

· 综述 ·

乙型肝炎病毒表面抗原的研究进展

黄明星 崇雨田

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus HBV) 感染可引起各种类型肝脏疾病, 包括急性慢性乙型肝炎、肝硬化、甚至肝细胞癌。自从1967年首次发现乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 以来^[1], HBsAg从最初作为慢性乙型肝炎病毒感染的定性诊断指标逐渐发展为目前广泛应用的HBsAg定量诊断及检测指标。HBsAg是HBV的结构蛋白, 很少发生转阴。HBsAg血清学转换是病毒清除、病情康复的重要指标之一, 目前HBsAg检测已广泛应用于临床常规定性检测和定量检测中, 以指导抗HBV疗效分析。当前利用HBsAg在临床治疗抗HBV中意义愈加重要, 本文就HBsAg的生物学特点及临床应用价值作如下综述。

一、HBsAg分子生物学特点

1. HBsAg来源——ccc DNA: HBV为小型DNA病毒, 属于嗜肝病毒科家族。HBV进入细胞后, 首先脱掉蛋白衣壳, 暴露出HBV的部分环状双链DNA。解旋的DNA进入细胞核后, 在DNA聚合酶作用下, 部分环状双链DNA修复为完整双链DNA——共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, ccc DNA)。随后, ccc DNA作为一种稳定、顽固、持久存在的非整合性微染色体长期存在肝细胞核内, 成为病毒基因转录模板^[2], 从而使慢性HBV携带者不断产生HBsAg。

2. HBsAg的结构特点: HBV在电镜下是大约42~45 nm长的DNA颗粒 (Dane颗粒), Dane颗粒有双层外壳, 外壳的膜蛋白就是乙型肝炎表面抗原 (HBs) 蛋白, 后者分为小HBs蛋白 (SHBs)、中HBs蛋白 (MHBs)、大HBs蛋白 (LHBs)。内壳是一个核心蛋白称为乙型肝炎核心蛋白 (HBc), 内壳包含有病毒聚合酶和病毒基因组。SHBs主要由17~25 nm球形粒子组成, 含量非常丰富, 大约是具有传染性颗粒的LHBs数量的10 000倍^[3]。此外, SHBs也有以丝状 (直径20 nm) 或球状 (直径20~22 nm) 的亚病毒颗粒形式分泌到血液, 但这些空的亚病毒颗粒不具有传染性。所有3种形式HBs蛋白 (SHBs、MHBs、LHBs) 可以通过临床常用的检测方法检测到, 统称为HBsAg。

乙型肝炎病毒基因组的共有4种不同的开放阅读框 (open reading frames, ORF), 编码的包膜、核

心、聚合酶和X蛋白质基因。分别编码4类抗原蛋白, 即表面抗原 (HBsAg) 包括S区编码的SHBs、PreS/S编码的MHBs、PreS1/PreS2/S区编码的LHBs、核心抗原 (hepatitis B virus core antigen, HBcAg)、X抗原 (hepatitis B virus X antigen, HBxAg) 及可分泌的e抗原 (hepatitis e antigen, HBeAg)^[4]。此外, HBV的3种表面蛋白 (SHBs、MHBs和LHBs) 由共同的开放阅读框不同的翻译起始位点翻译生成, 故其结构有相似部分, SHBs在内质网上由多次跨膜的226个氨基酸的疏水蛋白组成, MHBs和LHBs均含有SHBs结构, 但在MHBs在SHBs基础上增加了pre-S2区 (55个氨基酸组成), LHBs则在SHBs基础上增加pre-S2区和pre-S1区 (108或119个氨基酸组成)^[5]。

3. HBsAg合成和分泌: HBs蛋白是有mRNA转录产生, 其MHBs和SHBs由两种2.1 kb的mRNA编码, 而LHBs则由另外一种2.4 kb编码, 两种蛋白均以不同的方式翻译产生。与HBV基因表达有关的信号序列有4种: 启动子、增强子、polyA附加信号和糖皮质激素敏感因子 (glucocorticoid response element, GRE), 以上4种均参与HBV复制的调控^[6]。

在HBV复制活跃的患者体内, MSHBs和SHBs蛋白的合成占主导地位, 而在非活动性HBV携带者中, LHBs蛋白合成占主导地位^[7]。虽然LHBs的mRNA的包括的M/SHBs序列, 但其不翻译成的MHBs和SHBs蛋白, MHBs和SHBs蛋白的产生的比例控制是由一个复杂的机制完成, 但此机制尚未阐明^[8]。为形成一个完整的病毒颗粒, SHBs和LHBs的蛋白颗粒必须按比例组装, 且不可缺少^[9]。病毒颗粒通过出胞的形式输送到细胞膜, 但必须符合一些特殊要求才能成功, 首先必须有大量的SHBs, 其次是LHBs不能过量, 否则抑制其分泌, 同时也可导致内质网的毛玻璃样扩张^[10-11]。此外由于pre-S2区编码蛋白在HBV复制、分泌, 或在体外传染性中不是必需的, 故仅含有pre-S2区MHBs对HBV的感染进入细胞也并非必需, 但同时表达pre-S1和pre-S2蛋白的LHBs则对HBV的感染进入则起着关键性的作用^[12]。

