

HBsAg 阳性者前 S1 抗原和 HBV DNA 检测的相关性探讨

徐丽琼¹, 刘 华² (1. 云南省丽江市人民医院检验科 674100; 2. 云南省昆明医学院第一附属医院检验科 650032)

【摘要】 目的 探讨 HBsAg 阳性者血清中 HBV DNA 及乙型肝炎病毒前 S1 抗原(PreS1Ag)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)的关系及其临床应用价值。**方法** 对 368 例临床血清标本采用 ELISA 方法检测 HBeAg 和 PreS1Ag, 荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA。**结果** HBeAg 阳性组 PreS1Ag 阳性率为 87.2%, HBV DNA 阳性率为 91.0%; HBeAg 阴性组 PreS1Ag 阳性率为 54.7%, HBV DNA 阳性率为 55.7%。患者血清 PreS1Ag 与 HBV DNA 结果无明显差异($P>0.05$)。**结论** PreS1Ag 与 HBV DNA 符合率较高, 比 HBeAg 更能反映病毒复制情况, 可作为一项新的病毒复制指标。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 前 S1 抗原; HBV DNA; HBeAg; 聚合酶链反应; 酶联免疫吸附试验
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0149-02

Study on relationship of PreS1Ag and HBV DNA in patients of positive HBsAg XU Li-qiong¹, LIU Hua² (1. Department of Clinical Laboratory, Lijiang People's Hospital, Lijiang, Yunnan 674100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650032, China)

【Abstract】 Objective To discuss the relationship between HBV DNA with PreS1Ag and HBsAg and their clinical application value. **Methods** 368 specimens of clinical serum were tested HBeAg and PreS1Ag by ELISA and HBV DNA by FQ-PCR. **Results** In the positive HBeAg group, the positive rate of PreS1Ag was 87.2% and the positive rate of HBV DNA was 91.0%. In the negative HBeAg group, the positive rates of PreS1Ag and HBV DNA were 54.7% and 55.7% respectively. Serum PreS1Ag and HBV DNA had no significant difference($P>0.05$). **Conclusion** PreS1Ag has a higher coincidence rate with HBV DNA and better reflects the viral replication status than HBeAg, which may be used as a novel index of HBV replication.

【Key words】 HBV; PreS1-Ag; HBV DNA; HBeAg; FQ-PCR; ELISA

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染高发地区, HBV 携带者数量众多。HBV 为嗜肝病毒科家族的成员之一, 是一种新的肝非细胞病变的 DNA 病毒, 可引起包括慢性无症状携带、慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌等一系列肝脏疾病^[1]。掌握 HBV 在体内的复制情况, 对准确判断病情以及对抗病毒治疗的准确监测具有重要的意义。临床上检测病毒及其复制程度的方法主要是 ELISA 测 HBV 标志物和 PCR 测 HBV DNA。传统观念曾认为乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性可作为病毒复制不活跃的标志, 现已证明这种观念是错误的, 约有 1/3 的慢性乙型肝炎患者 HBeAg 阴性, 但仍伴有高水平的 HBV 复制^[2]。

近年来有研究表明, HBV 前 S1(PreS1)蛋白主要存在于 Dane 颗粒和管型颗粒上, 含有细胞膜受体, 其存在反映病毒活动性复制和肝损害, 在 HBV 感染、装配、复制和刺激机体产生免疫反应等方面有着十分重要的作用, 而且前 S1 抗原(PreS1Ag)抗体系统与 HBV 复制关系密切, 影响病情的发展和 HBV 感染的预后。本文对 368 例乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性患者血清进行 HBeAg、HBV DNA 及 PreS1Ag 对比检测, 评价各指标的临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源 临床收集 HBsAg 阳性标本 368 例。所有标本均来自 2010 年 1 月至 2011 年 6 月昆明医学院第一附属医院门诊及住院患者清晨空腹血, 采用密闭真空管采集, 3 000 r/min 离心分离血清, 选用无脂血、无溶血标本, 年龄为 10~80 岁, 其中男 228 例, 女 140 例。

