

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.17.007

血清乙型肝炎病毒大蛋白对乙型肝炎病毒感染者的检测意义

高嫣妮,李筱莉,崔兆磊,陈岩松,叶倩,陈燕[△]

(福建省肿瘤医院检验科/福建医科大学附属肿瘤医院检验科/福建省肿瘤生物治疗重点实验室,福州 350014)

摘要:目的 检测乙型肝炎病毒(HBV)感染者的乙型肝炎病毒大蛋白(HBV-LP)表达,分析其与 HBV-DNA、HBV-M、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甲胎蛋白(AFP)的相关性。方法 选取 283 例 HBV 感染者(HBsAg 阳性)作为观察组,同时选取 60 例健康体检者作为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测 HBV-LP 水平、HBV 两对半指标;使用荧光定量(PCR)法检测 HBV-DNA;应用化学发光法检测 AFP、ALT、AST。结果 283 例观察组患者 HBV-LP 阳性 200 例(70.7%),HBV-DNA 阳性 160 例(56.5%),HBV-LP 和 HBV-DNA 总检出率为 79.9%(226/283);HBV-DNA 中等程度复制组和高复制组 HBV-LP 表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。37 例大三阳患者 HBV-LP、HBV-DNA 检出率分别为 100.0%和 91.9%,差异无统计学意义($P=0.240$);219 例小三阳患者 HBV-LP、HBV-DNA 检出率分别为 66.2%和 50.2%,差异有统计学意义($P=0.001$)。HBeAg、HBeAb 阴性患者 HBV-LP 与 HBV-DNA 检出率差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。相关性分析显示,HBV-LP 表达与 HBV-DNA 含量呈正相关($r=0.464$, $P=0.000$)。HBV-LP 阳性患者 ALT、AST、AFP 水平高于 HBV-LP 阴性患者(均 $P<0.05$)。结论 HBV-LP 可很好地反映 HBV 感染患者病毒复制、肝细胞损伤、疗效监测。

关键词:乙型肝炎病毒大蛋白; 乙型肝炎病毒感染; DNA

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)17-2547-04

The clinical utility of serum HBV-LP testing in patients with HBV infectionGAO Yanni, LI Xiaoli, CUI Zhaolei, CHEN Yansong, YE Qian, CHEN Yan[△]

(Department of Clinical Laboratory/Fujian Cancer Hospital, Affiliated Tumor Hospital of Fujian Medical University/Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Fuzhou, Fujian 350014, China)

Abstract: Objective To detect the expression levels of HBV-LP in patients with chronic hepatitis and investigate associations between HBV-LP and HBV-DNA, HBV-M, ALT, AST and AFP. **Methods** A total of 283 HBsAg positive patients with chronic hepatitis were included, and another 60 healthy individuals were utilized as paired controls. Levels of serum HBV-LP were detected by ELISA, and that for HBV-DNA were determined by real time PCR. Status of AFP, ALT, and AST levels as well as HBV cassette was measured by chemiluminescence analysis. Associations between HBV-LP and HBV-DNA, HBV-M, ALT, AST and AFP were assessed by Spearman's correlation test. **Results** HBV-LP and HBV-DNA positive cases respectively account for 70.7% (200/283) and 56.5% (160/283) of all included patients, corresponding to a total positive detection rate of 79.9% (226/283). Significant differences were observed between HBV-Moderate copy group and high copy group ($P<0.05$). The positive detection rate of HBV-LP and HBV-DNA were 100.0% and 91.9% respectively, among all 37 HBsAg, HBeAg and HBeAb positive cases, with no statistical differences between groups ($P=0.240$). Another 219 HBsAg, HBeAb and HBeAb positive cases revealed a positive detection rate of 66.2% in HBV-LP test, which is higher than that in HBV-DNA test (50.2%, $P=0.001$). The positive detection rate of HBV-LP and HBV-DNA were substantially different among HBeAg and HBeAb negative cases ($P<0.05$). Spearman's correlation test showed that HBV-LP levels were positively correlated to HBV-DNA copies ($r=0.464$, $P=0.000$). The levels of ALT, AST and AFP in HBV-LP positive cases were higher than that in HBV-LP negative cases ($P<0.05$). **Conclusion** Serum HBV-LP testing is an important parameter in monitoring HBV replication and prognosis, and could be utilized as promising indicator in surveillance of the outcomes of antiviral treatment in Hepatitis B.

