

· 论 著 ·

乙型肝炎病毒表面大蛋白的检测及其临床应用

陈 勇, 胡毓安, 袁大莉, 袁静文

[摘要] **目的** 检测乙型肝炎病毒表面大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, LHBs), 并与乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)相比较, 探讨 LHBs 的临床应用价值。**方法** 分别采用 ELISA 和 PCR 法检测乙型肝炎 257 例血清中 LHBs, 乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)和 HBV DNA, 并进行相关性分析。**结果** LHBs 与 HBV DNA 的检出率差异无统计学意义($P > 0.05$); LHBs 的阳性率(83.12%)高于乙肝 e 抗原(HBeAg)的阳性率(54.63%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 血清中 LHBs 水平能反映 HBV 感染者体内的病毒复制情况, 将其作为 HBV 复制指标, 灵敏度高于 HBeAg, 可作为反映 HBV 感染者体内的病毒复制情况的新的血清学指标, 尤其是针对 HBeAg 阴性患者。

[关键词] 乙型肝炎病毒表面大蛋白; 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸; 酶联免疫吸附测定; 聚合酶链反应

[中图分类号] R512.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)06-0525-03

Detection of HBV large surface protein and its clinical significance in patients with hepatitis B

CHEN Yong, HU Yu-an, YUAN Da-li, YUAN Jing-wen. Nanjing University School of Medicine, Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To explore the clinical significance of Hepatitis B virus large surface protein (LHBs) by detecting LHBs. **Methods** The LHBs were detected by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Serum HBV DNA was detected by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA was used to detect the HBV markers in 257 serum samples from hepatitis B patients. **Results** No significant difference was found between the positive rate of LHBs and that of HBV DNA ($P > 0.05$). The positive rate of LHBs was 83.12%, which was higher than that of HBeAg which was 54.63%. There was significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of serum LHBs can be used to estimate the state of HBV replication and the sensitivity was superior to HBeAg. It may be used as a new serological maker to detect HBV replication, especially in HBeAg negative patients.

[Key words] LHBs; HBV DNA; ELISA; PCR

中国是乙型肝炎发病率较高的国家, HBsAg 阳性率约 10.2%^[1], 在我国乙型肝炎病毒流行感染率为 57.6%^[2], 故实验室相关指标的检测对于判断乙型肝炎病毒复制程度, 监测抗病毒治疗效果以及评估预后等至关重要。当前, 临床上主要以肝功能, 乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)作为主要指标监测乙肝患者体内病毒复制与抗病毒治疗效果, 但都有局限性, 尤其对 HBeAg 阴性的慢性乙肝患者缺乏能快速准确反映其体内乙肝病毒复制与疗效的指标。很多研究证明, 乙型肝炎病毒表面大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, LHBs)能够很好地反映 HBV 的复制

情况。LHBs 是乙型肝炎病毒(HBV)的包膜蛋白, 包括 HBsAg, 前 S 蛋白(preS1 蛋白和 preS2 蛋白)。目前, 对 HBV 复制评估的主要指标是用 PCR 法测定的 HBV DNA。近年来随着对 LHBs 中前 S 蛋白在乙肝发病机制, 感染与复制等方面研究的深入, 人们逐渐认识到 LHBs 在 HBV 感染中有重要的临床意义^[3-4]。本研究旨在探讨血清 LHBs 水平与 HBV 复制程度之间的关系, 并评价其作为反映 HBV 复制新的血清学指标的可能性。现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 257 例乙型肝炎为 2011 年 9 月至 2012 年 5 月我院门诊和住院患者, 其中男 132 例, 女 125 例。年龄 13 ~ 65 岁, 平均 44.5 岁。全部标本为空腹血清, 无溶血。

作者简介: 陈 勇(1979-), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 检验技师, 从事病毒学研究

作者单位: 210002 江苏南京, 南京大学医学院(南京军区南京总医院)临床中心实验科

1.2 检测方法 LHBs 试剂盒(北京热景生物技术公司),HBV-表型和 HBeAg 试剂盒(上海科华生物工程实业有限公司),均采用 ELISA 法检测,按试剂使用说明书进行操作和结果判定。HBV DNA 采用实时荧光定量 PCR 法(上海科华生物技术有限公司)检测,其结果大于 1.00×10^3 拷贝/ml 时判为阳性,反之为阴性。

1.3 统计学处理 用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,LHBs 和 HBV DNA 的阳性率比较采用 χ^2 检验。LHBs 含量与 HBV DNA 之间相关性采用线性相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 LHBs 与 HBV DNA 阳性率的比较 104 份 HBeAg 阳性血清中 LHBs 与 HBV DNA 检出阳性率分别为 96.15% 和 93.27%,两者差异无统计学意义($P > 0.05$);129 份 HBeAg 阴性血清中 LHBs 与 HBV DNA 检出阳性率分别为 74.44% 和 70.54%,两者差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 HBV DNA 阳性血清中 LHBs 与 HBeAg 阳性率的比较 205 例 HBV DNA 阳性血清中,LHBs 阳性率为 83.12%,HBeAg 阳性率为 54.63%,LHBs 阳性率高于 HBeAg 阳性率($P < 0.05$)。

