

乙型肝炎病毒外膜大蛋白和病毒标志物联合检测的意义*

张 静¹, 高 纯¹, 史进方¹, 蒋 敏¹, 王玉林¹, 甘建和², 罗二平², 顾国浩^{1△} (苏州大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 感染科 215006)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒外膜大蛋白(HBV-LP)和乙型肝炎病毒(HBV)标志物联合检测的意义。**方法** 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 196 例 HBV 感染者血清中 HBV-LP、应用实时荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 以及时间分辨免疫荧光分析法定量检测乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)。**结果** 196 例 HBV 感染者血清中 HBV-LP 与 HBV-DNA 的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.09, P>0.05$); 在 HBV-DNA 阳性患者中 HBV-LP 和乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)阳性率差异有统计学意义($\chi^2=68.76, P<0.05$); HBV-DNA 拷贝数的对数值与 HBV-LP 的吸光度值 A 有较好的相关性, 其相关系数(r)=0.97($P<0.01, F=104.52$); HBeAg 阴性 HBV 感染者血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=0.74, P>0.05$); 不同 HBV-M 模式 HBV 感染者 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** HBV-LP 能较准确地反映 HBV 复制水平, 是 HBV-M 较好的补充; 血清 HBV-LP 的含量与 HBV-DNA 的水平有较好的相关性; 血清 HBV-LP 是监测 HBV 感染者体内病毒复制、疾病进展与疗效的较好指标; HBV-LP 与 HBV 标志物联合检测更有助于 HBV 感染者的诊断和治疗。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒外膜大蛋白; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.06.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)06-0646-03

The combination detection and significance of HBV-LP and serum hepatitis B virus markers in HBV infected patients*

ZHANG Jing¹, GAO Chun¹, SHI Jin-fang¹, JIANG Min¹, WANG Yu-lin¹, GAN Jian-he², LUO Er-ping², GU Guo-hao^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infection Disease, First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

【Abstract】 Objective To explore the clinical significance of the combination detection of hepatitis B virus large protein(HBV-LP) and biomarkers. **Methods** For 196 cases of infected serum, HBV-LP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, serum HBV-DNA level was quantitatively detected by real-time polymerase chain reaction, and HBV-M was quantitatively detected by time resolved fluoroimmunoassay. **Results** The positive rates were not significantly different between HBV-LP and HBV-DNA($\chi^2=0.09, P>0.05$). The positive rates were significantly different between HBV-LP and HBeAg in the HBV-DNA positive patients($\chi^2=68.76, P<0.05$). HBV-LP absorbance value was remarkably correlated with the logarithm of HBV-DNA level, the correlate coefficient was 0.97($P<0.01, F=104.52$). There was no significant difference between the positive rates of HBV-LP and HBV-DNA in the HBeAg negative patient ($\chi^2=0.74, P>0.05$). The expressions were not significantly different between HBV-LP and HBV-DNA in various patterns of HBV serological markers either ($P>0.05$). **Conclusion** Serum HBV-LP is laboratory marker that can accurately reflect HBV-DNA reproduction, and was helpful for complementarity of HBV-M. There is a good correlation between the expression of HBV-LP and the level of HBV-DNA. HBV-LP is valuable for monitoring HBV-DNA replication therapeutic effect and progression of the disease, the combination with the HBV-M can help to the diagnose and treat HBV infected.

【Key words】 hepatitis B virus; HBV-LP; ELISA

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高流行区, 全国 1~59 岁人群乙型肝炎病毒表面抗原携带率为 7.18%。目前临床上主要以肝功能、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)血清学转换和 HBV-DNA 载量作为乙型肝炎患者体内病毒复制和抗病毒疗效检测的指标, 但尚有一定的局限性。近年来, 乙型肝炎病毒外膜大蛋白(HBV-LP)作为一种新的血清免疫学指标受到重视。新近研究表明, HBV-LP 的前 S 蛋白具有复杂的跨膜构象拓扑结构, 是 HBV-LP 活性表位所依赖的, 并可反式激活细胞内 HBV 的复制, 与 HBV 的感染、复制及其预后密切相关。因此, 检测含有此拓扑结构的 HBV-LP 对于判定体内 HBV 复制

