

乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定HBV DNA复制的意义

孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇

■背景资料

近年来随着对
大蛋白中HBV
Pre-S1抗原在乙
型肝炎发病机
制、HBV感染与
复制等方面研究
的深入, 研究者
们逐渐认识到了
Pre-S1抗原具有
越来越重要的临
床意义。

孙颖, 解放军军医进修学院 北京市 100853
辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇, 解放军302医院传染病研究所
病毒研究室 北京市 100039
通讯作者: 貌盼勇, 100039, 北京市西四环中路100号, 解放军
302医院传染病研究所病毒研究室. maopy302@yahoo.com.cn
共同通讯作者: 辛绍杰
电话: 010-66933315 传真: 010-63831874
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-17

Significance of hepatitis B virus large protein detection in prediction of HBV DNA replication

Ying Sun, Shao-Jie Xin, Li Lei, Jun Hou, Pan-Yong Mao

Ying Sun, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Shao-Jie Xin, Li Lei, Jun Hou, Pan-Yong Mao, Department of Virology, Institute of Infectious Disease, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
correspondence to: Pan-Yong Mao, the Department of Virology, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. maopy302@yahoo.com.cn
Co-correspondence to: Shao-Jie Xin
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-17

Abstract

AIM: To explore the significance of hepatitis B virus large protein (HBV-LP) in the diagnosis of viral replication.

METHODS: Serum HBV DNA level was quantitatively detected using real-time polymerase chain reaction, and HBV-LP, Pre-S1 and HBV markers expression were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 254 cases of infected serum.

RESULTS: There was no significant difference between the levels of HBV DNA and HBV-LP ($P > 0.05$). The expression of HBV DNA and HBV-LP were not significantly different among various patterns of HBV serological markers, either ($P > 0.05$). HBV-LP expression was markedly correlated with the logarithm of HBV DNA level ($r = 0.945$, $P < 0.001$). A proportion of 89% of the logarithm of serum HBV DNA changes could be predicted by the linear regression mod-

el with the independent variables (the levels of HBV-LP).

CONCLUSION: There is a perfect correlation between the copies of HBV DNA and the levels of HBV-LP, and HBV-LP expression can reflect the replication of HBV.

Key Words: Hepatitis B virus large protein; HBV DNA; HBV markers

Sun Y, Xin SJ, Lei L, Hou J, Mao PY. Significance of hepatitis B virus large protein detection in prediction of HBV DNA replication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;(3):354-357

摘要

目的: 通过检测患者血清乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP)、HBV DNA以及乙肝病毒标志物(HBV M), 探讨HBV-LP对于反映体内乙肝病毒复制的意义。

方法: 采用荧光定量PCR方法对254份HBV感染血清的HBV DNA进行检测, 并采用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法对HBV-LP、Pre-S1蛋白及HBV M进行检测。

结果: 大蛋白的检出结果与HBV DNA的检出结果无明显差异。不同HBV M模式的HBV DNA与HBV-LP的检出结果均无显著性差异。HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP表达具有相关关系($r = 0.945$, $P < 0.001$), HBV DNA拷贝数的对数值变化的89%可以用HBV-LP A值为解释变量的线性回归模型来解释。

结论: HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。

关键词: 乙肝病毒包膜大蛋白; 乙肝病毒DNA; 乙肝病毒标志物

孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇. 乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定HBV DNA复制的意义. *世界华人消化杂志* 2006;14(3):354-357

表1 大蛋白阳性率及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较

	HBV DNA	n	HBV-LP			Pre-S1		
			+	-	阳性率	+	-	阳性率
HBV 感染者	+	170	135	35	79.4%	97	73	57.1%
	-	84	44	40	52.4%	18	66	21.4%
健康对照	-	100	0	100	0	0	100	0
合计		354	179	75		115	139	

表2 HBV标志物阳性的不同模式患者的HBV DNA与HBV-LP检出情况

HBV M(+)	n	HBV DNA(+)	HBV-LP(+)
HBsAg HBeAg HBcAb	109	93 (85.32)	99 (90.83) ^a
HBsAg HBeAb HBcAb	85	45 (52.94)	46 (54.12) ^a
HBsAg HBeAg	23	19 (82.60)	18 (78.26) ^a
HBsAg HBcAb	37	13 (35.13)	16 (43.24) ^a
合计	254	170	179

