·论　　著·

HBeAg阴性乙型肝炎患者前S1、前C区变异、HBV DNA载量的相关性研究

刘成忠,肖传宇△,侯文华,谢　强

(湖北省枣阳市第一人民医院检验科　441200)

摘　要:目的　探讨HBeAg阴性的乙型肝炎(HBV)感染者前S1抗原阳性与前C区变异发生频率、HBV DNA阳性率之间的关系。**方法**　用荧光定量PCR检测313例HBeAg阴性HBV感染者血清HBV DNA载量,ELISA法检测前S1抗原,测序分析HBV前C区nt1 762～nt1 764位和nt1 896位点基因突变。**结果**　313例血清HBV DNA阳性175例(55.6%),阴性138(44.1%);175例HBV DNA阳性的标本中有155例(88.6%)前S1抗原阳性,138例HBV DNA阴性的标本中前S1抗原阳性33例(23.9%)。HBV DNA与前S1抗原结果比较差异有统计学意义($P<0.001$);总前S1抗原阳性188例,发生nt1 896位变异为160例,nt1 762～nt1 764位变异为117例。前S1抗原阴性的125例中,发生nt1 896位变异为67例,nt1 762～nt1 764位变异为69例。前S1抗原阳性与阴性患者nt 1 896位点变异率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　HBeAg阴性的HBV感染者中,前S1抗原不受前C区变异影响,可更客观地反映HBV复制状态。

关键词:肝炎,乙型;　肝炎病毒,乙型;　肝炎表面抗原,乙型;　突变;　PreS1抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.019　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2011)07-0766-02

Analysis of the relationship of serum PreS1、HBV-DNA and mutation frequency of Pre C in HBV infection patients with negative HBeAg

Liu Chengzhong, Xiao Chuanyu△, Hou Wenhua, Wang Jianwei, Xie Qiang

(*Department of Clinical Laboratory The First People's Hospital of Zaoyang, Hubei* 441200, *China*)

Abstract:Objective　To Analysis of the relationship of serum PreS1、HBV-DNA and mutation frequency of Pre C in HBV infection patients with negative HBeAg. **Methods**　PreS1 and HBeAg were detected by ELISA, and HBV-DNA examined by fluorescence quantitative PCR, mutation of PreC nt1 762～nt1 764 and nt1 896 were analysis by sequencing. **Results**　Among 313 HBeAg(－)patients, the positive of HBV-DNA(＋)was 175(55.6%), HBV-DNA(－)was 138(44.1%). In 175 HBV-DNA(＋)patients, 155(88.6%)patients PreS1 were positive and 33(23.9%) PreS1(＋)in 138 HBV-DNA(－)patients, the difference is significant($P<0.001$); The total positive PreS1-Ag patients were 188, mutation in nt1 896 160 patients and 117 in nt1 762～nt1 764, meanwhile, among 125 PreS1(－)patients, mutation in nt1896 were 67 patients and 69 in nt1 762～nt1 764. The difference of frequency in nt1 896 mutation between positive and negative PreS1-Ag was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion**　In the patients with HBeAg negative, PreS1-Ag is not affected by mutation of Pre-C gene and affect the copy of HBV objectively.

Key words: Hepatitis B;　hepotitis B virus;　hepatitis B surface antigens;　mutation;　PreS1-Ag

