

• 临床检验研究论著 •

兰州地区慢性乙型肝炎病毒感染者乙肝病毒大蛋白检测的临床意义

李彩东, 吴斌, 段正军, 田鹏飞

(兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046)

摘要:目的 探讨兰州地区慢性乙型肝炎病毒感染者血清乙型肝炎病毒大蛋白(HBV-LP)检测的临床意义。方法 选择兰州地区慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者 1 036 例,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HBV-LP 吸光度值,化学发光免疫分析法(CLIA)检测乙型肝炎病毒血清标志物(HBV-M)含量。结果 兰州地区 1 036 例慢性 HBV 感染者中 HBV DNA 阳性率为 72.01%(746/1036),HBV-LP 阳性率为 84.36%(874/1036),检出一致率为 78.19%。HBV-LP 的表达与 HBV DNA 水平呈正相关关系($r=0.94$),差异具有统计学意义($P<0.01$);不同 HBV-M 模式中 HBV DNA 与 HBV-LP 的检出率不同,HBsAg 和 HBeAg 同时阳性者 HBV DNA 与 HBV-LP 均有较高的阳性率,HBeAg 阴性者 HBV DNA 与 HBV-LP 的阳性率均较低。结论 兰州地区慢性乙型肝炎病毒感染者血清 HBV-LP 吸光度与 HBV DNA 拷贝数的对数值有较好的相关性,HBV-LP 表达与病毒复制有关,HBV-LP 的检测能够反应 HBV DNA 的复制情况。

关键词:肝炎病毒,乙型; DNA,病毒; 肝炎,乙型,慢性; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2667-02

Significance of HBV-LP detection in patients with HBV chronic infection in Lanzhou

Li Caidong, Wu Bin, Duan Zhengjun, Tian Pengfei

(Institute of Liver Diseases, The Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: Objective To discuss the significance of HBV-LP(hepatitis B virus large protein)detection in patients with HBV chronic infection in Lanzhou. **Methods** Selected 1036 patients with HBV chronic infection, using ELISA to detecting HBV-LP, and CLIA to detecting the assay of HBV-M. **Results** In 1036 patients, positive rate of HBV DNA is 72.01%, positive rate of HBV-LP is 84.36%, concordance rate of detection is 78.19%, HBV-LP expression and HBV DNA level showed positive correlation($r=0.94$), and the difference between both was statistically significant($P<0.01$). In HBV M model, HBV DNA and HBV-LP detecting rate is are different; Patients have positive in HBsAg and HBeAg show high positive rate in both HBV DNA and HBV-LP, and HBeAg negative show low positive rate. **Conclusion** Serum HBV-LP absorbance and log value of HBV DNA copy shows nice correlation in patients with HBV chronic infection in Lanzhou. HBV-LP expression has some relationship with replication of virus, HBV-LP can reflect the HBV DNA replication.

Key words: hepatitis B virus; DNA, viral; hepatitis B, chronic; enzyme-linked immunosorbent assay

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球性的公共卫生问题,目前我国有 1.2 亿 HBV 携带者,约占全世界的 1/3^[1]。HBV 感染在我国属于危害较重的传染性疾病,目前临床判断患者病毒是否复制,常用的指标是 HBeAg 和 HBV DNA。临床发现一部分 HBeAg 阴性的患者,病毒依然大量复制^[2-3],而 HBV DNA 检测条件要求高,质量控制严格,使其检测难以广泛普及,当前需要一种新的指标来反映 HBV 的复制状况。HBV 的 S 基因编码含 3 种外膜蛋白,主蛋白、中蛋白和大蛋白(HBV-LP);而 HBV-LP 含有 HBsAg、PreS1 蛋白和 PreS2 蛋白。在病毒感染早期,HBV-LP 含量很低,在感染后期含量增高,在病毒非复制期,大蛋白在血清中很低或没有,大量滞留在肝细胞中。因此检测血液中大蛋白的有无,可判断体内 HBV 病毒是否在进行复制。研究表明 HBV-LP 与 HBV 的侵入、组装和复制有着重要的关系,能反映患者体内的乙肝病毒的复制情况^[4-7]。本实验通过对兰州地区 1036 例慢性 HBV 感染者 HBV-LP、HBV DNA 和 HBV-M 定量的检测,探讨 HBV-LP 检测的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组:100 例,抽取 2010 年 3 月至 2010 年 5 月兰州市第二人民医院体检中心健康体检者,排除各型肝炎病毒感染,排除心肺疾病等,肝功能正常。其中,男性 68 例,女性 32 例;年龄 23~58 岁,平均年龄(46.1±13.2)岁。实验组:

