

• 临床检验研究论著 •

HBV 慢性感染者血清中 MBL、MASP 和 C3b 水平检测的临床意义*

许大成¹, 古丽米娜·玉山², 张朝霞¹, 严雪梅¹, 蒋静^{1△}

(新疆医科大学第一附属医院: 1. 检验科; 2. 输血科, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 研究 MBL、MASP 和 C3b 在不同感染程度的乙肝患者中的表达及其临床意义。方法 乙肝患者共 140 例, 依据血清中 HBeAg 和 ALT 的水平分为 6 组: A 组(HBeAg 阳性, ALT 正常)、B 组(HBeAg 阴性, ALT 正常)、C 组(HBeAg 阳性, ALT 轻度/中度升高)、D 组(HBeAg 阳性, ALT 高度/重度升高)、E 组(HBeAg 阴性, ALT 轻度/中度升高)、F 组(HBeAg 阴性, ALT 高度/重度升高)。采用 ELISA 法检测健康对照(G 组)及患者血清中 MBL、MASP 和 C3b 的水平, 并对这三者之间的水平做相关性分析。结果 A 组的 MBL 水平显著高于 C 组和 D 组($P < 0.05$), G 组的 MBL 水平高于除 B 组外的其余 5 组($P < 0.05$)。F 组的 MASP 水平显著高于 A、C、D 组, 同时其显著低于 B、G 组($P < 0.05$), D 组的 MASP 水平显著低于其余 6 组($P < 0.05$), G 组的 MASP 水平显著高于其余 6 组($P < 0.05$)。D 组和 F 组的 C3b 水平显著高于 A、B、C、E 组($P < 0.05$), 但 D、F 组之间并无显著差异($P > 0.05$), G 组的 C3b 水平显著低于其余 6 组($P < 0.05$), MBL 与 MASP 之间存在中度正相关性, 而 C3b 与 MASP、MBL 之间存在弱的负相关性($P < 0.05$)。结论 MBL 与机体清除 HBV 有关, 高水平 C3b 可能会提高乙肝病变程度, MASP 水平异常降低与乙肝患者肝损伤程度加重、病毒感染和复制水平加剧均有关系。

关键词:甘露糖结合凝集素; 补体 C3b; 甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶; 肝炎病毒, 乙型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3305-03

Study of the expression levels of MBL, MASP, and C3b and the clinical significance for hepatitis B infection patients*

Xu Dacheng¹, Gulimina · Yushan², Zhang Zhaoxia¹, Yan Xuemei¹, Jiang Jing^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To study the expression of MBL, MASP and C3b in patients with hepatitis B virus infection with different degree and its clinical significance. **Methods** 140 patients with chronic hepatitis B were divided into six groups based on HBeAg and ALT levels: group A (HBeAg positive, ALT normal), group B (HBeAg negative, ALT normal), group C (HBeAg positive, ALT mild/moderate rise), D group (HBeAg positive, ALT height/severe rise), group E (HBeAg negative, ALT mild/moderate rise), group F (HBeAg negative, ALT height/severe increase). ELISA test was used to detect the expression levels of MBL, MASP and C3b in normal control (namely group G) and patient groups, and the correlations with MBL, MASP and C3b were analyzed. **Results**

MBL level of group A was higher than those of group C and D ($P < 0.05$), and which of control group G was higher than the other five groups except group B ($P < 0.05$). MASP level in group D was the lowest while group G was the highest, which in group F was higher than those in group A and C ($P < 0.05$). C3b level in control group G was the lowest ($P < 0.05$), which in group D and F showed no statistical difference ($P > 0.05$), but both of them were higher than other 4 patient's groups. MBL and MASP had moderate positive correlation, C3b showed weakly negative correlation with MASP and MBL. **Conclusion** MBL removes HBV, its low level expression will increase the severity of hepatitis B. The high level of C3b may worsen HBV infection. Hepatitis B patients MASP level may have relation with the level of patients abnormal reduce and liver damage degree, virus infection and replication.

