

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480011071.6

[51] Int. Cl.

G12Q 1/00 (2006.01)

G12Q 1/04 (2006.01)

G12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月24日

[11] 公开号 CN 1777682A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/68 (2006.01)

[22] 申请日 2004.4.26

[21] 申请号 200480011071.6

[30] 优先权

[32] 2003.4.25 [33] US [31] 60/465,655

[86] 国际申请 PCT/CN2004/000405 2004.4.26

[87] 国际公布 WO2004/097033 英 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.25

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 何庆瑜 邱政夫 廖家杰 周 园

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 5 页

[54] 发明名称

乙型肝炎病毒感染肝脏的血清生物标记和检测该标记的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测乙型肝炎病毒(HBV)感染并伴有肝脏炎症病人中发生变化的血清蛋白存在的方法,包括:从病人获取血清样品;将样品进行蛋白凝胶电泳以分离其中包含的蛋白质;用硝酸银溶液对分离在电泳凝胶上的蛋白质进行染色;将染色蛋白质的图象扫描到图象分析扫描仪中以获取凝胶图象;将凝胶图象和由正常病人的血清和HBV感染并伴有肝脏炎症病人的血清制备的对照样品的电泳凝胶进行对比,以确定病人的血清样品是否包含特异性血清蛋白质。本发明也提供了诊断HBV感染和肝脏炎症病人的血清蛋白质生物标记。

1. 一种检测肝脏炎症病人中存在乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的方法; 包括:

5 (a) 从病人获取血清样品;

(b) 分离存在于病人血清样品中的蛋白质以确定样品中生物标记的存在; 和

(c) 将存在于步骤 (b) 中的蛋白质和存在于正常病人对照血清样品中的蛋白质进行比较, 以确定从 HBV 感染病人获得的血清样品是否包含可
10 指示 HBV 感染的发生变化的血清蛋白。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述 HBV 感染病人的血清样品包含表达发生变化的载脂蛋白 A-I(apoA-I)、载脂蛋白 A-I 片段、触珠蛋白 β 链、触珠蛋白切割的 β 链、触珠蛋白 2 链、载脂蛋白 A-IV (apoA-IV)、甲状腺素运载蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、 α 1-抗胰蛋白酶片段/同种型或 DNA 拓扑异构
15 酶 II(topo-II)。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述 HBV 感染病人的血清样品包含载脂蛋白 A-I 或其片段。

4. 在肝脏炎症病人中诊断 HBV 感染的血清生物标记, 其中所述血清生物标记包含一种或多种下列已纯化的蛋白: 载脂蛋白 A-I(apoA-I)、
20 载脂蛋白 A-I 片段、触珠蛋白 β 链、触珠蛋白切割的 β 链、触珠蛋白 2 链、载脂蛋白 A-IV (apoA-IV)、甲状腺素运载蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、 α 1-抗胰蛋白酶片段/同种型或 DNA 拓扑异构酶 II(topo-II)。

5. 在肝脏炎症病人中诊断 HBV 感染的血清生物标记, 其包含有载脂蛋白 A-I 或其片段。

乙型肝炎病毒感染肝脏的血 清生物标记和检测该标记的方法

5

发明背景

乙型肝炎病毒(HBV), 一种严重传染性的和分布广泛的人类病原体给全世界带来一个重大的健康问题。慢性 HBV 感染演变成肝细胞癌的风险非常高。虽然在过去的几年中已经取得了相当大的进展, 但 HBV 感染的发病机理仍然难以捉摸, 且 HBV 感染肝脏的明确诊断信息仍依赖于活组织检查。

乙型肝炎病毒(HBV) 感染是人类最常见的病毒感染之一, 大约有 20 亿人被感染[1]。在这些被感染的人中, 三亿五千万变为慢性感染。这在亚太地区, 例如中国南部特别受关注[2]。大约 25-40%最终死于肝脏疾病(即伴有或不伴有肝细胞癌的肝硬化); 男性死亡率为 50%, 女性为 15%。流行病学研究表明 HBV 感染是一种复杂的状况, 且感染的致病机理还不是完全明确[2, 3]。虽然在疾病的诊断和进展监控中已经鉴定和使用多种 HBV 标记, 例如乙型肝炎表面抗原(HBsAg), 乙型肝炎表面抗体, 乙型肝炎 e 抗原, 乙型肝炎 e 抗体, 乙型肝炎核心抗原, 乙型肝炎核心抗体, IgM 和 IgG, 但能够明确诊断感染的单一血清学试验却不存在[4]。例如 HBsAg 阳性是 HBV 感染的特点, 但 HBsAg 阴性不能够排除 HBV 感染[4]。到目前为止, 对 HBV 感染的肝脏炎症的明确诊断仍依赖于血清学, 生物化学和组织学检查的结合。

目前有两类药物被用来治疗慢性 HBV [5, 6]。第一类是通过调节宿主对 HBV 抗原的免疫反应起作用的一类免疫调制剂。第二类是一类病毒抑制剂。目前最好的免疫调节药物, 干扰素 α 2b 只具有有限的效果, 特别是对亚洲病人。病毒抑制剂需要很长时间才能有效降低 HBV 水平。很明显需要更特异和更有效的诊断和治疗方法。

发明概述

30 本发明提供了一种检测病人中存在乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法,

包括：从病人获取血清样品；将样品进行蛋白凝胶电泳以分离其中包含的蛋白质；用硝酸银溶液对分离在电泳凝胶上的蛋白质进行染色；将染色蛋白质的图象扫描到图象分析扫描仪中以获取凝胶图象；将凝胶图象和由 HBV 阴性血清和 HBV 阳性血清制备的对照样品的电泳凝胶进行对比，以确
5 定 HBV 感染病人的血清样品是否包含有发生变化的血清蛋白质。

本发明也提供了诊断病人中 HBV 感染和肝脏炎症的血清生物标记 (biomarker)，其中血清生物标记包含一种或多种下列蛋白：载脂蛋白 A-I (apoA-I)、载脂蛋白 A-I 片段、触珠蛋白 β 链、触珠蛋白切割的 β 链、触珠蛋白 $\alpha 2$ 链、载脂蛋白 A-IV (apoA-IV)、甲状腺素运载蛋白、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白
10 酶、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶片段/同种型或 DNA 拓扑异构酶 II(topo-II)。

附图简介

图 1 分别显示了正常、LNS 和 HNS 这三种有代表性的血清样品的 2 维 (2D) 凝胶图象 (A)，和显示人血清蛋白共同特征的放大的主 LNS 凝胶 (B)。 (Norm : 正常, LNS & HNS : 低和高的坏死性炎症(necroinflammatory)分
15 数)。

图 2 包括在 1 区和 2 区中显示蛋白质变化的触珠蛋白模式 (Norm : 正常, LNS & HNS : 低和高的坏死性炎症分数)。

图 3 在 3 区和 4 区显示有关 apoA-I、apoA-IV 和甲状腺素运载蛋白 (TTR) 的蛋白质变化 (Norm : 正常, LNS & HNS : 低和高的坏死性炎症分数)。

20 图 4 在 5 区和 6 区显示有关 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶的蛋白质变化 (Norm : 正常, LNS & HNS : 低和高的坏死性炎症分数)。

