

乙型肝炎病毒与载脂蛋白 B 关系及其意义的实验研究

卢燕辉, 徐成润, 卢秋燕, 吴贺华

解放军第 175 医院感染科, 福建 漳州 363000

摘要: **目的** 通过检测不同乙型肝炎病毒 (HBV) 载量受试者血脂水平的差异及其与 HBV 的关系及其意义。**方法** 选择 2017 年 6 月至 2018 年 1 月住院的 100 例 HBV 携带者及同期入院体检的 100 例健康人作为研究对象, 对其健康状态进行复检, 确定受试者无其他疾病影响的条件下, 将受试者根据 HBV 载量分为三组: 病毒载量 ≤ 500 拷贝/ml (正常组, $n = 100$), 500 拷贝/ml $<$ 病毒载量 $< 1 \times 10^5$ 拷贝/ml (HBV 携带组, $n = 37$), 病毒载量 $\geq 1 \times 10^5$ 拷贝/ml (乙肝患者组, $n = 63$)。检测血清血脂指标 [甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、载脂蛋白 (Apo) A1] 水平和血浆 ApoB 水平; 对转染与未转染 pHBV1.3 质粒的两种 HepG2 细胞中 ApoB mRNA 的表达进行测定; 对转染与未转染 ApoB 的两种 HepG3 细胞中 HBsAg、HBeAg 含量及 HBV-DNA 含量进行测定。**结果** HBV 数量随着患者病情加重而增多, 正常者体内不含 HBV。血清学检测显示, 随受试者体内病毒载量 (正常组 \rightarrow HBV 携带组 \rightarrow 乙肝患者组) 的递增, 其血清 TC、HDL、LDL、ApoA1 和血浆 ApoB 水平均呈递降 (P 均 < 0.05); 其中, LDL 含量下降最为明显。进一步对作为 HDL 主要载脂蛋白的 ApoB 进行的 RT-PCR 检测显示, 转染 pHBV1.3 质粒的 HepG2 细胞其 ApoB mRNA 表达水平低于未转染细胞。HBV 指标检测显示, 未转染 ApoB 的 HepG3 细胞其 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 含量均明显高于转染细胞 (P 均 < 0.01)。**结论** HBV 感染可减少患者血脂水平, 并以 LDL 及其主要载脂蛋白 ApoB 的下降最明显, HBV 感染可降低 ApoB 对 HBV 复制的抑制作用, 促进 HBV 的复制。该作用是否通过微粒体 TC 转移蛋白 (MTP) 途径而产生, 有待进一步研究。

关键词: 乙型肝炎病毒; 血脂; 低密度脂蛋白; 载脂蛋白 B; 病毒载量; 逆转录-聚合酶链式反应; 酶联免疫法; 核酸扩增荧光定量

中图分类号: R 512.91 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)01-0039-04

Experimental study of relationship between hepatitis B virus and apolipoprotein B and its significance

LU Yan-hui, XU Cheng-run, LU Qiu-yan, WU He-hua

Department of Infectious Diseases, The 175 Hospital of People's Liberation Army, Zhangzhou, Fujian 363000, China.

Corresponding author: WU He-hua, E-mail: 409455912@qq.com

Abstract: Objective By detecting the difference of blood lipid levels in subjects with different hepatitis B virus (HBV) loads to explore its relationship with HBV and their significance. **Methods** A total of 100 HBV carriers hospitalized from June 2017 to January 2018 and 100 healthy persons for physical examination during the same period were selected as the research subjects. Without the influence of other disease factors determined by re-examined, all subjects were divided into normal group (viral load ≤ 500 copies/ml, $n = 100$), HBV carrier group ($500 <$ viral load $< 1 \times 10^5$ copies/ml, $n = 37$) and hepatitis B patients group (viral load $\geq 1 \times 10^5$ copies/ml, $n = 63$) according to the detection of serum viral load. Serum lipid levels [triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), apolipoprotein (Apo) A1] and plasma ApoB level were measured; the expressions of ApoB mRNA in HepG2 cells transfected with and without pHBV1.3 plasmid were determined; the contents of HBsAg, HBeAg and HBV-DNA in HepG3 cells transfected with and without ApoB were detected. **Results** The loads of HBV increased with the aggravation of the patient's disease. No hepatitis B virus were detected out in normal peoples. Serological tests showed that the serum levels of TC, HDL, LDL, ApoA1 and plasma level of ApoB decreased gradually with the increase of viral load (normal group \rightarrow HBV carrier group \rightarrow hepatitis B patients group, all $P < 0.05$), and LDL content decreased most obviously. Further detection of ApoB as the main apolipoprotein of HDL by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay showed that ApoB mRNA expression level in HepG2 cells transfected with pHBV1.3 plasmid was lower than that in non-transfected

