

乙型肝炎病毒前-S1 抗原的基础与临床研究进展

高晓芳 伍伟平 郑瑞丹

自 1964 年美国人 Blumberg 发现“澳大利亚抗原”,人类真正开始对 HBV 进行了系统的研究。尽管目前对 HBV 的研究已经深入到分子水平和基因水平,但慢性乙型肝炎(CHB)作为一种高发病率、高病死率的传染病,至今仍是世界性的医学难题。随着研究的逐步深入,人们发现 HBV 的前-S1 抗原(Pre-S1)在 HBV 感染与复制、CHB 诊断治疗与预防免疫等方面发挥了极其重要的作用,Pre-S1 检测项目已经在临床上得到普遍开展和广泛运用,而且已有证据表明含有 Pre-S1 的新型重组蛋白疫苗与传统疫苗相比更加有效。

一、Pre-S1 的生物学特性

HBV 是嗜肝 DNA 病毒,基因组 DNA 包裹在一个正二十面体衣壳内,其编码区有广泛的重叠。不同病毒株的 HBV 负链核苷酸序列至少有 4 个开放读码框(open reading frame, ORF):C、P、S 和 X 基因。S 基因开放读码框(S-ORF,核苷酸 nt 2854-0-832)可分为 S 基因、前-S2 区和前-S1 区,各有其起始密码 ATG。S-ORF 编码病毒的外膜蛋白,包括 3 种外膜成分:S 基因编码的含 226 个氨基酸的多肽称为 S 蛋白或主蛋白(SHBs);前-S2 基因和 S 基因连续编码含 281 个氨基酸的多肽[含前-S2 蛋白(Pre-S2)和 S 蛋白]称中蛋白(MHBs);前-S1 基因、前-S2 基因和 S 基因连续编码含 389 个氨基酸的多肽(含 Pre-S1、Pre-S2 和 S 蛋白)称大蛋白(LHBs),埋在来自宿主细胞膜的双层脂质中^[1](图 1)。

Pre-S1 区的 5'-端在 ad 亚型较 ay 亚型多 33 bp(adr)或 12 bp(adw),有 290 ~ 324 bp,分别开始于 nt 2854、nt 2877 或 nt 2888。由于病毒亚型不同,Pre-S1 由 108 或 119 个氨基酸组成。Pre-S1 的 N-末端游离,C-末端与 Pre-S2 的 N-末端连接,存在于 Dane 颗粒上(图 1A)。在病毒颗粒装配中 Pre-S1 的 C-末端参与装配,如其末端的残基缺失,仅能形成亚病毒颗粒。

二、Pre-S1 的嗜肝细胞性

Pre-S1 是肝细胞特异的无涎糖蛋白受体,有高度活跃的细胞内吞饮作用,HBV 可能以其糖涎化的前-S1 区作为结合部位感染肝细胞。病毒附着于肝细胞膜上,最重要的介导部位是 Pre-S1 的 21 ~ 47 多肽片段。该片段相当保守,变异的病毒只要这一区段完好就有传染性^[2]。近年来,对 Pre-S1 与肝细胞结合的位点有了深入的研究。Argnani 等^[3]设计了一个 1-型单纯疱疹病毒突变株 KgBpK(-)gC(-),用于表达糖蛋白 C:前-S1 蛋白活性肽(gC:pre-S1ap)融合分子。生化分析显示,gC:pre-S1ap 融合分子得以表达并掺入到 KgBpK(-)gC(-):

作者单位:363000 福建漳州 解放军第 175 医院肝病治疗中心

通讯作者:郑瑞丹,Email: zhengruidan@tom.com

pre-S1ap 重组病毒的外膜上。该重组病毒能与 HepG2 细胞特异性结合并导致有效感染,而一种合成的 pre-S1ap 肽能够将该重组病毒从 HepG2 细胞上洗脱下来,表明这个位于 Pre-S1 内部由 27 个氨基酸残基组成的 pre-S1ap 是 HBV 与肝细胞结合的配体。

