

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.10.016

· 综述 ·

乙型肝炎病毒标志物研究的若干进展

Advances in the research of hepatitis B virus markers

付 沙(FU Sha), 黄 燕(HUANG Yan), 范学工(FAN Xue-gong)

(中南大学湘雅医院病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Key Laboratory of Viral Hepatitis of Hunan Province, Changsha 410008, China)

[关键词] 乙型肝炎病毒; 标志物; 原发性肝癌; preS/s 蛋白; HBx; LHBs

[中图分类号] R512.6+2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2014)10-0635-04

乙型肝炎仍是当前危害人民健康最严重的传染病之一, 每年约有 100 万人死于乙型肝炎病毒(HBV)感染所致的肝硬化、肝衰竭和原发性肝癌。近年来, 随着 HBV 标志物检测技术的迅速发展, 学界认识到 HBV 标志物在乙型肝炎患者管理中具有重要的指导意义, 并且某些 HBV 标志物的病理作用被进一步认识。本文对此领域的若干进展作一综述。

1 HBV 标志物发现的简要历史

1963 年, Blumberg 等^[1] 在一名澳大利亚人血液中发现一种新抗原, 该抗原与一例经多次输血的血友病患者的血清可发生凝集, 而在其他人中则无此凝集反应, 当时称此抗原为“澳大利亚抗原”(简称“澳抗”)。1965 年, Krugman 在血清肝炎者的血中发现“澳抗”阳性率甚高, 传染性肝炎中为阴性, 依此将肝炎分为“长潜伏期肝炎”及“短潜伏期肝炎”^[2], 而无注射史的“澳抗”阳性者均纳入“长潜伏期”组。这是肝炎诊断学中的第 1 个血清学指标。1969 年, 国际肝炎学会决定将“澳抗”改名为肝炎相关(协同)抗原 (hepatitis B associated antigen, HAA)。1972 年, 巴黎肝炎国际协会将“长潜伏期肝炎”和“短潜伏期肝炎”分别改称为“乙型病毒性肝炎”和“甲型病毒性肝炎”。HAA 只存在于乙型肝炎, 命名为乙型肝炎抗原 (hepatitis B antigen, HBAg)。1974 年,

美国病毒性肝炎委员会建议将乙型肝炎的抗原抗体系统统一命名为“HBsAg(乙型肝炎表面抗原)、HBcAg(乙型肝炎核心抗原)、HBeAg(乙型肝炎 e 抗原)、HBsAb(乙型肝炎表面抗体)、HBeAb(乙型肝炎 e 抗体)、HBcAb(乙型肝炎核心抗体)”, 即为当前的 HBV 标志物(HBV-markers)。

2 HBV 标志物从定性到定量

近年来, 对 HBV-M 的实验室研究已有很大的突破。从最初的对 HBsAg 的单项检测, 至乙型肝炎“两对半”(HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、抗 HBc)检测的广泛普及; 各种试剂盒的不断被研发, 人们可以用更加敏感及特异的方法检测患者血清中的标志物以确定肝炎病毒的存在, 为病毒性肝炎的早期诊断及鉴别诊断, 有无传染性, 乙型肝炎疫苗效果的考核等方面提供可靠的实验室依据。目前国内检测“乙肝两对半”最常用的方法是酶联免疫吸附试验(ELISA); 作为一种传统的定性方法, 因其本身的方法学的局限性, 容易造成乙型肝炎的漏诊。为了进一步满足临床的需求, 随后免疫发光检测技术在临床实验室普及应用, 实现了对 HBV 血清学标志物从定性检测到定量的跨越。时间分辨荧光免疫法(TRFIA)是近 10 年发展起来的一种高灵敏度的定量检测方法。其检测的线性范围更广, 不仅能提供“阴”、“阳”性结果, 而且能检测“乙肝两对半”5 项指标的浓度变化, 间接反映体内 HBV 复制活跃程度,

[收稿日期] 2014-04-01

[作者简介] 付沙(1989-), 女(汉族), 江西省宜春市人, 硕士, 主要从事炎症介质在肝脏疾病中作用的研究。

[通信作者] 范学工 E-mail: xgf@hotmail.com

为临床评价药物疗效提供动态数据,从而达到指导临床用药的目的。

此外,随着 HBV-M 定量检测方法的研究进展和其临床价值的进一步扩展,研究^[3]表明,HBsAg 定量可用于判断 HBV 复制活跃程度,可作为评价抗病毒治疗效果的一项重要指标;快速下降提示良好的应答和预后^[4-6]。在治疗过程中定期监测 HBsAg 定量和 HBV DNA,有助于了解 HBV 对核苷(核苷酸)类似物或干扰素等药物的应答情况,对不同应答患者制定个体化诊疗疗程具有重要参考价值,是乙型肝炎研究历程中的一个重要的里程碑。

