly lower than that of 10~20 IU/mL group and >500 IU/mL group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Compared with conventional PCR, high-sensitivity HBV DNA fluorescence quantitative PCR plays an important role in the monitoring of antiviral therapy with CHB patients.

**[KEY WORDS]** Chronic hepatitis B; Antiviral therapy; Efficacy monitoring; HBV DNA; High sensitivity fluorescence quantitative PCR

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展指导计划(151460653)

作者单位:石家庄市第五医院检验科,河北,石家庄 050021

\*通信作者:陈秀丽, E-mail: 13363887189@163.com

近年来,世界卫生组织、美国肝病研究学会(American Association for the study of liver disease, AASLD)、欧洲肝脏研究协会(European Association for the Study of the Liver, EASL)、亚太肝病研究学会(Asia Pacific association for the study of liver, APASL)以及中华医学会肝病学分会等制订的慢性乙型肝炎防治指南均推荐采用灵敏度和精确度高的实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR)法,最低检测下限为10~15 IU/mL<sup>[1-4]</sup>。然而,目前国内各单位常用的HBV DNA定量检测方法的检测灵敏度在100~1 000 IU/mL之间,往往不能很好地满足临床对CHB管理的需要。高灵敏度的HBV DNA试剂推广速度缓慢的原因除了进口试剂价格昂贵外,还包括临床对高灵敏度的HBV DNA检测的临床意义了解不深刻。本研究选取141份接受乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)抗病毒治疗慢性患者普通PCR检测HBV DNA阴性标本,采用高灵敏度的HBV DNA试剂进行复检,分析低值HBV DNA的分布特征,并探索高灵敏度HBV DNA检测在慢乙肝患者抗病毒疗效监测中的意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

49例初治CHB患者,均为2017年1月至2019年6月在石家庄市第五医院就诊患者。入选标准:年龄为18周岁及以上,性别不限;HBsAg阳性至少6个月;未接受过任何治疗的HBeAg阳性CHB患者。排除标准:合并其他肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的患者;合并自身免疫性疾病的患者;其他原因所致的慢性肝病患者;肝硬化患者;原发性肝癌患者;妊娠或哺乳期患者;合并其他严重的慢性疾病患者;目前正在参与其它临床试验研究患者。本研究通过了石家庄市第五医院伦理委员会审批,所有患者均签署了知情同意书。

### 1.2 治疗方法

所有患者均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)》<sup>[1]</sup>中抗病毒治疗的适应证。抗病毒治疗方案:恩替卡韦(苏州东瑞制药有限公司)0.5 mg,每日一次。

### 1.3 观察指标

治疗开始前(基线)、治疗开始后4、12、24、36、48周检测HBV血清学标志物和HBV DNA定量水

平,血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartic aminotransferase, AST)。采用高敏PCR试剂对141份采用普通PCR检测HBV DNA定量结果阴性(<500 IU/mL)的标本,进行复查。

#### 1.3.1 主要仪器与试剂

DA3200全自动核酸提取仪购自中山大学达安基因股份有限公司,ABI7500型荧光定量PCR仪购自美国Life Technologies公司,低温高速离心机购自德国Eppendorf公司;HBV DNA普通检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,其说明书声明的灵敏度为500 IU/mL,线性范围为500~5.0×10<sup>8</sup> IU/mL。HBV DNA高敏检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,其说明书声明的灵敏度为20 IU/mL,线性范围为20~1.0×10<sup>9</sup> IU/mL。autolumo A2000plus型全自动化学发光测定仪购自郑州安图生物工程股份有限公司。H7600型全自动生化分析仪购自日本日立公司。

#### 1.3.2 血清HBV DNA检测

采用荧光定量PCR技术检测血清HBV DNA含量。

#### 1.3.3 HBV血清学标志物检测

采用化学发光免疫分析技术定量检测血清HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc水平。

#### 1.3.4 肝功能检测

采用全自动生化分析仪检测血清ALT、AST水平。

### 1.4 统计学方法

将研究对象的临床数据导入Excel表格中,采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用方差分析;计数资料以例数( $n$ )或百分率(%)表示,组间比较用卡方分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高敏PCR与普通PCR检测CHB患者血清HBV DNA结果比较

141份采用普通PCR检测结果阴性CHB患者标本中,采用高敏PCR试剂进行复查,根据血清HBV DNA定量水平IU/mL,存在以下5种结果,即>500、20~500、10~20、<10 IU/mL和阴性,比例分别为13.5%、31.9%、18.4%、30.5%和5.7%,见表1。

表1 高敏PCR与普通PCR检测CHB患者血清HBV DNA结果比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of serum HBV DNA results between high sensitivity and normal PCR in CHB patients [n(%)]

时间点 (周)	普通PCR HBV DNA		高敏PCR HBV DNA 检测结果(IU/mL)			
	<500 IU/mL 例数	>500	20~500	10~20	<10	阴性
4	14	5(35.7)	6(42.9)	0(0)	3(21.4)	0(0)
12	32	8(25.0)	15(46.9)	5(15.6)	3(9.4)	1(3.1)
24	31	1(3.2)	14(45.2)	9(29.0)	6(19.4)	1(3.2)
36	33	2(6.1)	6(18.2)	8(24.2)	15(45.4)	2(6.1)
48	31	3(9.7)	4(12.9)	4(12.9)	16(51.6)	4(12.9)
合计	141	19(13.5)	45(31.9)	26(18.4)	43(30.5)	8(5.7)

### 2.2 CHB患者血清HBV DNA载量与ALT、AST水平的关系

按照高敏PCR试剂血清HBV DNA的检测分组,各组ALT、AST的状况见表2。随着血清HBV DNA水平增高各组ALT水平呈逐渐升高的趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。HBV DNA阴性组、<10 IU/mL组和10~20 IU/mL组与HBV DNA>500 IU/mL组CHB患者AST水平相比较,差异均有统计学意义( $P$ 值分别为0.010、0.012、0.023)。其余各组之间比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。随着血清HBV DNA水平增高,各组ALT、AST异常升高率也存在逐渐增加的趋势,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表2 CHB患者血清HBV DNA与ALT、AST的关系  
[( $\bar{x}\pm s$ )]

Table 2 Relationship between serum HBV DNA and ALT and AST in CHB patients [( $\bar{x}\pm s$ )]

HBV DNA 水平(IU/mL)	标本数	ALT 状况(U/mL)		AST 状况(U/mL)	
		异常 升高	水平	异常升高	水平
>500	19	8(42.1)	43.5±31.4	6(31.6)	37.4±18.3
20~500	45	10(22.2)	29.0±15.9	9(20.0)	30.7±15.8
10~20	26	6(23.1)	26.5±12.0	2(7.7)	28.2±8.1 <sup>*</sup>
<10	43	4(9.3)	30.6±29.5	6(13.9)	28.1±10.8 <sup>*</sup>
阴性	8	1(12.5)	25.5±9.7	0(0)	22.8±3.7 <sup>*</sup>

与>500 IU/mL组比较,  $P<0.05$ 。

### 2.3 CHB患者血清HBV DNA与血清HBV标志物的关系

随着血清HBV DNA水平逐渐降低,各组血清HBeAg阳性率和水平也存在逐渐降低的趋势。其

中,HBV DNA阴性组血清HBeAg阳性率显著低于10~20 IU/mL和>500 IU/mL,差异有统计学意义( $P$ 值分别为0.033、0.006),但各组HBeAg水平之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表3。

表3 CHB患者血清HBV DNA载量与HBeAg和抗-HBc状况的关系 [( $\bar{x}\pm s$ )]

Table 3 Relationship between serum HBV DNA load and HBeAg and anti-hbc status in CHB patients [( $\bar{x}\pm s$ )]

HBV DNA 标本数 水平(IU/ml) (n)	HBeAg 状况		抗-HBc 状况		
	阳性	水平	阳性	水平	
>500	19	16(84.2) <sup>a</sup>	136.6±221.9	19(100.0)	83.4±40.4
20~500	45	29(64.4)	34.7±112.1	45(100.0)	91.2±46.7
10~20	26	19(73.1) <sup>a</sup>	5.5±11.8	26(100.0)	107.4±38.2
<10	43	26(60.5)	43.6±232.5	43(100.0)	104.2±50.5
阴性	8	2(25.0)	4.0±7.7	8(100.0)	78.3±50.5

与HBV DNA阴性组比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

本文对比了同一公司的普通和高敏乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)的检测结果,结果显示141份采用普通HBV核酸定量检测试剂盒检测结果阴性(<500 IU/mL)的CHB患者标本中,采用高敏PCR试剂盒检测仅有8份(5.7%)为阴性。HBV复制的一个最显著的特点是经mRNA中间体进行逆转录,这一过程由于缺乏校对酶的作用而容易发生错误,核苷酸替代率约为 $1\sim 3\times 10^{-5}/nt/年$ <sup>[6]</sup>。HBV变异率高于其他DNA病毒4个数量级,而低于RNA病毒1~2个数量级。普通PCR试剂一般采用S或C区等保守段基因进行单靶标扩增,因此,不可避免的存在定量值

偏低甚至漏检可能<sup>[7]</sup>。一项 179 例 HBV 临床样本研究显示, 6.1% (11 例) Roche CAP/CTM 定量值显著低于(差值 $\geq 1.0 \log_{10}$  IU)双靶标扩增定量值, 其中 4 例在 nt1827-nt1970 位突变, 位于 Roche 试剂扩增靶区<sup>[8]</sup>。有研究显示双靶标扩增曲线荧光值高于单靶标, CT 值略有提前<sup>[9]</sup>。本文研究结果再次证实了这一结论, 有 19 份 (13.5%) 检测结果高于 500 IU/mL, 范围在 696~41 500 IU/mL 之间。

本文进一步分析了这些低病毒载量 (<500 IU/mL) 标本的临床特征, 随着血清 HBV DNA 水平的逐渐增高, 各组 ALT、AST 水平和异常升高率也存在逐渐增加的趋势, 但是仅仅各组 AST 水平差异有显著意义 ( $P < 0.05$ )。而且, 随着血清 HBV DNA 水平逐渐降低, 各组血清 HBeAg 阳性率和水平也存在逐渐降低的趋势。其中, HBV DNA 阴性组血清 HBeAg 阳性率显著低于 10~20 IU/mL 组和 >500 IU/mL 组 ( $P < 0.05$ ), 提示高灵敏度的 HBV DNA 定量检测结果在 CHB 患者抗病毒治疗监测中发挥的重要作用。HBV DNA 定量检测主要用于判断慢性 HBV 感染的病毒复制水平, 可用于抗病毒治疗适应证的选择及疗效的判断<sup>[5]</sup>。有文献报道治疗早期 HBV DNA 是核苷(酸)类药物疗效的预测因子, 治疗第 24 周时的 HBV DNA 值可预测长期治疗的 VR 率, 第 24 周时 HBV DNA  $< 2.3 \log_{10}$  IU/mL 的患者 3 年 VR 达到 98.6%, 治疗 24 周时 HBV DNA 值可预测 HBeAg 清除率<sup>[10]</sup>, 第 24 周时 HBV DNA  $< 63$  IU/mL 的患者 2 年 HBeAg 清除率达 43.2%<sup>[11]</sup>。而且, 对抗病毒治疗耐药的最初临床表现是病毒学突破, 病毒学突破可早于生化学数月甚至数年<sup>[12-13]</sup>。所有这些研究结果均提示灵敏度和精确度高的 HBV DNA 检测方法的重要性和必要性。普通 PCR 检测方法由于灵敏度差, 一般检测下限仅为 500 IU/mL, 远远不能满足临床慢乙肝管理的需求, 因此, 需要大力推广高敏 HBV DNA 定量检测技术。

本文发现了一些非常有临床价值的结果, 但由于例数偏少, 还需要多中心、大样本临床研究以及连续长期随访加以证实。本院牵头 7 个临床研究中心, 已经开展了为期 2 年的恩替卡韦抗病毒治疗队列研究, 期望对高灵敏度 HBV DNA 定量检测技术的临床价值有更深入的探讨和评价。

## 参考文献

- [1] World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. World Health Organization, 2015.
- [2] Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1560-1599.
- [3] European Association For The Study Of The Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *Journal of hepatology*, 2017, 67(2): 370-398.
- [4] Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. *Hepatology international*, 2016, 10(1): 1-98.
- [5] 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(2015 更新版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 888-905.
- [6] 徐道振. 病毒性肝炎临床实践 [Z]. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 139-153.
- [7] Kania D, Ottomani L, Meda N, et al. Performance of two real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA detection and quantitation [J]. *J Virol Methods*, 2014, 201: 24-30.
- [8] Liu C, Chang L, Jia T, et al. Real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA quantification may require two different targets [J]. *Virology*, 2017, 14(1): 94.
- [9] Sun S, Meng S, Zhang R, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection [J]. *Virology*, 2011, 8: 227.
- [10] Shin JW, Jung SW, Park BR, et al. Prediction of response to entecavir therapy in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B based on on-treatment HBeAg, HBeAg and HBV DNA levels [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(10): 724-731.
- [11] Peng CY, Hsieh TC, Hsieh TY, et al. HBV-DNA level at 6 months of entecavir treatment predicts HBeAg loss in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients [J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(4): 308-313.
- [12] Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(2): 405-415.
- [13] Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2007, 45(2): 507-539.

· 论 著 ·

# 高灵敏度 HBV DNA 检测在乙型肝炎相关性肝细胞肝癌中的临床应用价值研究

周莹<sup>1</sup> 张军霞<sup>2</sup> 黄舒<sup>1</sup> 刘黎明<sup>1</sup> 郭威<sup>3\*</sup>

**[摘要]** **目的** 通过对血清低病毒载量 HBV DNA (<1 000 IU/mL) 乙型肝炎相关性肝细胞肝癌 (HCC) 患者检测, 探讨乙型肝炎病毒血清高灵敏度 HBV DNA 检测水平对乙型肝炎相关性肝细胞肝癌临床治疗的帮助。 **方法** 选取 2016 年 2 月至 2018 年 10 月在江汉大学附属湖北省第三人民医院门诊和住院的, 普通荧光探针法 HBV DNA 水平持续小于 1 000 IU/mL 的 96 例 HCC 患者血清, 进行血清高灵敏度 HBV DNA 检测, 分析患者血清免疫学标志、肝功能指标与 HBV DNA 水平的相关性和临床意义。 **结果** 96 例乙型肝炎相关性 HCC 患者当中, HBV DNA 水平大于 10 IU/mL 有 74 例 (77.1%)。HBV DNA 水平大于 10 IU/mL 者的肝硬化发生率、肝功能指标 (ALT、 $\gamma$ -GT) 异常率均较 HBV DNA 水平小于 10 IU/mL 者高。 **结论** 乙型肝炎相关性 HCC 与乙型肝炎病毒持续复制有关, 高灵敏度 HBV DNA 检测较普通荧光探针法 HBV DNA 检测更有临床指导意义。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 低病毒载量; 肝细胞癌; 高灵敏度 HBV DNA 检测

## Clinical value of high sensitive HBV DNA detection in hepatitis B - related hepatocellular carcinoma

Zhou Ying<sup>1</sup>, Zhang Junxia<sup>2</sup>, Huang Shu<sup>1</sup>, Liu Liming<sup>1</sup>, Guo Wei<sup>3\*</sup>

(1. Hubei NO. 3 People's Hospital of Jianghan University, Hepatology Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, WuHan, HuBei, China, 430033; 2. Hubei NO.3 People's Hospital of Jianghan University, Clinical Laboratory, HuBei province, WuHan, 430033; 3. Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Department of Infectious Disease, WuHan, HuBei, China, 430030)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the relationship between hepatitis B virus serum high-sensitivity HBV DNA detection and hepatocellular carcinoma (HCC) by detecting low-viral HBV DNA (< 1 000 IU/mL) in patients with hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** From February 2016 to October 2018, 96 patients with HCC who had HBV DNA levels of less than 1 000 IU/mL in the general outpatient and inpatient hospitals of the Third People's Hospital of Hubei Province affiliated to Jianghan University were selected. Serum high-sensitivity HBV DNA was detected to analyze the correlation and clinical significance of serum immunological markers, liver function markers and HBV DNA levels. **Results** Of the 96 patients with hepatitis B-related HCC, 74 (77.1%) had HBV DNA levels greater than 10 IU/mL. The incidence of cirrhosis and liver function (ALT,  $\gamma$ -GT) in patients with HBV DNA levels greater than 10 IU / mL were higher than those with HBV DNA levels less than 10 IU/mL. **Conclusion** HBV-related HCC is associated with the continuous replication of hepatitis B virus. High-sensitive HBV DNA detection is more clinically significance than HBV DNA detection by common fluorescent probe methods.

**[KEY WORDS]** Hepatitis B virus; Low serum hepatitis B virus DNA level; Hepatocellular carcinoma; High-sensitive HBV DNA detection

作者单位: 1. 江汉大学附属湖北省第三人民医院中西医结合肝病科, 湖北, 武汉 430033

2. 江汉大学附属湖北省第三人民医院检验科, 湖北, 武汉 430033

3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科, 湖北, 武汉 430030

\*通信作者: 郭威, E-mail: weig369@aliyun.com

肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是我国第4位常见恶性肿瘤和第3位肿瘤致死病因<sup>[1]</sup>。我国HCC患者约85%以上与乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染相关<sup>[2]</sup>。研究表明HBV DNA是HCC发生的独立危险因素<sup>[3]</sup>,HBV DNA载量越高,HCC的发生风险越高<sup>[4]</sup>。近年来,核苷类抗HBV药物的广泛应用,使得治疗者HBV复制得到明显抑制,越来越多的患者出现HBV DNA阴转。但临床大多采用普通荧光探针法PCR检测HBV DNA水平(检出下限为<1 000 IU/mL),该方法灵敏度低,对于低病毒载量患者易出现假阴性结果,从而影响临床预后判断和治疗决策。高灵敏度HBV DNA检测法(检出下限为<10 IU/mL)的灵敏性和特异度均较高,有助于更好地了解低病毒载量的慢乙肝患者HBV DNA复制情况。本研究对普通荧光探针法血清HBV DNA持续小于检出最低下限(1 000 IU/mL)的乙型肝炎相关HCC患者进行高灵敏度HBV DNA检测,以研究高灵敏度HBV DNA检测在HCC高风险人群治疗监测中的临床应用价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

经医院伦理委员会批准同意,选取2016年2月至2018年10月在江汉大学附属湖北省第三人民医院门诊和住院确诊的96例乙型肝炎相关HCC患者(所有患者普通荧光探针法血清HBV DNA<1 000 IU/mL),其中男性81例,女性15例,年龄28~76岁,平均(51.4±23.6)岁。HCC的诊断均符合2001年中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的肝细胞肝癌诊断标准<sup>[5]</sup>。所选病例均有慢性乙型肝炎病史,并排除其他病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性肝病等其他原因所致肝病。慢性乙型肝炎诊断按照2015版《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[6]</sup>的诊断标准进行。

### 1.2 仪器与试剂

肝功能生化指标检测主要观察丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)和 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GT),采用美国进口生化仪检测;乙型肝炎标志物检测采用化学发光检测(试剂为进口试剂;高灵敏度HBV DNA检测采用进口HBV DNA定量试剂,用进口全自动核酸扩增仪检测,参考范围<10 IU/mL;PCR荧光探针定量检测HBV DNA试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司提供,参考范围<1 000 IU/mL)。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料满足正态分布的以( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较采用 $t$ 检验;计数资料用率(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者血清高灵敏度HBV DNA检测情况

96例普通荧光探针法血清HBV DNA<1 000 IU/mL的HCC患者中,血清高灵敏度HBV DNA>10 IU/mL(高敏HBV DNA阳性组)检出74例,占77.1%,其中HBV DNA<100 IU/mL患者51例,HBV DNA>100 IU/mL患者23例;血清高灵敏度HBV DNA<10 IU/mL(高敏HBV DNA阴性组)22例,占22.9%,见表1。

### 2.2 患者血清高灵敏度HBV DNA水平与肝硬化发生、抗病毒治疗情况

96例患者血清高灵敏度HBV DNA水平与肝硬化发生情况,见表2。高敏HBV DNA阳性组患者发生肝硬化的比例为85.1%,明显高于高敏HBV DNA阴性组患者的45.5%,二组比较有统计学显著差异( $\chi^2=14.66$ 、 $P<0.01$ )。

96例患者血清高灵敏度HBV DNA水平与患者发生癌变前接受核苷类抗HBV药物治疗情况见表2。血清高灵敏度HBV DNA<10 IU/mL的比

表1 患者血清高灵敏度HBV DNA水平

Table 1 Patients' serum high sensitivity HBV DNA levels

组别	例数( $n$ )	HBV DNA<10 IU/mL	10 IU/mL<HBV DNA<100 IU/mL	HBV DNA>100 IU/mL
高敏HBV DNA阳性组	74	0	51	23
高敏HBV DNA阴性组	22	22	0	0

$\chi^2=19.26$ ,  $P<0.01$ 。

例,发生癌变前接受核苷类抗 HBV 药物治疗的患者为 47.2%,明显高于发生癌变前未接受核苷类抗 HBV 药物治疗患者的 8.3%,二组比较有统计学显著差异( $\chi^2=19.26$ 、 $P<0.01$ )。

表 2 患者血清高灵敏度 HBV DNA 水平与肝硬化发生、抗病毒治疗情况

Table 2 Patients with serum high sensitivity HBV DNA levels are associated with cirrhosis and antiviral treatment

组别	例数	高敏 HBV	高敏 HBV
		DNA 阳性组	DNA 阴性组
癌变前接受抗 HBV 治疗患者	36	19(19.8)	17(17.7)
癌变前未接受抗 HBV 治疗患者	60	55(57.3)	5(5.2)
发生肝硬化	73	63(65.6)	10(10.4)
未发生肝硬化	23	11(11.5)	12(12.5)

### 2.3 患者血清免疫学标志与血清高灵敏度 HBV DNA 水平

96 例 HCC 患者乙型肝炎标志物检测结果见表 3。HBeAg 阳性患者高灵敏 HBV DNA>10 IU/mL 比例为 91.6%，HBeAg 阴性患者中高灵敏度 HBV DNA>10 IU/mL 为 75%，二组比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.84$ 、 $P>0.05$ )。

表 3 患者血清免疫学标志物与血清 HBV DNA 水平  
Table 3 Serum immunological markers and serum HBV DNA levels in patients

组别	例数	高敏 HBV DNA	高敏 HBV DNA
		阳性组	阴性组
HBeAg 阳性	12	11	1
HBeAg 阴性	84	63	21

### 2.4 患者血清肝功能指标与血清高灵敏度 HBV DNA 水平

96 例 HCC 患者血清肝功能指标 (ALT 及  $\gamma$ -GT) 异常者 72 例,占 75.0%。ALT 及  $\gamma$ -GT 异常组患者血清高灵敏度 HBV DNA 阳性率和滴度水平较 ALT 及  $\gamma$ -GT 正常组要高,见表 4,二组比较在统计学上具有显著差异 ( $P<0.05$ )。

表 4 患者血清肝功能指标与 HBV DNA 水平  
[ $n(\bar{x}\pm s)$ ]

Table 4 Serum liver function indicators and HBV DNA levels of patients [ $n(\bar{x}\pm s)$ ]

组别	例数	高灵敏度 HBV DNA 阳性组	HBV DNA 平均滴度 (IU/mL)
ALT 及 $\gamma$ -GT 正常	24	6	314 ± 273
ALT 及 $\gamma$ -GT 异常	72	68	546 ± 428
$\chi^2$ 值		49.14	12.529
P 值		<0.05	<0.05

## 3 讨论

常规的 HBV 治疗方案多使用抗病毒药物,HBV DNA 检测为判断预后的主要指标<sup>[1]</sup>,国内指南建议只要检测出 HBV DNA,就提示仍需继续治疗,然而目前国内常规的普通荧光探针法 HBV DNA 定量 PCR 检测技术所测下限为 1 000 IU/mL,进一步检测发现低于这个下限后 HBV DNA 依然存在低水平复制,故常规技术的检测结果假阴性率较高,无法正确判断治疗是否达到终点,严重耽误了最佳治疗时机,提高患者病情进一步加重的风险<sup>[7-8]</sup>。

相对普通荧光探针法 HBV DNA 定量 PCR 检测技术而言,高灵敏度 HBV DNA 定量检测的灵敏性和特异度均较高<sup>[9-10]</sup>。本研究对普通荧光探针法血清 HBV DNA 持续小于 1 000 IU/mL 的乙型肝炎相关 HCC 患者进行高灵敏度 HBV DNA 检测,发现 96 例患者中有 77.1% 患者的血清被检出存在 HBV DNA 低水平复制。临床此类 HBV DNA 低水平复制的乙型病毒性肝炎患者容易被忽视,影响其预后判断和治疗调整。按照欧洲肝脏研究学会(ESAL)指南意见,HBV 浓度应降至 PCR 检测方法最低下限(灵敏度=10 IU/mL),方可达到最理想的治疗效果<sup>[11]</sup>。高灵敏度 HBV DNA 检测有助于此类患者病情监测,确保及时调整抗 HBV 方案,以阻断肝脏损伤的持续进展,最终减少 HCC 的发生率<sup>[12-14]</sup>。

HBeAg 是反映体内 HBV 复制的指标,既往研究证实 HBeAg 水平与 HBV DNA 水平具有一定的相关性,而本研究结果表明患者 HBV DNA 水平与 HBeAg 状态并不相符,考虑主要原因为:患者服用核苷类抗病毒药物,有效地抑制病毒复制,导致患

者体内病毒少量残留,病毒载量与HBeAg不完全一致,HBeAg水平已无法准确反映HBV复制的程度<sup>[15]</sup>。提示在核苷类抗HBV时代,临床需要寻找更能准确反映体内cccDNA复制状态的指标,来指导预后判断和治疗调整。

研究发现患者HBV DNA水平与肝功能指标(ALT及 $\gamma$ -GT)之间也存在着密切的关系<sup>[16]</sup>,本研究发现肝功能异常的患者,HBV DNA的滴度均较肝功能正常患者高,提示HCC患者HBV DNA较高水平复制时肝脏损害可能更为明显。积极有效地抗HBV治疗有助于肝脏炎症的控制,进而减少HCC的发生风险。临床应用高灵敏度HBV DNA检测可更准确判断病毒复制情况,有助于准确地病情监测、治疗调整和判断预后,较普通荧光探针法HBV DNA检测更有临床指导意义。在常规的普通荧光探针法HBV DNA检测基础上,结合患者其他实验室检验数据及病情综合考虑,可进一步采用高灵敏度HBV DNA定量检测,可使诊断治疗更加精准有效进而达到更佳预后。

#### 参考文献

- [1] Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, First published: 12 September 2018.
- [2] Su JY, Kim YJ. Hepatitis B viral load affects prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(34):12-39.
- [3] Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level [J]. Jama the Journal of the American Medical Association, 2006, 295(1):65-73.
- [4] Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death [J]. Gastroenterology, 2010, 138(5):1747-54.
- [5] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(6): 324-325.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 888-905.
- [7] Hann HW, Fontana RJ, Wright T, et al. A United States compassionate use study of lamivudine treatment in nontransplantation candidates with decompensated hepatitis B virus - related cirrhosis [J]. Liver Transplantation, 2010, 9(1):49-56.
- [8] Chu C, Liaw Y. Hepatitis B Virus-Related Cirrhosis: Natural History and Treatment [J]. Seminars in liver disease, 2006, 26(2).
- [9] Germer JJ, Qutub MO, Mandrekar JN, et al. Quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA with a Taq Man HBV analyte - specific reagent following sample processing with the MagNA pure LC instrument [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(4): 1490-1494.
- [10] Koukouliti E, Brodzinski A, Mihm U, et al. Risk factors for resistance development against lamivudine during long-term treatment of chronic hepatitis B virus infections [J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2019, 31(&NA):1.
- [11] Liver EAFSO. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection [J]. Gastroenterol Clin Biol, 2009:539-554.
- [12] Feng S, Gao L, Xingchun Han, et al. Discovery of Small Molecule Therapeutics for Treatment of Chronic HBV Infection [J]. Acs Infectious Diseases, 2018, 4(3):257-277.
- [13] Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(7): 417-422.
- [14] Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. Journal of Hepatology, 2017, 67(2):370-398.
- [15] Jiang JN, Huang ZL, He LX, et al. Residual amount of HBV DNA in serum is related to relapse in chronic hepatitis B patients after cessation of nucleos(t)ide analogs [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2015, 49(4):323-328.
- [16] Stepien M, Fedirko V, Duarte-Salles T, et al. Prospective association of liver function biomarkers with development of hepatobiliary cancers [J]. Cancer Epidemiology, 2016, 40(Suppl 1): 179.

## 双靶标高敏HBV DNA检测技术在HBeAg阴性患者临床诊断中应用

冯磊\*

**[摘要]** 目的 对比双靶标高敏和普敏2种方法在血清乙型肝炎临床诊断中的应用价值。方法 针对180例血清乙型肝炎e抗原(HBeAg)阴性患者,分别采用双靶标高敏和普敏方法进行血清HBV DNA定量分析,并对HBV DNA水平和HBV感染相关性进行分析。结果 180例血清HBeAg阴性患者中,双靶标高敏法检出阳性103例,阴性77例,阳性检出率57.2%;普敏法检测出阳性35例,阴性145例,阳性检出率19.4%。双靶标高敏法阳性检出率显著高于普敏法,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ )。临床诊断慢性乙型肝炎患者HBV DNA检出率显著高于临床诊断非活动性HBeAg携带者,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 双靶标高敏法用于HBV DNA定量检测的灵敏度高于普敏法,更有助于医生临床诊断,并对患者的治疗、耐药预测及隐匿性肝炎的检出具有重要意义。

**[关键词]** 双靶标高敏乙肝检测方法;普敏检测法;HBeAg(-)

## Application of dual - target hyper - sensitivity hepatitis B DNA detection technology in clinical diagnosis of HBeAg negative patients

FENG Lei\*

(Department of Laboratory, People's Hospital of Yuxi City, Yuxi, Yunnan, China, 653100)

**[ABSTRACT]** Objective To compare the application value of dual-target hyper-sensitivity and ordinary-sensitivity detection methods in the clinical diagnosis of hepatitis B. Methods 180 patients with negative serum hepatitis B e antigen (HBeAg) were analyzed with dual-target hyper-and ordinary-sensitivity detection methods for serological quantitative and qualitative analysis of HBV DNA. The correlation between HBV DNA levels and HBV infection was also analyzed. Results The results of 2 methods were analyzed. Among the 180 patients with HBeAg-negative serum, 103 were positive by double-target high-sensitivity method and 77 were negative, and the positive detection rate was 57.2%. The ordinary method detected 35 cases of positive and 145 cases of negative, and the positive detection rate was 19.4%. The positive detection rate of double-target high-sensitivity method was significantly higher than that of ordinary method, and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). Conclusion The dual-target high-sensitivity method is more sensitive to HBV DNA quantitative detection than the ordinary method and is more helpful for doctors' clinical diagnosis. It is also of great significance for the treatment of patients, prediction of drug resistance and detection of occult hepatitis.

**[KEY WORDS]** Dual-target hyper-sensitivity hepatitis B detection method; ordinary sensitivity method; HBeAg(-)

基金项目:国家自然科学基金项目(81460326);云南省高层次卫生技术人才培养专项经费资助(D-201644)

作者单位:云南省玉溪市人民医院检验医学科,云南,玉溪 653100

\*通信作者:冯磊, E-mail: fngj2004@163.com

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)是乙型肝炎病毒的简称,为临床上引起乙型肝炎的病原体,其感染已呈世界性流行并成为全球性的公共卫生问题<sup>[1-2]</sup>。由病毒引起的乙型肝炎具有发病慢、传染性强、传播途径多样等特点,多数乙肝病毒携带者在临床表现上呈现不出明显症状,因此临床诊断上具有一定的困难<sup>[3-4]</sup>。目前,临床诊断HBV感染主要通过血清特异性抗原抗体免疫检测和HBV DNA检测来实现。随着新型抗病毒药物不断问世,抗病毒药物得到广泛应用,加之乙型肝炎疫苗免疫普及,感染HBV人口老龄化等,急性HBV感染明显减少,HBsAg阴性慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的比例有所上升<sup>[5-7]</sup>。研究表明,HBsAg阴性CHB是一种特殊的CHB临床类型,主要诱因为HBV变异和(或)宿主免疫压力,与HBsAg阳性CHB比较,具有隐匿性强,临床症状极不明显的特点<sup>[2,6]</sup>。通常,HBsAg阴性CHB患者年龄更大,病史更长,肝脏纤维化程度更为严重,而且在抗病毒的治疗中应答率对比其他类型患者更低,所以治疗效果多不理想,更易进展为肝硬化和原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[8-10]</sup>。故而找到一种更加有效的检测方法,对于判断病毒复制水平、评估疾病发展状态、选择有效治疗方案具有重大意义。本文比较双靶标高敏乙肝检测技术与传统普敏乙肝检测技术对HBsAg阴性HBV感染者检出率之差异,探讨双靶标高敏乙肝DNA检测在诊治中的优势。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2019年3月至2019年7月在本院就诊的180例血清HBsAg阴性HBV感染患者为研究对象。所有患者,包括乙型肝炎肝硬化代偿期、慢性乙型病毒性肝炎患者均满足《2015年慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准;研究对象筛选过程中排除血液标本中出现溶血、脂血者,其中男性110例,女性70例,年龄21~90岁,平均年龄(47.92±13.42)岁。所有患者及家属均已签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 核酸提取与PCR反应体系构建

核酸提取或纯化试剂(DA622)(购自中山大学达安基因股份有限公司)的预封装96孔板中加入4 μL内标液、20 μL蛋白酶K、200 μL血清样本和

阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品及4个阳性定量标准品,将其放入Smart32半自动核酸提取仪(购自中山大学达安基因股份有限公司),按核酸提取试剂盒说明书设置提取程序,运行结束后,将所得核酸(40 μL/孔)加入PCR反应管中(含配置好的反应液20 μL)。PCR扩增仪为ABI Prism 7300仪器,均购于中山大学达安基因股份有限公司。

#### 1.2.2 高敏核酸检测方法

采用中山大学达安基因股份有限公司生产的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR荧光探针法)(DA-Z051,双靶标),扩增程序设置为:50℃ 2 min, 1个循环;95℃ 15 min, 1个循环;94℃ 15 s, 55℃ 45 s, 45个循环。双靶标高敏试剂最低定量检测限20 IU/mL,检测灵敏度10 IU/mL。

#### 1.2.3 普敏法核酸提取

核酸提取试剂采用中山大学达安基因股份有限公司的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR荧光探针法)(DA0030),扩增程序设置为:93℃ 2 min, 1个循环;93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10个循环;93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30个循环。普敏法最低定量检测限100 IU/mL,检测灵敏度30 IU/mL。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。符合正态分布计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 $t$ 检验;非正态计量资料比较,采用非参数检验;计数资料以 $n$ 或(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2种试剂的检测结果

双靶标高敏乙肝检测法与普敏检测法180例患者血清HBV DNA载量情况,见表1。

### 2.2 2种不同方法检测HBV DNA阳性率比较

双靶标高敏乙肝检测法的阳性率显著高于普敏法,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),见表2。

### 2.3 2种不同方法检测HBV DNA水平比较

76例HBsAg阴性患者中两种不同的方法对不同年龄、性别的患者HBV-DNA水平比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );临床诊断慢性乙型肝炎患者HBV-DNA水平显著高于临床诊断非活动性HBsAg携带者,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,见表3)。

表1 2种试剂测定HBV DNA结果 (IU/mL)

Table 1 Determination of HBV DNA results by 2 reagents (IU/mL)

编号	普敏 定量值	高敏 定量值	编号	普敏 定量值	高敏 定量值	编号	普敏 定量值	高敏 定量值	编号	普敏 定量值	高敏 定量值
1	<5	1.79	46	16.4	7.01	91	<5	429	136	<5	79.3
2	<5	5.19	47	<5	1060	92	<5	<1	137	254	73.7
3	<5	1.13	48	<5	55	93	<5	<1	138	241	<1
4	12.5	15.1	49	<5	<1	94	<5	<1	139	192	44
5	6.18	12.5	50	<5	6.46	95	51.5	<1	140	<5	2.39
6	<5	11.6	51	69.5	1660	96	<5	<1	141	<5	<1
7	<5	<1	52	<5	54.2	97	<5	<1	142	<5	<1
8	29.9	56.1	53	<5	174	98	26.9	<1	143	<5	<1
9	6.06	10.2	54	<5	333	99	<5	38.9	144	18.4	<1
10	<5	11.2	55	31.3	17.9	100	<5	2.7	145	48.5	19.4
11	<5	6.67	56	<5	278	101	<5	52.6	146	<5	9.47
12	31.8	33.5	57	<5	7.07	102	<5	<1	147	63.7	251
13	<5	<1	58	<5	12.9	103	71.1	3.53	148	26.3	46
14	23.4	58.7	59	7.94	217	104	<5	<1	149	<5	<1
15	11.8	5.94	60	<5	10.5	105	105	17.5	150	<5	1.49
16	<5	23.1	61	53.8	19.5	106	<5	<1	151	<5	<1
17	<5	20.7	62	38.7	3.59	107	27.1	56.1	152	<5	6.24
18	<5	<1	63	<5	118	108	<5	<1	153	13.2	105
19	<5	25.8	64	7.17	<1	109	41.3	43.7	154	94.5	56.9
20	<5	<1	65	<5	6.5	110	<5	<1	155	<5	<1
21	10.2	<1	66	<5	11.7	111	<5	<1	156	<5	19.7
22	<5	<1	67	<5	<1	112	<5	<1	157	<5	644
23	<5	60.9	68	<5	127	113	<5	2.64	158	<5	267
24	<5	1.86	69	101	2320	114	28.8	10.8	159	<5	27.1
25	7.67	94.1	70	<5	42	115	<5	1.03	160	18.1	49.9
26	<5	<1	71	<5	1160	116	<5	6.85	161	16.2	27.2
27	<5	3.46	72	<5	156	117	<5	11.5	162	<5	6.81
28	66.2	28.2	73	12.4	44.7	118	<5	8.98	163	82.1	737
29	<5	8.88	74	16.7	138	119	<5	13.3	164	<5	90.9
30	24.2	102	75	<5	<1	120	<5	14.9	165	<5	4.47
31	<5	<1	76	<5	113	121	29.9	246	166	<5	19.5
32	41	102	77	<5	43.2	122	7.04	7.34	167	<5	13.3
33	20	214	78	85.5	556	123	27.5	24.9	168	<5	16.1
34	<5	87.3	79	<5	<1	124	41.9	47.2	169	<5	5.31
35	33	<1	80	13.6	112	125	<5	19.2	170	<5	3.02
36	<5	861	81	11.6	22.7	126	342	88.5	171	49.4	88.7
37	<5	1.03	82	<5	14.5	127	802	2140	172	<5	8.65
38	<5	1220	83	<5	11.9	128	<5	1.47	173	7.8	73.2
39	92.2	1.59	84	<5	12	129	188	15.7	174	<5	4.4
40	26.1	77.4	85	45.5	727	130	159	1.72	175	843	1290
41	<5	<1	86	42.6	666	131	<5	18.2	176	<5	15.8
42	<5	9.02	87	<5	14.3	132	<5	7.19	177	92.6	178
43	<5	116	88	24.1	536	133	63.1	80.9	178	<5	<1
44	12.5	86.6	89	<5	3.84	134	20.6	26.2	179	<5	9.32
45	<5	20.4	90	<5	10.6	135	42.5	13.2	180	<5	6.97

表2 2种试剂检测HBV DNA阳性率比较[n(%)]

Table 2 Comparison of HBV DNA positive rates detected by 2 reagents [n(%)]

试剂盒	例数	病毒载量		$\chi^2$ 值	P值
		阴性	阳性		
普敏试剂	180	145(80.6)	35(19.4)	54.34	<0.001
高敏试剂	180	77(42.8)	103(52.2)		

表3 2种试剂检测HBV DNA水平比较[n(%)]

Table 3 Comparison of HBV DNA levels detected by 2 reagents [n(%)]

方法	性别		年龄		临床诊断	
	男(n=110)	女(n=70)	≤45岁(n=79)	>45岁(n=101)	慢性乙型肝炎(n=112)	非活动性HBsAg携带(n=68)
高敏法	1.19	1.88	1.48	1.98	1.24	2.99
P值	0.65		0.24		<0.01	
普敏法	1.24	1.76	2.68	2.27	1.44	3.36
P值	0.79		0.59		<0.01	

效控制乙肝发病率。HBV DNA定量检测已经广泛应用于临床,主要为慢性HBV感染患者判断其体内病毒的复制水平即活跃程度,也是最直接、最可靠的指标,并同时为医生诊疗和预后判断提供重要的参考依据<sup>[11]</sup>。

运用荧光定量PCR技术检测HBV DNA具有精密度好、灵敏度高、特异性强等特点<sup>[12]</sup>。在国内临床上使用的HBV DNA荧光定量PCR试剂种类很多,各类试剂之间的性能参数如灵敏度、特异性、线性范围等方面均存有差异<sup>[17-18]</sup>。

高敏HBV DNA检测分析采用更智能的方式对血液标本实施核酸提取、纯化,其回收率较高,且重复性也较好,人为误差也有所降低使检测结果更加准确;且高敏法使用内部标准品,所以在检测样本的同时提取、扩增,可消除管间差异使检测结果更为可靠。普敏乙肝检测方法在临床中的应用范围广,但回收率偏低、重复性差,并且费时费力,容易造成人为误差,导致普敏法对于病毒定量检测的准确性偏低,特别在低载量病毒核酸分析中定量分析的效果更差<sup>[13-15]</sup>。C区突变或S区突变可能导致e抗原或表面抗原表达过低或不表达,造成免疫学相关检测阴性,但核酸可以检测到。双靶标高敏试剂是针对C区和S区设计双引探,对病毒变异株的检出能力增强,核酸提取、纯化、回收率较高,核酸纯度高,且重复性也较好,相对而言,对低病毒载量样本检测结果更加准确<sup>[14,16-18]</sup>。

本研究显示,180例血清HBeAg阴性患者中,

### 3 讨论

随着生活水平的不断提升,乙肝的发病率也有所上升,且因其隐匿性强,一般未见有明显的临床表现,多为体检发现,当出现临床症状时常已经发展为严重的肝脏疾病,如肝硬化、肝癌等,故而在疾病发展早期就可敏锐发现其发病趋势将有

双靶标高敏法检测出阳性103例,阴性77例,阳性检出率52.2%;普敏法可检测出35例阳性,145例阴性,阳性检出率19.4%。两种研究方法的对比中,双靶标高敏法的检出率显著高于后者,差异具有统计学意义( $P<0.001$ ),这与双靶标高敏试剂可同时检测两区变化有直接联系。双靶标高敏法在临床诊断慢性乙型肝炎患者HBV DNA水平显著高于临床诊断非活动性HBsAg携带者,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),即双靶标高敏检测法可更为准确的检测出HBeAg阴性乙肝肝硬化患者的低载量病毒进而准确指导医生用药,尽早精确控制病情,延缓肝脏疾病的不良事件的发生发展。该研究的结果与以往的研究<sup>[19-20]</sup>结果一致,具有一定的科学依据。

综上所述,双靶标高敏检测法用于血清HBV DNA定量检测准确性更高,较普敏法而言,超敏定量分析法对病毒检测精确度更佳,及时有效,漏检率更低,保证检测结果的正确性,判断患者是否感染有病毒,可作为筛查,治疗起点,疗效评估,治疗终点的评判依据,其临床应用价值较高。由于本文病例的选择并非完全随机,因此,未来还需要通过大样本、多中心的数据来验证确切的结论。

### 参考文献

- [1] 张琰,戴彰,朱建辉. 乙型肝炎病毒血清学检测采用化学发光法和酶联免疫法效果比较分析[J]. 中外医疗, 2018, 37(26):199-201.

