

人乙肝病毒 DNA 在感染树鼯肝细胞内状态的研究*

The Status' Study of HHBV DNA in Liver Cells of the Infected Tree Shrews

苏建家 王宇¹ 杨春 黄定瑞 冈本宏明² 严瑞琪³
 Su Jianjia Wang Yu Yang Chun Huang Dingrui Yan Ruiqi

(广西肿瘤防治研究所 南宁市滨湖路6号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 为探讨人乙肝病毒 (HBV) DNA 在树鼯肝细胞内存在状态, 对经血清学证明已被感染的树鼯肝组织进行转移印迹杂交分析。结果, 在实验感染早期的树鼯肝细胞检出 HBV DNA 复制的中间体; 在实验中晚期的动物肝细胞发现整合型的 HBV DNA 表明树鼯肝对 HHBV 敏感, 可成为乙肝和肝细胞癌发病机理研究及治疗乙肝药物筛选的较好的实验动物模型。

关键词 HBV DNA 印迹杂交 树鼯 复制 整合

Abstract The human hepatitis B virus (HBV) markers in the serum of the experimental tree shrews that had been inoculated with HHBV were detected by radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The intermediate form of HHBV replication and integrated HHBV DNA were found in the liver cells of these tree shrews in the early and later experimental stages respectively by southern blot analysis. These results indicated that tree shrews may easily be infected with HHBV and it is a useful animal model to study the drugs for prevention and treatment of hepatitis B and the mechanism of hepatocellular development.

Key words Human hepatitis B Virus, Southern blot, tree shrew, replication, intergrated
 中图分类号 R373.21; Q523; Q95-33

自1981年以来, 我们对多批树鼯 (Tupaia) 进行实验感染人乙肝病毒 (HBV) 的研究^[1,2]。用多种敏感的方法在实验树鼯的血清和肝细胞内检出 HBV 感染的标志物; 并在血清中观察到 Dane 颗粒 (病毒颗粒), 确证树鼯能感染 HHBV。其他学者的实验研究也得到相同的结果^[3,4]。但是, HBV DNA 在树鼯肝细胞内的状态, 尚未见报道, 未获得 HBV 在树鼯肝细胞内复制的直接证据。为此, 1988年, 我们将10份接种了 HHBV 的树鼯肝组织送日本自治医科大学, 用印迹杂交 (Southern Blot) 方法分析了 HBV DNA 在肝细胞内存在的状态。其中3份标本检出复制型或整合型

的 HBV DNA

1 材料与方法

1.1 材料

材料均为树鼯肝组织。A为活检标本; E3378及 E3276为处死时切除的部分肝组织。标本置 -20℃ 冰箱或液氮中保存。保存期分别为1, 10, 24个月。

1.2 实验方法

(1) A 号树鼯经股静脉接种乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 及乙肝病毒 e 抗原 (HBeAg) 均阳性的乙肝患者血清 0.5 mL, 3 d 后经腹腔注射等量同样血清。10 d 后, 每周抽血 1 次。用 ELISA 方法检测血清 HBV 感染的免疫学指标; 用赖氏法检测血清谷丙转氨酶 (ALT)。于接种后第 3 周末, ALT 值从 3 单位升至 18 单位。第 4 周起, 血清出现 HBsAg; 第 8 周出现抗-HBc; 第 14 周 HBeAg 阳性。第 22 周在全麻下行肝活检, 标本置 -20℃ 冰箱保存。第 30 周抽血, 用斑点杂

1997-02-17 收稿, 1997-04-08 修回

* 广西区卫生厅重点课题

1. 北京医科大学肝病研究所;
2. 日本自治医科大学;
3. 中山医科大学肿瘤研究所

交方法查血清 HBV DNA, 呈强阳性。

(2) E3276号树鼯接种人 HBV 后, 定期抽血, 用放射免疫法 (RIA) 测血清 HBs Ag 抗-HBs及抗-HBc 只检出抗-HBs及抗-HBc; HBs Ag 阴性 于第 34 周处死, 取部分肝组织置液氮中保存。