Key words: mannan binding lectin; complement fragment C3b; MBL associated serine protease; hepatitis type B virus

健康人血清中补体各组分的含量相对稳定, 不随机体的免疫反应增加而升高, 而肝脏是合成补体的主要场所^[1]。目前对乙肝病毒感染的免疫学研究报道很多, 但探讨甘露糖结合凝集素(MBL)、补体 C3b、甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶(MASP)三者与 HBV 病毒复制、肝细胞损伤之间的关系, 这方面的研究国内尚未见文献报道。本研究以慢性乙型肝炎患者体内补体系统 MBL、MASP、C3b 作为主要研究指标, 测定其不同临床类型的乙肝患者血清中的水平, 分析它们之间的相关性, 分析其在患者体内参与抗病毒免疫保护和导致肝细胞免疫损伤的机制及其在临床诊断中的意义, 同时也为临床辅助诊断乙型肝炎, 判断预后提供一定的参考和指导, 并对临床制定个性化的治疗方案提供有益的信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 标本来源 HBV 感染者来自新疆医科大学一附院 2010 年 1 月至 2011 年 1 月诊治的患者, 共 140 例, 经检验符合 HBV 感染的标准(HBsAg 阳性, HBV-DNA 阳性); 所选病例均排除以下疾病: 上呼吸道感染等炎症; 甲、丙、丁、戊、庚型肝炎; 恶性肿瘤、自身免疫病; 梅毒、HIV。健康对照组 20 例, 来自新疆医科大学一附院的健康体检人员, 经检测各型肝炎病毒血清标志均阴性者(HBsAg 阴性且肝功能转氨酶 AST、ALT 均正常)。

1.1.2 研究分组 参考卫生部修订的《乙型肝炎防治方案》^[4], 以本医院的 ALT 正常参考值为依据, 将 ALT 高于临

界值 5 倍以内定义为轻度/中度异常,将 ALT 高于临界值 5 倍以上定义为高度/重度异常;主要依据患者血清中 HBeAg 表达和 ALT 水平将收集的乙肝患者分为 6 组:A 组(即免疫耐受组,HBeAg 阳性,ALT 正常),B 组(即无症状 HBV 携带组,HBeAg 阴性,ALT 正常),C 组(HBeAg 阳性,ALT 轻度/中度升高),D 组(HBeAg 阳性,ALT 高度/重度升高),E 组(HBeAg 阴性,ALT 轻度/中度升高),F 组(HBeAg 阴性,ALT 高度/重度升高);G 组为健康对照组。

1.2 仪器与试剂 37 °C 恒温箱,奥地利 TECAN Sunrise 酶标仪;C3b、MASP、MBL ELISA 检测试剂盒,由美国 R&D 公司提供;HBV ELISA 试剂盒,由美国雅培公司提供;ALT 试剂盒,由上海玉兰生物技术有限公司提供;HBV-DNA RT-PCR 试剂,由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.3 方法 指标检测:采用 ELISA 法测定 HBeAg 水平,并计算 S/CO 值判定阴性、阳性;用荧光定量 PCR 法测定患者 HBV-DNA;用速率法测定 ALT 水平,用 ELISA-生物素亲和素抗体夹心法测定健康对照组及患者血浆中 C3b、MASP、MBL 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据比较采用单因素方差分析,如组间差异有显著意义时则进一步用 LSD 法进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。在相关性分析中,C3b、MASP、MBL 与定量数据采用 Pearson 相关系数,C3b、MASP、MBL 与定性数据采用秩相关系数。

2 结 果

血清 MBL、MASP、C3b 的水平在乙肝不同感染程度的 7 组患者中的表达情况,见表 1。随着乙肝病变程度的加重,MASP 和 MBL 的水平逐渐减低,而 C3b 的水平逐渐增高。两组间的比较发现:A 组的 MBL 水平高于 C、D 组($P < 0.05$);G 组的 MBL 水平高于 A、C、E 组($P < 0.05$);G 组的 MBL 水平高于 C 组($P < 0.05$);E 组和 F 组的 MBL 水平低于 G 组($P < 0.05$);而 B 组与 G 组 MBL 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);D 组的 C3b 水平高于 A、B、C、E 组($P < 0.05$);F 组的 C3b 水平高于 A、B、C、E 组($P < 0.05$);G 组的 C3b 水平低于其余 6 组($P < 0.05$);而 D 组与 F 组间 C3b 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);F 组的 MASP 水平高于 A、C、D 组,同时低于 B、G 组($P < 0.05$);G 组的 MASP 水平高于其余 6 组($P < 0.05$);D 组的 MASP 水平低于 A、B、C、E、F 组($P < 0.05$)。MBL 与 MASP 之间存在中度正相关性($r = 0.621$),而 C3b 与 MASP 之间存在弱的负相关性($r = -0.251$),C3b 与 MBL 之间也存在弱的负相关性($r = -0.242$),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 MBL、MASP、C3b 在乙肝不同感染组中的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MBL(ng/mL)	MASP(ng/mL)	C3b(ng/mL)
A 组	20	67.95 ± 18.61	74.45 ± 14.91	4.65 ± 2.58
B 组	20	76.22 ± 12.88	111.87 ± 21.78	5.72 ± 2.20
C 组	30	24.07 ± 17.98	61.11 ± 17.87	5.20 ± 1.79
D 组	20	20.43 ± 9.26	48.71 ± 16.29	7.55 ± 1.07
E 组	30	68.81 ± 11.06	86.11 ± 21.16	5.46 ± 1.14
F 组	20	61.11 ± 20.39	80.54 ± 12.02	7.07 ± 1.25
G 组	20	85.56 ± 25.11	134.02 ± 26.55	3.12 ± 1.62