目前有两种试剂用于定量检测血清 HBsAg 水平,分别为美国雅培公司和德国罗氏公司的 HBsAg 检测试剂。其中使用最为广泛的是雅培表面抗原检测方法。雅培等主流试剂 HBsAg 检测范围为 0.05~250.00 IU/mL,但临床乙型肝炎患者 HBsAg 水平大多集中在 100~500 000 IU/mL,这意味着临床急需中高值 HBsAg 定量检测试剂。雅培试剂可通过定量稀释法扩大线性检测范围,而新型罗氏诊断 ElecsysU HBsAg II 定量检测试剂盒也已上市,其线性范围达到 0.05~52 000.00 IU/mL。

HBcAg 为 HBV 的核心蛋白,由 HBV 基因组的 C 开放读码区编码。其主要在受染肝细胞浆中产生并装配成核衣壳,对 HBV 复制、调节以及激发机体免疫反应均起重要作用。既往研究^[7]表明,血清 HBcAg 能反映血清中 Dane 颗粒的存在,其定量结果与肝内 HBcAg 抗原及血清 HBV DNA 呈高度正相关,可作为治疗过程中 HBV DNA 的替代指标监测抗病毒疗效。目前,HBcAg 发光定量检测试剂已完成实验室研究和性能的初步评价,该检测方法不仅简单方便,而且廉价快捷,相对于血清 HBV DNA 的检测显示出良好的优越性。

3 肝组织中乙型肝炎标志物的研究

血清 HBV 标志物的检测虽然简单方便,但受很多其他因素的影响可出现假阳性及假阴性。在临床实践中,由于病毒基因片段的变异,有一部分患者虽然血清学 HBsAg 阴性、HBeAg 阴性及抗 HBs 阳性,但已有肝硬化临床症状及影像学表现,故血清 HBV 标志物并不能完全代表肝组织内 HBV 感染的真实情况。近年来,随着肝穿刺活检技术在临床的广泛开展,肝组织内 HBV-M 的检测为我们进一步了解肝组织内 HBV-M 的表达方式、表达强度以

及与血浆 HBV DNA 定量、肝脏损伤程度之间的关系提供了一种新的途径。

肝组织内共价闭合环状 DNA(cccDNA)是近年来兴起的一项检测指标。cccDNA 是 HBV 前基因组 RNA 复制的原始模板,它贯穿于 HBV 感染的整个自然史,是 HBV 持续感染和抗病毒药物停用后病情反复的关键因素。目前大部分学者认为只有清除了细胞核内的 cccDNA 才能彻底消除乙型肝炎患者病毒携带状态。相关研究^[8]表明, α -干扰素通过改变 cccDNA 微小染色体的表观遗传修饰,从而抑制嗜肝病毒的转录。阿德福韦酯通过一种非细胞溶解方式在抗病毒治疗 48 周后可使肝组织内 cccDNA 的含量下降 0.80 log copies/cell^[9]。OC-22 可通过一种靶向针对核 cccDNA 微小染色体外遗传控制的小分子抑制 HBV 的转录和翻译^[10]。然而,现有的抗病毒治疗药物如核苷酸(核苷)类似物(NA)主要抑制 HBV DNA 聚合酶,而干扰素主要通过诱导机体产生抗病毒蛋白发挥作用,两者均不能彻底清除肝组织内的 cccDNA。因此,现有的抗病毒药物并不能使乙型肝炎患者痊愈。当前研究趋势表明:彻底清除细胞核内 cccDNA 或使其基因表达沉默,将成为日后抗病毒治疗的一个潜在方向。

4 HBV 标志物与原发肝癌(HCC)的关系

世界范围内,HBV 感染的人群超过 4 亿,其中 1/3 的感染发生在中国。在中国大陆,特别是东南沿海的肝癌高发区,在 HCC 患者中,有 HBV 感染背景者占 90% 以上;在台湾,慢性 HBV 感染的男性患者发生 HCC 的概率是无病毒携带者的 102 倍。有研究^[11-12]表明,通过对儿童接种乙肝疫苗后,其 HBV 相关的 HCC 发病率及死亡率均下降。HBV 感染与肝癌的发生密切相关,已被众多流行病学资料证实。

鉴于 HBV 感染在 HCC 发生发展中的重要作用,反映 HBV 存在的 HBV-M 与肝癌的关系也逐渐成为国内外的研究焦点。目前,在 HBV 相关肝癌中,HBx 蛋白、HBV 大表面抗原(hepatitis B virus large S protein, LHBs)及截短的 preS/s 蛋白是肝癌组织中最常被检测到的 HBV 相关蛋白。

