

· 实验室研究 ·

# 江苏省宜兴地区丙型肝炎病毒 F 蛋白抗体检测

邓小昭 蒋春梅 许可 王忠灿 丁伟良 喻荣彬 王洁 吴超 张云

**【摘要】** 目的 检测江苏省宜兴地区丙型肝炎(丙肝)患者血清丙肝病毒(HCV)-F 抗体及其分布。方法 利用基因重组获得的 HCV-F/GST 蛋白作为抗原, 包被酶联反应板, ELISA 间接法检测 120 例丙肝患者、13 例乙肝患者、3 例戊肝患者及 10 份正常人血清 HCV-F 抗体, 结合丙肝患者的临床资料及疾病特征, 统计分析 HCV-F 抗体的分布情况及与 HCV 感染的关系。结果 120 例丙肝患者血清 HCV-F 抗体阳性 82 例, 阳性率 68%, 而 15 例乙肝、3 例戊肝患者及 10 份正常人血清标本均未检出阳性; 资料分析显示 HCV-F 抗体阳性率与 HCV 患者年龄、临床类型之间差异有统计学意义, 51 岁以上年龄组的 HCV-F 抗体阳性率是 20~50 岁组的 6.675 倍(95% CI: 2.407~19.071), 并且随着病程进展, 阳性率也随之增高(OR = 2.749, 95% CI: 1.470~5.141)。结论 江苏省宜兴地区 HCV 感染者血清中存在 HCV-F 抗体, 并可能与病程相关。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒; F 蛋白; 检测

**Detection of serum anti-F antibody in hepatitis C virus infected patients** DENG Xiao-zhao, JIANG Chun-mei, XU Ke, WANG Zhong-can, DING Wei-liang, YU Rong-bin, WANG Jie, WU Chao, ZHANG Yun. *Medicial Institute of Nanjing Amry, Nanjing 210002, China*  
Corresponding author: ZHANG Yun, Email: zhangyun111@sohu.com

**【Abstract】 Objective** To assess the prevalence of serum anti-F in patients with hepatitis C virus (HCV) infection and the distribution of anti-F. **Methods** The recombinant protein (HCV-F/GST) was coated onto micro titer plates as antigen. Sera of 120 patients with hepatitis C virus infection, 15 patients with hepatitis B, 3 patients with hepatitis E and 10 normal sera were tested by indirect ELISA for detecting anti-F. **Results** 82 samples out of the 120 (68%) HCV infected patients exhibited a positive anti-F reaction, showing significant difference from the controls with no HCV infection ( $P < 0.01$ ). Data from logistic analysis showed that the positive rate of anti-F was higher in patients over 50 year olds (OR = 6.675, 95% CI: 2.407-19.071). Patients of midrange, severe phase and hepatic cirrhosis had higher rate than the others (OR = 2.749, 95% CI: 1.470-5.141). **Conclusion** Prevalence and distribution of anti-F in Yixing hepatitis C patients was reported and which might be related to the progression of HCV infection.

**【Key words】** Hepatitis C virus; F protein; Detection

丙型肝炎病毒(HCV)感染所引起的丙肝呈全球分布。笔者曾对健康者与丙肝患者的外周血单个核细胞(PBMC)表达的蛋白质进行双相凝胶电泳和MALDI-TOF-TOF 串联质谱分析, 找到与正常人PBMC比较后有差异表达的 65 个蛋白。通过 Mascot 数据库检索和相关资料的查阅, 确定出其中具有进一步研究意义的差异蛋白——F(frameshifting)蛋白, 并在大肠埃希菌系统成功表达<sup>[1,2]</sup>。F 蛋白的产生机制尚不十分明了。近年来发现, HCV RNA 的核心区还

低水平表达了另外一种新型 C 蛋白, 以往的一些研究认为这种的新型 C 蛋白是被截短了的核心蛋白<sup>[3-5]</sup>。而最近的研究表明, 这种蛋白是由重叠在核心编码区的一段序列编码。与 HCV 传统单一阅读框架翻译的病毒蛋白不同, 新型 C 蛋白是由 HCV 核心蛋白编码序列在翻译时发生核糖体读码框移位产生的, 被命名为新型 C 蛋白或 ARFP(alternative ribosomal frameshift protein)或 F 蛋白<sup>[6,7]</sup>。本研究以基因重组获得的 HCV-F/GST 蛋白作为抗原<sup>[8]</sup>, 用 ELISA 间接法检测了丙肝患者血清 HCV-F 抗体, 初步研究了其分布情况及与丙肝进程的关系。

