DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.016

原位 PCR技术检测肝中 HBV-DNA的应用

张 娟* 胡大荣 陈国致 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆,400038

提 要 目的:探讨原位 PCR技术在 HBV低水平感染中的意义。方法:用原位 PCR方法检测42例肝炎患者石蜡包埋肝组织的 HBV-DNA并与原位杂交技术检测结果进行比较。结果:原位 PCR检测 HBV-DNA的检出率为50%,明显高于原位杂交法(19%,$P<0.01$),肝组织中 HBV-DNA检出率与临床诊断无关。阳性杂交信号均位于肝细胞浆,呈簇状和弥散状分布。结论:原位 PCR检测肝组织 HBV-DNA具有快速、灵敏、特异的优点,可检出 HBV低水平感染,适用于 HBV-DNA的组织细胞定位研究,部分 HBsAg阴性或抗 HBs阳性患者仍存在 HBV低水平复制,HBV感染是部分 HBVM阴性患者的病因。

关键词 脱氧核糖核酸/分析;原位 PCR;原位杂交;HBV-DNA
中图法分类号 R512.6

原位 PCR(ISPCR)是利用 PCR技术先将 DNA片段扩增,然后用原位杂交细胞化学标记的核酸探针与已扩增的 DNA进行杂交显示和定位,其敏感性达到单拷贝基因信号水平,可检出痕量 DNA,适用于细胞内 HBV基因的定位研究。本研究采用 Kominoth[1]介绍的原位 PCR法,对42例各型病毒性肝炎及 HBsAg携带者的石蜡包埋肝组织进行了 HBV-DNA检测,并与原位杂交(ISH)检测结果比较,以探讨原位 PCR技术在 HBV低水平感染中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 42份石蜡包埋肝标本均取自我科1988年住院患者,诊断标准按1984年南宁会议标准,其中急性肝炎8例,慢性肝炎27例,HBsAg携带者5例,肝硬化、肝癌2例。临床诊断均经病理检查证实。患者男性33例,女性9例,年龄17~62岁。

1.1.2 HBV血清标志(HBVM)检测 采用 ELISA方法检测试剂盒购自华美生物工程公司。

1.1.3 Bio-HBV-DNA分子杂交试剂盒 购自北京医科大学肝病研究所。

1.1.4 用于原位 PCR的引物位于 HBV-DNA S区,其正链引物为5′-CATCTTCTTGTTGGTTCTTCTG,负链引物为5′-TTAGGGTTTAAATGTATACCC,扩增片段413bp,由中国医学科学院上海生物化学研究所合成。

1.1.5 TaqDNA聚合酶、4× dNTP、蛋白酶 K、NP_{40}有10× Buffer等 PCR工作液均购自华美生物工程公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ELISA法检测 HBVM按试剂盒说明书的步骤进行。

1.2.2 原位 PCR及原位杂交检测肝组织中 HBV-DNA

1.2.3 盖玻片处理及组织切片制备 基本参照 Komminoth介绍的方法进行,但对其中个别步骤进行了改进。石蜡包埋肝组织块在普通切片机上切片7μm厚,固定于经多聚 L-赖氨酸处理的盖玻片上,60℃烘2h固定,经二甲苯脱蜡后置乙醇中分级脱水。根据 Eppendorf管内径大小,以肝组织为中心,将盖玻片裁成高约5mm的三角形,置于 Eppendorf管底部。

1.2.4 组织切片 PCR 先取25μg/ml蛋白酶 K溶液消化待扩增组织切片25min,然后用0.1mol/L Tris(pH7.4)漂洗5min 2次,在30μl PCR工作液内(10× Buffer 3μl,引物1 1.5μg,引物2 1.5μg,2.5mmol/L 4× dNTP 2.5μl,5mmol/L $MgCl_2$ 1.5μl,无 RNA酶去离子水20μl及 TaqDNA聚合酶0.5U)将切片94℃变性5min后再按94℃ 50s变性→50℃ 60s退火→72℃ 90s延伸,共循环35次后,用无水乙醇漂洗后固定两次,空气干燥待杂交。

1.2.5 扩增与不扩增肝组织切片的原位杂交 按 Bio-HBV-DNA试剂盒说明书在 Eppendorf管内进行。结果判断呈蓝紫色斑点为阳性。

1.2.6 原位 PCR设下列阴性对照 ①空白切片,仅以 HE染色显示组织形态;②四氯化碳致肝损伤的 Wistar大鼠肝组织切片;③无 Taq酶的 PCR工作液于阳性组织切片上进行扩增。

