

乙型肝炎、丙型肝炎合并EB病毒感染与肝硬化发生的横断面研究

杨玉奇¹, 张慧², 李昕², 王冰², 刘子杰² (1.大理市第二人民医院 检验科, 云南 大理 671003; 2.昆明医科大学第一附属医院 检验科, 昆明 650031)

摘要: 目的 探讨EB病毒(epstein-barr virus, EBV)感染对乙型肝炎、丙型肝炎肝硬化的影响。方法 选取2014年1月至2014年6月昆明医科大学第一附属医院确诊的乙型肝炎和丙型肝炎患者424例。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者306例, 其中合并EB病毒感染者130例, 乙型肝炎肝硬化141例; 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染者118例, 其中合并EB病毒感染者66例, 丙型肝炎肝硬化41例。以卡方检验分析乙型肝炎、丙型肝炎患者合并EB病毒感染与肝硬化的相关性。以Logistic回归调整抗病毒治疗史、饮酒、病程、性别、年龄、乙型肝炎、丙型肝炎病毒载量后分析EB病毒与肝硬化的相关性, 采用Mann-Whitney检验分析ALT、AST、ALT/AST、TBA、TBil、DBil在不同组间的差异。结果 卡方检验结果表明EB病毒与丙型肝炎肝硬化有显著相关性($P = 0.018$), 与乙型肝炎无显著相关性($P = 0.342$)。经Logistic回归调整后EB病毒与丙型肝炎肝硬化仍有一定相关性($P = 0.05$)。Mann-Whitney检验结果发现乙型肝炎和肝硬化及丙型肝炎与肝硬化组比较, ALT、ALT/AST、TBA、TBil、DBil差异有显著性, 而与EB病毒感染无关。结论 EB病毒感染与丙型肝炎肝硬化有一定相关性, 乙型肝炎与丙型肝炎患者是否感染EB病毒对ALT、AST、ALT/AST、TBA、TBil、DBil无明显影响。

关键词: EB病毒; 肝炎, 乙型; 肝炎, 丙型; 肝硬化

A cross-sectional survey of relationship between hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infected with epstein-barr virus infection and liver cirrhosis

YANG Yu-qi¹, ZHANG Hui², LI Xin², Wang Bing², Liu Zi-Jie² (1. Department of Laboratory Medicine, The Second People's Hospital of Dali, Dali 671003, Yunnan Province, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between hepatitis B/C co-infected with epstein-barr virus (EBV) and liver cirrhosis. **Methods** Total of 424 patients with hepatitis B and C from January 2014 to June 2014 in the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University were studied, among whom 306 patients were infected with HBV, 130 out of the 306 patients were co-infected with EBV, and 141 of them were with liver cirrhosis. Total of 118 patients were infected with hepatitis C virus, 66 patients were co-infected with EBV, and 41 of them were liver cirrhosis. The Chi-square test was used to determine the relationship between EBV and hepatitis B/C. Alcohol intake, medical duration, gender, age and viral load adjusted with Logistic regression method was used to analyze the correlation of EB virus and liver cirrhosis. Mann-Whitney test was applied to analyze variations of ALT, AST, ALT/AST, TBA, TBil and DBil in different groups. **Results** Chi-square test result indicated that there was a significant relationship between liver cirrhosis patients co-infected with EB virus and hepatitis C virus ($P = 0.018$). However, no significant difference was observed between EB virus and liver cirrhosis ($P = 0.342$), but there was still a correlation after adjusted with Logistic regression ($P = 0.05$) for hepatitis C patients co-infected with EB virus. Mann-Whitney test showed large diversities of ALT, AST, ALT/AST, TBA, TBil, DBil results between liver cirrhosis and hepatitis B/C groups. **Conclusion** There was a relationship between hepatitis C patients co-infected with EBV virus and liver cirrhosis, but EB virus dose not influence ALT, AST, ALT/AST, TBA, TBil, DBil in hepatitis B/C patients.

