

## 中国青海地区喜马拉雅旱獭嗜肝病毒自然感染的组织学研究\*

李新宇<sup>1,2</sup>, 王宝菊<sup>1</sup>, 孟忠吉<sup>1,2</sup>, 汪由坤<sup>1</sup>, 赵西平<sup>1</sup>, 陆蒙古<sup>3</sup>, 杨东亮<sup>1\*\*</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室, 感染病学教研室, 湖北武汉 430030; 2. 郧阳医学院附属太和医院肝病中心, 湖北十堰 442000; 3. 华中科技大学同济医学院病原生物学系, 湖北武汉 430030)

### Natural Infection of Hepadnavirus in Liver Tissues of *Marmota himalayana* in Qinghai, China

LI Xin-yu<sup>1,2</sup>, WANG Bao-ju<sup>1</sup>, MENG Zhong-ji<sup>1,2</sup>, WANG You-kun<sup>1</sup>, ZHAO Xi-ping<sup>1</sup>, LU Meng-ji<sup>3</sup>, YANG Dong-liang<sup>1\*\*</sup>

(1. Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China; 2. Center for Treatment of Liver Disease, Taixie Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China; 3. Department of Microbiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** Hepadnavirus surface, core antigen and c genes and their products which may exist in liver tissues of *Marmots himalayana* were detected by immunohistochemical staining and *in situ* hybridization, respectively. The data suggested that hepadnavirus surface antigens were detected in the liver of 13 out of 50 animals (26%) and the core antigen in 18 out of 50 animals (36%). Some of the samples were proven positive by detection of the c gene by *in situ* hybridization. The core antigen was located in the cytoplasm and/or nucleus of liver cells and had multiple appearance such as scattered, clustered or diffused. The C antigen was located in a scattered manner in the nucleus of liver cells. Mild inflammation was observed in 5 liver sections and did not correlate to antigen expression. Using histological detection methods of Woodchuck hepatitis virus (WHV), we demonstrated that a hepadnavirus similar to WHV infection may exist in *Marmota himalayana* in Qinghai, China. *Marmota himalayana* may be a potential animal model to study hepadnavirus infection.

**Key words:** *Marmota himalayana*; Hepadnavirus; Woodchuck hepatitis virus; Immunohistochemistry; In-situ hybridization

**摘要:** 应用原位杂交技术、免疫组化技术以土拨鼠肝炎病毒(Woodchuck hepatitis virus, WHV)的检测系统检测 50 份喜马拉雅旱獭肝组织可能存在的嗜肝病毒 c 基因、s 抗原及 c 抗原的表达,同时检测肝脏组织病理学改变。结果显示旱獭肝组织中嗜肝病毒 s 抗原、c 抗原的阳性率分别为 26%(13/50)、36%(18/50);在抗原双阳性的 10 份肝组织标本中有 c 基因的阳性表达,阳性率为 50%。c 抗原定位于肝细胞胞浆和/或胞核,呈散在、片簇状分布,c 基因定位于肝细胞的细胞核,阳性细胞散在分布。50 份标本中 5 份出现肝炎的病理改变,与抗原检出间无明显相关性。使用 WHV 的病毒检测系统证实青海地区喜马拉雅旱獭可能存在类似 WHV 的嗜肝病毒感染,从组织学的角度为中国青海地区喜马拉雅旱獭嗜肝病毒自然感染提供证据,此种动物有可能用于建立嗜肝病毒感染的动物模型。

**关键词:** 青海喜马拉雅旱獭;嗜肝 DNA 病毒属;土拨鼠肝炎病毒;原位杂交;免疫组化

**中图分类号:** S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)06-0570-04

收稿日期:2005-04-25,修回日期:2005-05-18

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271170)

