维普资讯 http://www.cqvip.com

262-263

(14)

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

丙型肝炎患者抗E2抗体的初步检测及其意义

R512.630.4

儿科学院传染科 朱朝敏*
北京医科大学人民医院肝病研究所 吴朝栋 陶其敏

提 要 为了探讨急、慢性丙型肝炎病人血清抗E2抗体的临床意义。用哺乳动物细胞表达的E2抗原，通过Western blot检测丙型肝炎病人血清中抗E2抗体。结果37份急慢性丙型肝炎病人血清抗E2抗体在HCV RNA阳性者中检测为59.5%，其中急性患者中检出率为30%，慢性患者中检出率为70.3%。提示抗E2抗体可以作为检测HCV感染有价值诊断指标之一。

关键词 丙型肝炎；E2糖蛋白；血清学检测 抗E2抗体 血清诊断
中图分类号 R512.63

自1989年第一代抗HCV EIA(酶免疫法)建立以来，目前已发展到第三代抗HCV EIA。第三代抗HCV EIA抗原包括结构蛋白C及非结构蛋白NS3、NS4、NS5[1]。近年研究发现包膜糖蛋白E2可作为抗HCV EIA抗原成分之一，用纯化的E2糖蛋白建立的EIA测定E2抗体，结果显示E2抗原具有很好的特异性和敏感性，尤其是在真核系统表达的包膜糖蛋白[2,3]。我们曾分离III/2a型中国株HCV的E2/NS1基因，并成功的在哺乳动物细胞进行稳定表达[4]，现采用表达的HCVE2糖蛋白作为抗原应用Western blot法，检测了37例急、慢性HCV病人的抗E2抗体，结果证明抗E2抗体可以出现在急、慢性丙型肝炎病人血清中，尤其是慢性丙型肝炎病人血清。

1 材料与方法

1.1 HCV感染患者血清 37份HCV患者血清均来自北京医科大学人民医院肝炎病房及门诊。HCV患者诊断均经HCV RNA及抗HCV检测确定。所有患者都有明确肝功能损害。其中10份血清来自急性HCV病人，27份血清来自慢性HCV病人。

1.2 HCVRNA及抗HCV检测 HCV RNA测定采用RT-PCR。RT-PCR引物源于HCV5'非编码区。抗HCV测定采用EIA。HCV RNA(批号:980523)及抗HCV第二代检测试剂盒(批号:980492)均由北京医科大学肝病研究所提供。

1.3 HCV基因分型 用内切酶HaeIII消化RT-PCR产物，II/1b基因片段为145bp，III/2a基因片段为56bp和89bp。

1.4 E2包膜糖蛋白 E2包膜糖蛋白在哺乳动物细胞稳定表达见参考文献[4]。

1.5 抗E2抗体检测 抗E2抗体检测采用Western blot分析法。阳性细胞克隆的细胞裂解物25μl加入等体积2×SDS上样缓冲液(100mmol/L Tris pH6.8,4%SDS,0.2%溴酚蓝,200mmol/L DTT,20%甘油)，100℃煮沸5分钟，经8%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白质从凝胶转移至硝酸纤维素膜(NC膜)，将NC膜装入杂交袋，封闭液为含5%脱脂奶粉的TBS-吐温(TBST pH7.4)室温封闭1小时，弃封闭液，将NC膜按上样泳道分开，每一条膜和一份HCV血清反应，血清用TBST稀释，滴度1:30，室温下轻摇反应1小时，TBST洗膜3次，每次10分钟，将NC膜再装入另一杂交袋，加入碱性磷酸酶标记的抗人IgG，滴度1:3000，室温下轻摇反应30分钟，同前洗膜3次，再用TBS短暂漂洗2次。显色缓冲液Ap Buffer(100mmol/L Tris pH9.5,100mM NaCl,5mM MgCl)每10ml加入NBT 66μl混匀，再加33μl BICP混匀，在30分钟内将NC膜置入显色至满意用TBS终止显色反应。Western blot分析采用ProtoBlot试剂盒，Promega公司产品。

2 结 果

2.1 丙型肝炎患者血清中HCV RNA及抗HCV的检测 37份急慢性HCV病人血清HCV RNA均为阳性，其中25份抗HCV阳性。

2.2 HCV感染株的基因分型 37份HCVRNA阳性血清中，除3份来自慢性HCV病人为III/2a型株

* 女，1954-08出生，副教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCV感染,余均为II/1b型株HCV感染。

