

caspase-3 活化复合物,引起细胞凋亡^[13]。本研究通过流式细胞仪检测 caspase-3 活性随着药物浓度增加逐渐增强,56μmol/L 组 caspase-3 活性是对照组的 11 倍。

综上所述,冬凌草甲素能诱导人胆囊癌 GBC-SD 细胞发生凋亡,其机制可能与细胞线粒体膜电位改变和 caspase-9、caspase-3 的激活密切相关。以上研究结果为进一步深入研究冬凌草甲素抗胆囊癌的分子机制提供了实验依据。

参考文献

- 1 刘净,谢韬,魏秀丽,等. 冬凌草化学成分的研究[J]. 中草药,2007,38(1):25-27
- 2 Ji Z, Tang Q, Zhang J, *et al.* Oridonin-induced apoptosis in SW620 human colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Oncol Lett*,2011,2(6):1303-1307
- 3 Kang N, Zhang JH, Qiu F, *et al.* Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways[J]. *Cancer Lett*,2010,294(2):147-158
- 4 Li X, Li X, Wang J, *et al.* Oridonin up-regulates expression of P21 and induces autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Int J Biol Sci*,2012,8(6):901-912
- 5 Gao FH, Liu F, Wei W, *et al.* Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Med*,2012,29(4):649-655
- 6 Zhang YH, Wu YL, Tashiro S, *et al.* Reactive oxygen species contribute to oridonin-induced apoptosis and autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2011,32(10):1266-1275
- 7 Li J, Yang L, Wu H. Oridonin induced the apoptosis of PC-3 cells and its mechanism[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*,2011,36(8):754-759
- 8 方敏,王晓东. 细胞凋亡的线粒体通路[J]. 北京大学学报:医学版,2002,34(1):1-10
- 9 谢晓原,陈俊辉,王少彬,等. 冬凌草甲素诱导人食管癌 SHEE 细胞凋亡及其线粒体改变[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(6):907-910
- 10 季宇彬,江剑,高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究[J]. 中草药,2011,42(10):2051-2055
- 11 Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(3):E41-E43
- 12 刘宇,季宇彬. 肿瘤细胞的凋亡及其分子机制研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2008,24(5):524-527
- 13 朱炎杰,高维娟. Cyt-C 与 caspase 在细胞凋亡中的作用及相互关系[J]. 中国老年学杂志,2011,31(15):2990-2992
- 14 Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes[J]. *J Biol Chem*,2002,277(22):19346-19352

(收稿日期:2012-09-13)

(修回日期:2012-10-11)

慢性乙肝病毒感染者肝组织学与临床资料的比较

王 伟 杨 方 张明香 魏 倪

摘 要 **目的** 研究慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者的肝组织学改变与临床资料的关系。**方法** 对 259 例慢性 HBV 感染者行肝活检及临床相关检查。分析病理与临床诊断的一致性,按病理诊断携带者、CHB 分组以及组织学是否 $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ 分组,对患者临床资料,包括社会学、生化学、病毒学、纤维化血清学、影像学资料与组织病理学资料比较。**结果** 病理及临床诊断总体一致性欠佳($Kappa = 0.273, P < 0.01$),尤其以携带者的诊断符合率最低(36/144,25%),但在 CHB 的临床分度方面有较好的符合率(66.7%~86.2%)。分组比较显示:CHB 组较携带组饮酒者以及 ALT、TBil 升高者居多(P 分别为 0.010、0.001、0.023),HA、PCⅢ、 γ 球蛋白水平增高(P 分别为 0.036、0.002、0.032),而 HBVDNA 水平降低($P = 0.010$);组织学 $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ 组较 $< G_2$ 或 $< S_2$ 组年龄大($P < 0.001$),饮酒者、男性、具家族史者居多(P 分别 < 0.001 、0.006、0.026),ALT、TBIL 升高及 WBC 降低者居多(P 分别 < 0.001 、0.005、0.023),HA、PCⅢ、 γ 球蛋白水平增高,脾脏面积增大,而 HBV DNA、HBsAg 水平降低。ROC 曲线分析显示脾面积和 PCⅢ的诊断界值分别为 25.15cm²、102.45μg/L,敏感度为 70.7%、69.8%,特异性为 67.9%、71.5%。**结论** 慢性 HBV 感染者的组织学与临床诊断总体一致性欠佳,以携带者最显著;脾面积 ≥ 25.15 cm²或 PCⅢ ≥ 102.45 μg/L 者,应更慎重地全面评估病情,肝组织活检的意义更大,以免延误治疗时机。