cells. Detection of HBV markers showed that the contents of HBsAg, HBeAg and HBV DNA in HepG3 cells without ApoB transfection were significantly higher than those in the ApoB-transfected cells (all $P < 0.01$). **Conclusions** HBV infection can reduce the blood lipid levels, especially LDL and its major apolipoprotein-ApoB. HBV infection can reduce the inhibitory effect of ApoB on HBV replication and promote HBV replication. It needs to be further studied whether this effect is produced through microsomal TC transfer protein pathway.

Key words: Hepatitis B virus; Blood lipid; Low density lipoprotein; Apolipoprotein B; Viral load; Reverse transcription polymerase chain reaction; Enzyme chain immunoassay; Nucleic acid amplification fluorogenic quantitative assay

乙型病毒性肝炎(乙肝)分为急性和慢性两种,主要是由乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的疾病。HBV 主要存在于肝细胞中,会引起肝细胞坏死、炎症和纤维化^[1]。乙肝在发展中国家的发病率比较高,我国 HBV 携带率约为 7.18%,主要表现为肝硬化或活动性乙肝^[2-4]。乙肝的传播方式主要是血液传播、医源性传播、母婴传播和性接触传播^[5-7]。HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae),基因组长大约为 3.2 kb,是已知的感染人体最小的 DNA 病毒之一,直径只有头发丝的四万分之一,而它导致的肝炎也是最难治愈的病毒性疾病之一^[8]。HBV 是一个双链 DNA 病毒,但和 RNA 病毒一样,其复制存在着逆转录的过程,使得病毒基因组能被整合到机体中,机体难以将病毒彻底清除,成为潜在致癌的隐患^[9-10]。HBV 进入人体后主要作用于肝细胞,所以,发生 HBV 感染后,肝脏中一些物质的含量显著降低,主要是低密度脂蛋白(LDL)的含量下降明显,同时,LDL 的某些成分还可能对 HBV 的复制有一定影响。本文主要研究 LDL 及某些成分表达对 HBV 增殖的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 6 月到 2018 年 1 月住院的 100 例 HBV 携带者以及同期入院体检的 100 例健康人作为研究对象。两类型受试者基本资料比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

表 1 受试者基本资料比较 ($n = 100, \bar{x} \pm s$)

类型	男/女(例)	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)
健康体检者	49/51	35.21 ± 10.52	168.57 ± 10.94	60.64 ± 10.31
HBV 携带者	50/50	38.96 ± 10.59	170.88 ± 10.84	58.11 ± 10.35
P 值	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

1.2 纳入与排除标准 (1)入组标准:18~65 岁的患者;有完整的基线资料记录。(2)排除标准(对所有受试者):排除其他肝炎病毒感染;合并恶性肿瘤、自身免疫性肝病、酒精性肝病及非酒精性脂肪性肝病;高脂血症、冠心病及动脉粥样硬化等其他影响脂质代谢的疾病;严重的心脑血管等疾病;精神疾病患者等^[2]。受试者与家属商议后签署研究同意书;研

究过程中按照规定充分保障受试者的身体健康;对受试的研究记录进行保密,保护其隐私。

1.3 分组方法 将所有受试者根据 HBV 载量分为三组:病毒载量 ≤ 500 拷贝/ml(正常组, $n = 100$), 500 拷贝/ml $<$ 病毒载量 $< 1 \times 10^5$ 拷贝/ml(HBV 携带组, $n = 37$), 病毒载量 $\geq 1 \times 10^5$ 拷贝/ml(乙肝患者组, $n = 63$)。

1.4 受试者身体基本状况的检测 对受试者的基本健康情况进行复检。在进行身体状况检测前一天不应食用过于油腻、高蛋白食物,避免大量饮酒;检测前一天 20:00 后开始禁食 12 h, 以免影响检测结果。在检测取样时应放松心情,避免因恐惧而增加取样的困难^[10]。取样方式为静脉采血。取位于体表的浅静脉,大部采用肘部静脉或手背静脉,部分采血不顺利者可取内踝静脉或股静脉。于清晨空腹取血,基本在采血的理想时间段 7:00~8:00, 并保证采血时间的统一;同时尽可能避免于受试者输液时取血,避免溶血和杂质污染;采血器确保干净、无菌,避免对实验结果产生干扰;本研究采血量控制在 5 ml 左右。血液样品采集完毕后,立即送往检验科进行检验^[6]。