- [2] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. *Vaccine*, 2012, 30(12):2212-2219.
- [3] 周玉林, 郑金川, 吴旭耀. 荧光定量 PCR 法检测乙肝病毒 DNA 与乙肝病毒标志物相关性[J]. *中国农村卫生事业管理*, 2013, 33(10):1191-1192.
- [4] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(14):1486-1500.
- [5] Fung J, Seto WK, Lai CL, et al. Profiles of HBV DNA in a large population of Chinese patients with chronic hepatitis B: Implications for antiviral therapy [J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 54(2):195-200.
- [6] Gialard O. Time-resolved Fluoro immunoemetry: principles and applications in clinical biology [J]. *Ann Biol Clin*, 2014, 54(11):751.
- [7] Lenci I, Marcuccilli F, Tisone G, et al. (2010) Total and covalently closed circular DNA detection in liver tissue of long-term survivors transplanted for HBV-related cirrhosis [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2010, (42):578-584.
- [8] 吴洪秋, 张永良, 黄坚尧, 等. 乙肝血清学标志物定量和 HBV DNA 定量联合检测在乙肝病毒感染诊断中的应用[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2016, 25(4):415-418.
- [9] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2015(3).
- [10] 杨娜, 袁涛, 张囡囡. 超敏乙肝 DNA 检测对 HBeAg 阴性 HBV 感染者的诊治意义[J]. *中外女性健康研究*, 2018.
- [11] Ganji A, Esmailzadeh A, Ghafarzadegan K, et al. Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV [J]. *Hepatitis Monthly*, 2011, 11(5):342-5.
- [12] Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease [J]. *Hepatology*, 2009, 49(S5).
- [13] 陈德喜, 黄雁翔, 刘丽. 国产 HBV DNA 定量检测试剂盒(磁珠法)与 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV DNA 检测法 2.0 的性能评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(A02):104-107.
- [14] Bustin S, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis [J]. *Clinical Science*, 2005, 109(4):365-379.
- [15] 郑志远. 超敏和普敏两种方法在血清 HBV-DNA 定量检测中的比较研究[J]. *中国现代药物应用*, 2017(12).
- [16] 戎国栋, 徐婷, 赵鸿, 等. 超敏 HBV DNA 定量检测系统的临床应用研究[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(8):1537-1541.
- [17] 许宏岳. 两种核酸提取方法对血清 HBV-DNA 定量检测的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2005(5):33-35.
- [18] 王静, 徐明华, 何瑛, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测血清 HBV-DNA 的临床意义[C]. *肝病实验室诊断与临床研究专题学术会议*, 2004.
- [19] Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, et al. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(11):3484-3491.
- [20] Castera-Guy J, Rubbo PA, Kania D, et al. Semi-quantitative real-time PCR: A useful approach to identify persons with low replicative chronic hepatitis B [J]. *J Virol Methods*, 2017, 244:1-3.

(上接第 347 页)

- [36] Terrault NA, Lok A SF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4):1560-1599.
- [37] EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):370-398.
- [38] Organization WH. Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. World Health Organization, 2015.
- [39] Buti M, Gane E, Seto WK, et al. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1(3):196-206.
- [40] Santos AP, Levi JE, Lemos MF, et al. An in-house real-time polymerase chain reaction: standardisation and comparison with the Cobas Amplicor HBV monitor and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV tests for the quantification of hepatitis B virus DNA [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2016, 111(2):134-140.

## 两种HBV DNA定量检测方法的临床对比研究

王爽 郭杰 王大刚 时景仁 潘美晨 殷商启 何超男 孟欢 张响 王雅杰\*

**【摘要】** 目的 比较某国产实时荧光定量PCR试剂(后称国产试剂)与某进口(后称进口试剂)检测乙型肝炎病毒(HBV)DNA的定量的结果。方法 根据进口试剂检测结果抽取514份慢性乙型肝炎的血浆标本,采用国产全自动核酸提取仪和PCR高敏试剂进行HBV DNA定量平行检测,以分析国产试剂的检测情况和与进口试剂的结果差异和相关性。结果 进口试剂和国产试剂的阳性检出率分别为77.2%和78.5%,不符合率分别为7.2%和8.6%,两者无明显差异;Spearman相关分析显示,两种试剂检测的HBV DNA在 $20\sim 1.7\times 10^8$  IU/mL区间内检测结果的相关系数( $r=0.966, P<0.0001$ ),表明二者具有较强的相关性;Bland-Altman分析2种方法检测病毒载量的差异分析显示结果具有较高的一致性。结论 国产高敏试剂和进口试剂,检测血浆HBVDNA在 $20\sim 1.7\times 10^8$  IU/mL的病毒载量结果具有较好的相关性和一致性。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒DNA; 荧光定量PCR; 病毒载量; 一致性

### Clinical comparative study of two quantitative methods for HBV DNA detection

WANG Shuang, GUO Jie, WANG Dagang, SHI Jingren, PAN Meichen, YIN Shangqi, HE Chaonan, MENG Huan, ZHANG Xiang, WANG Yajie\*

(Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100015)

**【ABSTRACT】** Objective To compare the results of a domestic real-time fluorescent quantitative PCR of (Domestic reagent) with a imported reagent(Imported reagent) for detection of hepatitis B virus (HBV) DNA. Methods A total of 514 plasma samples of chronic hepatitis B were collected according to the results of imported reagent test. HBV DNA was quantitatively detected by domestic automatic nucleic acid extractor and PCR high sensitive reagent in parallel to analyze the difference and correlation between the results of imported and domestic reagents. Results The positive detection rates of imported and domestic reagents were 77.2% and 78.5%, and the non-conformity rates were 7.2% and 8.6% respectively. There was no significant difference between the 2 reagents. Spearman correlation analysis showed that the correlation coefficient  $r=0.966$  ( $P<0.0001$ ) of HBV DNA detected by the 2 reagents in the range of  $20\sim 1.7\times 10^8$  IU/mL, indicating that the 2 reagents had strong correlation; Bland-Altman analysis showed that there was a high consistency between the 2 methods in virus load detection. Conclusion Domestic and imported reagents have good correlation and consistency in detecting the viral load of plasma HBV DNA at  $20\sim 1.7\times 10^8$  IU/mL.

**【KEY WORDS】** Hepatitis B virus DNA; Real time fluorescence quantitative PCR; Virus load; Consistency

基金项目:国家自然科学基金(81572474);吴阶平基金会临床科研专项资助基金(320.6750.19019)

作者单位:首都医科大学附属北京地坛医院检验科,北京,朝阳 100015

\*通信作者:王雅杰, E-mail: wangyajie@ccmu.edu.cn

在目前全球面临的最严峻的公共卫生问题中,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是最大的问题之一,目前全球慢性感染者逾2.57亿人,每年死亡88.7万人,其中约25%死于肝癌或肝脏相关并发症<sup>[1]</sup>。最大限度地长期抑制HBV复制是慢性乙型肝炎(Chronic hepatitis B, CHB)患者的治疗目标之一<sup>[2]</sup>。HBV DNA定量检测主要用于判断慢性HBV感染的病毒复制水平,HBV DNA复制水平越高,传染性就越强<sup>[3]</sup>。HBV DNA是反映HBV复制的最直接、最可靠的指标,在评价乙型肝炎药物的疗效与预后判定等方面具有至关重要的作用<sup>[4]</sup>。

荧光定量PCR技术检测HBV DNA具有灵敏度高特异性好的特点<sup>[5]</sup>。目前国产的HBV DNA荧光定量PCR试剂种类很多,各类试剂之间的性能参数如灵敏度、特异性、线性范围等方面存有差异<sup>[6-7]</sup>。临床检测使用国产试剂,开展HBV血浆病毒载量检测,相较于采用进口试剂不但能及时监测患者疗效,又能降低患者经济负担。本研究采用某国产超敏HBV病毒核酸定量检测试剂盒(简称国产试剂)和目前国际上普遍认可的某进口试剂(简称进口试剂)这2种试剂盒对乙型肝炎患者血浆中的病毒载量进行平行检测,通过对2种检测结果的相关性和一致性进行对比分析,现报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集2019年2月至6月在首都医科大学附属北京地坛医院就诊的本院门诊及住院乙型肝炎患者的血浆514例,所有患者诊断标准符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)》。选择的患者均为单一HBV感染,排除其他肝炎病毒或原因引起的肝病,同时选择无黄疸、溶血和脂血的样本。所有患者均已签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂和仪器

进口HBV定量检测系统采用COBAS AmpliPrep提取仪,标本用量为600  $\mu$ L;扩增试剂为COBAS HBV Test, v2.0(瑞士,Roche)。国产HBV定量检测系统采用Smart 32全自动核酸提取仪(磁珠法),标本用量为200  $\mu$ L;扩增试剂采用超敏PCR扩增试剂(购自国产中山大学达安基因股份有限公司),检测仪器采用美国ABI 7500型荧光定量PCR仪。

### 1.3 方法

将514例血浆标本分别用进口和国产试剂,按照试剂盒说明书标准步骤进行平行检测。2种HBV核酸检测方法的基本原理一致,均通过荧光定量PCR技术进行乙肝病人血浆中HBV病毒载量的检测。2种检测试剂的特征比较详见表1说明。

### 1.4 统计学方法

用Excel对数据进行整理,对有数值的HBV DNA病毒载量数据进行对数转换( $\log_{10}$ ),通过SPSS 16.0软件进行统计学分析。采用配对 $t$ 检验分析不同方法检测结果的差异,用相关分析法分析不同试剂检测结果的相关性,采用Bland-Altman模型分析不同检测方法检测结果的一致性,试剂比对用线性分析和 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2种试剂检测结果比较

本研究共收集慢乙肝患者血浆514例。进口试剂结果检测的数值分布为:“未检测到HBV”的标本117例,<20 IU/mL的标本110例,20~ $1.7 \times 10^8$  IU/mL区间的标本287例(其中 $>1.7 \times 10^8$  IU/mL的标本33例)。将国产试剂测试的结果与进口结果进行比对分析(见表2),结果显示:进口试剂的阳性检出率为77.2%(397/514),国产试剂的阳性

表1 2种试剂的特征比较

Table 1 Characterization comparison of 2 reagents

项目	国产试剂	进口试剂
样本类型	血清或血浆	血清或血浆
灵敏度	HBV:10 IU/mL	HBV:9(血清)/19(血浆)IU/mL
线性范围	HBV:20~ $1 \times 10^9$ IU/mL	HBV:20~ $1.7 \times 10^8$ IU/mL

检出率为78.5%(404/514),说明2种试剂的阳性检出率较接近,没有明显的差异( $P>0.05$ );两种试剂间的不符合率(一种检测结果高于检测下限/另一种检测结果低于检测下限)分别为:进口试剂7.2%(37/514)和国产试剂8.6%(44/514),没有显著差异( $P>0.05$ )。进口与国产试剂检测结果为“未检测到HBV”和 $<20$  IU/mL完全一致的标本分别为73例和54例,2种试剂同时高于检测下限的样本为285例(55.4%)。

### 2.2 国产和进口试剂检测结果的相关性和一致性分析

将国产试剂和进口试剂检测结果中285例大于检测下限的病毒载量值,其中33例 $>1.7\times 10^8$  IU/mL(取对数为 $>8.23$ )的标本,这33例标本的达安试剂检测结果值为 $(8.55\pm 0.39)$ ,说明检测结果一致。对检测结果在 $20\sim 1.7\times 10^8$  IU/mL区间内的252例载量值取对数后进行相关性和一致性分析

表2 2种试剂检测结果比较

Table 2 Comparison of the results of 2 reagents

进口试剂	国产试剂			合计
	未检测到HBV	$<20$	$20\sim 1.0\times 10^9$	
未检测到HBV	73	40	4	117
$<20$	36	54	20	110
$20\sim 1.7\times 10^8$	1	1	285	287
合计	110	95	309	514

(图1)。两种试剂检测结果的相关系数 $r=0.966$  ( $P<0.0001$ ),表明二者具有较强的相关性(图1A);Bland-Altman分析两种方法检测病毒载量的差异分析显示,国产与进口试剂定量值差值平均值为 $0.173\log_{10}$  IU/mL,95%可信区间为 $(-0.6779\sim 1.0240)\log_{10}$  IU/mL。95.6%(241/252)的样本检测值在95%可信区间内,说明国产与进口试剂具有高度一致性(图1B)。

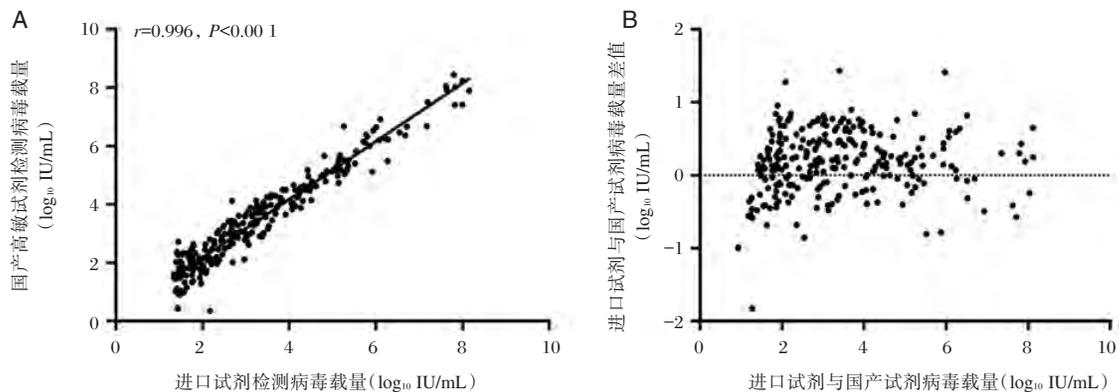


图1 2种试剂检测的相关性和一致性分析

Figure 1 The Correlation and consistency analysis between 2 reagents

本组结果按照不同病毒载量区间(低中高)进行相关性分析,国产试剂与进口试剂结果各组的相关性均良好;不同病毒载量区间范围内的相关性没有明显的差别,说明国产高敏试剂与进口试剂间在对不同病毒载量病人HBV DNA的检测能力上是一致的(如表3所示)。其中,在低浓度区 $20\sim 10^3$  IU/mL也具有较好的相关性,说明试剂的检测灵敏度较好。

### 3 讨论

HBV DNA定量检测已经广泛应用于临床,为慢性乙型肝炎患者的诊疗和预后判断提供重要的

表3 2种试剂有效值在不同病毒载量区间相关性分析结果

Table 3 Relativity analysis of 2 reagents in different virus load intervals

HBV 病毒载量区间(IU/mL)	$20\sim 10^3$	$10^4\sim 10^5$	$10^6\sim 10^8$
例数	179	54	19
相关系数( $r$ )	0.878	0.867	0.870
$P$ 值	$<0.0001$	$<0.0001$	$<0.0001$

参考依据<sup>[8-10]</sup>。结合传统HBV血清标志物结果,对临床判定传染性和指导治疗具有重要的参考价值<sup>[11-13]</sup>。目前进口试剂具有明显的高特异性和高

灵敏度,同时其准确性和重复性也被业界公认为是HBV DNA定量检测的“金标准”<sup>[14]</sup>。进口试剂具有精密度好、灵敏度高的特点,但是其试剂和仪器成本较高,检测花费时间长,需要患者提供的血浆量大,在临床上难于普及,特别是中小型企业。同时试剂本身价格的昂贵又制约了一部分乙肝病人进行乙肝定量定期检测的需求。基于诸多因素,开发国产试剂,使之进一步改善国产试剂检测灵敏度、特异性、重复性等特点具有十足的意义。

在本次比对实验中,国产试剂与进口试剂2种方法的检测结果可能会因实验方法、实验原理、检测靶点等各种差异引起检测数值上差异<sup>[15-16]</sup>。从方法学比较可以看出,本实验的两种方法均采用自动化磁珠提取法获取病人血浆中的HBV DNA,首先从模板获取效率上是一致的;在扩增试剂上,达安高敏试剂不仅提高了线性范围至 $10^9$  IU/mL,在灵敏度上也将检测下限降至10 IU/mL,可以给出更宽的检测范围,包括0~20 IU/mL之间的数值。本次研究平行检测了514例慢乙肝病人血浆标本,从进口试剂和国产试剂检测结果比较发现,两者的阳性检出率基本一致,没有明显差异;同时,两者的不符合率也比较接近。对两种试剂检测结果的有效值进行分析可以得出较好的相关性和一致性,特别在低拷贝区( $20\sim 10^3$  IU/mL)相关性也较好,说明国产试剂与进口试剂的检测效率是一致的。

国产试剂提高了检测灵敏度,甚至在载量为0~10 IU/mL的结果也能够给出数值,但由于其低于试剂盒的灵敏度,只能判断样本为阳性,其定值结果也仅供参考。对比结果显示,进口试剂检测结果为“未检测到HBV”的标本在国产试剂中测出为 $>20$  IU/mL的结果有4例,测出 $<20$  IU/mL的结果有40例,还不能确定这部分结果是由于试剂灵敏度差异产生的结果,也不排除这44例为假阳性结果,可能存在实验过程中污染等问题,需要第三方试剂的验证,但是目前还缺乏权威性的试剂来对这种低水平载量的检测验证。进口试剂检测结果 $<20$  IU/mL在达安基因试剂结果为“未检出HBV DNA”的样本有36例;进口试剂结果 $<20$  IU/mL的标本用国产试剂检测 $>20$  IU/mL的共20例,反之的结果有1例,这部分结果说明在检测下限附近还存在数据检测结果的差异,不排除检测过

程中的人为误差或系统本身的误差造成的这一区域的结果差异,但由于这部分国产试剂的检测结果处于20~100 IU/mL范围之内,排除其他指标变化的情况对于临床来说这种差异不会造成明显的治疗方案上的改变<sup>[2]</sup>。

乙肝病毒标记物的检测可为我国乙肝患者进行早期预防和治疗提供重要的判定依据,具有重要的应用价值<sup>[17]</sup>。现临床常用试剂检测方法还有待提高,尽管进口试剂具有开放性,检测准确、精密度高等优势,但因科室发展需要和经济水平受限等原因,目前使用国产试剂的临床单位较为普遍。目前国产试剂也在努力开发更加高灵敏度、高特异性的试剂缩短与进口试剂之间的差距从而满足临床需求,这有助于提高临床对乙型肝炎的早期诊断,也有利于国家卫生事业的蓬勃发展。在本次实验中,国产试剂在低拷贝区与进口试剂的检测差异在逐渐减少,也体现出了国产试剂在操作时长的控制和人为误差的控制上的提高,这极大的提高了临床检验的效率,降低了人为操作误差所带来的误判。由于本文病例的选择并非完全随机,还需要通过大样本、多中心的数据来验证确切的结论。

## 参考文献

- [1] Lee HM, Banini BA. Updates on Chronic HBV: Current Challenges and Future Goals [J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2019, 17(2): 271-291.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [3] Chu C J, Hussain M, Lok A S F. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection [J]. *Hepatology*, 2002, 36(6): 1408-1415.
- [4] Herve, Mommeja - Marin, Mondou E, 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] Bustin S, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis [J]. *Clinical Science*, 2005, 109(4): 365-379.
- [6] 陈德喜, 黄雁翔, 刘丽. 国产HBV DNA定量检测试剂盒(磁珠法)与COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV DNA检测法2.0的性能评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(A02): 104-107.

- [7] 沈玟,龙璐,邓中平,等. 新型国产乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂的质量评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013,36(3):280-285.
- [8] Ganji A, Esmailzadeh A, Ghafarzadegan K, et al. Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV [J]. Hepatitis Monthly, 2011, 11(5):342-5.
- [9] Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease[J]. Hepatology, 2009, 49(S5).
- [10] 李惠军,吴斌,李彩东. HBV感染者HBV血清标志物水平与HBV DNA及肝功能的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2016(6):784-786.
- [11] 秦昱,夏先根. 乙型肝炎病毒抗原抗体标志物与HBV-DNA联合检测的相关性分析[J]. 河北医学, 2014(3):478-481.
- [12] 武建国. HBsAg与HBVDNA定量测定的临床信息互补[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(11):801-804.
- [13] Hu K Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2002, 9(4):15.
- [14] Lindh M, Hannoun C. Dynamic Range and Reproducibility of Hepatitis B Virus (HBV) DNA Detection and Quantification by CobasTaqman HBV, a Real-Time Semiautomated Assay [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8):4251-4254.
- [15] Cai SH, Lv FF, Zhang YH, et al. Dynamic comparison between Daan real-time PCR and CobasTaqMan for quantification of HBV DNA levels in patients with CHB [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14, 14:85.
- [16] 周美英,高国生,胡爱荣. Roche定量试剂和国产PCR试剂检测HBV-DNA的比较分析[J]. 中国现代医生, 2017,55(34):114-117.
- [17] 黄百里. 磁微粒化学发光法与酶联免疫吸附法检测乙肝病毒标记物的作用评价[J]. 临床检验杂志(电子版), 2019,8(3):146-147.

---

(上接第354页)

- [3] Saurabh Bandhavkar. Developing Strategies for Early Detection of Hepatitis B Infection [J]. Clin Microbiol 2016,5:234.
- [4] Angela M. Caliendo, Alexander Valsamakis, James W. Bremer, et al. Multilaboratory Evaluation of Real-Time PCR Tests for Hepatitis B Virus DNA Quantification [J]. J. Clin. Microbiol, 2011,49(8):2854-2858.
- [5] Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, et al. HBV DNA integration: molecular mechanisms and clinical implications [J]. Viruses, 2017, 9(4):75.
- [6] Fourati S, Pawlotsky JM. Recent advances in understanding and diagnosing hepatitis B virus infection [J]. F1000 Res, 2016,5:2243.
- [7] Guo JT, Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics [J]. Antiviral Res, 2015,122:91-100.
- [8] Giersch K, Allweiss L, Volz T, et al. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity [J]. J Hepatol, 2016, 66(2):460-462.
- [9] WANG J, DU M, HUANG H, et al. Reply to: "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity": Consistent loss of serum HBV RNA might predict the "para-functional cure" of chronic hepatitis B [J]. J Hepatol, 2017,66(2):462-463.

## 高灵敏度 HCV RNA 检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗检测应用

黄成军 程书权\*

**[摘要]** **目的** 探讨高灵敏度 HCV RNA 检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗评价方面的临床意义。**方法** 收集本院就诊的 130 例未经治疗的丙肝抗体阳性的初治患者(初治组)和既往曾经抗病毒治疗、结束时用普通试剂检测结果低于检测下限( $<1\ 000\ \text{IU/mL}$ )且达到停药标准的 148 例患者(停药组),同时采用普通检测方法(检测值下限为  $1\ 000\ \text{IU/mL}$ )和高灵敏度检测方法(检测值下限为  $20\ \text{IU/mL}$ )检测 HCV RNA 并进行对比;另外收集 46 例丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)基因分型为 1b 型的慢性丙型肝炎初治患者,予患者抗病毒治疗,同时使用 2 种方法检测患者治疗前和治疗后 2、4、12 周的 HCV RNA 结果,进行对照分析。**结果** 初治组普通方法检测阳性 125 例,阴性 5 例,高灵敏度检测方法阳性 126 例,阴性为 4 例,2 者对比差异无统计学意义( $P>0.05$ ),停药组普通方法检测阳性 6 例,阴性为 142 例,高灵敏度方法检测阳性 16 例,阴性为 132 例,后者阳性率高于前者( $P<0.05$ )。1b 型的慢性丙型肝炎治疗 2 周后普通方法检测组 6 例(13%)阳性,高灵敏度方法组 42 例(91.3%),4 周时普通检测方法组阳性为 0 例,高灵敏度方法组为 4 例(8.7%),12 周普通检测方法组 HCV RNA 阳性率为 0,高灵敏度方法组为 1 例(2.2%);高灵敏度方法组在治疗 2 周后检测 HCV RNA 阳性率明显高于普通方法组( $P<0.05$ ),治疗前、治疗 4 周、12 周 2 组对比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 高灵敏度检测法用于监测和评价慢性丙型肝炎患者的疗效灵敏性更高,可用于指导慢性丙型肝炎的疗效评估。

**[关键词]** 慢性丙型肝炎;高灵敏;HCV RNA;治疗

### The clinical application of high sensitivity HCV RNA detection for diagnosis and treatment in patients with chronic hepatitis C

HUANG Chengjun CHENG Shuquan\*

(The third People Hospital of Guilin, Guilin, Guangxi, China, 541002)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the clinical application of high sensitivity HCV RNA detection for diagnosis and treatment of chronic hepatitis C patients with antiviral therapy. **Methods** Two groups of patients were collected. The first group (initial treatment group) included 130 untreated patients with positive chronic hepatitis C from our hospital. The second group (drug withdrawal group) included 148 patients who have been treated with antiviral in our hospital, and whose results at the end of the treatment were lower than the detection limit ( $<1\ 000\ \text{IU/mL}$ ) tested with common reagents. The second group were considered to have reached the standard of stopping drug treatment. The two groups were tested HCV RNA with two methods. One is the normal test method (lower limit values of  $1\ 000\ \text{IU/mL}$ ), and the other is high sensitivity detection method (lower limit values for  $20\ \text{IU/mL}$ ). In addition, 46 patients with hepatitis C virus (HCV) genotype 1b were treated with antiviral therapy and two methods were used to detect their HCV RNA before and after the treatment for 0, 2, 4 and 12 weeks. **Results** For the initial treatment group, tests with normal methods showed 125 cases positive and 5 cases negative. Tests with high sensitivity showed 126 positive and 4 negatives. There was no significant difference ( $P>0.05$ ) between the two tests. For the drug

基金项目:国家艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治重大专项(十二五)(2012ZX10002005-002)

作者单位:桂林市第三人民医院,广西,桂林 541002

\*通信作者:程书权, E-mail:csq126@sina.com

withdrawal group, tests with normal methods showed 6 cases of positive and 142 cases of negative. Tests with high sensitivity showed test positive showed 16 cases of positive and 132 cases of negative. The positive rate of the latter was higher than that of the former ( $P<0.05$ ). For the 1b Type chronic Hepatitis C who were treated with antiviral therapy for 2 weeks, normal method has detected 6 cases (13%) as positive, while the high-sensitive method has detected 42 cases (91.3%). For those treated for 4 weeks, the normal method has detected 0 cases for positive, high sensitive method, 4 cases (8.7%). The 12-week, normal method has detected 0 case for positive. The high sensitive method has detected 1 case (2.2%) for positive. The detection of positive rate by the high-sensitivity method was significantly higher than that of the normal method at the level of 2 weeks' treatment ( $P<0.05$ ). There was no statistical difference between the two groups before the treatment or after the treatment for 4 weeks and for 12 weeks ( $P>0.05$ ). **Conclusion** High-sensitivity assays are used to monitor and evaluate patients with chronic hepatitis C with greater sensitivity and can be used to guide the assessment of the efficacy of chronic hepatitis C.

[KEY WORDS] chronic hepatitis C; high-sensitive; HCV RNA; Antiviral

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)RNA 载量测定是判断丙型肝炎现行感染和治疗效果的基本手段,目前应用的有普通检测方法(检测下限 $<1\ 000\ \text{IU/mL}$ )和高灵敏度检测方法(检测值下限为 $15\sim 20\ \text{IU/mL}$ ),既往由于后者的检测试剂只有罗氏、雅培等国外公司提供,价格昂贵,故我国大多数地区由于经济条件的限制,HCV RNA 临床实验室以普通检测方法占主导,以手动操作为主,易污染出现假阳性<sup>[1]</sup>,检测结果线性范围窄,灵敏度低,不能用于准确判断病毒学应答情况<sup>[2]</sup>,近年,随着达安等国内厂家的高灵敏度 HCV RNA 试剂及检测方法的面世,大大降低了成本,使其普及成为可能。本研究同时使用 2 种 HCV RNA 检测方法应用于慢性丙型肝炎患者的诊断及治疗后对比,以探讨 2 种检测方法在慢性丙型肝炎的筛查、诊断和疗效判断的应用价值,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集 2017 年 12 月至 2019 年 3 月到本院初次就诊的 130 例丙肝抗体阳性的患者为初治组,所有患者均未接受过抗病毒治疗。同时收集既往曾经抗病毒治疗,疗程结束后用普通方法检测结果为阴性且达到 12 周持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)的 148 例患者为停药组。另选取 2018 年 6 月至 2019 年 3 月就诊的慢性丙型肝炎初治患者 46 例,予抗病毒治疗,治疗前均行 HCV 基因分型检查确定为 1b 型。停药组及行抗病毒治疗的患者均符合《丙型肝炎防治指南》的慢性丙型肝炎诊断标准<sup>[3]</sup>,排除标准:①曾接受过抗 HCV 治疗的患者;②合并其他嗜肝病毒感染,如乙型肝炎病毒、

甲型肝炎病毒等;③合并其他类型的肝病,如自身免疫性肝病等;④发生肝硬化或者原发性肝癌;⑤合并其他免疫系统疾病或孕期妇女;⑥依从性差不能配合治疗和随访者。本研究均获得患者知情同意签字并获得本院伦理委员会批准。

### 1.2 治疗方法

46 例 1b 型慢性丙型肝炎患者给予达诺瑞韦钠片(商品名:戈诺卫,歌礼药业(浙江)有限公司,用法:100 mg/次,2 次/d),聚乙二醇干扰素 a-2a 注射液(商品名:派罗欣,上海罗氏制药有限公司,用法:180 ug/次,1 次/d),利托那韦(商品名:艾治威,AbbVie Deutschland GmbH,德国,用法:100 mg/次,2 次/d),利巴韦林(上海信谊天平药业有限公司,用法:500 mg/次,2 次/d)。均予患者强调抗病毒治疗的依从性,嘱家属监督按时、按量服药,疗程 12 周。

### 1.3 检测仪器与试剂

普通检测方法采用 DA-7600 荧光定量 PCR 仪,检测试剂为丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),仪器设备及试剂均购自中山大学达安基因股份有限公司。

高灵敏度检测方法采用 SLAN-96P 全自动荧光检测系统,检测试剂为高灵敏丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),核酸提取或纯化试剂配套 Smart32 核酸提取仪使用,除扩增仪器购自上海宏石医疗科技有限公司,其余仪器设备及试剂均由中山大学达安基因股份有限公司提供。

### 1.4 检测方法

普通 HCV RNA 检测方法:按照丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒提供的核酸提取试剂对血清进行

处理和核酸提取,然后进一步行PCR扩增。循环条件如下:50℃ 15 min,1个循环;95℃ 5 min,1个循环;94℃ 15 s至55℃ 45 s,45个循环。高灵敏HCV RNA检测方法:按照高灵敏丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒提供的试剂对血清进行处理,根据核酸提取或纯化试剂和Smart32核酸提取仪的说明书进行核酸提取,然后进一步行PCR扩增。循环条件如下:50℃ 15 min,1个循环;95℃ 15 min,1个循环;94℃ 15 s至55℃ 45 s,45个循环。

### 1.5 观察指标

记录2种检测方法检测初治组和停药组的阳性率,记录46例1b型慢性丙型肝炎患者治疗前及治疗2周、4周、12周后2种检测方法检测为阳性的例数,并进行对比分析。

### 1.6 统计学方法

本研究数据均用SPSS 20.0统计软件处理,计数资料用例数(*n*)表示,计数资料组间率(%)的比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2种检测方法在初治组和停药组的比较

初治组采用普通检测方法阳性率96.2%,高灵敏度检测方法阳性率96.9%,两者对比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。停药组普通检测方法阳性率4.1%,高灵敏度检测方法阳性率10.8%,后者阳性率高于前者( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 2种方法在初治组和停药组的检测结果比较  
[*n*(%)]

Table 1 Comparison of 2 methods in the initial treatment group and the drug withdrawal group [*n*(%)]

组别	初治组( <i>n</i> =130)		停药组( <i>n</i> =148)	
	阳性	阴性	阳性	阴性
普通检测方法组	125(96.2)	5(3.8)	6(4.1)	142(95.9)
高灵敏度检测方法组	126(96.9)	4(3.1)	16(10.8)	132(89.2)
$\chi^2$ 值	0.000		4.91	
<i>P</i> 值	1.0		0.027	

### 2.2 2种检测方法在抗病毒治疗过程中的比较

46例1b型慢性丙型肝炎患者治疗前2组检测均为阳性,高灵敏度检测方法组在治疗后2周检测HCV RNA阳性率均明显高于普通检测方法组( $P < 0.05$ ),两种检测方法治疗前、治疗4周后及治疗12周后对比无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表2。

表2 2种方法在46例患者抗病毒过程中的检测阳性率结果比较 [*n*(%)]

Table 2 Comparing the positive percentages in the process of antiviral treatment with 2 methods [*n*(%)]

组别	治疗前	治疗2周	治疗4周	12周
普通检测方法组	46(100)	6(13)	0(0)	0(0)
高灵敏度检测方法组	46(100)	42(91.3)	4(8.7)	1(2.2)
$\chi^2$ 值		56.455	2.352	0.000
<i>P</i> 值		0	0.125	1.0

## 3 讨论

近年,随着我国卫生健康事业的发展,许多传染病如麻风病、麻疹、鼠疫等已经基本消灭或得到良好控制,在病毒性肝炎方面,由于母婴阻断治疗的广泛应用和疫苗计划免疫的实施,我国新生人口的乙肝发病率已大大下降,而丙型肝炎作为一个“沉默的杀手”,已渐渐浮出水面。目前全世界约有1.85亿人感染HCV,其中60%~85%的HCV感染者发展为慢性丙型肝炎<sup>[4]</sup>,而我国约1000万HCV感染患者,在高流行区域,由于注射毒品及性传播,丙肝患病率甚至可超过60%<sup>[5]</sup>。慢性丙型肝炎患者多无不适症状,且半数以上者无明显肝功能异常,就诊原因常为出现HCV感染的肝外症状(如类风湿性关节炎、干燥综合症或肾小球肾炎等)或者发展到肝硬化、肝癌后出现一系列症状和并发症而就诊。慢性丙型肝炎患者病情虽进展缓慢,最终可能发展至肝硬化或肝细胞肝癌<sup>[6-7]</sup>,由于HCV感染目前仍无有效疫苗预防,所以及早明确诊断并予治疗是防治慢性丙型肝炎的关键。HCV RNA是确认丙型肝炎现症感染的检验手段,患者只要被检测出HCV RNA阳性就应进行抗病毒治疗,这已成为国内外的一致共识,故HCV RNA检测已成为慢性丙型肝炎的诊断和治疗前评估的重要依据。本研究采用普通检测方法和高灵敏度检测方法对我院就诊的130例未经治疗的慢性丙型肝炎患者进行HCV RNA检测,结果提示,对于慢性丙型肝炎的诊断,使用普通检测方法和高灵敏度检测方法进行HCV RNA的检测效果相当,但对于经治患者,在判断是否出现停药后复发时,使用高灵敏度检测方法明显优于普通方法。

慢性丙型肝炎治疗的目标是控制肝脏炎症及纤维化,预防或减少HCV感染导致的并发症,改善患者生活质量、切断HCV的持续传播,而这一

切需要通过抗病毒治疗来实现。抗病毒治疗的成功标准是早期达到快速病毒学应答(rapid virological response, RVR)及尔后保持SVR。SVR是治疗后出现RVR的有效延续,故治疗时的HCV RNA的转阴率及其出现时间成为了关键。欧洲肝病研究学会(EASL)早把高灵敏的HCV RNA检测方法作为监测抗病毒治疗效果的首选<sup>[8]</sup>,普通检测方法因其灵敏度较低往往不能准确的判断病毒学应答情况<sup>[2]</sup>。本研究采用普通方法和高灵敏方法检测抗病毒治疗过程中的HCV RNA的变化时发现:在抗病毒治疗2周后,HCV RNA虽快速下降,但大部分患者血清中仍存在少量HCV RNA,由于普通检测方法灵敏度不高,其HCV RNA阳性率明显低于高灵敏度检测方法组。所以,使用高灵敏度的HCV RNA检测方法有助于更准确鉴定真实的RVR,排除假阴性,从而为确定抗病毒治疗疗程提供更可靠的依据<sup>[9]</sup>,治疗4周后及治疗12周后2种检测方法对比虽无统计学差异,值得注意的是,自DAA上市以来,丙型肝炎的抗病毒治疗有效率虽明显提高<sup>[10-11]</sup>,但至今仍无有效率达100%的治疗方案,正如本研究中所发现的一样,治疗12周后仍有1例患者使用高灵敏度方法能检测出HCV RNA,如该患者抗病毒治疗过程中使用普通方法检测HCV RNA变化,可能出现假阴性,未能及时调整方案,从而导致治疗失败,如使用高灵敏度方法在治疗过程中监测HCV RNA,可真实反映治疗效果,临床医生可根据HCV RNA变化及时调整治疗方案,才可使治愈率进一步提升从而尽可能接近100%。

HCV RNA的2种检测方法外在表现为检测下限不同,可能与2者检测操作过程中核酸提取方式不同有关。普通方法使用丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒自带的一步法提取,高灵敏度方法使用核酸提取或纯化试剂在Smart32核酸提取仪上进行核酸提取,后者更先进的核酸提取方式使核酸提取纯度和精确度大大提升,从而使其检测结果更灵敏和准确。采用高灵敏度HCV RNA检测方法可及时判断慢性丙型肝炎治疗后有否复发,必要时进行再治疗,进一步控制疾病进展,降低肝硬化及肝癌的发生率;同时,使用高灵敏度HCV RNA检测方法监测抗病毒治疗过程中的病毒量变化,可及时发现治疗效果不佳的患者,尽早调整治疗方案,从而提高治疗有效率,避免和减少治疗失

败后二次治疗的高额费用,减轻患者的经济负担。故我们认为高灵敏度HCV RNA检测方法是慢性丙型肝炎抗病毒治疗及停药后复查监测的首选。

综上所述,与普通HCV RNA检测方法相比,高灵敏度检测法用于监测和评价慢性丙型肝炎患者的疗效灵敏性更高,可用于指导慢性丙型肝炎的疗效评估。

## 参考文献

- [1] 刘天府,张岭漪. 丙型肝炎病毒的检测与临床应用[J]. 国际消化病杂志, 2017,37(1):15-19.
- [2] Cloherty G, Cohen D, Sarrazin C, et al. HCV RNA assay sensitivity impacts the management of patients treated with direct-acting antivirals [J]. *Antivir Ther*, 2015, 20:177-183.
- [3] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015更新版)[J]. *中华传染病杂志*, 2015, 33(12):705-724.
- [4] Pradat P, Virlogeux V, Trepo E. Epidemiology and Elimination of HCV-Related Liver Disease [J]. *Viruses*, 2018, 10(10):1.
- [5] 邹琳,余会元. 丙型肝炎的治疗及进展[J]. *肝脏*, 2017, 22(10):950-953.
- [6] Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(4):1182-1188.
- [7] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2557-2576.
- [8] 杨甲,饶慧瑛,魏来. 《2018年欧洲肝病学会丙型肝炎治疗推荐意见》介绍及解读[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(8):1622-1631.
- [9] Sarrazin C, Shiffman ML, Hadziyannis SJ, et al. Definition of rapid virologic response with a highly sensitive real-time PCR-based HCV RNA assay in peginterferon alfa-2a plus ribavirin response-guided therapy [J]. *Hepatology*, 2010, 52(6):832-8.
- [10] Indolfi G, Ricci S. Treatment of adolescents with chronic hepatitis C virus infection: new regimen on the block [J]. *Hepatology Commun*, 2018, 2(11):1289-1292.
- [11] 丁蕊,范颖,王艳斌. 丙型肝炎治疗方案优化选择[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(3):262-267.