## 材料与方法

1. 材料: 120 例 HCV 抗体阳性患者血清标本为

基金项目: 江苏省高校自然科学研究指导性计划基金资助项目(03KJD330144); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004011)

作者单位: 210002 南京军区军事医学研究所(邓小昭、王忠灿、张云); 南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系(蒋春梅、许可、喻荣彬、王洁); 宜兴市第一人民医院(丁伟良); 南京大学医学院附属鼓楼医院(吴超)

通讯作者: 张云, Email: zhangyun111@sohu.com

2003-2004 年江苏省宜兴市人民医院收集提供(上海实业科华生物技术有限公司酶联免疫法 HCV 抗体检测试剂盒检测)。平均年龄为 48.36 岁,其中男性 79 例,女性 41 例;结合流行病学调查和临床病史,根据中华医学会传染病与寄生虫分会和肝病分会 2000 年病毒性肝炎诊治方案中诊断标准,慢性丙肝患者 85 例,急性丙肝患者 19 例,丙肝肝硬化患者 16 例,并结合肝脏超声、CT 和核磁共振确诊。对照组为来自解放军八一医院和南京市传染病医院 15 份乙肝血清、3 份戊肝血清及宜兴市人民医院的 10 份健康人血清标本(HAV、HBV 和 HCV 感染指标均阴性)。酶联反应板为深圳产 96 孔板。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 抗体为南京阿恩地公司产品。抗原包被液为碳酸盐缓冲液(CBS, pH 值 9.6);封闭液、样本稀释液与酶标抗体稀释液均由本实验室配制(山羊血清为北京军区兽医防治中心产品,小牛血清为 Hyclone 公司产品);洗液为 PBST 缓冲液。HRP 酶底物采用 TMB 显色系统, TMB 底物及终止液为南京华欣药业生物工程有限公司产品(由南京军区军事医学研究所制备)。酶联免疫测定仪为 Bio-Rad 公司产品(Model 550)。HCV-F/GST 蛋白:将 HCV-1b 型核心蛋白基因 0 框 N 端 10 个氨基酸序列和 +1 框 10As~C 端的序列,克隆至原核表达载体 pGEX-4T-2,转化 *E. coli* TG1 后, IPTG (1.0 mmol/L) 诱导表达,超声裂菌。Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化回收 HCV-F/GST 蛋白。SDS-PAGE 鉴定纯度,紫外分光光度法调整浓度至(1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )<sup>[8]</sup>。

## 2. 方法:

(1) HCV-F/GST 包被:每孔 100  $\mu\text{l}$  包被液(50 mmol/L 碳酸盐缓冲液, pH 值 9.6) 含 0.1  $\mu\text{g}$  HCV-F/GST 蛋白加入 96 孔板, 44 $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日用 PBST(含 0.05% Tween-20 的 PBS) 洗涤后, 加入封闭液(含 30% 山羊血清和 10% 小牛血清的 PBS, 每孔 100  $\mu\text{l}$ ), 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭 4 h。吸去封闭液后, 洗液洗涤 3 次拍干。将待测血清用样品稀释液(含 20% 山羊血清, 10% 小牛血清和 0.2% Tween-20 的 PBS) 做 1:100 稀释后加入包被封闭好的酶联反应板内(每孔 100  $\mu\text{l}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 同时设立空白对照。PBST 洗板 5 次后, 加入稀释好的 HRP 标记的抗人 IgG 抗体(每孔 100  $\mu\text{l}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min。PBST 洗板 5 次后, 每孔加入 TMB 底物 A、B 液各一滴, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光显色 15 min, 再分别加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu\text{l}$  终

止反应。用空白孔调零, 酶标仪测定吸光度 ( $A_{490}$ ) 值。

(2) 统计学分析:临界值 ( $A$ ) = 阴性对照平均值 ( $A$ )  $\pm 2s$ 。数据采用了  $\chi^2$  检验、 $t$  检验和多因素 logistic 回归分析方法, 用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