有研究人员采用 HBV 大蛋白衍生肽感染 HepaRG 细胞株和人源肝细胞,发现含有 Pre-S1 前 47 位氨基酸残基且氨基末端十四烷基化的衍生肽能够阻断 HBV 感染。进一步的研究表明,含 Pre-S1 第 2 ~ 28 位氨基酸残基的最小衍生肽就能够有效阻断病毒感染^[4]。Barrera 等^[5]研究表明,Pre-S1 包含 2 个与 HBV 感染相关的区域:一个位于 Pre-S1 氨基末端的前 40 位氨基酸残基中,另一个在此区域的下游。而且要使 HBV 具有传染性,Pre-S1 氨基末端的甘氨酸必须十四烷基化。他们通过竞争性实验还发现 Pre-S1 第 5 ~ 20 位残基是 HBV 作用于宿主受体的最小区域。最近有学者以对 HBV 易感的树鼩 Tupaia 肝细胞为体外研究模型,测定了多种单克隆和多克隆抗体对 HBV 的中和能力,结果发现 Pre-S1 第 28 ~ 48 位氨基酸残基是附属结合位点,而第 9 ~ 18 位氨基酸残基是 HBV 与肝细胞受体结合的最小保守区域^[6]。这是迄今为止所知 Pre-S1 结合位点的最小片段。

三、Pre-S1 的免疫学特性

HBV 外膜蛋白是引起宿主保护性应答的免疫原表位,HBV 感染后病程依赖于宿主对病毒的免疫反应,其中包括对 Pre-S1、Pre-S2 和 HBsAg 免疫应答。Pre-S1 作为 HBV 胞膜蛋白的一个亚单位,具有很强的独特免疫原性。研究证实,Pre-S1 在 T 细胞和 B 细胞水平上具有免疫原性,针对 Pre-S1 的特异 T 细胞反应可以传递给无反应性的 Pre-S2 和 S 抗原。在人体中,Pre-S1 的第 21 ~ 28 位氨基酸是一个 T 细胞识别位点,第 12 ~ 32 和 32 ~ 53 位氨基酸是 B 细胞识别位点。另外,Pre-S1 的第 21 ~ 47 位氨基酸是 HBV 吸附于外周血单核细胞(PBMC)的主要结合位点^[7]。研究表明,单克隆抗体 MA18/7 能与大蛋白的前-S1 肽段结合(如图 1B 所示),从而中和 HBV 对原代培养人源肝细胞的感染力,还能阻断对原代培养树鼩 Tupaia 肝细胞的感染^[8]。而 Hong 等首次阐明人源化的单克隆抗体 KR127,能够识别 Pre-S1 的氨基酸残基 37 ~ 45 片段,并能够在体内阻断 HBV 感染黑猩猩,提示这种抗体可能用于对 HBV 感染有效预防^[9]。

另外,Pre-S1 由于其独特的免疫原性,已经被用来作为第三代 HBV 疫苗的组分,新型疫苗被证实比目前的疫苗更具免疫原性,并允许选择性免疫应答者长期停用乙肝免疫球蛋白^[10]。英国学者 Zuckerman 等开展的一项随机双盲对照试验表明,三联抗原疫苗 Hepacare 能够有效刺激对现用疫苗无免疫应答或低免疫应答者产生免疫应答,1 针 20 μ g 剂量的 Hepacare 比 5 针现用疫苗能够诱导出更高的抗体滴度^[11]。在欧洲和美国的一项联合研究表明,Hepacare 对于低免疫应答者在诱导抗-SHBs 抗体血清转换方面比传统疫苗更具有效力^[12]。类似疫苗还有 Genhvac B 和 Hepagene 等。

