维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第1期
1991年3月

病毒学杂志
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.1
Mar.1991

乙型肝炎病毒持续感染患者细胞内病毒复制的研究

曾令兰　熊开钧　黄华芳　何生松
罗端德　王心禾　代家珠　刘红艳

（同济医科大学附属协和医院传染病教研室，武汉　430022）

提　要

用Southern blot技术对乙肝病毒感染肝脏和外周血白细胞的情况进行了对比研究，发现白细胞的阳性率为44%，肝组织的阳性率为46%，两者无统计学差异。根据琼脂糖凝胶电泳速度可将病毒DNA分子分为游离型、整合型和混合型，配对检查两者亦无明确相关性，说明外周血白细胞是乙肝病毒攻击的靶细胞，亦是病毒复制的场所。白细胞中病毒DNA游离型与血清学指标HBeAg（＋），HBV DNA斑点杂交（＋）关系密切，而整合型除与上述指标有关外，还和抗-HBe（＋）有关，表明病毒在乙肝发病过程中复制和部分静止的差异。

关键词：Southern blot　技术　乙肝病毒　肝脏　白细胞　类型

目前对乙肝病毒的研究已进入分子水平，乙肝病毒除在肝细胞中复制外，1986年国外学者还证实在人体外周血单个核细胞内亦进行复制[1]，从而开创了新的研究领域。然而乙肝病毒对两种细胞感染的程度、复制的高低是否存在相关性，病毒感染与临床其他血清学指标关系如何，这些都是急待解决的理论与临床实践问题。我们自1986年起用Southern blot技术进行了乙肝病毒感染的研究，现将结果报道如下。

材料与方法

一、标本：外周血白细胞和肝组织取自慢性乙型肝炎病毒感染患者，共83例次。其中白细胞55例，肝细胞28例。全部病人HBsAg（＋）、其中50例HBeAg（＋）、29例抗HBe（＋）、38例HBV DNA（＋），男47、女36例，年龄20～43岁。全部病例均符合1984年全国第三次病毒性肝炎学术会议制定的标准。

对照组为正常人外周血白细胞10例，肝细胞4例。

二、试剂：Pronase E·RNA酶（西德）、限制性内切酶EcoR Ⅰ、Hind Ⅲ、λDNA（美国BRL公司）、^{32}P-HBV DNA探针（中国科学院武汉病毒所）。

三、方法与步骤：

（一）DNA提取

1，取7～10ml肝素抗凝新鲜血，用lysis液溶解红细胞后，2000g离心15分钟，去上清，获

本文于1989年11月26日收到

维普资讯 http://www.cqvip.com

得管底的白细胞。

2．白细胞经 Pronase E（200μg/ml），37℃ 消化2h，再用饱和酚/氯仿/异戊醇（24：24：1）提纯。

3．水相加入 RNA 酶（50μg/ml），37℃ 2h去除 RNA。

4．经上述两种酶消化的 DNA 放 4 ℃冰箱过夜，次日 27000g 离心 30 分钟，去除大分子的细胞DNA。

5．上清液中的小分子 DNA 用步骤 2 中的方法两次进一步去蛋白。

6．加入 2 倍体积的无水乙醇，置－20℃冰箱过夜沉淀 DNA。

（二）酶解

1．260/280 波长紫外光分光仪测定 DNA 含量，1 μg DNA 需 3～5 U 内切酶（Hind Ⅲ或 EcoR I），置37℃，4h。

2．取酶解完全样品 15～30μg DNA 进行琼脂糖电泳，同时进行λ DNA 标准对照，琼脂糖浓度为 1 %（内含溴化乙啶），电压20～50V，持续 15h 左右。

3．取凝胶板，紫外光观察结果，显带满意后照像。

（三）转移

1．电泳后的凝胶经蛋白变性处理。

2．放转移盘中转移 24h，将凝胶中的 DNA 转印到硝酸纤维薄膜上，烤干备用。

（四）杂交

1．小牛胸腺 DNA 预杂交，65℃，5h。

2．^{32}P-HBV DNA 探针杂交，68℃，24h。

3．漂洗后-45℃放射自显影，然后通过杂交带位置确定 DNA 的 Kb 值。

为了判断试验的准确性，同一份标本在同等的条件下加样两次，6 例病人重复试验的结果均一致。同份标本间隔30天后再次检测，6 例病人间隔试验前后完全一致。用斑点杂交和斑印杂交同时进行双盲试验 5 例，两者阳性率完全符合。用正常人血清及小牛胸腺 DNA，替代乙肝病毒 DNA 进行检查共 6 例，结果均为阴性。