1.2 仪器与试剂 HBV DNA 荧光定量聚合酶链反应(FQ-

PCR)所用仪器系美国 ABI 公司生产的 ABI7300 自动荧光 PCR 仪, HBV DNA FQ-PCR 试剂盒由中山大学达安基因诊断中心提供; HBeAg ELISA 所用仪器系芬兰生产的 Wellscan MK3 酶标仪, HBeAg 试剂盒由上海科华生物工程公司生产。HBV PreS1Ag 试剂由上海复星长征医学科学有限公司生产。

1.3 方法 HBeAg、PreS1Ag 以 ELISA 法、全自动酶标仪完成。HBV DNA 应用 FQ-PCR 法测定。所有试验严格按试剂说明书进行, 试剂均在有效期内使用。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 368 例 HBsAg 阳性患者中血清 PreS1Ag 阳性 252 例(68.5%); HBV DNA 阳性 260 例(70.7%)。

2.2 血清 HBeAg 与 PreS1Ag、HBV DNA 检测结果见表 1。结果显示, HBeAg 阳性组中, PreS1Ag 和 HBV DNA 的阳性率分别为 87.2% 和 91.0%, 经比较差异无统计学意义($P>0.05$)。HBeAg 阴性组中, PreS1Ag 和 HBV DNA 阳性率分别为 54.7% 和 55.7%, 经比较差异无统计学意义($P>0.05$)。提示 PreS1Ag 和 HBV DNA 二者有较好的相关性。

表 1 HBeAg 和 PreS1Ag、HBV DNA 的相关性

组别	n	PreS1Ag		HBV DNA	
		阳性数(n)	阳性率(%)	阳性数(n)	阳性率(%)
HBeAg 阳性	156	136	87.2	142	91.0
HBeAg 阴性	212	116	54.7	118	55.7

注: HBV DNA 阳性结果为 HBV DNA $>10^3$ copy/mL。

3 讨 论

PreS1Ag 是 PreS1 基因编码的外壳表面抗原蛋白成分之一,与 HBV 的组装、分泌和入侵肝细胞密切相关^[3],PreS1Ag 的持续存在提示病毒复制和病毒颗粒存在。近年来,它已成为一种新的 HBV 检测标志物。HBeAg 曾被认为是反映病毒复制的灵敏指标^[4],但有研究证实,HBV 感染宿主后,为逃避免疫应答而发生前 C 区与 C 区基因的突变,使 HBeAg 分泌减少^[5]。因此,HBeAg 阴性并不意味着 HBV 被清除或复制水平的降低^[6]。

本检测中 HBeAg 阴性组 PreS1Ag 和 HBV DNA 阳性率分别为 54.7% 和 55.7%,HBeAg 阳性组中 PreS1Ag 和 HBV DNA 阳性率分别为 87.20% 和 91.0%,说明 PreS1Ag 比 HBeAg 能更准确、灵敏地反映 HBV 的感染及复制,且与金标准 HBV DNA 有更高的符合率,与相关报道一致^[7]。

综上所述,本试验再次证实了 HBeAg 阴性患者仍可能在病毒复制,而 PreS1Ag 检测可能比 HBeAg 更有意义。PCR 检测 HBV DNA 虽然灵敏度、特异度均高,但对实验条件要求较高,费用偏贵,许多基层医疗单位未能开展。PreS1Ag 可通过双抗体夹心法测定,对实验条件相对低且费用更低,因此 PreS1Ag 是反映 HBV 复制且检测简便、理想的血清学指标,尤其在病毒发生变异后,HBeAg 阴转仍存在病毒复制可能时有特别的价值,对指导抗病毒治疗具有重要的临床意义。在一些未开展 HBV DNA 检测的医院,可作为 PCR 检测 HBV DNA,诊断 HBV 是否复制等的替代方法。

参考文献

[1] 蔡木发,吴显劲,李静.300 例 HBV 前 S1 抗原与 HBV 标

(上接第 148 页)