HBeAg阴性的慢性乙型肝炎(HBV)已成为HBV感染中一个独立的类型且临床表现复杂。由于HBV前C区基因变异率较高和宿主免疫系统的影响,HBV两对半的检测(尤其是HBeAg)已经不能客观地反映病毒在体内的复制情况。前S1只存在于完整的HBV外壳,含有肝细胞膜受体,介导HBV附着和侵入人体肝细胞,是血清中反映HBV复制的指标之一[1]。有统计表明,在常规检测中,30%～50%的HBeAg阴性感染者前S1蛋白抗原阳性。本组随机收集HBeAg阴性的HBV患者血清,检测血清中HBV DNA载量以及通过测序判断HBV核心启动子(basic core promoter,BCP)nt1 762～nt1 764位和前C区nt1 896位点突变,探讨HBeAg、前S1抗原、HBV前C区基因变异和HBV DNA阳性率之间的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料　2009年3月至2010年4月该院门诊HBeAg阴性的HBV感染者313例。诊断符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会2000年《病毒性肝炎防治方案》的标准。其中男218例,女95例。所有受检者排除HAV、HCV、HDV、HEV及HIV感染,均未经抗病毒治疗。

1.2　研究方法

1.2.1　采用上海科华生物技术有限公司试剂盒,双抗体夹心法检测前S1蛋白,ELISA法检测血清乙型肝炎标志物(HbsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)。

1.2.2　荧光定量PCR检测HBV DNA拷贝数　血清40 μL加入裂解液100 μL(1%SDS,2 mg/mL蛋白酶K)混匀后煮沸10 min,酚/氯仿抽提。采用ABI7300实时荧光定量PCR仪检测,检测试剂由达安基因诊断中心提供。按血清HBV DNA提取,PCR扩增,荧光标记探针杂交,标准DNA建立的直线回归方程计算出待检血清中的HBV DNA水平,以大于1 000 copy/mL为阳性。荧光定量PCR试剂盒购于中山大学达安基因诊断中心,质控物购自卫生部检定所。所有实验过程及结果

△　通讯作者,E-mail:xcy601@163.com。

判断均为自动化,并严格按 Notlte 等提出的防污染措施实施。

1.2.3　PCR 扩增 HBV 前 C 区　常规 PCR 扩增 HBV DNA 前 C 区及 C 基因启动子区。扩增仪器为 Hema 常规扩增仪。序列为 C2-JPN31 株(Geneback 登录号:AB362936.1)。扩增的引物序列为 C3:5′-CAC CTC TGC ACG TCG CAT GG-3′位点,1 592～1 611;C4:5′-GGA AAG AAG TCA GAA GGC AA-3′位点,1 955～1 974。扩增条件为 95 ℃预变性 10 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,循环 40 次,最后 72 ℃延伸 10 min,扩增产物长度 383 bp。

1.2.4　测序　用纯化的 PCR 产物进行 BCP T1762/A1764 和前 C nt1 896 位点突变序列的测定,由上海英骏公司进行。

1.3　统计学处理　采用统计软件 SPSS 11.0 对所有数据进行分析,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　检测结果　在 313 例 HBeAg 阴性 HBV 患者中,HBV DNA 阳性 175 例,占 55.9%,HBV DNA 阴性 138 例,占 44.1%。在 175 例 HBV DNA 阳性患者中,前 S1 抗原阳性 155 例(88.6%)。138 例 HBV DNA 阴性患者中,前 S1 抗原阳性 33 例(23.9%)。HBV DNA 与前 S1 抗原结果比较差异有统计学意义($P<0.001$)。说明两种检测结果有中度一致性。在所有 HBeAg 阴性的 HBV 患者中,前 S1 抗原阳性 188 例,占 60.1%;前 S1 抗原阴性 125 例,占 39.9%。经测序判断前 S1 抗原阳性的 188 例中,发生 nt1 896 位变异为 160 例,nt1 762～nt1 764 位变异为 117 例。前 S1 阴性的 125 例中,发生 nt1 896 位变异为 67 例,nt1 762～nt1 764 位变异为 69 例。前 S1 抗原阳性组与阴性组比较,nt1 762～nt1 764 位变异差异无统计学意义($P>0.05$),但前 C 区 nt1 896 位变异率的差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2　测序结果　313 例乙型肝炎患者血清 HBV DNA 发生 nt1 762～nt1 764 位双突变发生的 186 例。nt1 896 位 G→A 点突变 227 例,与 nt1 762 位 A→T/nt1 764 位 G→A 双突变联合变异 128 例。