## 两种 HCV RNA 定量检测方法的临床对比研究

彭亚柏 彭雅兰 管吉鹏\* 王敏

**[摘要]** **目的** 对比分析某国产的丙型肝炎病毒(HCV)核酸定量检测试剂(简国产试剂)和某进口试剂(简称进口试剂),检测其对HCV血清病毒载量的相关性和一致性。**方法** 收集2019年1月至5月期间在深圳市第三人民医院就诊的慢丙肝患者临床检测剩余血清标本132份,采用进口试剂和国产试剂,平行检测HCV感染者血清病毒载量,采用 $t$ 检验、线性回归和Bland-Altman等方法进行统计分析,评价2种检测试剂检测结果的相关性和一致性。**结果** 国产试剂和进口试剂检测结果均高于或低于检测下限的样本分别为114例和6例,检测结果一致性较高,达到90.91%(120/132)。进口试剂和国产试剂检测结果均高于检测下限的114例样本中,国产和进口试剂检测结果的平均HCV血清病毒载量分别为 $(2.38 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6)$  IU/mL,  $(5.47 \times 10^6 \sim 1.39 \times 10^7)$  IU/mL,差异具有统计学意义( $t = -3.32, P = 0.001$ )。2种检测方法在病毒载量 $>1\ 000$  IU/mL时差异有统计学意义( $t = -2.45, P = 0.02$ ),在病毒载量 $<1\ 000$  IU/mL时差异也具有统计学意义( $t = -2.30, P = 0.03$ )。相关分析显示,2种方法检测结果具有很强的相关性( $r = 0.98, P < 0.001$ )。差异性分析显示,进口试剂与国产试剂的2者定量值差异的平均值为 $-0.33 \log_{10}$  IU/mL,其95%可信区间为 $(-0.91 \sim 0.25) \log_{10}$  IU/mL。96%(109/114)的样本检测值在95%的可信区间内。**结论** 进口试剂与国产试剂2种试剂具有较高的相关性和一致性。

**[关键词]** 丙型肝炎病毒;病毒载量;相关性;一致性

### Clinical comparative study of two methods for quantitative detection of HCV RNA

PENG Yabai, PENG Yalan, GUAN Jipeng\*, WANG Min

(The Third People's Hospital of Shenzhen Institute of Hepatology, Shenzhen, Guangdong, China, 518112)

**[ABSTRACT]** **Objective** To compare a domestic Hepatitis C Virus (HCV) Nucleic Acid Quantitative Assay (domestic reagent) a imported (imported reagent) and to analyze the correlation and consistency of HCV serum viral load. **Methods** 132 samples of residual serum samples from patients with chronic hepatitis C who were admitted to Shenzhen Third People's Hospital from January to May 2019 were collected. Domestic reagent and imported reagent were used to detect the serum viral load of HCV infected patients in parallel. Statistical analysis was performed by methods such as  $t$  test, linear regression and Bland-Altman to evaluate the correlation and consistency of the detection results of the 2 detection reagents. **Results** The results of HCV viral load from 114 samples were both above the limit of detection (LOD) and 6 samples were both below the LOD determined by the domestic and imported reagents. The consistency of the 2 reagents was 90.91% (120/132). Among the 114 samples with domestic and imported detection results higher than the lower limit of detection, the average HCV serum viral load of imported and domestic reagents was  $(2.38 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6)$  IU/mL, and  $(5.47 \times 10^6 \sim 1.39 \times 10^7)$  IU/mL, respectively. The difference between the 2 methods was statistically significant ( $t = -2.45, P = 0.02$ ) at viral load  $>1\ 000$  IU/mL, and the difference was statistically significant at viral load  $<1\ 000$  IU/mL ( $t = -2.30, P = 0.03$ ). Correlation analysis showed that there

基金项目:广东省重点领域研发计划(2019B110233003)

作者单位:深圳市第三人民医院肝病研究所,广东深圳 518112

\*通信作者:管吉鹏, E-mail: gjp17@mails.tsinghua.edu.cn

was a strong correlation between the two methods ( $r=0.98$ ,  $P<0.001$ ). The difference analysis showed that the mean difference between the quantitative values of imported and domestic reagent reagents was  $-0.33 \log_{10} \text{IU/mL}$ , and the 95% confidence interval was  $(-0.91 \sim -0.25) \log_{10} \text{IU/mL}$ . 96% (109/114) of the sample values were within the 95% confidence interval. Conclusion Domestic reagent has a high correlation and consistency with the imported reagent.

[KEY WORDS] Hepatitis C; viral load; correlation; consistency

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起的病毒性肝炎,简称丙型肝炎或丙肝,通过血液传播、性传播、母婴传播等其他途径传播。丙型肝炎病毒是单股线性正链RNA病毒,是黄病毒科唯一的嗜肝病毒。世界卫生组织统计表明,丙肝已是一种全球性流行感染病,目前全世界约有1.7亿人感染HCV,感染率是3%左右,丙肝每年新发病例达到3.5万例<sup>[1]</sup>,且不同年龄、性别、种族均易感HCV<sup>[2-4]</sup>。现阶段暂无针对丙肝的疫苗,缺乏足够的治疗手段,并且因为HCV的生物学特点与感染者自身免疫功能等多方面因素影响,机体难以有效的清除病毒,所以早诊断、早发现、早治疗对于丙型肝炎的防治和积极阻断传播途径相当重要<sup>[5]</sup>。血清中的HCV RNA是病毒复制和肝炎进程的确切标志,被称为诊断HCV感染的“黄金标准”<sup>[6]</sup>。本研究收集了132例血清标本,同时用某国产丙型肝炎病毒(HCV)核酸定量检测(简称国产试剂)和某进口(简称进口试剂)2种试剂,用于评价并对比分析了2者检测结果的相关性和一致性,了解其在丙型肝炎早期诊断中的价值,现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集在2019年1月至5月于深圳市第三人民医院诊治的慢性丙型肝炎患者的临床检测剩余血清标本,保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下。诊断均符合《2015版慢性丙型肝炎防治指南》<sup>[7]</sup>中慢性丙型肝炎的诊断标准。男76例,女56例;最大年龄78岁,最小

年龄22岁,平均年龄 $(44.68\pm 12.96)$ 岁。

### 1.2 方法

每份样本同时使用进口试剂和国产试剂进行平行检测,操作过程严格按照说明书中标准步骤进行。2种检测方法在检测原理上基本一致,均采用磁珠法提取和纯化核酸,核酸扩增均采用Taqman实时荧光定量聚合酶扩增技术对血清中HCV病毒载量进行检测<sup>[8-9]</sup>。采集血清至1.5 mL灭菌离心管,采用核酸提取或纯化试剂对样本进行核酸提取,从试剂盒中取出HCV反应液,室温融化后振荡混匀,按比例配制反应液,之后将20  $\mu\text{L}$ 配制反应液分装到PCR管中,往上述HCV反应管中用带滤芯吸嘴分别加入提取后的待测样本核酸、HCV阴性质控品、HCV强阳性质控品、HCV临界阳性质控品和HCV阳性定量参考品40  $\mu\text{L}$ 。盖紧管盖,8 000 rpm离心数秒后转移至扩增检测区扩增。2种检测试剂盒的详细参数,见表1。

### 1.3 统计方法

应用Graphpad整理数据,使用R 3.6.0分析及绘图,采用配对 $t$ 检验分析2种检测方法结果的差异,采用相关分析法分析不同试剂检测结果的相关性,采用Bland-Altman模型分析2种检测方法结果的一致性。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2种试剂检测结果的比较

国产和进口试剂检测结果均高于检测下限的样本为114例,均低于检测下限的样本6例,检测结果一致性较高,达到90.91%(120/132)。进口检

表1 2种测试剂的参数对比

Table 1 comparison of parameter data between 2 reagents

试剂	核酸提取系统	核酸扩增系统	检测靶点	进样量( $\mu\text{L}$ )	线性范围(IU/mL)	检测下限(IU/mL)
国产	Smart32	ABI 7500	5'UTR	200	$50\sim 1\times 10^8$	20
进口	Automated Cobas AmpliPrep	Cobas TaqMan	5'UTR	650	$15\sim 1\times 10^8$	15

测结果中高于检测下限样本共 114 例,占比 86.36% (114/132);国产试剂检测结果中高于检测下限的样本共 126 例,占比 95.45%(126/132)。2 种试剂检测结果的不符合率分别为 9.52%(12/126)和 0%(0/114)。结果不符合的 12 例样本中,检测结果<100 IU/mL 的比例为 8.33%(1/12),2 种试剂差值超过 1 个 log(6.25 倍)的有 12 例,均为国产试剂高于进口试剂。

### 2.2 2 种试剂检测结果的对比分析

国产和进口试剂检测结果均高于下限的 114 例样本的平均 HCV 血清病毒载量分别为  $(2.38 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6)$  IU/mL 和  $(5.47 \times 10^6 \sim 1.39 \times 10^7)$  IU/mL, 配对 *t* 检验显示两者差异具有统计学意义 ( $t=-3.32, P=0.001$ ) (见图 1)。根据进口试剂的检测结果,分别对 <1 000 IU/mL 组和 >1 000 IU/mL 组的数据进行配对 *t* 检验。结果表明当病毒载量 >1 000 IU/mL 时,2 种检测试剂的结果差异有统计学意义 ( $t=-2.45, P=0.02$ ) (见图 2),在病毒载量 <1 000 IU/mL 时差异也具有统计学意义 ( $t=-2.30, P=0.03$ ) (见图 3)。

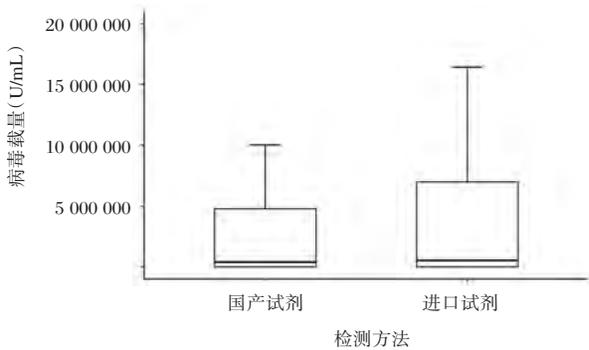


图 1 2 种试剂检测的 HCV 病毒载量的对比分析

Figure 1 Comparative analysis of HCV viral load detected by 2 reagents

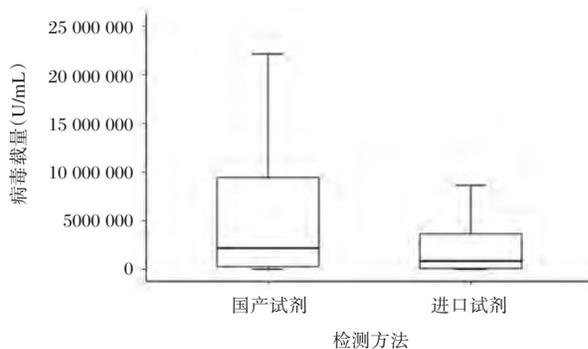
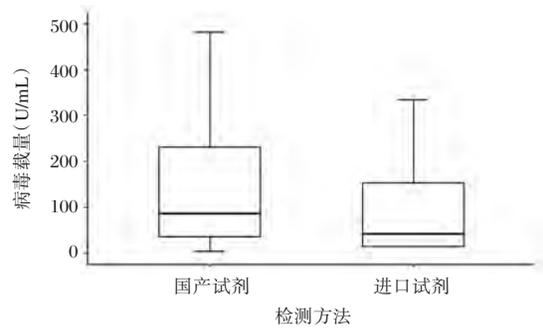


图 2 2 种试剂检测的 HCV 病毒载量的对比分析

Figure 2 Comparative analysis of HCV viral load detected by 2 reagents



病毒载量 <1 000 IU/mL

图 3 2 种试剂检测的 HCV 病毒载量的对比分析

Figure 3 Comparative analysis of HCV viral load detected by 2 reagents

### 2.3 2 种试剂检测结果的一致性分析

将 2 种方法检验结果均大于下限的 114 个病毒载量值,取对数后进行相关性分析,相关系数  $r=0.98, P<0.001$ ,表明两者具有很强的相关性(见图 4)。差异分析显示,进口试剂与国产试剂定量值差异平均值 96%(109/114)的样本检测值在 95% 的可信区间内,表明进口与国产具有较高的一致性(见图 5)。

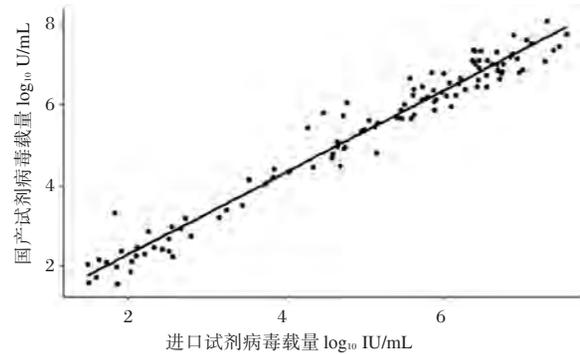


图 4 2 种试剂检测的 HCV 病毒载量的对比分析

Figure 4 Comparative analysis of HCV viral load detected by 2 reagents

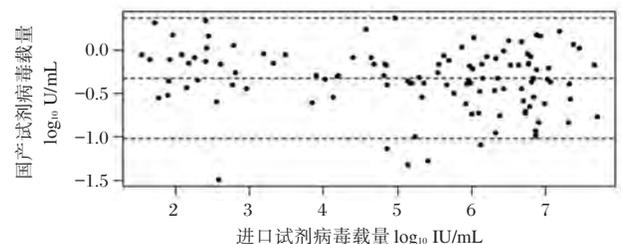


图 5 2 种试剂检测的 HCV 病毒载量一致性分析

Figure 5 Consistency analysis of HCV virus load detected by 2 reagents

### 3 讨论

HCV RNA 是临床诊断丙肝的金标准,具有早期、特异、灵敏等优点,在丙肝感染早期诊断、进程评估、疗效检测等方面发挥了重要作用<sup>[10-12]</sup>,其中早期临床诊断对丙肝及相关疾病的治疗和预后极其重要。血液传播是 HCV 的主要传播途径,同时也是病毒性肝炎发生的主要因素之一<sup>[13]</sup>。从发病机制看,当 HCV 进入人体内时,其会诱发病毒血症,同时在肝细胞内大量复制,阻碍细胞内的大分子合成,增加溶酶体膜通透性,进而导致细胞的病变,同时导致机体内肝脏等多器官损害<sup>[14]</sup>。目前临床通过注射疫苗的方式来预防甲型肝炎病毒与乙型肝炎病毒,然而目前尚无针对丙型肝炎病毒与丁型肝炎病毒疫苗,因此合理的筛查对于丙肝的临床诊治意义重大。

随着医疗环境的改善,特别是随着新医改方案出台,临床的血液供量不断增加,为了保证用血需求,减少血源的浪费,降低检测的假阳性率,有必要探索具备较高特异性及敏感性的检测方法<sup>[15]</sup>。本研究选择用进口试剂与国产试剂对比,是因为 2 种试剂检测原理相同,都基于实时荧光定量 PCR;通过这样的研究可以进一步了解国产试剂的具体性能。

在本次研究中,国产和进口检测结果均高于检测下限的样本为 114 例,均低于检测下限的样本 6 例,检测结果一致性较高,达到 90.91% (120/132)。虽然工作原理相同,国产试剂检测结果大于检测下限的样本比例稍高于进口试剂;国产试剂检测结果的不符合率也高于进口试剂,国产试剂线性范围下限是 20 IU/mL,而进口试剂的 15 IU/mL 稍低于国产试剂,尽管如此,检测结果不相符的 12 例样本中 8.33% (1 例)病毒载量小于 100 IU/mL,对于临床监测治疗效果和预测耐药发生无影响。

通过深入分析检测结果,我们发现 2 种试剂检测的病毒载量值在 >1 000 IU/mL 的样本中差异显著,而在 <1 000 IU/mL 的样本中,不仅差异显著还呈现了负相关性。

尽管 2 种试剂的检测结果显示具有较高的一致性,两者相关系数达到 0.98,仍有 12 例样本的检测结果显示差异超过 1 个 log (6.25 倍),推测可能是试剂靶点的不同导致了该差异出现,HCV 在不同样本中

的序列存在一定的差异性,也会导致不同的实际检测效能存在一定的差异。

综上所述,在丙型肝炎临床诊断中,国产与进口试剂均有其各自的优缺点,且 2 者具有较高的一致性,适合临床监测抗病毒治疗效果。国产试剂特异性高,便于操作,容易上手,性价比较高,同时对检验人员技术水平和仪器设备无特殊要求;而进口试剂具有灵敏度高,影响因素少,结果准确,更适合于窗口期感染者筛查,可以将其当作早期诊断 HCV 感染的有效检测方法。因此在临床上应根据患者具体情况对丙型肝炎病毒抗体检测中选用针对性强的检测方法。

世界卫生组织号召全人类行动起来,至 2030 年可以全面消灭慢性乙型/丙型病毒性肝炎对人类造成的健康威胁,从而使全世界的病毒性肝炎新发感染人数能减少 90%。总所周知从传染源上阻断病毒的传播扩散,对控制疾病以及降低发病率意义重大,故采取有效的 HCV RNA 定量检测方法,并将其灵活运用至临床中具有重大意义。

### 参考文献

- [1] Wu CC, Hsu CS. Rescue for interferon failures in HCV genotype 1/HBV dually infection [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(9):859-860
- [2] Pradat P, Virlogeux V, Trépo, et al. Epidemiology and Elimination of HCV-Related Liver Disease [J]. Viruses, 2018, 10(10):545-562.
- [3] 侯斐, 齐海宇, 阴赓宏. 慢性丙型肝炎的药物治疗进展 [J]. 中国医刊, 2017(4):337-339.
- [4] World Health Organization. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection [M]. 2018. Geneva: World Health Organization
- [5] 孟繁君, 焦婷婷, 杨秀莲. 化学发光法检测 HCV 核心抗原在丙型肝炎初期筛查中的应用研究 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(5):18-21.
- [6] 杨东亮. 丙型肝炎的病毒学检测指标及其临床意义 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(2):104.
- [7] 中华医学会肝病学会. 丙型肝炎防治指南 (2015 年更新版) [J]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2015, 29(5):1-19.
- [8] 刘萍, 张坚磊, 刘晔华, 等. 磁珠法提取核酸检测丙肝病毒 RNA 载量及其临床研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(6):482-484.

## HBeAg 与抗-HBe 双阳性的慢性乙型肝炎患者临床特征分析

罗琳\* 张廷超 刘书刚

**[摘要]** **目的** 探讨乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)与抗-HBe(HBeAb)双阳性的慢性乙型肝炎患者临床特征。**方法** 选择2016年1月至2017年12月在本院诊断治疗的慢性乙型肝炎患者500例为研究对象。根据HBeAg与抗-HBe阳性结果进行分组,其中双阳性组122例,e抗原阳性组173例,e抗体阳性组205例,比较3组HBeAg、抗-HBe、HBV DNA拷贝水平分布情况;比较各组肝功能指标、AFP结果异常比例。**结果** 双阳性组68.0%患者HBeAg在1~10.0 COI,只有0.8%患者>100.0 COI,与e抗原阳性组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。双阳性组63.9%患者抗-HBe在0~1.0 COI,只有12.3%患者0~0.1 COI,与e抗体阳性组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。双阳性组64.8%患者HBV DNA定量水平在 $5\times 10^2\sim 1\times 10^7$ 拷贝/mL,4.9% $>1\times 10^7$ 拷贝/mL;e抗原阳性组18.9% $>1\times 10^7$ 拷贝/mL,e抗体阳性组无 $>1\times 10^7$ 拷贝/mL的病例,3组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。双阳性组ALT异常率40.2%,TBA异常率为43.4%,AFP异常率为32.0%显著高于e抗原阳性组与e抗体阳性组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** HBeAg与抗-HBe双阳性的慢性乙型肝炎患者HBV DNA定量水平高,具有传染性,转氨酶水平更高,存在肝脏损伤,AFP水平更高,应引起足够重视。

**[关键词]** HBeAg; 抗-HBe; 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 肝功能; 甲胎蛋白

### Clinical characteristics of chronic hepatitis B patients with both HBeAg and HBeAb positive

LUO Lin\*, ZHANG Tingchao, LIU Shugang

(Laboratory Department, Guangyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangyuan, Sichuan, China, 628000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the clinical features of hepatitis B e antigen (HBeAg) and anti-HBe (HBeAb) double positive chronic hepatitis B patients. **Methods** 500 patients with chronic hepatitis B from January 2016 to December 2017 were selected as subjects, 122 cases in group of both positive, 173 cases in group of HBeAg positive, 205 cases in group of HBeAb positive. The distribution of HBeAg, HBeAb and HBV DNA copies in the three groups was compared. The abnormal liver function index and AFP results were evaluated. **Results** In the double positive group, 68.0% of patients had HBeAg of 1~10.0 COI, and only 0.8% of patients had >100.0 COI, which was significantly different from the e antigen positive group ( $P<0.05$ ). HBeAb of 63.9% cases in the group of both positive were 0~1.0 COI, and only 12.3% of patients had 0~0.1 COI, which was significantly different from the e-antigen-positive group ( $P<0.05$ ). HBV DNA of 64.8% cases in the group of both positive were  $5\times 10^2\sim 1\times 10^7$  copy/mL, and 4.9% cases were  $>1\times 10^7$  copy/mL; 18.9% cases in the group of HBeAg positive were  $>1\times 10^7$  copy/mL, and no case in the group of HBeAb positive was  $>1\times 10^7$  copy/mL; There was significant difference in the 3 groups ( $P<0.05$ ). In the group of both posi-

基金项目:广元市科技计划项目(2017ZCZDYF3912)

作者单位:广元市中医医院检验科,四川,广元 628000

\*通信作者:罗琳, E-mail:lipingytr@163.com

tive, abnormality rate of ALT was 40.2%, TBA was 43.4%, and AFP was 32.0%, which were higher than those in the group of HBeAg positive and group of HBeAb positive ( $P < 0.05$ ). Conclusion CHB patients with HBeAg and HBeAb double positive show high HBV DNA level. They are infectious, have higher levels of transaminase, have liver injury and higher AFP level, which should be paid enough attention.

[KEY WORDS] HBeAg; HBeAb; Chronic hepatitis B; Clinical characteristics; HBV; Liver function; AFP

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈全球性分布。我国是慢性乙型肝炎的高发地区,2014年世界卫生组织发布中国一般人群的乙肝病毒表面抗原阳性流行率估计为5.49%,约7400万例乙肝病毒携带者<sup>[1]</sup>。乙型肝炎e抗原(HBeAg)是人体感染HBV后出现的第2个血清学抗原标志物,提示肝细胞有较严重的损伤,患者有很强的传染性。抗-HBe即e抗体,是继乙肝核心抗体产生而出现的另一抗体。既往认为乙肝五项中的抗原与抗体出现有一定的规律,一般在急性感染期,表面抗体、e抗体与核心抗体均为阳性时提示处于乙肝恢复期;而e抗体与表面抗原、核心抗体同时阳性,表明在慢性持续感染期,患者具有传染性。既往临床上较少见到e抗原与e抗体同时阳性的情况,随着检测方法敏感性、准确性的提高,目前临床上常常会出现乙肝五项阳性与既往不同的规律,临床上可出现e抗原与e抗体同时阳性的情况,并且有研究认为其与肝脏慢性损伤、抗原转换、变异、病毒复燃等有关<sup>[2]</sup>。也有学者认为e抗原与e抗体同时阳性的慢性乙肝患者干扰素治疗的最终HBsAg转阴率以及HBeAg血清学转换率均高于恩替卡韦治疗的患者,对临床治疗有一定的指导意义<sup>[3]</sup>。随着e抗原与e抗体同时阳性病例在临床上的增加,了解此类患者的临床特征,对临床诊断、病情判断、治疗方案等均具有重要的临床意义。本研究分析慢性乙型肝炎患者e抗原与e抗体同时阳性者的临床特征,以期为临床诊断及治疗提供参考。现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2016年1月至2017年12月在本院诊断治疗的慢性乙型肝炎患者500例为研究对象。纳入标准:符合慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准<sup>[4]</sup>;对本次研究知情同意。排除标准:近6个月内应用免疫调节剂治疗者、抗病毒治疗者、合并其他病毒感染,

肝硬化,肝癌,妊娠,糖尿病血糖控制欠佳,甲亢,其他免疫系统疾病,心肝肾内分泌系统疾病,精神疾病史,神经疾病史。根据患者乙肝五项检测结果将所有病例分为3组,其中HBeAg与抗-HBe均为阳性122例纳入双阳性组,抗-HBe阴性173例纳入e抗原阳性组,205例纳入HBeAg阴性,抗-HBe阳性组(e抗体阳性组)。双阳性组男69例,女53例,年龄22~52岁,平均(41.4±10.5)岁;e抗原阳性组男91例,女82例,年龄20~55岁,平均(42.1±13.3)岁;e抗体阳性组男108例,女97例,年龄21~58岁,平均(42.8±14.8)岁。3组一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具可比性。

### 1.2 检测指标

#### 1.2.1 试剂/仪器

HBsAg、HBeAg、HBeAb试剂盒由Abbott Ireland Diagnostics Division提供。AFP试剂盒由Roche Diagnostics GmbH。检测仪器为罗氏Elec-sys2010免疫测定分析仪。HBV DNA试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司(单位已经换算成拷贝/mL),仪器为Applied Biosystems实时荧光定量PCR检测仪。肝功能指标采用西门子全自动生化分析仪ADVIA2400检测。

#### 1.2.2 检测方法

HBsAg检测采用微粒子化学发光法, $>0.05$  IU/mL为阳性(说明书);HBeAg与抗-HBe采用电化学发光免疫分析法检测,参考范围:HBeAg $>1.0$  COI为阳性,抗-HBe $<1.0$  COI为阳性(说明书)。肝功能指标检测:ALT、AST、ALP、GGT、TBIL、DBIL、TBA。AFP采用流式荧光发光法检测。HBV DNA检测采用PCR方法检测。

### 1.3 分析方法

比较3组HBeAg 1~10.0 COI、~100.0 COI、以及 $>100.0$  COI比例,抗-HBe 0~0.1 COI、0~0.5 COI、0~1.0 COI的比例;比较各组不同HBV DNA拷贝水平分布情况;比较各组肝功能指标、AFP结果异常比例。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件分析。计数资料采用  $n$  或 % 表示,行  $\chi^2$  列卡方检验;计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用  $F$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 双阳性组与 e 抗原阳性组 HBeAg 分布比较

双阳性组 68.0% 的患者 HBeAg 水平为 1~10.0 COI, 31.1% 的患者为 1~100.0 COI, 只有 0.8% 患者为 >100.0 COI, 与 e 抗原阳性组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 双阳性组与 e 抗原阳性组 HBeAg 分布比较 [n(%)]  
Table 1 Comparison of HBeAg distribution in double positive group and HBeAg positive group [n(%)]

组别	例数	1~10.0COI	1~100.0 COI	>100.0 COI
双阳性组	122	83(68.0)	38(31.1)	1(0.8)
e 抗原阳性组	173	50(28.9)	50(28.9)	73(42.2)
$\chi^2$ 值			73.251	
$P$ 值			<0.05	

### 2.2 双阳性组与 e 抗体阳性组抗-HBe 分布比较

双阳性组 63.9% 的患者抗-HBe 水平为 ~1.0 COI, 23.8% 的患者为 ~0.5 COI, 只有 12.3% 患者为 0~0.1 COI, 与 e 抗原阳性组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 双阳性组与 e 抗体阳性组抗-HBe 分布情况比较 [n(%)]

Table 2 Comparison of anti-HBe distribution between double positive group and e antibody positive group [n(%)]

组别	例数	0~0.1 COI	~0.5 COI	~1.0 COI
双阳性组	122	15(12.3)	29(23.8)	78(63.9)
e 抗体阳性组	205	175(85.4)	20(9.8)	10(4.9)
$\chi^2$ 值			179.430	
$P$ 值			<0.05	

### 2.3 3 组 HBV DNA 定量水平构成比比较

双阳性组 64.8% 患者 HBV DNA 定量水平在  $500 \sim 1 \times 10^7$  拷贝/mL, 30.3% 的患者  $< 5 \times 10^2$  拷贝/mL, 4.9%  $> 1 \times 10^7$  拷贝/mL; e 抗原阳性组 18.9%  $> 1 \times 10^7$  拷贝/mL, e 抗体阳性组无  $> 1 \times 10^7$  拷贝/mL 病例, 三组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 3 组 HBV DNA 定量水平构成比比较 [n(%), 拷贝/mL]

Table 3 Comparison of the ratio of HBV DNA quantitative levels in 3 groups [n(%), 拷贝/mL]

组别	例数	$< 5 \times 10^2$	$\sim 1 \times 10^4$	$\sim 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^7$
双阳性组	122	37(30.3)	28(23.0)	51(41.8)	6(4.9)
e 抗原阳性组	173	71(41.0)	18(10.4)	61(35.3)	23(13.3)
e 抗体阳性组	205	145(70.7)	40(19.5)	20(9.8)	0(0.0)
$\chi^2$ 值			103.510		
$P$ 值			<0.05		

### 2.4 各组肝功能指标、AFP 异常率

双阳性组 ALT 异常率 40.2%, TBA 异常率为 43.4%, AFP 异常率为 32.0%, 显著高于 e 抗原阳性组与 e 抗体阳性组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

## 3 讨论

HBeAg 是 HBV 活跃复制的重要标志, 抗-HBe 常在 HBeAg 消失不久后在血清中出现, 提示 HBV 复制减少, 传染性降低, 也可提示病毒有变异<sup>[5-6]</sup>。感染 HBV 后, 常于第 6 周血清出现 HBV DNA, 同

时 HBsAg、HBeAg 相继呈现阳性, 抗 HBcAg 大多于第 6~8 周出现<sup>[7]</sup>。HBeAg 阳性提示病毒复制活跃, 具有较强的传染性<sup>[8-9]</sup>。随着 HBsAg、HBeAg 效价下降并消失, 抗-HBs 是保护性抗体, 通常意味着疾病趋于康复, 并能防止在感染; 抗-HBe 的出现提示 HBV 复制减少, 肝脏炎症趋于消退<sup>[10-12]</sup>。随着检测方法敏感性的提高, 目前临床上常常见到 e 抗原与 e 抗体同时阳性的情况, 给临床诊断及指导治疗造成了一定程度的干扰<sup>[13]</sup>。王菲等<sup>[14]</sup>的研究中, 双阳性率为 7.16%, 本次研究结果中的阳性率显著高于上述研究结果, 可能与检测方法、纳入

表4 肝功能指标、AFP异常率 [n(%)]

Table 4 Liver function index and AFP abnormality rate [n(%)]

组别	n	ALT	AST	ALP	GGT	TBIL	DBIL	TBA	AFP
双阳组	122	49(40.2)	35(28.7)	26(21.3)	30(24.6)	41(33.6)	33(27.0)	53(43.4)	39(32.0)
e抗原阳性组	173	41(23.7)	49(28.3)	28(16.2)	49(28.3)	49(28.3)	46(26.6)	54(31.2)	30(17.3)
e抗体阳性组	205	37(18.0)	62(35.8)	27(15.6)	61(29.8)	68(33.2)	67(32.7)	57(27.8)	34(16.6)
$\chi^2$ 值		20.145	0.188	3.734	1.026	1.320	2.046	8.787	12.781
P值		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

样本量、纳入样本群体存在差异等有关。

在本次研究结果提示大部分双阳性患者两者均处于较低的水平,处于抗原、抗体转换过程中,这个过程在时间上有重叠,因此被同时检测出<sup>[2]</sup>。另外HBV发生变异,不同免疫的非耐受HBeAg消长有差异,因此出现抗-HBe同时存在的情况<sup>[15]</sup>。HBV DNA定量结果也显示,双阳性患者病毒水平在中低水平,但病毒仍然在复制,有传染性,有少部分患者病毒水平较高。肝功能指标提示肝脏的损伤情况,在本次研究中,双阳性患者ALT异常率最高,e抗体阳性患者异常率最低,提示双阳性患者虽然已经出现e抗体,处于恢复期,但是患者仍然存在肝脏的慢性损伤。AFP的异常提示了肝癌及肝硬化风险,双阳性患者最高,e抗体阳性患者最低。e抗原的血清学转换是慢性乙肝恢复的重要目标之一<sup>[16]</sup>。目前临床上也有通过检测患者治疗过程中出现双阳性时HBeAg、HBeAb时间、滴度以及ALT水平来判断抗病毒治疗药物的效果。有学者研究显示对乙二醇干扰素首次出现双阳性及发生HBeAg血清学转换时间明显早于恩替卡韦,认为干扰素有恩替卡韦不具备的免疫调节作用<sup>[3]</sup>。在张健等<sup>[17]</sup>的研究中,双阳性患者HBV DNA阴转率,HBeAg阴转率以及HBeAg血清转换率均较高。本次研究除了对双阳性患者HBV DNA水平进行了分析,还对肝功能、AFP、抗-HBe水平进行分析,探讨了双阳性患者病毒复制情况、肝脏损害情况、肝癌的风险性等。但本文不足之处是未分析经过治疗后患者的转归,以及不同治疗方法的效果,期待在今后的研究中收集资料进行分析,进而能为临床治疗提供参考。

综上所述,在临床工作中,部分慢性乙型肝炎患者HBeAg与抗-HBe同时阳性,在这个过程中,患者仍然有病毒复制,具有传染性,也会存在肝脏

损伤,并且相较于单纯HBeAg阳性或者抗-HBe阳性,其AFP水平更高,应引起足够重视。

### 参考文献

- [1] 陈词,庄辉.中国慢性乙肝流行病学现状[J].肝博士,2018,17(1):8-9.
- [2] 段梦夕,谷娅楠,于森琛,等.慢性乙型肝炎患者HBeAg与抗-HBe双阳性的原因与临床意义[J].中华医院感染学杂志,2017,27(19):4332-4335.
- [3] 王欣欣,王俊洁,张浩,等.慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗过程中出现HBeA/抗-hbe双阳性的临床意义[J].实用医学杂志,2015,31(11):1778-1780.
- [4] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2015更新版)[J].中华肝脏病杂志,2015,23(12):888-905.
- [5] 刘焕春.乙肝患者乙肝五项检验结果257例分析[J].河南医学研究,2018,27(4):633-634.
- [6] 乔艳,徐东平,李进.慢性乙型肝炎的免疫治疗研究进展[J].实用肝脏病杂志,2016,19(4):493-496.
- [7] Duygu F, Karsen H, Aksoy N, et al. Relationship of oxidative stress in hepatitis b infection activity with hbv dna and fibrosis[J]. Ann Lab Med, 2012, 32(2): 113-115.
- [8] Fei Q J, Yang X D, Ni W H, et al. Can hepatitis B virus DNA in semen be predicted by serum levels of hepatitis B virus DNA, HBeAg, and HBsAg in chronically infected men from infertile couples[J]. Andrology, 2015, 3(3):506-511.
- [9] 吴著球,张学东.58331例乙肝五项标志物定量检测不同模式分布分析[J].现代预防医学,2016,43(9):1691-1694.
- [10] 马龔,陈恋恋,朱春凯,等.慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA与e抗原含量的关系[J].中国现代药物应用,2016,10(8):28-29.
- [11] 王晓阳.慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA与e抗原含量的关系[J].中国医药指南,2015,13(31):37-38.

(下转第433页)

## 胱抑素 C 和肝动脉阻力指数在肝硬化患者中的临床意义

邵小梅<sup>1\*</sup> 杨杨<sup>1</sup> 韩丽霞<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 评价胱抑素 C(CysC)水平和肝动脉阻力指数(HARI)在评价肝硬化患者肝脏纤维化的临床意义。**方法** 选择2016年12月至2018年9月期间接受检查 and 治疗的63例肝硬化患者作为横向研究对象,对照组由30位年龄和性别相匹配的健康人群组成。对健康人群和肝硬化患者进行血清学检测、腹部多普勒超声检测和上腹部内窥镜检测。**结果** 与对照组相比,胱抑素 C 在肝硬化患者中的明显升高( $P=0.036$ ),与对照组( $0.65\pm 0.05$ )相比,研究组的 HARI 平均值显著增加( $0.73\pm 0.01, P<0.001$ )。HARI 和胱抑素 C 之间存在显著相关性( $r_s=0.531, P<0.001$ )。ROC 曲线下 HARI 指数面积远高于 CysC。Child-Pugh 分期阶段与胱抑素 C 水平具有相关性( $P=0.037$ )。**结论** 肝动脉阻力指数是一个比胱抑素 C 更准确的肝纤维化评价指标,而在肝硬化阶段胱抑素 C 是此肝动脉阻力更好的评价指标。

**[关键词]** 胱抑素 C; 肝动脉阻力指数; 肝硬化; 肝纤维化

### Clinical significance of cystatin C and hepatic artery resistance index in patients with liver cirrhosis

SHAO Xiaomei<sup>1\*</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, HAN Lixia<sup>2</sup>

(1. Department of clinical laboratory, The affiliated hospital of Liaoning university of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, China, 110032; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning, China, 116044)

**[ABSTRACT]** **Objective** To evaluate the clinical significance of cystatin C (CysC) levels and hepatic artery resistance index (HARI) in evaluating cirrhosis in patients with fibrosis. **Methods** A cross-sectional study of 63 patients with cirrhosis who underwent examination and treatment from December 2016 to September 2018 was selected. The control group consisted of 30 healthy individuals matched for age and sex. Serological testing, abdominal Doppler ultrasonography and upper abdominal endoscopy were performed in healthy people and patients with cirrhosis. **Results** Compared with the control group, Cystatin C was significantly higher in patients with cirrhosis ( $P=0.036$ ). Compared with the control group ( $0.65\pm 0.05$ ), the mean value of HARI in the study group significantly increased ( $0.73\pm 0.01, P<0.001$ ). There was a significant correlation between HARI and Cystatin C ( $r_s=0.531, P<0.001$ ). The area of HARI index under the ROC curve was much higher than that of Cystatin C. The Child-Pugh staging phase was correlated with cystatin C levels ( $P=0.037$ ). **Conclusion** The hepatic artery resistance index (HARI) is a more accurate parameter for patients with liver fibrosis than Cystatin C, and Cystatin C is a better indicator of cirrhosis.

