维普资讯 http://www.cqvip.com

乙型肝炎病毒前S蛋白的研究

VI.前S蛋白与人血清白蛋白的结合*

胡克勤 喻植群 张永源 李方和 郝连杰

（同济医科大学同济医院临床免疫研究室，武汉）

提 要

本文观察了40份HBV感染者血清前S_1、前S_2与PHSAR的关系，结果表明前S_2可能是PHSA的主要结合部位，但前S_1可能也具有结合PHSA的活性。体外条件下PHSA可阻断前S_1、前S_2以及PHSAR活性，这种阻断效应与PHSA稀释度呈反相关系。本文还证实，HBV感染者血清内存在HBV外壳蛋白—HSA复合物，推测HSA与HBV外壳蛋白的结合可能是宿主抗HBV感染的免疫防御方式之一。

关键词：乙型肝炎病毒，前S蛋白，聚合人血清白蛋白受体，人血清白蛋白

七十年代初国外学者发现，HBsAg阳性血清可以凝集聚合人血清白蛋白（PHSA）包被的红血球，这种现象被认为是乙肝病毒（HBV）的受体样功能。随后人们分离出HBV外壳蛋白的另一种成分前S蛋白，并制备出相应的抗体。进一步的研究提示，HBV与PHSA结合这种受体样的功能主要存在于前S_2蛋白（简称前S_2）[1]。由于PHSA对人肝脏也存在相同的亲和性，推测HBV前S_2这种受体样功能可能介导HBV粘附于人肝细胞，导致HBV感染[2]。但是以下实验结果似乎与此推测有矛盾：(1)正常人血清不含PHSA；(2)PHSA与肝细胞的结合并无种属特异性；(3)体外条件下与前S_2结合时，PHSA必须是经戊二醛交联的聚合体，而并非其它方式的聚合体[3,4]。本研究观察HBV感染者血清在体外条件下与PHSA的相互作用，证实这些血清中的HBV外壳蛋白-人血清白蛋白(HSA)复合物的存在，探讨HBV前S_1和前S_2在体外和体内条件下与PHSA和HSA的结合能力。

材 料 与 方 法

1.标本 本研究共收集门诊和住院HBV感染者血清标本40份，按南宁会议标准，这些病人包括急性乙型肝炎、HBV携带者、慢迁肝、慢活肝和肝硬化。采血后分离血清，－20℃保存备用。部分病例同时取肝活检标本 制备石蜡包埋切片。

2.试剂 抗HBs(c20/02)、抗前S_1(MA18/7)和抗前S_2(Q19/10)单克隆抗体系联邦德国格廷根大学Gerlich教授馈赠[3,5]；兔抗HBA系上海生物制品所产品；酶标羊抗兔IgG系北京生物

本文于1988年5月17日收到。

*本研究系国家"七·五"计划重点科技攻关和国家自然科学基金资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

制品所产品；酶标羊抗鼠 IgG 系美国 Eymed Lab Inc. 产品；酶标抗生物素系美国 Sigma 公司产品；HSA 纯品系武汉生物制品所产品；生物素标记抗 HBs 系本室制备；PHSA 系用戊二醛聚合而成，由葛州坝工程局第三职工医院赠送。

3.方法 血清 HBsAg、前 S_1、前 S_2、PHSAR 及乙肝病毒壳蛋白-HSA 结合力(HBVs-HSA 结合力)检测均采用本室建立的 LAB-ELISA 试验方法、具体操作步骤见表 1。

表 1 血清 HBsAg、前 S_1、前 S_2、PHSAR 及 HBVsp-HSA 结合力测定操作步骤

Table 1 The procedure of union test for HBsAg, pre-S, PHSAR and HBVsp-HSA

反应步骤	加入反应试剂					反应条件	
	HBsAg	前 S_1	前 S_2	PHSAR	HBVsp-HSA		
包被	抗-HBs	抗-前 S_{1m}	抗-前 S_{2m}	PHSA	HSA	4℃	24h
加待检血清	√	√	√	√	√	37℃	2h
加 B-抗-HBs	√	√	√	√	√	37℃	2h
加 A-P	√	√	√	√	√	37℃	30min
加 PO-H_2O_2	√	√	√	√	√	室温	10～15min