具有重要的临床意义。本研究对 196 例不同临床类型 HBV 感染者的 HBV-LP、HBV DNA 与乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)作了检测和分析, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 196 例均为本院 2010~2011 年住院和门诊 HBV 感染者, 男 102 例, 女 94 例, 年龄 16~82 岁, 平均年龄 (46.88±12.76) 岁。诊断符合 2010 年中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会联合修订的“慢性乙型肝炎防治指南”诊断标准^[2]。

1.2 标本采集及检测方法 血液标本由真空采血分离血清后

冻存于-80℃备用。实时荧光聚合酶链反应(PCR)法定量检测 HBV-DNA,试剂购自上海申友基因股份有限公司;时间分辨免疫荧光分析法定量检测 HBV-M,试剂购自上海新波生物技术有限公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)定性检测 HBV-LP,试剂购自北京贝尔生物工程有限公司,选择波长 450 nm, 630 nm,cut off=0.150;随盒附带阳性对照 1.829,阴性对照 0.016,检验仪器 BR68。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 HBV-DNA 与 HBV-LP 检测结果分析 196 例 HBV 感染者血清同步检测 HBV-LP 和 HBV-DNA,HBV-LP 阳性 153 例,占 78.06%(153/196),HBV-DNA 阳性 151 例,占 77.04%(151/196),以 HBV-LP 和 HBV-DNA 单项检测作为判断 HBV 复制的指标,二者差异无统计学意义($\chi^2=0.09,P>0.05$)。以 HBV-LP 和 HBV-DNA 均为阳性,或 HBV-DNA、HBV-LP 任一单项阳性,作为 HBV 感染性标志物,其阳性率达 88.78%,且 HBV-LP 与 HBV-DNA 联合检测比任一单项检测提高了 10.72%~11.74% 的阳性率,详细数据见表 1。

表 1 HBV-LP 和 HBV-DNA 检测结果(n)

HBV-DNA	HBV-LP		合计
	阳性	阴性	
阳性	130	21	151
阴性	23	22	45
合计	153	43	196

2.2 HBV-LP 与 HBV-DNA 水平之间的相关性分析 151 例 HBV-DNA 阳性感染者 HBV-LP A 值与 HBV-DNA 拷贝数对数值之间有良好的相关性,相关系数($r=0.97(P<0.01,F=104.52)$),回归方程为 $Y=-0.58+6.4X(P<0.01),r^2=0.9448$,HBV-DNA 拷贝数对数值变化的 94.48% 可以用 HBV-LP A 值为解释变量的线性回归模型来解释。以 HBV-DNA 和 HBV-LP 作为判断 HBV 复制的指标差异无统计学意义。不同数量级 HBV-DNA 中 HBV-LP 的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.90,P=0.86,P>0.05$),不同 HBV-DNA 拷贝数组的 HBV-LP 吸光度平均 A 值范围及阳性率结果见表 2;HBV-LP A 值与 HBV-DNA 拷贝数对数值相关分析见图 1。

表 2 不同 HBV-DNA 拷贝数组的 HBV-LP nA 值及阳性率比较

HBV-DNA(C/mL)	n	HBV-LP 阳性[n(%)]	A 值
10 ²	21	16(76.19)	0.572 0±0.434 4
10 ³	34	28(82.35)	0.650 1±0.707 2
10 ⁴	14	12(85.71)	0.854 3±0.345 2
10 ⁵	28	24(85.71)	0.993 6±0.543 6
10 ⁶	22	20(90.91)	1.084 4±0.441 3
10 ⁷	12	10(83.33)	1.095 2±0.892 7
10 ⁸	12	12(100.00)	1.363 5±0.467 5
10 ⁹	8	8(100.00)	1.659 4±0.653 9
合计	151	130(86.09)	—

2.3 HBV-LP 与 HBeAg 检测结果分析 151 例 HBV-DNA 阳性的患者中,HBV-LP 阳性 130 例,占 86.09%(130/151),HBeAg 阳性 54 例,占 35.76%(54/151),以 HBV-LP 与

HBeAg 作为作为判断 HBV 复制的指标,差异有统计学意义($\chi^2=68.76,P<0.05$),结果详见表 3。

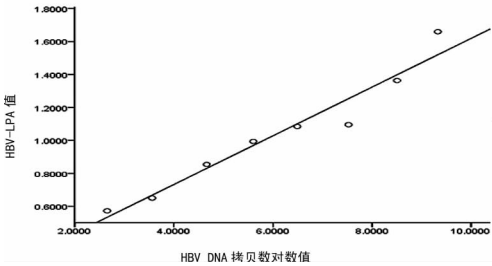


图 1 HBV-LP 平均 A 值与 HBV-DNA 拷贝数的对数值变化趋势

表 3 HBV-DNA 阳性患者血清 HBV-LP 与 HBeAg 检测结果(n)