1.2.7 原位杂交设下列阴性对照 ①~③同原位 PCR阴性对照;④无探针对照。

2 结果

2.1 血清 HBVM检测结果

HBsAg HBeAg及抗-HBc同时阳性5例(A组);HBsAg阳性、单项或多项抗体阳性5例(B组,均为抗-HBe阳性);单纯 HBsAg阳性10例(C组);HBsAg阴性、单项或多项抗体阳性13例(D组),其中抗-HBs及-HBc阳性4例,抗-HBs、抗-HBc及抗-

* 张 娟 女,32岁,主治医师,讲师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HBe阳性 3例,仅抗-HBc阳性 4例,仅抗-HBs阳性 2例); HBVM均阴性 9例(E组)。

2.2 原位 PCR及原位杂交检测肝组织 HBV-DNA结果见表 1

表 1 原位 PCR及原位杂交检测肝组织 HBV-DNA结果

Tab 1 The results of detecting HBV-DNA with the mothods of ISPCR and ISH

Group	n	HBV-DNA positive number (%)	
		ISPCR	ISH
A	5	4(80.0)	2(40.0)
B	5	3(60.0)	3(60.0)
C	10	5(50.0)	0(0.0)
D	13	6(46.1)	2(15.4)
E	9	3(33.3)	1(11.1)
Total	42	21(50.0)	8(19.1)

原位杂交 HBV-DNA阳性者原位 PCR检测均阳性,未见原位杂交结果阳性而原位 PCR检测阴性者。原位 PCR检测阳性率为 50% (21/42),原位杂交阳性率 19.1% (8/42),χ^2= 7.5837, P < 0.01,相差非常显著。原位 PCR检测 HBV-DNA阳性率以 A组最高(为 80%),E组最低(为 33.3%)。34例经原位杂交检测阴性者,经原位 PCR检测 13例(38.2%)阳性。9例 HBVM阴性患者,原位 PCR检测 3例阳性,其中 1例原位杂交检测也阳性。A B C 3组均为 HBsAg阳性共 20例,经原位 PCR检测 12例阳性(60%),原位杂交检测 5例阳性(25%)。D E二组 HBsAg阴性 22例,经原位 PCR检测 9例阳性(40.9%),经原位杂交检测 3例阳性(13.6%)。21例阳性杂交信号均见于肝细胞胞浆,呈族状和弥散状分布,见图 1.有 1例可见 Kupffer's细胞内有阳性杂交信号存在,见图 2 原位 PCR及原位杂交法所示阳性杂交信号的强度与频度差异不明显。各阴性对照均无阳性杂交信号出现。



图 1 21例阳性杂交信号均见于肝细胞胞浆,呈簇状和弥散状分布 (× 1000)

Fig 1 The signs of hybridized HBV-DNA of twenty-one cases were all localized in cytoplasm of hepatocyte, showing diffuse or cluster form. (× 1000)

图 2 肝细胞胞浆和枯否氏细胞内可见 HBV-DNA阳性杂交信号 (× 1000)

Fig 2 The signs of hybridized HBV-DNA were both observed in the cytoplasm of hepatocyte and Kupffer cell (× 1000)

2.3 HBV-DNA检测结果与疾病的关系,见表 2

表 2 HBV-DNA检测结果与疾病的关系

Tab 2 The relationship of the results of HBV DNA and the diseases

	n	HBV-DNA positive number (%)	
		ISPCR	ISH
Acute hepatitis	8	5(62.5)	1(12.5)
Chronic hepatitis	27	12(44.4)	5(18.5)
HBsAg carrier	5	3(60.0)	1(20.0)
Liver cancer and cirrhosis	2	1(50.0)	1(50.0)

42例患者原位 PCR检测 HBV-DNA的检出率组间相近;除肝癌、肝硬化组外,原位杂交检测 HBV-DNA检出率组间也相近,无明显差异。

3 讨论

自 1980年首次有关 PCR的文章发表以来,就有学者试图将该项技术直接用于组织切片的基因定位研究,但限于当时液相 PCR技术尚不成熟,在组织切片上进行 PCR十分困难。Bagasra等[2]在前人研究基础上将 PCR与原位杂交两项技术结合在一起初步建立了原位 PCR法。随后 Komminoth在乙型肝炎病毒、巨细胞病毒等感染组织切片上,对原位 PCR技术进行了详尽的方法学研究,使之更臻完善,为原位 PCR技术的实用化奠定了基础。本研究对其略加改进,利用普通 PCR扩增仪在同一组织切片上,同时进行原位 PCR及原位杂交,检测肝组织 HBV-DNA获得成功。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Komminoth 对肝组织 HBV-DNA的定位研究发现,原位 PCR阳性杂交信号主要见于肝细胞浆,但在 Kupffer's细胞、胆管上皮细胞、内皮细胞及炎性细胞中也有阳性信号分布。国内仅见刘玉兰[3]的研究结果,22例肝癌、肝硬化患者采用原位 PCR方法检测肝组织 HBV-DNA 9例阳性,其中 7例阳性杂交信号见于肝细胞浆,2例见于肝细胞核,呈簇状和弥散状分布。本文研究结果与 Komminoth 和刘玉兰等报告的结果相似,21例各类肝炎患者 HBV-DNA阳性杂交信号均见于肝细胞浆,有 1例还同时见于 Kupffer's细胞,也呈簇状和弥散状分布。

