

隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁

周永兴

周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038
项目负责人: 周永兴, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. zyxdx@fmmu.edu.cn
电话: 029-3537377 传真: 029-3537377
收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-20

摘要

HAV-HEV 5种嗜肝病毒发现和采取严格的预防措施后仍有不明原因的肝炎发生和流行, 10 a 来进行了大量寻找新肝炎病毒的工作, 但对其致病性至今仍为定论. 于是近年又有不少学者深入研究了HBV的血清学谱, 发现一部分未明原因肝炎实际由HBV引起. 本文就HBsAg阴性HB存在的证据, 机制以及如何定义和诊断综述如下.

周永兴. 隐匿性HBV感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11(2): 246-248

<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/246.htm>

0 引言

这个标题是美国密执安大学卫生系胃肠病学科 Conjeevaram et al^[1]博士为 *Hepatology* 杂志所写评述的题目. 这个标题并非骇人听闻, 就我国而言人群 HBV 感染率约 50-60%, 单 HBsAg 阳性者就有 1.2 亿多, 加上其他肝炎病毒感染, 确实是一个肝炎大国, 严重危害人民生命健康. 特别是临床上还存在大量肝炎病毒血清学阴性的肝炎, 据报道 1989 年发现 HCV 后, 输血后肝炎发病率仍高达 10-12%; 散发性肝炎中约 5-20% 检不出病因; 30% 的慢性肝炎病因不明^[2]; 40% 的暴发型肝炎患者无明确病因^[3]; 肝炎相关再生障碍性贫血患者在发生骨髓功能衰竭前有典型肝炎表现, 但大多未检出已知肝炎病毒^[4]. 由于此 1990 年代来国内外学者竭力寻找新型肝炎病毒, 但研究发现的 HGV、TTV、SENV 是不是嗜肝病毒还有待定论; 于是近年又有不少学者深入研究了 HBV 的血清学谱.

通常急性乙型肝炎恢复的指针是: 患者血清 HBV-DNA 的消失; 血清 HBeAg 转换、HBsAg 转换; 血清转氨酶正常^[5]. 这些变化意味着乙型肝炎病毒的清除和疾病的康复. 然而临床观察显示, 一些急性乙型肝炎恢复者可发生 HBV 自发的再活动或使用免疫抑制剂后再现^[5-8]. 随着对病毒抗原更敏感方法的建立; HBV-DNA 基因检测方法的引入^[9]; 以及对 HBV 基因变异认识意识的增强; 更导致了上述观念的部分修正, 尤其是对 HBV 感染者明显恢复后十多年的人应用 PCR 方法检测血清、肝、和外周血单个核细胞仍可检出 HBV-DNA^[11,12], 提示急性乙

型肝炎恢复不能导致病毒的完全清除, 而是免疫系统致使病毒维持在非常低的水平, 且仍可发生进行性肝脏病变. 从而提出了隐匿型(occult)乙型肝炎病毒感染的概念, 即血清 HBsAg 阴性、HBV-DNA 持续的 HBV 感染^[13].

1 隐匿型乙型肝炎病毒感染存在的证据

法国巴斯德研究所 Brechot 博士复习了大量文献并结合自己的研究提供了隐匿型乙型肝炎病毒感染存在的强有力的证据^[13], 根据感染个体 HBV 血清学检测结果分为: (1) 抗-HBc 和抗-HBs 阳性组. 对本组的急性 HBV 感染, 慢性肝炎和 HCC 不同类型的患者多截面研究, 明确表明有 HBV-DNA 的持续存在; 一般 HBV-DNA 的阳性率在肝组织里显著高于血清中; (2) 在抗-HBc 和抗-HBs 均阴性而有肝炎的临床和生化表现组. 也证实有 HBV-DNA 持续阳性; 但 HBV-DNA 的阳性率以抗-HBc 和抗-HBs 阳性组最高; (3) HBsAg 阴性的急性、尤其暴发性肝炎患者 HBV-DNA 检测阳性率低, 血和肝内分别为 10% 与 6%^[14,15]; HBsAg 阴性伴有或不伴 HCC 的慢性肝炎患者 30-35% 血清 HBV-DNA 阳性(范围在 5-55%); (4) 在对 HBV 高暴露的人群中阳性率在 7-60%; 这类人肝组织里的阳性率也显著高于血清中, 40-50% 对 13-71%, 与伴不伴 HCC 无关; (5) 随访急性 HBV 感染康复者, 临床生化持续 10-30 a 均正常, 但其中 55% 的患者血清 HBV-DNA 持续阳性(共检 45 份标本); Blackberg et al^[16]对急性乙型肝炎恢复后 30 a 患者的肝组织检出了病毒基因; (6) 随访自发的或抗病毒治疗后 HBsAg 转为阴性的慢性肝炎患者在血和肝组织中 HBV-DNA 的检出率分别高达 28% 和 94%; 这些患者在 HBsAg 转换后 HBV-DNA 的水平 and 抗-HBc 与抗-HBs 滴度明显低; (7) 自限性肝病及肝血清学指标正常的献血和捐器官者 HBV-DNA 检测均阴性^[17-19]; (8) 许多实验及临床研究也证实 HBsAg 阴性血液的传染性^[20-22]. Michalak et al^[23]报道鸭急性感染 WHV 恢复后, WHV-DNA 在血、肝和 PBMC 里持续终生; Thiers et al^[24]用 HBsAg 阴性 HBV-DNA 阳性血清给猩猩注射, 结果猩猩感染了 HBV; 输 HBsAg 阴性的血和母亲为 HBsAg 阴性结果发生了输血后肝炎和母婴 HBV-DNA 的传染^[24,25]; HBsAg 阴性肝硬化行肝移植后发生植入肝的再感染^[26-28]; 来自 HBsAg 阴性的器官致受者发生了感染^[30-32]; 这些观察均系通过检测患者肝组织中病毒的 RNA(包括病毒的基因组) 和 cccDNA 证实^[35,36]. 因此 HBV 血清标志的缺乏不能除外 HBV-DNA(含有传染性病毒颗粒) 在血清中循环, 该类血清的传染和 HBsAg 阳性血