PHSA 阻断试验在体外条件下，将待检血清用 1:100、1:10 的 PHSA 预处理，4℃ 20小时，然后用 LAB-ELISA 法检测这些经预处理后的血清 HBsAg、前 S_1、前 S_2 和 PHSAR，其操作流程同上，观察 PHSA 预处理对这些 HBV 标志检查结果的影响。

HBV 外壳蛋白-HSA 复合物的检测 用夹心 ELISA 法，以抗 HBs-抗 HSA、抗前 S_1-抗 HSA 和抗前 S_2-抗 HSA 抗体对检测 HBV 外壳蛋白-HSA 复合物。流程主要包括：(1)分别用抗 HBV 外壳蛋白抗体(抗 HBs、抗前 S_1、抗前 S_2)包板；(2)待检血清；(3)抗 HSA 抗体；(4)酶标羊抗兔 IgG，显色反应。对照试验包括：(1)省包被抗体；(2)HBV 标志均阴性的正常人血清取代待检血清；(3)省抗 HSA 或酶标羊抗兔 IgG。

用间接免疫酶技术检测肝组织内前 S_1 和前 S_2[7]。

结 果

1. HBsAg、前 S_1、前 S_2 与 PHSAR 的关系

40 份血清标本 HBsAg、前 S_1、前 S_2 和 PHSAR 的检出率分别为 90%、75%、60% 和45%，其中前 S_1 的检出率显著高于 PHSAR 的检出率 ($x^2=7.5$, $P<0.01$)，前 S_2 和 PHSAR 的检出率无显著性差别($x^2=1.8$, $P>0.05$)。如表 1，前 S_1、前 S_2 与 PHSAR 的符合率分别为 70% 和 75%，两者之间无显著性差别 ($x^2=0.25$, $P>0.05$)。PHSAR 活性只存在于前 S_1 和/或前 S_2 阳性的血清标本，3 份单纯 HBsAg 阳性标本未能检出 PHSAR 活性。2 份前 S_1 阳性、前 S_2 阴性的血清标本可检出 PHSAR 活性。部分前 S_1、前 S_2 阳性的标本未能检出 PHSAR 活性(表 2)。

为观察体外条件下，HBV 外壳蛋白是否能与 HSA 结合，从上述 40 个病例中选出 20 份经病理诊断为慢性肝病的血清标本，其中 10 例检出 PHSAR 活性。用 HSA 取代 PHSA 包被反应板，以后的操作同 PHSAR 检查法，20 份标本无一例呈阳性反应。

2. 体外条件下 PHSA 对前 S_1、前 S_2 和 PHSAR 的阻断效应

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 血清前 S_1、前 S_2 与 PHSAR 的关系

Table 2 The Relationship between PHSAR and Pre-S Proteins in Sera of Patients with Liver Diseases

PHSAR	前 S_1		前 S_2	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	18	0	16	2
阴性	12	10	8	14

用稀释度为1：100，1：10的PHSA体外条件下预处理待检血清标本，然后检测这些标本的前 S_1、前 S_2 以及PHSAR活性，结果参见表2。20份血清标本未经PHSA预处理时，前 S_1、前 S_2 和PHSAR的检出率分别为70%，55%和50%，体外条件下血清标本用PHSA预处理后对前 S_1、前 S_2 和PHSAR均有不同程度的阻断效应，其中对PHSAR阻断效果最明显，然后依次为前 S_2 和前 S_1；这种阻断作用呈一定的剂量效应关系，PHSA稀释度愈低，阻断率愈高（表3）。

表 3 PHSA 对血清前 S_1、前 S_2 和 PHSAR 的阻断效应

Table 3 The Blocking Test with PHSA in LAB-ELISA Detecting Pre-s Proteins and PHSAR

