

论 著

动态评价联合检测乙肝病毒前 S1 抗原与核心抗原的临床意义

华中科技大学同济医学院附属同济医院 王坤 田德英 章述军 周健 夏宁邵¹
黄元成*, 武汉 430030

摘要 目的: 探讨联合检测乙肝病毒前 S1 抗原和核心抗原与 HBV DNA 的关系以及在乙肝诊疗中的意义。方法: 对 100 例慢性乙肝患者的 346 份系列血清和 486 例正常对照血清采用实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 进行 DNA 定量检测, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行乙肝病毒前 S1 抗原和核心抗原的联合检测 (检测结果以 HBV NRAg 表示) 及对乙肝血清标志物进行定性检测。结果: 342 份 HBV DNA (+) 的血清中, 有 338 份 HBV NRAg 检测为阳性, 灵敏度为 98.8% (95% CI: 0.970~0.995), HBV NRAg 特异度为 99.6% (95% CI: 0.985~0.999)。45 例患者的系列血清 HBV NRAg 的 OD 均值随着 HBV DNA 拷贝数降低而下降, 且具有一定的相关性 ($r=0.721$)。其中有两位患者的血清标本出现了 HBV DNA 阴转。此外在 46 例不明原因肝功能不良患者中, 发现 3 例 HBsAg (-), HBV DNA (+) 的慢性乙肝患者。结论: 联合检测乙肝病毒前 S1 和 HBcAg 不仅能反映乙肝患者体内 HBV 复制情况, 而且对抗病毒药物在临床的使用具有一定的指导作用。

关键词 乙型肝炎病毒 前 S1 抗原 核心抗原 HBV DNA

中图分类号 R512.6 文献标识码 A

Clinical Significance of Dynamic Evaluation of Combined Detection of Hepatitis B Virus Pre S1 Antigen and Core Antigen WANG Kun, TIAN Deying, ZHANG Shujun, et al. Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To explore the correlation of combined detection of Pre S1 antigen and hepatitis B core antigen with HBV DNA as well as its significance in diagnosing and treating hepatitis B. Methods: HBV DNA in serum samples from 100 chronic hepatitis patients and 486 normal controls were detected by means of Quantitative Real-Time TaqMan PCR (FQ-PCR), HBV Pre-S1 combined with HBcAg and hepatitis B serum markers were detected by HBV NRAg ELISA. Results: Among 342 serum samples with HBV DNA (+), 338 cases showed HBV NRAg positive, the sensibility of HBV NRAg was 98.8% (95% CI: 0.970~0.995), the specificity was 99.6% (95% CI: 0.985~0.999). Mean optical density (OD) of HBV NRAg decreased as the level of HBV DNA dropped in 45 patients, and have some relevance ($r=0.721$). HBV DNA became negative in serum samples of 2 patients. In addition, 3 cases with chronic hepatitis B were found to have HBsAg (-) and HBV DNA (+) in 46 cases with unexplained liver dysfunction. Conclusions: Combined detection of Hepatitis B virus Pre S1 antigen and core antigen not only reflects the replication of HBV in patients with hepatitis B, but also shows guiding significance for clinical application of antiviral drugs.

Key words Hepatitis B virus Pre S1 antigen Hepatitis B core antigen HBV DNA

长期以来, HBV DNA 是判定乙肝患者是否具有病毒复制及传染性的金标准^[1]。近年来由于 HBV 变异株的出现, 导致 HBeAg (-)、HBV DNA (+) 的慢性乙肝患者所占比例较前明显升高^[2]。从而降低了 HBeAg 作为临床上评价病毒复制的价值。有实验数据显示: 采用双抗体夹心 ELISA 法联合检测 HBV 前 S1 和核心抗原, 其检测结果和荧光

定量 PCR 检测结果符合率较高, 并能有效检出由于前 C 基因变异导致的 HBeAg (-)、HBV DNA (+)^[2] 和 S 基因“a”表位变异导致的 HBsAg (-)^[3] 的乙肝患者。为进一步探讨联合检测 HBV 前 S1 和核心抗原的临床意义, 我们对 100 例慢性乙肝患者的系列血清进行了检测, 以探讨其临床应用价值。