关键词 慢性乙型肝炎 组织学 临床 诊断

Relationship of Histology and the Laboratory Markers in Subjects with Chronic HBV Infection. Wang Wei, Yang Fang, Zhang Mingxiang, Wei Ni. Department of Hepatology, Shenyang Sixth People's Hospital, Liaoning 110006, China

Abstract Objective To explore the correlation between histology and the laboratory markers in patients infected with chronic hepatitis B virus. **Methods** Liver biopsy and related clinical test were investigated for a total of 259 patients with chronic HBV infection. To study the consistence of pathology and clinical diagnosis, patients were divided into different groups according to pathological diagnosis: HBV carriers, CHB degree, and histology degree (whether $\geq G_2$ or $\geq S_2$), and their clinical data such as sociology index, biochemical indicator, virology, serum fibrosis index and imaging data were compared. **Results** The general diagnose accordance rate was poor ($Kappa = 0.273$, $P < 0.01$), especially in that of HBV carriers groups (36/144, 25%), but high in that of CHB degree groups (66.7% - 86.2%). The percentage of cases who drank was more in CHB degree groups than that in HBV carriers groups, respectively, so was the number of cases with higher ALT or TBil level ($P < 0.001$, 0.023). HA, PCⅢ, and the level of γ globulin of cases increased (P value were 0.036, 0.002, 0.032 respectively), on the opposite of the level of HBVDNA ($P = 0.010$). The middle age of $< G_2$ group and $\geq G_2$ group was 23 and 27, respectively ($P < 0.001$). The number of cases who drank, was female or had family history was more in $\geq G_2$ group than that in $< G_2$ group ($P < 0.001$, 0.006, 0.026), so was the number of cases with higher ALT or TBIL level or lower level of WBC ($P < 0.001$, 0.005, 0.023). HA, PCⅢ and the level of γ globulin and number of cases with enlarged spleen area increased in $\geq G_2$ group than that in $< G_2$ group, on the opposite of HBVDNA level and HBeAg level. The ROC curve analysis showed that the diagnostic cut off of spleen area and PCⅢ was 25.15cm² and 102.45ng/ml, with the sensitivity of 70.7% and 69.8%, and the specificity of 67.9% and 71.5%, respectively. **Conclusion** The general diagnose accordance rate of patients with chronic HBV infection was poor, especially for that of carriers. Patients with enlarged spleen area ($\geq 25.15\text{cm}^2$) or higher level of PCⅢ ($\geq 102.45\mu\text{g/L}$) should be paid more attention in diseases evaluations and results of liver biopsy, in case of timely treatment.

Key words Chronic hepatitis B; Histology; Clinic; Diagnosis

人类暴露于乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 后的发展和结局并不一致, 包括 HBV 携带者、慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB), 以及相关的肝纤维化、肝硬化, 有时早期难以诊断。虽然肝组织学检查在 HBV 感染领域仍难以替代, 但其毕竟有创并具一定的风险性, 难于广泛及重复开展^[1,2]。本文对 259 例经肝活检的慢性 HBV 感染者进行了回顾性的研究, 探讨其肝组织学改变与临床资料之间的关系, 旨在筛选有意义的无创性检测方法, 以早期诊断并为选择合适抗病毒治疗时机提供帮助。

材料与方法

1. 研究对象: 259 例均为沈阳市第六人民医院 2007 年 8 月 ~ 2009 年 10 月期间住院并经过肝活检的患者。其中男性 169 例, 中位年龄 25 (9 ~ 55) 岁。临床诊断: 慢性 HBV 携带者 144 例, CHB 患者 115 例, 其中轻度 87 例、中度 25 例、重度 3 例。上述诊断均符合中华医学会 2000 年病毒性肝炎防治方案及 2010 年慢性乙型肝炎防治指南^[3,4]。全部病例均未接受抗病毒治疗, 半年内未服用降酶药物。

