

· 经验交流 ·

CIC解离技术在低水平HBsAg人群中应用研究

周华君 车飞虎 金晓娟 戴玉柱 成军

乙型肝炎患者中存在一类乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)持续低水平表达的无症状感染者,其比例高达15.03%~21.1%^[1,2]。这类患者由于HBsAg检测过程中方法学的影响往往被漏检,这不仅增加了HBV传播的风险,也对临床输血安全构成严重威胁。有研究报道乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者中存在HBsAg循环免疫复合物(HBsAg circulating immune complex, HBsAg-CIC)^[3],但关于HBV感染者持续低水平表达HBsAg的机制是否与HBV感染者中HBsAg-CIC的形成有关报道甚少。为了临床上准确诊断HBV和筛查HBsAg持续低水平表达的HBV无症状感染者,了解HBV感染者持续低水平表达HBsAg的流行病学特征,本次研究通过应用自主研发的CIC解离技术对无症状HBV感染患者血清标本检测结果进行分析。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年1月至2020年6月中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院154份无症状HBV感染血清标本,其中男性109例、女性45例;年龄23~87岁,平均年龄(46.54±13.30)岁。纳入标准为:在1年的随访期间,至少3次检测显示HBV感染和血清HBsAg水平低于10 IU/ml的慢性无症状感染者,并且采样间隔时间至少3个月^[4,5]。剔除:①合并感染人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒的患者;②感染早期存在急性HBV感染(急性肝炎)或低HBsAg水平的患者;③恢复期内处于HBsAg/抗-HBs转化阶段的低HBsAg水

平患者;④长期共存HBsAg/抗-HBs阳性的患者;⑤其病史表明在样本采集前6个月内使用了肝脏保护剂、酶降低剂、免疫调节剂或抗病毒药物的患者。所有患者均签署知情同意书,本次研究获得本院伦理委员会批准。

1.2 方法 按血清中HBsAg水平将纳入患者分为高水平HBsAg组(HBsAg>10 IU/ml)和低水平HBsAg组(HBsAg≤10 IU/ml)。比较两组一般资料,包括年龄、性别、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)等;按照HBV血清标志物将HBV感染者分为三种血清型:HBsAg/HBeAg/anti-HBc阳性、HBsAg/anti-HBe/anti-HBc阳性、HBsAg/anti-HBc阳性。HBV无症状HBV感染者的血清标本进行HBsAg-CIC检测,比较低水平HBsAg组和高水平HBsAg组中不同血清学模式下HBsAg-CIC分布特征。评价高低水平HBsAg组HBsAg-CIC与HBV DNA和HBsAg相关性。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.01统计软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;不符合正态分布的计量资料以中位数(四分位数)表示,采用Mann-Whitney U 检验;计数资料采用 χ^2 检验;采用线性相关分析评价相关性。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 154份血清根据HBsAg水平分为低水平HBsAg组($n=94$)和高水平HBsAg组($n=60$)。两组患者的一般资料比较见表1。

由表1可见,低水平HBsAg组平均年龄大于高水平HBsAg组,HBV DNA阳性率低于高水平HBsAg组,差异均有统计学意义($t=2.96$, $\chi^2=61.12$, P 均 <0.05);两组的性别和ALT水平比较,差异均无统计学意义($\chi^2=1.59$, $Z=1.19$, P 均 >0.05)。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.006.026

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY15H200001)

作者单位:310013 浙江杭州,中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院检验科

表1 两组一般资料比较

组别	性别(男/女)	年龄/岁	ALT/U/L	HBV DNA 阳性率/%
低水平 HBsAg 组	70/24	49.01 ± 13.45*	24(16,36)	29(30.85)*
高水平 HBsAg 组	39/21	42.63 ± 12.18	25(18,42.25)	57(95.00)

注:*,与高水平 HBsAg 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 154 份血清中 HBsAg/HBeAg/anti-HBc 阳性 20 例、HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性 114 例、HBsAg/anti-HBc 阳性 20 例。其中,低水平 HBsAg 组中 94 例均为 HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性血清学模式,高水平 HBsAg 组中 HBsAg/HBeAg/anti-HBc 阳性、HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性、HBsAg/anti-HBc 阳性血清学模式各 20 例。在 HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性的血清学模式中,低水平 HBsAg 组的 HBsAg-CIC 阳性率(69.15%, 65/94)高于高水平 HBsAg 组(35.00%, 7/20),差异有统计学意义($\chi^2 = 8.26, P < 0.05$),且低水平 HBsAg 组总 HBsAg-CIC 阳性率(69.15%, 65/94)高于高水平 HBsAg 组(51.67%, 31/60),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.77, P < 0.05$)。在高水平 HBsAg 组中,HBsAg/HBeAg/anti-HBc 阳性、HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性和 HBsAg/anti-HBc 阳性血清学模式的 HBsAg-CIC 阳性率分别为 75.00%(15/20)、35.00%(7/20)、45.00%(9/20)。三种不同血清学模式间 HBsAg-CIC 阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.94, P < 0.05$)。

2.3 高低水平 HBsAg 组间 HBsAg-CIC 与 HBV DNA 相关性结果 在低水平 HBsAg 组中,HBV DNA、HBsAg-CIC、HBsAg 三者间具有线性关系(r 分别=0.05、0.21、0.16, P 均 <0.05)。在高水平 HBsAg 组中,HBV DNA、HBsAg-CIC、HBsAg 三者同样具有线性关系(r 分别=0.27、0.24、0.13, P 均 <0.05)。

