

精子细胞乙型肝炎病毒核心抗原流式细胞检测方法的建立

张照华 赵秀华 刘晨帆 刘葵花 刘靓文

【摘要】 目的 探讨建立流式细胞分析术对精子细胞乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)定性、定量检测的诊断方法。**方法** 收集62例乙型肝炎患者精液标本,制备成精子细胞单细胞悬液,用荧光标记的小鼠抗HBcAg单克隆抗体与标本细胞充分反应后,应用流式细胞分析术进行定性、定量检测,并制定诊断标准。**结果** 该方法对乙型肝炎患者精子细胞HBcAg定性阳性检出率即敏感度为96.77%,对10例健康对照标本HBcAg定性阴性检出率即特异度为100%,阳性、阴性预测值均为100%,准确度97.22%。该方法精子细胞中HBcAg含量以精子细胞HBcAg指数(SHBcI)表示。乙型肝炎组和对照组SHBcI分别为(5.8777 ± 8.9114)和(0.2800 ± 0.1549),差异具有统计学意义;高病毒载量(HBV DNA $\geq 10^6$ 拷贝/ml)组SHBcI明显高于低病毒载量(HBV DNA $< 10^6$ 拷贝/ml)组;24例拉米夫定治疗者,治疗后SHBcI明显下降,分别为(8.49 ± 5.13)和(4.18 ± 3.17)。**结论** 该方法能够对精子细胞HBcAg定性兼定量进行诊断,该方法建立对于预测乙型肝炎父婴传播以及阻断治疗都将起到指导作用。

【关键词】 乙型肝炎病毒核心抗原;流式细胞术;精子细胞

Establishment of flow cytometry detection of HBcAg in sperm cells from hepatitis B patients ZHANG Zhao-hua, ZHAO Xiu-hua, LIU Chen-fan, LIU Kui-hua, LIU Jing-wen. Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China

【Abstract】 Objective To investigate and establish the special qualitative and quantitative analysis method of HBcAg in sperm cells from hepatitis B patients by flow cytometry (FCM). **Methods** Sperm was collected from sixty-two hepatitis B patients and the sperm cells were made into cellular suspension, then completely reacted with HBcAb monoclonal antibody immunologically marked by fluorescent, finally qualitatively and quantitatively measured by FCM. **Results** The sensitivity of this special qualitative analysis method of HBcAg in sperm cells from hepatitis B patients was 96.77% and the specificity was 100%, the positive predictive value and the negative

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.005

基金项目:济南市卫生局立项科研项目(2005-86)

作者单位:250021 济南市,山东省济南市传染病医院

通讯作者:张照华,Email:huazz68@126.com

predictive value were both 100%, the accuracy were both 97.22%. The quantitation of HBcAg in sperm cells can be indicated by the sperm HBcAg index (SHBcI). The SHBcI in hepatitis B and control group were (5.8777 ± 8.9114) and (0.2800 ± 0.1549), respectively, with statistically significant difference. The SHBcI in HBV DNA $\geq 10^6$ copies/ml group was significantly higher than HBV DNA $< 10^6$ copies/ml group. The SHBcI had a distinct decline after lamivudine treatment (8.49 ± 5.13) vs (4.18 ± 3.17). **Conclusions** This study set up a diagnosis method that could qualitatively and quantitatively measure HBcAg expression in sperm cells. It will play an important role in the prediction and interruption of father to infant transmission in patients with hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B virus core antigen; Flow cytometry; Sperm cell

乙型肝炎是一种严重危害人类健康的世界性传染病,我国为乙型肝炎高发区。近几年来,乙型肝炎父婴传播逐渐成为研究热点。乙型肝炎父婴传播主要是指乙型肝炎病毒通过感染精子细胞使精子细胞携带病毒,从而将乙型肝炎病毒传给下一代,因此,建立一种准确、可靠的证明精子细胞内 HBV 存在的方法,对预测乙型肝炎父婴传播至关重要。本研究采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)对精子细胞 HBcAg 进行定性定量检测,根据检测值判断父婴传播的可能性。

资料和方法

一、临床资料

病例选择:所有病例均来自 2007 年 1 月至 2008 年 12 月本院门诊和住院患者。62 例均为男性,年龄 18~45 岁,平均(29.3 ± 7.4)岁,诊断均符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会 2000 年联合修订的《病毒性肝炎防治方案》。其中,慢性 HBV 携带者 27 例,慢性乙型肝炎患者 33 例,急性乙型肝炎患者 2 例;HBcAg 阳性者 38 例,HBcAg 阴性者 24 例;24 例患者接受拉米夫定(100 mg/d)抗病毒治疗 3~12 个月不等。对照组 10 例,由山东大学齐鲁医院检验科提供,HBV M 全部阴性。年龄 21~35 岁,平均(28.9 ± 6.5)岁。