作者简介:李新宇(1978-),女,湖北十堰籍,住院医师,硕士,主要从事病毒感染与免疫研究。

\*\* 通讯作者:杨东亮(1955-),男,博士,教授,主任医师,研究方向为病毒感染与免疫。

Corresponding author. Tel:027-83662894, E-mail: dlyang@tjh.tjmu.edu.cn

乙型肝炎病毒(*Hepatitis B virus*, HBV)导致的乙型肝炎严重危害人类健康,由于嗜肝病毒感染高度的种属和组织特异性使得我国至今缺乏理想的嗜肝病毒体内、外感染模型,这是研究乙型肝炎的发病机制、抗病毒药物筛选以及治疗中的瓶颈。土拨鼠肝炎病毒(*Woodchuck hepatitis virus*, WHV)及乙型肝炎病毒均属于嗜肝 DNA 病毒属,它们在形态学、基因组结构、基因产物、复制、流行病学、致病性等方面很相似。东方土拨鼠(*Marmota monax*)是 WHV 的宿主,土拨鼠模型已成为研究嗜肝病毒及其实验感染、致病性以及筛选治疗性疫苗、药物最适合的动物模型,但是东方土拨鼠仅存在美洲,来源困难,价格昂贵。我国的青海地区大量分布的喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*),与美洲的东方土拨鼠同为土拨鼠属(*Marmota*),曾有研究提示我国的旱獭(*Marmota*)群体有可能存在类似 WHV 的病毒感染<sup>[1~3]</sup>,本研究应用分子生物学、免疫学、组织学的技术对我国青海地区的旱獭肝组织标本进行筛查,试图为其自然感染提供证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本收集

收集青海地区喜马拉雅旱獭肝脏标本 50 份,10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋 4 $\mu$ m 厚连续切片备检;对照标本:WHV 感染/未感染东方土拨鼠石蜡包埋肝组织标本 11 份;鸭乙肝病毒(DHBV)感染石蜡包埋鸭肝组织 1 份;正常 Balb/c 小鼠肝组织 1 份。

### 1.2 试剂

抗 WHsAg 多克隆抗体为德国 Essen 大学病毒研究所 Roggendorf 教授馈赠,抗 WHcAg 多克隆抗体为本室制备,SP 试剂盒购自北京中杉金桥公司,原位杂交探针标记检测试剂盒购自德国 Roche 公司,二氨基联苯胺(DAB)购自美国 Dako 公司。

### 1.3 免疫组化检测

石蜡切片脱蜡至水,微波修复抗原,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶活性,封闭液封闭,一抗:兔抗 WHsAg 多克隆抗体,兔抗 WHcAg 多克隆抗体分别 4℃ 孵育过夜,依次加入二抗及酶标亲和素室温孵育 10min, DABH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色,常规脱水、透明、封片,光镜下观察嗜肝病毒核心抗原的表达情况。

### 1.4 原位杂交检测

按地高辛标记试剂盒说明,使用随机引物法标记双链 DNA 探针,检测探针敏感性、特异性,确定使用浓度。石蜡切片脱蜡至水,20 $\mu$ g/mL 蛋白酶 K

37℃ 消化 30min,预杂交液室温预杂交,Dig-WHc 标记探针煮沸变性 10min,冰浴 5min,滴加到载玻片后覆盖盖玻片,置湿盒中 90℃ 变性 10min,42℃ 杂交过夜,经杂交后洗涤,加入抗 Dig-AP 抗体室温孵育 3h,NBT/BCIP 显色,核固红复染,常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片,光镜观察。

### 1.5 病理学检测

石蜡切片常规 HE 染色,光学显微镜观察其病理改变,根据 Knodell 方案对肝组织病变分四项按严重程度计分,四项总积分作为组织活动指数(HAI)。

### 1.6 图像分析及图像采集

将组织切片置 Olympus 显微镜下( $\times 200$ ),对所测视野进行准确定位后由摄像系统提取数字化细胞图像输入多媒体彩色病理图像分析系统进行处理,每例随机选取 5 个完整而不重叠的视野进行定量分析,测定表面抗原、核心抗原和 c 基因阳性着色颗粒的平均光密度,取每张切片的均值作为该例的测量值。使用 Olympus B $\times$ 51 显微镜( $\times 200$ , $\times 400$ ),Nikon digital camera Dxm 1200 图像采集系统。

### 1.7 结果判定和数据处理

将细胞核和/或细胞质出现棕黄色或蓝紫色颗粒定为阳性。实验数据使用 SAS 8.1 统计软件进行 Cochran-Mantel-Haenszel  $\chi^2$  统计分析,以  $p < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 检测系统的建立

