DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.028

expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type Ⅱ pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. J Cell Sci, 1994, 107(2): 443

5 Mason R J, Walker S R, Shields B A *et al*. Identification of rat alveolar type Ⅱ epithelial cells with a tannic acid and polychrome stain. Am Rev Respir Dis, 1985, 131(5): 786

6 Cott G R. Stimulation of net active ion transport across alveolar type Ⅱ cell monolayers. Am J Physiol, 1986, 250(2): C222

7 丁自强.肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离培养及其应用.生理科学进展, 1990, 21(1): 45

(收稿: 1996-11-15;修回: 1997-05-25)

(编辑 汪勤俭)

DHBV的检测及雏鸭感染试验的探讨

A study on the identification of DHBV and duckling infection test

熊鸿燕* 张 凌 李 莉 孙华明 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室)重庆, 400038

提 要 目的: 建立特异、敏感、方便的鸭乙肝病毒(DHBV)检测方法。方法: 通过免疫电镜、PCR组织原位杂交及ELISA等技术观察病毒的颗粒形态及表面抗原与DNA的活性,并通过静脉途径感染一日龄麻鸭,了解动物感染实验的规律。结果: 透射电镜下,DHBV约为40 nm大小的圆形颗粒,其包膜完整、清晰,有的颗粒还见明显的多刺状核壳体;所选用的引物,能使DHBV阳性样本的DNA扩增产物电泳区有一232 bp的条带出现;光镜下DHBV阳性肝组织的原位杂交片中多处呈现明显的阳性显色区,区域内主要为肝细胞结果;DHBV的感染性越高,雏鸭被感染的比例就高,且指标转阳的时间越短;感染潜伏期约为7~21 d。结论: 研究所涉及的4种检测方法均有特异、敏感的特点。

鸭乙肝病毒(DHBV)是目前较好的替代HBV的试验病毒[1,2]。用同位素渗入法测定DHBV-DNA多聚酶(DNA-P)活性是国内外研究报道中常用的检测DHBV活性的方法,简便、快速,但缺乏特异性,结果的稳定性也较差。为建立特异、敏感、方便的DHBV检测方法,探索重庆麻鸭作为感染试验动物的可行性,本研究通过免疫电镜、PCR组织原位杂交及ELISA等技术观察了DHBV的颗粒形态及DHBsAg与DNA的活性,并初步探讨了DHBV阳性血浆对一日龄麻鸭的静脉感染方法。

1 材料和方法

1.1 DHBV阳性血浆的准备

从农贸市场分别收集新鲜重庆麻鸭血,枸橼酸钠抗凝,离心取上层血浆,分别用ELISA法测DHBsAg,用^{3}H-dTTP渗入法[3]测DNA-P,将DHBsAg强阳性,且DNA-P在500~700 cpm的血浆作为试验阳性血浆,将DHBsAg阴性,DNA-P在200 cpm以下的血浆作为阴性血浆。分别在-70℃保存,同时在5%甲醛液中保存相应的鸭肝组织。

1.2 DHBV的检测

1.2.1 透射电镜观察DHBV的形态 将10倍稀释的兔抗DHBsAg血清(军事医学科学院5所提供)0.1 ml与等体积待观察的鸭血浆样品混合,37℃水浴1 h,取1滴混合液,按负染色法制备样品,2%磷钨酸染色,用日本JEM-200EM电子显微镜观察。

1.2.2 ELISA测DHBsAg 按常规方法进行ELISA试验。鼠抗DHBsAg和HRP-羊抗兔血清由军事医学科学院5所提供。用酶标仪在490 nm波长处测定(OD)值。

1.2.3 PCR测定DHBV-DNA 按常规PCR方法[4]提取样本DNA反应模板,进行PCR扩增反应并电泳观察扩增产物。以含完整DHBV-DNA重组质粒的DNA样本为阳性对照,人血浆为阴性对照。PCR引物由军事医学科学院5所张文福博士提供。正向引物使于DHBV-DNA X/C区、基因图谱位置2657 bp,反向引物使于该区的2889 bp。PCR所用试剂购自华美生物试剂公司。

* 熊鸿燕,女,35岁,讲师,博士

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

1.2.4 原位杂交测定肝组织中 DHBV　按常规法扩增含完整 DHBV-DNA的重组质粒并提取 DNA(Jm103大肠杆菌由军事医学科学院 5所米志宝博士提供)。加内切酶 EcorV,切下 X/C区,位于 2650~ 3000 bp,约 350 bp的 DHBV-DNA片断,低溶点法收集目标 DNA并用地高辛标记作为探针。

