

血液透析及丙肝病毒感染者 F 蛋白抗体分析*

许可¹, 汤奋扬¹, 王昊鹏², 王洁³, 喻荣彬³, 邓小昭⁴, 张云⁴

摘要:目的 探讨丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV) F 蛋白抗体在血液透析人群 HCV 感染者中的分布特点及其影响因素。方法 利用 pEGX-4T-2/HCV-F 融合载体表达蛋白 HCV-F/GST 作为抗原, 包被酶联反应板, 间接 ELISA 法检测 128 例血液透析 HCV 感染者血清中的 HCV-F 抗体; Logistic 回归分析患者特征与 HCV-F 抗体是否阳性的关系。结果 128 例 HCV 感染者中 F 抗体阳性率为 45.3%; 单因素分析显示, 血透时间、HBcAb、HCV RNA 与 F 抗体是否阳性的差异有统计学意义(分别 $P = 0.038$ 、 $P = 0.012$ 和 $P = 0.002$); 多因素分析显示, 血透时间 > 10 年 ($OR = 4.153$ 95% $CI = 1.435 \sim 12.023$)、HCV RNA 阳性 ($OR = 3.697$ 95% $CI = 1.498 \sim 9.123$) 是 HCV-F 抗体阳性的影响因素。结论 血液透析人群 HCV 感染者中可检出 F 抗体; F 蛋白的表达可能与 HCV 复制有关。

关键词: 丙型肝炎病毒; F 抗体; 血液透析人群

中图分类号: R 183.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)03-0334-03

Prevalence of anti-HCV-F in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection XU Ke, TANG Fen-yang, WANG Hao-peng et al. Department of Acute Infectious Disease Prevention and Control, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control (Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To assess the prevalence of hepatitis C virus F (HCV-F) antibody in hemodialysis patients with HCV infection. **Methods** The recombinant protein (HCV-F/GST) was coated onto micro titer plates as antigen. Sera of 128 renal dialysis patients with hepatitis C virus infection were tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting HCV-F antibody. Logistic regression was adopted to analyze the risk factors of anti HCV-F. **Results**

Among the patients 58 (45.3%) exhibited a positive anti-HCV-F reaction. Time of hemodialysis, co-infection with hepatitis B virus (HBV) and HCV RNA were correlated with the expression of F protein ($P = 0.038$, 0.012 and 0.002). Logistic regression identified that duration of hemodialysis ≥ 10 years (odds ratio [OR] = 4.153 95% confidence interval [CI]: 1.435 - 12.023) and positive HCV RNA ($OR = 3.697$ 95% [CI]: 1.498 - 9.123) were risk factors of the anti HCV-F.

Conclusion Anti-HCV-F was detected in hemodialysis patients. Expression of F protein may be correlated with reproduction of HCV.

Key words: hepatitis C virus; F protein antibody; hemodialysis patients

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属黄病毒属,病毒基因组是一单链正股 RNA,其 1~191 位氨基酸编码可产生一种蛋白质,称之为核心蛋白(C 蛋白),它能够影响宿主细胞多种分子,从而促进 HCV 感染慢性化和肝细胞癌进程^[1-2]。近年来研究显示, HCV RNA 的 C 区通过移码读框表达另外一种低水平的新型 C 蛋白,被命名为选择性核蛋白体移码蛋白(alternative ribosomal frame shift protein, ARFP)或移码蛋白(frameshifting, F)^[3]。研究表明, F 蛋白可在 HCV 自然感染中产生^[4]。血液透析患者是丙型肝炎病毒感染的高危人群,为探讨 HCV-F 蛋白在 HCV 致病中的作用,为 F 蛋白的功能研究提供线索,本研究选取血液透析患者,以 HCV-F 蛋白为捕获抗原,检测血液透析者血清 F 蛋白抗体,比较 F 蛋白抗体在特殊人群中的分布特点。

1 对象与方法

1.1 对象 2008 年 6 月-2009 年 1 月选取江苏省 2 所三级甲等医院, 1 所二级甲等医院收治的血液透析患者 500 例,进行包括性别、年龄、血透时间等基本情况调查,并采集血清标本 500 份。选取其中 HCV 抗体阳性者 128 例,作为观察组,