HBeAg、抗-HBc、HBsAg、斑点杂交 HBV DNA 检测方法从略。

结 果

正常人外周血、肝组织无条带显示。

乙肝患者白细胞中显带者24例，阳性率44%，DNA 游离型（3.2kb或3.2kb 以下）16例（占阳性总数的 67%，下同），整合型（3.2kb以上）6 例（25%），既有游离又有整合的混合型 2 例（8 %），见图 1。

乙肝患者肝细胞显带者13例，阳性率46%，与白细胞显带进行统计学处理 $P>0.05$。游离型 9 例（69%），整合型 2 例（15.5%），混合型 2 例（15.5%），如图 2 所示。白细胞与肝细胞配对检查16 例，结果见表 1，$P>0.05$。其中两者同时阳性者 6 例，同时阴性者 2 例，8 例非同时阳性，两者的符合率为50%。

乙肝病毒感染的白细胞 DNA 类型与血清学其他指标的关系见表2，病毒感染肝细胞 DNA 类型与血清学指标的关系见表 3。表明游离型与 HBeAg（＋）、HBV DNA（＋）密切有关，而白细胞整合型除与该两项指标关系密切外，与抗-HBe（＋）亦有关，而

维普资讯 http://www.cqvip.com

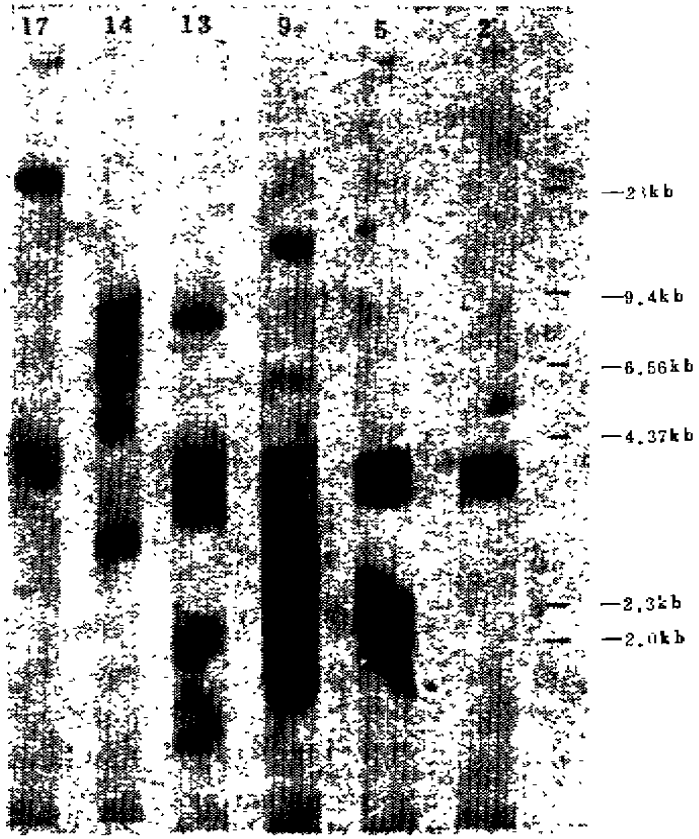

图1　白细胞中HBV DNA类型

Fig.1　The types of HBV DNA in white blood cells

Case 2: Free type, 3.2kb; Case 9: Mixed type, 10.36kb and flaked 2.8—0.9kb; Case 17: Integrated type, 17.92kb.

表1　配对检查16例乙肝病毒的DNA类型

Tab 1　The matching detection on types of DNA in 16 patients with hepatitis B virus

	白细胞 white blood cells	阳性率(%) Positive rate	肝组织 Liver	阳性率(%) Positive rate
游离型 Free type	8	50	6	37.5
整合型 Integrated type	3	19	2	12.5
混合型 Mixed type	0	0	1	6
不显带 No showing band	5	31	7	44

肝细胞整合型与HBV DNA斑点杂交关系不大，但由于例数较少，统计学处理$P>0.05$。

白细胞16例游离型中2.8kb以下的有5例，连同混合型1例1.9kb者，其HBeAg阳性率为67%，抗-HBe(+)33%。HBV DNA(+)67%。肝组织中2.8kb以下者有3例，HBeAg(+)、HBV DNA(+)均为100%，抗-HBe均为阴性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