2. 分组及观察指标: 按病理学诊断将全部病例分为 HBV 携带者组 (G0S0) 及 CHB 组 [$G \geq 1$ 和 (S_1 ^[3])] ; 以病理学 " $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ " 分界, 分为 "活动组及稳定组"。观察的临床指标为相关社会学、生化学、病毒学、纤维化血清学、血常规及超声影像学资料。

3. 肝活体组织学检查: 首先于超声下定位, 确定穿刺深度。穿刺以德国贝朗 "一秒针" 操作, 标本长度均在 1.5cm 以上, 经甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色及 Masson 染

色, 在光学显微镜下多视野读片, 由固定病理医师作出诊断^[3]: 炎症分级 G_{0-4} 、纤维化分期 S_{0-4} ; CHB 分度: 轻度 (G_{1-2} 、 S_{0-2})、中度 (G_3 、 S_{1-3})、重度 (G_4 、 S_{2-4})。

4. 仪器设备: 生化学检测采用美国雅培全自动生化分析仪及原厂试剂; 蛋白电泳采用琼脂糖电泳法, 应用 Helena 全自动电泳仪; HBsAg、HBeAg 采用 ELISA 法, 仪器为 KHBST360 酶标仪, 试剂为上海华美生物工程公司生产; HBVDNA 定量采用 PCR 法, 仪器为 MJ 公司生产的 OPTICON 基因扩增仪, 试剂为深圳匹基公司提供。肝纤维化系列: 层黏连蛋白 (Laminin, LN)、Ⅲ型前胶原 (precollagen Ⅲ, PC Ⅲ)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、Ⅳ型胶原 (Ⅳ Collagen, Ⅳ C) 均采用固相放射免疫法, 试剂盒由上海海军医学研究所提供。腹部超声检查采用美国 ATL 公司生产的 3500 彩色多普勒超声仪。

5. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析, 一致性检验采用 Kappa 检验、计数资料采用 χ^2 检验, 不符合正态分布的资料采用秩和检验, 诊断界值的确定采用 ROC 曲线分析方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 临床诊断与病理诊断的一致性: 经病理学诊断, 259 例患者中仅 36 例为 HBV 携带者 (临床诊断为 144 例)。余 223 例均为 CHB 患者 (临床诊断 115 例), 其中 CHB 轻度 186 例 (83.4%)、中度 32 例 (14.3%)、重度 5 例 (2.2%)。总体病理学诊断与临床诊断的一致性欠佳, 主要为临床诊断 HBV 携带者与病理诊断的符合率较低, 关联性分析: $Kappa = 0.273$, $P < 0.01$ 。而临床诊断轻、中、重度与病理诊断

的符合率尚好(表1)。

表 1 临床诊断与病理学诊断的一致性[*n* = 259, *n*(%)]

临床诊断	<i>n</i>	病理诊断			
		携带者	CHB 轻度	CHB 中度	CHB 重度
HBV 携带者	144	36(25.0)	106(73.6)	0(0.0)	2(1.4)
CHB 轻度	87	0(0.0)	75(86.2)	11(12.6)	1(1.1)
CHB 中度	25	0(0.0)	5(20.0)	20(80.0)	0(0.0)
CHB 重度	3	0(0.0)	0(0.0)	1(33.3)	2(66.7)

Spearman r_s = 0.577, *P* < 0.001

表 2 病理学诊断 HBV 携带者与 CHB 患者的临床资料比较

项目	<i>n</i>	饮酒史* (+)	ALT* (>1×ULN)	TBIL* (>1×ULN)	HBVDNA# (lg 拷贝/毫升)	HA# (ng/ml)	PCⅢ# (μg/L)	γ 球蛋白# (%)
CHB	223	46(20.6)	108(48.6)	39(17.6)	7.5(1.6)	88.2(38.1)	99.8(49.2)	19.4(6.0)
携带者	36	1(2.8)	0(0)	1(2.8)	7.9(0.8)	69.4(43.7)	69.1(42.8)	18.7(4.8)
统计值		6.649	30.123	5.172	-2.567	-2.098	-3.109	-2.149
<i>P</i>		0.010	<0.001	0.023	0.010	0.036	0.002	0.032