3　讨　　论

完整的 HBV 颗粒由外壳蛋白和核心成分组成,胞膜蛋白由前 S1 和前 S2 蛋白组成,其中前 S1 蛋白具有高度的免疫原性,第 21～47 位氨基酸为肝细胞膜的受体。通过受体参与 HBV 的组装、分泌、对肝细胞的侵袭等过程。机体对前 S1 的有效免疫应答可阻止病毒入侵肝细胞并清除肝细胞内 HBV[2]。因此血清前 S1 的水平在一定程度上可直接反映 HBV 活性和在肝细胞内的复制能力。HBeAg 是 HBV 核心抗原的裂解产物,传统上认为血清 HBeAg 阳性转阴,以及转变为抗-HBe 阳性后病毒复制水平降低,病情逐渐缓解,甚至自愈。这种观点并不全面,临床上有些病例因为 HBV 前 C 区变异等因素,改变编码蛋白导致临床上使用 ELISA 法检测 HBV 血清学标志物时无法检测出 HBeAg[3],而体内仍然持续感染,HBV DNA 阳性。

本组 313 例 HBeAg 阴性患者,175 例 HBV DNA 阳性中前 S1 抗原阳性的占 88.6%,前 S1 抗原在诊断乙型肝炎病毒复制与 HBV DNA 方面有较高的一致性,证实这些患者体内的 HBV 确实在复制,与研究相符[4-5]。但值得注意的是,本实验选择的患者都是 HBeAg 阴性 HBV 感染者,前 S1 抗原和 HBV DNA 的一致性并不能表明在临床表现与实际检查的一致性。徐媛媛和吴晓玲[6]研究发现,在 1 258 例 HBV 患者中前 S1 抗原阳性率为 26.4%,而 HBV DNA 则高达 83.4%。按照此观点,前 S1 抗原并不能完全取代金标准 HBV DNA 的检测。同时由于资料的完整性,本组也没有把抗-HBe 纳入考虑的范围,还应考虑到阳转后有无复制的可能。

前 S1 抗原与病毒复制有关,但与 HBeAg 检测表达的意义不完全一致[7-9]。本实验中,HbeAg 阴性而前 S1 抗原阳性患者占总数的 60.1%,这可能与 HBV 前 C 区基因变异有关。在 HBV 基因组中,影响 HBeAg 合成的基因突变主要有前 C 区启动子(nt1 762～nt1 764)、前 C 区终止密码(nt1 896)和信号肽酶裂解位点变异(nt1 862)[10]。比较常见的首先是 nt1 762 位 A→T、nt1 764 位 G→A 双点联合突变,可致前基因组 RNA 3′端茎环结构发生变化,突变产生的 TGAA 序列与 DR1 区的 UUCA 序列互补,生成一个更加稳定的结构模式,促进前基因组 RNA 的逆转录和病毒复制。其次 nt 1 896 位 G/A 替换,使编码色氨酸的密码子 TGG 变为终止密码子 TAG,导致 HBeAg 不能表达[11]。

本组 188 例 HBeAg 阴性的前 S1 抗原阳性患者中,有 160 例(85.1%)G1896A 变异,而 125 例前 S1 抗原阴性患者中该变异有 67 例(53.6%),两组变异率比较差异有统计学意义,与刘彦华和倪旭[12]研究相符。G1896A 变异在 HBeAg 阴性的 HBV 感染者中的发生率高达 85.1%,提示该位点的变异与病毒在体内持续复制密切相关。G1896A 位点变异导致 HBeAg 合成终止,帮助 HBV 逃避宿主免疫攻击,在体内长期存在。这也可以解释部分 HBV 感染者 HBeAg 转阴性,而前 S1 抗原持续表达。但是,前 C 区启动子(nt1 762～nt1 764)突变对前 S1 抗原阳性率的影响差异无统计学意义($P>0.05$)。这也提示,不是所有的前 C 区突变都能解释 HBeAg 阴性而 HBV 持续感染,宿主的免疫功能可能也是参考的另一个方面。

