

乙型肝炎病毒感染者血清 HBV-LP 检测意义及其与 PreS1 抗原、HBV DNA 之间关系的研究

程振波 谭黎明 李建英 毛玉环

(湖南省人民医院 检验科, 湖南 长沙 410001)

【摘要】目的: 初步探讨 HBV 感染者血清中的乙肝大蛋白 (HBV-LP) 检测的临床意义, 并对其与 PreS1 抗原、HBV DNA 之间的关系进行分析。**方法:** 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测 192 例 HBV 感染者血清中的 HBV-LP, PreS1 抗原及 HBV 分子标志物 (HBV M), 并用荧光定量 PCR 方法检测 HBV DNA。**结果:** 192 例 HBV 感染者血清 HBV-LP、PreS1 抗原、HBV DNA 及 HBeAg 阳性率分别为 67.18%、54.17%、52.60% 和 9.38%, HBV-LP 阳性率高于 PreS1 抗原阳性率 ($\chi^2=6.82$, $p<0.05$)、HBV DNA 检测阳性率 ($\chi^2=8.50$, $p<0.05$) 及 HBeAg 阳性率 ($\chi^2=135.80$, $p<0.05$); HBV-LP 含量 (A 值) 与 HBV DNA 拷贝数的对数值呈正相关关系 ($r=0.798$, $P<0.05$)。**结论:** 血清中 HBV-LP 的含量与 HBV DNA 的拷贝数相关性较好, HBV-LP 能准确的反应乙肝病毒复制情况, 是 HBeAg、PreS1 抗原的重要补充。

关键词 乙肝病毒包膜大蛋白; 乙肝病毒前 S1 抗原; 乙肝病毒 DNA; 乙肝病毒标志物

Significance of hepatitis B virus large protein (HBV-LP) detection and the relationship among HBV-LP, PreS1 and HBV DNA copies in infected serum *CHENG Zhen-bo, TAN Li-ming, Li Jian-ying, et-al. (Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410001, Hunan, China*

【Abstract】Objective To discuss the significance of hepatitis B virus large protein(HBV-LP) detection and the relationship among HBV-LP, PreS1 and HBV DNA copies. **Methods** Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) was used to detected the HBV-LP, PreS1-Ag, and HBV markers in 192 cases of infected serum,and the HBV DNA level was quantitatively measured by real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results** In 192 cases of infected serum the positive rate of HBV-LP, PreS1-Ag,HBV DNA, and HBeAg were 67.18%、54.17%、52.60% and 9.38%

基金项目: 湖南省医药卫生科研计划课题项目 (C2013-065)

【作者简介】程振波 检验师 研究生 湖南师范大学第一附属医院 湖南 长沙 410001 E-mail: zbcheng88hn@163.com

【通讯作者】谭黎明 硕士生导师，湖南省人民医院检验科副主任，tanliming838@163.com

respectively; the positive rate of HBV-LP was higher than that of PreS1-Ag ($\chi^2=6.82$, $p<0.05$), HBV DNA ($\chi^2=8.50$, $p<0.05$), and HBeAg ($\chi^2=135.80$, $p<0.05$); there was a positive correlation between the concentration of HBV-LP(A value) and the HBV DNA level ($r=0.798$, $P<0.05$). **Conclusion** The levels of HBV-LP was positively related with the number of copies of HBV DNA. Serum HBV-LP was a new laboratory marker that can accurately reflect HBV DNA reproduction, and was a helpful complementarity to traditional HBeAg and PreS1-Ag.

【Key words】Hepatitis B virus large protein; Hepatitis B virus PreS1-Ag; HBV DNA; HBV markers

