

• 论 著 •

乙型肝炎 X 蛋白的检测及其对乙型病毒性肝炎影响的探讨

黄国清, 郭强忠, 舒少为, 唐恒锋, 吴爱成
(广东省深圳市宝安区观澜人民医院 518110)

摘要:目的 通过检测乙型肝炎患者的 X 蛋白, 探讨其对疾病的影响。方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙型肝炎患者血清中 X 蛋白, 分别比较健康对照组、肝癌组与肝炎组的 X 蛋白检测阳性率的差异; 分析乙型肝炎 DNA 测定值阳性和阴性中 X 蛋白阳性率的差异以及 e 抗原(HBeAg)阳性和阴性中 X 蛋白检出率的差异, 探讨乙型肝炎 X 蛋白对疾病的影响。结果 肝炎组患者的 X 蛋白阳性率高于健康对照组, 肝癌组 X 蛋白阳性率高于肝炎组, 乙型肝炎 DNA 测定值阳性 X 蛋白阳性率高于阴性, HBeAg 抗原阳性中 X 蛋白的检出率也高于阴性, 并且差异均有统计学意义。结论 乙型肝炎 X 蛋白在疾病监测中有一定的临床意义, 并且可能对病毒的复制有影响。

关键词: 肝炎, 乙型; 肝肿瘤; 肝炎表面抗原, 乙型; X 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2057-02

Detection of HBV X protein and its influence on viral hepatitis B

Huang Guoqing, Guo Qiangzhong, Shu Shaowei, Tang Hengfeng, Wu Aicheng
(Guanlan People's Hospital, Baoan District, Shenzhen Guangdong 518110, China)

Abstract: **Objective** To detect HBV X protein in patients with viral hepatitis B to explore its influence on disease. **Methods** The difference of the positive rate of HBV X protein, detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) in healthy controls, patients with hepatocellular carcinoma and patients with viral hepatitis B. The positive rates of HBV X protein in subjects positive or negative with HBV DNA or HBeAg were also compared. **Results** The positive rate of HBV X protein in patients with viral hepatitis B was significantly higher than in healthy controls, in patients with hepatocellular carcinoma was significantly higher than in patients with viral hepatitis B, in subjects positive with HBV DNA or HBeAg was significantly higher than in those negative with HBV DNA or HBeAg respectively. **Conclusion** HBV X protein could have certain clinical significance for the monitoring of disease and might affect the duplication of HBV.

Key words: hepatitis B; liver neoplasms; hepatitis B surface antigens; X protein

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是引起病毒性肝炎的主要病原体之一, 可能导致肝硬化、原发性肝癌(primary hepatic cancer, PHC)等疾病的发生, 严重影响人们的生命健康, 是目前研究的热点。临床诊断 HBV 主要依赖 HBV 血清学标志物和 HBV DNA 定量检测。HBV 基因组中有 4 个开放阅读框, 分别为 S、C、P 和 X 区, 其中 X 基因是最小的一个, 编码的 X 蛋白可通过多种调控作用直接或者间接地对病毒的复制与增殖以及宿主细胞的凋亡、癌变等过程产生广泛的影响^[1]。本研究通过对临床样本的 X 蛋白的检验来探讨乙型肝炎 X 蛋白对乙型肝炎病毒的复制及对疾病的影响, 给临床检验提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2008 年 1 月至 2010 年 1 月该院乙型肝炎住院患者 186 例, 年龄 25~55 岁, 其中男 107 例, 女 79 例, 25~35 岁占 22.6%, 35~45 岁占 45.2%, 45~55 岁占 32.3%。以在该院体检筛选的 HBV 血清标志物阴性健康者 80 例作为健康对照组, 男 48 例, 女 32 例, 25~35 岁占 23.8%, 35~45 岁占 43.8%, 45~55 岁占 32.5%。所有患者及健康者均无其他系统的疾病, 排除甲、丙、丁、戊型肝炎或混合感染及脂肪肝、酒精性肝炎等其他肝脏疾病, 年龄、体质量等基本资料无显著性差异。

1.2 肝病诊断标准 根据美国肝病研究协会《慢性乙型肝炎防治指南(2007 年版)》^[2], 结合流行病学、临床症状、体征、实验室检查和(或)肝活体组织检查等手段, 进行综合分析, 动态观察予以诊断。其中 HBV 感染的标志物判定标准为: (1)血清 HBsAg 阳性; (2)血清 HBV DNA 阳性(斑点杂交法), 或