1.5 三组血脂指标的检测 三组受试者于早晨空腹抽取不抗凝的外周静脉血 5 ml, 等待血块凝固之后, 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 离心后收集约 2 ml 血清, 分装保存于 -80 °C 冰箱, 标本收集齐后一起检测。采用全自动生化分析仪检测样本中血脂指标[甘油三脂(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、LDL、载脂蛋白(Apo) A1], 所有试剂均为 BECKMAN 原装配套试剂^[11-12]。

1.6 转染与未转染 pHBV1.3 质粒的两种 HepG2 细胞中 ApoB 表达的比较 三组受试者空腹 12~14 h 后采静脉血 5 ml, 加入肝素抗凝, 1 000/min 离心 5 min, 血浆置 -80 °C 保存, 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和琼脂糖凝胶电泳法检测血浆 ApoB 含量^[2]。培养 HepG2(肝癌细胞系)细胞, 对一部分细胞进行细胞转染, 加入 pHBV1.3 质粒, 未转染过的细胞标为 HepG2.1, 转染过的细胞标为 HepG2.2, 将细

胞放置于加入了转染液的细胞培养基中,在 CO₂ 培养箱中继续培养。然后进行 RT-PCR 和琼脂糖凝胶电泳法检测:对转染和未转染的两种细胞用 TRIzolR 试剂提取细胞总 RNA,经 DNA 酶处理后取 1 μg 用反转录酶合成 cDNA,然后对 ApoB 基因的 RT-PCR 检测引物进行检测,同时以 β-actin 作为内参照进行平行扩增(ApoB、β-actin 特异性引物序列见表 2),采用软件 Primer Premier5.0 进行引物设计,扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳进行检测^[2]。对转染与未转染 pHBV1.3 质粒 HepG2 细胞中 AopB mRNA 的表达进行比较,以观察 HBV 对 ApoB 表达的影响。

表 2 ApoB、β-actin 特异性引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
ApoB	5' CACAGGCATCAGCCCACTT 3'	5' TCGCAGGCCATCTTCTTA 3'
β-actin	5' ATGATATCGCCGCGCTCGT 3'	5' CGCTCGGTGAGGATCTTCA 3'

1.7 转染与未转染 ApoB 的 HepG3 细胞中 HBsAg、HBeAg 含量及 HBV-DNA 含量的比较 将 ApoB 的真核表达载体 Flag2B-ApoB 转染 HepG3 (整合了 HBV 全基因组)细胞,设立 Flag2B 为空白未转染组作为对照。制取两组细胞悬液,24 h 后收集细胞上清液采用 ELISA 方法检测 HBsAg 和 HBeAg 含量,采用 HBV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒测定两组细胞中 HBV-DNA 含量^[13-15]。由专职检验师严格按试剂盒说明书操作。对转染与未转染 ApoB 的 HepG3 细胞中 HBsAg、HBeAg 含量及 HBV-DNA 含量进行比较,以观察 ApoB 对 HBV 复制的影响。

1.8 统计学方法 本研究中部分数据采用 SPSS 统计软件进行分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者乙肝五项复检结果 健康体检者 100 例乙肝五项结果正常,以 HBV 携带入院的 100 例受试者乙肝五项均显示携带 HBV。对 HBV 携带者 100 例进一步行 HBV 核酸扩增荧光定量检测结果显示:63 例 HBV 病毒载量 $\geq 1 \times 10^5$ 拷贝/ml,分为乙肝患者组;37 例 HBV 携带数量 $< 1 \times 10^5$ 拷贝/ml,分为

HBV 携带组。

2.2 三组血脂指标检测结果比较 结果显示,随着受试者体内病毒载量(正常组→HBV 携带组→乙肝患者组)的递增,其血清 TC、HDL、LDL 及 AopA1 水平均呈递降(P 均 < 0.05);其中,LDL 以外的三项水平乙肝患者组较正常组下降幅度约为 8%~34%,较 HBV 携带组下降幅度约为 8%~19%,而 LDL 水平较正常组下降幅度约为 44%,较 HBV 携带组幅度下降约为 31%,其下降幅度最为明显。见表 3。

