

# 乙型肝炎病毒感染与血清自身抗体的相关性

周明欢, 欧 强, 谭德明

周明欢, 湘西自治州人民医院消化内科 湖南省吉首市 416000  
欧强, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染病研究所 湖南省长沙市 410008  
周明欢, 1961-01-16, 湖南省凤凰县人, 苗族, 1983 年湖南医科大学本科毕业, 消化内科主任, 主任医师. 主要从事病毒性肝炎、肝硬化及胃肠病的研究. 湖南省湘西州自然科学基金资助项目, No. (2003)39  
项目负责人: 周明欢, 410006, 湖南省吉首市, 湘西自治州人民医院消化内科.  
电话: 0743-8267248  
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-12-06

## Relationship between HBV infection and autoantibodies

Ming-Huan Zhou, Qiang Ou, De-Ming Tan

Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, People Hospital, Xiangxi Autonomy State, Jishou 416000, Hunan Province, China  
Qiang Ou, De-Ming Tan, Viral Hepatitis Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Xiangxi Autonomy State, Hunan Province. No. (2003)39  
Correspondence to: Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, People Hospital, Xiangxi Autonomy State, Jishou 416000, Hunan Province, China.  
Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-12-06

## Abstract

AIM: To investigate the relationship between infection of hepatitis B virus (HBV) and development of autoantibodies.

METHODS: HBV-DNA and HBVM were tested in 160 serum samples by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. Anti-nuclear antibodies (ANA), an-double strain DNA antibodies. Ads-DNA Ab, thyroglobulin antibody and thyroid microsome antibody (TGA/TMA), rheumatoid factor (RF) were measured by using indirect immunofluorescent assay, radioimmunoassay, and immune emulsion agglutination respectively.

RESULTS: The positive rates of autoantibodies were significantly higher in patients with HBV infection compared to those in normal control (63.1% vs 20.8%  $\chi^2=15.28$ ,  $P<0.01$ ). The antibodies such as ANA and RF appeared frequently. There was no remarkably difference in the age and sex between autoantibodies positive and autoantibodies negative patients ( $P>0.05$ ). Compared to HBV infected patients without autoantibodies, ALT and TBIL and the positive rates of HBV-DNA and the time of HBV infection significantly increased in patients with autoantibodies ( $P<0.05$ ).

CONCLUSION: HBV infection can induce autoimmune reactions, resulting in production of autoantibodies. The autoimmune reaction has no connection with age and sex. It is in connection with the time of HBV infection, the positive rates of HBV-DNA and the liver dysfunction severity.

Zhou MH, Ou Q, Tan DM. Relationship between HBV infection and autoantibodies. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):607-609

## 摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒感染与自身抗体的相关性.

方法: 采用 ELISA 法、荧光 PCR 法分别检测 160 例 HBV 感染者血清 HBV 标志物和 HBV-DNA. 采用间接免疫荧光法、金标法、放射免疫法、免疫乳胶凝集法分别检测所有研究对象的抗核抗体(ANA)、抗双链 DNA 抗体(Ads-DNA)、抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)、类风湿因子(RF).

结果: 160 例 HBV 感染者血清中检出多种自身抗体, 总检出率达 61.3%, 显著高于正常对照组( $P<0.01$ ), 检出的自身抗体以 ANA, RF 多见, 滴度分布以低滴度为主. 自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别并无明显差异( $P>0.05$ ). 与自身抗体阴性组相比, 阳性组 HBV 感染者 ALT, TBIL 水平、HBV-DNA 定量的对数值、HBV-DNA 阳性检出率明显增高, HBV 感染史明显增长, 差异有显著性( $P<0.05$ ).

结论: HBV 感染可引发自身免疫性反应, 导致多种自身抗体的产生. 这种自身免疫性反应与感染者的年龄、性别无关, 而与 HBV 感染史的长短、病毒的复制水平以及肝功能损害的程度有关.