Key words: HBV-LP; HBV infection; HBV-DNA

乙型肝炎病毒(HBV)感染在我国属于危害较重的传染性疾病之一。用传统“两对半”指标的 HBsAg 和 HBeAg 不能充分反映 HBV 病毒感染及其疗效,存在很大的局限性。HBeAg 阴性的活动期肝炎患者越来越多,部分 HBeAg 阴性患者病毒仍大量复制,目前认为可能是免疫清除不全或 HBV 前 C 区末端发生变异而引起,该类常为慢性乙型肝炎患者,更易发生肝硬化及肝癌,预后较差^[1-2]。由于 HBV-DNA 早于 HBV 其他血清标志物出现,因此 HBV-DNA 阳性常被临床认为是判断 HBV 复制及感染的金标准。但 HBV-DNA 并不能完全反映静息期肝细胞 HBV 复制情况,且 HBV-DNA 检测成本高、技术难度大、操作复杂、影响因素较多,质量控制严格,故其检测难以广泛普及。现对 HBV 感染者进行血清乙型肝炎病毒大蛋白(HBV-LP)、HBV-DNA、HBV-M 及肝功能等指标检测,分析与其他指标的相关性,探讨 HBV-LP 用于 HBV 感染者 HBV 复制程度和疗效监测的可靠性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 7 月至 2016 年 12 月福建省肿瘤医院收治的 283 例 HBV 感染者作为观察组,诊断标准符合第十次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》中乙型肝炎病原学诊断标准。其中男 179 例,女 104 例,平均年龄(50.4±13.1)岁。选取同期 60 例健康体检者作为对照组。2 组研究对象留取血清标本 4 mL, -80℃ 冻存备用。本研究获得福建省肿瘤医院伦理委员会的批准和受检者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 HBV-LP 酶联免疫吸附试验(ELISA)定量检测试剂盒(北京热景生物技术有限公司),HBV-DNA 检测试剂盒(广州中山达安基因有限公司)。ABI7500 实时荧光定量 PCR 分析仪,安图酶标仪;HBV-M 检测试剂盒(英科新创科技有限公司),帝肯酶免自动分析仪;肝功能检测试剂盒(贝克曼库尔特有限公司),罗氏 P800 生化分析仪。所用试剂均在其有效期内。

1.3 方法 HBV-M、HBV-LP 测定均采用 ELISA 法,阳性判断标准:HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBV-LP 为 S/CO≥1 为阳性;HBeAb、HBcAb 为 S/CO≤1 为阳性。HBV-DNA 定量测定采用荧光定量(PCR)法,其含量≥500 copy 为阳性。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甲胎蛋白(AFP)采用化学发光法;实验所有操作均严格按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 *t* 检验,方差不齐时采用非参数检验,计数资料以例数或百分

率表示,两样本间率的比较应用 χ^2 检验,HBV-DNA 含量与 HBV-LP 的相关性采用 Spearman 相关分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组研究对象 HBV-LP 与 HBV-DNA 检出率结果比较 观察组 HBV-LP 检出率为 70.7% (200/283),HBV-DNA 检出率为 56.5% (160/283),HBV-LP 和 HBV-DNA 总检出率为 79.9% (226/283),而 HBeAg 检出率仅为 15.5% (44/283)。血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 的阳性符合率为 47.3% (134/283),阴性符合率为 20.1% (57/283),总符合率为 67.5% (191/283)。对照组血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 的检出率均为 0。

2.2 观察组 HBV-LP 与 HBV-DNA、肝功能指标的相关性 HBV-LP 各孔(S/CO)值与 HBV-DNA 含量(*r*=0.464, *P*=0.000)及 HBV-DNA 拷贝数均呈正相关(*r*=0.402, *P*=0.000)。HBV-LP 阳性患者的 ALT、AST、AFP 水平均高于 HBV-LP 阴性患者(均 *P*<0.05)。Spearman 相关分析显示,HBV-LP 与 ALT、AST、AFP 含量均呈正相关(*P*<0.05)。HBV-DNA 中等程度复制组($10^3 \sim 10^6$ copy/mL)和高复制组($\geq 10^6$ copy/mL)之间,HBV-LP 表达量差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1 和图 1、2。