**[KEY WORDS]** Cystatin C; Hepatic artery resistance index; Cirrhosis; Hepatic fibrosis

基金项目:辽宁省教育厅重点实验室项目(LS2010108)

作者单位:1. 辽宁中医药大学附属医院临床检验中心,辽宁,沈阳 110032

2. 大连医科大学附属第一医院检验科,辽宁,大连 116044

\*通信作者:邵小梅, E-mail:18102458078@163.com

肝硬化是由多种慢性肝病引起的常见肝损伤病理状态,是导致门静脉高压症(portal hypertension, PHT)死亡的主要原因,是该疾病最常见的并发症。肝纤维化是由于慢性肝炎症反应中细胞外基质的过度积累所致,最终可发展为肝硬化。在慢性肝病中,尤其是肝硬化的早期诊断,准确的肝纤维化分期和炎症程度,对于预测该疾病的病程至关重要。早期肝硬化的检测标志物是AAR(aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase ratio, AST/ALT),不过其检测准确性仅有50%<sup>[1]</sup>。肝硬化中门静脉高压症的最相关决定因素是肝血管结构扭曲和肝窦状细胞改变导致肝内血管阻力增加,促进肝窦的收缩和纤维化。多普勒超声检查通常作为肝硬化和门静脉高压症患者的首选非侵入性诊断模式,肝动脉阻力指数是多普勒超声检查参数,用于跟踪肝损伤中的微循环阻力。研究表明,血清胱抑素C(Cystatin C, CysC)随着慢性肝病的进展而增加,并且可能参与肝纤维化的发病机制<sup>[2-4]</sup>,CysC不受常规储存环境的影响,不受性别、年龄、饮食和炎症等因素的影响。因此,本研究对比分析不同病因的肝硬化患者与健康对照组之间CysC和肝动脉阻力指数的差异,旨在评价CysC和肝动脉阻力指数在评估肝硬化患者肝纤维化中的临床意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选择在2016年12月至2018年9月期间接受检查和治疗的63名肝硬化患者作为研究对象,其中酒精性肝硬化41例,占65.1%,病毒性肝硬化22例,占34.9%(丙型肝炎病毒肝硬化13例,乙型肝炎病毒肝硬化9例)。健康对照组由30名年龄和性别匹配的受试者组成。纳入标准:①患者由实验室检查和腹部多普勒超声检查结果诊断为肝硬化;②所有患者行腹部多普勒超声检查并且在常规检查期间进行上腹部内窥镜检查。根据Child-Pugh分类<sup>[5]</sup>将肝功能不全程度分为3个阶段:A(36.5%),B(33.3%)和C(30.2%)(评分A≤6,B7-9,C≥10)。West Haven精神状态分级标准<sup>[6]</sup>用于评估肝性脑病的严重程度,终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)评分<sup>[7]</sup>也用于评估肝硬化患者。

排除标准:①存在肝细胞癌,胃肠道出血,肝肾综合征以及任何叠加病症,如感染,内源性肾

病,慢性阻塞性肺病,充血性心力衰竭,甲状腺功能障碍和糖尿病;②接受糖皮质激素、抗病毒药物、血管紧张素II受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、非甾体抗炎药、β受体阻滞剂、硝酸盐和氨基酸L-精氨酸和L-鸟氨酸等治疗的患者。患者皆自愿签署知情同意书,医学研究伦理委员会同意本研究。

### 1.2 仪器和试剂

乙型肝炎病毒肝硬化的诊断是基于血清学(HBsAg、HBeAg,抗HBe和抗HBcIgG),聚合酶链反应测定乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(PCR HBV DNA)。丙型肝炎病毒性肝硬化通过抗HCV抗体的存在及聚合酶链反应丙型肝炎病毒核糖核酸(PCR HCV RNA)对每毫升血液的病毒载量进行定量来验证,试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司。PENIA方法(粒子增强比浊免疫测定法)用于测定CysC血清浓度,用SIEMENS(德国Marburg)进行检测,在激光浊度计(BN IIDadeBehring)上测量。彩色多普勒超声为东芝核心版本,多普勒双凸探头,3.5MHz。胃镜检查于Olympus exera II CV-165,Q165型。

### 1.3 临床检测

#### 1.3.1 生化指标检测

在真空采血管中收集静脉血样,以3 500 r/min(≈2 000g)速率离心,并在分离后保存在-80℃的环境下。CysC指示值为(0.59~1.04) mg/L。

#### 1.3.2 腹部多普勒超声检查

使用超声检查肝脏大小、肝实质的回声结构和可能的局灶性变化,脾脏直径和腹水的存在彩色多普勒超声确定肝动脉阻力指数,门静脉直径和血流速度。所有超声检查都是由同一人完成。正常情况下门静脉直径小于13 mm,禁食成人的血流速度范围为16~31 cm/s。阻力指数等于收缩期峰值速度减去最终舒张速度除以收缩期峰值速度,正常情况下阻力指数低于0.7<sup>[3]</sup>。

#### 1.3.3 上腹部内窥镜检查

进行胃镜检查以检查门静脉高压症的体征和结果:存在食管静脉曲张,胃静脉曲张和门静脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)。当存在食管静脉曲张时,使用Paquet分级系统将其大小分级为I~IV。

### 1.4 统计分析

使用SPSS 20.0(IBM Corporation)统计软件分

析。计数资料以  $n(\%)$  表示, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。使用  $t$  检验进行组间比较或 Mann-Whitney U 检验统计连续数据(取决于数据分布)和卡方检验统计数据, 使用 Spearman 相关分析相关性。接受者操作特征曲线(receiveroperating characteristic, ROC)和曲线下的面积(area under curve AUC)用于评估连续变量区分健康人群和肝硬化患者的诊断能力。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者临床资料

表 1 呈现了 2 组基本人口统计数据, 其中年龄、性别无统计学差异。研究组中不同病因肝硬化之间白细胞计数、Child-Pugh 评分无差异, 具有可比性。51 名(80.9%)患者观察到有食管静脉曲张, 其中 13 名患者有 I 级食管静脉曲张, 23 名患者有 II 级食管静脉曲张, 15 名患者有 III 级静脉曲张;

9 名(14.3%)患者也有胃静脉曲张, 47 名患者(74.6%)伴有门静脉高压性胃病。

### 2.2 门静脉直径、血流速度、肝动脉阻力指数、CysC 检测结果比较

与对照组相比, 研究组门静脉平均直径、肝动脉阻力指数(hepatic artery resistance index, HARI)和 CysC 的水平升高, 而血流速度明显较慢(表 2)。门静脉直径和血流速度与 CysC 水平之间无相关性(表 2)。HARI 和 CysC 之间存在显著相关性(表 3 和图 1)。与无静脉曲张的患者相比, 食管静脉曲张患者的 CysC 值显著升高, 具有统计学意义( $P=0.048$ ), 不同等级的食管静脉曲张患者 CysC 值无显著差异( $P=0.117$ )。食管静脉曲张时门静脉直径( $P=0.758$ )、血流速度( $P=0.124$ )或肝动脉阻力指数( $P=0.945$ )无统计学显著相关性。此外, 有和没有门静脉高压性胃病的患者 HARI 值没有统计学显著差异( $P=0.152$ )。

表 1 2 组间数据比较 [ $n(\%)$ ]  
Table 1 Comparison of data in 2 groups [ $n(\%)$ ]

	研究组( $n=63$ )		对照组( $n=30$ )	P 值
	病毒性肝硬化( $n=41$ )	酒精性肝硬化( $n=22$ )		
年龄	50.3±12.8	50.5±13.2	47.9±18.2	0.432
男性	30(73.2%)	18(81.2%)	25(80%)	0.567
白细胞计数( $10^9/L$ )	5.1	5.2		0.617
Child-Pugh 评分(A/B/C)	10/12/19	8/7/7		0.389

表 2 血流速度、肝动脉阻力指数、Cys C 检测结果比较  
Table 2 Comparison of blood flow velocity, HARI and Cys C test results

组别	VPD(mm)	VP BFV(cm/s)	HARI	Cys C(mg/L)
研究组	13.52±3.01	26.46±8.4	0.71±0.01	1.08(0.80-1.20)
对照组	10.53±0.98	34.27±5.46	0.65±0.05	0.89(0.79-1.00)
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	0.036

VPD, 门静脉直径; VP BFV 门静脉血流速度; HARI 肝动脉阻力指数; CysC 胱抑素 C

表 3 多普勒超声检查结果与胱抑素 C 的相关性  
Table 3 The correlation between the results of Doppler ultrasonography and cystatin C

组别	VPD(mm)	VP BFV(cm/s)	HARI
研究组	$r_s$	0.051	-0.243
	P	0.743	0.124
对照组	$r_s$	0.267	-0.070
	P	0.148	0.712

VPD, 门静脉直径; VP BFV 门静脉血流速度; HARI 肝动脉阻力指数; CysC 胱抑素 C;  $r_s$  斯皮尔曼等级相关系数

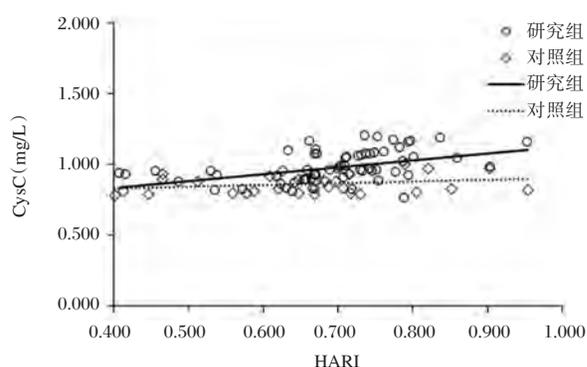
### 2.3 患者肝动脉阻力指数、CysC 相关性分析

研究组中, 46 名(73%)患者的肝动脉阻力指数增加, 平均值为(0.75±0.03), 肝动脉阻力指数与胱抑素 C 水平呈正相关( $r_s=0.531$ ,  $P < 0.001$ )。Child-Pugh 分期的门静脉直径和血流速度与 HARI 之间差异无统计学意义, 且与 MELD 评分无相

关性。

### 2.4 HARI、CysC 对肝硬化的诊断价值

ROC 曲线显示 HARI 指数曲线下面积远大于门静脉直径、门静脉血流速度以及 CysC, 具有良好的肝纤维化诊断特异度和敏感性(图 2)。



研究组 vs 对照组, HARI: 肝动脉阻力指数

图1 不同患者的肝动脉阻力指数和胱抑素C相关性分析  
Figure 1 Analysis of correlation between HARI and CysC in different patients

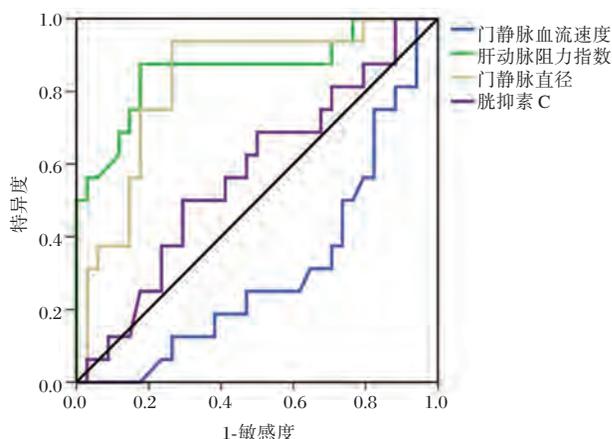


图2 门静脉血流速度、门静脉直径、肝动脉阻力指数及胱抑素C对肝硬化诊断价值的ROC分析(ROC)

Figure 2 ROC analysis of VP BFV, VPD, HARI and CysC in the diagnosis of cirrhosis

### 3 讨论

本研究结果显示,肝硬化患者门静脉平均直径、肝动脉阻力指数(HARI)和CysC的水平升高,而血流速度明显较慢。既往研究表明血流速度大于9.5 cm/s的侧支血管和位于脾门的侧支血管是发生肝硬化门静脉非前向流动(NFPF)的重要预测因素,NFPF患者的累积生存率明显低于使用Child-Pugh B和C分类的门前流患者<sup>[8]</sup>。Zardi等人报道门静脉高压性胃病患者平均门静脉直径只是略微增加并未明显增加。门静脉直径不稳定趋势从可控制到大尺寸食管静脉曲张可能表明在门静脉高压症初期不能释放门静脉压力。在大量肝硬化患者中门静脉直径无法预测食管静脉曲张的存在或

大小<sup>[9]</sup>。本研究中,与无食管静脉曲张的患者VP BFV相比,有食管静脉曲张的患者以上指标无明显差异,与先前研究结果一致。

研究表明,在慢性病毒性肝炎患者中,中度或重度炎症患者的肝动脉阻力指数显著高于轻度或可控制炎症患者<sup>[10]</sup>。此外,有学者得出结论慢性病毒性肝炎患者的肝动脉动力指数可能受到纤维组织沉积程度的显著影响,乙型和丙型肝炎病毒携带者轻度炎症病例中HARI的增加,因为这种增加可作为疾病进展指标,也可用于活检结果的确定<sup>[11]</sup>。一些研究证实肝硬化患者的HARI增加,但没有发现肝硬化程度和/或炎症有显著相关性<sup>[12]</sup>。这些研究表明,与健康对照组相比,HARI是区分纤维化患者很好的非侵入性检查手段。但是随着肝硬化的发展,出现侧支血管循环和食管静脉曲张,减轻内脏血管的压力,所有多普勒超声检查的结果包括肝动脉阻力指数没有评估疾病分期的能力,我们的研究结果与多普勒超声检查结果一致。

CysC是一种低分子量的非碱性糖基化蛋白,含有122种氨基酸。有核细胞可产生可持续的CysC,分泌到细胞外液中,包括血液、脑脊液和精液。肝硬化患者CysC值明显更高,与先前报道结果一致<sup>[13]</sup>。慢性肝病纤维化进展是由于细胞外基质合成和降解的不平衡导致血清胱抑素C水平的首次增加。胱抑素C是溶酶体半胱氨酸蛋白酶的有效抑制剂,可作为有效的促纤维化剂<sup>[14]</sup>,胱抑素C在肝星状细胞中的高表达是肝脏疾病的重要病理因素之一<sup>[15]</sup>。转化因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )是诱导肝纤维化的必需细胞因子,因为它促进肝肌成纤维细胞中肝星状细胞(HSC)的分化。在体外,TGF $\beta$ 是血管平滑肌细胞中胱抑素C分泌的有效诱导物<sup>[16]</sup>,在TGF $\beta$ 刺激下肌成纤维细胞HSC转分化过程中胱抑素C浓度上升。血浆TGF $\beta$ 水平显著增加与纤维化的严重程度平行(与肝脏活检一致),当达到肝硬化阶段时会有所下降<sup>[17]</sup>。

肝硬化患者血清CysC浓度的第二次增加可以解释为肾小球滤过率的下降<sup>[18]</sup>,这可能是胱抑素C浓度值升高与肝硬化分期相关的主要原因。由于样本量的原因该研究有一定的局限性,进一步的研究应该包括更多的患者,并且随着时间的推移,研究同一患者的这些参数将会更有趣。总之,我们确认肝动脉阻力指数是比胱抑素C能更

准确区分纤维化患者的一个参数,而胱抑素 C 是肝硬化阶段更好的指标。

### 参考文献

- [1] Denzer UW. Non-invasive diagnosis and monitoring of liver fibrosis and cirrhosis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2009, 23(3):453-460.
- [2] Ren S, Chang Y, Zhang Q, et al. How to estimate renal function in patients with liver disease: choosing the most suitable equation[J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(4):677-690.
- [3] Paka P, Huang B, Duan B, et al. A small molecule fibrokinase inhibitor in a model of fibropolycystic hepatorenal disease[J]. *World J Nephrol*, 2018, 7(5):96-107.
- [4] Mindikoglu AL, Opekun AR, Mitch WE, et al. Cystatin C Is a Gender-Neutral Glomerular Filtration Rate Biomarker in Patients with Cirrhosis[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(3):665-675.
- [5] 王昭君. 乙肝肝硬化患者血清胆碱酯酶的测定及其临床意义[D]. 宁夏医科大学, 2013.
- [6] Gundling F, Zelihic E, Seidl H, et al. How to diagnose hepatic encephalopathy in the emergency department[J]. *Ann Hepatol*, 2013, 12(1):108-114.
- [7] Ascha M, Hanounch MS. Ascha M, et al. Transjugular Intrahepatic Porto-Systemic Shunt in Patients with Liver Cirrhosis and Model for End-Stage Liver Disease  $\geq 15$ [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(2):534-542.
- [8] Kondo T, Maruyama H, Sekimoto T, et al. Reversed portal flow: Clinical influence on the long-term outcomes in cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(29):8894-8902.
- [9] Jamil Z, Malik M. Platelet count to splenic diameter ratio and other noninvasive markers as predictors of esophageal varices in patients with liver cirrhosis[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2017, 28(5):347-352.
- [10] Mansoor A, Shaukat R, Chaudhary AN. Diagnostic Accuracy of Doppler Ultrasonography in Predicting Presence of Esophageal Varices in Patients with Hepatitis -C Induced Cirrhosis [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(7):612-615.
- [11] Preuss S, Rother C, Renders L, et al. Sonography of the renal allograft: Correlation between doppler sonographic resistance index (RI) and histopathology [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2018, 70(4):413-422.
- [12] Sacerdoti D1, Bolognesi M, Bombonato G, et al. Paraumbilical vein patency in cirrhosis: effects on hepatic hemodynamics evaluated by Doppler sonography [J]. *Hepatology*, 1995, 22(6):1689-94.
- [13] Plestina S, Pulanic R, Kralik M, et al. Color Doppler ultrasonography is reliable in assessing the risk of esophageal variceal bleeding in patients with liver cirrhosis [J]. *WienKlin Wochenschr*, 2005, 117: 711-717.
- [14] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1655-1669.
- [15] Gressner AM, Lahme B, Meurer SK, et al. Variable expression of cystatin C in cultured trans-differentiating rat hepatic stellate cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(5):731-8.
- [16] Huang F, Song Y, Chen W, et al. Effects of *Candida albicans* infection on defense effector secretion by human oral mucosal epithelial cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 103:55-61.
- [17] Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, et al. Cytokine—Chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C [J]. *Transl Res*, 2007, 149(3):126-36.
- [18] Ahn HS, Kim YS, Kim SG, et al. Cystatin C is a good predictor of hepatorenal syndrome and survival in patients with cirrhosis who have normal serum creatinine levels [J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(116):1168-73.

## 抗乙肝病毒对肝癌 TACE 术后复发转移的临床疗效及免疫功能研究

陈明<sup>1\*</sup> 曹洋<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 探讨接受 TACE 治疗的乙肝病毒相关性肝癌患者在术后进行抗病毒治疗的临床效果及免疫功能的影响。方法 选取本科室在 2015 年 1 月至 2017 年 2 月期间收治的 86 例均接受 TACE 治疗的乙肝表面抗原阳性肝癌患者。根据术后是否应用核苷(酸)类似物抗病毒治疗,分为实验组( $n=53$ )和对照组( $n=33$ ),比较两组患者的近期疗效、1 年内肝癌复发率、免疫功能、及肝功能。结果 实验组患者近期疗效优于对照组(79.8% vs 54.5%,  $P=0.025$ ),且 1 年复发率更低(43.4% vs 60.6%,  $P=0.001$ );实验组患者 CD3<sup>+</sup>、NK、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>较对照组增高明显( $P < 0.05$ );实验组患者的肝功能改善情况优于对照组( $P < 0.05$ )。结论 接受 TACE 治疗的乙肝病毒相关性肝癌患者术后进行抗病毒治疗,可以改善患者预后,提高患者免疫能力,改善肝功能。

**[关键词]** 乙肝病毒;肝癌;疗效;免疫功能

### The clinical effect and immune function of anti HBV on recurrence and metastasis of liver cancer after transarterial chemoembolization

CHEN Ming<sup>1\*</sup>, CAO Yang<sup>2</sup>

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, The First Clinical Medical College, Guangzhou, Guangdong, China, 510405; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Tumor Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510405)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the clinical effects and immune function of antiviral therapy in patients with hepatitis B virus-related liver cancer receiving transarterial chemoembolization (TACE). Methods 86 patients with HBsAg positive liver cancer treated in our department from January 2015 to February 2017 were selected and all patients were treated with TACE. According to the application of nucleoside (acid) analogues in antiviral treatment, they were divided into experimental group ( $n=53$ ) and control group ( $n=33$ ). The short-term efficacy, recurrence rate, immune function and liver function in 1 years were compared between the two groups. Results The short-term efficacy of the experimental group was better than that of the control group (79.8% vs 54.5%,  $P=0.025$ ), and the 1-year recurrence rate was lower (43.4% vs 60.6%,  $P=0.001$ ); the experimental group patients CD3<sup>+</sup>, NK, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was significantly higher than the control group ( $P < 0.05$ ). The improvement of liver function in the experimental group was better than that in the control group ( $P < 0.05$ ). Conclusion Anti-viral treatment of patients with hepatitis B virus-related liver cancer receiving TACE can improve the prognosis, improve the patient's immunity and improve liver function.

**[KEY WORDS]** Hepatitis B virus; Liver cancer; Curative effect; Immune function

基金项目:广东省中医药管理局科研基金(No.20191106)

作者单位:1. 广州中医药大学第一临床医学院,广东,广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院肿瘤中心,广东,广州 510405

\*通信作者:陈明, E-mail: onco321@163.com

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是世界上最常见的癌症之一,其病死率位于恶性肿瘤导致死亡的前三位。目前肝细胞癌的治疗方法主要有2种:针对早期患者主要是行肝切除术;对于一些有肝切除术禁忌症的患者,经导管肝动脉化疗栓塞(Transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是一种重要的治疗方法,能明显提高患者的生存率。在我国,乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染在原发性肝癌的病因中起着重要的作用,约90%的HCC患者伴有乙肝病毒感染病史<sup>[1]</sup>。研究发现,在HBV引起的终末期肝病中,HBV复制水平与肝功能具有相关性<sup>[2]</sup>。因此,肝癌的治疗也可能影响HBV的复制,从而影响肝功能。治疗HCC的同时,积极抗HBV治疗对于改善肝癌患者的预后具有重要意义<sup>[3]</sup>。但对于经TACE治疗的HCC患者术后HBV是否存在再激活的报道目前还未统一<sup>[4]</sup>。若术后再次激活可能会促使用乙肝病毒感染爆发,增加肝癌患者复发风险。有研究认为行TECA治疗的术后患者常规

进抗病毒治疗能减少肝癌复发风险,对于HBV相关性肝癌预后具有一定价值<sup>[5]</sup>。因此,本研究通过分析抗病毒治疗对于行TECA治疗的HBV相关性肝癌患者临床影响,旨在找到抗病毒治疗在肝癌治疗中的临床价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院在2015年1月至2017年2月期间收治的86例经乙型肝炎病毒核酸定量检测(试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供)确认均为乙肝携带者的肝癌患者。所有患者均并接受TACE治疗。根据术后是否应用核苷(酸)类似物抗病毒治疗,分为实验组( $n=53$ )和对照组( $n=33$ )。两组患者在性别构成比、年龄、谷氨酸转氨酶 谷草转氨酶 谷氨酰转肽酶等临床资料上差异无统计学意义( $P>0.05$ )。此次实验分组合理有效,具有可比性,见表1。本次实验经医院伦理委员会批准,患者及家属均签署知情同意书。

表1 2组患者的一般临床资料比较

Table 1 Comparison of general clinical data between the 2 groups of patients

项目	性别 (男/女)	年龄 (岁)	ALT(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	Child-Pugh 评分	HBV-DNA (log10copies/mL)
实验组	44/9	55.72±8.68	83.34±53.82	124.22±61.45	185.81±118.91	7.32±2.11	5.30±2.14
对照组	28/4	56.42±7.92	81.53±55.25	124.28±58.95	187.77±124.38	7.45±2.32	5.27±2.33
P值	0.663	0.782	0.729	0.968	0.892	0.945	0.911

#### 1.1.1 入组标准

①病理活检确诊为原发性肝癌;②HBsAg阳性;③肝功能(Child-Pugh分级A或B);④肾功能良好(血清肌酐 $>124$  mol/L)。

#### 1.1.2 排除标准

①HBsAg阴性患者;②与其他嗜肝病毒共感染,或人类免疫缺陷病毒(HIV);③并发梗阻性黄疸或肝性脑病;④合并其他恶性肿瘤;⑤依从性较差或患有精神类疾病的患者。

### 1.2 方法

所有患者均采用Seldinger法穿刺股动脉,在腹沟股下方用穿刺针行股动脉穿刺,在X线透视及DSA造影下将导管置放于靶血管处,成功后先进行诊断性肝动脉造影,明确肿瘤的位置、大小、数目及供血情况,再以导丝导管法选择性插管至

肿瘤的供血动脉;采用“夹心面包”方式给药。先以化疗药-碘油乳剂栓塞肿瘤末梢血管,继而注入大量的化疗药物[EPI(阿霉素)+DDP(顺铂)+5-氟尿嘧啶(5-FU)],最后以明胶海绵栓塞肿瘤供血动脉的近端。术后给与消肿止痛、保肝等常规对症治疗,TACE治疗间隔时间6~8周。实验组在TACE术后立即服用恩替卡韦分散片(江西青峰药业有限公司,国药准字H20100141),空腹服用,每天一次,每次0.5 mg(一片),服用8周。

### 1.3 评价指标

①治疗4周后,比较两组患者的近期疗效,按WHO发布的实体瘤评价标准<sup>[6]</sup>:将肿瘤治疗效果分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、病变稳定(SD)、病变进展(PD)。客观缓解率(ORR)=(CR例数+PR例数+SD例数)/总例数 $\times 100\%$ 。随访1

年,统计复发率。②抽取患者术前、治疗后1周、4周的空腹静脉血液,应用流式细胞仪检测两组患者的免疫功能(CD3<sup>+</sup>、NK、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>),并进行比较。③比较2组患者术前、治疗后1周HBV DNA表达量及HBsAg值,采用实时荧光定量PCR技术进行HBV DNA定量的检测,HBV DNA表达量>1.0×10<sup>3</sup> copies/mL为表达阳性,以化学发光免疫法测定HBsAg,HBsAg阳性定义为OD值/阴性OD>2。④比较2组患者术前、治疗后4周的肝功能(ALT、AST、r-GT)检测,采用奥林巴斯Au2700全自动生化分析仪(OLYMPUS,日本)检测ALT、AST、r-GT。

### 1.4 统计学方法

本实验所得数据采用SPSS21.0进行统计学分析,计数资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用t检验;计量资料采用率(%),采用 $\chi^2$ 检验表示。 $P < 0.05$ ,为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2组患者术后近期疗效情况

实验组患者客观缓解率为79.8%(37/53),对

照组患者客观缓解率为54.5%(18/33),两组数据比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),术后随访1年,实验组患者的复发率为43.4%,对照组复发率60.6%,2组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 2组患者近期疗效比较[n(%)]

组别	n	CR	PR	SD	PD	ORR	复发率
实验组	53	7(13.2)	11(20.8)	19(35.8)	16(30.2)	79.8	23(43.4)
对照组	33	2(6.1)	4(12.1)	12(36.3)	15(45.5)	54.5	20(60.6)
$\chi^2$ 值	-					6.352	15.364
P值	-					0.025	0.001

### 2.2 2组患者免疫功能情况

治疗前,2组患者CD3<sup>+</sup>、NK、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗后,实验组患者上述指标显著增高( $P < 0.05$ ),而对照组患者上述指标未见明显变化,2组患者比较具有差异,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3。

表3 2组患者免疫功能比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of immune function between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> (%)			NK(%)			CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		
	治疗前	治疗后1周	治疗后4周	治疗前	治疗后1周	治疗后4周	治疗前	治疗后1周	治疗后4周
实验组	58.99±11.38	63.18±8.35 <sup>ac</sup>	64.68±9.04 <sup>bc</sup>	17.28±4.39	20.11±4.31 <sup>ac</sup>	22.01±4.46 <sup>bc</sup>	1.52±0.55	1.89±0.58 <sup>ac</sup>	1.96±0.61 <sup>bc</sup>
对照组	58.29±10.95	59.78±10.38	58.18±11.25	16.92±5.03	17.02±4.27	17.84±4.41	1.56±0.51	1.57±0.49	1.56±0.58
t值	1.886	6.965	5.487	1.468	7.154	7.345	2.128	5.472	6.264

组内比较,较治前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,较治疗后1周比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;组间比较,较对照组时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 2组患者乙肝标志物情况

治疗前,2组患者的HBV DNA及HBsAg阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗1周后,实验组患者的二者乙肝标志物阳性率均显著下降( $P < 0.05$ ),而对照组患者二者乙肝标志物阳性率明显上升( $P < 0.05$ ),见表4。

### 2.4 2组患者肝功能情况

2组患者在治疗前ALT、AST、GGT水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),治疗4周后,2组患者上述指标均有所下降,而实验组下降的更加明显( $P < 0.05$ ),见表5。

表4 2组患者乙肝标志物阳性率比较[n,(%)]

Table 4 Comparison of positive rates of hepatitis B markers in the 2 groups [n, (%)]

组别	HBV DNA(+)		HBsAg(+)	
	治疗前	治疗后4周	治疗前	治疗后1周
实验组	34(64.2%)	13(24.5%) <sup>a</sup>	21(31.6%)	9(17.0%) <sup>a</sup>
对照组	20(60.6%)	24(72.7%)	13(39.4%)	19(57.6%)
t值	0.976	9.986	1.012	7.115

较对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

表5 2组患者肝功能比较  $[(\bar{x} \pm s), \text{U/L}]$   
Table 5 Comparison of liver function between the 2 groups  $[(\bar{x} \pm s), \text{U/L}]$

组别	ALT		AST		GGT	
	治疗前	治疗后4周	治疗前	治疗后4周	治疗前	治疗后4周
实验组	83.34±53.82	42.03±26.35 <sup>a</sup>	124.22±61.45	52.03±20.35 <sup>a</sup>	185.81±118.91	102.03±40.25 <sup>a</sup>
对照组	81.53±55.25	65.21±50.20	124.28±58.95	73.21±30.02	187.77±124.38	110.12±95.02
<i>t</i> 值	1.065	4.529	1.048	7.021	0.116	6.127

较对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在我国慢乙肝是诱发肝癌主要的原因之一, 血清 HBV DNA 水平不仅是衡量乙肝病毒活动的主要生物指标之一, 同时也被认为是引起肝功能异常、肝脏损害、疾病进展以及肝癌发生的重要因素之一<sup>[7-9]</sup>。目前有报道, HBV 相关性 HCC 患者属在肝切除治疗后未进行抗病毒治疗时, 可以刺激 HBV 复制的潜力, 引起 HBV 的再激活<sup>[9]</sup>。然而, 对 TACE 术后对于治疗是否能够使 HBV 再激活、是否术后进行抗病毒治疗, 目前争议不断<sup>[10]</sup>。

HBV 复制是一种集病毒、肝细胞和宿主免疫系统三者之间相互作用的过程<sup>[11-12]</sup>, 机体免疫系统在清除病毒的同时, 也会对肝细胞形成损伤, 其原因主要是由于 HBV 在复制过程中会在肝细胞表面形成一种 HBV 标志物, 机体会对感染的肝细胞产生靶向攻击。人体的淋巴细胞亚群主要是 CD3<sup>+</sup>、NK、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>, 在机体的免疫系统中起着重要的作用, 其中 CD3<sup>+</sup> 能够反应病毒复制能力, CD4<sup>+</sup> 能够反应免疫应答水平, CD8<sup>+</sup> 能够反应免疫应答程度, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 下降, 意味着免疫能力受损, NK 是重要免疫细胞之一, 其表达水平反应抗肿瘤效果、抗病毒及免疫调节能力。本研究结果显示, 抗病毒 TACE 术后患者抗病毒治疗, 实验组患者体内的 CD3<sup>+</sup>、NK、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例显著增高, 提高了机体的免疫能力。黄春红等人认为抗病毒治疗不仅可以抑制病毒复制且具有免疫重建作用<sup>[12]</sup>。这与本研究结论一致。另外, 2 组患者的术后的 HBV 标志物的阳性率具有差异性, 实验组的 HBV DNA (+) 及 HBsAg (+) 比例较对照组显著降低。值得注意的是, 对照组患者的数据表明, TACE 术后的患者能使 HNV 病毒被激活。笔者认为其原因是化疗药物能够对正常免疫细胞造成一定负面

影响, 加之化疗副反应, 导致机体免疫功能持续下降, 增加了 HBV 再激活的发生机率<sup>[13]</sup>。可见免疫力的重建对于 TACE 术后 HBV 相关性肝癌患者意义重大, 而抗病毒治疗兼顾了免疫重建与抑制病毒复制的作用。

本次研究采用的抗病毒治疗药物是恩替卡韦, 是核苷类似物代表药物, 目前已被广泛运用于临床当中<sup>[14]</sup>, 我们的实验结果也证实其抗病毒的能力。本研究结果显示, 2 组患者在术后的 1 个月后, 其肝功能差异显著 ( $P < 0.05$ ), 尽管两组患者的 ALT、AST、GGT 水平较术前均有所下降, 表明肝功能均改善, 但实验组的肝功能改善的更加明显。因此, 抗病毒治疗可以有效地稳定肝脏的功能。另外, 抗病毒与 TACE 术后肿瘤治疗的疗效关系比较, 其结果显示, 实验组的近期疗效的客观缓解率优于对照组 (79.8% vs 54.5%,  $P = 0.025$ ), 在对所有患者术后随访 1 年, 比价 2 组患者的肿瘤复发率, 其结果亦显示实验组患者复发率较对照组明显降低 (43.4% vs 60.6%,  $P = 0.001$ )。目前对于 HBV 感染与肝癌之间的相互影响机制目前仍不清楚, 而循证医学表明长期的抗病毒治疗可以降低肝癌的发生率及死亡率, 提高患者的预后<sup>[15]</sup>。本研究也间接的证实了此观点。

综上所述, 接受 TACE 治疗的 HBV 相关性 HCC 患者, 预后进行抗 HBV 治疗是必要的, 在抑制 HBV 复制的同时, 可以提高患者术后的疗效。

### 参考文献

- [1] Lin H, Van d E J, Liu C, et al. Systematic review of hepatocellular adenoma in China and other regions [J]. J GASTROEN HEPATOL, 2011, 26(1):28-35.
- [2] Lao X M, Luo G, Ye L T, et al. Effects of antiviral therapy on hepatitis B virus reactivation and liver func-

- tion after resection or chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. *Liver International*, 2013, 33(4): 595-604.
- [3] Wong GL. How does hepatitis B virus infection react to hepatocellular carcinoma treatment [J]. *J GASTROEN HEPATOL*, 2012, 27(1):1-2.
- [4] Lao X M, Wang D, Shi M, et al. Changes in hepatitis B virus DNA levels and liver function after transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma[J]. *HEPATOL RES*, 2011, 41(6):553-563.
- [5] 林福煌, 林碧泉, 吴宁, 等. 抗乙肝病毒对肝癌TACE术后复发转移的治疗效果与免疫功能影响的研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(14):3196-3199.
- [6] Yenge LB, Behera D, Garg M, et al. Comparison of Symptom Score and Bronchoscopy -Based Assessment With Conventional Computed Tomography -Based Assessment of Response to Chemotherapy in Lung Cancer [J]. *INT J ONCOL*, 2017, 3(4):370-379.
- [7] 孙珍, 赵志军, 师志云, 等. 宁夏地区乙肝病毒感染患者HBV基因分型与临床意义[J]. *宁夏医科大学学报*, 2014, 36(1):34-37.
- [8] Gong W F, Zhong J H, Lu S D, et al. Effects of antiviral therapy on post-hepatectomy HBV reactivation and liver function in HBV DNA - negative patients with HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9):15047-15056.
- [9] 周诚, 黄维金, 吴星, 等. 乙型肝炎病毒核酸载量与血清学标志物相关性的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2009, 1(2):87-90.
- [10] Huang L, Li J, Lau W Y, et al. Perioperative reactivation of hepatitis B virus replication in patients undergoing partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma [J]. *J GASTROEN HEPATOL*, 2012, 27(1): 158-164.
- [11] Lin X J, Lao X M, Shi M, et al. Changes of HBV DNA After Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma and the Efficacy of Antiviral Treatment [J]. *DIGEST DIS SCI*, 2016, 61(9):1-12.
- [12] Guo F, Tang L, Shu S, et al. Activation of Stimulator of Interferon Genes in Hepatocytes Suppresses the Replication of Hepatitis B Virus [J]. *ANTIMICROB AGENTS CH*, 2017, 61(10).
- [13] 欧阳文婷, 曾智杰, 孙艳虹. HBV前S1抗原与HBV-DNA、HBV-M的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2009, 1(1):20-22.
- [14] Dusséaux M, Masse-Ranson G, Darche S, et al. Viral load affects the immune response to HBV in mice with humanized immune system and liver [J]. *Gastroenterology*, 2017(6):1647-1661.
- [15] K. Rajender Reddy, Kimberly L. Beavers, Sarah P. Hammond, et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Prevention and Treatment of Hepatitis B Virus Reactivation During Immunosuppressive Drug Therapy [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1):221-244.
- [16] Li X, Zhong X, Chen Z H, et al. Efficacy of prophylactic entecavir for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma receiving transcatheter arterial chemoembolization [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(18): 8665-8670.
- [17] Brown R S, McMahon B J, Lok A S F, et al. Antiviral therapy in chronic hepatitis B viral infection during pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 319-333.

(上接第386页)

- [9] 邱方, 陈子祥, 杨清玉. 不同方法提取血清总RNA的性能评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(4): 457-458.
- [10] 孙宏. 慢性丙型肝炎患者HCV核心抗原和HCV RNA检测价值研究[J]. *检验医学与临床*, 2018(4): 556-558.
- [11] 卓宏, 王涛, 谢松梅, 等. 慢性丙型肝炎及其抗病毒治疗进展[J]. *中国新药杂志*, 2015(19):2209-2213.
- [12] 刘国凤, 赵权, 张立营, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原ELISA检测在丙型肝炎病毒感染诊断中的价值[J]. *肝脏*, 2018, v.23(05):91-92.
- [13] 麻安喆. 酶联免疫法和胶体金法对比检测病毒性丙型肝炎[J]. *检验医学与临床*, 2014(7):953-953.
- [14] 梁梦婷. 丙型肝炎病毒抗体检测中酶联免疫和胶体金法的应用效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2018, v.3(14):139-140.
- [15] 谷金莲, 于洋, 梁争论. 四种丙型肝炎病毒抗体试剂检测方法的性能评估[J]. *微生物学免疫学进展*, 2016, 44(4):21-25.

## miR-3182 调控肝癌细胞凋亡和放射敏感性机制研究

于凤芹<sup>1\*</sup> 徐云芳<sup>2</sup> 张青<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 探讨微小RNA-3182(miR-3182)在肝癌细胞凋亡和放射敏感性中的作用及机制。方法 实时荧光定量PCR与Western blot检测肝癌细胞系及正常肝细胞中miR-3182、FAM83A的表达;miR-3182 mimics与si-FAM83A分别转染入肝癌MHCC97H细胞,采用平板克隆形成实验检测miR-3182与FAM83A对肝癌细胞放射敏感性的影响;流式细胞术检测细胞凋亡率;Western blot法检测Bcl-2、Bax的表达;生物信息学预测miR-3182下游调控的靶基因,双荧光素酶报告基因实验、Western blot法进一步验证。结果 miR-3182在肝癌细胞系中表达下调,而FAM83A表达上调;miR-3182过表达或抑制FAM83A表达后细胞放射敏感性增强,Bcl-2表达下调,Bax表达上调;miR-3182可靶向结合FAM83A,并可负性调控FAM83A表达;FAM83A过表达能够逆转miR-3182过表达对肝癌细胞凋亡及放射敏感性的作用。结论 miR-3182过表达可通过靶向调控FAM83A的表达促进肝癌细胞凋亡、抑制其存活从而提高肝癌细胞的放射敏感性。

**[关键词]** 肝癌; miR-3182; FAM83A; 凋亡; 放射敏感性

### miR-3182 promotes the apoptosis of hepato-carcinoma cells and enhance the radio-sensitivity of liver cancer cells

YU Fengqin<sup>1\*</sup>, XU Yunfang<sup>2</sup>, ZHANG Qing<sup>3</sup>

(1. Department of oncology, huai'an fourth people's hospital, Huai'an, Jiangsu, China, 223002; 2. Inspection department of the fourth people's hospital Huai'an, Jiangsu, China, 223002; 3. Xuzhou medical university, Xuzhou, Jiangsu, China, 22100)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the role and mechanism of microRNA-3182 (miR-3182) in apoptosis and radiosensitivity of hepatoma cells. **Methods** Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of miR-3182 and FAM83A in hepatocellular carcinoma cell lines and normal hepatocytes. miR-3182 mimics and si-FAM83A were transfected into liver cancer MHCC97H cells, respectively. The effect of miR-3182 and FAM83A on the radiosensitivity of hepatoma cells was detected by plate colony formation assay. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. The expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blot. The target gene regulated by miR-3182 was predicted by bioinformatics. Double luciferase reporter gene assay and Western blot method were further verified. **Results** The expression of miR-3182 was down-regulated in hepatoma cell lines, while the expression of FAM83A was up-regulated. After overexpression of miR-3182 or inhibition of FAM83A expression, the radiosensitivity of cells increased, Bcl-2 expression was down-regulated, Bax expression was up-regulated, and miR-3182 was targeted. FAM83A, and miR-3182 can target FAM83A and negatively regulate FAM83A expression. Over expression of FAM83A reversed the effect of miR-3182 over expression on apoptosis and radio-sensitivity of hepatoma cells. **Conclusion** Over expression of miR-3182 can promote the apoptosis of hepato-carcinoma cells and inhibit the survival of hepatoma cells by targeting the regulation of FAM83A

基金项目:江苏省淮安市科学技术局(HAS201614)

作者单位:1. 江苏省淮安市第四人民医院肿瘤科,江苏,淮安市 223002

2. 江苏省淮安市第四人民医院检验科,江苏,淮安市 223002

3. 徐州医科大学,江苏,徐州 22100

\*通信作者:于凤芹, E-mail:fish02209@163.com

expression, thereby increasing the radio-sensitivity of liver cancer cells.