资料与方法

标本来源 收集 2007 年 6 月~2008 年 5 月我院住院的 100 例慢性乙肝患者 (男 68, 女 32) 的系列

¹ 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

* 通讯作者: 黄元成, E-mail: tjyhc@soho.com

血清共 346 份, 年龄 18~ 70 岁, 平均(44±8) 岁。系列血清入选标准: FQ-PCR 检测 HBV DNA > 10⁴ copies/ml, ALT 为 80~ 200 U/L, 既往未行抗病毒治疗(包括核苷类似物及干扰素), 现拟以核苷类似物抗病毒治疗, 采集患者用药前 1 次和用药后连续至少 2 次, 采集间隔(10±3) d。46 例不明原因肝功能不良患者血清标本(男 29, 女 17)。未分型肝炎入选标准: 经检测 HBsAg(-), 抗 HCV(-), 抗 HAV(-), 抗 HEV(-), 肝功能反复异常> 6 月, 排除慢性酒精性肝炎, 非酒精性脂肪肝, 药物性肝炎, 自身免疫性肝病, 遗传性肝病等。正常对照血清 486 份, 来自感染科门诊和体检中心, 均经 ELISA 法检测为 HBsAg(-), FQ-PCR 检测 HBV DNA < 10³ copies/ml。标本采集方法: 空腹条件下抽取静脉血 5ml, 4000 r/min, 离心 10 min, 分离血清 1~ 2 ml, -70℃下保存, 半年内检测。诊断标准参照 2000 年 9 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》^[4]。

试剂和方法 采用 ELISA 法对 HBV 血清学标志物进行检测, 试剂购自上海科华生物技术有限公司, 仪器为 Alice Quality system 全自动分析仪。HBsAg、HBsAb、HBeAg 的判定为样品 OD 值> 阴性对照均值的 2.1 倍为阳性。HBeAb、HBcAb 的判定为样品 OD 值< Cut Off 值为阳性。所有具体操作均严格按照说明书进行, 并同步做质控。

采用 FQ-PCR 方法对 HBV DNA 进行检测, 试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司, 仪器为德国 Roche 公司生产的 Light Cycler 自动荧光 PCR 仪, 所有具体操作均严格按说明书操作。检测下限为 1×10³ copies/ml, 以多区段巢式 PCR 作为 HBV DNA 金标准。检测方法: 以蛋白酶 K 法提取, 采取适当引物进行巢式 PCR。程序如下: 95℃ 10 min, 95℃ 40 s, 53℃ 40 s, 72℃ 40 s, 35 个循环(第 2 轮 25 个循环, 退火温度升至 55℃)。S 区外侧引物 aF1: 5'-GTCTGCGGCGTTTATC-3' 和 aR1: 5'-ACAGTGGGGAAAGC-3', 内侧引物 aF2: 5'-TGGCCGTTT GTCCTCTA-3' 和 aR2: 5'-AGAAACGGRCTGAGGC-3' (产物约 200 bp)。前 C 区外侧引物 pcF1: 5'-CACCTCTGCCTAATCATCTC-3' 和 pcR1: 5'-ATGCTCAGGAGACTCTAAGG-3', 内侧引物为 pcF2: 5'-ACTGTTCAAGCC TCCAAGCT-3' 和 pcR2: 5'-AAGGAAAGAAGTCAGAGGC-3' (产物约 120 bp)。引物均为上海英骏公司合成。

采用双抗体夹心 ELISA 法检测 HBV 前 S1 和

HBcAg(HBV NRAg) 酶标板预包被抗前 S1 和 HBcAg 单抗, CUT OFF= 0.12+ 阴性对照 OD 均值, 结果以 HBV NRAg 表示。阳性表示血清中前 S1 和/或 HBcAg 阳性。试剂盒由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心研制, 北京万泰生物药业有限公司生产。

统计学处理 采用 SPASS 13.0 软件进行统计分析, 率的比较采用 χ^2 检验, 一致性比较采用 Kappa 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 组间的两两比较采用 χ^2 分割法, 并以公式 $\hat{a}' = a/2(k-1)$ 估计检验水准。

