

• 临床检验研究论著 •

慢性 HBV 感染者血清中人 MASP 水平检测的临床意义*

蒋 静¹, 王拥军², 薛 黎^{1△}, 何 超³(1. 新疆医科大学第一附属医院检验科,新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院
输血科,新疆乌鲁木齐 830054; 3. 兰州大学第一医院医学检验中心,甘肃兰州 730000)

摘要:目的 研究甘露糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶(MASP)在病毒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,根据血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和 HBeAg 的水平分为 6 组:A 组(ALT 正常, HBeAg 阳性)、B 组(ALT 正常, HBeAg 阴性)、C 组(ALT 轻度/中度升高, HBeAg 阳性)、D 组(ALT 高度/重度升高, HBeAg 阳性)、E 组(ALT 轻度/中度升高, HBeAg 阴性)和 F 组(ALT 高度/重度升高, HBeAg 阴性)。采用 ELISA 检测甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶水平在健康对照组(即 G 组)及患者血清中的水平,并与 ALT、AST、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 作相关性分析。结果 F 组的 MASP 水平显著高于 A 组、C 组和 D 组,同时其显著低于 B 组和 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($P < 0.05$); MASP 水平与 ALT、AST、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 的值存在相关性($P < 0.05$)。结论 乙肝患者血清中 MASP 水平会降低,且其水平异常降低与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:甘露糖结合外源凝集素; 丝氨酸内肽酶类; 肝炎病毒,乙型; 丙氨酸转氨酶**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.004**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)01-0009-03

The clinic significance of serum MASP detection in HBV chronic infected patients*

Jiang Jing¹, Wang Yongjun², Xue Li^{1△}, He Cao³

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,

Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Department Blood Transfusion, First Affiliated Hospital of

Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 3. Medical Examination Center, First Affiliated

Hospital of Lanzhou Medical University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To research the expression and clinical significance of MASP in patients with different gradient of HBV infection. **Methods** The 140 patients were divided into six groups by its HbeAg expression and ALT level: Group A (HBeAg positive, ALT normal), group B (HBeAg-negative, ALT normal), Group C (HBeAg positive, ALT mildly / moderately elevated), group D (HBeAg positive, ALT highly / severely increased), group E (HBeAg negative, ALT mildly / moderately elevated), group F (HBeAg negative, ALT highly / severely increased), and group G was the normal control group. ELISA was used to test the level of c3b in serum of each samples, and the correlation analysis was done with ALT, AST, HBSAg, HBeAg and HBV-DNA. **Results** The MASP level of F group was significantly higher than that of group A, C and D ($P < 0.05$), and the MASP level of group D was significantly lower than that of the other groups ($P < 0.05$). The MASP level of G group was significantly higher than that of the other groups ($P > 0.05$), and the level of MASP was positively correlated with ALT, AST, HbsAg and HBV-DNA ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum MASP levels of HBV infected patients are low. The abnormal low level of MASP can be assisted detection index of increase infection and prognostic.

Key words:mannose-binding lectin; serine endopeptidases; hepatitis B virus; alanine transaminase

甘露糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶(mannose-binding lectin-associated serine protease, MASP)是凝集素途径的中心蛋白酶分子。甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)或纤维胶凝蛋白(ficolin)分子通过其胶原样区(collagen-like region, CLR)与 MBL 相关丝氨酸蛋白酶 MASP-1 或 MASP-2 结合形成复合物,在其 C 端糖识别域(carbohydrate recognition domain, CRD)识别、结合病原微生物的糖结构后,可活化 MASP 酶原,从而激活补体凝集素途径而发挥天然抗感染免疫效应^[1]。本文根据患者的肝功能及乙肝两对半的结果不同将其分为不同的组,用 ELISA 法检测血清 MASP 在健

康人及患者中的含量,初步探讨 MASP 在乙肝病毒感染中的意义,研究 MASP 水平和 HBSAg、HBeAg、ALT、AST、HBV-DNA 的相关性,进而探讨 HBV 慢性感染者血清中甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶水平检测的临床意义,更好地为临床服务。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要设备 37 ℃恒温箱及奥地利 TECAN sunrise 酶标仪。**1.1.2 主要试剂** MASP ELISA 检测试剂盒来自美国 R&D

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30660718);新疆维吾尔自治区病原生物学重点学科资助项目(编号:BYX11001)。作者简介:蒋静,女,主管检验技师,主要从事免疫检测方面的研究。 △ 通讯作者,E-mail:XJXL0991@163.com。