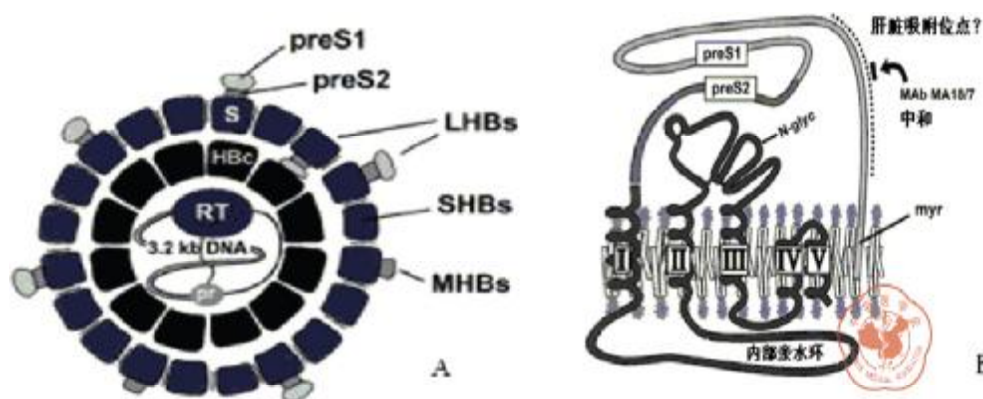


图1 HBV 病毒颗粒外膜蛋白示意图

四、Pre-S1 检测的临床意义

1. Pre-S1 与病毒复制的关系: Pre-S1 是 HBV 外膜蛋白的重要组成部分, 具有相对保守的氨基酸序列, 与 HBV 复制和再感染密切相关。朱合等^[13]对 208 例乙型肝炎病毒感染者血清标本进行 Pre-S1、HBV DNA 和 HBV 血清标志物检测, 发现 Pre-S1 与 HBV DNA 的相关系数为 0.998。HBV DNA 检测阳性 120 例中, Pre-S1 阳性 118 例; HBV DNA 检测阴性 88 例中, Pre-S1 阴性 79 例, 以 HBV DNA 为标准, Pre-S1 检测的敏感性、特异性、准确性分别为 98.3%、89.8%、94.7%。提示 Pre-S1 可作为反映 HBV 复制情况的指标。另有学者对携带不同 HBV 血清标志物患者的 HBV DNA 与 Pre-S1 阳性检出情况进行比较, 发现各组 HBV DNA 和 Pre-S1 阳性检出率差异不显著, 表明 Pre-S1 与 HBV 复制情况具有良好的一致性^[14]。

2. Pre-S1 与 e 系统的关系: 抗-HBe 阳性以往被认为是机体对乙型肝炎病毒感染具有保护作用 and 预后良好的征象, 但临床实践证明, 抗-HBe 阳转后, 部分患者病毒仍在持续复制, 病情继续恶化。景晔等^[14]对 336 例 HBV 感染者的血清学指标和 HBV DNA 进行检测, 发现 Pre-S1 阳性检出率明显高于 HBeAg, 与 HBV DNA 更为接近, 提示 Pre-S1 检测在抗-HBe 阳性慢性乙型肝炎患者中能较准确地反映病毒在体内的复制状态, 弥补因 HBeAg 的缺失而造成的诊治困难, 表明检测 Pre-S1 在反映 HBV 复制及传染性方面比 HBeAg 更有意义。另有学者指出, 作为反映 HBV 复制情况的指标, Pre-S1 敏感性高于 HBeAg, 尤其是低 HBV DNA 载量时 Pre-S1 明显优于 HBeAg, 但特异性则相反^[15]。

3. Pre-S1 与肝功能的关系: Pre-S1 具有很强的免疫原性, 可引起机体免疫应答, 同时调节机体对 Pre-S1 的免疫反应, 从而促进 HBV 的清除。当 Pre-S1 持续阳性或免疫反应过强时, 必然造成肝细胞的免疫性损伤, 使大片肝细胞炎性溶解坏死, 表现为严重肝功能受损, 因而 Pre-S1 阳性患者的转氨酶(ALT、AST)水平明显高于阴性者。有学者对一组血清标本进行检测, 发现 HBV 感染者的 Pre-S1 和 HBV DNA 表达与肝功能的损伤相关, Pre-S1 阳性患者的转氨酶(ALT、AST)水平

明显高于阴性者,差异有显著性($P < 0.01$),表明 Pre-S1 阳性患者较阴性患者肝组织损伤严重^[14]。这与李琴等^[16]的研究结果相类似。

4. Pre-S1 与治疗预后的关系:加强 Pre-S1 的检测对于更全面更有效地了解 HBV 复制情况、评估抗病毒药物的疗效、监控抗病毒治疗是非常必要的。急性肝炎患者 Pre-S1 出现后转阴越早,则病程越短,提示患者病情趋向好转,预后良好;如果 Pre-S1 持续存在,则预示患者病情趋向慢性化。有研究者发现 Pre-S1 阳性时,肝脏的损害程度增加,但经拉米夫定治疗 52 周后,Pre-S1 随着 HBV DNA 的转阴而转阴,表明 Pre-S1 含量随着病程的改变而改变,能正确反映乙型肝炎患者的病理发展过程^[17]。另外,用干扰素治疗慢乙型肝炎患者,治疗后 Pre-S1 滴度逐渐下降的患者,HBsAg 血清转换明显高于 Pre-S1 滴度下降不明显者。而患者 Pre-S1 滴度逐渐下降,HBV DNA 水平亦逐渐下降,两指标具有很好的一致性。表明 Pre-S1 检测对于监测判断干扰素的抗病毒疗效有重要意义^[18]。

