

乙肝病毒 HBx-d382 与 HBx-d431 突变体特异性抗体检测方法的建立及临床应用

祝玲玲¹, 朱平安¹, 蔡兰兰¹, 金 娟¹, 施培瑶¹, 吴 翔²

(1. 深圳市第七人民医院检验科, 广东 深圳 518081; 2. 中南大学湘雅医学院病原生物系)

摘要: **目的** 建立检测乙肝病毒 X 基因突变体 HBx-d382 和 HBx-d431 特异性抗体的方法, 探讨其在诊断 HBV 相关性肝细胞癌中的应用价值。 **方法** 通过生物信息和多肽合成的方法, 制备 HBx-d382 和 HBx-d431 特异性多肽抗原。采用间接 ELISA 法对正常人和慢性乙肝病毒感染者和肝细胞癌病人血清中抗 HBx-d382 和抗 HBx-d431 特异性抗体进行检测。 **结果** 肝细胞癌病人血清中抗 HBx-d382 和抗 HBx-d431 抗体的阳性率均高于正常人、慢性乙肝病毒感染者 ($P < 0.05$), 慢性乙肝病毒感染者抗 HBx-d382 和抗 HBx-d431 抗体的阳性率高于正常人 ($P < 0.05$)。慢性乙肝病毒感染者 HBsAg(+) / HBeAb(+) / HBcAb(+) 模式抗 HBx-d382 阳性率明显低于 HBsAg(+) / HBeAg(+) / HBcAb(+) 模式和 HBsAg(+) / HBcAb(+) 模式 ($P < 0.05$), 而抗 HBx-d431 和抗 HBxP 阳性率在这些血清学模式之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。 **结论** 抗 HBx-d382 和抗 HBx-d431 是乙肝病毒感染的一种特异性抗体, 可以用于 HBV 携带者及慢性乙肝病人的监测, 对预测肝细胞癌的发生有一定的意义。

关键词: 乙肝病毒 X 基因; 突变体; 特异性抗体; ELISA

中图分类号: R446

文献标识码: A

Development of Method for Detection of Specific Antibodies of Hepatitis B Virus X Gene Deletion Mutants HBx-d382 and HBx-d431 and Evaluation of its Clinical Use

ZHU Lingling, ZHU Pingan, CAI Lanlan, et al

(Department of Experimental Diagnosis, the Seventh Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518081, China)

Abstract: **Objective** To develop the method for detection of specific antibodies of hepatitis B virus X gene deletion mutants HBx-d382 and HBx-d431 and study its clinical value in the diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma.

Methods Specific peptide antigen of HBx-d382 and HBx-d431 were prepared by bioinformatics and peptide synthesis methods, and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay had been established to detect anti-HBx-d382 and anti-HBx-d431 specific antibodies in sera of patients with Chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. **Results**

The positive rate of anti-HBx-d382 and anti-HBx-d431 in sera of patients with hepatocellular carcinoma were higher than that of normal controls and patients with Chronic hepatitis B virus infection ($P < 0.05$), and positive rate of anti-HBx-d382 and anti-HBx-d431 in sera of patients with Chronic hepatitis B virus infection were higher than that of normal controls ($P < 0.05$). In chronic HBV infection patients, the anti-HBx-d382 positive rate of serological pattern with HBsAg(+) / HBeAb(+) / HBcAb(+) was lower than that of serological pattern with HBsAg(+) / HBeAg(+) / HBcAb(+) and HBsAg(+) / HBcAb(+) ($P < 0.05$), and positive rate of Anti-HBx-d431 and anti HBxP had no significant difference between these serological patterns ($P > 0.05$). **Conclusion** Anti-HBx-d382 and anti-HBx-d431 are specific antibodies of

收稿日期: 2014-03-20

基金项目: 深圳市科技计划项目(201102184), 深圳市盐田区科技计划项目(201110).