(3) E3378号树鼯接种 HHBV 后, 定期从股静脉抽血, 用 RIA 法测 HBs Ag 抗-HBs及抗-HBc 于第 3 周出现 HBs Ag 阳性; 第 2 周末抗-HBc 阳性; 第 30 周产生抗-HBs 从第 64 周起给予黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁), 共 6 周, 总量达 5.48 mg 于第 120 周处死, 肝组织分别置液氮保存及 10% 中性福尔马林液固定, 制片、光镜观察, 并进行 HBV DNA 原位杂交检测。

这 3 只动物接种含 HBV 的血清量、途径及供血者均相同 实验前均抽血作自身对照。

(4) 印迹杂交: 每例取 200 mg 肝组织, 加入 150 mM 氯化钠, 15 mM 柠檬酸, 1 mM EDTA 缓冲液各 1 mL, 于低温下匀浆, 经蛋白酶 k 及 RNase 消化后, 用 Tris 盐酸+ EDTA (TE) 饱和的酚及氯仿: 异戊醇 (1: 1 v/v) 抽提, 无水乙醇沉淀, -20°C 冰箱过夜, 离心收集沉淀, 加 200 mL TE 溶解 DNA, 并调至 0.5 ng/mL 浓度。每例取 20 ng DNA 共 3 份: 一份直接, 2 份分别经限制性内切酶 EcoRI 和 HindIII 消化后, 于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 然后按常规方法进行印迹转移。每张硝酸纤维素膜加 ³²P 标记的 HBV DNA 探针进行杂交。于 -80°C 超低温冰箱内放射自显影 48 h~96 h 采用缺口转录方法克隆 HBV 的序列作为 HBV DNA 探针, 经两次琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 为高纯度的 HBV DNA, 不含载体 DNA 将 ³²P 采用随机引物方法进行 HBV DNA 探针标记。探针活性为 $\times 10^9$ cpm~ $\times 10^9$ cpm 另外, 从正常树鼯肝组织提取 DNA 作为阴性对照。

2 结果

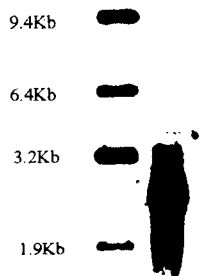
(1) 实验树鼯在接种 HHBV 前, 经两次 RIA 或 ELISA 方法检测, 血清 HBV 感染的标志物均阴性; ALT 值在正常范围; 肝活检未发现异常病变

(2) 转移印迹杂交分析 于放射自显影 7 h 后, A7 号树鼯的样品即在 1.9 kb~3.2 kb 之间出现清晰弥散的杂交带; 1.9kb 以下为不均一的条带; 在略大于 3.2kb 处有一隐约可见的条带 (图 1)。

E3378 和 E3276 号树鼯在大于 9.4 kb 处出现较宽的、清晰的杂交带。DNA 经 EcoRI 消化之后, E3378 产生 3 条自显影带: 其中 1 条位于 9.4kb 处, 1 条位于 6.4 kb~3.2 kb 之间, 1 条位于 3.2 kb。E3276 出现 3 条杂交带: 1 条大于 9.4 kb, 另 1 条约为 8.0 kb, 第 3 条较

弱, 位于 3.2 kb 处。而用 HindIII 消化后, E3378 出现 3 条带: 两条在 6.4 kb 附近;

Southern blot analysis



A7

图 1 A7 号树鼯接种人 HBV 后 22 周, 经 Southern Blot 分析, 在肝细胞检出 HBV DNA 复制的中间体 (在 3.2 kb~1.9 kb 之间为一弥散的拖带) 及位于和大于 3.2 kb 处各有一条带

