

# 基因疫苗的基础研究及应用现状

聂青和

聂青和,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心  
陕西省西安市 710038  
聂青和,男,1961-01-07生,江西省进贤县人,汉族.1983年青海医学院医疗系  
本科毕业,1993年军医进修学院传染病中心(北京解放军302医院)硕士毕业,  
1998年第三军医大学西南医院全军传染病专科中心博士毕业,1998年9月至  
2000-10为第四军医大学临床医学博士后流动站(传染病学专业)博士后研究  
人员(编号:8458),2000-10至今为第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中  
心副教授、副主任医师、硕士研究生导师,现任第四军医大学唐都医院传染  
病科副主任、第四军医大学传染病学教研室副主任.主要学术研究方向为  
传染病学临床与实验研究,以第一作者发表论文及综述100篇,获军队科技进  
步二等奖1项,三等奖2项,主编学术专著2部、副主编1部,参加17部学术  
专著编写,以第一申请者获国家自然科学基金和中国博士后科学基金资助各1  
项.现任《世界华人消化杂志》、《中国实用内科杂志》、《肝脏》、《胃  
肠病学和肝病杂志》、《中国感染控制杂志》、《实用肝脏病杂志》编  
委、《中华传染病杂志》特邀审稿人.  
项目负责人:聂青和,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐  
都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话:029-3377742 传真:029-3537377  
收稿日期:2002-12-05 接受日期:2002-12-28

## 摘要

基因疫苗已成为疫苗研究领域中的热点之一,特别是其研究  
方向与世界卫生组织儿童免疫长远目标-用一种疫苗预  
防多种疾病相吻合.从效力到成本的潜在优点已使基因疫苗  
成为今后疫苗制造的选择,故澳大利亚昆士兰医学所的  
Waine 和 McManus 在《Parasitology Today》上论证,基因  
疫苗为第三次疫苗革命.令人鼓舞的是艾滋病和T细胞淋巴  
瘤的基因疫苗已进入到了临床前阶段.基因疫苗不仅能预防  
某些传染病,还可做为治疗用疫苗来治疗一些复杂难治的疾  
病,例如病毒性肝炎、癌症等.这些均已显示出基因疫苗  
的巨大潜力和应用前景.但是,基因疫苗的历史毕竟很短,实验  
结果均来自动物,在用于人体之前还有许多工作必须完成,  
其中最重要的是解决基因疫苗对人体的安全性和效力问题,  
例如:(1)须用与人类疾病相关的动物模型证实其效果;(2)  
须用高度敏感的PCR技术等确证所注射的DNA不与宿主  
细胞基因组DNA整合,这是确保DNA疫苗遗传学安全性  
的重要指标之一;(3)最终还需要近期和长期的临床试验以  
明确其毒副作用和免疫保护效果.我国已制定了基因转移治  
疗的管理条例,基因免疫作为预防性基因治疗技术,同样应  
遵守此条例,这样才有利于基因治疗的健康发展.

聂青和.基因疫苗的基础研究及应用现状.世界华人消化杂志 2003;11(2):  
125-129  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/125.htm>

## 0 引言

许多传染病的控制、预防及治疗,近代医学发展中最辉  
煌的篇章.天花已经根绝,伤寒、结核、白喉、麻疹、  
骨髓灰质炎、乙型及丙型病毒性肝炎等的发病率和死  
亡率明显降低.这些医学成就从很大程度上应归功于疫

(菌)苗的研制及预防接种的普及.与传染病抗争最有效和  
最全面的方法是免疫接种,这种制剂被称之为疫苗.疫苗  
的研究历史是短暂的,可划分为三代:第一代是灭活、减  
毒或无毒的完整病原体(整株疫苗);第二代是病原体的蛋  
白、多糖或脂质等结构成分(成分疫苗);第三代是以接种  
的核酸(DNA或RNA)既是载体,又是抗原的来源,具有疫  
苗的功能,可称为基因疫苗或核酸疫苗.基因疫苗最新定  
义为能够编码某种特异性抗原并在人体或动物物体细  
胞内表达这种抗原的DNA或RNA等.因DNA分子较RNA  
分子小、性质稳定、可操作性强,所以,目前研究最多的是  
DNA疫苗,由于此疫苗不需任何化学载体,故又称为裸露  
DNA疫苗(naked DNA vaccine).

## 1 基因疫苗的发展史

传统上用于预防传染病的疫苗有减毒和疫苗的灭活疫  
苗.前者如未充分减毒,可使接种者发生临床型感染;而过  
分灭活或减毒的疫苗有可能不能够有效刺激宿主的免  
疫应答,难以获得可靠的免疫防护.故而人们迫切希望找  
到一种新的安全有效的疫苗.

1990年Wolff et al 试图用注射方法促使小鼠的肌  
细胞吸收质粒DNA以产生新的蛋白质.对照组在注射  
DNA时未加任何化学佐剂,出人意料的是对照组动物的  
肌细胞吸收了这种裸露的质粒DNA后,能高水平地表达  
外源蛋白.Tang et al 于1992年将人生长激素基因的质  
粒DNA导入小鼠表皮细胞后,在小鼠血清中可检测到特  
异的抗人生长激素抗体,从而提出基因免疫的概念.随后  
人们在鱼、鸡、大鼠、兔、猪、牛、雪貂、猴  
和黑猩猩的骨骼肌以及大鼠的心肌中注射裸露DNA,均  
能观察到外源蛋白的持续表达.而且在部分研究中证实,  
此途径引起的免疫应答对野生病毒的攻击具有保护作用.  
这此研究表明,直接给动物接种编码抗原的基因片段  
可使该动物获得对该抗原的免疫力,即将编码某种蛋白  
的处源基因直接导入动物细胞可达到免疫接种的目的.  
这一基因免疫技术的出现,为新型疫苗的研制开路了一  
条崭新途径.所接种的核酸(DNA或RNA)既是载体,又是抗  
原的来源,具有疫苗的功能,可称为基因疫苗或核酸疫苗.

## 2 基因疫苗的作用机制

基因疫苗一般由病原体抗原编码基因和以真核细胞作  
为表达载体的质粒构成.抗原编码基因可以是完整的一  
组基因或单个基因的cDNA;也可以是编码抗原决定  
簇的一段核酸序列.总之,其表达产物为病原体的有效抗  
原成分,可引起保护性免疫.载体质粒多以pBR322或

pUC 质粒为基本骨架,带有细菌复制子(ori),能在大肠杆菌内高效稳定的复制,但缺乏在哺乳动物细胞内复制的能力.质粒载体所带启动子多来源于病毒基因组,如CMV、RSV 和鼠白血病毒长臂末端重复序列(LTR)等启动子.此类启动子具有较强的转录激活作用,能保证抗原基因在真核细胞内有效表达并引起免疫应答.

基因疫苗激活免疫系统的详细机制尚不十分清楚.一般认为,含病原体抗原基因的核酸疫苗被导入宿主骨骼肌细胞或皮肤细胞后,可在细胞内表达病原体的蛋白质抗原,经加工后形成的多肽抗原可与宿主细胞MHC 类和 类分子结合,并被提呈给宿主的免疫识别系统,从而可引起特异性体液和细胞免疫应答.肌细胞吸收和表达处源DNA的效力较高,这可能与肌细胞本身的结构特点有关.肌细胞可形成多核细胞,含有肌质网;骨骼肌和心肌还具有T小管系统,该系统含有细胞外液并能伸入到细胞内部.Wolff et al 发现组织培养的肌细胞T小管和细胞膜穴样内陷可将质粒纳入.Vahlsing et al 认为,肌细胞可能作为一种中心成分直接参与诱导免疫应答.例如,流感病毒NP 基因只有在肌细胞内表达并分泌到胞外,才能刺激机体产生抗 -NP 抗体,介导体液免疫应答;而经肌细胞蛋白酶加工处理后的NP 则可在MHC 类分子的限制下提呈给T淋巴细胞,导致体内CTL 应答.所需刺激信号来源于肌细胞本身,或者来源于注射引起的损伤区域的浸润细胞.另一种观点是,肌细胞的直接参与并非必需,NP 从肌细胞分泌出来后,被巨噬细胞和(或)树突状细胞吞噬、处理、提呈、分别在MHC 和 类分子的限制下,诱导CTL 前体、B 细胞和特异性Th 细胞.还有一种解释是用DNA 免疫时,肌细胞和抗原呈细胞(APCs)均被转染,引起CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群的同时活化,从而产生特异性细胞免疫应答.

### 3 基因疫苗的影响因素

#### 3.1 肌细胞和髓源性APCs 在基因疫苗接种中的作用

3.1.1 骨骼肌细胞在基因疫苗接种中的作用 骨骼肌细胞能够摄取注入其周围的质粒DNA,使通过肌肉注射进行基因疫苗接种的方法显得颇为简单、直接.据报道,局部肌肉注射丁哌卡因或心脏毒素可导肌肉组织损伤,肌纤维在自损伤逐步恢复的过程中对质粒DNA 的摄取会增加,因此有时可借助这种现象提高基因疫苗的接种效率.但是肌组织并非免疫相关组织,因为肌细胞不具有APCs 的特征,不表达MHC- 限制性抗原和各种免疫识别所需的共刺激分子(costimulatory-molecules),不能分泌相应的细胞因子(cytokines);即使有相关共刺激分子的表达或存在粒巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素12(IL-12)等细胞因子的作用,非造血干细胞也不能转变为有效的APCs 细胞.成纤维细胞等非职业性APCs 虽能在体内成功地将抗原呈递给幼稚T 细胞,但这些抗原仅限于那些具有足够的免疫原性、能够克服共刺激分子缺乏的病毒抗原.此外,有一项研究显示,如果肌注质粒

DNA 后10 min 内将注射部位的肌肉切除,并不明显影响针对特异抗原的抗体免疫应答的程度和持续时间,进一步表明在通过肌肉注射途径进行基因疫苗接种时,肌细胞本身对免疫应答并不具有十分重要的作用,亦即肌细胞本身并不参与免疫激活的过程,而只是起一种抗原或基因疫苗运送转站的作用.确实,注射疫苗的肌肉部位也并无明显的炎性细胞浸润,特别是在疫苗接种后的急性效应相消失后.肌肉注射基因疫苗之所以可以启动免疫应答,可能有几个方面的机制:(1)肌细胞是抗原贮存库,可向专业APCs 提供全长蛋白或多肽以诱导免疫应答;(2)处于肌纤维间隔而未被肌细胞摄取质粒DNA 也可因穿刺操作进入血液循环而直接被流经局部的APCs 摄取,并在APCs 内表达;在上述两种情况下,表达抗原的髓源性APCs 随血流迁移入淋巴结组织,在此处激活T 淋巴细胞和B 淋巴细胞;(3)由于表达疫苗抗原的肌细胞易于被CTLs 攻击和破坏,因此其中的质粒DNA 可释放入血而持续转染包括单核-巨噬细胞在内的APCs.

3.1.2 髓源性APCs 在基因疫苗接种中的作用 骨髓重建技术显示髓源性APCs(bone marrow-derived APCs, BM-APCs)在基因疫苗的致免疫机制中具有关键性作用.已观察到携带有质粒疫苗的巨噬细胞自注射部位的肌组织迁移至淋巴结,并在被免疫动物的区域淋巴结和脾脏中发现少量疫苗质粒.基因枪接种后可在局部淋巴结中观察到被转染的树突状细胞;如果在体外将转染有基因疫苗的树突状细胞选择性耗竭,再将未被转染的APCs 回输入动物体内,则不能诱导T 细胞活化.树突状细胞不仅对以质粒DNA 为基础的疫苗接种极为重要,对重组病毒疫苗等顺利发挥活性也十分关键.此外,研究显示应用在体外能发挥最大表达活性的启动子未必能在体内诱导最强的免疫应答,但如果使用一种在树突状细胞内具有较高活性启动子,则可以达到较理想的免疫效果,因此基因疫苗的改建优化应以树突状细胞为基础.

3.2 细菌免疫促进性序列作为基因疫苗免疫佐剂的可能性 近年来发现卡介苗(BCG)具有一定的抗肿瘤活性,表现在可激活NK 细胞、诱导 和 型IFN 的产生等,而用DNA 酶(DNAase)处理则可使之丧失这种活性.进一步分析发现其基因组某些区域富含5'.....GACGTC...3'、5'...AGCGCT...3'、5'...AACGTT...3'等回文结构,而且每一种这样的序列中均含有5'...CpG...3'两个碱基.以后又发现原核生物基因组中几乎平均每16个碱基中就出现一个5'...CpG...3',且胞嘧啶甲基化者高达70-90%.现已基本明确原核生物基因中这种富含5'...CpG...3'且胞嘧啶不被甲基化的序列是一种免疫增强序列(ISS),体外人工合成含有这种序列的寡核苷酸片段(CpG-oligodeoxynucleotides CpG-ODN)也具有免疫佐剂活性;这种5'...CpG...3'基序(motif)可诱导B 细胞增生和合成免疫球蛋白,刺激IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-18 等分泌,其中IL-8 又能诱导NK 细胞产生IFN,这些均有助于应答向Th1 型发展.ISS 在体内外均可激活皮肤来源的树突状细

胞,提示其可能有助于质粒疫苗发挥效应.ISS具有完全弗氏佐剂的作用,而且对宿主无明显毒性.在基因疫苗接种时,ISS可以寡核苷酸的形式与质粒DNA同时应用,也可以在质粒骨架中增加 ISS 的数量以提高质粒疫苗的免疫效果.对于ISS是否具有种属特异性,其 CpG-ODN 中心以外的序列对活性限制性如何,目前尚不清楚.

3.3 异载体同抗原基因疫苗“致敏-强化”接种方案可提高基因疫苗免疫效果 使用基于病毒的可表达某种抗原的同一基因疫苗重复接种(homologous boosting),其缺点之一在于可刺激宿主产生针对疫苗载体的回忆反应,这种回忆反应可以破坏再次进入体内的基因疫苗,从而降低其免疫效果.“异载体疫苗‘致敏强化’接种方案(heterologous prime-boost-regimens)”则克服了这种缺点.该方案采用表达同一抗原但载体不同的基因疫苗先后进行接种,即在初期接种采用抗原性虽然较高但能高效表达编码抗原的、结构较复杂的载体.这种接种方案不仅可克服宿主回忆反应对接种效果的影响,而且可使免疫应答向 Th1 型方向发展,即使是在重组蛋白已启动了Th2型免疫应答的情况下.应用Pbergheei 疟疾模型研究显示,先用质粒载体、继用重组牛痘病毒载体接种的这种“异载体同抗原免疫接种法”有利于产生完全保护,而“同载体同抗原免疫接种法”收效甚微.动物实验还证实,先后分别用基因枪、牛痘病毒、鸟痘病毒将某一种肿瘤抗原接种动物,可显著提高免疫应答.这种先用简单载体(如质粒DNA)继用复杂载体(如牛痘病毒)携带抗原进行免疫接种方案之所以能取得相对理想的结果,可能有以下原因:(1)病毒本身的表达产物,如可溶性分泌性细胞因子受体类似物,有可能干扰初次接种的效果,对弱抗原尤其如此;(2)来自病毒载体的表位较之所携带的弱抗原可能具有免疫优势,在初次免疫时阻碍针对弱抗原的免疫应答并进而削弱加强阶段的免疫应答;但如果初次接种时应用质粒DNA载体避免这种干扰,则在加强接种时由于针对弱抗原的免疫已得到放大,这种病毒表位免疫优势的影响就相对较小;(3)人体可能存在对某些病毒载体的免疫性,增加了应用这些载体进行接种时免疫结果的复杂性.

3.4 免疫因素 理论上,不论宿主的体积大小,一定剂量的基因疫苗均有可能有效诱发特异性免疫应答.但目前各家报道的结果不相一致,难以进行比较.因为许多因素均可影响免疫应答的程度和类型.以质粒DNA为例,表1概括了影响其效果的主要因素.

#### 4 基因疫苗的特点

基因疫苗与传统疫苗相比,具有以下特点:(1)直接DNA接种:避免了制备传统疫苗的繁琐过程;(2)基因疫苗接种后蛋白质抗原可直接与MHC 类和 类分子结合形成免疫复合物,与减毒活疫苗或载体活疫苗一样能引起CTL反应,但不存在后者的毒力回升等危险;(3)基因免疫时产生的抗原多肽的提呈过程和自然感染时相似,以其

天然构象被提呈给免疫识别系统,此一特性对于构象型抗原表位引起的保护性免疫尤为重要,而用目前的重组技术在体外合成的蛋白抗原常造成构象型抗原表位的改变或丢失;(4)基因疫苗具有共同的理化性质为联合免疫提供了可能;(5)作为一种重组质粒,基因疫苗能在大肠杆菌工程菌内快速增生,且提取纯化简便,可大幅度降低成本,省时省力;(6)可以同种异株交叉保护.选择某一种病原体的编码保守蛋白的核酸序列作为基因疫苗,因其不会变异,故可对同一种病原体的变异型或新型产生交叉免疫,从而起到免疫保护作用.这是基因疫苗突出的优点之一.(7)受宿主预存免疫性(pre-existing immunity)的影响很小,这是基因疫苗无可比拟的优点之一;(8)基因疫苗不仅可用于预防,还可用于治疗.

基因疫苗的安全性是人们关心的重要问题.在理论上存在导入的外源DNA整合入宿主细胞基因组的可能,并导致细胞癌基因的顺式或反式激活、抗癌基因的失活等,使细胞发生恶性转化.但通过甲基化分析、酶切分析和PCR等技术的研究结果表明,进入骨骼肌细胞的DNA分子独立存在于细胞质中,未发现复制或整合.另一问题是有可能引起抗-DNA 抗体和自身免疫性疾病.但Robertson 最近研究表明,裸露的双链DNA分子很难引起抗-DNA抗体反应.然而,正如Spier (1995年)指出的那样,我们对基因免疫的机制还远未了解,其安全性有待进一步验证,今后的道路还很长.

#### 5 某些传染病基因疫苗的研究现状

目前,对兽用和人用DNA疫苗的研究日益深入,表2列出已在动物中进行DNA疫苗防治试验的病原体.现就几种重要的人用DNA疫苗的研究现状介绍如下.

表1 质粒DNA疫苗免疫效果的决定因素

影响因素	评论或可供解决的方案
质粒DNA骨架的结构	引入免疫促进性序列或聚腺苷(polyA)序列等将有助于提高免疫效果
导入质粒DNA的剂量	一般越多越好
抗原的表达水平	应使用高效表达抗原的载体;表达的抗原越多,免疫应答的程度越强,尽管未必呈现线性关系
接种间隔	确定各次接种间的合适时间间隔可以大大提高免疫效果
接种途径	合理选择接种方法,如肌肉或皮内注射、基因枪皮肤接种、黏膜接种等
接种的靶组织	不同的接种部位效果不同
接种次数	必须保证足够的次数
报告基因前是否存在内含子	有内含子存在时可以提高接种效果
接种对象的种类	如不同株的小鼠对DNA疫苗的反应性有质和量的差别
接种对象的年龄	较年轻的小鼠免疫应答能力较强
特异性抗原对被转染细胞的毒性	毒性抗原的表达不宜过高

表2 动物中进行DNA疫苗防治试验的病原体

病毒类	鸟流感病毒、牛疱疹病毒、牛病毒性腹泻病毒、登革热病毒、脑炎病毒、猫免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒-1型、人流感病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、麻疹病毒、人乳头状瘤病毒、狂犬病毒、呼吸道合胞病毒、猴免疫缺陷病毒、猴病毒40(SV40)等
细菌类	结核杆菌、牛嗜血杆菌、沙门菌、破伤风杆菌、Burgdorferi 疏螺旋体(Lyme 病病原体)、支原体、立克次体等
寄生虫类	隐孢子虫、利什曼原虫、疟原虫、血吸虫等
真菌类	球孢子菌、新型隐球菌等

**5.1 流感 DNA 疫苗** 1993 年 Robinson et al 直接将编码流感病毒血凝素(HA)的 DNA 肌注小鸡和小鼠,结果这些动物产生了抗 HA 特异性抗体并能抵抗嗣后致死剂量流感病毒的攻击.后来其用 DNA 滴鼻接种,能诱导呼吸道黏膜抗病毒的免疫保护作用.

甲型流感病毒经常发生变异,从而逃避免疫系统的监视,使原有的疫苗对新毒株不起作用.1993 年 Merck 研究室的 Ulmer et al 选择甲型流感病毒中序列保守的核蛋白(NP)基因制备 DNA 疫苗.将高度保守的流感病毒 A/PR/8/34 株的 NP 编码基因接种在 Rous 肉瘤病毒或 CMV 的启动子的控制下.将质粒直接注射 BALB/C 小鼠四头肌后, NP 基因在小鼠内转录成 mRNA 后表达 NP 蛋白.在致死剂量同型病毒异源毒株 A/HK/68 或 A/PR/8/34 株(两株为不同亚型,分离时间相隔 34 a)的攻击下,免疫小鼠的存活率为 90%,而注射空白载体(无 NP 序列)的小鼠存活率为 0,未注射的小鼠存活率为 20%.经纯化的 NP 蛋白免疫后产生抗 -NP 蛋白抗体的小鼠以及输入高效价的抗 NP 抗体小鼠,均不能抵抗病毒攻击,说明抗 -NP 蛋白抗体介导的体液免疫无效,而 CTL 介导的细胞免疫则能防御动物感染流感病毒,可见基因疫苗的作用机制与传统疫苗不同:编码 NP 的外源 DNA 在宿主细胞内表达,可产生 NP 蛋白,经加工处理后与 MHC 类分子形成复合物,提呈到细胞表面,CTL 能加以识别并发挥杀伤作用.此种疫苗可抵抗发生显著变异的各型甲型流感病毒.

**5.2 艾滋病 DNA 疫苗** 1993 年 Wistar 研究所的科学家给小鼠和非人灵长类动物的肌肉注射含有 HIV-1 包膜蛋白(env)基因的质粒 PM160,结果产生了抗 HIV-1(env)的特异性抗体,他能中和 HIV-1 的感染,在体外能抑制 HIV-1 介导的合胞体形成以及 CD4 与 gp120 结合.同时还观察到特异性 T 细胞和 CTL 应答,表明 HIV-1 env DNA 可在宿主肌细胞内表达和加工.表达产物 gp160 被切割成 gp120 和 gp41 后,可折叠成天然结构,从而诱导全面的免疫反应.诱生的特异性抗体不仅可与 gp120 和 gp41 结合,还能与 tat、tev 基因产物反应,这是 mRNA 发生剪接的结果.

美国 Agracetus 公司正在非人灵长类动物中试验 HIV 和猴免疫缺陷病毒(SIV)gp120 亚单位疫苗,预计进入人体试验至少还需 1 a.质粒 DNA gp120 和重组 DNA gp120 不同,后者为细胞外传递,而前者由细胞内表达产生.因此,虽然 gp120 疫苗在其他系统中效果不佳,但其 DNA 疫苗可

能有效.研制艾滋病疫苗的最大障碍之一就是 HIV 是一种变异率极高的 RNA 病毒,对某些 HIV 株有效的疫苗对同时大量存在的变异株可能完全无效.上述流感疫苗的研究结果给艾滋疫苗的研究提供了一条新思路,HIV 包膜蛋白变异性很大,这与流感病毒相似,但其核心蛋白高度保守.因此,通过基因疫苗方法将 HIV-C cDNA 导入体内,表达 C 蛋白后,借助 CTL 介导的细胞免疫,能否预防 HIV 感染,颇值得探索.同理,也为目前面临困境的丙型肝炎疫苗研制提供一条新思路,具有一定指导意义.

**5.3 狂犬病 DNA 疫苗** 狂犬病病毒(RV)糖蛋白与 RV 的致病性有关,又可诱生保护性中和抗体.1994 年 Xiang et al 将编码 RV 糖蛋白的 cDNA 插入质粒 DNA,在 AV40 早期启动控制下表达.用该质粒 CAN 直接注射小鼠腓肠肌,免疫 3 次,间隔 2-3 wk,150 μg/次,免疫后小鼠产生了抗 -PN 中和抗体、抗 -PV 糖蛋白特异性 CTL 和分泌淋巴因子的 Th 细胞,末次免疫后 2 wk 用半数致死量(LD<sub>50</sub>)病毒标准株(CVS)攻击,结果均获得完全保护;而用空白载体质粒免疫的对照组在相同剂量攻击下 14 d 内全部死亡.

**5.4 乙型肝炎 DNA 疫苗** 由于 HBV 变异及宿主免疫耐受等因素,使乙肝疫苗接种可能失败,给乙肝预防带来困难.基因疫苗能否解决这些问题,值得研究. Davis 和 Whalen 已在小鼠中证明含编码 HBsAg 及 preS 基因并有真核细胞启动子的重组质粒 DNA 免疫,可诱生抗 -HBS 和致敏 CTL 产生.最近,在黑猩猩中进行的实验说明,用 2 mg 裸 DNA 作肌肉注射,一次免疫力后即可诱生抗 HBs 达 100 mIU/mL.再刺激后,抗 -HBs 效价可达 14 000 mIU/mL.然而仅用 400 μg 的 HBV-DNA 免疫则一次免疫后未能测出抗 -HBs,如再刺激后,则仅有 60 mIU/mL,而且抗 -HBs 持续时间短暂.实验结果提示,这种疫苗不仅可预防 HBV 感染,而且极可能发展为可供治疗乙肝患者的治疗用疫苗.

**5.5 单纯疱疹 DNA 疫苗** 最近 Kriesel et al 将编码 HSV-2 型 gD<sub>2</sub> 和 pRSVmt 免疫 DALB/c 小鼠,13 d 后用半数致死量的 HSV 攻击,获得满意结果,而对照组的小鼠均先后死亡,表明单纯疱疹 DNA 疫苗对动物有保护性作用.

**5.6 结核病 DNA 疫苗** 麻风杆菌中 Mr 为 65 kD 的热休克蛋白具有高度保守性,他与结核杆菌的抗原非常相似,单独以该抗原免疫即可获得有效的保护作用.1994 年 Lowrie et al 以含该基因的质粒 DNA 肌注免疫小鼠用结核杆菌感染,然后检查肝脏内的活菌数,结果表明,裸露 DNA 免疫与常规卡介苗有相似的保护作用.

**5.7 疟疾 DNA 疫苗** 1994 年 Sedegah et al 构建的质粒 DNA 中含有编码尤氏疟原虫环孢子蛋白(PyCSP)的基因.该疫苗与目前试验中的疫苗(辐射处理的孢子)相比,能诱导更高水平的抗 -PyCSP 抗体和 CTL,并使 16 只免疫小鼠中的 9 只获得了对疟原虫感染的防御作用.最近研究表明疟疾基因疫苗有可能成为最早用于人类的基因疫苗.

**5.8 真菌 DNA 疫苗** 真菌在自然界广泛存在,但临床上所见到的严重真菌感染者多有自身免疫功能不同程度的缺陷或抑制.近些年来,由于皮质激素、广谱抗生素、免

疫抑制剂的广泛应用,导管插管、腹膜透析、放疗等侵入性诊疗操作大量开展以及艾滋病的出现,使深部真菌病日益多见.目前认为治疗真菌除了抗真菌药外,还需使机体处于高免疫状态.基于这种情况,真菌疫苗的研制工作显得尤为重要,也是近年来基因疫苗研究活跃的领域之一.(1)球孢子菌DNA疫苗:球孢子菌可通过被吸入其分生孢子途径感染人体,引起球孢子菌病.大多数可以在宿主体内刺激免疫反应,能有效控制疾病进展,对再次感染提供持久的保护作用,因此疫苗的研制很重要,他可能提供与自然的获得性感染相同的保护作用.研究证实,抗球孢子感染主要依赖T细胞介导的免疫.几种候选疫苗如PRAcDNA、疫苗Ag2cDNA、疫苗UTEcDNA疫苗等已被发现可用于抗实验小鼠球孢子菌感染.(2)副球孢子菌DNA疫苗:副球孢子菌是一种二态的真菌,可引起副球孢子菌病(PCM),主要通过吸入副球孢子菌繁殖体引起,慢性感染常累及肺部.实验性的和临床证据表明,宿主体内的细胞免疫比体液免疫能更有效地抵抗和控制副球孢

子菌的感染,也表明削弱DTH反应与疾病严重程度之间的关系.研究显示,副球孢子菌象其他的真菌一样,细胞介导的免疫是最主要的防御机制.(3)两种可能用于DNA免疫的基因:新型隐球菌是一种具有荚膜的酵母样真菌,主要引起艾滋病及一些免疫功能低下的患者并发隐球菌病,最常侵犯中枢神经系统,已成为艾滋病患者并发致死性脑膜炎的主要病因之一.早期的研究证实,形成荚膜是新型隐球菌主要的毒力因素之一.Alejandra et al于2000年研究发现,从隐球菌培养滤液中分离出的一种DHAI基因产物与DTH反应有关.DHAI基因可以激发DTH反应.如果这种DTH反应与保护作用有关,那么DHAI基因可以用于DNA疫苗的研制.Levitz et al于2001年报道用新型隐球菌的CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞杂交瘤免疫C57BL/6小鼠,发现一种刺激CD4细胞杂交瘤的隐球菌基因,该基因可以编码一种98 kD的蛋白,命名为MP98,MP98可刺激T细胞应答.该基因已被克隆测序,因其基因产物可刺激T细胞应答,所以编码MPR的基因有可能用于研制DNA疫苗.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

## 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心简介

第四军医大学第二附属医院(唐都医院)是一所集临床医疗、教学、科研为一体的三级甲等大型综合医院,拥有1000张病床,坐落在古城西安市灞桥区.第四军医大学传染病学学科组建于1949年秋,初为我校第一附属医院(西京医院)传染内科,1969年组建第二附属医院(唐都医院)传染内科.1996年因学科建设需要将两所医院传染内科合并于唐都医院,正式成立第四军医大学唐都医院传染内科,现拥有病房80张,3个门诊部(西京医院、唐都医院、唐都医院第二门诊部)和3个专业实验室(流行性出血热研究室、肝病研究室和艾滋病研究室)及第四军医大学传染病学教研室.

我科有较高的学术地位和声誉,为国内首批(1978年)传染病学硕士授权学科和军队第一个传染病学博士学位授权学科(1986年)及临床医学博士后流动站组成学科(1995年).现为国家级重点学科、国家“211工程”重点建设学科、陕西省首批医学重点学科、国家“长江学者奖励计划”特聘教授设岗学科及全军感染病诊疗中心.

我科现有教授/主任医师6名,副教授/副主任医师5名(其中博士生导师4名、硕士生导师4名),主治医师/讲师10名,主管技师2名.目前在位的主系列科技工作者85%以上具有医学博士学位.

自“七五”以来,我科以第一申请者获国家自然科学基金资助课题18项,军队和陕西省各类科研基金10项,国际合作科研基金课题1项,中国博士后科学基金资助项目3项.1998年获国家科技进步二等奖1项,以主要完成人获国家科技进步二等奖2项.主编学术专著10部,发表论文500余篇.已培养博士研究生38名(毕业25名),培养硕士研究生60名(毕业52名),3位博士后研究人员完成规定的科研任务后出站工作.我科肝病研究室现主要研究方向为慢性肝病的基因治疗、病毒性乙型和丙型肝炎分子发病机制研究、肝干细胞基础研究、HCV母婴传播分子机制及肝纤维化逆转研究等.

封面图片:图1第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心部分人员合影.图2免疫荧光法检测2.2.15细胞内HBeAg阳性表达( $\times 400$ ).图3表达HCV-C抗原的腺病毒载体感染HepG2细胞后以抗HCV-C McAb为一抗进行的间接免疫荧光试验阳性( $\times 200$ ).图4 ayw转基因小鼠肝组织中HBcAg阳性表达(免疫组化, BAROEnson法 $\times 400$ ).图5原位杂交法检测肝癌组织中TIMP-1 mRNA阳性表达( $\times 400$ ).图6原位杂交法检测肝硬化组织中TIMP-1 mRNA阳性表达( $\times 200$ ).图7包装HCV-C抗原腺病毒载体感染的293细胞电镜照片.图8免疫诱导型肝纤维化大鼠肝组织电镜所示激活的肝星状细胞.

联系电话: 029-3377452(主任办);3377752(一病区护士办);3377742(二病区护士办);3377595(实验室)

传 真: 029-3537377

通讯地址: 710038,陕西省西安市新寺路第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. cidtdx@fmmu.edu.cn

# 抗HBV感染治疗中患者体内病毒学和耐药性等因素的动态变化及其临床意义

王福生

王福生,中国人民解放军第302医院全军艾滋病与病毒性肝炎重点实验室  
北京市 100039

王福生,男,1962-08-31生,安徽省枞阳县人,汉族,1984年蚌埠医学院本科毕业,1992年军事医学科学院博士研究生毕业.现任解放军第302医院传染病研究所副所长,研究员,教授,博士生导师,主要从事传染病和肿瘤的发病机制和生物治疗的研究.

国家自然科学基金资助重点课题, No.7011005

项目负责人:王福生,100039,北京市丰台区西四环中路100号,中国人民解放军第302医院生物工程室. fswang@public.bta.net.cn

电话:010-66933332 传真:010-63831870

收稿日期:2002-08-24 接受日期:2002-10-03

## 摘要

近年来应用即时荧光定量 PCR 技术对慢性乙型肝炎患者体内病毒载量动态变化进行分析,结合临床症状、肝功能以及相关资料,不仅有助于探讨乙肝致病机制,而且有助于判断慢性感染的进程和临床结局.根据不同患者病毒载量动态变化规律、耐药性和病毒准种的特点及其临床意义,适时调整治疗策略,进而指导临床医师开展有针对性的个体化抗病毒序贯治疗.

王福生.抗HBV感染治疗中患者体内病毒学和耐药性等因素的动态变化及其临床意义.世界华人消化杂志 2003;11(2):130-133

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/130.htm>

## 0 引言

目前国内外盛行的干扰素、核苷类似物(如:拉米夫定,以下简称为3TC)治疗急性和慢性乙型肝炎取得了较好的抗病毒治疗效果,但是由于病毒准种变化、耐药性产生以及针对干扰素中和抗体的出现,也可导致抗病毒治疗的失败,在一定程度上限制了他们的应用<sup>[1]</sup>.近来随着核酸定量技术的发展,我们能够即时检测病毒在体内复制、表达的动态变化,这样患者在接受抗病毒治疗过程中,使我们可以进一步及时监测患者体内病毒的水平,并和患者肝功能和相关临床指标进行比较,从而对及时了解病情的进展,更好的指导临床进行针对性、个体化治疗<sup>[2-5]</sup>.本文就慢性乙肝接受抗感染治疗过程中,病毒载量、耐药性等的研究方法、他们的动态变化特点和临床意义等内容进行综述.

1 病毒载量检测与ALT水平以及免疫学指标的相互关系  
在慢性乙型肝炎的治疗过程中,临床医师通常把血清HBV病毒载量水平、免疫学指标、ALT水平等作为评价抗病毒疗效的指标.在此基础上对乙型肝炎的病原学诊断、疾病进程和预后进行分析.病毒载量一般指

每毫升血清(浆)中病毒拷贝数,也可用于表示单位肝脏组织中病毒含量.病毒载量可以通过测定病毒基因组来确定.目前即时荧光定量PCR方法可以达到标准化、简单化、自动化以及同时对多种已知病毒株进行定量分析<sup>[6,7]</sup>,已经改变了我们对乙肝病毒感染的传统认识.

对慢性活动性肝炎(CAH)干扰素(以下简称为IFN)治疗期间的研究显示<sup>[8]</sup>,抗-HBc IgM和病毒载量有很好的相关性.比较乙肝患者免疫指标与血清HBV DNA水平,发现HBeAg阳性患者血清HBV DNA显著高于阴转和HBsAg携带者;康复患者血清HBV DNA低于可检出水平.但是,乙肝病毒的表达和机体的免疫反应的强弱受多种因素的影响,免疫学指标与临床现象及病毒载量有可能不完全吻合<sup>[9-11]</sup>.由于抗病毒药物的广泛使用,病毒变异的广泛存在,仅仅依靠免疫学指标已经不能完全解释许多临床现象.血清学检测不能完全代替病毒载量的检测.病毒载量定量检测相对于病毒定性检测是一大进步,使我们能够比较清楚地了解病毒在体内的致病作用,在病因、疾病进程、预后和传染性分析等方面弥补了免疫学方法的不足.

病毒载量是比血清学更加量化的指标.目前,病毒载量在反映临床现象及其变化趋势方面,比血清学指标可能更加准确和灵敏.他不仅仅是作为血清学指标的必要补充和参考依据.实际上,病毒载量单项测定也有重要参考价值.报道认为<sup>[12]</sup>,HBeAg阳性患者的病毒载量比HBeAg阴性患者高.在HBeAg阴性的患者中,血清HBV DNA水平与丙氨酸转氨酶(ALT)活性高度相关.HBV DNA水平小于 $10^5$ /mL,ALT水平一般表现为正常;大于 $10^7$ /mL,ALT一般表现为升高.与病毒载量低的患者相比,病毒载量高的患者,更可能进展为肝内肿瘤转移和重度或中度活动性肝炎<sup>[18]</sup>.病毒载量也能反映患者的传染性,甚至比HBeAg更灵敏.

Nagata et al<sup>[13]</sup>连续观察了慢性乙型肝炎患者接受INF治疗期间和治疗后18 mo内的血清病毒载量的动态变化.治疗4 wk后对INF无反应性的患者和有反应的患者病毒载量有明显的差别.他们还发现即使抗HBs抗体已经阴转,HBV DNA检出率仍很高.Schlaak et al<sup>[14]</sup>通过血清HBV DNA定量测定,发现白介素-12(IL-12)对HBV诱导的免疫反应的共刺激作用与病毒载量有关.这些研究说明,病毒载量实时、动态检测可以帮助我们判断一种药物的抗病毒效果,分析机体免疫反应的机制.对尽早预测治疗方案的可行性,以便及时调整治疗策略,也有积极意义.

2 病毒载量动态检测与乙型肝炎病毒感染动力学研究  
Ribeiro et al<sup>[15]</sup>认为在研究病毒水平的动态变化时,引入一些数学分析模型及方法非常重要,他们有助于我们理解体内病毒复制、病毒清除以及HBV感染细胞的转换(Virus-infected cell turnover)的动态变化。在此基础上,我们可以设计更有效的治疗方案,更重要的是这些方法不仅是确定药物治疗有效性的定量手段,而且使我们能深入阐明抗病毒药物(如干扰素,3TC)的作用机制。特别是有助于阐明病毒学因素动态变化与治疗效果之间的相关性。更重要的是了解病毒感染动力学过程,可以更清楚的理解病毒感染发生、发展、转归以及药物治疗效果,因而直接指导临床抗病毒治疗。此外还能回答在治疗过程中需要确切知道的一些问题,例如患者体内病毒被清除的半衰期有多长?潜伏病毒库的大小?随着病毒载量动态检测技术的进一步发展和应用,上述问题将被进一步阐明,从而为彻底清除病毒、解决病毒反弹问题指明努力的方向。Nowak et al<sup>[16]</sup>通过假设拉米夫定完全阻断了新感染细胞的产生,感染细胞维持恒定,建立了一个数学模型。他们得出了病毒清除表现为双期过程的结论。表1中列出了HBV体内动态变化的一些重要参数。

表1 慢性活动性乙肝患者体内HBV病毒载量的动力学参数

	Adefovir 治疗	拉米夫定治疗
血中游离病毒		
半衰期	26.4 h	12-15 h
平均生活周期	36.9 h	34.6 h
每日产生	$2.1 \times 10^{12}$ 拷贝/d	$10^{11}$ 拷贝/d
病毒载量	$1.9 \times 10^{12}$ 拷贝/mL	$2 \times 10^{11}$ 拷贝/mL
感染细胞		
半衰期	11-13 d	10-100 d
平均生活周期	23.3 d	23.3 d
每日更新率	2.3-6.2 %	1-7 %

在临床中,可能还有一些病毒准种、抗病毒免疫应答等因素的差异,影响病毒载量的动态变化水平,到目前为止,所应用的数学等模型基于HCV和HIV的研究结果,但是HBV是DNA病毒,可能需要考虑到HBV产生共价闭合环状DNA分子的特点和动态变化、感染细胞的复制、通过非溶解机制导致感染状态的清除及其他未知因素等,所以可能建立一种更特异的HBV动态模型也许更合适<sup>[15]</sup>。为此Tsiang et al<sup>[7]</sup>对Nowak数学模型作了修正,他们的模型评价了adefovir dipivoxil的II期临床药效,得出30 mg/d adefovir dipivoxil对病毒的抑制效率为99.3%,即治疗期间每天仍有0.7%的病毒产生。他们将病毒载量检测的敏感性提高到400拷贝/mL。

London-Blumberg假设,肝脏由二群肝细胞组成,处于不同发育阶段,低分化细胞群,对病毒复制有抗性,称为R细胞,高分化细胞群,对病毒复制比较易感,为S细胞。Payer et al根据这一假设建立了London-Blumberg模型,他们的研究显示:对感染S细胞的免疫反应决定了感

染初期疾病的严重性,也控制了持续性肝炎表现为无症状还是有症状。而对感染R细胞的免疫反应决定了是否进展为持续性肝病。这可以解释为什么HBsAg的保护性抗体在急性感染后几个月才能检出。该模型还解释了HBV引起的种种症状的年龄依赖性,以及病毒诱发的肝癌并不随着病毒的感染而马上发生,而是有一段较长时间滞后。

Whalley et al<sup>[17]</sup>研究结果提示感染细胞中cccDNA非细胞裂解清除可能发生在第1阶段。在病毒复制高峰每天至少产生 $10^{11}$ - $10^{13}$ 个病毒,平均一个感染肝细胞1d最多能产生200-1000个病毒。在病毒复制高峰,每天都可能发生各种HBV基因突变<sup>[18]</sup>。

3 病毒载量动态检测与乙肝病毒感染肝外细胞的研究  
在研究乙型肝炎发病的宿主机制时,一个很自然的问题是乙肝病毒为什么具有嗜肝性,乙肝病毒是否也能感染肝外细胞?为什么大部分病毒能被机体(以及药物)清除,而一部分病毒仍在体内潜伏,从而使病情反复迁延。这些病毒潜伏在哪些种类的肝外细胞?对乙肝病毒动态检测能够回答病毒潜伏在哪些细胞以及潜伏病毒的类型(野生型、突变型)。Trippier et al<sup>[18]</sup>正是通过时病毒载量的检测发现了HBV急、慢性感染者外周血单核细胞(PBMCs)中存在病毒,病毒载量约1个拷贝/HBV阳性细胞<sup>[19]</sup>。他们报道单核细胞和B细胞感染率最高,其次是CD8<sup>+</sup>T细胞, NK细胞, CD4<sup>+</sup>T细胞。因为慢性感染者HBV阳性细胞的频率是急性感染者的50-500倍,这一结果我们可以理解为HBV在PBMCs中的半衰期很长,他可能参与了HBV持续感染;通过测定PBMCs的感染率可能是判断疾病慢性化、持续化的指标。当然这种推测尚需要通过病毒DNA动态检测来验证。

#### 4 病毒载量动态检测与乙型肝炎治疗

在不同患者、不同发病阶段、不同发病类型(如急性和慢性,单纯HBV感染和多种肝炎病毒共感染)中,相同数值的病毒载量可能表示不同的临床意义。因为病毒载量反映的是检测前感染细胞释放的病毒与被清除出体外的病毒的累积差值,其数值与感染细胞的破坏速度和机体清除游离病毒的速度有关。而游离病毒的清除速率又可能与免疫反应和病毒载量高低有关。病毒载量和免疫反应间可能又相互影响,病毒载量不同,诱发的免疫反应可能不同。因此,从客观上反映病毒复制状况应该是连续检测病毒载量的动态变化,结合临床现象和病情进展把握疾病演化的方向。

Wolter et al应用拉米夫定进行抗病毒治疗后,在48h(第0h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 40h和48h)内多次收集标本,详细分析了不同剂量3TC治疗后病毒载量、转氨酶等指标动态变化,也发现病毒载量的下降呈二个阶段,第一阶段是在1wk之内病毒水平下降较快,主要是因为游离的病毒被较快清除;第二阶段是持续2-4wk以

后病毒载量下降较缓慢,是HBV感染的细胞(如血细胞、肝细胞)的分裂和死亡,导致病毒颗粒的丢失.在这两个阶段,病毒的复制水平和机体清除病毒的能力相互消长,主要表现为拉米夫定抑制了HBV的复制,使体内HBV的来源减少,同时拉米夫定的治疗可激活机体的免疫功能<sup>[20]</sup>. Boni et al<sup>[21]</sup>认为3TC能使多数HBeAg的患者突破T功能低下的状态,通过增强机体细胞免疫反应.尤其是能提高特异性CTL应答水平,后者通过细胞溶解机制和非细胞溶解机制是体内病毒的清除下降.不过,不是药物本身使患者体内免疫耐受或功能降低的CTL恢复,是病毒下降而产生间接诱导作用所致.

以前的报道显示HBeAg转换在ALT高水平患者中更常见,由于是感染肝细胞高水平的转换(higher turnover),引起了血清中HBeAg抗原快速转换,有报道拉米夫定治疗后可引起持久的HBeAg下降,个别甚至是HBsAg的转阴.本研究最显著的特点是在治疗初期多次检测HBV载量,发现游离病毒清除半衰期是12-15 h,比以前报道的大约1 d时间要短,而且数据更准确<sup>[20]</sup>.

## 5 HBV产生耐药性及其临床意义

对拉米夫定治疗无效有明确的定义,即在3TC治疗数月后病毒继续活跃复制和HBV出现耐药性YMDD变异这两种情况都被认为是3TC治疗的失败.然而这两种情况发生的机制不同.第一种情况可能是患者体内的HBV并未发生变异,而是机体对3TC不能很好的吸收,肝细胞对3TC不能有效摄入或者产生磷酸化,这些宿主特异性因素导致3TC治疗失败,所以HBV仍然活跃复制.第二种情况可能是由于HBV发生基因变异,产生了耐药性,当停止治疗后,野生型病毒株逐渐恢复,但是在停药后4 mo后,仍然可以检测出耐药性病毒株.最常见的是YMDD变异. HBV-DNA聚合酶由p基因编码产生, YMDD基因位于p基因C区,是DNA聚合酶的活性部位. 3TC即是通过结合该部位干扰HBV的复制. YMDD变异常见两种形式,一种是编码的蛋氨酸被异亮氨酸取代(M552I),另一种是蛋氨酸被缬氨酸取代(M552V).在使用拉米夫定的前6 mo中,很少出现YMDD变异;但随着疗程的延长, YMDD变异率迅速增加.在用药的第12月时, HBV基因发生变异的机率为14-31%.发生YMDD变异的患者有以下一些特点: (1)变异HBV株复制水平和毒力较低; (2)变异毒株对3TC产生耐药性; (3)连续使用3TC仍可维持较低的病毒载量和血清ALT水平,部分患者还可能出现HBeAg血清转换和组织学上的改善; (4)以前接受过3TC治疗,患者体内存在变异的耐药株,再次使用3TC治疗时,仅野生型病毒复制被抑制,而变异的耐药株仍然断续复制,因而表现为3TC治疗后的几周中病毒载量下降的趋势减缓.此外,由于病毒准种和产生中和抗体的缘故, -干扰素疗效同样受到严重限制.

特别值得指出的是,由于目前使用的检测方法及敏感

性的限制,未检测到变异的HBV株不一定代表体内未出现病毒变异. Stuyver et al<sup>[22]</sup>应用INNO-LiPA DR-PCR检测法,可以检测到 $10^3$ 拷贝/mL水平,只要变异株占病毒准种的4-8%即可被检出.这表明在以往3TC治疗的患者中,的确可能存在变异HBV的感染,只是未能检测而已.

停药后反弹是目前乙肝治疗的一个瓶颈,其原因包括耐药病毒株低水平复制和野生型病毒株高水平复制两个部分<sup>[23-26]</sup>.要控制病毒反弹,除了在治疗早期开始观察病毒载量的动态变化,还应该直接对耐药株进行病毒载量的动态测定.特别值得提出的是在3TC等药物抗病毒治疗过程中或停药后,如何避免病毒的反弹?如何减少耐药株的产生?如何减少副作用?对以前接受过3TC治疗的患者,如何提高再次使用3TC等药物的治疗效果等,是临床医师们最关心的问题参考文献<sup>[27]</sup>.为了解决这些问题,目前专家们相继提出了联合序贯等不同的新型治疗方案.有望在今后的临床治疗实践中,抗HBV感染的治疗方案将不断完善.

## 6 参考文献

- 1 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 2000;46: 562-568
- 2 Clementi M. Quantitative molecular analysis of virus expression and replication. *J Clin Microbiol* 2000;38:2030-2036
- 3 Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clin Diagn Virol* 1998;10:25-47
- 4 Noborg U, Gusdal A, Pisa EK, Hedrum A, Lindh M. Automated quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by using the Cobas Amplicor HBV monitor test. *J Clin Microbiol* 1999;37:2793-2797
- 5 Weinberger KM, Wiedenmann E, Bohm S, Jilg W. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Virol Methods* 2000;85:75-82
- 6 Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, Tanaka S, Yoshida M, Kohara M. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2899-2903
- 7 Tsiang M, Rooney JF, Toole JJ, Gibbs CS. Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy. *Hepatology* 1999;29:1863-1869
- 8 Gerken G, Gomes J, Lampertico P, Colombo M, Rothaar T, Trippler M, Colucci G. Clinical evaluation and applications of the Amplicor HBV Monitor test, a quantitative HBV DNA PCR assay. *J Virol Methods* 1998;74:155-165
- 9 Chemin I, Zoulim F, Merle P, Arkhis A, Chevallier M, Kay A, Cova L, Chevallier P, Mandrand B, Trepo C. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol* 2001;34:447-454
- 10 Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol* 2001;64:312-319
- 11 Weston SR, Martin P. Serological and molecular testing in viral hepatitis: an update. *Can J Gastroenterol* 2001;15:177-184
- 12 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A. Correlation between serum transaminase activity and virus load among patients with chronic liver disease type B. *Hepatol Res* 2001; 21:159-168
- 13 Nagata I, Colucci G, Gregorio GV, Cheeseman P, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1999; 30: 965-969

- 14 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. The presence of high amounts of HBV-DNA in serum is associated with suppressed costimulatory effects of interleukin 12 on HBV-induced immune response. *J Hepatol* 1999;30:353-358
- 15 Ribeiro RM, Perelson AS. Hepatitis B virus viral dynamics: effects of drug dose and baseline alanine aminotransferase. *J Hepatol* 2002;37:277-279
- 16 Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-4402
- 17 Whalley SA, Murray JM, Brown D, Webster GJ, Emery VC, Dusheiko GM, Perelson AS. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* 2001;193:847-854
- 18 Trippler M, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods* 1999;78:129-147
- 19 Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, Levi-Drummer RS, Neumann AU, Schalm SW, de Man RA. The influence of baseline characteristics on viral dynamic parameters in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *J Hepatol* 2002; 37:253-258
- 20 Payne RJ, Nowak MA, Blumberg BS. The dynamics of hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6542-6546
- 21 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertolotti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971
- 22 Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, RimLand D, Schinazi RF, Rossau R. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:284-291
- 23 Puchhammer-Stockl E, Mandl CW, Kletzmayr J, Holzmann H, Hofmann A, Aberle SW, Heinz FX, Watschinger B, Hofmann H. Monitoring the virus load can predict the emergence of drug-resistant hepatitis B virus strains in renal transplantation patients during lamivudine therapy. *J Infect Dis* 2000;181:2063-2066
- 24 Buti M, Sanchez F, Cotrina M, Jardi R, Rodriguez F, Esteban R, Guardia J. Quantitative hepatitis B virus DNA testing for the early prediction of the maintenance of response during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 2001;183:1277-1280
- 25 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology* 2001;34:583-589
- 26 Da Silva LC, Pinho JR, Sitnik R, Da Fonseca LE, Carrilho FJ. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine doses for the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2001; 36:476-485
- 27 王小众, 陈运新, 马连生, 马景云, 潘伯荣. 中国慢性乙型肝炎抗病毒治疗的现状. *世界华人消化杂志* 2002; 10:745-748

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版电子版目次

2003 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm> 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm>

2003 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

以上电子版如您需要请 email 回复, 免费提供您使用. Email 地址: [wjg@wjgnet.com](mailto:wjg@wjgnet.com). 以后将新出版的世界华人消化杂志(月刊 15 日出版)和 World J Gastroenterol 电子版(月刊 15 日出版)电子版用 email 发给您收. 希望您推荐 10 位消化专业工作者的 email 地址, 让您的朋友也能获得电子版.

(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)

# 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义

苏 勤,张 伟,刘 节,王淑芳,Kunio Takegoshi,Claus H Schröder

苏勤,张伟,刘节,王淑芳,中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科  
陕西省西安市 710038  
Claus H Schröder,德国癌症研究中心病毒-宿主关系分部,D-69120,  
Heidelberg, Germany  
Kunio Takegoshi,Takegoshi 内科医院 Takaoka, Toyama, 933-0014 Japan  
苏勤,男,1960-06 生于山东省阳谷县,汉族,1982-01 毕业于潍坊医学院,分  
别于1985年和1990年在第四军医大学获硕士和博士学位。教授,主任医师,  
博士生导师。研究方向:分子病理学。  
国家自然科学基金, No. 39470778 和 No.30171052 和德国癌症研究基金  
资助课题。  
项目负责人:苏勤,710038,陕西省西安市新寺路,中国人民解放军第四军医大  
学唐都医院病理科。 qinsu@fmmu.edu.cn  
电话:029-3377467 传真:029-3552079  
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-21

## Detection of different viral transcripts in sera of patients with chronic hepatitis B virus infection

Qin Su, Wei Zhang, Jie Liu, Shu-Fang Wang, Kunio Takegoshi,  
Claus H Schröder

Qin Su, Wei Zhang, Jie Liu, Shu-Fang Wang, Department of Pathology,  
Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038,  
Shaanxi Province, China  
Claus H Schröder, Divisions of Virus-Host Interactions, German Cancer  
Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany  
Kunio Takegoshi, Takegoshi Internal Medicine Clinic, Takaoka, Toyama,  
933-0014 Japan  
Supported by the Natural Science Foundation, Grants 39470778 and  
30171052, and a Guest Research Fellowship of the German Cancer  
Research Center, Heidelberg  
Correspondence to: Prof. Dr. Qin Su, Department of Pathology, Tangdu  
Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038,  
China. qinsu@fmmu.edu.cn  
Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-21

## Abstract

**AIM:** To establish an assay for detecting serum hepatitis B virus (HBV) transcripts including the full-length (fRNA) and truncated RNA molecules (trRNA) in chronic HBV carriers, and to investigate its clinical significance.

**METHODS:** The serum viral nucleic acids were analyzed using PCR and RT-PCR targeted to the HBV x protein-encoding region. Reaction specificity was confirmed by Southern blotting. Representative amplification products were cloned and sequenced.