2.3 LHBs 含量检测与 HBV DNA 的关系 257 例慢性乙型肝炎患者血清中,随 HBV DNA 拷贝数增加其血清 LHBs 含量呈上升趋势,且两者之间有一定的相关性[相关系数(r) = 0.914, $P < 0.01$,表 1]。

表 1 LHBs 含量检测与 HBV DNA 的关系

HBV DNA (拷贝/ml)	<i>n</i>	LHBs (OD, $\bar{x} \pm s$)	LHBs (阳性例数)	LHBs 阳性率 (%)
$< 10^3$	52	0.257 ± 0.215	27	51.92
10^4	55	0.584 ± 0.192	42	76.36
10^5	107	0.741 ± 0.379	94	87.85
10^6	31	0.975 ± 0.421	31	100.00
10^7	12	1.583 ± 0.514	12	100.00

3 讨论

目前,临床上评估 HBV 复制的指标主要有 HBV DNA 和 HBeAg。HBV DNA 被视为最直接、最可靠的“金标准”,但对实验条件以及工作人员素质要求高,在一些基层医院难以开展。当前通常认为 HBeAg 阴性表示没有 HBV 复制。但是在 HBeAg 阴性的乙型肝炎患者中,由于长期治疗、持续免疫抑制,HBV 基因前 C 区或 CP 区变异,导致 HBeAg 合

成障碍^[5]。此时 HBeAg 阴性但 HBV DNA 为阳性,病毒实际仍在复制,未受到影响。故 HBeAg 转阴并不能排除病毒的感染与复制,不能想当然地认为 HBeAg 阴性就表明无 HBV 复制。

HBV 外膜蛋白是由 HBV S 基因编码合成的,主要有三种蛋白组成,包括主蛋白(HBsAg),中蛋白(HBsAg 和 preS2 蛋白)和大蛋白(HbsAg, preS1 蛋白和 preS2 蛋白)。LHBs 的前 S 区具有独特的双重跨膜拓扑结构,内侧可以和 HBV 核壳体膜结合,外侧可与病毒受体结合,是 HBV 颗粒成熟包装的关键^[6-7]。国外研究发现,HBV 形成外膜的过程中需要大蛋白和中蛋白的参与^[8]。LHBs 不仅近存在于具有感染性的病毒颗粒(Dane 颗粒)上,也存在于管状病毒颗粒(亚病毒颗粒)上^[8]。国外还有研究发现,亚病毒颗粒在 HBV 感染过程中,能显著增强细胞内病毒复制和基因表达,而这种增强作用正是由 LHBs 前 S 区的反式激活作用所触发的,这就是说 LHBs 具有反式激活病毒复制作用^[9]。国内有研究^[10-11]报道血清 LHBs 是新的反映 HBV 感染者体内病毒复制的血清学监测指标,且较 HBeAg、HB-VpreS2、HBVpreS1 均敏感,具有较高的敏感度、特异度与准确度。血清 LHBs 的检测是监测 HBeAg 阴性和低水平 DNA 的 HBV 感染者体内病毒复制程度、疾病进程、疗效与预后判断的血清学敏感指标^[12-13]。因此检测 LHBs 作为监测病毒复制和预后具有重要意义。

本研究 104 份 HBeAg 阳性血清中 LHBs 与 HBV DNA 检出阳性率分别为 96.15% 和 93.27%,两者差异无统计学意义($P > 0.05$);129 份 HBeAg 阴性血清中 LHBs 与 HBV DNA 检出阳性率分别为 74.44% 和 70.54%,两者差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。由此可见,LHBs 为反映病毒复制的一个良好的指标。205 例 HBV DNA 阳性血清中 LHBs 与 HBeAg 的阳性率分别为 83.12% 和 54.63%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。证实血清 LHBs 的检测能判断 HBV 完整外膜的存在,反映了病毒基因或亚病毒颗粒的存在。

本研究显示,LHBs 与 HBV DNA 拷贝数具有一定相关性($r = 0.914, P < 0.01$),HBV DNA 拷贝数越高,LHBs 含量越高,与国内学者研究一致^[14-15]。表明乙肝患者体内 LHBs 水平与病毒复制密切相关,且具有相似的临床意义,检测 LHBs 能准确反映患者体内病毒复制情况。LHBs 与 HBV DNA 的检出亦具有良好的一致性,能够反映乙肝患者病毒的复制情况,特别对 HBeAg 阴性的慢性乙肝患者价值