3 讨 论

乙肝是一种具有严重危害的传染病,流行呈世界性分

布^[3],中国是感染病毒人数最多的国家。近年来有很多关于 HBV 的临床和基础研究,而补体属于天然免疫系统,关于补体在乙肝患者中的研究较少见文献报道,尤其 MASP 的研究在国内、外迄今尚未见报道。血清转氨酶测定是肝功能检查的一项重要内容,当肝硬化发生时,肝细胞受到损伤,血清 ALT、AST 水平往往升高。随着病情的变化,肝细胞被损伤及坏死的程度也有所不同。而 MBL 和 C3b 的水平在不同临床类型乙肝患者体内的意义及它们之间的相关性,目前也未见报道。

补体是存在于人血清中的一组免疫功能相关的蛋白质,其在抗病毒感染中处于一线防御地位^[4]。但与抗体不同,其功能须待被激活,补体在体内识别激活物后,经过复杂的级联反应而被激活,最终具有杀伤细胞、清除抗原的活性,但同时也导致机体严重的炎症反应和组织损伤。故而补体在体内扮演着“双刃剑”的角色^[5],其免疫的保护效应与损伤效应并存。其组成复杂,目前发现的 30 余种蛋白质可被归类为 3 条激活途径,而本研究中的 MBL、MASP 及 C3b 均参与 MBL 途径。MBL 途径参与重要的天然免疫功能,机体发生微生物感染后,由肝细胞合成多种急性期蛋白(如 MBL 等)。MBL 的结构类似补体成分 Clq,是第 1 个发现具有防御功能的 C 型凝集素,可识别并结合微生物表面的甘露糖、N-氨基半乳糖、岩藻糖等,HBsAg 具有丰富的 N-乙酰葡萄糖和甘露糖末端寡糖链,可供 MBL 识别。活化的 MBL 可聚合 MASP,继而水解补体 C4、C2,形成 C3 转化酶,水解 C3 蛋白后得到 C3b 片段,后者是补体活化的重要枢纽,也参与其他 2 条补体活化途径,并使补体的活化在整体上具有自我放大效应,可加速补体的活化,导致更有效的免疫保护和(或)更严重的组织损伤。

本研究是以临床对乙型肝炎的防治方案为依据,同时兼顾考虑谷丙转氨酶水平、HBeAg 将患者分为不同的组,分析得出:MBL 与 MASP 呈正比,同时可以看出乙肝病变程度越重,MBL 和 MASP 的水平越低,这提示甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶是天然免疫的重要组成部分。在血浆中,作为酶原的 MASPs 与 MBL 或纤维胶素(ficolin)形成复合物而存在。酶原主要通过凝集素途径激活而活化,裂解下游补体各组分,发挥其调理吞噬及直接杀伤病原微生物的作用。而凝集素途径中,MBL 和 ficolin 是重要的模式识别分子,能与多种外来抗原的末端糖基如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、岩藻糖等结合。MBL 结合糖分子后,通过 MASPs 活化、裂解补体,启动补体活化的凝集素途径,发挥天然免疫的作用。肝脏是唯一能检测出 MASP 和 MAP mRNA 的组织。而 MASP 能在肝细胞系和神经胶质细胞中产生 mRNA,这也表明星形胶质细胞是脑组织表达 MASPs 的细胞^[6]。MASP2 的缺乏是一种新的遗传性免疫缺损,由于它的缺乏会使 H-ficolin、L-ficolin 和 MBL 激活补体的途径受到影响。因此,MASP2 的缺乏比单纯 MBL 缺乏的影响还要大。综上所述,MASPs 在补体活化的凝集素途径中起重要作用。因此,深入研究 MBL 与 MASPs 相互作用的精细的结构-功能关系及其机制,对阐明 MBL 结构基因突变引起免疫缺损的发病机制有重要意义。

而 MBL 与 C3b 呈反比,MASP 与 C3b 也呈反比;同时可以看出乙肝病变程度越重 C3b 的水平越高;这提示 MBL 是 C 型凝集素超级家族中胶凝素家族的成员。成熟的 MBL 肽链自 N 端至 C 端依次有富含 Cys 的 N 端区、胶原样区(CLR)、颈区和 C 端糖识别域(CRD)。CRD 是 MBL 识别的功能区,可选择性地识别多种病原体表面以 Man、ManNAc、GlcNAc 或 Fuc 等为末端糖基的糖结构。CLR 为 MBL 的效应功能区,可介导补体活化和调理吞噬。其补体活化作用无需 C1 和抗体