## 结 果

1. 血清标本 HCV-F 抗体检测:120 份丙肝患者血清中 82 份(约 68%) 样本的  $A_{490}$  值均高于 0.056, 其平均值为 0.696(表 1)。对照组 15 份乙肝血清、3 份戊肝血清及 10 份正常人血清标本  $A_{490}$  值平均值为 0.0434, 标准差为 0.0064; 临界值  $0.0434 + 2 \times 0.0064 = 0.056$ ; 两组的  $A_{490}$  值差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。随机选择 10% 的样本进行盲法重复检测, 共重复检测 12 份, 12 份酶标仪测定  $A_{490}$  值与第一次结果一致, 一致率为 100%。

表 1 宜兴市 120 例不同性别患者中 HCV-F 抗体分布

性别	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
男	58	21	73.4
女	24	17	58.5
合计	82	38	68.3

## 2. F 抗体的分布情况:

(1) F 抗体在不同性别患者中的分布:男性和女性丙肝患者 HCV-F 抗体的分布差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.762, P = 0.097$ ), 见表 1。

(2) HCV-F 抗体在不同年龄组中的分布:51 岁以上年龄组的阳性率(89.8%) 高于 20~50 岁组(47.5%), 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 24.787, P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 宜兴市 120 例不同年龄组中 HCV-F 抗体分布

年龄(岁)	总例数	阳性例数	阳性率(%)
20~	61	29	47.5
51~	59	53	89.8
合计	120	82	68.3

(3) HCV-F 抗体在不同临床类型患者中的分布:不同临床类型丙肝患者中, 中重度和肝硬化患者中的 F 蛋白阳性率最高, 分别达 93.9% 和 87.5%, 与其他两组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而 HCV-F 抗体在急性丙肝、轻度慢性丙肝的分布没有差异 ( $P > 0.1$ ), 见表 3。

(4) HCV-F 抗体与 HCV RNA 的关系:HCV-F 抗体的分布与患者血清中 HCV RNA 的检出差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.714, P = 0.099$ )。而在 HCV RNA 型别之间的分布差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.154, P = 0.926$ ), 见表 4。

**表3** 宜兴市 120 例不同临床类型丙肝患者中HCV-F抗体的分布

临床分类	例数	阳性例数	阳性率(%)
急性丙肝	19	8	42.1
轻度慢性丙肝	52	29	55.8
中重度慢性丙肝	33	31	93.9
肝硬化	16	14	87.5

**表4** 宜兴市 120 例肝炎患者HCV-F抗体与 HCV RNA 的关系

HCV-F 抗体	RNA 阳性例数			RNA 阴性 例数	合计
	1b	2	1b/2		
阳性	40	2	1	39	82
阴性	24	1	1	12	38
合计	64	3	2	51	120

(5) HCV-F 抗体的多因素分析: 经多因素 logistic 分析显示, F 抗体阳性率与患者年龄、临床类型之间存在统计学关联, 51 岁以上年龄组的抗体阳性率是 20~50 岁组的 6.675 倍 (95% CI: 2.407~19.071), 并且随着病程进展 F 抗体阳性率也随之增高 (OR = 2.749, 95% CI: 1.470~5.141)。而性别和 HCV RNA 与 F 抗体阳性率无关。

**表5** 宜兴市 120 例肝炎患者HCV-F抗体的多因素分析

变量	$\beta$	$s_x$	Wald $\chi^2$ 值	P 值	OR 值(95% CI)
性别	-0.592	0.512	1.335	0.248	0.553(0.203~1.510)
年龄组	1.913	0.528	13.130	0.000	6.775(2.407~19.071)
临床类型	1.011	0.319	10.030	0.002	2.749(1.470~5.141)
RNA	-0.476	0.380	1.564	0.211	0.621(0.295~1.310)