更大, LHBs 亦可单独或作为 HBV DNA 的补充指标反映乙肝病毒的复制情况。开展 LHBs 检测, 在乙型肝炎的治疗和预后判断中具有重要临床意义。

【参考文献】

- [1] 成均, 孙长贵, 戴玉柱, 等. 驻浙部队 HBV 感染情况及低浓度 HBsAg 流行病学调查[J]. 东南国防医药, 2009, 17(4): 298-301.
- [2] 时连华, 郑纪山. 乙型肝炎病毒血清亚型的研究进展[J]. 东南国防医药, 2003, 5(5): 398-399.
- [3] Bang G, kim KH, Gnarnieri M, et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. Virology, 2005, 332(1): 216-224.
- [4] Chua PK, Wang RY, Lin MH, et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus[J]. J Virol, 2005, 79(9): 13483-13496.
- [5] Hamassak K, Nakata K, Nagagama Y, et al. Change in prevalence of HBeAg negative mutant hepatitis B virus during the course chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 1994, 20(5): 8-14.
- [6] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepatitis B virus large envelope proteins[J]. J General Virol, 2004, 85(5): 1221-1225.
- [7] Foo NC, Ahn B, Ma X, et al. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein[J]. Hepatology,

2002, 6(3): 1400-1407.

- [8] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus Res, 2004, 106(2): 199-209.
- [9] Bruss M, Miska S, Chassot S. Enhancement of hepatitis B virus infection by non-infectious subviral particles[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1462-1468.
- [10] 毛远丽, 李伯安, 马洪滨, 等. 乙肝患者外膜蛋白血清学检测及对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(3): 276-278.
- [11] 乐爱平, 鞠北华, 王文, 等. 乙肝病毒大蛋白在乙型肝炎诊治中的临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(16): 1578-1581.
- [12] 魏红山, 黄玉波, 宋淑静, 等. e 抗原阴性慢性乙型肝炎患者血清表面抗原大蛋白水平与乙型肝炎病毒 DNA 之间的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(7): 543-546.
- [13] 乐爱平, 胡国信. 乙肝病毒大蛋白在血清 HBeAg 阴性与低水平 HBV DNA 乙肝患者中的检测意义[J]. 现代免疫学杂志, 2008, 28(3): 244-247.
- [14] 孙颖, 辛绍波, 雷厉, 等. 乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 354-357.
- [15] 吴正林, 刘玢, 肖桂初, 等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白与 HBV DNA 检测的对比研究[J]. 中华实验诊断学, 2007, 11(4): 479-481.

(收稿日期: 2012-06-26; 修回日期: 2012-08-20)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

(上接第 524 页)

【参考文献】

- [1] 赖福生, 卢少军, 王一芳, 等. 脐带血有核细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化的临床研究[J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 515-518.
- [2] 樊东升, 张俊, 邓敏, 等. 肌萎缩侧索硬化/运动神经元病的基础与临床研究[J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(3): 279-281.
- [3] 吴江. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [4] Naghii MR. A suggested method for the prediction of the oxidation resistance of low density lipoprotein by determination of the lag time[J]. Nutr Health, 2002, 16(2): 107-112.
- [5] 陈文霖, 谭峰. 62 例肌萎缩侧索硬化的临床分析[J]. 临床医学工程, 2011, 18(3): 355-357.
- [6] Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(5): 629-641.
- [7] 崔芳, 黄旭升. 肌萎缩侧索硬化症的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2010, 14(6): 104-107.
- [8] Ihara Y, Nobukuni K, Takata H, et al. Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation[J]. Neurol Res, 2005, 27(1): 105-108.
- [9] Smith RG, Henry YK, Mattson MP, et al. Presence of 4-hydroxy-nonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ann Neurol, 1998, 44(4): 696-699.

- [10] Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, et al. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden[J]. Neurology, 2004, 62(10): 1758-1765.
- [11] Wong NK, Strong MJ. Nitric oxide synthase expression in cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Eur J Cell Biol, 1998, 77(4): 338-343.
- [12] Tohi H, Abe T, Yamazaki K, et al. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. Ann Neurol, 1999, 46(1): 129-131.
- [13] Beal RS. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurosci Lett, 2000, 291: 44.
- [14] Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, et al. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. Ann Neurol, 2000, 47(4): 524-527.
- [15] 张蔷, 孟凤琴, 卜晖. 内质网应激和肌萎缩侧索硬化[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(4): 422-425.
- [16] Nicaise C, Mitrecic D, Pochet R. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induced differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011, 37(2): 179-188.
- [17] Tsikas D. Handling of commercially available enzyme immunoassays for 8-iso-prostaglandin F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}, iPF_{2α}-III, 15-F_{2t}-IsoP) in clinical research and science: considerations from the analytical and review point of view[J]. Clin Chim Acta, 2004, 344(1-2): 215-217.

(收稿日期: 2012-03-09; 修回日期: 2012-05-06)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)