Fig. 1 The intermediate form of HBV DNA replication was detected by Southern Blot analysis in liver tissue of tree shrew no. 7 after 22 weeks of inoculating human HBV. There is a permeation of band between 3.2 kb and 1.9 kb. There are two bands situated respectively in 3.2 kb and 1.9 kb. There are two bands situated respectively in 3.2 kb and a little higher

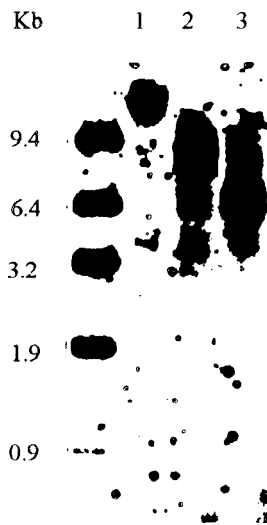


图 2 E3378 号树鼯接种人 HBV 后 126 周, 在肝细胞检出整合型 HBV DNA

Fig. 2 Integrated HBV DNA detected in the liver cells of tree shrew No. 3378 after 126 weeks of inoculating HBV. 1. 未经消化 Undigested; 2 经 EcoRI 消化后 Digested with EcoRI; 3 经 HindIII 消化后 Digested with HindIII.

条在 3.2 kb 处。E3276 样品也出现 3 条杂交带：1 条大于 9.4 kb；另 1 条约为 6.4 kb；第 3 条约为 3.2 kb (图 2 和图 3) 从正常的树鼩肝组织提取的 DNA 没有发现杂交带。

(3) 病理检查：E3378 号树鼩肝呈慢性肝炎及轻度纤维组织增生图像。部分肝细胞呈腺管样排列，并出现肝细胞增生灶或增生结节。可见少量的散在或聚集分布的异型增生的肝细胞。另外，用生物素标记的 HBV DNA 探针进行原位分子杂交，在该动物的肝细胞浆检出 HBV DNA。另外 2 例动物肝组织呈轻度炎症性病变，部分肝细胞轻度肿胀。

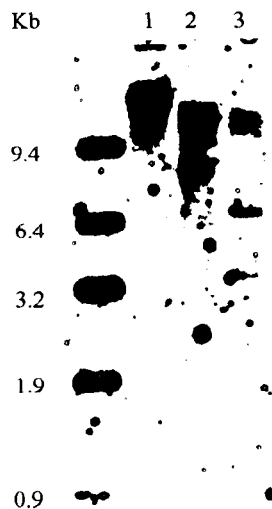


图 3 E3276 号树鼩接种人 HBV 后 34 周，在肝细胞检出整合型 HBV DNA

Fig. 3 Integrated HBV DNA detected in the liver cells of tree shrew No. 3276 after 34 weeks of inoculating HBV

1. 未经消化 Undigested; 2. 经 EcoRI 消化后 Digested with EcoRI; 3. 经 HindIII 消化后 Digested with Hind III

3 讨论

接种人 HBV 之前，在这些树鼩的血清及肝细胞内均未检出 HBV 感染的标志物。表明这些实验动物无自然感染 HBV。

近年来在 DNA 重组及分子克隆的基础上发展起来的分子杂交技术，在 HBV DNA 检测中具有很高的灵敏度和特异性。DNA 的印迹杂交是用标记的探针与经琼脂糖凝胶电泳分离并吸印到硝酸纤维素膜上的样品进行杂交。它主要用于判定 HBV DNA 在宿主细胞中存在的状态，即是整合型还是游离型。在 A7 号树鼩肝细胞内检出的 HBV DNA，是否为接种的乙肝患者血清 HBV DNA 的残留？或是 HBV DNA 污染了标本而造成的假象？以下几点可排除这些可能性：该动物在注射 HHBV 后两周内，血清中 HBV 感

染标志物均阴性，于第 4 周才检出 HBs Ag，肝活检是在第 2 周进行的，这排除了乙肝患者的血清在树鼩血内残留的可能性；(2) 该实验于分子杂交后用的是“高强度漂洗条件”，可排除 DNA 片段间的非特异杂交；(3) DNA 正常对照为阴性反应。排除了 HBV DNA 污染的可能性。

