Pre-S1Ag 和 Pre-S2Ag 及 HBV-LP 在乙肝病毒筛查中的价值*

刘军辉[1]，汪靖园[1]，王林川[1]，肖 尧[1]，阮竞雄[1]，闫 芳[2**]
(1. 西安交通大学第一附属医院 检验科，陕西 西安 710061；2. 西安市第三医院 输血科，陕西 西安 710018)

[摘 要] **目的**：探讨乙肝病毒(HBV)前 S1 抗原(Pre-S1 Ag)、前 S2 抗原(Pre-S2 Ag)及乙肝大蛋白(HBV-LP)在乙肝病毒(HBV)筛查中的价值。**方法**：258 例乙肝患者分为乙肝表面抗原(HBsAg)携带组($n=182$)及 HBV DNA 阳性组($n=76$)，另选 100 例健康体检者作为对照组；采用双抗体夹心(ELISA)法检测受检者血清 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 水平，比较 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 筛查 HBV 的灵敏度和特异度，分析 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 对 HBsAg 携带组 3 种血清学模式患者的 HBV 检出能力；采用线性回归法分析 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性，推算 3 个指标的 ABV 病毒检出限。**结果**：Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 应用于 HBV 筛查的特异度为 99% ~100%，但 Pre-S2 Ag 和 HBV-LP 筛查 HBV 的灵敏度显著高于 Pre-S1 Ag($P<0.01$)；HBeAg 阴性人群中(HBsAg-HBeAb-HBcAb 阳性和 HBsAg-HBcAb 阳性模式)的 Pre-S2 Ag、HBV-LP 检出率均显著高于 Pre-S1 Ag($P<0.01$)；Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 与 HBV DNA 正相关($r=0.82$、0.76、0.70，$P<0.01$)，Pre-S2 Ag、HBV-LP 对 HBV 的检出限接近 10^6IU/L，Pre-S1 Ag 对 HBV 的检出限≥10^8 IU/L。**结论**：Pre-S2 Ag、HBV-LP 相较于 Pre-S1 Ag 具有更高的灵敏度和更低的检出限，更适合作为 HBV 筛查的血清标志物。

[关键词] 肝炎病毒，乙型；前 S1 抗原；前 S2 抗原；乙肝大蛋白；酶联免疫吸附试验；灵敏度；特异度
[中图分类号] R446.61 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)12-1436-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.014

Clinical Value of Pre-S1Ag, Pre-S2Ag and HBV-LP in Hepatitis B Virus Screening

LIU Junhui[1], WANG Jingyuan[1], WANG Linchuan[1], XIAO Yao[1], RUAN Jingxiong[1], YAN Fang[2]
(*1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China; 2. Department of Blood Transfusion, Xi'an NO. 3 Hospital, Xi'an 710018, Shaanxi, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the clinical values of the pre-S1 antigen (Pre-S1 Ag), pre-S2 antigen (Pre-S2 Ag) and hepatitis B virus large protein (HBV-LP) in screening hepatitis B virus (HBV). **Methods**: According to HBV markers, 258 patients were divided into two groups: one group ($n=182$) with hepatitis B surface antigen (HBsAg) and another group ($n=76$) is HBV DNA positive. 100 healthy subjects were used as control group. Serum Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP levels were measured by its own specific ELISA kit. The sensitivity, specificity and detection limit of Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP levels in screening HBV were compared between HBsAg-carrying group and HBV DNA-positive group. In addition, their correlations with viral load were also analyzed. The association of Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP with HBV DNA was analyzed by linear regression. **Results**: In HBV screening, the specificity of Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP was 99% ~

*[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81500219)；陕西省科学技术研究发展计划项目(2016SF-217)
**通信作者 E-mail:173032147@qq.com
网络出版时间:2018-12-19 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.r.20181219.1014.001.html