的传染是相同的.用土拨鼠的研究也有同样的结论.在人和土拨鼠通过对 PBMC 系和在肝标本中鉴定 HBV 基因组的研究也证实 HBsAg 阳性和阴性 HBV 感染具相同的细胞向性^[29].由于各作者的 PCR 方法未能标准化,采用标本量及试剂的不同,HBV-DNA 检测差异变化在 10^1 - 10^3 copies/ml; 总之,这些研究共同确认了 HBV 感染是一个长期持续的感染,甚至在对病毒免疫反应明显有效时仍有 HBV 存在.

2 HBsAg 阴性患者 HBV 持续的分子基础

业已证明 HBsAg 阴性患者 HBV 持续的分子基础是病毒和宿主两方面.

2.1 关于病毒

2.1.1. 病毒保持极低度复制^[1,33,34,37] 对 HBsAg 阴性而 HBV-DNA 阳性的肝炎患者检测发现,HBV 感染的重要特征是循环病毒 DNA 的水平非常低及肝标本里每个细胞中病毒基因组的拷贝数低,这与在这些患者体内病毒增生水平极低不易检出相一致.对于这种情况有的研究者曾提出该类患者检出的 HBV 是否为远亲的新病毒,但按低严格杂交实验不支持这一假设,且 PCR 技术已在这些标本里明确显示 HBV 基因组存在^[18].另外 HBV 的动物模型研究的证明:由带有高病毒颗粒滴度的血清传染导致急性肝炎期多数肝细胞受染,相反,由低感染性 HBV 颗粒的传染仅能感染有限的肝细胞,并且使血中可检测蛋白的缺乏而有利于病毒持续.

2.1.2 HBV 基因变异 多个研究均证明存在 HBV 的基因变异^[38-42].S 基因的突变可致 HBsAg 检测阴性,这在 HBV 疫苗接种后发生逃脱突变(escape variants) 中早已报道;最近德国汉堡大学病毒与免疫研究所报道肝移植时注射大量 HBIG 致 HBV 的 S 基因变异,表达 S 蛋白基因发生氨基酸联合突变,如 G145R 频繁出现,结果诱导内质网分泌 S 蛋白停滞,血中 HBsAg 阴性;前 S1 序列的突变新近也有报道,前 S1 突变也可降低 HBsAg 的表达;对 S 基因突变的还可以改变病毒聚合酶(通过一个重迭读码框架编码的)的活性,并且聚合酶编码基因突变的影响也有其他新增证据.另外有报道前 S 和 S 序列突变后在 HBsAg 阴性患者可能影响病毒包膜的其他区域;且不同的 HBV 基因型在血清有或无可检 HBsAg 的患者中均存在.X 基因读码框架的突变也被描述,通过改变 HBx 和 / 或重迭核心启动子功能可减少 HBV 的复制,此可解释 HBV 病毒血症的低水平;其他报道也强调了前 C/C 序列可能的重要性,包括 encapsidation 信号,且这些设想已通过关键证据证实了.