男性 88 例,女性 40 例,平均年龄(53.52 ± 11.20)岁。按就诊医院相同、年龄 ± 5 岁,选取 HBsAg 和抗 HCV 均阴性的血液透析患者 100 例,作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 96 孔板酶联反应板(上海晶美公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 抗体(南京阿恩地公司);抗原包被液为碳酸盐缓冲液(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(北京军区兽医防治中心),小牛血清(美国 Hyclone 公司);洗液为磷酸盐 T 缓冲液(含 0.05% Tween-20)。辣根过氧化物酶(HRP)底物采用三甲氧基苯甲醛显色系统,底物及终止液(南京华欣药业生物工程有限公司,南京军区军事医学研究所制备);Model 550 酶联免疫测定仪(美国 Bio-Rad 公司)。HCV-F/谷胱甘肽-S-转移酶(GST)蛋白(HCV-F/GST 蛋白)制备见文献[5]。HCV 抗体检测试剂(上海科华生物有限公司)。

1.2.2 HCV-F 抗体检测 每孔 100 μ L 包被液(50 mmol/L 碳酸盐缓冲液, pH 值 9.6)含 0.1 μ g HCV-F/GST 蛋白加入 96 孔板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用磷酸盐 T 缓冲液(下文简称洗液)洗涤后,加入封闭液(含 30% 山羊血清和 10% 小牛血清的磷酸盐缓冲液,每孔 100 μ L) 4 $^{\circ}$ 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 磷酸盐缓冲液)做 1:100 稀释后加入包被封闭好的酶联反应板内,每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,同时设立空白对照。洗液洗板 5 次后,加

* 基金项目: 国家自然科学基金(81072343);江苏省自然科学基金(BK2011840)

作者单位: 1. 江苏省疾病预防控制中心急性传染病防治所,南京 210009; 2. 江苏省南京市卫生监督所; 3. 南京医科大学公共卫生学院; 4. 南京军区军事医学研究所

作者简介: 许可(1979-),女,江苏常熟人,主管医师,硕士,主要从事传染病流行病学工作。

通讯作者: 张云, E-mail: zhangyun111@sohu.com

入稀释好的辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体(每孔 100 μ L), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。洗板 5 次后, 每孔加入三甲氧基苯甲酰底物 A、B 液各 1 滴, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min, 再分别加入 2 mol/L 硫酸 50 μ L 终止反应。用空白孔调零, 酶标仪测定吸光度(A_{490})值。临界值 = 对照组平均值(A) + 2s, 观察组 A 值 > 临界值, 定义为 F 抗体阳性。随机选择 10% 样本进行盲法重复检测。

1.2.3 乙型与丙型肝炎感染检测 HBsAg, HBeAb, 抗 HCV 检测采用酶联免疫吸附试验, 试验步骤和结果判断均参照试剂盒说明书。HCV RNA 检测方法参照文献 [6]。

1.3 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。两组均数比较采用 t 检验, 率比较采用 χ^2 检验, 多因素分析采用 Logistic 回归方法, 检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 观察组血清标本 HCV-F 抗体阳性率 对照组 100 例血清标本 HCV-F 抗体 A_{490} 值为 0.0450 + 0.0056, 临界值为 0.056 2。128 例 HCV 感染者中, 血清 HCV-F 抗体阳性 ($A_{490} > 0.056 2$) 58 例, 阳性率为 45.3%。重复检测 13 例, 均与第 1 次结果一致。