五、问题与展望

Pre-S1 的发现已经有 20 余年的历史,近些年随着分子生物学技术的不断进步对其功能和应用研究才得到快速发展。各国研究人员对于 Pre-S1 的基础研究采用的研究方法不尽相同,导致部分结论出现偏差;而对于 Pre-S1 的临床研究更是由于纳入标准和分析方法的不同,研究现状显得比较杂乱。但总的来说,人们对 Pre-S1 的认识已经逐步清晰。目前,Pre-S1 检测项目已经在国内得到了广泛开展,但传统的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法有明显的局限性。时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)法与 ELISA 法相比测量范围、精密度和灵敏度有较大提高,能够准确、及时、敏感地反映患者体内 HBV 的复制情况^[19]。相信随着检测技术的不断进步和研究的不断深入,Pre-S1 检测对于乙型病毒性肝炎诊断、治疗和预后将发挥越来越重要的作用。

(本文图 1 见光盘)

参 考 文 献

- 1 Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51: 761-785.
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 27-43.
- 3 Argnani R, Boccafogli L, Marconi PC, et al. Specific targeted binding of herpes simplex virus type 1 to hepatocytes via the human hepatitis B virus preS1 peptide. *Gene Ther*, 2004, 11: 1087-1098.
- 4 Gripon P, Canine I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 2005, 79: 1613-1622.
- 5 Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol*, 2005, 79: 9786-9798.
- 6 Glebe D. Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006, 52: 3-21.
- 7 Chen X, Li M, Le X, et al. Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection. *Vaccine*, 2004, 22: 439-446.
- 8 Glebe D, Aliakbari M, Krass P, et al. Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, 2003, 77: 9511-9521.
- 9 Hong HJ, Ryu CJ, Hur H, et al. In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in

- chimpanzees. *Virology*, 2004, 318:134-141.
- 10 Beckebaum S, Cicinnati VR, Gerken G. Current concepts for prophylaxis and treatment of hepatitis B virus reinfection after liver transplantation. *Med Klin (Munich)*, 2008, 103:190-197.
 - 11 Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Recombinant hepatitis B triple antigen vaccine: Hepacare. *Expert Rev Vaccines*, 2002, 1:141-144.
 - 12 Page M, Jones CD, Bailey C. A novel, recombinant triple antigen hepatitis B vaccine (Hepacare). *Intervirology*, 2001, 44:88-97.
 - 13 朱合, 吴书笔. 检测乙肝病毒前 S1 蛋白的临床意义. *人民军医*, 2006, 49:80-81.
 - 14 景晔, 陆光生, 刁春红. HBV 感染者血清前 S1 抗原检测意义. *解放军预防医学杂志*, 2006, 24: 41-42.
 - 15 林晓梅, 陶志华, 周武, 等. 前 S1 抗原与 HBV 血清标志物及 HBV-DNA 相关性的探讨. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16: 871-873.
 - 16 李琴, 孙桂珍, 魏玉香, 等. 前 S1 蛋白与病毒 DNA 和核心抗原对乙型肝炎病毒复制诊断的对比. *中华肝病杂志*, 2004, 12:134-136.
 - 17 杨凤娟. Pre-S1 蛋白检测在乙型肝炎临床诊疗中的意义. *武警医学*, 2006, 17:65-66.
 - 18 谢建清, 郑瑞丹. 乙型肝炎病毒前 S1 抗原及其检测的临床意义. *临床军医杂志*, 2006, 34:500-501.
 - 19 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19:165-256.

(收稿日期:2008-09-27)

(本文编辑:温少芳)

高晓芳, 伍伟平, 郑瑞丹. 乙型肝炎病毒前-S1 抗原的基础与临床研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2009, 3(2):226-230.