维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0060-03

DHBV DNA在鸭胰脾组织中原位杂交的研究

彭凤英[1]，郭树华[2]

（1. 重庆医科大学临床学院传染科　重庆　400016；2. 重庆医科大学第二临床学院传染科　重庆　400010）

【摘　要】目的：对慢性DHBV感染鸭的肝、胰、脾组织DHBV DNA作对比研究。方法：采用原位杂交技术。结果：DHBV不仅可以感染鸭肝细胞，且可感染胰、脾组织，DHBV DNA 阳性细胞的分布密度以肝组织最高，胰脾次之。结论：DHBV具有组织器官泛嗜性，但其在肝外组织中的复制似不及在肝细胞中活跃。

【关键词】鸭乙型肝炎病毒；原位杂交；DNA探针；地高辛标记

【中国图书分类法分类号】S858.323；R365.51　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-06-20

Experimental study on DHBV DNA in duck's pancreas and spleen tissues by in situ hybridization

PENG Feng-ying, et al

(Department of Infectious Disease, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

【Abstract】 *Objective*: To study the difference of DHBV DNA in the duck's liver, pancreas and spleen tissue. *Methods*: In situ hybridization using digoxigenin-labeled DHBV DNA C gene probe. *Results*: DHBV DNA was present not only in hepatocytes but also in the pancreatic acini , in cells of splenic red pulp and in the splenic germinal center. The DHBV DNA positive cells appeared more frequently in liver than in spleen and pancreas. *Conclusion*: It suggests that DHBV is also tropic for extrahepatic tissue, but it may replicate more actively in liver than in the extrahepatic tissue.

【Key words】DHBV; In situ hybridization; DNA probe; Digoxigenin-labeled

嗜肝病毒家族由一小组DNA病毒组成，包括HBV、WHV、DHBV、GSHV四个主要成员，对其分子生物学研究发现，它们的基因组组成、病毒复制方式及组织嗜性等方面均有很大程度的相似性，基因组均为部分闭合环状双链DNA，复制过程中均有一个由RNA介导的逆转录过程。由于难以从HBV感染病人中获得典型感染的不同时期病理标本，以及病人的临床表现错综复杂等原因，使直接研究HBV感染的发病机制受到限制。鸭乙型肝炎病毒动物模型则能弥补这些不足。

在本实验中，我们对已于孵出一日龄即感染DHBV造成慢性感染的重庆麻鸭的肝及胰、脾组织进行原位杂交检测，对肝外组织DHBV感染及其致病性作了探讨。旨在为进一步利用鸭乙肝病毒动物模型研究人类HBV肝外感染的意义奠定实验基础。

1　材料和方法

1.1　标本收集

市售孵出一日龄重庆麻鸭一批，人工经腹腔感染DHBV DNA阳性血清后，饲养至2月龄，随机选取30只，杀鸭取肝、胰、脾组织各1cm×1cm ×1cm大小置10%福尔马林液中固定，石蜡包埋，以备原位杂交及病检。另各取2cm ×1cm×1cm大小组织块，于-70℃低温保存以备Southern blot分析。

1.2　实验探针为DHBV3DNA C区探针、地高辛标记，探针长约800bp，有效标记量为5μg/ml（本室自备）。非特异性对照用地高辛标记的PBR322探针（德国Bothringer mannherim产品）。

1.3　肝、胰、脾组织的原位杂交检测(方法略)。杂交过程中以PBR322探针作阴性对照，用经 Southern blot 检测为阳性的肝切片作阳性对照。

1.4　Southern blot　检测鸭肝、胰、脾组织中的 DHBV DNA (方法略)。

2　结　果

2.1　原位杂交检测结果：阳性肝细胞呈小叶弥漫性分布，阳性颗粒在肝细胞中以核型分布为主，偶为

作者介绍：彭凤英（1968-　），女，住院医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞浆包涵体型。阳性细胞与肝组织变性灶无定位关系。DHBV DNA 阳性的肝组织常规病检均有局灶性空泡变性，胰、脾切片中阳性细胞呈散在分布，主要在胰腺腺泡细胞及脾小结、脾红髓细胞中，以胞核型及胞浆包涵体型为主。胰岛细胞未见阳性信号。常规病检，病毒阳性的胰、脾组织未见明显病理改变。

