

• 论 著 •

乙型肝炎病毒外膜大蛋白意义分析及与慢性乙型肝炎患者病毒复制的相关性研究*

尹凌凡¹, 唐景云², 张日妹¹, 冉云³, 熊建辉¹

(1. 广东省深圳市龙岗区中医院检验科 518172; 2. 广东省深圳市坪山新区人民医院检验科 518172; 3. 广东省深圳市龙岗区中医院肝病科 518172)

摘要:目的 通过分析乙型肝炎病毒(HBV)感染患者血清免疫学标志物乙型肝炎病毒外膜大蛋白(HBV-LP)、HBV-DNA 及乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)的相关性,探讨 HBV-LP 对反映体内 HBV 复制的意义。方法 选取 2013 年 4 月至 2015 年 9 月深圳市龙岗区中医院收治的慢性乙型肝炎感染患者 540 例,采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测患者的血清 HBV-DNA,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 HBV-LP 及 HBV-M,对 HBV-LP、HBV-M 及 HBV-DNA 之间的相关性进行分析。结果 乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)阳性患者的 HBV-LP 阳性率为 96.39%,而 HBV-DNA 的阳性率为 93.33%,两者差异无统计学意义($P>0.05$);HBV-LP 水平与 HBV-DNA 的拷贝数对数值呈正相关;而 HBeAg 阴性患者的 HBV-LP 阳性率为 63.33%,HBV-DNA 的阳性率为 51.11%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 HBV 外膜大蛋白能够有效反映慢性乙型肝炎患者体内 HBV 复制情况,其灵敏度高于 HBeAg,对于 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者而言,HBV-LP 更能反映患者体内病毒的复制状态。

关键词:乙型肝炎病毒外膜大蛋白; 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎 E 抗原; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3271-03

Analysis on significance of HBV envelope large protein and its correlation with virus replication in patients with chronic hepatitis B*

YIN Lingfan¹, TANG Jingyun², ZHANG Rimei¹, RAN Yun³, XIONG Jianhui¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Longgang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518172, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Pingshan New District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518172, China; 3. Department of Liver Diseases, Longgang District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518172, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship among serum hepatitis B virus (HBV) envelope large protein (HBV-LP), HBV-DNA and HBV marker (HBV-M) for investigating the clinical significance of HBV-LP to reflect the HBV in vivo replication in the patients with HBV infection. **Methods** Total 540 cases of chronic HBV infection treated in the Longgang District Hospital of Traditional Chinese Medicine from April 2013 to September 2015 were selected. The real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect serum HBV-DNA, HBV-LP and HBV-M were detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation among HBV-LP, HBV-M and HBV-DNA were analyzed. **Results** The positive rate of HBV-LP in HBeAg-positive patients was 96.39%, and which of HBV-DNA was 93.33%, there was no statistically significant difference between them ($P>0.05$); The serum HBV-LP level was positively related with the logarithmic value of HBV-DNA copies; the positive rate of HBV-LP in HBeAg-negative patients was 63.33%, and which of HBV-DNA was 51.11%, the difference between them was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** HBV-LP can effectively reflect the HBV in vivo replication in the patients with chronic hepatitis B and its sensitivity is higher than that of HBeAg, HBV-LP can even more reflect the HBV in vivo replication status in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B.

Key words: hepatitis B virus envelope large protein; chronic hepatitis B; hepatitis B virus E antigen; correlation

慢性乙型肝炎是指由乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染病。慢性乙型肝炎属于世界流行性疾病,报道称全球约有 3.5 亿人为 HBV 的携带者,而我国为 HBV 感染的高发国家^[1]。近年来,随着乙型肝炎疫苗的普遍接种,HBV 感染控制较为理想,但是关于抗 HBV 治疗效果的监测,包括体内病毒水平及复制情况,仍然是临床工作者较为关注的问题。乙型肝炎 E 抗

原(HBeAg)和 HBV-DNA 是目前临床上用于评价患者体内 HBV 复制情况的有效指标,但是 HBeAg 阴性的乙型肝炎患者其体内仍可能存在病毒复制,并且 HBV-DNA 的检测费用和检测要求也在一定程度上限制了 HBV-DNA 的检测^[2-3]。研究显示,乙型肝炎病毒外膜大蛋白(HBV-LP)与 HBV 复制密切相关,能有效反映患者体内 HBV 的复制情况^[4]。本研究