[KEY WORDS] Liver cancer; miR-3182; FAM83A; apoptosis; radio-sensitivity

肝癌是一种发病率较高的恶性肿瘤,我国肝癌发病率及死亡率逐年升高,目前临床主要采用手术切除治疗肝癌,但患者术后5年生存期缩短且复发率升高<sup>[1-2]</sup>。由于部分患者出现放射抵抗性且患者就诊时已错失最佳治疗时机导致治疗效果不佳,因而增强肝癌患者放射敏感性具有重要意义。微小RNA(microRNA, miRNA)在多种恶性肿瘤中异常表达,并可能发挥癌基因或抑癌基因作用,研究表明 miRNA 异常表达与肝癌放射抵抗有关,但仍有部分 miRNA 与肝癌放射抵抗的关系尚未完全阐明<sup>[3]</sup>。研究表明微小 RNA-3182(miRNA-3182, miR-3182)在肺癌细胞中表达下调,过表达 miR-3182 可显著抑制肺癌细胞增殖及侵袭<sup>[4]</sup>。miR-3182 在骨肉瘤组织及细胞中低表达, lncRNA ODURL 可通过抑制 miR-3182 的表达而促进骨肉瘤的发展<sup>[5]</sup>。但 miR-3182 在肝癌中的表达及其相关研究尚未见报道。序列相似性家族 83 成员 A (family with sequence similarity 83, member A, FAM83A) 在乳腺癌患者外周血中的表达水平明显升高,且与临床分期、淋巴结转移密切相关<sup>[6]</sup>。乳腺癌组织中 FAM83A mRNA 的表达升高,其高表达与临床分期较晚及乳腺癌预后不良有关<sup>[7]</sup>。研究表明沉默 FAM83A 可增强胰腺癌细胞对化疗药物吉西他滨及放射敏感性<sup>[8]</sup>。starBase 预测显示 FAM83A 可能是 miR-3182 的靶基因,但需进行进一步实验验证, miR-3182 和 FAM83A 在肝癌细胞中的表达及其对肝癌细胞凋亡和放射敏感性的影响尚未可知。因此,本研究主要探讨 miR-3182 对肝癌细胞凋亡及放射敏感性的影响,并分析 FAM83A 是否为 miR-3182 增强肝癌细胞放射敏感性的功能性靶基因,为 miR-3182 在肝癌细胞放射增敏作用中的分子机制提供新方向,为 miR-3182 用于肝癌治疗奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与主要试剂

肝癌细胞株 MHCC97H、Huh7、MHCCLM3 与正常肝细胞株 THLE-2 均购自美国 ATCC 细胞库。RPMI 1640 培养基与胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂与 Lipofectamine2000 re-

agent 均购自美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司;兔抗人 FAM83A、Bcl-2、Bax 抗体均购自美国 Abcam 公司;细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒及其基因表达质粒均购自美国 Promega 公司; miR-3182 mimics 及阴性对照 miR-NC、FAM83A-siRNA 及阴性对照 si-NC 均购自广州锐博生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞转染及分组

细胞培养:取冻存肝癌 MHCC97H 细胞,解冻, 1 000 r/min 转速离心 5 min,弃上清,加入 2 mL RPMI 1640 培养基重悬细胞, PBS 洗涤 3 次×5 min,每 24 h 更换一次培养液,放入 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。细胞转染:取对数生长期 MHCC97H 细胞接种于 96 孔板(1×10<sup>5</sup>个/孔),放入 37℃ 细胞培养箱内培养 4 h,待细胞生长融合度达到 60%-70% 时进行转染, miR-3182 mimics 与 miR-NC 分别转染至 MHCC97H 细胞,分别为 miR-3182 组、miR-NC 组;将 FAM83A siRNA、siRNA-NC 分别转入 MHCC97H 细胞,分别为 si-FAM83A 组、si-NC 组。为验证 FAM83A 是否为 miR-3182 功能性靶基因,将 miR-3182 mimics 分别与 FAM83A 过表达质粒、空质粒共转染入 MHCC97H 细胞,分别为 miR-3182+pcDNA-FAM83A 组、miR-3182+pcDNA 组,转染 48 h 后收集细胞用于后续实验。

#### 1.2.2 qRT-PCR 检测 miR-3182、FAM83A mRNA 表达

取出冻存细胞及转染后各组 MHCC97H 细胞,冰上溶解,加入 1 mL Trizol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度,参照反转录试剂盒合成 cDNA,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒配置 qRT-PCR 反应体系, miR-3182 以 U6 为内参, FAM83A 以 GAPDH 为内参,检测细胞中 miR-3182、FAM83A mRNA 的相对表达量,严格按照试剂盒说明书进行操作, qRT-PCR 反应条件: 95℃ 3 min 循环 1 次, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共循环 40 次。应用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应,反应结束后收集数据,

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-3182、FAM83A mRNA 的表达水平。

### 1.2.3 双荧光素酶报告基因实验

将含有 miR-3182 结合位点的 FAM83A 3'UTR 序列及其突变体插入荧光素酶报告基因载体中, 分别得到 WT-FAM83A、MUT-FAM83A, 分别将质粒与 miR-3182 mimics、miR-NC 共转染至肝癌 MHCC97H 细胞, 转染后继续培养 48 h, 参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测各组细胞相对荧光素酶活性。

### 1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

分别收集对数生长期 MHCC97H 细胞, 胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞接种于 6 孔板, PBS 洗涤细胞, 每孔分别加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC、5  $\mu$ L PI, 充分混匀, 室温孵育 10 min, 于 1 h 内放入流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 1.2.5 克隆形成实验

设定 0、2、4、6、8 Gy 剂量组, 将细胞培养板置于直线加速器, 按照设定剂量组照射细胞(源靶距 100 cm, 照射野 10 cm $\times$ 10 cm, 吸收剂量率 300 cGy/min), 收集肝癌 MHCC97H 细胞, 胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞接种于 24 孔板( $3\times 10^4$  个/mL), 加入 RPMI 1640 培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  饱和湿度培养箱内培养 10~15 d, PBS 洗涤, 细胞呈肉眼可见克隆时终止培养, 计算克隆形成率(PE)及存活分数(SF), PE=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%, SF=(照射组细胞 PE/对照组细胞 PE) $\times$ 100%, 应用 GraphPad Prism7.0 软件采用多靶单击模型进行曲线拟合。

### 1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 FAM83A、Bcl-2、Bax 蛋白表达

取对数生长期各组细胞, 加入 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法定量蛋白, 每孔 30  $\mu$ g 蛋白样品进行上样, SDS-PAGE 电泳反应分离蛋白, 转膜、封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次 $\times$ 5 min, 按照 1:1 000 稀释比稀释一抗, 加入 FAM83A、Bcl-2、Bax 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, TBST 洗涤 3 次 $\times$ 5 min, 孵育二抗(稀释比 1:2 000), 滴加 ECL 显影, 放入成像系统分析蛋白条带灰度值。

### 1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 21.0 进行分析, 计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-3182 和 FAM83A 在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达

与正常肝细胞株 THLE-2 相比, miR-3182 在肝癌细胞株 MHCC97H、Huh7、MHCCLM3 中的表达水平下调( $P<0.05$ ), 其中 miR-3182 在肝癌 MHCC97H 细胞中的表达水平较其他类型肝癌细胞相对降低, 而 FAM83A mRNA 及蛋白的表达水平显著升高( $P<0.05$ ), 见图 1、表 1。

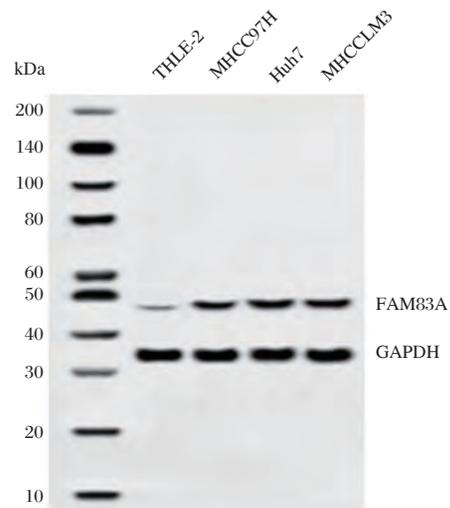


图 1 FAM83A 蛋白表达

Figure 1 Expression of FAM83A protein

表 1 miR-3182 和 FAM83A 在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达 ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 1 Expression of miR-3182 and FAM83A in hepatoma cells and normal hepatocytes ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

分组	miR-3182	FAM83A mRNA	FAM83A protein
THLE-2	1.03 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.02
MHCC97H	0.29 $\pm$ 0.03*	2.76 $\pm$ 0.28*	0.63 $\pm$ 0.06*
Huh7	0.42 $\pm$ 0.04*	3.11 $\pm$ 0.29*	0.75 $\pm$ 0.07*
MHCCLM3	0.35 $\pm$ 0.03*	2.86 $\pm$ 0.27*	0.69 $\pm$ 0.06*
F 值	367.174	136.632	172.800
P 值	0.000	0.000	0.000

与 THLE-2 组比较, \* $P<0.05$

### 2.2 miR-3182 靶向调控 FAM83A 的表达

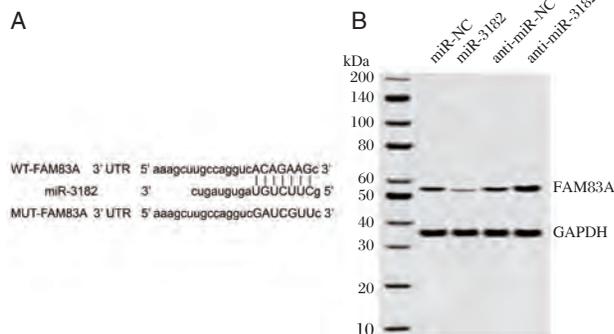
starBase 生物信息学预测发现 miR-3182 与 FAM83A 的 3'UTR 区存在结合位点, 见图 2A。双荧光素酶报告系统基因检测结果显示共转染 FAM83A 的 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体与

miR-3182 mimics 的细胞中, 荧光素酶活性显著下调 ( $P < 0.05$ ); 而 miR-3182 mimics 或 miR-NC 与 MUT-FAM83A 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体共转染肝癌 MHCC97H 细胞时, 荧光素酶活性无明显改变 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。表明 miR-3182 在肝癌细胞中通过靶向作用于 3'UTR 区负向调节 FAM83A 基因的表达。Western blot 实验结果显示, 在肝癌 MHCC97H 细胞中过表达 miR-3182, FAM83A 表达水平下降 ( $P < 0.05$ ); 抑制 miR-3182 表达, FAM83A 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B、表 3。表明 miR-3182 可靶向抑制 FAM83A 的表达。

表 2 双荧光素酶报告实验 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )  
Table 2 Dual luciferase reporter experiment ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

分组	WT-FAM83A	MUT-FAM83A
miR-NC	1.02±0.09	1.04±0.08
miR-3182	0.38±0.04*	1.03±0.09
<i>t</i> 值	19.495	0.249
<i>P</i> 值	0.000	0.806

与 miR-NC 组比较, \* $P < 0.05$



A: FAM83A 的 3'UTR 中含有与 miR-3182 互补的核苷酸序列;  
B: FAM83A 蛋白表达  
A: The 3'UTR of FAM83A contains a nucleotide sequence complementary to miR-3182; B: the expression of FAM83A protein

图 2 miR-3182 靶向调控 FAM83A 的表达  
Figure 2 miR-3182 targets the regulation of FAM83A expression

### 2.3 miR-3182 过表达对肝癌 MHCC97H 细胞的凋亡和放射敏感性的影响

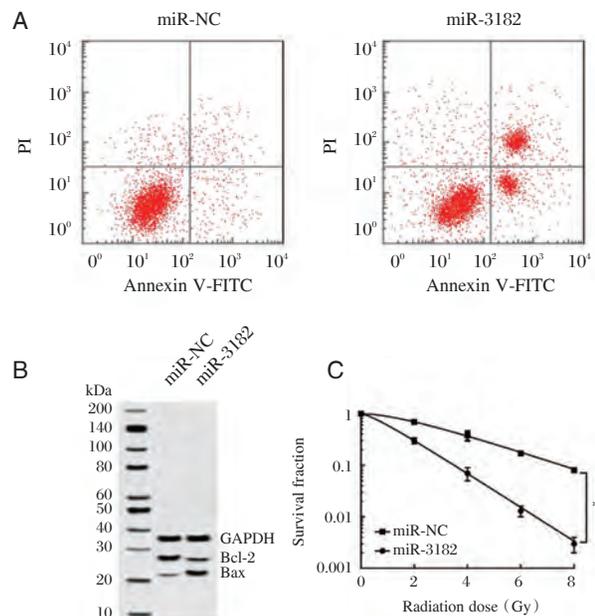
qRT-PCR 实验检测肝癌 MHCC97H 细胞中转染 miR-3182 mimics 的转染效果, 结果显示, miR-3182 组细胞中 miR-3182 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 表明成功提高肝癌 MHCC97H 细胞中 miR-3182 的表达水平。细胞放射及平板克隆实验结果显示, 肝癌细胞中过表达 miR-3182 后, 与

表 3 miR-3182 调控 FAM83A 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )  
Table 3 miR-3182 regulates the expression of FAM83A protein ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

分组	FAM83A protein
miR-NC	0.63±0.06
miR-3182	0.25±0.03*
anti-miR-NC	0.61±0.06
anti-miR-3182	1.02±0.09#
<i>F</i> 值	219.907
<i>P</i> 值	0.000

与 miR-NC 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 anti-miR-NC 组比较, # $P < 0.05$

miR-NC 组相比, 细胞存活分数显著减少 ( $P < 0.05$ ) 见图 3C; 流式细胞术检测结果显示与 miR-NC 组相比, miR-3182 组细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ ) 见图 3A, 提示 miR-3182 可增强肝癌细胞放射敏感性。Western blot 实验结果显示, 在肝癌细胞中过表达 miR-3182 后, 与 miR-NC 组相比, Bcl-2 表达下降 ( $P < 0.05$ ), Bax 表达升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B、表 4。表明过表达 miR-3182 可增强肝癌细胞放射敏感性。



A: 细胞凋亡流式图; B: 凋亡相关蛋白表达; C: 不同剂量照射后 MHCC97H 细胞的存活曲线

图 3 miR-3182 过表达对肝癌 MHCC97H 细胞的凋亡和放射敏感性的影响

Figure 3 Effect of miR-3182 overexpression on apoptosis and radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H

表4 miR-3182过表达对肝癌MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

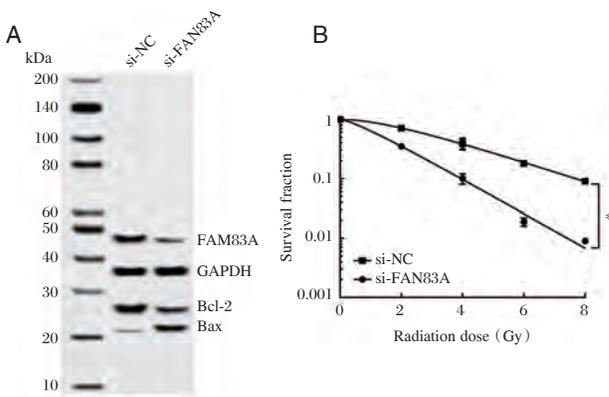
Table 4 Effect of miR-3182 overexpression on apoptosis and radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

分组	miR-3182	Apoptosis rate (%)	Bcl-2 protein	Bax protein	D <sub>0</sub> (Gy)	D <sub>q</sub> (Gy)	N	SF <sub>2</sub>	k	SER
miR-NC	1.00±0.08	7.35±0.71	0.75±0.07	0.28±0.03	2.564	1.699	1.940	0.696	0.390	-
miR-3182	2.67±0.28*	21.65±2.08*	0.32±0.03*	0.62±0.06*	1.322	0.477	1.434	0.300	0.756	1.939
t值	17.204	19.519	16.939	15.205						
P值	0.000	0.000	0.000	0.000						

与miR-NC组比较, \*P<0.05

2.4 抑制FAM83A表达对肝癌MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的影响

肝癌MHCC97H细胞中抑制FAM83A表达后,与si-NC组相比,细胞凋亡率显著升高(P<0.05),细胞存活分数显著下降(P<0.05),Bax表达上调(P<0.05),而Bcl-2表达下调(P<0.05),见图4、表5。



A: FAM83A和凋亡相关蛋白表达; B: 不同剂量照射后MHCC97H细胞的存活曲线

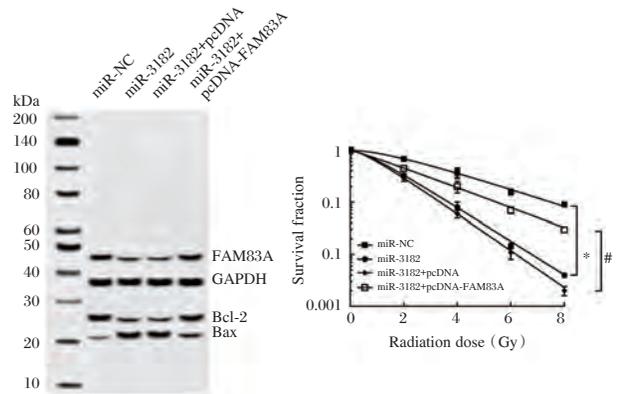
图4 抑制FAM83A表达对肝癌MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的影响

Figure 4 Effect of inhibition of FAM83A expression on apoptosis and radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H

2.5 FAM83A过表达逆转了miR-3182过表达对MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的作用

为明确FAM83A是否为miR-3182的功能性靶基因,通过在过表达miR-3182肝癌MHCC97H细胞中转染FAM83A过表达质粒,探讨FAM83A能否逆转由miR-3182过表达对细胞放射敏感性的作用,结果显示,过表达的肝癌MHCC97H细胞中转染FAM83A后可逆转miR-3182过表达对细胞

放射敏感性的作用,细胞凋亡率显著降低(P<0.05),细胞存活分数显著升高(P<0.05),Bcl-2表达上调(P<0.05),而Bax表达下调(P<0.05),见图5、表6。



A: FAM83A和凋亡相关蛋白表达; B: 不同剂量照射后MHCC97H细胞的存活曲线

图5 FAM83A过表达逆转了miR-3182过表达对MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的作用

Figure 5 FAM83A overexpression reverses the effect of miR-3182 overexpression on apoptosis and radiosensitivity of MHCC97H cells

3 讨论

miR-3182在乳腺癌细胞系中表达下调,其可能通过调控mTOR和S6K1基因表达进而参与乳腺癌发生及发展过程<sup>[9]</sup>。miR-3182表达水平降低还可能作为诊断肺腺癌的重要标志物<sup>[10]</sup>。索拉非尼可能通过调控miR-3182表达进而参与结直肠癌细胞发展进程<sup>[11]</sup>。研究表明miR-3182表达异常与鼻咽癌远处转移密切相关<sup>[12]</sup>。miR-3182在肝癌中的研究尚未见报道,本研究结果显示miR-3182在肝癌细胞中表达水平降低,提示miR-3182表达水平降低与肝癌的发生密切相关。本研究通过上调

表5 抑制FAM83A表达对肝癌MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )Table 5 Effect of inhibition of FAM83A expression on apoptosis and radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97H ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	FAM83A protein	Apoptosis rate(%)	Bcl-2 protein	Bax protein	D <sub>0</sub> (Gy)	D <sub>q</sub> (Gy)	N	SF <sub>2</sub>	k	SER
si-NC	0.65±0.06	6.28±0.63	0.76±0.07	0.26±0.03	2.577	1.817	2.024	0.713	0.388	-
si-FAM83A	0.29±0.03*	18.29±1.36*	0.39±0.03*	0.58±0.05*	1.501	0.515	1.409	0.350	0.666	1.717
t值	16.100	24.039	14.575	16.464						
P值	0.000	0.000	0.000	0.000						

与 si-NC 组比较, \*P<0.05

表6 FAM83A过表达逆转了miR-3182过表达对MHCC97H细胞的凋亡和放射敏感性的作用( $\bar{x} \pm s, n=9$ )Table 6 FAM83A overexpression reverses the effect of miR-3182 overexpression on apoptosis and radiosensitivity of MHCC97H cells ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	FAM83A protein	Apoptosis rate(%)	Bcl-2 protein	Bax protein	D <sub>0</sub> (Gy)	D <sub>q</sub> (Gy)	N	SF <sub>2</sub>	k	SER
miR-NC	0.67±0.06	8.06±0.79	0.74±0.07	0.26±0.03	2.588	1.602	1.857	0.683	0.386	-
miR-3182	0.31±0.03*	20.65±2.17*	0.35±0.03*	0.61±0.06*	1.343	0.605	1.569	0.330	0.745	1.928
miR-3182+pcDNA	0.28±0.03	22.71±2.13	0.33±0.03	0.63±0.03	1.227	0.554	1.571	0.290	0.815	-
miR-3182+pcDNA-FAM83A	0.56±0.05*	12.69±1.36*	0.64±0.06*	0.38±0.03*	2.255	0.286	1.135	0.453	0.443	1.544
F值	165.418	144.010	148.777	185.524						
P值	0.000	0.000	0.000	0.000						

与 miR-NC 组比较, \*P<0.05; 与 miR-3182+pcDNA 组比较, \*P<0.05

miR-3182 表达, 研究结果显示 miR-3182 过表达可明显促进肝癌细胞凋亡, 降低细胞存活分数, 说明 miR-3182 过表达可通过诱导肝癌细胞凋亡从而增强细胞放射敏感性。本研究结果显示 miR-3182 过表达后可促进肝癌细胞中 Bax 的表达, 而抑制 Bcl-2 的表达。研究表明 Bcl-2/Bax 比例升高可抑制细胞凋亡, 其比例降低可促进细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>, 说明 miR-3182 过表达可下调 Bcl-2 的表达及上调 Bax 的表达从而促进肝癌细胞凋亡, 提示 miR-3182 过表达可能通过诱导肝癌细胞凋亡进而增强细胞放射敏感性。

FAM83A 在肺腺癌组织中的表达水平明显升高, 且高表达量与患者预后不良有关<sup>[15]</sup>。研究表明 FAM83A 在乳腺癌、膀胱癌等多种恶性肿瘤中高表达, 并可在肿瘤发生发展过程中发挥癌基因作用<sup>[16]</sup>。FAM83A 可通过激活 EGFR/PI3K/AKT 信号通路进而促使乳腺癌细胞对放疗或化疗产生一定抗性<sup>[17]</sup>。相关研究表明 FAM83A 可能参与食管鳞癌发生及发展过程, 并可能作为肿瘤治疗的

潜在靶点<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, FAM83A 在肝癌细胞中的表达水平明显升高, 提示 FAM83A 表达水平升高可能促进肝癌的发生。本研究进一步研究显示沉默 FAM83A 可促进肝癌细胞凋亡, 增强细胞放射敏感性。提示沉默 FAM83A 可能作为肝癌放射治疗的潜在靶点。通过双荧光素酶报告基因证实 FAM83A 是 miR-3182 的靶基因, 经恢复实验证明 miR-3182 过表达的肝癌细胞系中过表达 FAM83A 可逆转其对肝癌细胞凋亡及放射敏感性的作用, 进一步证明 FAM83A 是 miR-3182 调节肝癌细胞放射敏感性的功能性靶基因。提示 miR-3182 可通过下调靶基因表达进而促进肝癌细胞凋亡及增强细胞放射敏感性。

综上所述, miR-3182 过表达可通过抑制靶基因 FAM83A 表达, 从而调控肝癌细胞放射敏感性, 为 miR-3182 在肝癌放射增敏作用中的机制提供理论依据。但本研究仅在体外探讨 miR-3182 对肝癌细胞放射敏感性的作用, 并未进行体内实验验证, 后续研究将进行深入探讨。

## 参考文献

- [1] 周军, 马萍, 李钧, 等. 重组腺相关病毒介导 HLA-A2 基因转导肝癌细胞增强杀伤性 T 细胞抗肿瘤免疫应答[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(2): 117-121.
- [2] 陆兴热, 陈凤羽, 刘孝文, 等. 肝病患者 AFP、TP、ALB、SOD 检测的临床价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(1):37-40.
- [3] 张余琴, 陈龙华, 丁轶, 等. miR-20a 通过靶向抑制 PTEN 诱导肝癌细胞放射抵抗[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(9):850-854.
- [4] Xue M, Shi D, Xu G, et al. The long noncoding RNA linc00858 promotes progress of lung cancer through miR-3182/MMP2 axis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):2091-2097.
- [5] Zhu KP, Ma XL, Zhang CL. LncRNA ODRUL contributes to osteosarcoma progression through the miR-3182/MMP2 axis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(10):2383-2393.
- [6] 许亚娜, 许倩, 刘镭. 乳腺癌外周血标记物 FAM83A 的检测及临床意义[J]. 河北医学, 2013, 19(10):1446-1450.
- [7] 万俊, 王倩, 赵倩茹, 等. 肺腺癌组织中 FAM83A 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(6):90-92.
- [8] 倪猛, 殷涛, 王旻, 等. FAM83A 对胰腺癌细胞 PANC-1 干细胞样表型和放射敏感性的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2018, 38(9):647-653.
- [9] Razaviyan J, Hadavi R, Tavakoli R, et al. Expression of miRNAs Targeting mTOR and S6K1 Genes of mTOR Signaling Pathway Including miR-96, miR-557, and miR-3182 in Triple-Negative Breast Cancer [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 186(4):1074-1089.
- [10] Ju L, Han M, Li X, et al. MicroRNA Signature of Lung Adenocarcinoma with EGFR Exon 19 Deletion [J]. *J Cancer*, 2017, 8(7):1311-1318.
- [11] Pehserl AM, Ress AL, Stanzer S, et al. Comprehensive Analysis of miRNome Alterations in Response to Sorafenib Treatment in Colorectal Cancer Cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):2011-2021.
- [12] 周敏燕, 兰桂平, 司勇峰, 等. MiR-3182 在鼻咽癌中的表达及其与远处转移和预后关系的研究[J]. 中国临床新医学, 2016, 9(5):369-372.
- [13] 杨颖, 李志鹏, 贾春丽, 等. 薏苡仁注射液提高人肝癌细胞 Bel-7402 放射敏感性的机制研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2017, 37(12):885-890.
- [14] 许刚, 卜珊珊, 王修身, 等. 微小 RNA-122 靶向调控细胞周期蛋白 G1 上调肝癌细胞放射敏感性及其机制研究[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(3):567-567.
- [15] 何大川, 龚道明, 朱小波, 等. 肺腺癌组织 FAM83A 基因表达与预后相关性[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(4):239-244.
- [16] Snijders AM, Lee SY, Hang B, et al. FAM83 family oncogenes are broadly involved in human cancers: an integrative multi-omics approach [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(2):167-179.
- [17] Grant S. FAM83A and FAM83B: candidate oncogenes and TKI resistance mediators [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9):3048-3051.
- [18] 李泓漪, 程彩霞, 翟元芳, 等. FAM83B 的表达与食管鳞癌临床病理特征及预后的相关性[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(6):583-588.

## 外周血细胞因子在慢性乙型肝炎的治疗效果判断的价值研究

隋佳<sup>1</sup> 于梦<sup>1</sup> 朱淑珍<sup>2</sup> 魏青政<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 通过研究细胞因子与谷丙转氨酶(ALT)、乙型肝炎病毒(HBV)DNA、免疫分期等的相关性,分析外周血细胞因子作为慢性乙型肝炎的疗效评价指标的潜在价值。方法 选取2017年6月至2019年6月于本院传染科门诊就诊确定为慢性乙肝患者75例,根据血清学指标的不同分为免疫耐受(IT)组20例、免疫清除(IC)组30例、非活动病毒携带(IA)组25例,同时选择25例无乙肝病史的健康志愿者为健康对照组。再根据ALT和HBV DNA的不同再次分组,检测细胞因子与ALT、HBV DNA、免疫分期等的相关性。对30例IC组患者进行为期12个月的抗病毒治疗,比较治疗后细胞因子、ALT、HBV DNA等的差异。结果 IL-4、IL-6、IL-8与HBsAg DNA和ALT呈正相关,IL-17、IFN- $\gamma$ 与之呈负相关。各组TGF- $\beta$ 显示( $P>0.05$ ),差异无统计学意义。除TGF- $\beta$ 外,其他细胞因子均在不同分期显示( $P<0.05$ ),差异有统计学意义。IC组患者治疗后IL-4、IL-6和IL-8较治疗前明显降低( $P<0.05$ ),IL-17、IFN- $\gamma$ 较治疗前明显升高( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$ 无显著性变化( $P>0.05$ )。结论 外周血细胞因子IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、IFN- $\gamma$ 与ALT、HBsAg DNA及慢性乙肝感染分期都存在一定的相关性,可以作为慢性乙型肝炎治疗的潜在评价指标。

**[关键词]** 慢性HBV感染;细胞因子;HBV DNA;丙氨酸氨基转移酶

### Study on the value of peripheral blood cytokines in the treatment of chronic hepatitis B

SUI Jia<sup>1</sup>, YU Meng<sup>1</sup>, ZHU Shuzhen<sup>2</sup>, WEI Qinzhen<sup>1\*</sup>

(1. Inspection department of Qingdao municipal hospital, Qingdao, Shandong, China, 266000; 2. Inspection department of Qilu Hospital of Shandong University Qingdao, Qingdao, Shandong, China, 266035)

**[ABSTRACT]** Objective To analyze the correlation between cytokines and ALT, HBV DNA, immune staging, etc., and to analyze the potential of peripheral blood cytokines in evaluating therapeutic effect of chronic hepatitis B. Methods A total of 75 patients with chronic HBV infection who were admitted to our hospital from June 2017 to June 2019 were enrolled. According to the different serological criteria, 20 patients in the immune tolerance (IT) group and 30 in the immune clearance (IC) group were selected. 25 patients were enrolled in the non-active virus-bearing (IA) group, and 25 healthy volunteers without a history of hepatitis B were selected as healthy controls. Then, according to the difference between ALT and HBV DNA, the correlation between cytokines and ALT, HBV DNA, immune staging, A total of 30 patients in the IC group were treated with antiviral therapy for 12 months, and the differences in cytokines, ALT, and HBV DNA after treatment were compared. Results IL-4, IL-6 and IL-8 were positively correlated with HBsAg DNA and ALT, while IL-17 and IFN- $\gamma$  were negatively correlated. There was no

基金项目:青岛市医疗卫生优秀青年医学人才培养

作者单位:1. 青岛市市立医院检验科,山东,青岛 266000

2. 山东大学齐鲁医院检验科,山东,青岛 266035

\*通信作者:魏青政, E-mail:1270700065@qq.com

significant difference in TGF- $\beta$  between the groups ( $P>0.05$ ). Except for TGF- $\beta$ , other cytokines were significantly different in different stages ( $P<0.05$ ). IL-4, IL-6 and IL-8 were significantly lower in the IC group than in the treatment group before treatment ( $P<0.05$ ), IL-17 and IFN- $\gamma$  were significantly higher than before treatment ( $P<0.05$ ), and TGF- $\beta$  showed no significant changes ( $P>0.05$ ). Conclusion Peripheral blood cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, and IFN- $\gamma$  have a certain correlation with ALT, HBsAg DNA and chronic hepatitis B infection staging, which can be used as potential evaluation indicators for treatment of chronic hepatitis B.

[KEY WORDS] Chronic HBV infection; Cytokines; HBV DNA; ALT

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是一种常见的严重肝脏疾病,每年全球大约有2.4亿人感染HBV,大约有60万人因此死亡。尽管人类在HBV的防治方面取得了很大的进展,但HBV感染仍然是慢性肝炎,肝硬化,肝癌的主要原因<sup>[1-3]</sup>。慢性HBV感染过程包括免疫耐受期(im-mune tolerance, IT)、免疫清除期(immune clear-ance, IC)和非活动病毒携带期(inactive virus carri-er, IA),在不同时期患者免疫系统的反应不同,进而表现出不同的临床症状,同时治疗疗效也不一样<sup>[4-5]</sup>。细胞因子是机体免疫系统发挥功能的重要分子,其产生和作用都离不开免疫系统,在HBV的感染和免疫过程中也扮演着不可替代的作用<sup>[6-7]</sup>。目前,临床上对慢性乙型肝炎的免疫分期和治疗疗效评价的指标有限,主要依赖乙肝两对半、谷丙转氨酶(Glutamate-pyruvate transaminase, ALT)、乙型肝炎病毒DNA(HBV DNA)等血清学指标,缺乏免疫指标的参与。本研究旨在通过研究细胞因子与ALT、HBV DNA、免疫分期等的相关性,分析外周血细胞因子作为慢性乙型肝炎的疗效评价指标的潜在价值。

## 1 对象和方法

### 1.1 病例来源

选取2017年6月至2019年6月于本院传染科门诊就诊的慢性HBV感染患者75例为病例来源,所有入组患者均由主治以上医师依据《慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)》<sup>[8]</sup>中关于慢性乙型肝炎的诊断标准进行确诊。本实验经医院伦理委员会批准,所有入组病例及家属均对本研究知情并同意。排除标准:①肝癌;②合并甲、丙、丁、戊型病毒性肝炎感染者;③合并药物性肝炎、酒精性肝炎、脂肪性肝炎;④合并自身免疫性疾病、系统性自身免疫性疾病;⑤合并妊娠者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组

依据慢性乙型肝炎免疫分期标准<sup>[8-9]</sup>,将75例慢性HBV感染者分为IT组20例[HBsAg(+), ALT<60 U/L、HBV DNA>10<sup>5</sup>拷贝/mL]、IC组30例[HBsAg(+/-)、ALT>60 U/L、HBV DNA>10<sup>5</sup>拷贝/mL]、IA组25例[HBsAg(-)、ALT<60 U/L、HBV DNA<10<sup>5</sup>拷贝/mL],同时选择25例无乙肝病史的健康志愿者为健康对照组。所有组别的性别比例、年龄均无统计学意义,具有可比性。

将上述100例受试者根据HBV DNA水平不同分为低病毒载量组(HBV DNA<10<sup>5</sup>拷贝/mL)、中病毒载量组(10<sup>5</sup>拷贝/mL≤HBV DNA<10<sup>6</sup>拷贝/mL)、高病毒载量组(HBV DNA>10<sup>6</sup>拷贝/mL)。再根据血清ALT水平的不同分为低ALT组(60 U/L≤ALT<160 U/L)、中ALT组(160 U/L≤ALT<500 U/L)、高ALT组(ALT≥500 U/L)。

#### 1.2.2 细胞因子和ALT检测

所有受试者在入组次日早晨空腹采集静脉血4 mL,静置20 min,4 000 r/min离心2 min、分离血清进行检测,将检测结果根据不同分组进行比较分析。细胞因子IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、 $\gamma$ -干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、转化生长因子- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )的检测采用ELISA法,检测试剂盒均由武汉优尔生商贸有限公司提供。实验步骤严格按照产品说明进行操作;ALT应用全自动生化分析仪,具体操作步骤参照ALT测定试剂盒说明书。ALT>160 U/L为异常。

#### 1.2.3 血清病毒载量(HBV DNA)检测

分离患者血清,应用Real-time PCR法检测血清中HBV DNA载量。乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)由中山大学达安基因股份有限公司提供(单位已经换算成拷贝/mL)。

实验步骤参照试剂说明书。HBV DNA $>10^3$ 拷贝/mL为异常。

#### 1.2.4 抗病毒治疗

对30例IC组患者进行抗病毒治疗1年,药物选用恩替卡韦分散片(江西青峰药业有限公司,国药准字H20100141),剂量为5 mg/d。治疗12个月后,再次检测ALT、血清病毒载量和细胞因子水平并与治疗前数据进行比较分析

#### 1.2.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。作图使用GraphPad Prism 7。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血HBV DNA水平与细胞因子的相关性分析

根据不同HBV DNA水平分组(具体分组方法见1.3),分析不同HBV DNA水平的慢性HBV感染患者的外周血细胞因子水平,结果如表1所示。从正常对照组到高病毒载量组,IL-4、IL-6的变化趋势都是逐渐上升的,随着病毒载量的升高,其表达量也升高,相邻2个组别间为( $P < 0.05$ ),差异具有统计学意义。正常对照组和低病毒载量组血清IL-8水平为( $P > 0.05$ )差异无统计学意义,但明显低

于中病毒载量组( $P < 0.05$ ),值得一提的是,高病毒载量组IL-8水平远高于其他组别( $P < 0.05$ )。IL-17和IFN- $\gamma$ 的变化趋势较为一致,随着病毒载量的升高而下降,且正常对照与低病毒载量组无显著性差异( $P > 0.05$ ),除中高病毒载量组IFN- $\gamma$ 无显著性差异外,其余各组间均有显著性差异( $P < 0.05$ )。TGF- $\beta$ 水平也随病毒载量升高而升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 血清ALT水平与细胞因子的关系

根据血清ALT水平分组(具体分组方法见1.3),分析不同血清ALT水平的慢性HBV感染患者的外周血细胞因子水平,结果如表2所示。与2.1中结果类似,IL-4、IL-6和IL-8随ALT水平的升高而升高,低ALT组( $60 \leq \text{ALT} < 160$ )IL-6水平较正常对照组( $\text{ALT} < 60$ )显著升高外( $P < 0.05$ ),低ALT组IL-4和IL-8水平较正常对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。IL-17、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 的变化趋势与2.1相似,高ALT组TGF- $\beta$ 与正常对照组比较有统计学差异( $t = 2.08, P = 0.04 < 0.05$ )。

### 2.3 慢性HBV感染过程中不同阶段患者的细胞因子变化

如图1所示,与NC组比较,IT期患者血清IL-4、IL-6、IL-8水平明显升高( $P < 0.05$ ),除IA期IL-8水平与NC组无显著性差异外( $P > 0.05$ ),其余IC期和IA期患者IL-4、IL-6、IL-8水平均显著低于IT期和

表1 不同HBV DNA水平患者细胞因子表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Cytokine expression in patients with different HBV DNA levels ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	IL-4(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	TGF- $\beta$ (pg/mL)
正常对照组	35	8.5 $\pm$ 3.6	28.5 $\pm$ 13.2	7.0 $\pm$ 2.2	154.3 $\pm$ 66.3	31.5 $\pm$ 7.1	98.2 $\pm$ 46.3
低病毒载量组	15	18.8 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	38.5 $\pm$ 15.9 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 3.8	157.1 $\pm$ 46.3	28.7 $\pm$ 5.1	103.2 $\pm$ 54.1
中病毒载量组	17	34.7 $\pm$ 5.4 <sup>ab</sup>	58.1 $\pm$ 17.3 <sup>ab</sup>	12.3 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	113.5 $\pm$ 37.2 <sup>ab</sup>	16.4 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	111.2 $\pm$ 46.5
高病毒载量组	33	42.2 $\pm$ 6.8 <sup>abc</sup>	70.4 $\pm$ 21.3 <sup>abc</sup>	61.1 $\pm$ 41.3 <sup>abc</sup>	89.4 $\pm$ 31.3 <sup>abc</sup>	14.5 $\pm$ 4.3 <sup>ab</sup>	123.2 $\pm$ 62.3

vs 正常对照组, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; vs 低病毒载量组, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; vs 中病毒载量组, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

表2 不同ALT水平患者细胞因子表达( $\bar{x} \pm s$ )

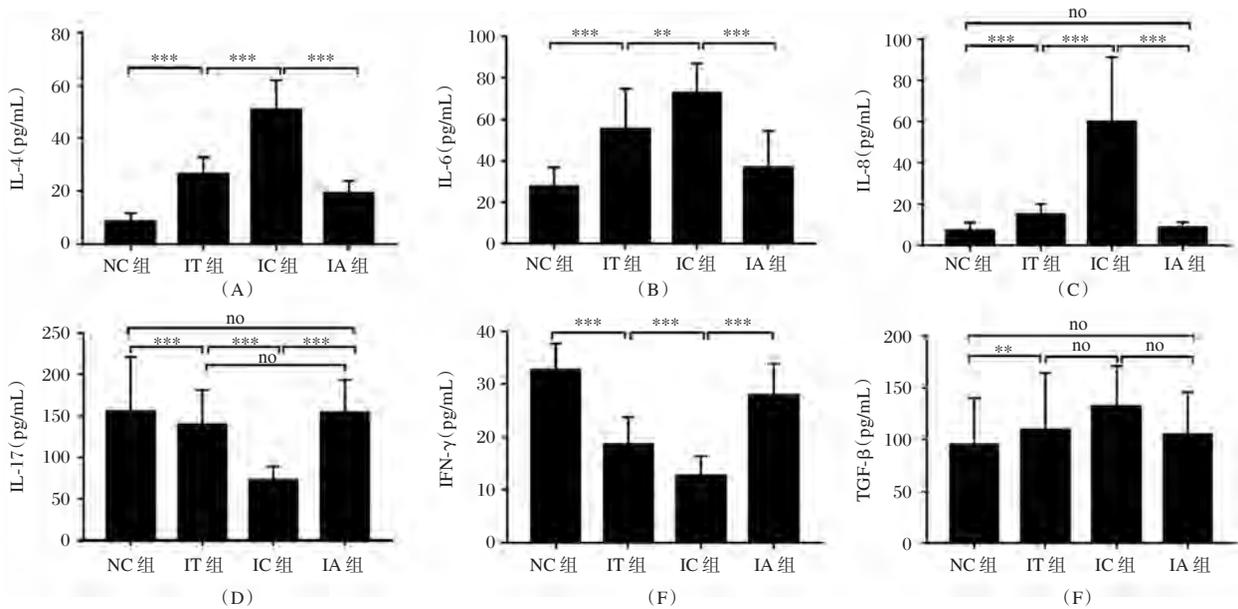
Table 2 Cytokine expression in patients with different ALT levels ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	IL-4(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	TGF- $\beta$ (pg/mL)
正常对照组	70	8.6 $\pm$ 4.1	29.6 $\pm$ 11.8	7.5 $\pm$ 4.2	159.3 $\pm$ 70.6	33.2 $\pm$ 6.3	99.4 $\pm$ 50.1
低ALT组	12	10.3 $\pm$ 3.2	52.5 $\pm$ 17.8 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 3.3	153.0 $\pm$ 44.5	25.7 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	105.1 $\pm$ 37.8
中ALT组	7	28.7 $\pm$ 4.9 <sup>ab</sup>	58.1 $\pm$ 20.5 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 10.1 <sup>ab</sup>	123.9 $\pm$ 40.1 <sup>ab</sup>	15.4 $\pm$ 4.7 <sup>ab</sup>	115.2 $\pm$ 45.4
高ALT组	11	54.3 $\pm$ 10.9 <sup>abc</sup>	75.4 $\pm$ 21.3 <sup>abc</sup>	63.1 $\pm$ 38.4 <sup>abc</sup>	74.4 $\pm$ 29.6 <sup>abc</sup>	11.5 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>	133.2 $\pm$ 41.2 <sup>a</sup>

vs 正常对照组, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; vs 低ALT组, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; vs 中ALT组, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

NC组患者( $P<0.05$ )。对比IL-17和IFN- $\gamma$ 表达可发现,与NC组比较,IT期患者IL-17和IFN- $\gamma$ 表达显著减少( $P<0.05$ ),但IC期和IA期又开始回升,IA期IL-17水平甚至与NC组相当,无统计学

差异( $P>0.05$ )。与NC组比较,IT期TGF- $\beta$ 水平明显升高( $P<0.05$ ),IC期和IA期水平略降低,但无统计学差异,且与NC组也无统计学差异( $P>0.05$ )。



\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$

图1 不同感染阶段患者血清细胞因子水平

Figure 1 Serum cytokine levels in patients at different stages of infection

### 2.4 抗病毒治疗前后患者血清各指标变化

收集25例HBsAg阳性的慢性乙肝患者,应用替恩卡韦干预治疗12个月以后采集外周血,检测ALT、HBV DNA、各细胞因子等数据,结果如图2所示。患者ALT和HBV DNA水平较治疗前显著降低( $P<0.05$ )。细胞因子的检查发现,患者治疗后IL-4、IL-6和IL-8较治疗前明显降低( $P<0.05$ ),IL-17、IFN- $\gamma$ 较治疗前明显升高( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$ 无显著性变化( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