二、方法

1. 标本收集及处理:禁欲 2~8 d,手淫法采精液于清洁阴茎套内;于 1 h 内取液化精液 1.0 ml,加生理盐水洗涤,2000 r/min,离心 5 min,留取部分上清液作为精浆 -20°C 保存备用,弃去其余上清液,再加生理盐水洗涤,再次 2000 r/min,离心 5 min,弃上清液,加少许生理盐水混匀沉渣。用 75% 乙醇固定沉渣, 4°C 保存备用。

2. 精子细胞悬液的制备:75% 乙醇固定的精液 400 μl (约 2×10^6 个精子细胞),平均分入两支试管,分别加入 2 ml 磷酸盐缓冲液(PBS),1000 r/min 离心 5 min,弃上清(重复两次);一支试管加入抗-HBc 荧光工作液 20 μl ,另一支管加入无荧光标记抗-HBc 工作液 20 μl ,分别振荡混匀,室温避光反应 30 min;PBS 洗涤

两次,弃上清重悬细胞,待机检测。

3. 流式细胞仪检测:上机收集 1×10^4 个细胞,荧光散射数据存软盘,HBcAg 含量以荧光强度表示,由计算机处理结果得出组方图。精子细胞中 HBcAg 含量以 HBcAg 指数(sperm HBcAg index, SHBcI)表示,其计算公式为:

$$\text{SHBcI} = \frac{\text{精子细胞 HBcAg 荧光强度均值}}{\text{同例未标记精子细胞荧光强度均值}}$$

(注:SHBcI 值可以排除因细胞数、检测电压等不同所致的误差)

4. HBcAg 定性判断方法:取 10 例正常健康男性精子细胞 SHBcI 均值(0.2800 ± 0.1549),95% 可信区间的上限值($0.2800 + 1.6400 \times 0.1549 = 0.5340$)作为 HBcAg 定性界值。如精子细胞 SHBcI 数值 > 0.5340 ,即诊断为 HBcAg 阳性。

5. HBcAg 定量判断方法:SHBcI 数值的大小即为 HBcAg 含量的多少。

6. 主要试剂与仪器:异硫氰酸荧光标记抗-Hbc 购自 Santa Cruz 公司。流式细胞仪 FACSCantoTM 型购自美国 BD 公司。

7. 其他观察指标:血清、精浆 HBV DNA 定量采用美国 PE(Perkin Elmer)公司产 5700 型荧光定量分析仪,HBV DNA 最低检出下限 1000 拷贝/ml。

三、统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件对计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结 果

一、流式细胞术对精子细胞 HBcAg 定性测定的评价

根据 SHBcI > 0.5340 即诊断 HBcAg 阳性,流式细胞仪对精子细胞 HBcAg 定性测定结果显示,试验组 HBcAg 阳性 60 例(a),阴性 2 例(c);对照组 HBcAg 阳性 0 例(b),阴性 10 例(d)。其中,敏感度(真阳性率)(SEN)为 96.77% [$\text{SEN} = a/(a + c)$];特异度(真阴性率)(SPE)为 100% [$\text{SPE} = d/(b + d)$];阳性预测值(+PV)为 100% [$+PV = a/(a + b)$];阴性预测值(-PV)为 100% [$-PV = d/(b + d)$];准确度(ACC)为 97.22% [$\text{ACC} = (a + d)/(a + b + c + d)$]。

二、流式细胞术对精子细胞 HBcAg 定量值结果

62 例乙型肝炎男性患者,精子细胞 HBcAg 定量平均(5.8777 ± 8.9114),其中低度表达($\text{SHBcI} \leq 2.5$)7 例(11.29%)、中度表达($\text{SHBcI}: 2.5 \sim 5$)18 例(29.03%)、高度表达($\text{SHBcI} \geq 5$)37 例(59.68%)。对照组精子细胞 HBcAg 定量平均(0.2800 ± 0.1549)。二者相比具有统计学意义($t = 4.94, P = 0.00$)。