100%, but the sensitivity of Pre-S2 Ag and HBV-LP in HBsAg-carrying group and HBV DNA-positive group is significantly higher than Pre-S1 Ag ($P<0.01$). The sensitivity of Pre-S2 Ag and HBV-LP was significantly higher than that of Pre-S1 Ag for HBsAg carriers (86.81%、85.71% vs 48.9%) and HBV DNA positive cases (86.84%, 89.47% vs 35.53%), $P<0.0001$. Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP were positively correlated with HBV DNA ($r=0.82$, 0.76, 0.70, $P<0.01$). The detection limit of Pre-S2 Ag, HBV-LP for HBV is around 106 IU/L, whereas the detection limit of Pre-S1 Ag for HBV is ≥108 IU/L. **Conclusions**: Pre-S2 Ag and HBV-LP have higher sensitivity and lower detection limit than Pre-S1 Ag, and thus are more suitable as serum markers for HBV screening.

[**Key words**] hepatitis B virus; pre-S1 antigen; pre-S2 antigen; hepatitis B large protein; enzyme-linked immunosorbent assay; sensitivity; specificity

乙型肝炎病毒(HBV)是一种双链环状 DNA 病毒,基因组长度约为 3.2 kb,包含 4 个开放阅读框(ORF),分别编码外膜蛋白、核心蛋白、聚合酶及 X 蛋白[1]。HBV 外膜蛋白编码区编码合成前 S1 抗原(Pre-S1Ag)、前 S2 抗原(Pre-S2Ag)及 S 蛋白,是 HBV 小(S)、中(M)、大表面蛋白(HBV-LP)的重要组成部分[2]。WHO 数据显示,全球 HBV 感染人数约为 24 800 万[3],HBV 感染也是急性或慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌(HCC)的主要病因,每年导致全球 100 万人死亡[4]。目前,乙肝表面抗原(HBsAg)和 HBV DNA 检测仍是 HBV 感染筛查和病毒监测的常规方法。但自上世纪 90 年代开始,Pre-S1Ag 作为间接反映 HBV 存在和复制的血清标志物开始应用于临床,也是目前国内应用最为广泛的 HBV 表面蛋白检测项目,而 Pre-S2Ag 与 HBV-LP 在国内研究较少,因此本研究通过采用双抗体夹心(ELISA)法检测 HBV 患者血清 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 水平,比较 3 种表面蛋白在 HBV 筛查中的灵敏度、特异度及检出限,并分析其与病毒载量的相关性。

1　对象与方法

1.1　对象

选取 2017 年 6 ~ 9 月在感染科接受诊治的 HBV 患者 258 例,其中男 138 例,女 130 例,年龄 16 ~ 89 岁(中位年龄 49.5 岁);根据标志物不同分为 HBsAg 携带组($n=182$)及 HBV DNA 阳性组($n=76$);另选取同期体检的 100 例健康人群作为对照组,其中男 45 例,女 55 例,年龄 24 ~ 83 岁(中位年龄 54.5 岁)。对照组入选标准:肝功能及肾功能正常,甲肝抗体、HBsAg、丙肝抗体、戊肝抗体、梅毒抗体、HIV 抗体检测为阴性的人群。

1.2　方法

采集受检者空腹 3 ~ 5 mL 静脉血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20 ℃保存备用。使用烟台艾德康 ASP150/8 全自动酶免工作站,采用双抗体夹心法(ELISA)法测定血清 Pre-S1Ag、Pre-S2Ag 及 HBV-LP 水平,试剂盒购自英科新创、北京建安及北京贝尔公司,严格按照说明书进行。HBV 筛查灵敏度(%) = HBV 患者检出人数(阳性数)/ 患者总人数) × 100% ,即 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 HBsAg 携带组、HBV DNA 阳性组中的阳性率;HBV 筛查特异度(%) = 检测为正常的人数(阴性数)/ 总的正常人数 × 100% ,即 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 在健康对照组中阴性率。根据血清学模式再将 182 例 HBsAg 携带者分为 HBsAg-乙肝 e 抗原(HBeAg)-乙肝核心抗体(HBcAb)阳性($n=47$)、HBsAg-乙肝 e 抗体(HBeAb)-乙肝模式核心抗体(HBcAb)阳性模式($n=97$)及 HBsAg-HBcAb 阳性模式($n=38$),计算 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在不同血清学模式下检出率。根据病毒 HBV DNA 水平将 HBV DNA 再分为 $\leqslant 10^6$ IU/L 组($n=28$)组、$10^6 \sim 10^8$ IU/L 组($n=30$)及 $>10^8$ IU/L($n=18$),通过计算 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 3 组患者中检出率推断其 HBV 病毒检出限(检出阳性率≥50%),依据测定的 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 吸光度(*OD*)值,采用线性回归法分析 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性。