HBV感染在全球特别在发展中国家,是一种严重的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。急性HBV感染以后,大约1%~5%的成人会发生慢性感染,这种感染的发病率随着年龄的增长而降低,新生儿和儿童的发病要高于成人<sup>[10]</sup>。慢性乙型肝炎病毒感染是导致患者发病和死亡的重要原因。从HBV的自然史可以了解到,准确把握慢性HBV感染分期,对于治疗和预防再发有着重要的意义<sup>[11]</sup>。目前关于慢

性乙型肝炎的治疗效果主要通过ALT,乙肝五项,HBsAg DNA等角度来评判,但这一判断机制大多从病毒和脏器角度出发,没有深入到免疫层面。细胞因子在机体抗病毒免疫中发挥着重要作用,外周血细胞因子的检测相对容易获得,通过分析外周血细胞因子与ALT、HBsAg DNA以及慢性HBV感染分期的关系,有助于深入挖掘细胞因子作为慢性乙型肝炎疗效评价的指标<sup>[6]</sup>。

IL-4对HBV基因表达有抑制作用,因此在调节病毒基因的表达和肝脏的先天防御机制中起着重要而复杂的作用<sup>[12]</sup>。关于慢性肝炎患者IL-4水平的报道不尽相同,一些研究报道慢性肝炎患者IL-4的表达水平降低而一些研究中表明IL-4水平升高<sup>[13-16]</sup>。本研究中,IL-4水平随HBV DNA水平升高而升高,与血清ALT水平呈正相关趋势,随HBV感染过程先升高后下降,抗病毒治疗后水平下降。这些结果提示我们,IL-4的表达水平与肝脏的炎症和坏死程度密切相关,即患者受到感染后随着疾病的进展,肝脏炎症反应逐渐增加,IL-4

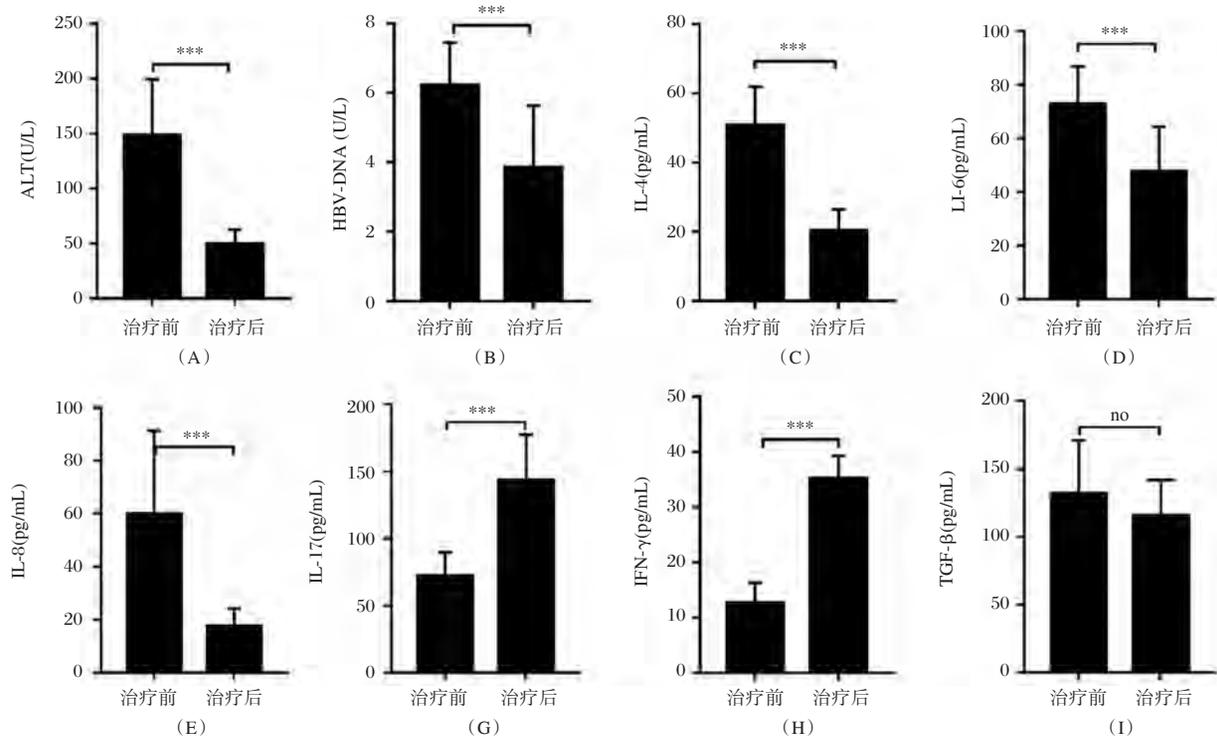


图2 抗病毒治疗前后ALT、HBV-DNA和细胞因子的变化

Figure 2 Changes of ALT, HBV-DNA and cytokines before and after antiviral therapy

的水平也随之波动。与IL-4变化类似的还有IL-6、IL-8和TGF- $\beta$ 。IL-6是一种多效细胞因子,其水平的升高与各种慢性疾病<sup>[17]</sup>以及慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的发病率和疾病活动有关。本研究中,IL-6的水平随ALT水平的升高而升高,也说明了IL-6可以反应肝脏的炎症情况。TGF- $\beta$ 与本研究中多个细胞因子有相互作用关系。在慢性乙型肝炎中,肝组织的炎症反应激活肝脏间质细胞表达TGF- $\beta$ ,TGF- $\beta$ 对Th17的分化成熟非常重要,它与IL-6共同作用可以启动CD4+ T细胞向Th17细胞分化,成熟的Th17细胞产生IL-17、IL-6等炎症介质,进一步加强炎症反应。TGF- $\beta$ 本身具有抗炎作用,本研究中随着ALT水平的升高而升高,原因可能在于肝脏炎症反应的增强促进了TGF- $\beta$ 的进一步分泌以减少炎症影响、维持肝脏功能。本研究中涉及到的另外两个细胞因子IL-17和IFN- $\gamma$ 的表达水平规律类似,随HBV DNA水平升高而升高、但在高病毒载量时表达水平略有下调,与ALT之间的关系也是如此;在不同的疾病进展过程中,这两种细胞因子水平随疾病进展先降低后升高,在抗病毒治疗后表达水平显著升高。造成这一现象的原因可能是在肝脏受到损伤时,在TGF- $\beta$ 等

细胞因子的作用下,Th17细胞分化较多,IL-17水平升高;而当病毒感染较为严重时,总的CD4+ T细胞的数量减少,尽管有细胞因子促进了Th17细胞的分化但数量仍受到限制,导致IL-17的分泌有一定程度的下降。IFN- $\gamma$ 同理。

本研究通过比较不同HBsAg DNA和ALT分级的细胞因子(如IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 等)的变化趋势,探究哪些细胞因子可以作为潜在疗效的评价指标。结果显示,除TGF- $\beta$ 外,其他细胞因子均与HBsAg DNA和ALT存在一定的相关性,IL-4、IL-6、IL-8与HBsAg DNA和ALT呈正相关,IL-17、IFN- $\gamma$ 与之呈负相关。然后对比不同慢性HBV感染分期的细胞因子指标差异,结果显示,除TGF- $\beta$ 外,其他细胞因子均在不同分期差异显著( $P < 0.05$ )。尤其是IL-8,在IC期的表达水平明显高于其他时期。最后,本研究选择IC期30例进行抗病毒治疗,12个月以后,检测细胞因子和其他血清学指标发现IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、IFN- $\gamma$ 同HBsAg DNA和ALT一样在治疗前后有显著性变化,TGF- $\beta$ 在治疗前后变化差异不大。因此,有理由相信,细胞因子可以作为评价慢性乙型肝炎疗效的潜在指标。本研究由于经费和人员

的关系,只检测了六种报道与慢性HBV感染关系较为密切的细胞因子,更多的潜在的细胞因子还需要更深入的研究来发现。此外,通过对细胞因子的深入挖掘,还有利于对慢性HBV发病机制的研究。由于本研究所选的样本量有限,且年龄因素尚未考虑,还需要更多更深入的研究论证IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、IFN- $\gamma$ 是否可以作为慢性乙肝治疗效果的评价指标。

综上所述,外周血细胞因子IL-4、IL-6、IL-8、IL-17、IFN- $\gamma$ 与ALT、HBsAg DNA及慢性乙肝感染分期都存在一定的相关性,可以作为慢性乙型肝炎治疗的潜在评价指标。

### 参考文献

- [1] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13:29-60.
- [2] Lee WM. Hepatitis B virus infection [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(24):1733-1745.
- [3] Bridges CB, Watson TL, Nelson NP, et al. Challenges with hepatitis B vaccination of high risk adults- A pilot program[J]. *Vaccine*, 2019, 37(35):5111-5120.
- [4] 高红艳,刘娜,李春霞,等.慢性HBV感染者免疫耐受期自然转归相关影响因素的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(8):1572-1575.
- [5] 秦维,杨昭,祝素平,等.慢性HBV感染者自然史不同阶段sOX40L的表达与意义[J]. *中国地方病防治杂志*, 2018, 33(4):464.
- [6] 鲁晓娟,寇应琳,陈妍,等. HBV感染患者病毒载量对外周血T淋巴细胞、细胞因子及肝功能的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(1):63-66.
- [7] 王新伟,杨道坤,梁海军,等. 白细胞介素-35对慢性乙型肝炎患者外周血Th17细胞的影响及其临床意义[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(10):885-890.
- [8] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2015, 9(5):570-589.
- [9] Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(25):3099-3105.
- [10] 韩悦,张欣欣.乙型肝炎病毒感染的固有免疫反应[J]. *肝脏*, 2012, 17(1):44-46.
- [11] Gao, Qiu-Ju. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15(44):5610.
- [12] Zamorano J, Rivas MD, Perez GM. Interleukin-4: A multifunctional cytokine [J]. *Immunologia*, 2003, 22: 215-24.
- [13] Astakhin AV, Levitan BN, Afanas' ev SS, et al. Tumor necrosis factor - alpha and interleukin - 4 in the blood sera of chronic hepatitis patients[J]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 2004 (2): 46-50.
- [14] Loginov AS, Tsaregorodtseva TM, Zotina MM, et al. [Interleukins in chronic viral hepatitis] [J]. *Terapevticheskiĭ Arkhiv*, 2001, 73(2):17.
- [15] Gigi E, Raptopoulou-Gigi M, Kalogeridis A, et al. Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1-TH2 cytokine profile in subjects with self - limited disease [J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2008, 15(2):10.
- [16] Nejatollahi F, Davarpanah MA, Hosseini SH. Interferon - gamma, Interleukin - 10 and interleukin - 4 in the blood sera of patients with chronic hepatitis B virus infection in Shiraz. In: 4th international Tehran hepatitis congress, 2011.
- [17] Cronstein BN. Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis [J]. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases*, 2007, 65 Suppl 1(1):S11-5.

## 丙型肝炎患者 HCV RNA 载量与 HCV-cAg 及 SOD、FFA 相关性分析

方伟祯<sup>1</sup> 古文深<sup>1</sup> 房绮梅<sup>1</sup> 曾无艺<sup>2</sup> 丁睿<sup>1</sup> 段朝晖<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 目的 探究丙型肝炎患者血清中丙肝病毒 RNA(HCV RNA)载量与丙型肝炎核心抗原(HCV-cAg)及超氧化物歧化酶(SOD)、游离脂肪酸(FFA)的相关性。方法 对2015年1月至2019年2月105例HCV RNA定量检测为阳性的临床标本,同时检测其HCV-cAg及SOD、FFA的含量。结果 HCV RNA载量与HCV-cAg、SOD、FFA水平有显著相关性,随着患者体内HCV RNA载量的升高,HCV-cAg阳性率也随之升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),两者呈正相关;HCV RNA载量不同组间SOD水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),SOD水平随着患者体内HCV-RNA载量的升高而降低,两者呈负相关关系;低、中载量组间FFA水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而均与高载量组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 HCV-cAg与HCV RNA有良好的相关性,出现时间早且适合基层推广,SOD和FFA在一定程度上可以反映病情进展情况,联合检测在丙型肝炎的早期诊断和监测治疗效果上有重要的临床意义。

**[关键词]** 丙型肝炎; HCV-RNA; 超氧化物歧化酶; 游离脂肪酸

### Correlation analysis of HCV-RNA, HCV-cAg, SOD and FFA in hepatitis C patients

FANG Weizhen<sup>1</sup>, GU Wenshen<sup>1</sup>, FANG Qimei<sup>1</sup>, ZENG Wuyi<sup>2</sup>, DING Rui<sup>1</sup>, DUAN Chaohui<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Department, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yet-Sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510120; 2. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 511436)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the correlation between hepatitis C virus RNA (HCV RNA) load and hepatitis C core antigen (HCV-cAg), superoxide dismutase (SOD) and free fatty acid (FFA) in patients with hepatitis C virus. Methods 105 cases of positive HCV RNA quantitative test were collected from January 2015 to February 2019, and the levels of HCV-cAg, SOD and FFA were also detected. Results The HCV RNA load was significantly correlated with the levels of HCV-cAg, SOD and FFA. The HCV-cAg positive rate was increased with the HCV RNA ( $P<0.05$ ); The SOD level was negative association with the HCV RNA ( $P<0.05$ ); though there was no significant difference of the HCV RNA load between the low and medium level of FFA groups ( $P>0.05$ ), however, there was a statistically significant difference between high-load group and the remaining 2 groups ( $P<0.05$ ). Conclusion HCV-cAg has a good correlation with HCV RNA. The level of SOD and FFA could reflect the progress of the disease. These combined detection methods have important clinical significance in the early diagnosis and monitoring of hepatitis C.

**[KEY WORDS]** Hepatitis C; HCV RNA; Superoxide dismutase; Free fatty acid

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313070)

作者单位:1. 中山大学孙逸仙纪念医院检验科,广东,广州 510120

2. 广州医科大学,广东,广州 511436

\*通信作者:段朝晖, E-mail:1725012289@qq.com

目前全世界约有 1.85 亿人感染丙型肝炎病毒,且每年新增丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染者约 35 万<sup>[1]</sup>,丙型肝炎呈全球性流行,不同性别、年龄、种族人群均对 HCV 易感,主要经血液传播,也可经破损的皮肤和黏膜传播<sup>[2]</sup>,但是目前却尚未研制出能够预防丙肝感染的疫苗,因此,对丙肝进行早期准确诊断、合理治疗和疗效监测具有重要的临床意义。目前认为 HCV RNA 定量检测是诊断 HCV 感染的金标准<sup>[3]</sup>,一般人在感染 HCV 1~2 周,血清中即可检测到 HCV RNA,反映病毒的复制与传染性<sup>[4]</sup>。外周血中 HCV 核心抗原(HCV-cAg)是 HCV 病毒颗粒的结构蛋白,在各亚型 HCV 病毒中高度保守,血清中的 HCV-cAg 非常稳定,可以在室温条件下稳定存在 7 d<sup>[5]</sup>,根据国内外近十几年的许多研究报道显示<sup>[6]</sup>,HCV-cAg 的灵敏度与 HCV RNA 接近,且价格趋于便宜,因此其应用越来越受到重视。

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是体内消除超氧阴离子自由基对细胞损害的一种非常重要的抗氧化酶,具有保护机体细胞免受损伤的作用<sup>[7]</sup>。近年来的研究表明<sup>[8]</sup>,游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)可导致肝细胞线粒体肿胀和通透性增加、肝细胞变性、坏死和炎症细胞浸润,极低浓度的 FFA 即可对肝脏造成损伤,还可诱发肝纤维化。而 SOD 与 FFA 水平在丙肝患者中变化的相关研究却不多。为此,本研究检测在不同 HCV RNA 载量组中 SOD 和 FFA 的水平,探讨检测 SOD 和 FFA 在 HCV 病情进展评估中的意义。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取中山大学孙逸仙纪念医院 2015 年 1 月至 2019 年 2 月收治的 HCV RNA 定量检测阳性的 105 例丙肝患者为研究对象,其中男 72 例,女 33 例,平均年龄(56.42±13.5)岁,丙肝诊断参考中华医学会肝病学会、传染病与寄生虫病学会《丙型肝炎防治指南》的诊断标准<sup>[1]</sup>,排除肝硬化,肝细胞癌患者,除丙型外其他类型肝炎患者与心功能严重不全者。所收集的病例均为首次感染丙肝的患者,并为治疗前的血清标本,标本离心后立即检测,若不能立即进行检测应放在-20℃环境下保存。将 HCV RNA 拷贝数检测为阳性的标本进行分组,其中拷贝数  $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$  的为低载量组( $n=22$ ),拷贝数  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  的为中载量组( $n=34$ ),拷贝数

$\geq 1.0 \times 10^6$  的为高载量组( $n=49$ )。

### 1.2 主要试剂

HCV-RNA 采用中山大学达安基因股份有限公司生产的丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒;HCV-cAg 检测采用山东莱博生物科技有限公司生产的 HCV-cAg 诊断试剂盒;SOD 检测采用福建福缘生物科技有限公司的超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒;FFA 检测采用积水医疗科技(中国)有限公司的血清游离脂肪酸检测试剂盒。

### 1.3 主要仪器

美国 ABI ViiA™ 7 实时荧光定量 PCR 仪;上海赛默飞世尔 MK3 酶标仪;美国贝克曼库尔特 AU5800 生化分析仪。

### 1.4 方法

HCV RNA 检测采用 PCR-荧光探针法;HCV-cAg 检测采用酶联免疫法;SOD 检测采用邻苯三酚比色法;FFA 检测采用酶法测定。所有标本检测都严格参照说明书进行。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计处理,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料用  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验,计量资料比较采用  $t$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCV RNA 各载量组与 HCV-cAg 阳性率的结果比较

105 例标本中,HCV RNA 低载量组中 1 例 HCV-cAg 阳性,中载量组 3 例阳性,高载量组 23 例阳性,随着患者体内 HCV RNA 载量的升高,HCV-cAg 阳性率也随之升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两者呈正相关,见表 1。

表 1 HCV RNA 各载量组与 HCV-cAg 阳性率的结果比较  
[ $n(\%)$ ]

Table 1 Comparison of HCV RNA group and HCV-cAg positive rate [ $n(\%)$ ]

HCV RNA 载量分组(copies/mL)	例数	HCV-cAg 阳性率
低载量组( $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ )	22	1(4.5)
中载量组( $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ )	34	3(8.8)
高载量组( $\geq 1 \times 10^6$ )	49	23(46.9)
总计	105	27(25.7)

组间比较  $P < 0.05$

## 2.2 HCV RNA 各载量组与 SOD、FFA 水平的结果比较

105 例标本中, HCV RNA 载量不同组间 SOD 和 FFA 水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 随

着患者体内 HCV RNA 载量的升高, SOD 水平逐渐降低, 两者呈负相关关系; 低、中载量 FFA 水平组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 而均与高载量组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 2。

表 2 HCV RNA 各载量组与 SOD、FFA 水平的结果比较

Table 2 Comparison of HCV RNA group and result of SOD and FFA test

HCV RNA 载量分组(copies/mL)	例数(n)	Lg(HCV RNA)	SOD(U/mL)	FFA( $\mu$ mol/L)
低载量组( $1\times 10^3\sim 1\times 10^5$ )	22	4.44 $\pm$ 8.49	141.27 $\pm$ 18.11	530.86 $\pm$ 197.93
中载量组( $1\times 10^5\sim 1\times 10^6$ )	34	5.63 $\pm$ 5.41	115.76 $\pm$ 17.04 <sup>a</sup>	592.74 $\pm$ 283.90 <sup>b</sup>
高载量组( $\geq 1\times 10^6$ )	49	7.28 $\pm$ 7.51	97.96 $\pm$ 18.31 <sup>a</sup>	736.47 $\pm$ 218.86 <sup>c</sup>
总计	105	6.95 $\pm$ 7.38	112.80 $\pm$ 24.31	646.85 $\pm$ 251.36

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P>0.05$ ; 与低载量和中载量组相比, <sup>c</sup> $P<0.05$

## 3 讨论

丙型肝炎在人群中的感染率逐年增高, 其中 50%~85% 的丙型肝炎为慢性病毒性肝炎, 又有 10%~15% 的患者可发展为肝硬化, 进而增加了肝癌的发生率, 死亡人数也成倍增长<sup>[9]</sup>。丙肝已经成为堪比艾滋病的严重社会与公共卫生问题, 因此丙型肝炎的早预防、早发现、早治疗显得尤为重要。

目前临床上丙型肝炎的检测手段主要是 HCV RNA 以及抗 HCV 的检测。虽然 HCV RNA 是丙型肝炎患者临床诊断的金标准, 但也存在一定的不足与缺陷<sup>[10]</sup>。HCV RNA 的前处理过程复杂性较高, 易出现 HCV RNA 污染、灭活等现象, 造成结果错误<sup>[11]</sup>, 同时也不能确切反映患者肝脏的病理改变。HCV-Ab 不能区分既往感染和现症感染, 且出现较慢, 根据刘潇, 陈佳琦等试验表明<sup>[3]</sup>, HCV-Ab 阳性组中丙型肝炎感染率为 25%, 可见单纯检测 HCV-Ab 在临床丙型肝炎感染筛查中特异性不高, 容易造成漏检。

许多研究显示, HCV-cAg 与 HCV 感染的早期诊断密切相关, HCV-cAg 在患者感染 HCV 后 14~70 d 即可出现, 其出现的时间仅比 HCV RNA 晚约 1 d<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, HCV RNA 载量不同组间 HCV-cAg 阳性率比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 随着 HCV RNA 载量的增加, HCV-cAg 阳性率也逐渐升高, 两者呈正相关关系。在 HCV RNA 低载量组中, HCV-cAg 阳性检出率较低, 仅为 4.5%, 分析其原因可能是因为在 HCV 感染早期, HCV-cAg 浓度较低, 未到达酶学检测下限或标本

中的 HCV-Ab 和用于核心抗原检测的单克隆抗体竞争结合抗原而造成 HCV-cAg 假阴性。上述结果表明丙型肝炎患者外周血中 HCV-cAg 与 HCV RNA 有良好的相关性, 是理想的 HCV 感染标志物。

研究表明<sup>[12]</sup>, 自由基及其诱导的脂质过氧化物是导致组织损伤的重要原因。肝病患者均存在严重的脂质氧化过损伤, SOD 活性下降, 其活性大小可以间接反映体内自由基的数量。本研究结果显示, HCV RNA 载量不同组间 SOD 水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 提示在肝功能损伤时, 氧自由基增多, SOD 水平逐渐降低, 且随着病情的加重其 SOD 值更低, 两者呈负相关关系。上述结果表明, SOD 的变化不仅可作为判断丙型肝炎的病变程度, 而且对估计病情具有重要的临床价值。提高 SOD 活性, 有可能减轻或改善丙型病毒性肝炎的损伤程度。

当患者感染 HCV 时, HCV 病毒在肝脏中进行大量复制, 不仅激活了机体正常的免疫系统对病毒进行清除, 同时也引发机体的免疫病理反应<sup>[13]</sup>, 导致肝细胞的损伤破坏, 肝功能异常。FFA 是具有很强毒性的两性分子, 对肝细胞具有直接毒性作用, 有研究表明<sup>[14]</sup>, 血清中 FFA 浓度的略微增加即可损伤肝细胞, 进一步加重病情, 在 HCV 病程中发挥很重要的作用。本研究结果显示, FFA 水平与 HCV RNA 之间存在相关关系, HCV RNA 低、中载量组间 FFA 水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 而均与高载量组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。分析其原因可能是因为在 HCV RNA 低、中载量组中, 此时的肝脏仍然具备一定的代偿

能力,HCV RNA 载量增多引起的肝脏处理 FFA 能力的下降还处于可代偿的范围。当患者 HCV RNA 载量增多到高载量时,肝脏处理 FFA 的能力失代偿,导致患者血清 FFA 水平急剧上升。因此血清 FFA 水平不仅可以用来预测丙肝患者肝脏炎症的程度,还可以用来预计 HCV 病毒复制的活跃程度。

综上所述,血清 HCV RNA 载量对丙肝诊断和药物治疗疗效监测具有重要指导意义,HCV-cAg 检测具有较高的灵敏度和特异性、快速检测以及操作简便的优点,SOD、FFA 在一定程度上可以反映肝脏损伤程度和病变情况,因此将 HCV RNA、HCV-cAg、SOD 和 FFA 四项指标联合检测,在丙型肝炎早期准确诊断及监测疗效中具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2015,23(12):906-923.
- [2] LIU J. Clinical analysis of dynamic monitoring of chronic hepatitis C infection by multiple biochemical indexes[J]. *Int J Lab Med*, 2014, 35(16):2241-2242.
- [3] Baranov AV, Maleev VV. Association between HCV RNA level and anti-HCV antibodies during chronic hepatitis C[J]. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii*, 2009, (5):19.
- [4] 刘潇,陈佳琦. 联合检测丙肝病毒核心抗原和抗体在丙型肝炎早期诊断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2012,(2):316-317,323.
- [5] 林文浩,夏凌志. HCV-cAg 与 HCV-Ab 联合检测在丙型肝炎初筛实验诊断中的价值研究[J]. 现代医药卫生, 2015,31(22):3446-3447.
- [6] LI H, ZHANG X Q. The clinical value of hepatitis C core antigen detection[J]. *Chin J Health Lab Sci*, 2014, 24(5):699-700.
- [7] 徐艳秋,刘斌,常媛,等. 超氧化物歧化酶在乙型肝炎和肝细胞癌中的应用价值[J]. 中国现代普通外科进展, 2017,20(11):841-844.
- [8] 徐正婕,范建高,王国良. 游离脂肪酸在脂肪性肝炎发病中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2000,8(2):127.
- [9] 王婧婧,梁瑾. 丙肝病毒核心抗原以及血清自身抗体检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 首都食品与医药, 2019,26(05):86-87.
- [10] Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, et al. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 157(1):8-14.
- [11] 孙宏. 慢性丙型肝炎患者 HCV 核心抗原和 HCV RNA 检测价值研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(04):556-558.
- [12] 李国宏,郑风林,刘淑梅. 慢性乙型肝炎患者血清超氧化物歧化酶的检测以及与干扰素受体表达的关系[J]. 泰山医学院学报, 2016,37(12):1321-1322.
- [13] JIANG SP, LI Y, WANG M. Study on the relationship between HCV genotype and HCV-RNA concentration and coagulation function in patients with chronic hepatitis C[J]. *Chin J Clin Lab Med*, 2015, 12(8):1027-1029.
- [14] 胡汉宁,童秀峰,陈薇,等. 丙型肝炎患者血清游离脂肪酸水平与丙肝病毒 RNA 载量及肝损伤的关系[J]. 微循环学杂志, 2013,23(4):51-52, 55.

## miR-122、miR-150 在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的研究

马青松<sup>1\*</sup> 张云芬<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨微小RNA(miR)-122和miR-150在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的应用效果。**方法** 选择本院2018年3月至2019年2月收治的45例隐匿性乙型肝炎患者(A组)、60例慢性乙型肝炎患者(B组)和50例健康人(C组)作为研究对象,检测所有受检者清晨空腹静脉血清miR-122和miR-150水平。以血清miR-122和miR-150的Ct值作为自变量,以是否为隐匿性乙型肝炎作为因变量,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析miR-122和miR-150水平鉴别诊断隐匿性乙型肝炎感染的效能,绘制ROC曲线,确定最佳截断值并计算敏感度、特异度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值和符合率。**结果** A组和B组血清miR-122和miR-150的Ct值显著低于C组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );而A组和B组比较,二者差异无统计学意义( $P>0.05$ )。血清miR-122的AUC为0.949(95%CI:0.903~0.991),最佳截断值为Ct=28,敏感度、特异度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值和符合率分别为95.56%、88.00%、83.56%、83.67%、95.65%和91.58%。血清miR-150的AUC为0.937(95%CI:0.893~0.985),最佳截断值为Ct=26,敏感度、特异度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值和符合率分别为91.11%、90.00%、81.11%、89.13%、91.84%和90.53%。**结论** 血清miR-122和miR-150鉴别诊断隐匿性乙型肝炎具有良好的敏感性和特异性。

**[关键词]** 隐匿性乙型肝炎;微小RNA;miR-122;miR-150;受试者工作特征曲线

### Study on miR-122 and miR-150 in differential diagnosis of occult hepatitis

MA Qingsong<sup>1\*</sup>, ZHANG Yunfen<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory, Qian'an Hospital of TCM, Qian'an, Hebei, China, 064400; 2. Metabolism Department, Qian'an Hospital of TCM, Qian'an, Hebei, China, 064400)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the application of microRNA (microRNA) 122 and miR-150 in the differential diagnosis of occult hepatitis B. **Methods** 45 patients with occult hepatitis B (group A), 60 patients with chronic hepatitis B (Group B) and 50 healthy persons (Group C) were selected as the study subjects from March 2018 to February 2019. The levels of serum miR-122 and miR-150 were detected in all the subjects. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to analyze the efficiency of differentiating the levels of miR-122 and miR-150 in the diagnosis of latent hepatitis B infection. ROC curve was drawn to determine the best cut-off value and calculate sensitivity, specificity, Yoden index, positive predictive value, negative predictive value and coincidence rate. **Results** The Ct values of serum miR-122 and miR-150 in group A and group B were significantly lower than those in group C ( $P<0.05$ ). There was no significant difference between the A group and the B group ( $P>0.05$ ). The AUC of serum miR-122 was 0.949 (95% CI: 0.903~0.991), the optimal cutoff value was Ct=28, sensitivity, specificity, Yoden index, positive predictive value, negative predictive value and coincidence rate were 95.56 respectively. %, 88.00%,

作者单位:1. 迁安市中医医院检验科,河北,迁安 064400

2. 迁安市中医医院代谢病科,河北,迁安 064400

\*通信作者:马青松, E-mail:maqingsong44655@163.com

83.56%, 83.67%, 95.65% and 91.58%. The AUC of serum miR-150 was 0.937 (95% CI: 0.893~0.985), the optimal cutoff value was Ct=26, and the sensitivity, specificity, Yoden index, positive predictive value, negative predictive value and coincidence rate were 91.11%, 90.00%, 81.11%, 89.13%, 91.84% and 90.53%, respectively. **Conclusion** The differential diagnosis of occult hepatitis B by serum miR-122 and miR-150 has good sensitivity and specificity.

[KEY WORDS] Occult hepatitis B; microRNA; microRNA; microRNA - 122; microRNA - 150; Working characteristic curve of subjects

有研究表明当出现病毒变异或稀有亚型乙型肝炎(hepatitis B virus, HBV)感染时,乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)检测结果为阴性;还有一部分患者血清 HBsAg 检测阴性,但血清或者肝脏组织中 HBV DNA 检测阳性,此部分患者被称为隐匿性感染<sup>[1]</sup>。隐匿性乙型肝炎临床一般无法检测到血清 HbsAg,但病毒本身仍处于低复制活动状态,仍具有一定传染性,增加患者乙肝复发机率,加速肝脏疾病进展,并使其成为威胁输血安全、器官移植安全的巨大隐患<sup>[2]</sup>。据报道中国无偿献血人群中隐匿感染率约为 0.01%~0.1%<sup>[3]</sup>,而在病因不明的慢性肝病、HBsAg 阴性肝癌患者中,隐匿性 HBV 感染率分别高达 28.3%和 70.4%<sup>[4]</sup>。由于隐匿性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 拷贝数较低,有时无法通过 HBV DNA 检测发现。鉴于此,临床迫切需要一种敏感度、特异度较高的隐匿性乙型肝炎

诊断技术。众多研究表明,微小 RNA (microRNA, miR) 在 HBV 复制以及乙型肝炎发生和进展过程中具有重要作用,如 miR-122, miR-150, 2 者在肝癌细胞中均呈异常表达<sup>[5-6]</sup>。本研究旨在探讨 miR-122 和 miR-150 在隐匿性乙型肝炎鉴别诊断中的应用价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选择本院 2018 年 3 月至 2019 年 2 月收治的 45 例隐匿性乙型肝炎患者(A 组)、60 例慢性乙型肝炎患者(B 组)和 50 例健康人(C 组)作为研究对象。3 组年龄和性别构成比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ), B 组血清 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA、谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平显著高于 A 组和 C 组,而 HBsAb 阳性率显著低于 A 组和 C 组( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 3 组研究对象基线资料比较

Table 1 Comparison of baseline data of 3 groups of subjects

基线资料	A 组(n=45)	B 组(n=60)	C 组(n=50)	F/ $\chi^2$ 值	P 值
平均年龄(岁)	37.82±9.54	38.16±10.23	37.71±11.50	0.028	0.973
性别组成(男/女)	24/21	33/27	26/24	0.100	0.951
HBsAb 阳性	29	15	32	22.626	0.000
HBeAg (S/CO)	0.34±0.04	405.51±264.72	0.35±0.07	110.967	0.000
HBV-DNA (×10 <sup>4</sup> copies/mL)	3.65±1.45	6358.87±3163.92	0.03±0.02	191.238	0.000
谷丙转氨酶(IU/L)	21.53±8.53	264.51±57.61	22.43±7.64	814.177	<0.05
谷草转氨酶(IU/L)	27.83±11.53	194.52±78.43	19.52±9.23	219.626	<0.05

纳入标准:①符合慢性乙型肝炎<sup>[7]</sup>、隐匿性肝炎<sup>[8]</sup>诊断标准;②年龄≥18 岁;③无肝硬化迹象或者其他系统性疾病。排除标准:①罹患其他肝炎病毒或人类免疫缺陷病毒感染;②合并严重肝、肾功能异常及免疫功能缺陷者;③有结核病、血吸虫病;④酒精性脂肪肝、酗酒、脂肪肝等。所有患者均已签署知情同意书,并通过医院伦理委员

会批准。

### 1.2 仪器与试剂

RNeasy Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司。反转录试剂盒、TaqMan 反转录试剂盒、2×TaqMan 快速通用 PCR 反应液购自美国 Applied Biosystems 公司。miR-122、miR-150 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。高速离心机和高速冷冻

离心机均为德国 Eppendorf 生产。AGT9601 型普通 PCR 仪购自杭州安杰思生物科技有限公司。7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品采集

抽取患者空腹静脉血约 4 mL, 混匀后于 2 h 内通过  $3\ 000\times g$  离心 15 min, 收集血清,  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冻存待检。

#### 1.3.2 血清 miR-122 和 miR-150 检测

① RNA 提取: 采用 HiPure Liquid RNA/miRNA Kit 从 250  $\mu\text{L}$  血清中提取总 RNA。② cDNA 合成: 采用 First Strand cDNA Synthesis Kit 以总 RNA 为模板逆转录 cDNA, 反应体系: RNA-primer Mix (总 RNA 1  $\mu\text{g}$ 、250  $\mu\text{mol/L}$  oligo dT primer 1  $\mu\text{L}$ 、无酶水至总体积 13  $\mu\text{L}$ )、5 $\times$ RT Reaction Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、25 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ 、25 U/ $\mu\text{L}$  RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$ 、200 U/ $\mu\text{L}$  M-MLV RTase 1  $\mu\text{L}$ 、无酶水 4  $\mu\text{L}$ 。混匀反应, 低速离心机短暂离心后  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 反应结束后,  $85^{\circ}\text{C}$  灭活处理 5 min, 然后用无酶水对反应产物稀释 5 倍, 形成 positive cDNA Mix。最后  $-20^{\circ}\text{C}$  保存逆转录产物。③ 定量 PCR 检测: 采用 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒进行定量 PCR 检测, 反应体系: 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), cDNA 1  $\mu\text{L}$ , dH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  30 s、 $95^{\circ}\text{C}$  5 s、( $60^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  10 s) $\times 40$  循环, 于  $72^{\circ}\text{C}$  检测荧光信号。反应结束后, 立即进行熔解曲线分析, 检测条件为  $72^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$  范围内  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{次}$ , 10 s/次,  $30^{\circ}\text{C}$  30 s。所有反应设置 3 个复孔和无模板的阴性对照, 计算 Ct 值, 并以 U6 为内参计算标准化 Ct 值。

#### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 统计软件包处理数据, 计量资料以  $(\bar{x}\pm s)$  表示, 计数资料 (%) 表示。计量资料间两组间  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 并用 LSD 法进行两两比较, 计数资料的比较采用卡方检验。绘制受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 计算血清 miR-122 和 miR-150 水平的 ROC 曲线下面积 (Area under the ROC curve, AUC), 比较 miR-122 和 miR-150 的诊断价值。  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组血清 miR-122 和 miR-150 水平比较

A 组和 B 组血清 miR-122 和 miR-150 的 Ct 值显著低于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 而 A 组和 B 组比较, 均无显著差异 ( $P>0.05$ ), 见表 2。

表 2 3 组血清 miR-122 和 miR-150 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of serum levels of miR-122 and miR-150 in 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	miR-122	miR-150
A 组 ( $n=45$ )	25.36 $\pm$ 1.03	24.74 $\pm$ 1.66
B 组 ( $n=60$ )	25.66 $\pm$ 1.14	24.35 $\pm$ 1.68
C 组 ( $n=50$ )	31.52 $\pm$ 1.63	29.13 $\pm$ 1.36
<i>F</i> 值	364.805	145.540
<i>P</i> 值	0.000	0.000

### 2.2 血清 miR-122 和 miR-150 水平诊断隐匿性乙型肝炎的 ROC 曲线分析

以血清 miR-122 和 miR-150 的 Ct 值作为自变量, 以是否为隐匿性乙型肝炎作为因变量, 绘制 ROC 曲线, 如图 1、表 3。

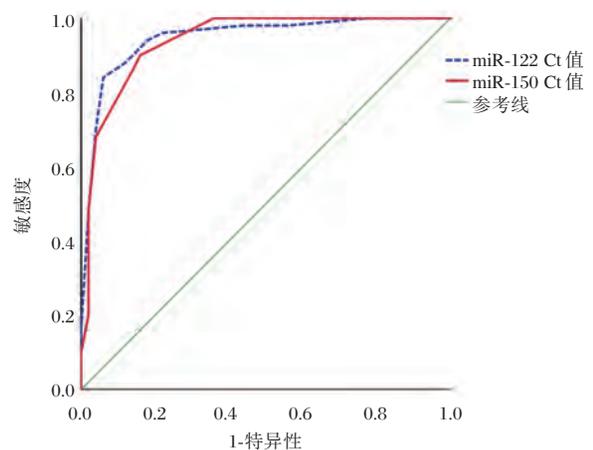


图 1 血清 miR-122 和 miR-150 水平诊断隐匿性乙型肝炎的 ROC 曲线

Figure 1 ROC curves of serum levels of miR-122 and miR-150 in diagnosis of occult hepatitis B

## 3 讨论

microRNA 是近年来肿瘤、传染性疾病等领域的研究热点和重点, 现有研究表明 microRNA 在肿

表3 血清 miR-122 和 miR-150 水平诊断隐匿性乙型肝炎的 ROC 曲线分析

Table 3 Analysis of ROC curve of serum levels of miR-122 and miR-150 in diagnosis of occult hepatitis B

项目	AUC	SE 值	95%CI	Cut-off 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	约登指数 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	符合率 (%)
miR-122	0.949	0.022	0.903~0.991	28	95.56	88.00	83.56	83.67	95.65	91.58
miR-150	0.937	0.024	0.893~0.985	26	91.11	90.00	81.11	89.13	91.84	90.53

瘤发生、进展、治疗等过程中发挥关键作用<sup>[9]</sup>,也有研究显示 microRNA 能够通过影响 HBV 的复制和患者免疫功能,影响乙肝肝硬化和肝癌的发生和发展,如 miR-122、miR-150<sup>[10]</sup>。

miR-122 具有肝脏特异性,在肝脏发育、细胞分化、脂质代谢、应激反应和肝细胞癌的发生进展等过程的信号通路中具有重要的作用。有研究采用基因敲除技术沉默 miR-122 表达,发现乙肝病毒转染的 Huh7 细胞 HBsAg 和 HBeAg 表达显著降低<sup>[11]</sup>。Gao 等<sup>[12]</sup>研究则表明 miR-122 表达下调可造成干扰素表达降低,进而诱导 HBV 感染。miR-122 表达上调能够降低血红素氧化酶 1 表达水平<sup>[13]</sup>,而血红素氧化酶 1 具有抗 HBV 作用,提示 miR-122 表达上调能够抑制 HBV 复制。本研究结果表明,A 组和 B 组患者血清 miR-122 的 Ct 值显著低于 C 组( $P<0.05$ )。

研究发现 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞等免疫细胞中 miR-150 可在感染、肿瘤和自身免疫性疾病等病理状态下呈高表达状态<sup>[12]</sup>。但目前对 miR-150 的研究较少,据现有研究结果可知,miR-150 能够抑制 c-myc 基因表达进而抑制细胞增殖,但 miR-150 在不同肿瘤组织中表达水平有所差异,在子宫内膜癌中高表达,在胃癌中则呈低表达<sup>[14]</sup>。陈渊源研究显示慢性乙型肝炎患者和隐匿性乙型肝炎患者的血清 miR-150 水平与健康者显著高于健康者<sup>[15]</sup>。本研究结果也表明 A 组和 B 组患者血清 miR-150 的 Ct 值显著低于健康者,提示肝炎患者血清 miR-150 水平上调。

本研究采用 ROC 曲线探讨了血清 miR-122 和 miR-150 水平鉴别诊断隐匿性乙型肝炎的效能,结果表明,血清 miR-122 和 miR-150 鉴别诊断隐匿性乙型肝炎的最佳截断 Ct 值分别为 28 和 26,敏感度、特异度分别为 95.56%、88.00% 和 91.58%、91.11%,2 个指标均具有良好的诊断效能。

综上,血清 miR-122 和 miR-150 鉴别诊断隐匿

性乙型肝炎具有良好的敏感性和特异性,可进一步探讨两种 miRNA 在 HBV 感染、复制和乙型肝炎进展中的作用机制,以确定 miR-122 和 miR-150 应用的效能和安全性。

参考文献

[1] 黄象艳,石庆芬,黄涛. 隐匿性乙型肝炎病毒感染研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(5): 688-692.

