

· 综 述 ·

乙型肝炎病毒表面大蛋白的研究进展

陈 勇 综述, 胡毓安 审校

[摘要] 临床上主要以肝功能、乙肝病毒 e 抗原 (HBeAg)、HBV DNA 作为主要指标监测乙型肝炎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 阴性的慢性乙型肝炎患者缺乏快速准确反映其体内乙型肝炎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, HBV-LP) 能够很好地反映 HBV 的复制情况。本文结合国内外相关研究文献,对 HBV-LP 的研究进展作一综述。

[关键词] 乙型肝炎病毒表面大蛋白;生物学功能;临床应用

[中图分类号] R373.21 **[文献标志码]** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-271X.2013.04.020

中国是乙型肝炎发病率较高的国家,HBsAg 阳性率约 10.2%^[1],乙型肝炎病毒感染流行率为 57.6%^[2]。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是严重危害人类健康的全球性公共卫生问题,全世界有 3.5 亿 ~ 4 亿感染者。每年因 HBV 感染死亡的人数为 100 万 ~ 200 万^[3-5]。我国感染过 HBV 的总人口中,慢性携带者占 9.75%^[6]。目前主要采取检测 HBV DNA 载量的方法来评估乙肝病毒复制情况,但许多基层医疗机构不具备核酸检测的能力。因此,寻找一种新的、可靠的血清学指标势在必行。血清乙型肝炎病毒表面大蛋白 (hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP) 的检测是近年来研究较多的一个新的诊疗指标。随着对其基础研究的深入,其血清检测的临床应用研究亦越来越被临床工作者所重视。现将 HBV-LP 的结构特点、生物学功能、作用机制及其临床应用的研究进展综述如下。

1 HBV-LP 的结构特点

乙型肝炎病毒包膜蛋白由 HBV-DNA 的 S 区编码合成,包括主蛋白 (即 HBsAg)、中蛋白 (M 蛋白即 HBsAg 和 PreS2) 和大蛋白 (即 HBsAg、preS1 和 preS2)^[7-8]。新近的研究表明,HBV-LP 的前 S 蛋白具有独特的双重跨膜构象拓扑结构,与 HBV 的感染、复制及预后密切相关^[9-11]。该拓扑结构由 preS1、preS2 和 S 结构域组成。在病毒粒子成熟与分泌过程中,大蛋白 preS 结构域开始时均位于胞质内 (i-preS),通过蛋白 S 的跨膜折叠区域在 N 端的 I

型及内部 II 型信号和疏水 C 端跨内质网膜,大约一半大蛋白的拓扑结构在翻译后发生了重折叠,使得 preS 区域转移进入内质网膜的腔内一侧 (e-preS),从而产生大蛋白的独特的双重跨膜拓扑结构。双重跨膜拓扑结构是 HBV-LP 发挥多种生物学功能作用的依赖性结构。HBV-LP 上的 preS 区 AA99-169 (横跨部分 preS1 和 preS2 及其衔接区) 形成一个环状 Loop 区,具有众多的免疫表位^[12]。

2 HBV-LP 的生物学功能

HBV-LP 存在于感染性颗粒 (Dane 颗粒) 和亚病毒管状颗粒上,是病毒形成完整外膜的重要标志,与病毒复制、病毒颗粒组装和从细胞内释放调节密切相关^[13]。HBV-LP 在病毒复制过程中起关键性作用,也依赖于其独特的拓扑结构。它独特的双重跨膜拓扑结构使其在病毒生活周期中执行了两个重要功能:①e-preS 结构域暴露在病毒粒子的表面,通过 preS1 的 N 末端区域作为配体与病毒受体结合;②i-preS 结构域作为基质蛋白在病毒粒子形成的出芽过程中,通过其中 103 位精氨酸和 124 位丝氨酸之间或 92 ~ 113 位氨基酸之间 (与病毒基因型有关) 的 preS 区域直接与核壳相互作用,同时介导 HBsAg 亚病毒颗粒的细胞质滞留^[14]。这是病毒粒子形成所必须的,该区域的小氨基酸的替换会阻断病毒粒子的形成^[15]。因此将 preS 区作为一个整体来进行功能研究会更有意义。但是 HBV-LP 的 N 端含有细胞内滞留信号肽,具有细胞内滞留性,在体外难以基因重组表达,同时该 HBV-LP 极容易降解,故以往将 HBV-LP 的 preS 区作为一个整体来进行功能研究相对较少。近年,通过蛋白修饰等技术,已经可以完整表达 HBV-LP 或其 preS 抗原。完整 HBV-LP 或其