^a $P>0.05$, 说明HBV-LP与HBV DNA在统计学上无显著性差异。

0 引言

HBV S基因编码合成的HBV外膜蛋白由3种蛋白组成, 包括主蛋白(即HBsAg), 中蛋白(即HBsAg和Pre-S2蛋白)和大蛋白(即HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白)^[1]。近年来随着对大蛋白中HBV Pre-S1抗原在乙型肝炎发病机制、HBV感染与复制等方面研究的深入, 研究者们逐渐认识到了Pre-S1抗原具有越来越重要的临床意义^[2-8], 如Pre-S1抗原能够反映HBV的复制情况, 可以作为预测干扰素治疗是否有效的指标, 推测急、慢性乙型肝炎的预后情况, 并可用于制备重组乙肝疫苗。但是由于大蛋白是构象蛋白, Pre-S1抗原作为大蛋白的一部分, 无法模拟其复杂的拓扑结构, 在制作单克隆抗体时其序列会被折叠, 卷曲而失去暴露表位的机会。这样的低级结构抗原制作出来的单克隆抗体在实际应用中便可能导致漏检。为了提高HBV Pre-S1抗原检测在临床应用中的意义, 我们利用构象型前S区的高亲和力、高特异性的单抗来检测由HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白3种蛋白成分组成的乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP), 通过此研究来探讨HBV-LP对于反映体内乙肝病毒复制的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-01/2005-07 302医院的住院患者血清254份及正常体检职工血清100份。所有标本均于-20℃保存以备用。

1.2 方法 HBV DNA实时荧光聚合酶链反应(PCR)定量试剂盒购自广州中山大学达安基因公司。乙型肝炎病毒Pre-S1抗原采用ELISA方法, 试剂购自上海阿尔法生物技术有限公司, 乙型肝炎血清标志物检测试剂盒购自中山生物技术有限公司, 检测HBV-LP的单克隆抗体由热景生物技术有限公司馈赠, 该单抗为针对大蛋白Pre-S区复杂的拓扑结构制备而成。

统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计分析。HBV-LP及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较采用配对资料的 χ^2 检验; 不同乙肝病毒血清标志物中HBV DNA阳性率与大蛋白阳性率的比较采用R×C列联表的 χ^2 检验; HBV-LP含量与HBV DNA的拷贝数的相关性分析采用频数表的相关与回归分析。

2 结果

2.1 大蛋白阳性率及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较 我们检测了254份HBV感染血清, 其中HBV DNA阳性的为170份, HBV DNA阴性的为84份, 大蛋白总阳性率为79.4%, 前S1的总阳性率为57.1%, 大蛋白的检测方法与HBV DNA检测结果经配对卡方检验, 两者的检出率无明显差异($\chi^2 = 1.025$), HBV-LP比原来的前S1试剂效果大大提高, 说明大蛋白的检测比前S1更有意义(表1)。

2.2 不同乙肝病毒血清标志物中HBV DNA与大

■研究前沿

由于大蛋白是构象蛋白, Pre-S1抗原作为大蛋白的一部分, 无法模拟其复杂的拓扑结构, 在制作单克隆抗体时其序列会被折叠, 卷曲而失去暴露表位的机会, 这样的低级结构抗原制作出来的单克隆抗体在实际应用中便可能导致漏检。

■创新盘点

本研究利用构象型前S区的高亲和力、高特异性的单抗来检测乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP), 研究结果显示HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。

表3 大蛋白4值与HBV DNA拷贝数的相关性

组别 (HBV DNA Copies)	<i>n</i>	HBV-LP A	HBV-LP阳性 <i>n</i>	HBV-LP 阳性率(%)
<10 ⁴ (阴性)	84	0.266 ± 0.044	23	27.38
10 ⁴	43	0.416 ± 0.081	29	67.44
10 ⁵	63	0.504 ± 0.205	46	73.02
10 ⁶	24	0.898 ± 0.180	21	87.50
10 ⁷	17	1.275 ± 0.319	16	94.12
10 ⁸	23	1.428 ± 0.238	23	100.00

表4 大蛋白4值与HBV DNA拷贝数相关系数计算表

HBV DNA拷贝数的对数值(X)	HBV-LP A								HBV-LP 阳性 <i>n</i>	HBV DNA拷贝数 对数值的组中值
	0.2-	0.4-	0.6-	0.8-	1.0-	1.2-	1.4-	1.6-		
4-	23								23	4.5
5-		29							29	5.5
6-				39	7				46	6.5
7-				3	4	8	6		21	7.5
8-					2	7		7	16	8.5
各组频数	23	29	0	42	13	15	6	7	135	
HBV-LP A 的组中值	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7		

蛋白的检测结果比较(表2)

2.3 HBV-LP与HBV DNA的相关性 HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP A值的相关系数 $r=0.945$, 回归方程为 $Y=-1.134+0.312X$, $P<0.001$, $R\text{ Square}=0.894$, 这一结果说明HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP A值具有相关关系, HBV DNA拷贝数的对数值变化的89%可以用HBV-LP A值为解释变量的线性回归模型来解释(表3-4)。