* 基金项目:广东省深圳市坪山新区卫生系统科研资助项目(201428)。

作者简介:尹凌凡,女,副主任技师,主要从事细胞免疫研究。

中,选取 540 例慢性乙型肝炎患者就 HBV-LP 与 HBV 复制的相关性进行分析,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 4 月至 2015 年 9 月深圳市龙岗区中医院收治的慢性乙型肝炎患者 540 例,其中男 340 例、女 200 例,年龄 20~70 岁、平均(43.8±4.2)岁;所选患者均符合 2005 年中华医学会肝病学会分会与感染病学分会联合制定的关于 HBV 感染的诊治标准^[5]。排除乙型肝炎以外的其他类型肝炎、结核病、肝硬化、糖尿病及神经精神疾病等。

1.2 方法 患者空腹状态下采取血液标本,分离血清后冻存于-80℃冰箱保存备用。采用实时荧光定量 PCR 检测患者的血清 HBV-DNA,荧光定量 PCR 仪购自罗氏,试剂盒购自湖南圣湘科技有限公司,<5×10² copy/mL 为 HBV-DNA 阴性;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 HBV-LP 及乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)[乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)、HBeAg、乙型肝炎 e 抗体(抗-HBe)和乙型肝炎核心抗体(抗-HBc)]。全自动酶标仪购自郑州安图生物工程有限公司;试剂盒购自深圳百安生化技术有限公司。所有指标的检测方法均按照说明书严格进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理及分析。计数资料以例数或率表示,比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,回归分析采用直线相关回归分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBeAg 阴性和 HBeAg 阳性患者 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率之间的比较 540 例慢性乙型肝炎患者中 HBeAg 阴性患者 180 例(33.33%)和 HBeAg 阳性患者 360 例(66.67%);在 HBeAg 阳性患者中,HBV-LP 与 HBV-DNA 的阳性率分别为 96.39%和 93.33%,差异无统计学意义(*P*>0.05);在 HBeAg 阴性患者中,HBV-LP 与 HBV-DNA 的阳性率分别为 63.33%、51.11%,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。540 例慢性乙型肝炎患者血清中不同的 HBV 标志物模式中,HBV-DNA 和 HBV-LP 在 HBeAg 阴性和 HBeAg 阳性的检出率不同,在 HBsAg(+)HBeAg(+)抗-HBc(+),HBsAg(+)抗-HBe(+)抗-HBc(+)以及 HBsAg(+)抗-HBc(+)这 3 种模式中,HBV-DNA 和 HBV-LP 在 HBeAg 阴性患者中的检出率较低。见表 2。

表 1 HBeAg(-)和 HBeAg(+)患者 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率之间的比较[n(%)]

HBeAg	n	HBV-LP(+)	HBV-DNA(+)	χ^2	P
阴性	180	114(63.33)	92(51.11)	5.49	<0.05
阳性	360	347(96.39)	336(93.33)	-0.20	>0.05

表 2 不同 HBV-M 模式下 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率比较[n(%)]

HBV-M	n	HBV-DNA	HBV-LP
HBsAg(+)HBeAg(+)抗-HBc(+)	360	336(93.33)	347(96.39)
HBsAg(+)抗-HBe(+)抗-HBc(+)	56	32(57.14)	36(64.29)
HBsAg(+)抗-HBc(+)	87	45(51.72)	63(72.41)

续表 2 不同 HBV-M 模式下 HBV-LP 和 HBV-DNA 阳性率比较[n(%)]

HBV-M	n	HBV-DNA	HBV-LP
HBsAg(+)抗-HBe(+)	33	14(42.42)	14(42.42)
HBsAg(+)抗-HBs(+)抗-HBe(+)	1	0(0.00)	0(0.00)
抗-HBc(+)	1	0(0.00)	0(0.00)
抗-HBe(+)抗-HBc(+)	2	1(50.00)	1(50.00)
HBsAg(+)抗-HBe(+)抗-HBc(+)	1	0(0.00)	0(0.00)