二、HBsAg分子生物学功能及定量测定和变异特点

1. HBsAg分子生物学功能: HBsAg亚型较多, 其中adr、adw、ayr和ayw为主要亚型, 其拥有共同抗原决定簇a, 因此, 抗原决定簇a具有群特异性。HBsAg是乙型肝炎病毒感染的诊断指标之一, 但其在血液中实际上并不含病毒核心的空壳, 故不能反映HBV有无复制和传染性强弱。HBsAg的主要分子生物学功能是包裹病毒基因

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.031

基金项目: 广东艾滋病、病毒性肝炎社区综合防治研究 (No. 2012ZX10004-902)

作者单位: 510630 广州市, 中山大学附属第三医院感染科

通讯作者: 崇雨田, Email: ytchong2005@126.com

成分,此外,其能在感染肝细胞早期过程中起黏附细胞膜的重要作用。一些研究已经证实S基因中的pre-S1区域是上述黏附过程起决定性作用,其特异性地结合到肝细胞浆膜上,且能被单克隆抗体抑制,具有种属感染的特异性^[13]。然而,黏附中的SHBs蛋白也提示在肝细胞内毒素II中的识别作用,内毒素能特异性结合SHBs蛋白^[14]。所以,从宿主的角度,HBsAg具有的主要抗原组分,即抗原决定簇a,后者对于宿主激活免疫起重要作用。但从病毒学的角度来看,大量HBs蛋白可使感染性病毒颗粒能远离中和抗体的中和作用,从而导致免疫耐受^[15]。

2. HBsAg定量测定方法:早在1970年开始首次用放射免疫学方法及酶免疫学方法定性测定HBsAg,后来逐渐发展越来越多的测定方法,但临床上大多数为定性测定方法。最近开始,HBsAg的定量测定方法也逐渐成熟,目前,国内较为常用检测方法来自雅培公司(Architect HBsAg QT)和罗氏公司(Elecsys HBsAg II)。雅培公司应用的是全自动检测系统的化学发光微粒免疫分析法,其检测下限为HBsAg 0.2 g/ml,检测范围为0.05~250.0 IU/ml^[16]。罗氏公司应用的则是应用电化学发光免疫试剂测定,它的结果以有反应性或无反应性以及Cut-off指数形式(标本信号/Cut-off)报告。标本的Cut-off指数<1.0判断为HBsAg无反应性,可判定该标本HBsAg阴性,无需进一步的试验。标本的Cut-off指数≥1.0判断为HBsAg有反应性,则需进行二次测定。

3. HBsAg定量与ccc DNA定量关系:由于HBsAg主要来源于与肝细胞核基因相整合的HBV基因(ccc DNA)的转录和翻译结果,血清HBsAg定量测定能一定程度上反映肝细胞内ccc DNA定量复制水平,所以HBsAg被认为是肝细胞内含有ccc DNA的标志^[17],而且尽管血清HBV DNA定量是监测抗HBV治疗的“金标准”,但价格昂贵,基层医院开展不多。与此相反,HBsAg定量的测定却是相当便宜,技术也比较简单,所以HBsAg更能普及推广检测,而且其与HBV DNA定量关系也得到广泛的研究。

早在2004年HBsAg定量与HBV DNA定量的关系已确定,Deguchi等^[18]首次报道了HBsAg定量测定的临床意义,即在HBeAg阳性患者与HBeAg阴性患者相比,前者HBsAg定量较后者更高。且HBsAg定量与HBV DNA定量的相关,其相关系数为 $r = 0.862$ 。尽管有一些HBsAg定量与HBV DNA定量相关性不一致的报道,HBsAg已能作为HBV DNA定量的辅助检查指标,血清HBsAg的下降表示ccc DNA转录翻译减少。因此,HBsAg定量的检测能够提供HBV DNA定量或者ccc DNA的补充信息。

4. HBsAg在抗病毒治疗的预测价值:既然HBsAg可用来推测HBV DNA定量,那么HBsAg也可用来评估抗病毒治疗的效果。目前HBsAg主要用于含有干扰素的抗病毒治疗方案中评估其抗病毒效果。在由Chan等^[19]一项研究中聚乙二醇化干扰素(PegIFN)联合拉米夫

