

# 乙肝病毒大蛋白检测在乙型肝炎诊治中的临床意义

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景

## ■背景资料

随着近年来对乙肝病毒表面蛋白中前S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>抗原在乙型肝炎发病机制、病毒感染与复制等方面的深入研究,具有双重拓扑结构的乙肝病毒大蛋白对HBV感染、复制及其疗效动态监测的临床应用越来越被研究者重视。

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景, 南昌大学第一附属医院检验科 江西省南昌市 330006

乐爱平, 江西医学院医学检验专业毕业, 学士, 讲师, 主要从事临床免疫学的教学、临床与科研工作。

通讯作者: 乐爱平, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院检验科. leaping@126.com

电话: 0791-8692785

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-03-24

## Clinical significance of serum hepatitis B virus large surface protein in diagnosis and treatment of patients with hepatitis B

Ai-Ping Le, Bei-Hua Ju, Wen Wang, Wen-Jing Zhang

Ai-Ping Le, Bei-Hua Ju, Wen Wang, Wen-Jing Zhang, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China  
Correspondence to: Dr. Ai-Ping Le, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China. leaping@126.com  
Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-24

## Abstract

**AIM:** To discuss the clinical significance of hepatitis B virus large surface protein (HBV-LP) detection in the diagnosis and treatment of patients with hepatitis B.

**METHODS:** Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the levels of serum HBV-LP, HBV preS<sub>1</sub>, HBV preS<sub>2</sub> and HBV markers, and fluorescence quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect HBV DNA in 162 patients with hepatitis B as well as 47 normal controls.

**RESULTS:** In serum samples of the patient with HBV infection, the level of HBV-LP had significant correlation with that of HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub> and HBVpreS<sub>1</sub> antigen ( $\chi^2 = 9.22, 11.89, 60.35, 99.87$ ; all  $P < 0.01$ ). The contents of serum HBV-LP was positively correlated with HBV DNA copies ( $r_s = 0.64, P < 0.001$ ). The level of serum HBV-LP was also significantly different between the groups with different HBV DNA copies ( $P < 0.01$ ). The level and positive

rate of serum HBV-LP were significantly different between HBV DNA-positive and negative patients ( $Z = 5.85, P < 0.001$ ), and they were in the same situation for HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub> and HBVpreS<sub>1</sub> antigen ( $Z = 8.70, 8.44, 8.84$ ; all  $P < 0.001$ ). The serum HBV-LP was more sensitive than HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub> and HBVpreS<sub>1</sub> antigen in HBeAg-negative patients (76.8%). Serum HBV-LP was significantly different between the patients with HBV infection and normal controls ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** HBV-LP may serve as a reliable marker in the reflection of HBV replication at protein level, and it is valuable to monitor HBV replication and prognosis of the disease, especially in HBeAg-negative HBV infected patients.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Large surface protein; Hepatitis B virus DNA; Hepatitis B virus preS<sub>1</sub> antigen; Hepatitis B virus preS<sub>2</sub> antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay; Fluorescence quantitative-polymerase chain reaction

Le AP, Ju BH, Wang W, Zhang WJ. Clinical significance of serum hepatitis B virus large surface protein in diagnosis and treatment of patients with hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(16):1578-1581

## 摘要

**目的:** 探讨乙肝病毒(HBV)大蛋白(LP)在乙型肝炎诊治中的临床意义。

**方法:** 对162例HBV感染者及47名正常对照血清采用酶联免疫吸附试验检测HBV-LP, HBV前S<sub>1</sub>抗原, HBV前S<sub>2</sub>抗原及乙型肝炎血清标志物; FQ-PCR定量检测HBV DNA。

**结果:** 在HBV感染组中, HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>间相关显著( $\chi^2 = 9.22, 11.89, 60.35, 99.87$ ; 均 $P < 0.01$ ), 其含量与HBV DNA拷贝数成正相关( $r_s = 0.64, P < 0.001$ ), 不同HBV DNA拷贝数组别间HBV-LP含量存在差异显著性( $\chi^2 = 135.34, P < 0.01$ ); HBeAg, HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>不同模式间HBV-LP含量及阳性率均存在差异