HBV-LP	HBeAg		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	80	130
阴性	4	17	21
合计	54	97	151

2.4 HBV 感染者不同血清标志物中 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率($P>0.05$) 详见表 4。

表 4 HBV 感染者不同血清标志物中 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率比较

HBV-M	n	HBV-LP	HBV-LP	HBV-DNA	HBV-DNA
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
135	64	59	92.19	51	79.69
145	100	70	70.00	78	78.00
15	32	24	75.00	22	68.75
合计	196	153	78.06	151	77.04

注:设 HBsAg 阳性为 1,抗-HBs 阳性为 2,HBeAg 阳性为 3,抗-HBe 阳性为 4,抗-HBc 阳性为 5。

3 讨 论

HBV-DNA 是临床评估抗病毒疗效的重要指标之一,外周血中 HBV-DNA 是 HBV 复制最可靠最直接的证据,可用于判定患者和病毒携带者有无传染性,但外周血中 HBV-DNA 拷贝数的下降或者低于检测水平并不能作为乙型肝炎治疗疗效判定和停药指标。其原因是血清 HBV-DNA 检测尚有待标准化,其检测限的认识仍存在争议,实际临床治疗过程中肝内 cccDNA 的降低远低于血清 HBV-DNA 水平,血清低水平 HBV-DNA 时肝内 DNA 仍可维持一定水平,因此血清 HBV-DNA 检测阴性并不意味着病毒已经完全清除。

HBeAg 是临床上作为判定 HBV 复制程度、传染性的强弱及慢性乙型肝炎患者预后的另一个重要标志物,但由于持续免疫压力、长期治疗、前 C 和 C 启动子变异等因素导致 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎明显增多,此时患者体内仍可能有低水平的病毒复制,故 HBeAg 阴转并不能排除病毒的感染与复制,造成临床上难以确定停药时机等情况。

HBV-LP 是 HBV 分泌的 3 种外膜蛋白之一,它与中蛋白(HBsAg、Pre-S2Ag)和小蛋白(HBsAg)以合适的比例组装成 Dane 颗粒。3 种膜蛋白中 HBV-LP 与 Dane 颗粒的关系最为密切,即与病毒的复制密切相关。HBV-LP 具有反式激活病毒复制的作用,可使病毒复制重新激活,与病毒颗粒从细胞内释

放调节有关^[2]。近年国内外的研究证实 HBV-LP 对肝细胞有直接毒性作用,是导致肝细胞损伤的直接原因。在经抗病毒治疗的 HBV-DNA 低载量或者 HBV-DNA 阴转的乙型肝炎患者中,由于核苷类似物抗病毒药物只能抑制 DNA 的复制,但不能清除 cccDNA,以病毒 DNA 为模板的转录和病毒蛋白的翻译表达不受影响,并组装成管状、小球状的亚病毒颗粒,HBV-LP 的累积会导致细胞毛玻璃样变,对细胞产生毒性作用,因此在监测病毒复制、观察疗效和判断停药时机上仅采用 HBV-DNA 和 HBV-M 检测有一定的局限性,最好常规联合 HBV-LP 检测。魏红山等^[3]研究表明在 HBeAg 阴性的乙型肝炎患者血清中 HBV-LP 含量与 HBV-DNA 水平变化一致,具有良好的相关性,认为检测血清 HBV-LP 有助于 HBeAg 阴性患者体内 HBV 复制程度的判定。在本研究中,HBV-DNA 阳性感染者的 HBV-LP 的吸光度值与 HBV-DNA 拷贝数对数值有较好的相关性, $r=0.97(P<0.01, F=104.52)$,说明 HBV-LP 可以作为监测病情较好的补充。本实验观察发现 132 例 HBeAg 阴性感染者 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.74, P>0.05$),与周咏梅等^[4]以及陈凯杰等^[5]的研究结果一致。本研究中 132 例 HBeAg 阴性感染者中 10.61% 的患者检测结果为 HBV-LP 阳性而 HBV-DNA 阴性,分析其原因可能是:(1)HBV-LP 的消减晚于 HBV-DNA,在抗病毒治疗应答明显的患者中,HBV-LP 比 HBV-DNA 阴转大约晚了 5 个月^[6],其机制可能是由于残留的病毒持续表达蛋白;(2)用实时荧光 PCR 定量检测 HBV-DNA 时,其引物和探针不能检测到已发生变异的 HBV-DNA,在抗病毒药物的选择压力下,病毒基因可发生变异,尤其是口服拉米夫定的变异率较高,在治疗 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年后,YMDD 的发生率从治疗 1 年的 16.32% 分别上升到 38%、53%、66% 和 69%^[7],而检测大蛋白是用 ELISA 方法,针对其单克隆抗体识别特异性抗原,受基因突变的影响小,只要特异性抗原未发生抗原决定簇的变异就能特异性地检测 HBV 感染者。