观察指标	病例数	1：100 PHSA 阻断率	1：10 PHSA 阻断率
前 S_1	14	28.6	50.0
前 S_2	11	45.5	81.8
PHSAR	10	50.0	100.0

1份前 S_1、前 S_2 和PHSAR均阳性的标本经1：10 PHSA预处理后，PHSAR活性消失，但仍可检出前 S_1 和前 S_2；另2份前 S_1 和PHSAR阳性的标本，PHSA预处理可同时阻断前 S_1 和PHSAR活性。

3. 血清HBV外壳蛋白-HSA复合物的检测

选20份经病理诊断为慢性肝病的血清标本，分别用抗HBs-HSA、抗前 S_1-抗HSA、抗前 S_2-抗HSA抗体对的夹心ELISA法检测HBV外壳蛋白-HSA复合物。10份HBsAg、前 S_1 和前 S_2 均阳性的标本5例可检出HBV外壳蛋白-HSA复合物，并可同时与上述三种抗体对反应。1例HBsAg、前 S_1 和前 S_2 均阳性的标本，和2例HBsAg、前 S_1 阳性，前 S_2 阴性的标本只能与抗HBs-抗HSA和抗前 S_1-抗HSA抗体对反应。1例单纯HBsAg阳性的血清标本可同时与上述三种抗体对反应，用间接免疫酶技术可在其肝组织内检出前 S_1 和前 S_2。

讨　论

一般认为HBV前 S_2 分子上有PHSA结合部位，这种结合有种属特异性，可能介导HBV对人肝细胞的粘附与感染[1,2]。最近的研究结果对这一推测提出了争议，Yu等证

维普资讯 http://www.cqvip.com

实 HBV 外壳蛋白只能与戊二醛交联的 PHSA 结合，不能与天然存在的 PHSA 结合[3]、提示体外实验并不能真正反映前 S_2 与 PHSA 的结合特性；Ishihara 等报道，不带前 S 的 HBsAg 同样可与 PHSA 结合，这种结合效应与 HBsAg 滴度有显著的相关性[8]，提示 PHSAR 活性不仅存在于前 S_2 可能也存在于 HBsAg。本研究采用 LAB-ELISA 进行各项指标的检测，发现前 S_1、前 S_2 及 PHSAR 仅存在于 HBsAg 阳性的血清中；前 S 的检出率显著高于 PHSAR。前 S_2 和 PHSAR 的检出率无显著性差别，提示前 S_2 与 PHSAR 活性关系密切，前 S_2 很可能是 PHSA 的主要结合部位。我们也发现 2 例 HBsAg 和前 S_1 阳性，前 S_2 阴性的血清标本可检出 PHSAR 活性，提示少数 HBV 感染者血清 HBsAg 和前 S_1 可能也参与同 PHSA 的结合。Takahachi 等报道，前 S_2 的含量，空间构形、糖基化程度的不同，其对 PHSA 的结合亦不尽相同。本研究观察到并非所有前 S_2 阳性的 HBV 感染者血清中均能检出 PHSAR 活性，为该氏的论点提供了证据，同时也说明血清中 PHSAR 测定并不能完全取代前 S_2 的检测。

本研究证实，在体外条件下，PHSA 对 PHSAR 前 S_2 和前 S_1 有不同程度的阻断效应，但对 HBsAg 的检测无明显影响、这种阻断效应与 PHSA 稀释度呈反相关系。除 1 份标本外，PHSA 对前 S_2 和 PHSAR 的阻断效应有平行关系，进一步表明前 S_2 可能是 PHSA 主要的结合部位，PHSAR 的检测反映了前 S_2 在体外条件下与 PHSA 结合的特性。PHSA 对前 S_1 虽有阻断效应，但阻断率低于 PHSAR 和前 S_2，我们还发现 2 例前 S_2 阴性的标本，PHSA 可选择性地阻断前 S_1 和 PHSAR。Neurath 等报道，抗前 S_1 能明显地抑制肝细胞(Hep G_2)对 HBsAg 纤维素的粘附[10]，结合本实验的结果，我们认为前 S_1 可能也具有结合 PHSA 的活性，其在介导 HBV 粘附至肝细胞中所起的作用尚有待进一步研究。