## ■研究前沿

研究乙肝病毒大蛋白可否作为判断乙肝患者病毒复制与抗病毒疗效的一种新的可靠的定量血清免疫学指标。

显著性( $Z = 8.70, 5.85, 8.44, 8.84$ , 均 $P < 0.001$ ); HBeAg阴性感染血清中HBV-LP较HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>更为敏感(76.8%). HBV感染组与正常对照组间HBV-LP含量存在差异显著性( $P < 0.01$ ).

**结论:** HBV-LP是从蛋白水平反映HBV感染者体内病毒复制程度的可靠指标, 尤其是HBeAg阴性患者体内病毒复制及预后判断的良好血清学监测指标.

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 大蛋白; HBV DNA; 乙型肝炎病毒前S<sub>1</sub>抗原; 乙型肝炎病毒前S<sub>2</sub>抗原; 酶联免疫吸附试验; 荧光定量聚合酶链反应

乐爱平, 鞠北华, 王文, 张文景. 乙肝病毒大蛋白检测在乙型肝炎诊治中的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(16):1578-1581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1578.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的公共卫生问题. 我国属高地方性流行地区, 一般人群中HBsAg流行率为9.09%, 其中慢性HBV感染者约占全世界的1/3<sup>[1]</sup>; 其流行现状是HBeAg阴性活动期肝炎增多, HBV变异株增加, HBV的突变率较高. 在慢性HBV感染患者中, 约15%-25%最终死于与HBV感染相关的肝病<sup>[2]</sup>. 前瞻性研究表明, 慢性HBV感染患者发展肝硬化的估计年发生率为2.1%, HBeAg阳性者的肝硬化发生率较阴性者高<sup>[3]</sup>. 有学者对HBeAg阴性的慢性乙肝患者进行平均为期9(1-18.4)a的随访, 发现其进展为肝硬化和肝癌(HCC)的发生率分别为23%和4.4%<sup>[4-5]</sup>. 目前临床上主要以肝功能的改善, HBeAg血清转换和HBV DNA阴转作为乙肝患者病毒复制与抗病毒疗效的监测指标<sup>[6]</sup>, 但尚有一定的局限性, 尤其对HBeAg阴性慢性乙肝患者缺乏准确反映体内病毒复制与抗病毒疗效的血清学指标. 为此我们研究乙肝病毒大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP)作为一种新的可靠的定量血清免疫学指标在乙型肝炎诊治中的检测意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2006-01/02 HBV感染者血清162例, 男109例, 女53例; 年龄5-70(平均27.8)岁; 均符合HBV感染的临床诊断标准, 且无其他嗜肝病毒合并感染. 正常对照组47名来自健康无偿献血者的血清, 男31例, 女16例, 年龄6-78(平均30.3)

表 1 HBsAg阳性的HBV感染血清HBV-LP与HBV DNA的关系

HBV DNA拷贝数的对数值	<i>n</i>	HBV-LP (μg/L) Median (Min-Max)	HBV-LP阳性率 <i>n</i> (%)
正常对照组	47	0.23 (0.05-1.84)	0 (0)
HBV感染组			
<3	60	9.82 (0.03-171.15) <sup>b</sup>	44 (73.7)
3-4	24	15.51 (0.49-91.41) <sup>b</sup>	20 (83.3)
5-6	22	22.94 (1.56-140.83) <sup>bd</sup>	20 (90.9)
>7	56	134.87 (0.27-200.31) <sup>bdf</sup>	53 (94.6)

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs <3组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 3-4组, 5-6组.

岁, 均无嗜肝病毒感染, 且无肝脏、肾脏功能损害. 德国Diasorin公司的ETI-max3000全自动酶免分析仪; 美国PerKin Elmer公司的PE5700自动荧光PCR仪. HBV-LP酶免定量检测试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供; HBV DNA荧光定量试剂盒购自广州中山大学达安基因股份有限公司; HBVpreS<sub>1</sub>定性检测试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司; HBVpreS<sub>2</sub>检测试剂盒由北京肝炎试剂研究中心提供; HBVM检测试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司. 所用试剂均在其有效期内.