HBV DNA 多聚酶阳性, 或 HBeAg 阳性(单独 HBeAg 阳性, 需要作中和试验, 以排除假阳性), 血清抗-HBc IgG 阳性(单独阳性, 需要作中和试验, 以排除假阳性); (3)肝内 HBcAg 阳性和(或)HBsAg 阳性, 或 HBV DNA 阳性。有以上任何一项阳性者可诊断为 HBV 感染。

1.3 仪器与试剂 伯乐 680 全自动酶标仪; ABI 7500 实时荧光定量 PCR 扩增检测仪。血清样本来源于 186 例患者和 80 例健康者; 鼠抗人 HBx Ab 购自 Chemicon 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为 Beyotime 公司产品; DAB 显色试剂盒为福州迈新生物技术有限公司产品; HBV DNA 定量检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 血清中 HBxAg 的检测 用包被缓冲液将血清稀释后加入 96 孔酶标板中, 同时设置阴性对照孔, 4℃过夜后倒掉孔中包被物, 拍干后加洗涤液每孔 250 μL, 3~5 min 后倒掉洗涤液, 再拍干, 重复 3 次。再加含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液封闭, 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h。洗涤 3 次后拍干, 加入稀释的 HBxAb, 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h, 洗涤 3 次后加入稀释的二抗即 HRP-羊抗鼠 IgG, 每孔 100 μL, 37℃孵育 1 h。加入终止液后用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。结果判定: P/N>2.1 判为阳性(P、N 分别为待检和阴性对照孔血清的 OD₄₅₀ 值)。

1.4.2 血清中 HBV DNA 含量的测定 吸取血清 40 μL 加入 40 μL 提取液, 充分混匀后沸水浴 10 min, 转放 4℃静置 6~8 min 后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 μL 进行 PCR 反应。反应条件为 93℃预变性 2 min, 然后 93℃ 45 s, 55℃ 60 s 反应 10 个循环, 再进行 93℃ 30 s, 55℃ 45 s 反应 30 个循

环。检测灵敏度为 100 IU/mL,阳性值为 HBV DNA>500 IU/mL。

1.4.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 对结果进行分析,计数资料采用卡方检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者中肝炎患者有 121 例,肝癌患者有 65 例。肝炎患者中 X 蛋白阳性的有 25 例,肝癌患者中 X 蛋白阳性的有 23 例,健康对照组中 X 蛋白检测结果全为阴性。肝炎组与健康对照组的 X 蛋白检测结果比较,差异有统计学意义($P<0.01$),肝炎组和肝癌组的 X 蛋白检测结果比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1 和表 2。

表 1 肝炎组与健康对照组的 X 蛋白检测结果比较[n(%)]

项目	健康对照组	肝炎组
X 蛋白阴性	80(100.0)	96(79.3)
X 蛋白阳性	0(0.0)*	25(20.7)

*:与肝炎组 X 蛋白阳性率比较, $\chi^2=18.88,P<0.01$ 。

表 2 肝炎组和肝癌组的 X 蛋白检测结果比较[n(%)]

项目	肝炎组	肝癌组
X 蛋白阴性	96(79.3)	42(64.6)
X 蛋白阳性	25(20.7)	23(35.4)*

*:与肝炎组 X 蛋白阳性率比较, $\chi^2=4.79,P<0.05$ 。

2.2 检测患者血清中 HBV DNA 含量,其临界值为 500 IU/mL,结果显示 HBV DNA 测定值分别为阳性和阴性的标本间,X 蛋白阳性率差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3。

表 3 X 抗原阴性和阳性中 HBV DNA 检测结果比较[n(%)]

项目	HBV DNA 含量(IU/mL)	
	≤500	>500
X 蛋白阴性	51(91.1)	96(73.8)
X 蛋白阳性	5(8.9)*	34(26.2)

*:与 HBV DNA 含量大于 500 IU/mL 组 X 蛋白阳性率比较, $\chi^2=7.0,P<0.01$ 。

2.3 HBeAg 抗原阳性和阴性患者分别为 114 例和 72 例,两组的 X 蛋白阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 HBeAg 抗原阳性与阴性患者的 X 蛋白阳性率结果比较[n(%)]

项目	X 蛋白阳性	X 蛋白阴性
e 抗原阳性	90(57.7)*	24(80.0)
e 抗原阴性	66(42.3)	6(20.0)

*:与 e 抗原阳性组 X 蛋白阳性率比较, $\chi^2=5.28,P<0.05$ 。

3 讨 论

HBV 的 X 基因位于 HBV 基因组中 C 基因的上游,长约 465 个核苷酸,是病毒基因中最小的开放阅读框。X 基因编码 154 个氨基酸残基的 X 蛋白(即 HBx),是一种具有反式激活作用的多功能蛋白质,它在调节基因转录、细胞信号转导、控制细胞增殖和转化方面具有重要作用。本研究结果也表明 HBx 与病毒的复制和疾病的发展有一定的相关性。