**RESULTS:** Different viral transcripts including fRNA and trRNA were identified in sera of HBV carriers. Presence of fRNA was closely correlated with seropositivity of hepatitis B e antigen and viral DNA. However, trRNA did not depend on serum e antigen, its association with circulating viral DNA was weak. Similarly, no remarkable correlation was ob-

served between the levels of trRNA and the degrees of liver damage. Different age-dependent representations for fRNA and trRNA were recognized, fRNA was progressively decreased to undetectable levels and trRNA increased to high levels in the second decade of life and then remained in high level in the rest of life. The trRNA and RNA without polyadenylation at either of the two addition sites were detected even in the absence of any other conventional HBV markers such as viral DNA. They were also observed in sera from patients with cryptogenic cirrhosis or chronic hepatitis C.

**CONCLUSION:** The viral transcripts are potential serum markers for identifying replicative and non-replicative infection stages and diagnosis of occult HBV infection.

Su Q, Zhang W, Liu J, Wang SF, Takegoshi K, Schröder CH. Detection of different viral transcripts in sera of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;11(2):134-143

## 摘要

**目的:** 建立针对乙型肝炎病毒(HBV)全长型(fRNA)和顿挫型转录体(trRNA)的血清学检测方法,并探讨其临床应用价值。

**方法:** 自患者血清中提取病毒核酸,经PCR及PRT-PCR进行扩增,琼脂糖电泳显示产物, Southern印迹验证反应的特异性。取代表性产物克隆,测序。

**结果:** 在HBV慢性携带者的血清中检测到了在上述不同poly(A)位点成熟的病毒RNA。血清中fRNA的检出与e抗原阳性和较强的病毒DNA信号相对应,与转氨酶活性呈正相关,这一血清学指标反映了病毒复制;而trRNA的检出与e抗原阳性和转氨酶活性无关,不象fRNA那样依赖于血清中病毒DNA的量。二者检出率随年龄有不同变化,前者随年龄增加而进行性减低乃至转阴;而后者在10-20岁期间检出率升至80%,以后维持在较高水平。即使在某些表面抗原阴性血清中,也能检测到trRNA和不在上述两个位点成熟的病毒RNA。这些转录体在某些隐匿性肝硬变和丙型肝炎患者血清中也存在。

**结论:** 病毒转录体的血清学检测有助于确定目前尚不认识的HBV感染期,可用来更准确地地区分复制期和非复制期以及检出隐匿性HBV感染。

苏勤,张伟,刘节,王淑芳,Takegoshi K, Schröder CH. 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;11(2):134-143  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/134.htm>

## 0 引言

通常乙型肝炎病毒慢性感染是指血中乙型肝炎表面抗

原(HBsAg)阳性持续达 6 mo, 依其病程分为复制期和非复制期<sup>[1,2]</sup>. 不管是否引起临床上可检测到的慢性肝炎, HBsAg携带状态导致肝细胞癌(HCC)发生危险性明显增加<sup>[2-4]</sup>. 对于众多的已感染HBV的患者来讲, HCC发生的早期检测是一项迫切需要解决的任务<sup>[5]</sup>.

HBV有4个阅读框, 分别称为PreS2/PreS1/S, PreC/C, 聚合酶和X基因, 转录为3 500个核苷酸的前基因组转录体和2 400及700个核苷酸的亚基因组转录体. 其中最小转录体的翻译产物称为乙型肝炎x蛋白(hepatitis B x protein, HBx), 与HCC发生有关<sup>[5-8]</sup>. 在复制期间, 所有上述病毒转录体利用同一个信号成熟, 这一信号位于1 789位上的UAUAAA结构区<sup>[9]</sup>, 此研究中这一类HBV转录体称为全长型RNA (full-length RNA, fRNA). 然而, 整合入染色体内的病毒DNA常有HBx阅读框3'端缺失<sup>[10,11]</sup>, 因而fRNA的产生受到影响, 转录时HBx序列与下游的细胞序列融合, 形成相应的嵌合转录体和病毒/细胞融合蛋白<sup>[12]</sup>. 另一种病毒转录体还可利用HBx阅读框内一个CAUAAA结构区(1661位)成熟, 称为顿挫型RNA (truncated RNA, trRNA). trRNA存在于HCC及其周围的肝实质细胞内<sup>[12]</sup>, 编码的顿挫型蛋白可能保持有全长HBx的生长调控作用<sup>[13]</sup>.

能区分上述两种病毒RNA 3'端结构的技术已经建立, 但这种检测通常需要新鲜肝标本<sup>[14]</sup>. 此研究建立了利用血清来源RNA检测HBV转录体的技术, 并且从多数HBsAg阳性血清中检测到fRNA, 其存在提示复制期感染; 而trRNA为主则提示更晚期改变.

## 1 材料和方法

**1.1 血清标本及核酸提取** 此研究共检查了437例血清标本(表1). 其中观察组为295例, 118例标本来自HCC患者(第四军医大学唐都医院71例, 天津医科大学肿瘤医院25例, 陕西省肿瘤医院16例, 日本Takaoka地区Takegoshi内科医院8例), 168例来自无HCC的HBsAg携带者(唐都医院167例, Takegoshi内科医院1例), 9例来自收住唐都医院的隐源性肝硬变患者; 对照组为142例HBsAg阴性标本, 75例来自以非肝脏病变在唐都医院住院的患者, 37名来自健康西安市民, 30例来自德国Lübeck市的健康献血申请者. 血清分离后贮于-80℃冰箱. 应用试剂盒(Roche, mannheim, germany)提取病毒核酸, 每次提取用血清200 μL, 提取物终体积为50 μL.

**1.2 引物和探针** 上游引物包括txs3 (1434, Xho I酶切排序): 5'- TCT CAT CTG CCG GAC CGT GT -3', txs1 (1 454): 5'- GCA CTT CGC TTC ACC TCT GC -3', txs (1 445): 5'- GGA CCG TGT GCA CTT CGC TT -3', souts (0 001): 5'- TCG AGG ACT GGG GAC CCT GC -3', sins (0 482): 5'- TCC CAT CAT CCT GGG CTT TC -3', couts (1 732): 5'- ACT GTT CAA GCC TCC AAG CT -3', cins (1 760): 5'- GGT GGC TTT AGG GCA TGG AC -3', GAPDH1 (3 755): 5'- CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA -3'; 下游引物包括

txas5 (1683): 5'- (T)<sub>15</sub> GCT GG -3', Rxas2 (1808): 5'- (T)<sub>15</sub> GAA GC -3', Rxas4 (1806): 5'- (T)<sub>15</sub> AGC TC -3', xas1 (1 668): 5'- AAT TTA TGC CTA CAG CCT CC -3', xas2 (1 634): 5'- TTA ACC TAA TCT CCT CCC CC -3', souts (0 646): 5'- TGT ACA GAC TTG GCC CCC AA -3', sins (0 624): 5'- CCA CAT CGT CCA TAT AAC TG -3', couts (2 157): 5'- AGT GCG AAT CCA CAC TC -3', cins (1 931): 5'- GTA TGG TGA GGT GAA CAA TG -3', GAPDH2 (4 344): 5'- GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT -3'; 用于确定PCR产物极性的探针包括1 561+: 5'- GAC CGA CCT TGA GGC ATA CTT CAA AGA CTG -3', 1590-: 5'- CAG TCT TTG AAG TAT GCC TCA AGG TCG GTC -3'.

**1.3 病毒DNA的PCR扩增** 取2 μL提取物, 在含有引物对txs3/xas1的50 μL反应体系中应用Tag DNA聚合酶(Gibco BRL, Life technologies inc., Gaithersburg, MD)按标准条件扩增35个循环. 应用fRNA的cDNA质粒pMT9T40A<sup>[12]</sup> (200 pg)和trRNA的cDNA质粒pMT9T41A<sup>[12]</sup> (200 pg)作为阳性对照, 用水作为阴性对照.

**1.4 HBx区RNA的RT-PCR检测** 此研究把跨越引物对txs3/xas1结合点(1 434/1 638, Xho I酶切排序; 图1)的RNA统称为HBx RNA. 这一反应检测到的成分包括fRNA, trRNA和不在上述任何一个位点成熟的RNA分子, 其构成每例各不相同(见下文). 血清核酸提取物经过DNase I (Gibco)消化后, 应用50 μL单管RT-PCR系统(Roche)进行逆转录和扩增. 反应阳性对照仍然采用质粒DNA pMT9T40A和pMT9T41A, 阴性对照包括水, DNase I处理过的上述质粒DNA以及上述核酸提取过程中使用过的载体, 即18 S和22 S核糖体RNA (1 ng). 为了验证此反应的RNA特异性, 30份经过DNase I处理的来自HCC患者的标本(HBsAg阳性17例, 阴性13例)分别进行PCR和RT-PCR反应, 反应产物(2 μL)再加入到含有内引物对txs1/xas1或txs1/xas2的反应体系中进行第2轮PCR. 为了确保上述HBx RNA检测反应的可靠性以及显示选择不同病毒基因区段作为检测靶序列的敏感性, 对于上述30份经DNase I处理的标本逆转录后还进行了HBV S和C区的巢式扩增. 病毒转录体的C区的体系中外引物对为couts/coutas, 内引物对为cins/cinas, 长度为172 bp; 预期产物检测S区检测体系外引物对为souts/soutas, 内引物对为sins/sinas, 预期反应产物长度为143 bp. 为了表明血清中RNA的广泛存在和其分子的相对完整性, 应用含有引物对GAPDH1/GAPDH2<sup>[15]</sup>的RT-PCR体系对相同的标本中3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) RNA进行逆转录和扩增.

**1.5 逆转录后通过半巢式PCR检测HBV RNA 3'端结构** 由于锚定oligo d(T)引物能够特异的扩增poly(A) RNA<sup>[14]</sup>, 检测病毒RNA的3'端结构的反应不需要DNase I预处理标本. 如图1所示, 检测fRNA的RT-PCR应用引物txs3/Rxas2和Rxas4, 第二轮PCR反应应用引物txs1/Rxas2/Rxas4; 检测trRNA的RT-PCR用引物对txs3/txas5, 第二

轮 PCR 用 txs/txas5. 为了进一步显示反应的扩增效率及特异性, 始终应用质粒 DNA pMT9T40A 和 pMT9T41A 进行平行扩增. 前者为 fRNA RT-PCR 阳性而 trRNA 反应阴性; 后者为 fRNA 反应阴性而 trRNA 反应阳性<sup>[14]</sup>. 其次, 1例自肝炎组织内提取的仅含有 fRNA 的提取物以及来自 1例 HCC 组织仅含 trRNA 的提取物<sup>[14]</sup> 也被用来做对照反应. 此外, 去离子水和 18S/22S 核糖体 RNA 也被用来作为阴性对照. 始终参照 Kwok 和 Higuchi 提出的原则<sup>[16]</sup> 避免实验室内污染. 所有的反应至少重复一次.

**1.6 DNA 探针的制备** 应用含有引物对 txs1/xas1 的 PCR 体系以 pMT9T40A 作为模板, 以地高辛(digoxin, Dig)标记的 dUTP 作为掺入物制备杂交探针, 应用较低的掺入比 (Dig-11-dUTP dTTP = 1 20) 来证实反应产物的 HBx 区序列特异性.

**1.7 电泳, Southern 印迹和杂交** 扩增产物(15  $\mu$ L)上样到含溴化乙锭(0.2  $\mu$ g/mL)的琼脂糖凝胶(2%)进行电泳, 紫外线下观察, 然后将产物转印到 Hybond-N<sup>+</sup> 膜(Amersham)上, 应用 Dig 标记的探针进行杂交, 用羊抗 Dig 抗体(Roche)和碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG (Jackson immuno research laboratories, inc.)来显示杂交信号. 由于锚定 oligo d(T) 引物介导的 RT-PCR 反应常产生 2 条带, 一条泳动位置与预期的相同, 另一条泳动得较快. 应用 P<sup>32</sup>-ATP 标记的极性相反的探针(1 651+ 和 1 590-)分别进行杂交, 以显示上述凝胶中每个带的 DNA 链构成.

**1.8 DNA 克隆和测序** 部分血清标本的 fRNA 和 trRNA 扩增物被用来重组进克隆载体 pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>

(Invitrogen, groningen, the netherlands), 以 Sanger 等的方法进行 DNA 测序.

统计学处理 如表 1 所示, 此研究共发现 286 例 HBV 阳性标本, 其中 237 份 HBsAg 阳性, 49 份 HBsAg 阴性但病毒核酸阳性. 这些标本都被用来分析上述不同种类的病毒转录体与年龄和血清免疫学指标的关系. 所有检测标本被分为 4 组: (1) HBsAg+/乙型肝炎 e 抗原(HBeAg) +; (2) HBsAg+/HBeAg-; (3) HBsAg-/病毒核酸 +; (4) HBsAg-/病毒核酸 -. 根据来自相当于 40  $\mu$ L 血清内提取的病毒 DNA 和 RT-PCR 阳性信号强度估算其中靶分子的含量, 分级为弱(1+), 中(2+)和强(3+), 分别与应用 1 fg, 10-100 fg 和 1 pg 的 cDNA (pMT9T40A 和 pMT9T41A) 进行平行扩增得到的信号强度相当.

应用 S-PLUS 和 StatXact 3 for Windows (Cytel software corp.) 进行统计学运算, 应用 Pearson 相关系数( $\gamma$ )反映血清中病毒 RNA 和 DNA 与血清 HBV 免疫学标志, 谷-丙转氨酶(ALT)值以及年龄的关系, 并给出 95% 可信限 (CI), 应用 Krushal-Wallis 等级检验描述不同年龄组间病毒 RNA 和 DNA 阳性率及阳性强度的区别, 应用 Wilcoxon 等级检验进行逐对比较. 应用 Fisher 检验(双侧)比较乙型肝炎核心抗体(anti-HBcAg)阳性和阴性以及携带和不携带 HCC 患者组病毒转录体以及 DNA 的检出率. 对于 50 例以内的小标本, 应用 Fisher 精确检验进行比较; 达到 50 例的大样本, 则用  $\chi^2$  检验或 StatXact 中的近似精确检验来评价两组样本间的关系. 此文中所有相关值均以绝对值形式给出, 其方向从正文或图中都可看出.  $P < 0.05$  被认为统计学显著.

表 1 患或不患 HCC 患者的 HBsAg 阳性或阴性血清中 HBV 转录体及 DNA 的检出率

血清来源	检测 <i>n</i>	DNA+RNA (%)	病毒 DNA (%)	病毒转录体(%)		
				HBx RNA	fRNA	trRNA
HBsAg + <sup>a</sup>	237	220 (92.8)	165 (69.6)	211 (89.0)	143 (60.3)	142 (59.9)
有 HCC	69	62 (89.9)	58 (84.1)	56 (81.2)	46 (66.7)	34 (49.3)
无 HCC	168	158 (94.0)	107 (63.7)	155 (92.3)	97 (57.7)	108 (64.3)
HBsAg -/有 HCC <sup>b</sup>	49	29 (59.2)	9 (18.4)	19 (38.8)	9 (18.4)	14 (28.6)
HBV 抗体 + <sup>c</sup>	26	19 (73.1)	6 (23.1)	12 (46.2)	7 (26.9)	10 (38.5)
HBV 抗体 -	23	10 (43.5)	3 (13.0)	7 (30.4)	2 (8.7)	4 (17.4)
HBsAg -, 有肝硬化 <sup>d</sup>	9	5 (55.6)	0 (0.0)	2 (22.2)	2 (22.2)	3 (33.3)
HBsAg -, 其他患者 <sup>e</sup>	75	11 (14.7)	1 (1.3)	5 (6.7)	4 (5.3)	9 (12.0)
健康市民, 中国西安	37	4 (10.8)	0 (0.0)	3 (8.1)	0 (0.0)	2 (5.4)
健康市民, 德国 Lübeck	30	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

<sup>a</sup>+, 血清阳性; -, 血清阴性.

<sup>b</sup>42 例来自中国西安, 其中 3 例 HCV 抗体 +; 7 例来自日本, 其中 6 例 HCV 抗体 +.

<sup>c</sup>21 例 HBV 抗体阳性(其中 7 例 anti-HBsAg 或 anti-HBeAg 阳性); 5 例仅 anti-HBsAg +.

<sup>d</sup>9 例隐匿性肝硬化中, 7 例 HBV 抗体阳性, 其中 2 例 anti-HBcAg +, 3 例 anti-HBsAg +, 2 例 anti-HBcAg + 和 anti-HBsAg +.

<sup>e</sup>75 例患肝外疾病, 其血清 33 例 HBV 抗体阳性, 其中 11 例 anti-HBcAg +, 13 例 anti-HBsAg +, 1 例 anti-HBeAg +, 8 例 anti-HBcAg + 和 anti-HBsAg +.

表2 全长及顿挫型 HBV RNA 的序列变异<sup>a</sup>

fRNA <sup>c</sup> (n =17)	位 置 <sup>b</sup>								trRNA <sup>c</sup> (n =16)
	1 484	1 486	1 526	1 592	1 600	1 619	1 626	1 635/1 637	
0	G	G	C	T	<b>A</b>	G	T	AG	1
1	G	G	C	T	<b>A</b>	G	T	AG	0
0	<b>C</b>	G	C	T	G	G	T	AG	2
0	G	G	C	T	G	<b>C</b>	T	AG	2
0	G	G	<b>T</b>	T	G	G	T	AG	1
0	G	<b>A</b>	C	T	G	G	T	AG	1
1	G	G	C	T	G	G	T	AG	2
1	G	G	C	<b>G</b>	<b>A</b>	G	T	AG	0
1	G	G	C	<b>G</b>	<b>C</b>	G	T	AG	0
0	G	<b>A</b>	C	T	<b>A</b>	G	T	<b>TA</b>	1
1	G	<b>A</b>	C	T	<b>A</b>	G	<b>C</b>	<b>TA</b>	0
1	G	<b>A</b>	<b>T</b>	T	<b>A</b>	G	T	<b>TA</b>	1
2	G	G	C	T	<b>A</b>	G	<b>C</b>	<b>TA</b>	0
0	G	G	C	T	<b>A</b>	G	T	<b>TA</b>	1
2	G	G	<b>T</b>	T	<b>A</b>	G	T	<b>TA</b>	2 <sup>d</sup>
0	G	G	<b>T</b>	<b>G</b>	G	G	T	<b>TA</b>	1
1	G	G	C	<b>G</b>	G	G	<b>C</b>	<b>TA</b>	0
1	G	G	C	T	G	G	<b>G</b>	<b>TA</b>	0
0	G	<b>A</b>	C	T	G	G	<b>G</b>	<b>TA</b>	1
1	G	G	C	T	G	G	T	<b>TA</b>	0
2	G	G	C	<b>G</b>	<b>A</b>	G	<b>C</b>	<b>TA</b>	0
1	G	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	G	T	<b>TA</b>	0
1	G	<b>A</b>	C	<b>G</b>	<b>T</b>	G	T	<b>TA</b>	0

<sup>a</sup>琼脂糖电泳分离之前直接与 pCR® 2.1-TOPO® 连接制备 cDNA 克隆;  
<sup>b</sup>fRNA 和 trRNA 共有段中的替代突变, Xho I 酶切坐标(1484 Xho I=1611 Eco RI);  
<sup>c</sup>来自 17 例 fRNA 为主型标本的有代表性的 fRNA cDNA 克隆和 15 例 trRNA 为主型标本的 trRNA cDNA 克隆;  
<sup>d</sup>在 1 例 fRNA 为主的标本, 获得 fRNA 和 trRNA cDNA 克隆.

2 结果

2.1 血清中病毒转录体和 DNA 的检测 首先应用 PCR 技术检测了 HBsAg 阳性组和阴性组以及携带或不携带 HCC 患者血清中对应于 X 基因区段的 RNA 和 DNA, 以期与早先用肝组织及肝癌标本得到的数据<sup>[14]</sup>进行比较.

图 1 显示了待检测的 HBx 区 DNA 和不同 RNA 分子的位置及其引物对, 同时也列出了核酸杂交探针所处的位置(1454-1668). 图 2 所示为 15 份来自 HCC 患者代表性血清的检测数据. 病毒核酸提取物经过或不经 DNase I 消化分别进行 PCR 及 RT-PCR, 显示标本 B, E, I, K 和 O 中既含有病毒 DNA 又含有病毒转录体, 后者的检测中, HBx 区的反应结果与 S 区和 C 区的检测结果基本一致, 但优于后两者 (比较系列 c, d, e 和 f). 已表明 fRNA 和 trRNA RT-PCR 特异扩增 HBV RNA 的 3' 端结构<sup>[14]</sup>. 此研究中, 有的病毒 DNA 阴性标本中也可检测到 fRNA 和 trRNA (图 2, 标本 D 和 L; 图 3, 标本 M, S-U; 图 4, 标本 B, D 和 H), 这进一步证实了上述扩增反应的 RNA 特异性. 在检查过的 437 份标本中, GAPDH RT-PCR 反应全部能显示出一个

产物. 这一产物大小都为 305 bp, 证实确定属于 GAPDH 的转录体, 而非其 DNA, 因为这一引物在 GAPDH DNA 分子所跨的距离不是 305 bp, 而是 590 bp.

图 3 和图 4 显示了有代表性的标本中的 RT-PCR 和 PCR 结果, 多数标本中 HBx RNA 阳性, 但信号强度变化很大. 溴化乙锭染色和在 Southern 印迹膜上进行的杂交都显示, fRNA 信号为 2 条带. 上边一条为主带, 位于预期的位置上(370 bp); 泳动较快的一条带强度较弱, 可能是由不对称扩增产生的过剩单股负链 DNA. 产物的股极性测定试验证实了这一推测(图 5), trRNA 的 3' 端结构扩增产物大小为 245 bp, 与预期的相同. 在 fRNA 中度及强阳性病例, trRNA RT-PCR 也能显示出 370 bp 的信号, 克隆测序结果显示, 这一 370 bp 的 cDNA 片段与 fRNA 相同. 这一结果表明, trRNA 扩增用的锚定 oligo d(T) 引物与 fRNA 末端 1 803-1 806 位置的结构也有一定亲合力. 然而, trRNA 信号(245 bp)的存在并不依赖于 370 bp 的 fRNA 产物(图 3, 比较标本 A, B 和 C). 很显然, 目前所用的 trRNA RT-PCR 既能识别 trRNA, 也能检出 fRNA.

上述阳性信号反映了40  $\mu$ L 血清中的病毒RNA含量,按其强度分级为弱(1+),中(2+)和强(3+),分别与应用1 fg, 10-100 fg和1 pg cDNA 质粒(pMT9T40A或pMT9T41A)产生的信号强度大致相当.这忽略了体系中其他种类的RNA对反应的敏感性的影响,因而这一估计仅反映了待测标本中靶RNA的最低值.

根据样本中fRNA和trRNA的存在与否及其相对强度,将此组病例分为5型(图6D):fRNA为主型并强阳性(3+;见图3,标本B,C,E,F,H-J,O和Q);fRNA为主型并较弱阳性(2+或1+;见图3标本K和图4中标本B);trRNA为主型(图3,标本G和T);trRNA单独型(1+到3+;见图3中A,M,N,S,R和图4中D和H)和fRNA-/trRNA-型(图3中D和R,图4中A,E和I).

**2.2 fRNA和trRNA RT-PCR扩增产物的测序结果** 表2分别列出不同病例来源的fRNA和trRNA扩增产物的序列,黑体字母显示与野生型不同的核苷酸残基.已经明确,病毒基因组1635/1639位(Xho I酶切坐标位置,相当于Eco RI酶切坐标的1762/1764位)以及1526和1626位点上的替代突变标志着HBV感染进入晚期<sup>[17,18]</sup>.我们的测序数据显示, trRNA既来源于保守的病毒DNA,也转录于上述变异体(表2, trRNA); fRNA的测序结果与trRNA相似,但不如后者保守(表2, fRNA).

**2.3 HBsAg阳性血清中的病毒转录体** 237例HBsAg阳性标本中,多数呈病毒转录体阳性. fRNA和trRNA的总体阳性率相似,约为60%(表1).在几乎所有的fRNA阳性标本中,HBx RNA阳性信号也存在,并与fRNA信号强度基本一致(图2,3).与半巢式PCR扩增的trRNA信号相比,自trRNA为主或独有型的标本中经过一轮RT-PCR检测到的HBx RNA信号往往较弱(图3,标本A,G,N和S).有63例HBsAg阳性标本fRNA和trRNA均为阴性,其中39例尚可检测到HBx RNA信号(图2,标本I;图3,标本D),提示这种标本中含有病毒RNA,但他们不带上述poly(A)信号.

**2.4 全长型转录体与病毒复制过程有关** 某些HBsAg阴性的标本也含有上述类型的病毒核酸,因而也被认为是HBV携带者.血清中病毒DNA的存在及其量反映了病毒复制过程.为了探讨fRNA及trRNA与病毒DNA含量的关系,HBsAg阳性( $n=237$ )和HBsAg阴性但病毒核酸阳性的病例( $n=49$ )都被用来进行Pearson检验, fRNA与病毒DNA含量之间关系密切( $\gamma=0.79$ ,  $P<0.05$ ),但trRNA与病毒DNA含量之间的相关性很弱( $\gamma=0.14$ ,  $P<0.05$ ).很显然,血清中trRNA的存在与否不象fRNA那样依赖于病毒DNA存在.

**2.5 血清fRNA水平降低与HBeAg和HBsAg转阴有关** HBsAg+/HBeAg+, HBsAg+/HBeAg-和HBsAg-/病毒核酸阳性这三组病例的平均年龄为28.7, 42.0和52.7岁,差别显著( $P<0.01$ ).如图6所示,病毒DNA信号在绝大多数HBeAg阳性血清中很强,但HBeAg转阴后多数明显减弱,随HBsAg转阴进一步减弱( $P<0.05$ );血清中fRNA水平也有相同的变化( $P<0.05$ ),与病毒DNA水平一致.然而,上

述过程中trRNA的改变不明显( $P>0.05$ ).可以明确的是,上述过程中fRNA/trRNA比例明显改变了( $P<0.05$ ).

**2.6 病毒DNA和fRNA水平与ALT水平有关** 依常理而论,血清中所有类型HBV转录体的存在应该与肝细胞损伤有关.如果真正是这样,目前检测的上述指标只不过是反映了慢性肝炎的活动性,病毒转录体的存在应该与ALT水平升高相关.为了澄清这一点,把171例检查过ALT的HBsAg阳性标本分为正常范围(0-40 IU/L),轻度(41-80 IU/L)和重度升高组(>80 IU/L).血清中fRNA ( $P<0.05$ ;图7B)和病毒DNA水平( $P<0.05$ ;图7A)与ALT值呈一定程度的正相关.然而, trRNA的水平与ALT值无明显相关性( $P>0.05$ ;图7C).很显然,血清中fRNA及病毒DNA的存在与肝损伤有一定程度的关联,但trRNA的存在与肝实质损伤无关.

**2.7 血清fRNA和病毒DNA水平随着年龄增加而降低**,但trRNA持续存在.在HBV流行区,绝大多数慢性携带者是在围产期或婴儿期受到的感染<sup>[2]</sup>.因此,患者的年龄可反映病程的长短.把来自未患HCC患者的168例HBsAg阳性标本和20例HBsAg阴性但病毒核酸阳性标本按年龄分组,比较不同年龄组间病毒RNA和DNA水平的差别.青少年患者血清中fRNA水平较高,随着年龄增加其水平逐渐降低( $P<0.05$ ;图8B),这与病毒DNA水平的改变一致( $P<0.05$ ;图8A).然而,血清trRNA水平改变不明显,10岁以内其平均水平低于fRNA,但在第二个10 a其水平与fRNA相当,其后几十年仍保持较高水平,无明显减低( $P>0.05$ ;图8C).在几十年进展中,血清病毒RNA分子中fRNA比例逐渐减少而trRNA比例渐升高( $P<0.05$ ;图8D).在30-50岁区段, fRNA为主型的病例也由高水平转变为较低水平,这类标本往往仍含有较高水平的病毒DNA.高水平的fRNA为主型,较低水平fRNA为主型, trRNA为主型, trRNA单独存在型和fRNA-/trRNA-型的平均年龄分别为27.5, 36.6, 34.6, 39.2和42.4岁,其中第一组病例的平均年龄明显低于后四组任何一组( $P<0.05$ ).

**2.8 HBV转录体存在于HBsAg阴性的HCC或肝硬变患者血清中** 在这组HBsAg阴性的HCC病例中,超过半数的血清样本中可检出病毒核酸(29/49, 59.2%), anti-HBcAg和anti-HBsAg阳性样本的病毒核酸检出率(19/26, 73.1%)明显高于HBV免疫学标志完全阴性的病例(10/23, 43.5%; $P<0.05$ ).在检出的29例病毒核酸阳性病例中,20例仅检出病毒转录体(图2,标本D和L),5例查到病毒RNA和DNA同时存在,4例中为病毒转录体阴性但DNA呈弱阳性.在这49例HBsAg阴性标本中, fRNA和trRNA的检出率分别为18.4%和28.6%, HBx RNA的检出率高达38.8%(19/49;表1).

在这些HBsAg阴性HCC病例中,9例HCV抗体阳性,其中6例来自日本,3例来自中国.检测结果表明,其中7例标本中有HBV核酸.在这7例阳性标本中5例携带HBx RNA,其中2例还查到trRNA;1例仅查到fRNA,余下1例仅查到病毒DNA(图4).

此研究还检查了9例来自西安的隐源性肝硬变患者

的血清标本. 如表 1 所示, 5 例为病毒转录体阳性 (3 例 trRNA 阳性, 2 例 fRNA 阳性, 2 例 HBx RNA 阳性), 无 1 例呈病毒 DNA 阳性.

2.9 其他 HBSAg 阴性患者血清中病毒转录体的检测 此研究还检查了取自 75 例患有肝外慢性疾病的住院患者血清, 11 例带有病毒转录体(14.7%), 其中 1 例还携带病毒 DNA (1.3 %). 在这 11 例阳性标本中, 9 例的病毒转录体全部(7 例; 图 3, S 和 U)或主要(2 例; 图 3T)利其隐匿 poly (A)信号终止, 2 例的转录体仅受标准信号指导成熟.

2.10 来自 HBsAg 阴性健康个体血清中的病毒转录体 来自中国西安的城市居民血清 37 份和自德国 Lübeck 健康献血申请者的血清 30 份也被用作参照组. 如表 1 所示, 所有标本均为病毒 DNA 阴性. 在西安参照组, 4 例携带病毒转录体, 其中 3 例 trRNA 阳性, 1 例仅携带不含上述 2 种 3' 端结构的病毒 RNA 分子. 在德国参照组, 现有的检测手段未能显示出任何病毒 RNA 信号.

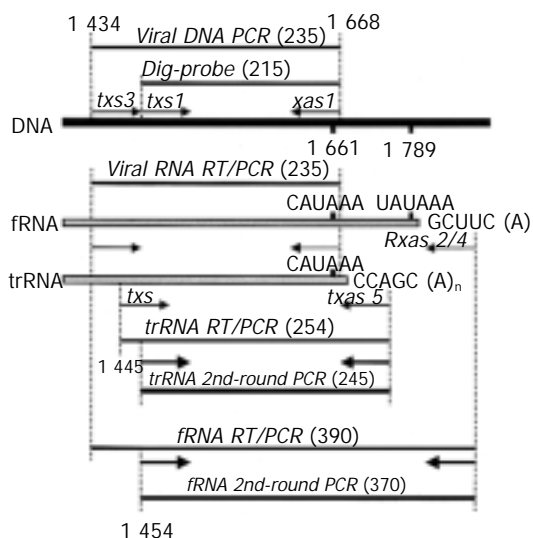


图1 HBx DNA 和 RNA 扩增引物的位置.数字表示 Xho I 酶切坐标, 括号内数字表示扩增产物的大小.

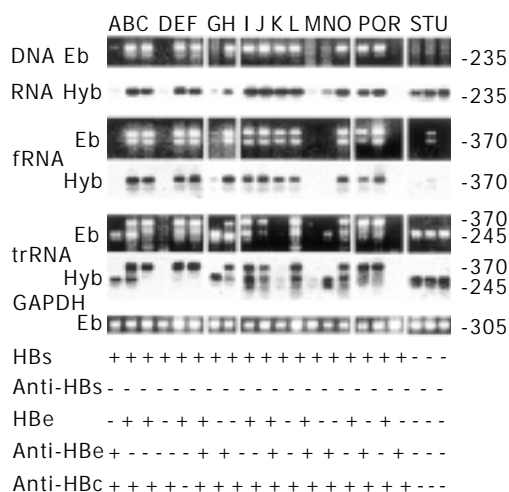


图3 血清中HBx区核酸检测的代表性数据. 扩增产物分别经溴化乙锭染色(Eb)或 Southern 杂交(Hyb)显示, HBx区 DNA (DNA)和转录本 (RNA), 全长型(tRNA)和顿挫型病毒转录本 (trRNA)以及 GAPDH RNA (GAPDH)分别为 235, 370, 245 和 305 bp. 底部显示相应的血清学指标, 包括HBsAg (HBs)及其抗体(Anti-HBs), HBeAg (HBe)及其抗体(Anti-HBe), 和HBcAg 抗体(Anti-HBc).

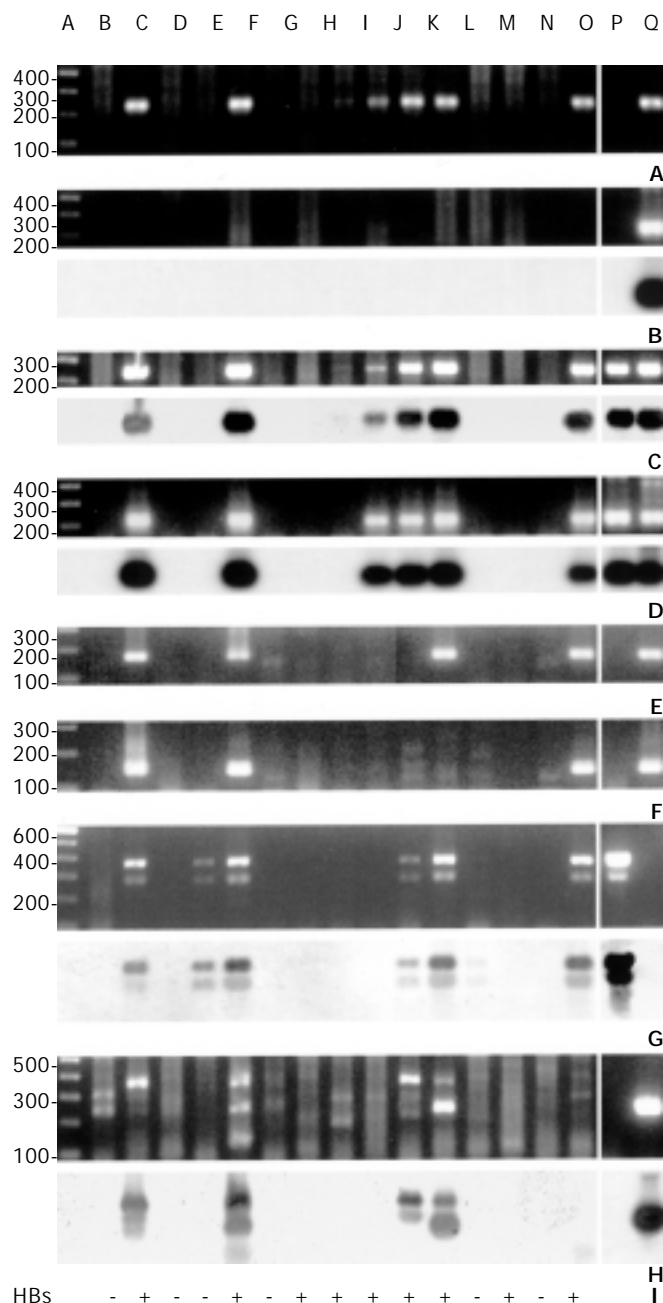


图2 HBx 转录体 RT-PCR 的特异性, 与其 C 区和 S 区 RT-PCR 反应结果的对照及其 3' 端结构。15 例 HCC 患者血清 (A-Q), 9 例 HBsAg (HBs) 阳性, 6 例阴性 (底部 I), P 和 Q 为各种反应的对照。应用其核酸提取物分别进行 HBx 区 DNA PCR (系列 A), 全长型 (fRNA; 系列 G) 和顿挫型病毒转录体 (trRNA; 系列 H) 半巢式锚定 RT-PCR 反应; 相同的标本经 DNase I 消化后检测病毒 DNA HBx 区 (系列 B), 病毒转录体 HBx 区 (系列 C 和 D), C 区 (系列 E) 和 S 区 (系列 F)。系列 A, PCR 检测病毒 DNA, 引物对 txs3/xas1, 产物长度为 235 bp, 采用 DNase I 消化过的来自 1 例 (trRNA) 阳性 HCC 组织的 RNA 提取物 (P) 和 trRNA cDNA 质粒 pMT9T41A (Q) 作为对照, 溴化乙锭 (EB) 染色显示。系列 B, 半巢式 PCR 检测病毒 DNA, 外引物对为 txs3/xas1, 内引物对为 tx1/xas1, 产物长度为 215 bp, 对照同系列 A。系列 C 和 D, 逆转录反应后进行一轮 (系列 C, 引物 txs3/xas1, 长度 235 bp) 或两轮 PCR (系列 D, 引物对为 txs3/xas1 和 tx1/xas1, 长度为 215 bp) 检测病毒转录体 HBx 区段, 对照同系列 A, 分别经 EB 染色 (上) 或应用  $P^{32}$ -ATP 标记的寡核苷酸探针 (1561+) 进行 Southern 杂交 (下) 显示扩增产物。系列 E 和 F, 逆转录反应后进行两轮 PCR 检测病毒转录体 C 区段 (系列 E, 引物对为 couts/coutas 和 cins/cinas, 产物长度为 172 bp) 和 S 区段 (系列 F, 引物对为 souts/soutas 和 sins/sinas, 长度为 143 bp), P 为 trRNA cDNA 质粒 pMT9T41A, Q 分别为 C 区 cDNA 质粒 pd4 (系列 E) 和来自 1 例阳性肝硬变组织<sup>[14]</sup>的 RNA 提取物 (系列 F), EB 染色显示。系列 G 和 H, 逆转录反应后进行两轮锚定 PCR 检测病毒转录体 3' 端结构 fRNA (系列 G, 产物长度为 370 bp) 和 trRNA (系列 H, 长度为 245 bp), 分别经 EB 染色或 Southern 杂交显示扩增产物 (详见图 1)。每个凝胶的左侧以 bp 数显示 DNA 标准物。

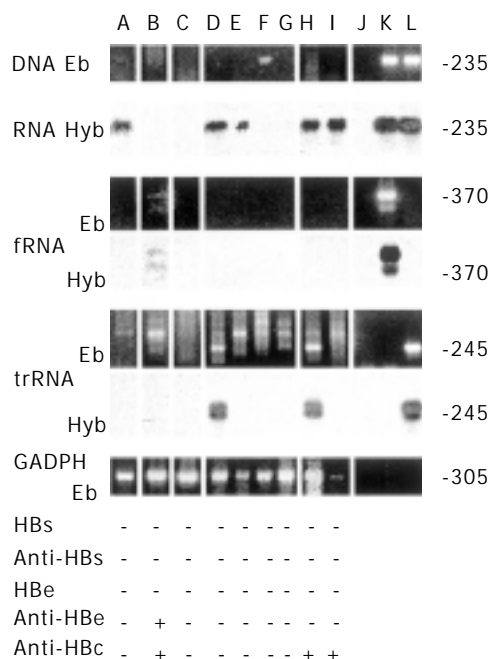


图4 HCV阳性HCC患者血清中的HBV核酸。顶部大写字母表示不同患者的血清标本(A-I)和对照,后者包括水(J),fRNA的cDNA pMT9T40A(K)和trRNA的cDNA pMT9T41A(L)。相应的血清学数据见底部。

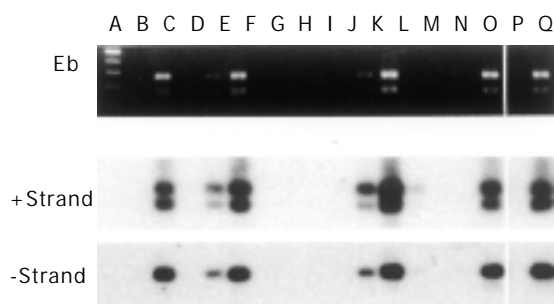


图5 fRNA RT-PCR中由锚定引物造成的不对称扩增。来自15例HBsAg阳性的HCC患者血清核酸提取物(A-O)与图2相同,用水作为阴性对照(P),质粒DNA pMT9T40A为阳性对照(Q)。在溴化乙锭染色的凝胶上,扩增产物为两条带,一条位于预期的370 bp,另一条在接近300 bp的位置(Eb)。用两个相同的凝胶分别进行Southern印迹,制备两个相同的印迹膜,一个与 $P^{32}$ -ATP标记的反意寡核苷酸探针(1 590-)杂交检测+股产物,另一个与 $P^{32}$ -ATP标记的正意寡核苷酸探针(1 561+)杂交,检测-股产物。

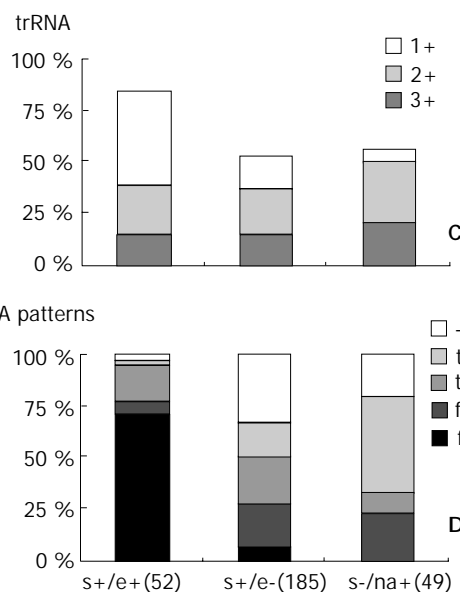
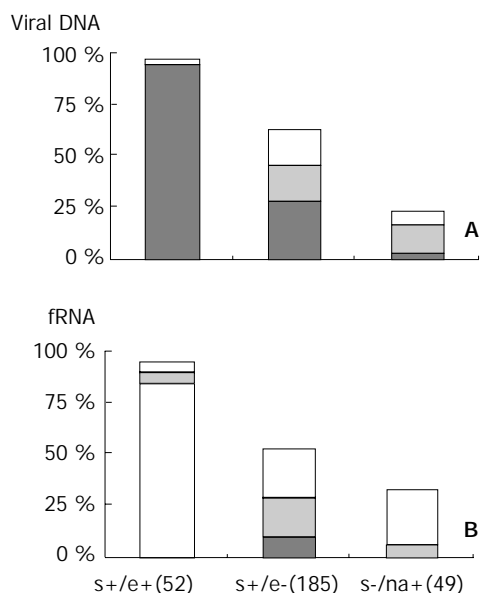


图6 血清中病毒核酸水平及组成与HBeAg和HBsAg转阴的关系。HBsAg阳性组在HBeAg转阴前(s+/e+)和转阴后(s+/e-)以及HBsAg阴性但病毒核酸阳性组(s-/na+)的血清标本中病毒DNA (Viral DNA; A),全长型(fRNA; B)和顿挫型病毒转录体(trRNA; C)表现不同。D为两种根据上述两种RNA分子的相对比例确定的5种不同的病毒转录体组合类型(f/trRNA patterns): fRNA - /trRNA - (-/-); trRNA单独型(tr2); trRNA为主型(tr1);较低水平fRNA为主型(f2)和高水平fRNA为主型(f1)。A:  $\gamma=0.58$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.51-0.64; B:  $\gamma=0.60$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.53-0.67; C:  $\gamma=0.008$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=-0.12-0.11; (D):  $\gamma=0.51$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.42-0.60。底部括号内为每组病例数。

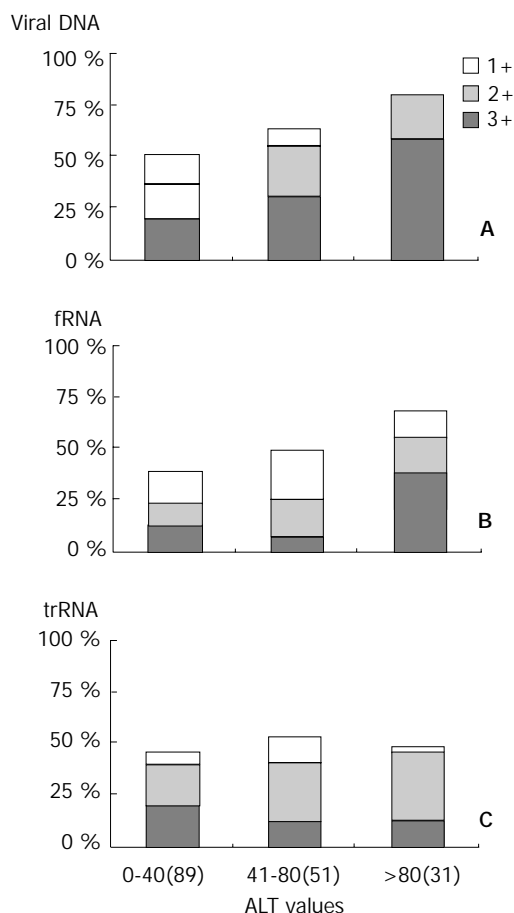


图7 血清中病毒核酸水平与谷-丙转氨酶值(ALT values)的关系。A. Viral DNA:  $\gamma=0.39$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.24-0.55。B. fRNA:  $\gamma=0.28$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.11-0.46。C. trRNA:  $\gamma=0.04$ ,  $P>0.05$ , 95% CI=-0.20-0.13。ALT值(IU/L): 0-40, 正常范围; 41-80, 轻度升高; >80, 显著升高。底部括号内为每组病例数。

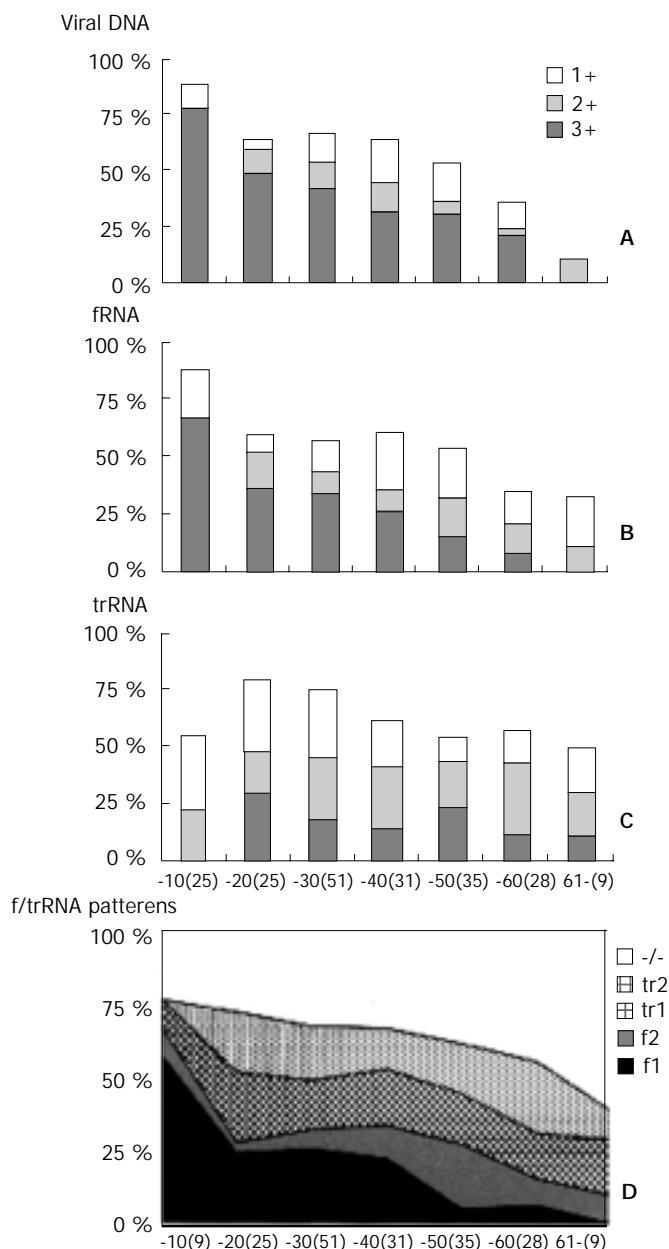


图8 不同年龄组血清中病毒核酸水平(A-C)以及两种RNA分子的相对比例(D)。A. Viral DNA:  $\gamma=0.31$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.17-0.44。B. fRNA:  $\gamma=0.32$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.20-0.45。C. trRNA:  $\gamma=0.07$ ,  $P>0.05$ , 95% CI=-0.07-0.22。D. f/trRNA patterns:  $\gamma=0.31$ ,  $P<0.05$ , 95% CI=0.18-0.43。底部括号内为每组病例数。

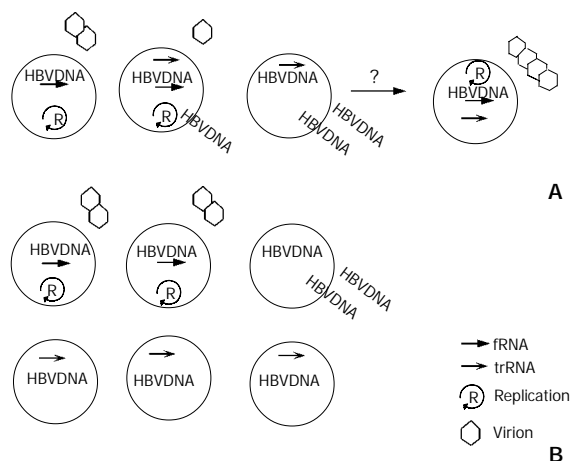


图9 HBV感染分期示意图。A. 由产生病毒颗粒的细胞进展为停止包装病毒颗粒但产生trRNA和未包装衣壳的病毒DNA的细胞; B. 感染晚期表现为非复制状态, 无(上)或有(下) trRNA表达。

### 3 讨论

在高流行区, HBV多数于围产期或幼儿期通过母-婴方式传播, 容易慢性化<sup>[2]</sup>。慢性感染早期是病毒高复制阶段, 常为HBeAg阳性, 血中有高水平的病毒DNA<sup>[1]</sup>。随着血清HBeAg转阴, 血中病毒DNA随之减少, 这种病例可检测到anti-HBeAg<sup>[17]</sup>。尽管血清中HBsAg相对稳定, 每年也有约1% (0.1-2.0%)转阴<sup>[2]</sup>, 这是HBV慢性感染的更晚期阶段。在某些病例, HBsAg转阴后一段时间内血液中仍存在anti-HBcAg<sup>[19-22]</sup>。

大多数学者相信, HBsAg转阴后血中病毒DNA消失<sup>[2,23]</sup>, 但此时HBV DNA仍可以整合形式存在于肝组织内<sup>[10,24-29]</sup>。病毒转录体, 尤其是HBx区RNA, 也存在于HBsAg阴性患者的肝组织和HCC组织中<sup>[10,27-29]</sup>, 其转录模板可能是整合型的病毒DNA<sup>[10,11]</sup>。已有报道显示, HBsAg转阴后一段时间内可观察到低水平的病毒复制<sup>[20,21]</sup>。这种情况下, 部分RNA也可能来自于游离病毒DNA (图9)。HCV二重感染可能会抑制HBsAg产生, 并影响病毒复制过程, 导致某些血液免疫学指标转阴, 但肝组织内可检测到HBV转录体<sup>[30]</sup>。对慢性乙型肝炎组织中HBx区转录体的观察已经使我们开始认识不同类型的病毒RNA分子<sup>[12,14,27]</sup>, 但对其在慢性肝炎进展过程中的变化和意义所知甚少。

此研究在90%的HBsAg阳性血清中检测到HBx区RNA。这与以前在肝组织内观察到的结果相似。HBx区RNA也存在于半数来自HCC (50%)或隐源性肝硬变患者 (5/9)的HBsAg阴性血清标本中。这些数据表明, 作为一种有潜在应用价值的血清学指标, 病毒RNA测定有助于确定病毒复制停止后的晚期感染状态。

我们的研究表明, fRNA与血中DNA水平和HBeAg密切相关, 也与血ALT水平相互关联, 提示fRNA与病毒复制有关联 (图9A), 这与应用新鲜肝组织得到的数据一致<sup>[14]</sup>。trRNA的存在与否与上述病毒复制指标及ALT值没有明确相关性, 在迄今为止所有的HBV血清学指标中trRNA表现最稳定。上述数据提示, 染色体整合的HBV DNA可能是trRNA的主要转录模板 (图9B)。

除了fRNA和trRNA外, 我们还检测到一种病毒RNA, 既不在标准的终止位点上成熟, 又不使用隐匿的终止信号。基于这种RNA类型 (HBx RNA+/fRNA-/trRNA-) 出现较晚, 平均年龄为42.4岁, 这种标本中多数检测不到病毒DNA, 我们认为, 这种HBx RNA分子与trRNA表现相似, 在慢性感染的病程中逐渐增加, 也可能转录自整合型病毒DNA。目前尚不清楚这种转录体是否代表含HBx区的病毒/细胞RNA嵌合分子。

HBV病毒颗粒在肝细胞内的形成依赖于病毒DNA存在。此研究表明某些血清标本中trRNA独立于fRNA和病毒DNA而存在。很显然, 这种情况下病毒逆转录无法进行, 肝细胞内也不会形成正常的病毒颗粒 (图9B)。肝细胞质膜面经常脱出一些微小囊泡<sup>[31]</sup>。我们设想, 这一过程可能是肝细胞内RNA释放入血液循环的一种机制。血液中还可能存在其他成分保护RNA分子免遭降解。这尚待更多的研究证实。

嗜肝病毒感染后相当一部分病例病毒复制停止,血清表面抗原转阴. 尽管如此,这样的人群<sup>[32,33]</sup>和土拨鼠<sup>[34]</sup>HCC危险性明显高于未感染者. 目前这种状态的诊断缺乏可靠指标. 此研究在超过一半的来源于HCC或隐匿性肝硬变患者的HBsAg阴性血清中检测到HBx编码区RNA,尤其是trRNA,在约15%的来自西安住院患者的HBsAg阴性血清中也检测到这种病毒转录体,表明HBV RNA可被用作一种新的血清学指标来检测上述隐匿性感染<sup>[35]</sup>. 我们还检查了37例来自健康的西安居民的HBsAg阴性血清,约10%携带有HBx RNA,而来自Lübeck的30名健康献血申请者的血清全为阴性. 这种差别是否反映了中国的HBV高感染率(>60%<sup>[2,3]</sup>),有待较大规模的调查证实.

肝细胞染色体中整合型HBx DNA的相对稳定性确保了HBx区RNA表达几十年,这种表达在游离病毒被完全清除后仍可进行. 这可能会增加宿主患HCC的危险性. HBV DNA整合入肝细胞可能促进恶性表型的形成,而对恶性表型的维持并非必需<sup>[5,7]</sup>. 已有报道显示,HBx区DNA和RNA存在于HBsAg阴性, HCV抗体阳性患者的HCC组织内<sup>[10,25,26,29,36]</sup>. 针对HBsAg阴性, HCV抗体阳性患者的两项前瞻性调查表明,肝组织内病毒DNA或RNA阳性或血清anti-HBcAg阳性者HCC发生危险性高<sup>[29,37]</sup>. 此研究检查了9例来自日本和中国的HBsAg阴性, HCV抗体阳性的HCC患者的血清,在6例中发现有HBx RNA, 1例中有病毒DNA. 这提示在所谓“HCV相关的HCC”发生过程中, HBx可能是一个不容忽视的角色.