表 1 HBV-DNA 含量与 HBV-LP(S/CO)值的相关性

HBV-DNA(copy/mL)	例数(<i>n</i>)	HBV-LP(S/CO)平均值
$10^1 \sim 10^3$	141	6.59
$10^3 \sim 10^4$	50	8.73
$10^4 \sim 10^5$	32	8.99
$10^5 \sim 10^6$	26	9.11
$10^6 \sim 10^7$	11	18.50
$10^7 \sim 10^8$	17	25.40
$>10^8$	6	30.91

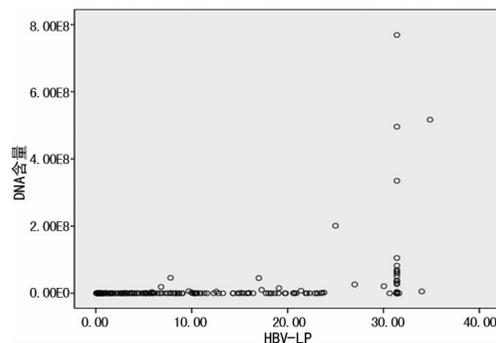


图 1 HBV-DNA 含量与 HBV-LP 的相关性

2.3 不同模式的 HBV-LP 和 HBV-DNA 检出率结果比较

2.3.1 “两对半”常见模式的 HBV-LP 和 HBV-DNA

检测结果比较 37 例大三阳(HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性)患者的 HBV-LP 检出率为 100.0%(37/37),而 HBV-DNA 检出率为 91.9%(34/37),两者比较差异无统计学意义($P=0.240$)。219 例小三阳(HBsAg、HBeAb、HBcAb 均阳性)患者的 HBV-LP 检出率为 66.2%(145/219),HBV-DNA 检出率为 50.2%(110/219),两者比较差异有统计学意义($\chi^2=11.498, P=0.001$) (其他“两对半”模式数量较少,未作统计)。见表 2。

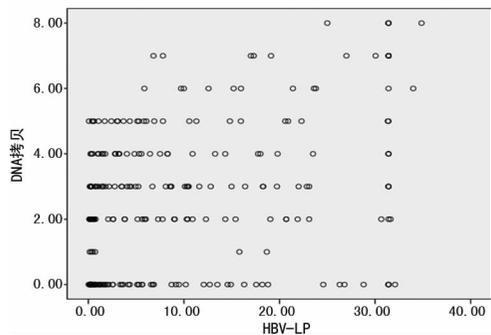


图 2 HBV-DNA 拷贝数与 HBV-LP 的相关性

表 2 “两对半”常见模式 HBV-LP 与 HBV-DNA 检出率结果比较 [% (n/n)]

类别	例数(n)	HBV-LP 检出率	HBV-DNA 检出率	P
大三阳	37	100.0(37/37)	91.9(34/37)	0.240
小三阳	219	66.2(145/219)	50.2(110/219)	0.001

2.3.2 HBeAg 与 HBeAb 阳性和阴性患者 HBV-LP 及 HBV-DNA 检出率结果比较 44 例 HBeAg 阳性患者 HBV-LP 和 HBV-DNA 的检出率比较,差异无统计学意义($P=0.241$),阳性符合率达 93.2%。239 例 HBeAg 阴性患者的 HBV-LP 和 HBV-DNA 检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.722, P=0.001$),阳性符合率为 38.9%(93/239)。HBeAg 阴性但 HBV-DNA 阳性患者的 HBV-LP 阳性率为 78.2%(93/119),HBeAg 阴性患者有 59.6%(93/156)为 HBV-LP 阳性而 HBV-DNA 阴性。226 例 HBeAb 阳性的 HBV 感染者 HBV-LP 和 HBV-DNA 检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.248, P=0.001$)。57 例 HBeAb 阴性的 HBV 感染者 HBV-LP 和 HBV-DNA 检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.363, P=0.243$)。见表 3。

表 3 不同血清标志物模式的 HBV-LP 与 HBV-DNA 检出率结果比较 [% (n/n)]

类别	例数(n)	HBV-LP 检出率	HBV-DNA 检出率	P
HBeAg(+)	44	100.0(44/44)	93.2(41/44)	0.241
HBeAg(-)	219	66.2(145/219)	50.2(110/219)	0.001
HBeAb(+)	226	67.3(152/226)	51.8(117/226)	0.001
HBeAb(-)	57	84.2(48/57)	75.4(43/57)	0.243