图 5 在 7 区显示 DNA 拓扑异构酶 II 的模式，显示了蛋白质变化 (Norm : 正常, LNS & HNS : 低和高的坏死性炎症分数)。

优选实施方案的详细描述

25 本发明提供了一种在肝脏炎症病人中检测乙型肝炎病毒 (HBV) 感染存在的方法；包括：(a) 从病人获取血清样品；(b) 分离存在于病人血清样品中的蛋白质以确定样品中生物标记的存在；和 (c) 将存在于步骤 (b) 中的蛋白质和存在于正常病人对照血清样品中的蛋白质进行比较，以确定从 HBV 感染病人获得的血清样品是否包含可指示炎症性肝脏被 HBV 感染
30 的发生变化的血清蛋白质。

本发明提供了一种检测病人中存在乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法，包括：从病人获取血清样品；将样品进行蛋白凝胶电泳以分离其中包含的蛋白质；用硝酸银溶液对分离在电泳凝胶上的蛋白质进行染色；将染色蛋白质的图象扫描到图象分析扫描仪中以获取凝胶图象；将凝胶图象与由正常病人的血清和 HBV 感染并伴有肝脏炎症病人的血清制备的对照样品的电泳凝胶进行对比，以确定病人的血清样品是否包含可指示炎症性肝脏慢性 HBV 感染的发生变化的血清蛋白质。优选地，HBV 感染并伴有肝脏炎症病人的样品包含载脂蛋白 A-I(apoA-I)、载脂蛋白 A-I 片段、触珠蛋白 β 链、触珠蛋白切割的 β 链、触珠蛋白 2 链、载脂蛋白 A-IV (apoA-IV)、甲状腺素运载蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、 α 1-抗胰蛋白酶片段/同种型或 DNA 拓扑异构酶 II(topo-II)。在另一个实施方案中，此方法中所用的相同血清包含载脂蛋白 A-I 或其片段。

本发明也提供了诊断病人 HBV 感染性肝脏炎症的血清生物标记，其中血清生物标记包含一种或多种下列已鉴定的蛋白：载脂蛋白 A-I(apoA-I)、载脂蛋白 A-I 片段、触珠蛋白 β 链，触珠蛋白切割的 β 链、触珠蛋白 2 链、载脂蛋白 A-IV (apoA-IV)、甲状腺素运载蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、 α 1-抗胰蛋白酶片段/同种型或 DNA 拓扑异构酶 II(topo-II)。在另一个实施方案中，血清生物标记包含纯化的载脂蛋白 A-I 或其片段。

参考下面的实验细节可以更好地理解本发明，但本领域熟练技术人员很容易理解这里详细描述的具体实施例是用于解释本发明，不意味着限制其后所描述的发明。

实验细节

i. 引言

蛋白质组学分析是最近研发的一种具有较强功能的技术，可增强人类疾病诊断、治疗和预防方面的研究[7,8]。蛋白质组学通过 2 维电泳或蛋白质芯片技术对正常样品和患病样品或药物治疗样品的不同的蛋白质表达谱（表达水平、翻译后修饰、相互作用等）进行综合检查分析，可以提供有关新的生物标记、疾病相关的靶和发病机制方面的信息。这项技术已经被广泛用于研究癌症和其他疾病[9-11]，但目前还没有关于蛋白质组学应用于研究 HBV 感染性肝脏炎症的报道。在这项研究中，我们采用蛋白质组学对

HBV 感染血清样品进行了全局性的分析。通过与正常血清样品进行比较，鉴定出了多种明显不同的蛋白质表达。对这些蛋白质的详细分析可能为 HBV 感染性肝脏疾病的诊断和治疗揭示有价值的信息。

在这篇报道中，我们利用蛋白质组学对 HBV 感染的血清样品进行全局性检测的目的是寻找能够用作进行诊断的血清生物标记和/或发病机理研究靶蛋白的肝脏疾病相关蛋白质。通过与正常血清样品和 HBV 阴性血清样品进行比较，我们发现在 HBV 感染并伴有肝脏炎症病人的血清中至少有七种蛋白质发生了明显变化。经鉴定这些变化较大的蛋白质是触珠蛋白 β 链和 $\alpha 2$ 链、载脂蛋白 A-I 和载脂蛋白 A-IV、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、甲状腺素运载蛋白和 DNA 拓扑异构酶 II α 。这些蛋白质的变化不仅表现在量上，而且表现在它们的模式（或特异性）上，而这与坏死性炎症分数相关。特别是载脂蛋白 A-I 表现出不同同种型表达水平的不均一变化，而 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶产生了暗示不同切割路径的明显不同的片段。这些独特的现象似乎是 HBV 感染特有的。一种同时考虑这些蛋白质的量和同种型的组合是 HBV 诊断和治疗有用的血清生物标记（或指标）。

i. 材料和方法

A. 受试人

我们在中国香港特别行政区（Hong Kong SAR）Queen Mary 医院的肝脏学研究诊所（Hepatology Research Clinic）（属于 GKK Lau）对 18 名慢性乙型肝炎 e 抗原阳性的中国受试者进行了随访研究。九人处于免疫耐受期（第 1 组），九人处于免疫清除期（第 2 组）（表 1）。他们都进行了用于评估或用来进行与临床试验计划一致的治疗前评估的肝脏活组织检查[12]。由不清楚病人临床发现的 2 位病理学家对肝活组织检查进行评估。既从组织学也从修饰的组织活性指标方面进行评估[13]。对肝脏活组织检查时收集的血清样品的血清 ALT 水平进行评估，并采用 bDNA 信号扩增测定（bDNA Quantiplex™ HBV DNA, Chiron, Emeryville, CA, 美国）对血清中的 HBV DNA 进行定量[14]。第 1 组病人血清 HBV DNA 高($6554 \pm 1731 \times 10^6/\text{ml}$)，ALT 水平低($33 \pm 14 \text{ IU/L}$)，坏死性炎症分数(LNS)低(≤ 2)，而第 2 组病人血清 HBV DNA 低($922 \pm 1388 \times 10^6/\text{ml}$)，ALT 水平高($427 \pm 253 \text{ IU/L}$)，坏死性炎症分数 (HNS)高(≥ 7)（表 1）。另外，用 5 名乙型肝炎阴性和 10 名正常受试者作

为对照。所有的血清样品都储存在-80℃直到使用。采用 Bradford 方法确定所有样品的蛋白质浓度。

A. 2D 凝胶电泳

用 Amersham Pharmacia IPGphor IEF 和 Ettan Dalt 的六电泳单元参照
5 Amersham Pharmacia 公司建议的规程进行 2D 凝胶电泳。简而言之，就是将
250µg(~3 µl)血清样品混入含有 8 M 尿素、4% CHAPS、1mM PMSF、20 mM
DTT 和 0.5%IPG 缓冲液的 340µl 再水化溶液中。在 30 V 低电压下对预制的
18 cm 的 IPG 条进行超过 10 小时的再水化步骤。遵循“逐步”电压增加程
序运行 IEF：即 500 V 和 1000 V 各 1 小时，5000-8000 V 约 10 小时，总量为
10 64K Vh。IEF 后，将条在平衡缓冲液中进行两步平衡，第一步在包含 6 M 尿
素、30%甘油、2% SDS 和 50 mM Tris-HCl (pH6.8)及 1% DTT(w/v)的缓冲液
中进行，第二步在包含 6 M 尿素、30%甘油、2% SDS 和 50 mM Tris-HCl
(pH6.8)及 2.5%IAA (w/v) 的缓冲液中进行。然后将条转移到在 10℃在 1.5 mm
厚的 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶上运行的二维 SDS-PAGE 上。