结 果

灵敏度和特异性 346 份血清中, HBV DNA > 10³ copies/ml 者共 328 份。对 18 份 HBV DNA 阴性标本行多区段巢式 PCR 检测, 其中 14 份血清 HBV DNA 阳性。在此 342 份 HBV DNA 阳性血清中, 338 份标本 HBV NRAg 阳性, 灵敏度为 98.8% (95% CI: 0.970~ 0.995)。486 份正常对照血清标本进行 HBV NRAg 检测, 有 4 份 HBV NRAg 阳性, 其中 2 份经多区段巢式 PCR 检测为 HBV DNA 阳性, 特异度为 99.6% (482/484) (95% CI: 0.985~ 1.999)。

HBV DNA 拷贝数和 HBV NRAg OD 均值相关性比较 100 例慢性乙肝患者的血清标本中(共 346 份), 有 45 位患者(共 159 份)所测 NRAg OD 值随 HBV DNA 拷贝数的降低而下降。在此 159 份标本中, HBV NRAg OD 均值和 HBV DNA 拷贝数具有一定的相关性, $r = 0.721$, 见表 1, 图 1。

表 1 系列血清标本分组

分组	n	HBV DNA (copies/ml)
1 组	27	0~ 10 ³
2 组	71	10 ³ ~ 10 ⁵
3 组	48	10 ⁵ ~ 10 ⁸
4 组	13	> 10 ⁸

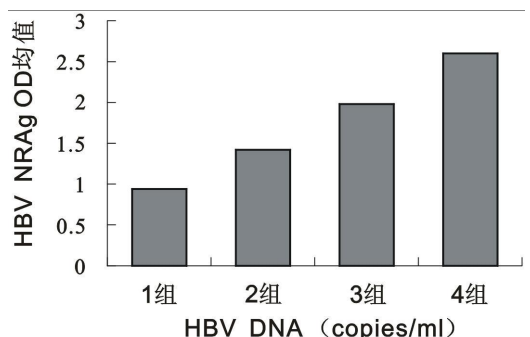


图 1 HBV DNA 拷贝数和 HBV NRAg OD 均值相关性比较

HBV NRAg 与 HBV DNA 的一致性 本研究检测的 832 份血清标本中, HBV NRAg 与 HBV DNA 的总符合率为 97.3%, Kappa 值 0.945 (Kappa > 0.75), 见表 2。

表 2 HBV NRAg 与 HBV DNA 的检测结果

HBV DNA	HBV NRAg		合计
	+	-	
+	324	4	328
-	18	486	504
合计	340	490	832

表 3 HBV NRAg 和 HBV DNA 在不同 HBV-M 模式中的检出情况

HBV-M 模式	例数		HBV NRAg(+)		HBV DNA(+)	
	n	%	n	%	n	%
H BsAg(+)+ H BeAg(+)+ H BcAb(+)	129	37.3	126	97.7	128	99.2
H BsAg(+)+ H BeAb(+)+ H BcAb(+)	112	32.4	109	97.3	110	98.2
H BsAg(+)+ H BcAb(+)	95	27.5	95	100	94	98.9
H BsAg(+)+ H BeAb(+)+ H BsAg(+)	10	2.8	9	90	10	100
合计	346	100	340	98.3	342	98.8

DNA 拷贝数的升高, HBV NRAg 阳性率亦随之升高, 差异有显著性($x^2 = 35.099, P < 0.05$)。进行组内两两方差分析示, 当 HBV DNA > 10^3 (copies/ml) 时, 其阳性率之间, 差异无显著性 ($P > 0.007$)。当 HBV DNA < 10^3 (copies/ml) 时, 其阳性率与其他各组比较, 差异有显著性 ($x^2 = 9.321, P < 0.007$; $x^2 = 31.386, P < 0.007$; $x^2 = 11.118, P < 0.007$)。在 HBV DNA > 10^3 (copies/ml) 的血清中, H BeAg 的阳性检出率仅为 38.3%, 见表 4。