公司;HBV-DNA RT-PCR 试剂来自中山大学达安基因股份有限公司;ALT 试剂盒来自上海玉兰生物技术有限公司;HBV ELISA 试剂盒来自美国雅培公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标本来源 HBV 感染者来源于 2010 年 1 月至 2011 年 1 月到新疆医科大学第一附属医院诊治的患者,共 140 例,经检验符合乙肝感染的标准(表面抗原和 HBV DNA 均为阳性),所选病例均排除以下疾病:(1)甲、丙、丁、戊、庚型肝炎;(2)梅毒、HIV 感染;(3)恶性肿瘤、自身免疫病;(4)上呼吸道感染等炎症。20 例健康对照者选取新疆医科大学第一附属医院的健康体检人员,各型肝炎病毒血清标志结果均为阴性者(表面抗原阴性且肝功转氨酶为正常值)。对这 160 例的性别和年龄进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明研究对象具有可比性。

1.2.2 研究分组 本研究参考卫生部修订的《乙型肝炎防治方案》^[2],根据患者血清中 ALT 和 HBeAg 的水平将 140 例乙肝患者分成了 6 组,分别是:A 组(ALT 正常, HBeAg 阳性,即免疫耐受组)、B 组(ALT 正常, HBeAg 阴性,即无症状 HBV 携带组)、C 组(ALT 轻度/中度升高, HBeAg 阳性)、D 组(ALT 高度/重度升高, HBeAg 阳性)、E 组(ALT 轻度/中度升高, HBeAg 阴性)和 F 组(ALT 高度/重度升高, HBeAg 阴性)。G 组是健康对照组。

1.2.3 指标检测 对照组及患者血清中 MASP 水平用 ELISA-生物素亲和素抗体夹心法测定,患者 HBV-DNA 水平用荧光定量 PCR 法测定,HBeAg 水平用 ELISA 方法测定,根据 S/CO 值判定其阴性、阳性;ALT 水平用速率法测定,参照《乙型肝炎防治方案》,同时根据本医院的谷丙转氨酶正常参考

值,将谷丙转氨酶高于正常参考值 5 倍以内设定为轻度或中度异常,将谷丙转氨酶高于正常参考值 5 倍以上设定为高度或重度异常。

1.3 统计学处理 本研究的统计学处理采用 SPSS 16.0 软件,以 $\bar{x} \pm s$ 表示所得的数据,采用单因素方差分析来比较计量数据,用 LSD 法对差异有统计学意义的组间进行进一步两两比较,检验水准依据 $\alpha=0.05$ 。在相关性分析中,用 Pearson 相关系数来讨论 MASP 与定量数据的相关性,用秩相关系数来研究 MASP 与定性数据的相关性。

2 结 果

2.1 各组 MASP、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA、AST 水平比较 G 组的 MASP 水平显著高于其余 6 组($P<0.05$);G 组的 HBeAg(定量)和 AST 水平显著低于 C 组和 D 组($P<0.05$);D 组的 MASP 水平显著低于 A 组、B 组、C 组、E 组和 F 组($P<0.05$);D 组的 HBV-DNA 水平显著低于 A 组、B 组和 E 组($P<0.05$);D 组的 HBeAg(定量)水平显著高于 A 组、B 组、E 组、F 组和 G 组($P<0.05$);D 组的 AST 水平显著高于 A 组、B 组、C 组、E 组和 G 组($P<0.05$);F 组的 MASP 水平显著高于 A 组、C 组和 D 组,同时其显著低于 B 组和 G 组($P<0.05$);F 组的 AST 水平显著高于 A 组、B 组、C 组、E 组和 G 组($P<0.05$);F 组的 HBeAg(定量)水平显著低于 C 组和 D 组($P<0.05$);F 组的 HBV-DNA 水平显著低于 C 组($P<0.05$),见表 1。

2.2 MASP 水平与 ALT、AST、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 的相关性分析 MASP 与 HBeAg(定性)存在较强的负相关, MASP 与 AST、HBSAg(定量和定性)、HBeAg(定量)、HBV-DNA(定量)存在较弱的负相关,见表 2。