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区南京总医院临床中心实验科

通讯作者: 胡毓安, E-mail: hu_yu_an@163.com

preS 区具有更为天然的构象,多个疫苗和药物研究均基于此。除了以上功能外,最近的研究表明 preS1 蛋白具有反式调节作用^[16]。研究发现 HBV-LP 反式调节作用与病毒复制具有密切关系,亚病毒颗粒能显著增强细胞内病毒复制和基因表达,更重要的是亚病毒颗粒的 preS 蛋白能触发该增强效应^[17-19]。有实验表明这种增强作用由 preS 蛋白的反式激活功能所活化的信号转导所引发,表明含 HBV 的血清感染性不仅依赖于感染性病毒颗粒的数量,还与不含核酸的亚病毒颗粒的数量息息相关,特别是与 HBV-LP 上的 preS 蛋白相关^[20-21]。这个研究具有重要的临床意义。preS2 蛋白由 55 个氨基酸残基组成,不仅存在于病毒颗粒表面,亦可出现在非传染性球形颗粒表面,具有调节对表面蛋白的免疫应答及控制病毒颗粒装配等功能,可促进病毒免疫清除。PreS2 蛋白已被证明具有很强的反式调节作用,可以与蛋白激酶 C (PKC) α/β 结合,发生磷酸化反应触发了 PKC 依赖的 c-Raf-1/MPKKK(丝裂激活蛋白激酶激酶激酶)信号转导系统,从而激活转录子,如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NK- κ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子,参与病毒感染后的炎症和肝细胞肝癌的发生^[22]。

3 HBV-LP 的反式调节作用机制

HBV 进入肝细胞后,可以与肝细胞染色体整合并编码两种反式调节因子:preS2 反式调节因子家族和 HBV-LP 和羧基端截短型中蛋白(MHBst)。HBV-LP 的反式激活作用与其独特的双重跨膜拓扑结构密切相关,其 preS1 和 preS2 区有一个与翻译不同步的转位过程,在横跨内质网膜时是指向内质网的胞质侧,这种在胞质滞留的 preS2 区,有机会与细胞中信号转导相关因子相互作用,发挥其反式激活作用,另有一部分 HBV-LP 的 preS1 和 preS2 区在翻译后转位跨过内质网膜,进入分泌途径,参与病毒颗粒的组装^[23-25]。MHBst 是变异的病毒表面抗原中蛋白,缺失了位于 C 末端的膜定位信号,使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能,不进入分泌途径而在 ER 滞留,其 preS2 区指向胞浆区,从而有机会与胞浆蛋白相互作用,发挥广泛的反式激活效应^[26]。

4 HBV-LP 的临床应用

HBV-LP 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,操作简便,无需特殊设备,对实验室的要求不高,一般实验室均可开展,所以近年来相关研究较多。临床

上主要以肝功能改善、HBeAg 血清转阴和 HBV DNA 阴转作为近期抗病毒治疗终点目标的监测指标。但临床上很少有乙肝病例能够达到临床治愈标准,即使达到了临床治愈标准其肝脏组织内仍持续有 HBV 感染,还能检测出共价闭合环状 HBV DNA(cccHBV DNA)^[27]。由于持续免疫抑制、长期治疗,致使 HBV 基因前 C 区和 CP 区变异,导致 HBeAg 合成障碍^[28]。故 HBeAg 阴转并不能排除病毒的感染与复制。血清为低水平 HBV DNA 时肝内 DNA 仍能维持一定水平,因此血清 HBV DNA 检测阴性并不意味着病毒已完全清除。以往通过针对 preS1 蛋白线性表位制备的单克隆抗体检测血清 HBV-LP,已有研究表明 preS1 前端的第 2 位甘氨酸残基发生豆蔻酰基化,导致 preS1 前端插入磷脂层,形成一个立体构象的环状结构,使得 preS1 片段并不完全暴露于病毒表面,而造成 preS1 不能有效被检测^[29-30]。此外还有研究证明 HBV-LP 的反式激活作用位于 HBV-LP 的 preS2 区^[31]。因此检测 HBV-LP 的临床意义涵盖了 preS1 和 preS2。作为 HBV-LP 一部分的呈线性结构的 HBV preS1、HBV preS2 抗原是较 HBeAg 敏感的可反映 HBV 感染与复制的血清学指标,出现在病毒感染的早期,其阴转是病毒清除的最早迹象,若持续阳性则提示感染慢性化和疾病持续活动。血清 HBV-LP 检测判断 HBV 完整外膜的存在,代表着病毒基因或亚病毒颗粒的存在。国内有报道^[32-33]血清 HBV-LP 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 HBV-DNA、HBeAg、preS1、preS2 均敏感,具有较高的敏感度、特异度与准确度,是对 HBV 检测有益的补充。魏红山等^[34]报道血清 HBV-LP 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、疾病进展、疗效与预后判断的血清学敏感指标,并有助于鉴别 HBeAg 阴性活动期肝炎,监测低水平 HBV DNA 患者的疾病进展与抗病毒治疗疗效,弥补 HBV DNA 监测的不足^[35],提高临床 HBV 感染者的实验诊断与治疗水平。