2.2 HCV-F 抗体单因素比较(表 1) 血透时间、HBeAb、HCV RNA 的阴阳性与 HCV-F 抗体有统计学关联。

表 1 血液透析丙型肝炎感染者 F 抗体单因素分析

| 因素 | F 抗体阳性 | | F 抗体阴性 | | χ^2 值 | P 值 |
|-----------|--------|------|--------|------|------------|-------|
| | 例数 | % | 例数 | % | | |
| 性别 | | | | | | |
| 男性 | 39 | 44.3 | 49 | 55.7 | 0.112 | 0.848 |
| 女性 | 19 | 47.5 | 24 | 52.5 | | |
| 年龄(岁) | | | | | | |
| <50 | 23 | 48.9 | 24 | 51.1 | 0.589 | 0.745 |
| 50~ | 15 | 40.5 | 22 | 59.5 | | |
| ≥ 70 | 20 | 45.5 | 4 | 54.5 | | |
| 血透时间(年) | | | | | | |
| <5 | 10 | 29.4 | 24 | 70.6 | 0.621 | 0.038 |
| 5~10 | 27 | 45.8 | 32 | 54.2 | | |
| 10~ | 21 | 60.0 | 14 | 40.0 | | |
| HBsAg | | | | | | |
| 阳性 | 7 | 53.8 | 6 | 46.2 | 0.514 | 0.566 |
| 阴性 | 51 | 44.3 | 64 | 55.7 | | |
| HBeAb | | | | | | |
| 阳性 | 30 | 58.8 | 21 | 41.2 | 6.245 | 0.012 |
| 阴性 | 28 | 36.4 | 49 | 63.6 | | |
| 肝功能 | | | | | | |
| 正常 | 42 | 47.7 | 46 | 52.3 | 0.663 | 0.449 |
| 异常 | 16 | 40.0 | 24 | 60.0 | | |
| 谷丙转氨酶 | | | | | | |
| <80 | 48 | 43.6 | 62 | 56.4 | 0.346 | 0.445 |
| ≥ 80 | 10 | 55.6 | 8 | 44.4 | | |
| HCV RNA | | | | | | |
| 阳性 | 49 | 53.8 | 42 | 46.2 | 9.252 | 0.002 |
| 阴性 | 9 | 24.3 | 28 | 75.7 | | |

2.3 F 抗体阳性率多因素分析 将单因素分析有意义的 3 个因素变量纳入 logistic 回归模型, 进行多因素分析, 结果显示, 血透时间、HCV RNA 是 F 抗体阳性率的影响因素, 血透时间 ≥ 10 年和 HCV RNA 阳性会增加 F 抗体阳性的可能性。

表 2 血液透析丙型肝炎感染者 F 抗体阳性率多因素分析

| 因素 | 参照组 | β | S_x | Wald χ^2 值 | P 值 | OR 值 | 95% CI |
|------------------|------|---------|-------|-----------------|-------|-------|--------------|
| 血透时间(年) | | | | | | | |
| $\geq 5 \sim 10$ | <5 年 | 0.785 | 0.485 | 2.615 | 0.106 | 2.192 | 0.847~5.675 |
| $\geq 10 \sim$ | | 1.424 | 0.542 | 6.893 | 0.009 | 4.153 | 1.435~12.023 |
| HBeAb 阳性 | 阳性 | 0.758 | 0.396 | 3.671 | 0.055 | 2.135 | 0.983~4.638 |
| HCV RNA 阳性 | 阴性 | 1.308 | 0.461 | 8.051 | 0.005 | 3.697 | 1.498~9.123 |

3 讨论

国内外相关研究表明, 在 HCV 慢性患者和 HCV 所致肝细胞癌患者体内可检出 F 抗体^[7], HCV 所致肝癌患者肿瘤组织内可检出 F 蛋白准种^[8]。本研究结果显示, 肾透析患者 HCV 感染者中, F 抗体阳性率为 45.3%, 提示 F 蛋白可在 HCV 感染者体内表达并诱导特异性体液免疫反应。

单因素分析结果显示, 血透时间 > 10 年的 HCV 感染者的 F 抗体阳性率明显高于 < 5 年组, 一方面可能由于血透时间越长机体抵抗力越差, 从而使 F 蛋白在不同免疫水平机体中存在表达差异; 另一方面可能与 HCV 感染时间长短有关。但由于 HCV 感染的真实时间较难获得, 故本文未能做该方面分析。结果还显示, F 抗体与血清 HCV RNA 间存在关联, 差异具有统计学意义, 提示 F 蛋白可能与病毒复制有关。