Key words: Epstein-barr virus; Hepatitis B; Hepatitis C; Liver Cirrhosis

EB病毒（Epstein Barr virus, EBV）是一种普遍存在、主要侵犯人类B淋巴细胞的疱疹病毒群。EBV感染所致肝功能损伤为自限性肝炎，可引起胆汁淤积，少数可发展为慢性肝炎及肝功能衰竭^[1]。据报道，在不明原因的肝功能损伤中，0.85%为EB病毒性肝炎^[2]。肝硬化是临床常见的慢性进行性肝病，由一种或多种病因长期或反复作用形成的弥漫性肝损害。肝硬化的病因很多，目前在中国，病毒性肝炎尤其是慢性乙型、丙型肝炎，是引起门静脉性肝硬化的主要因素^[3]。研究表明HBV DNA载量、饮酒史和病程对肝硬化的发生有一定影响^[4]，但乙型、丙型肝炎病毒合并EB病毒感染对肝硬化是否有影响尚不明瞭，本文采用昆明医科大学第一附属医院EBV感染合并乙型、丙型肝炎病毒感染的住院病例，分析EB病毒对乙型肝炎、丙型肝炎肝硬化的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集2014年1月至2014年6月昆明医科大学第一附属医院确诊的乙型肝炎和丙型肝炎住院患者，总计504例，入组标准：乙型肝炎/丙型肝炎病史1年以上，乙型肝炎和丙型肝炎患者进行HBV DNA、HCV RNA定量检测，所有患者均进行EB DNA定量检测，采用CT、磁共振、肝硬度检测或肝脏组织活检进行肝硬化的诊断；排除标准：排除自身免疫性疾病、传染性单核细胞增多症与疑似患者、其他肿瘤疾病、非乙型、丙型肝炎者、重叠其他肝炎病毒感染者、酒精性肝硬化、脂肪肝、药物性肝炎、自身免疫性肝炎、全身性疾病的肝脏表现、乙型肝炎组排除丙型肝炎病毒合并感染、丙型肝炎组排除合并乙型肝炎病毒感染。经筛选后424例病例符合入组标准。乙型肝炎患者306例，其中合并EB病毒感染者130例，肝硬化141例，男性214例，女性92例，年龄14~77岁，中位数为44.5岁；丙型肝炎病毒感染者118例，其中合并EB病毒感染者66例，肝硬化41例，男性65例，女性53例，年龄14~79岁，中位数为42岁。

1.2 试剂及仪器 HBV DNA、HCV RNA、EB DNA检测仪器为美国ABI7300实时荧光定量PCR仪，

试剂购自湖南圣湘生物工程有限公司，EB DNA采用外周全血提取核酸进行检测。丙氨酸氨基转移酶（alanine transaminase, ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（aspartate tyansaminase, AST）、总胆汁酸（total bile acid, TBA）、总胆红素（total bilirubin, TBil）、直接胆红素（direct bilirubin, DBil）采用OLYMPUS AU5400全自动生化分析仪进行检测，ALT、AST检测试剂购自中生北控生物科技股份有限公司，TBA试剂购自上海复星长征医学科学有限公司，TBil、DBil检测试剂购自日本禾纯药工业株式会社。所有检测均按试剂说明书操作。

1.3 研究方法 收集入组患者临床资料（姓名、性别、年龄、出院诊断、饮酒史、抗病毒治疗史、病程、HBV DNA、HCV RNA定量检测结果、EB DNA结果、是否发生肝硬化）。采用Pearson卡方检验分析EB病毒对乙型肝炎、丙型肝炎肝硬化发生的影响；采用Logistic回归分析校正年龄、性别、病史、饮酒史、HBV DNA、HCV RNA后分析EB病毒对乙型肝炎、丙型肝炎肝硬化发生的影响；采用Mann-Whitney非参数检验分析肝硬化与肝炎（乙型肝炎、丙型肝炎）组间及EB病毒感染与非感染组间ALT、AST、ALT/AST、TBA、TBil、DBil的差异。