1 036 例病例均为 2010 年 10 月至 2011 年 5 月兰州市第二人民医院住院及肝病专家门诊慢性 HBV 感染者,排除甲、丙、丁、戊等肝炎病毒感染,排除自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎等疾病。其中,男性 683 例,女性 353 例;年龄 2~74 岁,平均(35.7±12.4)岁。诊断符合 2010 年 12 月中华医学会肝病学会和中华医学会感染学会联合制定的慢性乙型肝炎诊治指南中的诊断标准^[8]。

1.2 试剂 HBV-M 标志物(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc)定量试剂盒由北京科美生物技术有限公司提供,HBV-LP 检测试剂盒由北京贝尔生物工程股份有限公司提供,HBV DNA 定量检测试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 仪器 北京科美 GLORUNNER 化学发光免疫分析仪,美国 ABI7300 荧光定量分析仪,美国贝克曼 AU-680 全自动生化分析仪等。

2 结果

2.1 1 036 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 与 HBV-LP 检测结果 1 036 例慢性乙型肝炎患者血清中,HBV DNA 阳性率为 72.01%(746/1 036),HBV-LP 阳性率为 84.36%(874/1 036),其检出一致率为 78.19%,二者比较差异有统计学意义($\chi^2=166.144, P=<0.01$)。

2.2 HBV-M 不同模式中 HBVDNA 与 HBV-LP 的检测结果

不同的 HBV-M 模式中 HBV DNA 和 HBV-LP 的检出率不同, HBsAg 和 HBeAg 同时阳性者 HBV DNA 和 HBV-LP 均有较高的阳性率, HBeAg 阴性者 HBV DNA 和 HBV-LP 的阳性率都较低。见表 1。

表 1 HBV-M 不同模式中 HBV DNA 与 HBV-LP 的检测结果的比较 [n(%)]

HBV-M 模式	n	HBV DNA(+)	HBV-LP(+)
HBsAg(+), HBeAg(+), HBeAb(+)	494	484(97.97)	465(94.57)
HBsAg(+), HBeAb(+), HBeAb(+)	192	76(41.99)	136(70.83) [△]
HBsAg(+), HBeAb(+)	272	114(42.86)	201(73.90) [△]
HBsAg(+), HBeAg(+)	70	70(100.00)	70(100.00)
HBsAg(+), HBeAb(+), HBeAb(+), HBeAb(+)	2	0(0.00)	0(0.00)
HBeAb(+), HBeAb(+)	4	2(50.00)	2(50.00)
HBeAb(+), HBeAb(+), HBeAb(+)	2	0(0.00)	0(0.00)
合计	1 036	746(72.01)	874(84.36)

△: P < 0.01, 与 HBVDNA(+) 比较。

2.3 血清 HBV-LP 浓度与 HBV DNA 拷贝数间的相关性分析 HBV 感染者中, HBV-LP 吸光度 (OD) 值及阳性率随 HBV-DNA 拷贝数的增加均呈上升趋势, 二者之间呈正相关 ($r=0.94, P<0.01$); 血清 HBV-LP OD 值及阳性率在健康对照组与 HBV 感染组中分别为 $0.0285 \pm 0.04, 0\%$, $0.9004 \pm 0.83, 84.36\%$, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.4 血清 HBV-LP 用于判断病毒复制的性能评价 1 036 例 HBV 感染者中, HBV-DNA、HBeAg、HBV-LP 共同阴性 143 例, 893 例 HBV 感染者存在不同程度的 HBV 复制。血清 HBV-LP 用于判断 HBV 复制的诊断试验敏感度为 92.83% (829/893), 特异度为 68.53% (98/143), 准确度为 89.48% (927/1036), 阳性似然比为 2.95, 阴性似然比为 0.13。

3 讨 论

HBV-LP 具有双重跨膜拓扑结构^[9], 存在于感染性颗粒 (Dane 颗粒) 和亚病毒管状颗粒中, 是病毒形成完整外膜的重要标志。HBV-LP 能反式激活 HBV 复制, 调节病毒颗粒从细胞内释放^[10-12], 并与肝细胞表面特异蛋白结合介导乙型肝炎病毒进入肝细胞。另有研究表明, 过量 HBV-LP 在肝细胞内质网积聚是导致内质网应激的关键因素, 还能致肝细胞毒性甚至致癌, 因此, HBV-LP 在乙型肝炎病毒的生活周期中具有重要的作用^[13]。