综上所述,HBV-LP 检测能反映乙型肝炎病毒复制状态,为临床提供了一个新的监测 HBV 感染者体内病毒复制、疾病进展、抗病毒疗效、肝细胞损伤与预后的血清学敏感指标。合理开展 HBV-LP 检测,有助于提高 HBV 感染者的血清学诊断的准确性及临床诊治水平,在乙型肝炎的治疗预后中具有重要的临床应用价值。

【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, 11(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] McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2009, 4(9): 45-55.
- [4] Holness G, Carriero DC, Dieterich DT. Hepatitis B the rapies and antiviral nesistance detection and management [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(7): 693-699.
- [5] Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection[J]. World Gastroenterol, 2009, 1(5): 3099-3105.
- [6] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 245-259.
- [7] Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, et al. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction[J]. JAMA, 1996, 276(11): 882-888.
- [8] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol, 2004, 85(5): 1221-1225.
- [9] Chai N, Gudima S, Chang J, et al. Immunoadhesins containing pre-S domains of hepatitis B virus large envelope protein are secreted and inhibit virus infection[J]. J Viral, 2007, 81(10): 4912-4915.
- [10] Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, et al. Hepatitis B vires subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking[J]. J Viral, 2007, 81(8): 3842-3845.
- [11] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol, 2004, 85(5): 1221-1223.
- [12] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus research, 2004, 106(2): 199-209.
- [13] Bang G, Kim KH, Guarnieri 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.
- [14] Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal Pro-S domain of large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis[J]. J Virol, 1995, 69(11): 6652-6657.
- [15] 兰 萌, 暴旭广, 莫炳强, 等. 乙型肝炎病毒大蛋白含量与病毒复制的关系[J]. 广东医学, 2009, 30(1): 87-88.
- [16] Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain[J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt 5): 1083-1086.
- [17] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol, 2004, 8(Pt 5): 1221-1225.
- [18] Bruns M, Miska S, Chassot S, et al. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious sub viral particles[J]. Virol, 1998, 72(2): 1462-1468.
- [19] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus Res, 2004, 10(6): 199-209.
- [20] Foo NC, Ahn B, Ma X, et al. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein[J]. Hepatology, 2002, 6(8): 1400-1407.
- [21] Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis[J]. Virol, 1995, 69(11): 6652-6657.
- [22] 成 军, 刘 妍, 洪 源, 等. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(4): 1245-1247.
- [23] 成 军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(3): 125-128.
- [24] 刘 妍, 成 军, 陆荫英, 等. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(3): 217-219.
- [25] Hartman-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with g2-Adaptin, a clathrin adaptor-related protein[J]. Virol, 2001, 7(5): 5343-5351.
- [26] HU YP, Yao YC, Li JX, et al. The cloning of 3 truncated preS/S gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice[J]. Gastroenterol, 2000, 6(4): 734-737.
- [27] 侯 玲, 徐晚枫. 乙型肝炎 (HBV) 感染临床治愈后的长期预后[J]. 日本医学介绍, 2004, 25(11): 515-516.
- [28] Hamassak K, Nakata K, Nagagama Y, et al. Chang in prevalence of HBeAg negative mutant hepatitis B virus during the course chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 1994, 20(5): 8-14.
- [29] 彭建明, 李金明. 病毒样颗粒在免疫测定中的应用研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 2(8): 214-216.
- [30] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2000, 16(2): 4-7.
- [31] Paran N, Cooper A, Shaul Y. Interaction of hepatitis B virus with cells[J]. Rev Medvml, 2003, 1(3): 137-143.
- [32] 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.
- [33] 乐爱平, 鞠北华, 王 文, 等. 乙肝病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.
- [34] 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.
- [35] 陈 勇, 胡毓安, 袁大莉, 等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白的检测及其临床应用[J]. 东南国防医药, 2012, 14(6): 525-527.

(收稿日期: 2013-02-20; 修回日期: 2013-04-26)

(本文编辑: 张仲书)