表 4 HBV DNA 载量与 HBV NRAg 阳性结果比较

HBV DNA 载量 (copies/ml)	例数		HBV NRAg(+)		H BeAg(+)	
	n	%	n	%	n	%
> 10^8	39	11.3	39	100*	16	41.1
$10^5 \sim 10^8$	181	52.3	180	99.4*	82	45.3
$10^3 \sim 10^5$	108	31.2	105	97.2*	26	24.1
$0 \sim 10^3$	18	5.2	14	77.8	4	22.2

注: 组间的两两比较采用 x^2 分割法, 以公式 $\hat{a} = a/2(k-1)$ 估计检验水准, 得 $\hat{a} = 0.007$, 与 $0 \sim 10^3$ 相比较, * $P < 0.007$

HBV NRAg 对不明原因肝功能不良患者的检测 46 份不明原因肝功能不良患者血清中, 3 份 HBV NRAg 检测为阳性, 其 OD 值分别为 0.341、0.475、0.145。均值仅为 0.32。后对此 3 份标本进行重复 HBV DNA 多区段巢式 PCR 检测, 证实为 HBV DNA(+), H BsAg(-) 的慢性乙肝患者。

不同 HBV 标志物模式中 HBV NRAg 和 HBV DNA 的检出率 HBV NRAg 在 H BsAg 阳性的标本中检出率为 98.3% (340/346), H BeAg 阳性率为 37.9% (129/346), 而 HBV DNA 阳性率为 98.8% (342/346), 差异有统计学意义 ($x^2 = 115.07, P < 0.05$)。各种模式 HBV NRAg 阳性率之间, HBV DNA 阳性率之间均无显著性差异 ($x^2 = 5.474, P > 0.05$; $x^2 = 0.678, P > 0.05$), 见表 3。

HBV DNA 拷贝数与 HBV NRAg 及 H BeAg 之间的关系 在 346 份血清标本中, 随着血清 HBV

讨论

临床上常通过检测乙肝血清标志物, 尤其是 H BsAg 和 H BeAg, 来判断病毒的复制情况^[5,6]。近年来, 随着乙肝疫苗、核苷类似物的长期临床应用, 出现部分病毒基因组前 C 区或 C 区启动子变异, 致使 H BeAg 的形成和分泌发生障碍^[7]。形成一部分 H BeAg 阴性而体内仍然存在病毒复制的慢性乙肝患者。据报道亚洲地区平均 50% 的 H BeAg 阴性的慢性乙肝患者存在 C 区突变^[8]。并且证实此类患者更易发展至慢性乙肝, 部分最终可演变为肝硬化甚至肝癌^[9]。有报道证实利用生物探针杂交法检测发现乙肝病毒前 S1 抗原的表达与 H BcAg, HBV-DNA 的表达相平行。前 S1 抗原主要存在于 Dane 颗粒区带^[10], 是 HBV 外膜蛋白最前端的一部分。Yuki 等^[11]报道前 S1 抗原与 HBV 的复制指标具有较好的一致性, 并且前 S1 抗原在患者血清的阳性率可达 75%^[12]。通过对乙肝病毒前 S1 抗原的检测可间接的反映患者体内 HBV 的复制情况, 却不能避免由于 H BsAg“a”抗原表面的变异, 而导致的 H BsAg(-), HBV DNA(+) 乙肝患者的漏检。乙肝病毒核心抗原 (H BcAg) 是 Dane 颗粒的重要结构蛋白, 其血清内含量浓度与 HBV DNA 含量高度相关。通过对 H BcAg 进行检测, 可弥补乙肝病毒前

(下转第 145 页)

chicken and egg" question. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2000, 10: 275.

- 3 Sarafidis PA, Lasaridis AN. Insulin resistance and endothelin: another pathway for renal injury in patients with the cardiometabolic syndrome? *J Cardiometab Syndr*, 2008, 3: 183.
- 4 Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature physiology and pathophysiology. *J Vasc Res*, 2001, 38: 415.
- 5 Holzl B, Iglseider B, Stadlmayr A, et al. Intima media thickness of carotid arteries is reduced in heterozygous carriers of the Gly972A rg variant in the insulin receptor substrate-1 gene. *Eur J*

- 6 Guerre Millo M, Gervois P, Raspe E, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem*, 2000, 275: 16638.
- 7 Ide T, Shimano H, Yahagi N, et al. SREBPs suppress IRS mediated insulin signaling in the liver. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 351.
- 8 Pollare T, Lithell H, Berne C. Insulin resistance is a characteristic feature of primary hypertension independent obesity. *Metabolism*, 1990, 39: 167.