3 讨 论

HBV-LP 是 HBV 病毒的包膜蛋白,空间上具有 2 种不同跨膜结构,其外侧能与易感细胞受体结合,内侧能与 HBV 核壳体膜结合。HBV-LP 包括表面抗原和前 S 蛋白,PreS1 蛋白和 PreS2 蛋白是 HBV Dane 氏颗粒和亚病毒颗粒的主要包膜。HBV 病毒感染、复制、预后过程中,HBV-LP 起着至关重要的作用^[2-3]。

本研究结果表明,HBV-LP 在 HBV 感染血清中较 HBV-DNA、HBeAg 更敏感,HBV-LP 检出率显著高于 HBV-DNA、HBeAg。ELISA 法检测 HBV-LP 相对表达量与 HBV-DNA 含量及拷贝数之间均存在良好的正相关性,提示 HBV-LP 表达与病毒的复制密切相关。本研究 26 例 HBV-LP 阴性而 HBV-DNA 阳性标本,可能与 PCR 技术的高灵敏度有关^[4]。还有 66 例 HBV-DNA 阴性而 HBV-LP 阳性标本,与 HBV-LP 的生物学机制密切相关。原因如下,(1) HBV-LP 具有双重跨膜拓扑结构:HBV-LP 较早释放进入血液,感染早期可作为受体蛋白与细胞受体结合介导病毒粒子的细胞内摄入;在感染中后期则明显增加参与病毒粒子的组装和分泌;其前 S 区的拓扑结构还可反式激活细胞内病毒的复制等^[5-7]。(2) HBV-LP 存在超量表达:有研究以鸭乙型肝炎为模型证实亚病毒颗粒能够反式激活病毒,使病毒复制重新激活,能显著增强细胞内的病毒复制和基因表达^[8]。这种增强作用提示 HBV 的血清感染性不仅依赖于感染性病毒 Dane 颗粒的数量,还与富含 HBV-LP 的亚病毒颗粒的数目紧密相关。(3) 单抗特异识别检测 HBV-LP:机体免疫压力和药物压力等因素,使 HBV 基因组的前 C 区和核心启动子变异频繁,HBeAg 转阴但病毒仍然复制,因此 HBeAg 阴性的乙型肝炎感染流行率呈不断升高趋势;而已设计好的商品化 PCR 引物有一定的漏检率;然而本研究使用包被针对立体构象型表位的单克隆抗体检测 HBV-LP,受基因变异的影响较少。(4) HBV-LP 消失晚于 HBV-DNA^[9]:HBV-LP 反式激活作用与 cccDNA 再复制密切相关。由于抗病毒药物(如核苷类)只能抑制肝脏内病毒 cccDNA 的复制,而不可抑制已形成的病毒表达蛋白,不能减少前基因组 RNA 及 mRNA,即以病毒 DNA 为模板的转录和病毒蛋白的翻译表达不受影响,病毒在一段时间内持续分泌不含 DNA 的空粒。同时外周血中有亚病毒粒数目约为 Dane 粒的 1 万倍,故 HBV-LP 消除需要一定的半衰期,减退比 HBV-DNA 晚。对该类患者,肝脏 cccDNA 的降低程度远低于血清中 HBV-DNA 降低水平,肝脏 cccDNA 仍然较多存在,临床出现抗病毒治疗后患者 HBV-DNA 已阴转、HBeAg 发生血清转换,而 HBV-LP 仍在一段时间内存在。

本研究结果显示,HBsAg 阴性而 HBsAb 阳性患者 HBV-LP 与 HBV-DNA 检出率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且不同 HBV-M 模式下,HBV-DNA 和 HBV-LP 的检出率不同。分析 2 种常见“两对半”模式,由于本研究肝癌或肝硬化患者较多,因此小三阳居多。小三阳患者 HBV-DNA 与 HBV-LP 检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),小三阳 HBV 感染者检测 HBV-LP,能更准确地判断患者 HBV 复制情况。本研究结果显示,HBV-LP 在对照组血清中未能检测到,提示只有 HBV 携带者或 HBV 患者才能检测到 HBV-LP。另外,本研究通过对所选标本的肝功能分析发现,HBV-LP 阳性患者的 ALT、AST 水平高于 HBV-LP 阴性患者,由于 ALT 及 AST 是反映肝细胞损伤极为灵敏的指标,HBV-LP 与 ALT、AST、AFP 含量均呈正相关关系,提示 HBV-LP 表达与肝细胞损伤有关,可能与直接的肝细胞毒性及 HBV 的活动性相关。