表 1 各组血清中 MASP、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA、AST 水平比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | MASP/(ng·mL ⁻¹) | HBeAg/(S·CO ⁻¹ 值) | HBSAg/(S·CO ⁻¹ 值) | AST/(U·L ⁻¹) | HBV-DNA(拷贝/mL) |
|-----|----|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---|
| A 组 | 20 | 74.45±14.91 ^{☆△} | 10.60±16.75 [☆] | 200.54±101.47 | 35.21±20.26 ^{●☆} | 1.12×10 ⁶ ±2.36×10 ⁶ [☆] |
| B 组 | 20 | 111.87±21.79 ^{☆●△} | 0.22±0.21 [☆] | 121.26±106.03 | 78.95±47.99 ^{●☆} | 1.25×10 ⁶ ±3.84×10 ⁶ [☆] |
| C 组 | 30 | 61.11±17.87 ^{☆●△} | 200.30±372.13 ^{△●} | 132.84±124.05 | 92.10±60.94 ^{△●☆} | 1.40×10 ⁷ ±2.11×10 ⁷ [●] |
| D 组 | 20 | 48.71±16.29 ^{△●} | 187.41±426.54 ^{△●} | 109.84±72.34 | 222.05±28.29 [△] | 1.08×10 ⁷ ±2.35×10 ⁷ |
| E 组 | 30 | 86.11±21.16 ^{☆△} | 0.34±0.33 [☆] | 135.73±124.36 | 76.46±73.61 ^{●☆} | 1.59×10 ⁶ ±3.68×10 ⁶ [☆] |
| F 组 | 20 | 80.54±12.02 ^{☆△} | 0.39±0.91 [☆] | 117.76±102.88 | 212.97±23.87 [△] | 4.34×10 ⁶ ±9.46×10 ⁶ |
| G 组 | 20 | 134.02±26.56 [●] | 0.39±0.13 [☆] | 0.88±0.29 | 21.48±7.36 ^{●☆} | — |

△: $P<0.05$, 与 G 组比较;☆: $P<0.05$, 与 D 组比较;●: $P<0.05$, 与 F 组比较。—: 该项无数据。

表 2 MASP 与 ALT、AST、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 的相关性

| 与 MASP 的相关性 | AST | ALT | HBSAg(定量) | HBSAg(定性) | HBeAg(定量) | HBeAg(定性) | HBV-DNA(定量) |
|-------------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| r 值 | -0.443 | -0.517 | -0.255 | -0.490 | -0.438 | -0.677 | -0.457 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

3 讨 论

由于 HBV 的感染,机体会产生抗原抗体复合物,激活补体系统,引发多种生物学效应,导致补体的消耗。同时肝脏合成补体的功能下降不能及时合成,造成体内的补体含量下降。从本组资料来看,乙肝患者的补体含量都有所下降,其下降的程度与肝炎病变程度有关。目前有大量关于感染乙肝病毒的

免疫学研究报道,而本文探索处于不同感染程度的乙肝患者中人甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶(MASP)的水平的不同,将 MASP 与 ALT、AST、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 进行相关性分析,研究 MASP 与肝细胞受损以及病毒复制之间的关系,有关这方面的研究国内、外还未见报道。

MASP 和补体 Cls 具有共同的结构域(2 个 CUB 结构域、

EGF 结构域、2 个 CCP 结构域和丝氨酸蛋白酶结构域), 同属丝氨酸蛋白酶亚家族^[3-4]。MASP 家族包含 3 个丝氨酸蛋白酶(MASP-1, 2, 3) 和非酶蛋白 MAP19^[5]。最近的研究显示, ficolins 在人的血清中与 MASP 和 sMAP 形成复合物, 该复合体能激活补体系统^[6]。MBL 与细菌、酵母、寄生的原生动物或病毒表面的甘露聚糖残基结合后, 可与 MASP 结合, 激活该蛋白酶, 从而激活补体途径。激活的 MASP 可代替 C1 水解 C2 和 C4, 形成 C3 转化酶, 然后与经典途径相同, 形成早期抵御病原微生物感染的一种先天性免疫防御机制^[7-8]。

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, 探讨在不同感染程度的乙肝患者血清中的 MASP 的水平, 分析在乙肝疾病的发展过程中 MASP 所起的作用和其可能发挥的抗病毒免疫功能。分析得出: 健康对照组的 MASP 水平显著高于其余 6 组, 同时, HBeAg 阳性, ALT 高度/重度升高组的 MASP 水平显著低于其余 6 组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示 MASP 的水平在乙肝患者中降低, 且乙肝病变程度最重的组 MASP 水平最低, 提示低水平的 MASP 更易感染乙肝病毒, 这可能是由于 MASP 水平降低使天然免疫系统中关键分子的缺陷, 诱发感染性疾病。这与 Schlapbach 等^[9]2007 年研究结果发现相一致, 在儿童恶性肿瘤患者应用化学治疗过程中, MASP-2 缺乏是化疗并发感染的危险因素, 它将增大导致发热与发生中性粒细胞减少症的危险。