15 A. 银染色

将凝胶在 40%乙醇和 10%乙酸水溶液中过夜进行固定，接着在含有
30%乙醇、41%乙酸钠和 0.2%硫代硫酸钠的缓冲液中温育 30 分钟。在水中
洗涤凝胶三次，每次 5 分钟，然后在包含 0.02%甲醛的 0.1%的硝酸银溶液
中将凝胶染色 40 分钟。在由 2.5%碳酸钠和 0.01%甲醛组成的溶液中继续进
20 行 15 分钟显影。用 EDTA 溶液(1.46%)终止显影，然后在水中洗涤染色的凝
胶三次，每次 5 分钟。

A. 图象获取和分析

用 Amersham Pharmacia Biotech 的软件 LabScan 3.00 操纵的 ImageScanner
(Amersham) 扫描染色的凝胶。在获取凝胶图象前用强度阶式光楔进行强
25 度校准。使用 Amersham Pharmacia 的 ImageMaster 2D Elite 软件 4.01 对图象
进行分析。先对图象点进行检测，配对，然后进行手工编辑。正常血清样
品的十幅凝胶图象被平均，作为用于比较的参考。通过本底扣除和总的点
强度标准化处理每一个点的强度值，所得到的点强度的百分比用来进行比
较。只选择那些具有显著差异的点(2 倍增加或降低)用质谱法进行分析。

30 A. 凝胶内的胰蛋白酶消化

将蛋白点切下，转移到硅烷化处理的 1.5 ml Eppendorf 管中。在 1: 1 的 30 mM 的铁氰化钾和 100 mM 硫代硫酸钠的混合溶液中对凝胶芯片进行脱色后，在 50 mM 碳酸氢铵中平衡以使 pH 为 8.0。用乙腈水合以及在 SpeedVac 中干燥凝胶后，将凝胶在最少量的胰蛋白酶溶液(在 25 mM NH_4HCO_3 中 10 $\mu\text{g/ml}$) 中进行再水化，并于 37 $^\circ\text{C}$ 温育过夜。上清液直接用于有等量基质的样品盘中。如果需要，接下来可以用 50% 和 80% 乙腈提取凝胶内的消化物，然后在样品盘中使用前用 Zip 尖端对其进行浓缩和脱盐处理。

A. MALDI-TOF 质谱分析和蛋白质鉴定

用 Voyage-DE STR MALDI-TOF 质谱仪(Applied Biosystems)获取胰蛋白酶肽的质谱图。仪器设置为延迟提取时间为 175 ns、栅压为 60-65%和加速电压为 20k 的反射器模式。用每一个光谱中的 250 个激光点获取质量为 600 到 2500 道尔顿的图谱。胰蛋白酶自溶片段峰(906.5049、1153.5741 和 2163.0570)作为质量校准内标物。通过使用 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>) 在 NCBI nr 蛋白质数据库中进行检索来鉴定蛋白质。用 50 ppm 或更好的质量精确度，至少 4 个匹配肽质量和分子量和与凝胶的估计值匹配的 pI 设定检索标准。也进行了发射源衰减后 (post-source decay) MS/MS 测定和 MS-Tag (<http://prospector.ucsf.edu/>)搜索来证实 MS-Fit 的结果。物种搜索只限于智人 (Homo sapiens)。

i. 结果

A. 蛋白质分离

对两组 HBV 感染血清样品和对照样品进行了 2D-PAGE，并通过银染色显现蛋白质。对每一份样品进行三次 2D 凝胶，以使凝胶间差异最小化。图 1A 分别显示了正常、HBV 感染的低和高坏死性炎症分数 (LNS and HNS) 这三种血清的代表性凝胶图象。图 1B 是显示人血清蛋白质共同特征的放大的主 LNS 凝胶。总之，在 SWISS-2D 数据库(<http://www.expasy.ch/ch2d/>)中凝胶具有与血浆图谱非常相似的模式，只除了缺少纤维蛋白原外。对凝胶上分子量在 6k-20k Da，以及 pIs 在 4-10 的超过 1000 个点进行了检测。多个系列的点代表那些一级结构具有不同程度糖基化和/或磷酸化 (同种型)，从而导致 pI 和分子量渐进性变化的蛋白质。借助于 ImageMaster 程序，在三类样品之间对点强度进行了比较。在图 1B 显示的至少七个区内发现了明显且

恒定的差异。

A. 蛋白质鉴定

将具有明显差异的蛋白质点切割下来，并用胰蛋白酶进行消化，进行 MALDI-TOF 质谱测量和数据库检索。通过将点的位置和模式与 SWISS 数据库血浆图谱中的那些进行比较来对蛋白质鉴定进行适当的确认。表 2 概括了七个区内已鉴定的蛋白质和它们在正常、LNS 和 HNS 血清样品中的变化。总之，在慢性 HBV 感染和肝脏炎症病人的血清中有 3 种蛋白质（组）的表达被抑制，且 5 种蛋白质（组）的表达增强。

有关触珠蛋白的一个显著变化显示在图 2（图 1B 的 1 和 2 区）中。触珠蛋白 $\alpha 2$ 链、 β 链和切割的 β 链在 2D 凝胶中表现出它们特有的系列模式，特征在于分别具有三种、七种和六种可检测的同种型。与正常样品相比，触珠蛋白在 LNS 血清样品中总体上轻度增加或没有变化，但在 HNS 病人中受到明显抑制（表 2）。在有些情形中（30%），蛋白质减少到不可检测的水平。相反在图 2 的 1 区用圆圈突出显示的蛋白簇则从对照样品中不可检测的表达水平逐渐增加到 LNS 中的部分可见，然后增加到 HNS 中的完全显现。

图 3 显示了发生在载脂蛋白 A-I(apoA-I)区（图 1B 3 区）的另一个明显的变化。正常血清具有三个主要的 apoA-I 蛋白点（从左到右为同种型 2、1 和 0）[15]，紧接着在这些主要点的下方有一到三个非常弱的切割片段点。在慢性 HBV 感染的血清样品中，apoA-I 谱的全部模式被改变。同种型 2 大大上调，同种型 0 明显下调，而同种型 1 保持不变（表 2）。除了这三个主要的点外，弱的片段点显著增强，而且在低分子量区域出现了许多新的点（图 3）。经鉴定这些新的点具有 apoA-I 的一级结构序列，且它们可能属于 apoA-I 的切割片段或其他同种型。也值得注意的是主要 apoA-I 蛋白点的强度在 LNS 和 HNS 样品中全部都下降，而且 apoA-I 的切割片段或其他同种型在 LNS 中的强度值比在 HNS 样品中的对应值高（表 2）。

在分子量更低的 4 区中还观察到另一种 apoA-I 片段（图 3）。这个点出现在 LNS 和 HNS 样品两者中，但正常血清样品中却没有。类似地在两种 HBV 感染样品的相同 4 区中都鉴定出一个 apoA-IV 的点，而在对照中却没有检测到。正常样品的 4 区中唯一可检测的点经鉴定是甲状腺素运载蛋

白。在 HBV 携带者的血清中甲状腺素运载蛋白同种型的表达水平明显降低。

图 4 显示了图 1 B 的 5 和 6 区中的蛋白质变化。5 区中的三个点和 6 区中的两个点在 LNS 和 HNS 样品中都显著增强（表 2）。经鉴定这些点具有与 α 1-抗胰蛋白酶相同的一级序列。这种蛋白质通常在代表 2D 凝胶中范围为 pI 5.0-5.2, MW 55kDa (<http://www.expasy.ch/ch2d/>)的各种表型的一组点中出现(图 1B)。在对照和 HBV 血清样品之间没有发现正常 α 1-抗胰蛋白酶水平的明显变化。然而在低分子量区域(MW 38-39kDa), α 1-抗胰蛋白酶的水平在 HBV 样品中大大增强（表 2）。HNS 6 区中蛋白质增加的表达水平比 LNS 样品中的多 2 倍。