只有肝组织DHBV DNA阳性鸭的胰、脾组织中可见杂交信号，肝组织的阳性细胞率高于胰、脾组织的阳性细胞率。



图1 肝细胞中病毒颗粒以核型为主，阳性肝细胞无空泡变性 （×400）

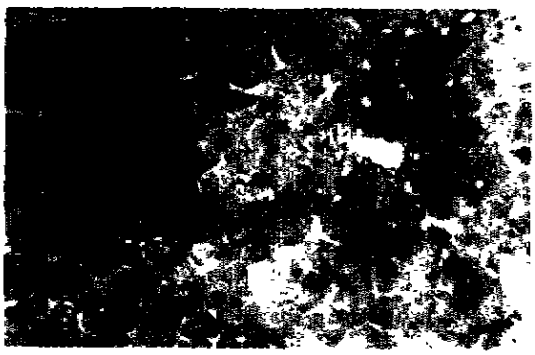


图2 鸭胰腺组织中DHBV DNA阳性细胞散在分布（×100）

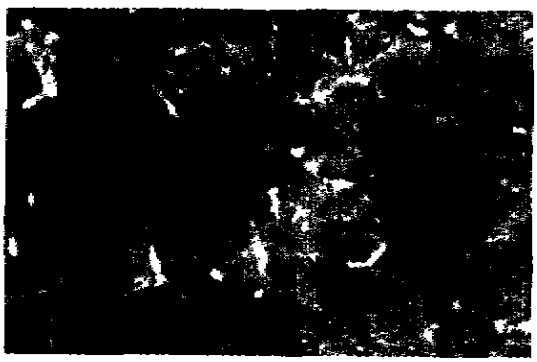


图3 病毒主要分布于胰腺腺泡细胞中，呈胞浆包涵体型及核型，病毒阳性细胞结构正常，组织无病理损害（×250）

2.2 Southern blot 检测鸭肝及胰脾组织中的DHBV DNA，结果发现：肝提取物中存在着3.0-3.5Kb松驰环状及线状双链DNA，且有<2.1Kb以下的单链及部分单链DHBV DNA 存在。而胰、脾组织提取物中仅见3.0～3.5Kb处的双链DNA，未见<2.1Kb以下的单链形式。



图4 脾红髓及脾小结中散在DHBV DNA阳性细胞，病毒以胞核型分布为主，组织无病理损害（×250）

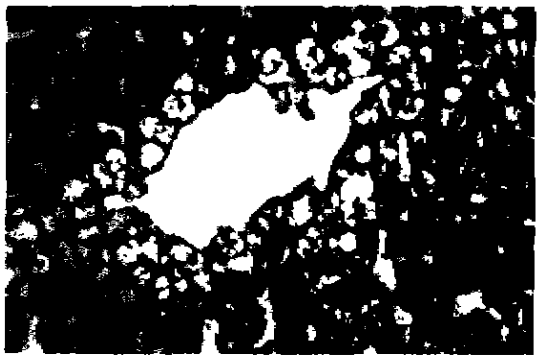


图5 感染DHBV DNA的鸭肝组织病检，可见局灶状空泡变性（H.E ×400）

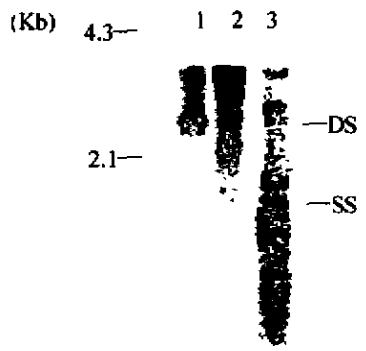


图6 Southern blot analysis of the DNA extracts from duck's liver, spleen and pancreas
Kb: Kilobase pair (λ/Hind]]] DNA marker)
Ds: Doule strand DNA
Ss: Single strand DNA
1: Spleen 2: Pancreas 3: Liver