周明欢, 欧强, 谭德明. 乙型肝炎病毒感染与血清自身抗体的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(3):607-609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/607.asp>

## 0 引言

我国是慢性肝病的高发区<sup>[1-6]</sup>, 病毒性肝炎占大多数<sup>[7-10]</sup>, 严重威胁着人们的身体健康. 乙肝慢性化及慢性肝炎炎症变的发生机制是多年来肝病研究的重点<sup>[11-12]</sup>. 慢性病毒性肝炎患者(主要是乙型、丙型)血清中存在多种自身免疫性抗体, 与正常人相比有显著性差异<sup>[13-20]</sup>. 自身免疫在病毒性肝炎发病机制、病情转归及癌变中的作用正日趋受到人们的重视. 为进一步探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染后引发自身免疫反应的机制及自身抗体对肝脏功能损害的病理意义, 我们检测了 HBV 感染者 160 例血清中的有关自身抗体, 现报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 我科 2003-01/2003-06 门诊和住院 HBV 感染者 160 例, 男 103 例, 女 57 例, 年龄 14-68 岁; 其中无症状病毒携带者 30 例, 慢性乙肝 48 例, 慢性重型乙肝 67 例, 乙肝肝硬化 15 例. HBV 感染的诊断根据血清

HBV 标志物和 HBV-DNA 测定, 所有病例均符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》诊断标准<sup>[21]</sup>. 重叠有甲、丙、戊肝病毒或庚肝病毒(HGV)感染, 及合并有其他严重疾病的患者均从研究对象中去除. 所有病例近 3 mo 内未使用免疫调节剂. 随机选择健康献血员 24 名作为正常对照, 均已除外肝炎病毒感染. 清晨采集受检者空腹静脉血 4 ml, 分离血清, -20 °C 保存备用.

1.2 方法 使用 ELISA 法检测血清 HBV 标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HbcAb). 试剂盒购于洛阳华美生物工程公司. 严格按说明书操作, 结果由酶标仪测定. 采用核酸扩增技术(PCR)结合荧光标记探针杂交方法检测 HBV-DNA, 试剂盒购于上海申友生物技术有限公司. 取裂解缓冲液 20 μL 加入离心管后, 分别加入血清标本, 阴性对照、阳性对照、临界对照液 20 μL, 混匀. 开水浴 10 min, 1 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μL 做 PCR 反应. 荧光实时定量 PCR 反应在 Icyler 仪中进行. 参比品分别设定  $3 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^8$  拷贝/L 以绘制标准曲线. 结果判断: 大于  $10^7$  拷贝/L 为 HBV-DNA 阳性. 血清谷丙转氨酶(ALT)测定采用赖氏法, 总胆红素(TBIL)测定采用 Jendrassic-Groff 法, 试剂均购自上海荣盛生物试剂厂, 按说明书严格操作. 抗核抗体(ANA)测定采用间接免疫荧光法, 大鼠肝抗原片由本院免疫室制备, 羊抗人 IgG 荧光抗体购自卫生部上海生物制品研究所. 将待测血清用 PH7.2PBS 缓冲液按 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 稀释, 分别加入抗原基质片上, 内置 37 °C 水浴箱孵育 30 min, 取出放入染色缸中用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 吸水纸吸干, 加入荧光抗体, 室温孵育 30 min, PBS 缓冲液洗片 3 次, 以甘油缓冲液封片, 荧光显微镜镜下观察. 抗双链 DNA 抗体(Ads-DNA)测定采用金标斑点渗滤法, 试剂购自福建三强生物技术公司. 将反应板回温到 35 °C, 滴加 100 μL 试剂 B 于反应孔中使其完全渗入. 滴加待测血清 100 μL 于反应孔中待完全渗入后再加入 150 μL 试剂 A, 最后滴加 100 μL 试剂 B 于反应孔中, 2min 后观察结果. 抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)测定采用放射免疫法, 试剂购自卫生部上海生物制品研究所. 将 <sup>125</sup>I-TG 和 <sup>125</sup>I-TM 各 100 μL 分别加入 T 管和待测管, 加 20 μL 待测血清和 200 μL 缓冲液于待测管中, 然后将两管摇匀, 37 °C 孵育 60 min, 再加入分离试剂 TMAB, TGAB, 摇匀, 室温 30 min 3 500 r/min, 离心 15 min, 吸上清液, 测 T 管和待测管沉淀. 类风湿因子(RF)采用免疫乳胶凝集法测定, 试剂购自上海伊华医学科技有限公司. 将待测血清用生理盐水 1:20 稀释后, 加 50 μL 于玻璃板上, 滴加一滴胶乳试剂, 充分摇匀, 3 min 后观察结果, 凝集为阳性.