一般认为,HBV 抗体尤其是抗-HBs和抗-HBc转换常预示 HBV 复制结束,但 Blum 及 Liang[4,5]的研究发现,部分抗-HBs和抗-HBe转换患者,HBV 可以在肝细胞内长期隐匿,呈低水平复制状态,HBV 介导的持续免疫损伤是肝炎慢性化的重要原因。提高 HBV 低水平感染诊断水平对于适时采用抗病毒治疗及改善预后具有重要意义[6]。本研究发现 HBsAg阳性、单项或多项抗体阳性的 5例患者 3例原位 PCR及原位杂交阳性;单项 HBsAg 阳性的 10例患者 5例原位 PCR阳性,原位杂交均阴性;HBsAg阴性、单项或多项抗体阳性 13例患者 6例原位 PCR阳性,2例原位杂交阳性;HBVM 均阴性的 9例患者 3例原位 PCR阳性,1例原位杂交阳性;2例抗-HBs单项阳性的患者原位杂交均阴性,但 1例原位 PCR阳性。原位 PCR检测 HBV-DNA 的检出率为 50% (21/42)明显高于原位杂交法(19%,8/42,$P < 0.01$)。研究结果表明,原位 PCR检测肝组织 HBV-DNA具有极为快速、灵敏、特异的优点,其敏感性显著优于原位杂交,可检出部分 HBV 低水平感染,适用于 HBV-DNA的组织细胞定位研究;HBsAg 阴性或抗-HBs阳性患者仍存在 HBV 低水平复制;HBV 感染是部分 HBVM 阴性肝炎患者的病因,与骆抗先等观点一致[7]。

本研究还对原位 PCR及原位杂交法检测 HBV-DNA的检出率与病理诊断的关系作了探讨,将 42例患者按病理诊断分为急性肝炎(8例)、慢性肝炎(27例)、表面抗原携带者(5例)和肝癌、肝硬化(2例)等四组。经原位 PCR及原位杂交法检测 HBV-DNA的阳性率在各组间相近。可见 HBV-DNA的检出率与其病理诊断无明显相关,与 Gayno等[8]的观点一致。

原位 PCR为一项快速、敏感、特异的检测技术,它是阐明病理组织标本靶基因定位及分布的良好方法,尤其对低拷贝基因更为有效,既有利于确诊,又可作为病毒学研究的直观技术,对研究乙型肝炎发病有重要意义。该方法也存在局限性,仍可漏检部分 HBV 低水平感染者,其原因与 HBV 基因突变有关[9]。HBV 复制方式的一个最显著的特点是 mRNA中间体进行逆转录,这一过程由于缺乏校对酶而容易发生错误,从而在 HBV-DNA序列内发生一些突变。因此,本实验仅用 S 区引物,存在因引物与待检病毒序列不完全互补而出现假阴性结果的可能,设计多组引物是提高原位 PCR 方法敏感性的重要途径。

参考文献

1 Long A A, Komminoth P, Lee E, *et al*. Comparison of indirect and direct *in situ* PCR in cell preparations and tissue sections. Histochemistry, 1993, 99(2): 151

2 Bagasra O, Seshamma T, Pomerantz R L. Polymerase chain reaction *in situ*: Intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. J Immunol methods, 1993, 158(1): 131

3 刘玉兰,杜绍财,陶其敏.原位 PCR技术检测石蜡包埋肝组织中 HBV-DNA.中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15(2): 141

4 Blum H E, Galun E, Liang T J, *et al*. Naturally occurring missense mutation in polymerase gene terminating hepatitis to virus replication. J Viral, 1991, 65(4): 1836

5 Liang T J, Blum H E, Wands J R. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without HBV serologic markers. Hepatology, 1990, 12(2): 204

6 Hu K Q, Vierling J M. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. Gastroenterol Clin North Am, 1994, 23(3): 479

7 骆抗先.用聚合酶链反应研究乙型和丙型肝炎病毒感染的前景和问题.中华传染病杂志, 1992, 10(3): 160

8 Gayno S, Marcelling P, Loriot M A, *et al*. Detection of HBV-DNA in serum of chronic B hepatitis before activateness using PCR. Hepatology, 1992, 14(2-3): 357