综上所述,前 S1 抗原能在一定程度上反映 HBV 的复制状态、宿主的体液免疫功能和病情转归。尤其是在 HBeAg 阴性的 HBV 持续感染者中,考虑病毒本身变异对检测指标的影响,综合判断可为疾病的诊断和预后判断提供更准确的依据。

参考文献

[1] Kramvis A,Kew MC,Bukofzer S. Hepatitis B virus precore mutants in serum and liver of Southern African Blacks with hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,1998,28(1):132-141.

[2] 洪远,朱海燕,陆洪兵. 前 S1 抗原在乙型肝炎临床诊断中的意义和应用[J]. 华北煤炭医学院学报,2006,8(1):31-32.

[3] 李宏杰,杨茜,程家坤,等. ELISA 共系统检测 HBeAg 与抗-HBe 结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):279.

[4] 陈作芬,曹永平,江培学. 乙型肝炎病毒第 1 896 位点变异与基因分型同肝脏功能的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(7):681.

[5] 管彩霞. 766 例 e 抗原阴性慢性乙型肝炎病毒前 S1 抗原与 HBV DNA 结果分析[J]. 临床医药实践,2010,19(2):131-132.

[6] 徐媛媛,吴晓玲. 乙型肝炎前 S1 抗原、HBV DNA、HBeAg 的相关性分析及临床应用[J]. 实用肝脏病杂志,2009,12(2):63-65.

[7] 血清中前 S1 及 HBV DNA 含量对乙型肝炎病毒复制的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2009,30 (8):232-234.(下转第 769 页)

2.2　糖尿病患者组与健康对照组细胞免疫功能的结果比较　糖尿病患者组与健康对照组比较，其 CD3、CD4、CD4/CD8 比值、B 淋巴细胞、NK 细胞均显著降低，见表 2。

2.3　糖尿病患者组与健康对照组红细胞黏附功能比较　糖尿病患者组红细胞黏附功能明显降低，与健康对照组比较差异有统计学意义，见表 3。

表 3　糖尿病患者组与健康对照组红细胞黏附功能比较($\bar{x}\pm s$，%)

组别	例数(n)	红细胞免疫复合物花环率
健康对照组	100	8.5±3.2
糖尿病患者组	100	6.5±2.1*

*：$P<0.01$，与健康对照组比较。

3　讨　　论

机体的免疫状态是抵御外来感染的关键，本研究表明糖尿病患者组较健康对照组 IgG 有明显的降低，提示糖尿病患者免疫功能发生改变，这可能是由于患者长期处于高血糖状态下，血细胞的趋化性、吞噬作用及杀菌能力降低，导致免疫力下降，易并发感染或是感染扩散[1]。糖尿病患者 IgA 有明显的升高，可能是糖尿病患者由于黏膜长期处于亚临床感染状态而存在黏膜局部免疫系统的增强或者是一种代偿性增高而致[2]。而糖尿病患者 IgM 水平与健康对照组相比几乎无变化，且糖尿病患者血清免疫球蛋白水平明显下降，可能是长期高糖状态下多形核白细胞和 B 淋巴细胞功能受损，导致患者应激能力相对减弱，血清免疫球蛋白水平失衡，可能也是临床上对糖尿病患者的感染较难控制的原因。

糖尿病患者组与健康对照组的补体水平进行比较[3]，补体 C3 没有显著差异，补体 C4 水平高于健康对照组，提示糖尿病的发生、发展与体液免疫功能异常有密切的关系外，非特异性免疫也发生改变。补体是反映机体非特异性免疫的重要指标，本研究结果显示补体 C4 显著升高，免疫球蛋白也有显著改变，证明糖尿病患者既有非特异性免疫又有特异性免疫功能的紊乱。