乙型肝炎是我国重要的乙类传染病之一。目前临床上主要采用血清标志物检测来分析和判断患者的病情及传染性[1]。但是传统的血清标志物并不能很好的反应病毒在体内的复制及活动情况。HBV DNA 是乙型肝炎病毒（HBV）感染最为直接、最为灵敏和最为特异的指标[2]，通常被作为 HBV 感染及复制的金标准[3]。但开展 HBV DNA 检测对实验室要求严格，需要特殊的仪器设备。乙型肝炎病毒表面大蛋白（HBV-LP）是一种外膜蛋白，它存在于乙肝病毒 Dane 颗粒、亚病毒管状颗粒表面，是 HBV 形成完整外膜的重要标志，与病毒复制密切相关，对 HBV 复制有反式激活作用[4]。早期检测血清 HBV-LP 对乙型肝炎诊断、病毒复制、传染性强弱的判断和疗效预测与观察具有重要的临床意义。为进一步探讨 HBV-LP 检测对 HBV 感染者的诊断价值及其与 PreS1 抗原、HBV DNA 之间的关系，本研究对 192 例 HBV 感染者血清 HBV DNA, HBV M, PreS1 抗原及 HBV-LP 进行了检测分析。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取湖南省人民医院 2015 年 3 月至 2015 年 9 月乙肝感染者血清 192 份，诊断标准符合中华医学会肝病分会制定的病毒性肝炎防治方案 [5]，标本均于-80℃保存。HBV Pre-S1 抗原检测、HBV DNA 实时荧光聚合酶链反应（PCR）定量检测及 HBV M 检测试剂盒分别购自上海复星长征医学科学有限公司、湖南圣湘生物科技有限公司、北京万泰生物药业股份有限公司，检测 HBV-LP 的试剂盒由北京热景生物技术有限公司馈赠。

1.2 方法 ①乙肝大蛋白的检测：采用酶联免疫吸附（ELISA）法，试剂盒由北京热景生物

技术有限公司提供, 检测仪器上海科华 KHB ST-360 免疫检测酶标仪。严格按照试剂盒操作说明书进行操作, 结果判定通过酶标仪测出 OD 值, 临界值的定义为阴性对照孔平均 OD 值 $\times 2.1$, 阴性对照孔 OD 值低于 0.05 者按 0.05 计算。② HBV - DNA 定量检测: 采用荧光定量 PCR 法, 试剂购于由湖南圣湘生物科技有限公司, 检测仪器为美国应用生物系统公司生产的 7500 型 PCR 定量检测仪, 湖南湘仪 H1650R 台式高速冷冻离心机。严格按照试剂盒操作说明书进行操作, 结果以 5×10^2 copies/ml 为参考临界值, 大于 5×10^2 copies/ml 定义为阳性。③HBV Pre-S1 抗原及 HBV M 检测: 采用酶联免疫吸附(ELISA)法, 试剂盒分别由上海复星长征医学科学有限公司和北京万泰生物药业股份有限公司提供, 检测仪器上海科华 KHB ST-360 免疫检测酶标仪。严格按照试剂盒操作说明书进行操作, 结果判定通过酶标仪测出 OD 值, HBV Pre-S1 临界值的定义为阴性对照孔平均 OD 值 $\times 2.5$, 阴性对照孔 OD 值低于 0.05 者按 0.05 计算; HBV M 临界值的定义为阴性对照孔平均 OD 值 $\times 2.1$, 阴性对照孔 OD 值低于 0.05 者按 0.05 计算。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。各种检测指标阳性率的比较均采用 χ^2 检验, HBV-LP 含量与 HBV DNA 的拷贝数的相关性分析采用频数表的相关与回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV-LP, PreS1 抗原, HBV DNA, HBeAg 阳性率的比较 从表 1 可见, HBV-LP, PreS1 抗原, HBV DNA, HBeAg 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=146.96$, $P < 0.05$); 进一步统计分析表明, HBV-LP 阳性率高于 PreS1 抗原 ($\chi^2=6.82$, $P<0.05$)、HBV DNA 阳性率 ($\chi^2=8.50$, $P<0.05$) 及 HBeAg 阳性率 ($\chi^2=135.80$, $P<0.05$), PreS1 抗原与 HBV DNA 阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2=0.094$, $P > 0.05$)。血清 HBV-LP、PreS1 抗原和 HBV-DNA 配对检测情况见表 2

表 1 血清 HBV-LP、PreS1 抗原、HBeAg 检测结果

项目	阳性数	阴性数	阳性率 (%)
HBV-LP	129	63	67.18
PreS1 抗原	104	88	54.17
HBeAg	18	174	9.38
HBV DNA	101	91	52.60