9 Gerken G, Paterlinl P, Manns M, *et al*. Assay of hepatitis B virus DNA by PCR and its relationship to pre-S and S-encoded viral surface antigens. Hepatology, 1991, 13(1): 158

(收稿: 1997-10-18;修回: 1998-06-21)

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Use of *in situ* PCR in detection of HBV-DNA in hepatic tissue

Zhang Juan, Hu Darong, Cheng Guozhi (Department of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the significance of *in situ* PCR (ISPCR) in detecting low-leveled HBV infection. Methods: ISPCR was used to detect hipatitis B virus DNA (HBV-DNA) in paraffin-embedded liver specimens and the results were compared with those of *in situ* hybridization (ISH). Results: HBV-DNA was positive in 50% (21/42) of the specimens detected with ISPCR, which was significantly higher than that detected with ISH ($P < 0.01$). The hybridized HBV-DNA was distributed in the cytoplasm of the hepatocytes and kupffer's cells in appearance of clusters or diffusion. Conclusion: ISPCR is more sensitive, specific and rapid in detecting HBV-DNA than ISH and it is especially suitable for studying the localization of HBV-DNA in the liver tissue of those patients in whom HBsAg is negative or anti-HBs is positive with low level of DNA replication. These suggest that ISPCR may play an important role in the study of the pathogenesis of HBV infection.

Key words *in situ* PCR; *in situ* hybridization; hepatitis B virus; DNA

磨牙残根的多钉桩核冠修复

Multi-post-nucleus-crown prosthesis in treatment of molar residual root

邓蔓菁* 李红长 陈渝斌 (第三军医大学附属大坪医院口腔科) 重庆, 400042

磨牙残根为外科拔牙适应症。近年来,我院采用多钉桩核冠修复方法,保留患者磨牙残根,取得了较好的疗效。

1 材料和方法

1.1 材料

选择上下颌第一、二磨牙残根,要求髓室底完整,牢固,残根边缘嵴不低于龈缘,根管通畅无明显弯曲,根尖暗影≤ 2 mm,根分叉病变≤ Ⅰ°,共34例。其中上颌第一磨牙5例,下颌第一磨牙21例,下颌第二磨牙8例。

1.08~1.20 mm根管螺纹钉,0.75 mm自攻自断螺纹钉,0.9 mm自制不锈钢钉。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 常规根管治疗,有根分叉病变者行龈下刮治术,调磨残根边缘尖锐脆弱的牙体组织。

1.2.2 固位钉的植入 固位钉的数目为充填根管数。本组上颌磨牙为3~4钉,下颌磨牙2~4钉。钉的直径应与根管粗细相适应,可适当扩大根管上半部份。根管螺纹钉上头呈方形或扁形。若无合适的固位钉,可选择粗细适应的不锈钢丝进行调磨,并形成凹凸不平的表面。钉深入牙根根长1/2~2/3,钉在根上高度低于拟恢复牙冠高度1 mm。钉应顺应牙根的方向,同时相互间形成一定的交角。调拌稀稠适度的磷酸锌粘固粉,将固位钉旋转粘入根管内。

1.2.3 桩核的制备 根据口内余牙大小选择较同名牙小1~2号与残根边缘匹配的带环成形牙冠。充填汞合金时,桩与桩间应严密充填,使合金与桩钉紧密结合。汞合金高度以覆盖桩顶端1 mm并较 面低1~1.5 mm为宜。颈部与残根边缘吻合。成形约10 min去除带环,即时修整外形,消除倒凹、悬突。

1.2.4 全冠保护 于桩核修复次日行全冠修复。

2 结果

34例患牙经6月至2年随访,2例因咀嚼硬物意外折断,冠桩分离,1例根折。其余自觉咀嚼功能良好,桩核冠无松动。

3 讨论

严格的病例选择是残根桩核冠修复成功的基础。残根桩核固位力的获得是成功的关键。而固位力的获得依靠两方面[1,2]。一是桩与根管间的固位力;一是桩与修复材料间的固位力。前者可充分利用牙根的长度,并力求桩与根管内壁的吻合。而修复材料与桩的固位则有赖于二者的紧密结合。多桩方向的不一致性以及桩体上部外形特殊性亦对充填体产生一定的约束力。修复体与对颌牙间良好的咬合关系是残根桩核冠维持长久疗效的必要保证。

关键词 残根;固位钉;桩核;全冠修复

中图法分类号 R781.4

参考文献

1 朱希涛主编.口腔修复学.第2版.北京:人民卫生出版社,1992.121~124

2 魏 敏.后牙残冠残根的桩冠修复.口腔医学,1997,17(1):38

(收稿:1998-04-16;修回:1998-09-04)

(编辑 冯崇英)

* 邓蔓菁,女,28岁,住院医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net