[2] 陈静娜,李婷婷,王镇,等. 乙型肝炎病毒核心蛋白区突变与隐匿性乙型肝炎病毒感染的相关性[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(4): 533-537.

[3] 蒋菲菲,吕蓉,李敏,等. 华东地区献血者人群隐匿性乙型肝炎病毒感染及 S 区变异分析[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(7):762-766.

[4] 房勇,梁爽,陈思佳,等. 中国北方地区隐匿性肝炎及乙型肝炎表面抗原阴性肝癌患者中隐匿性 HBV 感染流行状况分析[J]. 国际免疫学杂志, 2013, 36(6):472-475.

[5] Coulouarn C, Factor VM Andersen JB, Durkin ME, et al. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties[J]. Oncogene, 2009, 28(40):3526-3536.

[6] Zhang J, Luo N, Luo Y, et al. microRNA - 150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb[J]. Int J Oncol, 2012, 40(3):747.

[7] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(6):384-384.

[8] Ocana S. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterology, 2011, 17(12): 1553-1557.

[9] 徐晓宏,高守宝,王玥,等. miRNA 表达与免疫细胞因子相关性在原发性肝癌早期诊断和预后中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(1):104-108.

## 高灵敏度HBV DNA临床检测应用现状及发展趋势

里进 李一荣\*

**[摘要]** 乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的全球性公共健康问题,相比于传统的HBV DNA检测方法,高灵敏度HBV DNA技术因其检测下限低和线性范围广等优点,近年来受到临床医生的更多关注,许多专家和指南也推荐高灵敏度HBV DNA检测结果作为乙肝病毒核苷酸类药物治疗终点的监测指标。目前,国内外高灵敏度HBV DNA检测试剂种类较多,虽然原理基本类似,但检测效能却不尽相同,且在临床应用的过程中存在一些问题和局限性,本文就目前高灵敏度HBV DNA临床应用的现状做一分析总结,这有助于临床医生和检验同仁们更好地了解高灵敏度HBV DNA检测技术自身的特点,使该技术更好、更规范地应用于临床。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;聚合酶链式反应;高灵敏度;质量控制

### Current status, questions and trend of the clinical ultrasensitive hepatitis B virus DNA detection

LI Jin, LI Yirong\*

(Department of Laboratory Medicine, zhongnan hospital, wuhan university, Wuhan, Hubei, China, 430071)

**[ABSTRACT]** Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious global public health problem. At present, the ultrasensitive HBV DNA detection has increasingly prominent value in clinical diagnosis and decision of hepatitis B. Compared with traditional HBV DNA detection, more clinicians pay attention on the ultrasensitive HBV DNA detection owing to its low detection limit and wide linear range. Many experts and guidelines also recommend ultrasensitive HBV DNA detection as an important indicator of the end treatment-point of anti-HBV nucleotide drugs. At present, there are many kinds of ultrasensitive HBV DNA reagents at home and abroad. Although the principle is basically similar, the detection efficiency is different. Besides, there are many confusions in the process of clinical application. This paper summarizes the current status of clinical application of the ultrasensitive HBV DNA detection, which helps clinicians and laboratory colleagues to better understand the ultrasensitive HBV DNA detection technology.

**[KEY WORDS]** HBV; PCR; ultrasensitive; quality control

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的全球性公共健康问题,全球约20亿人感染过HBV,其中2.57亿人为慢性HBV感染者<sup>[1]</sup>,每年约有65万人死于HBV感染所致的肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)<sup>[2]</sup>。目前,HBV感染的病毒学诊断和监测主要依据免疫学检测和核酸检测,而核酸检测由于可以准确定量,并能实时监测病毒感染状态和抗病毒疗效,因此在乙肝临床诊断和决策中有着突出的临床价值<sup>[3]</sup>。近年来,高灵敏度HBV

基金项目:国家(十三五)科技重大专项课题“湖北及周边省传染病病原谱和流行规律研究”(2017ZX10103005)  
作者单位:武汉大学中南医院检验科,湖北,武汉 430071  
\*通信作者:李一荣, E-mail: liyirong838@163.com

DNA 技术因其检测下限低和线性范围广等优点,越来越受到临床医生的关注,许多专家和指南也将高灵敏度 HBV DNA 检测结果作为乙肝病毒核苷酸类药物治疗终点的重要指标。虽然高灵敏度 HBV DNA 检测目前在临床应用过程中还存在诸多问题,但由于其技术自身的优势,未来将成为 HBV-DNA 检测发展的必然方向。

## 1 高灵敏度 HBV DNA 临床检测应用现状

### 1.1 国内外行业指南

除了指导临床合理停药,高灵敏度 HBV DNA 检测还在术前/输血前筛查<sup>[4]</sup>、化疗/免疫抑制剂治疗监测<sup>[5]</sup>、器官移植病毒残留检测<sup>[6]</sup>以及隐匿性 HBV 感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)检测<sup>[7]</sup>等方面起到了关键性作用,相关行业指南也针对高灵敏度 HBV DNA 检测做了说明(参见表 1):①亚太肝病学会(Asian Pacific Association for the Study of Liver, APASL)在 2015 版的乙型肝炎防治指南中指出对于持续性病毒学应答(sustained virologic response, SVR)患者,当 HBV DNA $\geq$ 100 IU/mL 时判断为 HBV 复发。对于 HBV DNA 低于检测下限的含义,APASL 明确指出高灵敏度 HBV DNA 检测应为 $<$ 12 IU/mL<sup>[8]</sup>;②美国肝病学会(American Association for the Study of Liver

Disease, AASLD)在 2018 版的慢性乙型肝炎防治指南中指出慢乙肝病人乙肝表面抗原阴转后,通常表现较低的 HBV DNA 水平(20~200 IU/mL),如果这类人群始终没能产生乙肝表面抗体,其肝癌发生率和非活动性慢乙肝病人类似<sup>[9]</sup>。AASLD 还给出了几种主要核苷酸类药物治疗的 cut-off 值:恩替卡韦和替诺福韦 $<$ 60 IU/mL 时判断抑制乙肝病毒有效;替诺福韦艾拉酚胺(二代替诺福韦) $<$ 29 IU/mL 时判断抑制乙肝病毒有效;③欧洲肝病学会(European Association for the Study of the Liver, EASL)2017 版的乙型肝炎感染防治指南写到对于高灵敏度 HBV DNA 检测,核苷酸类药物病毒学应答定义为 $<$ 10 IU/mL。EASL 同时指出对于乙肝肝硬化失代偿人群,HBV DNA $>$ 20 IU/mL 患者比 HBV DNA $<$ 20 IU/mL 患者更易发展为肝癌<sup>[10]</sup>;④世界卫生组织(World Health Organization, WHO)2015 版的慢性乙型肝炎感染防治指南规定高灵敏度 HBV DNA $<$ 15 IU/mL 时为未检出 HBV 病毒<sup>[11]</sup>;⑤我国中华医学会肝病学分会 2015 年出版的慢性乙型肝炎防治指南中并未明确指出高灵敏度 HBV DNA 检测的下限,但对于乙型肝炎再活动的定义也是 $\geq$ 100 IU/mL,此外,对于非活动性 HBV 携带者必须满足 HBV DNA 低于检测值下限或 $<$ 200 IU/mL<sup>[2]</sup>。

表 1 各指南关于高灵敏度检测 HBV-DNA 临床应用说明

Table 1 Guidelines for Clinical Application of the ultrasensitive HBV-DNA detection

指南	说明
亚太肝病学会(APASL)2015 版	高灵敏度检测 HBV DNA $<$ 12 IU/mL 时定义为低于检测下限; SVR*患者 HBV DNA $\geq$ 100 IU/mL 时定义为 HBV 复发
美国肝病学会(AASLD)2018 版	恩替卡韦和替诺福韦 $<$ 60 IU/mL 时判断 HBV 抑制有效; 替诺福韦艾拉酚胺(二代替诺福韦) $<$ 29 IU/mL 时判断 HBV 抑制有效
欧洲肝病学会(EASL)2017 版	高灵敏度检测 HBV DNA $<$ 10 IU/mL 时定义为 HBV 抑制药物病毒学应答; 对于乙肝肝硬化失代偿人群,HBV DNA $>$ 20 IU/mL 患者比 HBV DNA $<$ 20 IU/mL 患者更易发展为肝癌
世界卫生组织(WHO)2015 版	高灵敏度检测 HBV DNA $<$ 15 IU/mL 时定义为低于检测下限
中华医学会肝病学分会 2015 版	(没有明确说明) 非活动性 HBV 携带者必须满足 HBV DNA 低于检测值下限或 $<$ 200 IU/mL

\* SVR, Sustained virologic response 持续性病毒学应答

### 1.2 高灵敏度 HBV DNA 试剂

从以上各指南可以看出,国内外专家均高度肯定了高灵敏度 HBV DNA 检测在 HBV DNA 定

量中的意义,这一方面是因为极低水平的 HBV DNA 在部分人群中确实有着重要的临床意义,另一方面也是因为传统 HBV 检测已不能满足目前

临床的需求。正因如此,已有不少针对高灵敏度 HBV DNA 检测的方法学研究报道<sup>[12-14]</sup>,成品的试剂盒也逐渐得到中国食品药品监督管理局(China food and drug administration, CFDA)批准进入我国市场。表 2 列举出几家主要的高灵敏度 HBV DNA 试剂厂家(均经 CFDA 批准),进口试剂有 3 家,国产试剂有 5 家。由于磁珠法核酸提取效率最高,这 8 家高灵敏度试剂厂家均采取了磁珠法提取 HBV 核酸。此外,这 8 家试剂厂家 HBV 检测灵敏度也都能达到 10~15 IU/mL,不少试剂可以达到 10 IU/mL,但是在一些关键参数上各有不同,主要体现在以下几点:①血清/血浆提取量:国外试剂基本取 0.5 mL 血清/血浆做核酸提取,国内只有复星一家试剂提取量>0.5 mL,血清/血浆提取体积越大纳入的 HBV DNA 载量也越大,假阴性率越低;②上样量:上样量指的是加入到 PCR 体系中的 HBV 核酸洗脱液体积,目前只有罗氏和圣湘两家

试剂可将提取好的全部核酸连同磁珠一起上 PCR 仪扩增,其他产品只能将提取的部分核酸(20~40  $\mu$ L)进行 PCR,因此存在丢失核酸的风险,核酸丢失会使 PCR 结果产生偏差而偏离真实值;③HBV 基因型覆盖度:有少数几家基因型覆盖不全,对特殊基因型有漏诊的风险;④内标:除罗氏是定量内标外,其他厂商试剂内标都属于竞争性内标/非竞争性内标,不参与定量,也不能监控各管的扩增效率,如果样本中存在黄疸、溶血等干扰因素,将对结果产生一定的影响;⑤成本差异:罗氏公司 COBAS HBV DNA 高灵敏度试剂因其性能优异,是国内外同行公认的参比试剂,但其成本过于昂贵,患者难以承受,临床使用较少。相比之下国内试剂及耗材成本低廉,仪器通用性好,在许多医院也得到了应用。因此,虽然这些试剂都称作高灵敏度 HBV DNA 检测,但在检验效能上还是存在一定的差异。

表 2 部分高灵敏度 HBV-DNA 试剂生产厂家对比

Table 2 Comparison of these different ultrasensitive HBV-DNA detection reagents

生产厂家	规格 (人份)	样本量 ( $\mu$ L)	上样量 ( $\mu$ L)	灵敏度 (IU/mL)	线性范围 (IU/mL)	内标	覆盖 基因型	核酸 提取方法
罗氏	72	500 血清血浆	含磁珠 全部 上样	10	20 ~ 1.7 $\times$ 10 <sup>9</sup>	定量内标	A-H 及前 C 突变型	磁珠法(加热)
雅培	24 或 48	500 血清血浆 /200 血清血浆	50/20	10-15	20 ~ 1 $\times$ 10 <sup>9</sup>	竞争性内标	A-H	磁珠法(常温)
PerkinElmer	48	400 血清血浆	40	10	20 ~ 1 $\times$ 10 <sup>9</sup>	非竞争性内标	A-H	磁珠法(常温)
达安	48 24/48	400 血清血浆 /200 血清血浆	40/20	10	20 ~ 1 $\times$ 10 <sup>9</sup>	竞争性内标	A-H	磁珠法(加热)
圣湘	48	200 血清	含磁珠 全部 上样	10	20 ~ 2 $\times$ 10 <sup>9</sup>	竞争性内标	A-H	磁珠法(常温)
天隆	32	200 血清血浆	20	10	30 ~ 1 $\times$ 10 <sup>8</sup>	竞争性内标	A-D	磁珠法(加热)
东北制药	48	200 血清血浆	20	10	30 ~ 3 $\times$ 10 <sup>8</sup>	竞争性内标	B、C、D	磁珠法(常温)
复星	32	600 血清	20	15	100 ~ 1 $\times$ 10 <sup>9</sup>	竞争性内标	A、B、C、D	磁珠法(常温)

## 2 高灵敏度 HBV DNA 临床检测应用过程中的问题及对策

### 2.1 核酸污染

高灵敏度核酸检测对临床基因扩增(PCR)实验室来说犹如“达摩克利斯之剑”,虽然拥有极高

的检出能力,但也有着无法回避的问题,这个问题就是检测结果容易受核酸污染的影响<sup>[15-16]</sup>。核酸污染会导致假阳性结果,一旦发生,围绕整个 PCR 实验室寻找污染源是一件十分耗时、耗力的事情。轻度核酸污染要终止实验,待污染清除之后再开始,重度核酸污染可能需要更换设备、仪器

甚至场地。PCR实验室最常见的污染源是气溶胶(aerosol),产生气溶胶最主要的操作环节是提取和扩增步骤<sup>[17]</sup>。有研究报道一个 $10^9$  copies扩增产物其产生的最小气溶胶中靶序列核酸含量也有 $10^6$  copies<sup>[18]</sup>。如果气溶胶污染不加控制,在相对较短的时间内,气溶胶中的核酸产物就可能污染移液器、试剂、设备、桌面地面、生物安全柜以及整个通风系统<sup>[19]</sup>。因此,各开展高灵敏度HBV DNA检测的单位应对核酸污染防控应给予高度重视,相应的标准操作规程(standard operating procedures, SOP)要严于普通HBV DNA检测流程。

以下结合我单位的工作经验,列举几点主要注意事项:①高灵敏度核酸检测建议在全自动封闭式核酸提取系统中进行,样本提取纯化后自动转移至扩增检测系统,整个过程未经任何开盖操作,可最大限度的防止气溶胶的产生;②全自动核酸提取系统建议单独一间房间使用,不应与普通HBV DNA检测共用一间房间,因为普通核酸提取多采用煮沸法,极易产生气溶胶,造成交叉污染;③选用含有UNG酶/dUTP防污染体系的试剂,这类试剂盒以dUTP取代dTTP,所以PCR产物都含有dU碱基。PCR开始前增加 $50^{\circ}\text{C}$  2 min步骤,UNG酶即可特异性地将反应体系中残留U-DNA污染物序列降解,并在 $95^{\circ}\text{C}$ 时被灭活,不会再降解新扩增的产物U-DNA,从而保证扩增结果的特异性和准确性。④实验前、实验后常规消毒、紫外线照射,每天实验前用75%酒精擦拭需要使用的移液器和设备,实验后用喷壶对全房空气喷洒75%酒精,用含氯量500 mg/L的84消毒液拖地,用75%酒精擦拭使用过的移液器、桌面和设备,可有效消除和防控气溶胶的污染;⑤定期监控,可将多个装有纯净水的Ep管打开静置于提取及扩增检测区30~60 min,同时用沾水的棉签擦拭使用过的移液器、桌面和设备,将这些监控物同样本一样提取上机扩增,若为阳性则说明实验室有核酸污染的存在。⑥其他方面,如实验室分区设计、人员物品流向、空气流向、扩增产物处理等按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》执行<sup>[20]</sup>。

## 2.2 行业监管及标准

目前,高灵敏度HBV DNA检测国内外暂没有统一的行业标准,国际标准化组织(International

Organization for Standardization, ISO)针对临床PCR实验室最新一版管理文件CNAS-CL02-A009:2018也没有相关说明和要求<sup>[21-22]</sup>。室内质控、试剂盒性能验证、精密度与正确度的判定、抗干扰能力等相关质量管理程序都处在空缺的状态。此外,临床基因扩增实验室评审和省部级临检中心也没有涉及高灵敏度HBV DNA检测的项目,这都为高灵敏度HBV DNA检测标准化管理带来了不少难度。尽管行业监管及标准缺如,但开展高灵敏度HBV DNA检测的单位却越来越多,从第三方检测机构、医院检验科到各小型实验室都有,报告单上虽然都标注的是高灵敏度HBV DNA检测,但背后的质量却参差不齐。因此,尽快形成一个高灵敏度HBV DNA检测的行业标准是一件迫在眉睫的事情。

## 3 高灵敏度HBV DNA检测发展趋势

从表1可以看出,部分指南将高灵敏度HBV DNA检测下限定在10~15 IU/mL,虽然本文列举的产品灵敏度能达到10 IU/mL,但这些试剂检测下线多在20 IU/mL,这意味着10~20 IU/mL的样本多数情况下是测不准的,因此,目前的试剂检测性能离各专业学会的指南要求还有一定的差距,需继续发展新的检测技术(如数字PCR, digital PCR)去探寻更低的检测下限。例如,Liu Y等人将罗氏COBAS TaqMan方法与数字PCR方法同时检测替诺福韦治疗后的人群发现,罗氏COBAS是无法区分 $<58$  copies/mL的患者,而数字PCR检测能力可以低至8 copies/mL<sup>[23]</sup>(1 IU/mL $\approx$ 5.3 copies/mL<sup>[11]</sup>)。Hui Tang等人利用pAAV/HBV 1.2质粒发现数字PCR方法的检测上线是 $10^5$  copies,而下限甚至达到1 copy<sup>[24]</sup>。最近,鲁凤民等人建立了一种跨缺口数字PCR技术,不但可以高灵敏度的检测HBV DNA载量,还可以特异性检测隐匿性乙肝人群(OBI)中有HBV复制能力的病毒核酸片段(松弛环状双链DNA, rcDNA和共价闭环状DNA, cccDNA),从而更加精准的评估OBI人群的预后<sup>[7]</sup>。

随着新技术的出现,HBV DNA检出能力会越来越高,但这并不意味着每个乙肝患者都需要高灵敏度HBV DNA检测。国内外指南虽然对慢性乙型肝炎抗病毒治疗的诊断标准不同,但对于HBV DNA的治疗水平都基本一致,例如对于

表3 各指南关于慢性乙型肝炎抗病毒治疗的指征

Table 3 The recommendations for antiviral treatment of chronic hepatitis B in the guidelines

指南	慢性乙型肝炎抗病毒治疗指征
亚太肝病学会(APASL) 2015版	① HBV DNA $\geq$ 20 000 IU/mL (HBeAg 阳性) 或 HBV DNA $\geq$ 2 000 IU/mL (HBeAg 阴性); ② HBV DNA $\geq$ 2 000 IU/mL, 晚期纤维化或肝硬化
美国肝病学会(AASLD) 2018版	① HBV DNA > 20 000 IU/mL (HBeAg 阳性) 或 HBV DNA > 2 000 IU/mL (HBeAg 阴性); ② HBV DNA > 2 000 IU/mL, 肝硬化, 不考虑 ALT 水平;
欧洲肝病学会(EASL) 2017版	③ HBV DNA < 2 000 IU/mL, 成人, 代偿性肝硬化 ① HBeAg 阳性或 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎定义为 HBV DNA > 2 000 IU/mL; ② HBeAg 阳性或 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者, HBV DNA < 2 000 IU/mL, ALT 正常或轻微的肝脏疾病, 有肝细胞肝癌或肝硬化家族史
英国国家卫生保健研究院(NICE) 2013版	① HBV DNA > 2 000 IU/mL 且 ALT 水平异常; ② 肝硬化, 不考虑 HBeAg 状态, 可检测到 HBV DNA
世界卫生组织(WHO) 2015版	ALT 水平持续异常, HBV DNA > 20 000 IU/mL, 不考虑 HBeAg 状态
中华医学会肝病学分会 2015版	HBV DNA $\geq$ 20 000 IU/mL (HBeAg 阳性) 或 HBV DNA $\geq$ 2 000 IU/mL (HBeAg 阴性)

HBeAg 阳性(大三阳)患者, 中国、亚太和美国指南建议 HBV DNA  $\geq$  20 000 IU/mL, HBeAg 阴性(小三阳)患者 HBV DNA  $\geq$  2 000 IU/mL 需接受抗病毒治疗; 欧洲和英国指南较为谨慎, 不考虑 HBeAg 状态, 其 HBV DNA > 2 000 IU/mL 则需要接受抗病毒治疗<sup>[25-26]</sup>(各指南建议的慢性乙型肝炎抗病毒治疗指征参见表3)。由此可见, 对于大多数慢性乙肝患者抗病毒治疗的初期是不需要使用高灵敏度 HBV DNA 检测, 仅在评估停药时间点上需要使用到高灵敏度 HBV DNA。因此, 临床医生可根据患者的病情, 选择合适的方法去检测, 如当 HBV DNA > 2 000 IU/mL 时, 性价比高的普通 HBV DNA 检测仍然是可靠的; 当 HBV DNA < 500 IU/mL (传统 HBV DNA 检测下限) 时, 亦或是特殊乙肝人群(输血、移植、隐匿性感染等), 敏感度更高的高敏 HBV DNA 检测技术才能体现其价值。

#### 4 总结

在“精准医学, 精准治疗”的时代背景下, 高灵敏度 HBV DNA 检测是大势所趋。在保证检测质量的前提下, 高灵敏度 HBV DNA 检测项目如能进一步降低成本并纳入医保, 将必然取代传统乙肝病毒核酸检测方法。虽然目前这一领域还存在不少问题和瓶颈, 但随着技术的进步和学术机构

的推广, 相信以高灵敏度 HBV DNA 检测为代表的感染性病原体精准检测将逐步规范并广泛应用于临床, 最终造福每一位患者。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B [A]. WHO Fact Sheet (Updated July 2018).
- [2] 王贵强, 王福生, 成军, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 19(5): 1-18.
- [3] Lai MW, Lin TY, Tsao KC, et al. Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination [J]. Gastroenterology, 2012, 143(2): 400-407.
- [4] Candotti D, Boizeau L, Laperche S. Occult hepatitis B infection and transfusion-transmission risk [J]. Transfus Clin Biol, 2017, 24(3): 189-195.
- [5] Hwang JP, Anna S-F L. Management of patients with hepatitis B who require immunosuppressive therapy [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(4): 209.
- [6] Loomba R, Liang TJ. Hepatitis B Reactivation Associated With Immune Suppressive and Biological Modifier Therapies: Current Concepts, Management Strategies, and Future Directions [J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1297-1309.

- [7] 鲁凤民, 廖昊, 刘永振, 等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染再认识[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(5): 445-449.
- [8] Sarin SK, Kumar M, Lau GK, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update[J]. *Hepatology*, 2016, 10(1):1-98.
- [9] Terrault NA, Lok AS, McMahon BJ, et al. Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment and of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4).
- [10] Liver EAftSot. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):370-398.
- [11] Organization WHO. Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection[A]. WHO, 2015.
- [12] 余学高, 邓间开, 何小洪, 等. HBV DNA 高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):111-116.
- [13] 陈小颖, 龙璐, 李琼, 等. 基于 Pre-NAT 全自动核酸提取平台的高敏 HBV DNA 检测性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(10): 696-700.
- [14] Wu B, Xiao F, Li P, et al. Ultrasensitive detection of serum hepatitis B virus by coupling ultrafiltration DNA extraction with real-time PCR [J]. *Plos One*, 2017, 12(2): e0170290.
- [15] Sefers S, Schmitz J E. Molecular contamination and amplification product inactivation [M]. *Adv Techniq in Diag Microbiol*. Springer, Cham, 2018: 505-526.
- [16] 李金明. 实时荧光 PCR 技术(第2版)[M]. 2018.
- [17] 张瑞, 李金明. 涉及基因扩增的个体化医学检测质量保证的重要性[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(11): 963-966.
- [18] Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-Positive Results and Contamination in Nucleic Acid Amplification Assays: Suggestions for a Prevent and Destroy Strategy [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23(4): 289-299.
- [19] Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, 34(4): 389.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》[A]. 卫办医政发[2010]2194号.
- [21] 中国合格评定国家认可委员会. 《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》[A]. CNAS-CL02-A009: 2018.
- [22] 中国合格评定国家认可委员会. 《分子诊断检验程序性能验证指南》[A]. CNAS-GL039: 2019.
- [23] Liu Y, Cathcart AL, Kitrinis KM. Development of a digital droplet PCR assay to measure HBV DNA in patients receiving long-term TDF treatment [J]. *J Virol Methods*, 2017, 249: 189.
- [24] Tang H, Cai Q, Li H, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(11): 2159-2164.
- [25] 刘红, 吴疆. 国内外慢性乙型肝炎防治指南比较: 抗病毒治疗诊断标准和治疗方案[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018, 10(01): 15-22.
- [26] Sarri G, Westby M, Bermingham S, et al. Diagnosis and management of chronic hepatitis B in children, young people, and adults: summary of NICE guidance [J]. *Bmj*, 2013, 346(f3893): f3893.

(上接第421页)

- [10] Carey I, Shang D, Bruce M, et al. HBV/HDV co-infection microRNA profile: downregulation of anti-inflammatory and upregulation of pro-apoptotic and viral replication mircoRNAs is associated with HDV RNA replication and HBsAg levels [J]. *J Hepatology*, 2017, 66(1):S487-S488.
- [11] Ma J, Wu Q, Zhang Y, et al. MicroRNA sponge blocks the tumor-suppressing functions of microRNA-122 in human hepatoma and osteosarcoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6):2744.
- [12] Gao W, He H W, Wang Z M, et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease [J]. *Lipids Health Dis*, 2012, 11(1):55.
- [13] Qiu L, Fan H, Jin W, et al. miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(4):771-777.
- [14] Xiao C, Calado D P, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb[J]. *Cell*, 2007, 131(1):146-159.
- [15] 陈渊源. 血清 miRNA 表达谱用于隐匿性乙型肝炎诊断的研究[D]. 南京:南京大学, 2012.

## 高敏 HCV RNA 检测技术的临床应用

刘娜 李春霞 东冰 周路路 张瑞芹 徐光华\*

**[摘要]** 丙型肝炎病毒(HCV)感染已成为全球面临的公共卫生问题。抗-HCV是HCV感染的初筛指标,但其缺点是窗口期较长,易出现假阴性结果,且不能准确判别是感染的状态。HCV RNA是HCV感染确诊的直接指标,但国内常规的PCR技术由于最低检测限为500~1 000 IU/mL,故不能满足临床的需求。超敏HCV RNA检测技术可实现较低水平的检测下限(12~15 IU/mL),可实现对HCV感染的早筛查、早诊断。故超敏HCV RNA检测技术具有较高的临床应用价值。

**[关键词]** 丙型肝炎病毒; 诊断; 病毒载量; 超敏

### Clinical application of hypersensitive HCV RNA detection technology

LIU Na, LI Chunxia, DONG Bing, ZHOU Lulu, ZHANG Ruiqin, XU Guanghua\*

(The Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shanxi, China, 716000)

**[ABSTRACT]** Hepatitis C virus (HCV) infection has become a public health problem worldwide. The presence of anti-HCV antibody is an indicator for HCV blood screening. But anti-HCV testing is prone to generate negative results due to the relatively long window period and cannot accurately discriminate the states of infection. HCV RNA is the direct evidence for the presence of HCV infection. However, the domestic conventional PCR technology cannot meet the clinical needs due to the minimum detection limit of 500~1 000 IU/mL. Hypersensitive HCV RNA detection technology enables lower levels of detection (12~15 IU/mL) and early screening and early diagnosis of HCV infection. Therefore, the hypersensitive HCV RNA detection technology has high clinical application value.

**[KEY WORDS]** Hepatitis C virus; Diagnosis; Viral load; hypersensitive detection

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是引起全球慢性肝病的主要原因之一<sup>[1]</sup>。2015年世界卫生组织(WHO)估计全世界约有7 100万慢性丙型肝炎(Chronic hepatitis C, CHC)患者(全球流行率:1%)<sup>[1-2]</sup>;2006年全国血清流行病学调查显示我国1~59岁人群抗-HCV流行率为0.43%<sup>[3]</sup>。HCV感染具有隐匿性,且高度慢性化(慢性化率为55%~85%<sup>[3]</sup>),20%~30%的CHC患者会在20~30年内发展为肝硬化,而发展为肝硬化的患者肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的年发生率为2%~4%<sup>[4]</sup>。基于此,WHO发布了病毒性肝

炎的全球战略,即在2030年之前将丙型肝炎的新发感染率下降90%,死亡率下降65%;要求90%的感染者得到诊断,80%被确诊患者得到治疗<sup>[5]</sup>。然而在目前7 100万CHC患者中,只有1 400万人(20%)被诊断(70%的差距);在1 400万被诊断的患者中,只有110万人(7%)开始接受治疗(73%的差距)<sup>[6]</sup>。随着2014年sofosbuvir(SOF)的上市,丙肝成为一种可以治愈的疾病<sup>[7]</sup>。故现阶段,早筛查、早诊断对于丙肝的防控尤为重要。目前,国内外主要以抗-HCV的筛查试验和HCV RNA的确认试验来诊断HCV感染。抗-HCV检测窗口期

作者单位:延安大学附属医院,陕西,延安716000

\*通信作者:徐光华, E-mail:yaxugh@163.com

较长(8~12周的窗口期,部分患者甚至可长达5~8个月<sup>[8]</sup>)、无法区分既往感染与现症感染,且易出现假阳性、假阴性结果;而国内常规的PCR技术虽能区分既往感染与现症感染,但由于最低检测限为500~1 000 IU/mL,故不能满足临床的需求。高敏HCV RNA检测因其灵敏度高、特异性强、线性范围宽、携带污染低、检测反应时间短、自动化程度高等优点,可实现对HCV感染的精准诊治,因此具有巨大的临床应用前景。

## 1 高敏HCV RNA检测技术的概述

实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time, PCR)融汇了PCR高敏感性、探针杂交高特异性和光谱检测高精确性等技术优点,被认为是检测HCV RNA定量的标准方法<sup>[9]</sup>。市面上现有多种FQ-PCR检测技术。国内传统的非高敏FQ-PCR检测技术由于线性范围窄、灵敏度低,最低检测限为500~1 000 IU/mL,在HCV RNA载量较低时往往难以检出,特别是不能检测低于检测下限(limit of detection, LOD)的阳性样本,故无法满足临床检测需求。高敏PCR检测技术应用全自动核酸提纯及荧光PCR分析系统的HCV RNA定量检测性能,实现了提取和扩增的全程自动化,在提取试剂中加入内标,可与样本同时进行提取和扩增,实现全程监控实验进程,有效地避免了假阴性结果;利用磁珠法提取可增加反应体积;对扩增体系进行了优化(见图1所示)。且其检测结果采用国际单位(IU)/mL表示(WHO制定的统一标准)<sup>[10]</sup>。目前已在临床广泛应用的2种高敏HCV RNA检测方法分别是雅培Abbott RealTime(ART)m2000 PCR仪(线性范围:12~1×10<sup>8</sup> IU/mL)

和罗氏COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan2.0(CAP/CTM2)全自动病毒载量仪(线性范围:15~1×10<sup>8</sup> IU/mL)<sup>[11]</sup>,均可实现较低水平的LOD。高敏HCV RNA的检测结果可以用4种不同的方式来报告:①目标未检测出:HCV的Ct值未达到含量测定限值或者未检出HCV的Ct值,报告结果有时也表示为“target not detected”或“undetectable”;②可检测/不可量化:可检测到HCV RNA,但计算的IU/mL值低于测定的定量下限(lower limit of quantification, LLOQ),报告结果为HCV RNA<12 IU/mL(ART)或<15 IU/mL(CAP/CTM2);③具体特定值:在相应的测定线性范围内,即≥LLOQ且≤定量上限(upper limit of quantification, ULOQ),报告结果为具体的数值的IU/mL;④>ULOQ,计算结果超过了测定的线性范围,报告结果为HCV RNA>10<sup>8</sup> IU/mL(ART或CAP/CTM2);如果希望得到定量结果,原始的标本需要按要求稀释后重复测试。谷金莲等<sup>[12]</sup>通过比较国产试剂与罗氏进口试剂对HCV RNA的检测性能,发现3种国产HCV RNA定量试剂的阳性检出率11.51%~14.80%,均显著低于进口试剂的阳性检出率(26.97%),而国产试剂检测漏检的样本主要分布在HCV RNA<50 IU/mL的检测下限中。目前国内指南均建议应用采用灵敏度和精确度更高的FQ-PCR方法定量检测HCV RNA<sup>[3,10,13-14]</sup>。

## 2 高敏HCV RNA检测技术的临床应用

随着分子生物学诊断方法的不断革新,近年来,高敏HCV RNA检测技术已经逐渐被应用于临床中,且临床应用优势越来越明显。

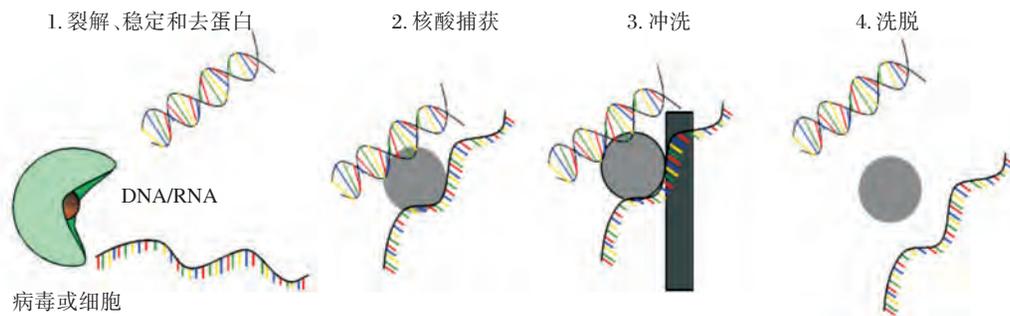


图1 磁珠分离技术

Figure 1 Magnetic bead separation technology

## 2.1 在急性慢性丙型肝炎诊断中的应用

抗-HCV在大多丙型肝炎患者中均可测定,但由于窗口期较长,一般为8~12周的部分患者甚至可长达5~8个月<sup>[8]</sup>,故对于急性丙型肝炎(acute hepatitis C, AHC)患者可出现抗-HCV阴性<sup>[3]</sup>,不能完全满足早期筛查的要求。而血清中HCV RNA出现较早,暴露HCV后约1周在外周血中即可检测到HCV RNA<sup>[15]</sup>;且由于抗-HCV仅反映HCV是否感染的主要指标,不能区分HCV是现症感染还是已被清除,特别对于18个月以下的婴幼儿,只有通过检测HCV RNA,才能明确感染的状态,因为经过胎盘的母体抗-HCV可在婴幼儿血液里保持18个月<sup>[10]</sup>。高敏HCV RNA检测技术不但可以缩短检测窗口期,而且对于抗-HCV阳性的婴幼儿可实现精准诊断。HCV感染的精准筛查非常重要,不仅可以降低传播率,而且对于AHC患者早期抗病毒治疗可以取得更高的应答率<sup>[16]</sup>。研究证实,对于AHC患者早期应用DAAs治疗后不仅可以改善临床结局,而且与推迟治疗到CHC阶段相比,具有很高的成本效益<sup>[17]</sup>。抗-HCV由于本身技术的局限性在临床中易出现假阳性、假阴性结果(重组蛋白纯度不足、骨髓瘤、类风湿性关节炎、自身免疫性肝炎等患者可出现抗HCV假阳性<sup>[18-19]</sup>,而血液透析和免疫功能缺陷或合并HIV感染者可出现抗-HCV假阴性<sup>[20]</sup>);尽管第三代ELISA试剂的特异性已达99%<sup>[21]</sup>,但在低危险人群的假阳性率高达15%~60%(平均35%)<sup>[22]</sup>。目前大多数实验室对于丙肝的筛查采用两步方法,第一步做抗-HCV检查,当抗体阳性后第二步做HCV RNA检测,故易出现漏诊,特别是那些高感染风险(注射吸毒者、艾滋病病毒抗体阳性的男男性行为无保护<sup>[13]</sup>)以及抗-HCV高流行地区,建议有条件尽可能行高敏HCV RNA检测<sup>[23]</sup>;对于那些免疫功能低下的抗-HCV阴性者,也应积极进行HCV RNA检测<sup>[24]</sup>。早在2009年美国肝脏病研究协会(AASLD)就指出在高危人群中应用敏感的方法筛查和诊断丙型肝炎病毒感染的重要性<sup>[20]</sup>。研究表明,感染基因型1和6的患者HCV RNA往往高于基因型2或3的患者<sup>[25]</sup>,故对于基因型2或3的低病毒载量患者更建议应用高敏HCV RNA检测技术进行评估,因为低水平病毒复制仍可能引起肝脏的持续损伤,进而引起肝纤维化、肝硬化甚至HCC,常规

的PCR技术就可能使患者错过最佳的抗病毒治疗时机。此外,2015年国家开始对抗-HCV阴性献血员筛查HCV RNA,经输血和血制品传播已很少发生,而高敏的HCV RNA检测仍可发现隐匿性感染病例。因此,应用高敏HCV RNA检测技术是精准诊断急性慢性丙型肝炎的重要保障。

## 2.2 在判定抗-HCV灰区标本是否感染中的应用

在抗-HCV免疫测定中,结果判断是根据被检测物的吸光度值(Signal)同诊断界值(Cutoff, CO)的比值(Signal-to-Cutoff, S/CO)来决定的。由于检测技术本身问题,CO值临界范围内的测定结果难以明确判断是阴性还是阳性,被界定为灰区。ELISA方法检测抗-HCV一般将 $S/CO \geq 1$ ,判断为反应阳性; $S/CO < 1$ ,则判断为阴性<sup>[26]</sup>。闵少菊等人<sup>[27]</sup>对183例处于ELISA灰区( $0.7 \leq S/CO < 1$ )的标本进行了HCV RNA检测(国产达安试剂),3例HCV RNA阳性。而第三代免疫分析仪Architect i2000化学发光微粒子免疫分析(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)方法检测抗-HCV一般将 $S/CO > 5$ ,判断为反应阳性; $S/CO < 1$ ,则判断为阴性。有人将处于Architect i2000检测灰区的标本( $1 \leq S/CO \leq 5.2$ )进一步行高敏HCV RNA( $LOD \leq 30$  IU/mL),阳性率为0.75%(5/665)<sup>[28]</sup>;杜丽枝等人<sup>[29]</sup>也将Architect i2000检测抗-HCV阳性灰区标本( $1 \leq S/CO \leq 5$ )进一步行高敏HCV RNA检测( $LOD \leq 25$  IU/mL),阳性率为0。可见,由于免疫测定技术本身的局限性,抗-HCV的假阳性结果在一定程度上会给受检者带来不必要的就医和心理压力。此外,由于灰区临界值设置尚未统一化、标准化,合格血液有可能被判定为抗-HCV阳性而报废处理,不利于血液的合理、有效地利用;不合格的血液有可能被判定为抗-HCV阴性造成受血者有输血传播性感染(TTI)的风险。可见,确定合适的诊断界值对减少假阳性和假阴性的出现均有重要意义,若误诊会加重患者的心理负担,甚至引起医疗纠纷。因此,高敏HCV RNA检测为精准判定灰区样本是否存在HCV感染提供了有效依据。

## 2.3 在抗病毒应答及停药中的应用

有效抗病毒治疗不一定会造成抗-HCV阴转,即使感染治愈后抗-HCV可持续阳性。HCV RNA定量检测适用于HCV现症感染的确认、抗病毒治疗前基线病毒载量分析,以及抗病毒治疗过程中