**1.2 方法** HBV-LP检测采用ELISA双抗体夹心法, 定量时利用定值标准品0, 10, 25, 50, 100, 200 μg/L, 通过4-Parameter model由ETI-max3000全自动酶免分析仪自动测定结果; 定性则样品A值 $\geq$ 阴性对照均值(0 μg/L标准品) $\times 2.1$ 时判为阳性, 反之为阴性. HBV DNA荧光定量测定采用FQ-PCR, 其含量小于 $1.00 \times 10^3$ 时判为阴性, 反之判为阳性. HBVM, HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>测定均采用ELISA, 定性结果判定均严格按试剂说明书编程由ETI-max3000全自动酶免分析仪自动判读. 实验所有操作均严格遵守南昌大学一附院临床免疫实验室SOP文件.

**统计学处理** 计量资料用中位数描述, 组间比较采用秩和检验, 两指标间相关性分析采用Spearman等级相关分析; 计数资料的两指标间关联与率的显著性检验采用卡方检验或精确概率; 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ . 统计软件为SPSS12.0.

## 2 结果

**2.1 HBV-LP含量与HBV DNA拷贝数相关** HBV感染者血清中, HBV-LP含量随HBV DNA拷贝数的增加呈上升趋势. 随HBV DNA拷贝数组别级

## ■ 相关报道

乙肝鸭模型证实HBV感染者血清的感染性不仅依赖于Dane颗粒的多少, 还依赖于富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量. 亚病毒颗粒能够反式激活病毒, 使病毒复制重新激活.

## ■ 创新盘点

本研究显示, HBV-LP含量与HBV-DNA拷贝数间具有良好的正相关, 能反映HBV感染者机体内病毒感染与复制程度, 较HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>, HBV-DNA, HBeAg敏感, 大蛋白阳性能区分HBeAg阴性慢性乙肝中的活动期肝炎, 尤其是HBV-DNA低水平复制时具有重要意义.

### ■应用要点

HBV-LP是用于HBV感染者机体内病毒复制程度监测及疗效判断的良好指标,其检测有利于对HBeAg阴性HBV感染者的病情进程、疗效判断及预后的监测。

表 2 HBV感染者血清HBV-LP与定性检测指标的相关性

HBV-LP	n	HBV DNA		HBeAg		HBVpreS <sub>2</sub>		HBVpreS <sub>1</sub>	
		+	-	+	-	+	-	+	-
阳性	137	93	44	61	76	120	17	125	12
阴性	25	9	16	2	23	4	21	0	25
合计	162	102	60	63	99	124	38	125	37

表 3 HBeAg, HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>不同模式间HBV-LP含量比较

分组	n	HBV-LP (μg/L)		Z	P
		Median	(Min-Max)		
HBeAg	阳性	63	130.85 (0.27-200.31)	8.70	<0.001
	阴性	99	10.73 (0.03-166.13)		
HBV DNA	阳性	102	48.45 (0.27-200.31)	5.85	<0.001
	阴性	60	9.82 (0.03-171.15)		
HBVpreS <sub>2</sub>	阳性	124	31.23 (0.27-200.31)	8.44	<0.001
	阴性	38	1.70 (0.03-14.54)		
HBVpreS <sub>1</sub>	阳性	125	30.87 (0.27-200.31)	8.84	<0.001
	阴性	37	1.67 (0.03-12.73)		

数增加, HBV-LP阳性率亦逐渐增加( $P<0.05$ )。二者之间有良好的正相关性( $r_s=0.64$ ,  $P<0.001$ )。正常对照组, HBV感染组中不同HBV DNA拷贝数组别间HBV-LP含量存在差异显著性( $\chi^2=135.34$ ,  $P<0.001$ , 表1)。