(2008-12-14 收稿 2009-04-02 修回)

(上接第134页)

S1 抗原由于变异而导致的漏检现象。

本研究中 342 份 HBV DNA(+) 的血清中仅 37.4% 为 HBeAg 阳性, 而 HBV NRAg 检测的灵敏度达 98.8%。此外, 通过对 HBV NRAg 和荧光定量 PCR 这两种方法进行比较, 证实具有较好的一致性, 总符合率达到 97.3% (Kappa 值 0.945)。表明 HBV NRAg 对于判定乙型肝炎患者体内病毒是否复制优于 HBeAg, 与 HBV DNA 具有相似的临床价值。同时研究结果显示 HBV DNA 拷贝数与 HBV NRAg OD 具有一定的相关性 ($r = 0.721$)。提示虽然 HBV NRAg 检测为一种 HBV DNA 定性检测方法, 但可以通过分析其 OD 值的变化, 对动态监测抗病毒疗效有一定的临床指导意义。本研究还发现, HBV DNA 阴性时, HBV NRAg 检测的阳性率较 HBV DNA 阳性时有明显下降 ($P < 0.007$)。可能是随着抗病毒药物的使用, 虽然 HBV DNA 并未阴转, 但大部分已接近临界值, 故检出率降低。此外, 对 46 例未分型肝炎患者血清标本进行检测, 发现有 3 份 HBV NRAg OD 值为弱阳性。后经多区段巢式 PCR 检测证实, 为 HBsAg(-), HBV DNA (+) 的乙肝患者。可能是 HBV DNA 低水平感染导致抗原量过低或先天 S 基因和或前 C 区变异等引起。

综上所述, 对乙肝患者进行乙肝病毒前 S1 抗原和核心抗原的联合检测, 不仅能准确的反映患者体内的病毒复制情况, 而且能对部分变异株进行有效的筛查。对于目前 HBV DNA 定量检测尚未普及的情况下, 可以补充常规以乙肝全套作为评价感染性的一些不足, 在同等意义上讲, 可以运用 HBV

NRAg 来替代 HBV DNA 检测判定其感染性。

参考文献

- 1 程钢, 何笙韶, 周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒. *中华医学检验杂志*, 1999, 22: 135.
- 2 成军. 应充分重视 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者的诊断与治疗. *中华传染病杂志*, 2006, 24: 1.
- 3 Jongerius JM, Wester M, Cuypers HT, et al. New hepatitis B virus mutant from a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion*, 1998, 38: 56.
- 4 中华医学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8: 324.
- 5 Trepo C, Zoulim F, Alonso C, et al. Diagnostic markers of viral hepatitis B and C. *Gut*, 1993, 34: S20.
- 6 Petit MA, Buffelø-Le Guillou D, et al. Residual hepatitis B virus particles in liver transplants recipients receiving lamivudine: PCR quantitation of HBV DNA and ELISA of PreS1 antigen. *Med Virol*, 2001, 65: 493.
- 7 Cuthbert JA. Hepatitis B-molecular variants with clinical significance. *Am J Med Sci*, 1991, 302: 396.
- 8 Funk ML, Rosenberq DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat*, 2002, 9: 52.
- 9 Chen CH, Hung CH, Lee CM, et al. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*, 2007, 133: 1466.
- 10 Petit MA, Zoulim F, Capel F, et al. Variable expression of Pre S1 Antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: An accurate marker for the level of hepatitis B virus reapplication. *Hepatology*, 1991, 11: 809.
- 11 Yuki N, Hayashi N, Katayama K, et al. Quantitative analysis of Pre-S1 and Pre-S2 in relation to HBsAg expression. *Hepatology*, 1990, 11: 38.
- 12 Zhang YY, Yu ZQ, Wan YK, et al. Comparison of pre-S1 and pre-S2 proteins in hepatocytes with replication by in situ hybridization assay. *Tongji Med Univ*, 1990, 10: 150.

(2008-11-11 收稿 2009-04-10 修回)