3 讨论

虽然目前医学界认为外周血HBV DNA是HBV复制最直接和可靠的指标, 可以用来判定患者和携带者有无传染性。但是Bruns *et al*^[9]通过研究鸭乙肝病毒发现含有嗜肝病毒的血清的感染性不仅依赖于具有感染性的病毒颗粒(Dane氏颗粒)的多少, 而且还依赖于缺乏核酸的亚病毒颗粒(SVPs, subviral particles, 包括管状颗粒和小球颗粒)的数量, 研究发现亚病毒颗粒在HBV感染过程中, 能显著增强细胞内的病毒复制和基因表达, 而这种增强作用是由pre-S蛋白的反式激活作用所触发的。此外还有研究发现, 在HBV形

成包膜的过程中需要大蛋白(即HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白)和中蛋白的参与^[10], 因此检测Pre-S蛋白的存在对于临床上判定HBV复制具有一定的意义。以往的检测是通过检测大蛋白的独有片断Pre-S1蛋白来实现的^[11,12], 但是编码pre-S蛋白的HBV-LP Pre-S区具有较为复杂的拓扑结构^[13], 导致Pre-S1抗原的检出率较低^[14,15], 不能很好的反映HBV的复制情况。我们通过对HBV感染者血清中的HBV-LP, HBV M以及HBV DNA的检测表明: HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。由此可见HBV-LP在反应病毒复制方面是一个较好的指标。大蛋白的检测可以为小三阳病人的抗病毒治疗停药时间的确立提供参考。在我们检测的DNA阴性的52.4%血清标本中, 检测到了大蛋白的存在, 但其含量均较低, 通过进一步研究发现这些血清均来自处于抗病毒治疗过程中的患者, 这一现象提示我们在HBVDNA阴性的患者中, 大蛋白阳性可能是肝内病毒继续复制和抗病毒治疗不彻底的标志。但是对于这一结论还需要进一步

的研究.

4 参考文献

- 1 Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 1996; 9: 23-31
- 2 何华, 张大志. 乙型肝炎病毒前S1抗原的研究进展. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 765-766
- 3 李琴, 孙桂珍, 魏玉香. 前S1蛋白与病毒DNA和核心抗原对乙型肝炎病毒复制诊断的对比. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 134-136
- 4 李欣华, 蒋卫平, 郑颖. 乙肝病毒前S1蛋白与HBVDNA、乙肝免疫标志物检测结果相关性分析. *临床肝胆病杂志* 2004; 20: 303-304
- 5 张雪红, 易长庚, 喻淑萍. 乙肝患者血清前S1蛋白与HBV-M、HBV-DNA检测结果的分析. *中国医师杂志* 2005; 1: 136-137
- 6 廖可育, 彭志高, 罗玲. 前S1蛋白在反映慢性乙型肝炎、HBsAg携带者病毒复制中的价值分析. *中国医师杂志* 2005; 7: 974-975
- 7 黄伟刚, 陈青龙, 张慧萍, 林津. 乙肝病毒前S1蛋白检测在诊断乙型肝炎病毒复制中的意义. *临床医学* 2005; 10: 5-7
- 8 李秀惠, 骆抗先, 田琦琦, 黄已实. 前S1抗体反映肝细胞损伤和病毒清除. *中华实验和临床病毒学杂志* 1994; 8: 120-121
- 9 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 76: 1462-1468
- 10 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209
- 11 Chen Kun. Establishment and preliminary use of hepatitis B virus preS1/2 antigen assay. *World J Gastroenterol* 1999; 11: 550-552
- 12 闵福援, 孙桂珍, 王健. 前S1蛋白在乙型肝炎诊断及判断预后中的作用. *中华检验医学杂志* 2004; 27: 224-226
- 13 Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *J Gen Virol* 2004; 85: 1221-1225
- 14 陈芳建, 胡雅国, 陆军. 乙型肝炎患者血清HBV-DNA与病毒复制标志物相关性探讨. *浙江预防医学* 2005; 17: 20-21
- 15 张旭, 邹焕荣, 黄衍锋. 前S1蛋白在乙型肝炎病毒检测中的临床意义. *医学文选* 2004; 23: 282-284

■应用要点

外膜大蛋白的存在与乙肝病毒的复制密切相关. 因此检测包膜大蛋白对于判断HBV感染的预后及抗病毒治疗的疗效具有较为重要的意义.

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第一届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 经中华医学会外科学分会批准, "第十届全国临床营养支持学术会议"将于2006-05在上海召开. 本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办, 主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结. 现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号, 上海中山医院外科吴国豪收, 邮编: 200032; 同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn, 注明上海中山医院外科吴国豪收. 征文请自留底稿, 恕不退稿.

2 截稿日期

征文截止日期: 2006-03-15.

本次会议举行优秀论文评奖活动, 欢迎踊跃投稿. 会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分.