2.2 血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 的关系 在 428 例 HBV-DNA 阳性的血清标本中,HBV-LP OD 值与 HBV-DNA 拷贝数对数值呈良好的正相关(回归方程为 $Y=0.258X-0.845$,回归系数 $r=0.984$,*P*<0.01),随着 HBV-DNA 拷贝数的增加,HBV-LP OD 值也呈上升趋势。见表 3。

表 3 血清 HBV-LP 与 HBV-DNA 的关系($\bar{x}\pm s$)

HBV-DNA 拷贝数	n	HBV-DNA 对数值	HBV-LP OD 值
10 ²	32	2.431±0.124	0.238±0.067
10 ³	44	3.356±0.242	0.420±0.083
10 ⁴	61	4.674±0.315	0.548±0.096
10 ⁵	75	5.487±0.338	0.716±0.124
10 ⁶	146	6.438±0.386	0.957±0.149
10 ⁷	46	7.548±0.416	1.235±0.186
10 ⁸	24	8.434±0.442	1.384±0.258

3 讨论

慢性乙型肝炎是我国常见的慢性传染病之一,流行病学资料表明我国每年死于 HBV 相关性疾病的患者多达 35 万,HBV 严重威胁着人类的生命健康^[6]。因此,建立一种简单、灵敏度高且重复性好的 HBV 检测方法具有重要的临床意义。目前,临床上反映慢性乙型肝炎患者体内 HBV 复制情况的指标主要包括 HBV-DNA 和 HBeAg 两种^[7]。通常采用定量 PCR 检测 HBV-DNA,但是由于该方法对实验条件有较高要求,因而很多基层医疗单位无法开展而导致其应用受限。研究表明慢性乙型肝炎患者的 HBeAg 转阴并不代表 HBV 复制的停止,事实上当 HPV 前 C 或 BCP 区发生变异后会导致 HBeAg 合成障碍,表现出 HBeAg 阴性但病毒复制未受影响的情况,这说明 HBeAg 阴性并不能表示 HBV 复制的终止,因此寻找新的能够有效代表 HBV 复制的免疫血清学指标是目前临床研究的热点之一^[8-9]。

HBV-LP 是 HBV 上与肝细胞膜特异性受体结合的主要蛋白成分之一,HBV-LP 主要由 HBsAg、前 S1 蛋白(pre-S1)和前 S2 蛋白(pre-S2)组成^[10]。研究表明,HBV-LP 与 HBV 的复制程度密切相关,在感染早期,HBV-LP 通过与细胞受体结合而介导病毒进入细胞内,在感染晚期,HBV-LP 在主蛋白(HBsAg)和中蛋白(HBsAg、前 S2 蛋白)的作用下组装并分泌出完整病毒外壳^[11]。近年来,随着国内外对 HBV 外膜蛋白在乙型肝炎发病、感染与病毒复制等方面的深入研究,HBV-LP 已逐渐成为研究热点^[12]。HBV-LP 具有双重拓扑结构,通过激活蛋白激酶 C 而导致 C-RAF/ERK2 信号级联放大通路

的激活,从而控制细胞因子和病毒启动子的表达。此外,研究发现 HBV-LP 具有肝细胞毒性且对 HBV 的复制具有反式激活作用^[3]。赵燕飞等^[13]的研究结果显示,HBV 感染患者的血清 HBV-LP 可以有效地反映患者体内的病毒复制情况,其水平与 HBV-DNA 的拷贝数明显相关,可以作为抗病毒治疗的新型血清免疫学指标之一,尤其是对于 HBeAg 阴性的 HBV 感染患者而言,HBV-LP 具有重要的临床诊断价值。

本研究发现,360 例 HBeAg 阳性的 HBV 感染患者中,HBV-LP 的阳性检出率与 HBV-DNA 的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),而在 180 例 HBeAg 阴性的 HBV 感染患者中,HBV-LP 的阳性检出率明显高于 HBV-DNA 的阳性率,这种差异可能是由于 HBV-LP 和 HBV-DNA 的检测方法不同所致,同样也提示相对于 HBV-DNA,HBV-LP 更能反映 HBeAg 阴性患者体内的 HBV 复制情况。此外,还发现在 428 例 HBV-DNA 阳性的血清标本中 HBV-LP OD 值与 HBV-DNA 拷贝数对数值呈良好的正相关,随着 HBV-DNA 拷贝数的增加,HBV-LP OD 值也呈上升趋势。说明 HBV-LP 可以作为 HBV 感染、诊断、治疗及预后的参考指标,具有较高的临床应用价值,与赵燕飞等^[13]的研究结果一致。