1.3　观察指标

比较 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 筛查 HBV 灵敏度和特异度,分析 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 HBsAg 携带组 3 种血清学模式下的检出率,计算 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 3

组 HBV DNA 阳性患者中的 HBV 病毒检出限；采用线性回归法分析 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计数资料用百分比(%)表示，其中灵敏度、特异性、检出率比较采用 χ^2 检验，Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性分析采用线性回归法。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 筛查 HBV 的灵敏度和特异度

结果显示，Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在对照组中的特异度比较，差异无统计学意义($P=0.367$)；Pre-S2Ag、HBV-LP 在 HBsAg 携带组、HBV-DNA 阳性组的灵敏度高于 pre-S1Ag，差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1　Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 筛查 HBV 的灵敏度和特异度

Tab. 1　The sensitivity and specificity of three surface proteins for HBV screening

组别	n	灵敏度(%)			特异度(%)		
		Pre-S1Ag	Pre-S2Ag	HBV-LP	Pre-S1Ag	Pre-S2Ag	HBV-LP
HBsAg 携带组	182	48.9	86.81(1)	85.71(1)	NA	NA	NA
HBV-DNA 阳性组	76	35.53	86.84(1)	89.47(1)	NA	NA	NA
健康对照组	100	NA	NA	NA	99	100	100

注：NA 为不适用，(1) 与同组 Pre-S1Ag 比较，$P<0.01$

2.2 不同血清学模式 HBV 携带者 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 对 HBV 的检出率

HBeAg 阳性人群中(HBsAg-HBeAg-HBcAb 阳性模式)，Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 检出率比较，差异无统计学意义($P=0.589$)；HBeAg 阴性人群中(HBsAg-HBeAb-HBcAb 阳性和 HBsAg-HBcAb 阳性模式)，Pre-S2 Ag、HBV-LP 检出率均显著高于 Pre-S1 Ag，差异有统计学意义($P<0.01$)；提示 Pre-S2Ag 和 HBV-LP 对小三阳 HBV 患者检出能力明显优于 Pre-S1 Ag。见表 2。

表 2　不同血清学模式 HBV 携带者 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 对 HBV 的检出率

Tab. 2　The detection rates of three HBV surface proteins in different serological patterns

血清学模式	n	检出率(n,%)		
		Pre-S1Ag	Pre-S2Ag	HBV-LP
HBsAg-HBeAg-HBcAb 阳性	47	43(91.49)	45(95.74)	45(95.74)
HBsAg-HBeAb-HBcAb 阳性	97	32(32.99)	86(88.66)(1)	83(85.57)(1)
HBsAg-HBcAb 阳性	38	14(36.84)	27(71.05)(1)	28(73.68)(1)

(1) 与同组 Pre-S1Ag 比较，$P<0.01$

2.3 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 3 组 HBV DNA 阳性患者中的 HBV 病毒检出限

HBV DNA 阳性样本检测中，Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 检出率随 HBV DNA 水平增高而递增，见表 3。Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 $>10^8$IU/L 组的检出率比较，差异无统计学意义($P=0.361$)；Pre-S2Ag、HBV-LP 在 $\leqslant 10^6$ IU/L 组及 $10^6\sim10^8$ IU/L 组的检出率均显著高于 Pre-S1Ag，差异无统计学意义($P<0.01$)；提示 Pre-S2Ag、HBV-LP 对于低、中、高 HBV 样本均有很高的检出率，而 Pre-S1Ag 仅在 HBV DNA 高水平样本中可稳定检出；Pre-S1Ag 在 HBV DNA 的检出限约为 10^8 IU/L，Pre-S2Ag 及 HBV-LP 接近于 10^6 IU/L。