及治疗结束后的应答评估<sup>[3]</sup>。精准的 HCV RNA 定量检测对 HCV 感染的治疗意义重大,有助于预测治疗效果、判断停药时机以及评估治疗结局。在干扰素治疗时代,特别强调应答指导治疗(response-guided treatment, RGT)的概念,即在治疗前及治疗 4、12 和 24 周应采用高敏 FQ-PCR 方法监测 HCV RNA,根据治疗期间 HCV RNA 的水平早期评估对干扰素的应答情况,以确定治疗的疗程<sup>[30]</sup>。对于实现快速病毒学应答(rapid virological response, RVR)的患者考虑疗程可缩短为 24 周(基因 1 型或 4 型)或 12~16 周(基因 2 型或 3 型)<sup>[3, 31-32]</sup>。RGT 有助于提高 Peg-IFN 的持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)率和降低不良反应率<sup>[14]</sup>,还可以减轻患者的经济负担和精神负担。国产试剂检测的灵敏度较低,可能会导致一些部分早期病毒学应答(partial EVR, pEVR)患者被误判为完全早期病毒学应答(complete EVR, cEVR),未将疗程再延长 24 周,可能导致复发率升高。王剑等人<sup>[33]</sup>通过对比国产试剂与 Roche COBAS TaqMan 试剂的 Peg-IFN/利巴韦林(RBV)的应答率,发现国产试剂判定 RVR 的假阴性率为 37.3% (28/75), EVR 的假阴性率为 20.8% (5/24)。在 DAAs 治疗时代,精准检测 HCV RNA 水平对个体化诊疗方案的制定也有一定的意义。对于未治疗、非肝硬化、基因 1 型的患者,应用 ledipasvir(LDV)和 sofosbuvir(SOF)治疗时只要基线 HCVRNA 水平  $<6.8\log_{10}$  IU/mL,就可将治疗时间从 12 周缩短到 8 周<sup>[34]</sup>。缩短疗程后可降低高成本的治疗费用、防止 DAAs 的副作用、减少药物的相互作用(drug-drug interactions, DDIs)<sup>[11]</sup>。由于大多数患者应用 DAAs 治疗后,早期就可获得病毒学应答,但在治疗第 2 周、第 4 周和治疗结束时检测高敏 HCV RNA 水平,可以实时掌握患者的依从性和治疗效果<sup>[14]</sup>。有研究发现 SOF/RBV 治疗基因型 1 的 CHC 中,治疗 2 周时,复发患者与 SVR 患者 HCV RNA 水平差异最大<sup>[35]</sup>。因此精准的掌握 HCV RNA 定量可预测患者 SVR 率,识别易治和难治的患者,特别在某些难治的患者群中,包括晚期肝硬化、HCV 基因型 3 的患者,治疗早期 HCV RNA 的变化是治疗结果的有效预测因素<sup>[36-38]</sup>。判断抗 HCV 治愈的标准是通过 SVR 来判断,被定义为在治疗结束后 12 周(SVR12)或 24 周(SVR24)中检测不到 HCV RNA, LOD 需  $\leq 15$  IU/mL<sup>[16]</sup>,因为超过 99%的 SVR 患者

不会复发<sup>[39]</sup>。有研究报称在治疗结束时,经常规 PCR(检测限为 50~100 IU/mL)检测阴性的血清标本中,应用雅培 ART 技术检测高敏 HCV RNA 后 13.8% (28/202)为阳性,殊不知这种微量残留的病毒血症对治疗后的病毒学复发有很高的预测作用<sup>[40]</sup>。

总之,国内传统的非高敏 FQ-PCR 检测技术 HCV RNA 定量已逐渐不能满足临床的需求,而高敏 HCV RNA 检测可精准评估 HCV RNA 水平,是 HCV 感染者个体化诊疗的基石,是实现 HCV 感染诊疗并重、精准治愈的重要工具,也符合国内外指南对 HCV RNA 定量检测的要求,故具有较高的临床应用价值,值得推广应用。

### 参考文献

- [1] Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study [J]. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 2017, 2 (3): 161-176.
- [2] Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study [J]. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 2017, 2 (5): 325-336.
- [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 更新版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 906-923.
- [4] LEE MH, YANG HI, YUAN Y, et al. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection [J]. *World journal of gastroenterology*, 2014, 20 (28): 9270-9280.
- [5] WARD JW, HINMAN AR. What is Needed to Eliminate Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus as Global Health Threats [J]. *Gastroenterology*, 2019, 152(2): 297-310.
- [6] HUTIN YJ, BULTERYS M, HIRNSCHALL GO. How far are we from viral hepatitis elimination service coverage targets? [J]. *Journal of the International AIDS Society*, 2018.
- [7] PAWLOTSKY JM, FELD JJ, ZEUZEM S, et al. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure [J]. *Journal of hepatology*, 2015, 62(1 Suppl): S87-99.
- [8] SWELLAM M, MAHMOUD MS, ALI AA. Diagnosis of hepatitis C virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcriptase - nested

- polymerase chain reaction: a comparative evaluation [J]. *IUBMB life*, 2011, 63(6): 430-434.
- [9] POLJAK M, LEPEJ SZ, RODE OD. [Recent developments in serologic and molecular diagnosis of hepatitis B and C] [J]. *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 2013, 67(4): 281-290.
- [10] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee [M]. *Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection*. Geneva; World Health Organization. 2018.
- [11] MAASOUMY B, VERMEHREN J. Diagnostics in hepatitis C: The end of response - guided therapy? [J]. *Journal of hepatology*, 2016, 65(1 Suppl): S67-s81.
- [12] 谷金莲, 于洋, 梁争论. 3种国产丙型肝炎病毒核酸定量与罗氏试剂检测性能的初步评价[J]. *中国病毒病杂志*, 2013, 3(6): 445-449.
- [13] Hepatitis C guidance: AASLD - IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2015, 62(3): 932-954.
- [14] EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015 [J]. *Journal of hepatology*, 2015, 63(1):199-236.
- [15] BUSCH MP, GLYNN SA, STRAMER SL, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors [J]. *Transfusion*, 2005, 45(2): 254-264.
- [16] EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018 [J]. *Journal of hepatology*, 2018, 69(2): 461-511.
- [17] BETHEA ED, CHEN Q, HUR C, et al. Should we treat acute hepatitis C? A decision and cost-effectiveness analysis [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2018, 67(3): 837-846.
- [18] BERGER A, RABENAU H, ALLWINN R, et al. Evaluation of the new ARCHITECT anti-HCV screening test under routine laboratory conditions [J]. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2008, 43(2): 158-161.
- [19] ALTER MJ, KUHNERT WL, FINELLI L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention [J]. *MMWR Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*, 2003, 52(Rr-3): 1-13.
- [20] GHANY MG, STRADER DB, THOMAS DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2009, 49(4): 1335-1374.
- [21] COLIN C, LANOIR D, TOUZET S, et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature [J]. *Journal of viral hepatitis*, 2001, 8(2): 87-95.
- [22] ROOME AJ, HADLER JL, THOMAS AL, et al. Hepatitis C virus infection among firefighters, emergency medical technicians, and paramedics -- selected locations, United States, 1991-2000 [J]. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*, 2000, 49(29): 660-665.
- [23] CHAPKO MK, DUFOUR DR, HATIA RI, et al. Cost-effectiveness of strategies for testing current hepatitis C virus infection [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2015, 62(5): 1396-1404.
- [24] KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease [J]. *Kidney international Supplement*, 2008, 73(109): S1-99.
- [25] CHAKRAVARTI A, DOGRA G, VERMA V, et al. Distribution pattern of HCV genotypes & its association with viral load [J]. *The Indian journal of medical research*, 2011, 133(3): 326-331.
- [26] 陈显, 胡文佳, 黄成垠, 等. 献血者ELISA检测为灰区标本的确证试验与核酸检测情况分析 [J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(2): 198-199.
- [27] 闵少菊, 刘念, 赵强, 等. 抗-HCV结果分析及灰区范围设置的探讨 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(9): 1211-1213.
- [28] CHOI MS, LEE K, HONG YJ, et al. The Role of the Signal-to-Cutoff Ratio in Automated Anti-HCV Chemiluminescent Immunoassays by Referring to the Nucleic Acid Amplification Test and the Recombinant Immunoblot Assay [J]. *Annals of laboratory medicine*, 2018, 38(5): 466-472.
- [29] 杜丽枝, 林勇平, 向波, 等. 化学发光法检测丙型肝炎病毒抗体灰区标本的假阳性 [J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(7): 855-858.
- [30] KAU A, VERMEHREN J, SARRAZIN C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C [J]. *Journal of hepatology*, 2008, 49(4): 634-651.

- [31] LIU CH, CHEN DS, KAO JH. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV [J]. The New England journal of medicine, 2007, 357(16): 124-134.
- [32] JENSEN DM, MORGAN TR, MARCELLIN P, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2006, 43(5): 954-960.
- [33] 王剑, 金茜, 饶慧瑛, 等. 国产试剂与 Roche COBAS TaqMan 试剂对慢性丙型肝炎快速和早期病毒学应答的比较研究[J]. 传染病信息, 2012, 25(3): 177-179.
- [34] KOWDLEY KV, GORDON SC, REDDY KR, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis [J]. The New England journal of medicine, 2014, 370(20): 1879-1888.
- [35] MAASOUMY B, VERMEHREN J, WELKER MW, et al. Clinical value of on-treatment HCV RNA levels during different sofosbuvir - based antiviral regimens [J]. Journal of hepatology, 2016, 65(3): 473-482.
- [36] STEINEBRUNNER N, SPRINZL MF, ZIMMERMANN T, et al. Early virological response may predict treatment response in sofosbuvir - based combination therapy of chronic hepatitis c in a multi-center "real-life" cohort [J]. BMC gastroenterology, 2015, 15(1): 1-8.
- [37] SIDHARTHAN S, KOHLI A, SIMS Z, et al. Utility of hepatitis C viral load monitoring on direct-acting antiviral therapy [J]. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2015, 60(12): 1743-1751.
- [38] GOOSSENS N, NEGRO F. Is genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2014, 59(6): 2403-2412.
- [39] EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016 [J]. Journal of hepatology, 2017, 66(1): 153-194.
- [40] BORTOLETTO G, CAMPAGNOLO D, MIRANDOLA S, et al. Comparable performance of TMA and Real-Time PCR in detecting minimal residual hepatitis C viraemia at the end of antiviral therapy [J]. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2011, 50(3): 217-220.

(上接第 390 页)

- [12] 王莉, 许爱玲, 林青. 乙型肝炎表面抗原定量检测在慢性乙型肝炎患者的临床应用[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32(6): 381-384.
- [13] 吕金龙. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 与 e 抗原含量的关系分析 [J]. 河南医学研究, 2017, 26(6): 1026-1027.
- [14] 王菲, 许爱玲, 辛霞霞, 等. 乙型肝炎患者血清 HBsAg 和抗-HBe 与 HBV DNA 定量的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(4): 534-536.
- [15] 尹凌凡, 熊建辉, 冉云, 等. 某院 1250 例乙型肝炎患者 HBeAg 和 HBeAb 阳性的检测结果分析及其防治对策[J]. 抗感染药学, 2017, 14(5): 976-978.
- [16] 徐冬梅, 朱艳, 张晓梅, 等. 乙型肝炎血清标志物 HBeAg 与 HBeAb 同时阳性模式的相关研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(12): 2787-2790.
- [17] 张健, 张艳茹, 李威, 等. 慢性乙型肝炎患者干扰素治疗过程中出现 HBsAg/抗-HBe 双阳性现象的临床分析[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(4): 446-448, 474.

## 乙型肝炎病毒耐药性研究进展

张劲丰 安宏亮\* 苏荣 吕微风

**[摘要]** 乙型肝炎病毒(HBV)是导致慢性乙型肝炎(CHB)和原发性肝细胞癌(HCC)的重要原因之一。核苷(酸)类似物和干扰素已被证明可以有效控制HBV,降低肝癌的发生率。然而,HBV耐药性的产生限制了抗病毒类药物长期有效性,其耐药机制的研究对新的抗病毒药物的研发十分关键。本文对HBV抗病毒药物作用机制、耐药性产生机制及耐药性预防策略进行系统综述,以期对HBV新抗病毒药物的开发及临床治疗提供参考意见。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;耐药性;核苷(酸)类似物;干扰素;药物靶标

### Progress in research on hepatitis B virus resistance

ZHANG Jinfeng, AN Hongliang\*, SU Rong, LV Weifeng

(Department of Clinical Laboratory, Foshan hospital of traditional Chinese medicine, Foshan, Guangdong, China, 528000)

**[ABSTRACT]** Hepatitis B virus (HBV) is one of the important causes of chronic hepatitis B (CHB) and primary hepatocellular carcinoma (HCC). Nucleos(t)ide analogues and interferons have been shown to be effective in controlling HBV and reducing the incidence of liver cancer. However, the development of HBV resistance limits the long-term effectiveness of antiviral drugs, and the study of drug resistance mechanisms is critical for the development of new antiviral drugs. This article reviews the mechanism of action of HBV antiviral drugs, the mechanism of drug resistance and the prevention strategy of drug resistance, in order to provide reference for the development and clinical treatment of new antiviral drugs for HBV.

**[KEY WORDS]** HBV; drug resistance; Nucleos(t)ide analogues; interferon; drug targets

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种含有不完整双链DNA的包膜病毒,通过入侵肝脏细胞导致急性肝炎(acute hepatitis B)、慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化等,严重时甚至会诱发原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报告表明,HBV感染形势十分严峻,全球约20亿人曾感染过HBV,超过3.5亿人患有慢性乙型肝炎,每年约有786 000人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发

性肝癌<sup>[2]</sup>。中国为乙型肝炎病毒感染高等流行地区,乙肝病毒携带者超过1.2亿,约15%~40%的乙肝病毒携带者最终发展为肝硬化甚至肝癌<sup>[3]</sup>。目前,乙型肝炎的治疗主要以抗病毒治疗为主,但抗病毒治疗易产生耐药性,因而限制了HBV长期治疗。深入了解HBV耐药机制对于HBV新治疗药物的开发十分重要。本文对抗HBV药物及其作用进行了阐述,并对HBV耐药机制进行系统的综述,以期对HBV的治疗及新治疗药物的开发提供参考。

作者单位:佛山市中医院检验医学中心,广东,佛山 528000

\*通信作者:安宏亮, E-mail:438320079@qq.com

## 1 抗HBV的药物及其作用机制

HBV的治疗策略分为抑制HBV病毒在机体内的增殖和提高人体自身免疫力两个方面。目前临床应用的抗HBV的主要药物有核苷(酸)类似物(Nucleos(t)ide analogues, NAs)和干扰素(Interferon, IFN)两大类药物。

NAs为治疗HBV的主要药物。主要的作用机制是抑制HBV复制过程中所需的逆转录聚合酶(reverse transcription polymerase, RT)的活性,阻断其生命周期,从而抑制乙肝病毒繁殖扩散<sup>[4]</sup>。逆转录酶是HBV复制过程关键酶,参与HBV逆转录形成子代HBV DNA过程。NAs通过与天然核苷酸

竞争在逆转录酶中的整合,从而抑制HBV逆转录酶活性。目前,有5种NAs类药物已获得FDA(Food and Drug Administration)批准用于慢性乙型肝炎的治疗,包括拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦(adeфовir, ADV)、恩替卡韦(entecavir, ETV)及替比夫定(telbivudine, TED)、替诺福韦(tenofovир, TDF)、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)<sup>[5-7]</sup>,各药物具体作用机制略有不同,但均能明显抑制HBV的复制,如表1所示。其中替诺福韦是治疗HBV的最新的NAs类药物,抗HBV感染作用明显,慢性乙型肝炎患者经长期TDF治疗后,可持续抑制HBV复制长达240周<sup>[8]</sup>。但NAs长期服用会导致耐药性的产生。

表1 NAs抗病毒机制  
Table 1 Antiviral mechanism of various NAs

药物名称	种类	抑制机制
拉米夫定	胞嘧啶类似物	与胞嘧啶竞争性结合HBV逆转录酶活性位点
阿德福韦	单磷酸腺苷类似物	与NTPs竞争HBV DNA聚合酶
恩替卡韦	鸟苷类似物	与dGTP竞争HBV DNA聚合酶
替比夫定	胸腺嘧啶脱氧核苷酸类似物	与HBV天然底物胸腺嘧啶的5'腺苷竞争
替诺福韦	福韦双磷酸盐	双磷酸盐竞争掺入病毒DNA链中,由于其缺乏3'-OH导致DNA链延长受阻而抑制病毒复制

IFN主要通过提升人体免疫系统以防御病毒的入侵。IFN是一种天然存在的细胞因子,包括3种型别,为干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ,其中IFN- $\alpha$ 为主要的抗病毒抗肿瘤干扰素<sup>[9]</sup>。在机体感染病毒时,细胞免疫应答产生干扰素进行抗病毒和免疫调节。IFN通过诱导细胞合成抗病毒蛋白(antiviral proteins, AVP)发挥作用,其中PKR蛋白激酶(protein Kinase R, PKR)和2,5-寡腺苷酸合成酶(2',5'-oligoadenylate synthetase, 2',5'-OAS)是两种重要的标志性蛋白质<sup>[10-11]</sup>。PKR可降解病毒mRNA,2'-5'-OAS可抑制病毒多肽链的合成,二者均可干扰病毒在细胞内的组装,使病毒量下降。IFN还具有免疫调节功能,增强杀伤性T细胞识别并清除感染的肝细胞的能力。IFN长期服用也会导致耐药性的产生。研究表明,仅26%的慢性乙肝患者长期使用干扰素进行治疗有效<sup>[12]</sup>。

## 2 HBV产生耐药性原因

慢性乙型肝炎患者在接受治疗的过程中容易产生耐药。由于HBV基因组比较小,复制过程中基因组容易产生变异,且乙型肝炎病毒逆转录酶不具有校正功能,不能修复错误核苷酸,随着疗程的延长,病毒选择适应性增加,导致耐受病毒产生。HBV耐药已成为临床实践中最棘手的问题。

### 2.1 HBV耐受核苷(酸)类似物的机制

NAs极易使HBV产生耐药性。研究报道,NAs不能彻底清除病毒,由于核苷(酸)类似物的抑制作用仅针对病毒的逆转录酶,核苷(酸)类似物虽能显著降低血清中的HBV DNA的含量,但HBsAg和cccDNA的减少幅度较小<sup>[13]</sup>。临床试验数据显示,使用NAs治疗1年以上的乙型肝炎患

者,HBV 的耐药性逐步增强,耐药比例每年增加 14%~20%<sup>[14]</sup>。

NAs 的耐药性产生多与 HBV 逆转录聚合酶某些区域位点的突变有关。LAM 的作用靶点为 HBV 的逆转录酶,当编码此酶的基因发生变异,引起逆转录酶的空间结构改变,LAM 失活。图 1 为编码逆转录酶的基因组结构,LAM 抗性突变主要位于 POL/RT 区的 rtM204I/V 中,编码 HBV YMDD (酪氨酸,蛋氨酸,天门冬氨酸,天冬氨酸)的 HBV 逆转录酶基序,引起蛋氨酸突变为缬氨酸或异亮氨酸<sup>[15]</sup>。LAM 抗性的发生率为每年大约 20%,在慢性乙型肝炎患者服用 5 年后达 69%<sup>[16]</sup>。ADV 一

般用于已产生 LAM 耐药性的 HBV 变异株。ADV 耐药性突变主要与 rtN236T D 域原发性突变有关<sup>[17]</sup>。此外,研究报道,ADV 耐药性也与逆转录聚合酶不同区域发生的次要突变相关,如 rtE218G 突变<sup>[18]</sup>、rtA181T/V<sup>[19]</sup>。ETV 耐药比较少见,临床和实验数据表明,RTL180M+A181C+M204V 是一种新的非经典 ETV 耐药突变模式<sup>[20]</sup>。TDF 为目前最新且效果最佳的抗 HBV 病毒药物,长期使用 TDF 治疗显示出持续抗病毒效果<sup>[8]</sup>。目前 TDF 的耐药性研究不多,有研究显示,其耐药性产生往往与多种基因突变相关,如 A719V, S724N, L802F M789T 和 A724V 等<sup>[21]</sup>。

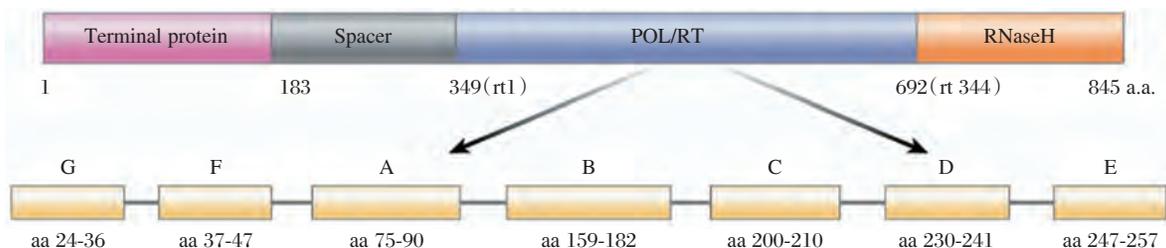


图 1 HBV 逆转录聚合酶基因组结构

Figure 1 Genomic structure of HBV reverse transcription polymerase

## 2.2 HBV 耐受干扰素类药物的机制

HBV 对 IFN 产生耐药性的原因比较复杂。IFN 增强细胞免疫抵抗涉及多条信号通路,影响相关通路的因素均可能导致其药效减弱,使 HBV 耐药性增强。两面激酶(janus kinase, JAK)/信号传导及转录激活因子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)通路为 IFN- $\alpha$  作用的主要通路,IFN- $\alpha$  与受体结合使该通路的 JAKs 蛋白磷酸化,激活含有特定酪氨酸残基的 STATs (STAT1-5),进而转录各类干扰素刺激基因(Interferon stimulated gene, ISGs)<sup>[22]</sup>。STAT1 发生变化直接影响 IFN- $\alpha$  的抗 HBV 作用,研究显示,激活 STAT 蛋白抑制因子 1(recombinant Protein Inhibitor Of Activated STAT 1, PIAS1)可通过抑制 STAT1 干扰 IFN- $\alpha$  发挥作用<sup>[23]</sup>,而 STAT1 的甲基化可以解除此干扰。JAK/STAT 信号通路还参与针对 HBV 特异性毒性 T 细胞(Cytotoxic T Cells, CTL)诱导的 Th1 免疫应答,抑制 JAK/STAT 信号

通路,导致 IFN- $\gamma$ +CD8+T 细胞数量减少,使得 HBV 对干扰素的耐受性增强<sup>[24]</sup>。此外,HBV 自身基因组的变异也是导致对干扰素耐药的原因之一。HBV X 基因 BCP 区 1762 A $\rightarrow$ T 与 1764 G $\rightarrow$ A 突变、前 C 基因中 1896 G $\rightarrow$ A 突变均可增强 HBV 对干扰素的耐药性<sup>[25]</sup>。研究表明,机体自身存在某些物质亦可抑制干扰素对 HBV 病毒的作用,如细胞内的 MicroRNA-548j 抑制慢性乙肝患者产生 I 型干扰素,548j 模拟物的瞬时转染导致 MoDC 细胞中 IFN- $\alpha/\beta$  显著降低<sup>[26]</sup>。HBV 还可通过影响宿主细胞基因的表达而减低药物的抗 HBV 作用。HBV 长期作用可影响人 IFN- $\alpha$  受体(interferons alpha receptors, IFNAR)的表达,使得 IFN- $\alpha$  与细胞表面受体 IFNAR 相互作用减弱,导致 IFN- $\alpha$  治疗失败<sup>[27]</sup>。

## 2.3 HBV 耐药的宿主机制

HBV 的耐药性与宿主本身有关。Liu 等研究发现,多重耐药相关蛋白 4(Multidrug resis-

tance protein 4, MRP4) 与 NAs 抗逆转录病毒的治疗失败有关<sup>[28]</sup>。MRP4 是一种跨膜转运载体, 可以将 NAs 泵出胞外, 使 NAs 无法进入细胞抑制 HBV 逆转录聚合酶<sup>[29]</sup>。某些蛋白还可通过增加 MRP 载体的表达活性, 进而增强细胞对药物的抵抗能力, 如乙型肝炎病毒 X 蛋白 (Hepatitis B virus pre-X protein, HBx) 可通过增加肝癌细胞系 (hepatoma cells, H4IIE) 中 MRP1 的转录活性和蛋白表达, 使 H4IIE 细胞对维拉帕米这种药的吸收更具抵抗力<sup>[30]</sup>。此外, 宿主细胞内存在校准酶, 可从 DNA 链 3' 端切下结合在 DNA $\beta$ -D 或  $\beta$ -L 构象上的 NAs, 终止其抑制活性。据报道, 人细胞中普遍存在的细胞质核苷酸酶 (Cytosolic 5'-nucleotidase I, cN-1) 所催化的切除反应, 可使细胞对双脱氧胞苷及其衍生物的敏感性降低 300 倍<sup>[31]</sup>。

### 3 HBV 耐药性的防治策略

#### 3.1 抗病毒药物的联合用药

聚乙二醇干扰素  $\alpha$ 2a、恩替卡韦和替诺福韦是抗 HBV 一线治疗药物, 然而单药治疗并非疗效最佳, 药物频繁更换容易导致更强的耐药性。目前, 抗病毒药物的联合用药是降低耐药风险的重要策略之一。研究表明, 相比单一的 ADV 治疗 LAM 耐药性 CHB 患者, ETV+ADV 联合治疗具有更好的疗效<sup>[32]</sup>。LAM 加 TDF 联合治疗 HBV/HIV 合并感染患者疗效优于 LAM 单药治疗<sup>[33]</sup>。此外, 随着新型药剂的开发, 除同类药物之间的联合用药外, 新的药物组合方式也不断在临床实践得到尝试。研究表明, 将不同作用机制的药物联合使用, 如同时给予 NAs 和聚乙二醇干扰素进行治疗, 或在使用 NAs 治疗的过程中添加聚乙二醇干扰素, 更有利于 HBV 的长期治疗<sup>[34]</sup>。联合用药方案的设计, 需要考虑病毒因子 (病毒生产动力学, 病毒逆转录酶的错误倾向性)、宿主因子 (患者相关特征和遗传因素) 及抗病毒药物等多种因素。正确合理的联合用药是提高抗 HBV 疗效和减少病毒突破的重要策略。

#### 3.2 HBV 耐药性的监测

HBV 耐药性的监测具有重要意义。在用药前进行抗性基因检测可指导抗病毒药物的选择及使

用; 此外, 在乙肝治疗过程中需进行实时耐药性监测, 以便及时调整用药方案。HBV 耐药性存在个体较大差异, 因此 HBV 耐药性的检测十分必要。常见的耐药检测技术包括 Sanger 测序、荧光定量 PCR 检测、分子杂交检测等, 通过对治疗前及治疗中 HBV 基因突变的检测辅助判断是否产生耐药以此指导慢乙肝患者的个性化治疗。近年来, 一些新兴技术不断在 HBV 的检测中得以运用。环介导等温扩增反应 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术通过对 HBV 前表面/表面抗原区的基因的扩增, 可以检测血液制品中是否存在 HBV<sup>[35]</sup>。电化学 DNA 探针法生物传感器利用二茂铁作为氧化还原报告剂共价连接到 DNA 探针, 对 HBV 耐药基因区的 PCR 扩增进行放大检测, 可以灵敏地区分健康患者和含低拷贝 HBV DNA 的患者<sup>[36]</sup>。Zhang 等开发了一种基于量子点技术的核酸检测方法 (quantum dots-mediated fluorescent method), 可用于检测拉米夫定或替比夫定抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者血清中 HBV 耐药基因突变<sup>[37]</sup>。随着生物技术的发展, 新型核酸检测技术不断涌现, 将使得 HBV 的临床检测灵敏度更高、成本更低、使用更便捷。

#### 3.3 新药物作用靶标挖掘

目前治疗慢性 HBV 感染的抗病毒药物主要的作用靶标为 HBV 逆转录酶, 由于耐药性问题, HBV 的治疗并没有取得令人满意的效果。基于 HBV 分子生物学基础的研究对于开发新的抗 HBV 药物十分重要。目前, 针对 HBV 在肝细胞内的复制过程, 已报道了多种可作为药物结合的靶标。cccDNA 表观遗传修饰对病毒复制有重要意义, 抑制 cccDNA 的表达有助于控制 HBV 的复制<sup>[38]</sup>。而在最新研究中发现, X 蛋白通过与 cccDNA 相互作用, 调控 cccDNA 的转录, 使得 HBV 的复制处于活跃状态<sup>[39]</sup>, X 蛋白可能是潜在 cccDNA 抑制类药物的靶点。HBV 附着肝细胞的过程也存在多种潜在药物靶点, 研究表明, 肝细胞膜上的钠离子-牛磺胆酸协同转运蛋白 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 对于 HBV 在细胞膜上的附着必不可少<sup>[40]</sup>。同时, NTCP 在肝脏内发挥转运胆酸的作用, 可以利用胆汁盐及其衍生

物与HBV竞争NTCP受体,使得HBV无法附着于肝细胞<sup>[41]</sup>,已有研究报道环孢霉素及其衍生物可阻断HBV与NTCP的相互作用<sup>[42]</sup>。通过抑制组装或诱导破坏病毒核衣壳可用于抗HBV的治疗,已有多种新型的衣壳调节剂被报道。例如,化合物(sheteroaryldihydropyrimidines, HAPs)被证明可以与HBV核心蛋白结合并降解核心蛋白,抑制核衣壳的形成<sup>[43]</sup>。衣壳调节剂苯甲酰胺(benzamides, BA)衍生物,同样能显著减少胞质HBV DNA的数量<sup>[44]</sup>。乙型肝炎病毒衣壳组装调节剂(Novira, NVR3-778)可通过抑制HBV组装,降低血清HBV DNA和HBV RNA水平<sup>[45]</sup>。通过抑制乙肝病毒核衣壳组装进行抗HBV治疗具有广阔的应用前景。

#### 4 展望

慢性乙型肝炎的治疗已成为世界各国关注的焦点,为尽快研发出新的高效治疗药物,攻克乙肝,世界卫生组织已提出“2030年消灭乙肝”的口号。HBV耐药性的产生是限制乙型肝炎用药治疗的主要原因。而HBV的耐药性产生由多种因素导致,开发新的治疗药物控制HBV需从多方面考虑。探索新的耐药机制,从抗病毒药物的耐药机制出发,寻找新的HBV治疗策略,减缓抗病毒类药物耐药性,开发新的抗病毒治疗药物是治疗HBV的重要途径之一。HBV耐药机制的研究有赖于高效的HBV耐药检测技术。随着科学研究的不断发展,HBV相关耐药的检测更为灵敏、特异、快速,HBV耐药检测将在科学研究及临床检测中得到广泛的应用,新的治疗靶点逐渐被发现,推动新的HBV治疗药物研究不断前进,最终克服HBV耐药问题,消灭乙肝。

#### 参考文献

- [1] Xu C, Zhou W, Wang Y, et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer letters*, 2014, 345: 216-222.
- [2] Ginzberg D, Wong RJ. Global HBV burden: guesstimates and facts [J]. *Hepatology International*, 2018, 12(4): 315-329.
- [3] Ren H. The experience of management of chronic hepatitis B in China [J]. *Journal of viral hepatitis* 24 Suppl, 2017, 1: 4-5.
- [4] Ibragimov EK, Abdurakhmanov DT, Rozina TP, et al. Efficacy and safety of long-term therapy with nucleos(t)ide analogues in chronic hepatitis B [J]. *Terapevticheskii arkhiv*, 2019, 91(2): 40-47.
- [5] Xu B, Lin L, Xu G, et al. Long-term lamivudine treatment achieves regression of advanced liver fibrosis/cirrhosis in patients with chronic hepatitis B [J]. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2015, 30(2): 372-378.
- [6] Wu X, Zhou J, Xie W, et al. Entecavir monotherapy versus de novo combination of lamivudine and adefovir for compensated hepatitis B virus-related cirrhosis: a real-world prospective multicenter cohort study [J]. *Infection and drug resistance*, 2019, 12: 745-757.
- [7] Chen J, Zhao SS, Liu XX, et al. Comparison of the Efficacy of Tenofovir Versus Tenofovir plus Entecavir in the Treatment of Chronic Hepatitis B in Patients With Poor Efficacy of Entecavir: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Clinical therapeutics*, 2017, 39(9): 1870-1880.
- [8] Liang X, Gao Z, Xie Q, et al. Long-term efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in Chinese patients with chronic hepatitis B: 5-year results [J]. *Hepatology international*, 2019, 13(3): 260-269.
- [9] Zhou Y, Li S, Tang Z, et al. Different antiviral effects of IFNalpha and IFNbeta in an HBV mouse model [J]. *Immunobiology*, 2017, 222(3): 562-570.
- [10] Wu S, Lin J, Fu Y, et al. RIG-I enhances interferon-alpha response by promoting antiviral protein expression in patients with chronic hepatitis B [J]. *Antiviral therapy*, 2018, 23(7): 575-583.
- [11] Domagalski K, Pawlowska M, Zalesna A, et al. Impact of IL28B and OAS gene family polymorphisms on interferon treatment response in Caucasian children chronically infected with hepatitis B virus [J]. *World journal of gastroenterology*, 2016, 22(41): 9186-9195.
- [12] Vigano M, Invernizzi F, Grossi G, et al. Review article: the potential of interferon and nucleos(t)ide analogue combination therapy in chronic hepatitis B infection [J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2016, 44(7): 653-661.
- [13] Wong DK, Seto WK, Fung J, et al. Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency

- [J]. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 2013, 11(8): 1004-1010.e1.
- [14] Levrero M, Subic M, Villeret F, et al. Perspectives and limitations for nucleo(t)side analogs in future HBV therapies [J]. *Current opinion in virology*, 2018, 30: 80-89.
- [15] Banerjee P, Chakraborty A, Mondal RK, et al. HBV quasispecies composition in Lamivudine-failed chronic hepatitis B patients and its influence on virological response to Tenofovir-based rescue therapy [J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 44742.
- [16] Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(6): 1743-1751.
- [17] Monavari SH, Keyvani H, Mollaie H, et al. Detection of rtN236T mutation associated with adefovir dipivoxil resistance in Hepatitis B infected patients with YMDD mutations in Tehran [J]. *Iranian journal of microbiology*, 2013, 5(11): 76-80.
- [18] Wang JH, Wang XY, Fei R, et al. Tetracycline-inducible replications of wild-type and an adefovir-dipivoxil-resistant hepatitis B virus in human liver cells [J]. *Chinese journal of preventive medicine*, 2016, 50(4): 351-356.
- [19] Kim JH, Jung YK, Joo MK, et al. Hepatitis B viral surface mutations in patients with adefovir resistant chronic hepatitis B with A181T/V polymerase mutations [J]. *Journal of Korean medical science*, 2010, 25(2): 257-264.
- [20] Liu Y, Zhou Y, Li X, et al. Hepatitis B virus mutation pattern rtL180M+A181C+M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice [J]. *Emerging microbes & infections*, 2019, 8(1): 354-365.
- [21] Andrei G, Gillemot S, Topalis D, et al. The Anti-Human Immunodeficiency Virus Drug Tenofovir, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Also Targets the Herpes Simplex Virus DNA Polymerase [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2018, 217(5): 790-801.
- [22] Schneider WM, Chevillotte, MD, Rice, CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses [J]. *Annual review of immunology*, 2014, 32: 513-545.
- [23] Tai DJ, Hsu WL, Liu YC, et al. Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning [J]. *The EMBO journal*, 2011, 30(1): 205-220.
- [24] Wu S, Chen X, Tang Y, et al. Delivery of Tapasin-modified CTL epitope peptide via cytoplasmic transduction peptide induces CTLs by JAK/STAT signaling pathway in vivo [J]. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2018, 50(2): 181-190.
- [25] Yang Z, Zhuang L, Lu Y, et al. Naturally occurring basal core promoter A1762T/G1764A dual mutations increase the risk of HBV-related hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12525-12536.
- [26] Yu K, Li Q, Cheng Q, et al. MicroRNA-548j inhibits type I interferon production by targeting ZBTB11 in patients with chronic hepatitis B [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017, 488(4): 628-633.
- [27] Ma N, Zhang X, Yang L, et al. Role of Functional IFNL4, IFNLR1, IFNA, IFNAR2 Polymorphisms in Hepatitis B virus-related liver disease in Han Chinese population [J]. *Journal of viral hepatitis*, 2018, 25(3): 306-313.
- [28] Liu W, Song H, Chen Q, et al. Multidrug resistance protein 4 is a critical protein associated with the antiviral efficacy of nucleos(t)ide analogues [J]. *Liver international*, 2016, 36(9): 1284-1294.
- [29] Liu YT, Liu W, Zhu GY, et al. Involvement of multidrug resistance protein 4 in the hepatocyte efflux of lamivudine and entecavir [J]. *Molecular medicine reports*, 2018, 17(5): 7113-7121.
- [30] Han HK, Han CY, Cheon EP, et al. Role of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 357(2): 567-573.
- [31] Magni G, Amici A, Orsomando G. The enzymology of cytosolic pyrimidine 5'-nucleotidases: functional analysis and physiopathological implications [J]. *Current medicinal chemistry*, 2013, 20(34): 4304-4316.
- [32] Seo SY, Kim IH, Sohn JY, et al. Long-term efficacy of entecavir plus adefovir combination therapy versus entecavir monotherapy in adefovir refractory chronic hepatitis B patients with prior lamivudine resistance [J]. *Intervirolgy*, 2014, 57(1): 8-16.

- [33] Luo A, Jiang X, Ren H. Lamivudine plus tenofovir combination therapy versus lamivudine monotherapy for HBV/HIV coinfection: a meta-analysis [J]. *Virology journal*, 2018, 15: 139.
- [34] Wu D, Ning Q. Toward a Cure for Hepatitis B Virus Infection; Combination Therapy Involving Viral Suppression and Immune Modulation and Long-term Outcome [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2017, 216 suppl-8: S771-s777.
- [35] Chen HW, Belinskaya T, Zhang Z, et al. Simple Detection of Hepatitis B Virus in Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Method [J]. *Military medicine*, 2019, 184(7-8): e275-e280.
- [36] Ahangar LE, Mehrgardi MA. Amplified detection of hepatitis B virus using an electrochemical DNA biosensor on a nanoporous gold platform [J]. *Bioelectrochemistry*, 2017, 117: 83-88.
- [37] Zhang C, Chen Y, Liang X, et al. Detection of Hepatitis B Virus M204I Mutation by Quantum Dot-Labeled DNA Probe [J]. *Sensors*, 2017, 17(5).
- [38] Hong X, Kim ES, Guo H. Epigenetic Regulation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA: Implications for Epigenetic Therapy against Chronic Hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2017, 66(6): 2066-2077.
- [39] Gao Y, Feng J, Yang G, et al. Hepatitis B virus X protein-elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1413-1429.
- [40] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. *eLife*, 2012, 1: e00049.
- [41] Yan H, Peng B, Liu Y, et al. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide [J]. *Journal of virology*, 2014, 88(6): 3273-3284.
- [42] Watashi K, Sluder A, Daito T, et al. (2014). Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) [J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 1726-1737.
- [43] Qiu Z, Lin X, Zhang W, et al. (2017). Discovery and Pre-Clinical Characterization of Third-Generation 4-H Heteroaryldihydropyrimidine (HAP) Analogues as Hepatitis B Virus (HBV) Capsid Inhibitors [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(8): 3352-3371.
- [44] Wu S, Zhao Q, Zhang P, et al. Discovery and Mechanistic Study of Benzamide Derivatives That Modulate Hepatitis B Virus Capsid Assembly [J]. *Journal of virology*, 2017, 91(16).
- [45] Klumpp K, Shimada T, Allweiss L, et al. (2018). Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(3): 652-662.

## 北京大学基础医学院鲁凤民教授实验室

北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病研究中心鲁凤民教授实验室位于北京市海淀区学院路38号,病理楼3层东侧。鲁凤民教授课题组现有教职工6名,其中正高级职称1名、副高级职称2名、中级职称3名;博士生导师3名。实验室功能齐全,具备病毒学、分子生物学和细胞生物学研究所需的平台。

该团队长期从事感染性疾病的病原学、致病机制和诊疗新技术的研究,具有优秀的科研人员梯队和工作积累。在乙型肝炎病毒病毒学、慢性肝病诊断新标识等方面取得了一系列进展,主要工作成就有:实验证实了慢性HBV感染者血清HBV RNA为核衣壳包裹的病毒前基因组RNA及其剪切变体,这一发现完善了我们对HBV生命周期的认识;提出了血清HBV RNA检测用于接受核苷(酸)类药物巩固治疗停药风险评估的理念;明确了血清GP73为不同病因肝硬化的实验室检测指标。近5年来,主持国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项、国家自然科学基金重点项目和面上项目、北京市科技计划项目、北京市自然科学基金面上项目等课题。作为参加人获得国家科技进步二等奖等科技奖励多项。申请国家发明专利10余项,其中获得授权国家发明专利4项,多项专利已实现成果转化。作为通讯作者或第一作者在New England Journal of Medicine、Journal of Hepatology、Hepatology、Small、Cancer Research、Theranostics、Oncogene、Emerging Microbes & Infections等相关领域期刊发表SCI论文120余篇。作为主编、副主编及编委编写了多部国家级规划教材。

学术带头人鲁凤民教授是北京大学基础医学院病原生物学系暨感染病研究中心教授、学系主任,并担任国务院学位委员会基础医学学组委员,中国医药质量协会转化医学分会主任委员,中国研究型医院分子诊断专业委员会副主任委员,中华医学会医学病毒学分会委员,北京市医学病毒学分会副主任委员,中国微生物学会病毒学工作委员会常委,北京市微生物学会常委等学术任职。长期从事病毒性肝炎、肿瘤等诊疗技术及发病机制研究。



### 杂志简介：

《分子诊断与治疗杂志》于 2009 年 5 月创刊，是由中山大学主管，《中国家庭医生》杂志社有限公司主办，中山大学达安基因股份有限公司承办的面向国内外公开发行的分子医学权威性刊物，也是我国第一份以分子诊断与治疗学科为主要内容的分子医学专业学术期刊。本刊以传播分子医学理念、报道分子医学前沿、倡导分子医学创新、促进分子医学进步为办刊宗旨。主要刊登我国医学分子诊断和分子治疗相关领域中的基础理论研究、临床实践和技术方法的最新研究成果以及国内分子医学新技术、新理论和新进展等方面的文章。目前有编委及审稿专家 80 余人。在编委会和审稿专家及编辑部的共同努力下，于 2016 年被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

目前有“述评”、“论著”、“综述”、“前沿进展”、“专家笔谈”、“讲座”、“动态”和“专栏”等栏目。涵盖基因诊断、免疫诊断、核酸分子诊断、蛋白分子诊断、信号分子诊断、分子影像诊断、诊断仪器应用、基因治疗、核酸分子治疗、蛋白分子治疗等内容。