7 区中的点被鉴定为 DNA 拓扑异构酶 II(topo-II) (图 5)。在正常血清中只检测到这种蛋白质的一个点,而在 HBV 样品中发展为一组的五个点。结果,在 HBV 血清中蛋白水平总计升高了约 20 倍（表 2）。考虑到完整 topo-II 分子量为 180kDa 这一事实,认为 7 区中的这些点可能是低分子量的片段。

A. 讨论

触珠蛋白、apoA-I 和 α 1-抗胰蛋白酶属于肝脏分泌的最丰富的血清糖蛋白。因此肝脏损伤导致这些蛋白发生变化是合理的,反过来就可以用这些蛋白质作为监控肝脏疾病的生物标记。最近已经努力将这些蛋白质和其他的基础血清标记结合作为诊断 HCV 疾病的指标,从而减少在慢性 HCV 感染病人中进行的肝脏活组织检查的数目[16,17]。所有的这些研究几乎都基于正常和患病样品中标记蛋白量的比较。目前的这份报告通过蛋白质组学分析在全局范围内研究了这些生物标记的变化(其表达水平及模式),因此能够为 HBV 感染提供更加具体的评估。

已经用触珠蛋白来研究包括 HBV 感染的各种肝脏疾病的血清很长时间了。但却报道出相反的结果。早期的研究表明在慢性[18,19]和急性[20]病毒性肝炎中触珠蛋白水平降低,而其他的报道则声称触珠蛋白水平在急性肝炎中发生变化[21],而在慢性肝炎中没有观察到明显的变化[22]。另外一项最近的研究揭示触珠蛋白在所有的急性病毒性肝炎和慢性 HBV 感染中都增加,在其他慢性肝炎病人中则下降[23]。产生这些不一致结果的原因可能是

因为使用的测量方法、样品来源和疾病所处的分期不同。我们在这里对低(LNS)和高(HNS)炎症期的 HBV 血清进行了具体评估。我们的结果显示, 在 LNS 血清中, 触珠蛋白 $\alpha 2$ 和 β 链轻度增加, 而在 HNS 样品中显著下降 (表 2)。这暗示与慢性 HBV 感染的低 ALT 和高 HBV-DNA 免疫耐受期相对应的不伴有炎症的 HBV 感染可能不会导致严重的肝损伤[6]。而炎症晚期会使肝功能严重损伤, 从而导致受损肝脏分泌的触珠蛋白 α 和 β 链都明显下降。

许多研究已经表明 apoA-I 的水平与慢性肝脏疾病中肝细胞功能的变化相关[24-27]。蛋白水平低意味着肝细胞损伤严重。已经确信在翻译后水平控制 apoA-I[28], 且肝脏损伤减少了 apoA-I 从其他同种型的转化[29]。我们的结果表明, 在慢性 HBV 感染中, 2D 凝胶中的 apoA-I 不仅水平发生了变化, 而且整个模式也发生了变化 (图 3)。特别是三种主要的 apoA-I 同种型的表达水平各自独立地发生了变化。这是在 HBV 感染中第一次观察到这种现象。这种不均一的变化反映出不同同种型 apoA-I 具有不同的翻译后控制, 这可能与同种型的具体特征或功能相关。对这些特殊蛋白质同种型中潜在的特殊修饰进行进一步的鉴定能够为 HBV 感染提供有用的诊断信息。出现新的 apoA-I 点的簇也似乎是 HBV 感染特有的, 因为在其他炎症, 例如饮酒过度、肝硬化和其他肝脏损伤中没有揭示类似的观察结果[30] (未公布的结果)。这些新的点可能包含用普通的比浊计测定检测不到的 apoA-I 的不同同种型。这表明在慢性肝炎中观察到的 apoA-I 水平下降只与 apoA-I 三种主要同种型的变化相对应。因此开发对 apoA-I 同种型特异性的单克隆抗体用于 HBV 感染的血清学测定是可能的。这种可能性仍在研究中。

apoA-IV 是由人肠合成的糖蛋白, 在多基因簇中与 apoA-I 密切相关[31, 32]。已经暗示 apoA-IV 对病变和动脉粥样硬化具有保护功能[33-35], 以及具有调节胃功能的生理作用[36, 37]。已经发现在炎症[38]、急性肝炎[39]和肝硬化[40]的情况下 apoA-IV 水平被抑制。目前在 HBV 血清的低分子量区出现的 apoA-IV 点可能是完整蛋白的片段 (~45kDa)。这暗示观察到的 apoA-IV 下降是由炎症过程中发生的蛋白质切割所导致的, 而这是评估 HBV 感染的又一个指示标记。

已经发现公知的负急性期蛋白—甲状腺素运载蛋白在多种急性肝脏疾

病中浓度显著下降[23, 41, 42]。在当前这篇报道中我们证实至少一种甲状腺素运载蛋白同种型在 LNS 和 HNS 血清样品中都表现出一半的表达水平(表 2)，这表明甚至在严重炎症出现以前病毒感染导致的肝功能障碍就已经发生。

5 □1-抗胰蛋白酶作为一种强效的细胞凋亡和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活抑制剂之一能够抑制多种即将死亡的细胞释放的蛋白酶，因此在应激过程例如炎症中能够保护正常组织[43]。在急性和慢性肝炎中都观察到的 α 1-抗胰蛋白酶水平增高[19]可能是肝脏的自我保护反应。另一方面，已经显示 α 1-抗胰蛋白酶活性的缺失与肝脏疾病密切相关[44, 45]。这种 α 1-
10 抗胰蛋白酶缺失可以遗传自一些表型变体中的突变基因[46-48]。在当前这项研究中，我们发现 α 1-抗胰蛋白酶在低分子量区域(~40kDa)增加。考虑到 α 1-抗胰蛋白酶是分子量为 52kDa 的 394 个氨基酸的单链蛋白质，我们相信较低 MW 的蛋白质可能是片段，而不是其他的表型。令人感兴趣的是，这些大的片段分散在两个不同的 pI 区，以完全不同的模式存在，而且在 LNS
15 和 HNS 病例中表现出不同的增高程度，这表明这些大的片段是不同切割途径的产物。对这些肽的进一步鉴定可能揭示潜在的有利于理解 HBV 感染和诊断 HBV 感染的信息。而且在其他的肝脏炎症中没有观察到这种特殊现象，表明这种变化可能是 HBV 感染特有的。

DNA 拓扑异构酶 II 是一种使一条 DNA 双链体通过第二条 DNA 双链体
20 中的一个瞬间缺口而催化拓扑基因组变化的 ATP 依赖性酶[49]。这种酶具有两种分别编码的同种型，topoII α 和 topoII β 。两种形式都是几种广泛使用的可中断酶促 DNA 断裂-再结合，从而导致 DNA 复制过程终止，最终导致细胞死亡的抗癌剂的分子靶[50]。topoII α 的超表达暗示其与包括 HCC[51]，肺癌[52,53]和卵巢癌[54]的几种攻击性肿瘤具有潜在的联系。在
25 人卵巢癌[54]和 K562 细胞[55]中也发现 topoII β 的 mRNA 水平升高。当前在 HBV 血清中发现的 topoII β 片段的大大增高可以反映与 HBV 感染相关的 topoII β 表达的明显增高。虽然这种改变是否代表 HBV 诱导的恶性细胞转化的最初征兆还需要更加详细的研究，但它表明 DNA 代谢过程与 HBV 感染有关。