HBx 为 HBV X 区基因所编码的蛋白产物,是一种多功能的调节蛋白,具有广泛的反式激活功能,在胞内信号转导、病毒复制转录、细胞周期进程、细胞增殖与凋亡等方面有确切作用^[13-14]。目前,对于

HBx 与 HCC 关系的研究主要围绕在 HBx 表达与端粒酶活性的激活^[15]、HBx 对炎症因子的调节、HBx 对 DNA 损伤反应的调控、HBx 与抑癌基因 P53 的功能失调、HBx 介导血管内皮生长因子 (VEGF) 及基质金属蛋白酶 (MMps) 的上调、HBx 介导对 NF- κ B 的反式激活、HBx 与表观遗传学等方面。HBx 正是通过以上不同的分子生物学机制来调控肿瘤细胞生长,调节肿瘤血管再生,从而影响肝癌的发生发展。

LHBs 存在于感染性 Dane 颗粒和亚病毒颗粒上,具有双重跨膜拓扑结构。相关研究^[16]表明,进展性肝病患者的 Pre-S 区具有较高的突变率。很多研究证实了 LHBs 与肝癌发生关系密切,从慢性乙型肝炎病毒携带者的毛玻璃样肝细胞中分离出的 LHBs 已被证明与肝癌发生率呈正相关。LHBs 的具体致癌机制大致有以下观点:(1)LHBs 在内质网中积累可引起强烈的内质网应激和氧化应激,并在肝细胞中通过诱导细胞周期 A 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达,促进肝细胞的不断增殖,从而为肝细胞生长提供一种优势^[17-18]。(2)HBV 通过 LHBs 与内质网因子 JAB1 直接相互作用,引发 RB 基因磷酸化而失活,从而导致肝癌的发生^[19]。(3)LHBs 通过 c-Jun 的激活域结合蛋白 1 诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P27 降解,从而加速细胞周期进程^[20]。故目前有学者将 LHBs 作为一种潜在致癌病毒蛋白,其在慢性乙型肝炎的病程中促进肿瘤发生,并有望成为肝癌发生的一项重要预测指标。此外,已有研究^[20]表明,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 可抑制 LHBs 转基因小鼠中 P27 的降解及 CDK2 的活化,并有效抑制由 LHBs 诱导的细胞增殖,有望成为 LHBs 相关性肝癌的化学预防药物。

关于截短的 preS/s 蛋白与肝癌关系的研究主要源于近年来 NA 抗病毒药物广泛使用所伴随的耐药问题。某些耐药突变可同时导致 HBV 表面蛋白 (S 蛋白) 发生结构的改变。由于 HBV 基因组中不同的蛋白编码区有相互重叠的特点,其中 S 基因与病毒 DNA 聚合酶基因中的逆转录酶区 (RT) 完全重叠。NA 抗病毒治疗引起 RT 区突变的同时可导致 S 蛋白的改变。此种突变可导致 S 基因提前产生一个终止密码子,使 S 蛋白羧基端发生截短变异,其产物为截短的 preS/s 蛋白。

截短的 preS/s 蛋白对 SV40 和人的 c-myc 启动子有反式激活作用。在裸鼠致癌实验中,将表达截短的 preS/s 蛋白的 NIH3T3 细胞注射入裸鼠,结

果显示,该蛋白的致癌性可达野生型 preS/s 蛋白的 5 倍左右^[21-22]。Yeh 等^[23]研究表明,拉米夫定 (LAM) 耐药患者中出现 rtA181T/sW172* 的人群,其肝癌发生的风险性随之增加。国内一项研究^[24]认为,HBV sW172* HBsAg 的分泌缺陷可导致蛋白在内质网中堆积,进而引起氧化应激和氧化 DNA 损伤,并可能通过激活内质网信号通路诱导肝癌的发生。此外,Lai 等^[25]还发现 1 例未接受药物治疗的 39 岁肝癌患者,其血清 HBsAg 阴性,但 HBeAg 阳性,HBV DNA > 10⁵ 拷贝/mL,其癌旁组织中 HBsAg 和 HBcAg 均阳性。进一步研究发现该患者带有 rtA181T (sW172*) 突变株,这表明 HBV 聚合酶 rtA181T/表面截短突变体在未行抗病毒治疗的前提下可自发产生。这提示对于 HBsAg 阴性患者,若其他标志物阳性,须完善 HBV DNA 检查;在使用核苷类药物抗病毒治疗的过程中,应定期监测 rtA181T 突变的发生。