选取 WHV 阳性的土拨鼠肝组织分别应用兔抗 WHsAg 多克隆抗体,兔抗 WHcAg 多克隆抗体进行免疫组化实验,确定了抗 WHs/WHc 多克隆抗体在筛选实验中的最佳稀释度、最佳孵育时间。选取强阳性标本进行一抗、二抗、SP 复合物空白、替代实验,结果均为阴性,选取正常土拨鼠肝组织作为阴性对照结果为阴性,另外以 DHBV 感染的鸭肝组织及正常 BALB/c 小鼠肝组织作为对照检测结果均为阴性。原位杂交实验选取强阳性标本进行探针空白、无关探针对照结果均为阴性,阳性标本采取 Rnase 消化对结果无影响,选取正常土拨鼠肝组织作为对照,结果为阴性。

### 2.2 嗜肝病毒表面、核心抗原表达

WHV 检测系统筛查显示 50 例旱獭肝组织中嗜肝病毒 S 抗原、C 抗原的阳性率分别为 36%(18/50)、26%(13/50),双阳性率为 22%(11/50),核心抗原单阳性为 2 例 4%(2/50),表面抗原单阳性为 7 例 14%(7/50)。核心抗原检测发现棕黄色染色颗

粒主要定位于细胞浆,少数位于细胞核阳性细胞在肝组织中呈散在、簇、片状分布;表面抗原检测发现棕黄色染色颗粒主要定位于细胞浆,阳性细胞在肝组织中呈散在、簇、片状分布(图 1A、1B)。染色模式均与土拨鼠肝组织土拨鼠肝炎病毒表面抗原/核心抗原(WHsAg/WHcAg)免疫组化染色模式很接近。

### 2.3 嗜肝病毒 c 基因检测

WHV 检测系统检测 WHsAg/WHcAg 双阳性标本 11 例显示嗜肝病毒 c 基因阳性为 5 例(45%),紫兰色染色颗粒定位细胞核,阳性细胞在肝组织中呈散在分布(图 1C)。其染色模式与土拨鼠肝组织土拨鼠肝炎病毒 c 基因表达一致。

### 2.4 旱獭肝组织病理改变

50 例肝组织标本中,3 例肝小叶有点/灶状坏死,2 例汇管区可见炎性细胞浸润(图 1D)。根据

Knodell 方案对肝组织病变分四项进行计分,总分作为组织活动指数(HAI)。HAI 评分为 1~2 分的共 5 例,2 分的 2 例;其中 3 例 WHsAg 和 WHcAg 检测阳性。统计学分析进一步表明:肝组织有、无病理改变组间嗜肝病毒表面、核心抗原的阳性率无明显差异(表 1)。

表 1 嗜肝病毒表面、核心抗原表达与旱獭肝脏组织病理学改变的关系

Table 1 Relationship between the expression of surface, core antigen of hepadnavirus and parameter of pathology in liver tissue of marmota

HAI scores	number (n)	Surface antigen	Core antigen
		Positive(%)	Positive(%)
0	45	15(33.3) *	10(22.2) #
1-2	5	3(60.0)	3(60.0)