本研究发现在 1 036 例兰州地区慢性乙型肝炎患者血清中, HBV DNA 阳性率为 72.01%, HBV-LP 阳性率为 84.36%, 其检出一致率为 78.19%; 不同的 HBV-M 模式中 HBV DNA 和 HBV-LP 的检出率不同, HBsAg 和 HBeAg 同时阳性者的 HBV DNA 和 HBV-LP 均有较高的阳性率, HBeAg 阴性者 HBV DNA 和 HBV-LP 的阳性率都较低。HBV 感染组与健康对照组间 HBV-LP 水平差异具有统计学意义 ($P<0.01$); HBV-LP 水平与 HBV DNA 拷贝数间呈正相关 ($r=0.94, P<0.01$), 与相关文献^[11]的报导相近。不同 HBV DNA 拷贝数组别间 HBV-LP 阳性率差异有统计学意义 ($P<0.01$); HBV-LP 用于判断 HBV 复制的诊断试验敏感度为 92.83%, 特异度为 68.53%, 准确度为 89.48%。

血清 HBV DNA 拷贝数仍是目前公认的评估 HBV 复制和抗病毒疗效的主要指标, 但某些抗病毒药物如核苷类似物只能抑制 HBV DNA 的复制, 而不能彻底清除 HBV cccDNA, 不

影响已形成的 HBV DNA 继续转录、表达和组装病毒颗粒释放入血, 因此抗病毒治疗后血清 HBV DNA 下降的速度远快于 HBV-LP, 且体内仍存在一定数量的 HBV DNA 和 HBV-LP, 由于 HBV-LP 对 HBV 复制具有反式激活作用, 容易出现停药后反跳, 因此, 只检测 HBV DNA 难以全面反映体内 HBV 复制, HBV-LP 和 HBV DNA 同时检测更能代表 HBV 病毒复制水平。

另外, 本研究还发现部分患者 HBV-LP 阳性而 HBV-DNA 阴性, 考虑为 HBV DNA 可能在引物设计位点发生变异, 目前的 PCR 检测尚不能完全体现体内 HBV DNA 的水平。同时笔者发现部分患者 HBV-LP 阴性而 HBV DNA 阳性, 可能是由于 HBV 基因前 S 区变异致 HBV-LP 漏检所致, 尚有待进一步证实。因此, HBV-LP 和 HBV DNA 对于检测乙型肝炎各有优缺点。笔者认为在监测病毒复制、观察治疗效果上还应该增加 HBV 包膜蛋白 HBV-LP 的检测, 二者协同检测更能代表 HBV 病毒复制水平, 在临床上具有很好的指导意义。

参考文献

- Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid[J]. *Virus Res*, 2004, 106(8): 199-209.
- Chang TT, Robeft GG, Robert M, et al. A comparison of Entecavir and Lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (10): 1001-1010.
- 贾继东. 乙型肝炎 e 抗原阴性慢性乙型肝炎的治疗[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(7): 539.
- Paran N, Cooper A, Shaul Y. Interaction of hepatitis B Virus with Cells [J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13 (3): 137-143.
- Sung VM, Lai MM. Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system[J]. *J Virol*, 2002, 76(2): 912-917.
- 熊俊, 刘欧, 石文静. eAg 阴性慢性乙肝患者血清中乙肝表面抗原大蛋白的表述[J]. *现代检验医学杂志*, 2007, 22(3): 35-36.
- 毛远丽, 李伯安. 乙肝患者外膜蛋白检测对于判定 HBVDNA 复制的意义[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(3): 276-278.
- 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24.
- Le Seyee J, Chouteau P, Cannie I, et al. Infection Process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the Pre-S1 domain[J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 2052-2057.
- Bangq G, Kin KH, Guamieri 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.
- Hildt E, Mung B, Saher G, et al. The PreS-activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/ErK2 signaling in transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2002, 21(4): 525-535.
- Foo NC, Ahn BY, Ma X, et al. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B Virus large surface protein[J]. *Hepatology*, 2002, 36(6): 1400-1407.
- Chua PK, Wang RY, Lin MH, et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus(HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus [J]. *J Virol*, 2005, 79(21): 13483-13496.