

慢性 HBV 感染者血清病毒动力学的检测及分析

邓国宏, 王宗笠, 王宇明, 王开发, 范 焱

邓国宏, 王宇明, 范焱, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
王宗笠, 重庆大学理学院 重庆市 400030
王开发, 中国人民解放军第三军医大学数学教研室 重庆市 400038
邓国宏, 男, 1972-12-05 生, 四川省犍为县人, 汉族. 1994 年第三军医大学本科毕业, 1999 年第三军医大学硕士研究生毕业, 讲师. 主要从事病毒性肝炎的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30200234, No. 10101029
项目负责人: 邓国宏, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. ghdengsnp@hotmail.com
电话: 023-66768962 传真: 023-65337618
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

Dynamic determination and analysis of serum virus load in patients with chronic HBV infection

Guo-Hong Deng, Zong-Li Wang, Yu-Ming Wang, Kai-Fa Wang, Yi Fan

Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang, Yi Fan, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Zong-Li Wang, Department of Physics, Chongqing University, Chongqing 400030, China
Kai-Fa Wang, Department of Mathematics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30200234 and 10101029
Correspondence to: Dr. Guo-Hong Deng, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. ghdengsnp@hotmail.com
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To observe the variation of viral load and characteristics of within-host dynamics in patients with chronic hepatitis B virus infection without receiving antiviral therapy.

METHODS: Serum was collected consecutively from 3 patients with different clinical phenotype, ALT and total bilirubin were determined, and HBV DNA was measured by quantitative TaqMan fluorogenic PCR.

RESULTS: Spontaneous fluctuations of HBV DNA load were observed when measured daily, weekly and monthly in our untreated patients with chronic HBV infection, but there was no determinate correlation between HBV DNA loads and ALT values.

CONCLUSION: The spontaneous fluctuation of viral load in untreated patients with different clinical phenotype displays some characteristic patterns. Here we propose a PID pattern for host feedback to virus using population quantity of HBV as variant, which may be used for the prediction of virus-host ecological evolution in persistent HBV infection.

Deng GH, Wang ZL, Wang YM, Wang KF, Fan Y. Dynamic determination and analysis of serum virus load in patients with chronic HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):862-865

摘要

目的: 观察未抗病毒治疗的慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者体内病毒载量的变化及其动力学特征.

方法: 采用荧光定量 PCR 方法对未进行抗病毒治疗的 3 例不同临床表型的慢性 HBV 感染者血清 HBV 载量进行连续监测, 同时测定每一时相点的血清 ALT 和总胆红素.

结果: 不管是间隔 1 d、1 wk 还是 1 mon, 3 例慢性 HBV 感染者体内 HBV DNA 水平均存在自发波动, 且与血清 ALT 和总胆红素变化相关性不确定.

结论: 3 例慢性感染者体内 HBV 载量的自然波动表现出一定的模式特征. 我们提出一种宿主对病毒负反馈控制的 PID 模式, 以期对持续性病毒感染的体内生态演化作出评价和预测.

邓国宏, 王宗笠, 王宇明, 王开发, 范焱. 慢性 HBV 感染者血清病毒动力学的检测及分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):862-865
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/862.asp>

0 引言

近年来, 人们逐渐从生态学角度来研究感染性疾病. 宿主体内的群体动力学(within-host population dynamics)从多元、综合、定量、演化的角度来研究持续性病毒感染, 着重考虑对决定宿主体内病毒群体丰度(abundance)、多样性(diversity)和分布(distribution)的主要因素以及免疫反应进行定量描述和数学分析, 以揭示宿主体内持续性病毒感染的生态演化特征及机制^[1-4]. 虽然人们对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染有不少研究^[5-10], 但对于大量未用药的慢性 HBV 感染者体内的病毒动力学(within-host viral dynamics)仍然知之甚少, 绝大多数的病毒定量仅限于单一时相点的测定. 少量有关 HCV 的研究显示, 未治疗的慢性 HCV 感染者体内病毒载量存在自发波动, 变化范围为 2.5-128 倍, 且与 ALT 水平无显著相关^[11]. 体内 HBV 的自然波动是否存在尚不清楚. 我们采用荧光定量 PCR 方法对未进行抗病毒治疗的 3 例不同临床表型患者血清 HBV 载量进行了连续监测, 并分析 HBV 载量变化模式与疾病的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 按全国病毒性肝炎防治方案(西安, 2000)诊

断标准, 收集肝硬化和慢性肝炎(重度)住院患者各 1 例, 均为男性; 无症状携带志者 1 名, 女性(表 1).