用 HSA 取代 PHSA 包被反应板，本研究发现在体外条件下，前 S_1 和前 S_2 阳性的病人血清不能与 HSA 结合。采用夹心 ELISA 法我们发现，10 份 HBsAg、前 S_1 和前 S_2 均阳性的血清可分别与抗 HBs-抗 HSA、抗前 S_1-抗 HSA 和抗前 S_2-抗 HSA 反应；Heermann 等报道，正常人血清能抑制抗前 S_2(Q19/10) 与前 S_2 决定簇的结合[3]，上述资料提示部分 HBV 感染者的血清内可能存在 HBV 外壳蛋白-HSA 复合物。我们还观察到，单纯 HBsAg 阳性和 HBsAg、前 S_1 均阳性但前 S_2 阴性的病例也可检出 HBV 外壳蛋白-HSA 复合物，提示 HBV 感染者体内 HSA 既可与前 S_2 也可与前 S_1 和 HBsAg 结合形成相应的复合物。由于 HBV 外壳蛋白可粘附人肝细胞[1,2]，HBV 感染者体内 HSA 与 HBV 外壳蛋白的结合可能是宿主抵抗 HBV 感染的免疫防御方式之一。

我们曾报道，血清前 S_1 和前 S_2 的检出率略低于肝组织相应的检出率[5]。本文观察的 HBV 外壳蛋白-HSA 复合物阳性病例，除 1 例血清前 S_1、前 S_2 阴性、肝组织前 S_1、前 S_2 阳性外，其余病例血清 HBsAg、前 S_1 和或前 S_2 均阳性，提示这些病例血清中 HSA 与 HBV 外壳蛋白的结合只是部分的、不完全的，基本上不影响血清 HBsAg、前 S_1 和前 S_2 的检测。同时检测肝组织内前 S_1 和前 S_2 可排除 HBV 外壳蛋白-HSA 复合物对检测血清前 S_1 和前 S_2 的影响，提高检出率。

参 考 文 献

〔1〕Machida A, et al., 1984, *Gastroenterol* 86：910.
〔2〕Gerlich WH, et al., 1987, Presurface and precore products of human hepatitis B virus. In Robinson W, et al, eds. *UCLA Symposia on Molecular Biology*, New Series. NY: Alan R. Liss, Inc.
〔3〕Heermann KH, et al., 1987, *J Med Virol* 21：56A.
〔4〕Yu MW, et al., 1985, *J Virol* 55：736.
〔5〕Heermann KH, et al., 1984, *J Virol*, 52：396.
〔6〕胡克勤等，待发表资料.
〔7〕胡克勤等，待发表资料.
〔8〕Ishihara K, et al., 1987, *J Med Virol* 21：89.
〔9〕Takahshi K, et al., 1986, *J Immunol* 136：3467.
〔10〕Neurath AR, et al., 1986, *Cell* 46：429.

Researches on Pre-S Proteins of Hepatitis B Virus

VI. Binding of Pre-S Proteins with Human Serum Albumin

Hu Ke-qin Yu Zhi-qun Zhang Yong-yuan Li Fang-he Hao Lian-jie

(*Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan*)

40 serum samples were used to study the relation of Pre-S_1 and pre-S_2 proteins to polymerized human serum albumin receptor (PHSAR). Our results suggested that pre-S_2 may be the main binding site for PHSA, but pre-S_1 may also possess the activity to bind PHSA. Pre-S_1, pre-S_2 and PHSAR may be blocked in vitro by pretreatment with PHSA and the negative correlation between the blocking rate and the dilution of PHSA was seen. We also showed that the complexes of HBV envelop protein-human serum albumin may occur in the serum with HBV infection and it is proposed that the binding between HSA and HBV envelop proteins may be one of mechinisms for host to defence HBV infection.

Key words: Hepatitis B virus, Pre-S proteins, Polymerized human serum albumin, Human serum albumin