T 细胞为异质性群体[4]。外周血成熟 T 细胞包含 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞两个亚群，其中 $CD4^+$ T 细胞识别主要组织是相容性复合体(MHC)Ⅱ递呈的抗原肽，根据其分泌的细胞因子和介导的功能再分为 Th1 和 Th2 细胞。$CD8^+$ T 细胞识别 MHCⅠ递呈的抗原肽，根据功能可分为细胞毒性 T 细胞和抑制性 T 细胞。B 细胞在受到抗原刺激时迅速向浆细胞分化，产生各种抗体参与体液免疫应答。NK 细胞具有细胞毒性效应，无需预先致敏就能自发杀伤靶细胞，在肿瘤免疫和抗病毒感染中均起重要作用。本研究结果显示，与健康者比较，糖尿病患者无论伴或不伴感染，其 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 比值、B 淋巴细胞、NK 细胞均显著降低，表明糖尿病患者体内细胞免疫功能遭到不同程度的破坏。糖尿病患者除持续高血糖外，胰岛功能受损也是造成其细胞免疫功能降低的重要原因。

红细胞免疫系统是机体免疫功能的重要组成部分。红细胞免疫功能主要是通过膜上的 C_{3b} 受体与 C_{3b} 特异的免疫黏附实现的。C_{3b} 能与许多生物活性颗粒(如各种抗原物质、免疫复合物、寄生虫、微生物等)非特异性牢固结合。红细胞 C_{3b} 受体通过与 C_{3b} 的特异性结合，使循环中的许多生物活性物质黏附到红细胞膜上，从而促进多形核细胞对微生物的吞噬或将黏附的抗原微生物等带到肝、脾网状内皮系统经吞噬细胞消灭[5]。本组糖尿病患者的红细胞免疫黏附功能较健康对照组有显著降低。

糖尿病患者存在免疫功能紊乱，但究竟是由于免疫功能紊乱而导致糖尿病，使血糖升高、代谢紊乱，还是糖尿病的一系列改变导致患者免疫功能紊乱，还有待进一步的研究。

参考文献

[1]　李明龙，陈凌，徐德凤. 非胰岛素依赖型糖尿病患者免疫功能研究[J]. 上海免疫学杂志，1996，16(1)：26.

[2]　Hamilton R. Human IgG Subclass measurements in the clinical laboratory[J]. Clin Chem，1987，33(10)：1707.

[3]　罗儒超，钟代平. 2 型糖尿病患者血清免疫球蛋白及补体变化[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(7)：741-742.

[4]　周光炎. 免疫学原理[M]. 上海：科学技术文献出版社，2000：31-33.

[5]　Cornacoff JB. Immune cornplex——clearing mechanism[J]. J Clin Invest，1983，71(2)：236.

(收稿日期：2011-01-13)

(上接第 767 页)

[8]　Hou J，Lin Y，Waters J，et al. Detection and significance of a G1862T variant of hepatitis B virus in Chinese patients with fulminant hepatitis[J]. J Gen Virol，2002，83(9)：2291-2298.

[9]　刘成忠，王琴，肖传宇，等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 前 C 区 A1896 变异和 BCP T1762/A1764 双变异与临床相关性分析[J]. 现代检验医学杂志，2010，25(2)：83.

[10]　朱江，张树林. HBV 前 C 区 G1896A 变异产生和 HBeAg 转换时相的关系[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(4)：64-66.

[11]　林裕龙，兰萌，龙国进. PCR-RFLP 检测 HBeAg 阴性前 S1 抗原阳性的 HBV 感染者前 C 区基因变异[J]. 临床检验杂志，2006，24(5)：91-92.

[12]　刘彦华，倪旭. HBV 前 C 区基因变异与乙型肝炎病毒复制的相关性[J]. 河北医药，2007，29(10)：1058.

(收稿日期：2011-02-12)