HCV、HBV 具有相似的传播途径, 常常引起双重感染。有研究表明, HCV/HBV 之间的双重感染可以显著影响肝纤维化、肝硬化、肝癌的发生发展^[9]。本研究结果表明, HCV/HBV 联合感染与 HCV 单独感染比较, F 抗体阳性率存在差异, 提示 F 蛋白可能参与肝炎慢性化和肝细胞癌发生发展。

目前, HCV 的致病机制尚不明确, 阻碍了 HCV 疫苗和丙型肝炎治疗性药物的研制。研究 HCV-F 蛋白功能对了解 HCV 的致病机制有着重要的作用, 本研究提示, F 蛋白与 HCV 的感染时间和复制情况有关, 可能在 HCV 的致病过程中起到重要的作用。

参考文献

- (1) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice [J]. Nat Med, 1998, 4(9): 1065-1067.
- (2) 王旭东, 费昆仑, 陈溥言. 丙型肝炎病毒基因和结构蛋白研究 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20(8): 998-1000.
- (3) Xu Z, Choi J, Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift [J]. EMBO J, 2001, 20(14): 3840-3848.
- (4) Cohen M, Bachmatov L, Ben-Ari Z, et al. Development of specific antibodies to an ARF protein in treated patients with chronic HCV infection [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(9): 2427-2432.
- (5) 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 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(2): 134-137.
- (6) 许可, 邓小昭, 丁伟良, 等. 江苏省宜兴地区丙型肝炎病毒基因分型研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(11): 901-903.
- (7) Ogata S, Nagano-Fujii M, Ku Y, et al. Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift products, the F protein of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3625-3630.

- (8) 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 other[J]. Semin Liver Dis 2005 25(1): 105-117.
- (9) Shi J, Zhu L, Liu S, et al. A meta-analysis of case-control studies on

the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China[J]. Br J Cancer 2005 92(3): 607-612.

收稿日期: 2010-11-19

(孔繁学编辑 韩仰欢校对)

【实验研究】

不同民族妇女子宫颈癌组织中 IFITM1 蛋白表达*

郑威楠¹, 韩虎¹, 赵志敏¹, 汪霞¹, 李妍², 蒋旭鹏¹, 潘泽民¹

关键词: 子宫颈癌; 宫颈炎; 干扰素介导的跨膜蛋白 1; 维吾尔族; 汉族

中图分类号: R 737.33

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)03-0335-03

干扰素介导的跨膜蛋白 1(interferon-induced transmembrane protein 1, IFITM1) 是干扰素诱导跨膜蛋白家族的成员之一⁽¹⁻²⁾。IFITM1 是一个细胞生长和肿瘤生长的重要的负调控因子, 是一个潜在的抑癌基因⁽³⁾, 但目前尚不清楚该基因对子宫颈癌的影响。为了解 IFITM1 基因对子宫颈癌的作用, 为子宫颈癌的预防、诊断及治疗提供理论基础, 本研究采用免疫组织化学方法对新疆喀什地区人民医院、新疆维吾尔自治区人民医院和石河子大学医学院第一附院 2008 年 1 月-2010 年 3 月采集的 93 例子宫颈癌和 75 例子宫颈炎组织标本进行分析。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来源于新疆喀什地区人民医院、新疆维吾尔自治区人民医院和石河子大学医学院第一附院 2008 年 1 月-2010 年 3 月采集的 93 例子宫颈癌和 75 例子宫颈炎组织标本。其中维吾尔族妇女子宫颈癌和宫颈炎标本分别为 59 和 42 例, 汉族妇女子宫颈癌和宫颈炎标本分别为 34 和 33 例。以上标本均经苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)切片并经 3 位教授病理诊断。