HBV 属 DNA 病毒，但其复制过程有 RNA 逆转录病毒的特性^[5]。需要逆转录酶活性，产生 RNA/DNA 复制中间体。它在印迹杂交中出现的是许多弥散状的小于 3.2 kb 的杂交带^[6]。本研究 A7 号树鼩在 2.4 kb~1.9 kb 之间出现的是弥散的拖带。说明在该动物肝细胞检出的也是 HBV DNA 复制的中间体 (RNA/DNA)。最近，德国学者^[7]在接种了 HHBV 的树鼩肝细胞也检出复制型的 HBV DNA。均证明树鼩肝细胞对 HHBV 易感。

提取的宿主肝细胞 DNA，以限制性内切酶 EcoRI 及 HindIII 等处理，染色体 DNA 被切割成大小不等的片段。HBV DNA 因只有一个 EcoRI 酶切点而呈线性化。大多数学者认为 HBV DNA 上无 HindIII 酶切点^[8]而用于对照。这些片段经印迹杂交后，杂交带位于 3.2 kb 或小于 3.2 kb 的，表明是游离型 HBV DNA；而大于 3.2 kb 者为整合型的 HBV DNA^[6]。本研究 E3276 和 E3378 两只树鼩，在大于 9.4 kb 处出现杂交带。经两种限制性内切酶切割后，出现几条不同的大于 3.2 kb 条带。表明这两只树鼩肝细胞中的 HBV DNA 主要是处于整合状态，并提示不只是一个整合片段。它们在树鼩肝细胞 DNA 整合的位点并不相同。与在人肝细胞的整合一样，具有随机性^[9,10]。此外，这两只动物肝 DNA 经限制性酶切之后，都在 3.2 kb 处出现不很明显的杂交带，表明在肝细胞也存在少量游离的 HBV DNA。图 1 在略大于 3.2 kb 处有一隐约的杂交带，也说明 A7 号树鼩的少数肝细胞也存在整合状态的 HBV DNA。由此可见，对于同一样本来说，整合型的与非整合型的、复制型与非复制型的可同时存在。

E3276 号动物的血清 HBs Ag 阴性，只检出相应的抗体，但仍能在肝细胞检出整合型的 HBV DNA。这与在部分人的研究结果相似^[11]。可能是整合的 HBV DNA 较少复制。在接种 HBV 后 12 周的 E3378 号树鼩检出整合型及少量游离型 HBV DNA，且肝组织呈慢性炎症改变。表明能在树鼩肝细胞形成慢性 HBV 携带状态。

过去一直认为 HBV 只能在人和黑猩猩肝细胞增殖^[12]。本研究首次在接种了 HHBV 的树鼩肝细胞检出与在感染了 HBV 的人肝细胞内相同的复制型

及整合型的 HBV DNA 证实树鼯对 HBV 易感。由于树鼯来源丰富,是用于 HBV 生物学特性、感染机理、治疗乙肝药物筛选验证及 HBV 致肝癌发生机理等研究的较好的实验动物模型。

参考文献

- 1 苏建家, 严瑞琪, 甘友全等. 成年树鼯实验感染人乙型肝炎病毒的研究. 中华病理学杂志, 1987, 16 (2): 103
- 2 Yan R Q, Su J J, Huang D R et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma- I. Experimental infection of tree shrew with hepatitis B virus. J of Cancer Research & Clinical Oncology, 1996, 122 (5): 283
- 3 李奇芬, 丁明权, 王洪等. 成年树鼯感染丁型肝炎病毒的研究. 第三军医大学学报, 1994, 16 (4): 1.
- 4 刘芳华. 人乙型肝炎病毒血清实验感染树鼯的研究. 贵州医学, 1987, 11 (2): 24.
- 5 Summers J, Mason W. Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell, 1982, 29 403.