表 3　Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag 及 HBV-LP 在 3 组不同水平 HBV DNA 阳性患者中的 HBV 病毒检出率

Tab. 3　The detection rates of three HBV surface proteins in patients with HBV DNA

HBV DNA 水平	n	检出率(n,%)		
		Pre-S1Ag	Pre-S2Ag	HBV-LP
$\leqslant 10^6$IU/L	28	1 (3.57)	20(71.43)	21(75.00)
$10^6\sim10^8$IU/L	30	8(26.67)	28(93.33)	29(96.67)
$>10^8$IU/L	18	17(94.44)	18(100.00)	18(100.00)

2.4 Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 与 HBV DNA 的相关性

以乙肝表面蛋白测定的 *OD* 值为纵坐标，对应

的 HBV DNA(病毒载量)对数值为横坐标进行相关性分析。结果显示,Pre-S1Ag、Pre-S2Ag 及 HBV-LP 的 *OD* 值与 HBV DNA 水平正相关(r = 0.82、0.76、0.70,P < 0.01)。见图 1。

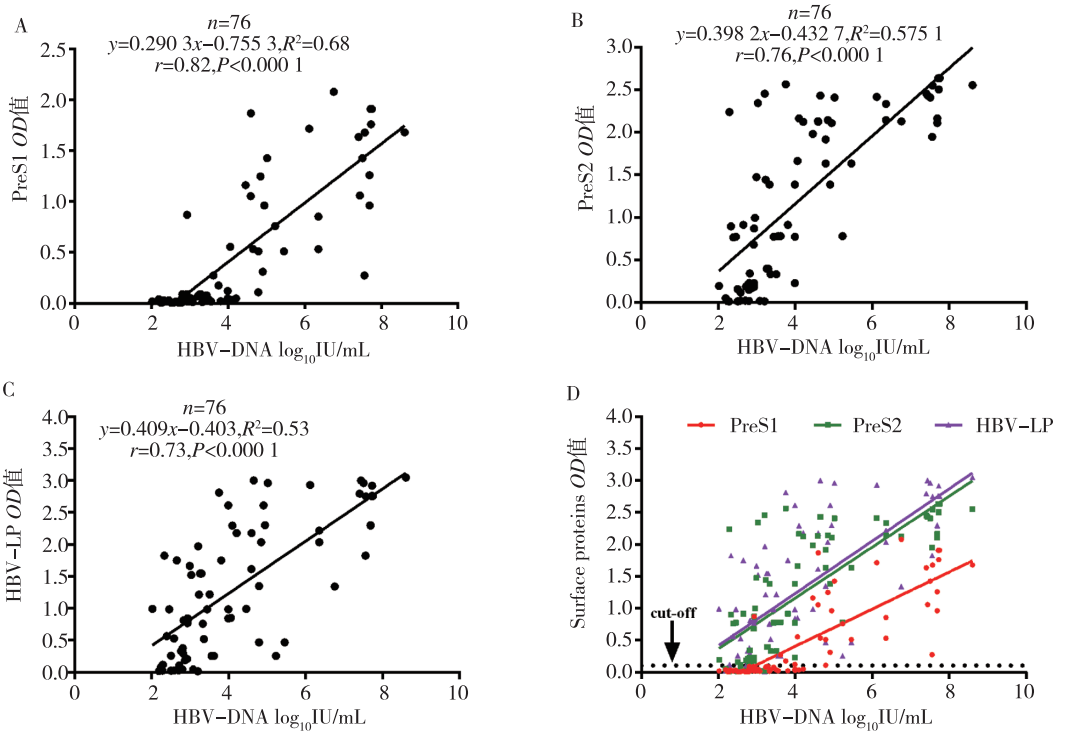

图 1　Pre-S1 Ag、Pre-S2 Ag、HBV-LP 与 HBV DNA 的相关分析

Fig. 1　The association of Pre-S1 Ag, Pre-S2 Ag and HBV-LP with HBV DNA

3　讨论

HBV 感染诊疗中,常常选择 HBsAg 进行筛查,以 HBeAg 阳性作为判断是否存在病毒复制及具有传染性的血清学标志物。但存在乙肝病毒 S 区突变[5]或者特殊的血清型(如 ay)引起 HBsAg 漏检及前 C 区启动子突变导致 HBeAg 假阴性的现象,因此有必要引入其他的标志物进行补充[6-9]。Pre-S1Ag、Pre-S2Ag、HBV-LP 作为 HBV 表面蛋白的组成成分,参与 HBV 复制、感染细胞的识别,并与 HBV 相关疾病的进展密切相关[10-13],对其检测可作为 HBV 感染诊断、HBV 复制监测和预后判断的有用工具。