**2.2 HBV-LP与HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>, HBV DNA, HBeAg相关性** 在162例HBV感染者血清中, HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>阳性符合率分别为91.2%, 96.8%, 96.8%, 100%。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>的符合率分别为67.3%, 51.8%, 87.0%, 92.6%。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>间相关显著( $\chi^2=9.22, 11.89, 60.35, 99.87$ ;  $P<0.01$ )。HBV-LP与HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>间存在差异显著性( $\chi^2=23.11, 70.20, 6.86, 10.08$ ;  $P<0.05$ )。HBV-LP的检出率为84.6%(137/162), 较HBV DNA, HBeAg, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>高(表2)。HBeAg, HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>不同模式间HBV-LP含量比较见表3。

**2.3 HBeAg阴性HBV感染血清中HBV-LP检测** 99例HBeAg阴性HBV感染者血清中, HBV-LP与HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>间相关显著( $\chi^2=33.14, 57.28$ ;  $P<0.01$ )。而与HBV DNA间无统计学意义( $\chi^2=1.49$ ,  $P>0.05$ )。HBV-LP与HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>间存在差异显著性( $\chi^2=25.0, 7.58, 9.09$ ;  $P<0.01$ )。HBV-LP的阳性检出

表 4 HBeAg阴性HBV感染者血清HBV-LP与定性检测指标的相关性

HBV-LP	n	HBV DNA		HBVpreS <sub>2</sub>		HBVpreS <sub>1</sub>	
		+	-	+	-	+	-
阳性	76	34	42	60	16	65	11
阴性	23	7	16	3	20	0	23
合计	99	41	58	63	36	65	34

率为76.8%(76/99), 较HBV DNA, HBVpreS<sub>2</sub>, HBVpreS<sub>1</sub>高(表4)。

### 3 讨论

乙肝病毒的3个包膜蛋白是从一个开放阅读框的3个不同起始位点与相同的终止位点翻译表达而来。在病毒粒子成熟过程中, 大蛋白preS结构域开始时都停留在胞膜的细胞质中, 通过S结构域的II型信号和疏水C端跨内质网膜, 大约一半大蛋白的跨膜区域的拓扑结构在翻译后发生了改变, 使得preS区域暴露于病毒粒子的表面, 从而产生大蛋白的独特双重拓扑结构<sup>[7]</sup>。通过双重拓扑学结构, 大蛋白preS结构域定位于病毒包膜的两侧, 在病毒生活周期中执行两个重要功能: 在外侧, preS<sub>1</sub>的N末端区域作为配体与病毒受体结合; 在内侧, 在病毒组装时作为基质蛋白, 通过其103位精氨酸和124位丝氨酸之间的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<sup>[7-8]</sup>。亚病毒颗粒的形成和分泌可作为HBV包膜蛋白正确折叠和参与病毒粒子形成的指标<sup>[9]</sup>。本研究显示, HBV-LP的含量在正常对照组与HBV感染组间存在差异显著性( $P<0.01$ )。162例HBV感染血清中, HBV-LP的含量与HBV DNA拷贝数间存在良好的正相关性( $r_s=0.64$ ,  $P<0.001$ )。不同HBV DNA拷贝数指数级间HBV-LP含量及阳性率两两比较有统计学意义( $P<0.01$ )。二者间的含量及阳性率存在一定的平行关系; HBV-LP在HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>, HBV DNA, HBeAg不同模式间的含量存在差异显著性( $P<0.01$ )。各指标间的阳性符合率具有高度一致性, 其关联显著( $P<0.01$ )。表明HBV-LP是反映HBV感染者机体内病毒复制程度的可靠指标。研究同时发现HBV-LP在HBV感染血清中较HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>, HBV DNA, HBeAg敏感, 分析其原因: (1)HBV-LP检测采用的是立体构象型表位的mAb, HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>作为HBV-LP的一部分, 无法模拟其复杂的双重拓扑结构, 在制作单克隆抗体时由于序列的折叠、卷曲而