定(Lamivudine, LAM)治疗基线HBsAg定量浓度<10 000 IU/ml的CHB患者获得持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)患者中的敏感性,特异性,阳性和阴性预测值与为86%、56%、43%和92%。此外,根据Manesis等^[20]利用拉米夫定使得HBsAg的完全清除需要10.6年,而干扰素持续治疗则仅需要5.4年。Marcellin等^[21]长期研究发现,35%的干扰素抗病毒治疗患者在第12周时出现HBsAg定量<1500 IU/ml,这些患者经过继续4年的干扰素治疗后能清除HBsAg,此研究表明HBsAg定量测定对疗效估计的重要意义。此外,在接受聚乙二醇化干扰素为基础的治疗的患者中,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)优于ccc DNA和血清HBV DNA预测SVR的能力,其ROC曲线分别为0.769、0.734和0.714。此外,有研究证明在不同抗HBV药物治疗过程中,HBsAg的下降幅度不同,干扰素类药物显著大于核苷(酸)类药物^[22]。

5. HBsAg变异特点分析:HBV基因易发生突变,较其他DNA病毒的突变率约高10倍^[23],因此编码HBsAg的S区基因的任何氨基酸残基的改变均有可能导致HBsAg抗原性的改变。HBV抗原突变原因除了缺乏HBV复制的校对能力外^[24],也包括广泛的乙肝疫苗接种,肝移植后注射乙肝免疫球蛋白(hepatitis B immune globulin, HBIG)和P基因中的重叠突变。

由于乙肝疫苗广泛推广,大多数新生儿或婴儿产生了乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb),接种过乙肝疫苗婴儿再次感染HBV时,可能导致了HBsAg的变异性相应增加,特别是HBsAg的137~147氨基酸变异,导致HBsAg不能被中和抗体(HBsAb)识别,最重要的是G145R突变体的出现,可引起复制能力的改变,这种改变非常稳定,至少能在宿主细胞内持续14年以上^[25]。台湾一项流行病学研究发现,经15年的广泛的乙肝计划免疫后,抗原决定簇a的突变的发生率自7.8%上升至28.1%^[26]。但在随后10年中HBsAg变异的发生率未升高,也无HBV感染的暴发的不良事件出现,继续推行计划免疫仍有足够充足的证据^[27-28]。

肝移植后广泛应用HBIG也增加了HBV的变异压力。20例肝移植患者经HBIG预防性治疗后仍发生HBV再感染,此20例患者中有10例发现其中有氨基酸系列替换,包括抗原决定簇a,大部分移植后的患者均出现HBsAg突变^[29]。另外一项320例肝移植术患者中,术前经HBIG治疗后也同时出现HBsAg的基因突变,即S区“a-决定簇”基因变异发生在I126S、T131N、S143T和G145R位点,“a-决定簇”的上游和下游变异的有L110F、I113S和T160K位点^[30]。

长期口服核苷酸类药物治疗(即抗HBV治疗)引起的P基因的突变也导致S基因的改变,因为P基因和S基因有重叠^[31]。核苷酸位点rt204是LAM、LdT和ETV的共同耐药位点,而rtM204V/I变异可导致S基因上的sI195M、sW196S、sW196L和终止密码子的变异^[32]。在Yeh等^[33]

研究中, 拉米夫定依赖性HBsAg突变出现在A529T位点, 导致S基因终止子产生, 进而出现HBsAg分泌障碍。rt181是另一种多种核苷酸药物的共同突变位点, 其同时具有阿德福韦酯、拉米夫定和恩替卡韦的共同耐药位点, rt181T与HBs抗原蛋白sW172能发生共改变, Warner等^[34]发现rt181T突变具有分泌缺陷作用, 能对野生型HBV病毒颗粒的分泌起抑制作用。同样, ETV相关的rtI169T突变重叠HBsAg的sF161L突变可导致HBsAg免疫反应能力的下降^[35]。

Kamili等^[36]进一步阐明了P和S基因的重叠突变的临床表现特点, 该研究者成功构建了的黑猩猩感染模型, 即在有高水平的抗-HBs中仍然可以感染带有P基因突变的rtV173L、rtL180M和rtM204V位点HBV, 其中两个P基因同时重叠S基因突变的(sE164D和sI195M)。

三、小结

综上所述, HBsAg分子结构复杂, 生物学功能丰富, 但又易发生变异。HBsAg定量在临床上的应用价值已得到广泛重视, 特别是作为抗病毒应答的预测因子。而且最有意义的是HBsAg将来可能作为乙型肝炎抗病毒治疗的终点的参考指标。目前美国肝病年会和欧洲肝病年会指南关于抗HBV治疗的终点介绍是仍不明确^[37-38]。HBsAg定量的定期监测可用于HBV DNA低于检测下限的患者中, 以决定抗HBV治疗的终点和抗病毒治疗的有效性。定量监测HBsAg的水平将有助于对CHB患者制定最好的治疗和管理策略。

