DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.01.004

生物素标记HBV DNA探针在肝石蜡切片上作原位杂交技术的研究

——各型肝病时HBV DNA的定位及形态

李奇芬 朱纯吾* 张士敏* 王慧芬（第一附属医院 传染科）

提 要 报告用生物素标记HBV DNA探针原位杂交技术，现察75例慢性肝病者肝石蜡切片上HBV DNA定位及形态。共检出HBV DNA阳性者25/75例（33.33%）。其中：CPH2/7例、CAH10/21例、肝硬化0/3例、SS4/11例、无症状HBsAg携带者4/21例和HCC5/12例。HBV DNA在肝切片上呈棕黄色粗颗粒状，主要分布于肝细胞浆内，个别核内亦可见少数浅染棕黄色颗粒。阳性肝细胞分布有三种形式：Ⅰ型（弥漫型）：25例中有4例（16%），Ⅱ型（局灶型）：20例（80%），Ⅲ型（散在型）：仅1例（4%）。颗粒在胞浆内亦有a型（密集）和b型（稀疏）之分。各型乙型肝炎HBV DNA在肝切片上定位与分布不完全相同，可能表示不同的病毒感染状态和复制的活跃程度。HCC只在癌旁肝组织内查见HBV DNA。

关键词 杂交，原位；生物素；HBV DNA；肝疾病—病理学

乙型肝炎病毒损害肝细胞的机理，虽进行了许多研究，但尚未完全探明。自将吸印法引入乙肝病毒的研究，使乙肝病毒研究达到了分子学水平，特别是原位杂交技术的应用，更进一步使得在组织切片上直接观察和分析病毒的定位、分布与细胞病变的特点及相互关系成为可能，从而有助于阐明病毒的致病机理。

本文用美国Enzo Biochem公司生产的生物素标记的HBV DNA探针，在75例各型肝病患者和4例非乙型肝炎病毒感染者的福尔马林固定、石蜡包埋的肝组织切片上，作了HBV DNA原位杂交实验，观察HBV DNA的定位及形态表现，获得满意结果，现初步报告如下。

材料与方法

病例来源 75例慢性肝病患者和4例对照病例主要来自：1. 重庆西南医院（40例），2. 北京302医院（23例），3. 南京军区总医院（16例）。计：慢性迁延型肝炎（CPH）7例、慢性活动型肝炎（CAH）21例、亚急性重型肝炎（SS）11例、慢性无症状HBsAg携带者（ASC）21例、肝炎肝硬化（LC）3例、肝硬化肝癌（HCC）12例，诊断标准根据1984年南宁会议方案。全有组织学诊断。肝炎病例系1985～1986年间北京302医院和重庆西南医院的住院患者，均经血清学检查确定为HBV感染者；肝癌病例系上述两医院1976～1986年间住院患者，其中8例经血清和/或肝免疫组织化学证实有HBV感染。HBV无症状携带者主要从南京某部新入伍战士中筛选。每例患者取肝组织一块，其中尸检取材6例，手术中取材11例，经皮肝穿刺（活检或死后）取材58例。所有肝组织均经10%中性福尔马林固定、石蜡包埋。

原位杂交方法 参阅本实验报告。

结 果

一、63例各型乙型肝炎和12例肝硬化肝癌患者其肝切片上显示HBV DNA阳性者共25例，占

* 解放军302医院病理科

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

33.33%。各型肝炎的检出率见附表。肝切片的HBV DNA检出率，在不同类型肝炎中略有不同，以慢性活动型肝炎较高（47.62%），无症状携带者较低（19.04%），但各组间均无统计学意义的差异。

附表 各型肝病HBV DNA之检出率

诊断	病例数	HBV DNA阳性数（%）
慢性迁延型肝炎	7	2(28.57)
慢性活动型肝炎	21	10(47.62)
亚急性重型肝炎	11	4(36.36)
肝硬化	3	0
无症状HBsAg携带者	21	4(19.04)
肝细胞性肝癌	12	5(41.67)
总计	75	25(33.33)

二、HBV DNA在肝切片上定位和表现形式：

用生物素化探针原位杂交技术，见肝石蜡切片上的HBV DNA呈棕黄色粗颗粒状，主要分布于肝细胞浆内，有时可集中于细胞核周围。个别细胞核内亦可见少数浅染的棕黄色颗粒。