### ■名词解释

乙肝病毒大蛋白: 在病毒粒子成熟过程中, 大蛋白preS结构域开始时都停留在胞膜的细胞质中, 通过S结构域的II型信号和疏水C端跨内质网膜, 大约一半大蛋白的跨膜区域的拓扑结构在翻译后发生了改变, 产生大蛋白的独特双重拓扑结构。大蛋白preS结构域定位于病毒包膜的两侧。在外侧, preS<sub>1</sub>的N末端区域作为配体与病毒受体结合; 在内侧, 在病毒组装时作为基质蛋白, 通过其103位精氨酸和124位丝氨酸之间的preS区域直接与核壳相互作用。



失去表位暴露的机会导致漏检; (2)HBV突变株不断增加、HBV DNA检测的方法学与灵敏度缺陷等使HBV DNA阴转并不能真实反映肝组织内HBV感染及复制情况, 尤其是HBV DNA低水平时, 肝内HBV DNA仍可维持一定水平; 目前抗病毒治疗只能抑制cccDNA再复制, 并不能抑制已经形成的病毒表达蛋白, 富含大蛋白的亚病毒颗粒在一段时间内仍存在; (3)由于持续免疫压力、长期治疗、前C和C启动子变异等原因, HBeAg阴性的慢性乙肝流行率呈不断升高趋势, HBeAg的阴转已不能真实反映HBV复制情况。综上表明HBV-LP是用于HBV感染者机体内病毒复制监测及疗效判断的良好指标。

在99例HBeAg阴性的HBV感染血清中, 研究表明, HBV-LP与HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>间关联显著( $P<0.01$ ), 而与HBV DNA之间无统计学意义( $P>0.05$ ), 这可能与HBV感染者体内DNA低水平复制及HBV-LP细胞内滞留有关。HBV-LP检出率较HBV DNA, HBVpreS<sub>1</sub>, HBVpreS<sub>2</sub>更为敏感( $P<0.01$ )。HBV感染肝细胞合成的大蛋白数量远远超过病毒形态发生所需要的量, 在缺少病毒核衣壳的条件下, 最终形成球状或纤维状的空的亚病毒颗粒(SPVs)。乙肝鸭模型证实HBV感染者血清的感染性不仅依赖于Dane颗粒的多少, 还依赖于富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量。亚病毒颗粒能够反式激活病毒, 使病毒复制重新激活<sup>[10]</sup>。提示大蛋白阳性对HBeAg阴性慢性乙肝中的活动期肝炎, 尤其是HBV DNA低水平复制时的病情具有监测意义。有研究表明, 大蛋白超量表达会通过反式调控作用使SPVs不会分泌, 形成亚病毒包膜纤维体, 其在细胞内积累可导致肝细胞液泡化和细胞凋亡<sup>[11]</sup>。这提示HBV-LP含量的连

续检测有利于对慢性乙肝预后的监测, 防止或延缓肝硬化或HCC的发生与发展。综上说明HBV-LP的检测有利于对HBeAg阴性HBV感染者的病情进程、疗效判断及预后的监测。

#### 4 参考文献

- 1 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658
- 2 庄辉. 我国乙型肝炎病毒感染与挑战. 中华传染病杂志 2005; 23(增刊): 2-5
- 3 Liaw YF, Tai DI, Chu CW, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 1988; 8: 493-496
- 4 Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 35: 1522-1527
- 5 Liaw YF, Lin DY, Chen TJ, Chu CM. Natural course after the development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Liver* 1989; 9: 235-241
- 6 乐爱平, 鞠北华, 胡庆宏. HBVpreS<sub>1</sub>-Ag、HBVpreS<sub>2</sub>-Ag、HBV DNA、HBVM的相关性分析及其意义. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 344-346
- 7 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: 6652-6657
- 8 Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* 1997; 71: 9350-9357
- 9 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209
- 10 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468
- 11 Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36: 1400-1407

#### ■同行评价

本文结论有利于提高HBV感染者的血清学诊断的准确性, 有临床实用价值。论文实验设计合理, 方法可靠, 基本结果可信。

电编 李琪 编辑 潘伯荣