另发现, HBeAg 阴性, ALT 高度/重度升高组的 MASP 水平显著高于 HBeAg 阳性, ALT 高度/重度升高组、HBeAg 阳性, ALT 轻度/中度升高组和 HBeAg 阳性 ALT 正常组, 同时该组的 MASP 水平显著低于 HBeAg 阴性 ALT 正常组和健康对照组, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这提示了乙肝病变程度高的组 MASP 水平较低, 而乙肝病变程度低的组 MASP 水平较高, 这可能是由于血浆 MASP 水平较低^[10], 阻碍补体活化的凝集素途径, 引起机体非特异性免疫系统功能障碍^[11]。因此低水平的 MASP 可能会引起患者肝损伤程度加剧。同时还发现 HBeAg 阳性, ALT 高度/重度升高组的 HBV-DNA 的水平显著低于 HBeAg 阳性 ALT 正常组、HBeAg 阴性 ALT 正常组和 HBeAg 阴性, ALT 轻度/中度升高组; 另发现 HBeAg 阴性, ALT 高度/重度升高组的 HBV-DNA 的水平显著低于 HBeAg 阳性, ALT 轻度/中度升高组, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这提示肝细胞损伤的程度与病毒的复制水平并不同步, 超敏反应在广泛损伤肝细胞的时候也抑制了病毒在细胞内的复制。

研究还发现 MASP 的水平分别与肝功转氨酶(ALT 和 AST)、HBSAg、HBeAg、HBV-DNA 的水平呈负相关, 即随着乙肝病变程度的加重其 MASP 的水平越来越低, 而且 AST、HBSAg、HBV-DNA 和 HBeAg(定量)的值与 MASP 水平存在弱的相关性, ALT 和 HBeAg(定性)的值与 MASP 存在中度负相关性, 这提示 MASP 水平的下降预示着乙肝病变程度的加重, 这可能是由于 MASP 水平的下降使得补体活化的凝集素途径受阻碍, 这可能会加剧病毒的复制和超敏反应性组织损伤。

综上所述, 很多学者都认为慢性感染的乙型肝炎与 MASP 表达水平低相关, 并且乙肝病变程度越重越阻碍了补体活化的凝集素途径, 阻碍了 MASP 代替 C1 水解 C2 和 C4, 形成 C3 转化酶, 使 MASP 抵御病原微生物感染的一种先天性免疫防御机制受阻, 引起机体非特异性免疫系统功能障碍, 引起一系列肝组织损害的免疫效应, 但是慢性 HBV 的不同感染程度与 MASP 的表达水平之间的相关性还有待于进一步的研究来验证。本研究的结果也表明低表达水平的 MASP 与患者出现的肝细胞损伤有关, 也与 HBV 的病变程度的加重和不良的疾病预后有关系, 有关 MASP 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] Ambrus G, Gal P, Kojima M, et al. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments[J]. Immunol, 2007, 170:1374-1382.
- [2] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 胃肠病学杂志, 2011, 16(6): 351-366.
- [3] Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by man nose-binding protein in association with a novel Cls-like serum protease[J]. J Exp Med, 2008, 176:1497.
- [4] Bork P, Beckmann G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins[J]. J Mol Biol, 2006, 231(4): 539.
- [5] Schwable W, Thiel S. The mannan-binding lectin-associated serine protease (MASPs) and MAP19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes[J]. Mol Immunol, 2002, 205(4/5):455.
- [6] Ambrus G, Gal P, Mayumi K, et al. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: A study on recombinant catalytic fragments[J]. Immunol, 2003, 170(12):1374.
- [7] 金铂泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 244.
- [8] 陈政良. 补体激活第三条途径-凝集素途径[J]. 国外医学分子生物学分册, 2008, 21(2):295.
- [9] Schlapbach LJ, Aebi C, Otth M, et al. Deficiency of mannos-binding lectin-associated serine protease-2 associated with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients[J]. Pediatr Infect Dis J, 2007, 26(11):989-994.
- [10] Varga. Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema[J]. Clin Exp Imm, 2008, 153(1):68-74.
- [11] Stover C, Endo Y, Takahashi M, et al. The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the factor component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36. 2-3[J]. Genes Immun, 2007, 30(3):119-127.

(收稿日期: 2013-08-28)