DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.06.012

分子杂交技术对外周血单个核细胞及肝细胞内HBV-DNA的初步研究

崔晓红 李梦东 顾长海 （第三军医大学西南医院 传染病科） 630038

提 要 本文分别用转移印迹杂交和斑点杂交检测61例乙肝患者外周血单个核细胞(PBMC)及血清中的HBV-DNA，同时用转移印迹杂交和原位杂交检测其中31例患者肝活检组织中的HBV-DNA。结果发现血清、PBMC及肝组织HBV-DNA阳性率分别为26.2%（16/61）、24.6%（15/61）及48.4%（15/31）。同一个体内，血清、PBMC及肝组织内HBV-DNA之间无明确的关联，血清HBV-DNA阴性时，仍可在11例患者的PBMC或肝内检出HBV-DNA。结果表明，PBMC可能也是独立于肝外的HBV贮存及复制的场所。血清HBV-DNA阴性不能否定体内仍有HBV复制的可能。

关键词 单核细胞；脱氧核糖核酸病毒；乙型肝炎病毒；分子杂交

近年来的研究证实HBV不仅侵犯人体肝组织，而且广泛存在于胰、肾、皮肤等肝外组织[1][2]。一些作者也曾在淋巴细胞及其亚群中检测到游离或整合形式的HBV-DNA，并推测HBV可能会干扰淋巴细胞功能[3-5]。本文观察了乙型肝炎患者的PBMC、血清及肝细胞中HBV-DNA的状况及血清HBV标志，旨在探讨这些指标之间的相互联系，为阐明乙肝的发病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 检测对象

61例乙肝患者中，男45例，女16例，平均年龄33.2岁。按1984年南宁会议修订的病毒性肝炎诊断标准[6]，本组共急性肝炎23例，HBsAg携带者6例，慢迁肝13例，慢活肝11例，慢活肝重型8例。35例经肝活检病理诊断证实。28例健康献血员作为对照，男17例，女11例，平均年龄29.3岁。

1.2 主要试剂

1.2.1 蛋白酶K、RNA酶A、限制性核酸内切酶EcoRI由华美生物工程公司供应。

1.2.2 生物素化HBV-DNA探针由华西医科大学肝炎研究室制备。

1.2.3 a-^{32}P-dATP及dCTP由北京福瑞诊断用品联营公司供应。

1.2.4 缺口转移药盒系美国BRL公司生产。NBT系统DNA检测药盒为美国BRL公司生产。

1.3 方法

1.3.1 PBMC的分离：外周静脉抗凝血经淋巴细胞分离液密度梯度离心，分离出PBMC。用0.14mol/L NaCl洗4次。将PBMC及最后1次洗液上清于-20℃贮存，待测HBV-DNA。

1.3.2 转移印迹杂交：抽提PBMC及肝活检组织的DNA，部分DNA标本用EcoRI做完全酶切，经1%琼脂糖凝胶电泳，将DNA转移至微孔滤膜上[7]，按缺口转移法用a^{32}P-dATP及dCTP标记纯化的HBV-DNA和PBR$_{322}$ DNA，探针比放为2～5×10^8 dPM/μg，灵敏度达1 pg检测低限。然后，进行预杂交、杂交、漂洗及放射自显影。

1.3.3 斑点杂交：按文献[8]中的方法用a-^{32}P-HBV-DNA探针检测血清及PBMC最后1次洗液中有无HBV-DNA。

1.3.4 肝细胞内HBV-DNA原位杂交：根据文献[9]中的方法，肝活检组织石蜡切片经常规脱蜡水化及蛋白酶K作用后，用生物素化HBV-DNA探针杂交，然后以NBT检测系统进行显色。

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

1.3.5 血清HBV标志物的检测：用 RIA 法测 HBsAg、HBeAg、抗-HBs 及抗-HBe，ELISA法测抗-HBc。

2 结 果

2.1 HBV血清标志物

28例献血员血清中HBV标志物均阴性。61例乙肝患者中，20例HBsAg、HBeAg同时阳性（$HBsAg^+$ $HBeAg^+$），29例$HBsAg^+$ $HBeAg^-$（20例抗-HBe^+，9例抗-HBe^-），12例$HBsAg^-$ $HBeAg^-$（4例抗-HBs^+，5例抗-HBe^+，3例抗-HBs^+抗-HBe^+），所有患者抗-HBc均阳性。

2.2 HBV-DNA的检测

28例献血员血清及PBMC中HBV-DNA均阴性。乙肝患者中，血清、PBMC及肝内HBV-DNA的检出率分别为26.2%（16/61），24.6%（15/61）及48.4%（15/31）。

15例PBMC内HBV-DNA阳性者，经转移印迹杂交分析，11例为游离非复制型，杂交信号为3.2kb区带不伴有拖带，4例为游离复制型，杂交信号为0.6～3.2kb拖带，并在不同区域内有加强，EcoRI酶切前后结果相同。