阳性肝细胞在肝切片上的分布形式，大致有三种表现：Ⅰ型（弥漫型）：肝切片上全部或大多数肝细胞内都显示有HBV DNA，偶尔见阴性的肝细胞。本组25例阳性标本中有4例为此型，占阳性标本的16%；Ⅱ型（局灶型）：阳性细胞呈成簇分布，常数个、十数个或数十个阳性细胞成簇集中，同时可伴有单个散在分布的阳性细胞，这种表现形式最为常见，在25例阳性标本中占20例（80%）；Ⅲ型（散在型）：阳性细胞数量较少，呈单个散在分布，本组仅1例CAH患者肝切片属此型（4%）。

肝细胞胞浆中，棕黄色粗颗粒状HBV DNA阳性物质之颗粒有大有小，分布亦有密有疏，根据颗粒之多少及分布情况，可分为a型（密集型）：肝细胞胞浆HBV DNA颗粒数量很多，以致密集成堆，分布于整个胞浆或集中于核周围；b型（稀疏型）：HBV DNA颗粒数量少而稀疏，较均匀地分布于胞浆内（图1、2、3、）。

本组HBV DNA阳性病例中有17/25例（68%）同时于肝细胞核中存在HBV DNA，但仅见于极少少数胞浆阳性的细胞核中。每个阳性的细胞核中，仅有少数阳性颗粒，且染色亦较胞浆内的浅淡，难以辨认（图4）。

HBV DNA阳性的细胞多数为形态大致正常的肝细胞，少数脂肪性变的肝细胞中，在脂肪滴周围也可见到阳性颗粒。

三、各型肝病时HBV DNA的定位与形态：各型肝病时HBV DNA在肝切片上的定位与分布不完全一致。

1. 无症状HBsAg携带者共检出4例阳性，其中3例HBV DNA分布形式为Ⅰ型（弥漫型），就单个细胞来看，阳性颗粒分布为b型（稀疏型）。有2例核阳性。另1例表现则与上述3例明显不同，肝细胞HBV DNA分布呈Ⅱ型（局灶型），胞浆颗粒密集（a型），此例乃一血清携带HBsAg的肝胆管结石患者，肝组织有肝硬化病变，但临床上始终无症状，肝功能亦正常。

2. CPH和CAH患者肝切片上HBV DNA形态与分布相似，多为Ⅰ型，个别病例呈Ⅰ型或Ⅱ型；就单个细胞看，6例为a型，2例为b型，3例为a+b型，10例同时核阳性。

3. SS患者4例阳性，全部为Ⅰ型，棕黄色粗颗粒集中在残存的、形态基本正常的肝细胞或新生的肝细胞团的胞浆中，周围的大量炎细胞和纤维组织等均阴性，对比鲜明。胞浆中阳性颗粒分布疏密不一，有的胞浆中布满密集颗粒，有的则集中于于肝细胞核的周围，胞浆周围部分仅有少量或甚至没有阳性颗粒。

4. HCC患者5例阳性，HBV DNA集中存在在于癌旁基本正常的肝细胞内，多为Ⅰ型，常在肝包膜下的肝细胞，或癌组织与包膜之间被挤压成一狭窄的肝组织索内。浆内HBV DNA可为a型或b型，3例同时于少数肝细胞核内有HBV DNA，12例HCC患者除1例未检查癌组织，结果不详外，其余11例癌组织内均未见到胞浆或胞核内有HBV DNA，呈阴性反应。

讨论

生物素标记探针原位杂交技术在肝石蜡切片上检测HBV DNA，是国外近年才发展起来的分子杂交技术，国内至今尚未见报导，它具有较好的特异性及可重复性[1]。本文4例非HBV感染的阴性对照病例检测结果为阴性，3例吸印法确认为肝内有HBV DNA的肝切片，结果为阳性，且经多次实验证实，

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

表明本文采用的探针及技术具有较好的特异性及可重复性。

原位杂交法检测HBV DNA的阳性率，Negro报告为30%（6/70例）[1]，Rijntjes等为44.44%（20/45例）[2]，本文为33.33%（25/75例）（以上为生物素标记探针、石蜡切片），而Burrell用^{3}H标记探针、冰冻切片的阳性检出率为44.44%（8/18例），结果基本相同。本文病例中包括了部分无症状HBsAg携带者，这可能是使总阳性率偏低的一个因素。