在本次研究中,Pre-S1Ag、Pre-S2Ag 和 HBV-LP 在 HBeAg 阳性 HBV 患者和健康人群中具有很高的灵敏度(91.49% ~95.74%)和特异度(99% ~100%)。但值得注意的是在 HBsAg 携带者及 HBeAg 阴性的 HBV 患者中,Pre-S2Ag 和 HBV-LP 检出率均显著高于 Pre-S1Ag。在国内的类似研究中,HBeAg 阴性的 HBV 患者中存在病毒复制的比例高达 44.7% ~54.57%[11,14],而 Pre-S1Ag、Pre-S2Ag 和 HBV-LP 对这类患者检出率分别为 12.68%[15]、72.52%[15]、72.32%[16]。此外,WANG 等[10]在 28 例 HBsAg 阴性的 HBV 患者 Pre-S1Ag、Pre-S2Ag 和 HBV-LP 检测中,其阳性率分别为 10.7%、17.9% 及 75%。以上研究结果一方面提示,HBeAg、Pre-S1Ag 阴性并不是排除 HBV 病毒复制的可靠指标;另一方面说明作为 HBV 感染筛查的血清学指标,Pre-S2Ag 和 HBV-LP 灵敏度优于 Pre-S1Ag。

本研究在对不同 HBV DNA 水平的样本检测中发现 3 种表面蛋白阳性检出率随 HBV DNA 水平增高而递增,而且其 OD 值与 HBV DNA 水平正相关,与国内其他报道一致[15,17]。Pre-S1Ag 只有当 HBV 载量□10^8 IU/L 时可稳定检出,而病毒载量在 < 10^6、10^6 ~ 10^8 IU/L 样本中其阳性率仅为 3.57%、26.67%。而 Pre-S2Ag 和 HBV-LP 在病毒载量在 ≤ 10^6 样本中阳性率分别为 71.43%、75.00%。表明对于 HBV 的检出限,Pre-S1Ag 约为

10^8IU/L,而 Pre-S2Ag 和 HBV-LP 接近于 10^6IU/L,提示作为反映 HBV 存在与否的依据,Pre-S2Ag 和 HBV-LP 可靠性优于 Pre-S1Ag。此外,国内学者在 HBV 患者抗病毒治疗中对 HBV 外膜蛋白、HBV DNA 检测时发现,能有效应答的 HBV 患者首先出现 Pre-S1Ag 阴转,然后是 Pre-S2Ag 和 HBV DNA,HBV-LP 阴转最后出现,而治疗中出现反弹的患者往往表现出 HBV-LP 持续阳性[10,18-20]。

综上,尽管 Pre-S1Ag 在 HBeAg 阳性 HBV 患者中检出率很高并与 HBV 复制密切相关。但作为 HBV 感染筛查、判断 HBV 是否存在的血清学标志物,Pre-S2Ag 和 HBV-LP 对 HBV 患者的检测灵敏度和病毒检出限明显优于 Pre-S1Ag。

4 参考文献

[1] ROBERTA M, BIRGIT H, TILL W T, et al. Exogenous hepatitis B virus envelope proteins induce endoplasmic reticulum stress: involvement of cannabinoid axis in liver cancer cells[J]. Oncotarget, 2016,7(15): 20312-20323.