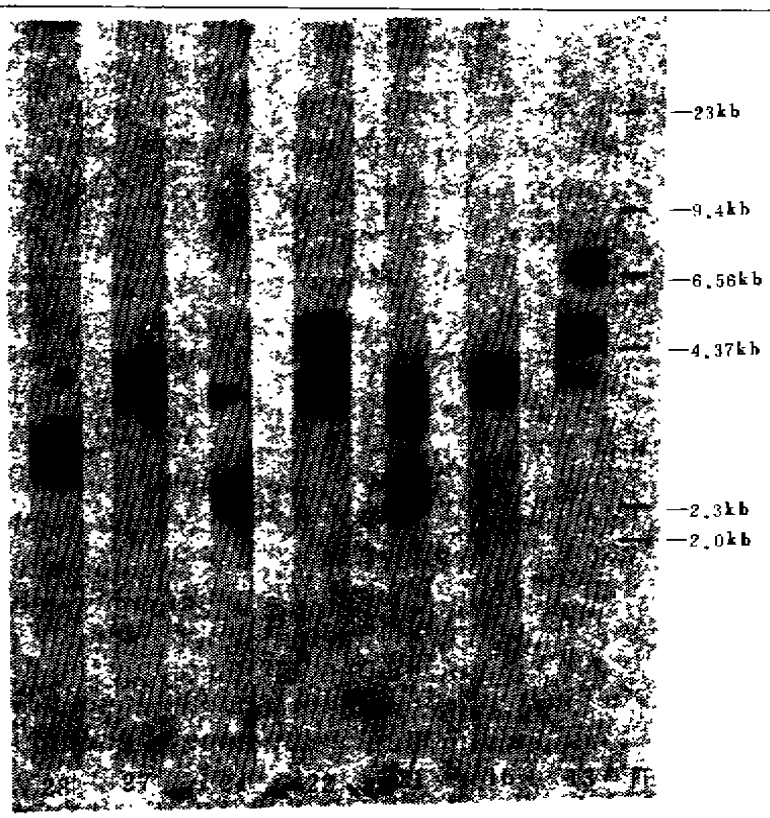

图2 肝细胞中HBV DNA类型

Fig.2 The types of HBV DNA in livers

Case 13: Mixed type 8.56kb, 4.37kb and 3.2kb;

Case 28: Free type, 2.94kb

表2 白细胞中乙肝病毒DNA类型与血清学指标的关系

Tab 2 The relationship between types of DNA infected hepatitis B virus in white blood cells and serological indexes

	Cases	HBeAg(+)	Anti-HBe(+)	HBV DNA
Free type	16	14(88)	2(13)	12(75)
Integrated type	6	6(100)	3(50)	5(83)
Mixed type	2	2(100)	1(50)	2(100)
Total	24	22(92)	6(25)	19(79)

*括号为阳性率 ( ); positive rate

表3 肝细胞中乙肝病毒DNA类型与血清学指标的关系

Tab 3 The relationship between types of DNA infected hepatitis B virus in livers and serological indexes

	Cases	HBeAg(+)	Anti-HBe(+)	HBV DNA
Free type	9	7(78)	1(11)	8(89)
Integrated type	2	1(50)	1(50)	0(0)
Mixed type	2	1(50)	1(50)	2(100)
Total	13	9(69)	3(23)	10(77)

*括号为阳性率 ( ); positive rate

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

Southern blot 技术是英国 Southern 首创，以前运用此技术对乙肝病毒的研究注重肝组织，闻玉梅研究98例患者的肝脏，HBeAg（＋）者，肝内 HBV DNA 分子杂交的阳性率达77.19%[1]。但临床上由于取材的困难使该项研究的深入进行受到限制。Pontisso 首先用此技术检查了 16 例乙肝病人的外周血白细胞，发现其中 10 例含有病毒 DNA 片段，阳性率为63%。顾建人研究HBsAg（＋）和HBeAg（＋）的患者，白细胞分子杂交的阳性率为44%[3]，然而上述作者均未同时进行肝细胞、白细胞 HBV DNA的检测。我们的研究证实了乙肝病毒DNA片段的阳性率在白细胞和肝组织中几乎相同，两者在游离型、整合型、混合型的比例上亦无统计学差异，配对研究两者亦无明确关系，说明乙肝病毒不仅仅是嗜肝病毒，外周血白细胞亦是其靶细胞，病毒可在其内复制。现已证明乙肝病毒可以感染胰腺、肾脏、皮肤和骨髓细胞[5]。