不论是生物素标记的或同位素标记的探针，肝切片上HBV DNA均呈粗颗粒状。同位素标记探针放射自显影显示的粗颗粒代表HBV基因拷贝数，有人曾作过计算：每个细胞内若有200个颗粒，则相当于至少1500个HBV基因拷贝[5]。从而即可根据肝切片上细胞内显示的颗粒数量，估计病毒基因的含量，预测病毒复制的活跃程度。本文用生物素探针所显示的棕黄色粗颗粒数量可能也反应病毒基因的含量。本文肝HBV DNA的分布状况与文献报导相似，主要分布在肝细胞胞浆内，这种胞浆型HBV DNA，有人认为属于单股DNA[5]，为DNA复制过程的中间物[4]，也有人认为是游离型DNA。总之，胞浆型HBV DNA与病毒复制关系密切[6]。Gowans等指出，肝细胞胞浆内颗粒强阳性（即密集型），表明其病毒正在活跃复制[6]，而阳性细胞的分布状态也和HBV慢性感染有关[4]，如阳性细胞呈灶性分布，代表病毒基因由一个细胞向另一个细胞感染蔓延的一种方式，即慢性HBV感染的一种方式。因此，分析各病例肝切片上HBV DNA之定位，就可以粗略估计病毒感染的状态。

分析本文有限的病例，可见不同类型的乙型肝炎患者，肝切片上HBV基因的表达有所差别。CHP和CAH时，多数患者阳性细胞在肝切片上呈灶性分布，胞浆内DNA多数亦显密集型或疏密相间型，仅少数为稀疏型，表明这二个类型患者多为慢性HBV持续感染状态，且多数细胞内病毒复制活跃。无症状HBsAg携带者则表现为另一种形式，4例阳性者中有3例肝切片上HBV基因信号几乎完全相同，阳性细胞分布弥漫，但胞浆内颗粒稀疏，可能表明受病毒感染的肝细胞虽较普遍，但病毒复制并不活跃。另1例携带者肝切片上HBV DNA表现形式不同于上述3例患者，而与CPH或CAH者的形态相似。此例患者肝组织已有肝硬化表现，实际上不属无症状携带者范畴。

SS患者肝内HBV DNA的表现，不论阳性细胞的分布或是胞浆内病毒含量，均表明其病毒复制相当活跃，严重的炎症缓解后，仍可能处于慢性HBV持续感染状态。

上述所见各型肝炎肝HBV DNA定位与分布的差异是否有规律性，因病例有限，尚需积累更多资料，从各个角度进行观察，可望得到更多启示。

本文12例HCC，只在5例患者癌旁肝组织中查得HBV DNA，而无1例癌细胞内HBV DNA阳性，这与文献报导所有不同，其原因尚待进一步探求。

（本实验承韩本立教授提供HBV Patho-Geno药盒；张太和教授提供部分病例；程淑秀、孙枫、任白净同志进行技术协助，谨致衷心感谢。）

参考文献

1. Negro F. et al. J Med Virol 1985; 15:373
2. Rijntjes PJM. et al. Am J Pathol 1985; 120:411
3. Burrell CJ. In "Advance in Hepatitis Research" ed by FV Chisari. Masson Publishing USA Inc. p62. 1984
4. Burrell CJ. et al. Hepatology 1982; 2:85S
5. Gowans EJ. et al. J Gen Virol 1983; 64:1229
6. Blum HE. et al. Lancet 1984; Ⅰ(No 8406):771

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

Studies of in situ Hybridization in Routine Paraffin Embedded Liver Tissue Sections with Biotinylated HBV DNA Probes: Localization and Morphology of HBV DNA in Various Types of Liver Diseases

Li Qifen, et al (Department of Infectious Diseases, First Teaching Hospital, Third Military Medical College)

The in situ hybridization of HBV DNA with biotinylated probe in formalin-fixed and paraffin-embedded liver tissue sections was performed and the localization and morphology of HBV DNA in various types of chronic liver diseases was observed. 25 cases out of 75 (asymptomatic HBsAg carriers 4/21, chronic persistent hepatitis 2/7, chronic active hepatitis 10/21, liver cirrhosis 0/3, subacute severe hepatitis 4/11 and hepatocellular carcinoma with cirrhosis 5/12) were HBV DNA positive(33.33%). HBV DNA in hepatocytes was demonstrated as numerous coarse grains in cytoplasm and occasionally a few grains in individual nucleus. The distribution of the HBV DNA positive hepatocytes in the sections was in 3 forms, i.e., the diffuse type(Type I, 4/25, 16%), the focal type(Type II, 20/25, 80%), aud the scattered type (Type III, 1/25, 4%). The HBV DNA grained in the cytoplasm might be condensed(Type a)or sparsed(Type b)depending on the number of HBV DNA grains. The different distribution patterns and the amount of HBV DNA might be a reflection of the replication activity and the state of infectivity of HBV. HBV DNA positive hepatocytes were found only in the tissue adjacent to the cancer cells in cases of hepatocellular carcinoma with cirrhosis.