此外, 尽管HBsAg研究取得了很大的进展, 但仍有许多亟待解决的问题。HBsAg在HBV中的产生确切机制仍不清楚。虽然HBsAg与HBV DNA定量的相关性已被证实, 但是其明确关系尚需进一步研究确定, 不同基因型及不同的感染阶段, HBsAg与HBV DNA定量的变化特点尚需更多的研究证实。总之, 认真分析研究HBsAg的相关知识, 对于未来乙型肝炎的抗病毒治疗是有重要意义的。

参考文献

- Alter HJ. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. [J] Am Med Assoc 1965;191:541-546]. J Hepatol,2003,39(2):149-152.
- Reaiche GY, Le Mire MF, Mason WS, et al. The persistence in the liver of residual duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA is not dependent upon new viral DNA synthesis. Virology,2010,406(2):286-292.
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med,2004,350(11):1118-1129.
- 闻玉梅. 乙型肝炎病毒 e 抗原的生物学功能及血清学转换的免疫学基础. 微生物与感染,2011,6(4):193-198.
- Schmitt S, Glebe D, Alving K, et al. Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. J Biol Chem,1999,274(17):11945-11957.
- Moolla N, Kew M, Arbuthnot P, et al. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. J Viral Hepat,2002,9(5):323-331.
- Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. J Virol,1997,71(7):5449-5454.
- Gallina A, De Koning A, Rossi F, et al. Translational modulation in hepatitis B virus pre-S-S open reading frame expression. J Gen Virol,1992,73(Pt1):139-148.
- Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. J Virol,2006,80(24):11935-11945.
- Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. Science,1986,234(4782):1388-1391.
- Ueda K, Tsurimoto T, Matsubara K. Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. J Virol,1991,65(7):3521-3529.
- Fernholz D, Galle PR, Stemler M, et al. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. Virology,1993,194(1):137-148.
- Ishikawa T, Ganem D. The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(14):6259-6263.
- Hertogs K, Leenders WP, Depla E, et al. Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. Virology,1993,197(2):549-557.
- Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. Curr Top Microbiol Immunol,1991,168:61-83.
- Nguyen T, Desmond P, Locamini S. The role of quantitative hepatitis B serology in the natural history and management of chronic hepatitis B. Hepatol Int,2009,3(Suppl 1):5-15.
- Lee HJ, Kim SY, Lee SM, et al. Elecsys hepatitis B surface antigen quantitative assay: performance evaluation and correlation with hepatitis B virus DNA during 96 weeks of follow-up in chronic hepatitis B patients. Ann Lab Med,2012,32(6):420-425.
- Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. J Virol Methods,2004,115(2):217-222.
- Chan HL, Wong VW, Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. Clin Gastroenterol Hepatol,2007,5(12):1462-1468.
- Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, et al. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. Antivir Ther,2007,12(1):73-82.
- Marcellin P, Brunetto MR, Bonino F, et al. In patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B HBsAg serum levels early during treatment with peginterferon alfa-2a predict HBsAg clearance 4 years post-treatment. Hepatology,2008,48:718A.
- Manesis EK, Schina M, Le Gal F, et al. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. Antivir Ther,2007,12(3):381-388.
- Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. Expert Rev Mol Diagn,2005,5(1):75-91.
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(9):4398-4402.
- Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. Antiviral Res,2003,60(2):75-78.
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. Gut,2004,53(10):1499-1503.
- Chen DS. Hepatitis B vaccination: the key towards elimination and eradication of hepatitis B. J Hepatol,2009,50(4):805-816.
- Mele A, Tancredi F, Romano L, et al. Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers

- in Italy. *J Infect Dis*, 2001, 184(7):905-908.
- 29 Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology*, 1998, 27(1):213-222.
 - 30 宋红丽, 沈中阳, 王建, 等. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染患者的病毒S区与P区重叠基因变异. *中华肝脏病杂志*, 2008, 16(4):265-269.
 - 31 Chen CH, Lee CM, Wang JH, et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 16(11):1213-1218.
 - 32 Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, 2009, 137(5):1593-1608. e1-e2.
 - 33 Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the original original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*, 2000, 31(6):1318-1326.
 - 34 Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology*, 2008, 48(1):88-98.
 - 35 Sloan RD, Ijaz S, Moore PL, et al. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant. *Antivir Ther*, 2008, 13(3):439-447.
 - 36 Kamili S, Sozzi V, Thompson G, et al. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology*, 2009, 49(5):1483-1491.
 - 37 Liaw YF, Leung N, Kao JH, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. *Hepatol Int*, 2012, 6(3): 531-561.
 - 38 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2012, 57(1):167-185.

(收稿日期: 2013-02-25)

(本文编辑: 孙荣华)

黄明星, 崇雨田. 乙型肝炎病毒表面抗原的研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(6): 912-915.