最近有人检测52例乙肝患者和10例无症状 HBsAg 携带者外周血单个核细胞的 HBV DNA，仅有 4 例出现微弱阳性，阳性率仅为 6 %[4]。根据我们的经验，HBV DNA分子杂交阳性率与HBeAg（＋）和血清斑点杂交HBV DNA阳性率有关。本实验白细胞中乙肝病毒DNA 显带者 92%HBeAg（＋），79%斑点杂交阳性。除了病例选择外，提高阳性率的经验尚有：① 用 lysis 液取代淋巴细胞分层液，收集到了更多的白细胞，由于离心去掉上清液，一般不会有血清残留污染而影响结果。但有作者认为，血浆HBV DNA阳性者，细胞洗涤四次后，仍有 10%患者洗涤液做斑点杂交仍为阳性，如何完全避免血清污染有待我们进一步探索。②经 Pronase E 和 RNA 酶消化后的 DNA不直接提纯，而是放置 4 ℃冰箱中过夜，高速离心后去除细胞的 DNA，可加强乙肝病毒的 DNA 纯度。③直接将溴化乙啶加入琼脂糖电泳板中，使方法简便，显带更为清晰。

据文献报道，酶切后的DNA通过凝胶电泳和转移杂交显示 3.2kb 以上的条带是乙肝病毒游离环状和线状 DNA，2.8kb 为部分双链 DNA[6]。Osamu 认为杂交后的 HBV DNA 病毒分为两种类型，一种是超螺旋的病毒 DNA，意味着仅存在复制模板，而另一种为复制的中间体，意味着 HBV DNA 的活化复制[6]。梁氏认为在3.2kb 位置以下显示的杂交带均是游离型病毒 DNA，游离型的存在表示病毒的复制和增生，而整合型的存在说明病毒趋于静止状态[7]。我们的试验表明游离型患者血清中 HBeAg 阳性率和 HBV DNA 斑点杂交阳性率均较高，抗 -HBe 阳性率较低，而整合型抗 -HBe 阳性率较高，肝细胞整合型 HBV DNA 斑点杂交为阴性，支持梁氏观点。

Osamu 认为仅仅存在超螺旋体的 DNA 只是感染开始，没有活动的 DNA 转录发生，而 2.8kb—2.0kb 以及 1.5kb 以下者意味着活化转录[6]。我们的试验亦能说明此点，白细胞中的 DNA 6 例2.8kb 以下者血清中 HBeAg、HBV DNA 阳性率均较高，而抗-HBe 则较低，肝细胞 3 例更能说明，其 HBeAg 及 HBV DNA 斑点杂交均为 100%阳性，然而这点仍需要更多的病例证实。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 闻玉梅等，1986，中华医学杂志 66(9)：521。
〔2〕 Pontisso et al.，1984. *British Medical Journal* 288：1563.
〔3〕 顾建人等，1984，中华传染病杂志 2(4)：221。
〔4〕 童舒平等，1989，中华传染病杂志 7(3)：145。
〔5〕 Romet-Lemonne JP et al.，1983，*Lancet* 11：732.
〔6〕 Osamu et al，.1983，*Gastroenterology* 89：610.
〔7〕 梁炽森等，1986，中华传染病杂志 4(1)：9。

Study on Intercellular Virus Replication in the Patients Continually Infected by Hepatitis B Virus

Zeng Ling-lan et al

(*Department of Infectious Diseases, Xiehe Hospital, Tongji Medical University, Wuhan* 430022)

The status of livers and white blood cells in peripheral blood after infected with hepatitis B virus were studied by Southern blot technique. The positive rate was 44% in white blood cells and 46% in the livers, respectively. There was no significant different beween them. According to speed of agarose gel electrophoresis, DNA fragments of virus can be divided into three types, namely free, integrated and mixed types. There was also no significance. These results suggested that white blood cells were target cells which were attacked by hepatitis B virus and there virus can replicate. In white blood cells free type was closely related to serological HBeAg(+) and HBV DNA(+). In addition to above indexes, integrated type was related to anti-HBe(+). These differences showed there are replication and partial quiescent stages after infected by hepatitis B virus in chronic liver disease.

Key words: Southern blot technique Hepatitis B virus Liver White blood cell Type