作者简介: 祝玲玲, 本科, 副主任检验师, 研究方向: 病毒性肝炎和肝癌, E-mail: linglingzhu@126.com. 通讯作者朱平安, 博士, 主任检验师, 研究方向: 病毒性肝炎和肝癌, E-mail: Pan_zhu@126.com.

hepatitis B virus mutants HBx-d382 and HBx-d431, and it is significant for early diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma, HBV carriers and chronic hepatitis B patient monitoring.

Key words: hepatitis B virus X gene; deletion mutant; specific antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

原发性肝细胞癌在东南亚和中国是最常见的恶性肿瘤之一。已有研究表明,长期慢性 HBV 感染以及 HBV X 基因突变与原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展密切相关。以往研究发现,肝癌组织中存在 HBx-d382、HBx-d431 缺失型突变体,这些缺失型突变体构建的真核表达载体转入 QSG7701 肝细胞后,能加速 QSG7701 肝细胞恶性转化,有明显的致癌作用^[1-2]。由于早期诊断、早期治疗是提高原发性肝细胞癌生存率的关键,为了早期诊断肝细胞癌,本研究在前期研究的基础上,建立了检测 HBx-d382 和 HBx-d431 突变体特异性抗体的 ELISA 方法,并对正常人、慢性乙肝病毒感染者和肝细胞癌病人血清进行检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 HBx-d382 和 HBx-d431 特异性多肽抗原的制备 采用生物信息学方法,对乙肝病毒突变体 HBx-d382、HBx-d431 和乙肝病毒参考序列(AF282917)X 基因氨基酸序列进行分析,筛选出 HBx 蛋白共同抗原肽(HBxP)、HBx-d382 特异性多肽(HBxP-d382)和 HBx-d431 特异性多肽(HBxP-d431),其氨基酸序列分别为 ARDVLCLRPVGA、CIHQHHANWSVTFs、MIFVLGGCRHKLVCIF。采用多肽合成法制备多肽抗原。抗原肽由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.2 试剂 辣根过氧化物酶(HRP)标记的 SPA 购自北京鼎国生物技术发展中心,为美国 Southern-Biotech 公司产品;包被缓冲液 0.05 mol/L、pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液,稀释液为 pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS,含 0.05% 吐温-20 和 10% 正常兔血清),PBS 缓冲洗涤液 pH 值 7.4,底物显色溶液(TMB),2.5 mL/L H₂SO₄ 终止液等试剂均由上海荣盛生物技术有限公司提供。

1.1.3 标本 350 例 HBV 感染者血清标本来自 2005 年 5 月~2012 年 12 月深圳市第七人民医院、中南大学湘雅医院和邵阳市中心医院门诊和住院患

者。其中慢性 HBV 感染者 266 例,男 182 例,女 84 例,年龄 21~61 岁;肝细胞癌患者 84 例,男 55 例,女 29 例,年龄 25~65 岁。上述患者均为乙肝病毒表面抗原阳性,诊断依据为 2000 年西安第 10 次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的诊断分型标准。随机选择 HBV 血清学标志物阴性健康成人 20 名作为正常对照组,年龄 23~62 岁。

1.1.4 血清稀释度和酶结合物浓度的选择 采用方阵滴定法,确定血清稀释度和酶结合物最佳浓度。

1.2 抗 HBx-d382 和抗 HBx-d431 特异性抗体检测

采用间接法,将 HBx-d382 和 HBx-d431 特异性抗原肽稀释后包被聚丙烯乙烯反应板。37℃ 水浴 1 h,4℃ 冰箱过夜,PBS 缓冲洗涤液洗板 5 次并扣干。每孔加入 100 μL 封闭液,37℃ 水浴 1 h,4℃ 冰箱过夜,PBS 缓冲洗涤液洗板 5 次并扣干。在上样孔中加入稀释的血清,37℃ 水浴 1 h,PBS 缓冲洗涤液洗板 5 次并扣干。加入 HRP 标记的 SPA;水浴 1 h,PBS 洗板 5 次并扣干,加入底物液(底物 A 为 H₂O₂,底物 B 为 3,3',5,5' 四甲基联苯胺)显色 10 min,加入终止液 5 min 后,1 h 内用酶标仪 450/630 nm 波长检测各孔的吸光度 A。结果判断:临界值 CO = 阴性对照孔 A 均值 × 2.1。测定 A 值/CO ≥ 1 为阳性,测定 A 值/CO < 1 为阴性。