表 1 3 例 HBV 感染者病史情况

编号	性别	年龄	诊断	HBV 血清学标志									
				HBsAg	HBsAb	HBcAg	HBcAb	HBcAbIgM	HAV	HCV	HDV	HEV	
A	男	56	肝炎肝硬化	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B	男	36	慢性肝炎(重度)	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C	女	38	无症状携带者	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

1.2 方法 3 例患者在监测期及监测前 1 a 内均未抗病毒治疗. 对每例患者均连续采集不同时相点的血样 3 mL, 分离血清后检测 ALT 和总胆红素, 剩余样本 -70 °C 冻存. 病毒标志采用商用 ELISA 试剂盒(上海科华公司产品)检测. 血清 ALT 和总胆红素检测采用 7250 型全自动生化分析仪(Hitachi, Japan)进行. HBV DNA 定量采用 LightCycler 荧光定量 PCR 仪(Roche 公司)和商用 HBV 荧光 PCR 试剂盒(深圳匹基生物)按说明书操作进行. 所有标本的病毒定量检测在同一批次进行, 确保各时相点结果之间的可比性.

统计学处理 为了分析两个变量间线性相关密切程度和相关方向, 选用 SPSS 9.0 统计软件中的 Pearson 相关分析方法^[12]. 计算公式如下:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

其中 \bar{x}, \bar{y} 分别是变量 x, y 的均值; x_i, y_i 分别是变量 x, y 的第 i 个观测值.

2 结果

慢性 HBV 感染者 A 血清 HBV DNA 在观察期间呈波动变化, 开始比较平缓, 逐渐加强, 变化幅度为 16 倍(最大值/最小值). 患者 C 血清 HBV DNA 也呈波动变化, 开始变化较强, 中间平缓, 再加强, 变化幅度为 76 倍(最大值/最小值). 患者 B 血清 HBV DNA 经小幅度波动后总体呈单调递减变化, 25 d 后趋于平稳, 变化幅度为 3 490 倍(最大值/最小值)(见图 1, 2). 患者 A、C 的血清 HBV DNA 波动与 ALT、总胆红素的波动之间无显著相关性, 而患者 B 血清 HBV DNA 波动与 ALT、总胆红素的波动显著相关见表 2.

表 2 3 例慢性 HBV 感染者血清 HBV DNA 与 ALT、总胆红素之间的 Pearson 相关系数

	HBV DNA		
	患者 A	患者 B	患者 C
ALT	0.712 (P=0.073)	0.785 (P=0.012)	-0.121 (P=0.740)
总胆红素	-0.202 (P=0.663)	0.863 (P=0.003)	0.090 (P=0.804)

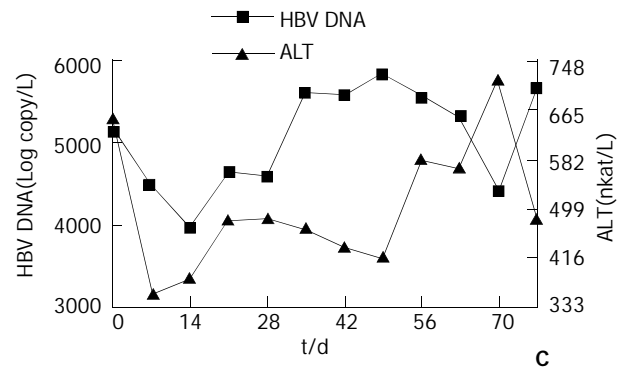
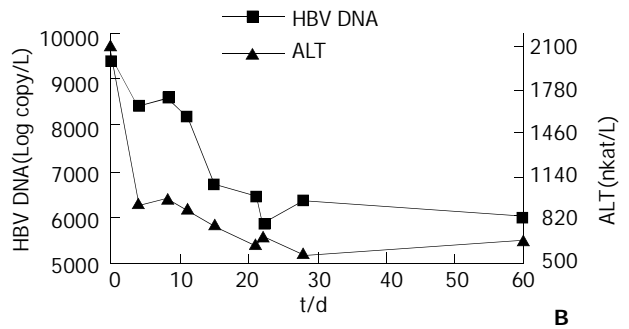
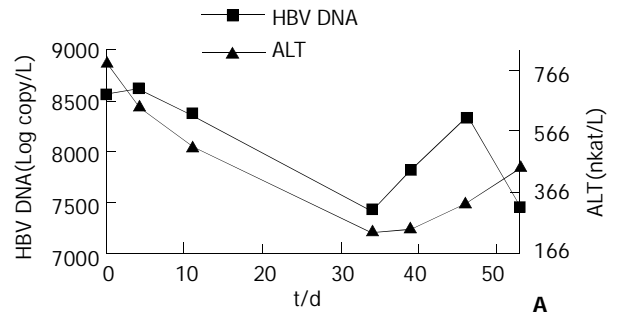
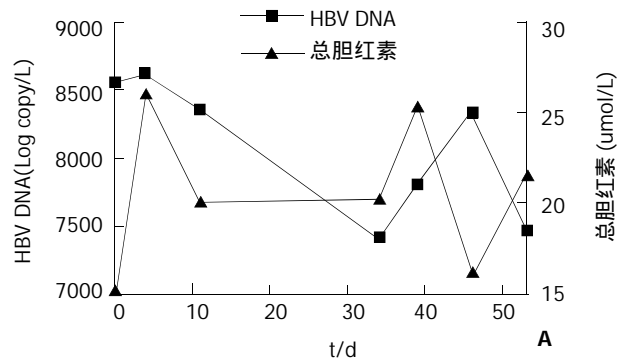