1.4 统计方法 EB病毒与乙型/丙型肝炎肝硬化之间的关系采用Pearson卡方检验，ALT等非正态分布数据在各组间的差异采用Mann-Whitney *U*检验；Logistic回归分析时哑变量的编码为：性别（1：男，0：女），饮酒史（1：有，0：无）；HBV DNA、HCV RNA、EB DNA定量检测结果转化为以10为底的对数，病史以天为单位进行分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 EB病毒对乙型肝炎、丙型肝炎肝硬化的影响 EB DNA检测结果的Cut-off值设为400拷贝/ml，经Pearson卡方检验分析EB病毒感染与丙型肝炎肝硬化有显著相关性（ $\chi^2 = 5.583$, $P = 0.018$ ）与乙型肝炎无显著相关性（ $\chi^2 = 0.904$, $P = 0.342$ ），见表1。

表1 Pearson 卡方检验分析 EB 病毒与乙型、丙型肝炎肝硬化的关系（例）

组别		EB DNA			χ^2 值	<i>P</i> 值
		阴性	阳性	合计		
丙型肝炎肝硬化	无	40	37	77	5.583	0.018
	有	12	29	41		
	合计	52	66	118		
乙型肝炎肝硬化	无	99	66	165	0.904	0.342
	有	77	64	141		
	合计	176	130	306		

2.2 调整饮酒史、病程、年龄、性别、HCV RNA后EB病毒感染与丙型肝炎肝硬化发生的相关性 经Logistic回归分析后EB病毒载量与丙型肝炎肝硬化的发生有一定相关性 ($P=0.05$)，见表2。

2.3 为进一步探讨EB病毒载量与丙型肝炎肝硬化的关系，对丙型肝炎与肝硬化组间的EB病毒载量采用Mann-Whitney方法进行分析，结果表明两组间差异无显著统计学意义 ($Z=-1.665$, $P=0.096$)。

2.4 EB病毒与乙型肝炎、丙型肝炎病毒合并感染对肝功能是否有影响 经Mann-Whitney检验分析乙型肝炎和肝硬化组间ALT、ALT/AST、TBA、TBil、DBil有显著差异，而EB病毒感染与非感染的乙型肝炎患者间无显著差异；丙型肝炎和肝硬化组间ALT/AST、TBA、TBil、DBil有显著性差异，而EB病毒感染与非EB病毒感染的丙型肝炎患者间无显著差异，结果见表3、表4。

3 讨论

EB病毒是一种疱疹病毒，潜伏在受感染的B淋巴细胞中持续终生^[5]。EB病毒与鼻咽癌关系密切，已成为鼻咽癌筛查的常用指标。此外EB病毒也可侵犯肝脏，引起EB病毒性肝炎^[6]。研究表明乙型、丙型肝炎重叠EB病毒感染是其病程迁延的原因之一^[7,8]。有学者认为重新激活的EB病毒特异性T细胞能释放大量的细胞因子，包括干扰素- γ 、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-2和IL-10，外源性IL-10可促进HCV复制，而干扰素- γ 具有抑制HBV的复制作用。此外，EBV的BCRF₁蛋白与人类IL-10高度同源且具有相同的活性，体外实验表明EB病毒的EBNA1蛋白具有促进HCV复制的作用^[9-11]，因此EB病毒可能具有促进HCV复制而抑制HBV复制的作用^[12]，本研究发现EB病毒与丙型肝炎肝硬化的发生具有一定相关性，与文献结果一

表 2 Logistic 回归分析 EB 病毒与丙型肝炎肝硬化之间的关系

项目	回归系数 (B)	标准误 (SE)	Wals 检验值	自由度 (df)	显著性 (Sig)	优势比
治疗史	-0.150	0.555	0.073	1	0.788	0.861
饮酒	0.636	0.588	1.170	1	0.279	1.889
病程	0.000	0.000	7.518	1	0.006	1.000
性别	0.376	0.565	0.443	1	0.506	1.457
年龄	0.025	0.021	1.453	1	0.228	1.025
HCV RNA	-0.213	0.090	5.580	1	0.018	0.808
EB DNA	0.243	0.125	3.804	1	0.050	1.275
常量	-2.225	1.127	3.900	1	0.048	0.108