*表示[*n*(%)];#表示中位数(四分位间距)

3. 病理学显示为活动组及稳定组的临床资料比较:两组患者在年龄、性别、家族史、饮酒史;ALT 及 TBil 升高、WBC 降低;γ 球蛋白、HBeAg、HA、PCⅢ、

HBVDNA 水平;以及脾脏面积的差异具有统计学意义(表3、表4)。而在血常规中 HGB、PLN;血清 LN、IVC 水平、HBeAg 是否阳性方面的差异无统计学意义。

表 3 病理学显示为活动组及稳定组的临床计数资料比较[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	男性	饮酒史(+)	家族史(+)	ALT>1×ULN	TBIL>1×ULN	WBC<4×10 ⁹ /L
稳定组	184	73(40.1)	22(12.0)	49(26.8)	52(28.6)	21(11.5)	15(8.2)
活动组	75	17(22.4)	25(32.9)	31(40.8)	56(73.7)	19(25.3)	16(21.1)
χ ²		7.429	15.751	4.940	44.832	7.799	5.172
<i>P</i>		0.006	<0.001	0.026	<0.001	0.005	0.023

表 4 病理学显示为活动组及稳定组的临床计量资料比较[中位数(四分位间距)]

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	γ 球蛋白 (%)	HBVDNA (lg 拷贝/毫升)	HBeAg (s/co)	HA (ng/ml)	PCⅢ (μg/L)	脾脏面积 (cm ²)
稳定组	184	23(10)	19.0(5.1)	7.66(1.2)	345.0(115.2)	79.1(45.1)	85.5(45.1)	23.0(3.3)
活动组	75	27(14)	20.8(6.6)	7.21(2.1)	285.7(228.2)	93.7(33.9)	112.8(47.3)	27.0(10.6)
χ ²		-3.609	-2.003	-2.777	-4.120	-2.808	-5.100	-4.702
<i>P</i>		<0.001	0.045	0.005	<0.001	0.005	<0.001	<0.001

4. 按病理学“≥G₂ 或 ≥S₂”为分界点,受试者工作特征曲线(ROC)分析结果:年龄、γ 球蛋白、HBeAg、HA、PCⅢ、HBV DNA 水平及脾脏面积对 G₂ 以上诊断界值分别为 25.5 岁、19.26%、339.47s/co、79.99ng/ml、102.45μg/L、7.41lg 拷贝/毫升、25.15cm²;其诊断的敏感度分别为 63.2%、59.3%、67.9%、71.2%、69.8%、60.9%、70.7%;特异性分别为 59.9%、53.7%、54.9%、53.4%、71.5%、62.0%、67.9%;ROC 曲线下面积分别为 0.642、0.589、0.699、0.642、0.757、0.615、

0.719。

讨 论

我国 1~59 岁一般人群 HBsAg 携带率为 7.18%,且以围生期传播为主,易发展成慢性感染,大多数儿童和成人患者最终将从免疫耐受期进展至免疫激活期,即抗病毒治疗的最佳时期^[7~9]。为获得最大的疗效,近年国内外学者已达成共识,对其适应证亦有较明确的规定,但对于启动治疗时机的把握,在很大程度上取决于诊断的准确性。其中重要的手段为组织病理

学检查,即所谓“金标准”^[3]。本研究以此为基础来探讨临床常用的、易于接受的、较为敏感的无创性临床指标,来提高诊断水平,在我国当前有非常重要的现实意义。

本研究对于临床与病理诊断符合率的比较发现,两者虽有一定的相关性($r_s = 0.577, P < 0.001$),但不同亚组间一致程度存在差异。尤其对于 HBV 携带者,诊断符合率仅 25.0%,提示目前 ALT 的检测正常值上限之内包含了为数不少的肝脏不正常人群^[10]。但对于 CHB 患者,肝组织学检查与临床诊断有较高的一致性,与于晓辉等^[11]的报道相似。以病理学诊断的携带者、CHB 的分组比较结果:除 ALT、TBIL 增高外, γ 球蛋白增高、肝纤维化指标中 HA、PCⅢ的高值也提示可能为活动性肝病,嗜酒对疾病进展的影响也不容忽视,而血清 HBVDNA 高水平则提示为免疫耐受阶段的 HBV 携带者。