1.3 统计学方法

使用 SPSS17.00 软件,采用 χ^2 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 包被抗原的最佳浓度、血清标本与酶结合物最佳稀释度

通过生物信息和多肽合成的方法,筛选并合成了 HBx 蛋白共同抗原肽、HBx-d382 特异性多肽和 HBx-d431 特异性多肽,经方阵滴定法确定,HBx-d382 和 HBx-d431 特异性抗原肽最佳包被浓度为 25 μg/mL,血清标本最佳稀释度为 1:10,酶结合物最佳稀释度为 1:6 000。

2.2 重复性

取一中强阳性的标本同一酶标板测定 15 孔,其

批内变异系数为 5.20%,用不同批酶标板对同一中强阳性的标本反复检测 15 次,其批间变异系为 7.90%,试剂重复性好。

2.3 慢性 HBV 感染者不同血清学模式抗 HBx 抗体检测

266 例慢性 HBV 感染者不同血清学模式 HBx 抗体检测结果见表 1,抗 HBxP 为 HBx 蛋白共同抗原肽抗体,抗 HBx-d382 为 HBx-d382 特异性多肽抗体,抗 HBx-d431 为 HBx-d431 特异性多肽抗体。在

表 1 慢性 HBV 感染者不同血清学模式 HBx 抗体检测结果(例,%)

组别	<i>n</i>	抗 HBxP	抗 HBx-d382	抗 HBx-d431
HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+)	46	8(17.39)	26(56.52)	18(39.13)
HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)	188	40(21.27)	52(27.66)	98(52.13)
HBsAg(+)/HBcAb(+)	32	6(18.75)	22(68.75)	12(37.50)
阴性	20	0(0)	0(0)	0(0)

2.4 肝细胞癌病人血清中抗 HBx 抗体的检测

从表 2 可见,肝癌组、HBV 组与正常对照组比较,抗 HBxP、抗 HBx-d382、抗 HBx-d431 抗体阳性率明显高于正常对照组(χ^2 值分别为 43.26,69.23,80.01; $P<0.05$)。肝癌组与 HBV 组比较,肝细胞癌病人抗 HBxP、抗 HBx-d382、抗 HBx-d431 抗体阳性率明显增高(χ^2 值分别为 103.42,78.01,63.12; $P<0.05$)。

表 2 肝细胞癌病人与 HBV 感染者血清中 HBx 抗体检测结果(例,%)

组别	<i>n</i>	抗 HBxP	抗 HBx-d382	抗 HBx-d431
正常对照组	20	0(0)	0(0)	0(0)
肝癌组	84	68(81.0) ^a	78(92.9) ^a	82(97.7) ^a
HBV 组	266	54(20.3) ^{ab}	100(37.6) ^{ab}	128(48.1) ^{ab}

与正常对照组比较,a: $P<0.05$;与肝癌组比较,b: $P<0.05$

3 讨 论

原发性肝细胞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,每年大约引起 40 万人死亡。大量流行病学调查表明,长期慢性乙肝病毒感染是导致 HCC 的主要病因,且 HBV 感染者发生肝细胞癌的概率大约是非感染者的 100~400 倍^[3]。感染的 HBV DNA 可整合至肝细胞上,整合的位点恰好位于 HBx 基因区,且整合的 HBx 基因经常断裂不全。断裂的 HBx 基因连接在细胞 DNA 上,转录成融合蛋白。已有研究

3 种 HBsAg 阳性常见血清学模式中,HBsAg(+)/HBcAb(+)模式抗 HBx-d382 阳性率最高,阳性率为 68.75%,其次为 HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+)模式,阳性率为 56.52%;这两组模式抗 HBx-d382 阳性率明显高于和 HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)模式(χ^2 值分别为 13.85,20.68; $P<0.05$)。而抗 HBxP 和抗 HBx-d431 阳性率在这些血清学模式之间差异无显著性($P>0.05$)。