1.2 方法 采用链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)染色法对标本进行免疫组织化学法染色。第一抗体 IFITM1 兔抗人单克隆抗体(美国 MILLIPORE 公司); SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)为即用性, 使用浓度分别为 1:200 和 1:300。染色程序按 SP 试剂盒说明书进行; 干扰素诱导跨膜蛋白 1(IFITM1)山羊抗兔二抗工作液由石河子大学医学院病理教研室赠送。未加一抗的阴性对照标本同步完成。判断标准: 免疫组化染色以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞蛋白染色结果, 评分为阳性细胞数和染色强度分数之积。无阳性细胞记为 0 分, 阳性细胞数占 1%~5% 记为 1 分, 6%~25% 记 2 分, 26%~50% 记 3 分, >50% 记 4 分; 阳性细胞胞浆颗粒呈淡黄色记 1 分, 黄棕色记 2

分, 棕褐色记 3 分; 评分 0 分为(-), 1~4 分为(+), 5~8 分为(++), 9~12 分为(+++)。

1.3 统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法分析。

2 结果

2.1 IFITM1 蛋白在不同民族妇女子宫颈组织中表达

2.1.1 IFITM1 蛋白在维吾尔族妇女子宫颈组织中表达(图 1-A, B, C, D) IFITM1 蛋白在慢性宫颈炎组织中大部分呈强阳性表达(图 A), 在子宫颈鳞癌组织中, IFITM1 蛋白在宫颈组织强阳性表达较少, 且随着子宫颈鳞癌分化程度不同, 蛋白的表达也不同(图 B-D)。

2.1.2 IFITM1 蛋白在汉族妇女子宫颈组织中表达(图 2-A, B, C, D) IFITM1 蛋白在慢性宫颈炎组织细胞中表达(图 2-A), IFITM1 蛋白在子宫颈鳞癌组织细胞中表达(图 2-B, C, D)。

2.2 IFITM1 蛋白在宫颈炎和子宫颈癌组织中表达水平(表 1) 经免疫组织化学分析, 75 例子宫颈炎组织中 -, +, ++, +++ 者分别为 14、15、19、27 例, 分别占 18.67%、20.00%、25.33%、36.00%; 93 例子宫颈癌组织中 -, +, ++, +++ 者分别为 20、30、31、12 例, 分别占 21.51%、32.26%、33.33%、12.90%; IFITM1 蛋白在宫颈炎和子宫颈癌组织中表达水平差异有统计学意义($\chi^2 = 12.928, P = 0.005$)。维吾尔族妇女宫颈炎与子宫颈癌组织比较, IFITM1 蛋白在不同组织中表达水平差异有统计学意义($\chi^2 = 15.692, P = 0.001$); 汉族妇女宫颈炎与子宫颈癌组织比较, IFITM1 蛋白在不同组织中表达水平差异无统计学意义。不同民族妇女宫颈炎组织比较, IFITM1 蛋白在不同民族妇女宫颈炎组织中表达水平差异有统计学意义($\chi^2 = 9.286, P = 0.025$); 不同民族妇女子宫颈癌组织比较, IFITM1 蛋白在不同民族妇女子宫颈癌组织中表达水平差异无统计学意义。

2.3 不同子宫颈癌病理分级 IFITM1 蛋白表达水平(表 2)

93 例子宫颈癌组织病理分级为高、中、低分化者分别为 23、60、10 例, 分别占 24.73%、64.52%、10.75%。23 例高分化子宫颈癌组织中 -, +, ++, +++ 者分别为 5、7、8、3 例, 分别占 21.74%、30.43%、34.78%、13.04%; 60 例低分化子宫颈癌组织中 -, +, ++, +++ 者分别为 11、21、21、7 例, 分别占 18.33%、35.00%、35.00%、11.67%; 10 例低分化子宫颈癌组织中 -, +, ++, +++ 者分别为 4、2、2、2 例, 分别占

* 基金项目: 国家自然科学基金(30860302; 30660193); 教育部春晖计划(22006-1-83011); 石河子大学后补助项目(2RKX2008081)

作者单位: 1. 石河子大学医学院生物化学教研室新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院预防医学系

作者简介: 郑威楠(1976-), 女, 新疆人, 讲师, 硕士, 研究方向: 分子遗传学。

通讯作者: 潘泽民, E-mail: panzemin89@yahoo.com.cn