

## 肝病患者肝细胞内 HBV DNA 原位杂交 研究——形态、分布及意义

张永源 鄢璞 李淋 汪由坤 郝连杰

(同济医科大学同济医院临床免疫研究室, 武汉 430030)

### 提 要

应用生物素标记 HBV DNA (乙肝病毒脱氧核糖核酸) 作探针, 对 129 例肝病患者肝组织作原位杂交研究。发现 HBV DNA 主要存在肝细胞浆内, 可分为胞浆致密型、疏松型和包涵体型。HBV DNA 阳性肝细胞在肝实质中分为三种型: 小叶型、局灶型与散在点状分布。HBV DNA 在慢性活动型肝炎中检出率最高 (81%), 显著高于肝硬化, 慢性小叶型肝炎、急性肝炎及原发性肝癌组。乙肝复制指标阳性患者肝细胞内 HBV DNA 检出率明显高于非复制组; 并观察到 HBV DNA 阳性肝细胞与肝细胞坏死灶关系密切, 多数紧邻肝细胞坏死灶/或和位于坏死灶中间, 尤以局灶型分布的 HBV DNA 阳性肝细胞为显著。

**关键词** HBV DNA 原位分子杂交 生物素探针

迄今, 乙型肝炎病毒 (HBV) 复制及发病机理不清。应用 HBVDNA (乙肝病毒脱氧核糖核酸) 基因克隆及分子杂交技术可检查血清及肝组织内 HBVDNA<sup>[1]</sup>, 为进一步研究 HBV 复制及发病机理提供了一个新手段。由于肝细胞内 HBVDNA 分析多采用吸印法, 少见原位杂交分析<sup>[2]</sup>。分子杂交多用同位素标记探针, 同位素的缺陷使其实际应用受到限制, 而近年出现的生物素标记探针可克服同位素的不足。本研究采用生物素标记 HBVDNA 探针进行肝细胞内 HBVDNA 原位杂交, 并分析其意义。

## 材 料 与 方 法

### 病例

共 129 例肝组织标本, 均取自住院肝炎患者。其中慢性活动型肝炎 (CAH) 83 例; 肝炎肝硬化 7 例; 亚急性重症肝炎 3 例; 慢性迁延性肝炎 (CPH) 9 例; 慢性小叶型肝炎 (CLH) 9 例; 急性肝炎 4 例; 原发性肝癌患者 12 例; 脂肪肝及肝脏反应性炎症各 1 例。采用国际<sup>[3]</sup>及全国肝炎病理诊断标准。

肝组织标本均用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片。

### 方法

1. 原位分子杂交 采用生物素标记 HBVDNA 作特异性探针。(美国 ENZO Biochem 公司产品, 批号: HBV patho Gene II EBP 854 Lot-7D-W12)。操作步骤如下:

清洁载玻片→干燥→涂布粘附剂→4 $\mu$ m组织切片, 贴片→常规脱蜡→阻断内源酶→各级酒精入水→0.2N HCl处理5~6分钟→0.2%甘氨酸×PBS洗10分钟→蛋白酶(Proteinase K, Behring Co)消化→0.2%甘氨酸×PBS洗10分钟→4%多聚甲醛后固定5分钟→切片自然干燥→加探针, 量以覆盖组织为宜→92℃, 变性7分钟→-20℃降温→37℃杂交, 2-3小时→加亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC, 美国Vector公司产品)温育1小时→3,3'-二氨基联苯胺显色20分钟→苏木素衬染→透明封片。

用已知肝内HBVDNA阳性标本作为阳性对照。

阴性对照包括: 1) 用生物素标记不含HBVDNA质粒PBR<sup>322</sup>与阳性标本杂交, 结果为阴性; 2) 用特异性探针与正常肝组织和1例脑肿瘤组织杂交为阴性; 3) 每例设空白对照, 即用PBS代替探针, 结果为阴性; 4) 用DNA酶(DNAase)消化后再杂交, 阳性信号明显减弱, 如同时用DNA与RNA酶消化, 则为阴性结果。

2. 血清HBsAg、HBe/抗HBe、抗HBc均用ELISA法检查;

3. 采用斑点杂交检查血清HBVDNA, 检测药盒购自武汉病毒研究所;

