

Microbiol, 2009, 47(4): 959-968.

[8] Zhong Q, Shao SH, Cui LL, et al. Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*; a new insight into pathogenicity[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(23): 2138-2142.

[9] Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo[J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 632-639.

[10] Kim KK, Kim HB. Protein interaction network related to *Helicobacter pylori* infection response[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(36): 4518-4528.

[11] Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits β 1 integrin in a novel RGD-Independent manner[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(12): 1-14.

[12] Snider JL, Allison C, Bellaire BH, et al. The β 1 integrin activates JNK independent of CagA, and JNK activation is required for *Helicobacter pylori* CagA⁺-induced motility of gastric cancer cells

[J]. J Biol Chem, 2008, 283(20): 13952-13963.

[13] Ogden SR, Wroblewski LE, Weydig C, et al. p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(10): 4110-4121.

[14] Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(1): 1-16.

[15] Xiao WM, Ding YB, Shi RH, et al. Correlation of *Helicobacter pylori* infection with the expression of COX-2 and EGFR and VEGF in human gastric carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2008, 30(9): 668-671.

[16] Wiedemann T, Loell E, Mueller S, et al. *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils[J]. PLoS ONE, 2009, 4(3): 1-13.

(收稿日期: 2010-05-04)

• 综 述 •

乙型肝炎病毒外膜大蛋白

谢国强, 邵耀明 综述, 徐 苗 审校

(江苏省无锡市人民医院检验科 214023)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 外膜大蛋白; 研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 02. 041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0225-03

随着人们对乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)认识的深入,在预防、诊断和治疗方面的突破,若仍延用传统的常规诊断方法(如乙肝三系和 HBV-DNA 检测)已不能全面、真实、快速地反映乙肝病毒在患者体内感染状况以及抗病毒治疗的效果。近年来随着对乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP)在乙型肝炎发病机制、感染与病毒复制等方面的探究,研究者们逐渐认识到 HBV-LP 具有越来越重要的临床意义,如 Pre-S1 抗原能够反映 HBV 的复制情况,可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,并用于制备重组乙肝疫苗等^[1]。目前我国关于 HBV-LP 的报道还很少,本文将就其研究进展和临床应用作一概述。

1 HBV-LP 的结构-双重拓扑结构

乙型肝炎病毒为嗜肝 DNA 病毒,含有 3 200 个核苷酸,4 个开放读码框架,可编码 6 种蛋白,其中由 S 基因编码了 3 种外膜蛋白,即主蛋白(即 HBsAg)、中蛋白(HBsAg 和 Pre-S2 蛋白)和大蛋白(HBsAg、Pre-S1 蛋白和 Pre-S2 蛋白)。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^[2]。乙肝病毒感染人体后,在血清中主要存在三种形式:即大球形颗粒(Dane 颗粒)、小球形颗粒和管形颗粒。前 S1 抗原、前 S2 抗原只在 Dane 颗粒上表达,前 S1 抗原由 108~110 个氨基酸残基组成,其 21~47 位氨基酸为肝细胞膜受体。前 S2 抗原含有 55 个氨基酸残基,其 C 端与表面抗原 N 端相连,N 端 109~133 位氨基酸为聚令人血清蛋白受体。

在病毒粒子成熟过程中,大蛋白 preS 结构域停留在内质网膜的胞质面,通过 S 结构域的 II 型信号和疏水 C 端跨过内质网膜,大约有一半的大蛋白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^[3]。

2 HBV-LP 是 HBV 一个转录激活子

HBV 表面抗原基因由一个单独的 ORF 组成。该 ORF 被分割成三个分别起始于三个同框 ATG 密码子的编码区 PreS1、PreS2、S,相应的蛋白结构域分别为 PreS1、PreS2 和 S,由 ATG 翻译合成的三个 HBV 表面蛋白都是组成膜蛋白的成分。最近的研究工作显示,HBV-LP 的 PreS1-PreS2 定位于细胞质而不是在翻译时通过转移跨过内质网膜^[4-6],该定位使得 PreS2 aa4 的糖基化位点不能与糖基转移酶靠近。在病毒颗粒中,有一部分的 HBV-LP 的 PreS1-PreS2 出现在病毒表面。