3 讨 论

过去用Southern blot方法、免疫组化法及电镜

维普资讯 http://www.cqvip.com

法等均在DHBV感染鸭肝细胞、肌管上皮细胞、肾小球上皮细胞、近曲小管上皮细胞、胰腺内、外分泌细胞，胰岛α、β细胞中检出了DHBV[1~5]。本实验用地高辛标记的DHBV C区探针也在感染DHBV的鸭胰腺腺泡细胞，脾红髓及生发中心的单个核细胞中检出了DHBV DNA，证实了DHBV确能感染肝外组织。

郎振为等在对乙肝患者的尸检中发现，HBV感染的肝脏可有急、慢性重症肝炎或肝硬化等严重病损，其相应的心、肾、睾丸、肾上腺、胰等组织虽可检出HBV DNA及HBcAg，但常规病检均无明显的病理改变，我们的实验也得到相似结果，即感染DHBV的鸭肝组织可有轻度空泡变性，其相应的胰、脾组织无任何病损。可能病毒在肝外组织中复制力较弱是造成这一病理损害差异的原因之一。但尚须进一步研究证实。

DHBV病毒单链DNA的存在提示病毒在细胞中活跃复制。Tagawa等在鸭肝、胰、脾组织DNA提取物中均检出了单链DNA，认为三种组织均为DHBV复制场所[1]。而Halpern等在鸭肝、脾组织中检出单链DNA，但胰腺中只检出双链DNA，认为胰脏不是病毒活跃复制场所，而病毒能在肝、脾中复制。本实验用Southern blot检测到肝组织中有DHBV DNA单链存在，而胰、脾组织则未检出该类型，提示肝外组织中DHBV复制可能不及在肝组织中活跃。

在对人类HBV感染的研究中发现，HBV可以存在于人外周血单个核细胞（PBMC）中[6,7]，但HBV在PBMC中的存在是与机体再感染HBV有关或是与产生逃避免疫的突变株有关尚不明确。Tagawa等[1]在鸭腔上囊内（B细胞）未检出DHBV病毒，而在胸腺中（T细胞）则检出大量DHBV DNA，认为DHBV感染单个核细胞可能与抑制机体免疫有关（主要是细胞免疫）。我们在实验中发现脾红髓及生发中心单个核细胞中均可感染DHBV，但由于脾脏淋巴细胞的分布特征至今不明，目前尚无区分淋巴细胞种属的单克隆抗体等条件，故DHBV感染单个核细胞的意义尚待进一步研究。

Halpern等发现，DHBV最早在胰岛细胞中出现，其后在外分泌腺中存在，但病毒的存在量随着鸭龄增大，在胰岛细胞中逐渐减少，而在胰腺腺泡细胞中则逐渐增多。因此本次实验胰岛细胞中未检出DHBV，可能与所用的鸭龄较大有关。

参 考 文 献

[1] Tagawa- M, Omata-M, Yokosuka-O, et al. Early events in duck hepatitis B virus infection[J]. Gastroenterology, 1985; 89: 1224-1229.

[2] Halpern-MS, Egan-J, Mason-WS, et al. Virus antigen in endocrine cells of the pancreatic is lets and adrenal cortex of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus[J]. Virus Res, 1984;1:213-223.

[3] Halpern-MS, Egan-J, McMahon-SB, et al. Duck hepatitis B virus is tropic for exocrine cells of the pancreas[J]. Virology, 1985; 146:157-161.

[4] Mason-WS, Halpern-MS, England-JM, et al. Experiment transmission of duck hepatitis B virus[J]. Virology, 1983;131:375-384.

[5] Chen-LB, Chen-PL, Wang-GL, et al. Ultrastructural study on extrahepatic infection of duck hepatitis B virus in ducks[J]. Chinese Medical Journal, 1992;105(3):212-216.

[6] 江家骥，Brind-A，Brechot-C，等．外周血单个核细胞在乙型肝炎病毒再感染和选择乙型肝炎病毒变异株中的作用[J]．中华肝脏病杂志，1997;5(4):193-196.

[7] 郭亚兵，张继锁，侯金林，等．外周血单个核细胞与血清中HBV DNA及其变异比较[J]．中华传染病杂志，1999;17(1):49-51.