4. 肝内HBsAg、HBcAg检测采用ABC法, 药盒购自美国Vector公司。

## 结 果

### 一、各型肝炎患者肝内HBVDNA检出率(表1)

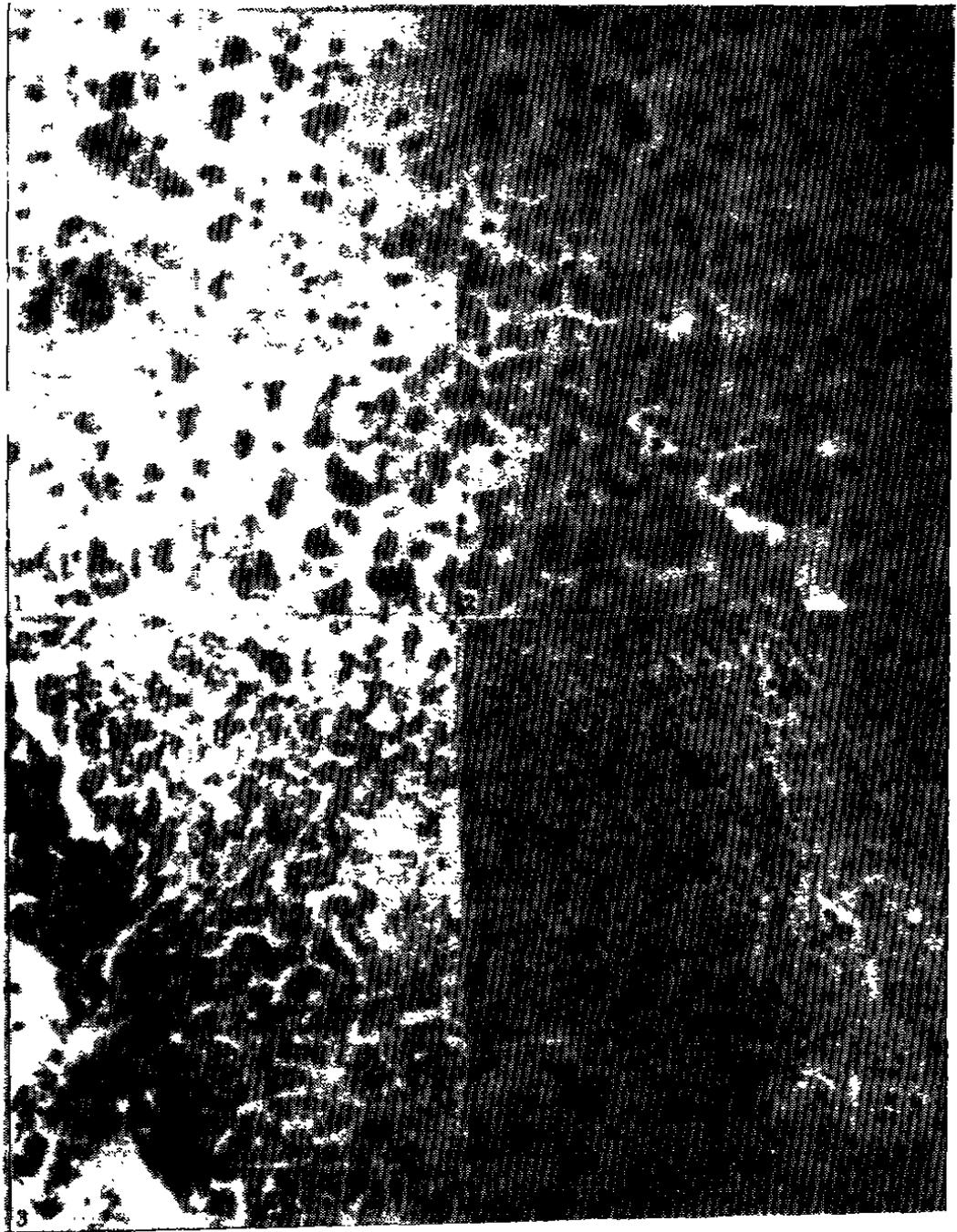
表1 各组肝病患者HBVDNA检出率  
Table 1 Prevalence of Intrahepatic HBVDNA in Various Forms of Liver Diseases

组 别	例 数	肝细胞内HBVDNA	
		+	%
亚急性重症肝炎	3	0	0
CAH	83	67	81
CPH	9	6	67
CLH	12	6	50
肝硬化	7	3	43
急性肝炎	4	1	25
HCC	9	4	44
脂肪肝	1	0	0
非特异炎症	1	0	0
小计	129	87	67

肝细胞内HBVDNA在CAH组检出率最高(81%), 与肝硬化、CLH、HCC、急性肝炎相比(25~50%), 差异有显著或极显著意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), CAH组HBVDNA检出率虽高于CPH组, 但未见统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 二、HBV不同感染状态下的肝内HBVDNA检出(表2)

根据血清HBeAg、肝内HBcAg阳性与否, 将大部分病例分成HBV复制组(即血清HBeAg阳性14例, 肝内HBcAg阳性28例, 两者同时阳性19例)与HBV非复制组(单纯血清HBsAg或肝内HBsAg阳性40例, HBsAg阴性/抗HBe阳性6例), 两者比较, HBV