参与,而是通过活化 2 个 MBL 相关丝氨酸蛋白酶(MASP1 和 MASP2)而实现的。该作用能直接杀菌和溶解病毒,还可通过产生 C3b/C4b 起间接调理作用。MBL 能籍其 CLR 与吞噬细胞表面的胶凝素受体结合,介导直接调理功能^[7-8]。MBL 与病原微生物的糖类结合后产生的效应功能是由其保守的胶原尾巴介导的^[9]。一方面,可通过巨噬细胞膜表面表达的特定受体介导的调理作用来清除病原体,另一方面,MBL 可以直接或通过与其连接的蛋白酶,即 MASP 来激活补体的经典途径以及凝集素途径。MASP 与 MBL 结合后直接切割 C3 或激活经典通路中的 C3 转换酶,使 C3b 产生增加;或催化 C4 和 C2,形成 C4b2b。除此之外,MBL 还能在 Clq 与 Clr 和 Cls 的作用中替代 Clq,并激活经典补体通路中的 C3 转换酶^[10]。综上所述,MBL 与 MASP 具有正相关性($r=0.641, P<0.05$),同时可以看出乙肝患者肝组织损伤程度越重,MBL 和 MASP 的水平越低,这提示甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶是天然免疫的重要组成部分。而 MBL 与 MASP 均参与补体的同一条活化途径(MBL 途径),且分属上游和下游蛋白,具有较高的正相关符合这一免疫学基本理论。而 MBL、MASP 均存在较低程度的负相关,一方面提示 C3b 虽然也参与 MBL 途径,但在乙肝患者体内,其产生并非主要来源于 MBL 途径的激活,可能存在其他更重要的来源(如经典途径);另一方面,在确定高水平的 MBL、MASP 对乙肝患者具有保护意义后,C3b 的升高则会导致超敏反应和组织损伤。关于补体各成分及其水解片段在机体内的免疫功能至今尚未清楚,而它们在乙肝患者体内参与的免疫保护和(或)免疫损伤机制也无定论,有关 MASP、MBL 及 C3b 的表达和肝细胞受损程度之间的关系还需要进行更多的研究。

参考文献

[1] Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al. Interplay between promoter

(上接第 3304 页)

参考文献

[1] 武湘云,李贵霞,单保恩,等. 缺血修饰白蛋白和 D-二聚体及肌钙蛋白 I 在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(5):443-447.
 [2] Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study[J]. Clin Chem, 2001, 47(3): 464-470.
 [3] Apple FS, Wu AHB, Mair J, et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome[J]. Clin Chem, 2005, 51(5): 810-824.
 [4] Quiles J, Roy D, Gaze D, et al. Relation of ischemia-modified albumin(IMA) levels following elective angioplasty for stable angina pectoris to duration of balloon-induced myocardial ischemia[J]. Am J Cardiol, 2003, 92(3): 322-324.
 [5] Bar-Or D, Winkler JV, VanBenthuyzen K, et al. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: A preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I[J]. Am Heart J, 2001, 141(6): 985-991.
 [6] Bar-Or D, Curtis G, Rao N, et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human al-

bumin[J]. Euro J Biochem, 2001, 268(1): 42-48.
 [7] Brennan SO, George PM, Peach RJ. Characterisation of a slow component of normal human serum albumin[J]. Clin Chim Acta, 1988, 176(2): 179-184.
 [8] Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction[J]. Clin Chem, 2003, 49(4): 581-585.
 [9] Bar-Or D, Lau E, Winkler J V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report[J]. J Emerg Med, 2000, 19(4): 311-315.
 [10] Heesch C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, et al. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain[J]. JAMA, 2004, 291(4): 435-441.
 [11] 荣嵘,洪岩,贾玫. 冠心病患者血清缺血修饰白蛋白及心肌损伤标志物的变化和意义[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 405-407.
 [12] 刘红,杨营军. 急性冠状动脉综合征患者血清缺血修饰白蛋白的检测及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(16): 63-64.
 [13] 马春华,秦笛,史连义,等. 缺血修饰白蛋白在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J]. 实用预防医学, 2012, 19(6): 914-916.
 [14] 张瑞青,朱一堂,尹艳霞. 三项生化指标在急性冠状动脉综合征早期诊断中的意义[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(19): 3798-3799.

(收稿日期:2013-08-22)

(收稿日期:2013-08-06)