三、不同组 SHBcI 检测结果

根据血清 HBV DNA 定量结果,分为低病毒载量($\text{HBV DNA} < 10^6$ 拷贝/ml)和高病毒载量($\text{HBV DNA} \geq 10^6$ 拷贝/ml)两组,血清 HBV DNA $< 10^6$ 拷贝/ml 组 18 例,SHBcI 平均(4.09 ± 2.61),血清 HBV DNA $\geq 10^6$ 拷贝/ml 组 44 例,SHBcI

平均(7.62 ± 7.37),两组相比具有统计学意义($t = 2.779, P = 0.007$)。

流式细胞组方图上显示随着血清 HBV DNA 水平的升高,精子细胞 HBcAg 单克隆荧光强度依次升高,见图 1。

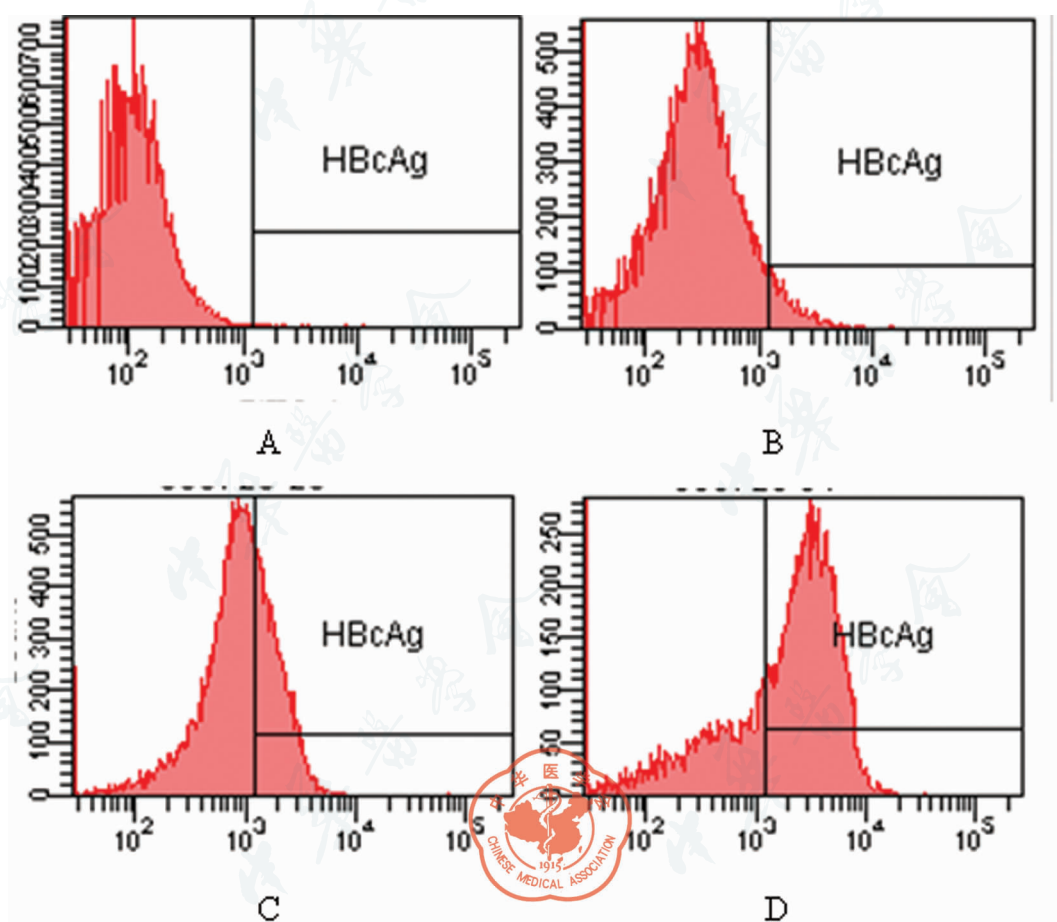


图1 正常对照精子细胞与乙肝患者精子细胞 HBcAg 含量流式细胞检测图
注:横坐标为小鼠抗人 HBcAg 单克隆抗体荧光强度,纵坐标为受检细胞数。HBcAg 所在区域为 HBcAg 阳性区域。A 为正常对照精子细胞;B、C、D 依次为乙型肝炎患者 HBcAg 低、中、高度表达的精子细胞。

24 例患者经拉米夫定治疗后,随着血清 HBV DNA 水平的下降,SHBcI 值明显下降(8.49 ± 5.13 vs 4.18 ± 3.17 ; $t = 8.509, P = 0.000$)。