图 1 3 例慢性 HBV 感染者血清 HBV DNA 和 ALT.



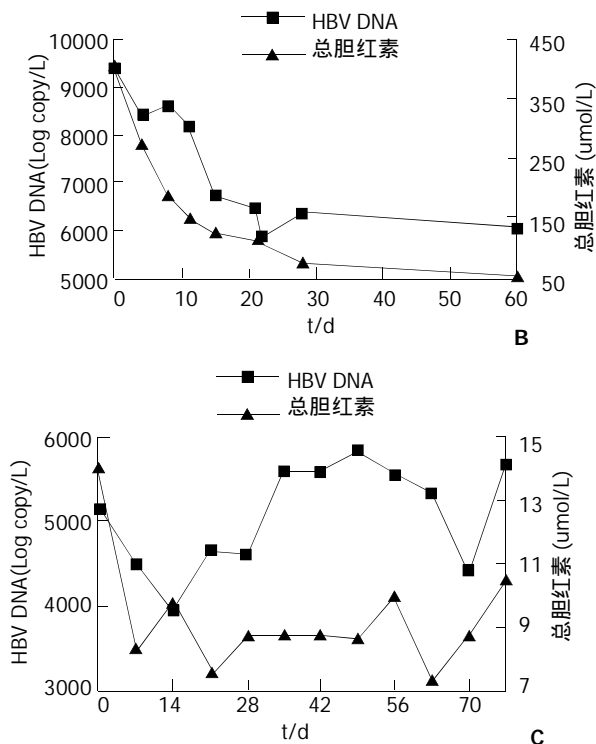


图2 3例慢性HBV感染者血清HBV DNA和总胆红素。

3 讨论

有关自然状态下慢性HCV、HBV感染者体内病毒动力学的研究极少,且采用斑点杂交、bDNA等半定量/定量方法,灵敏度低,稳定性、重复性不好。TaqMan荧光定量PCR方法^[13]是病毒定量中一种特异性强、灵敏度高、准确性好的方法,已开始推广。本实验所有HBV DNA定量均在同一批完成,更避免了定标、操作上的误差,定量数据之间的可比性高。

Chun et al 采用基于PCR的HBV DNA半定量方法对未抗病毒治疗的35例慢性HBV感染者病毒载量进行监测(每2 mo 1次,持续8 mo),结果表明,慢性HBV感染者血清病毒载量存在大幅度波动,这种自发波动取决于个体,与ALT、前C变异、HBV基因型、血清病毒标志(eAg状态)无关^[14]。我们的结果显示,不管是间隔1 d, 1 wk还是1 mo, 3例不同临床表型慢性HBV感染者体内HBV DNA水平均存在自发波动。同时,病毒水平的波动表现出一定的模式特征:患者A、C体内病毒水平无明显的单调递增或递减趋势,波动的幅度小,限于100倍以内,与ALT水平变化无相关性,病毒复制和肝功能处于一种相对稳定状态;患者B体内病毒水平呈单调递减,变化幅度大,为3 490倍,与ALT水平变化相关,显示出病毒受抑制、肝功能恢复的过程。限于采样原因,本实验观察到的病毒波动周期尚不够多,以后的研究尚需进一步延长监测时间,并观察更多的不同临床表型的病例数,以找到自然状态下慢性HBV感染者体内病毒动力学不同的特征模式。

实际上,宿主体内感染与免疫的群体动力学是高度非线性的、多元的,精确的数学模型需要考虑很多个变量且往往难以求解。因此,群体动力学研究本身需要新的简便有效的算法,根据体内病毒种群数量的变化来分析感染与免疫非线性相互作用的特征模式。若将健康人体考虑为稳态,则免疫反应类似于一种针对病原的负反馈控制。人体能经受病原体的干扰而恢复到相对稳定状态,表明存在高效的负反馈免疫自控机制。抗病毒药拉米夫定可使血清HBV DNA数量急剧下降,一旦撤除,病毒数量迅速上升至原来的水平并维持平衡,强烈表明机体的负反馈控制具有某种确定性^[15]。同时,HBV感染的病程及发病的严重程度在不同临床类型,甚至不同患者之间又各不相同,表现出极强的个性。PID(比例、积分、微分, partial, integral and differential)算法是自动化控制理论中研究反馈控制的一种优秀的模式,其算法综合考虑变量的当前值、平均值和变化率并给出反馈量,使系统获得长期稳定行为。控制论中的PID算法已成功地应用于神经生物学,在人工神经网络(artificial neural networks, ANNs)、视觉发生、听觉发生等研究中得到充分应用^[16-17]。因此,我们考虑将PID模式用于分析持续性病毒感染中宿主反馈控制的特征。宿主对病毒控制的PID模式可用公式表示如下:

$$X_{i+1} = X_i + \alpha_1 X_i + \alpha_2 \frac{\sum_j X_j}{m} + \alpha_3 \frac{X_i}{t} \quad (\text{其中 } j = i - m + 1)$$

X_i : 病毒的当前量; X_{i+1} : 病毒下一时刻的量; $\frac{\sum_j X_j}{m}$: 病毒在 X_i 附近的平

均值; $\Delta X_i / \Delta t$: 病毒在 i 时刻的前置变化率 $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$: PID 特征参数。

在PID模式下,我们不用知道病毒与宿主相互作用的太多细节,就可以抓住系统反馈控制的关键特征,这些特征可以刻画HBV感染的演化规律。同时, PID模式具有极强的个性,不同的HBV感染临床表型可能具有不同的PID特征。通过特征参数可以预见病毒种群的变化趋势。新近研究表明HBV在体内的清除可能主要依赖于非溶细胞性途径,肝细胞的损伤可能是非特异性CD₈⁺T细胞介导的^[18]。因此,宿主反应的模式是至关重要的,错误的、不考虑病毒种群当前值、平均值和变化率的模式(比如病毒数量已经下降了,宿主却继续损伤肝细胞)会导致严重肝损伤。宿主反应的PID模式可决定HBV是受到控制、持续感染还是暴发肝衰竭。

以HBV种群数量为变量,可确立宿主反应的PID模式特征,从而得到体内HBV动力学参数,包括HBV负载水平、产生率、清除率、感染细胞更新率等。成功的PID模式可同样适用于HCV、HIV等其他持续性病毒感染疾病,对持续性病毒感染的体内生态演化作出评价和预测,为临床防治提供理论依据和行之有效的措施。

4 参考文献

- 1 Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 1999;283:806-809
- 2 Levin BR, Antia R. Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science* 2001;292:1112-1115
- 3 Perelson AS. Modelling viral and immune system dynamics. *Nat Rev Immunol* 2002;2:28-36
- 4 Kelly JK, Williamson S, Orive ME, Smith MS, Holt RD. Linking dynamical and population genetic models of persistent viral infection. *Am Nat* 2003;162:14-28
- 5 Song W, Leung WK, Chan HL. Icteric flare of chronic hepatitis B in a 95-year old patient. *World J Gastroenterol* 2003;9:2876-2877
- 6 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697
- 7 Peng XM, Chen XJ, Li JG, Gu L, Huang YS, Gao ZL. Novel assay of competitively differentiated polymerase chain reaction for screening point mutation of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:1743-1746
- 8 Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- 9 Flichman D, Kott V, Sookoian S, Campos R. Acute hepatitis C in a chronically HIV-infected patient: Evolution of different viral genomic regions. *World J Gastroenterol* 2003;9:1496-1500
- 10 Baptista M, Kramvis A, Jammeh S, Naicker J, Galpin JS, Kew MC. Follow up of infection of chacma baboons with inoculum containing a and non-a genotypes of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:731-735
- 11 Gordon SC, Khan BA, Dmuchowski CF. The spontaneous fluctuation of viremia over time in untreated patients with chronic type C hepatitis. *Hepatology* 1995;22(4 Pt 2):341(A)
- 12 马斌荣. SPSS for Windows 在医学统计中的应用. 北京: 科学出版社, 2001:101-113
- 13 Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000;32:626-629
- 14 Chun YK, Kim JY, Woo HJ, Oh SM, Kang I, Ha J, Kim SS. No significant correlation exists between core promoter mutations, viral replication, and liver damage in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;32:1154-1162
- 15 Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-4402
- 16 Nykamp DQ, Tranchina D. A population density approach that facilitates large-scale modeling of neural networks: analysis and an application to orientation tuning. *J Comput Neurosci* 2000;8:19-50
- 17 Benck S, Slypen I, Meulders JP, Coralciuc V. Experimental partial and total kerma coefficients for aluminium at incident neutron energies from reaction thresholds to 65 MeV. *Phys Med Biol* 2000;45:29-48
- 18 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文，如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文，将优先发表，使 WJG 成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。