我们的观察还表明,检测HBV隐匿感染也可应用的血清标本,肝组织活检并非必需. 通过外科手术取得肝组织标本来诊断HBV隐匿性感染是不现实的. 即使是通过细针穿刺抽吸进行肝组织活检,也较难接受,有的病例还可能发生并发症,而且取得的肝组织量常常有限. 应用血清标本不但方便,得出的数据可能更具有代表性.

致谢 此研究曾得到Harald zur Hausen, 刘振立和成诗银教授的长期支持,还受益于与Astrid Kairat, Lutz Edler, 邹菊贤, Milena Ilievsta-Arsova, Rüdiger Braun和Anita Mohos等同道的讨论;在技术上曾得到Raoul Breittkreutz, Maria Mildenerberger, Bettina Ehret和Anja Reiman协助;梁秀芬,牛昀和Holger Hennig大夫提供部分标本. 作者非常感激. 此论文经过Peter Bannasch, 刘彦仿, 潘伯荣, Angel Alonso和Holger Friesel五位教授认真审阅. 在此一并致谢.

#### 4 参考文献

- 1 Raimondo G, Burk RD, Liebermann HM, Muschel J, Hadziyannis SJ, Will H, Kew MC. Interrupted replication of hepatitis B virus in liver tissue of HBsAg carriers with hepatocellular carcinoma. *Virology* 1988; 166:103-112
- 2 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:351-366
- 3 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch* 1997;431:391-406
- 4 Kew MC. Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma. *Res*

- 5 *Virology* 1998; 149:257-262
- 6 苏勤. 病毒性肝炎致癌机制. 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-262
- 7 Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus x antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- 8 Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto J, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus (HBV) x protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27:1109-1120
- 9 王小众, 陶其敏. 乙肝病毒 X 基因与肝癌. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1063-1064
- 10 Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 1983;305:336-338
- 11 Poussin K, Diens H, Sirma H, Urban S, Beaugrand M, Franco D, Schirmacher P, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Expression of mutated hepatitis B virus X genes in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 1999;80:497-505
- 12 Unsal H, Zakicier C, Marais C, Kew MC, Volkmann M, Zentgraf H, Isselbacher K, Ozturk M. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:822-826
- 13 Hilger C, Velhagen I, Zentgraf H, Schröder CH. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA. *J Virol* 1991; 65:4284-4291
- 14 Rakotomahanina CK, Hilger C, Fink T, Zentgraf H, Schröder CH. Biological activities of a putative truncated hepatitis B virus X gene product fused to a polylysine stretch. *Oncogene* 1994;9:2613-2621
- 15 Kairat A, Beerheide W, Zhou G, Tang ZY, Edler L, Schröder CH. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age. *Intervirology* 1999; 42:228-237
- 16 Hsu EM, McNicol PJ, Guijon FB, Paraskevas M. Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1993;55:397-401
- 17 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238
- 18 Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepatitis* 1999;6:415-427
- 19 于乐成, 顾长海. 乙型肝炎病毒变异及其与临床肝病的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:978-979
- 20 Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 1999; 42:69-80
- 21 Uemoto S, Sugiyama K, Marusawa H, Inomata Y, Asonuma K, Egawa H, Kiuchi T, Miyake Y, Tanaka K, Chiba T. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. *Transplantation* 1998;65: 494-499
- 22 Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimotohno K, Chiba T. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31:488-495
- 23 王平忠, 周永兴. 乙型肝炎病毒血清学标志物与DNA检测结果的对比分析. 世界华人消化杂志 1999;7:918-919
- 24 Imperial JC. New treatment strategies in hepatitis B and C: natural history of chronic hepatitis B and C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):S1-5
- 25 Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo P. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 1998;27:1736-1742
- 26 Koike K, Shimotohno K, Okada S, Okamoto H, Hayashi N, Ueda K, Kaneko S, Koike K, Yagosuka O, Chiba T, Marusawa H, Hino O, Utida T, Omata M, Fuji T, Nojiri N, Takada K, Miyamura T, Osuga T, Ito Y. Survey of hepatitis B virus co-infection in hepatitis C virus-infected patients suffering from chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:1270-1272
- 27 Shibata Y, Nakata K, Tsuruta S, Hamasaki K, Hayashida Y, Kato Y, Nakao K, Eguchi K. Detection of hepatitis B virus X-region DNA in liver tissue from patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis who subsequently developed hepatocellular

- carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 14:1153-1156
- 27 Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Br  chot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21:313-321
  - 28 Kobayashi S, Saigoh K, Urashima T, Asano T, Isono K. Detection of hepatitis B virus x transcripts in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Surg Res* 1997; 73:97-100
  - 29 Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Koh N, Moriyama Y, Fujimoto S, Takeda T, Shiomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S, Kuroki T. Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus. *Hepatology* 1999;29:1429-1434
  - 30 Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Low-level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2084-2086
  - 31 Black PH. Shedding from normal and cancer cells. *N Engl J Med* 1980; 303:1415-1416
  - 32 Okada S, Sato T, Okusaka T, Ishii H, Ikeda M, Nakasuka H, Kosakamoto H. Past exposure to hepatitis B virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Br J Cancer* 1998; 77:2028-2031
  - 33 Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Tsukamoto T, Hamba H, Shuto T, Yamamoto T, Ikebe T, Kinoshita H. Clinical significance of prior hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999; 86:793-798
  - 34 Korba BE, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Tennant BC, Popper H, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks; presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology* 1989;9:461-470
  - 35 苏勤. 乙型肝炎病毒隐匿性感染. 肝脏 2002;7:197-198
  - 36 Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341:22-26
  - 37 Shiratori Y, Shiina S, Zhang PY, Ohno E, Okudaira T, Payawal DA, Ono-Nita SK, Imamura M, Kato N, Omata M. Does dual infection by hepatitis B and C viruses play an important role in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 1997;80:2060-2067

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版

本刊讯 世界华人消化杂志 (原新消化病学杂志) 从 1993-2002 年的电子版全部出版. 世界华人消化杂志过刊索引: 新消化病学杂志, 1993 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1994 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1995 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1996 (1-12 期); 新消化病学杂志, 1997 (1-12 期); 华人消化杂志, 1998 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 1999 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 2000 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 2001 (1-12 期). 世界华人消化杂志现刊索引: 2002 (1-12 期).

World Journal of Gastroenterology (原中国新消化病学杂志) 从 1993-2002 年的电子版全部出版. 过刊索引: China Natl J New Gastroenterol, 1995 (1 期); China Natl J New Gastroenterol, 1996 (1-4 期); China Natl J New Gastroenterol, 1997 (1-4 期); World J Gastroenterol, 1998 (1-6 期); World J Gastroenterol, 1999 (1-6 期); World J Gastroenterol, 2000 (1-6 期); World J Gastroenterol, 2001 (1-6 期). 现刊索引: World J Gastroenterol, 2002 (1-6 期).

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 的电子版网址如下: 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-28)

# 复制缺陷型HCV C基因腺病毒表达载体的构建包装及鉴定

郝春秋,冯志华,周永兴,聂青和,李谨革,贾战生,梁雪松,谢玉梅,曹义战,康文臻

郝春秋,冯志华,周永兴,聂青和,李谨革,贾战生,梁雪松,谢玉梅,曹义战,康文臻,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心  
陕西省西安市 710038

郝春秋,男,1965-01-14生,河北省南宮市人,汉族,副主任医师,副教授.1987年第四军医大学空军医学系本科毕业,2002年获博士学位.主要从事病毒性肝炎基因治疗的研究.

国家自然科学基金课题, No.39800122

项目负责人:冯志华,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. fengzh@fmmu.edu.cn

收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-16

## Construction, package and identification of replication-deficient recombinant adenovirus expression vector of HCV C

Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Jin-Ge Li, Zhan-Sheng Jia, Xue-Song Liang, Yu-Mei Xie, Yi-Zhan Cao, Wen-Zhen Kang

Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Jin-Ge Li Zhan-Sheng Jia, Xue-Song Liang, Yu-Mei Xie, Yi-Zhan Cao, Wen-Zhen Kang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Affiliated Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39800122

Correspondence to: Zhi-Hua Feng, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Affiliated Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. fengzh@fmmu.edu.cn

Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-16

## Abstract

**AIM:** To construct a replication-deficient recombinant adenovirus expression vector of HCV C.

**METHODS:** The HCV core gene was cloned at the downstream of CMV promoter of the adenoviral shuttle plasmid pAd.CMV-link.1, and the resultant recombinant plasmid pAd.HCV-C was cotransfected into 293 cell together with plasmid pJM17 containing adenoviral genome, then the adenovirus expression vector was obtained, and identified by infecting test, electronic microscope observation and PCR co-amplification. The plasmid pAd.HCV-C was identified by endonuclease, PCR and sequencing. The expressive activity of adenovirus vector was identified by immunofluorescence and Western blot.

**RESULTS:** HCV core gene in the inserted DNA of pAd.HCV-C was confirmed by endonuclease, PCR and sequencing. Results of infecting test, electronic microscopic observation and PCR co-amplification showed that the adenovirus vector had been constructed successfully. Expression of HCV core antigen was proved in the HepG2 cells by immunofluorescence and Western blot.

**CONCLUSION:** The replication-deficient recombinant adenovirus vector can express HCV core antigen in HepG2 cells. This

study established a foundation for further study on HCV vaccines and gene therapy for hepatitis C.

Hao CQ, Feng ZH, Zhou YX, Nie QH, Li JG, Jia ZS, Liang XS, Xie YM, Cao YZ, Kang WZ. Construction, package and identification of replication-deficient recombinant adenovirus expression vector of HCV C. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):144-147

## 摘要

**目的:** 构建能表达HCV C基因的复制缺陷型腺病毒表达载体.

**方法:** 将HCV H株C区基因定向插入到腺病毒穿梭质粒pAd.CMV-Link.1中, 获得重组质粒pAd.HCV-C, 再与pJM17共转染293细胞, 包装腺病毒表达载体. 通过酶切、PCR及测序对穿梭质粒进行了鉴定. 对腺病毒载体进行了感染性鉴定、电镜鉴定及双引物PCR鉴定. 利用间接免疫荧光法和Western blot检测了腺病毒载体在人肝癌细胞HepG<sub>2</sub>中的表达.

**结果:** 酶切、PCR及测序鉴定证实, 穿梭质粒插入片段为HCV C区基因. 包装的腺病毒载体具有良好的感染性, 可以在293细胞中形成病毒颗粒, 腺病毒载体内携带HCV C区基因, 并可以在HepG<sub>2</sub>细胞中表达HCV C抗原.

**结论:** 包装成功的复制缺陷型腺病毒载体可以在HepG<sub>2</sub>细胞中表达HCV C抗原, 为丙型肝炎的基因治疗及疫苗的进一步研究奠定了基础.

郝春秋,冯志华,周永兴,聂青和,李谨革,贾战生,梁雪松,谢玉梅,曹义战,康文臻. 复制缺陷型HCV C基因腺病毒表达载体的构建包装及鉴定. 世界华人消化杂志 2003;11(2):144-147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/144.htm>

## 0 引言

腺病毒具有宿主范围广、感染率高、包装容量大、繁殖滴度高、不发生整合及安全性好、性质稳定、载体制备较容易等特点<sup>[1-5]</sup>, 成为继逆转录病毒载体后被广泛应用的载体系统. 丙型肝炎病毒(HCV)感染是当前危害人类健康的重要传染病<sup>[6]</sup>, 至今尚无特异性的预防和治疗措施<sup>[7,8]</sup>. 基因治疗作为一种控制HCV感染的新途径, 正在受到人们的重视<sup>[9-13]</sup>. 因而, 构建并包装携带HCV C基因的腺病毒表达载体, 在丙型肝炎的预防和基因治疗中具有重要意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pBRTM/HCV1-3011质粒含HCV-H株除5' CR外的全部HCV序列, 由美国华盛顿大学Rice教授惠

赠<sup>[14]</sup>;E<sub>1</sub>区缺失的复制缺陷型腺病毒穿梭质粒 pAd.C M V-Link.1,腺病毒重组质粒 pJM17 和转化有腺病毒 E<sub>1</sub>区基因的包装细胞 293 细胞均为李谨革博士惠赠;大肠杆菌 E.coli JM 109 及 HepG2 细胞为本室保存. Hind<sup>III</sup>, Bgl<sup>II</sup>, T<sub>4</sub>DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶, dNTP, PCR 产物回收试剂盒及 Plasmid Purification Kit 均为 Promega 公司产品;脂质体 Lipofectamine 2000、DMEM 及胎牛血清均为 Gibco 公司产品;小鼠抗 HCV C 单克隆抗体购自中国预防科学院.PCR 引物设计参考已发表的 HCV H 株 C 区序列设计 1 对引物,在每条引物的 5' 端引入相应的酶切位点及保护碱基, P<sub>1</sub>(上游引物, 5' 端含有 Bgl<sup>II</sup> 位点及起始码): 5' GAAGATCTATGAGCAC GAATCCTA AACCT3'; P<sub>2</sub>(下游引物, 5' 端含有 Hind<sup>III</sup> 位点及终止码): 5' CCAAGCTTTTAGGCTGAAGCGGGCACAGT 3', 插入的 HCV C 区序列两端腺病毒载体特异性引物设计为: P<sub>3</sub>(上游引物): 5' ATAGAAGACACCGGGACCGAT CCAGCCTCC 3'; P<sub>4</sub>(下游引物): 5' TCTAGAGTCGACGGA TCCTACGTAGGTACC 3';均由大连宝生物公司合成.

## 1.2 方法

1.2.1 HCV C 基因腺病毒载体的包装 将构建好的携带 HCV C 区基因的腺病毒穿梭质粒<sup>[15]</sup> pAd.HCV-C 与腺病毒重组质粒 pJM17 用 Lipofectamine 2 000 共转染 293 细胞, 培养 24 h 后, 加第 1 层空斑琼脂糖凝胶复合物(配方为: 2 × MEM 10 mL; FBS 2 mL; 16 g/L Agar 6.8 mL; 30 g/L 谷氨酰胺 0.8 mL; 双抗 0.2 mL; Hepes 0.4 mL; 75 g/L NaHCO<sub>3</sub> 0.8 mL; NEAA 0.2 mL), 每孔 3 mL, 37 °C 培养 96 h, 加第 2 层空斑琼脂糖凝胶复合物(配方同第 1 层), 每孔 3 mL, 37 °C 培养 96 h, 加第 3 层空斑琼脂糖凝胶复合物(配方在第 1 层的基础上加 14 g/L 中性红 0.6 mL), 每孔 3 mL, 37 °C 培养 24 h, 可出现空斑. 挑取分化良好的单个空斑, 再感染 293 细胞, 出现 CPE(cytopathic effect) 时收获细胞并制成细胞冻融液(含包装好的腺病毒载体), -70 °C 冻存储用.

1.2.2 HCV C 基因腺病毒载体的鉴定 感染性鉴定用冻存的腺病毒载体感染 70-80 % 融合的 293 细胞, 37 °C 培养 2-3 d, 观察 293 有无 CPE 出现. 电镜鉴定用冻存的腺病毒载体感染 293 细胞, 37 °C 培养 2-3 d 后, 293 细胞出现 CPE. 将 293 细胞收获, 制作电镜标本, 电镜下观测细胞内有无病毒样颗粒形成. 双引物 PCR 鉴定用冻存的腺病毒载体再感染 293 细胞, 待出现 CPE 时吸取 1 mL 培养液, 提取病毒 DNA, 采用插入的 HCV C 区基因特有引物 P<sub>1</sub> P<sub>2</sub> 和腺病毒载体特有引物 P<sub>3</sub> P<sub>4</sub>, 进行双引物 PCR 鉴定. 腺病毒载体表达的免疫荧光鉴定用重组腺病毒感染 HepG2 细胞, 以抗 HCV C 单抗为一抗做间接免疫荧光实验, 检测重组腺病毒载体在 HepG2 细胞中表达 HCV C 抗原的情况. 腺病毒载体表达的 Western Blot 鉴定, 把腺病毒感染的 HepG2 细胞裂解后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后将蛋白条带电转移到硝酸纤维素膜上, 以抗 HCV C 单克隆抗体为一抗(1:10), 以 HRP-羊抗鼠 IgG 为

二抗(1:100)进行 Western Blot 实验, 检测重组腺病毒载体在 HepG2 细胞中表达 HCV C 抗原的情况.

## 2 结果

2.1 感染性鉴定 用腺病毒载体感染 293 细胞, 37 °C 培养 2-3 d, 发现 293 细胞圆缩、脱落, 出现 CPE. 表明包装成的腺病毒载体感染性良好, 可以在 293 细胞中 E1 基因产物的反式作用下大量增生, 并阻断宿主细胞 DNA 和蛋白质生成, 最终导致细胞营养耗竭而死亡.

2.2 电镜鉴定 用腺病毒载体感染 293 细胞 2-3 d 后, 293 细胞出现 CPE. 将 293 细胞收获, 制作电镜标本, 在电镜下观测, 发现有病毒样颗粒形成(图 1). 未感染腺病毒的 293 细胞未发现有病毒样颗粒形成.

2.3 双引物 PCR 鉴定 腺病毒感染的 293 细胞出现 CPE 时提取病毒 DNA, 采用插入的 HCV C 区基因特有引物 P<sub>1</sub> P<sub>2</sub> 和腺病毒载体特有引物 P<sub>3</sub> P<sub>4</sub>, 进行双引物 PCR 鉴定, 结果出现 573 和 857 两个条带(图 2), 未感染腺病毒的 293 细胞提取的 DNA 用相同的引物进行 PCR, 未见条带, 表明包装的腺病毒载体内携带 HCV C 基因.

2.4 腺病毒载体表达的免疫荧光鉴定 用重组腺病毒感染 HepG2 细胞 72 h 后, 以抗 HCV C 单抗为一抗做间接免疫荧光实验, 获得阳性结果(图 3), 证明重组腺病毒载体可以在 HepG2 细胞中表达 HCV C 抗原.

2.5 腺病毒载体表达的 Western Blot 鉴定 Western Blot 检测表明, 腺病毒载体可以在 HepG2 细胞中表达 HCV C 抗原, 该抗原可与抗 HCV C 单克隆抗体特异性结合, 其分子质量为 22 ku (图 4).

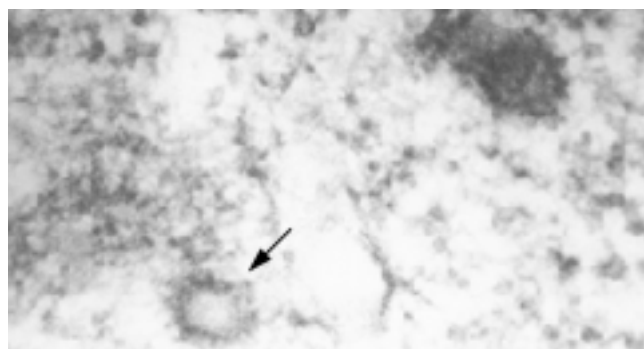
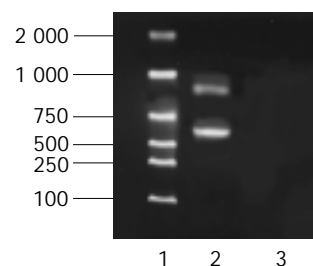


图 1 293 细胞中病毒样颗粒的形成(×100k)



1: Marker (DL-2000); 2: 重组腺病毒载体; 3: 阴性对照  
图 2 重组腺病毒载体双引物 PCR 鉴定.

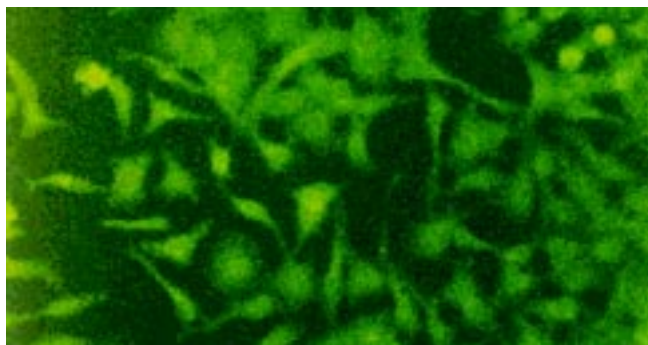
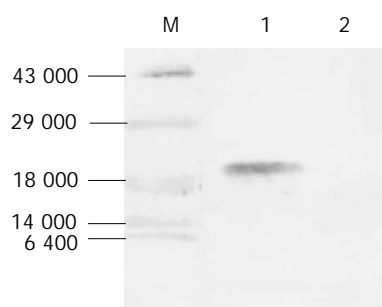


图3 间接免疫荧光法检测 HCV C 抗原在 Hep G2 细胞中表达。



M:蛋白质 marker;  
1:腺病毒感染 HepG2 细胞;  
2:未感染腺病毒的 HepG2 细胞

图4 Western Blot 法检测 HCV C 抗原在 HepG2 细胞中表达。

### 3 讨论

利用腺病毒具有与细胞表面受体结合并将其基因导入宿主细胞的特性,将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必需基因去除后可制备成腺病毒载体。因腺病毒载体具有宿主广泛、可感染静止及分裂期细胞、包装容量大及不整合等优点<sup>[1]</sup>,成为继逆转录病毒之后被广泛应用的病毒载体。我们构建的 pAd.HCV-C 是 E1 区缺失的复制缺陷型腺病毒。由于 E1 区基因为腺病毒复制所必需,因此需要由转化了 E1 区基因的包装细胞即 293 细胞提供反式补偿才能复制和扩增。这种复制缺陷的重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不能复制,因而不会直接造成靶细胞的损害。由于腺病毒基因组较大(36 kb),不便直接进行分子克隆,因此,在构建腺病毒载体时,将腺病毒基因组左端制备成含 E1 区缺失的穿梭质粒(pAd.CMV-Link.1),将目的基因 HCV C 插入其多克隆位点后(通过酶切、PCR 及测序三重鉴定,证实目的基因 HCV C 已正确插入穿梭质粒 pAd.CMV-Link.1 中)<sup>[14]</sup>再与含腺病毒基因组的质粒(pJM17)共转染至 293 细胞内进行同源重组。由于在 pJM17 中包装信号( )缺失不能被包装成病毒<sup>[15]</sup>,必须与含有包装信号的 pAd.CMV-Link.1 重组后才能形成感染性病毒,因此,有重组病毒形成后形成的空斑大多为含有目的基因的阳性克隆。本实验中,感染性试验证明了腺病毒载体具有良好的感染活性;电镜鉴定从形态学上展示了腺病毒载体的包装过程;采用插入的 HCV C 区基因特有引物和腺病毒载体特有引物,进行双引物 PCR 鉴定后,证明包装的腺病毒载体内携带 HCV

C 基因;用重组腺病毒感染 Hep G2 细胞后,通过间接免疫荧光实验发现腺病毒载体可以在 7721 细胞中表达 HCV C 抗原,证实了其表达功能的完整性。

近年由于血液、血制品和经血治疗方法的广泛应用及吸毒现象的日益严重, HCV 的感染越来越引起人们的重视<sup>[16-21]</sup>。HCV 感染常导致慢性肝炎、肝硬化、甚至肝癌及其他肝外病变<sup>[22-33]</sup>。HCV 基因序列的高度变异性,主要表现为病毒各种基因型、亚型及准种变异的存在和免疫逃避现象,使病毒得以逃避宿主免疫系统的作用而造成病毒的持续感染。由于其极易变异,型别众多,在体内呈准种分布,因而难以治疗及预防<sup>[34-36]</sup>。HCV 感染力强,没有理想的细胞模型,除黑猩猩外也没有方便的动物模型,这使 HCV 致病机制及疫苗的研究遇到了极大的困难<sup>[37]</sup>。

要获得有效的防治 HCV 感染的疫苗,必须克服 HCV 多型、易变带来的困难。HCV 中和抗体位点所在膜区(E 区)呈高度变异性<sup>[38-45]</sup>,机体感染 HCV 后易发生免疫耐受,因此,采用传统方法难以获得对不同 HCV 株型同时具有防治功效的疫苗。要克服这种免疫耐受现象,就必须避开高变区,选择相对保守区进行实验,同时诱导机体产生体液免疫及对预防和清除不同株型 HCV 感染具有重要作用的细胞免疫应答。因此,本文选用在我国常见的 HCV 1 型 H 株的高度保守区 C 区基因作为目的基因,插入到腺病毒表达载体中,构建了能表达 HCV C 基因的腺病毒载体,为以后进一步探讨抗 HCV 重组腺病毒疫苗及 T 细胞疫苗奠定了基础<sup>[46-48]</sup>。

### 4 参考文献

- Amalfitano A, Parks RJ. Separating fact from fiction: assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:111-133
- Shi M, Wang FS, Gao LX. Towards development of adenoviruses vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1282-1286
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He TC. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-162
- Alesci S, Ramsey WJ, Bornstein SR, Chrousos GP, Hornsby PJ, Benavente S, Trimarchi F, Ehrhart-Bornstein M. Adenoviral vectors can impair adrenocortical steroidogenesis: clinical implications for natural infections and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ;99:7484-7489
- Rademaker HJ, Abou El Hassan MA, Versteeg GA, Rabelink MJ, Hoebe RC. Efficient mobilization of E1-deleted adenovirus type 5 vectors by wild-type adenoviruses of other serotypes. *J Gen Virol* 2002;83:1311-1314
- Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285:26-30
- Higuchi M, Tanaka E, Kiyosawa K. Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. *Jpn J Infect Dis* 2002;55:69-77
- Geller SA. Hepatitis B and hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2002;6: 317-334
- Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8
- Anderson WF. Gene therapy: The best of times, the worst of times. *Science* 2000;288:627- 629
- Xu CT, Pan BR. Current status of gene therapy in gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998;4:85-89
- Wu GY, Wu CH. Gene therapy and liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):18-19
- Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321.

- J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 14 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
  - 15 Mizuguchi H, Hayakawa T. Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* 2002;285:69-77
  - 16 Alavian SM, Gholami B, Masarrat S. Hepatitis C risk factors in Iranian volunteer blood donors: A case-control study. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1092-1097
  - 17 Van Hulst M, De Wolf JT, Staginnus U, Ruitenberg EJ, Postma MJ. Pharmacoeconomics of blood transfusion safety: review of the available evidence. *Vox Sang* 2002;83:146-155
  - 18 Wang NS, Liao LT, Zhu YJ, Pan W, Fang F. Follow up study of hepatitis C virus infection in uremic patients on maintenance hemodialysis for 30 months. *World J Gastroenterol* 2000;6:888-892
  - 19 Sreekumar R, Rasmussen DL, Wiesner RH, Charlton MR. Differential allograft gene expression in acute cellular rejection and recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:814-821
  - 20 Miller CL, Johnston C, Spittal PM, Li K, Laliberte N, Montaner JS, Schechter MT. Opportunities for prevention: Hepatitis C prevalence and incidence in a cohort of young injection drug users. *Hepatology* 2002;36:737-742
  - 21 Robaey G, Mathei C, Buntinx F, Vanranst M. Management of hepatitis C virus infections in intravenous drug users. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:99-100
  - 22 Danta M, Dore GJ, Hennessy L, Li Y, Vickers CR, Harley H, Ngu M, Reed W, Desmond PV, Sievert W, Farrell GC, Kaldor JM, Batey RG. Factors associated with severity of hepatic fibrosis in people with chronic hepatitis C infection. *Med J Aust* 2002;177:240-245
  - 23 Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein in genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
  - 24 Wu J, Cheng ML, Ding YS, Liu RC, Li J, Wang WL, Hu L. A five year followed up survey of risk factor of viral hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1365-1367
  - 25 Hamada H, Yatsushashi H, Yano K, Daikoku M, Arisawa K, Inoue O, Koga M, Nakata K, Eguchi K, Yano M. Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with posttransfusion chronic hepatitis C. *Cancer* 2002;95:331-339
  - 26 Du JH, Cha WZ. Interrelation between hepatitis C and primary hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:176-179
  - 27 Ganne-Carrie N, Chevret S, Barbare JC, Chaffaud C, Grando V, Vogt AM, Beaugrand M, Trinchet JC. Practical screening and early treatment of hepatocellular carcinoma. *Results French Survey Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:570-577
  - 28 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75
  - 29 Hassan MM, Frome A, Patt YZ, El-Serag HB. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:266-269
  - 30 Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
  - 31 Koukourakis MI, Kapsoritakis A, Maltezos E, Potamiano S, Mouzas I, Kouroumalis H. Unexpected toxicity after low-dose docetaxel treatment of a cancer patient with clinically latent HCV-positive hepatic cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:2491-2492
  - 32 Gasparotto D, De Re V, Boiocchi M. Hepatitis C virus, B-cell proliferation and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2002;43:747-751
  - 33 Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol* 2002;40:3127-3134
  - 34 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
  - 35 Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000;6:465-469
  - 36 Yan XB, Wu WY, Wei L. Clinical features of infection with different genotypes of hepatitis C virus. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:653-655
  - 37 Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ. Interaction of Hepatitis C Virus-Like Particles and Cells: a Model System for Studying Viral Binding and Entry. *J Virol* 2002;76:9335-9344
  - 38 Nishiguchi S, Tanaka M, Shiomi S, Kaneshiro S, Enomoto M, Fukuda K, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tohdoh N, Otani S, Tatsumi N. Changes in hypervariable region 1 in patients with chronic hepatitis C of genotype 1b with biochemical response to interferon. *Hepatol Res* 2002;23:237
  - 39 Esumi M, Zhou Y, Tanoue T, Tomoguri T, Hayasaka I. In vivo and in vitro evidence that cross-reactive antibodies to C-terminus of hypervariable region 1 do not neutralize heterologous hepatitis C virus. *Vaccine* 2002;20:3095
  - 40 Song ZQ, Hao F, Zhang J, Gu CH. Detection of antibodies against hypervariable region 1 in sera from patients with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:666-668
  - 41 Min F, Hao F. Hepatitis C virus envelope protein and protective immunity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1065-1067
  - 42 Passos EP, Silveira TR, Salazar CC, Facin AC, Souza CA, Guerin YL, Gratao AA, Cunha-Filho JS. Hepatitis C virus infection and assisted reproduction. *Hum Reprod* 2002;17:2085-2088
  - 43 Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, Saitoh S, Tsubota A, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Influence of hepatitis C virus subtype on hepatocellular carcinogenesis: a multivariate analysis of a retrospective cohort of 593 patients with cirrhosis. *Intervirology* 2002;45:71-78
  - 44 Legrand E, Neau D, Galperine T, Trimoulet P, Moreau JF, Pitard V, Lacut JY, Ragnaud JM, Dupon M, Le Bail B, Bernard N, Schvoerer E, Houghton M, Fleury H, Lafon ME. CD4 T Lymphocyte Proliferative Responses to Hepatitis C Virus (HCV) Antigens in Patients Coinfected with HCV and Human Immunodeficiency Virus Who Responded to Anti-HCV Treatment. *J Infect Dis* 2002;186:302-311
  - 45 Woitas RP, Sippel M, Althausen EM, Brackmann HH, Kochan B, Matz B, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U. Differential expansion of T-cell receptor variable beta subsets after antigenic stimulation in patients with different outcomes of hepatitis C infection. *Immunology* 2002;106:419-427
  - 46 McMichael A, Mwau M, Hanke T. HIV T cell vaccines, the importance of clades. *Vaccine* 2002;20:1918-1921
  - 47 Bona CA, Csaszar S, Brumeau TD. Towards development of T-cell vaccines. *Immunol Today* 1998;19:126-133
  - 48 Elliott SL, Pye S, Le T, Mateo L, Cox J, Macdonald L, Scalzo AA, Forbes CA, Suhrbier A. Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine* 1999;17:2009-2019

# 丙型肝炎病毒锤头结构核酶的细胞内免疫

贾战生,陈琳,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,曹义战,周永兴

贾战生,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
陈琳,中国人民解放军第四军医大学唐都医院呼吸内科 陕西省西安市 710038  
曹义战,中国人民解放军第四军医大学唐都医院急诊科 陕西省西安市 710038  
贾战生,男,1959-10-30生,陕西省西安市人,汉族,副主任医师,副教授,医学博士,中华医学会传染病与寄生虫病分会全国青年委员,主要从事病毒性肝炎发病机制和基因治疗研究,发表论文50篇,获军队科技进步成果奖5项,参与编写专著5部。  
国家自然科学基金课题, No.30070687  
全军医药卫生基金资助课题, No.89D048  
项目负责人:贾战生,710080,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, jiazsh@fmmu.edu.cn  
电话:029-3377742 传真:029-3537377  
收稿日期:2002-10-15 接受日期:2002-11-16

## Intracellular immunization by hammerhead ribozyme against HCV

Zhan-Sheng Jia, Lin Chen, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jin-Ge Li, Jiu-Ping Wang, Yi-Zhan Cao, Yong-Xing Zhou

Zhan-Sheng Jia, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jin-Ge Li, Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China  
Lin Chen, Department of Respiratory System, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China  
Yi-Zhan Cao, Department of Emergency Medicine, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China  
Supported by the Scientific Foundation of Military Medicine, No.89D048  
Correspondence to: Dr. Zhan-Sheng Jia The center of diagnosis and treatment of infection diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China.  
jiazsh@fmmu.edu.cn  
Received:2002-10-25 Accepted:2002-11-16

## Abstract

AIM:To evaluate the effect of hammerhead ribozyme 213 (Rz 213) against hepatitis C virus (HCV) infection.

METHODS:Rz213 cleaving 5'noncoding region (5'NCR) of HCV was beforehand transfected in a human hepatic carcinoma cell (HHCC) line and selected for G418 resistance. Cells stably expressing Rz213 were retransfected with pCMVNCRIuc containing 5'NCR-luc fusion genes by lipofectAMINE; luciferase activity in lysate of transfectant was measured in scintillation counter.

RESULTS:HHCC cells stably expressing Rz213 exhibited significant resistance to retransfection of targeting gene.

CONCLUSION:Stably transfected cells with Rz213 were selected and expressed in HHCC, and thus exerted the intracellular immunity against infection of HCV.

Jia ZS, Chen L, Hao CQ, Feng ZH, Li JG, Wang JP, Cao YZ, Zhou YX. Intracellular immunization by hammerhead ribozyme against HCV. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):148-150

## 摘要

目的:探讨预先转染丙型肝炎病毒(HCV)核酶(Rz213)的人肝癌细胞对HCV再转染的抑制作用。

方法:应用从前构建的HCV锤头结构Rz(Rz213),通过脂质体介导的基因转染方法,转染人肝癌细胞(HHCC),经G418筛选转染Rz213的基因克隆,应用luc报告基因的表达活性,观察该细胞克隆对靶基因(pCMVNCRIuc)转染的抑制作用。

结果:G418筛选能使Rz213在转染细胞内有效表达Rz RNA,转染Rz的多克隆细胞能有效地阻断靶基因的再转染。

结论:我们构建的Rz213真核表达载体能在HHCC细胞内有效表达,预先转染发挥细胞内免疫作用,可防止HCV感染。

贾战生,陈琳,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,曹义战,周永兴. 丙型肝炎病毒锤头结构核酶的细胞内免疫. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):148-150  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/148.htm>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)非编码区(5' NCR)和核心(C)区高度保守,具有重要的生物学功能,是基因治疗选择的理想靶序列<sup>[1-5]</sup>。锤头结构核酶(hammerhead Rz)分子较小,结构简单,易于体外设计合成,已广泛用于抗病毒基因治疗研究<sup>[6-13]</sup>。应用Rz基因转染技术作为细胞内免疫的工具,由Baltimore at al首次提出,并应用于艾滋病毒(HIV)的防治研究。Heusch at al应用发夹(hairpin)结构核酶作为细胞内免疫分子,预先转染人CEM/1细胞证明,该细胞可以有效抵抗HIV病毒感染。我们从前的研究结果表明,以HCV 5' NCR为靶序列设计的锤头结构Rz,可在细胞内有效地抑制靶基因的表达<sup>[10,14,15]</sup>。本研究探讨了抗HCV 5' NCR核酶预先转染靶细胞的预防作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株(human hepatic carcinoma cell, HHCC)由中科院上海细胞所细胞库引种,本校863研究室保存。核酶真核表达载体pcEM-Rz213(Rz213)由本室自行设计构建,并经测序体外切割证明<sup>[14]</sup>。靶基因pCMVNCRIuc含有HCV 5' NCR和C区66 nt,并与luc基因融合,由德国的Alt教授惠赠<sup>[1]</sup>。转染方法按试剂盒说明操作(Lipofectamine和G418为Gibco产品)。

1.2 方法 通过显微镜观察Rz转染对细胞生长特性的影响,同时收集对数生长期细胞,用胰酶消化,尽可能消化成

单个细胞悬液, 75 ml/L 乙醇固定, 流式细胞仪检测细胞周期。细胞转染 Rz213 48 h 后, 传代细胞 (1~5) 于 6 孔和 24 孔培养板内, 换用 350 mg/L 的 G418 完全培养液, 筛选转染细胞, 每 3 d 换培养液 1 次。不同时间收集细胞, 制备裂解液。留一部分做克隆筛选, 直至细胞克隆出现。荧光素酶 (Luc) 活性检测按试剂盒说明操作 (luciferase assay system 为 promega 产品)。取 20  $\mu$ L 细胞裂解液, 加入 1.5 mL Eppendorf 管, 加 100  $\mu$ L luc 测试液, 混匀; 尽快用液体闪烁计数器计 1 min 的 cpm 值<sup>[15]</sup>。同时用 Bradford 法测定 20  $\mu$ L 裂解液中的蛋白含量, 最后核算成每  $\mu$ g 蛋白所含的计数值。

统计学处理 数据均以均值加减标准差表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 Rz 转染对细胞的影响** 将 pcEM-Rz213 转染的 HHCC 细胞多克隆 (20 d), 传代取对数生长期细胞, 作细胞周期检测, 同时用转染空载体的 HHCC 细胞对照。结果表明, 两组之间无显著意义, 说明 Rz 和载体在短期内对细胞的增生周期可能无影响。

**2.2 G<sub>418</sub> 筛选对 Rz 与 luc 基因共转染的影响** pCMVNCRIuc 为瞬时表达载体, 缺乏新霉素基因, 与 pcDNA3 共转染, 经 G<sub>418</sub> 筛选可明显延长 luc 的表达。然而, 该载体与 Rz213 共转染, G<sub>418</sub> 筛选提高了 Rz 基因的表达, luc 活性并没有延长, 说明 Rz 基因在细胞内抑制了 luc 的表达。靶基因组、Rz+靶基因组和对照组 (空载体+靶基因) luc 活性均随时间下降, 但在第 5 天时各组之间就有显著差异, 对照组最高, Rz 组最低。8 d 后见 Rz 组 luc 活性明显低于对照组。随 G<sub>418</sub> 筛选时间延长 (最长 20 d), 仅对照组可检测到 luc 活性, 但 cpm 值均在 5 000 以下, 远比前 72 h 低 (图 1)。

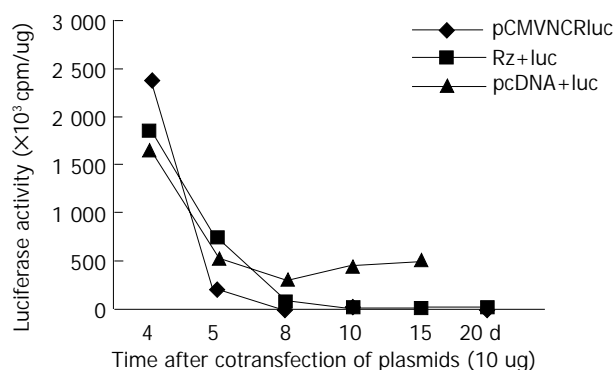


图 1 G<sub>418</sub> 筛选对 Rz+luc 基因共转染的影响

**3.3 pcEM-Rz213 的细胞内免疫** Rz213 与 pCMVNCRIuc 靶基因共转染细胞, Rz213 可有效地抑制 luc 的活性。为了证明 Rz 对细胞的保护作用, 预先将 pcEM-Rz213 转染 HHCC 细胞, 经 G<sub>418</sub> 筛选抗性多克隆细胞。以此为靶再用 pCMVNCRIuc 转染。结果表明, 预先转染 pcEM-Rz213 的 HHCC 细胞可有效地阻断再转染靶基因的表达 (图 2)。

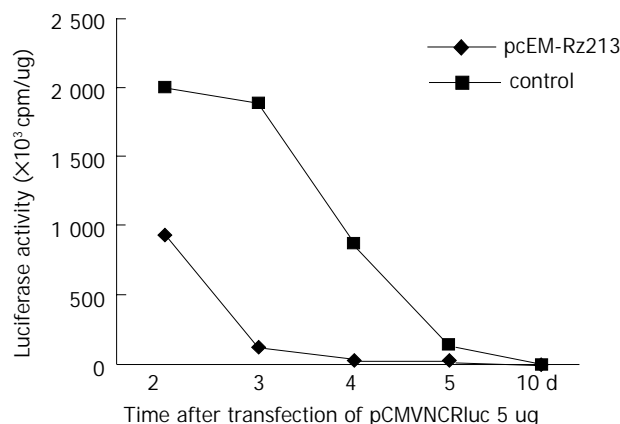


图 2 pCMVNCRIuc 在 pcEM-Rz213 转染免疫细胞内的表达

## 3 讨论

细胞内免疫包括细胞内抗体、DNA 免疫、核酶和细胞因子基因转染等<sup>[16-21]</sup>, 是抗病毒基因治疗的重要手段之一。其主要步骤: 将目的基因转入靶细胞, 使靶细胞稳定表达某种抗病毒分子, 通过细胞内分子的作用, 有效地抑制病毒基因的表达和复制, 因此转入该基因的细胞能有效地抵抗病毒的攻击, 达到细胞内免疫的目的。Yu at al 应用逆转录病毒为载体, 将抗 HIV-1 病毒的核酶基因转入胎儿脐血 CD34<sup>+</sup> 干细胞, 结果发现随细胞分化增生, 核酶基因仍有效表达, 转染目的基因的细胞可抵抗 HIV-1 病毒的感染。最近, Fraiser at al<sup>[22]</sup> 应用抗 tat 核酶和抗 TAR 的 RNA 诱饵联合细胞内免疫, 并在靶基因的 3' 端添加  $\beta$ -球蛋白的 3' 非编码序列, 增加了靶基因的稳定性, 有效地提高了抗 HIV 效果。

HCV 感染者接受肝移植后, 发生移植肝再感染 HCV 是导致肝脏移植失败的主要原因<sup>[23]</sup>。应用核酶技术, 采用 HIV 细胞内免疫的思路, 有可能防止移植肝再感染 HCV。HCV 核酶作为基因治疗的手段之一, 已经多位学者证明, 可有效地抑制病毒基因的表达<sup>[11, 12, 22-24]</sup>。我们在研究了抗 HCV Rz 在细胞内抑制病毒基因表达的基础上, 探讨了该 Rz 预先转染肝细胞的细胞内免疫效应。结果表明, 抗 HCV 5' NCR Rz213 预先转染的 HHCC 细胞, 可有效地表达 Rz RNA 分子, 经 G<sub>418</sub> 筛选的抗性多克隆细胞能够有效地抵抗靶基因的再转染。提示将抗 HCV Rz 预先导入细胞, 有可能象 HCV “疫苗” 免疫一样, 防止 HCV 感染, 这对于慢性肝病晚期接受肝移植的患者可能是一种新治疗希望, 预先将抗 HCV Rz 导入移植的肝细胞, 以防止移植肝再感染 HCV。

基因治疗能否应用于临床, 一方面取决于基因治疗的有效性, 另一方面由其对机体的副作用决定<sup>[25-27]</sup>。抗 HCV Rz 载体介导的内源性 Rz 在细胞内有效表达是 Rz 清除病毒的基础。借鉴体外切割实验的数据, Rz 在细胞内要达到完全清除病毒, 其分子数必需是靶基因的 100 倍以上, 并要求 Rz 能到达所有 HCV 感染的肝细胞和非肝细胞<sup>[4, 24]</sup>。我们选择 pcDNA3 作为真核载体是一高效真核表达载体, 结果表明, 经 G<sub>418</sub> 抗性筛选可以提高 Rz

的表达. 细胞生长特性和细胞周期的研究表明,该载体和 Rz 基因近期对靶细胞无毒副作用.

#### 4 参考文献

- Alt M, Eisenhardt S, Serwe M, Renz R, Engels JW, Caselmann WH. Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest* 1999;29:868-876
- Pybus CG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 2001;292:2323-2325
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- Cornberg M, Wedemeyer H, Manns MP. Hepatitis C: therapeutic perspectives. *Forum* 2001;11:154-162
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135
- Ni YH. In vivo hepatic gene therapy. *Acta Paediatr Taiwan* 2001;42:191-200
- Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Inhibition of hepatitis B virus by hammerhead ribozyme targeted to the poly(A) signal sequence in cultured cells. *Biol Chem* 2001;382:655-660
- Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA- dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
- Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computer design of the hammerhead ribozyme against hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice[J]. *Hepatology* 2000;32:640-646
- Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY. Inhibition of the expression of hepatitis C virus by hammerhead ribozyme in HHCC. Cell line[J]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:631-633
- Jia ZS, Zhou YX, Feng ZH, Lian JQ, Li GY, Jiao CS, Li GY. Intracellular inhibition of viral gene expression by ribozyme against 5'-noncoding region of hepatitis C virus. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 2000;18:10-12
- Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 1999;30:300-307
- zu Putlitz J, Skerra A, Wands JR. Intracellular expression of a cloned antibody fragment interferes with hepatitis B virus surface antigen secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:110-113
- Chen L, Li G, Tang L, Wang J, Ge XR. The inhibition of lung cancer cell growth by intracellular immunization with LC-1 ScFv. *Cell Res* 2002;12:47-54
- Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
- Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibition of E antigen of hepatitis B virus by ribozyme in HHCC cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:28-30
- Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA, Lode HN. IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 2001;166:6944-6951
- Fraisier C, Irvine A, Wrighton C, Craig R, Dzierzak E. High level inhibition of HIV replication with combination RNA decoys expressed from an HIV-Tat inducible vector. *Gene Ther* 1998;5:1665-1676
- Teixeira R, Papatheodoridis GV, Burroughs AK. Management of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Viral Hepat* 2001;8:159-168
- Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM, Blatt LM. Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat* 2001;8:400-405
- Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology* 2000;32:640-646
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* 2000;288:669-672
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135

# 透射电镜及激光共聚焦技术观察体外丙型肝炎病毒感染的人胎盘滋养层细胞

程勇前,聂青和,周永兴,黄晓峰,罗红,杨华光

程勇前,聂青和,周永兴,罗红.中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
黄晓峰,中国人民解放军第四军医大学电子显微镜室 陕西省西安市 710038  
杨华光,中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科 陕西省西安市 710038  
程勇前,女,1971-11-20 生,汉族,医学硕士,医师.山西省太原市人.  
国家自然科学基金资助课题, No.39970767  
项目负责人:聂青和,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-20

## Ultrastructure characteristics of HCV infected human trophoblast cells in culture

Yong-Qian Cheng, Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Xiao-Feng Huang, Hong Luo, Hua-Guang Yang

Yong-Qian Cheng, Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Hong Luo, The center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China.  
Xiao-Feng Huang, Department of Electron Microscope, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China.  
Hua-Guang Yang, Department of Obstetrics & Gynecology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China.  
Supported by National Natural Scientific Foundation, No. 39970767  
Correspondence to: Dr. Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Disease of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China. nieqinghe@hotmail.com  
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-20

## Abstract

**AIM:** To investigate whether the cultured trophoblastic cells can be infected with hepatitis C virus (HCV) and observe the ultrastructural features of infected cells.

**METHODS:** Human placentae were digested with trypsin and then centrifuged with percoll density gradient to obtain trophoblastic cells, and then incubated in HCV positive serum. The HCV RNA in HCV infected syncytiotrophoblasts was quantitated with RT-PCR. Ultrastructural characteristics of infected syncytiotrophoblasts were observed with transmission electron microscope.

**RESULTS:** HCV RNA was detected in supernatant of the cultured medium during 40 day periods of incubation. The antibody of HCV NS5 was observed around the nucleus with confocal microscope. The Ultrastructure of infected trophoblast cells differed obviously from that of normal cells, and manifested with hyperplasia of lysosomes and rough endoplasmic, appearance of vacuoles and virus-like particles, and decreased lipid droplets.

**CONCLUSION:** Trophoblastic cells could be infected by HCV,

and the cellular ultrastructure changed dramatically following infection of HCV.

Cheng YQ, Nie QH, Zhou YX, Huang XF, Luo H, Yang HG. Ultrastructure characteristics of HCV infected human trophoblast cells in culture. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):151-156

## 摘要

**目的:** 探讨体外分离培养的人体胎盘滋养层细胞感染丙型肝炎病毒(HCV)的可能性,以及滋养层细胞感染HCV后的超微结构改变。

**方法:** 采用胰蛋白酶消化法及Percoll密度梯度分离法分离培养人胎盘组织中滋养层细胞后,以HCV RNA阳性血清对滋养层细胞进行体外感染试验,应用RT-PCR法定性及定量检测感染后细胞培养上清中HCV RNA,透射电镜观察HCV感染后滋养层细胞的超微结构改变,并用激光共聚焦技术观察免疫荧光染色后HCV NS5在滋养层细胞中的定位。

**结果:** HCV感染后的细胞培养上清中可间断检测到HCV RNA,而对照组始终未检出;激光共聚焦观察显示HCV NS5主要定位于细胞核周;HCV感染后滋养层细胞超微结构发生了明显改变,主要表现为溶酶体大量增生,粗面内质网增生,脂滴减少,出现空泡状结构,并可观察到病毒样颗粒。

**结论:** HCV可以感染滋养层细胞,并导致滋养层细胞的超微结构发生类似黄病毒科病毒感染后的改变。

程勇前,聂青和,周永兴,黄晓峰,罗红,杨华光. 透射电镜及激光共聚焦技术观察体外丙型肝炎病毒感染的人胎盘滋养层细胞. 世界华人消化杂志 2003;11(2):151-156  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/151.htm>

## 0 引言

HCV主要经血液或血制品传播,随着对血制品检测的加强及检测技术的提高,HCV经输血传播的发生率已大大降低<sup>[1]</sup>.现研究认为HCV存在母婴传播<sup>[2-8]</sup>,HCV感染的母亲中,HCV母婴传播发生率大约为5%左右<sup>[9-13]</sup>,但目前尚无有效的方法阻断HCV的母婴传播,因此HCV的母婴传播将可能成为未来HCV感染的重要途径<sup>[14]</sup>.我国丙型肝炎较常见,对人类健康危害很大,在目前尚无特效药物治疗HCV感染,以及丙型肝炎疫苗尚难以用于人体预防HCV感染的情况下<sup>[15-33]</sup>,阻断HCV母婴传播的研究工作显得十分重要。

目前有关 HCV 母婴传播的研究多数为流行病学调查,关于HCV如何在母婴间进行传播的具体机制尚不清楚,可能为宫内传播、出生时传播和出生后通过母乳、唾液等,而宫内感染可能是HCV母婴传播的主要机制之一.胎盘是胎儿与母体之间进行物质交换的重要器官,由滋养层细胞、毛细血管内皮细胞以及二者之间基膜所构成的胎盘屏障是营养物质以及某些药物、病毒、激素等从母体进入胎儿的必经之路,而滋养层细胞是胎盘屏障的第一道防线.本研究用 HCV RNA 阳性血清感染体外培养的人胎盘滋养层细胞,并运用透射电镜及激光共聚焦技术观察滋养层细胞感染HCV后的特性,为进一步研究 HCV 的母婴传播机制提供形态学基础.

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂来源 Percoll 细胞分离液为美国 Pharmacia 公司产品(No:05-59-16-001A),免疫组织化学染色用 ABC 试剂盒购自华美生物工程公司,所用细胞角蛋白(No:C8541)及波形蛋白抗体(No:MU074-UC)购自宝泰克生物工程公司.HCV RNA 荧光定量检测试剂盒购自美国 Acegene 公司.

1.2 单细胞悬液的制备 取剖腹产术后的无菌胎盘组织,将绒毛组织剪碎至 1-3 mm<sup>3</sup>,以 0.25 % 胰蛋白酶液及 20 u/ml DNase 于 37 °C 恒温摇床内消化 30 min,消化产物经 100 目不锈钢筛网过滤后,滤液加入预先加有 5 ml 小牛血清的 50 ml 离心管内,1 000 rpm·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清,DMEM 培养液重悬沉淀.

1.3 Percoll 密度梯度制备 用 9.0 % NaCl 与 Percoll 以 1 : 9 混合,以达到生理性渗透压,再以 0.9 % NaCl 稀释为 45 % 和 35 % 两个浓度,按浓度从大到小将两个不同密度的 Percoll 溶液逐层缓慢加入 10 ml 离心管内,每个浓度 3 ml.

1.4 细胞的纯化与培养 将收集的细胞悬液 2 ml 缓慢加于 Percoll 分离液上层,以 2 500 rpm·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,用吸管小心吸取云雾状的中层置于一 50 ml 离心管内,DMEM 稀释 4 倍,1 000 rpm·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清,以含 20 % 胎牛血清 DMEM 培养液重悬沉淀,将细胞悬液浓度调整至 5-6 × 10<sup>5</sup>·L<sup>-1</sup>,置于培养瓶或预先置有盖玻片的六孔培养板内 37 °C,5 % CO<sub>2</sub> 孵箱内培养.

1.5 免疫细胞化学染色 细胞爬片固定后,用 ABC 法进行细胞角蛋白、波形蛋白染色,操作步骤按说明书进行.胎盘组织切片脱蜡至水后用 ABC 法进行细胞角蛋白、波形蛋白染色.

1.6 HCV 体外感染试验 HCV 感染血清选择抗 HCV 阳性, HCV RNA 6.1 × 10<sup>7</sup> copies·L<sup>-1</sup> 的血清,经血清学检查甲、乙、丁、戊肝炎病毒标志物均为阴性,同时用正常人血清作为阴性对照.

以含 20 % 丙型肝炎患者血清(HCV RNA 检测阳性)的 DMEM 培养液感染体外培养 24 h 后的滋养层细胞.同时分别含 20 % 正常人血清的 DMEM 培养液感染体外培

养 24 h 后的滋养层细胞作为阴性对照,37 °C,5 % CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 24 h 后倒置显微镜下观察,并进行第 1 次换液,弃去感染血清,PBS 充分洗涤 5 次后加入新鲜培养液,留取最后 1 次洗液待检,以后每 2 d 换液 1 次,留取培养上清待检.

1.7 培养上清的 HCV RNA 定性及定量检测 为保证试验可靠性,分别采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及扩增敏感试验(amplisensor assay)对培养上清中 HCV RNA 进行定性及定量检测,具体步骤按操作说明书进行.