- 图1 示胞浆型HBVDNA呈致密样分布。(生物素探针、ABC法) 200×  
Fig.1 HBVDNA in the cytoplasm of hepatocytes, with positive granules densely accumulated in the cytoplasm (Bio-probe ABC method) 200×
- 图2 示HBVDNA疏松分布在肝细胞浆(生物素探针ABC法)  
Fig.2 HBVDNA sparsely scattered in the cytoplasm of hepatocytes, as cytoplasmic discrete type. (Bio-probe ABC method) 150
- 图3 示含HBVDNA阳性细胞呈小叶分布, 未见肝细胞坏死灶(生物素探针ABC法) 200×  
Fig.3 The hepatocytes containing HBVDNA distributed in the parenchyma as lobular pattern, without evidence of hepatic necrosis. (Bio-probe, ABC method) 200×
- 图4 示含HBVDNA阳性细胞毗邻肝细胞坏死灶, 阳性细胞局灶分布(生物素探针) 300×  
Fig.4 The HBVDNA-positive hepatocytes distributed in the parenchyma as focal pattern, with intimate relation to the focal hepatic necrosis. (Bio-probe ABC method) 200×

表 2 肝内HBVDNA检出与HBV感染状态关系  
Table 2 Relationship of Intrahepatic HBVDNA with HBV Infection Status

组 别	例 数	HBVDNA	
		+	%
复制组*	61	60	82.0
血清HBcAg			
1. 肝内HBcAg 阳性	19	15	79.0
2. 血清HBcAg阳性	14	12	86.0
3. 肝内HBcAg阳性	28	23	88.0
非复制组	46	29	63.0
1. HBsAg阳性	40	27	67.0
2. HBsAg阴性/抗HBc阳性	6	2	33.3

\*与非复制组比较 $P < 0.05$

复制组的肝内HBVDNA检出率显著高于非复制组 ( $P < 0.05$ )。在HBV复制组,无论是单纯HBcAg或是HBcAg阳性,还是两者同时阳性均与肝内HBVDNA有很好的相关性。

另外,在11例所谓乙肝指标全阴患者中,发现5例肝内HBVDNA阳性。

### 三、HBVDNA在肝细胞内形态、分布及与肝细胞坏死灶关系

1. HBVDNA主要定位在肝细胞浆内,仅3例可见肝细胞核阳性。肝细胞浆内HBVDNA形态可分为三种: 1) 胞浆致密型 HBVDNA颗粒密集地分布在肝细胞浆内(图1)此类型占多数; 2) 胞浆稀疏型 HBVDNA颗粒稀疏地分布在肝细胞浆(图2), 3) 胞浆包涵体型 HBVDNA颗粒局灶分布在肝细胞浆内,形状如包涵体。

2. HBVDNA阳性肝细胞在小叶内分布有三种形式: 1) 小叶分布,整个肝小叶的肝细胞均为HBVDNA阳性; 2) 局灶型分布,HBVDNA阳性肝细胞灶性分布在肝小叶内; 3) 散在分布。(图3, 4)

3. HBVDNA阳性肝细胞分布多与肝细胞坏死灶存在部位一致,HBVDNA阳性细胞紧邻毗邻肝细胞坏死灶或/和位于肝细胞坏死灶中间,其中HBVDNA阳性肝细胞局灶型分布与肝细胞坏死灶相关性更为密切。(图3, 4)

## 讨 论

检查肝内HBV复制状态的分子生物学方法有吸印法和原位分子杂交<sup>[4-12]</sup>。由于吸印法需要一定量经深冻保存的肝组织,故给临床常规应用和科研带来了一定限制;同时,吸印法所反映的是提取总量DNA中的平均HBVDNA含量和状态。而原位分子杂交可在福尔马林固定,石蜡包埋组织切片上进行,且能分析单个细胞内HBVDNA含量及状态,并可和组织病变及HBV抗原表达结合分析,此为探讨HBV复制及免疫发病机理的一个新方法<sup>[10]</sup>。本研究采用生物素标记HBVDNA作探针,避免了同位素标记探针的缺陷。用该探针与正常肝组织、脂肪肝及脑肿瘤组织杂交均为阴性,并用生物素标记的不含HBVDNA质粒与阳性标本杂交及多次重复试验,证明其特异性高,重复性好。也证实用生