Key words, Hybridization, in situ, Biotin, HBV DNA, Liver diseases/pathology

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

图5　神经切断缝合后42天，吻合口纵切面。见新外膜，束膜管为一梭形结构，两侧向正常束膜、外膜移行，管内(C)再生神经组织走向较整齐，直达近侧端（右）。石蜡切片　H.E.×36

图6　神经切断缝合后42天，远侧断端电镜图。束膜部位完整的神经小束形成。小束的束膜细胞（Peri）具有正常束膜细胞的特征。RN.再生神经单位　×8 000

生物素标记 HBV DNA 探针在肝石腊切片上作原位杂交技术的研究

——各型肝病时HBV DNA的定位及形态　（正文见第14页）

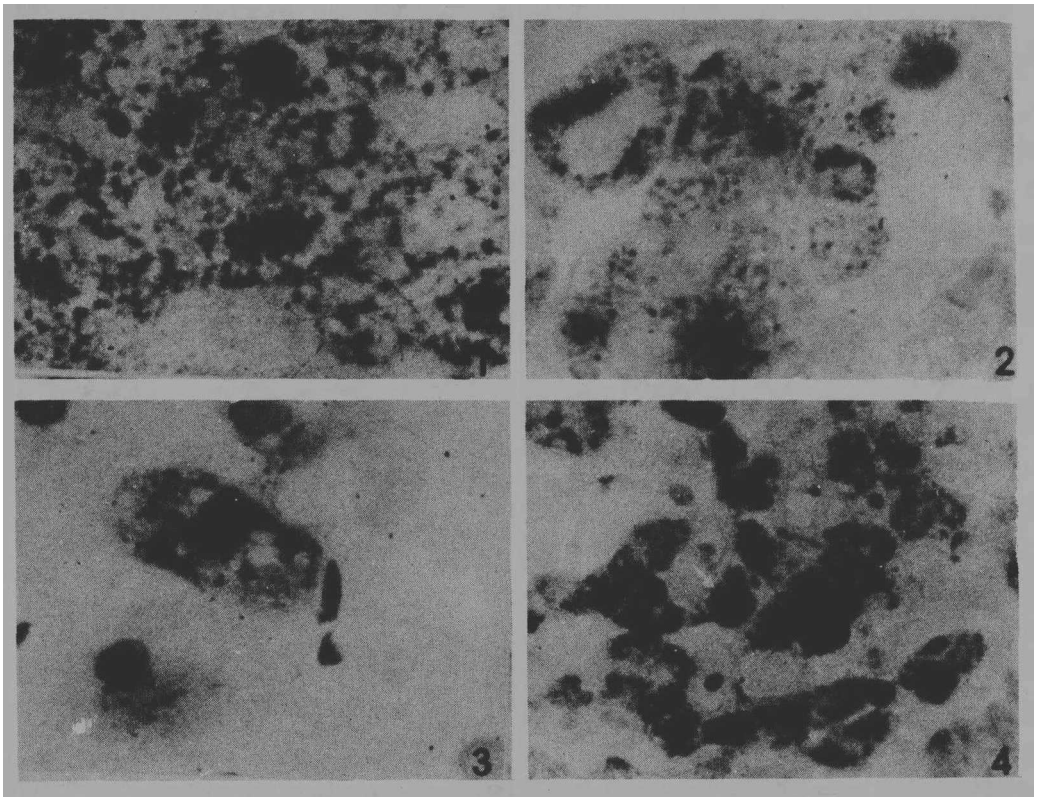


图1　肝组织内HBV DNA呈弥漫型，胞浆内HBV DNA颗粒稀疏分布。

图2　肝组织内HBV DNA呈灶性阳性，胞浆内HBV DNA阳性颗粒有的密集，有的稀疏。

图3　散在个别的HBV DNA阳性细胞。

图4　HBV DNA阳性的肝细胞核内亦有少数阳性颗粒（箭头所示）。

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