\*  $P=0.492$  #  $P=0.197$

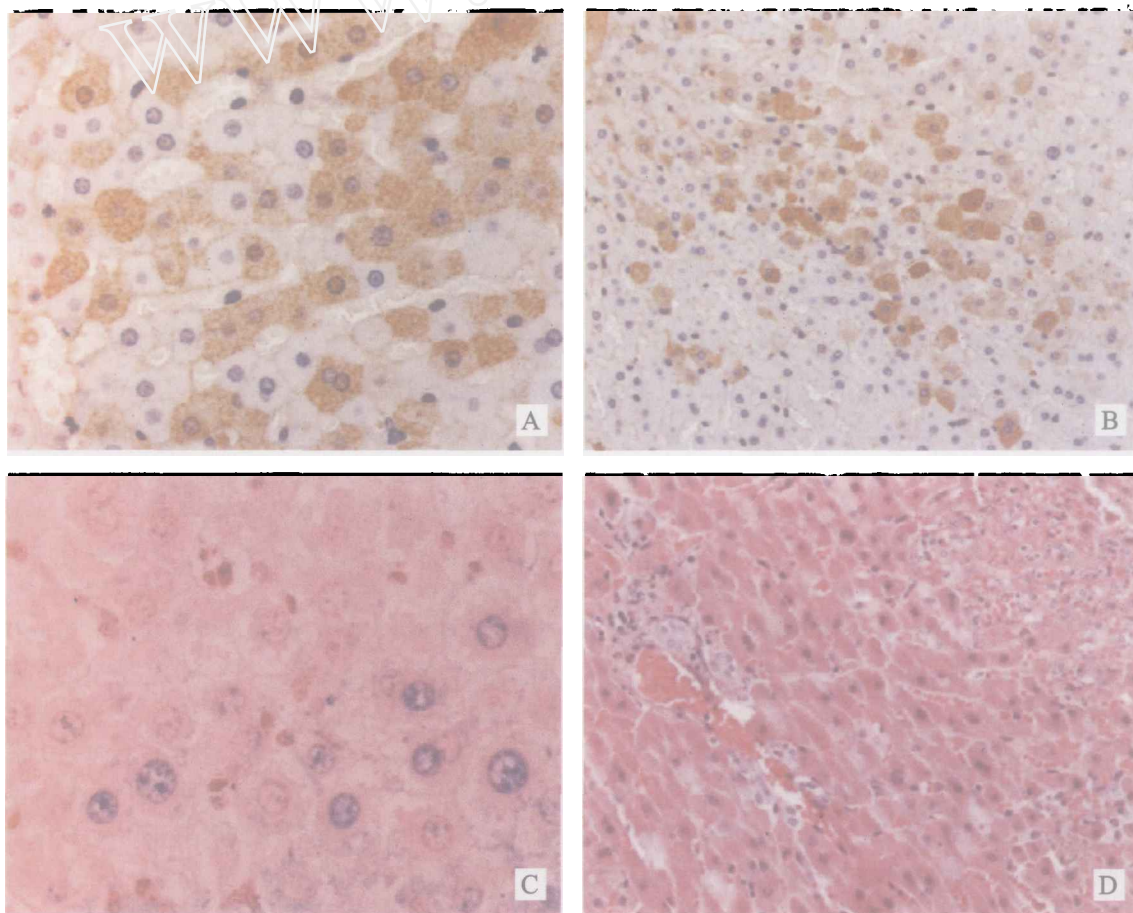


图 1 嗜肝病毒基因表达及青海旱獭肝组织病理的电观察

Fig. 1 Gene expression of Hepadnavirus and liver pathology

A. The positive express of Hepadnavirus surface antigen in *Marmota himalayana* in Qinhai (Sp method); B. The positive express of Hepadnavirus core antigen in *Marmota himalayana* in Qinhai (Sp method); C. The positive express of Hepadnavirus c gene in *Marmota himalayana* in Qinhai as shown by in-situ hybridization; D. Liver pathology of *Marmota himalayana* in Qinhai (Hematoxylin/eosin-staining). Z

### 3 讨论

嗜肝 DNA 病毒科的所有成员都是含双链 DNA 的嗜肝性病毒。分为 2 个亚族:哺乳动物正嗜肝 DNA 病毒属 (*Orthohepadnavirus*) 和禽类嗜肝 DNA 病毒 (*Avianhepadnavirus*)。人乙肝病毒 (HBV)、土拨鼠肝炎病毒 (WHV) 属于正嗜肝 DNA 病毒<sup>[4]</sup>, 同一种属的嗜肝病毒序列有高度同源性, 其中 c 基因更具有保守性, HBV 与 WHV c 基因的同源性可达到 65%, 液相杂交实验可证实其同源性<sup>[5]</sup>。WHVc 基因的编码产物 WHsAg 和 WHV-cAg 具有血清学上的交叉反应性<sup>[6]</sup>; 其核心抗原是具有病毒的种属特异性抗原, 有助于发现嗜肝病毒家族的新成员<sup>[7]</sup>。

由于 HBV 很窄的宿主范围和组织特异性, 难以在普通实验动物中建立疾病模型, 黑猩猩是很好的研究 HBV 的实验动物, 然而来源困难, 费用昂贵, 难以在国内应用; HBV 转基因小鼠模型与人类 HBV 自然感染显著不同难以推广应用; 我国鸭有很高的鸭乙肝病毒感染率, 其形体小、易饲养、价格低廉, 可进行较大样本的研究, 广泛用于嗜肝病毒复制周期和病毒与肝细胞相互作用的研究, 但 DHBV 与 HBV 亲缘性较远, 禽类的新陈代谢和药代动力学与哺乳动物差异很大, DHBV 感染鸭肝脏并无明显的炎症应答, 不适合进行免疫发病机制和筛选抗病毒药物的研究。土拨鼠模型已成为研究嗜肝病毒及其实验感染、致病性以及筛选治疗性疫苗、药物最适合的动物模型, 我国青海地区的喜马拉雅旱獭与 WHV 的宿主美洲东方土拨鼠同目同科同属, 曾有学者发现我国的旱獭群体存在着类似 WHV 的病毒感染。且在不同地区和种属的獭群中感染状况有所不同<sup>[1,2]</sup>。我国的学者也试图利用我国丰富的旱獭资源探索建立嗜肝病毒感染的动物模型<sup>[3,8,9]</sup>。本实验室曾对中国新疆灰旱獭群体进行了嗜肝病毒自然感染的研究, 发现其肝组织中嗜肝病毒表面抗原检出率为 82.2%<sup>[10]</sup>。