表明,HBx 基因及其编码蛋白与肝细胞癌发生发展密切相关^[4]。肝癌组织中 HBx 基因缺失型突变体,表达截短的 HBx 蛋白导致 HBx 功能发生变化,参与肝细胞的恶性转化^[2,5-6],促进肝癌细胞的增殖^[7]。我们在前期研究中发现,肝癌组织中存在 HBx-d382、HBx-d431 缺失型突变体,这些缺失型突变体能加速 QSG7701 肝细胞恶性转化^[2],促进 LO₂ 肝细胞的增殖和细胞周期素 D1 的表达^[8-9]。为了进一步研究 HBx-d382、HBx-d431 缺失型突变体在早期诊断肝细胞癌上的意义,本研究制备了 HBx-d382、HBx-d431 缺失型突变体特异性多肽,建立了检测 HBx-d382、HBx-d431 缺失型突变体特异性抗体的 ELISA 法,并对肝细胞癌病人、慢性 HBV 感染者和正常人血清进行检测。研究结果表明,不同血清学模式的慢性 HBV 感染者抗 HBx-d382 与抗 HBx-d431 特异性抗体阳性率是不一样的。HBsAg(+)/HBcAb(+)模式抗 HBx-d382 阳性率(68.75%)和 HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+)模式阳性率(56.52%)明显高于 HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)模式阳性率(27.66%)($P<0.05$);HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)模式抗 HBx-d431 阳性率(52.13%)虽然高于 HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+)模式(39.13%)和 HBsAg(+)/HBeAb(+)模式(37.50%),但其与抗 HBxP 一样,各血清学模式之间阳性率无显著性差异($P>0.05$)。这提示抗 HBx-d382 与抗 HBx-d431 (下转第 280 页)

(上接第 264 页)

特异性抗体阳性率与 HBV 感染的进程、HBV 血清学模式转变有关。同时本研究还发现,肝细胞癌病人血清中抗 HBx-d382 与抗 HBx-d431 特异性抗体阳性率明显高于慢性 HBV 感染者 ($P < 0.05$),提示抗 HBx-d382 与抗 HBx-d431 特异性抗体的出现可能与 HCC 发生发展密切相关。

由此可见,检测慢性 HBV 感染者和肝细胞癌病人血清中抗 HBx-d382 与抗 HBx-d431 特异性抗体,对于了解 HBV 感染的进程、HBV 血清学模式转变、肝细胞癌发生发展有非常重要的意义,可以用于 HBV 携带者及慢性乙肝病人的监测。

参考文献:

- [1] Zhu PA, Tan DM, Peng ZT, et al. Polymorphism Analyses of Hepatitis B Virus X Gene in Hepatocellular Carcinoma Patients from Southern [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(4): 265-272.
- [2] 朱平安, 谭德明, 彭忠田, 等. 肝癌组织中 HBx 基因的多态性及突变体对 QSG7701 细胞生物学行为的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(1): 7-11.
- [3] Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2009, 286(1): 52-59.

- [4] Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(5): 477-483.
- [5] Iavarone M, Trabut JB, Delpuech O, et al. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection [J]. J Hepatol, 2003, 39(2): 253-261.
- [6] Tu H, Bonura C, Giannini C, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues [J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7803-7810.
- [7] 刘晓红, 朱明华, 曹晓哲, 等. HBx 蛋白羧基端缺失对肝癌细胞生物学行为的影响 [J]. 癌症, 2005, 24(10): 1213-1219.
- [8] Zhang H, Shan CL, Li N, et al. Identification of a natural mutant of HBV X protein truncated 27 amino acids at the COOH terminal and its effect on liver cell proliferation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(4): 473-480.
- [9] Fu XY, Tan DM, Hou ZH, et al. The effect of miR-338-3p on HBx deletion-mutant (HBxd382) mediated liver-cell proliferation through cyclinD1 regulation [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43204.

(此文编辑:朱雯霞)