2.3 HBV 对 ApoB 表达的影响 因 HBV 感染对血脂指标水平下降的影响以 LDL 最明显,故进一步分析 HBV 感染对作为 HDL 主要载脂蛋白的 ApoB 的影响。三组受试者血清中的 ApoB 水平随着受试者体内病毒载量(正常组→HBV 携带组→乙肝患者组)的递增而递降($P < 0.05$)。见表 3。对转染和未转染 pHBV1.3 质粒的两种 HepG2 细胞经 RT-PCR 检测其 ApoB mRNA 的表达,图 1 可见,感染了 HBV 的 HepG2 细胞 ApoB mRNA 条带明显较模糊,而 β-actin 基因条带前后无变化。

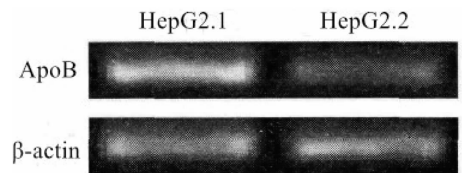


图 1 RT-PCR 检测 HepG2.1 和 HepG2.2 细胞 ApoB mRNA 表达水平的差异

2.4 ApoB 对 HBV 复制的影响 未转染 ApoB 的 Flag2B 组和转染了 ApoB 的 Flag2B-ApoB 组的 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的含量均存在统计学差异(P 均 < 0.01)。HBsAg 是 HBV 的外壳,Flag2B-ApoB 组中 HBsAg 含量高表明其细胞中的 HBV 数量较多;HBeAg 产生于病毒内部,Flag2B-ApoB 组的 HBeAg 含量高表明细胞中 HBV 活动性强;HBV-DNA 的含量直接代表 HBV 的数量。综合三个指标,Flag2B-ApoB 组的 HBV 数量明显多于 Flag2B 组。见表 4。

3 讨论

HBV 只对人 and 猩猩有易感染性,HBV 抗性较强,难以彻底清除,HBV 进入人体之后,会长期潜伏在人

表 3 三组血清 TC、TG、HDL、LDL、AopA1 及血浆 ApoB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	AopA1 (g/L)	ApoB (g/L)
正常组	100	1.30 ± 0.76	4.78 ± 0.91	1.35 ± 0.37	2.85 ± 0.64	1.35 ± 0.17	0.85 ± 0.12
HBV 携带组	37	1.31 ± 0.58	4.25 ± 0.78 [#]	1.10 ± 0.22 [#]	2.33 ± 0.59 [#]	1.17 ± 0.14 [#]	0.71 ± 0.19 [#]
乙肝患者组	63	1.20 ± 0.57 ^{#*}	3.67 ± 0.99 ^{#*}	0.89 ± 0.37 ^{#*}	1.60 ± 0.59 ^{#*}	1.04 ± 0.31 ^{#*}	0.56 ± 0.21 ^{#*}
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与 HBV 携带组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

表 4 转染与未转染 ApoB 的 HepG3 细胞中
HBV 指标含量对比 ($\bar{x} \pm s$)

是否转染 ApoB	HBsAg 含量 (ng/ml)	HBeAg 含量 (PEIU/ml)	HBV-DNA 含量 (lgIU/ml)
Flag2B 组	62.61 ± 24.33	8.53 ± 3.16	4.26 ± 0.98
Flag2B-ApoB 组	165.23 ± 79.21	26.56 ± 12.14	13.51 ± 3.98
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

体细胞核中,主要是对肝细胞的功能产生影响,肝细胞的各种指标都发生不同程度的变化,主要体现在 TG、TC、HDL、LDL 及 AopA1 等几种血清成分的变化^[16-17]。该五项指标水平都是慢性乙肝病程进展的危险因素。本研究发现,随着 HBV 进入人体数量的增多,TC、HDL、LDL、及 AopA1 水平均呈明显下降趋势,其中 LDL 下降最明显,所以研究 HBV 对 LDL 的抑制机制具有重要意义。