表 2 血清 HBV-LP、PreS1 抗原和 HBV-DNA 配对检测情况

HBV DNA	PreS1 抗原		HBV-LP		总计
	+	-	+	-	Total
+	91	10	97	4	101
-	13	78	32	59	91
合计 Total	104	88	129	63	192

2.2 HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性分析 结果见图 1。血清 HBV DNA 拷贝数的对数值与 HBV-LP 含量（A 值）的相关系数 $r = 0.798 (P < 0.05)$ ，回归方程为 $Y = 4.4779X + 0.8081$ 。这一结果说明血清中 HBV DNA 拷贝数的对数值与 HBV-LP 含量（A 值）具有正相关关系。

图 1.HBV 感染者血清 HBV DNA 拷贝数的对数值与 HBV-LP 含量（A 值）变化趋势图

3 讨论

乙型肝炎是影响人类健康的主要传染病之一，其不仅感染率高，而且易于慢性化，引起肝硬化和原发性肝癌[6]。我国属高地方性流行地区，人群中 HBsAg 流行率为 9.09%[7]。据 WHO 估计全世界大约有 3.5 亿 HBV 感染者，仅中国就有 1.2 亿 HBV 携带者[8]。HBV 是一种嗜肝 DNA 病毒，其 S 基因编码 3 种外膜蛋白，分别是主蛋白（即 HBsAg）、中蛋白（即 HBsAg 和 Pre-S2 蛋白）和大蛋白（HBV-LP）[4]。目前临床上对 HBV 复

制的判断主要依靠血清 HBeAg 检测及 HBV DNA。但是当 HBV 前 C 区终止密码子发生变异后, 会出现 HBeAg 阴性而病毒仍在复制的情况, 在我国就约有 1/3 的慢性乙型肝炎患者 HBeAg 阴性但仍伴有较高水平的 HBV 复制[9]。因此, 用 HBeAg 来判断乙肝病毒复制存在一定程度的假阴性。近年来有研究表明 Pre-S1 抗原能够反映 HBV 的复制情况[10], 但目前 Pre-S1 蛋白检测试剂盒包被单抗仅仅针对线性表位, 而实际编码 Pre-S1 蛋白的 Pre-S 区具有较为复杂的拓扑结构[8], 造成临床使用的 Pre-S1 试剂盒容易出现漏检。HBV DNA 虽能直接反映体内 HBV 的复制情况, 但是昂贵的检测设备和高要求的实验条件致使该项检测不能普及开展。

乙型肝炎病毒表面大蛋白 (HBV-LP) 是一种 HBV 包膜蛋白, 它具有双重跨膜拓扑构象, 内侧可与 HBV 核壳体膜结合, 外侧可与易感细胞受体结合, 是 HBV 颗粒包装成熟的关键[11]。已有研究表明, HBV-LP 的存在与 HBV 的复制密切相关[12,13]。检测血清 HBV-LP 对体内 HBV 复制情况的判定具有一定意义。而目前研究使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测血清 HBV-LP, 包被的抗体为应用结构生物学、蛋白晶体学针对 HBV 前 S 区双重拓扑构象型单克隆抗体, 对实验设备的要求不高, 一般基层医院均可开展, 近几年得到了广泛的研究 [14]。

本研究采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法对 192 例 HBV 感染者血清中的 HBV-LP、PreS1 抗原及 HBV M 进行检测, 结果显示: HBV-LP 阳性 129 例, 阳性率为 67.18%; PreS1 抗原阳性 104 例, 阳性率 54.17%; HBeAg 阳性 18 例, 阳性率 9.38%。同时应用荧光定量 PCR 方法检测血清 HBV DNA, 结果以 5×10^2 copies/ml 为参考临界值, 大于 5×10^2 copies/ml 定义为阳性。结果显示 HBV DNA 阳性 101 例, 阳性率 52.60%。统计分析表明, HBV-LP, PreS1 抗原, HBV DNA, HBeAg 阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HBV-LP 阳性率高于 PreS1 抗原 ($P < 0.05$)、HBV DNA ($P < 0.05$) 和 HBeAg 阳性率 ($P < 0.05$), PreS1 抗原与 HBV DNA 阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 HBV-LP 可作为 PreS1 抗原, HBV DNA, HBeAg 的有益补充。进一步分析发现, 血清中 HBV DNA 拷贝数的对数值与 HBV-LP 含量 (A 值) 具有正相关关系 $r = 0.798 (P < 0.05)$, 与吴正林[15]、王志东[16]等报道一致。研究结果表明在 HBV 感染者血清中 HBV-LP 检测较 HBV PreS1 抗原, HBV DNA, HBeAg 敏感, 更能准确反映 HBV 复制状态。因此, 合理开展 HBV-LP 检测对 HBV 感染与复制的判断、疗效及预后的评估具有重要的临床意义。

