



## 乙型肝炎患者 HBV 复制水平的定量 PCR 研究

何玉先 张启云 杨立信 刘志浩

(北京地坛医院临床病毒研究室,北京市卫生局病毒传染病防治研究中心,北京 100011)

**摘要** 本文采用定量 PCR 方法观察了慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA 的复制水平。结果表明在 HBeAg 阳性患者血清 HBV-DNA 检出率和水平显著高于 HBeAg 阴性患者 ( $P < 0.01$ ); 血清 HBV-DNA 水平的高低与 ALT 异常情况未发现相关性。

**关键词** 定量 PCR, 乙型肝炎病毒 DNA

乙型肝炎的发病机理尚不清楚,而且缺乏有效的治疗方法。PCR 技术的发展,使我们能够从分子病毒学的角度探讨乙型肝炎病毒 (HBV) 的致病性。有关乙肝患者 HBV 的复制及其与血清病毒标志物和肝功能损伤的相互关系,以前已有报道,但主要是基于 HBV-DNA 的定性检测<sup>[1,2]</sup>。本文采用最新发展的定量 PCR 方法检测慢性乙肝患者血清 HBV-DNA 的浓度,以此代表 HBV 病毒血症水平,并分析 HBV-DNA 浓度与 HBeAg、ALT 间的相关性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本来源

本组病例系 1995 年 3—8 月本院收治的 140 名乙型肝炎患者,病原学诊断明确。甲、丙、丁、戊肝炎及 CMV、EB 感染的血清学检测均为阴性。

#### 1.2 病原学检测方法

所有项目均采用常规 ELISA 法。

#### 1.3 HBV-DNA 定量 PCR

此法系荧光信号引物能量转移法。HBV-DNA 套式定量 PCR 试剂及定量 PCR 仪由美国 ACCESS 公司提供。

#### 1.4 血清 ALT 测定

采用日立 7071 全自动生化分析仪测定。

### 2 结果

#### 2.1 HBeAg 与 HBV-DNA 水平的关系(表 1)

由表 1 可见,在 HBsAg 阳性的乙肝患者中,HBeAg 阳性和 HBeAg 阴性二组血清 HBV-DNA 的检出率分别为 86.6% 和 30.0%,这与以前报道的结果相近<sup>[3]</sup>。对 HBV-DNA 阳性标本定量分析的结果表明,HBeAg 阳性患者 HBV-DNA 水平为  $10^{6.62} \pm 10^{1.1}$  拷贝/ $\mu$ l 血清,显著高于 HBeAg 阴性患者的  $10^{3.13} \pm 10^{0.8}$  拷贝/ $\mu$ l 血清。

表 1 乙肝患者 HBeAg 与 HBV-DNA 的关系

组 别	例 数	HBV-DNA 阳性(%)	HBV-DNA 水平(拷贝/ $\mu$ l)
HBsAg(+), HBeAg(+)	67	58(86.6)	$10^{6.62} \pm 10^{1.1}$
HBsAg(+), HBeAg(-)	73	22(30.0)	$10^{3.13} \pm 10^{0.8}$
P 值		$< 0.01$	$< 0.01$

#### 2.2 HBV-DNA 水平与血清 ALT 水平的 相关性

将 HBV-DNA 阳性标本按照 HBV-DNA

1995-08-31 收稿

水平高低分为  $>10^5$  拷贝/ $\mu\text{l}$  和  $\leq 10^5$  拷贝/ $\mu\text{l}$  两组,经统计学分析两组间血清 ALT 水平无显著差别,  $P > 0.05$  (表 2)。对 HBV-DNA 水平和 ALT 水平进行相关性分析,结果  $r = 0.179$ ,  $P > 0.05$ 。表明乙肝患者血清 ALT 的异常情况与 HBV 复制水平的高低无关。

表 2 乙肝患者血清 HBV-DNA 水平与 ALT 水平的关系

组别	例数	ALTU/L
$>10^5$	32	$192.0 \pm 12.2$
$\leq 10^5$	48	$173.6 \pm 17.5$
P 值		$>0.05$