30 HBV 疾病是一种复杂的状况。已经鉴定了多种血清生物标记，且基于

它们量的变化在临床诊断中已经使用这些标记。然而在诊断和处理慢性 HBV 感染时不同的血清学检测具有不同的限制[4]。这项研究表明 2D-PAGE 电泳能够产生全面的血清学谱，其中 HBV 蛋白生物标记的变化模式不仅表现在量上，而且表现在其性质（或特异性）上。特别是我们已经观察到这

5 些生物标记的不同同种型发生的多种变化，这尤其能够提供信息，且对于评估 HBV 感染特别有用。蛋白质组学分析为 HBV 诊断的常规测量和临床研究环境进展提供了一种特异和合适的选择。将这些基本的血清标记和它们特别的同种型变化结合的全局性检测对 HBV 治疗是有益的，因此能够充分减少在慢性 HBV 感染病人中进行的肝脏活组织检查的数目。

V. 参考文献

在这里引入下列在说明书中以数字形式提及的参考文献作为本发明的背景参考技术，并用于提供技术状态。

- [1] Maynard, J.E., Kane, M.A., Alter, M.J., in: Zuckerman, A.J. (Ed) *Control of hepatitis B by immunization: Global perspective*. 1988, pp. 967-969.
- [2] Chen, C.J., Wang, L.Y., Yu, M.W., *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15(suppl):E3-E6.
- [3] Feitelson, M.A., *Bull. Inst. Pasteur.* 1998, 96, 227-236.
- [4] Chan, H.L.Y., *Hospital. Med.* 2002, 63, 16-19.
- [5] Lai, C.L., Wu, P.C., *Hong Kong Med. J.* 1997, 3, 289-296.
- [6] Lau, G.K.K., *Clin. Liver Dis.* 2001, 5, 361-379.
- [7] Borman, S., *Chem. Engineering News* 2000, 78, 31-37.
- [8] Hunt, D.F., *J. Proteome Res.* 2002, 1, 15-19.
- [9] Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Stulik, J., Koupilova, K., Pleibner, K-P., Otto, A. et al. *Electrophoresis* 1999; 20:2100-2110.
- [10] Hanash SM, Madoz-Gurpide J, Misek DE. Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics. *Leukemia* 2002; 16:478-485.
- [11] Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright JrGL. *Clin Chem* 2001; 47:1901-1911.
- [12] Lau G, Nanji A, Hou J, Fong D, Au W, Yuen S et al. *Viral Hepat* 2002; 9(4):280-287.
- [13] Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N et al. *Hepatology* 1981; 1(4):431-435.

- [14] Urdea M, Horn S, Fultz T, Anderson M, Runnings J, Hamren S et al. *Nucleic Acids Res Symp Ser* 1991; □□:197-200.
- [15] Contiero E, Ferrari R, Vaselli GM, Folin M. *Electrophoresis* 1997; 18(1):122-126.
- [16] Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. *Lancet* 2001; 357:1069-1075.
- [17] Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J et al. *J Viral Hepat* 2002; 9(2):128-133.
- [18] Hiramatsu S, Kojima J, Okada TT, Inai S, Ohmori K. *Acta Hepato-Gastroenterologica* 1976; 23(3):177-182.
- [19] Meliconi R, Parracino O, Facchini A, Morselli-Labate AM, Bortolotti F, Tremolada F et al. *Liver* 1988; 8(2):65-74.
- [20] Borsotti M, De Philippis C, Leoncini F, Mazzotta F, Paci F, Piazza E et al. *Quad Scavo Diag Clin Lab* 1980; 16(4):385-401.
- [21] Pateva R, Koichev K, Vurbanov G, Rusinov E, Danev I. *Vutreshni Bolesti* 1982; 21(2):65-69.
- [22] Henke J, Kellner S, Kasulke D. *Blut* 1978; 36(2):109-110.
- [23] Volchkova EV, Pak SG, Malov VA, Umbetova KT. *Ter Arkh* 2000; 72(11):18-21.
- [24] Nayak SS, Ramani A, Kamath SS, Kundaje GN, Aroor AR. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 40(3):299-304.
- [25] Matsuura T, Koga S, Ibayashi H. *Gastroenterol Jpn* 1988; 23(4):394-400.
- [26] Geiss HC, Ritter MM, Richter WO, Schwandt P, Zachoval R. *Hepatology* 1996; 24(6):1334-1337.
- [27] SelimoGlu MA, AydoGdu S, YaGci RV. *Pediatr Int* 2002; 44(4):400-403.
- [28] Panduro A, Lin-Lee YC, Chan L, Shafritz DA. *Biochemistry* 1990; □□(□□):8430-8435.

- [29] Isobe H, Sakai H, Satoh M, Sakamoto S, Koga S, Nawata H. *Clin Chem Acta* 1990; 189(3):303-311.
- [30] Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF et al. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 220:78-85.
- [31] Tso P, Liu M, Kalogeris TJ, Thomson AB. *Annu Rev Nutr* 2001; 01:231-254.
- [32] Vergnes L, Taniguchi T, Omori K, Zakin MM, Ochoa A. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1000(0):299-310.
- [33] Kalopissis AD, Chambaz J. *Int J Tissue React* 2000; 00(00):67-78.
- [34] Ostos MA, Conconi M, Vergnes L, Baroukh N, Ribalta J, Girona J et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 01(0):1023-1028.
- [35] Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, Emmanuel F, Castro G, Fruchart JC et al. *Science* 1996; 000:966-968.
- [36] Kalogeris TJ, Rodriguez MD, Tso P. *J Nutr* 1997; 100(0):537S-543S.
- [37] Vergnes L, Baroukh N, Lehy T, Moizo L, Bado A, Baralle M et al. *FEBS Lett* 1999; 00(1):178-181.
- [38] Quilliot D, Walters E, Guerci B, Fruchart JC, Duriez P, Drouin P et al. *Metabolism* 2001; 0(0):1019-1024.
- [39] Miyata Y, Koga S, Ibayashi H. *Gastroenterol Jpn* 1986; 01(0):479-485.
- [40] Seishima M, Usui T, Naganawa S, Nishimura M, Moriwaki H, Muto Y et al. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(0):746-751.
- [41] Yasmin MY, Aziz B, Nazim M, Madhavan RK. *Malays J Pathol* 1993; 10(0):147-150.
- [42] Citarella F, Felici A, Brouwer M, Wagstaff J, Fantoni A, Hack CE. *Blood* 1997; 0(0):1501-1507.
- [43] Van Molle W, Denecker G, Rodriguez I, Brouckaert P, Vandenabeele P, Libert C. *J Immunol* 1999; 100(1):5235-5241.