统计学处理 HBV-DNA 定量结果采用对数平均值来计算, 阴性作 0 计算; 计量资料以 mean±SD 表示, 采用组间均数 t 检验; 计数资料以率表示, 采用  $\chi^2$  检验. 所有数据均在计算机中经 SPSS10.0 统计软件处理.

## 2 结果

2.1 HBV 感染者自身抗体在 HBV 感染者 160 例中有 101 例检出至少一种以上的自身抗体, 自身抗体总检出率达 63.1%, 显著高于正常对照组(63.1% vs 20.8%  $\chi^2=15.28$ , <sup>a</sup>P < 0.01). 慢性乙肝、慢性重型乙肝、乙肝肝硬化组自身抗体检出率分别为 66.7%, 68.7% 和 73.3%, 均显著高于 HBV 健康携带者(<sup>b</sup>P < 0.01), 但三组间自身抗体检出率比较无统计学意义(P > 0.05 表 1). HBV 感染者血清中检出的自身抗体以 ANA 和 RF 多见, 滴度分布以低滴度为主. 59 例 ANA 阳性者检出 1:40 者 50 例, 1:80 者 6 例, 1:160 者有 2 例, 1:320 者 1 例.

表 1 HBV 感染者与正常对照组血清自身抗体检测结果

分组	n	总阳性(%)	ANA	Ads-DNA	RF	TGA	TMA
正常对照组	24	5 (20.8)	5	0	0	1	2
HBV 感染者	160	101 (63.1)	59	1	36	18	18
HBV 健康携带者	30	12 (40.0)	10	0	2	2	1
慢性乙肝	48	32 (66.7)	22	0	13	5	6
重型乙肝	67	46 (68.7)	21	1	17	10	10
乙肝肝硬化	15	11 (73.3)	6	0	4	1	1

ANA: 抗核抗体; Ads-DNA: 抗双链 DNA 抗体; TGA/TMA: 抗甲状腺球蛋白抗体 / 抗甲状腺微粒体抗体; RF: 类风湿因子.

2.2 HBV 感染者自身抗体与病情 自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别均无明显差异(P > 0.05). 与自身抗体阴性组相比, 阳性组 HBV 感染者 ALT, TBIL 水平明显增高, HBV 感染史明显增长, 差异有显著性(<sup>a</sup>P < 0.05 表 2).

表 2 HBV 感染者自身抗体与病情的相关性

自身抗体	n	年龄(岁)	(男/女)	病程(a)	ALT(μkat/L)	TBIL(μmol/L)
阳性	101	36.3 ± 10.8	88/13	8.4 ± 5.9 <sup>a</sup>	4.2 ± 4.8 <sup>a</sup>	242 ± 236 <sup>a</sup>
阴性	59	38.4 ± 10.4	45/14	2.5 ± 2.3	2.5 ± 3.9	155 ± 221

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 阴性.

2.3 HBV 感染者自身抗体与病毒负荷量 自身抗体阳性 101 例 HBV 感染者中有 70 例检出 HBV-DNA 阳性, 阳性率为 69.3%, 59 例自身抗体阴性的 HBV 感染者检出 HBV-DNA 阳性 27 例, 阳性率为 49.2%, 两组 HBV-DNA 阳性检出率比较有显著性差异( $\chi^2=6.41$ , <sup>a</sup>P < 0.05), 两组 HBV-DNA 定量的对数均值比较差异有显著性( $5.8 \pm 1.4$  vs  $3.7 \pm 1.3$  <sup>b</sup>P < 0.01).