ApoB 是乳糜微粒和 LDL 主要的载脂蛋白,这些脂蛋白负责携带胆固醇至组织。尽管目前尚不清楚 ApoB 在 LDL 中扮演了什么角色,但它是 LDL 的主要成分。微粒体 TC 转移蛋白(MTP)存在于细胞微粒体和内质网内,是肝细胞中极低密度脂蛋白(VLDL)和小肠细胞中乳糜微粒(CM)合成和分泌所必需的脂质转移蛋白。MTP 可以促进膜两侧的 TC、TG 和磷脂转运,在脂质代谢中具有重要作用。本研究发现,和正常细胞相比,感染 HBV 后 HepG3 细胞的 RNA 电泳条带更模糊,说明感染后细胞 AopB mRNA 的表达能力明显下降。MTP 的含量可能对 ApoB 的合成起着重要作用,当 HBV 进入人体后,能够抑制 MTP 蛋白的表达,MTP 含量减少,导致 ApoB mRNA 表达水平降低,最终使 ApoB 的含量减少^[18]。

目前普遍认为 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的含量是监测乙肝患者体内病毒复制效果的主要指标。本研究发现,转染了 ApoB 表达基因的 HepG3 细胞中的 HBsAg、HBeAg 含量和 HBV-DNA 的数量减少,活动性弱,提示 ApoB 可以抑制 HBV 细胞的复制。可以推测,HBV 细胞进入人体后,在 DNA 水平上抑制 MTP 蛋白的产生,通过减少 MTP 蛋白的含量,来抑制 ApoB mRNA 的表达,降低 AopB 的含量,而在细胞中 ApoB 含量的增多,可以抑制 HBV 的复制。

综上所述,HBV 感染可减少患者血脂水平,并以 LDL 及其主要载脂蛋白 ApoB 的下降最明显,HBV 感染可降低 ApoB 对 HBV 复制的抑制作用,促进 HBV 的复制。该作用是否通过 MTP 途径而产生,有待对 MTP 进行进一步研究。

参考文献

- [1] 段章好,陈新梅. 抗乙肝病毒中药活性成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(9):79-82.
- [2] 古今刚. 乙型肝炎病毒对血浆载脂蛋白表达影响的研究及其机制探讨[D]. 武汉:武汉大学,2013.
- [3] 吴琳,唐敏英,张美娜,等. 乙肝免疫标志物与乙肝病毒核酸含量与肝功能的关系研究[J]. 现代生物医学进展,2015,15(7):1241-1244.
- [4] Schott E, Bergk A, Berg T. Strategies for the prevention of hepatocellular carcinoma in the context of chronic viral hepatitis[J]. Z Gastroenterol,2008,46(1):69-80.
- [5] 王志宏,李辉. 核酸检测法对血液标本内乙肝病毒的检测价值分析[J]. 河北医学,2016,22(12):2097-2099.
- [6] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention[J]. J Clin Virol,2005,34 Suppl 1:S1.
- [7] Mathews G, Bhagani S. The epidemiology and natural history of HIV/HBV and HIV/HCV co-infections[J]. J HIV Ther,2003,8(4):77-84.
- [8] Fung J, Lai CL, Yuen MF. Management of chronic hepatitis B in severe liver disease[J]. World J Gastroenterol,2014,20(43):16053.
- [9] Hsu SH, Wang B, Kota J, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver[J]. J Clin Invest,2012,122(8):2871-2883.
- [10] 沈月爽,李萌,吴国友. 慢性乙型肝炎患者血清血脂和载脂蛋白水平的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(16):2758-2760.
- [11] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Reprint of: Epidemiological serosurvey of Hepatitis B in China--declining HBV prevalence due to Hepatitis B vaccination[J]. Vaccine,2013,31 Suppl 9:J21-J28.
- [12] Sandig V, Löser P, Lieber A, et al. HBV-derived promoters direct liver-specific expression of an adenovirally transduced LDL receptor gene[J]. Gene Ther,1996,3(11):1002-1009.
- [13] 吴洪秋,张永良,黄坚尧,等. 乙肝血清学标志物定量和 HBV DNA 定量联合检测在乙肝病毒感染诊断中的应用[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2016,25(4):415-418.
- [14] 王杰,鲁凤民. 再认识乙肝病毒 实现临床“治愈”[J]. 中华医学信息导报,2017,32(1):20.
- [15] 洗永超,程书权. 乙肝病毒基因分型研究及应用进展[J]. 国际病毒学杂志,2016,23(4):285-288.
- [16] Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum MR, et al. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature[J]. Hepatology,2003,37(6):1309-1319.
- [17] Petta S, Cammà C, Di Marco V, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with severe fibrosis in patients with chronic hepatitis caused by HBV or HCV infection[J]. Liver Int,2015,31(4):507-515.
- [18] Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. Gut,2015,64(12):1972-1984.