- 6 高寿征主编. 病毒性肝炎防治研究. 北京: 北京出版社, 1993. 498.
- 7 Eike Walter, Ruth Keist. Hubert E. Blum et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatology, 1996, 24 (1): 1.
- 8 王宇, 陶其敏. HBV adr 亚型全基因组分子克隆的建立. 北京医科大学学报, 1986, 18 44.
- 9 陈怀宇, 骆抗先. 整合的乙型肝炎病毒核酸与原发肝癌. 国外医学, 流行病学传染病学分册, 1988, 15 52.
- 10 陈健, 刘启福, 魏琦等. 广西 HBs Ag 阳性母亲的胎儿肝、肾细胞中乙肝病毒 DNA 存在状态的研究. 生物化学杂志, 1994, 10 (5): 611.
- 11 Hajime H A, Terkatsu Arima, Hides Nagashima. Hepatitis B virus DNA in human hepatocellular carcinoma is the integration of hepatitis B virus DNA really carcinogenic Hepatology (Rapit literature Review), 1987, 17 (3): 869.
- 12 Pierre tiollais, Christine poured & Anne Dejean. The hepatitis B virus. Nature, 1985, 317 489.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 138 页 Continue from page 138)

曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 诱导的实验大鼠肝癌中有 N-ras 基因的突变, 且发生于第 8 第 13 第 14 和第 18 等多个密码子, 本研究肝癌的多位点 N-ras 基因点突变与之相似。据以往的流行病学资料^[6], 广西南部食物中 AFB₁ 的污染程度较高, 所以本文的 N-ras 基因突变, 可能还与 AFB₁ 的作用有关, 而不仅仅是 HBV 感染的作用。

参考文献

- 1 Miyaki M, Sato C, Gotanda T et al. Integration of region X of hepatitis B virus genome in human primary hepatocellular carcinomas propagated in nude mice. J Gen Virol, 1986, 67 1449.
- 2 顾健人, 胡利富, 万大方等. 人原发性肝癌转化基因 N-ras 的研究. 肿瘤, 1985, 5 52.
- 3 李仕能, 王明生, 李士谔等. 大鼠肝癌变过程中细胞癌基因的表达. 中国医学科学院学报, 1990, 12 (2): 121.
- 4 Farshid M, Tabor E. Expression of oncogenes and tumor supressor genes in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. J Med Virology, 1992, 38 235.
- 5 Breasley RP, Hwang L Y, Lin CC et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus a prospective study of 22, 707 men in Taiwan. Lancet, 1981, 2 1129.
- 6 Yeh FS, Yu M C, Mo CC et al. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinomas in Southern Guangxi,

- China. Cancer Res, 1989, 49 (9): 2506.
- 7 Wang W L, London W T, Feitelson M A. Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer. Cancer Res. 1991, 51 4971.
- 8 Tada M, Omata M, Ohto M. Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. Cancer Res, 1990, 50 1121.
- 9 Recharad C A, Short SA, Thorgeirsson SS et al. Characterization of a transforming N-ras gene in human hepatoma cell line Hep G2 additional evidence for the importance of c-myc and ras cooperation in hepatocarcinogenesis. Cancer Res, 1990, 50 (5): 1521.
- 10 房殿春, 罗元辉, 鲁荣等. 原发性肝癌组织癌基因 ras 和抑癌基因 p53 点突变研究. 第三军医大学学报, 1994, 16 340.
- 11 Leon M, Kew M C. Analysis of ras gene mutations in hepatocellular carcinoma in Southern African blacks. Anticancer Res, 1995, 15 859.
- 12 Doria M, Klein N, Lucito R et al. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of ras and nuclear activator of transcription factors. EMBO J, 1995, 14 (19): 4747.
- 13 McMahan G, Davis EF, Huber LJ et al. Characterization of c-ki-ras and N-ras in aflatoxin B₁-induced rat liver tumors. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (3): 1104.

(责任编辑: 蒋汉明)