另有报道称乙型肝炎病毒 C 端截短的中表面蛋白(MH-Bst)能作为转录激活子起作用,该功能依赖于 MHBst N 端 PreS2 结构域的胞质定位。在野生型 MHBs 中,PreS2 结构域在翻译时转移至内质网(ER)腔。最近也有报道显示,HBV-LP 的 PreS2 结构域在翻译完成后先停留在 ER 膜的胞质面,那么,HBV-LP 是否与 MHBst 具一样的转录激活功能? Eberhard 等研究发现,与 MHBst 相似,HBV-LP 也能激活一系列启动子元件。另有证据表明 HBV-LP 能依赖 PKC 活化 AP-1 和 NF- κ B,PKC 下游的 c-Raf-1 激酶的功能是 AP-1 和 NF- κ B 依赖 HBV-LP 活化的先决条件,因为对 c-Raf-1 激酶的抑制能消除 AP-1 和 NF- κ B 的 HBV-LP-依赖的转录水平的活化。

相关研究还证明了 HBV-LP 确实是一个转录激活因子,并且与 HBV-LP 依赖的转录活化和 MHBst 依赖的转录激活一样,由 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2-激酶信号转导途径的活化所介导。

3 HBV-LP 在乙肝病毒形成中的作用

乙肝病毒核衣壳的形成依靠 HBV-LP,HBV-LP 作为一个跨膜多肽存在于内质网膜中^[7]。之前的研究表明,HBV-LP 的

N 末端 Pre-S 区域长 174 个氨基酸,可是一直截短其到 103 位也不会影响病毒粒子的形成^[8],然而进一步的截短将改变 HBV-LP 的跨膜拓扑结构,并且难以形成病毒粒子。这部分主要是位于 98 位的天门冬酰胺到 125 位的苏氨酸的 4 个突变体。相对照,另外 7 个在 124 位丝氨酸下游的突变体能够包膜化病毒粒子并且分泌乙肝病毒,在不同的乙肝分离株中,103 位的精氨酸到 124 位的丝氨酸序列是十分保守的,当 Pre-S 暴露于胞质 C 末端,这个保守区域的丙氨酸由于点突变会阻止病毒粒子的形成,而突变的别的非保守区域的残基则不会产生这种效果。

这些结果表明,Pre-S 区域可以被分为两个亚结构域。Pre-S 的 N 末端区域为病毒受体的配体^[9]。这个作用已经被病毒颗粒的蛋白 L 的 Pre-S 区域暴露在衣壳外所证实。在 103 位精氨酸和 124 位丝氨酸的 C 末端部分起到了对病毒粒子形成的关键性作用。

4 HBV-LP 在乙肝病毒复制中的作用

研究发现,HBV-LP 在病毒进入肝细胞时作为受体蛋白起作用,在病毒组装时,则是基质类似蛋白,同时还行使调节功能。而且这种多功能性依赖于 HBV-LP 前 S 区独特的双重拓扑结构。Bruns 等^[10]通过鸭肝模型研究发现,含有嗜肝病毒血清的感染性不仅依赖于具有感染性的 Dane 颗粒的多少,而且还依赖于缺乏核酸、富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量,后者主要包括管状颗粒和小球形颗粒,这些颗粒具有反式激活作用,能显著增强细胞内的病毒复制和基因表达^[11-12]。亚病毒颗粒能够反式激活病毒,使病毒复制激活^[7]。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。

HBV-LP 对 HBV 复制过程具有反式激活作用,并与病毒颗粒从细胞内释放,调节有关 HBV-LP 存在于感染性颗粒(Dane 颗粒)和亚病毒管状颗粒上,是病毒形成完整外膜的重要标志,与血清 HBV-DNA 拷贝数具有良好的相关性,能反映患者机体内乙肝病毒复制情况。

5 HBV-LP 检测与临床意义

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。与此同时,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^[13],特别是自 Bruns 等通过研究鸭乙肝病毒证明了 HBV-LP 的存在之后,越来越多的专家学者通过不同的实验相继证明了这一观点。因此检测 HBV-LP 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^[14],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^[15],导致 Pre-S1 抗原的检出率较低,不能很好的反映 HBV 的复制情况。王永忠等^[16]通过对 289 例 HBV-DNA 阳性标本进行 HBeAg 和 HBV-LP 的检测结果显示,HBV-LP 阳性率 87.2%,明显高于 HBeAg 阳性率 50.2% ($P < 0.01$),显然在判断病毒复制和传染性方面,HBV-LP 比 HBeAg 具有明显的优势,在不具备 HBV-DNA 检测条件的基层医院,HBV-LP 可以用于作判断有无病毒复制的血清学指标。