将外周血 DHBsAg和 DHBV-DNA为阳性的鸭肝组织按常规方法[5]制片并进行杂交和免疫组化反应。光镜下控制显色强度,乙醇脱水,二甲苯透明封片。同时,试验还设外周血 DHBsAg和 DHBV-DNA均为阴性的鸭肝组织样本及不加探针的实验阴性对照。

1.3 雏鸭感染试验

将 1日龄重庆麻鸭(重庆白市驿养鸭场提供)70只进行编号,分别取颈静脉血 0.5 ml作 DHBsAg(ELISA)测定,阴性血浆进一步作 DHBV-DNA(PCR)测定。将无 DHBV感染的雏鸭随机分成 4组。其中,第 1组以 100μl/只静脉注入 DHBV阳性血浆;第 2至第 4组分别以 100μl/只静脉注入经 7170 J/m^2 UVC照射后用再用碘复合物(IC)处理不同时间的 DHBV阳性血浆。

在染毒后的第 7、14、21天连续 3次采血进行 DHBsAg测定,阴性样品进一步作 DHBV-DNA测定。

2 结果

2.1 DHBV的形态观察

从图 1可见,透射电镜下,DHBV约为 40 nm大小圆形颗粒,其包膜完整、清晰,有的颗粒还见明显的多刺状核壳体。

2.2 血浆样品的 PCR检测

本课题所选用的引物,能使 DHBV阳性样本的 DNA扩增产物电泳区有一 232 bp的条带出现,见图 2

2.3 鸭肝组织的原位杂交检测

试验中,鸭肝组织原位杂交结果显示,光镜下 DHBV阳性肝组织的原位杂交片中,见图 3A,多处呈现明显的阳性显色区,区域内主要为肝细胞结构。而阴性样本的肝组织的原位杂交图片,见图 3B,未见肝组织中有阳性显色区。

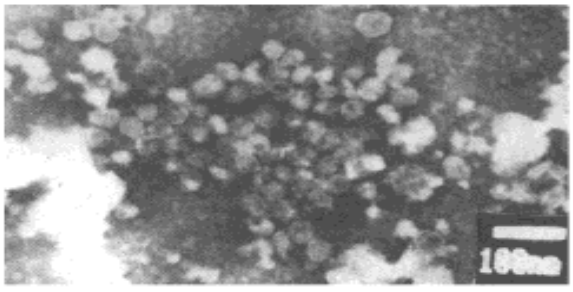


图 1 鸭血浆中 DHBV的形态观察 (TEM× 50 000)