HBV-LP 阴性或许可作为抗病毒治疗终点的辅助指标之一,对指导临床治疗具有较高的应用价值。GRIPON 等^[10]研究发现,源于大蛋白的乙酰化肽段能使肝细胞表面的受体失活,切断病毒感染其他肝细胞的途径。只有当血清 HBV-DNA 和 HBV-LP 均检测不到时,说明病毒核酸复制、外膜蛋白的表达均处于停止状态,提示抗病毒治疗达到较为理想的目标,可较好地避免 HBV-DNA 病毒变异阴转之后,造成漏检,导致患者病情出现反复^[11-12]。有研究表明,HBV 感染肝细胞合成的大蛋白数量远超过病毒形态发生所需数量,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),其在细胞内积累可导致肝细胞液泡化和细胞凋亡^[13]。提示 HBV-LP 含量的连续检测有利于对慢性 HBV 预后的监测,防止或延缓肝硬化或肝癌的发生与发展。

综上所述,由于 HBV-LP 是导致肝脏细胞损伤、病变及死亡的主要原因之一,且能反式激活 HBV 病毒,促进其复制,因此 HBV-LP 是能够很好地反映患者的病毒复制、肝细胞损伤、疾病进程、疗效与预后判断的新的灵敏监测指标。HBV-LP 采用 ELISA 法检测比 HBV-DNA 采用 PCR 定量检测的实验室环境和条件要求均低,其检测简单、快速,可作为“两对半”检测的补充,特别适合各级医院、各类人群作为常规检查项目。当然,考虑到各项指标并非完全一致,HBV-LP 与 HBV-DNA、乙型肝炎“两对半”和肝功能联合检测,将会更全面地反映 HBV 感染患者血清的病毒复制及感染状态,对患者的抗病毒治疗,以及临床疗效、预后观察具有指导性作用,促进患者 HBV 清

除和慢性肝性疾病康复。

参考文献

- [1] 王宇,杨延敏.乙型肝炎患者检测乙肝表面抗原大蛋白和前 S1 抗原的区别和临床意义[J].大连医科大学学报,2010,32(6):706-708.
- [2] 张苏贞,张杰,余算,等.血清乙肝病毒大蛋白与乙肝前 S1 抗原联合检测在 HBsAg 阴性乙肝患者诊断中的意义[J].中国微生态学杂志,2017,29(8):935-938.
- [3] WANG N Y,ZHANG D,ZHAO W,et al.Hepatitis B Virus large surface protein as a candidate biomarker for evaluating hepatitis B Virus infection[J].Chin Biochem,2011,44(14):1199-1204.
- [4] HU X B,YUE Q H,ZHANG X Q,et al.Hepatitis B virus genotypes and evolutionary profiles from blood donors from the northwest region of China[J].Virol J,2009,6(1):199-205.
- [5] SCHULZE A,SCHIECK A,NI Y I,et al.Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction[J].J Virol,2010,84(4):1989-2000.
- [6] SCHULZE A,GRIPON P,URBAN S.Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans[J].Hepatology,2007,46(6):1759-1768.
- [7] PATIENT R,HOUIROUX C,SIZARET P Y,et al.Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking[J].J Virol,2007,81(8):3842-3851.
- [8] 游选旺.乙肝病毒大蛋白用于抗病毒治疗效果监测的临床意义[J].实验与检验医学,2011,29(2):165-166.
- [9] 陈晓明,杨美芳,薛寒,等.乙型肝炎病毒大蛋白和 DNA 在抗病毒治疗过程中的变化[J].中华传染病杂志,2007,25(7):405-407.
- [10] GRIPON P,CANNIE I,URBAN S.Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein[J].J Virol,2005,79(3):1613-1622.
- [11] 杨柳,宋红丽.乙肝病毒感染慢性化与相关免疫细胞[J].实用医学杂志,2016,32(6):1022-1024.
- [12] 刘键,蒋英,吴正林,等.乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒外膜大蛋白 LHBs 的检测分析[J].实用预防医学,2014,21(5):607-609.
- [13] FOO N C,AHN B Y,MA X H,et al.Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein[J].Hepatology,2002,36(6):1400-1407.