HBV 核酸虽为双链 DNA, 仍有变异倾向。特别是在长期治疗、持续免疫压力下, HBV 基因频繁突变, 由于检测方法与灵敏度的缺陷, HBV DNA 可出现假阴性结果, 致

使 HBV DNA 阴转并不能真实反映体内 HBV 感染及复制情况出现。而 HBV-LP 检测采用的是单克隆抗体特异性识别, 受基因变异影响小。含 HBV-LP 的亚病毒颗粒的数量是完整病毒颗粒的 10000 倍以上, 可反式激活病毒再复制, 其在血液中消退也晚于 HBV DNA[17]。目前研究认为 HBV-LP 检测比 HBV DNA 能更好的反应 HBV 的复制状态[18]。且 HBV-LP 检测不需要特殊设备, 操作简便, 一般实验室及基层医院均可开展。

参考文献

- [1]杨秀清, 高蕾, 彰颖, 等. 乙型肝炎患者 HBV DNA 定量与血清标志物的关系分析[J]. 检验医学与临床, 2009,6(16):1322-1334.
- [2]蔡兰兰, 祝玲玲. 乙肝 HBV DNA 荧光定量检测与乙肝五项及 Pres1 相关性分析[J]. 实用预防医学, 2014,21(10):1171-1172.
- [3]卜国平, 开远胜. 乙型肝炎病毒潜 S1 抗原的实验室检测及其应用[J]. 实用肝病杂志, 2007, 10(4):250-251.
- [4] Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition[J]. J Virol, 2005, 2005(79): 9786-9798.
- [5] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙肝防治指南[J]. 医药导报, 2006, 25: 116-1201.
- [6]毛远丽, 李伯安, 马洪滨等. 乙肝患者外膜蛋白血清学检测及对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(3): 276-278.
- [7]梁晓峰, 陈园生, 王晓军等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(3): 655-658.
- [8] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. J Gen Virol, 2004, 85: 1221-1225.
- [9]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, 5(13): 539.
- [10] 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: 6730-6734.
- [11] 刘键, 蒋英, 吴正林, 等. 乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒外膜大蛋白 (LHBs) 的检测分析[J]. 实用预防医学, 2014,21(5):607-609.
- [12] Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain

involved in receptor recognition[J]. J Virol, 2005, 2005(79): 9786-9798.

[13]Paran N,CooperA,ShaulY. Interaction of HBV with cells[J].Rev Med Viol,2003,13(3):137-143

[14] 熊俊, 刘欧, 石文静. e 抗原阴性慢性乙肝患者血清中乙肝表面抗原大蛋白的表达[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 35-36.

[15] 吴正林, 陆学东, 钟小强等, HBeAg 阳性患者乙型肝炎表面大蛋白水平的变化及其与 ALT 的关系[J].中国实验诊断学, 2008,12(3):890-892.

[16] 王志东, 王亚, 李颢, 乙型肝炎大蛋白 (LHBs) 在慢性乙型肝炎患者中检测结果分析[J].国际检验医学杂志, 2011,32(14):1628-1629.

[17] Yamada T,Iwabuki H,Kanno T,et al.Physicolchemical and immunological characterization of HBV envelope particles[J].Vaccine,2001,19:3154-3163.

[18] 徐爱芳, 陈刚, 张永乐,等.乙型肝炎病毒表面大蛋白研究进展[J].肝脏杂志, 2009,14 (6) :505-506.