基于可靠的检测系统及对照系统的建立以及标准化的筛选策略, 对青海地区 50 份喜马拉雅旱獭肝组织标本进行免疫组化筛查, 结果显示旱獭肝组织中嗜肝病毒表面抗原、核心抗原的阳性率分别为 26% (13/50)、36% (18/50), 染色模式均与土拨鼠肝组织土拨鼠肝炎病毒表面抗原、核心抗原免疫组化染色模式很接近。进一步对抗原筛查双阳性的标本进行了原位杂交检测, 结果显示 10 例中有 4 例为阳性, 染色模式与土拨鼠肝组织一致。以上结果提示

旱獭群体中有可能存在与 WHV 类似的嗜肝病毒感染。此结果为青海喜马拉雅旱獭存在自然感染提供了组织学方面的证据, 将为人工感染提供有价值的实验依据。

另一方面, 病理学检测发现: 喜马拉雅旱獭肝组织病理改变不明显, 偶可见肝细胞肿胀、小叶内点灶状出血坏死, 淋巴细胞和/或中性粒细胞浸润, 肝窦少量淋巴细胞, 汇管区炎性细胞浸润这样的轻度慢性炎症改变。统计学分析进一步表明: 肝组织有、无病理改变组间嗜肝病毒表面、核心抗原的阳性率无明显差异。在 HBV 慢性携带者中可以发现这种现象; 新近的文献显示: 低剂量 WHV 感染土拨鼠时并不出现肝损伤, 而是导致淋巴系统的感染<sup>[11]</sup>。旱獭群体是否也存在病毒的慢性携带或者病毒感染数量的问题还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 刘寿鹏, 姜双应, 易虎, 等. 青海喜马拉雅旱獭类人乙肝病毒的发现及系列验证[J]. 青海医药杂志, 1987, 5(1): 1-3.
- [2] Mai K, Ma L L, Jin Z H, et al. Woodchuck hepatitis virus infection in some colonies of Chinese Marmots[J]. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, 1988, 8: 459-461.
- [3] Jin Z H, Zhao G L, Zhong S S, et al. An experimental transmission of woodchuck hepatitis virus to young Chinese Marmots[J]. *Hepatology*, 1988, 8: 371-373.
- [4] Summers J, Smolec J M, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks[J]. *Med Science*, 1978, 75: 4533-4537.
- [5] Irving Millman, Theresa Halbherr, Heidi Simmons. Immunological cross-reactivities of woodchuck and hepatitis B viral antigens[J]. *Infection and Immunity*, 1982, 35: 752-757.
- [6] Stannard L M, Hantz O, Trepo C. Antigenic cross-reactions between woodchuck hepatitis virus and human hepatitis B virus shown by immune electron microscopy [J]. *J virol*, 1983, 64: 975-980.
- [7] Barbara G. Werner, Jo M. Smolec. Serological relationship of woodchuck hepatitis virus to human hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 1979, 32: 314-322.
- [8] 赵素元, 黄星, 邹林樾, 等. 灰旱獭实验感染 HBV 的血清学反应[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12: 79-81.
- [9] 赵素元, 黄星, 邹林樾, 等. 合成 HBcAg 多肽干预灰旱獭感染 HBV 的实验研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12: 138-140.
- [10] 张珺, 王宝菊, 孟忠吉, 等. 旱獭肝组织中嗜肝病毒表面抗原表达的免疫组化研究[J]. 华中医学杂志, 2003, 27: 231-232.
- [11] Tomasz I. Michalak, Patricia M., Mulrooney, Carla S. Coffin. Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver[J]. *J Virol*, 2004, 78: 1730-1738.