表 3 丙型肝炎与肝硬化组间及丙型肝炎是否合并 EB 病毒感染对 ALT 等指标的影响 (p25, p75)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT/AST	TBA ($\mu\text{mol/L}$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)	DBil ($\mu\text{mol/L}$)
丙型肝炎组 (n=77)	28.8, 103.9	26.9, 74.1	0.95, 1.64	5.2, 14.4	8.9, 20.4	3.6, 7.8
丙型肝炎肝硬化组 (n=41)	26.5, 73.0	35.4, 83.5	0.68, 1.03	12.4, 47.5	14.7, 31.5	5.2, 13.5
Z 值	-1.506	-1.176	-4.510	-3.815	-3.501	-3.180
P 值	0.132	0.240	0.000	0.000	0.000	0.001
丙型肝炎合并 EB 病毒感染组 (n=66)	34.7, 100.7	32.9, 82.1	0.75, 1.49	4.8, 19.8	9.8, 23.3	3.8, 9.5
丙型肝炎未合并 EB 病毒感染组 (n=52)	24.5, 84.4	25.5, 76.8	0.78, 1.49	7.1, 40.4	10.1, 22.1	4.1, 10.3
Z 值	-0.794	-1.117	-0.133	-1.778	-0.030	-0.342
P 值	0.427	0.264	0.894	0.075	0.976	0.733

注: p25 表示第 25 百分位点, p75 表示第 75 百分位点

表 4 乙型肝炎与肝硬化组间及乙型肝炎是否合并 EB 病毒感染对 ALT 等指标的影响 (p25, p75)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT/AST	TBA ($\mu\text{mol/L}$)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)	DBil ($\mu\text{mol/L}$)
乙型肝炎组 (n=164)	29.1, 212.7	28.4, 106.7	0.96, 1.87	6.0, 23.6	11.3, 26.1	4.0, 9.6
乙型肝炎肝硬化组 (n=140)	24.3, 77.5	31.6, 99.4	0.65, 1.18	8.2, 81.3	11.7, 43.6	5.2, 22.8
Z 值	-1.506	-1.176	-4.510	-3.815	-3.501	-3.180
P 值	0.132	0.240	0.000	0.000	0.000	0.001
乙型肝炎合并 EB 病毒感染组 (n=129)	25.7, 130.4	29.5, 104.1	0.73, 1.58	6.8, 61.3	11.4, 40.2	4.2, 15.1
乙型肝炎未合并 EB 病毒感染组 (n=175)	27.7, 148.0	29.1, 102.8	0.78, 1.67	7.6, 63.3	11.7, 34.5	4.4, 15.6
Z 值	-0.794	-1.117	-0.133	-1.778	-0.030	-0.342
P 值	0.427	0.264	0.894	0.075	0.976	0.733

注: p25 表示第 25 百分位点, p75 表示第 75 百分位点

致。但丙型肝炎与肝硬化组间EB病毒载量无显著统计学差异,可能的原因为本研究中EB病毒采用外周血淋巴细胞进行检测,外周血淋巴细胞感染的EB病毒并未对肝脏造成损伤,本研究结果也表明无论是乙型肝炎还是丙型肝炎合并EB病毒感染对肝功能影响无显著统计学差异。此外研究表明目前尚未在肝细胞内发现EB病毒^[13],EB病毒是否能进入肝细胞与丙型肝炎发挥协同作用及其具体机制尚不明确,还需进一步研究。

机体感染肝炎病毒后细胞毒性T细胞仍长期持续应答^[14]。机体免疫功能受损,容易再感染EB病毒,并使潜伏在B细胞中的EB病毒激活,从而整合成完整病毒^[15]。乙型肝炎、丙型肝炎病毒感染后引起肝功能逐渐受损、机体免疫力逐渐下降,而EB病毒感染活化后又进一步加重肝脏损害^[7]。而本研究发现EB病毒感染与乙型肝炎肝硬化的发生无显著相关性,同时EB病毒感染对乙型肝炎患者与肝硬化患者肝功能指标的影响也无显著差异,这可能是外周血淋巴细胞感染EB病毒并未在肝细胞内增殖而影响肝细胞功能。也有研究表明重新激活的EB病毒能加重肝脏损伤也可能是因为纳入研究的病例相对较少,对结果有一定影响。