### 3 讨论

病毒感染的临床诊断技术已从定性走向定量检测,这对探讨感染量与致病的关系以及临床抗病毒治疗等方面具有重要的指导作用。HBV-DNA 是乙型肝炎病毒颗粒的重要组份,用 PCR 方法检测患者血中 HBV-DNA 的存在与否,能够准确反映患者的病毒血症情况,具有很高的灵敏度和特异度。近年来又发展了检测 HBV-DNA 含量的定量 PCR 技术,借此评价乙肝患者 HBV 复制水平与临床病情关系,促进了 HBV 感染的基础与临床研究。

HBV e 抗原和 e 抗体是 HBV 感染过程中出现的一个独立的极其重要的抗原抗体系统,它与病毒复制、病程预后和感染性密切相关,是临床诊断乙肝的重要检测指标。一般认为 HBeAg 阳性,提示 HBV 增殖旺盛。尤其是使用斑点杂交或 PCR 方法进一步证实了 HBeAg 与病毒复制有关<sup>[4,5]</sup>。但同时也发现在 HBeAg 阴性而抗-HBe 阳性的乙肝患者中也检出相当高比例的 HBV-DNA,多数认为这与 HBV 的低水平复制和病毒变异有关<sup>[6]</sup>。HBV

前 c 基因区的突变,导致其不能产生 HBeAg,但乙肝病毒却仍继续存在,持续复制。本实验采用定量 PCR 方法检测 HBV-DNA 复制水平的结果,也进一步证实了 HBeAg 确是反映 HBV 复制情况的良好指标,乙肝患者 HBeAg 阳性者 HBV-DNA 检出率和复制水平显著高于 HBeAg 阴性患者。HBeAg 阴性患者 HBV-DNA 复制水平较低的原因尚需进一步研究。由于 HBeAg 阴性而抗-HBe 阳性的乙肝患者中不少呈现血清 HBV-DNA 阳性且处于低拷贝状态,这部分病人在临床病情判断及治疗中不容忽视。

关于 HBV 复制水平与其致病性的关系,目前尚不清楚。多数认为慢性乙肝主要是由免疫损伤介导的肝脏病变,病毒本身复制水平的高低和肝功能的损伤无关;但也有人认为 HBV 增殖水平与肝功能损伤有一致性<sup>[7]</sup>,本研究观察了慢性乙肝患者血清 HBV-DNA 含量和 ALT 水平之间的关系,结果表明 HBV 复制水平和肝功能异常情况无相关性。

**致谢** 本文得到中国科学院北京科海医疗生物工程公司协助,特此致谢。

### 参考文献

- [1] Jalawa T. *Biotechniques*, 1993, 74: 2699—2700.
- [2] 赵富玺,马存根,王力生,等. *中华微生物与免疫学杂志*, 1991, 11(4): 249—251.
- [3] 李菲,毕青,乔鸣,等. *中西医结合肝病杂志*, 1995, 5(1): 7—11.
- [4] Loria M A, Marcellin P, Bismuth E, *et al.* *Hepatology*, 1992, 15: 32—36.
- [5] 王慧玲,陈昌文. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1993, 7(1): 87—90.
- [6] Tong S P, Li J S, Vitvitski L, *et al.* *Virology*, 1990, 176: 596—599.
- [7] 池肇春主编. *新编实用肝病学*, 北京: 中国医药科技出版社, 1994, 90.

## THE STUDY OF HBV-DNA LEVELS IN SERUM OF HEPATITIS B PATIENTS BY QUANTITATIVE PCR

He Yuxian Zhang Qiyun Yang Lixin Liu Zhihao

*(Dept. of clinical virology, Beijing ditan hospital; and Beijing research center of virus infectious diseases, Beijing 100011)*

**Abstract** The quantitative polymerase chain reaction (QPCR) was used to determine serum HBV-DNA levels in hepatitis B patients. The results showed HBV-DNA levels is significantly higher in HBeAg positive patients than HBeAg negative patients ( $P < 0.01$ ); and no relativity was found between serum HBV-DNA levels and ALT contents in patients with hepatitis B.

**Key words** quantitative PCR, HBV-DNA