31例患者的肝组织16例用转移印迹杂交检测HBV-DNA，6例阳性者中5例为游离复制型，杂交信号与PBMC内的复制型相同，1例为13kb区带，因标本量不够而未进行酶切分析。29例患者的肝组织切片用原位杂交检测HBV-DNA，13例阳性，HBV DNA颗粒以胞浆存在为主，阳性细胞多呈局灶性分布，病变及正常肝细胞内均可见到HBV-DNA颗粒。

2.3 血清、PBMC及肝内HBV-DNA与血清HBV标志的关系

2.3.1 血清$HBsAg^+$ $HBeAg^+$组中，血清HBV-DNA的检出率显著高于$HBsAg^+$ $HBeAg^-$和$HBsAg^-$ $HBeAg^-$组。在这3组中，PBMC或肝内HBV-DNA的检出率无明显差别（附表）。

附表 血清HBV标志物与血清、PBMC及肝内HBV-DNA的关系

Tab. The relationship between HBV-M and HBV-DNA positivs rates in sera, PBMCS and hepatocytes

Serological HBV Markers	Serum HBV-DNA No. positive/No. tested(%)	PBMC HBV-DNA No. positive/No. tested(%)	Liver HBV-DNA No. positive/No. tested (%)
$HBsAg^+HBeAg^+$	11/20(55.0)[a]	5/20(25.0)	4/12(33.3)
$HBsAg^+HBeAg^-$	5/29(17.2)[b]	8/29(27.6)	10/16(62.5)
$HBsAg^-HBeAg^-$	0/12(0)[c]	2/12(16.7)	1/ 3(33.3)

a:b $\chi^2 = 9.05$, $P<0.05$　　a:c $\chi^2 = 7.76$, $P<0.01$

2.3.2 对31例患者同一个体内血清、PBMC和肝组织内HBV-DNA检测结果表明，PBMC与血清共同阳性或肝组织与血清共同阳性者各4例。血清阴性而PBMC或肝组织HBV-DNA阳性者各11例。PBMC及肝组织 HBV-DNA 共同阳性者4例，共同阴性者14例，分别呈阳性者13例。从上述结果来看，血清、PBMC及肝组织内HBV DNA之间似无明确关系。

2.4 方法学特异性检验

21例经转移印迹杂交呈HBV-DNA阳性的肝组织，与α-^{32}P-PBR322探针做转移印迹杂交，结果均阴

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

性。所有PBMC最后1次洗液用斑点杂交结果亦均阴性。表明转移印迹杂交HBV-DNA阳性结果不存在PBR322同源序列和血清污染所致的假阳性。原位杂交均没有阴性、阳性对照组织细胞切片及白导蛋白对照。

3 讨 论

本文应用转移印迹杂交技术在61例患者的PBMC中检测出HBV-DNA者15例，并观察到HBV-DNA有两种存在状态，即游离复制型和游离非复制型。非复制型为3.2kb的游离单体，复制型的杂交信号为0.6～3.2kb拖带，且在不同区域内有加强，反映出病毒复制过程中存在不等长度的复制中间体，且核酸片段在某些长度处有选择性停顿。对31例患者在同一个体检测PBMC和肝内HBV-DNA的结果表明，两者无明确的关联。以上资料提示，PBMC可能独立于肝脏外既可作为HBV的贮存场所，也可作为其复制场所。

本文结果表明，血清HBV-DNA随HBsAg、HBeAg的阴转；抗-HBs及抗-HBe的出现而明显减少或消失，但PBMC内或肝内HBV-DNA的阳性率却无明显改变。血清HBV-DNA阴性时，仍有部分患者的PBMC或肝内存在HBV的复制。有文献发现非甲非乙肝炎患者的淋巴细胞可经注射途径造成黑猩猩非甲非乙肝炎的传播，并推论含有HBV的淋巴细胞也可能传播乙型肝炎[10]。因此，血清HBV-DNA阴性并不能否定体内仍有HBV复制，也不是传染性消失的指标。HBV侵入人体后，机体免疫功能有可能清除血清中的HBV，但组织细胞内的HBV有可能不被清除，并作为复制的模板而继续保留，以后有可能再次激活成为复制型。进一步深入探讨HBV在PBMC内存在的状态，对阐明HBV入侵后的发病机理、传播机理及免疫学机理可能具有重要意义。