## 讨 论

目前对 F 蛋白的生物学特性及功能了解甚少。它在丙型肝炎的慢性化和病毒相关的发病机制中的潜在作用尚不清楚。已发现它不稳定, 在体外细胞实验中半衰期约 10 min, 免疫荧光染色及亚细胞分布实验发现 F 蛋白位于胞浆中, 主要与内质网相连, 这与核心蛋白及 NSSA 蛋白相似, 推测该蛋白在此发挥其功能。F 蛋白在 HCV 生活周期中的作用, 尤其是 F 蛋白与核心蛋白同时在体内表达, 以往认为核心蛋白的有些功能可能与 F 蛋白有关, 值得深入探讨。

我们以往的实验结果表明, 在 HCV 感染者 PBMC 中存在 F 蛋白表达, 本研究中检测的 120 份 HCV 感染者血清中 F 抗体阳性 82 份, 检出率为 68%; 在对照组人群中均未检出 F 抗体, 证明 F 蛋白可在 HCV 感染者体内自然表达。

分析 F 抗体在不同性别人群中的分布, 男性和女性丙型肝炎患者 HCV-F 抗体的分布差异有统计学意义 ( $P=0.104$ )。20~50 及 51 岁以上两个年龄组的受检对象几乎相等 (分别为 61, 59), 检出率分别为 47.5%、89.8%, 且两者差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。经多因素分析 F 蛋白抗体阳性率与年

龄、临床类型之间存在统计学关系; 提示 F 蛋白在不同年龄上的丙肝患者中免疫应答存在差异。

在不同临床类型丙肝患者中, 中重度和肝硬化患者中的 F 抗体阳性率最高, 分别达 93.9% 和 87.5%, 多因素分析亦显示 F 抗体阳性率也随着病程的进展而增高。而 HCV-F 抗体在急性丙肝、轻度慢性丙肝间的分布没有差异 ( $P>0.1$ )。推测 F 蛋白表达的可能性与表达量随着感染年限增加而增长。Callaghan 等<sup>[9]</sup>报道 F 蛋白表达的水平与肝脏受损有关, 并且表达的水平与组织学的损害程度有关, 提示它是肝脏损害的特异性标志物。Branch 等<sup>[10]</sup>报道, 在对 HCV 相关的肝细胞癌患者癌组织进行体外培养时, 获得高表达的 F 蛋白, 定量 RT-PCR 显示核心蛋白水平降低并伴随 F 蛋白高表达, 推测后者竞争性地抑制了前者表达; 并且认为 F 蛋白可能与 HCV 感染的慢性化有关。

本研究以重组克隆的 HCV F 蛋白作为免疫检测抗原, 报道了江苏宜兴地区 HCV 感染人群的 HCV-F 抗体阳性率, 结合 120 份具有相对完整资料的临床病例, 分析了 HCV-F 蛋白与 HCV 感染进程的相关性, 这些工作将有助于进一步研究 HCV-F 蛋白的功能以及与 HCV 感染的关系。

## 参 考 文 献

- [1] Xu ZM, Choi J, Benedict Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*, 2001, 20(14):3840-3848.
- [2] Xu ZM, Choi J, Lu W, et al. Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 2003, 77(2):1578-1583.
- [3] Vassilaki N, Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/Core + 1 coding open reading frame. *JBC*, 2003, 278:40503-40513.
- [4] Boulant S, Beechi M, Penin F, et al. Unusual multiple recoding events leading to alternative form of HCV core protein from genotype 1b. *JBC*, 2003, 278(46):45785-45792.
- [5] Baril M, Brakier-Gingras L. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(5):1474-1486.
- [6] Varaklioti A, Vassilaki N, Gogopoulou U, et al. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *JBC*, 2002, 277(20):17713-17721.
- [7] Choi J, Xu Z, Ou JH. Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Bio*, 2002, 23(5):1489-1497.
- [8] 蒋春梅, 刁振宇, 崔国兴, 等. 丙型肝炎 F 蛋白的原核表达及初步应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(2):134-137.
- [9] Callaghan N, Majeed T, O'Connell A, et al. A comparative study of serum F protein and other liver function tests as an index of hepatocellular damage in epileptic patients. *Acta Neurol Scand*, 1994, 89(4):237-241.
- [10] Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, et al. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double frameshift protein, and others. *Seminars Liver Disease*, 2005, 25(1):105-117.

(收稿日期:2007-06-15)

(本文编辑:尹廉)