## 3 讨论

HBV 感染的致病机制非常复杂. 目前认为 HBV 感染后的肝组织损伤并非 HBV 在肝细胞内复制繁殖直接作用的结果, 而是机体一系列免疫反应造成肝细胞的病理免疫损害. 这种乙肝免疫损伤包括细胞介导的免疫损

伤、免疫复合物引起的免疫损伤及自身免疫反应引起的免疫损伤。自身免疫是针对自身成分的抗体或细胞性免疫效应的现象, 是机体对自身组织成分的免疫应答过于亢进的表现。国内外学者近年来发现HBV感染存在各种自身免疫现象, 主要表现为血清中检测出各种自身抗体, 自身免疫在乙型肝炎发病机制中的作用越来越受到了人们的重视。

我们在HBV感染者血清中检出多种自身抗体, 总检出率显著高于正常对照组( $P < 0.001$ ), 检出的自身抗体以ANA、RF多见, 滴度分布以低滴度为主, 与文献报道基本一致。研究结果显示, HBV感染可引发自身免疫性反应, 导致机体自身免疫紊乱。其可能机制为: (1) 肝炎病毒感染诱导自身抗原修饰, 从而激发自身免疫; (2) 肝炎病毒感染导致控制自身免疫的机制紊乱; (3) 肝炎病毒抗原与机体自身抗原之间的分子模拟。TMA/TGA是甲状腺特异性自身抗体, 本组106例HBV感染者中, 36例TMA/TGA阳性, 与正常组相比 $P < 0.01$ , 提示HBV感染能促进甲状腺自身抗体的产生, 推测可能原因是甲状腺组织成分与HCV结构有部分相似性, 但不排除HBV感染直接导致自身免疫性甲状腺疾病, 有待进一步研究证实。我们还观察到出现临床症状的HBV感染者包括慢性乙肝、慢性重型乙肝、乙肝肝硬化三组自身抗体检出率均显著高于HBV健康携带者( $P < 0.01$ ), 提示自身抗体的出现可能加剧肝脏的病理损害, 自身免疫在乙型肝炎肝细胞损伤中起重要作用。

为进一步明确HBV感染者血清自身抗体存在的临床意义, 我们详细询问了所有HBV感染者的病史并检测了肝功能, 发现自身抗体阳性和自身抗体阴性组年龄、性别并无明显差异。与自身抗体阴性组相比, 阳性组HBV感染者ALT、TBIL水平显著增高, HBV感染史明显增长, 说明HBV感染后引发的自身免疫性反应与感染者的年龄、男女性别间的免疫差异无关, 而与HBV感染史的长短和肝功能损害的程度有关。HBV感染史长及肝功能损害明显的HBV感染者自身抗体阳性率相对较高, 机体自身免疫现象更为明显。上述结果进一步证实HBV感染后的自身免疫反应可引起肝功能损害, 是乙型肝炎的重要发病机制之一。值得提出的是在乙型肝炎中检出的自身抗体大多滴度较低, 不会引发自身免疫性疾病。对于滴度明显偏高且肝功能损害严重的乙型肝炎患者应怀疑重叠自身免疫性肝病的可能。本组检出ANA阳性1:160者2例, 均为慢性重型乙肝患者, 后完善相关检查确诊1例重叠自身免疫性肝炎; ANA1:320者1例, 为乙肝肝硬化, 后查抗线粒体抗体(AMA)阳性证实合并原发性胆汁性肝硬化。

慢性丙型肝炎存在与HCV复制有关的自身免疫现象<sup>[21]</sup>。我们采用核酸扩增技术(PCR)结合荧光标记探针杂交方法定量检测了160例HBV感染者的HBV-DNA, 发现自身抗体阳性组的HBV-DNA阳性率明显高于自身抗体阴性组, 且两组HBV-DNA定量的对数值比较

有显著性差异。这说明自身抗体的出现与HBV在体内的活跃复制有关, HBV复制可促进自身免疫, 最终加重肝脏的病理损害。

总之, HBV感染与自身免疫密切相关。HBV感染引发的自身免疫性反应与感染者的年龄、性别无关, 而与HBV感染史的长短、病毒的复制水平以及肝功能损害的程度有关。自身免疫是乙型肝炎的重要发病机制之一。我们认为, 乙肝患者检出自身抗体阳性, 提示机体免疫紊乱明显, 可在保肝、抗病毒治疗的基础上加用免疫调节剂治疗。对于检出高滴度自身抗体的乙肝患者还要高度警惕重叠自身免疫性疾病可能。