（本研究得到华西医科大学阎思亮、赵连三、王锦蓉医师及河南医科所朱金凤医师等的热情帮助，谨致谢忱）

参 考 文 献

1. Davison F, Alxander GJM. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes of chronic HBsAg carriers. J Hepatol 1987; 4 (1):37
2. Dejean A, Lugassy C, Zafrani S, et al. Detection of HBV-DNA in pancreas, kidney and skin of two human carriers of the virus. J Gen Virol 1984; 65 (4):651
3. Gu JR, Chen YC, Jiang HQ, et al. State of hepatitis B virus DNA in leucocytes of hepatitis B patients. J Med Virol 1985; 17 (1):73
4. Shen HD, Choo KB, Lee SD, et al. Hepatitis B virus DNA in leucocytes of patients with hepatitis B virus associated liver disease. J Med Virol 1986; 18(2):201
5. Yoff B, Noonan CA, Melnick JL, et al. Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA. J Infect Dis 1986; 153 (3):471
6. 病毒性肝炎防治方案。中华内科杂志 1985; 24 (增刊):52
7. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98 (4):507
8. 陈渊卿 顾建人 蒋惠秋，等。斑点杂交试验直接检测血清中HBV-DNA。中华传染病杂志 1983; 1 (2):63
9. Negro F, Berninger M, Chiaberge E, et al. Detection of HBV-DNA by in situ hybridization used a biotin-labeled probe. J Med Virol 1985; 15 (4):373
10. Hellings JA. Non-A, non-B hepatitis: An update. Vox Sang 1986; 51(suppl 1):63 :63

（收稿：1990-07-03；修回：1991-09-25）

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

Investigation of HBV-DNA in peripheral blood mononuclear cells and hepatocytes with molecular hybridization

Cui Xiaohong, Li Mengdong, Gu Changhai (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The existence of HBV-DNA in the mononuclear cells of peripheral blood and in the serum of 61 patients with HBV infection was determined with southern blot and dot blot hybridization, and that in the liver tissue of 31 patients out of the 61 with southern blot and in situ hybridization. The positive rate of HBV-DNA in the serum, mononuclear cells and hepatocytes was 26.2% (16/61), 24.6% (15/61) and 44.8% (13/31) respectively. There was no concordance of the existence of HBV-DNA in the serum, peripheral mononuclear cells and hepatocytes in an individual. For example, HBV-DNA was absent in the serum but present in mononuclear cells and hepatocytes in 11 cases. In fact, peripheral mononuclear cells can serve as the reservoir for HBV to replicate. It cannot be denied that HBV can replicate in an individual even though HBV-DNA is negative in the serum.

Key words mononuelear cell; DNA Viruses; hepatitis B virus; molecular hybridization

腺泡型肝细胞癌一例报告

周子成 于冬梅[△] 江正辉 (第三军医大学西南医院 消化科) 630038

患者男，50岁。因间歇性上腹痛1年加重3周于1990年4月23日入院。年前始感间歇性上腹隐痛，空腹明显，餐后缓解。3周前上腹呈牵扯样胀痛或剧痛，后转移至右肋部，痛似断裂样，伴恶心、呕吐胃内容，饱胀，体重略减。

查体：一般情况好，体重67kg。蜘蛛痣（-），肝掌(±)，巩膜无黄染。左锁骨上触及1个1cm×1cm大扁平结节，质中，光滑。无腹壁静脉曲张。肝肋下4cm，剑下7cm，质中偏硬，表面有结节，轻度压痛及叩痛，肝区血管杂音（-）。脾未及。腹水征（-）。无肝炎史。无饮酒嗜好。

实验室及其他检查：血常规正常。HBsAg（-），抗-HBe(+)，抗-HBc（+）。ALT<35IU/L，GGT 154 IU/L，AIP157IU/L，LDH 598 IU/L。A/G=42.4/27.5，γ-球蛋白29.4%。空腹胆酸>4000μg/dl。α_1AT 3.6μmol/min/ml，AFP<31ng/L。B超示左肝外叶有6.3cm×4.3cm多个团块互相融合，边界欠清，有完整晕圈，右肝前叶4.3cm×3.9cm稍增强，有晕圈块影。CT示肝脏散在多发性低密度占位病灶，最大直径约5cm，肝右叶部分病灶融合成片。胃镜诊断慢性浅表性胃炎。

入院后病情进行性加重，相继出现发热，黄疸，消瘦，衰竭，肝脏增大至右下腹、质硬，触痛明显，腹水征不显，腹穿未能抽出腹水。于同年7月7日死于全身衰竭，肾衰，消化道出血。

死后肝穿病理检查示大部分区域肝细胞呈浊肿，胞浆疏松，肝细胞及毛细胆管内有胆汁淤积，部分区域见有片状坏死，在纤维组织间质或坏死边缘，见有呈腺样结构的组织，或呈菊花样排列，瘤细胞体积小，境界清楚，核圆形稍大、浓染，核仁不明显。诊断：腺泡型肝细胞癌（图1、2）。

讨 论

腺泡型肝细胞癌（Acinar liver cell carcinoma）极少见。临床不易诊断，主要靠病理检查。在一

[△] 本院病理科

（下转568页）

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