培养上清的 HCV RNA 定性检测简要步骤如下:提取 HCV RNA,加入逆转录反应体系,37 °C,30 min:预变性 94 °C,300 sec,第 1 次 PCR 循环,94 °C 45 sec,50 °C 45 sec,72 °C 45 sec 循环 35 次,终延伸 72 °C,300 sec;取 2 μl 第 1 次循环后的产物加入第 2 次 PCR 反应缓冲液 23 μl;预变性 94 °C,300 sec,第 2 次 PCR 循环,94 °C 45 sec,55 °C 45 sec,72 °C 45 sec 循环 35 次,终延伸 72 °C,300 sec;取扩增产物 15 μl 加样于含溴化乙锭的 2 % 琼脂糖凝胶,于 1 × TAE 缓冲液中在 60 v 电压下电泳 15-20 min.根据试剂盒说明,紫外灯下观察 225 bp 处有荧光者为阳性.

培养上清的 HCV RNA 定量检测简要步骤如下:提取 HCV RNA,加入逆转录反应体系,37 °C,45 min:预变性 90 °C,2 min,PCR 循环,95 °C 25 sec,60 °C 35 sec,72 °C 45 sec 循环 20 次,终延伸 72 °C,30 sec,10 °C 保温 1 h;计算机读取数值, > 10<sup>4</sup> 者为阳性.

1.8 电镜标本制作 细胞培养 40 d 后以 0.25 % 胰蛋白酶分别消化感染组及对照组贴壁生长的细胞,PBS 洗涤 1 次,2 000 rpm·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,4 % 戊二醛固定过夜,送本校电镜室.

## 2 结果

2.1 滋养层细胞体外生长特性观察 本方法分离纯化后的中层细胞在倒置显微镜下观察以单个核细胞为主,培养 3 h 后开始贴壁,18 h 后基本全部贴壁,贴壁细胞多呈上皮细胞样生长,形态多样,个别细胞呈纤维细胞样.24 h 后开始出现多个核细胞,并随时间推移逐渐增大,成片生长.HCV 感染后,感染组及对照组细胞光镜下观察未见明显不同.

2.2 免疫细胞化学染色结果 细胞爬片染色阳性信号为棕黄色颗粒,结果显示,90 % 以上细胞的细胞角蛋白染色阳性,阳性信号定位于细胞质,而波形蛋白染色仅个别细胞可见阳性信号.

2.3 免疫荧光染色结果 HCV 感染后的滋养层细胞抗-HCV NS5 染色阳性,阳性信号为黄绿色或黄色荧光,主要定位于细胞核周.正常对照标本的滋养层细胞抗-HCV NS5 染色未见黄绿色或黄色荧光,因伊文蓝衬染而呈现红色.

2.4 激光共聚焦观察 HCV 感染后的滋养层细胞抗 HCV NS5 染色阳性信号为黄绿色或黄色荧光,主要定位于细胞核周(图 1).

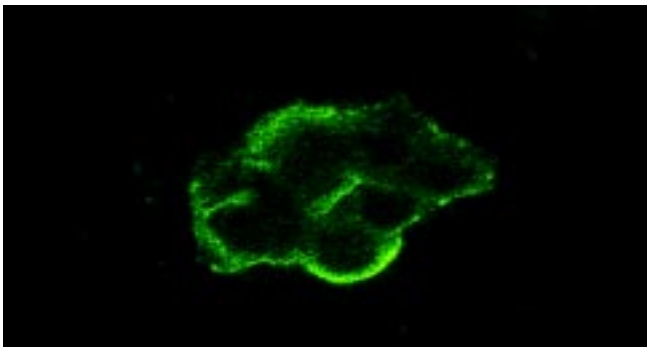


图1 HCV 感染后的滋养层细胞抗 HCV NS5 染色 (300 × 3.53)

2.5 培养上清 HCV RNA 检测结果 对收集的感染前、感染血清、感染后洗液、感染后 2-16 d 培养上清共 11 份标本进行 HCV RNA 定性(图 2)定量检测,结果如下(见表 1).

表 1 HCV RNA 定量、定性检测结果

	定量检测(单位:copies/ml)		定性检测	
	感染组	对照组	感染组	对照组
感染前	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染血清	6.1 × 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后洗液	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 2 d	1.4 × 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 4 d	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 6 d	9.7 × 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 8 d	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 10 d	2.5 × 10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>4</sup>	+	-
感染后 12 d	1.5 × 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 14 d	6.0 × 10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>4</sup>	-	-
感染后 16 d	4.0 × 10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>4</sup>	+	-

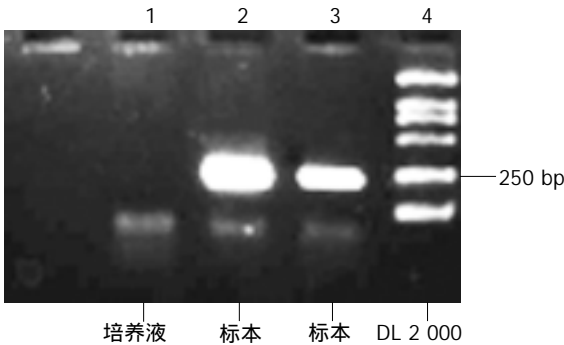


图2 培养上清 HCV RNA 定性检测结果

2.6 电镜观察 透射电镜下未感染 HCV 的滋养层细胞直径 16 μm 左右, 表面微绒毛发达, 可见较多被膜小凹, 胞质内可见较多包膜小泡及丰富的微丝, 脂滴较多.感染HCV后的滋养层细胞超微结构发生了明显的改变主要表现如下:

2.6.1 病毒样颗粒 在 HCV 感染后的滋养层细胞内观察到许多病毒颗粒样结构(图3),位于胞质内或空泡状结构内, 圆球形或椭圆形, 有明确的外膜, 核衣壳样结构外表面为细长的钉状突起, 核心直径 50 nm 左右.在细胞膜上发现类似病毒内吞和芽生的形态.

2.6.2 溶酶体大量增生 感染了 HCV 的滋养层细胞内可见大量的溶酶体增生,增生的溶酶体有两种形态:(1)空泡状溶酶体:细胞电子密度降低, 胞质被大量增生的溶酶体所占据,增生的溶酶体内可见许多更小的空泡状结构(图4);(2)髓鞘状溶酶体:细胞电子密度较高,胞质内可见大量电子密度较高的溶酶体,形成髓鞘状(图 5).

2.6.3 空泡状结构 HCV 感染的滋养层细胞内可以看到许多聚集存在的花环状排列的空泡结构,并有大量小囊泡结构, 其内亦可见到类似病毒核衣壳样小空泡(图 6).

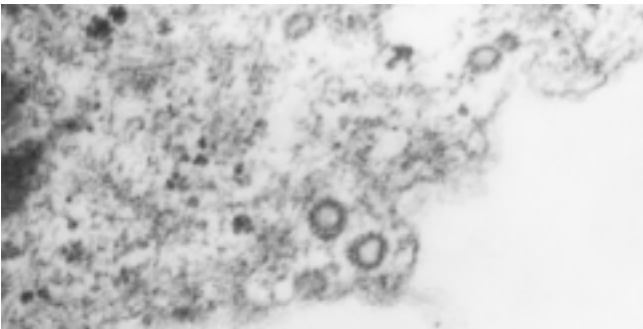


图3 病毒颗粒样结构(× 40K)

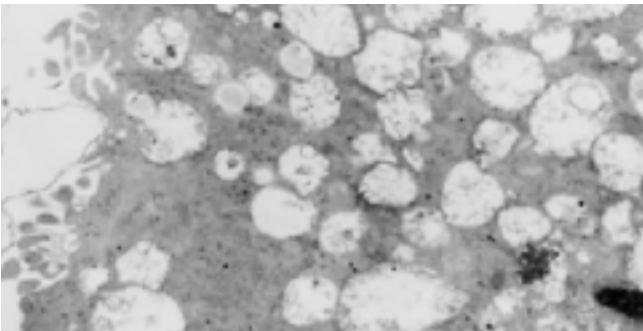


图4 空泡状溶酶体及小囊泡(× 1K)

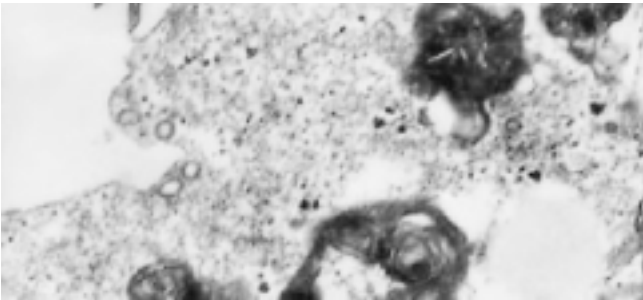


图5 髓鞘状溶酶体及病毒样颗粒(× 20K)

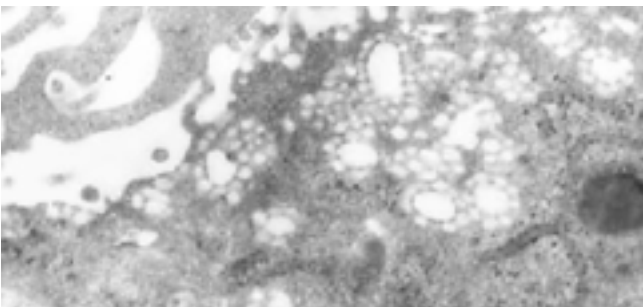


图6 空泡状结构(× 15K)

2.6.4 粗面内质网增生 HCV感染的滋养层细胞内可见粗面内质网增生,粗面内质网内可见细丝状物和小泡状结构,小泡膜似与粗面内质网内膜相连。

2.6.5 脂滴减少 正常滋养层细胞内可见大量脂滴,而感染了HCV的细胞内脂滴明显减少。

### 3 讨论

胎盘屏障是营养物质以及某些药物、病原体、激素等从母体进入胎儿的必经之路,合体滋养层细胞还具有重要的内分泌功能,体外分离培养滋养层细胞是研究其功能及母体与胎儿之间物质交换的具体分子机制的细胞学基础,本研究在Kaldor et al<sup>[34]</sup>建立的Percoll不连续密度梯度分离纯化方法基础上作如下改进。

将分离细胞的密度梯度简化为两层:Kliman et al用14个不连续Percoll分离密度梯度进行分离,并确定滋养层细胞在Percoll中所处的密度值为 $1.048-1.062\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而Nie et al<sup>[35]</sup>用连续密度梯度观察其密度值为 $1.053-1.060\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以此为依据并根据美国Pharmacia公司提供的Percoll使用说明书中不同稀释度的Percoll在0.15M(0.9%)盐溶液中相应的密度值曲线,将分离梯度简化为两层,即35%(密度值为 $1.043\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )与45%(密度值为 $1.062\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),以使所要分离的滋养层细胞处于二层之间,这样既节约了实验试剂,又简化了操作步骤。

许多学者研究证实,在胎盘绒毛组织中细胞角蛋白染色阳性的仅细胞滋养层细胞及合体滋养层细胞<sup>[34-38]</sup>。本研究培养细胞爬片免疫组化染色结果显示,细胞角蛋白染色阳性者占90%以上,证明改进后的分离方法同样可以得到满意的分离效果。

目前,HCV感染靶细胞的方式主要有血清直接感染法、脂质体介导法、电穿孔法及真核细胞表达载体携带法等。直接感染法是HCV感染细胞的主要方法,即把丙型肝炎患者血清直接加到培养细胞中进行感染,37℃温育不同时间后,更换新鲜培养液,在不同时间检测细胞及其培养上清中的HCV RNA。RT-PCR用于直接检测培养上清及细胞中HCV正链及负链RNA,可直观反映HCV在感染细胞中的复制情况。该方法简便,特异性好,但培养液中残留的HCV感染物可能会出现假阳性结果。

本研究参照国外学者<sup>[39-42]</sup>用HCV感染体外培养细胞的方法,对滋养层细胞进行感染试验。经定性及定量RT-PCR双重检测,证明了实验的可靠性。结果表明,感染前及感染后洗液及对照组中HCV RNA检测均为阴性,排除了标本来源及HCV感染试验时培养液中残留HCV感染物污染的可能。在感染后16d的培养上清中间断检测到了HCV RNA。HCV RNA定性检测结果为阳性标本HCV RNA定量检测 $>10^5$ 。证实HCV可以感染胎盘滋养层细胞,但这种感染是否为一过性感染,HCV能否在滋养层细胞中复制尚有待进一步研究。

采用电子显微镜技术直接观察转染细胞内或培养上清内的HCV颗粒及细胞的超微结构改变,这也是判定

HCV转染是否成功的一个可靠标准。1994年Kaitol et al<sup>[43]</sup>首次用特异性的抗假定HCV包膜蛋白的多克隆抗体及单克隆抗体,对含高效价HCV RNA而HBsAg、抗-HTLV1和HIV均阴性的血浆标本经反复超速离心并经连续蔗糖密度梯度分离,在密度 $1.140-1.160\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组分中见到55-65 nm球形病毒样颗粒,有棘状突起,形态特性与其他黄病毒相似。进行间接免疫电镜鉴定,发现病毒外膜为胶体金颗粒特异标记,证明所见确为HCV颗粒。关于病毒颗粒的大小,论文作者描述为直径55-65 nm,但陈良标 et al<sup>[39]</sup>根据论文照片提供的标尺测量,病毒的实际大小是:含包膜的完整病毒直径110-130 nm,内含直径55-65 nm圆球形核心或核壳体。核壳体表面6 nm长的细钉状突起,可能是病毒核壳体的子粒结构。病毒包膜与核心之间间距25-35 nm,类似疱疹病毒形态。病毒包膜不稳定,纯化过程中易破裂丢失,故不少报告HCV直径55-65 nm<sup>[44-50]</sup>,实际可能是指病毒的核心结构。

本研究中采用透射电镜观察HCV感染后滋养层细胞的超微结构改变,发现正常成熟细胞滋养层细胞有丰富的表面微绒毛,被膜小凹,细胞内包膜小泡、脂滴、粗面内质网、微丝等结构。这些结构有效地增加了母体血与胎儿血的接触面积,并有利于其完成合成蛋白、激素及物质转运功能。HCV感染后滋养层细胞超微结构发生了明显改变,主要表现为溶酶体大量增生,粗面内质网增生,脂滴减少,胞质内及胞质小囊泡内存在大量聚集分布的空泡状结构,其形态类似于病毒核衣壳。溶酶体的增生为细胞受到感染后的表现,但为何有些细胞出现空泡状溶酶体,而有些则为髓鞘样溶酶体尚有待研究。有意义的是在感染后的细胞胞质内存在许多病毒颗粒样结构,核心直径约为50 nm左右,有明确的外膜和棘突,完整病毒颗粒直径约100 nm左右。这些形态特征与其他黄病毒科病毒相似,黄病毒科病毒复制过程中一般伴随特征性的粗面和滑面内质网增生,形成众多微泡或板层状膜结构。并且感染后的滋养层细胞超微结构改变与目前研究的HCV感染人外周血淋巴细胞、人胎肝细胞等<sup>[38-42]</sup>的改变相似。

HCV NS<sub>5</sub>为HCV非结构蛋白之一,目前对其功能研究得较为明确,HCV NS<sub>5</sub>主要表达RDRP,参与HCV的复制,并具有外周核定位功能,提示HCV的复制位于核周围的内质网膜上。用特异性抗-HCV McAb NS<sub>5</sub>,采用间接免疫荧光法直接检测感染细胞内特异性抗原的表达情况,并用激光共聚焦方法观察发现,HCV NS<sub>5</sub>主要在核周表达。

这些改变为HCV感染滋养层细胞提供了形态学依据,提示HCV可以感染滋养层细胞,并有可能因此导致HCV的母婴传播,但HCV感染后滋养层细胞中的病毒样颗粒尚有待免疫电镜、原位杂交等方法的证实,HCV能否在滋养层细胞中复制并产生有感染性的病毒颗粒尚在进一步研究中。

## 4 参考文献

- 1 Resti M. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:489-493
- 2 Cheng YQ, Nie QH, Zhou YX. Study on mother-to-infant transmission mechanisms of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:445-447
- 3 Conte D, Colucci A, Minola E, Fraquelli M, Prati D. Clinical course of pregnant women with chronic hepatitis C virus infection and risk of mother-to-child hepatitis C virus transmission. *Dig Liver Dis* 2001;33:366-371
- 4 Healy CM, Cafferkey MT, Conroy A, Dooley S, Hall WW, Beckett M, Clarke TA, White MJ, Gorman WA, Butler KM. Outcome of infants born to hepatitis C infected women. *Ir J Med Sci* 2001; 170:103-106
- 5 Rubio Quevedo C, Holgado Carballo MA, Garcia Suarez A, Martin de Lara IM, Molto Ripoll L. Vertical transmission of hepatitis C virus. *An Esp Pediatr* 2001;54:27-31
- 6 Kaldor JM, Dore GJ, Correll PK. Public health challenges in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:E83-90
- 7 Polatti F, Viazzo F, Colleoni R, Belloni C, Zara F. Vertical transmission of hepatitis C virus and follow-up of newborns from infected mothers. *Minerva Ginecol* 2000;52:59-62
- 8 Resti M, Bortolotti F, Azzari C, Giacchino R, Zancan L, Gussetti N, Vierucci A. Transmission of hepatitis C virus from infected mother to offspring during subsequent pregnancies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:491-493
- 9 Okamoto M, Nagata I, Murakami J, Kaji S, Iitsuka T, Hoshika T, Matsuda R, Tazawa Y, Shiraki K, Hino S. Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* 2000;182:1511-1514
- 10 Ceci O, Margiotta M, Marelllo F, Francavilla R, Loizzi P, Francavilla A, Mautone A, Impedovo L, Ierardi E, Mastroianni M, Bettocchi S, Selvaggi L. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus in a Cohort of 2,447 HIV-Seronegative Pregnant Women: A 24-Month Prospective Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33:570-575
- 11 Tajiri H, Miyoshi Y, Funada S, Etani Y, Abe J, Onodera T, Goto M, Funato M, Ida S, Noda C, Nakayama M, Okada S. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:10-14
- 12 Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, Healy M, Neave P, Cafferkey M, Butler K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000;356:904-907
- 13 Paternoster DM, Santarossa C, Grella P, Palu G, Baldo V, Boccagni P, Floreani A. Viral load in HCV RNA-positive pregnant women. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2751-2754
- 14 Wejstal R, Manson AS, Widell A, Norkrans G. Perinatal transmission of hepatitis G virus (GB virus type C) and hepatitis C virus infections-a comparison. *Clin Infect Dis* 1999;28:816-821
- 15 Kudo T, Yanase Y, Ohshiro M. Analysis of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: quasispecies nature and buoyant densities of maternal virus populations. *J Med Virol* 1997;51: 225-230
- 16 Giovannetti A, Mazzetta F, Coviello R, Casadei AM, Sartorerri MR, Marziali M, Pierdominici M, Kuonen D, Pesce AM, Fiorilli M, Aiuti F, Quinti I. T-Cell immune activation in children with vertically transmitted hepatitis C virus infection. *Viral Immunol* 2001;14:169-179
- 17 Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* 1999; 17:1730-1733
- 18 Ou Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: Role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 19 Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002;76:990-997
- 20 Liu J, Zhu L, Zhang X, Lu M, Kong Y, Wang Y, Li G. Expression, purification, immunological characterization and application of Escherichia coli-derived hepatitis C virus E2 proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 2001;34:109-119
- 21 Roccasecca R, Folgori A, Ercole BB, Puntoriero G, Lahm A, Zucchelli S, Tafi R, Pezzanera M, Galfre G, Tramontano A, Mondelli MU, Pessi A, Nicosia A, Cortese R, Meola A. Mimotopes of the hyper variable region 1 of the hepatitis C virus induce cross-reactive antibodies directed against discontinuous epitopes. *Mol Immunol* 2001;3:4854-4892
- 22 Hunziker IP, Zurbriggen R, Glueck R, Engler OB, Reichen J, Dai WJ, Pichler WJ, Cerny A. Perspectives: towards a peptide-based vaccine against hepatitis C virus. *Mol Immunol* 2001;38:475-484
- 23 Moriya O, Matsui M, Osorio M, Miyazawa H, Rice CM, Feinstone SM, Leppla SH, Keith JM, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001; 20:789-796
- 24 Fournillier A, Wychowski C, Boucreux D, Baumert TF, Meunier JC, Jacobs D, Muguet S, Depla E, Inchauspe G. Induction of hepatitis C virus E1 envelope protein-specific immune response can be enhanced by mutation of N-glycosylation sites. *J Virol* 2001; 75:12088-12097
- 25 Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR, Rehmann B. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 2001;75:11392-11400
- 26 Begemann M, Polcar M. Pneumococcal vaccine failure in an HIV-infected patient with fatal pneumococcal sepsis and HCV-related cirrhosis. *Mt Sinai J Med* 2001;68:396-399
- 27 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:1091-1103
- 28 Chlabicz S, Grzeszczuk A. Prevalence of hepatitis B markers in patients with hepatitis C infection in north-eastern Poland: risk factors and vaccine use. *Eur J Epidemiol* 2001;17:267-270
- 29 Wedemeyer H, Gagneten S, Davis A, Bartenschlager R, Feinstone S, Rehmann B. Oral immunization with HCV-NS3-transformed Salmonella: induction of HCV-specific CTL in a transgenic mouse model. *Gastroenterology* 2001;121:1158-1166
- 30 Aslam M, Aslam J. Seroprevalence of the antibody to hepatitis C in select groups in the Punjab region of Pakistan. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:407-411
- 31 Merola M, Brazzoli M, Cocchiarella F, Heile JM, Helenius A, Weiner AJ, Houghton M, Abrignani S. Folding of hepatitis C virus E1 glycoprotein in a cell-free system. *J Virol* 2001;75:11205-11217
- 32 Nie QH, Li MD. Current study and strategy of hepatitis C vaccine. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 1998;19:47-49
- 33 Mele A, Spada E, Sagliocca L, Ragni P, Tosti ME, Gallo G, Moiraghi A, Balocchi M, Sangalli M, Lopalco PL, Stroffoli T. Risk of parenterally transmitted hepatitis following exposure to surgery or other invasive procedures: results from the hepatitis surveillance system in Italy. *J Hepatol* 2001;35:284-289
- 34 Kaldor JM, Dore GJ, Correll PK. Public health challenges in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:83-90
- 35 Nie QH. Mother-to-infant infection of hepatitis C virus. *Shiyong Ganzangbing Zazhi* 2000;5:52-53
- 36 Polatti F, Viazzo F, Colleoni R, Belloni C, Zara F. Vertical transmission of hepatitis C virus and follow-up of newborns from infected mothers. *Minerva Ginecol* 2000;52:59-62
- 37 Resti M, Bortolotti F, Azzari C, Giacchino R, Zancan L, Gussetti N, Vierucci A. Transmission of hepatitis C virus from infected mother to offspring during subsequent pregnancies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:491-493
- 38 Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75:1755-1760
- 39 Chen LB. Application of electron microscope on the diagnosis and study of viral hepatitis. *Dianzi Xianwei Xuebao* 1997;16:574-587
- 40 Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 1995;76:2337-2341
- 41 Watson JP, Bevitt DJ, Spickett GP, Toms GL, Bassendine MF.

- Hepatitis C virus density heterogeneity and viral titre in acute and chronic infection: a comparison of immunodeficient and immunocompetent patients. *J Hepatol* 1996;25:599-607
- 42 Trestard A, Bacq Y, Buzelay L, Dubois F, Barin F, Goudeau A, Roingeard P. Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Arch Virol* 1998;143:2241-2245
- 43 Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus particle detected by immuno-electron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75:1755-1760
- 44 De Vos R, Vanstapel MJ, Desmyter J, De Wolf-Peeters C, De Groote G, Colaert J, Mortelmans J, De Groote J, Fevery J, Desmet V. Are nuclear particles specific for non-A, non-B hepatitis? *Hepatology* 1983;3:532-544
- 45 Iwarson S, Schaff Z, Seto B, Norkrans G, Gerety RJ. Retrovirus-like particles in hepatocytes of patients with transfusion-acquired non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1985;16:37-45
- 46 Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983;41:816-821
- 47 Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985;88:773-779
- 48 An P, Chen LB, Tian HY. The significance of detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis C. *Zhonghua Neike Zazhi* 1999;38:737-739
- 49 Chen LB, Chen PL, Liu CY. Identification and visualization of virus-like particles in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with hepatitis C. *Zhongguo Yixue Yingxiangxue Zazhi* 1999;7: 110-111
- 50 Serafino A, Valli MB, Andreola F, Carloni G, Bertolini L. Morphological modifications induced by HCV infection in the TOFE human lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1998;149:299-305

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM) 和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 200 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com> (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# IRES 特异性 IRNA 对 HCV IRES 启动蛋白翻译细胞内抑制作用

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
梁雪松,女,1970-12-03生,汉族,医学博士,主治医师.山西省和顺县人.  
国家自然科学基金课题, No:3000147  
项目负责人:连建奇,710038,陕西省西安市新寺街1号,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. lianjq@yahoo.com  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-20

## Inhibitory effect of IRES specific inhibitor RNA on HCV IRES mediated protein translation

Xue-Song Liang, Jian-Qi Lian, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Chun-Qiu Hao

Xue-Song Liang, Jian-Qi Lian, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Chun-Qiu Hao, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China  
Supported by National Nature Science Foundation of China, No:3000147  
Correspondence to: Dr Jian-Qi Lian, The center of diagnosis and treatment of infectious diseases of PLA, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China. lianjq@yahoo.com  
Received:2002-10-25 Accepted:2002-11-20

## Abstract

AIM:To explore the inhibitory effect of internal ribosome entry site (IRES) specific inhibitor RNA (IRNA) on HCV IRES mediated protein translation *in vivo*.

METHODS:Human hepatic carcinoma cell line (HHCC) was transfected with the eukaryotic vectors of IRNA or miRNA (pcRz-IRNA or pcRz-miRNA), and then selected with G418 for 4 weeks. HHCC expressing IRNA or miRNA was cotransfected with pCMVNCRLuc containing HCV IRES. HHCC stably expressing pCHCVcluc was transfected with pcRz-IRNA, and pcRz-miRNA, respectively, the luciferase activity was examined at desired time post-transfection.

RESULTS:The pCMVNCRLuc was efficiently suppressed in HHCC expressing IRNA rather than the cell line expressing miRNA. The IRES specific IRNA inhibited expression of HCV IRES mediated luc gene by 20 % to 80 % in pCHCVcluc expressing cell after transfection; However, no inhibitory effect of the mutant IRNA was observed.

CONCLUSION:pCHCVcluc could be expressed successfully in HHCC, and IRNA inhibited HCV IRES mediated gene expression *in vivo*.

Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Nie QH, Hao CQ. Inhibitory effect of IRES specific inhibitor RNA on HCV IRES mediated protein translation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):157-160

## 摘要

目的:研究核糖体内部进入位点(internal ribosome entry site, IRES)特异性抑制性 RNA (inhibitor RNA, IRNA) 细胞内对丙型肝炎病毒(HCV) IRES 介导蛋白翻译的抑制作用.

方法:体外应用脂质体细胞转染法,将 IRNA 及其突变体 miRNA 真核表达载体 pcRz-IRNA/pcRz-miRNA 转染人肝癌细胞株 (HHCC), 经 G418 筛选 4 wk 后建立 IRNA 及 miRNA 表达株;以相同的方法构建 pCHCVcluc 转染株;以脂质体介导细胞转染法将 pCMVNCRLuc 转染 IRNA 及 miRNA 细胞株,于转染后 48 h 检测荧光素酶表达量;将 IRNA 及 miRNA 真核表达体转染 pCHCVcluc 表达株,于转染后不同时间检测荧光素酶表达量.

结果:HCV IRES 介导蛋白翻译在 IRNA 表达株明显受到抑制,同样 IRNA 对 HCV 翻译复制子的蛋白翻译作用有明显抑制性;突变体 miRNA 表达株和空载体对照株中未见相似的抑制性.

结论:pCHCVcluc 在 HHCC 细胞中获得有效表达;IRES 特异性 IRNA 能有效的抑制 HCV IRES 介导细胞内蛋白翻译作用.

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋. IRES 特异性 IRNA 对 HCV IRES 启动蛋白翻译细胞内抑制作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):157-160  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/157.htm>

## 0 引言

随着丙型肝炎病毒感染的蔓延<sup>[1-24]</sup>, 治疗方法的研究成为目前研究的热点<sup>[25]</sup>, 尤其是近年有关基因治疗的研究更是日新月异<sup>[26-33]</sup>. HCV 5' 非编码区(NCR)含有一富含嘧啶区即 IRES 区, 该区的完整性和稳定性对病毒蛋白翻译和核酸复制至关重要. 基于其结构的重要性而成为目前基因治疗的主要靶位点<sup>[34]</sup>. 我们对 IRES 特异性 IRNA 及其突变体 miRNA 对 HCV IRES 介导报道基因荧光素酶细胞内表达量的抑制活性进行了初步研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pcRz-IRNA/pcRz-miRNA 为本研究室构建保存, 该质粒在多克隆位点内含有两个具有自剪切作用的顺式核酶及 IRNA/miRNA; 质粒 pCMVNCRLuc 由德国 Alt 教授惠赠, 含 HCV 5' NCR 基因和 66 nt 的 C

区基因,与荧光素酶基因(luciferase,luc)融合,可通过检测 luc 活性间接反应 HCV 5' NCR 的功能.pCHVCvluc 由本研究室构建保存,含 HCV IRES 及核心抗原部分编码序列.人肝癌细胞系(HHCC)为本室保存株.脂质体转染试剂及 1 640 培养基、新生牛血清为 Gibco 公司产品.荧光素酶及  $\beta$  乳糖酶检测试剂盒为 Promega 产品.

1.2 方法 用含 100 ml/L 新生小牛血清的 RPMI 1 640 培养液,加青链霉素,在 37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO $_2$  孵箱中培养.建立 IRNA 及 miRNA 表达株和 HCV IRES 介导蛋白翻译细胞株.6 孔板中单层 HHCC 培养至密度为 0.06-0.08.准备 A 液:无血清 1 640 培养液 250  $\mu$ L 中加 10  $\mu$ g pcRz-IRNA/pcRz-miRNA 或 pcHVCvluc.准备 B 液:脂质体 12  $\mu$ L 与无血清 1 640 培养液 250  $\mu$ L 混合,混匀 A、B 液,室温静置 20 min,然后补足无血清 1 640 1 mL,加于待转染细胞上,37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO $_2$ ,培养 17 h,更换完全培养液,培养 48 h 细胞形态好转后更换含 G418 200 mg/L 选择培养基,继续培养 4 wk 至细胞形成单克隆,并继续传代培养.质粒转染: pCMVNCRIuc 5  $\mu$ g、pSV40- $\beta$ gal 5  $\mu$ g 共转染表达 IRNA 或 miRNA 细胞株,于转染后 48 h 收获细胞裂解液进行荧光素酶活性检测; pcRz-IRNA/pcRz-miRNA/pcDNA3 10  $\mu$ g 转染 pcHVCvluc 转染株,于转染后不同时间检测荧光素酶表达量.用荧光素酶检测试剂盒(Promega)于 TD-20/20 发光仪上检测荧光素酶活性;用  $\beta$ -Gal 活性检测试剂盒(Promega)于可见-紫外分光光度仪上检测  $\beta$ -Gal 浓度.荧光素酶表达量以荧光素酶活性单位(IU)/ $\beta$ -Gal 浓度(U)表示,抑制率 = 1 - 实验孔荧光素酶表达量/对照孔荧光素酶表达量  $\times$  100%.转染细胞玻片上生长、固定,抗 HCV C 单克隆抗体稀释液均匀滴于细胞玻片,放于湿盒,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;取出后 PBS 缓冲液振洗 3 次,10 min/次;0.1 g/L 伊文氏兰配制的 PBS 与 FITC 标记二抗 10 $^{-1}$  稀释后均匀滴于玻片上,放入湿盒,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;PBS 缓冲液振洗 3 次,10 min/次,500 mL/L 甘油缓冲液封片.

## 2 结果

2.1 荧光素酶基因在 HHCC 中表达 pCMVNCRIuc 为一瞬时表达载体,当转染于 HHCC 细胞后,表达荧光素酶的活性随转染后时间的延长而下降.因此,我们分别于转染后 2 d、3 d、4 d、7 d 和 10 d 收集细胞,裂解保留上清液,检测荧光素酶活性.结果证实,该载体在转染 HHCC 细胞后可有效表达,转染后 2 d 的活性最高,4 d 时荧光素酶活性明显下降,于 10 d 时将为本底水平(图 1).  
2.2 HCV IRES 介导荧光素酶基因在 IRNA/miRNA 表达株中的表达 将含 HCV IRES 的瞬时表达载体 pCMVNCRIuc 与转染效率控制载体 pSV 40- $\beta$ gal 共转染 IRNA/miRNA 表达株及空载体 pcDNA3 株和空白 HHCC 株,于转染后 48 h 时检测荧光素酶活性,并以抑制率表示 IRNA 的活性.检测结果显示,在 IRNA 表达株中由 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量同对照组相比明显下降,在

荧光素酶表达最高的转染后 48 h 时,抑制率达到 80%,而在 miRNA 表达株中及空载体对照株中却仅有不到 5% 的抑制率.同时进行的由帽状结构介导的荧光素酶表达量在 3 种细胞株中同空白组相比抑制率均低于 5%(图 2).

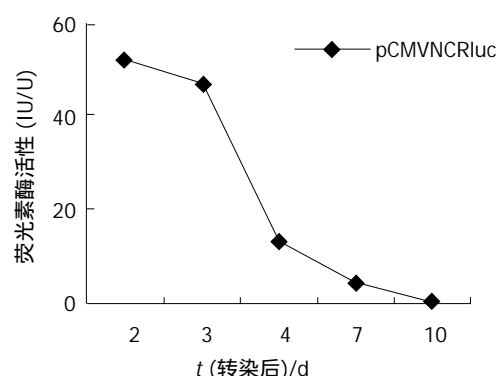


图1 pCMVNCRIuc 在 HHCC 中的表达

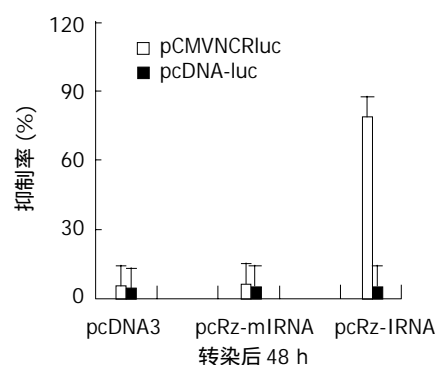


图2 HCV IRES 介导荧光素酶基因在 IRNA 表达株中的表达

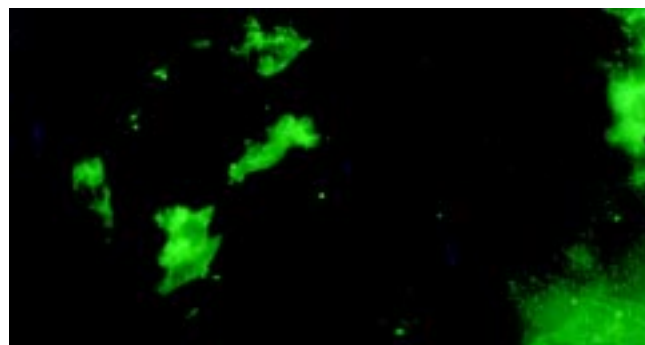


图3 pCHVC-luc 在人肝癌细胞株 HHCC 中稳定表达免疫荧光鉴定

2.3 pcHVCvluc 在 HHCC 中的表达 质粒转染并经 G418 筛选 4 wk 后,转染 HHCC 细胞形成单克隆,进一步传代培养后用间接免疫荧光检测 HCV 核心抗原.同未转染细胞相比,pcHVCvluc 在 HHCC 中获得稳定表达(图 3).  
2.4 IRNA 及 miRNA 在 pcHVCvluc 细胞表达株中的表达 IRNA 在转染 pcHVCvluc 细胞表达株后 24 h 时,由 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量同未转染 IRNA 株相比下降 15% 左右,随着时间的延长 IRNA 对 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量抑制性增加,在转染后 72 h 时达到最大 80%,在转染后 7 d 时转染效率仍为 80%.同时转染的 miRNA 和空载体 pcDNA3 未见对 HCV IRES 介导荧光素酶具抑制活性(图 4).

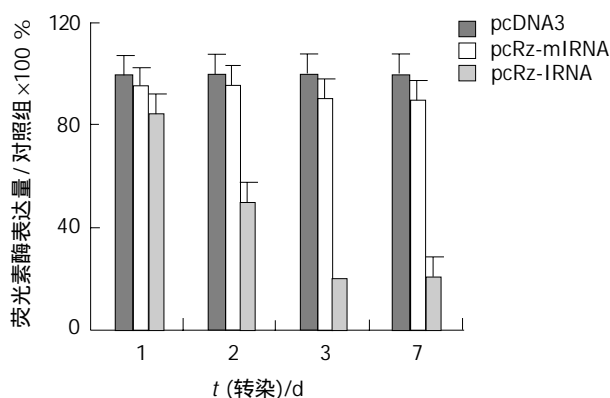


图4 IRNA 及 miRNA 在 pcHCVluc 细胞表达株的表达

### 3 讨论

在全世界范围内 HCV 感染人数达到 1.7 亿人左右,成为严重威胁着人类健康和生活质量的疾病之一。然而,目前抗 HCV 感染的主要药物 - 干扰素疗效有限,且副反应较多不易耐受。因此有必要寻找更有效的治疗途径。HCV 为一单链正股 RNA 病毒,含有一个开放读码框(ORF)。HCV5' 端含有一长的非编码区,且该区具有多个起始密码子(AUG)和明显的空间结构,这种结构同脊髓灰质炎病毒和 EMCV 等的 IRES 结构相似<sup>[32-34]</sup>。研究证实, HCV IRES 区在 HCV 基因复制和蛋白翻译过程中具有重要的作用,因而该区成为抗 HCV 感染治疗的重要靶位之一。近年已经在体内外研究中证实,针对 HCV IRES 区的反义核酸和核酶能明显的抑制病毒蛋白翻译和核酸复制<sup>[35-37]</sup>。

HCV IRES 介导蛋白翻译过程中一些宿主细胞因素同 IRES 功能相关。这些因素的作用主要是促进 IRES 与核糖体结合从而增强病毒蛋白翻译功能。目前已经证实的宿主蛋白包括聚嘧啶束蛋白(PTB)、La 蛋白及核仁素等<sup>[38]</sup>。这些发现可激发人们发现新的抗病毒感染策略。在 1992 年时, Coward et al 偶然反现在酿酒酵母中脊髓灰质炎病毒 IRES 介导蛋白翻译受到抑制,原因是由于一长 60 nt 的 RNA 片段,并命名为抑制性 RNA(IRNA)。此后,在体外实验中证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译具有抑制作用,且 IRNA 作用机制是通过与宿主因素 La 抗原等相结合而发挥作用的<sup>[39]</sup>。我们在体外化学合成 IRNA 互补 cDNA 并应用能量级最低原则建立了其突变体,成功建立了在 IRNA 和 miRNA 两端引入具自剪切作用顺式核酶的原核表达载体,并于体外实验证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译具有抑制作用。为了进一步研究其对 HCV IRES 介导蛋白翻译的体内抑制性,我们用含 HCV IRES 的瞬时表达载体转染 IRNA 及 miRNA 表达细胞株,结果提示 IRNA 在细胞内同样具有抑制 HCV IRES 介导蛋白翻译作用,而 miRNA 却完全失去了抑制活性。在此基础上我们进一步证实,由 HCV IRES 介导的报道基因荧光素酶表达量同对照组和空载体对照组相比明显受到抑制,而在基本结构明显改变的 miRNA 株却未见有明显的减少。

为了排除非特异性短片段 RNA 对 HCV IRES 介导

蛋白表达的影响,我们在实验中同时将靶基因 pCMVNCRIuc 转染空载体(pcDNA3)细胞株,结果证实非特异性短片段 RNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译无明显的抑制作用。同空白对照相比空载体株和 miRNA 表达株蛋白表达量均有轻度下降(抑制率 5% 左右),这可能是由于转染并经 G418 筛选后细胞活性较空白细胞株相比较差。此外,为了排除转染效率的影响,我们应用靶基因和转染效率控制载体共转染靶细胞,并应用荧光素酶活性(IU)/β 牛乳糖酶活性(U)表示 HCV IRES 介导荧光素酶表达量。Das et al 应用相似的研究方法得到了相同的研究结果。我们的研究结果提示, pcDNA-luc 转染 IRNA 表达株后,荧光素酶表达量未受到明显的抑制,这提示 IRNA 对由帽状结构依赖性方式进行的蛋白翻译无抑制活性。别的学者研究中得到了相似的结果,并且他们还证实 IRNA 对宿主细胞蛋白翻译无影响,这为其进一步的抗 HCV 治疗应用奠定了基础<sup>[40]</sup>。本研究中反过来将 IRNA 表达体转染含 HCV IRES 的 pcHCVluc 细胞表达株,结果是在 IRNA 转染后 24 h 是荧光素酶表达量就被抑制,到转染后 72 h 时抑制率达最高(80% 左右),而转染后 7 d 时抑制率并未见提高,这一结果提示 IRNA 并不能完全阻断 HCV IRES 介导的蛋白翻译。

### 4 参考文献

- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
- Yan J, Dennin RH. A high frequency of GBV-C/HGV coinfection in hepatitis C patients in Germany. *World J Gastroenterol* 2000;6:833-841
- Wang NS, Liao LT, Zhu YJ. Follow-up study of hepatitis C virus infection in uremic patients on maintenance hemodialysis for 30 months. *World J Gastroenterol* 2000;6:888-892
- Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000;6:465-469
- Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- Cheng JL, Tong WB, Liu BL, Zhang Y, Yan Z, Feng BF. Hepatitis C virus in human B lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus in vitro by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 2001;7:370-375
- Meier V, Mihm S, Wietzke-Braun P, Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV-infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7: 228-234
- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;15:7:208-215
- Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL,

- Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
- 13 Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566
  - 14 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
  - 15 Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002;8:499-504
  - 16 Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
  - 17 Yang SS, Wu CH, Chen TH, Huang YY, Huang CS. TT viral infection through blood transfusion: retrospective investigation on patients in a prospective study of post transfusion hepatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:70-73
  - 18 Yu YC, Mao Q, Gu CH, Li QF, Wang YM. Activity of HDV ribozymes to trans-cleave HCV RNA. *World J Gastroenterol* 2002;8:694-698
  - 19 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
  - 20 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
  - 21 Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
  - 22 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
  - 23 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS3 protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
  - 24 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
  - 25 Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002;8:577-579
  - 26 Scheiflinger F, Dorner F. Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications towards a more effective therapeutic regime. *Wien Klin Wochenschr* 1999;111:172-180
  - 27 Fang J, Edwin O. Transfection and expression of HCV-NS(5)B gene in Huh-7 cells *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:33-34
  - 28 Kolarski V. The European consensus on hepatitis C. *Vutr Boles* 1999;31:21-28
  - 29 Fang J, Ouyang E, Wu CH, Wu GY, Qiu D, Xiao S. Transfection and expression of HCV-NS5B gene in Huh-7 cells. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:602-605
  - 30 Wang QM, Heinz BA. Recent advances in prevention and treatment of hepatitis C virus infections. *Prog Drug Res* 2001;79:110
  - 31 Odreman -Macchioli F, Baralle FE, Buratti E. Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translation ability. *J Biol Chem* 2001;276:41648-41655
  - 32 Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triple essential for translation and IRES folding. *J Virol* 2000;77:10430-10437
  - 33 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, Blatt LM. Inhibition of hepatitis C virus RNA dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
  - 34 Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ, Harrison GP, Aboul-Ela F, Varani G, Walker SA. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 2002;9:375-380
  - 35 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequence in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
  - 36 Wiklund L, Spangberg K, Goobar-Larsson L, Schwartz S. Cap and poly A tail enhance translation initiation at the hepatitis C virus internal ribosome entry site by a discontinuous scanning, or shunting mechanism. *J Hum Virol* 2001;4:74-84
  - 37 Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, Anderson KP. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicro Agents Chemother* 1999;43:347-353
  - 38 Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 2000;7:1105-1110
  - 39 Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001;76:17-29
  - 40 Venkatesan A, Das S, Dasgupta A. Structure and function of a small RNA that selectively inhibits internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Nucle Acid Res USA* 1999;27:563-572

# 不同载体表达核酶对HBV mRNA细胞内表达的阻断作用

李谨革, 连建奇, 贾战生, 冯志华, 聂青和, 王九平, 黄长形, 白雪帆

李谨革, 连建奇, 贾战生, 冯志华, 聂青和, 王九平, 黄长形, 白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
李谨革, 男, 1967-12-04生, 汉族, 内蒙古自治区呼和浩特市人. 医学博士, 讲师.  
国家自然科学基金资助项目, No.39570652  
项目负责人: 李谨革, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. ban211@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3374311 传真: 029-3374447  
收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-20

## Effect of ribozymes on inhibiting expression of HBV mRNA in HepG2 cells

Jin-Ge Li, Jian-Qi Lian, Zhan-Sheng Jia, Zhi-Hua Feng, Qing-He Nie, Jiu-Ping Wang, Chang-Xing Huang, Xue-Fan Bai

Jin-Ge Li, Jian-Qi Lian, Zhan-Sheng Jia, Zhi-Hua Feng, Qing-He Nie, Jiu-ping Wang, Chang-Xing Huang, Xue-Fan Bai, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, Province, 710038, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.39570652  
Correspondence to: Dr. Jin-Ge Li, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, Province, 710038, China. ban211@fmmu.edu.cn  
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-20

## Abstract

**AIM:** To study the activity of ribozymes with multiple cleavage sites and mutated ribozymes on expression of HBV mRNA in HepG2 cells.

**METHODS:** The triple ribozymes and two cis-ribozymes or two mutated ribozymes were inserted, respectively, into five kinds of eukaryotic plasmids, which were cotransfected into the HepG2 cells with p1.2 plasmid carrying genome of ady-subtype HBV. Cleavage effect of ribozymes on HBeAg and HBcAg were detected by ELISA and laser confocal imaging technique.

**RESULTS:** The transfected HepG2 cells expressed the expected ribozyme and muta-ribozyme. Intracellular level of HBeAg was suppressed variably with variety of ribozymes. The ribozyme plasmid with tRNA promoter demonstrated the highest inhibitory rate at 81 % for suppression HBeAg expression.

**CONCLUSION:** The ribozymes exert varied inhibitory effect on the expression of HBV in HepG2 cells depending on kinds of eukaryotic expressing plasmids.

Li JG, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH, Nie QH, Wang JP, Huang CX, Bai XF. Effect of ribozymes on inhibiting expression of HBV mRNA in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):161-164

## 摘要

**目的:** 探讨多位点自剪切核酶及突变核酶对细胞内 HBV mRNA 的切割作用。

**方法:** 构建5个不同的多位点核酶及突变核酶的真核表达载体, 将他们分别与乙型肝炎病毒全基因序列共转染HepG2细胞, 用ELISA, 共聚焦定量及图像分析的方法观察多位点核酶在细胞内对HBV mRNA 切割作用。

**结果:** 构建的真核表达载体在细胞内确可表达出多位点核酶, 核酶及突变核酶在细胞内对HBV基因的表达均有抑制作用, 不同表达载体的抑制率不同, 以tRNA启动子的表达载体抑制效率最高, 达81%, 突变核酶亦有部分反义RNA的抑制效果。

**结论:** 抗乙型肝炎病毒核酶在细胞内可抑制HBV基因的表达, 不同表达载体其核酶的表达效率不同。

李谨革, 连建奇, 贾战生, 冯志华, 聂青和, 王九平, 黄长形, 白雪帆. 不同载体表达核酶对HBV mRNA 细胞内表达的阻断作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):161-164  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/161.htm>

## 0 引言

HBV (hepatitis B virus), 是一种严重危害人类健康的病原体, 能够引起急、慢性乙型肝炎<sup>[1-7]</sup>. 而且慢性HBV携带者发生肝癌的可能性是正常人的100倍. 目前的研究确信HBV是少数几种致癌病毒之一, HBV的感染、复制等生命活动的依赖基因组的转录和表达. 同时HBcAg在细胞内达到一定量后, 可取代细胞染色体中组蛋白, 而使宿主细胞的正常基因表达发生紊乱. 而且HBcAg也免疫因子作用的靶位点<sup>[8]</sup>.

目前常用的药物治疗方法无法阻断细胞中HBV的表达, 起到细胞内的保护作用, 核酶做为一种新效法已显示出明显优势<sup>[9-32]</sup>. 前期的研究中, 我们采用核酶对HBV表达进行阻断, 已取得一定效果, 其抑制率低于66%. 为提高核酶的剪切活性, 我们采用了自剪切载体表达3个位点核酶, 且对照组使用突变核酶, 用不同的载体及启动子表达核酶, 观察核酶对相应蛋白的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** p1.2 (含乙型肝炎病毒基因全序列), 由连建奇博士惠赠, pcDNA3 由冯志华博士惠赠. pCI 由军事医学科学院王海涛教授惠赠. pBBS212 及 pCEp 由本室保存. HepG2细胞由本校病理教研室惠赠. DMEM, Lipofectamine 2000 购自Gibco公司. ELISA检测试剂盒购自科华公司. 各种抗体购自DAKO公司.

**1.2 方法** 表达自载切核酶的不同真核表达载体的构建 pcDNA3-Rz123 pcDNA3-mRz12 的连接, 将核酶及突变核酶, 用Apal/Bst XI 双酶切, 回收270 bp左右的DNA片

段,pcDNA用EcoR 酶切,回收做为载体.回收的片段经T4DNA聚合酶补平后,将二者进行连接,转化后挑克隆进行鉴定,鉴定采用XbaI/Hind 双酶切或XbaI单酶切.(图1) pCI-Rz123及pCI-mRz123的连接,将pGEMRz123及pGEM-mRz12用ApaI/BstXI双酶切.回收补平,pCI用EcoRI及XbaI双酶切后回收补平、连接、转化,挑取克隆,用XhoI+SalI双酶切鉴定大小及用XbaI+SalI鉴定方向.pBBS212-Rz123及pBBS212-mRz12的连接,将pBBS212及pcDNA3-Rz123及pcDNA3-mRz12均用KpnI及XhoI进行双酶切,回收片段及载体,双粘端连接,转化.挑取克隆,鉴定用KpnI及XhoI进行双酶切.pCEp-Rz123 pCEp-mRz12的连接,将pCEp及pcDNA3-Rz123及pcDNA3-mRz12均用KpnI及XhoI进行双酶切,回收片段及载体,进行双粘端连接、转化,挑取克隆,鉴定用KpnI及XhoI进行双酶切.pDCTRZA-Rz123与pDCTRZA-mRz12的连接,将pGEM-Rz123及pGEMRz-mRz12,用BstXI单切后切胶回收、补平,用Sac 酶切后回收270 bp及200 bp左右的DNA片段.将pDCTRZA质粒用BamHI单切后切胶回收、补平,用Sac 酶切酶回收载体DNA,将载体与片段进行连接、转化.挑取克隆,鉴定用Sac 、MluI进行双酶切.(图2) 质粒DNA转染细胞前16-20 h,用胰酶消化HepG2细胞,接种于6孔培养板( $1 \times 10^5$ /孔)37 ,待细胞生长至50-70%融合时,取7.5  $\mu$ g核酶及突变核酶质粒DNA及7.5  $\mu$ g p1.2

质粒DNA溶于100  $\mu$ L无血清DMEM中,混匀;取Lipofectamine 20 008  $\mu$ L加无血清DMEM中,混匀.缓慢混合,室温25 min,加无血清DMEM800  $\mu$ L至总体积1 mL,混匀.用无血清DMEM洗细胞1次,加入上述转染液于培养板(1 mL/well),37 培养16 h,换完全培养液,传代,48 h后更换选择性培养液,筛选出阳性克隆后,混合克隆,次日收集细胞.细胞用冰浴的PBS缓冲液冲洗3次,加1 mL含10 mmol/LEDTA的PBS缓冲液消化细胞,加入1-10 mL PBS悬浮细胞,计数离心,去除上清,悬浮细胞于0.25 mmol/L Tris-HCl (pH7.5) (100  $\mu$ L/ $10^6$ 细胞),上清即为胞质裂解液,用于测定HBeAg、ELISA检测按说明书进行. A值在450 nm下读取.结果均以阳性孔A值/阴性孔A值(P/N)表示,抑制率按下式计算:抑制率=(实验孔P/N值-对照孔P/N值)÷(对照孔P/N值-2.1)×100%免疫荧光及激光共聚焦的检测转染的细胞爬片后固定,滴加HBcAg抗体IgG,37 ,30min,洗涤5次,滴加荧光抗体37 ,30 min,吹干,封片,镜检,用激光共聚焦显微镜观测,定量.免疫细胞化学用SABC法检测(参见说明书),共转染HepG2细胞染色结果判定,呈棕色者为阳性,不着色者为阴性,依据其着色的深浅,代表HBcAg表达的量的多少,不同载体转染各选择5份标本,40倍镜下随机各选择50个细胞,测定其胞度的灰度,计算其均数及标准差,所有结果均以SPLM软件进行t检测.细胞的总RNA用异硫氰酸胍法提取,用 $^{32}$ P标记单链DNA的5'末端,打点杂交方法参见说明书.