#### 4 参考文献:

- 1 李兰娟, 吴仲文. 重视肠道微生态变化在慢性肝病中作用的研究. 中国微生态学杂志 2002;14:63-64
- 2 李异玲, 傅宝玉. 慢性肝病的治疗. 辽宁药物与临床 2003;6:113-117
- 3 金仙玉, 张新宇. 乙型肝炎病毒母婴传播及其预防的研究现状. 中华围产医学杂志 2000;3:258-260
- 4 屠小卿, 仲人前, 范列英, 朱烨, 薛葛, 叶伟民. 自身免疫性肝病患者的自身抗体的分析. 上海医学检验杂志 2002;17:349-351
- 5 姬新颖, 付恩清, 白雪帆, 王海涛, 杨为松. 新型肝炎病毒TTV的研究进展. 微生物学免疫学进展 2000;28:53-59
- 6 齐名, 熊华, 刘新钰, 吴引伟, 李鹤林, 李保全, 宗永兰, 邵海枫. 不同基因型丙型肝炎病毒感染者的自身免疫表现. 临床检验杂志 2002;20:8-10
- 7 李健, 倪季军. 乙型肝炎病毒母婴传播问题探讨. 厦门大学学报 2000;39:869-871
- 8 陈勇, 洪艳, 杨连华, 倪崖, 陈念良, 凌志强, 俞为群, 毛江森. 中国五省市甲型肝炎病毒基因分型的研究. 病毒学报 2000;16:309-311
- 9 霍艳英, 徐德忠, 赵小宁, 李如琳, 刘蓬勃, 王全楚, 王歆. 西安和郑州地区丙型肝炎患者的HCV基因分型. 第四军医大学学报 2002;23:749-751
- 10 佟玉品, 詹美云, 毕胜利. 戊型肝炎病毒分子生物学及疫苗研究进展. 病毒学报 2002;18:93-96
- 11 范列英, 仲人前, 孔宪涛, 徐玲玲, 薛葛. 慢性肝炎与肝癌患者血清中肝特异性自身抗体的差异分析. 上海医学 2000;23:279-281
- 12 张春英, 全文斌, 冯百芳, 王琰, 陶其敏. 抗-HBs基因水平的研究. 中华微生物和免疫学杂志 1997;17:284-286
- 13 McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26:689-701
- 14 Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:613-619
- 15 Unal F, Genel F, Ozgenc F, Aksu G, Aydogdu S, Kutukculer N, Yagci RV. Immune status and autoantibody formation in children with chronic hepatitis B infection. *Panminerva Med* 2002;44:353-357
- 16 范列英, 仲人前, 孔宪涛, 薛葛, 徐玲玲. 慢性乙型肝炎患者血清中肝特异性自身抗体的检测. 第二军医大学学报 2000;21:309-312
- 17 Jablonska J, Zabek J, Kozłowska J, Cianciara J. Immunological disorders in patients with chronic viral hepatitis type C. *Przegl Epidemiol* 2001;55:459-464
- 18 Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, Matsushima H, Kawashima Y, Hankins RW, Miyakawa H. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and -positive patients. *J Autoimmun* 2001;17:243-249
- 19 Squadrito G, Previti M, Lenzi M, Le Rose EP, Caccamo G, Restuccia T, Di Cesare E, Pollicino T, Raimondo G. High prevalence of non-organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus-infected cirrhotic patients from southern Italy. *Dig Dis Sci* 2003;48:349-353
- 20 Liu WE, Tan DM, Zhang Z. A study of the autoimmune pathogenesis of chronic HCV infection. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2000;25:367-370
- 21 刘文恩, 谭德明, 范学工, 欧阳颖, 张铮. 丙型病毒性肝炎发病机制中自身免疫反应的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:120-121