讨 论

父婴垂直传播指 HBV 通过患者精子细胞将病毒传播给子代或经接触感染其配偶继而由配偶再传给子代,前者更为多见。Huang 等^[1,2]采用荧光原位杂交方法证实 HBV DNA 能够在精子细胞染色体中整合,整合可以增加精子细胞染色体的不稳定性,导致染色体畸变,从而揭示了 HBV 可以通过生殖细胞垂直传播至下一代的可能性。Ali 等^[3,4]将金仓鼠卵母细胞与携带 HBV 人精子体外授精,并对其早期胚胎细胞进行 HBV X 基因复制和表达检测,结果证实了在胚胎细胞原核、

细胞核以及染色体水平均有 X 基因复制和表达,为 HBV 可从父代传给子代提供了直接证据。Vicari 等^[5]发现与 HCV 感染者相比,HBV 感染对精子的数量、运动性、形态以及活力等参数影响更大。王珊珊等^[6]用 PCR 检测 HBsAg 阳性而其配偶正常的男性携带者血清、精子及其受染胎儿血清 HBV DNA,经测序发现父婴间核苷酸同源性达 98% ~ 100%。上述方法操作复杂,不能定性兼定量地反映精子细胞内病毒表达的程度。随着科技的发展,一些新的检测技术被开发出来,闫玉萍等^[7]将 37 例慢性乙型肝炎患者肝活检组织制备成单细胞悬液,用小鼠抗人 HBcAg 单克隆抗体标记后,应用流式细胞分析术进行了定性、定量检测,建立了肝活检组织 HBcAg 定量检测方法。

由于直接的父婴传播发生在生殖细胞阶段,本研究从生殖细胞水平,利用流式细胞分子生物学诊断技术,建立了对乙型肝炎患者的精子细胞 HBcAg 定性、定量检测的诊断方法。并制定了精子细胞 HBcAg 流式定性、定量判断标准。由于流式细胞仪受检细胞数多,漏诊率低,从而提高了该方法的灵敏度(96.77%),对 10 例健康对照精子细胞 HBcAg 定性检测全部阴性,体现了特异度高的特点(100%),这样可以减少误诊,以上两点保证了该方法的准确度(97.22%)。本文首次提出了以精子细胞 HBcAg 指数(SHBcI)来表示慢性乙型肝炎患者精子细胞中 HBcAg 含量,发现高病毒载量组 SHBcI 值高,提示血清 HBV DNA 越高,精子细胞 HBcAg 表达越高,精子细胞带病毒可能性也越大,越容易实现父婴传播,与临床相符。研究还发现,经拉米夫定治疗后,随着血清 HBV DNA 水平的降低,SHBcI 值明显下降,提示孕前拉米夫定抗病毒治疗可以减少 HBV 的父婴垂直传播。因此,该方法的建立,对于乙型肝炎父婴传播的预测以及乙型肝炎父婴传播干预措施疗效的判定都将起到指导作用。

参 考 文 献

- 1 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, et al. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl*, 2002, 4: 209-212.
- 2 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, et al. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 736-740.
- 3 Ali BA, Huang TH, Xie QD. Detection and expression of hepatitis B virus X gene in one and two-cell embryos from golden hamster oocytes in vitro fertilized with human spermatozoa carrying HBV DNA. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70: 30-36.
- 4 Ali BA, Huang TH, Salem HH, et al. Expression of hepatitis B virus genes in early embryonic cells originated from hamster ova and human spermatozoa transfected with the complete viral genome. *Asian J Androl*, 2006, 8: 273-279.
- 5 Vicari E, Arcoria D, Di MC, et al. Sperm output in patients with primary infertility and hepatitis B or C virus; negative influence of HBV infection during concomitant varicocele. *Minerva Med*, 2006, 97: 65-77.
- 6 王珊珊, 李文玲, 彭桂福, 等. 父婴传播的乙型肝炎病毒 S 基因进化树分析. *中华医学杂志*, 2003, 83: 451-454.
- 7 闫玉萍, 尹格平, 马继顺, 等. 肝活检组织乙型肝炎病毒核心抗原定量检测方法的建立. *中华检验医学杂志*, 2002, 25: 22-24.

(收稿日期: 2010-01-19)

(本文编辑: 孙荣华)

张照华, 赵秀华, 刘晨帆, 等. 精子细胞乙型肝炎病毒核心抗原流式细胞检测方法的建立[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2010, 4(3): 266-270.