在本实验中,196 例 HBV 感染者以 HBV-DNA 和 HBV-LP 单项检测作为判定 HBV 复制的指标,差异无统计学意义($\chi^2=0.09, P>0.05$);在 HBV-DNA 阳性组中,HBV-LP 和 HBV-DNA 有较好的相关性;以上数据分析表明,以 HBV-LP

和 HBV-DNA 单项检测作为判定 HBV 复制的标志无统计学差异,以 HBV-LP 和 HBV-DNA 均为阳性,或 HBV-DNA、HBV-LP 任一单项阳性,作为 HBV 感染性标志物,其阳性率达 88.78%,且 HBV-LP 与 HBV-DNA 联合检测比任一单项检测提高了 10.72%~11.74% 的阳性率,联合检测优于单项检测。

从上述结果分析可知,仅采用 HBV-DNA 和 HBV-M 监测病毒复制、观察疗效、判定停药时机存在一定的局限性,如将有反式激活作用、对肝细胞直接产生毒性作用的 HBV-LP 联合检测则更科学合理,具有非常重要的实用价值。

参考文献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011,4(1):1-13.

[2] 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]. Virol-ogy, 2005,332(1):216-224.

[3] 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):543-544.

[4] 周咏梅,游节根,乐爱萍,等. 乙型肝炎病毒大蛋白在 HBeAg 阴性 HBV 感染者中的检测意义[J]. 临床实用医学, 2008,9(12):22-24.

[5] 陈凯杰,钟琼,袁汉尧,等. 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):658-659.

[6] 陈晓明,杨美芳,薛寒,等. 乙型肝炎病毒大蛋白和 DNA 在抗病毒治疗中的变化[J]. 中华传染病杂志, 2007,25(7):487-489.

[7] Ocamo P, Opio CK, Lee WM. Hepatitis B virus infection: Current status[J]. Am J Med, 2005,118(12):1413.

(收稿日期:2011-11-15)

(上接第 645 页)

胞因体积较大被推到尾部末梢,还可能与仪器细胞分类和人工分类时计数的细胞数不同以及分析技术与手段不够完善等因素有关^[7]。该仪器对异常细胞的检出能力强,有利于大量常规样本的过筛,大大降低了工作人员的劳动强度。

总体来看,BC-5300 的精密度、携带污染率、线性等主要性能能够达到要求,与已知性能的血细胞分析仪相关性好,因此该仪器是一款实用、快速、可靠、理想的血细胞分析仪。

参考文献

[1] International Council for Standardization in Hematology. Guidelines for the evaluation of blood cell analyzer including those used for differential leukocyte and reticulocyte counting and cell marker application[J]. Clin Lab Hematol, 1994,2:157-174.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006:123.

[3] Waiters J, Patricia G. Performance evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer [J]. Lab Hematol, 2000,6:83-92.

[4] Nakul AD, Sudaka SL, Ferrero VC, et al. Evaluation of the Sysmex Xe-2100 hematology analyzer in hospital use [J]. Clin Lab Anal, 2003,17:113-123.

[5] Lehto T, Hedberg P. Performance evaluation of Abbott CELL-DYN Ruby for routine use [J]. Lab Hematol, 2008,30:400-407.

[6] Ruzicka K, Veitl M. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2001,125(3):391.

[7] 彭黎明,府伟灵,高行军. Sysmex SE-9000 全自动血细胞分析仪性能的评价[J]. 临床检验杂志, 2004,22(5):396-397.

(收稿日期:2011-10-05)