2.3 抗E2抗体的测定 37份HCV感染的血清,其中10份急性HCV病人血清有3/10份抗E2抗体阳性,27份慢性HCV病人血清19/27份抗E2抗体阳性。结果见表1及图1。

表1 丙型肝炎患者HCV标志物的检测状况

	例数	抗E2阳性	抗HCV阳性	HCV RNA阳性
急性丙型肝炎	10	3	6	10
慢性丙型肝炎	27	19	25	27

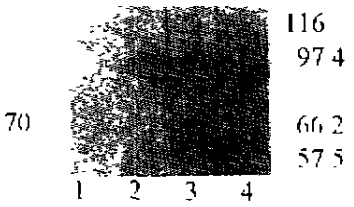


图1.Western blot检测抗E2抗体

1 正常血清 2 急性丙型肝炎 3 慢性丙型肝炎患者血清 4 蛋白分子量标准

3 讨论

HCV是单股正链RNA病毒,基因全长约9.4Kb,编码一个大的多聚蛋白前体,其中第三个裂解产物为E2蛋白,成熟的E2蛋白是糖蛋白[5]。现已在许多系统中成功地表达了E2蛋白,但只有来自哺乳动物的E2糖蛋白接近天然蛋白[5,6]。我们表达E2糖蛋白,发现其有很好的免疫原性[4],因而本文采用该表达蛋白通过Western blot法检测了37例急慢性丙型肝炎病人血清中抗E2抗体,并对其意义进行了初步分析。通过检测发现,22份血清(59.5%)为抗E2抗体阳性,其中急性HCV病人血清3份阳性(30%),慢性HCV病人血清19份阳性(70.3%)。3份急性丙肝患者血样均来自急性HCV感染后期,且三者均发展为慢性丙型肝炎。该结果一方面提示表达的E2蛋白具有满意的免疫原性,另一方面提示抗E2抗体与HCV病毒血症或HCV肝炎的慢性化有关,与国外类似报道基本一致[7]。从理论上讲,HCV序列异源性有碍于抗E2抗体测定,实际上,在HCV RNA阳性病人的基因型分析发现来自HCV 1B基因的SE2与HCV 1B及HCV3A型病人血清均有反应[4]。中国HCVIII/2a基因型与HCVII/1b基因型的核苷酸及氨基酸序列分析显示其同源性为70.67%及75.55%[8]。但我们用中国HCVIII/2a基因型所表达的E2包膜糖蛋白在HCVII/1b基因型感染的病人血清中检测出抗E2抗体,提示E2糖蛋白与不同基因型HCV感染血清之间有交叉反应。

用哺乳动物细胞表达的E2糖蛋白作为抗原检测抗HCV血清在国内尚属首次,结果显示开展抗E2抗体检测有助于对预后及病情分析,是HCV感染有价值诊断指标之一。我们即将利用纯化的E2糖蛋白建立EIA法用于检测,不但使操作更为简便,而且可进一步提高检测的敏感性和特异性。

参考文献

1.Lavanchy D, te al.J Clinic Microbio 1994,32:2272.
2.Lesniewski R, et al.J Med Virol, 1994,45:415.
3.Cerino A, et al. JMedVirol, 1995,51:1.
4.吴朝栋,等.中国生物化学与分子生物学报 1998,14:15 .
5.Rosa D, et al..Proc Natl Acad Sci USA1996,93:1759
6.Spaete RR, et al.Virology1992,188:819
7.Fournillier-Jacob A,et al.J Med Virol1996,50:159.
8.吴朝栋,等.中华医学杂志 1998, 78:115。

(收稿日期 1998-10-12)

Detection of antibody against E2 glycoprotein in sera from hepatitis C patients

Zhu Chaomin, et al
Department of infections diseases, college of pediatrics

Antibody response against E2 glycoprotein in hepatitis C virus was studied in 37 patients with acute or chronic hepatitis C. E2 glycoprotein expressed in mammalian cells was used to detect specific antibody (anti-E2) in samples obtained by Western blot from patients with acute and chronic hepatitis C.These results showed that anti-E2 could be detected in 59.5% of the patients including 3 of 10 acute patients and 19 of 27 chronic patients. It is suggested thatanti-E2 is an useful marker for determining HCV.

KEY WORDS Hepatitis C; Envelope glycoprotein; Serology