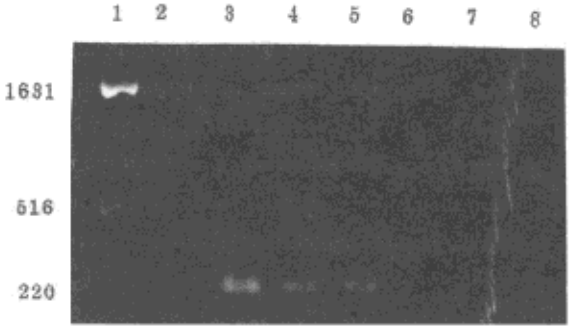


图 2 DHBV血浆样本的 PCR检测
1 DNA分子标准　2 DHBV阴性对照
3 DHBV阳性对照　4~ 8 鸭血浆样本

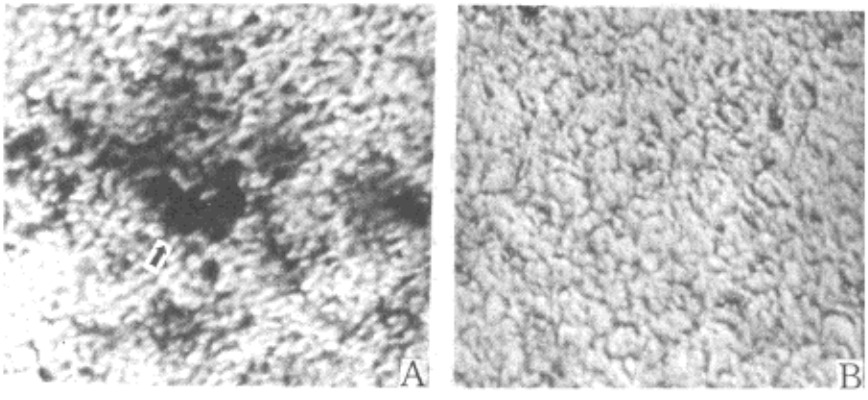


图 3 鸭肝组织的原位杂交图 (LM× 200)
A. DHBV阳性肝组织　B. DHBV阴性肝组织

2.4 雏鸭感染试验

动物感染试验的结果显示,见表 1,DHBV的感染性越高,雏鸭感染的比例就高,且指标转阳的时间越短;感染潜伏期约为 7~ 21 d

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

表1 DHBV阳性血浆对雏鸭的感染结果

试验分组	试验动物数(只)	不同天数标志物阳转雏鸭数(只)				感染总数(只)
		0	7	14	21	
Ⅰ	15	0	9	6	0	15
Ⅱ	10	0	0	4	1	5
Ⅲ	13	0	0	2	0	2
Ⅳ	10	0	0	0	0	0

Ⅰ:注入DHBV阳性血浆;Ⅱ:注入UVC+IC(30 min)处理血浆;Ⅲ:注入UVC+IC(90 min)处理血浆;Ⅳ:注入UVC+IC(120 min)处理血浆

3 讨论

本研究所涉及的4种检测方法均有特异、敏感的特点。其中,电镜观察直观,ELISA法结果稳定,PCR和原位杂交测定能直接反应病毒DNA的活性和分布情况。这些测定结果的相互证实和补充将明显提高DHBV检测结果的质量。但这些测定方法的结果代表DHBV感染活性的程度如何?还不得而知,有待深入探讨。

我们对重庆麻鸭DHBV感染的初步观察发现,无论成年鸭或雏鸭,其自然感染率均约为20%左右,这首先为DHBV的收集和动物试验时雏鸭选择的可能和经济性提供了保证。本研究结果进一步显示,一定感染强度的DHBV阳性血浆经静脉感染一日龄雏鸭后,试验动物被感染的周期短,感染率高,感染率与DHBV活性有量效反应关系。由此说明,重庆麻鸭有较高的投入DHBV感染试验应用研究的价值。同时,我们也认识到,鸭感染试验的动物模型基础理论,诸如动物品系的钝化、感染途径、感染后病毒转归及影响因素等方面的研究还有待加强。

关键词 DHBV 感染;检测
中图法分类号 Q55

参考文献

1 Mason W S, Seal G, Summers J. Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J Virolog, 1980, DEC: 829
2 Shead A, Vickery K, Pajkos A *et al*. Effects of phyllanthus plant extracts on duck hepatitis B virus *in vivo* and *in vitro*. Antiviral Research, 1992, 18: 127
3 Milborrow H M, Burnett L, Lowe S B *et al*. Rapid method for the concentration of hepatitis B virus particles using Beckman airfuge. J Clin Pathol, 1986, 39: 808
4 金冬雁,黎孟枫译.分子克隆试验指南.第2版.北京:科学技术出版社,1992. 672~683
5 苏慧慈.原位杂交.北京:科学技术出版社,1994. 115~158

(收稿:1997-03-04;修回:1997-10-21)
(编辑 王 红)

肺癌患者高粘血征的观察

Observation on the hyperviscosity syndrome in lung cancer patients

关华军* 张楚毅 陈维中 李启明 (第三军医大学附属新桥医院肿瘤中心)重庆,400037

提 要 目的:探讨肺癌患者高粘血征的影响因素。方法:检测43例肺癌患者血液流变学、凝血酶时间(TT),凝血酶原时间(PT),白陶土部份凝血活酶时间(KPTT),血小板最大聚集率(PAgT)及D-二聚体(D-D)。结果:43例肺癌患者中33例全血粘度增高,D-D增高者33例,TT、PT、KPTT异常者分别是18例、15例、22例。结论:引起肺癌高粘血征的主要因素是红细胞聚集指数(RAI)以及硬度指数(TK)明显增高。血浆D-D水平与疗效及预后有关。

恶性肿瘤患者的血栓发生率为5%~15%。支气管肺癌的血栓发生率为26.8%[1]。血栓形成与血液粘度、凝血功能、纤溶状态及血小板功能等多种因素密切相关。本文就43例肺癌患者血液流变学、凝血酶时间(TT),凝血酶原时间(PT),白陶土部份凝血活酶时间(KPTT),血小板最大聚集率(PAgT)及D-二聚(D-D)的测定结果分析,以探索肺癌血栓形成的各种因素。

* 关华军,女,45岁,副主任医师,大专

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