总之,HBV-M 作为目前临床实验室开展诊断乙型肝炎的常规方法,其不仅是临床诊断的主要依据,而且可用于预测患者对治疗的应答,有助于及时调整治疗方案,提高治疗效果。在以后的临床研究中,HBV-M 的定量检测有可能成为一种“应答导向 (response-directed)”。随着血清 HBcAg 定量发光试剂的研发及在临床的广泛应用,未来乙型肝炎的血清学诊断模式将开始由乙型肝炎“两对半”向“三对”的转变,HBV-M 在乙型肝炎中的运用价值呈现了良好的前景。此外,今后对乙型肝炎 HBx 蛋白、LHBs、截短的 preS/s 蛋白生物学效应的进一步深入研究,有望进一步阐明肝癌发生发展的分子生物学机制,为抑制肝细胞恶性转化提供新的药物作用靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Blumberg B S. Australia antigen and the biology of hepatitis B [J]. *Science*, 1977, 197 (4298): 17 - 25.
- [2] Krugman S, Giles J P, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection [J]. *JAMA*, 1967, 200 (5): 365 - 373.
- [3] Su T H, Hsu C S, Chen C L, et al. Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B [J]. *Antivir Ther*, 2010, 15 (8): 1131 - 1139.
- [4] Ma H, Yang R F, Wei L. Quantitative serum HBsAg and HBeAg are strong predictors of sustained HBeAg seroconver-

- sion to pegylated interferon alfa-2b in HBeAg-positive patients. [J] *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(9): 1498 - 1506.
- [5] Yu J, Kim, Hyun C, et al. The change of the quantitative HBsAg level during the natural course of chronic hepatitis B[J]. *Liver International*, 2011, 31(6): 817 - 823.
- [6] Lau G K, Marcellin P, Brunetto M R, et al. On-treatment HBsAg decline during peginterferon alfa-2a (40 KD) ± lamivudine in patients with HBeAg-positive CHB as a potential predictor of durable off-treatment response[J]. *Hepatology*, 2008, 48(Suppl 1): 714A.
- [7] Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBeAg) and relation between levels of HBeAg and HBV DNA[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5): 1901 - 1906.
- [8] Liu F, Campagna M, Qi Y, et al. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(9): e1003613.
- [9] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(7): 1750 - 1758.
- [10] Palumbo G A, Belloni L, Valente S, et al. OC-22 suppression of HBV transcription and replication by small molecules that target the epigenetic control of nuclear cccDNA minichromosome[J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45: S8.
- [11] Chang M H, You S L, Chen C J, et al. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees; a 20-year follow-up study[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(99): 1348 - 1355.
- [12] Chang M H, Chen C J, Lai M S, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group [J]. *N Engl J Med*, 1997, 336: 1855 - 1859.
- [13] 章莉, 郑大利, 黄健, 等. HBx 基因转染对 Huh7 细胞中基因转录的影响[J]. *肿瘤*, 2008, 28(4): 282 - 287.
- [14] Bui-Nguyen T M, Pakala S B, Sirigiri R D, et al. NF-kappaB signaling mediates the induction of MTA1 by hepatitis B virus transactivator protein HBx[J]. *Oncogene*, 2009, 29(8): 1179 - 1189.
- [15] Liu H, Shi W, Luan F, et al. Hepatitis B virus X protein up-regulates transcriptional activation of human telomerase reverse transcriptase[J]. *Virus genes*, 2010, 40(2): 174 - 182.
- [16] Chen B F, Liu C J, Jow G M, et al. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(4): 1153 - 1168.
- [17] Wang H C, Wu H C, Chen C F, et al. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 2441 - 2449.
- [18] Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(4): 766 - 768.
- [19] Hsieh Y H, Su I J, Wang H C, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant surface antigen induces degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through c-Jun activation domain-binding protein 1[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(10): 1063 - 1072.
- [20] Huang W. Histone deacetylase inhibitor SAHA as a chemopreventive drug for hepatoma induced by hepatitis virus pre-S2 mutant large surface antigen[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(Suppl 4): iv120.
- [21] Lai M W, Huang S F, Hsu C W, et al. Identification of non-sense mutations in hepatitis B virus S gene in patients with hepatocellular carcinoma developed after lamivudine therapy [J]. *Antivir Ther*, 2009, 14(2): 249 - 261.
- [22] Lai M W, Yeh C T. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/surface truncation mutant[J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(7): 875 - 879.
- [23] Yeh C T, Chen T, Hsu C W, et al. Emergence of the rtA181T/sW172* mutant increased the risk of hepatoma occurrence in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1): 398.
- [24] 国际肝病网. HBV sW172* 耐药突变体引起的截短蛋白胞内堆积可能通过内质网应激通路参与致肝癌机制[OL/EB]. (2011-09-21)[2014-03-25]. <http://www.ihepa.com:8088/index.html>.
- [25] Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus /sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound[J]. *Hepatology*, 2008, 48(1): 88 - 89.

(本文编辑:任旭芝)