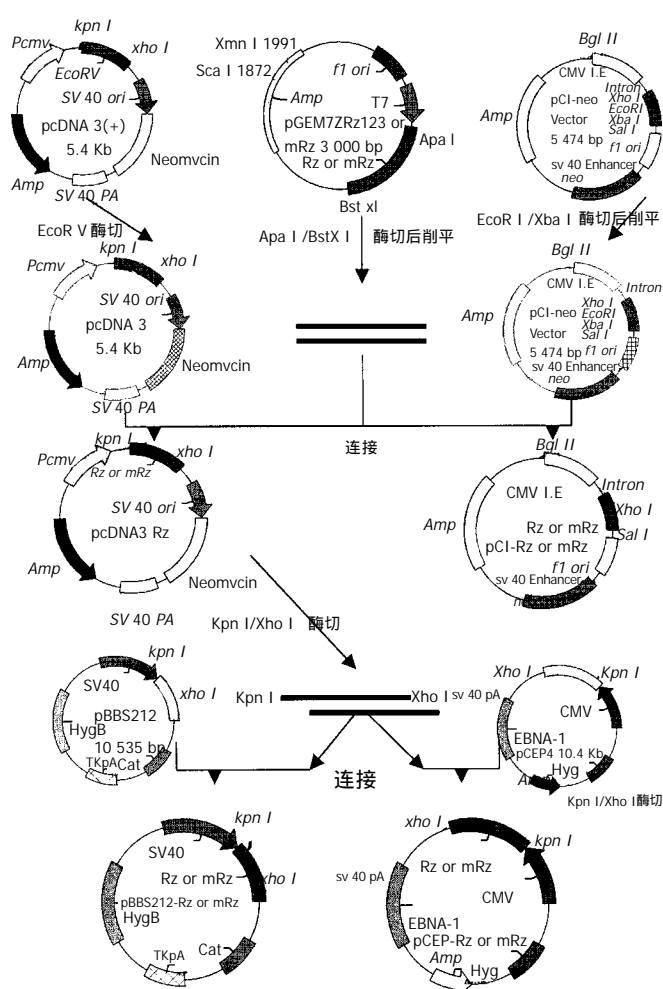


图1 四种不同载体的核酶及突变体的构建流程图

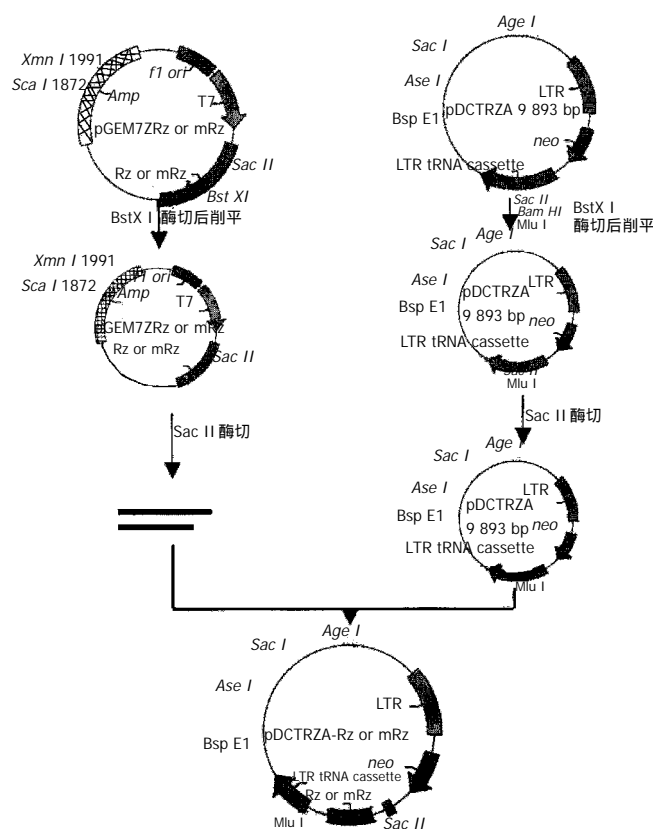
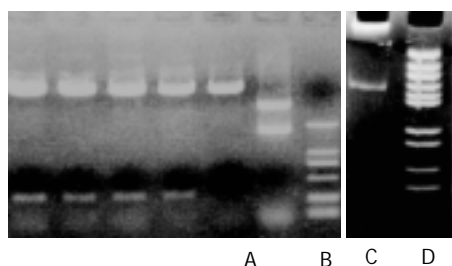


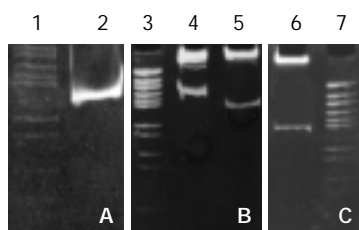
图2 pDCTRZA-Rz或mRz构建流程图

## 2 结果

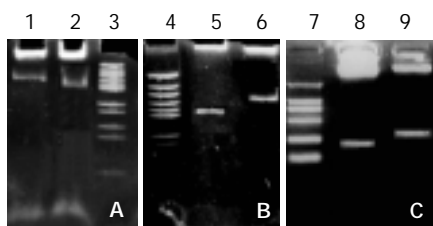
2.1 构建的不同载体鉴定 pcDNA3- Rz123 与 pcDNA3-mRz12 质粒,用不同的单酶或双酶酶切鉴定结果与预想结果相同,说明质粒构建成功(图3).pCI-Rz123 及 pCI-mRz12 质粒, pBBS212-Rz123 及 pBBS212-mRz12, pCEp-Rz123 及 pCEp-mRz12, pDCTRZA-Rz123 及 pDCTRZA-mRz12, 用不同的单酶或双酶切鉴定结果与预计结果相吻合,证明构建质粒成功(图4,5).



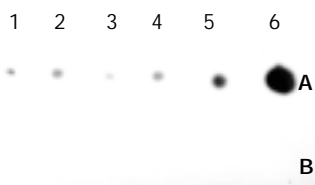
A:Xho I/Hind III 酶切; B:DL2 000 Marker;  
C:Xba I 酶切; D:pGEM7Z Hea III Marker  
图3 pcDNA3-Rz123 酶切鉴定图



1:pGEM7Z Hea III Marker; 2:Xho I/Hind III 酶切; 3、7: pGEM7Z Hea III Marker; 4:Xho I/Sal I 酶切; 5:Xba I /Sal I 酶切; 6:Xho I/Sal I 酶切  
图4 pcDNA3-mRz12(A)、pCI-Rz123(B)及 pCI-mRz129 (C)质粒酶切鉴定图.



1:pBBS212-Rz123; 2:pBBS 212-mRz12; 3, 4:7Marker; 5:pCEP-mRz12; 6:pCEP-Rz123; 7:pDCTRZA-mRz12; 8:pDCTRZA-Rz123  
图5 pBBS212-Rz123 pBBS 212-mRz12(A) pCEP-Rz123 及 pCEP-mRz12(B). pDCTRZA-Rz123 及 pDCTRZA-mRz12(C)的酶切鉴定图.



1:pcDNA;2:pCI; 3 : pBBS212;4:pCEP;5:pDCTRZA;6:对照组;  
A:核酶组;B:突变核酶组  
图6 核酶在细胞中的表达 (RNA 点杂交图)

2.3 多位点核酶对细胞质中乙型肝炎病毒核心蛋白表达的抑制作用 在将p1.2 与多个核酶的不同载体以及突变核酶,空载体分别转染 HepG2 细胞,转染 1wk 后

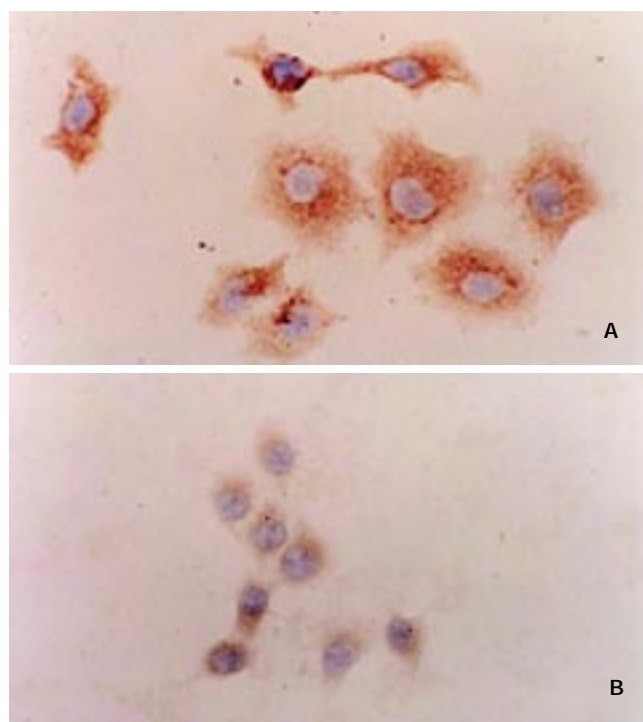
胞质中可见到 HBeAg 的表达.待筛选出阳性克隆后,取胞质裂解液进行ELISA测定.由表中可见,不同的载体表达核酶,对 HBeAg 的表达有不同的抑制率,以 pDCTRZA 为最高,为 81 %,其次为 pBBS212 76 %,最低为 pCEp,且突变核酶亦有一定的抑制率,说明其具有部分反义 RNA 的功能(表 1).

表 1 不同载体多位核酶对 HBeAg 表达的作用(P/N 值,抑制率,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	pcDNA3	pCI	pBBS212	pCEP	pDCTRZA
核酶组	2.6±1.3(0.73)	2.9±0.7(0.61)	2.5±0.4(0.76)	3.1±0.4(0.55)	2.6±1.1(0.81)
突变核酶组	3.6±1.0(0.18)	3.7±0.7(0.21)	3.4±0.1(0.26)	3.9±1.0(0.21)	3.8±1.0(0.39)
空载体组	3.9±0.1	4.2±0.1	3.9±1.10	4.4±0.1	4.9±0.3

2.4 免疫荧光及激光共聚焦的结果 取突变组及核酶组细胞分别进行免疫荧光测定,荧光强度差异明显.将其进行共聚焦定量,以下列公式计算:抑制率=1-核酶组像素密度/突变核酶组像素密度,经计算,其最高抑制率可达 73.2 %.

2.5 免疫组化及图像分析结果 取突变组、空载体组及核酶组两种细胞抗原表达有明显差异(图7).将此细胞进行图像分析,亦表明二者有差异.



A:空载体组 B:核酶表达组  
图7 核酶对细胞内 HBV 表达的抑制作用.

## 3 讨论

近年来,在细胞内应用核酶抑制基因表达已取得了令人瞩目的成果,尤其抗 HIV 核酶已在 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞中表达,并将进行回输人体进行研究.因此尽管核酶的酶效率较低,比蛋白质低几个数量级,但在细胞和活体研究中,却发现他可以降低靶 RNA 90 % 以上.可见核酶用于抑制基因表达和基因治疗有着广阔的前景.乙型肝炎病毒(HBV)的复制必须经过由细胞的 RNA 多聚酶转录成多

拷贝的3.5 kb RNA,以这一RNA前基因组为模板,通过逆转录,自DR1区开始合成负链DNA,因此前基因组mRNA是关键的一步,所设计的核酶如能正确切割mRNA,则可抑制乙型肝炎病毒的复制和表达,从而起到胞内免疫的作用.到目前为止,关于细胞内核酶抗HBV的研究尚不多<sup>[32]</sup>,Beck所用核酶没有在细胞内做到有活性的表达,而Welch则用串联核酶表达,做到最高抑制率83%,南非学者也用荧光蛋白来检测细胞内核酶对HBV的抑制作用,证实确可抑制HBV的表达.

本室前期的工作亦证实对HBV C区基因的表达有明显的抑制作用.同时在前期工作的基础上,我们增加了自剪切序列及核酶的数量,用自剪切来包装核酶,避免其两侧的附加序列影响到核酶的切割活性,使切割核酶与靶RNA作用后更易脱落下来,进行新一轮的切割.增加核酶数量则使其能在不同的位点破坏靶RNA,避免病毒变异造成的单一核酶切割作用的丧失,也可避免结合蛋白掩盖切割位点.细胞内核酶的表达,关键在于启动子的选择, Cotton将核酶基因克隆在蛙蟾tRNA met及密码环中,提高了核酶的转录水平. Baier利用tRNA启动子可使核酶基因高效表达,同时tRNA的结构稳定,可抵抗核酸酶的降解,因此被认为是细胞内表达核酶的理想启动子.本研究即将核酶克隆于含有tRNA启动子的真核载体中.本研究的结果也印证了上述理论,杂交证实转染细胞中有核酶的mRNA存在, ELISA等方法检测发现核酶及突变核酶对HBV的表达均有抑制作用. pcDNA3, pCI, pBBS212, pCEp, pDCTRZA所达核酶对HBV C基因抑制率为73%, 61%, 76%, 55%, 81%. 最高者为pDCTRZA即tRNA启动子所启动表达的核酶.这也说明核酶作为一种抗HBV的手段是可行的.

#### 4 参考文献

- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- $\alpha$ 1 versus interferon-treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- Li JG, Zhou YX, Lian JQ. Intracellular application of two-unit ribozyme gene against hepatitis B virus. *Zhonghua Neike Zazhi* 2000; 39:27-30
- Shan Y, Xiong SS, Liu X, Zhao M, Ba QJ, Zhou LJ. Comparison of human leukocyte interferon and recombinant interferon alpha 1 in the treatment of chronic hepatitis B. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:40-41
- Liu WE, Tan DM, Fan XG, Ouyang K, Zhang Z. Role of autoimmune reaction in pathogenesis of patients with chronic HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:120-121
- Xie Q, Guo Q, Zhou XQ, Gu RY. Effect of adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human serum albumin on duck hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:125-126
- Xu KC, Wei BH, Yao XX, Zhang WD. Recent therapy for chronic hepatitis B by combined traditional Chinese and Western medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:970-974
- Pan X, Ke CW, Pan W, Wu WB, Zhang B, He X, Cao GW, Qi ZT. Construction of eukaryotic expression vector carrying IFN- $\gamma$  gene under control of human HBV promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:520-523
- Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- Zhong S, Wen SM, Zhang DF, Wang QL, Wang SQ, Ren H. Sequencing of PCR amplified HBV DNA pre-c and c regions in the 2.2.15 cells and antiviral action by targeted antisense oligonucleotide directed against sequence. *World J Gastroenterol* 1998;4:434-436
- Yang SM, Zhou H, Chen RC, Wang YF, Chen F, Zhang CG, Zhen Y, Yan JH, Su JH. Sequencing of p53 mutation in established human hepatocellular carcinoma cell line of HHC4 and HHC15 in nude mice. *World J Gastroenterol* 1998;4:506-510
- Shi JJ, Miao F, Liu FL. Therapeutic effect of medicinal herbs and western drugs on hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):61-62
- Qiu AG, Qiu RB, Miao Y, Fu ZL, Zhang YR, Zheng YQ, Hong YS, Wu BS, Jiang YP, Qian CF. Clinical study on therapeutic effect of three cycle natural therapy on chronic hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):82
- Zhu Y, Wang YL, Shi L. Clinical analysis of the efficacy of interferon alpha treatment of hepatitis. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):85-86
- Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- Ma CH, Sun WS, Zhang LN, Ding PF. Inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides complementary to HBV on HepG2.2.15 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6 (Suppl 3):72
- Gao XW, Jia SY, Liu XM. BCG vaccine combined with dipyridamole in the treatment of HBV infection. *World J Gastroenterol* 2000;6 (Suppl 3):76
- Bo AH, Tian CS, Xue GP, Du JH, Xu YL. Morphology of immune and alcoholic liver diseases in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:157-160
- Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- Tu SP, Wu YL, Sun J, He Q, Ke YM, Fu H, Yuan YZ, Jiang SH. Disinfecting effect of electrolyzed acid water on gastroendoscope. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:874-876
- Tang ZY. Hepatocellular Carcinoma Cause, Treatment and Metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Ghaneh P, Slavin J, Sutton R, Hartley M, Neoptolemos JP. Adjuvant therapy in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:482-489
- Spangenberg HC, Wands JR. Ribozymes and hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1084-1085
- Li JG, Zhou YX, Li JQ, Feng ZH, Li GY. Preliminary study on the inhibition of HBeAg expression in cells by ribozyme. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 1999; 17:152-154
- Li JG, Zhou YX, Li JQ, Jia ZS, Feng ZH. Preliminary study on ribozyme inhibit gene expression. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999; 7:181
- Li JG, Zhou YX, Li JQ, Feng ZH. Intercellular application two-unit ribozyme gene against hepatitis B virus. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 1999; 24:99-101
- Feng Y, Kong Y, Wang Y, Qi G. Antiviral Activity of a Hammerhead Ribozyme against HBV in HepG2.2.15 Cells. *Shengwuhuaxue Yu Shengwuwuli Xuebao (Shanghai)* 2002;34:204-208
- Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
- Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibitory effect of ribozyme on HBeAg in human HCC cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:28-30
- Zheng WC, Lu CD, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Hammerhead Ribozymes Suppress HBV (adr) in HepG2 Cells. *Shengwuhuaxue Yu Shengwuwuli Xuebao (Shanghai)* 2001;33:25-29
- Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380

# DNA 疫苗对小鼠 HCV - C 皮下移植瘤的防治

孙 利,周永兴,郝春秋,冯志华,赵 君,胡沛臻,付 勇,马福成,常吉庆,王九平,聂青和

孙利,周永兴,郝春秋,冯志华,王九平,聂青和,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
赵君,胡沛臻,付勇,马福成,中国人民解放军第四军医大学病理学教研室 陕西省西安市 710032  
常吉庆,山西省临汾市肿瘤医院 041000  
孙利,女,1971-02-22生,1995年于第四军医大学获医学本科学位,现攻读第四军医大学医学硕士学位,从事丙肝DNA疫苗方面的研究。  
国家自然科学基金资助, No. 39800122  
项目负责人:孙利,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。 sunli200096@sina.com.cn  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

## Effect of DNA vaccine on anti-HCV infection in mice with subcutaneous inoculating tumor

Li Sun, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jun Zhao, Pei-Zhen Hu, Yong Fu, Fu-Cheng Ma, Ji-Qing Chang, Jiu-Ping Wang, Qing-He Nie

Li Sun, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jiu-Ping Wang, Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Jun Zhao, Pei-Zhen Hu, Yong Fu, Fu-Cheng Ma, Department of Pathology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Ji-Qing Chang, Tumour Hospital, Linfen 041000, Shanxi Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of Shaanxi Province, No. 39800122  
Correspondence to: Master Li Sun, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.  
sunli200096@sina.com.cn  
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-16

## Abstract

AIM: To investigate the effect of DNA vaccine on infection of hepatitis C virus (HCV) in mice model of subcutaneous inoculating tumour of HCV - C.

MEHODS: SP2/0 cell was transfected with pcDNAHCV-C with the lipofectamine and confirmed the ability to express the HCV-C antigen steadily, and then inoculated subcutaneously into Balb/c mice. The formed nodules were removed surgically and examined pathologically.

RESULTS: T lymphocytes infiltrated dominately in inoculated tumour; HCV-C antigen was mainly expressed in cytoplasm and membrane of Sp2/0 cell, and scarcely in nucleolus; The level of expression of HCV-C antigen in experimental group was significantly lower than that in control group.

CONCLUSION: HCV-C DNA vaccine has the effect against HCV infection.

Sun L, Zhou YX, Hao CQ, Feng ZH, Zhao J, Hu PZ, Fu Y, Ma FC, Chang JQ, Wang JP, Nie QH. Effect of DNA vaccine on anti-HCV infection in mice with subcutaneous inoculating tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(2): 165-168

## 摘要

目的:从病理组织学方面验证DNA疫苗对小鼠HCV-C皮下移植瘤的预防及治疗作用,为将来的临床应用提供动物实验依据。

方法:利用脂质体转染技术将pcDNA HCV-C质粒转染SP2/0细胞并将稳定表达HCV C抗原的SP2/0细胞皮下接种于Balb/c小鼠,成瘤后取小鼠瘤组织,用病理组织学方法验证DNA疫苗对HCV-C皮下移植瘤的预防及治疗作用。

结果:肿瘤组织中以T淋巴细胞浸润为主;HCV-C抗原表达主要在SP2/0细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中;对照组HCV-C抗原表达明显强于实验组。

结论:HCV-C DNA疫苗对HCV的感染有预防和治疗作用。

孙利,周永兴,郝春秋,冯志华,赵君,胡沛臻,付勇,马福成,常吉庆,王九平,聂青和。  
DNA疫苗对小鼠HCV-C皮下移植瘤的防治。世界华人消化杂志 2003; 11(2): 165-168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/165.htm>

## 0 引言

丙型肝炎呈世界性,常呈持续感染,是一严重危害人类身心健康的传染性疾病。目前除了部分患者对于干扰素(IFN)有部分应答之外<sup>[1-4]</sup>,至今尚无特异性的预防和治疗措施。因此寻求免疫预防及治疗措施以防止这种致死性疾病的发生至关重要。DNA免疫能诱导细胞免疫及体液免疫,从而使其成为免疫治疗的策略之一<sup>[5,6]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 材料 5-8周龄 Balb/c小鼠由本校动物中心提供,小鼠骨髓瘤SP2/0细胞由本校免疫学教研室惠赠,重组真核表达质粒pcDNA HCV-C基因和CMV启动子由本室构建。胰蛋白酶、酵母提取物为Oxford公司产品;氨苄青霉素为齐鲁制药厂产品;琼脂糖为BRL产品;溴化乙锭(EB)为华美公司产品;质粒提取及纯化试剂盒(大量)为上海华舜生物工程公司产品;质粒超大量提取试剂盒为Sigma公司产品;脂质体 lipofectamine 2000和DMEM均为Gibco公司产品;国产小牛血清为杭州四季青公司产品;核酸内切酶HindIII, XhoII, DNA/HindIII, DNA/EcoRI+HindIII, G418, 荧光标记的羊抗人IgG和过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG均购自华美生物工程公司;小鼠抗HCV-C单克隆抗体由南京军区总医院检验科李保全主任惠赠。

**1.2 方法** 用含 100 mL/L 小牛血清的 DMEN 培养基,于 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养.取重组质粒 DNA 20 μg,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 及 3 倍体积的无水乙醇,混匀后置 -20 过夜,1 000 g 离心 10 min,弃上清,加 700 mL/L 乙醇 1 mL 轻轻冲洗管壁,弃上清后倒置无菌超净台约 1 h,吹干备用.收获 SP2/0 细胞,将  $2 \times 10^5$  细胞重悬于完全培养基 2 mL 中.转种于 35 mm 培养瓶,37 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 18-24 h,使细胞达 50-80 % 汇合,于无菌 Ep 管中制备溶液 A:质粒 DNA 20 μg 溶于无血清培养基 100 μL 中,溶液 B:lipofectamine 15 μL 加无血清培养基 85 μL,溶液 A 和溶液 B 轻轻混合,置室温 15 min;弃取细胞培养基,用无血清培养基洗涤细胞 1 次,将 lipofectamine-DNA 混合物 200 μL 加无血清培养基 800 μL,轻轻混匀,小心滴加至细胞上,置 37 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 15-18 h,弃取培养基,加完全培养基 2 mL 继续培养.转染 72 h 后,取少量细胞滴加在微孔玻片上,晾干,冰丙酮固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,滴加 HCV 阳性患者血清(1:20 稀释),5 % CO<sub>2</sub> 孵箱中湿育 1 h, PBS 液洗涤 3 次,加荧光标记羊抗人 IgG (1:200 稀释),50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中湿育 1 h 后,置荧光显微镜下观察转染细胞瞬时表达情况.同时,细胞按 1:4 传代,继续培养,细胞达 50-80 % 汇合后,更换浓度为 400 mg/L 的 G418 培养基进行筛选,约 96 h 后,对照细胞大部分死亡时,筛选液 G418 浓度降至为 150 mg/L,维持筛选约 3 wk,待被转染细胞 HCV-C 抗原荧光染色均阳性后,将其做为靶细胞备用.将 pcDNA HCV-C 质粒转染并稳定表达 HCV-C 抗原的 SP2/0 细胞(SP2/0-HCV-C)以每只 Balb/c 小鼠  $5 \times 10^6$  /L 右肋皮下接种观察肿瘤形成情况.将 16 只小鼠随机分为预防组和治疗组(记为 A 组和 B 组),A 组又随机分为对照组和实验组(记为 A<sub>1</sub> 组和 A<sub>2</sub> 组),分别注射空载体 pcDNA3 和重组体 pcDNA HCV-C 质粒,2 wk 后与 B 组同时接种 SP2/0-HCV-C, B 组又随机分为对照组和实验组(记为 B<sub>1</sub> 组和 B<sub>2</sub> 组),于接种后 3 d 开始治疗,每次股四头肌肌肉注射 1 g/L 质粒 100 μL,1 次/wk,共 4 次,每次注射质粒前 24 h 于小鼠股四头肌注射 2.5 mL/L 布比卡因 100 μL.观察成瘤时间、肿瘤大小及小鼠存活情况.治疗 4 wk 后,拉颈处死各组小鼠,取出瘤体,直接做冰冻切片,其余用 40 g/L 甲醛固定,做成石蜡切片,用免疫组化的方法观察瘤组织内 HCV-C 抗原表达情况.一抗用小鼠 HCV-C 单克隆抗体,二抗用过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG,最后 DAB 显色.另外做特异性 T 淋巴细胞标记,看肿瘤组织中 T、B 淋巴细胞浸润情况.由本校病理学教研室 协作完成.

## 2 结果

用免疫荧光法检测表明, SP2/0 细胞内的表达产物,可与 HCV-C 单抗发生特异性结合(图 1,2).pcDNA HCV-C 对 SP2/0-HCV-C 细胞在小鼠体内成瘤时间延长, B<sub>2</sub> 组尤为明显(图 3,4).肿瘤组织中以 T 淋巴细胞浸润为主(图 5);HCV-C 抗原表达主要在 SP2/0 细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中,对照组 HCV-C 抗原表达明显强于实验组(图 6-9).

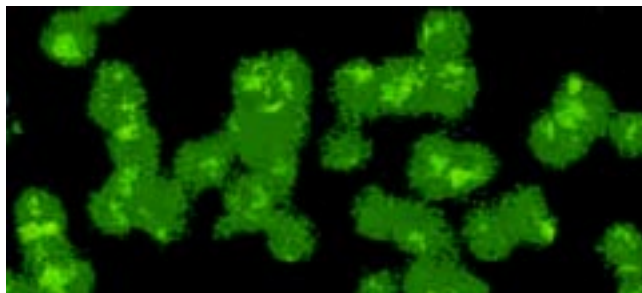


图 1 免疫荧光法检测 SP2/0 细胞内的表达.

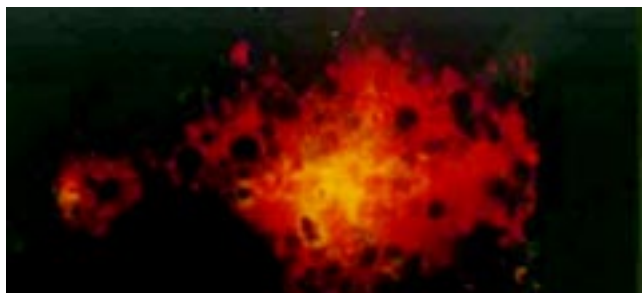
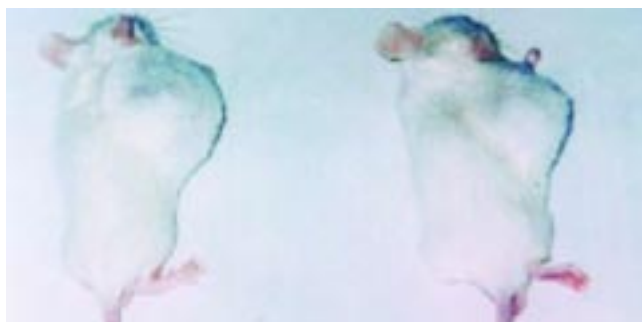


图 2 阴性对照产物与 HCV-C 单抗发生特异性结合.



左:对照组 右:实验组  
图 3 预防组小鼠成瘤情况.



左:对照组 右:实验组  
图 4 治疗组小鼠成瘤情况.

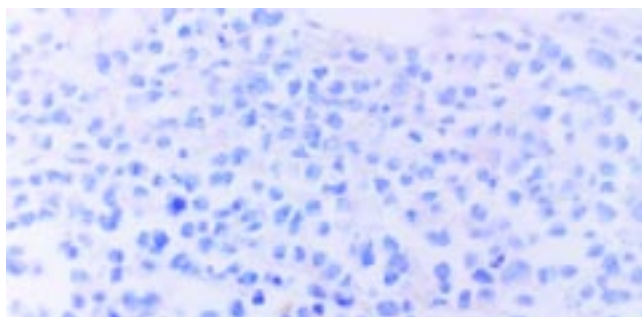


图 5 肿瘤组织特异性 T 淋巴细胞显色

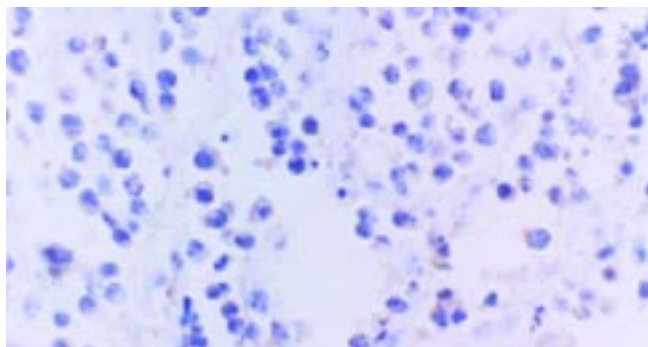


图6 A1组HCV-C抗原表

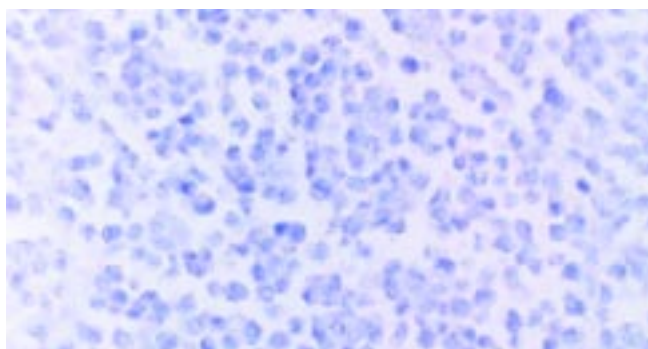


图7 A2组HCV-C抗原表达

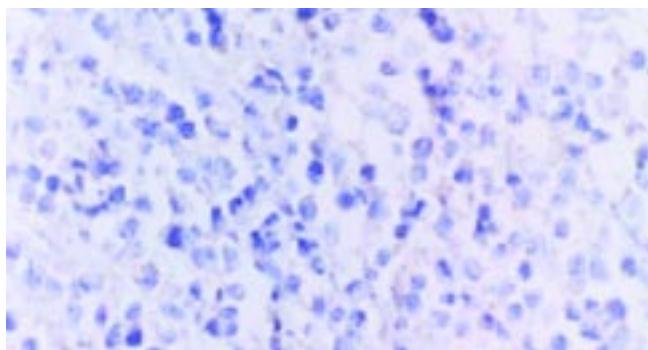


图8 B1组HCV-C抗原表达

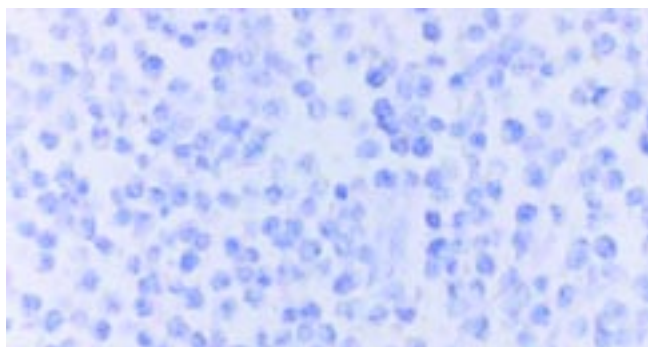


图9 B2组HCV-C抗原表达

### 3 讨论

丙型肝炎是一种严重的进展性肝病,急性丙型肝炎患者中有50-60%转为慢性,其中5a内20%发展为肝硬化,且与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[5,7-12]</sup>,我国输血后HCV感染率为34.8%左右,献血人群中HCV感染率达40%<sup>[13]</sup>,是流行范围仅次于乙型肝炎的第二大传染性肝

病.HCV为单股正链RNA病毒,HCV-RNA全长9600bp,含有一个大的单一开放阅读框(ORF),编码约3010个氨基酸的病毒前体蛋白.在HCV的编码基因中,核心区(C区)序列具有高度遗传保守性,核心蛋白定位于胞核中<sup>[14]</sup>,C基因表达产物具有良好的抗原稳定性.人肝细胞<sup>[15]</sup>和黑猩猩对HCV很敏感,但HCV体外培养尚未找到敏感有效的细胞培养系统.有报道HCV核心蛋白在酵母中表达成功<sup>[16]</sup>;以非融合蛋白的方式,在大肠杆菌中高效表达了完整的HCV核心蛋白,具有较高生物活性<sup>[17,18]</sup>.Hao et al<sup>[19]</sup>构建了HCV C基因腺病毒表达载体的骨架质粒,并证实其可以在7721细胞中瞬时表达HCV C基因.应用PCR方法获取完整的HCV核心区cDNA片段,克隆到真核表达载体PBK-CMV上,可在HepG2中稳定表达C蛋白,提供了理想的实验用细胞株<sup>[20]</sup>.

丙型肝炎发病机制仍未明.体液免疫应答总的效应很弱,不能有效地中和病毒.多数学者认为细胞免疫病理反应可能起重要作用,其组织浸润细胞以CD3<sup>+</sup>为主,细胞毒T细胞(TC)特异攻击HCV感染的靶细胞,可引起肝细胞损伤.

DNA疫苗是一种新的针对靶抗原诱导产生免疫的方法.他直接使识别基因编码的抗原和包含基因片段的抗原成为疫苗传播媒介,识别候选基因可快速进入感染机体和肿瘤细胞.DNA一项优点是在免疫的所有路径均显示了活性,特别是细胞毒T细胞反应,而在蛋白疫苗中很难产生.对于各种病毒包括那些血液传播的病毒,DNA疫苗均可被用于预防措施中.对于慢性感染和肿瘤患者,DNA疫苗则可作为一种治疗措施.在这种情况下,可把具有免疫活性的基因片段引入疫苗中,对基因片段进行合适处理以及联合增加免疫的操作识别系统<sup>[21]</sup>.丙肝DNA疫苗含有编码病毒蛋白(如核心蛋白、包膜蛋白)的基因,宿主细胞摄取外源性DNA并表达病毒基因、产生相应的病毒蛋白,后者通过宿主细胞的主要组织相容性复合体类(MHC-)途径被运载到细胞表面,通过刺激细胞表面的CD8及细胞毒性T细胞启动细胞介导的免疫反应,从而发挥抗病毒作用<sup>[22]</sup>.

本实验中SP2/0-HCV-C细胞形成的肿瘤组织中以T淋巴细胞浸润为主,说明HCV核心基因疫苗能诱导Balb/c小鼠产生良好的细胞免疫应答,与相关报道一致<sup>[23-27]</sup>,并发现HCV-C抗原表达主要在SP2/0细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中.实验组HCV-C抗原表达明显弱于对照组,说明HCV-C DNA疫苗对HCV感染有预防及治疗作用.

表达HCV结构蛋白(C,E1,E2)的FVB/n转基因小鼠及野生型(WT)FVB/n小鼠经肌肉注射免疫表达核心(pHCVC)质粒或C/E1/E2(pHCVCst)质粒.WT和转基因小鼠经结构蛋白或包膜蛋白免疫后均可产生抗C抗体和显示T细胞增生反应.WT小鼠免疫pHCVCst后,只产生抗E2的CTL活性,非针对抗C或抗E1,而当WT小鼠免疫pHCVC时可产生强烈的抗C的CTL活性.经pHCVC免

疫的转基因小鼠未测出抗 C 或抗包膜蛋白的 CTL 活性,但免疫 pHVCV 的转基因小鼠产生了独特型抗 C 的 CTL 活性<sup>[28]</sup>. Balb/c(H-2d)和 C57bl/6 小鼠接受联接多顺反子 C/E1/E2/NS2/NS3(pRC/C-NS3)的黄痘病毒增强了对 HCV 蛋白的抗体和细胞反应,CD8(+)T 细胞反应增强<sup>[29]</sup>. 重组质粒 pcDNA HCV-C 治疗组,使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低,对 HCV 皮下移植瘤有一定的治疗作用;与表达 IL-12 质粒联合接种后,治疗作用加强<sup>[30]</sup>. 脂质转染剂<sup>[31]</sup>或联合注射 GM-CSF 细胞因子<sup>[26]</sup>可以促进基因疫苗的摄取并增强其诱导的抗病毒免疫应答的效力. pRSC-HBV/HCV 可分别表达 HBcAg 及 HCV 核蛋白,免疫 Balb/c 小鼠后可诱导其体液免疫应答<sup>[32,33]</sup>. 双表达载体 pcDNA3.0 BA 同时输送 GM-CSF 与 pc154 基因能增强 Balb/c 小鼠对 HCV C 蛋白基因的体液免疫应答及免疫鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增生能力<sup>[34]</sup>. 重组的 HCV 结构区 DNA 疫苗(pBK-CMV)能诱导小鼠体内特异性 T 淋巴细胞反应<sup>[35]</sup>. rhIL-12 可在体外显著增加慢性 HCV 感染者淋巴细胞的增生反应<sup>[36]</sup>. HCV 多表位抗原基因 PCX 克隆到真核表达载体 pREP9(RSV 启动子)及 pcDNA3 (CMV 启动子)中,构建真核表达载体 pREP9/PCX 及 pcDNA3/PCX,将其肌肉注射免疫小鼠及家兔,可诱发特异性免疫应答且安全性好<sup>[37]</sup>. HCV 不同区段的基因重组抗原或人工合成多肽可诱导 HLA-II 类分子限制 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞增生,这种增生反应的强弱可能反映不同人群对 HCV 免疫应答的不同,并与 HCV 感染的预后有关.

#### 4 参考文献

- 1 Yu SK, Yi DY. Response of Patients with HCV Genotype Infection to IFN  $\alpha$ . *J Jiangxi Med* 2000;40:1
- 2 Zhou GP, Bai JY, Huang YQ, Wang YZ, Deng WQ, Chen M. The levels of Hepatitis C virus RNA of sera in patients with Chronic hepatitis C during alpha interferon treatment. *J Ningxia Med* 2000;22:7
- 3 Yao ZB, Fu XX, Tian GS, Xu DZ, Hao LJ, Huang PY. Clinical trial of consensus interferon for chronic hepatitis C. *Chinese J Epidemiol* 2000;18:2
- 4 Zhao GZ, An P, Li Y. The relationship between HCV genotypes, HCV RNA quantities, and IFN therapeutic effectiveness. *J Chinese Med Univers* 2000;29:6
- 5 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 6 Brinster C, Inchauspe G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 2001;44:143-153
- 7 Li J, Wang WL. Detection of hepatitis C virus RNA in the tissue of hepatocellular carcinoma by multiple detection system. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2000;14:1
- 8 Liu RH. Chronic liver disease and hepatitis B and hepatitis C virus infection. *J Ningxia Med* 2000;22:4
- 9 Wang RQ, Zhou ZC, Yang JM, Fang DC. Expression of oncogenes and tumor-suppressor gene in the tissues of hepatocellular carcinoma with different types of HBV HCV infection. *Chongqing Med* 2000;29:2
- 10 Yang JM, Wang RQ, Pu B, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. The effect of hepatitis C virus infection on expression of several cancer-associated gene products in hepatocellular carcinoma. *Tumour* 2000;20:1
- 11 Zhang WJ, Yu XL, Du CX, Yin Q, Du SC. The infections of HBV HCV HGV TTV in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and the possibility and prevention in interventional treatment. *Shaanxi Tumour Med* 2002;10:1
- 12 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:91-103
- 13 Han DL, Liu W, Ou ZY, Liang M, Hu Q. A survey on HCV infec-

- tion among blood donors. *Contem Precaut med* 2001;28:4
- 14 Chen LB, Chen PL, Fan GR, Li L, Liu CY. Localization of hepatitis C virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Chin J Exper Clin Virol* 2002;16:1
- 15 Ma QY, Hao F, Wang YM. Study on the infection of normal adult hepatocytes with HCV in vitro. *J Third Milit Med Univer* 2001;23:10
- 16 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Lu MY, Li L. Cloning and expression of the gene of hepatitis C virus core in yeast. *J Surg Advan Coll* 2002;23:1
- 17 李华,潘承恩,陈武科,王全颖,杨广笑. 丙型肝炎病毒核心区基因在大肠杆菌中的高效表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:221-223
- 18 Zhao W, Liao GY, Li WD, Chen JY, Zhang XW, Sun MB, Jiang SD. Expression of hepatitis C virus core protein in E. coli and its immunological characteristics. *Immunol J* 2001;17:06
- 19 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- 20 刘重阳, 刘为纹, 杨建民, 鲁荣, 罗元辉. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:1049-1050
- 21 Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001;80:12-18
- 22 Tang XP, Xu YL, Yuan XZ, Zhang FC. Activity of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Chin J Epidemiol* 2001;19:4
- 23 Tan DM, Liu SH, Li CZ, Fan XG, Yan MY, Sun KZ. V specific cellular and humoral immune responses induced by intramuscular injection of DNA vaccine containing HCV core gene in mice. *Fund Med Clin* 2000;20:5
- 24 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Jiao CS, Li JG. Construction and gene immunization of recombinant expression plasmid of Hepatitis C virus core gene. *Chin J Immunol* 2000;16:4
- 25 Ceng XW, Du Y, Wang QC. Research on DNA vaccines of hepatitis C virus. *J Sich Univer* 2000;37:04
- 26 Ou-Yang P, Huang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 27 Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19:992-997
- 28 Sato I, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehmann B, Liang TJ. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001;75:12121-12127
- 29 Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis* 2000;182:18-27
- 30 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Jia ZS, Jiao CS, Wang QC, Li JG. Enhancing therapeutic effect of DNA vaccine against hepatitis C virus infection by interleukin-12. *Chin J Epidemiol* 2001;19:1
- 31 Feng ZH, Zhou YX, Wang QC, Du DW, Jiao CS, Li JG. Lipofectamine coated hepatitis C virus core gene vaccine promotes the efficacy of immune responses. *J Fourth Mil Med Univer* 2000;21:7
- 32 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NL, Hu DR, Li L, Huang SL, Jia KP. Constructs and expression of hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Immunol* 2002;18:3
- 33 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NI, Hu DR, Wang M, Jia KP. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Med* 2002;82:77-80
- 34 Liao GY, Zhang XW, Sun MB, Cheng JY, Yang HJ, Jiang D. Enhancement of immune response to HCV core gene by GM-CSF gene with bicistronic vector. *Immunol J* 2001;17:4
- 35 Li B, Yin PQ, Wang J, Dou J, Lin L, Wang LX, Shi ZY. DNA immunization of mice with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins elicits significant cell-mediated immune responses. *Immunol J* 2001;17:5
- 36 Fan XG, Ou ZM, Hu GL. Effect of IL-12 on lymphoproliferative response in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *Chin J Immunol* 2000;16:4
- 37 Zhang LY, Ren DM, Chen LS, Guo MQ, Huang JS, Shen XR, Zhang Q, Xie YM, Chen LY, Jia FX. Immunogenicity of a multiple epitope antigen gene of hepatitis C virus in mice and rabbits. *Chin J Cell Mol Immunol* 2001;17:1

# 乙型肝炎病毒准种异质性对干扰素应答性的影响

兰 林,王宇明

兰林,王宇明,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所重庆市 400038

兰林,男,1963-06-24生,四川省宜宾市人,1985年泸州医学院本科毕业,1994年华西医科大学硕士研究生毕业,2002年博士毕业,讲师.主要从事传染性疾病的病毒学研究.

项目负责人:兰林,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. llin6624@hotmail.com

收稿日期:2002-03-14 接受日期:2002-06-08

## Effects of quasi-species heterogeneity of HBV on response to IFN- $\alpha$ therapy

Lin Lan,Yu-Ming Wang

Lin Lan,Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of PAL, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Lin Lan, Institute of Infectious Diseases of PAL, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. llin6624@hotmail.com

Received:2002-03-14 Accepted:2002-06-08

### Abstract

AIM: To study effects of quasi-species heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) on response to interferon(IFN)- $\alpha$  therapy.

METHODS: Serum quasi-species heterogeneity of HBV in 20 patients (10 responders and 10 non-responders) with chronic hepatitis B before administration of IFN- $\alpha$  was detected with conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE), and the relationship between response to IFN- $\alpha$  and quasi-species heterogeneity of HBV was analyzed.

RESULTS: No significant difference in levels of HBV DNA between responders ( $7.27 \times 10^{10} \pm 8.79 \times 10^{10}$ ) and non-responders ( $5.16 \times 10^{10} \pm 5.13 \times 10^{10}$ ) before IFN- $\alpha$  therapy was found ( $P > 0.05$ ). But the quasi-species complexity and genetic diversity in non-responders were significantly higher than those in responders ( $8.30 \pm 1.89$  vs  $18.5 \pm 2.68$ ,  $P < 0.001$  and  $0.926 \pm 0.008$  vs  $0.869 \pm 0.016$ ,  $P < 0.001$ ).

CONCLUSION: The level of quasi-species heterogeneity of HBV was reversely associated with the probability of response to IFN- $\alpha$  therapy.

Lin L,Wang YM.Effects of quasi-species heterogeneity of HBV on response to IFN- $\alpha$  therapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):169-172

### 摘要

目的: 了解乙型肝炎病毒(HBV)准种遗传异质性对干扰素(IFN- $\alpha$ )应答性的影响.

方法: 用构象敏感凝胶电泳(CSGE)对20例(完全应答者和无应答者各10例)已接受IFN- $\alpha$ 治疗的慢性乙型肝炎患者治疗前血清中HBV准种的异质性进行检测, 分析准种的异质性与IFN- $\alpha$ 应答性的关系.

结果: HBV DNA含量在IFN- $\alpha$ 应答患者和非IFN- $\alpha$ 应答患者之间无差异( $7.27 \times 10^{10} \pm 8.79 \times 10^{10}$  vs  $5.16 \times 10^{10} \pm 5.13 \times 10^{10}$ ,  $P > 0.05$ ),但是,在无应答患者HBV准种的复杂性和遗传差异性明显高于应答患者 ( $8.30 \pm 1.89$  vs  $18.5 \pm 2.68$ ,  $P < 0.001$  和  $0.926 \pm 0.008$  vs  $0.869 \pm 0.016$ ,  $P < 0.001$ ).

结论: HBV准种的异质性对IFN- $\alpha$ 的应答性有影响.

兰林,王宇明. 乙型肝炎病毒准种异质性对干扰素应答性的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(2):169-172

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/169.htm>

### 0 引言

- 干扰素(interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )是抗HBV的主要药物, 但疗效并不理想. 在治疗的病例中, HBeAg和HBV DNA的阴转率仅比对照组高20%, HbsAg的阴转率只比对照组高5-6%<sup>[1]</sup>. 影响IFN- $\alpha$ 应答性的因素尚不完全清楚<sup>[2-5]</sup>. 在病毒学方面, 有关变异株对IFN- $\alpha$ 应答性影响的研究报道很多<sup>[6-14]</sup>. 但有关HBV准种遗传异质性对IFN- $\alpha$ 应答性影响的研究尚未见报道. 我们检测了对IFN- $\alpha$ 治疗完全应答和无应答的各10例慢性乙型肝炎患者治疗前体内HBV的准种情况, 观察HBV准种的异质性对IFN- $\alpha$ 疗效的影响.

### 1 材料和方法

1.1 材料 2001年度住院接受IFN- $\alpha$  2b治疗的慢性乙型肝炎20例, 完全应答和无应答各占10例, 男13例, 女7例, 年龄23-56岁, 临床诊断符合2000-09西安会议《病毒性肝炎防治方案》标准. 临床检测HbsAg、HBeAg和抗-HBc阳性. 患者均无使用HBV疫苗史和抗病毒治疗史. 无甲、丙、丁和戊型肝炎病毒合并感染. 患者在治疗开始前抽取静脉血, 保存于-70℃备用. 所有患者均接受IFN- $\alpha$  2b 6Mu肌注, 3次/wk, 疗程3 mo, 治疗结束后随访3 mo. IFN- $\alpha$  治疗完全应答的标准是: 治疗结束时HBV DNA、HBeAg均转阴, ALT复常, 治疗停止后3 mo仍维持不变. IFN- $\alpha$  治疗无应答的标准是: HBV DNA、HBeAg均未转阴, ALT亦未复常. IFN- $\alpha$  2b为安徽安科生物高技术有限公司产品. 血清HBV DNA的定量检测采用荧光定量PCR法(FQ-PCR), FQ-PCR试剂盒为深圳匹基生物技术公司产品, Lightcycler检测仪为Roche公司产品.

1.2 方法 血清DNA提取, 用蛋白酶K消化. 饱和酚: 氯仿抽提法提取患者血清100  $\mu$ L中的DNA. PCR引物合成, 以adr亚型<sup>[15]</sup>HBV基因序列为依据设计引物. 上游引物:

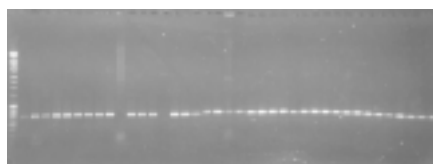
5' -TGTACTAGGAGGCTGTAG-3 (1 769-1 786 nt),下游引物:5' -CCACCTTATGAGTCCAAG-3 (2 481-2 464 nt),扩增片段长约 712 bp,扩增区域包括整个 C-ORF 区序列. PCR 100  $\mu$ L 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳后,长波紫外灯下切取目的条带,用玻璃奶法(上海生工)回收 PCR 产物,取纯化产物 1-2  $\mu$ L 与 pCR<sup>®</sup> 2.1T 载体(Invitrogen 公司产品)14 连接过夜. 次日用连接混合物转化 INV F' 感受态细菌,细菌复苏后涂于含有氨苄青霉素和 X-gal 的 LB 琼脂平板上,37 培养 20 h. 从转化的克隆中分别用消毒牙签挑出 40 个左右的白色菌落,分别“接种”进 PCR 反应混合物中(PCR 反应体积 100  $\mu$ L 中包含 10  $\times$  缓冲液 10  $\mu$ L、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L、二种引物各 1  $\mu$ L(50 pmol)、和 Taq 酶 0.5  $\mu$ L(5 Mu/L). 同时牙签分别划种在另一含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,以备复查. PCR 循环条件为 94 1 min, 58 1 min, 72 1 min, 先做 6 次循环. 接着 94 1 min, 54 1 min, 72 1 min, 继续再做 24 次循环, 总共 30 个循环. 反应结束后,取 PCR 产物 5  $\mu$ L,在含 EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,检查每个样品的扩增结果. 随机从扩增阳性的样本中选取 34 个 PCR 产物,再从中随机选取 1 个 PCR 产物作为驱动序列进行构像敏感凝胶电泳(conformation-sensitive gel electrophoresis, CSGE)检测<sup>[16]</sup>. 聚丙烯酰胺凝胶主要成分:60 g/L 聚丙烯酰胺、150 g/L 乙二醇、200 g/L 甲酰胺和 150 g/L 尿素. 电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TTE (1  $\times$  TTE 含 89 mmol/L Tris、15 mmol/L Taurine、0.5 mmol/L EDTA pH 9.0) 电泳条件,电压 200 V,室温下电泳 18 h. 准种异质性分析参照 Delwart et al<sup>[17]</sup>方法进行,包括:准种复杂性=不相同电泳带型克隆的数目(代表组成准种的病毒株数);准种内病毒株(克隆)频率=相同电泳带型克隆的数目 $\div$ 克隆总数(33) $\times$  100%;准种毒株平均遗传差异性=所有克隆两条异源双链条带的平均相对移行距离之和 $\div$ 驱动克隆同源双链条带的相对移行距离 $\times$  克隆总数(33).

统计学处理 t 检验.

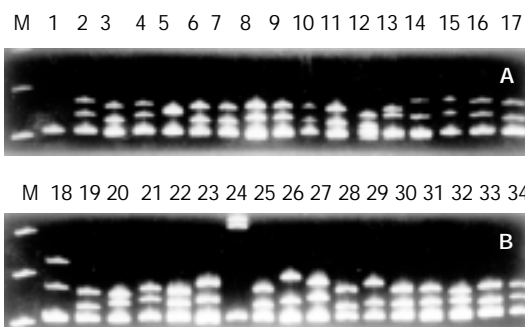
## 2 结果

从待测血清中扩增的 HBV C-ORF 片段经纯化、连结和转化感受态细胞后,在 2 个 90 mm LB 平板上共获得大约 200 个转化克隆,其中 70-80 % 为白色菌落. 在挑出的 40 个菌落中,PCR 证实 90 % 以上含有插入片段(图 1). 20 例患者 CSGE 均获得清晰的电泳图谱(图 2、3). HBV 准种复杂性、毒株频率及毒株遗传距离的结果见表 1. 在两组患者 HBV DNA 含量  $7.27 \times 10^{10} \pm 8.79 \times 10^{10}$  vs  $5.16 \times 10^{10} \pm 5.13 \times 10^{10}$  ( $P > 0.05$ ),HBV 准种复杂性  $8.30 \pm 1.89$  vs  $18.5 \pm 2.68$  ( $P < 0.001$ ),毒株间遗传差异  $0.926 \pm 0.008$  vs  $0.869 \pm 0.016$  ( $P < 0.001$ ).

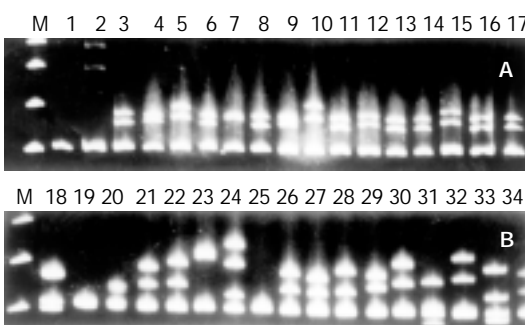
M



M:DNA 标准参照物;1-39: HBV C-ORF 克隆的 PCR 产物.  
图 1 HBV C-ORF 片段克隆的 PCR 鉴定结果.



A M:DNA marker;1:驱动序列 2-17 检测的克隆  
B M:DNA;marker;18-34 检测的克隆;  
图 2 IFN- $\alpha$  治疗应答患者的 CSGE.



A M:DNA marker;1:驱动序列;2-17:检测的克隆;  
B M:DNA marker;18-34 检测的克隆;  
图 3 IFN- $\alpha$  治疗无应答患者的 CSGE.

表 1 慢性乙型肝炎患者的 HBV DNA 含量和准种异质性参数

Patient	HBV DNA load	Quasispecies Heterogeneity		
<i>n</i> =20	(copies/L)	Complexity	Clonal frequencies (%)	Diversity
Sustained Responsive (SR)				
1	9.538×10 <sup>10</sup>	6	3-48.5	0.926
2	2.547×10 <sup>10</sup>	10	3-57.6	0.931
3	5.574×10 <sup>10</sup>	9	3-51.5	0.927
4	4.896×10 <sup>9</sup>	11	3-45.5	0.942
5	2.760×10 <sup>10</sup>	5	3-69.7	0.924
6	2.248×10 <sup>11</sup>	10	3-60.6	0.933
7	3.436×10 <sup>9</sup>	8	3-72.7	0.923
8	2.987×10 <sup>10</sup>	8	3-63.6	0.921
9	2.384×10 <sup>11</sup>	9	3-57.6	0.918
10	2.162×10 <sup>10</sup>	7	3-66.7	0.914
Nonresponsive(NR)				
11	2.206×10 <sup>10</sup>	27	3-12.1	0.897
12	1.158×10 <sup>11</sup>	16	3-18.2	0.856
13	7.656×10 <sup>10</sup>	16	3-18.2	0.869
14	1.769×10 <sup>7</sup>	18	3-21.2 %	0.843
15	1.341×10 <sup>11</sup>	18	3-21.2	0.895
16	1.069×10 <sup>11</sup>	17	3-24.2	0.876
17	2.647×10 <sup>10</sup>	16	3-21.2	0.855
18	4.518×10 <sup>9</sup>	13	3-18.2	0.847
19	1.197×10 <sup>10</sup>	21	3-21.2	0.889
20	2.153×10 <sup>6</sup>	11	3-15.2	0.812
$\bar{x} \pm s$				
SR 7.27×10 <sup>10</sup> ±8.79×10 <sup>10a</sup>		8.30±0.89 <sup>b</sup>	0.926±0.008 <sup>c</sup>	
NR 5.16×10 <sup>10</sup> ±5.13×10 <sup>10</sup>		18.5±6.8	0.869±0.016	

<sup>a</sup> $P > 0.05$ , vs NR; <sup>b</sup> $P < 0.001$ , vs NR; <sup>c</sup> $P < 0.001$ , vs NR.