脏内的血液和影响酶消化的 Ca²⁺,又可以在灌注酶液后扎紧结扎口,使酶液充分灌注到肝脏的每个部分,充分消化肝实质细胞和胶原,有利于后续细胞的分散。(2)细胞铺板后 30 min,收集未贴壁的细胞重新铺板,有效去除 Kupffer 细胞的影响,因为 Kupffer 细胞和 HSC 的沉降系数相似,因此分离纯化的 HSC 中往往含有 Kupffer 细胞,影响细胞的纯度^[8],这一直是困扰研究者的一个难题。本研究根据 Kupffer 细胞比较容易贴壁的特点,一般铺板 30 min 可以贴壁,而此时大部分 HSC 没有贴壁,因此,此时用一步去除大部分 Kupffer 的干扰,增加了 HSC 的纯度。(3)选用液体的 Optiprep 梯度分离液。传统的分离液为固体 Nycodenz,配置过程需滤过除菌,操作复杂;而 Optiprep 为无菌液体,使用时仅需按要求稀释,操作简便,更加容易精确控制浓度。(4)吸取密度梯度分离后的细胞时,尽量少地吸取细胞层下面介质中的细胞,可以防止 Kupffer 细胞和其他非实质细胞的影响。

总之,本研究摸索出的这一套 HSC 分离培养及鉴定方法,经多次实验证实,在保证 HSC 纯度的同时,提高了产量和活率,为进一步研究 HSC 在肝损伤后细胞基质的沉积及纤维化的形成奠定了基础。

参考文献

[1] 尤金·R·希夫,迈尔·F·索雷尔,威利斯·C·马德里.希夫肝脏病学[M].黄志强,译.9 版.北京:化学工业出版社医学图书出版中心,2006:367-374.

志物及 HBV DNA 检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(10):1177-1178.

[2] 贾继东.乙型肝炎 e 抗原阴性慢性乙型肝炎的治疗[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(7):539.

[3] Hu WG,Wei J,Yang XX,et al. Expression of overlapping PreS1 fragment recombinant proteins for the determination of immunogenic domains in HBsAg PreS1 region[J]. Acta Biochim Biophys Sin,2004,36(6):397-404.

[4] 郭卉,董瑶佳,刘晓峰,等. 乙肝血清学标志物与 HBV-DNA 含量关系的分析[J]. 实验与检验医学,2010,28(4):417-418.

[5] FunK ML,Rosenberg DM,Lok AS. World-wide epidemiology of HbeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants [J]. Viral Hepat, 2002,9(1):52-61.

[6] 陈恺杰.乙型肝炎病毒外膜大蛋白的检测及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):658-660.

[7] 韩昌洪,陈瑶. HBV PreS1 蛋白及 HBV DNA 含量检测在诊断乙型肝炎病毒复制中的临床意义[J]. 海南医学院学报,2009,15(9):1052-1054.

(收稿日期:2011-08-03)

[2] Friedman SL. Hepatic stellate cell:peotean,multifunctional and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev,2008,88(3):125-172.

[3] Wu J,Zern MA. Hepatic stellate cells;a target for the treatment of liver fibrosis[J]. J Gastroenterol,2000,35(9):665-672.

[4] Okazaki I,Watanabe T,Hozawa S,et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis;with special reference to the role of matrix metalloproteinases[J]. J Gastroenterol Hepatol,2000,15(Suppl):D26-D32.

[5] Winau F,Quack C,Darmoise A,et al. Starring stellate cells in liver immunology[J]. Curr Opin Immunol,2008,20(20):68-74.

[6] Chen CH,Kuo LM,Chang Y,et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice[J]. Hepatology,2006,44(5):1171-1181.

[7] Knook DL,Seffelaar AM,Delleuwa M. Fat-storing cells of the rat liver;their isolation and purification[J]. Exp Cell Res,1982,139(2):468-471.

[8] 张志奇,邱江锋,赵刚,等. 大鼠肝星状细胞和库普弗细胞的分离培养及鉴定[J]. 中华消化外科杂志,2009,8(2):149-150.

(收稿日期:2011-07-14)