尽管这些观察是相当重要的,但仅少数研究者注意到这一问题,并且仅显示病毒结构蛋白编码序列少数氨基酸突变,这种突变不好解释血清学反应缺乏;而作者研究用重组一个全长 HBV 基因,在传染猩猩后,从 HBsAg、抗-HBs 阴性患者和抗-HBc 阴性的 HCC 患者的血清中去分离;然后在体外行 S 基因的表达,同时伴有

HBsAg 合成,HBsAg 应用常规方法检测,结果作者认为不排除某些病例 HBV-DNA 突变后,可能改变病毒蛋白的抗原性^[13].但大量文献复习又表明 HBV 基因组的分离,不管是急性 HB 期还是明显缓解后 30 a 都未表现出序列的偏差^[15].还有证据表明用标准的 HBV 疫苗对 HBsAg 阴性 HBV-DNA 阳性的传染有保护作用.Teo et al^[15]新近总结了美国一大系列的 HBsAg 阴性患急性暴发性肝炎的病因,认为美国不存在隐匿性急性暴发性肝炎,HBV 前 C 和 C 基因变异是常见现象,暴发性肝炎患者未见特别类型基因变异.因此是否因基因变异而表现为 HBsAg 阴性其原因还值得深入研究.

2.2 宿主及相关因素^[1,13] (1)HBV 基因组复制的低水平可能取决于在肝内细胞因子合成情况,已有充分的证据证实细胞因子,如 TNF- 和 INF- 在转录后对 HBV 基因组的表达低调上起着重要作用.细胞因子合成又依赖于 HBV 特异的 CTL,他们的表达可能通过 HBV-DNA 激发.可以想像不管是自发的还是抗病毒治疗的结果,最后使病毒确立了与宿主免疫系统的平衡“equilibrium”在那里他刺激免疫反应,免疫反应反过来维持 HBV 在极低水平增生.这些现象及推论导致细胞内 HBV 基因组表达的非活动概念的产生.(2)感染时的年龄可能也影响免疫反应的模式.(3)免疫遗传可以干扰对 HBV 的免疫反应和该类患者体内对 HBV 蛋白成低的或缺乏体液免疫反应.另外形成免疫复合物致 HBVM 不能检出也可能是原因.(4)慢性酒精的积累可低调 HBV 抗原的表达.(5)HBV 和 HCV 同时感染可降低两个病毒中其中一个的增生.Squadrito 报道了一组 HBV 和 HCV 同时感染的患者的病毒学谱,82 例抗-HCV 阳性患者中 24 例为隐匿性 HBV 感染.可能 HCV 的核心蛋白对 HBV 有抑制作用.(6)还可能环境因素,例如伴随病,药物,化学致癌物等,都可发挥使病毒蛋白低表达的类似作用^[10].

3 研究的重要性

隐匿性 HBV 感染发生的地理差别的调查研究结论是:隐匿性 HBV 感染最常见于高流行区,在高流行区有 70-90% 的人暴露于 HBV,低流行区暴露率仅 5-20%.这种长期反复的暴露是形成大量隐匿性 HBV 感染的重要原因之一^[13].在我国临床上常见到大量不明原因的肝病患者,我们曾行肝组织活检,并行 HBV 抗原的免疫组化和原位杂交检测发现血清 HBVM 全阴性或抗-HBs、抗-HBc 阳性患者可呈阳性;但由于肝组织是采用石蜡包埋所以阳性率不高(15.5%),如采用冰冻切片或检测外周血单个核细胞或用新的灵敏的方法可能获得很高的阳性率.这些文献提示临床出现的 HBVM 阴性或抗-HBs、抗-HBc 阳性患者困扰临床医师,可能是对隐匿性 HBV 感染认识的不足.

总之,Conjeevaram 建议隐匿性乙型肝炎的定义是:在 HBsAg 阴性的个体用 PCR 或其他基因扩增方法检出了 HBV-DNA.隐匿性 HBV 感染的发生率似乎在 HB 流行区

和HBV血清学抗-HBc阳性个体,不论伴或不伴抗-HBs阳性.尽管隐匿性HBV感染肯定存在,但当前对于他的准确定义;他的流行病学情况;诊断方法;临床意义;抗病毒治疗;与肝癌的关系及对献血员、器官捐赠者条件的影响等均需进行深入研究^[1].以更新血清HBVM阴性或抗-HBs、抗-HBc阳性肝炎的认识.