EB病毒在人群中的感染率较高,而乙型或丙型肝炎病毒合并EB病毒感染对于疾病进展、治疗、预后有何影响目前尚无明确的研究结果。目前研究表明乙型肝炎引起的肝脏损伤主要是由于乙型肝炎病毒引起的免疫反应导致的肝细胞损伤^[16],因此肝细胞发生炎症时释放的趋化因子等会使外周血淋巴细胞趋化至炎症部位,淋巴细胞中潜伏的EB病毒可能通过表面蛋白或激活细胞因子释放等方式引起肝细胞的进一步损伤或发生纤维化。同时,这种协同作用也可能导致乙型肝炎、丙型肝炎病毒对抗病毒药物的敏感性或预后发生改变,这有待于进一步研究。

本研究的不足之处在于横断面研究的结果很难表明EB病毒是否能导致肝硬化,如果能进行前瞻性的研究则有利于探索EB病毒与乙型、丙型肝炎患者发生肝硬化的关系,但前瞻性研究随访时间很长,执行起来较困难。同时本研究中部分患者病史不清楚,个别患者未进行全面检查,虽具有肝硬化的临床症状但缺乏确诊依据,有些患者未明确诊断

就出院,因此部分病例不符合入组标准而被排除,这也可能对本文结果造成影响。此外,部分病例可能合并影响EB病毒表达的其他疾病(如传染性单核细胞增多症)而未得到明确诊断也可能对结果有影响,因此,需扩大病例数以进行进一步研究。

参考文献

- [1] 强春倩, 荆国红, 徐学彩, 等. 104例EB病毒感染肝功能损害患者的临床特点及预后分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2014, 6: 101-104.
- [2] Vine LJ, Shepherd K, Hunter JG, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus hepatitis among patients with jaundice or acute hepatitis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 1: 16-21.
- [3] 杨志国, 陈晓慧, 沈敏, 等. 580例肝硬化住院患者病因分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 3: 47-49.
- [4] 汤磊, 邵玉峰, 叶珺. 慢性乙型肝炎患者HBV DNA载量与肝组织炎症及纤维化程度的相关性分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2013, 3: 1-4.
- [5] Arfelt KN, Fares S, Rosenkilde MM. EBV, the human host, and the 7TM receptors: defense or offense?[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 129: 395-427.
- [6] 安辉, 周小军, 缪灿铭. EB病毒感染与乙肝病毒相关性肝病关系的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 3: 144-145.
- [7] 何泽宝, 尹有宽, 成扬, 等. 乙型丙型肝炎、EB病毒双重感染与病程迁延关系(附16例报告)[J]. 中国医师杂志, 2002, 4: 381-382.
- [8] 李鑫静, 曲利娟, 郑雄伟, 等. 慢性活动性EB病毒性肝炎的临床病理特征[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 23: 2325-2330.
- [9] Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect[J]. Hepatology, 2003, 38: 859-868.
- [10] 叶中绿, 庞伟军, 黄秀兰. EB病毒感染患儿细胞因子水平与T细胞亚群检测的临床意义[J]. 现代预防医学, 2008, 12: 2306-2308.
- [11] 张衍国, 王长军, 刘玉峰, 等. EB病毒蛋白对培养B细胞产生TNF- α 和IL-8的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 5: 415-417.
- [12] Richiardi L, De Marco L, Gillio-Tos A, et al. Persistent infection by HCV and EBV in peripheral blood mononuclear cells and risk of non-Hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Epidemiol, 2010, 6: 709-712.
- [13] Kimura H, Nagasaka T, Hoshino Y, et al. Severe hepatitis caused by Epstein-Barr virus without infection of hepatocytes[J]. Hum Pathol, 2001, 32: 757-762.
- [14] Han Q, Lan P, Zhang J, et al. Reversal of hepatitis B virus-induced systemic immune tolerance by intrinsic innate immune stimulation[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28: 132-137.
- [15] Tabli A, El Abd Y, El Din NG, et al. Establishment of human clones producing neutralizing human monoclonal antibodies to the envelope E1/E2 protein of hepatitis C virus by EBV immortalization of immune CD22⁺B cells[J]. Hum Antibodies, 2013, 22: 55-65.
- [16] Negro F. The paradox of Epstein-Barr virus associated hepatitis[J]. J Hepatol, 2006, 44: 839-841.

收稿日期: 2015-07-16