魏红山等^[17]的研究也表明,在 HBeAg 阴性慢性乙肝患者血清中 HBV-LP 与 HBV DNA 具有良好的符合率,该研究中

213 位 HBV-DNA 阳性患者仅 40.4% 为 HBeAg 阳性,而 HBV-LP 阳性率达到 81.7%,而且在 275 份标本中 HBV-LP 和 HBV-DNA 的阳性率差异无统计学意义,HBV-LP 的 A 值与 HBV-DNA 拷贝数呈良好的正相关性($r^2 = 0.910$)。表明 HBV-LP 对于判定乙肝患者体内病毒复制水平优于 HBeAg,与 HBV-DNA 具有相似的临床价值。

此外,黎广益等^[18]采用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法和荧光定量 PCR 方法对 HBV-DNA 对 HBV-LP 进行检测,通过对 31 位经拉米夫定抗病毒治疗患者的研究,证明了在拉米夫定抗病毒治疗过程中动态检测 HBV-LP 可用于评估抗病毒治疗效果。

目前临床抗病毒治疗过程中,在 HBV-DNA 阴转后通常会继续用药以防止病情反复,由于乙型肝炎病毒大蛋白晚于 HBV-DNA 的阴转,并具有反式激活病毒复制能力,因此在监测病毒复制和观察治疗效果上具有重要的临床意义。

6 HBV-LP 研究的发展前景

我国是 HBV 的高流行地区,约 10% 的人口携带 HBV,其中 10%~20% 可发展为肝硬化,肝硬化患者中,HBeAg 阴性者大于 60%,因此对 HBeAg 阴性肝炎患者 HBV 复制程度的评估已成为临床上亟需解决的问题之一。由于 HBV-LP 能更好地反映 HBV 的复制情况,且通过 ELISA 方法检测 HBV-LP 操作简便,各级医疗机构都能开展;同时由于 HBV-DNA 检测相对复杂,需要有专用 PCR 实验室和相关昂贵的定量检测系统,在不具备 PCR 实验条件时,HBV-LP 的检测具有不可低估的临床价值。另外,在已开展 PCR 实验的情况下,联合检测 HBV-LP 又可以作为 HBV-DNA 检测的有益补充。

目前临床抗病毒治疗已经取得了一定效果,拉米夫定是目前治疗慢性乙型肝炎的主要抗病毒药物。但是目前的抗病毒药物不能彻底清除共价闭环状 DNA(cccDNA),HBV-LP 的残留阳性也意味着肝细胞内残留病毒的高复制能力。此外,由于 HBV-LP 具有肝细胞直接毒害性,HBV-LP 持续阳性可致预后不良,因此应用拉米夫定抗病毒治疗效果监测上单独采用 HBV-DNA 指标是不够的,应该增加具有反式激活作用、对肝细胞具有直接毒性的 HBV-LP 的检测。虽然拉米夫定能明显降低 HBV DNA 水平,并促使 ALT 恢复正常,但抗病毒治疗的停药时间很难把握,部分病例按照 2000 年拉米夫定临床应用指导意见^[19]停药后,仍会出现病毒的突发,以 HBV-LP 转阴作为预示抗病毒治疗较为彻底的判断有待于进一步观察。

目前我国在该领域的研究尚处于起步阶段,对 HBV-LP 检测方法的作用及改进、中国人群参考价值范围以及在乙型肝炎病毒防治应用中的评价都是摆在广大检验工作者和临床医生面前的课题。

参考文献

- [1] Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, et al. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(17): 6730-6734.
- [2] Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, et al. Large surface proteins of hepatitis B virus of the virus containing the pre-s sequence[J]. J Virol, 1984, 52(2): 396-402.
- [3] Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis[J]. J Virol, 1995, 69(11): 6652-6657.
- [4] Bruss V, Lu X, Thomssen R, et al. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope

- protein[J]. EMBO J, 1994, 13(10): 2273-2279.
- [5] Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis[J]. EMBO J, 1994, 13: 1048-1057.
- [6] Prange R, Streek G. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins[J]. EMBO J, 1995, 14(2): 247-256.
- [7] Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation[J]. J Virol, 1997, 71(12): 9350-9357.
- [8] Bruss V, Thomssen R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation[J]. J Virol, 1994, 68(3): 1643-1650.
- [9] Ishikawa T, Kuroki K, Lenhoff R, et al. Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the pre-S protein of duck hepatitis B virus[J]. Virology, 1994, 202(2): 1061-1064.
- [10] Hildt E, Saher G, Bruss V, et al. The Hepatitis B Virus Large Surface Protein (LHBs) Is a Transcriptional Activator[J]. Virol, 1996, 225(1): 235-239.
- [11] 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]. Virology, 2005, 332(1): 216-224.
- [12] Bruns M, Miska S, Chassot S, et al. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1462-1468.
- [13] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. Virus Res, 2004, 106(2): 199-209.
- [14] Chen K, Han BG, Ma XK, et al. Establishment and preliminary use of hepatitis B virus preS1/2 antigen assay[J]. World J Gastroenterol, 1999, 5(6): 550-552.
- [15] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 5): 1221-1225.
- [16] 王永忠, 吴国祥, 秦有来, 等. 乙型肝炎病毒外膜大蛋白血清学检测及临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(4): 244-245.
- [17] 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.
- [18] 黎广益, 盛江来, 黄海军. 乙型肝炎病毒大蛋白检测在拉米夫定抗病毒治疗中的应用研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(2): 133-135.
- [19] 王爱霞, 张定凤. 2000 年拉米夫定临床应用指导意见[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(4): 249-250.

(收稿日期: 2010-05-04)

• 综 述 •

悬浮式点阵与肿瘤研究

戎彪学 综述, 杨拴盈[△] 审校

(西安交通大学第二附属医院, 陕西 西安 710004)

关键词: 核酸类; 蛋白质类; 肿瘤; 悬浮式点阵; 液态芯片

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 02. 042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)02-0227-03

生物芯片技术(biochip, BC)融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体, 具有重大的基础研究价值, 又具有明显的产业化前景。悬浮式点阵(suspension array, SA)是生物芯片技术领域又创新, 由于检测过程中分子杂交在悬浮液体中, 故又被称之为液态芯片(liquid chip, LC)。

1 LC 的一般特点

1.1 传统 BC 与 LC 的区别 传统 BC 是指包被在硅片、尼龙膜等固相支持物上的高密度的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类以及其他生物组分的微点阵, 通过检测芯片与标记样品的杂交信号即可实现对生物样品的分析。常见生物芯片主要有基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片等。LC 将激光技术、应用流体力学、高速数字信号处理器和计算机法则整合在一起, 在特制的微球上包被抗体、抗原或核酸探针等, 可同时检测液相中多种成分, 如细胞因子、自身抗体、特定核酸序列等^[1-2]。

1.2 LC 的原理 采用荧光编码技术, 对液相体系中的微球(直径 5.6 μm 聚苯乙烯小球)用不同比例红色分类荧光标记地址, 通过 2 种荧光染料对微球染色, 调节荧光染料的比例可获得 100 种不同颜色的微球, 每种荧光的浓度又分为 10 个等级。将每种颜色的微球交联上针对特定检测物的生物探针(探针通过羧基结合到微球表面), 将编码微球混合后加入微量

待检样本, 悬液中靶分子与微球表面的探针进行特异性结合。以激光流式细胞仪作为分析平台, 当微球通过激光流式仪时, 两束不同波长的激光(635 nm 和 532 nm)对微球颜色进行鉴定, 同时通过靶分子上的报告分子完成定量分析。其检测原理是让单个微球通过检测区域, 再使用不同波长的激光同时对微球探针上的红色分类荧光和报告分子上的绿色标记荧光进行检测, 一束激光激发微球探针上的红色分类荧光, 根据不同的分类荧光信号和荧光浓度等级将微球探针进行分类(寻址), 从而寻找到各个不同的反应分子类型, 另一束激光激发绿色标记荧光, 以微球探针上结合的报告分子标记荧光数量反映微球探针上结合的待测分子的数量^[3]。LC 具有高通量、高敏感性等特点, 与平板式芯片(planar microarrays)相比使用更方便、成本更低、统计学处理更快, 在杂交动力学增速以及阵列准备等方面具有更高的灵活性和可塑性^[4]。以 LC 技术检测 5 637 例血液标本中的 β 地中海贫血常见类型, 发现 132 例携带 β 地中海贫血突变基因, 携带率为 2.34%, 检测结果准确、快速, 且成本较低^[5]。

2 LC 在肿瘤研究中的应用

目前主要通过血液中肿瘤标志物的检测对被检测者作出诊断或疗效及预后判断。普遍使用的放射免疫分析、酶免疫分

[△] 通讯作者, E-mail: yangshuanying66@163.com.