综上所述,HBV 外膜大蛋白能够有效反映慢性乙型肝炎患者体内 HBV 复制情况,其灵敏度高于 HBeAg,对于 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者而言,HBV-LP 更能反映患者体内病毒的复制状态。

参考文献

[1] You CR, Lee SW, Jang JW, et al. Update on hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(37): 13293-13305.

[2] 柯柳华,覃彦平,梁伟清. 慢肝患者 HBeAg 不同状态 HBsAg 水平与 HBV-DNA 载量相关性[J]. *中国医药指南*, 2014, 12(29): 76-77.

[3] 周丽英,蒋理. 乙型肝炎病毒核酸载量与乙型肝炎病毒大蛋白的相关性研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(1): 39-42.

[4] Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus large

surface protein: function and fame[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015, 4(1): 1-10.

[5] 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.

[6] 黄成志. 阿德福韦酯与其他药物联合治疗乙肝的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(27): 3073-3075.

[7] Boglione L, Cardellino CS, De Nicolò A, et al. Different HBsAg decline after 3 years of therapy with entecavir in patients affected by chronic hepatitis B HBeAg-negative and genotype A, D and E[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(11): 1845-1850.

[8] Hsieh YH, Chang YY, Su IJ, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant large surface protein inhibits DNA double-strand break repair and leads to genome instability in hepatocarcinogenesis[J]. *J Pathol*, 2015, 236(3): 337-347.

[9] 管军,叶军. 乙型肝炎病毒前 C 区(1896)和 BCP 区(1762/1764)变异对肝癌发病率的影响[J]. *实用临床医学*, 2014, 15(5): 20-21.

[10] 尹兴鑫. 前 S1 蛋白在乙型肝炎诊疗的作用分析[J]. *中国保健营养*, 2014, 24(3): 1774-1775.

[11] Lee SA, Kim H, Won YS, et al. Male-specific hepatitis B virus large surface protein variant W4P potentiates tumorigenicity and induces gender disparity[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 23-27.

[12] Niedre-Otomere B, Bogdanova A, Bruvere R, et al. Posttranslational modifications and secretion efficiency of immunogenic hepatitis B virus L protein deletion variants [J]. *Virol J*, 2013, 10(1): 1-6.

[13] 赵燕飞,姜新华,兰天丽. 乙型肝炎病毒大蛋白检测的临床意义及应用价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(12): 3394-3396.

(收稿日期:2016-04-26 修回日期:2016-07-18)

(上接第 3270 页)

原发性膜肾病的预后指标,具有重要的临床价值。

参考文献

[1] Goldstein SL, Devarajan P. Acute kidney injury in childhood: should we be worried about progression to CKD[J]. *Pediatric Nephrology*, 2011, 84(11): 5449-5453.

[2] 张海燕. 肾脏病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 1424-1425.

[3] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 459-488.

[4] Mok CC, Tang SS, To CH, et al. Incidence and factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(9): 2774-2784.

[5] Brugos B, Zeher M. Biomarkers in lupus nephritis[J]. *Orv*

Hetil, 2010, 151(29): 1171-1176.

[6] Swiatlo E, King J, Nabors CS, et al. Pneumococcal surface protein A is expressed in vivo, and antibodies to PspA are effective for therapy in a murine model of pneumococcal sepsis [J]. *Infet Immun*, 2003, 71(12): 7149-7153.

[7] Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and Evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Infet Immun*, 2010, 68(10): 5889-5900.

[8] 府伟灵,徐克前. 临床生物化学检验[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2011: 182-206.

[9] National kidney foundation practice guide. lines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification [J]. *Ann Intern Med*, 2013, 39(2): 137-147.

(收稿日期:2016-05-09 修回日期:2016-07-27)