- [44] Durr R, Caselmann WH. *Arch Surg* 2000; 385(3):154-161.
- [45] Theal RM, Scott K. *Am Family Physician* 1996; □□(□):2111-2119.
- [46] Ortiz-Pallardo ME, Zhou H, Fischer HP, Neuhaus T, Sachinidis A, Vetter H et al. *J Mol Med* 2000; □□(□):212-216.
- [47] Novoradovskaya N, Lee J, Yu ZX, Ferrans VJ, Brantly M. *J Clin Invest* 1998; □□(□):2693-2701.
- [48] Tung BY, Kowdley KV. *Gastroenterologist* 1996; □(□):245-261.
- [49] Wang JC. *Annu Rev Biochem* 1996; □□:635-692.
- [50] Caron PR, Wang JC. In: Andoh T, Ikeda H, Oguro M. (Eds) *Molecular Biology of DNA Topoisomerases*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993: 243-263.
- [51] Watanuki A, Ohwada S, Fukusato T, Makita F, Yamada T, Kikuchi A et al. *Anticancer Res* 2002; □□ (□□):1113-1119.
- [52] Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S, Scagliotti GV, van der Valk P, Postmus PE et al. *Lung Cancer* 2001; □□(□):117-128.
- [53] Dingemans AC, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. *Clin Cancer Res* 1999; □(□):2048-2058.
- [54] Withoff S, van der Zee AG, de Jong S, Hollema H, Smit EF, Mulder NH et al. *Br J Cancer* 1999; □□(□□):748-753.
- [55] Zhou R, Wang Y, Gruber A, Larsson R, Castanos-Velez E, Lillemark E. *Med Oncol* 1999; □□(□):191-198.

表 1. 所用的 HBV 感染血清样品概括。NIS 指坏死性炎症分数

病人	年龄	性别	HBeAg	HBV-DNA	ALT	NIS
第1组						
1	41	M	+	5874	46	2
2	24	M	+	4032	21	1
3	22	F	+	10536	24	2
4	22	M	+	6876	52	2
5	44	F	+	6949	16	2
6	25	M	+	7443	36	1
7	34	F	+	6690	17	2
8	42	M	+	5408	45	2
9	50	F	+	5175	19	1
第2组						
10	21	F	+	104	425	8
11	49	F	+	13	706	9
12	29	F	+	16	461	7
13	18	M	+	750	1050	8
14	29	M	+	476	277	9
15	31	F	+	454	307	7
16	54	M	+	4695	190	8
17	36	M	+	1320	200	7
18	49	M	+	471	253	7

表2. HBV感染血清样品中蛋白质变化总结 (N/D: 不可检测的)

蛋白质	区	实验分子量 MW(kDa)/pI	正常 (% vol)	LNS (% vol)	HNS (% vol)
触珠蛋白 α 链 (7个点)	1	37.2/5.0-5.6	3.242 \pm 1.021	3.196 \pm 1.243	0.873 \pm 0.661
触珠蛋白切割的 α 链 (6个点)	1	35.7/5.1-5.8	0.329 \pm 0.185	0.410 \pm 0.262	0.066 \pm 0.072
触珠蛋白 α 2 链 (3个点)	2	19.8/5.3-5.9	1.225 \pm 0.582	1.638 \pm 0.631	0.421 \pm 0.310
Apo A-I (同种型1、2和3)	3	23.8/5.1-5.2	0.136 \pm 0.082	0.416 \pm 0.179	0.359 \pm 0.220
			0.708 \pm 0.189	0.745 \pm 0.256	0.720 \pm 0.358
			2.893 \pm 0.424	1.210 \pm 0.401	1.326 \pm 0.718
Apo A-I 片段 (10个点)	3	22.3/5.0-5.1	0.037 \pm 0.031	1.043 \pm 0.622	0.474 \pm 0.284
	4	15.8/5.0	N/D	0.264 \pm 0.125	0.163 \pm 0.187
Apo A-IV	4	15.7/5.0	N/D	0.552 \pm 0.335	0.403 \pm 0.277

甲状腺素运载蛋白	4	15.9/5.1	0.493 ± 0.198	0.234 ± 0.216	0.237 ± 0.240
□1-抗胰蛋白酶 (正常)		54.4/5.0-5.2	2.935 ± 0.592	2.352 ± 0.825	2.384 ± 1.182
□1-抗胰蛋白酶 (片段或同种型)	5	38.9/4.6-4.7	0.012 ± 0.008	0.524 ± 0.352	0.522 ± 0.484
	6	38.2/5.4	N/D	0.063 ± 0.075	0.170 ± 0.152
	6	38.2/5.6	N/D	0.059 ± 0.041	0.183 ± 0.131
DNA 拓扑异构酶 II α (5个点)	7	21.2/6.6-7.7	0.053 ± 0.027	0.937 ± 0.721	1.106 ± 0.664