本实验结果显示肝炎组的 X 蛋白阳性率明显高于健康对照组,而肝癌患者的 X 蛋白阳性率高于肝炎患者,并且差异有统计学意义,说明 X 蛋白在肝炎组中的表达量较健康对照组高,而肝癌患者中 X 蛋白表达量较肝炎患者高,说明 X 蛋白对于疾病的发展有一定的影响。关于 HBx 与疾病关系的研究有许多,有动物实验表明,转染了 HBx 基因的转基因小鼠可诱导

肝癌的形成,而剔除了 HBx 基因的转基因小鼠(HBV-x-/-)则显著降低了肝癌的发生率^[3-4]。这两个实验都说明了 HBx 基因在疾病发展中的重要性,并且也与本实验的推理一致。HBV X 蛋白是一种重要的转录激活因子,具有广泛的反式激活作用,与乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化密切相关^[5-7]。因此如果在临床检验中将该蛋白作为常规检测项目中的一 项,可以用于作为对疾病发展的一项参考资料。

乙型肝炎病毒 HBV DNA 是检测乙型肝炎病毒是否复制最直接的指标,本实验中 X 蛋白阳性的 HBV DNA 阳性率高于阴性,提示 X 蛋白对病毒的复制有影响。e 抗原与 HBV DNA 具有非常高的相关性,是判断 HBV 复制的良好指标,提示患者的传染性^[8-9]。本实验结果显示 e 抗原阳性中 X 蛋白的阳性率也高于 e 抗原阴性,进一步说明 X 蛋白对乙型肝炎病毒的复制有一定的影响。在完整的 HBV 病毒和某些肿瘤中发现的游离 DNA 均可表达 HBx 蛋白,干扰 HBx 蛋白的表达不仅能控制病毒载量,还可有效控制肿瘤的生长^[10]。而且 HBV X 基因在转录前和转录后均有参与调控 HBV 的复制,不仅通过作用于顺式元件而反式激活病毒和宿主基因,还通过调控多种转录因子促进病毒的转录和复制。

HBx 蛋白具有广泛的反式激活功能,能通过直接或间接的蛋白质间相互作用参与干扰肝细胞的信号转导、细胞凋亡和细胞周期调控,在 HBV 的复制和肝癌的形成中发挥重要的作用^[11-12]。其可以提供一个新的视角来研究肝炎、PHC 的发病机制,有可能为疾病的早期诊断提供分子标志,并为治疗药物开发提供新的作用靶点,所以临床检测 HBx 基因的阳性者应引起高度重视。

参考文献

[1] 潘颖,管世鹤. X 蛋白的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,3(13):1486.

[2] Lok AS,McMahon BJ. Molecular markers in prostate cancer: the role in preoperative staging[J]. Hepatology,2007,45(2):507-539.

[3] Zhang X,Zhang H,Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med,2006,147(64):58-66.

[4] Wu BK,Li CC,Chen HJ,et al. Blocking of G₁/S transition and cell death in the regenerating liver of hepatitis B virus X protein transgenic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,340(72):916-928.

[5] 邵新华,刘树业,邵媛媛,等. 乙型肝炎病毒 X 抗原、X 抗体检测的临床意义[J]. 检验医学,2007,2(6):641.

[6] 肖鸿敏,任建林,董菁. 乙型肝炎病毒 X 蛋白在肝细胞癌发生中的作用机制[J]. 实用肝脏病杂志,2009,12(3):226-227.

[7] 叶倩,陈燕,李筱莉. 原发性肝癌患者乙型肝炎病毒标志物模式与病毒 DNA 载量分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):186.

[8] 李云,夏正武,瞿良. 乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(4):443.

[9] 郭卉,董瑶佳,刘晓峰,等. 乙型肝炎血清标志物与 HBV DNA 含量关系的分析[J]. 实验与检验医学,2010,28(4):417-418.

[10] Benhenda S,Cougot D,Buendia M,et al. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis[J]. Adv Cancer Res,2009,103(31):75-109.

[11] 吴胜昔,卢春利,曾进兰,等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白研究进展[J]. 重庆理工大学学报(自然科学版),2010,24(11):50-55.

[12] 刘煌,石统东. HBx 抗原对 DNA 损伤反应的影响与肝细胞癌发生[J]. 免疫学杂志,2011,27(1):77-80.