4 参考文献

- Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: A hidden menace? *Hepatology* 2001;34:204-206
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, Mecks EL, Beack MJ. The Natural history of community-acquired hepatitis C in united . *N Engl J Med* 1992; 327:1899-1905
- Chemin I, Zoulim F, Merle P. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol* 2001;34:447-452
- Brown N, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-Associated aplastic anemia . *N Engl J Med* 1997;336:1059
- Perrillo RP. Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. *Sastroenterology* 2001;120:1009-1022
- Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DE, Jenes EA, Micetich KC, Young RC, Costa J. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med* 1982;96:447-449
- Lok ASF, Liang RHS, Chiu EKW, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100:182-188
- Yeo W, Chan PK, Chan HL, Mo FK, Johnson PJ. Hepatitis B virus reactivation during cytotoxic chemotherapy-enhanced viral replication precedes overt hepatitis. *J Med Virol* 2001;65:473-477
- Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995;21:313-321
- Paulotsky JM, Bestie A, Hezode C, Lonjon I, Darthuy F, Remire J, Dhumeauz D. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *J Virol Methods* 2000;85:11-21
- Pol S, Thiers V, Nalpas B, Degos F, Gazengel C, Carnot F, Tiollais P. Monoclonal IgM radioimmunoassay and serum HBV-DNA hybridization as diagnostic tools of HBV infection : relative prevalence among HbsAg-negative alcoholics , patients with chronic hepatitis or hepatocellular carcinomas and blood donors . *Eur J Clin Invest* 1987;17:515-521
- Brechot C. Applications of molecular biology to the diagnosis of viral hepatitis. In: Zuckerman A, Thomas H (eds). *Viral Hepatitis*. Thirded. *London Churchill Living* 1998:585-604
- Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Brechot PP. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely 'occult'? *Hepatology* 2001;34:194-203
- Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease. *Antiviral Res* 2001; 52:117-123
- Teo EK, Ostapowicz G, Hussain M, Lee WM, Fontana RJ, Lok ASF. Hepatitis B infection in patients with acute liver failure in the United States. *Hepatology* 2001;33:972-976
- Blackberg J, Kidd-Llunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000;33:992-997
- Dow BC, Peterkin MA, Green RH, Caeron SO. Hepatitis B virus transmission by blood donation negative for hepatitis B surface antigen , antibody to HbsAg, antibody to hepatitis B core antigen and HBV DNA. *Vox Sang* 2001;81:140
- Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T, Ikeda H. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of serologic HbsAg assay. *Transfusion* 2001; 41:1107-1113
- Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Kimura S, Ino S, Koike K. Frequent presence of HBV in the sera of HbsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001;41:1093-1099
- Wands JR, Fujita YK, Isselbacher KJ, Dazza MC, Thiers V, Tiollais P. Identification and transmission of a hepatitis B virus-related variants. *Proc Nantl Acad Sci USA* 1986;83:6608-6612
- Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth G. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985;312:270-276
- Coursaget P, Bourdil C, Adamowicz P, Chotard J, Diop Mar I, Yvonne B, Mevelec MN. HbsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet* 1987;12:1354-1357
- Michalak TI. Occult persistence and lymphotropism of hepadnaviral infection : in sights from the woodchuck virus hepatitis model. *Immunol Rev* 2000;174:98-111
- Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, Goudeau A. Transmission of hepatitis from hepatitis-B-seronegative subjects. *Lancet* 1988;ii:1273-1276
- Baginski I, Chemin I, Hantz O. Transmission of serologically silent hepatitis B virus along with hepatitis C virus in two cases posttransfusion hepatitis. *Transfusion* 1992;32:215-220
- Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, Carey K, Ferrell L, Roberts JP, Ascher NL. Occult hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994;343:142-146
- Roche B, Samuel D, Gigou M, Feray C, Virot V, Schmets L, David MF. De novo and apparent de novo hepatitis B virus infection after liver transplantation. *J Hepatol* 1997;26:517-526
- Tokeshi S, Sata M, Tanikawa K. Detection of serum HBV DNA and anti-HCV antibody in HbsAg seronegative patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 1996;70:103-107
- Cabrero M, Bartolome J, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear by a defective hepatitis b virus with deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 2002;9:265-271
- Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Serberg EC, Wiesner RH, Zetterman RK. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The national institute of diabetes and digestive and kidney diseases liver transplantation database. *Gastroenterology* 1997;113:1668-1674
- Uemoto S, Sugiyama K, Marusawa H, Inomata Y, Asonuma K, Egawa H, Kiuchi T. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. *Transplantation* 1998;65:494-499
- Ko WJ, Chou NK, Hsu RB, Chen YS, Wang SS, Chu SH, Lai MY. Hepatitis B virus infection in heart transplant recipients in a hepatitis B endemic area. *J Heart Lung Transpl* 2001;20:865-875
- Mason A, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo R. Molecular basis for persistent hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 1998;6:1736-1742
- Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimothono K, Chiba T. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000;31:488-495
- Laure F, Zaguri D, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH, Brechot C. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS related complex. *Science* 1985;229:561-563
- Pasquinelli C, Laure F, Chatenaud L, Beauvin G, Gazengee C, Bismuth H, Degos F. Hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *J Hepatol* 1986;3:95-103
- Babrero M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:1
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-791
- Carman W, Thomas H, Domingo E. Virus genetic variation hepatitis B virus a clinical example. *Lancet* 1993; 341:349-353
- Brunetto M, Rodriguez U, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 1999;42:69-80
- Zuckerman AJ, Zuckerman JN. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants. *J Med Virol* 1999;58:193-195
- Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sterntck M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutation from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394