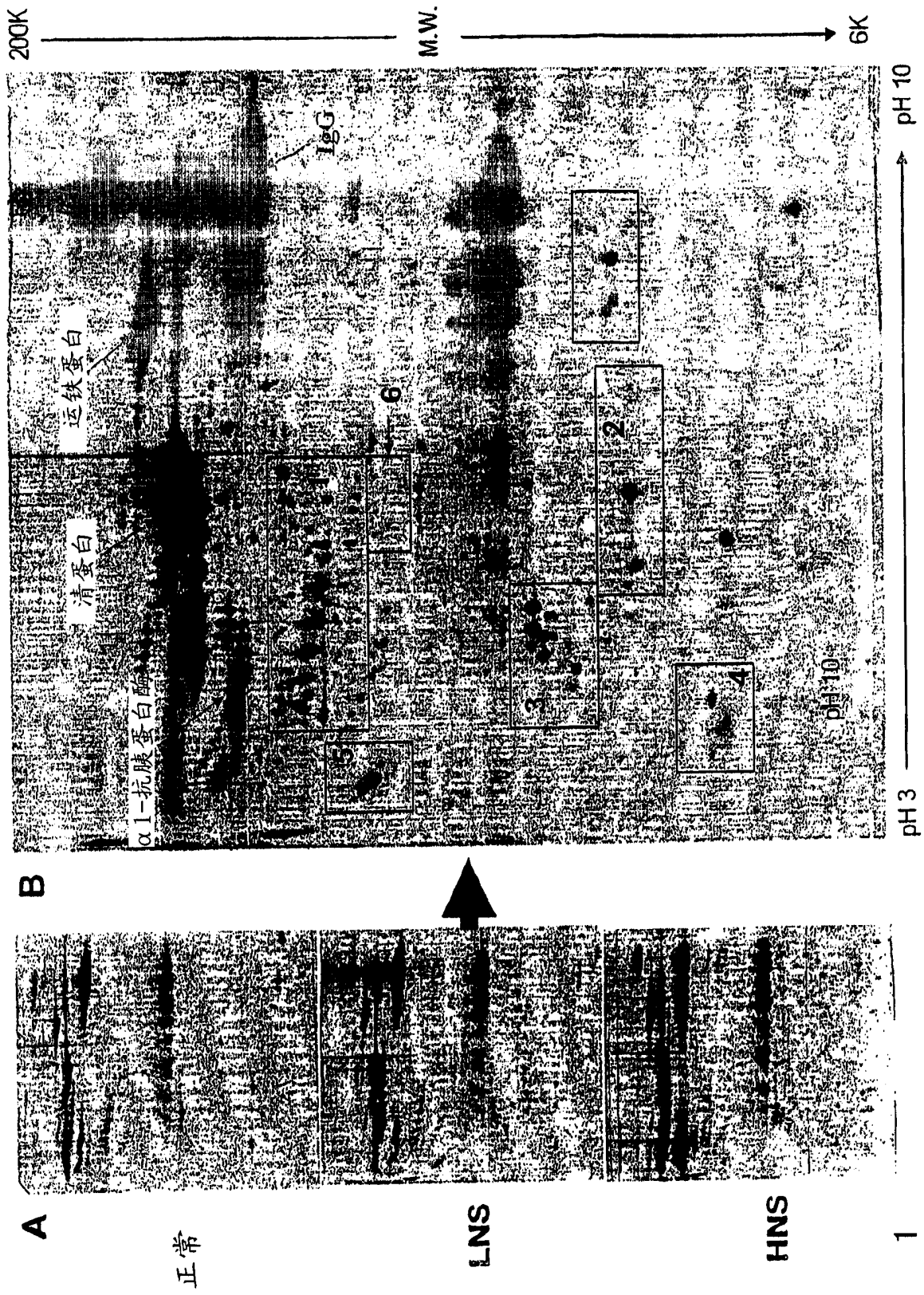


图 1

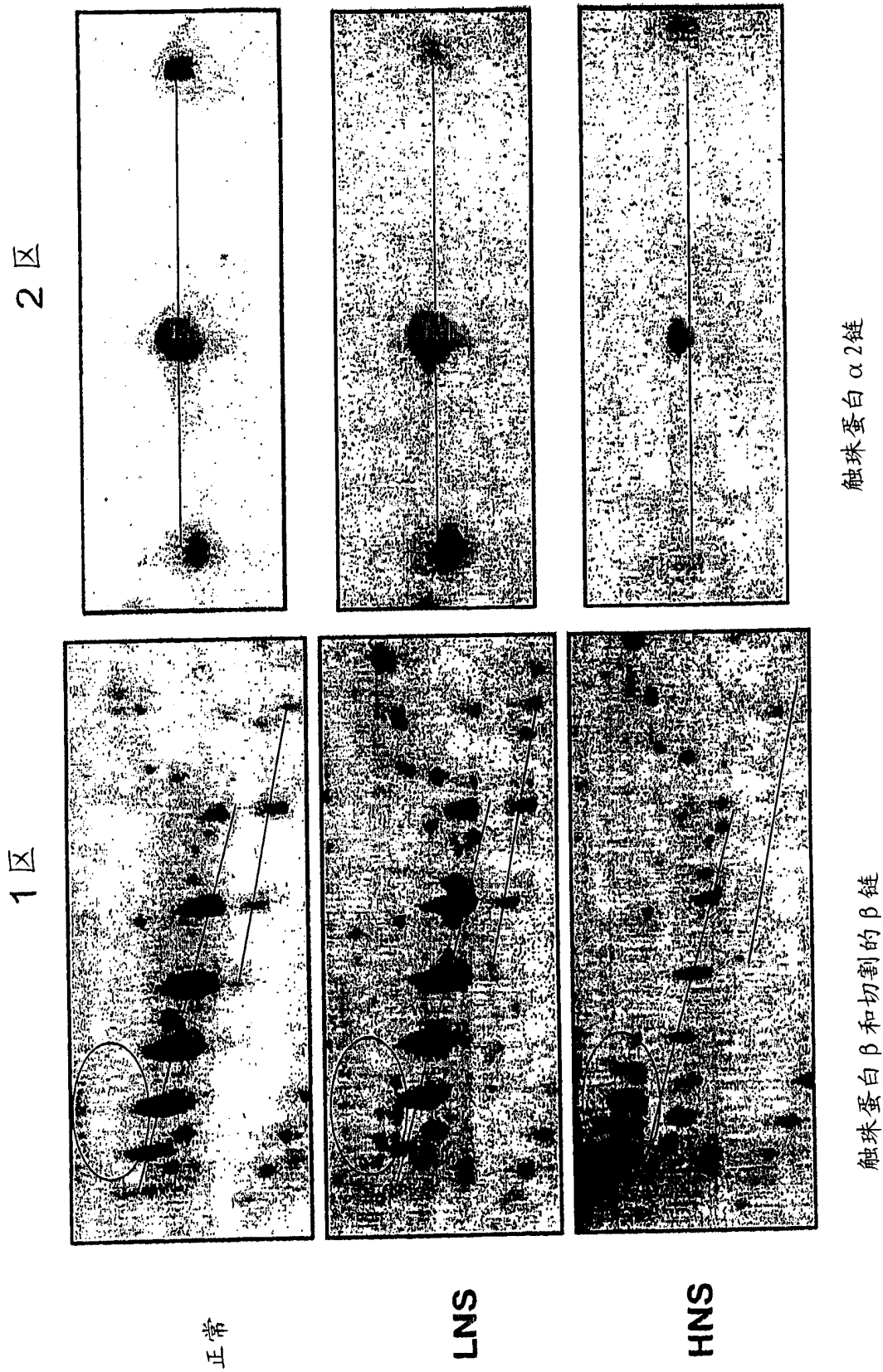


图 2

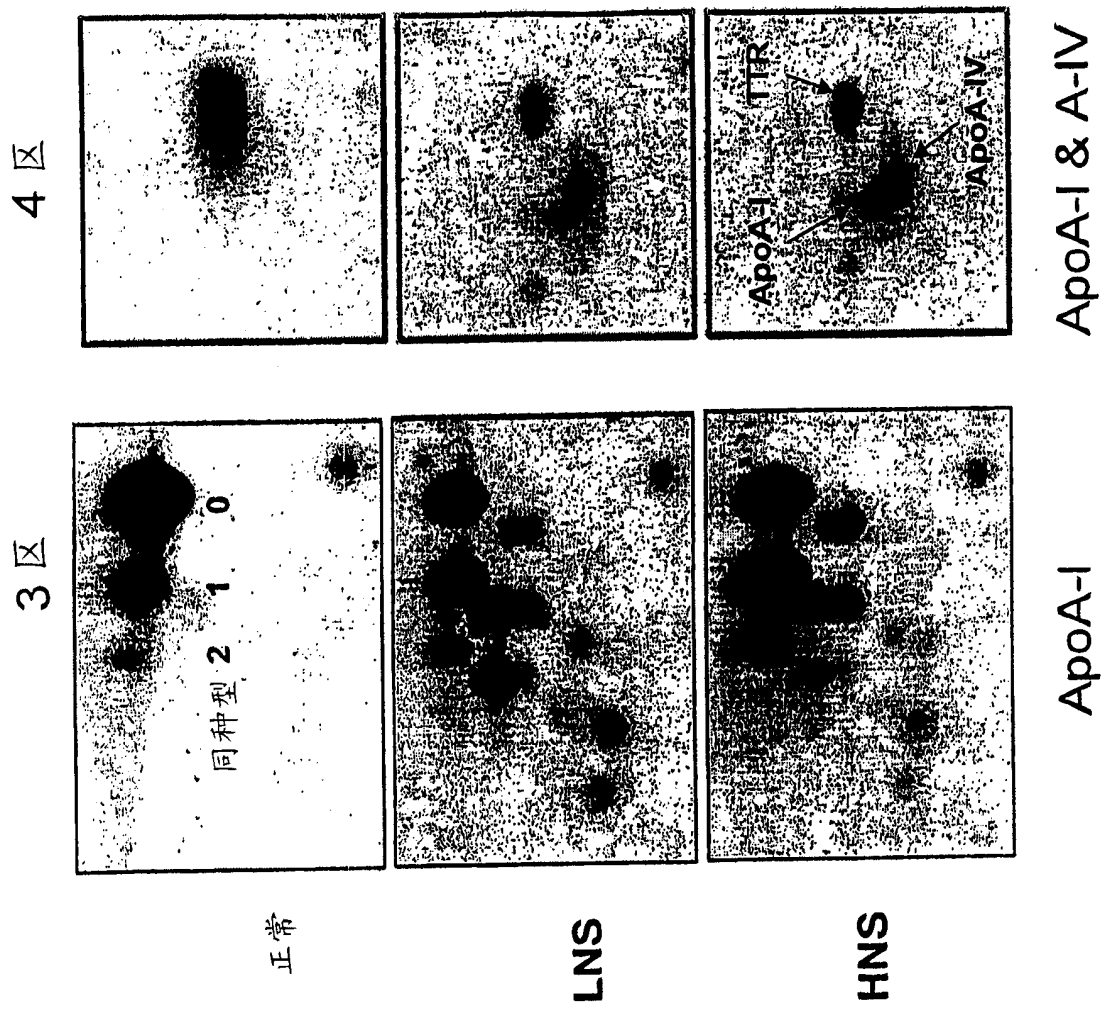