与我国 2005 版慢性乙肝防治指南对于抗 HBV 治疗的组织学指征要求“ $\geq G_2$ ”不同的是,2010 版指南将组织学“ $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ ”作为启动抗 HBV 治疗的指征,因此本文以是否组织学“ $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ ”进行分组比较各项临床资料。研究仍显示嗜酒是肝炎活动的影响因素,是导致肝病进展在性别间存在显著性差异的原因之一,这也提示临床医生在对患者进行教育的时候,应更加重视饮酒对疾病进展的影响,但临床实际情况可能并不乐观。年龄增加提示病程延长,符合我国 HBV 感染的流行病学特点。生化检查 ALT 作为反映肝脏炎症的敏感指标亦得到证实,部分病例 TBIL 增高,在疾病活动组较为明显^[8]。肝纤维化指标 HA、PCⅢ与肝脏炎症分级的相关性较好,与其他学者的结论一致^[12,13]。由于慢性肝病导致库普弗细胞功能减退,不能清除内源性或肠源性抗原物质,B 淋巴细胞产生大量抗体,导致血清 γ 球蛋白增高,本研究两种分组法均提示其显著性差异($P = 0.032$ 及 < 0.001),应作为判定疾病程度的重要指标之一。超声检测脾脏面积在鉴别 CHB 与携带者方面意义不大,但随着肝病进展($\geq G_2$ 或 $\geq S_2$)脾面积亦明显增加($P < 0.001$),末梢血 WBC 也随之降低($P = 0.023$),因此,在影像学检查尚未出现明显的纤维化之前,脾面积的增大是有意义的指标。HBeAg 是否阳性不能对病情做出判断,但 $\geq G_2$ 组的血清 HBeAg 含量降低,提示定量检测在肝脏炎症较重时意义更大^[14,15]。

为了进一步明确上述各指标的价值,本研究通过 ROC 曲线分析,显示脾脏面积、血清 PCⅢ含量是判别肝组织学是否 $\geq G_2$ 或 $\geq S_2$ 的较理想指标。因此,对于慢性 HBV 携带者或临床资料显示肝病进展程度不符合抗病毒治疗一般适应证的患者,若脾面积 $\geq 25.15\text{cm}^2$ 或 PCⅢ $\geq 102.45\mu\text{g/L}$,应更慎重地全面评估病情,肝组织活检的意义更大,以免延误治疗时机。

参考文献

- European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B[J]. Hepatol, 2009,50(2):227-242
- Keeffe EB, Dieterich DT, Han S, *et al.* A Treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the united States: 2008 Update[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2008,6(12):1315-1341
- 中华医学会传染病与寄生虫病学学会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001,19(1):56-63
- 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011,19(1):13-24
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2010,18(3):167-170
- 王纯正,徐智章. 超声诊断学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:271-282
- Liang X, Bi S, Yang W, *et al.* Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China - declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination[J]. Vaccine, 2009,27(47):6550-6657
- 梁晓峰,陈园生,王晓军,等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005,26(9):655-658
- Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, *et al.* National institutes of health consensus development conference statement: management of hepatitis B[J]. Ann Intern Med, 2009,150:104-110
- 中华医学会肝病学分会、中华医学会消化病学分会. 常用肝脏生物化学试验的临床意义及评价共识[J]. 2010,18(5):387-393
- 邱德凯. 自身免疫性肝炎的诊断和治疗[J]. 临床肝胆病杂志, 2012,28(5):321-322
- Patel K, Lajoie A, Heaton S, *et al.* Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003,18(3):253-257
- 陈永鹏,冯筱榕,戴琳,等. 代偿性肝硬化无创诊断指标的筛选及评价[J]. 中华肝脏病杂志, 2003,11(4):225-227
- Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection[J]. Hepatology, 2002,36(6):1408-1415
- 柳龙根,方国平,马春明,等. 乙型肝炎患者血清 HBeAg 和 HBV-DNA 载量与临床分型及病理分级分期的关系[J]. 临床荟萃, 2001,19(24):1391-1393

(收稿日期:2012-09-26)

(修回日期:2012-10-15)