物素探针作原位分子杂交有较好的敏感性, 与其他反映 HBVDNA 复制指标如血清 HBeAg、肝内 HBcAg 有很好相关性; 同时可在 HBsAg 阳性或单纯抗 HBc 阳性肝组织中检出 HBVDNA, 并在 11 例所谓乙肝标志全阴患者中发现 5 例 HBVDNA 阳性。这一结果与国外报道一致<sup>[5]</sup>。综上, 肝内 HBVDNA 检查是直接反映 HBV 复制的敏感指标, 能弥补其他反映 HBV 复制标志的不足。

本研究观察到: HBVDNA 主要存在肝细胞浆内, 并可分为三种形态, 与 Michitaka 及李氏观察相同<sup>[7,11]</sup>。一般认为胞浆内 HBVDNA 为游离复制型 HBVDNA, 其存在表明 HBVDNA 处于复制状态<sup>[4,7]</sup>。研究结果亦表明: 肝内 HBVDNA 存在与其他 HBV 复制指标密切相关, 即血清 HBeAg、肝内 HBcAg 阳性患者肝细胞内 HBVDNA 检出率显著高于 HBV 复制组, 与国内陈氏报道一致<sup>[12]</sup>。同时也提示: HBV 复制时, 肝细胞内可能有数量较多的 HBVDNA 拷贝, 较易检出; 在 HBV 感染病程中, 如果仅有 HBsAg 表达或 HBsAg 阴性/抗 HBc 阳性, 此时肝细胞内 HBVDNA 拷贝数减少或已经整合到宿主基因组中, 故不易检出。因此, HBVDNA 检出率高低与 HBV 复制状态有关, 评判肝内 HBV DNA 检出率时, 应建立在受检对象及其乙肝指标可比的基础上。

HBVDNA 存在与肝脏病变活动性有关, 即 CAH 组的 HBV DNA 检出率最高, 显著高于肝硬化、CLH 及 HCC、急性肝炎组。这一结果提示: 大部分 CAH 患者的 HBVDNA 处于活动性复制状态, 也表明 HBV 活动性复制是肝细胞持续破坏的重要原因。本研究进一步发现: HBVDNA 阳性肝细胞坏死灶关系密切, 常位于肝细胞坏死灶中间或毗邻, 尤以局灶型 HBVDNA 表达与肝细胞坏死灶紧连一起。这一观察为 HBV 复制与肝细胞坏死关系研究提供了新证据。

### 参 考 文 献

- [1] Bonino F, et al, 1986, *Hepatology* 3:136—141.
- [2] Brechot C, et al, 1985, *N Eng J Med*, 312:270—276.
- [3] International Group, 1977, *Lancet* 2:914—919.
- [4] Negro F, et al 1985, *J Med Virology* 15:373—382.
- [5] Rijtjes P, J, M, et al, 1985, *American J of Patology* 120:411—418.
- [6] Blum HE, et al, 1984, *Lancet* 1:771—775.
- [7] Michitaka K, et al, 1988, *Liver* 8:247—253.
- [8] Herrmann G and Hubner K, 1987, *Hepato-Gastroenterology* 34:148—151.
- [9] Gowans E, et al, 1981, *J Med Virology* 8:67—78.
- [10] Burrell CI, et al, 1984, *Hepatology* 4:20—24.
- [11] 李奇芬等, 1988, 第三军医大学学报 10:14—17.
- [12] 陈梅龄, 等, 1988, 第三次全国传染病寄生虫病学术会议论文摘要汇编 p19—20.

## Morphology, Distribution and Its Signification of Intrahepatic HBV DNA in Liver Disease: A Study by in Situ Hybridization

Zhang Yong-yuan Yan Pu Seng Han-qin Li Ling Hao Lian-jie

(Clinical Immunology Research Unit, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

A biotin-labeled DNA probe specific for hepatitis B virus (HBV) nucleotide sequences was hybridized in situ to liver tissue of 129 cases with liver disease. It was found that HBVDNA was predominately visualized in cytoplasm of hepatocytes in three ways, cytoplasmic compact pattern, discrete pattern and inclusion pattern. Its distribution in parenchyma within the section of specimens may be defined as lobular, focal and spotty. The detection of intrahepatic HBVDNA depended on two factors at least in present study, I, liver disease activity, as chronic active hepatitis (CAH) group had a significant higher prevalence (81%), compared to cirrhosis, chronic lobular hepatitis (CLH) acute hepatitis and hepatocellular carcinoma (HCC) groups, II HBV infection status; HBVDNA in HBsAg positive/or intrahepatic HBcAg positive patients more easily detected than the single HBsAg positive or anti-HBc cases. The interesting finding that hepatocytes expressing HBVDNA hepatocytes, particularly as focal distribution were closely related to hepatic necrotic sites suggests that HBV replication may occur in conjunction with hepatic necrosis.

**Key words,** HBVDNA In situ hybridization Bio-probe Immunopathology