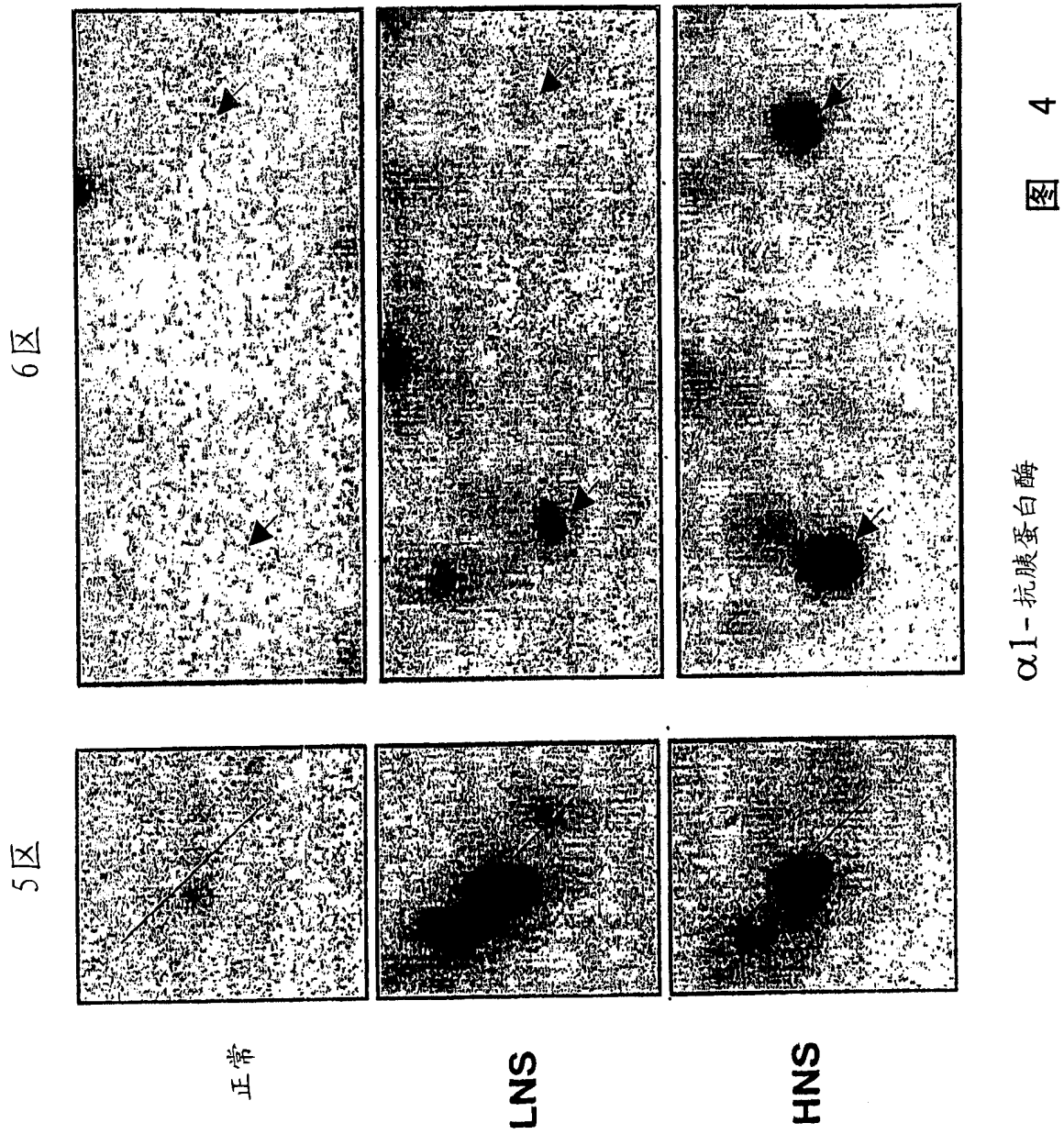
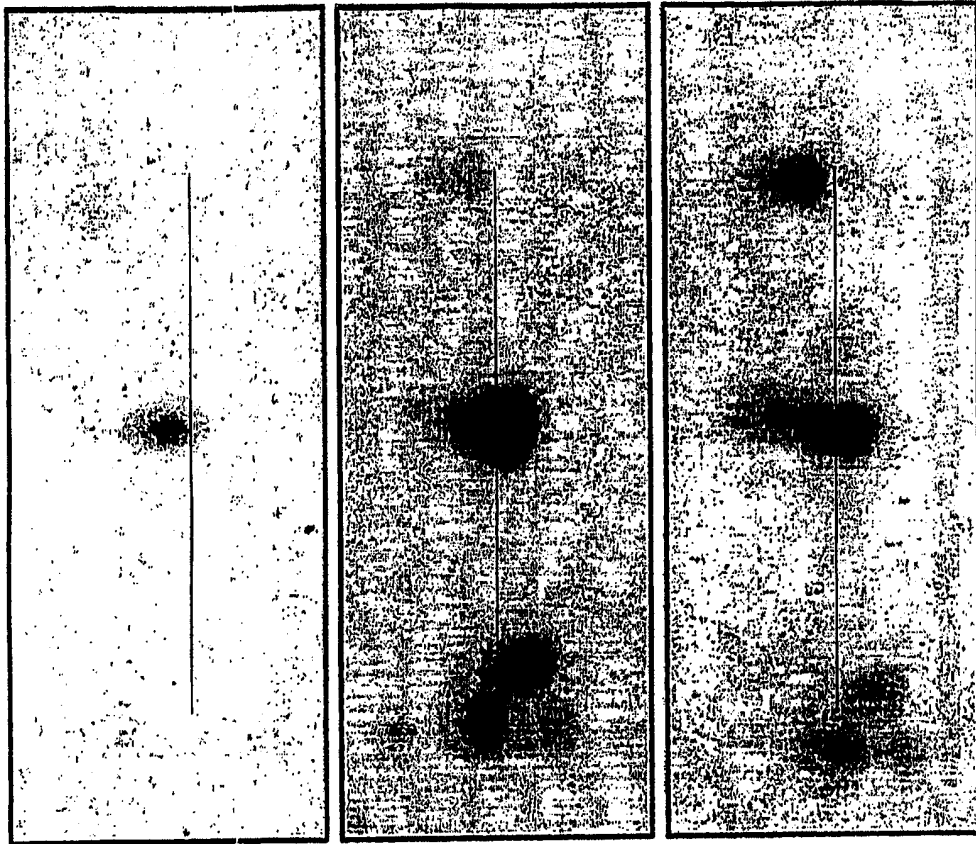


图 3



7区



正常

LNS

HNS

DNA拓扑异构酶 II β

图 5