### 3 讨论

病毒准种(quasispecies)是病毒在感染个体内,由于不断的变异和选择而形成的异质性病毒群体<sup>[18-21]</sup>. 病毒准种特性及其临床意义的研究近来受到了越来越多的关注.但是准种理论的大量研究结论主要来自于对 HIV 和 HCV 等 RNA 病毒的研究<sup>[22-29]</sup>.而有关 HBV 病毒准种特性的研究报道很少,目前国外只有少量的研究报道,初步证实了在慢性 HBV 感染者中 HBV 存在准种特性,国内也有学者研究了 HBV 多个基因区及 HBV 基因组全序列<sup>[30-35]</sup>, 研究结果表明在慢性 HBV 感染者中的确存在准种现象,并发现 HBV 准种有如下特点:(1)HBV 准种是慢性 HBV 感染者普遍存在的现象,而不是个别患者的特点;(2)HBV 准种特点贯穿于 HBV 整个基因组;(3)HBV 准种特性具有重要地生物学和临床意义;(4)HBV 准种的研究,将 HBV 基因序列的动态变化和种群的概念引入了 HBV 的研究领域中,在 HBV 感染的个体内,病毒株的变异不再是指单一病毒基因序列的改变,而是指 HBV 种群的漂变(shift).不过这些研究报道的病例数和分析的克隆数均较少(2-8 克隆/每份血清样本). HBV 准种是一个异质性的病毒群体,慢性乙型肝炎患者血液中 HBV DNA 拷贝数常在百万至十亿之间,随机抽取单个或少数几个克隆株可能难以真实地代表 HBV 的准种组成. 在前期的研究中,我们从 1 例慢性乙型肝炎患者的血清样本克隆中,随机选取 34 个克隆进行核酸序列分析,从中就发现 28 种不同的核酸序列(已提交 NIH GenBank, 查询号是 AF480337-AF480364). 在本研究中,我们对每份血清样本分析了 33 个克隆,克隆型(clonotype 待检样本与驱动子所形成的异源双链和同源双链在 CSGE 图谱上的带型组合,不同的克隆型代表不同的准种成份)介于 5-27 之间. 表明 HBV 准种组成在部分慢性乙型肝炎是非常复杂的,需要尽可能多地分析 HBV 的准种成份,才可能对其有一个全面的了解.

多数有关 HBV 变异株对 IFN- $\alpha$  应答性影响的研究集中在 HBV 的 C-ORF 区<sup>[36-38]</sup>,因而本研究我们也选择了这个区域. 我们的研究结果显示:在慢性乙型肝炎患者血清中,HBV 种群在 C-ORF 区序列的确存在明显多态性,且 HBV 准种的复杂性和病毒株间的遗传差异性在 IFN- $\alpha$  治疗应答患者和无应答患者之间存在显著性差异. 研究结果证实在慢性乙型肝炎患者体内 HBV 存在准种特性,且 HBV 准种的异质性对 IFN- $\alpha$  的应答性有影响. 本研究结果与在 HCV 所作的相关研究相一致<sup>[39-43]</sup>. 另外,我科前期的另一项研究已经发现,在感染个体内 HBV 基因高同源性是急性自限性乙型肝炎的主要特征<sup>[44]</sup>. 我们再次从另一个角度证实了 HBV 准种特性的临床意义. 我们的研究结果还显示,治疗前 HBV DNA 的载量在两组患者中无显著性差异. 本研究共研究了 20 份病例,对每份样本均分析了 33 个克隆,相对具有较好的代表性,研究结果较好的展示了慢性乙型肝炎 HBV 准种的异质性.

准种特性的存在可能是病毒进化的一种生存优势,病毒最大限度地“制造”出自己的大量变异株,在这些变异株中可能包括了潜在有用的病毒,如对抗病毒制剂有抵抗能力、能逃避 CTL 攻击和诱导免疫耐受的病毒变异株. 这样当环境改变后病毒可以快速的做出反应,从而保证其在宿主体内的生存. 最近的研究还发现病毒准种类似于人体免疫系统具有记忆能力,当准种再次遇到经历过环境时,保存在突变体谱内的少量病毒株将迅速地大量复制成为准种的主要序列<sup>[45-47]</sup>. 因此如果病毒准种的异质性越大,组成准种的病毒株就越复杂,其中包含的各种抵抗株可能就越多,其适应环境变化的能力就越强. 另外,要清除这样复杂的病毒群体,对宿主免疫系统也是一个很大的负荷. 所以 IFN- $\alpha$  治疗的难度可能就越大. 这一点在 HCV 的研究中已得到证实. 从理论上分析,复杂性和差异性二者都是与病毒变异性相关的指标,二者越大,组成准种的病毒株就越复杂,对 IFN- $\alpha$  治疗的应答性就越差. 而 HBV DNA 载量主要是由准种中主要序列的复制能力所决定,这与 IFN- $\alpha$  的应答性之间没有直接地联系. 所以 HBV 准种的异质性对 IFN- $\alpha$  治疗的应答性有影响,而血清中 HBV DNA 载量与 IFN- $\alpha$  的应答性无关. 对 HBV DNA 载量对 IFN- $\alpha$  治疗应答性的影响目前有不同的报道,本文所研究的病例数偏少,下一步可能还需要研究更多的病例以证实这个问题. 早期研究发现 IFN- $\alpha$  疗效与 ALT 高低有密切的关系,而 ALT 升高是宿主对 HBV 产生免疫应答的重要标志,但 ALT 变化的影响因素众多,不一定能准确预测 IFN- $\alpha$  疗效,为此,我们设想,患者 IFN- $\alpha$  治疗前 HBV 准种的异质性可以作为预测 IFN- $\alpha$  疗效的补充指标.

### 4 参考文献

- 1 Robert L, Carithers JR. Effect of interferon on hepatitis B. *Lancet* 1998; 351: 157
- 2 Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol* 2001;75:2684-2691
- 3 Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Mogavero AR, Stanzione M, Filippini P, Felaco FM, Piccinino E. Isolated anti-HBc in chronic hepatitis C predicts a poor response to interferon treatment. *J Med Virol* 2001;65:681-687
- 4 Simon K, Rotter K, Zalewska M, Gladysz A. HBV-DNA level in blood serum as a predictor of good response to therapy with interferon-alpha-2b of patients with chronic hepatitis B. *Med Sci Monit* 2000;6:971-975
- 5 Fukuda R, Ishimura N, Hamamoto S, Moritani M, Uchida Y, Ishihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y. Co-infection by serologically-silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down-regulation of type-I interferon receptor gene expression in the liver. *J Med Virol* 2001;63:220-227
- 6 Blum HE. Variants of hepatitis B, C, and D viruses: molecular biology and clinical significance. *Digestion* 1995;56:85-95
- 7 Hannoun C, Horal P, Krogsgard K, Lindh M. Mutations in the X region and core promoter are rare and have little impact on response to interferon therapy for chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:171-178
- 8 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001; 8: 311-321

- 9 Zhang X, Han Y, Lu Z, Gao J, Luo Z, Zhang D. Effect of multiple mutations in the core promoter and pre-core/core region of hepatitis B virus genome on the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16: 393-398
- 10 Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994; 68: 8102-8110
- 11 Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999;73:1239-1244
- 12 Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-5851
- 13 Nakao K, Nakata K, Yamashita M, Tamada Y, Hamasaki K, Ishikawa H, Kato Y, Eguchi K, Ishii N. p48 (ISGF-3 $\alpha$ ) is involved in interferon- $\alpha$ -induced suppression of hepatitis B virus enhancer-1 activity. *J Biol Chem* 1999;274:28075-28078
- 14 Rang A, Heise T, Will H. Lack of a role of the interferon-stimulated response element-like region in interferon  $\alpha$ -induced suppression of hepatitis B virus in vitro. *J Bio Chem* 2001; 276: 3531-3535
- 15 Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983;11:4601-4610
- 16 Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10325-10329
- 17 Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, Mullins JI. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-1261
- 18 Eigen M. Self-organization of matter and evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 1971;58:465-523
- 19 Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:151-178
- 20 Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982;215:1577-1585
- 21 Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E. Memory in viral quasispecies. *J Virol* 2000;74:3543-3547
- 22 Farci P, Strazzer A, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 3081-3086
- 23 Hirschel B. Planned interruptions of anti-HIV treatment. *Lancet Infect Dis* 2001;1:53-59
- 24 Asselah T, Martinot M, Cazals-Hatem D, Boyer N, Auperin A, Le Breton V, Erlinger S, Degott C, Valla D, Marcellin P. Hypervariable region 1 quasispecies in hepatitis C virus genotypes 1b and 3 infected patients with normal and abnormal alanine aminotransferase levels. *J Viral Hepat* 2002;9:29-35
- 25 Alves K, Canzian M, Delwart EL. HIV Type 1 Envelope Quasispecies in the Thymus and Lymph Nodes of AIDS Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:161-165
- 26 Collins KR, Quinones-Mateu ME, Wu M, Luzze H, Johnson JL, Hirsch C, Toossi Z, Arts EJ. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) quasispecies at the sites of Mycobacterium tuberculosis infection contribute to systemic HIV-1 heterogeneity. *J Virol* 2002;76:1697-1706
- 27 Fraser C, Ferguson NM, Anderson RM. Quantification of intrinsic residual viral replication in treated HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15167-15172
- 28 Domingo E, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S, Arias A, Pariente N, Baranowski E, Escarmis C. Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res* 2002;82:39-44
- 29 Toja M, Escarmis C, Domingo E. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* 1999;64:161-171
- 30 Blum HE. Hepatitis B virus: Significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993; 35: 40-50
- 31 Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- 32 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS. The preliminary study on hepatitis B virus quasispecies in a patient with chronic HBV infection. *Chin J Intern Med* 2000;39:838-839
- 33 Dong J, Li J, Shi SS. The study on quasispecies of hepatitis B virus (HBV): HBV genome as an example. *Med J Chin PLA* 2002;27:116-118
- 34 Liu Y, Dong J, Huang JK. Effect of hepatitis B virus x gene heterogeneity on its transactivation. *Med J Chin PLA* 2002;27:125-127
- 35 Liu Y, Dong J, Huang JK. Effect of hepatitis B virus core promoter gene heterogeneity on its transcriptional activity. *Med J Chin PLA* 2002;27:128-130
- 36 Manesis EK, Hadziyannis SJ. Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2001;121:101-109
- 37 Wartelle-Bladou C, Lafon J, Trepo C, Pichoud C, Picon M, Pellissier JF, Zoulim F. Successful combination therapy of pol-yarthritis nodosa associated with a pre-core promoter mutant hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2001;34:774-779
- 38 Yuen MF, Hui CK, Cheng CC, Wu CH, Lai YP, Lai CL. Long-term follow-up of interferon alpha treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B infection: The effect on hepatitis Be antigen seroconversion and the development of cirrhosis-related complications. *Hepatology* 2001;34:139-145
- 39 Yeh BI, Han KH, Lee HW, Sohn JH, Ryu WS, Yoon DJ, Yoon J, Kim HW, Kong ID, Chang SJ, Choi JW. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol* 2002;66:481-487
- 40 Takahashi K, Takahashi T, Takahashi S, Watanabe K, Boku S, Matsui S, Arai F, Asakura H. Difference in quasispecies of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus between alcoholic and non-alcoholic patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:416-423
- 41 Gursoy M, Gur G, Arslan H, Ozdemir N, Boyacioglu S. Interferon therapy in haemodialysis patients with acute hepatitis C virus infection and factors that predict response to treatment. *J Viral Hepat* 2001;8:70-77
- 42 Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001;8:1-18
- 43 Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000;31:1360-1361
- 44 Zhang R, Wang HL, Gu CH. High homogeneity of HBV genes is mainly character of acute hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:434-435
- 45 Domingo E, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S, Arias A, Pariente N, Baranowski E, Escarmis C. Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res* 2002;82:39-44
- 46 Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Molina-Paris C, Briones C, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E. Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol* 2002; 315: 285-296
- 47 Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E. Memory in viral quasispecies. *J Virol* 2000;74:3543-3547

# HCVNS3蛋白对正常人源肝细胞生长及MAPK磷酸化的影响

孙 意,程瑞雪,冯德云,欧阳小明,郑 晖

孙意,中南大学湘雅二医院病理科 湖南省长沙市 410011  
程瑞雪,冯德云,郑晖,中南大学湘雅医学院病理教研室 湖南省长沙市 410078  
欧阳小明,广州医学院附二院病理科 广东省广州市 510260  
孙意,男,1971-09-20生,浙江省诸暨市人,汉族,2001年中南大学湘雅医学院  
硕士研究生毕业.主要从事肝脏病理研究.  
卫生部科学基金资助课题项目, No.98-1-110  
项目负责人:程瑞雪,410078,湖南省长沙市,中南大学湘雅医学院病理教研室.  
chengrx@cs.hn.cn  
电话:0731-4805393  
收稿日期:2002-04-26 接受日期:2002-05-11

## Effect of HCV NS3 on proliferation and phosphorylation of MAPK in human hepatocytes

Yi Sun, Rui-Xue Cheng, De-Yun Feng, Xiao-Ming Ouyang, Hui Zheng

Yi Sun, Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China  
Rui-Xue Cheng, De-Yun Feng, Hui Zheng, Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China  
Xiao-ming Ouyang, Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangzhou Province, China  
Supported by the Scientific Foundation of Ministry of Public Health No.98-1-110  
Correspondence to: Pro. Rui-Xue Cheng, Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China. chengrx@cs.hn.cn  
Received: 2002-04-26 Accepted: 2002-05-11

## Abstract

AIM: To study effects of HCV NS3 protein on proliferation and transformation of normal human liver cell line.

METHODS: QSG7701 cells were transfected with pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3' and pRcCMV using liposome transfecting technique and selected with G418; Expression of HCV NS3 protein was determined by immunohistochemistry; Biological characters of transfected cells were evaluated by population doubling time and soft agar assays; activation of MAPK was analyzed by western blot.

RESULTS: QSG7701 cells transfected with pRcHCNS3-5' showed strong intracellular expression of HCVNS3 protein, and the positive signal was localized in cytoplasm. The level of expressed HCVNS3 protein in pRcHCNS3-3'-transfected cells was lower than that in pRcHCNS3-5'-transfected cells. The population doubling time in pRcHCNS3-5'-transfected cells (12 h) was significantly shorter than that in pRcHCNS3-3'-transfected cells (24 h), pRcCMV transfected cells (26 h) and normal cells (28 h) ( $P < 0.01$ ). The cells transfected with pRcHCNS3-5' showed much more anchorage independent colonies than those with pRcHCNS3-3' and pRcCMV ( $P < 0.01$ ). The cloning efficiencies of transfected cells with pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3', pRcCMV and controls were 33 %, 1.33 %, 1.46 %, 1.11 %, respectively. The level of phosphorylated MAPK in

cells with pRcHCNS3-5' was much higher than those with pRcHCNS3-3' and cell transfected with pRcCMV and normal cells ( $8\,858 \pm 877$ ,  $5\,612 \pm 656$ ,  $2\,212 \pm 245$ ,  $989 \pm 188$ ,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: QSG7701 is the good human liver cell line for investigating the pathogenesis of HCV NS3 protein. 5' region of the HCV genome segment encoding NS3 is involved in cell growth and cell phenotype. N-terminal peptide of HCV NS3 protein may up-regulate the activation of MAPK.

Sun Y, Cheng RX, Feng DY, Ouyang XM, Zheng H. Effect of HCV NS3 on proliferation and phosphorylation of MAPK in human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):173-177

## 摘要

目的: 研究丙型肝炎病毒非结构区3(HCV NS3)蛋白对正常人源肝细胞的转化及 MAPK 磷酸化调节的作用。

方法: 利用脂质体介导转染技术和 G418 筛选得到稳定表达 NS3 蛋白的正常人源性肝细胞 QSG7701, PCR 和免疫组化 S-P 法检测细胞中 NS3 的表达; 细胞计数和软琼脂实验鉴定其生物学性质; 抗磷酸化 MAPK 抗体和抗 MAPK 抗体 Western blot 检测转染细胞 MAPK 活性及表达。

结果: HCV NS3 转染的 QSG7701 肝细胞, 其 NS3 蛋白过度表达于细胞质; 真核表达质粒 pRcHCNS3-5' 转染细胞倍增时间为 12 h, 较 pRcHCNS3-3'、pRcCMV 转染细胞和未转染的 QSG7701 明显缩短(分别 24 h, 26 h 和 28 h)。pRcHCNS3-5'、pRcHCNS3-3' 和 pRcCMV 转染细胞及正常肝细胞在软琼脂中的克隆形成率分别为 33 %、1.33 %、1.46 %、1.11 %, pRcHCNS3-5' 形成的克隆明显高于其他三种细胞( $P < 0.01$ )。pRcHCNS3-5' 转染细胞 MAPK 磷酸化程度明显高于其他三种细胞(分别为  $8\,858 \pm 877$ ,  $5\,612 \pm 656$ ,  $2\,212 \pm 245$  和  $989 \pm 188$ ), ( $P < 0.01$ ), 而 MAPK 的表达量没有差异( $P > 0.05$ )。

结论: 人源性正常肝细胞 QSG7701 是研究 HCV NS3 蛋白致病机制的较好的细胞系; HCV NS3 蛋白 N 端多肽具有促进细胞增生和改变细胞表型的作用; HCV NS3 蛋白 N 端多肽能上调 MAPK 活性, 不影响 MAPK 的表达量。

孙意, 程瑞雪, 冯德云, 欧阳小明, 郑晖. HCVNS3 蛋白对正常人源肝细胞生长及 MAPK 磷酸化的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):173-177

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/173.htm>

## 0 引言

丙型肝炎病毒非结构区 3(HCV NS3)基因位于 HCV 基因

组非结构区 3'420-5'312 核苷酸区段,可编码含有 631 个氨基酸的 p72 蛋白.HCV NS3 具有多种潜在的生物学功能,例如蛋白酶、解旋酶活性、介导细胞免疫反应、反式激活端粒酶、调节 p53 活性及参与 PKA (protein kinase A) 和 STAT(signal transducers and activators of transcription) 信号转导等<sup>[1-9]</sup>,但目前其确切的作用机制仍不十分清楚.我们利用真核表达质粒 pRcHCNS3 转染人肝细胞株 QSG7701,观察 HCV NS3 蛋白对人肝细胞转化作用及 MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路的影响,从信号转导的角度探讨 HCV 致癌性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 正常人源肝细胞株 QSG7701 购自上海细胞生物所;真核表达质粒 pRcHCNS3-5' (表达 HCV NS3 蛋白 N 多肽)和 pRcHCNS3-3' (表达 HCV NS3 蛋白 C 多肽)由日本 Takegami 教授惠赠<sup>[6]</sup>;空白质粒 pRcCMV 购于 Sigma 公司;脂质体 Lipofectamine™ kit 和 G418 系 Gibco 公司产品;Xba 及其 buffer、PCR 试剂盒和 Marker 购于华美生物工程公司;抗 HCV NS3 蛋白单克隆抗体和 SP 免疫组化试剂盒分别购自武汉博士德公司和福州迈新生物技术公司;抗磷酸化 MAPK 抗体系 New England Biolabs 产品,抗 MAPK 抗体及 ECL 化学发光剂购自 Santa Cruz 公司;HCV NS3-5' 基因序列的 PCR 引物 (正义:5' - CGGGC ACGTT GTAGG CATC-3';反义:5' - AACGG ACGGC TTTAG GACGA-3')由上海生工公司合成.

1.2 方法 实验分为 4 组:未转染 QSG7701 细胞组;空白质粒 pRcCMV 转染细胞组;质粒 pRcHCNS3-3' 转染细胞组;质粒 pRcHCNS3-5' 转染细胞组.质粒 pRcCMV、pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 制备、纯化及鉴定用 CaCl<sub>2</sub> 法制备感受态大肠杆菌 MC1061,分别将 pRcHCNS3-5'、pRcHCNS3-3' 及 pRcCMV 导入细菌内扩增,碱裂解法小量制备质粒,XbaI 酶切,于 15g/L 琼脂糖上以 60 V 电泳 45 min,质粒 pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 分别出现 1 031 bp 和 886 bp 的电泳带,与 HCV NS3-3' 基因和 HCV NS3-5' 基因片段大小一致(图 1).质粒经酶切鉴定后,用碱裂解法大量抽提纯化质粒,用于转染 QSG7701 细胞.HCV NS3 基因导入 QSG7701 细胞及其克隆筛选和鉴定用 Lipofectamine reagent 试剂盒按产品说明书将质粒 pRcCMV、pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 转染至正常人肝细胞株 QSG7701,传代于含 400 mg/L G418 的选择培养基中筛选 2 wk,形成阳性克隆,其中挑选质粒 pRcCMV 阳性克隆 5 个,pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 阳性克隆分别为 8 个和 9 个(图 2).抽提 DNA,并在 PE480/PE DNA 扩增仪上进行 PCR 扩增:总反应液体积为 50  $\mu$ L:亚沸水 37.5  $\mu$ L,10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L,2 mmol/L dNTPs 5  $\mu$ L,25  $\mu$ mol/L 引物各 0.5  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L (100 ng),Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L (5MU/L);95  $^{\circ}$ C 预变性 90 s,循环参数为:94  $^{\circ}$ C 30 s,57  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,35 个循环后再 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min.PCR 产物在 8 g/L

Agarose 凝胶上以 80U 电压电泳 30 min,观察到 pHcNS<sub>3</sub>-5' 转染细胞 DNA 扩增出 HCV 特异性的 257 bp 片段,电泳条带清晰,无杂带及拖尾<sup>[6]</sup>;pRcHCNS<sub>3</sub>-3' 转染细胞 DNA、pRcCMV 转染细胞 DNA 及未转染的 QSG7701 细胞 DNA 均未扩出相应产物(图 3).质粒 pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 转染细胞中 HCV NS3 蛋白表达利用 S-P 免疫组化方法检测质粒 pRcHCNS3-5',pRcHCNS3-3' 及 pRcCMV 转染细胞中 HCV NS3 蛋白的表达.用 PBS 缓冲液分别代替一抗或二抗作空白对照;用空白质粒转染细胞作阴性对照;未转染细胞作空白对照.

1.1.1 转染细胞生物学行为的观察 (1)生长曲线的测定:未转染细胞和转染细胞( $6 \times 10^4$ )接种于 24 孔培养板,每隔 24 h 消化计数,每次每组计数 3 孔,取均值,共检测 7 d,绘制生长曲线并计算出细胞的倍增时间.实验重复 3 次.(2)停泊非依赖性生长实验:未转染细胞和转染细胞以  $2 \times 10^3$  /L 的密度接种于 3.5 g/L 的顶层琼脂中,底层琼脂浓度为 7 g/L.连续培养 4 wk,计数 >50 细胞的克隆数,求出克隆形成率(克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数  $\times 100\%$ ).实验重复 3 次.

1.1.2 Western blot 检测 MAPK 表达及其活性 未转染和转染得到稳定克隆的 QSG7701 细胞,胰酶消化后按  $5 \times 10^5$  细胞 / 孔接种于 6 孔板中培养 24 h,加无血清培养基饥饿 24 h 使细胞生长同步化,加含 100 mL/L FCS 培养基刺激细胞生长.5 h 后用冰预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,每孔细胞直接裂解于样品缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl,20 g/L SDS,100 mL/L glycerol,50 mmol/L DTT,1 g/L bromophenol blue)80  $\mu$ L,超声破碎 5-7 s,95-100  $^{\circ}$ C 煮 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清分装,-70  $^{\circ}$ C 储存备用.取 20  $\mu$ L 于 100 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,转至硝酸纤维素膜上,膜于 50 g/L 脱脂奶粉中封闭 3 h,然后和抗磷酸化 MAPK 抗体(1:1 000 稀释于脱脂奶粉中)于 4  $^{\circ}$ C 反应过夜,1g/L 吐温 20 的 TBS 洗 3 次,加入抗小鼠 IgG+HRP 室温孵育 1h.ECL 化学发光剂(Santa Cruz)检测阳性信号.检测完磷酸化 MAPK 的膜在洗脱液(100 mmol/L  $\beta$ -ME,20 g/L SDS,62.5 mmol/L Tris-HCl,pH6.7)中 50  $^{\circ}$ C 洗脱 30 min,然后用非磷酸化的 MAPK 单克隆抗体按上述程序检测非磷酸化的 MAPK.将所得 X 光片上的信号条带进行灰度扫描,计算其积分光密度值.实验重复 3 次.

统计学处理 采用 F 检验和 t 检验.

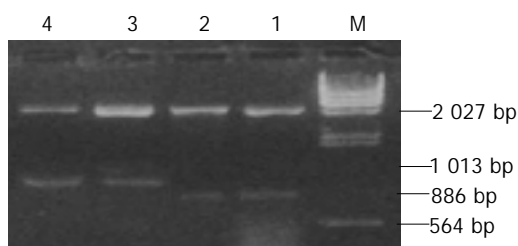
## 2 结果

2.1 质粒 pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 转染细胞中 HCV NS3 蛋白的表达 免疫组化检测显示 pRcHCNS3-3' 和 pRcHCNS3-5' 转染的细胞均呈 HCV NS3 蛋白阳性,阳性信号位于细胞质.空白对照组和阴性对照组均阴性;阳性对照组阳性(图 4)

2.2 转染细胞生物学行为的观察 对四种细胞分别测定生长曲线(图 5),并得到其倍增时间.未转染细胞为 28 h,pRcCMV 为 26 h,pRcHCNS3-3' 为 24 h,pRcHCNS3-5'

为 12 h. 后者的生长速度明显增快. pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3', pRcCMV 转染细胞及正常细胞的克隆形成率分别为 33%、1.33%、1.46%、1.11%. pRcHCNS3-5' 转染细胞形成的克隆明显高于其他三种细胞 ( $P < 0.01$ ).

2.3 质粒转染对 QSG7701 细胞 MAPK 的激活作用  
pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3', pRcCMV 质粒转染细胞和未转染细胞的 MAPK 磷酸化经 Western blot 检测其值分别为  $8858 \pm 877$ ,  $5612 \pm 656$ ,  $2212 \pm 245$  和  $989 \pm 188$ , 前者显著大于后三者 ( $P < 0.01$ ), 而 MAPK 总蛋白的表达各组没有差异 ( $P > 0.05$ ). pRcHCNS3-5' 具有促进 MAPK 磷酸化的作用 (图 6).



M: DNA 分子质量标准 (DNA/Hind III).  
1, 2: pRcHCNS3-5'; 3, 4: pRcHCNS3-3'.  
图 1 pRcHCNS3-5' 及 pRcHCNS3-3' 酶切产物.

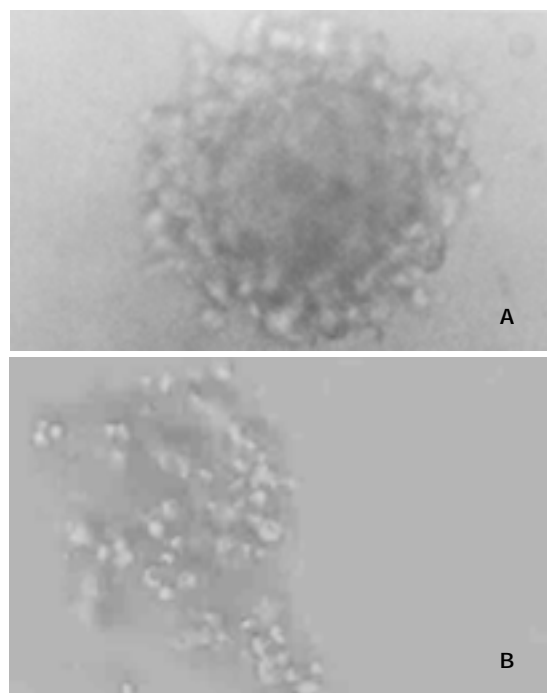
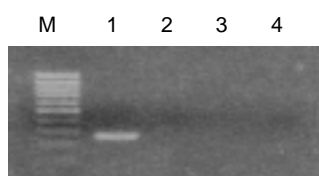


图 2 质粒 pRcHCNS3-5' (a) 和 pRcHCNS3-3' (b) 转染 QSG7701 细胞所形成的软琼脂克隆.



M: 100 bp DNA 分子质量标准. 1: pRcHCNS3-5'; 2: pRcHCNS3-3'; 3: pRcCMV; 4 为正常 QSG7701 细胞.  
图 3 pRcHCNS3-5' 和 pRcHCNS3-3' 及 pRcCMV 转染细胞基因组 DNA PCR 产物.

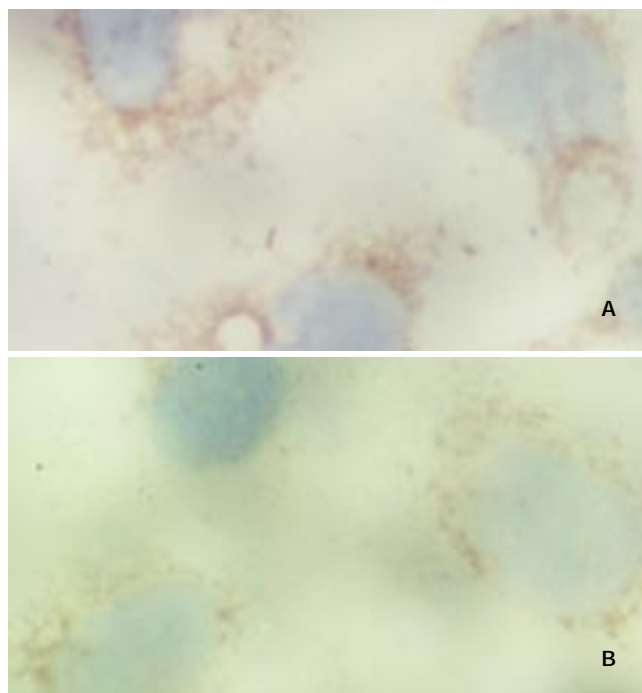


图 4 pRcHCNS3-5' 转染细胞 (a) 和 pRcHCNS3-3' 转染细胞 (b) 均呈 HCV NS3 蛋白阳性, 阳性信号位于细胞质. SP 法

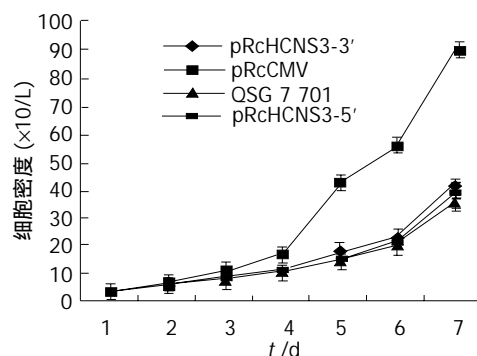
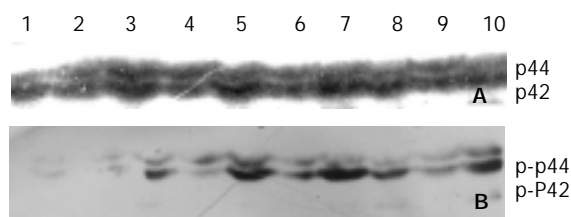


图 5 转染和未转染细胞生长曲线.



1, 2: 未转染细胞; 3, 4: pRcCMV; 5, 6, 7: pRcHCNS3-5' 转染细胞; 8, 9, 10: pRcHCNS3-3' 转染细胞.

图 6 A: pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3', pRcCMV 质粒转染细胞及未转染 QSG7701 细胞在血清刺激下非磷酸化 MAPK 的表达; B: pRcHCNS3-5', pRcHCNS3-3', pRcCMV 质粒转染细胞及未转染 QSG7701 细胞对血清刺激的 MAPK 磷酸化的影响.

### 3 讨论

QSG7701 是一种永生化的正常人肝细胞. 我们利用真核表达质粒 pRcHCNS3-5' 和 pRcHCNS3-3' 转染该细胞系, 并在其强大的启动子 SV40 和 CMV 作用下成功地表达筛选标志和目的基因, 分别获得 9 个 pRcHCNS3-5' 阳性克隆和 8 个 pRcHCNS3-3' 阳性克隆, 经 PCR 和免疫组化证实, 目的基因在 QSG7701 细胞中得到稳定表达. 我们首次采用人肝细胞作为 HCV NS3 转染的受体细胞

研究 HCV 的致癌性<sup>[10,11]</sup>,并获得满意结果,这为研究 HCV NS3 的致癌机制建立了 HCV NS3 蛋白高度表达的细胞模型。HCV 是一种正链 RNA 病毒,无逆转录酶活性,不能以“病毒基因组插入”方式致癌,普遍推测 HCV 可能是通过其表达的蛋白质参与癌变<sup>[12-20]</sup>。HCV NS3 蛋白是一种多功能蛋白,定位于细胞质,氨基端表现为蛋白酶,羧基端为螺旋酶<sup>[21,22]</sup>。我们发现表达 HCV NS3 蛋白 N 端多肽的 QSG7701 细胞的倍增明显时间缩短,克隆形成率增高,停泊非依赖性生长能力明显增强,在一定程度上表现出肿瘤细胞的特性;而表达 HCV NS3 蛋白 C 端多肽细胞,阴性和空白对照组无明显差异。表明 HCV NS3 蛋白 N 端多肽的蛋白酶功能有转化细胞表型的作用。

HCV NS3 蛋白在分裂、加工病毒及其宿主细胞蛋白的过程中,可能导致癌基因和信号转导因子的激活<sup>[2,4,5]</sup>。Ras-Raf-MAPK 信号转导通路是与细胞生长和增生密切相关的主要通路,MAPK 以磷酸化的方式激活,其活性持续增高是细胞转化和癌变的关键<sup>[23-26]</sup>。本资料显示 HCV NS3 蛋白 N 端多肽能明显上调 MAPK 磷酸化,对总 MAPK 表达无影响,且细胞呈现转化表型,提示 HCV NS3 蛋白可能是通过激活 MAPK 信号转导通路促进细胞转化。HCV NS3 蛋白上调 MAPK 磷酸化的具体机制尚不清楚,但有关 HCV NS3 蛋白干扰蛋白磷酸化,抑制 cAMP 依赖 PKA 信号转导途径的已有报道<sup>[4]</sup>。在 Ras-Raf-MAPK 信号通路中,Ras 和 Raf 间有特异性的结合位点,对 Raf 的浆膜定位和活化十分重要。PKA 通过对 Raf-N 末端丝氨酸 43 磷酸化,在 N 末端形成帽状结构覆盖在 Ras 与 Raf 的作用位点上,从而阻断 Ras 对 Raf 的激活<sup>[27-36]</sup>。HCV NS3 蛋白 1 487-1 500 氨基酸存在一个富含精氨酸的序列,该序列与 PKA R 亚基的底物识别位点高度同源,作为识别信号介导 PKA C 亚基与 HCV NS3 蛋白结合,导致了 PKA 失活,从而推测 HCV NS3 蛋白通过抑制 PKA 的负调控作用,激活 Ras-Raf-MAPK 信号转导通路,导致细胞增生和转化。

致谢 日本 Kanazawa 医科大学 Takegami 教授馈赠真核细胞表达质粒。

#### 4 参考文献

- Du MX, Johnson RB, Sun XL, Staschke KA, Colacino J, Wang QM. Comparative characterization of two DEAD-box RNA helicases in superfamily II: human translation-initiation factor 4A and hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) helicase. *Biochem J* 2002;363:147-155
- Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- van der Most RG, Harrington LE, Giuggio V, Mahar PL, Ahmed R. Yellow Fever Virus 17D Envelope and NS3 Proteins Are Major Targets of the Antiviral T Cell Response in Mice. *Virology* 2002;296:117-124
- Aoubala M, Holt J, Clegg RA, Rowlands DJ, Harris M. The inhibition of cAMP-dependent protein kinase by full-length hepatitis C virus NS3/4A complex is due to ATP hydrolysis. *J Gen Virol* 2001;82:1637-1646
- Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
- Zemel R, Gerech S, Greif H, Bachmatove L, Birk Y, Golan-Goldhirsh A, Kunin M, Berdichevsky Y, Benhar I, Tur-Kaspa R. Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. *J Viral Hepat* 2001;8:96-102
- Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- Du JH, Cha WZ. The research situation of relationship between HCV and HCC. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:176
- Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- Zhu FL, Lu HY, Li Z, Qi ZT. Cloning and expression of NS3 cDNA fragment of HCV genome of Hebei isolate in E. coli. *World J Gastroenterol* 1998;4:165-168
- Woitars RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566
- Levin MK, Patel SS. Helicase from hepatitis C virus: Energetics of DNA binding. *J Biol Chem* 2002;28
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
- Li J, Chen YF, Wang WL, Lin SG. Translocated expression of HCV core protein inhibits apoptosis in the tissue of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:579-582
- Dai YM, Shou ZP, Ni CR, Wang NJ, Zhang SP. Localization of HCV RNA and capsid protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:136-137
- Caselmann WH, Serwe M, Lehmann T, Ludwig J, Sproat BS, Engels JW. Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:626-629
- Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
- Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002;8:499-504
- Tessmann K, Erhardt A, Haussinger D, Heintges T. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods* 2002;103:75-88
- Ingallinella P, Fattori D, Altamura S, Steinkuhler C, Koch U, Cicero D, Bazzo R, Cortese R, Bianchi E, Pessi A. Prime site binding inhibitors of a serine protease: NS3/4A of hepatitis C virus. *Biochemistry* 2002;41:5483-5492
- Singh RP, Tyagi AK, Zhao J, Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 2002;23:499-510
- Kwon YW, Ueda S, Ueno M, Yodoi J, Masutani H. Mechanism of p53-dependent apoptosis induced by 3-methylcholanthrene: involvement of p53 phosphorylation and p38 MAPK. *J Biol Chem* 2002;277:1837-1844
- Rivedal E, Opsahl H. Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells.

- Carcinogenesis* 2001;22:1543-1550
- 26 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 27 Borowski P, Kuhl R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 1999; 13:61-69
- 28 Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol* 1999;144: 687-701
- 29 Borowski P, zur Wiesch JS, Resch K, Feucht H, Laufs R, Schmitz H. Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 1999; 274:30722-30728
- 30 Borowski P, Oehlmann K, Heiland M, Laufs R. Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Virol* 1997; 71:2838-2843
- 31 Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* 2002;22:3237-3246
- 32 Soh JW, Lee EH, Prywes R, Weinstein IB. Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol* 1999;19:1313-1324
- 33 Lo LW, Cheng JJ, Chiu JJ, Wung BS, Liu YC, Wang DL. Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKC $\alpha$ -mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J Cell Physiol* 2001;188:304-312
- 34 Yan F, Polk DB. Kinase suppressor of ras is necessary for tumor necrosis factor  $\alpha$  activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase in intestinal epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:963-969
- 35 Hekman M, Hamm H, Villar AV, Bader B, Kuhlmann J, Nickel J, Rapp UR. Associations of B- and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine and lipid second messengers: Preferential binding of Raf to artificial lipid Rafts. *J Biol Chem* 2002;277:24090-24102
- 36 Coles LC, Shaw PE. PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* 2002;21:2236-2244

## WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(*Index Medicus* / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上供国际和国内消化病学专家免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

# 基因芯片技术检测 HBV HCV 及 HBV YMDD 变异株

李 刚, 舒 欣, 马会慧, 陈 伟, 陈文思, 陈 青, 江元森, 姚集鲁

李刚,舒欣,马会慧,陈伟,陈文思,陈青,江元森,姚集鲁,中山大学附属第三医院传染病学 广东省广州市 510630

李刚,男,1964-03-11生,广东省梅州市人,汉族,传染病学教授,主任医师,硕士生导师.1987年中山医科大学毕业,1995年获得博士学位,1998年到英国进修1年.现从事病毒性传染病的研究.

广东省科技攻关项目资助, No.2km05302s

项目负责人:李刚,510630,广东省广州市石牌岗顶,中山大学附属第三医院传染病学. ligangzh@public.guangzhou.gd.cn

电话:020-87544614

收稿日期:2002-07-20 接受日期:2002-08-09

## Detection of HBV, HCV and HBV YMDD mutants by DNA microarray

Gang Li, Xin Shu, Hui-Hui Ma, Wei Chen, Wen-Si Chen, Qing Chen, Yuan-Sen Jiang, Ji-Lu Yao

Gang Li, Xin Shu, Hui-Hui Ma, Wei Chen, Wen-Si Chen, Qing Chen, Yuan-Sen Jiang, Ji-Lu Yao, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou, 510630, Guangdong Province, China

Supported by the Key Project from the Department of Science and Technology of Guangdong Province, No. 2km05302s

Correspondence to: Gang Li, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Zhongshan University, Gangding, Shipai, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. ligangzh@public.guangzhou.gd.cn

Received: 2002-07-20 Accepted: 2002-08-09

## Abstract

AIM: To investigate the effect of DNA microarray in detection of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and HBV YMDD mutants.

METHODS: HBV and HCV in 40 serum samples were detected by mixed microarray and quantitative determination method as well; 20 serum samples from patients with hepatitis B treated with lamivudine were detected by microarray loaded HBV YMDD mutants gene, and were simultaneously tested with mismatched PCR and DNA sequencing for comparison.

RESULTS: The coincident rate of mixed microarray and quantitative determination of HBV DNA was 85 % (34/40). The detectable rate of HBV by mixed microarray was 83 % (19/23); 2 of 17 samples showed false positive reaction. The coincident rate of mixed microarray and HCV RNA quantitative determination was 85 % (34/40). The detectable rate of HCV by mixed microarray was 58 % (7/12). One of 28 samples showed false positive reaction. The coincident rate of HBV YMDD mutants microarray and mismatched PCR was 70 % (14/20). Mixed infection of wild and mutant HBV or different mutants were detected by microarray.

CONCLUSION: Mixed microarray has high sensitivity and low non-specificity in detection of HBV, but has lower sensitivity and higher specificity in detection of HCV. Detection of HBV YMDD

mutants and mixed infection with microarray had higher sensitivity and specificity.

Li G, Shu X, Ma HH, Chen W, Chen WS, Chen Q, Jiang YS, Yao JL. Detection of HBV, HCV and HBV YMDD mutants by DNA microarray. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):178-181

## 摘要

目的: 探讨基因芯片技术在乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)及HBV YMDD变异株检测中的应用。

方法: 采用HBV、HCV联合基因芯片检测40份血清标本,并与HBV、HCV基因定量检测方法比较;采用HBV YMDD变异株芯片检测20份血清标本,并与错配PCR及DNA序列测定方法比较。

结果: HBV、HCV联合基因芯片与HBV DNA定量检测的符合率为85 % (34/40), HBV检出率为83 % (19/23), 假阳性率为12 % (2/17); 与HCV RNA定量检测的符合率为85 % (34/40), HCV检出率为58 % (7/12), 假阳性率为4 % (1/28)。HBV YMDD变异株芯片与本室设计的错配PCR符合率为70 % (14/20), 5份芯片检测的标本与DNA序列测定结果一致,该芯片尚可检测出不同病毒体或变异体的混合感染。

结论: HBV、HCV联合基因芯片对HBV的检测有较高的敏感性,但存在一定程度的非特异性;对HCV的检测敏感性偏低,但特异性较高。HBV YMDD变异株芯片敏感性和特异性均较高,同时能检测出病毒变异体的共生现象。

李刚,舒欣,马会慧,陈伟,陈文思,陈青,江元森,姚集鲁. 基因芯片技术检测HBV HCV及HBV YMDD变异株. 世界华人消化杂志 2003;11(2):178-181

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/178.htm>

## 0 引言

微阵列(microarray)亦称为生物芯片(biochip),其中用于检测基因的生物芯片称为基因芯片(genechip, Affymetrix公司注册商标)。芯片是一种融电子学、生物学、分子生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术。具有高通量,自动化程度高,系统化等特点<sup>[1-6]</sup>。目前,该技术已应用于药物筛选,基因表达谱测定,多态性分析,新基因鉴定,测序,临床检测等领域的研究<sup>[7-23]</sup>。HBV和HCV是引起慢性肝炎的最主要原因,这两种病毒基因及其变异株的检测对于临床诊断,治疗方案选择及药物疗效评估有重要价值<sup>[24-28]</sup>。本文采用基因芯片

技术检测 HBV, HCV 基因及 HBV YMDD 变异株, 并与其他检测方法进行比较, 以探讨该法临床应用的可行性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 血清标本 60 例采自广州中山大学附属第三医院传染病科 1999-10/2001-09 门诊和住院患者, -30 保存备用。患者年龄 14-72 (平均 35.1) 岁。其中 40 份为乙、丙型肝炎基因芯片检测所用标本, 男 25 例, 女 15 例。20 份为 HBV YMDD 变异株检测所用标本, 男 16 例, 女 4 例, 均为拉米夫定(贺普丁)治疗(100 mg/d)超过 1 a 的病例。

**1.2 方法** 病例初筛: HBsAg, HBeAg, 抗 HBs, 抗 HBe, 及抗 HBc 采用酶免疫试验 (EIA) 法(美国 Abbott 诊断试剂), 抗 HCV IgM, 抗 HCV IgG 采用 ELISA 法(沈阳惠民试剂公司), 实验操作按试剂盒说明。HBV DNA, HCV RNA 定量检测: 采用荧光定量 PCR 方法 设备为 GeneAmp 5700 Sequence Detection System (applied biosystems 公司), 试剂购自广州中山大学达安基因诊断中心。按说明书进行操作。错配 PCR 检测 HBV YMDD 变异株: 所用引物由课题组设计, 序列见表 1。取待检血清 50  $\mu$ L, 加入裂解液 5  $\mu$ L (含 EDTA 和 25 mmol/L  $MgCl_2$ ), 在 98  $^{\circ}C$  变性 15 min, 离心取上清 5  $\mu$ L 进行 PCR 扩增, 第 1 次扩增用外引物 P24, P26, 第 2 次扩增正链内引物为 P25, 负链内引物分别用 YMDD, YVDD, YIDD 特异的引物 P27, P28, P30。反应总体积为 50  $\mu$ L, 含 dNTP (2.5 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 (2 U), 在 94  $^{\circ}C$  30 s, 57  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  1 min, 30 个循环。第 2 次扩增时退火温度根据引物  $T_m$  值进行调整, 扩增产物 166 bp, 取 10  $\mu$ L 在 20g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察结果。DNA 序列测定: 用引物 P25, P26 对 5 份标本进行扩增, 反应条件同上, 获得扩增产物 249 bp, 电泳后采用胶纯化 DNA 方法, 用 QIA Quick Gel Extraction Kit 纯化, 按说明书操作。将纯化 PCR 产物直接测序, 经双脱氧链末端终止法进行正反方向测序, 在 ABI373 全自动测序仪上进行, 测序工作由北京赛百盛公司完成。基因芯片检测: 芯片制备 由上海博华基因芯片技术有限公司制备, 包括迈科锐 HBV、HCV 联合基因检测芯片和 HBV YMDD (拉米夫定耐药基因) 检测芯片。血清核酸扩增 取待检测血清 10  $\mu$ L, 采用常规酚、氯仿、异戊醇方法抽取核酸, 异丙醇沉淀。反转录及 PCR 扩增 反转录反应体积 15  $\mu$ L, 含抽提核酸, dNTP, 反转录酶, 42  $^{\circ}C$  30 min, 取 5  $\mu$ L 用于 PCR 扩增, 共 35 个循环, 再吸取 PCR 产物 2  $\mu$ L, 加入 CY5 标记的 dUTP, 进行 PCR 标记, 共 35 个循环。杂交 标记的产物沉淀后加入杂交试剂, 并与芯片分别于 95  $^{\circ}C$  变性 5 min, 冷却后将杂交液 10  $\mu$ L 滴于芯片的上样区, 封闭后在湿盒内 42  $^{\circ}C$  杂交 1.5 h, 然后用 0.1  $\times$  SSC 洗涤 10 min, 双蒸水冲洗并避光晾干。扫描及信号分析 将杂交后的芯片插入 ScanArray 300 扫描仪(美国)中进行扫描, 扫描强度 55-60%, 获得的图片用 GenArray-Check 软件

分析各点的信号状况, 结果根据信号强度及比值作出判断(图 1, 表 2)。

表 1 错配 PCR 检测 HBV YMDD 变异株所用引物

编号	极性	位置	序列
p24	+	457-476	AGGAAGCTTGCCCGTTTGTC(外正)
p25	+	594-613	CTAAGCTTGATTCCCATCC(内正)
p26	-	843-824	TAGAATTCAAATGTATACCC(外负)
p27	-	760-741	CCCAATACCACATCATCCAT(YMDD)
p28	-	760-741	CCCAATACCACATCATCCAC(YVDD)
p30	-	760-743	CCCAATACCACATCATCA(YIDD)

表 2 基因芯片扫描信号强度(1 例 YVDD 共生 + L528M 共生的结果)

	平均值	比值	结果
YVDD 突变点	13 795.16	1.07	共生
单点差异对照	2782.76		
单点差异对照	5 002.95		
YMDD 野生点	12 886.75		
A548V 突变点	629.18	0.64	野生
单点差异对照	580.87		
单点差异对照	546.46		
A548V 野生点	981.00		
L528M 突变点	5 383.92	0.99	共生
单点差异对照	729.66		
L528M 野生点	1 319.74		
L528M 野生点	5 440.26		
YIDD 突变点	2 264.35	0.15	野生
单点差异对照	870.77		
单点差异对照	1 313.16		
YMDD 野生点	14 675.54		

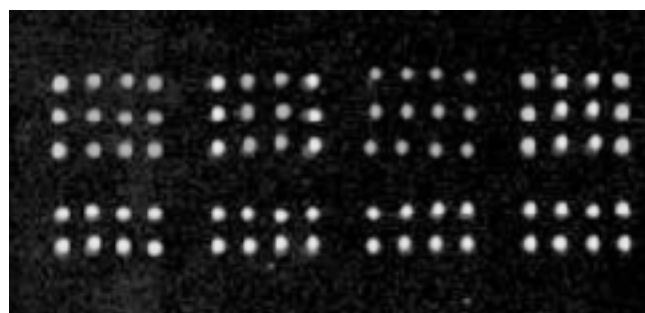


图 1 基因芯片扫描图。

## 2 结果

**2.1 HBV, HCV 联合基因芯片检测** 在 40 份血清标本中, 通过检测 HBsAg 及 HBV DNA 定量证实 23 份为 HBV 感染者, 通过检测抗 HCV 及 HCV RNA 定量证实 12 份为 HCV 感染者, 其余 5 份为阴性对照。基因芯片检测结果与上述标本一致的有 34 份, 符合率为 85 % (34/40)。在 23 份 HBV 感染者中, 芯片检测 19 份为 HBV 阳性, 阳性率

为83%(19/23);在其余17份HBV阴性标本中,有2例为阳性(12%)。在12例HCV感染者中,芯片检测7例为HCV阳性,阳性率58%(7/12);28份HCV阴性标本中,1份为阴性(1/28)。

**2.2 HBV YMDD 变异株基因芯片检测** 在20份拉米夫定治疗1a后的血清标本中,有3份为HBV DNA定量检测阴性,用错配PCR和芯片检测亦为阴性。另17份HBV DNA定量检测阳性标本中,错配PCR检测发现8份为YMDD野生株,8份YVDD变异株,1份YIDD变异株;芯片检测发现5例为YMDD野生株,6例为YVDD变异株,1例YIDD变异株,2例为YVDD变异株与野生株共生,1例为YVDD变异株与YIDD变异株共生,其余2例为阴性。其中5份标本用DMA序列测定法检测,结果与芯片检测基本一致,仅1例DNA序列测定为YIDD变异株,而芯片检测为YIDD变异株与YVDD变异株共生。5例序列测定标本中,1例与错配PCR不符。芯片检测与错配PCR结果完全一致的有8例(8/17),部分一致的有3例(3/17),表现为错配PCR检测为单一病毒株,芯片检测为两种病毒株共生。

### 3 讨论

目前,临床上常用的病毒性肝炎特异性病原检测方法主要有ELISA法检测病毒抗原或抗体,以及PCR法定性或定量检测病毒基因。就确定病毒感染而言,抗原抗体检测仍然是首选方法,而病毒基因的检测对于了解患者的病毒载量,病毒复制状况,传染性大小,抗病毒药物疗效等有较大意义<sup>[29-33]</sup>。上述两种方法每次只能检测一种病原体或一种基因,也难以检测基因的变异,特别是多种变异体存在的情况下。基因芯片则可弥补上述不足,它具有高通量的特点,一个芯片可同时检测多个病原体或变异体<sup>[34]</sup>,而病毒性肝炎是由多种肝炎病毒引起的常见病,HBV和HCV是慢性肝炎的主要病原体,临床上很多情况下对两种病毒的基因都要进行检测。另外,乙型肝炎病毒基因容易发生变异,特别是拉米夫定治疗后有部分患者出现病毒变异,而且变异株可以不止一种,变异株的出现表明病毒出现了耐药。在上述情况下,基因芯片可同时检测两种以上病原体或变异体的优势可凸现出来。我们用HBV、HCV联合基因芯片对40份标本进行检测,并与HBV DNA定量检测作了比较,二者的符合率为85%(34/40),在23份HBsAg阳性及HBV DNA定量阳性者中,芯片检测出率为83(19/23)。在17份HBsAg阴性及HBV DNA定量阴性标本中,有2例芯片检测阳性,假阳性率12%。在HCV检测方面,芯片与抗HCV及HCV RNA定量检测的符合率亦为85%(34/40),但检出率偏低,为58%(7/12),同时假阳性率也较低,仅为4%(1/28)。从上述数据看出,HBV、HCV联合基因芯片对HBV检测有较高的敏感性,但存在一定的非特异性;对HCV的敏感性偏低,但特异性较高。芯片对HCV检测敏感性偏低可能与血标

本中病毒量低有关。在HBV YMDD变异株检测方面,芯片检测结果与DNA序列测定一致。我们仅对5例进行了序列测定,由于标本数偏少,得出的结论须待更大量的标本来证实。芯片检测与本室设计的错配PCR法符合率为70%(14/20),而芯片可检测出3例不同病毒株混合感染的共生现象。由此可见,芯片检测HBV YMDD变异株的敏感性和特异性均较高,且能检出病毒变异体的共生状况。

基因芯片检测的生物学基础是核酸杂交<sup>[35,36]</sup>,但在实际操作中,单纯采用核酸杂交进行检测,其信号强度不足,导致敏感性低。在目前阶段,样品扩增,如通过PCR,仍是其必不可少的一个步骤,是提高敏感性的措施,但亦导致其步骤的复杂化及PCR带来的假阴性或假阳性。因此,从多个方面进行优化,包括标记方式的改进,增强信号强度,提高信号检测仪器的灵敏度,杂交温度的控制等是今后基因芯片能否在临床广泛应用的关键<sup>[37-39]</sup>。本结果显示,基因芯片在HBV、HCV基因检测中是一种较为有效的手段,在同时检测HBV、HCV两种病毒及病毒变异株中有其独到的优势,临床应用中可作为其他检测方法的补充,在分析结果时须参考其他临床资料再作出判断。

### 4 参考文献

- 1 Ohyama H, Zhang X, Kohno Y, Alevizos I, Posner M, Wong DT, Todd R. Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization. *Biotechniques* 2000;29:530-536
- 2 Zhang Y, Price BD, Tetradis S, Chakrabarti S, Maulik G, Makrigiorgos GM. Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E66
- 3 Barone AD, Beecher JE, Bury PA, Chen C, Doede T, Fidanza JA, McGall GH. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosid Nucleotid Nucleic Acids* 2001;20:525-531
- 4 Hsiao LL, Jensen RV, Yoshida T, Clark KE, Blumenstock JE, Gullans SR. Correcting for signal saturation errors in the analysis of microarray data. *Biotechniques* 2002;32:330-332
- 5 Chu TM, Weir B, Wolfinger R. A systematic statistical linear modeling approach to oligonucleotide array experiments. *Math Biosci* 2002;176:35-51
- 6 Yoshioka K, Matsuda F, Takakura K, Noda Y, Imakawa K, Sakai S. Determination of genes involved in the process of implantation: application of GeneChip to scan 6500 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:531-538
- 7 Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3022-3028
- 8 Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- 9 Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001;61:2129-2137
- 10 Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 2001;80:1-11
- 11 Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J, Liu F, Huang QH, Cheng ZH, Li NG, Du JJ, Hu W, Shen KT, Lu G, Fu G, Zhong M, Xu SH, Gu WY, Huang

- W, Zhao XT, Hu GX, Gu JR, Chen Z, Han ZG. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:15089-15094
- 12 Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Oлару A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 2002;21:4855-4862
  - 13 Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398-2407
  - 14 Bustin SA, Dorudi S. The value of microarray techniques for quantitative gene profiling in molecular diagnostics. *Trends Mol Med* 2002;8:269-272
  - 15 Shoemaker DD, Linsley PS. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:334-337
  - 16 Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001;20:3674-3682
  - 17 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
  - 18 Wen WH, Bernstein L, Lescallett J, Beazer-Barclay Y, Sullivan-Halley J, White M, Press MF. Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* 2000;60:2716-2722
  - 19 Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7382-7387
  - 20 Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:869-876
  - 21 Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T, Olesen SH, Andersen LD, Cordon-Cardo C, Orntoft TF. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000;46:1555-1561
  - 22 Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics* 2000;68:136-143
  - 23 张建中, 黄英武, 刘冬梅, 杨利桃, 韩瑞刚, 王晋芬, 岳茂兴. 组织芯片技术的建立及其在大肠癌的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:157-160
  - 24 王平忠, 聂青和, 张中伟, 白宪光. 丙型肝炎病毒感染的不同人群 HCV RNA 定量研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1247-1250
  - 25 Meier V, Mihm S, Wietzke Braun P, Ramadori G. HCV RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-234
  - 26 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
  - 27 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin-a1 versus interferon in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
  - 28 王平忠, 张中伟, 周永兴, 白雪帆. 定量 PCR 检测慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA 及其意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:755-758
  - 29 兰林, 王宇明. 构象敏感凝胶电泳快速检测 HBV 准种序列异质的方法. *世界华人消化杂志* 2002;10:411-414
  - 30 Xiao LY, Yan XI, Mi MR, Han FC, Hou Y. Preliminary study of a dot immunogold filtration assay for rapid detection of anti-HCV IgG. *World J Gastroenterol* 1999;5:349-350
  - 31 Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000; 6:800-804
  - 32 Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki MR, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
  - 33 Zhang SL, Han XB, Yue YF. Relationship between HBV viremia level of pregnant women and intrauterine infection: nested PCR for detection of HBV DNA. *World J Gastroenterol* 1998;4:61-63
  - 34 Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res* 2002;9:59-62
  - 35 Simon R, Radmacher MD, Dobbin K. Design of studies using DNA microarrays. *Genet Epidemiol* 2002;23:21-36
  - 36 Fidanza JA, McGall GH. High-density nucleoside analog probe arrays for enhanced hybridization. *Nucleosid Nucleotid* 1999;18:1293-1295
  - 37 Tran PH, Peiffer DA, Shin Y, Meek LM, Brody JP, Cho KW. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e54
  - 38 Efron B, Tibshirani R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 2002;23:70-86
  - 39 Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e48

# 慢型丙型肝炎患者干扰素治疗前后HCV HVR1准种的动态变化

张琳,赵桂珍,李颖,石理兰

张琳,赵桂珍,李颖,石理兰,中国医科大学第二临床学院传染科  
辽宁省沈阳市 110003

张琳,女,1967-06-12生,辽宁省沈阳市人,汉族.1990年大连医学院本科毕业,1997年中国医科大学硕士研究生毕业,讲师.主要从事病毒性肝炎治疗方面的研究.