3 讨论

目前,HBsAg 仍然是诊断 HBV 感染的首选血清学标志物,是感染 HBV 后最早可检测出的血清学标志物,可在 HBV 感染后 4~10 周检测到^[6]。HBsAg 在监测自然史、评估治疗效果和预测疾病进展过程中发挥着重要作用^[7]。已有研究表明,部分 HBV 感染者持续低水平表达 HBsAg,这类人群有其独特的临床表现和流行病学特征。本次研究结果显示,低水平 HBsAg 组年龄大于高水平 HBsAg 组,HBV DNA 阳性率低于高水平 HBsAg 组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05),表明持续低水平表达 HBsAg 的 HBV 感染者具有年龄大、以 HBsAg/anti-

HBe/anti-HBc 阳性血清学模式为主、HBV DNA 低复制等特点,这与以往的研究结果[8]一致。

本次研究基于本课题组自主研发的免疫复合物解离专利技术,对高、低 HBsAg 组进行了 HBsAg-CIC 检测。结果表明,两组间 HBsAg/HBeAg/anti-HBc 阳性血清学模式的 HBsAg-CIC 阳性率均高于其他两种血清学模式。此外,在 HBsAg/anti-HBe/anti-HBc 阳性的血清学模式下,低水平 HBsAg 组的 HBsAg-CIC 阳性率高于高水平 HBsAg 组($P < 0.05$),表明低水平表达 HBsAg 人群清除免疫复合物的能力下降或相对下降(宿主免疫清除能力下降,而宿主免疫识别能力增强导致机体产生的免疫复合物超出清除能力,进而呈现出宿主免疫清除能力的相对下降)。结合既往研究和文献,HBsAg-CIC 的形成可能是宿主免疫有效清除 HBV 的重要途径^[9]。低水平 HBsAg 的形成与宿主处于免疫耐受状态密切相关,结合本次研究推测,低水平 HBsAg 组的 HBsAg-CIC 阳性率高于高水平 HBsAg 组可能是因为:在一般情况下,HBsAg 的清除过程是先宿主识别抗原,然后产生中和抗体,形成免疫复合物,最后宿主免疫清除免疫复合物。而低水平 HBsAg 人群处于免疫耐受状态,而这种耐受状态的发生集中在宿主免疫有效清除 HBsAg-CIC 的能力下降。

另外,本次研究还发现高低水平 HBsAg 组中 HBsAg-CIC 均与血清 HBsAg、HBV DNA 具有线性关系(P 均 <0.05),提示 HBsAg-CIC 的形成与病毒复制、血清 HBsAg 的抗原表位有效识别密切相关。Salpini 等^[10]的研究发现,不同 HBV 基因型分泌产生不同 HBsAg,目前鉴定出的数十种 HBV 基因型,在病毒复制、病毒蛋白表达和中和能力方面表现出明显的疾病进展和分子机制差异,提示低水平 HBsAg 人群基因型差异可能是机体难以识别血清 HBsAg 的抗原表位,导致 HBsAg-CIC 堆积,是其难以清除的原因。同时,有研究发现,HBsAg 的主要亲水区中发生的免疫逃逸突变,获得了 N-连接糖基化位点,影响和改变 HBsAg 的结构和抗原性,促进 HBV 再激活,导致了病毒持续复制。这可能是持续低水平

HBsAg 人群 HBsAg-CIC 形成和堆积的另一个途径^[11]。

综上所述,HBV 感染者持续低水平表达 HBsAg 的形成可能与其免疫耐受状态有关,其中宿主清除 HBsAg-CIC 的能力下降起到了一定作用。另外,基于本次研究调查的样本例数偏少、血清学模式不全等多个影响因素影响,上述结论还有待于进一步的体、内外的验证,从而深入研究以确定 HBsAg 持续低水平表达的 HBV 患者 HBsAg-CIC 的形成机制。

参考文献

- 1 Cheng J, Dai Y, Yan L, et al. Clinical characteristics and correlation analysis of subjects with chronic hepatitis B virus (HBV) infection and sustained low levels of hepatitis B surface antigen (HBsAg)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 1826-1835.
- 2 Wang T, Cui D, Chen S, et al. Analysis of clinical characteristics and S gene sequences in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2019, 43(2): 179-189.
- 3 Jiang X, Chang L, Yan Y, et al. Paradoxical HBsAg and anti-HBs coexistence among chronic HBV Infections: Causes and Consequences[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(4): 1125-1137.
- 4 王贵强, 段钟平. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版) [S]. 中国病毒病杂志, 2020, 10(1): 1-25.
- 5 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.
- 6 Höner C, Maasoumy B, Cornberg M. What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection?[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(3): 281-289.
- 7 Mak LY, Seto WK, Fung J, et al. Use of HBsAg quantification in the natural history and treatment of chronic hepatitis B[J]. Hepatol Int, 2020, 14(1): 35-46.
- 8 Wang T, Dai Y, Zhang M, et al. Sequence analysis of the Pre-S gene in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(5): 2689-2699.
- 9 Dai Y, Che F, Jiang X, et al. Clinical characteristics and association analysis of persistent low-level HBsAg expression in a physical examination population with HBV infection[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(1): 19-32.
- 10 Salpini R, Battisti A, Piermatteo L, et al. Key mutations in the C-terminus of the HBV surface glycoprotein correlate with lower HBsAg levels in vivo, hinder HBsAg secretion in vitro and reduce HBsAg structural stability in the setting of HBeAg-negative chronic HBV genotype-D infection[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 928-939.
- 11 Salpini R, Piermatteo L, Battisti A, et al. A hyper-glycosylation of HBV surface antigen correlates with HBsAg-negativity at immunosuppression-driven HBV reactivation in vivo and hinders HBsAg recognition in vitro[J]. Viruses, 2020, 12(2): 251.

(收稿日期 2022-03-01)

(本文编辑 高金莲)