[2] WHO. Preventing perinatal hepatitis B virus transmission:a guide for introducing and strengthening hepatitis B birth dose vaccination[S]. WHO, 2015.

[3] WHO. Guidelines on hepatitis B and C testing[S]. Geneva, 2017.

[4] BLOCK T M, RAWAT S, BROSGART C L. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon[J]. Antiviral Res, 2015,35(121):69-81.

[5] 李海波, 季兆东, 郭陈. 乙型肝炎病毒前S基因突变研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2015,9(11):2221-2223.

[6] PENG Y, LI Y, HOU J, et al. The nucleotide changes within HBV core promoter/precore during the first 12weeks of nucleos(t)ide treatment might be associated with a better virological response[J]. Infection Genetics & Evolution, 2017,17(49):116-121.

[7] 刘金涛.乙型肝炎病毒外膜大蛋白检测的应用价值及其研究进展[J].检验医学, 2014,29(2):186-191.

[8] 陈海潮,单平囡,许德顺.HBV-LP与HBV-DNA检测在乙型肝炎诊治中的互补作用[J].中华医院感染学杂志, 2012,22(18):4051-4053.

[9] 何丽苇,陈会欣.乙肝病毒外膜大蛋白检测在临床诊断与治疗中的意义[J].临床血液学杂志(输血与检验), 2018,31(4):588-592.

[10] WANG N Y, ZHANG D, ZHAO W, et al. Hepatitis B virus large surface protein in serum as a candidate biomarker for evaluating hepatitis B virus infection[J]. Clinical Biochemistry, 2011, 44(14-15):1199-1204.

[11] 夏芳,徐元宏,郑美娟, 等.乙型肝炎病毒外膜大蛋白、DNA、前S1抗原检测用于评价乙型肝炎病毒复制状况的对比分析[J].中华预防医学杂志, 2017,40(6):501-505.

[12] 卓传尚,柳丽娟,谢海花, 等.乙型肝炎病毒包膜蛋白诱导肝癌细胞系内质网应激的研究[J].中华实验和临床感染病杂志, 2016,10(3):375-379.

[13] 李阳,咸建春.慢性乙型肝炎患者血清HBV外膜大蛋白、HBsAg、HBV DNA及ALT水平与肝组织炎症活动度的相关性[J].临床肝胆病杂志, 2015,31(12):2054-2056.

[14] 张海雁, 刘方鹤, 葛存兴, 等. 乙型肝炎病毒前S1抗原和HBV-DNA联合检测在乙型肝炎诊疗中的作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015,32(23):3458-3459.

[15] 邓乐, 温志立, 何金秋, 等. 乙型肝炎患者联合检测血清前S1、前S2抗原、E抗原的临床意义[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 06(1):147-150.

[16] 李彩东, 吴斌, 段正军, 等. 慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒外膜大蛋白与病毒复制的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(20):4976-4978.

[17] 龚杰,刘柏林,方艳秋, 等.乙肝病毒外膜大蛋白、前S1抗原、HBV-DNA与血清标志物之间相关性分析[J].中国实验诊断学, 2013,17(9):1634-1637.

[18] 盛江来, 黄海军. 拉米夫定抗病毒治疗的乙型肝炎患者血清乙肝大蛋白和乙肝病毒DNA监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(9):2240-2241.

[19] 徐瑞芳,张红云,田怡, 等.慢性乙型肝炎抗病毒治疗中监测乙肝大蛋白的临床价值[J].胃肠病学和肝病学杂志, 2016,23(2):171-173.

[20] 高锦,徐爱芳,王妙禅, 等. 乙肝病毒外膜大蛋白检测在核苷类似药物治疗CHB患者中的价值研究[J].中国卫生检验杂志, 2013,23(18):3471-3473.

(2018-09-13 收稿,2018-11-27 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