项目负责人:张琳,110003,辽宁省沈阳市,中国医科大学第二临床学院传染科.  
收稿日期:2002-06-08 接受日期:2002-07-05

## Dynamic changes of HVR1 quasispecies in chronic hepatitis C after IFN therapy

Lin Zhang,Gui-Zhen Zhao,Ying Li,Li-Lan Shi

Lin Zhang,Gui-Zhen Zhao,Ying Li, Li-Lan Shi,Department of Infectious Disease,The Second Clinical College,China Medical University, Shenyang 110003,Liao Province,China

Correspondence to: Dr.Lin Zhang,Department of Infectious Disease, The Second Clinical College,China Medical University,36 Sanhao Street,Shenyang 110003,Liaoning Province,China.

Received:2002-06-08 Accepted:2002-07-05

## Abstract

**AIM:**To evaluate the correlation between the complexity of HCV HVR1 quasi-species and their response to IFN therapy in patients with chronic hepatitis C.

**METHODS:**Twenty patients with chronic hepatitis C received IFN therapy (3mu/day, three times/week for 24 weeks). Serum quasispecies complexity of HVR1 was analyzed by polymerase chain reaction mediated singl-strand conformation polymorphism (SSCP) before and 3 months,6 months post-therapy, respectively.

**RESULTS:**Of 20 patients,7 had low level of complexity (SSCP bands =3),13 had high level of complexity (SSCP bands >3). The rate of HCV RNA negative in low level complexity group was higher than that in high level complexity group. Patients with low level of complexity prior to therapy had good response to IFN;Serum HCV RNA in some patients did not convert to negative after IFN therapy,however, the number of SSCP bands decreased gradually.

**CONCLUSION:**HCV HVR1 quasi-species complexity is a predictive factor in response to IFN therapy, a statistically significant correlation between high level of complexity of HCV HVR1 quasi-species and lacking of response to IFN therapy in patients with chronic hepatitis C was found.

Zhang L, Zhao GZ, Li Y, Shi LL. Dynamic changes of HVR1 quasispecies in chronic hepatitis C after IFN therapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(2):182-184

## 摘要

**目的:**探讨感染HCV1b型慢型丙型肝炎患者HCV HVR1区

准种的复杂性与干扰素疗效的关系,以便对干扰素治疗疗效进行预测.

**方法:**应用IFN治疗的慢性丙型肝炎患者共20例,于治疗前、治疗后3 mo、6 mo留取血清,-70℃冻存待测.治疗方案为:干扰素3 mu,3次/wk,肌肉注射,共24 wk. HCV HVR1准种的检测采用单链构象多态性聚合酶链反应法(SSCP法).

**结果:**IFN治疗前,35%(7/20)的患者表现为SSCP低复杂性(SSCP条带数=3),65%(13/20)表现为高复杂性(SSCP条带数>3).治疗3 mo后,4例患者HCV RNA阴转,均发生在低复杂性组,其余大部分患者SSCP条带数减少1-2条带.治疗6 mo时,7例患者HCV RNA阴转,仅2例发生在高复杂性组.治疗结束时13例(65%)无应答患者中,8例患者SSCP条带数均较治疗前减少,2例无变化,1例恢复到治疗前水平,2例较治疗前升高.

**结论:**HCV HVR1区准种的复杂性可以对IFN治疗进行疗效预测,治疗前准种数少者可预测对IFN治疗有较好的应答.

张琳,赵桂珍,李颖,石理兰.慢型丙型肝炎患者干扰素治疗前后HCV HVR1准种的动态变化.世界华人消化杂志2003;11(2):182-184

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/182.htm>

## 0 引言

HCV基因组具有高度的变异性,可以逃避机体的免疫反应,使HCV感染极易慢性化<sup>[1-4]</sup>.尤其在E2/NS1区存在两个高变区(HVR1和HVR2),其中HVR1被认为机体免疫选择部位<sup>[5-8]</sup>,可刺激机体产生免疫反应,而机体产生的免疫压力又促使其产生更多的变异,与HCV持续感染和慢性化密切相关,并给临床治疗带来困难.HCV变异除产生不同的基因型和亚型外,另一重要的特征是在宿主体内以准种的形式存在<sup>[9,10]</sup>.准种即同一株病毒,基因组序列极为相似的病毒群,但一些位点仍存在差异.由于HVR1的高变性,常用其来确定准种的数量<sup>[30]</sup>.近年研究发现,基因型HCV1b型患者HVR1区准种的复杂性(准种数)与干扰素治疗疗效有密切关系,慢性丙型肝炎患者HVR1准种的复杂性程度越高,对IFN无应答的可能性越大<sup>[11-16]</sup>.Sandres et al<sup>[17,18]</sup>则报道HVR1准种的复杂性与IFN疗效无关,不能用于疗效预测.我们对沈阳地区20例HCV1b型慢性丙型肝炎患者进行了IFN治

疗前后 HVR1 准种复杂性的动态观察,以探讨 HCV HVR1 准种的复杂性与干扰素疗效的关系,报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者 20 例均感染 HCV1b 型、HCV RNA 阳性,男 15 例,女 5 例,年龄 23-45 岁。干扰素治疗方案:干扰能 3 mu,3 次 /wk,肌肉注射,疗程 6 mo。疗效判定:治疗结束时,ALT 正常、HCV RNA 阴转为有效。否则为无效。分别于治疗前、后 3 mo、6 mo 留取血清,-70℃ 冻存储用。

1.2 方法 HCV 基因分型采用 C 区型特异性引物 PCR 法(中国公共卫生 1997;13:199-200)。HCV HVR1 准种检测采用 SSCP 法。引物序列根据中国人基因组序列设计(病毒学报 1993;9:114-126),由华美公司合成。外引物 1:5'-CTACTCCGGATCCCACAAGC-3' (核苷酸位置 1 009-1 028);外引物 2:5'-GGGCTCGGAGTGAAGCAATA-3' (核苷酸位置 1 519-1 538)。内引物 1:5'-ATTCCATG GTGGGGAAGTGG-3' (核苷酸位置 1 085-1 104);内引物 2:5'-GCAATACACTGGACCACACA-3' (核苷酸位置 1 504-1 523)。HCV RNA 提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿提取法。血清 50 μL,分别加入异硫氰酸胍 200 μL,氯仿/异戊醇 50 μL,振荡混匀,离心,13 000 r/min,10 min,取水相 100 μL,加等量异丙醇,混匀,离心,13 000 r/min,10 min,弃上清,控干残留液体,加 750 mL/L 乙醇 200 μL 洗涤,离心,13 000 r/min,5 min,弃上清,真空抽干,65℃ 20 min 备用。

HVR1 基因片断 PCR 扩增:逆转录及第一轮 PCR 扩增。10 × buffer 3 μL,dNTP3 μL,MgCl<sub>2</sub> 1.56 μL,Taq 2U,AMV 3U,Rnasin 20U,外引物<sub>1</sub> 20pmol(1 μL),外引物<sub>2</sub> 20pmol(1 μL),水 19 μL,总反应体积 30 μL。37℃ 30 min 逆转录之后进入 PCR 扩增,反应条件为 94℃ 300 s 预变性,94℃ 45 s、50℃ 45 s、72℃ 45 s,共 35 个循环,终延伸 300 s。第二轮 PCR 扩增:取第一轮扩增产物 5 μL,10 × buffer 3 μL,dNTP3 μL,MgCl<sub>2</sub> 1.56 μL,Taq 酶 2U,内引物<sub>1</sub> 20 pmol(1 μL),内引物<sub>2</sub> 20pmol(1 μL),水 15 μL,总反应体积 30 μL。反应条件与第一轮相同。取第二轮扩增产物 5 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,片断大小在 280 bp 左右为阳性结果。

SSCP 检测:取 PCR 产物 10 μL,加变性上样液 10 μL,进行 96℃ 10 min 预变性,取出后立即放入冰浴中,之后进行 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳(300 V,5 h),胶取出后用 100 mL/L 乙醇加 5 g/L 冰乙酸进行固定 20 min,洗涤后用 2 g/L 硝酸银染色 20 min,之后用 15 g/L NaOH 加 4 g/L 甲醛显色,肉眼观察至显带为止,用 100 mL/L 冰乙酸进行终止。将结果存入电脑。

## 2 结果

2.1 IFN 治疗前后 HVR1 准种的动态变化 HCV RNA 阳性的 HCV1b 型慢性丙型肝炎患者 20 例中,7 例(35%)

表现为 SSCP 低复杂性,13 例(65%)为高复杂性,IFN 治疗 3 mo 后,4 例(20%)患者 HCV RNA 阴转,均发生在低复杂性组。其余大部分患者 SSCP 条带数减少 1-2 条带。治疗 6 mo 时,7 例(35%)患者 HCV RNA 阴转,其中仅 2 例发生在高复杂性组。13 例无应答患者中,8 例 SSCP 条带数均有所减少,2 例无变化,1 例恢复到治疗前水平,2 例较治疗前增加(表 1)。

表 1 IFN 治疗前后 HVR1 准种的动态变化

No	治疗前		3 mo		6 mo	
	SSCP 条带数	HCV RNA	SSCP 条带数	HCV RNA	SSCP 条带数	HCV RNA
1	2	+	0	-	0	-
2	4	+	2	+	1	+
3	3	+	1	+	0	-
4	5	+	5	+	5	+
5	4	+	2	+	1	+
6	6	+	5	+	3	+
7	2	+	0	-	0	-
8	3	+	3	+	3	+
9	4	+	3	+	4	+
10	5	+	3	+	2	+
11	4	+	1	+	0	-
12	6	+	3	+	3	+
13	2	+	0	-	0	-
14	4	+	4	+	5	+
15	1	+	0	-	0	-
16	4	+	2	+	0	-
17	4	+	2	+	2	+
18	3	+	1	+	1	+
19	4	+	4	+	5	+
20	5	+	4	+	3	+

2.2 HVR1 准种复杂性与 HCV RNA 阴转率和疗效的关系 治疗结束时,7 例患者 HCV RNA 阴转,5 例(71.4%)发生在低复杂性组,2 例(15.4%)在高复杂性组,二者相比具有显著差异( $P < 0.05$ )。治疗结束时,20 例患者中 7 例(35%)表现为完全应答,13 例(65%)为无应答。有效组与无效组 HVR1 准种数的比较( $2.43 \pm 0.98$  vs  $4.46 \pm 0.88$ ,  $P < 0.01$ )差异非常显著。

## 3 讨论

由于 HCV 基因组的高度变异性<sup>[19-22]</sup>,使 HCV 感染后很难被机体的免疫反应所清除,80% 以上的 HCV 感染者将转变成慢性肝炎,并逐步发展成肝硬化和肝癌<sup>[23-26]</sup>。目前尚无有效的疫苗预防 HCV 感染,IFN 仍是唯一可以清除病毒、改善患者生化和组织学指标的药物。然而,慢性 HCV 感染者对 IFN 的完全应答率仅 10-30%,且副作用大,治疗费用昂贵。因此,选择合适的病例进行治疗,并对疗效进行有效预测,具有重要临床意义。在

影响 IFN 疗效的众多因素中, 1b 型 HCV 感染是导致 IFN 疗效低下的重要因素之一<sup>[27-29]</sup>。我国大部分 HCV 感染者为此种基因型。近年在研究 1b 型 HCV 抵抗 IFN 的机制时发现, HVR1 准种的复杂性与 IFN 疗效有关, 大多数研究表明, HCV HVR1 准种复杂性越高, 对 IFN 无应答的可能性越大。但 Sandres et al 则认为, HVR1 准种的复杂性与 IFN 疗效无关, 不能进行疗效预测。我们的研究结果发现, 治疗前 SSCP 条带 3 组患者 HCV RNA 阴转率为 71.4 %, SSCP 条带 >3 组患者为 15.4 %, 二者相比具有显著差异。且治疗有效组 SSCP 条带数明显少于无效组。表明 HVR1 准种的复杂性确与 IFN 疗效有关, IFN 治疗前 HVR1 准种数较少者可预测对 IFN 有较高的应答率。

一般认为, IFN 治疗 3 mo 时, HCV RNA 仍未阴转或 ALT 仍未降至正常, 则该患者对 IFN 无应答的可能性较大。6 mo 时仍为此种情况则为无效, 应停药。在该组患者的动态观察中发现, 3 mo 时有效率为 25 %, 6 mo 时为 35 %。部分患者虽然治疗结束时 HCV RNA 未阴转, 但 SSCP 条带数较治疗前减少。由于该组患者均未延长治疗时间, 未能观察到延长疗程是否可以提高 IFN 应答率。因此建议今后对治疗结束时无应答者, 但 SSCP 条带数在治疗过程中逐渐减少者, 可适当延长疗程。

在 HCV 准种的检测方法中, 以 SSCP 法最简单易行, 易于临床开展。在此技术中, 对目的基因进行 PCR 扩增后, 产物通过加热变性获得单链 DNA, 并通过电泳进行分析。分离的单链的泳动速度取决于其三维构象。因此众多异质性基因组成的混合体可被分离成不同的条带, 而且条带数即可代表基因序列的复杂程度。尤其核苷酸片断 <300 bp 时, 更适用于此种方法。

总之, 对 HVR1 准种复杂性是否可以预测 IFN 疗效方面, 尚有不同的观点存在, 今后有必要进一步进行大样本研究和进行氨基酸序列测定以证实。

#### 4 参考文献

- Honda M, Kaneko S, Sakai A, Unoura M, Murakami S, Kobayashi K. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 1994;20:1144-1151
- Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999;30:556-561
- Koizumi K, Enomoto N, Kurosaki M, Murakami T, Izumi N, Marumo F, Sato C. Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 1995;22:30-35
- Gonzalez RP, Qian K, Jan Y, Davis GL, Ohno T, Mizokami M, Lau Z. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996;49:242-247
- Shirai M, Arichi T, Nishioka M, Nomura T, Ikeda K, Kawanishi K, Engelhard V, Feinstone S, Berzofsky JA. CTL responses of HLA-A2.1-Transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of human carrying HLA-A2.1. *J Immunol* 1995;154:2733-2742
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15394-15399
- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996;223:409-412
- Allain JP, Zhai W, Shang D, Timmers E, Alexander G. Hypervariable region diversity of hepatitis C virus and humoral response: comparison between patients with or without cirrhosis. *J Med Virol* 1999;59:25-31
- Maetell M, Esteban J, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229
- Polyak SJ, Gerotto M. The molecular basis for responsiveness to anti-viral therapy in hepatitis C. *Form (Genova)* 2000;10:46-58
- Grahovac B, Bingulac-Popovic J, Vucelic B, Hrstic I, Ostojic R, Drazic V, Balija M, Grgicevic D. Hypervariable region 1 of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:905-910
- Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazaki M, Okuda M, Okita K. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 2000;7:36-42
- Moribe T, Hayashi N, Kanazawa Y, Mita E, Fusamoto H, Negi M, Kaneshige T, Igimi H, Kamada T, Uchida K. Hepatitis C viral complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 1995;108:789-795
- Guen BL, Squadrito G, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1250-1254
- Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and response to interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998;54:256-264
- Toyoda H, Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, Kiriya S, Sone Y, Kinoshita M, Hadama T. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. *J Hepatol* 1997;26:6-13
- Polyak SJ, Faulkner G, Carithers RL, Corey L, Greth DR. Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. *J Infect Dis* 1997;175:1101-1107
- Sandres K, Dubois M, Pasquier C. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* 2000;74:661-668
- Brechot C. Hepatitis C virus molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996;41:6s-12s.
- Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-1538
- Simmonds P. Variability of hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:570-583
- Mullan B, Kenny-Walsh E, Collins JK, Shanahan F, Fanning LJ. Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions. *Anal Biochem* 2001;289:137-146
- Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):98-112
- Ambrosch A, Konig W. Characteristics of the hepatitis C virus and viral predictors of therapeutic response. *Med Klin* 1999;94:626-632
- Lunel F, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus. Virological diagnosis. *Pathol Biol* 1995;43:681-690
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 1995;25:75-91
- Mita E, Hayashi N, Hagiwara H, Ueda K, Kazanawa Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Predicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer. *Dig Dis Sci* 1994;39:977-982
- Trepo C. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000;7:250-257
- Gitnick G. Hepatitis C: controversies, strategies and challenges. *Eur J Surg Suppl* 1998;582:65-70
- Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in serum, peripheral blood mononuclear cells and liver. *Hepatology* 1999;29:217-222

# 拉咪呋啉预防乙肝相关性肝硬化肝移植术后乙肝再感染的临床对照研究

卢实春,严律南,李波,文天夫,赵纪春,程南生,刘冲,刘隽,王晓波,李晓东,秦山,赵连三,雷秉均,张秀辉

卢实春,严律南,李波,文天夫,赵纪春,程南生,刘隽,王晓波,李晓东,四川大学华西医院普外科 四川省成都市 610041  
刘冲,秦山,赵连三,雷秉均,四川大学华西医院肝炎研究室 四川省成都市 610041  
张秀辉,四川大学华西医院病理教研室 四川省成都市 610041  
卢实春,男,1962-03-18生,重庆市垫江县人,汉族,1979年重庆医学院本科毕业,1987年华西医科大学硕士研究生毕业,1994年西德 Freiburg 大学博士研究生毕业,教授,主要从事肝胆胰及肝移植的临床及研究工作。  
四川省科技厅资助项目, No. C2005  
项目负责人:卢实春,610041,四川省成都市,四川大学华西医院普外科。  
shichunl@hotmail.com  
电话:028-85422476 传真:028-85423724  
收稿日期:2002-04-11 接受日期:2002-07-10

## Effect of lamivudine against HBV reinfection after liver transplantation

Shi-Chun Lu, Lu-Nan Yan, Bo Li, Tian-Fu Wen, Ji-Chun Zhao, Nan-Sheng Cheng, Chong Liu, Jun Liu, Xiao-Bo Wang, Xiao-Dong Li, Shan Qin, Lian-Shan Zhao, Bin-Jun Lei, Xiu-Hui Zhang

Shi-Chun Lu, Lu-Nan Yan, Bo Li, Tian-Fu Wen, Ji-Chun Zhao, Nan-Sheng Cheng, Jun Liu, Xiao-Bo Wang, Xiao-Dong Li. Department of Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China  
Chong Liu, Shan Qin, Lian-Shan Zhao, Bin-Jun Lei. Viral Hepatitis Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China  
Xiu-Hui Zhang. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China  
Supported by the Science and Technology Department of Sichuan Province, No. C2005  
Correspondence to: Dr. Shi-Chun Lu MD, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. shichunl@hotmail.com  
Received: 2002-04-17 Accepted: 2002-07-10

## Abstract

**AIM:** To assess the prophylactic effect of lamivudine in preventing reinfection of HBV and the dynamic alternations of HBV markers in serum and liver tissue after liver transplantation.

**METHODS:** Twenty five recipients were non-randomly divided into HBV active replicating group (15 cases) and HBV non-active replicating group (10 cases) and control group (3 cases). Lamivudine 100 mg /day was administered to each patient before and after operation, 3 of 10 cases in non-active replicating group failed to take lamivudine on time and thus was grouped as control. The HBV markers in serum and bioptic liver tissues in 25 recipients were evaluated regularly with enzyme-linked radioimmunoassay, HBV DNA fluorescent quantitative assay, immunohistochemistry stain LSAB and digoxin labeled HBV DNA hybridization *in situ*.

**RESULTS:** Serum HBV DNA in 80 % cases with active HBV

replication became negative following 2-week periods of lamivudine treatment prior to liver transplantation. HBsAg in all recipients converted to negative after liver transplantation. HBsAb (9/15), HbcAb (13/15) and HBeAb (11/15) appeared within one week postoperatively, and disappeared gradually within 6 months. Serum HBV DNA was negative; Results of *in situ* hybridization in bioptic liver tissue showed that HBsAg, HBeAg as well as HBV DNA remained negative after treatment of lamivudine. 10 of 15 recipients had got to clinical clearance of HBV, HBV markers were undetectable in both serum and liver biopsy samples between 12 to 44 weeks (average 24 weeks), 1-, 2-year survival rate in this group reached 83 %. Two of 15 subjects (13.3 %) developed allograft HBV reinfection or recurrence of hepatitis in 2 years after the prophylactic treatment of lamivudine. In HBV non-active replicating group, the outcome was similar with that in the active group. The HBV antibody was HBsAb (+, 4/7), HBeAb (+, 6/7), HBeAb (+, 2/7), 3 of 7 recipients achieved HBV clinical clearance in both serum and liver bioptic samples, while in control group, all 3 recipients developed allograft HBV reinfection and recurrent hepatitis in 8, 10 and 12 months post-transplantation, respectively, one of three died from fibrosing cholestatic hepatitis, the other 2 cases recovered after the additional therapy of lamivudine. The overall allograft reinfection rate was 9.1% (2/22) and the overall 1-, 2-year accumulative survival rate was 87% in patients received lamivudine.

**CONCLUSION:** Lamivudine can effectively prevent liver allograft from HBV reinfection in HBV related decompensated liver cirrhosis and even in HBV active replicating recipient.

Lu SC, Yan LN, Li B, Wen TF, Zhao JC, Cheng NS, Liu C, Liu J, Wang XB, Li XD, Qin S, Zhao LS, Lei BJ, Zhang XH. Effect of lamivudine against HBV reinfection after liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(2):185-190

## 摘要

**目的:** 了解乙肝相关性失代偿肝硬化肝移植术后使用拉咪呋啉预防移植后乙肝再感染的疗效及乙肝标志物在血清及肝组织中的动态变化。

**方法:** 用酶联免疫法, 血清HBV DNA荧光定量法、肝穿组织免疫组化LSAB法及HBV DNA原位杂交法定期检测25例受体血清及肝穿组织, 观察肝移植术后HBV标志物在血清及肝组织中的动态变化。本研究设计为前瞻的开放的非随机的临床对照研究。25例被分为乙肝病毒活跃复制(15例)及非活跃复制组(10例)两组, 皆以拉咪呋啉100 mg/d术前后服用预防, 非活跃复制组中有3例未能及时服用拉咪呋啉作为对照组。

结果:在 HBV 活跃复制组,术前口服拉咪呋啶平均 2 wk 能使 80 % 以上的患者血清 HBVDNA 阴转;继续口服,术后表面抗原消失,部分血清乙肝病毒抗体(表面抗体 HBsAb 9/15,核心抗体 HBcAb 13/15 及 HBeAb 11/15)可在术后 1-2 wk 出现,至 6 mo 可逐渐消失;血清中 HBVDNA 荧光定量可一直维持阴转的状态;肝穿组织中 HbsAg, HBcAg 及 HBVDNA 原位杂交可长期维持阴性。10 例乙肝病毒活跃复制受体其 HBV 血清标志物在 12-44 wk 之间完全消失;本组中 2 例(2/15, 13.3 %)在 2 a 时发生拉咪呋啶预防失败而致移植物再感染或乙肝复发;在 HBV 非活跃复制组,乙肝病毒抗原抗体表达同活跃复制组:表面抗原术后即消失,乙肝病毒抗体即在 1-2 wk 出现(BsAb 4/7, HBcAb 6/7, HBeAb 2/7),6 mo 左右消失。3 例(43 %, 3/7)在近 2 a 时血清及肝组织中 HBV 标志即完全消失。本组无移植物再感染,乙型肝炎复发及乙肝病毒相关死亡。若血清中重新出现表面抗原或 HBVDNA 荧光定量阳性或肝穿组织免疫组化或 HBVDNA 原位杂交阳性则可诊断为 HBV 再感染。未能及时服用拉咪呋啶的 3 例非活跃复制的乙肝受体分别在术后 8、10、12 mo 移植物感染及复发新肝乙型肝炎,移植物再感染率及乙肝复发率为 100 %,其中 1 例死于纤维淤胆性肝炎,后二者经加用拉咪呋啶治疗为主的综合治疗而缓解。本研究除对照组外,拉咪呋啶预防下移植物总的乙肝再感染率为 9.1 %(2/22),受体 HB 复发率为 4.5 %(1/22),1-2 a 生存率达 87 %。

结论:拉咪呋啶能有效地预防失代偿期乙肝相关性肝脏疾病受体,尤其是乙肝病毒活跃复制受体肝移植术后移植物乙肝病毒的再感染及乙型肝炎复发,甚至使血清中及移植物的乙肝病毒达到临床清除。远期疗效正在进一步的评价中。

卢实春,严律南,李波,文天夫,赵纪春,程南生,刘冲,刘隽,王晓波,李晓东,秦山,赵连三,雷秉均,张秀辉.拉咪呋啶预防乙肝相关性肝硬化肝移植术后乙肝再感染的临床对照研究.世界华人消化杂志 2003;11(2):185-190

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/185.htm>

## 0 引言

肝移植是目前治疗乙肝相关性终末期肝病的惟一有效手段,但因移植后乙型肝炎(HB)复发率高达 70-80 %,复发后 1 a 生存率 68 %,3 a 实际生存率仅为 44 %<sup>[1]</sup>,使乙肝相关性肝病肝移植术后远期效果难以令人满意。自 1990 年代中末期,我国重新开展肝移植治疗终末期肝病的临床实践以来,肝移植正在全国范围内广泛推广,目前正以每年超过约 300 例(尸肝及亲体供肝)的速度递增,其中 80 % 以上为乙肝相关性肝脏疾病受体,接近半数乙肝病毒活跃复制的受体<sup>[2]</sup>,随着受体及移植物生存期的延长,乙肝复发正日益突出,必将会成为影响肝移植在我国临床实践的重要因素。近年国际文献报道 lamivudine 或/和乙肝高价免疫球蛋白临床应用于肝移植在预防和治疗乙肝复发方面取得了良好效果<sup>[3-9]</sup>,但国内尚无系统的相关临床资料报道。1999-02/2001-12 我

们在 50 例肝移植(含原位与亲体供肝肝移植)中纳入了 25 例进行系统的单用拉咪呋啶预防及治疗乙肝复发的非随机的临床对照研究并随访,随访时间为 6-36 mo,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1999-02/2001-12 肝移植 50 例中,HBsAg(乙肝表面抗原)阳性的终末期肝脏疾病受体为 41 例(82 %),22 例(54 %)为乙肝病毒活跃复制的 HBVDNA 或/和 HBeAg 阳性受体,7 例术后早期死亡,死因与乙肝复发无关,故被排除此研究,19 例(46 %)为乙肝表面抗原阳性或病肝免疫组化乙肝标志物阳性的非活跃复制患者,其中 8 例为原发性肝癌,1 例术后早期死于肺部感染未纳入研究,故此组仅 10 例进入研究。总计进入研究 25 例患者,术后随访时间从 6-36 mo(平均 12 mo)(表 1)。纳入研究的肝移植受体术前必须是血清中表面抗原和/或 HBVDNA 阳性或病肝组织免疫组化 HBsAg 和/或 HBcAg 阳性染色的失代偿期肝病患者。丙肝(HCV)抗体阳性,巨细胞包含体 IgG/IgM 抗体阳性或供体核心抗体(HBcAb)阳性的受体排除于此研究,其他需要长期抗病毒治疗且对乙肝病毒活性有影响的患者亦排除在外。所有纳入研究的患者都签署正式的同意,研究获医院伦理委员会同意。

1.2 方法 由于肝移植后乙肝复发目前尚无有效的治疗方法,25 例进入研究的肝移植受体按其进入研究时乙肝病毒复制状态非随机地分为乙肝病毒活跃组(15 例,HBVDNA 定量阳性或/和 HBeAg 阳性)与乙肝病毒非活跃复制组(10 例,HBsAg 阳性,HBVDNA/HBeAg 阴性)二组。后者中有 3 例因施术前后乙肝抗病毒药 lamivudine 未上市故未及时服用(术后 12、10、3 mo 才服用)作为阴性对照。处理因素按拉咪呋啶使用全国指导方案给予,即尽可能的手术前及手术后给两组共 22 例患者每日口服拉咪呋啶 100 mg,术后口服时间暂定为 2 a,定期观察血清及肝穿组织中乙肝标志物的动态变化及 1-2 a 生存率。综合国内外资料<sup>[1,9-12]</sup>,拟定了以下结果判断标准。治疗及预防成功:血清中 HBV 标志物(含抗体)及肝组织免疫组化染色 HBV 标志物阴性,血清 HBVDNA 荧光定量阴性,肝组织中 HBVDNA 原位杂交阴性为乙肝病毒血清及肝组织的清除(临床清除);仅有血清 HBV 相应抗体(HBeAb,HBcAb,HBsAb)存在为有效;自发性的或接种疫苗后 HBsAb 产生达到 10 IU/L<sup>[12]</sup>以上且持续 2 a 以上的为体内乙肝病毒清除。预防失败:血清 HBsAg 阳性或血清 HBVDNA 荧光定量阳性或肝穿组织染色 HBV 标志物持续阳性的为 HBV 受体移植物再感染;合并出现胆红素、转氨酶等生化指标上升或/和临床症状者为乙型肝炎复发;治疗过程中出现 HBeAg 阴性及 HBVDNA 阳性者为 YMDD 变异。

病毒检测用酶联免疫分析法(abbott laboratories, north chicago, IL)测定 HBsAg, HBeAg 以及相应的抗体

(HBsAb, HBeAb, HBcAb), 并作 HBsAb 定量(Roche Elecsys Anti-HBs Immunoassay), 血清 HBVDNA 荧光定量由我校肝炎研究室用荧光定量法测定, 测定下限为 0.05 ng/L (PCR 法为  $10^6$  HBVDNA 拷贝/L); 用 SLAB 法作系列肝穿组织的染色测定 HBsAg 与 HBcAg (消耗材料购自 BioGenex, San Romon CA 94 583 USA); 用地高辛标记的 HBVDNA 原位杂交法测定肝穿组织的 HBVDNA 状态 (探针标记盒购自 behringer mannoheim gmBH, germany; 地高辛抗体购自 roche diagnostics corperation, indianapolis, USA) 对所有肝移植受体按以下时点切取病肝及供肝标本或植入后的肝穿活检: 病肝, 供肝植入前, 供肝植入后关腹前, 术后 1, 4, 12, 24, 48, 72, 96 和 144 wk 或按需施行. 每次肝穿前皆取得患者及亲属的书面同意, 成对的标本由两个对临床资料、患者特征不了解的高年资病理医师评判 HBsAg, HBcAg 过氧化物酶染色程度.

统计学处理 所有计数资料均表示为均数  $\pm$  标准差; 远期生存率用 Kaplan-Meier 生存分析.

## 2 结果

2.1 乙肝病毒活跃复制组 乙肝病毒活跃复制组(HBVDNA 阳性或/和 HBeAg 阳性组)15 例候选者进入此研究前平均血清 HBVDNA 含量为  $9.2 \times 10^9$  拷贝/L. 术前平均服用拉咪呋啉 2 wk 后 12 例血清中 (80%) HBVDNA 水平降至不能测出的水平, 血清 HBVDNA 荧光定量阳性仅在术前服用拉咪呋啉时间少于 1 wk 的肝移植候选者出现. 本组术前后使用拉咪呋啉预防的受体, 血清 HBsAg 及 HBeAg 术后一直维持阴性, 相应的抗体出现最早且在术后 1 wk 内即可出现, 出现的频率为乙肝表面抗体 HBsAb 9/15, 乙肝核心抗体 HBcAb 13/15, 乙肝 E 抗体 HBeAb 11/15, 6 mo 内逐渐消失. 术后 1 wk 内在 HBsAb 阳性的受体, 其 HBsAb 定量值平均可  $> 300$  IU/L, 估计与被输入的血液及血液制品有关<sup>[8]</sup>; 血浆 HBVDNA 荧光定量维持至测不出的水平; 血清总胆红素 (bilirubin) 和谷丙转氨酶 (ALT) 至 2 wk 时轻 - 中度上升, 3 wk 后开始下降, 术后 3 mo 时可达正常范围<sup>[9]</sup> (表 1). 术后 1-4 wk 肝穿免疫组化仅在 2 例植入肝 HBsAg 呈微量阳性反应, 1 例 HBcAg 阳性, 3 mo 后肝穿免疫组化全部阴转. 所有受体术后肝穿组织中地高辛标记的 HBVDNA 原位杂交持续阴性 (表 2). 在随访的 18-88 wk 期间, 有 10 例肝移植受体血清及肝组织中乙肝标志物消失, 平均消失时间血清中为  $(23.7 \pm 13.05)$  wk, 肝组织中约 4 wk. 上述乙肝标志物的临床消失似与肝移植前血清 HBVDNA 水平无关. 该组病例中有 2 例 1 a 时临床 (阴转) 清除的病例, 1 例其术后 1 wk 时 HBsAb 曾达 764 IU/L, 术后 24 wk 时为 84.5 IU/L, 1 a 时  $< 2$  IU/L; 另 1 例术后乙肝表面抗体一直阴性. 在随访至 2 a 时, 2 例皆出现血清 HBsAg 呈阳性, HBVDNA 荧光定量阳性, HBeAg 呈阴性, 前者无相应的转氨酶及胆红素升高, 后者出

现纤维淤胆性肝炎 (fibrosing cholestatic hepatitis), 实为拉咪呋啉预防失败的病例, 因而本组预防失败率为 13.3 % (2/15).

2.2 乙肝病毒非活跃复制组乙肝标志物的动态变化 7 例乙肝病毒非活跃复制受体移植前后使用拉咪呋啉预防结果同活跃复制组相似, HBsAg 术后立即消失, 术后 1 wk 之内即可测得相应的抗体 (HBsAb 4/7, HBcAb 6/7, HBeAb 2/7), HBsAb 定量大于 250 IU/L. 持续时间约 24 wk. HBcAb 及 HBeAb 持续时间稍长. 有 3 例受体 HBV 标志物在 1-2 a 之内消失 (表 3). 肝穿组织 HBV 免疫组化染色术后 6 mo 内皆呈阴性, 6 mo 后虽有 2/7 受体仅在其肝穿组织中一过性测及 HBcAg 或 HBsAg, 无相应生化指标改变, 不能判断为移植物再感染或乙肝复发; HBVDNA 原位杂交持续阴性 (表 3).

2.3 对照病例乙肝标志物的动态变化 3 例术前术后未及时服用拉咪呋啉的肝移植受体, 术后 HBsAg、HBcAg 可立即消失, HBsAb, HBcAb 与 HBeAb 在 1 wk 内出现并可持续 6 mo, HBsAb 定量甚至可  $> 100$  IU/L; 肝穿免疫组化 HBsAg 最早可在术后 12 wk 呈阳性, 至 6 mo 时 HBsAg 与 HBcAg 均可探及 (3/3), 8-12 mo 时血清 HBVDNA 呈阳性伴转氨酶及胆红素升高 (HB 复发), HBVDNA 原位杂交阳性; 1 例死亡, 肝穿组织具有纤维淤胆性肝炎的特征, 2 例加用拉咪呋啉为主的综合治疗, HBVDNA 阴转, 胆红素及转氨酶下降, 目前属临床治疗有效 (表 4). 本研究纳入病例 HBV 移植物再感染率、HB 复发率及生存率分述如下: 随访期间, 活跃复制组死亡 2 例, 1 例死于与 HB 复发无关的脑溢血, 另 1 例死于 HB 复发的纤维淤胆性肝炎 (fibrosing cholestatic hepatitis), 非活跃复制组无移植物 HBV 再感染, 无 HB 复发及以此相关的死亡. 对照组 3 例皆发生移植物 HBV 再感染及复发乙肝, 1 例死于 HB 复发 (纤维淤胆性肝炎). 按前述定义, 拉咪呋啉预防组共 22 例 HBV 临床清除率至少为 59 % (13/22 例), 移植物 HBV 再感染为 9.1 % (2/22), 乙肝复发死亡 1 例 (4.5 %, 1/22), 活跃复制组预防失败率为 13.3 % (2/15). 对照组 HBV 临床清除率为 0 (0/3), HBV 再感染率及 HB 复发率均为 100 % (3/3), 1 a 时死亡 1 例 (33 %), 死亡率为 33 % (1/3). 拉咪呋啉预防组 22 例总体 1-2 a 生存率为 87 % (Kaplan-Meier 生存分析).

表 1 25 例研究对象进入研究时的资料

年龄 (岁)	39 (25-58)
男 / 女	22 (88 %) / 3 (12 %)
肝移植后平均时间 (mo)	12 (6-36)
血清 HBsAg 阳性 (%)	25 (100 %)
HBeAg 阳性 (%)	13 (52 %)
免疫组化染色 HBsAg (+)	20 (80 %)
HBcAg (+)	10 (40 %)
HBV DNA 原位杂交阳性	15 (75 %)
荧光定量阳性	$9.2 \times 10^9$ 拷贝/L
谷丙转氨酶	60 IU/L
血胆红素水平	120 $\mu$ mol/L
白蛋白水平	35 (25-47) g/L

表2 HBV DNA 阳性活跃复制受体在拉咪呋啶预防下血清及肝组织中乙肝标志物的变化(15例,wk)

HBV 标志物	术前	术毕	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	12 wk	24 wk	48 wk	60 wk	72 wk	96
血清标志物												
HBsAg	15/15			1/15	0/15	0/15	0/15	0/13	0/5	0/4	0/4	1/2
HbeAg	6/15			0/15	0/15	0/15	0/15	0/13	0/5	0/4	0/4	0/2
Anti-HBs	0/15			9/15	10/15	5/15	2/15	1/13	0/5	0/4	0/4	0/2
Anti-HBc	15/15			13/15	15/15	9/15	5/15	3/13	0/5	0/4	0/4	1/2
Anti-HBe	3/15			11/15	10/15	7/15	3/15	1/13	0/5	0/4	0/4	1/2
HBV DNA	9.2×10 <sup>9</sup>			阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	0/2
胆红素水平(μmol/L)	37.71±10			157.15±30	70±9	50±20	38±6	< 28	< 28	< 28	< 28	< 28
谷丙转氨酶(IU/L)	40±10			150±50	100±10	60±20	50±8	30±10	30±10	30±10	30±10	
肝组织标志物												
HBsAg	10/15	0/15	2/15		2/15		0/15	0/13	0/5	0/4	0/4	0/2
HbcAg	10/15	0/15	0/15		1/15		0/15	0/13	0/5	0/4	0/4	0/2
HBV DNA												
原位杂交	10/15	0/15	0/15		0/15		0/15	0/13	0/5	0/4	0/4	0/2

表3 HBV 乙肝非活跃复制肝移植受体在拉咪呋啶预防下血清及肝组织中乙肝标志物的动态变化(7例,wk)

HBV 标志物	术前	术毕	1wk	2 wk	4 wk	8 wk	12 wk	24 wk	48 wk	96 wk	144 wk
血清标志物											
HBsAg	5/7			0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/6	0/4	0/1
HbeAg	0/7			0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/6	0/4	0/1
Anti-HBs	0/7			0/7	4/7	4/7	3/7	4/7	1/6	2/4	1/1
Anti-HBc	7/7			4/7	6/7	6/7	5/7	5/7	2/6	0/4	0/1
Anti-HBe	2/7			6/7	2/7	2/7	2/7	2/7	2/6	0/4	0/1
HBV DNA											
By PCR	阴性			阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
血胆红素水平	轻度升高			阴性	近正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
谷丙转氨酶	轻度升高			升高	近正常	正常	正常	正常	正常	正常	正常
肝组织 HBV 标志物											
HBsAg	7/7	0/7	0/7		0/7	0/7	0/7	2/7	2/7	0/4	0/1
HBcAg	7/7	0/7	0/7		0/7	0/7	0/7	2/7	1/7	0/4	0/1
HBV DNA原	0/7	阴性	阴性		阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
位杂交	阴性										

表4 乙肝非活跃复制受体未用拉咪呋啶预防其血清及肝组织中乙肝标志物的动态变化(3例,wk)

HBV 标志物	术前	术毕	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	12 wk	24 wk	48 wk	96 wk	144 wk
血清标志物											
HBsAg	3/3			0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	1/2	0/1
HBeAg	0/3			0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/2	0/1
Anti-HBs	0/3			3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/1
Anti-HBc	3/3			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	1/1
Anti-HBE	2/3			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	1/1
HBVDNA by PCR	阴性			阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	5.6 × 10 <sup>8</sup>	阴性	阴性
Bilirubin	轻度升高			升高	升高	升高	升高	近正常	升高	正常	正常
ALT	轻度升高			升高	升高	升高	升高	正常	轻度升高	轻度升高	轻度升高
肝组织标志物											
HBsAg	3/3	0/3	0/3		0/3		1/3	3/3	2/3	1/2	0/1
HBcAg	3/3	0/3	0/3		0/3		0/3	3/3	3/3	1/2	0/1
HBVDNA 原位杂交	阴性	阴性	阴性		阴性		阴性	阴性	阳性	阴性	阴性

### 3 讨论

Samuel报告乙肝病毒活跃复制肝移植受体乙型肝炎复发率高达90-100%<sup>[1]</sup>,乙肝高价免疫球蛋白曾被用于预防乙肝相关性肝病肝移植术后HB的复发,虽然可使乙肝复发率降低至36%,但对HBVDNA阳性的受体预防效果并不令人满意<sup>[1,9]</sup>.因而乙肝病毒活跃复制状态被列为肝移植的绝对反指征.Greillier于1996年报告10例HBVDNA阳性受体肝移植术后用拉咪呋啉预防乙肝复发.随访18-90 wk,9例在24 wk时HBsAg阴转,1例HBVDNA持续阳性,72 wk时复发HB(复发率10%)自此始拉咪呋啉被广泛用于乙肝相关性肝病肝移植后移植物再感染及HB复发的预防,乙肝相关性肝病又被重新列为肝移植的适应证<sup>[13-18]</sup>,在我国及亚洲地区由于是乙肝高发区尤显意义重大<sup>[19]</sup>.

本研究显示15例HBVDNA阳性肝移植候选者术前2 wk始服用拉咪呋啉,能使12例(80%)受体术前血清HBVDNA降至测不出的水平,少于7 d者血清中HBVDNA极难阴转,此结果似较非肝移植活跃复制者服用拉咪呋啉的效果为优<sup>[20]</sup>.其原因可能为术前使用拉咪呋啉降低了肝移植时受体血循环中的HBV病毒颗粒含量,有人认为可减少达97%<sup>[20]</sup>,进而减少了乙肝病毒颗粒再侵入新肝的危险性.乙肝病毒活跃复制受体术前尽可能服用2 wk拉咪呋啉以预防术后乙肝复发的建议亦为我们的结果所证实<sup>[2]</sup>.本组正规服用拉咪呋啉预防方案的HBVDNA阳性受体其血清标志物变化显著,术后血清中HBsAg, HBeAg完全消失,1 wk内即可出现相应的抗体(HBsAb 9/15, HBeAb 11/15, HBcAb 13/15),持续时间约24 wk, HBcAb持续时间稍长.3种抗体中以HBsAb抗体出现意义较大,出现率为60%以上.我们另题研究表明可能系术中术后输入血液及血液制品被动带入的HBsAb所致<sup>[21]</sup>,术后1 wk其血清浓度平均可高达160 IU/L以上,已达保护水平<sup>[1,13]</sup>,以后逐渐减低,虽维持时间有限,但临床意义积极.超过86%的受体定期的血清学、肝穿免疫组化及HBVDNA原位杂交无乙肝标志物的出现,说明植入物及受体得到了有效的保护.极少受体及植入物肝穿免疫组化显示微量的HBsAg与HBcAg的存在,但呈一过性,如排除实验误差,说明受体此时可能存在自动清除机制.综上所述,我们推断有4种可能的保护性机制构成了对本研究的受体及移植物的保护:(1)术前2 wk口服拉咪呋啉已使血清中HBVDNA颗粒数大为减少,且其复制亦受到了抑制;(2)随着病肝的切除,乙肝病毒的发源地亦得以清除,减少了HBV来源;(3)由于术中大量输血输液亦使血循环中病毒浓度得以降低甚至洗脱;(4)超过60%的个体被动无意识的接受了献血员乙肝表面抗体的输入,对中和病毒意义较大.我们把此期暂称为在拉咪呋啉(某种程度的HBIG联合预防)预防下肝移植术后移植物对HBV再感染的安全期.本研究拉咪呋啉预防处理组在6 mo内无1例HB复发且有超过59%的病例HBV达临床清除即证明了这一结论.而处理组术后超过2 a的乙肝再感染则涉及

复杂的复发机制<sup>[1]</sup>.而继往的资料显示<sup>[1,9]</sup>乙肝复发常在6 mo之内.术后12-44 wk期间(平均24 wk时)本组15例HBVDNA阳性受体中10例(66.7%)血清及肝穿组织中乙肝标志物完全阴转(10/15),已达到了临床清除的目的,但临床清除并不意味着HBV在体内的彻底清除,由于HB复发机制还不清楚且本组观察时间平均约1 a,故尚需进一步的观察.本组中我们也发现了2例使用拉咪呋啉已达2 a的移植物HBV再感染(9.1%,2/22)受体,我们的资料说明其1例早期应为拉咪呋啉与HBIG的联合作用,但仍有复发,说明远期病毒变异危险确实存在.因而在临床清除病例中,如何激活受体对HBV疫苗产生主动免疫反应而具备终生对乙肝病毒入侵的保护应是一个努力的方向<sup>[12]</sup>.在术后2 wk前后,无论用否拉咪呋啉,受体血清总胆红素及转氨酶都将呈轻、中度甚至重度升高,此种升高与使用拉咪呋啉预防乙肝复发无关,其升高常在术后4-8 wk逐渐恢复正常.其发生与多种因素有关,我们另有专题讨论<sup>[22]</sup>.

Todo报告乙肝相关性肝病肝移植后1 a复发率高达70-80%,2 a实际生存率54%<sup>[1]</sup>.非活跃复制乙肝相关性肝脏疾病受体(HBsAg+),HBVDBA(-)在免疫抑制状态下乙肝病毒亦可被激活,亦被建议使用拉咪呋啉预防<sup>[14]</sup>,如本研究对照组3例未及时服用拉咪呋啉的非乙肝病毒活跃复制受体分别于术后8,10,12 mo移植物再感染及乙肝复发,血清HBVDNA呈阳性,血清中HBsAg, HBeAg呈阳性,肝穿组织HBsAg, HBcAg呈阳性为其特征.而使用拉咪呋啉预防的7例无1例移植物再感染及HB复发,且有3例HBV标志物达临床清除,随访1 a以上无1例移植物HBV再感染及HB复发,说明用拉咪呋啉预防乙肝病毒非活跃复制受体术后移植物HBV再感染及HB的复发亦是合理的和必须的.本研究拉咪呋啉预防组患者共22例,平均随访1 a无乙型肝炎复发,发生移植物HBV再感染或乙肝复发仅2例(2/22,9.1%)活跃复制组受体拉咪呋啉预防失败及移植物HBV再感染率为13.3%(2/15)HB复发率为6.7%(1/15),较Lai et al<sup>[20]</sup>报告的14%为低.1-2 a生存率达87%以上,而对照组HBV移植物再感染率,HB复发率均为100%,死亡率>33%(1/3),上述实验说明拉咪呋啉预防肝移植术后近期HBV移植物再感染及HB复发的疗效是令人满意的.而同时出现又与香港资料<sup>[19]</sup>相一致的表面抗体的临床意义尚在进一步的评价之中<sup>[7]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Samuel D, Bismuth H, Marcellin P, Benhamou JP. Liver transplantation in the management of chronic viral hepatitis in: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. *Viral Hepatitis*, 2<sup>nd</sup> Edition. Churchill Living stone. Harcourt Asia 2001:237-244
- 2 卢实春,严律南,李波,文天夫,赵纪春,王晓波,刘冲,马玉奎,张秀辉.乙肝病毒活跃复制肝移植受体在拉咪呋啉预防下乙肝病毒标志物动态变化的研究. *肝脏* 2002;7:76-78
- 3 Seehofer D, Rayes N, Neuman U, Neuhaus R, Nüller AR, Tullius SG, Berg T, Steinmüller T, Bechstein WO, Neuhaus P. Preoperative antiviral treatment and postoperative prophylaxis in HBV-DNA positive patients undergoing liver transplantation. *Trans-*

- plantation 2001;72:1381-1385
- 4 Lee KW, Lee SK, Joh JW, Kim SJ, Park JH, Chan SE, Choi SH, Heo JS, Paik SW, Koh KW, Lee JH, Choi MS, Kim YI, Lee BB. Comparison of the efficacy in preventing of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation between HBIG and lamivudine. *Transpl Proc* 2001; 33:3643-3644
  - 5 Rosenau J, Tillmann HL, Hahr MJ, Trautwein C, Boeker KH, Nashan B, Klempnauer J, Manns MP. Successful hepatitis B reinfection prophylaxis with lamivudine and hepatitis B immune globulin in patients with positive HBV-DNA at time of liver transplantation. *Transpl Proc* 2001; 33:3637-3638
  - 6 Marzan A, Salizzoni M, Debernardi-Venon W, Smedile A, Franchello A, Ciancio A, Gentilecore E, Piantino P, Barbui AM, David E, Negro F, Rizzetto M. Prevention of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in cirrhotic patients treated with lamivudine and passive immunoprophylaxis. *J Hepatol* 2001; 34: 903-910
  - 7 Rosenau J, Bahr UJ, Tillmann HL, Trautwein C, Klempnauer J, Manns MP, Boker KHW. Lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin for prophylaxis of hepatitis B reinfection after liver transplantation possible role of mutations in the YMDD motif prior to transplantation as a risk factor for reinfection. *J Hepatol* 2001; 34:895-902
  - 8 Fontana RJ, Hann HW, Wright T, Everson G, Baker A, Schiff ER, Ridy C, Anshuetz G, Riker-Hopkins M, Brown N. Lamivudine compassionate use study group. A multicenter study of lamivudine treatment in 33 patients with hepatitis B after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7:504-510
  - 9 Han SH, Ofman J, Holt C, King K, Kunder G, Chen P, Dawson S, Goldstein L, Yersiz H, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Martin P. An efficacy and cost-effectiveness analysis of combination hepatitis B immune globulin and lamivudine to prevent recurrent hepatitis B after orthotopic liver transplantation compared with hepatitis B immune globulin monotherapy. *Liver Transpl* 2000; 6:741-748
  - 10 Seehofer D, Rayes N, Steinmuller T, Muller AR, Settmacher U, Neuhaus R, Radke D, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Occurrence and clinical outcome of lamivudine-resistant hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7:976-982
  - 11 Segovia R, Sanchez-Fueyo A, Rimola A, Grande L, Bruguera M, Costa J, Soguero C, Uriz J. Evidence of serious graft damage induced by de novo hepatitis B Virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7:106-112
  - 12 Sanchez-Fueyo A, Rimola A, Grande L, Costa J, Mos A, Navasa M, Cirera I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Hepatitis B immunoglobulin discontinuation followed by hepatitis B virus vaccination: A new strategy in the prophylaxis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 31:496-500
  - 13 Steinmuller T, Seehofer D, Rayes N, Muller AR, Settmacher U, Jonas S, Neuhaus R, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002; 35:1528-1535
  - 14 Naoumov NV, Lopes AR, Burra P, Caccamo L, Temmolo RM, de Man RA, Basseudine M, O'Grady JG, Portmann BG, Anshuetz G, Barrett CA, Williams R, Atkins M. Randomized trial of lamivudine versus hepatitis B immunoglobulin for long-term prophylaxis of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 34:888-894
  - 15 Ben-Ari Z, Mor E, Shapira Z, Tur-Kaspa R. Long-term experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7:113-117
  - 16 Perrillo RP, Wright T, Rakala J, Levy G, Schiff E, Gish R, Martin P, Dienstag J, Adams P, Dickson R, Anshuetz G, Bell S, Condreay L, Brown N. A multicenter united states-canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 33:424-432
  - 17 Macedo G, Maia JC, Gomes A, Beleza M, Teixeira AS, Ribeiro A. Lamivudine: a new strategy to suppress HBV replication in the pretransplant setting. *Transplant Proc* 2002; 32:2642
  - 18 Yao FY, Terrault NA, Freise C, Maslow L, Bass NM. Lamivudine treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study using a matched, untreated cohort. *Hepatology* 2001; 34:411-416
  - 19 Lo MC, Cheung ST, Lai CL, Liu CL, Ng IO, Yuan MF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in Asian patients with chronic hepatitis B using Lamivudine prophylaxis. *Ann Surg* 2001; 233:276-281
  - 20 Lai CL, Chien RN, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998; 339:61-68

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志》收录。国内被以下检索系统收录, 分别为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊之一), 中国学术期刊文摘, 中国生物医学文献光盘数据库, 中文科技资料目录医药卫生, 解放军医学图书馆 CMCC 系统, 世界消化网数据库, 中国医学文摘外科学分册(英文版), 中国医学文摘内科学分册(英文版), 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995 年度, 1998 年度, 1999 年度, 2000 年度 2001 年度, 分别被评为山西省一级期刊。中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年度世界华人消化杂志®总被引频次 6468, 影响因子 3.733, 即年指标 0.747, 他引总引比 0.2, 海外作者论文比 0.012, 地区分布数 29, 基金和资助论文比例 0.176, 指标综合加权评分 76.96。世界华人消化杂志®大 16 开, 128 页, 月刊, 定价 24.00 元/期, 邮发代号 82-262。E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

# 肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究

王九平,白雪帆,张三奇,李谨革,张颖,张岩,薛克昌,顾宜,王平忠,骆抗先

王九平,白雪帆,李谨革,张颖,张岩,王平忠,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
张三奇,薛克昌,顾宜,中国人民解放军第四军医大学西京医院药剂科 陕西省西安市 710038  
骆抗先,中国人民解放军第一军医大学南方医院传染科 广东省广州市 500515  
王九平,女,1961-10-25生,汉族,医学博士,讲师,陕西省西安市人。  
项目负责人:王九平,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。 jpwang@fmmu.edu.cn  
电话:028-85422476 传真:028-85423724  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-19

## Anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid nano-particles

Jiu-Ping Wang, Xue-Fan Bai, San-Qi Zhang, Jin-Ge Li, Ying Zhang, Yan Zhang, Ke-Chang Xue, Yi Gu, Ping-Zhong Wang, Kang-Xian Luo

Jiu-Ping Wang, Xue-Fan Bai, San-Qi Zhang, Jin-Ge Li, Ying Zhang, Yan Zhang, Ke-Chang Xue, Yi Gu, Ping-Zhong Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Kang-Xian Luo, Department of Infections Diseases Nanfang Hospital the First Military Medical University Guangzhou 510515, Guangzhou Province, China  
Correspondence to: Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.  
jpwang@fmmu.edu.cn  
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-19

## Abstract

AIM: To investigate the anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid Nano-particles (LAP-SLN).

METHODS: The nano-particles modified by galactosides (LAP-GSLN) were prepared and delivered into 2.2.15 cells. HBsAg, HBeAg and HBV DNA of 2.2.15 cells were detected by ELISA and hepatitis B virus fluorescence polymerase chain reaction (PCR). The cytotoxicity of targeted LAP-GSLN on 2.2.15 cells were observed. Fifteen male mice (2 months old) were randomly divided into 3 groups: LAP-SLN group, LAP-GSLN group and LA group. Levels of lamivudine in serum, liver, kidney, lung and spleen tissue were detected by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

RESULTS: LAP-GSLN could be targeted to the liver. Liver LAP-GSLN content in LAP-GSLN group was 3.3 times of that in the LA group. HBV DNA was inhibited on the 4th day. HBV DNA in LAP-GSLN group and LA group with concentration of lamivudine at 10 mg/L was less than  $1.11 \times 10^7$  /L and  $5.06 \times 10^9$  /L, respectively. Inhibition of HBsAg and HBeAg showed on the 6th day, the inhibition rate of LAP-GSLN on HBsAg and HBeAg with concentration of lamivudine at 0.01 mg/L was 52.9 %, 53.9 %, respectively; while the inhibition rate of LA on HBsAg and HBeAg was 32.2 %, 31.1 %, respectively. When the concentration of lamivudine was

10 mg/L, the inhibition rate of LAP-GSLN on HBsAg and HBeAg was 67.2 %, 69.0 %, respectively; while the inhibition rate of LA on HBsAg and HBeAg was 45.1 %, 41.0 %, respectively. No cytotoxic effect on 2.2.15 cells was found.

CONCLUSION: LAP-GSLN can target liver effectively *in vivo* and inhibit HBV expression and DNA replication.

Wang JP, Bai XF, Zhang SQ, Li JG, Zhang Y, Zhang Y, Xue KC, Gu Y, Wang PZ, Luo KX. Anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid nano-particles. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):191-194

## 摘要

目的: 探讨肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗HBV的作用。

方法: 以半乳糖苷为载体, 构建十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒 (PLN-LAGS), 将其靶向导入 2.2.15 细胞, 共同温育 10 d 后, 观察对细胞的毒性作用; 同时将 LAP-GSLN 尾静脉注入小鼠体内, RP-HPLC 测定拉米呋定 (lamivudine, LA) 在血清、肝、肾、肺及脾中的分布, 用 ELISA 和荧光定量 PCR 检测多个时期培养上清中 HBsAg, HBeAg 和 HBV DNA。

结果: LAP-GSLN 在肝脏中具有靶向性, LAP-GSLN 组肝脏的含药量为 LA 组的 3.3 倍; 导向后 4 d 出现对 HBV-DNA 的抑制, 在药物浓度 10.0 mg/L 时 LAP-GSLN 组 HBV DNA  $< 1.11 \times 10^7$  拷贝/L, 而单纯 LA 组则为  $5.06 \times 10^9$  拷贝/L; 6 d 出现对 HBsAg, HBeAg 抑制, 在药物浓度 0.01 mg/L 时, LAP-GSLN, LA 组对 HBsAg, HBeAg 抑制率分别为 52.9 %, 53.9 %; 32.2 %, 31.1 %; 在药物浓度 10.0 mg/L 时, LAP-GSLN, LA 组对 HBsAg, HBeAg 抑制率分别为 67.2 %, 69.0 %; 45.1 %, 41.0 %。未发现对 2.2.15 细胞的毒性作用。

结论: 小剂量半乳糖介导十六酸拉米呋定脂质纳米粒能快速有效的抑制 HBV 抗原表达和 DNA 复制。

王九平, 白雪帆, 张三奇, 李谨革, 张颖, 张岩, 薛克昌, 顾宜, 王平忠, 骆抗先. 肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):191-194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/191.htm>

## 0 引言

近年来国内外有关使用核苷类药物治乙型肝炎已取得了初步疗效, 特别是近来拉咪呋啶 (lamivudine, LA) 的临床应用<sup>[1-6]</sup>, 证实其对乙肝病毒有效, 但疗效尚不理想<sup>[5]</sup>. 主要是由于乙肝病毒核心抗原存在于肝细胞内, 核苷类药物须进入肝细胞, 并经胸腺嘧啶核苷激

酶催化三磷酸后方显效.而核苷类药物不易透过肝细胞,且乙肝病毒感染的细胞缺少胸腺嘧啶核苷激酶,宿主细胞磷酸化作用缓慢,达不到抑制病毒复制的有效浓度.许多研究表明<sup>[13,14]</sup>,靶向给药不仅可使给药量约80%的药物浓集于肝脏,而且可迅速进入肝细胞,为了提高拉米夫定的疗效,我们研制半乳糖苷介导的十六酸拉米夫定脂质纳米粒,并证实了肝靶向性和对乙肝病毒抗原(HBV)表达和HBV-DNA复制的抑制作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 拉米夫定(英国葛兰素);十六酸(分析纯、天津市化学试剂二厂);卵磷脂(美国Sigma公司);D-半乳糖(上海试剂二厂);(2-C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-羟基乙基)-r-十二烷基醚(MOA)(江苏海安石油化工厂,经柱层析纯化);其他药品和试剂均为分析纯. HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞为HepG<sub>2</sub>肝癌细胞转染HBV后能表达HBsAg, HBeAg, HBV DNA及Dane颗粒等的细胞,购于北京医科大学.DMEM粉、胎牛血清为美国Gibco, G418(Geneticin)为美国Sigma公司.MTT为德国Boehringer公司产品.昆明种小鼠,体质量19-21 g,雌雄各半(第四军医大学实验动物中心).

1.2 方法 合成十六酸拉米夫定酯(lamivudiny palmitate, LAP)用拉米夫定1.29 g,十六酸1.55 g,二环己基碳二亚胺(DCC)1.50 g,4-二甲氨基吡啶(DMAP)置于100 ml干燥的二氯甲烷中,室温反应12 h,抽滤浓缩,硅胶柱层析(氯仿40:1),得白色粉末.合成半乳糖苷Gal<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>(GMOA):用四乙酰溴代半乳糖2.17 g, MOA1.25 g, AgCO<sub>3</sub> 1.05 g,置于30 mL氯仿中,室温避光搅拌16 h,过滤浓缩,加入200 mol/L CH<sub>3</sub>ONa的甲醇溶液20 mL,搅拌0.5 h.加入浓盐酸1滴.浓缩,硅胶柱层析纯化(氯仿-甲醇30:1)得无色膏状物1.35 g.制备半乳糖脂质纳米粒十六酸拉米夫定 lamivudiny palmitate-solid lipid nanoparticles modified by galactoside, LAP-GSLN).LAP-SLN处方:LAP 11.3 mg,卵磷脂100 mg;LAP-GSLN处方:LAP 11.3 mg,卵磷脂95 mg,GMOA5 mg.精密称取处方量物质于100 mL园底烧瓶中,加入氯仿15 mL溶解.旋转蒸发除去氯仿,在烧瓶壁上形成一层薄膜,加入60 g/L甘露醇水溶液10 mL,水溶液超声2次,1 min/次,无菌过滤装于安瓿中放入冰箱待用. HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞培养按文献<sup>[7]</sup>等方法进行.在HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞长满培养瓶后转种于24孔板,每孔1 mL,密度1×10<sup>5</sup>个细胞/L,第2天加入不同浓度的药物,留一不加药为对照孔,每2 d换液1次,仍加入原浓度的药物,10 d终止试验.收集各孔培养上清液测定HBsAg, HBeAg和HBV DNA.每种药物浓度均加3孔,取3孔之平均值.

1.2.1 十六酸拉米夫定酯固体脂质纳米粒对细胞内HBV的抑制 ELSIA检测 HBsAg, HBeAg:按试剂盒说明书操作,测定每孔吸光度(A)值,换算成P/N值(X),计算

抑制率.抑制率计算公式为抑制率=(对照组X-实验组X)÷(对照组X-2.1)×100%.无效:抑制率<30%,轻度抑制=30-50%,明显抑制>50%.HBV-DNA检测:采用Hepatitis B virus fluorescence polymerase chain reaction(PCR)定量方法.试剂由广州中山大学达安基因诊断公司提供.不对称引物P<sub>1</sub> 5' ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT 23' 3 bp;P<sub>2</sub> 5' ACAGTGGGGGAAAGCCCTACGAA3' 23 bp;信号引物为:5' TGGCTAGTTTACTAGTGCCA TTTTG3' 25 bp.按操作说明常规碱基解法从血清中提取HBV-DNA,不对称扩增,取提上清液5 μL,加不对称扩增反应混合液10 μL(含不对称扩增引物P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, dNTP, Taq酶及PCR缓冲液),先预变性93 120 s,然后93 45 s, 55 60 s 10个循环,再按93 30 s, 55 45 s做30循环;使用PE 5700荧光DNA检测仪(美国Perkin Elmer公司),并依据纯化HBV-DNA建立直线回归方程,ASAP专用软件自动分析,读出HBV-DNA模板数.

1.2.2 细胞毒性及肝脏靶向性观察 按上述HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞方法培养,也加入不同浓度的靶向药物,每个浓度设3孔,设空孔对照,继续培养6 d后观察结果.取健康昆明种幼鼠15只,体质4±1 g,随机分3组,分别于LAP-SLN组, LAP-GSLN组和LA组,小鼠禁食12 h后尾静脉给药.给药后30 min时小鼠眼眶取血,处死后取出肝、肾、肺、脾加二倍水制自匀浆.取血清或匀浆0.1 mL,加入甲醇0.5 mL,离心10 min(14 000 g),上清液20 μL进样,用反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定LA含量.

## 2 结果

2.1 LAP-SLN、LAP-GSLN和LA抑制 2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg LAP、LAP-SLN及LAP-GSLN对2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg均有抑制作用,抑制作用的大小随着药物作用延长而增大,LAP-SLN、LAP-GSLN组在6 d时对HBsAg, HBeAg呈现明显抑制作用,而LA组在8 d后,1.0 mg/L以上的浓度才有明显的抑制作用表1.

2.2 LAP, LAP-SLN及LAP-GSLN对2.2.15细胞HBV-DNA复制的影响 LA、LAP-SLN及LAP-GSLN对HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞HBV DNA的抑制作用(图1),在HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞培养中,LA组细胞外HBV DNA(培养上清液中)随着培养时间的延长,HBV DNA含量缓慢的下降,到第8天时,HBV DNA含量降至正常.LAP-SLN组在第6天HBV DNA含量接近正常,LAP-GSLN组的HBV DNA含量下降很快,在第4天HBV DNA含量达到正常.结果表明:LA、LAP-SLN及LAP-GSLN对HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞HBV DNA有抑制作用,但LAP-SLN及LAP-GSLN较LA作用迅速,尤以LAP-GSLN组明显.

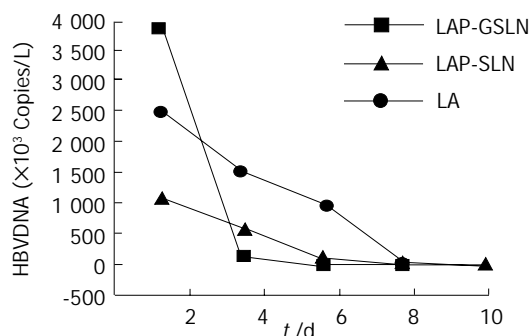
表1 LAP-SLN, LAP-GSLN 和 LA 对 HBsAg 和 HBeAg 抑制率(%).

药名	浓度 mg/L	1 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
LAP-SLN	0.01	12.2(17.4)	20.1(25.8)	29.8(30.3)	45.9(43.2)	55.1(52.1)	64.2(60.3)
	0.10	20.6(21.2)	28.4(30.2)	31.9(32.5)	54.2(52.4)	59.8(50.3)	66.3(59.3)
	1.00	23.4(23.6)	32.0(32.5)	39.9(40.3)	53.3(51.4)	64.9(55.2)	70.2(55.2)
	10.00	28.9(27.4)	19.9(21.1)	30.9(33.0)	60.1(51.9)	62.8(67.7)	65.5(59.0)
LAP-GSLN	0.01	15.2(17.0)	19.9(21.2)	30.9(33.0)	52.5(53.9)	62.8(67.7)	65.5(59.0)
	0.10	21.9(22.3)	30.3(33.4)	37.2(38.2)	60.2(59.1)	71.4(77.5)	70.2(70.9)
	1.00	28.7(29.0)	36.9(40.3)	44.7(45.3)	60.4(54.3)	71.3(69.2)	71.9(68.4)
	10.00	30.1(32.3)	35.3(41.2)	60.5(61.2)	67.2(69.0)	72.4(51.9)	74.2(67.7)
LA	0.01	10.2(15.4)	15.8(11.5)	26.2(27.3)	30.2(31.1)	45.2(44.3)	60.9(61.2)
	0.10	17.2(19.3)	20.9(21.0)	33.3(35.4)	33.5(36.6)	49.8(55.5)	61.8(59.2)
	1.00	20.3(21.6)	29.8(29.6)	40.1(39.2)	42.7(41.2)	56.2(40.2)	59.6(60.3)
	10.00	25.1(26.9)	27.9(30.2)	40.9(40.3)	45.1(41.0)	53.4(49.8)	60.3(64.0)

括号外为对 HBsAg 的抑制率,括号内为对 HBeAg 的抑制率.

表2 给药 30min 后 LA 在血清和脏器中的含量占总药量的百分比.

药物	血清	肝脏	肾脏	肺脏	脾脏
LA	40.0	39.4	12.8	6.4	1.4
LAP-SLN	25.2	52.1	12.7	7.3	2.7
LAP-GLSN	11.4	77.4	5.2	3.6	2.4

图1 LA、LAP-SLN 及 LAP-GSLN 对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞 HBV DNA 的作用.

2.3 细胞毒性效应和体内分布观察 实验组与对照组比较均未见细胞生长、形态和活细胞计数有明显改变.各脏器含量分布及各脏器药物含量占总药量的百分比见表2,利用 SPSS 软件对3次肝脏药物含量数据进行方差分析,证明 LAP-SLN 和 LAP-GSLN 在肝脏中都有靶向性,且 LAP-GSLN 强于 LAP-SLN ( $P < 0.01$ ).LAP-GSLN 组肝脏的含药量为 LA 组的 3.3 倍,是 LAP-SLN 组的 2.0 倍.LAP-SLN 组肝脏的含量为 LA 组的 1.7 倍,进一步证明 LAP-SLN 和 LAP-GSLN 在肝脏中有靶向性,且 LAP-GSLN 强于 LAP-SLN.

### 3 讨论

拉咪呋啶作为一种新的抗 HBV 药物<sup>[8-11]</sup>,其疗效已得到公认,且无毒性,不良反应轻微,可口服,有

望成为干扰素以外新的另一治疗选择.然而,拉咪呋啶的作用只能阻断 HBV 复制过程中的中间环节,但不能清除肝细胞内及肝外组织细胞中 HBV 的复制源 cccDNA,同时对整合入宿主细胞基因的 HBV-DNA 亦无能为力.对肝细胞内病毒状态似无影响,停药后易复发<sup>[2, 14-15]</sup>.因此寻找一条小剂量,快速持续在肝细胞内 HBV-DNA 势在必然.固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是近年正在发展的一种新型毫微粒类给药系统<sup>[12, 13, 16-25]</sup>,以类脂为载体,将药物包裹于类脂核中制成酸态给药体.进入机体后,很快被网状内皮系统吞噬而被动进入肝脾,达到肝靶向作用.SLN 主要适用于包封亲脂性药物,LA 的脂溶性,故将其酶化制成十六酸拉咪呋啶酯(LAP),增加脂溶性.肝细胞膜上有半乳糖受体(ASGP-R)<sup>[23]</sup>交联物与受体结合后,通过细胞的吞噬作用进入肝细胞,随后到达溶酶体.由于溶酶体 PH 较低,交联物与载体分离,在肝细胞中发挥药效.

HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞是转染了 HBV-DNA 序列的肝癌细胞,能长期稳定地产生 HBV-DNA 颗粒,其表面存在 ASGP-R<sup>[7]</sup>.LA 对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞 HBV-DNA 具有抑制作用.本文以 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞为靶细胞,以半乳糖苷修饰十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒治疗手段,将 LA 直接运载至肝脏,观察肝细胞内抗乙型肝炎病毒作用.结果观察到 LAP-GSLN 4d 对 HBV-DNA 复制有明显抑制,6 d 对 HBeAg,HBsAg 有明显抑制作用,而单纯 LA 需 8 d 后只有  $> 1.0$  mg/L 才对 HBV-DNA 和 HBV 抗原表达有明显抑制作用.且 LAP-SLN, LAP-GSLN 和单用 LA 无论是对 HBV 的 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制还是对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞的存活率的影响均相似.本结果显示,靶向的 LA 只需短暂作用于细胞,即可对病毒抗原分泌和 DNA 复制产生有效的抑制作用.半乳糖修饰的 LAP-SLN 可以迅速、完全地进入 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞,使细

胞内的LA增多发挥更高的抗病毒效应.这一结果与多位学者采用半乳糖修饰后的抗乙肝病毒药物疗效提高作用相似<sup>[22-25]</sup>.

研究结果还表明,LAP-SLN和LAP-GSLN对小鼠肝组织有明显的选择亲和力,这种靶向能将LA定向的转入肝细胞,且LAP-GSLN与肝细胞膜上的ASGP-R迅速结合,故LAP-GSLN靶向性作用强于LAP-SLN,这对提高药物疗效,减少用量,有一定意义.

#### 4 参考文献

- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998;27: 1670-1677
- Lai CL, Ching CK, Tung AK, Li E, Young J, Hill A, Wong BC, Dent J, Wu PC. Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1997;25:241-244
- Nevens F, Main J, Honkoop P, Tyrrell DL, Barber J, Sullivan MT, Fevery J, De Man RA, Thomas HC. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: a six-month randomized dose-ranging study. *Gastroenterology* 1997;113:1258-1263
- Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, Marinos G, Ahmed M, de Man R, McPhillips P, Johnson M, Williams R, Elias E, Schalm S. Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study. *J Hepatol* 1998;28:923-929
- Mason WS, Cullen J, Moraleta G, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Tennant B, Frick L, Averett D, Condreay LD, Jilbert AR. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 1998;245:18-32
- Wu GY, Wu CH. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1992;267:12436-12439
- Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987;262:4429-4432
- Lai CL, Chen RN, Leung NWY. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
- 姚光弼,王宝恩,崔振宇.拉咪味啉治疗慢性乙型肝炎患者的长期疗效. *中华肝病杂志* 1999;7:80-83
- Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B-antigen-negative/ hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999;29:889-896
- Buti M, Cotrian M, Cruzde Castro E. One year treatment with lamivudine in different hepatitis B virus related hepatic disease. *Gastroenterol Hepatol* 1999;22:117-121
- 张志荣,廖共铁,侯世祥.米托蒽醌聚酞基丙烯酸正丁酯毫微粒的研究. *药学报* 1994;29:544-547
- 张志荣,何勤.肝靶向万乃洛韦毫微粒的研究. *药学报* 1998;33:702-706
- Sokal EM, Mieli-Vergani G. A dose ranging study of the pharmacokinetics, safety, and preliminary efficacy of lamivudine in children and adolescents with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:590-597
- Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;341:1256-1263
- Moynihan JS, Jones DH, Farrar GH, Howard CR. A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B. *Vaccine* 2001; 19:3292-3300
- Moynihan JS, D'Mello FI, Howard CR. 48-mer synthetic peptide analogue of the hepatitis B virus "a" determinant induces an anti-HBs antibody response after a single injection. *J Med Virol* 2000; 62:159-166
- Agudde MT. Future approaches to vaccine development: single-dose vaccines using controlled-release delivery systems [J]. *Vaccine* 1993;11:596-604
- 柳钟勋. 新型免疫佐剂在疫苗中的应用. *中华微生物学和免疫学杂志* 1997;17:337-341
- 吴晓蓉,贾文祥,刘莉,张再蓉,邱玉,李孝红,邓先模. PELA 微球乙型肝炎疫苗的免疫原性研究. *生命科学研究* 2000;4:167-172
- Hashida M, Nishedawa M, Tadakura Y. Hepatic targeting of drugs and proteins by chemical modification. *J Controll Rel* 1995; 36: 99-107
- Nishikawa M, Kamijo A, Fujita T. Synthesis and pharmacokinetics of a new liver-specific carrier, glycosylated Carboxymethyl-Dextran, and its application to drug targeting. *Pharm Res* 1993;10: 1253-1261
- 谢青,郭清,周霞秋,谷瑞瑛. 乳糖化清蛋白单磷酸阿糖腺苷的抗鸭乙型肝炎病毒作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:125-126
- Torrani Cerenzia M, Fiume L, De Bernardi Venon W, Lavezzo B, Brunetto MR, Ponzetto A, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Gervasi GB, Bonino F, Verme G. Adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human albumin administered for 4 weeks in patients with chronic type B hepatitis decreased viremia without producing significant side effects. *Hepatology* 1996;23: 657-661
- 陈永鹏,章廉,胡俊,刘定立,冯筱榕,骆抗先. 脂质体的乳糖化修饰极其肝脏靶向性的研究. *第一军医大学学报* 2001;21:177-179

# 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究

康文臻,谢玉梅,聂青和,张 岩,郝春秋,王久平,陈伟红

康文臻,谢玉梅,聂青和,张岩,郝春秋,王久平,陈伟红,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
康文臻,女,1966-06-21生,四川省金川县人,汉族,医学博士,主治医师,讲师.主要从事肾综合征出血热发病机制及肝纤维化发病机制及中药治疗的研究.发表论文7篇.

项目负责人:康文臻,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. kangwz@fmmu.edu.cn

电话:029-3377742 传真:029-3537377

收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-16

## Effect of Oxymatrine on experimental liver fibrosis

Wen-Zhen Kang, Yu-Mei Xie, Qing-He Nie, Yan Zhang, Chun-Qiu Hao, Jiu-Ping Wang, Wei-Hong Chen

Wen-Zhen Kang, Yu-Mei Xie, Qing-He Nie, Yan Zhang, Chun-Qiu Hao, Jiu-Ping Wang, Wei-Hong Chen, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Wen-Zhen Kang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. kangwz@fmmu.edu.cn

Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-16

## Abstract

**AIM:** To study the effect of Oxymatrine on liver fibrosis in immunogenic liver fibrosis rat model.

**METHODS:** Rat liver fibrosis model was induced by human serum albumin (HSA), 60 Wistar rats were randomly divided into 5 groups, control group without any treatment, liver fibrosis model group, oxymatrine preventive group, oxymatrine therapeutic group, and cochicine therapeutic group. The pathological changes of liver were observed by HE and Von-Gieson staining. The expressions of mRNA and proteins of collagen I/III in liver were determined by in situ hybridization and immunohistochemistry.

**RESULTS:** The liver fibrosis degree and level of mRNA and proteins of collagen I/III in the liver were significantly reduced in the decreasing order in oxymatrine preventive group, oxymatrine therapeutic group, and cochicine therapeutic group.

**CONCLUSION:** Oxymatrine may inhibit hepatic inflammation and hepatic synthesis of collagen I/III, and thus prevent and inhibit hepatic fibrosis.

Kang WZ, Xie YM, Nie QH, Zhang Y, Hao CQ, Wang JP, Chen WH. Effect of Oxymatrine on experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(2):195-198

## 摘要

**目的:** 探讨苦参素对实验性大鼠肝纤维化的预防与治疗作用。

**方法:** 采用人血清白蛋白免疫损伤 Wistar 大鼠造成肝纤维

化模型, 60 只 Wister 大鼠, 分为 5 组: 造模组、秋水仙碱治疗组、试验组 I (苦参素预防组)、试验组 II (苦参素治疗组), 另设正常对照组。动态观察大鼠肝组织病理变化, 采用 HE 染色观察肝组织改变及 Von-Gieson 胶原纤维特殊染色观察肝纤维化程度, 并采用免疫组织化学染色及肝组织原位杂交检测 I 型、III 胶原含量及 I 型、III 型胶原 mRNA 的表达。

**结果:** 试验组肝组织结构明显好转, 纤维组织增生程度明显低于肝纤维化模型组; I 型、III 型胶原含量及 I 型、III 型胶原的 mRNA 表达均低于模型组免疫诱导型肝纤维化大鼠, 其效果为试验组 I (苦参素预防组) 效果最好, 试验组 II (苦参素治疗组) 次之, 秋水仙碱治疗组再次之, 三组均优于造模组。

**结论:** 苦参素可减轻肝脏炎症活动、抑制肝内胶原合成, 对实验性大鼠肝纤维化具有防治作用。

康文臻, 谢玉梅, 聂青和, 张岩, 郝春秋, 王久平, 陈伟红. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11(2):195-198

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/195.htm>

## 0 引言

肝纤维化是慢性肝损伤向肝硬化发展的基础, 是由于肝细胞外基质增生与降解失衡所致, 其主要病理变化是肝细胞外基质在肝脏的过度沉积<sup>[1-4]</sup>。目前, 人们普遍认为, 此阶段是可逆的病理过程<sup>[5-8]</sup>。目前国内外对于肝纤维化尚无理想的治疗方法, 因此, 寻找有效药物, 阻断、延缓及逆转肝纤维化的发生和发展是亟待解决的问题, 是治疗肝硬化的关键。曾有文献<sup>[9-12]</sup>报道秋水仙碱具有抑制肝细胞外基质生成的作用, 并曾应用于少数病例, 但由于疗效不佳, 毒副作用较大, 临床应用受到限制。苦参素是从中药苦豆子和苦参根中提取的有效成分, 具有抗炎、免疫调节、稳定细胞膜及阻断肝细胞凋亡等作用<sup>[13-17]</sup>。有文献报道, 苦参素临床应用具有抗纤维化作用<sup>[18,19]</sup>, 本研究应用免疫损伤性大鼠肝纤维化模型, 初步探讨了苦参素抗肝纤维化的作用机制, 以期为其临床应用提供可靠的理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 大鼠肝纤维化模型的制备** Wister 大鼠, 体重  $140 \pm 20$  g, 60 只, 清洁级 (购自第四军医大学实验动物中心) 取 54 只 Wister 大鼠参照文献<sup>[20,21]</sup>应用

人血白蛋白免疫攻击方法制备免疫性肝纤维化大鼠模型(人血白蛋白,选自兰州生物制品研究所,不完全福氏佐剂系 sigma 公司产品)抗大鼠 IgG 单克隆抗体购自法国 Coulter 公司.另 6 只 Wister 大鼠设为正常对照组.

1.2 动物分组 试验组 I(10 只):尾静脉攻击同时,开始予苦参素(氧化苦参碱,博尔泰力注射液,由宁夏绿谷药业公司生产)50 mg/kg 腹腔内注射 1 次/d,维持 3 mo,造模结束后存活 8 只;44 只实验攻击动物存活 29 只,按随机分组法随机分为 4 组:模型组(9 只)尾静脉攻击结束后不予任何其他干扰因素;治疗组(10 只)尾静脉攻击结束后予秋水仙碱(系昆明制药股份有限公司生产)0.28 mg/kg 灌胃治疗,6 次/wk,维持 3 mo;试验组 II(10 只):尾静脉攻击结束后,予苦参素 50 mg/kg 腹腔内注射 1 次/d,维持 3 mo;正常对照组(6 只):等量无菌生理盐水腹腔内注射,1 次/d,维持 3 mo.所有动物均于给药 3 mo 后处死,打开腹腔,取肝脏方叶小块组织置 10 % 中性甲醛固定,留作病理检查.

### 1.3 检测指标

1.3.1 病理学观察 常规 HE 染色观察肝组织学改变;Von Gieson 胶原纤维特殊颜色.

1.3.2 型、型胶原的免疫组化染色 型、型胶原免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗 型、型胶原单克隆抗体试剂编号分别为 BA0325 和 BA0326.具体方法按试剂盒说明书常规进行操作.

1.3.3 肝组织原位杂交 型、型前胶原 mRNA 表达检测采用地高辛标记探针原位杂交法.型、型前胶原原位杂交试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,试剂编号分别为 MK1171 和 MK1549.按试剂盒说明书常规进行操作.

1.3.4 图像分析与数据处理 免疫组化及杂交结果经计算机图像灰度扫描数字转换后,进行统计数字处理,各组间行 t 检验,以 P 值<0.05 判断有显著性差异.

## 2 结果

2.1 肝脏病理变化肉眼观察 正常大鼠肝脏颜色鲜红,表面光滑,质脆柔软.造模组大鼠肝脏体积缩小,质地较韧,边缘较钝,颜色呈暗红色,表面粗糙.肝组织汇管区中可见纤维组织增生,同时,纤维组织于中央静脉周围增生并向肝小叶内延伸,但纤维间隔较纤细,汇管区及中央静脉周围可见炎细胞浸润,沿界板及其他部位有肝细胞浓染、溶解及小双核细胞.造模组 V-G 染色胶原纤维沿汇管区及中央静脉周围向肝小叶内延伸,交联成网状结构(图 1).试验组 I、试验组 II 与治疗组大鼠肝脏在色泽、质地、大小及表面光滑度方面较造模组均有明显改善.光镜检查可见肝脏组织内炎性细胞浸润、肝细胞坏死和纤维组织增生等方面均较造模组大鼠为轻,纤维间隔较薄.

2.2 型、型胶原肝组织免疫组化 免疫组化检测的

阳性信号呈现为棕黄色颗粒状,正常肝脏 I 型胶原阳性染色只见于汇管区和中央静脉管壁,III 型胶原主要存在于大血管周围;造模组肝脏中 型、型胶原广泛存在于纤维间隔及肝细胞内;试验组 I、试验组 II 与治疗组大鼠肝脏中 型、型胶原明显减少,纤维间隔较薄.将胶原免疫组化结果进行图像分析,表明试验组 I、试验组 II 与治疗组肝脏中 型、型胶原较造模组明显减少.杂交结果经计算机图像灰度扫描数字转换值见表 1.

2.3 肝组织原位杂交 原位杂交检测的阳性信号呈现为棕黄色颗粒状,分布在肝细胞质内,呈散在或弥漫性分布,未见细胞核着色(图 2).将 型、型前胶原 mRNA 表达结果进行图像分析,表明试验组 I、试验组 II 与治疗组肝脏 型、型前胶原 mRNA 表达较造模组明显减少.结果经计算机图像灰度扫描数字转换值见表 2.

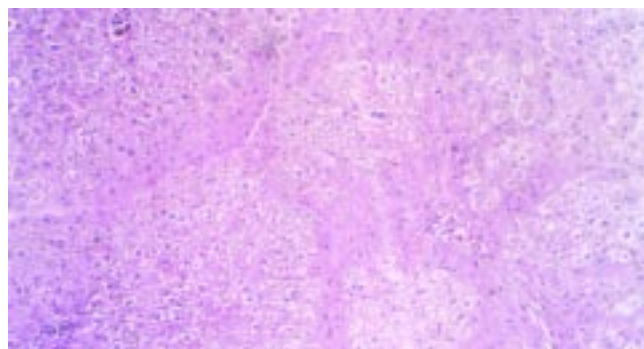


图 1 造模组大鼠肝组织 V-G 染色 ( $\times 400$ )

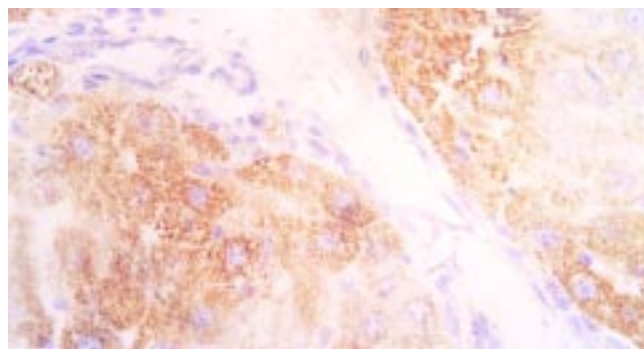


图 2 试验组大鼠肝组织中 型前胶原 mRNA 原位杂交结果 ( $\times 400$ )

表 1 各组大鼠肝脏组织 型、型胶原免疫组化结果(灰度扫描数字转换值)

分组	n	I 型胶原	III 型胶原
造模组	9	476.11 $\pm$ 160.32	676.67 $\pm$ 182.81
试验组 I	8	162.88 $\pm$ 40.63 <sup>bc</sup>	380.88 $\pm$ 77.38 <sup>bd</sup>
试验组 II	10	226.1 $\pm$ 77.7 <sup>b</sup>	518.2 $\pm$ 89.6 <sup>a</sup>
治疗组	10	319 $\pm$ 148.6 <sup>a</sup>	579.1 $\pm$ 136.88
对照组	6	68 $\pm$ 10.57	99.67 $\pm$ 23.67

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 造模组比较; <sup>b</sup>P < 0.01 vs 造模组比较;

<sup>c</sup>P < 0.05 vs 治疗组比较; <sup>d</sup>P < 0.05 vs 治疗组比较.

表2 各组大鼠肝脏组织 I、III 型前胶原 mRNA 表达量(灰度扫描数字转换值)

分组	n	I 型前胶原 mRNA	III 型前胶原 mRNA
造模组	9	1 258.11±229.23	1 587.44±280.62
试验组 I	8	798.25±129.81 <sup>b</sup>	867.38±134.31 <sup>bc</sup>
试验组 II	10	947.1±250.12 <sup>a</sup>	1143.6±238.32 <sup>b</sup>
治疗组	10	959.2±244.64 <sup>a</sup>	1 258.3±344.5 <sup>a</sup>
对照组	6	228.17±50.56	235.83±70.89

<sup>a</sup>P <0.05 vs 造模组比较; <sup>b</sup>P <0.01 vs 造模组比较;<sup>c</sup>P <0.05 vs 治疗组比较; <sup>d</sup>P <0.05 vs 治疗组比较。

### 3 讨论

多种病因所致的慢性肝损伤, 由于肝细胞的变性坏死、纤维组织增生, 最终可发展成肝硬化, 因此, 肝纤维化是慢性肝炎向肝硬化发展的必经阶段。肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应。目前认为, 肝纤维化的发生机制主要是细胞外基质(EMC)的过度增生并在肝内异常沉积<sup>[22-30]</sup>。细胞外基质包括胶原、糖蛋白及蛋白多糖等, 其中胶原是最主要的成分。肝纤维化的形成过程主要取决于胶原的合成、沉积、降解和吸收的动态平衡。当胶原合成与沉积大于降解和吸收时, 肝内胶原纤维增加, 逐渐形成肝纤维化。胶原在正常肝组织中只占蛋白成分的 5-10%, 但在肝硬化组织中可增高到 50% 以上, 而 I 型胶原可占硬化肝脏胶原总量的 60-70%, III 型胶原可占硬化肝脏胶原总量的 20-30%<sup>[31-33]</sup>, 因而 I 型、III 型胶原可作为反应胶原代谢的重要参数<sup>[34-38]</sup>, 观察 I 型、III 型胶原合成的多少, 可以判断抗纤维化药物的疗效<sup>[39,40]</sup>。原位杂交是一项分子病理学技术, 主要检测的是正在表达的基因<sup>[45,46]</sup>, 定位性强, 敏感性高, 有利于对肝纤维化发病机制的研究; 地高辛是近年应用较广的非同位素标记物, 其敏感性高, 具有特异性好, 储存稳定等特点, 同时避免了同位素的污染, 易被人们接受使用<sup>[47-49]</sup>。在肝纤维化的形成过程中, 前胶原 mRNA 的增高先于或同步于胶原的增加, 前胶原的转录过程是胶原合成的限速步骤。与组织学检测相比, 前胶原 mRNA 的测定能更好地反映当时肝脏胶原合成的状况, 并可提示肝纤维化的发展趋势<sup>[41-44]</sup>。

目前, 人们普遍认为, 肝纤维化是可逆的病理过程<sup>[5-8]</sup>。因此, 寻找有效药物, 阻断延缓及逆转肝纤维化的发生和发展是急待解决的问题。抗肝纤维化的治疗, 国内外虽陆续有过一些报道, 但因种种原因尚未找到十分理想的药物, 众多学者仍在进行有益的探索。近些年来, 国内学者报道以中药为主或中西药物联合应用治疗肝纤维化, 动物实验和临床应用均显示出较好的苗头<sup>[47-55]</sup>。苦参素(oxymatrine)又名氧化苦参碱, 系由中药苦豆子中提取的生物碱类, 大量研究表明, 苦参素有抗 HBV 作用, 能阻断肝细胞凋亡、稳定细胞膜、消除自由基、保护肝细胞, 调节免疫功能及防治肝纤维化等作用<sup>[13-19]</sup>。

本实验采用人血白蛋白注射所致免疫诱导性大鼠肝纤维化模型, 用苦参素治疗大鼠肝纤维化。应用苦参素预防和治疗的大鼠, 其肝表面色泽、质地较肝纤维化模型组明显改善, I 型、III 型前胶原 mRNA 均较造模组明显降低, 治疗效果依次为: 试验组 I > 试验组 II > 治疗组 > 模型组。I 型、III 型胶原的免疫组化也显示同样的结果。表明苦参素能有效地抑制大鼠肝内 I 型、III 型胶原的累积; 降低肝纤维化大鼠肝内 I 型、III 型前胶原 mRNA 的表达, 因而推测苦参素可能通过抑制肝脏胶原合成而实现抗纤维化作用, 也可通过抗炎、抗病毒、抑制免疫等环节起到抗肝纤维化作用。而其抑制成纤维细胞的增生及前胶原 mRNA 的表达可能是其抗肝纤维化的主要环节。另外, 鉴于苦参素无明显毒副作用, 有望成为很有前途的抗肝纤维化药物, 其临床疗效还有待进一步深入研究。

### 4 参考文献

- 1 Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998;59:376-380
- 2 Alcolado R, Arthur MJP, Iredale P. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997;92:103-112
- 3 Oberti F, Valsesid E, Pilette C. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616
- 4 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372
- 5 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000;46:443-446
- 6 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- 7 Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9:127-134
- 8 Bai WY, Tao XX, Feng LY. The advance of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1267-1268
- 9 Rodriguez L, Cerbon-Ambriz J, Munoz ML. Effects of colchicine and colchicine in a biochemical model of liver injury and fibrosis. *Arch Med Res* 1998;29:109-116
- 10 Rhoden EL, Pereira-Lima J, Rhoden CR, Mauri M, Pereira-Lima JC, Zettler CG, Barros EG. The role of colchicine in prevention of hepatic cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1111-1115
- 11 Montasser MF, Younis TA, Fahmy IA, Sabry NM, el-Monayerhy MS, Rashad MS. Histopathological evidences for the antifibrogenic effect of colchicine in schistosomiasis mansoni in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 1994;24:155-165
- 12 Yang CQ, Hu GL, Zhou WH, Tan DM, Zhang Z. Effects of colchicines on the expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the livers of rats with hepatic fibrosis. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 2000;18:176-179
- 13 Xiang XX, Wang GJ, Cai X, Li YL. The protective effect of oxymatrine on the fulminant hepatic failure in mice. *Linchuang Gandanbing Zazhi* 2000;16:92-93
- 14 Yu YY, Si CW, Zeng Z, Wang QH, Zhou XQ, Zhang QP, Huang ZH, Zhang LX, Qiao GY. A clinical trial of oxymatrine in treating chronic viral hepatitis type B. *Zhonghua Neike Zazhi* 2001;40:843-846
- 15 Wang JX, Wang GJ, Cai X, He P. Effect of oxymatrine and glycyrrhizin on hepatocyte apoptosis induced by cessation of phenobarbital treatment in mice. *Dier Junyidaxue Xuebao* 1999;20:222-224
- 16 Liu T, Hu JH, Cai Q. Study on the mechanism of Matrine on

- hepatic fibrosis in vitro. *Jiefangjun Yaoxue Xuebao* 2002;16:119-122
- 17 Hu ZL, Zhang JP, Qian DH. Effects of matrine on mouse splenocyte proliferation and release of interleukin-1 and -6 from peritoneal macrophages in vitro [J]. *Zhongguo Ya li Xuebao* 1996;17:259-261
- 18 Tao SC, Wang JZ. Pharmacology of Alkaloids of Sophora Alopecuroides. *Zhongguo Yaixue Zazhi* 1992;27:201-202
- 19 Chen WZ, Zhang JP, Xu Q. effect of matrine on rat liver fibrosis model. *Dier Junyidaxue Xuebao* 1996;17:424-426
- 20 王宝恩, 王志富, 殷蔚黄, 黄受方, 李建军. 实验性免疫性肝纤维化模型的研究. *中华医学杂志* 1989;69:503-505
- 21 Nyberg A, Anna EL, Loof L. Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis: a biochemical marker for progressive liver damage[J]. *Hepatology* 1988;8:142-146
- 22 Isbrucker RA, Oeferson TC. Platelet-derived growth factor and pentoxifylline modulation of collagen synthesis in myofibroblasts. *Toxicology and Applied*[J]. *Pharmacology* 1998;149:120
- 23 Jiang HQ, Zhang XL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:687-689
- 24 Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Arch Pediatr* 2002; 9:392-405
- 25 Murawaki Y, Kawasaki H. Pathophysiology of hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:1143-1152
- 26 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002;99:353-364
- 27 Housset C, Guechot J. Hepatic fibrosis: physiopathology and biological diagnosis. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47:886-894
- 28 Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103:76-85
- 29 Murawaki Y, Kawasaki H. Pathophysiology of hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:1143-1152
- 30 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 31 Schppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagen and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990;10:1-10
- 32 Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, Mackenzie JW, Boyd CD, Deak SB. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 1987;262:1652-1658
- 33 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 34 Rojkind M. Collagen in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979;76:710
- 35 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- 36 Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425
- 37 Suzuki C, Kayano K, Uchida K, Sakaida I, Okita K. Characteristics of the cell proliferation profile of activated rat hepatic stellate cells in vitro in contrast to their fibrogenesis activity. *J Gastroenterol* 2001;36:322-329
- 38 Shiba M, Shimizu I, Yasuda M, Ii K, Ito S. Expression of type I and type III collagens during the course of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Liver* 1998;18:196-204
- 39 Bickel M, Baringhaus KH, Gerl M, Gunzler V, Kanta J, Schmidts L, Stapf M. Selective inhibition of hepatic collagen accumulation in experimental liver fibrosis in rats by a new prolyl 4-hydroxylase inhibitor. *Hepatology* 1998;28:404-411
- 40 Wang Y, Gao Y, Yang JZ. Expression of interstitial collagenase in rats with experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:1004-1006
- 41 Goddard CRJ, Smith A, Hoyland JA. Localization and semiquantitative assessment of hepatic procollagen mRNA in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998;43:433-440
- 42 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM, Zhou XH. Study on the collagen producing cells in experimental liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1998;6:238-240
- 43 Kauschke SG, Knorr A, Heke M, Kohlmeyer J, Schauer M, Theiss G, Waehler R, Burchardt ER. Two assays for measuring fibrosis: reverse transcriptase-polymerase chain reaction of collagen alpha(1) (III) mRNA is an early predictor of subsequent collagen deposition while a novel serum N-terminal procollagen (III) propeptide assay reflects manifest fibrosis in carbon tetrachloride-treated rats. *Anal Biochem* 1999;275:131-140
- 44 Goddard CJ, Smith A, Hoyland JA, Baird P, McMahon RF, Freemont AJ, Shomaf M, Haboubi NY, Warnes TW. Localisation and semiquantitative assessment of hepatic procollagen mRNA in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998;43:433-440
- 45 Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T, Liu F, Ito S. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells in vivo and in vitro. *Gut* 1999;44:127-136
- 46 Cho JJ, Lee YS. Enzyme-linked immunosorbent assay for serum procollagen type III peptide in rats with hepatic fibrosis. *J Vet Med Sci* 1998;60:1213-1220
- 47 Kayano K, Sakaida I, Uchida K, Okita K. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1998;29:642-649
- 48 Yang H, Chen Y, Xu R, Shen W, Chen G. Clinical observation on the long-term therapeutic effects of traditional Chinese medicine for treatment of liver fibrosis. *J Tradit Chin Med* 2000;20:247-250
- 49 Sun YF, Tao XX, Jiang SL. Treatment of Chinese medicine in liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:686-687
- 50 Yao X, Yao XX, Xiu HM, Gao JP, Zhang YZ. Blood-activating and stasis-eliminating effects of concentrated Yigan decoction of Chinese herb on hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:544-548
- 51 Yang Q, Yan YC, Gao YX. Inhibitory effect of Quxianruangan Capsulae on liver fibrosis in rats and chronic hepatitis patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1246-1249
- 52 Liu YK, Shen W. Effect of Cordyceps sinensis on hepatocytic proliferation of experimental hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:388-391
- 53 Yao YX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effect of Yigan Decoction on the expression of type I, III collagen proteins in experimental hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:263-267
- 54 Shen BS, Wong XG, Qiao HC, Lu CH, Han Q, Wang W, Guan HL. Preventive effect of Sanjia Yigan granule in hepatofibrosis in rats. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:386-388
- 55 Sun YF, Yao XX, Jiang SL. Therapeutic effects of traditional Chinese medicine for treatment of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:686-687

# 中药双甲五灵冲剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中TIMPs蛋白及基因表达的影响

谢玉梅,聂青和,周永兴,黄长形,康文臻,张 岩,郝春秋,王九平,朱晓慧

谢玉梅,聂青和,周永兴,黄长形,康文臻,张岩,郝春秋,王九平,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
朱晓慧,中国人民解放军第四军医大学病理教研室 陕西省西安市 710033  
谢玉梅,女,1962-09-02生. 汉族,吉林省长春市人,医学硕士,主治医师,讲师,  
项目负责人:谢玉梅,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心.  
电话:029-3377742 传真:029-3537377  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-16

## Effect of Chinese herb Shuangjiawuling on expression of TIMPs in rat with liver fibrosis

Yu-Mei Xie, Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Chang-Xing Huang, Wen-Zhen Kang, Yan Zhang, Chun-Qiu Hao, Jiu-Ping Wang, Xiao-Hui Zhu

Yu-Mei Xie, Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Chang-Xing Huang, Wen-Zhen Kang, Yan Zhang, Chun-Qiu Hao, Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Disease of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Xiao-Hui Zhu, Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Correspondence to: Yu-Mei Xie, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Disease of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.  
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-16

## Abstract

AIM: To explore the effect of Chinese herb Shuangjiawuling in preventing hepatic fibrosis in rat with liver fibrosis.

METHODS: Rat immunogenic liver fibrosis model was induced by administration human serum albumin (HSA 200 g/L) intravenously, 80 rats were randomly divided into 5 groups. Shuangjiawuling was taken orally simultaneously with (group A), immediately after (group B), or 3 months after (group C) administration of HAS intravenously. Colchicine tablets were taken orally with the administration of HAS (group D), normal rats were used as control (Group E). The pathological changes of liver tissue were observed by HE and Von-Gieson staining. The hepatic mRNA and protein of TIMP-1 and TIMP-2 were analyzed by in site hybridization and immunohistochemistry.

RESULTS: Hepatic fibrosis developed gradually and became obviously on the third month after administration of HAS. And strong expressions of TIMP-1 and TIMP-2 were observed, however, its expression and hepatic fibrosis were reduced dramatically following administration of Shuangjiawuling and colchicine tablets. The effect of Shuangjiawuling in preventing fibrosis was superior to that of colchicine tablets ( $P < 0.05$ ), and its effect in group A, B, and C decreased in order.

CONCLUSION: Chinese herb Shuangjiawuling can inhibit the development of hepatic fibrosis and the expression of TIMPs, and promoted the effect of the degradation of the extracellular matrix.

Xie YM, Nie QH, Zhou YX, Huang CX, Kang WZ, Zhang Y, Hao CQ, Wang JP, Zhu XH. Effect of Chinese herb Shuangjiawuling on expression of TIMPs in rat with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):199-203

## 摘要

目的: 研究在活血化淤基础上辅以软坚散节自制的双甲五灵冲剂对大鼠肝纤维化模型抗纤维化的治疗机制。

方法: 采用免疫诱导型肝纤维化大鼠模型, 80只Wister大鼠, 分为5组, A预防组 造模同时开始喂食双甲五灵冲剂; B治疗组1 在造模结束的同时开始喂食双甲五灵冲剂; C治疗组2 在造模结束3 mo后开始喂食双甲五灵冲剂; D秋水仙碱组 在造模结束的同时开始喂食秋水仙碱; 另设正常对照组10只。采用HE染色观察肝组织改变及Von-Gieson胶原纤维特殊染色以观察肝纤维化程度, 并采用肝组织原位杂交及免疫组织化学染色观察大鼠肝脏组织中TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白的表达强度。

结果: 免疫诱导型肝纤维化大鼠, 在造模结束后肝组织学改变呈进行性加重, 以造模结束后3 mo为著, 其TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白呈强阳性表达, 而经双甲五灵冲剂治疗后的大鼠与模型组大鼠相比, 肝组织结构明显好转, 纤维组织明显减少, TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ), 并且其效果为: 预防组效果最好, 治疗1组较治疗2组效果好, 即造模同时开始喂食双甲五灵冲剂最好, 造模结束同时用药好于造模结束3 mo后用药, 三组均明显优于秋水仙碱组。

结论: 中药双甲五灵冲剂治疗肝纤维化的机制可能通过抑制TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白的表达而降低对MMPs的抑制, 从而有利于MMPs对细胞外基质的降解。

谢玉梅,聂青和,周永兴,黄长形,康文臻,张岩,郝春秋,王九平,朱晓慧. 中药双甲五灵冲剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中TIMPs蛋白及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(2):199-203

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/199.htm>

## 0 引言

病毒性肝炎在我国是常见病,多发病,严重影响患者及家

属的生活质量.在肝炎抗病毒治疗尚未取得突破性进展的今天,防治肝纤维化的发生可以说是治疗慢性肝病的重大决策.肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬变的必经阶段和共同病理途径,现已知肝纤维化是一个可逆性病变,而肝硬化则是一不可逆性病变<sup>[1,2]</sup>.近10 a来,肝纤维化发生机制的研究已取得了长足发展,许多方面的研究结果得以共识.肝纤维化的形成主要由于肝星状细胞(HSC)激活,细胞外基质(extracellular matrix ECM)生成过多,降解相对不足,在肝内大量沉积所致<sup>[3-5]</sup>.影响细胞外基质降解的主要酶是基质金属蛋白酶(mastrix metalloproteinases MMPs)及基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP),MMP是一组能降解ECM的重要蛋白分解酶,而TIMP是一组具有抑制MMP功能的活性多肽,通过对MMP的抑制从而阻止ECM的降解<sup>[6-10]</sup>.

国内外许多学者都在积极探索肝纤维化治疗的有效方法.但至今为止,尚无治疗肝纤维化高效、低毒、价廉而理想的药物.有报道秋水仙碱、D-青霉胺、马洛替酯等药物具有抗肝纤维化的作用,其中秋水仙碱曾一度被认为具有抑制基质生成的作用,并曾应用于一些病例,但由于疗效不佳,毒副作用较大,临床应用受到极大的限制.近年研究发现活血化瘀中药在抗纤维化治疗中较有应用前途<sup>[11-19]</sup>.我们通过对纯中药制剂“双甲五灵冲剂”对免疫损伤性肝纤维化大鼠的治疗,同时选用秋水仙碱作为对照,应用常规病理学及免疫、分子病理学检测技术,以探讨中药治疗肝纤维化的作用机制,为临床应用提供可靠的理论依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wister大鼠,80只,体质量120-150 g(购自第四军医大学实验动物中心).人血白蛋白,购自卫生部兰州生物制品研究所;不完全福氏佐剂(Sigma产品);中药制剂双甲五灵冲剂系第四军医大学唐都医院感染科研制,中药制剂科生产(重要方剂由五味子、灵芝、柴胡、丹参、桃仁、黄芪、鳖甲等中药组成);市售秋水仙碱系昆明制药股份有限公司生产.链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫染色超敏试剂盒(SP-Kit)购自福州迈新生物技术开发公司,产品编号Kit-9710,按试剂盒说明书常规进行免疫组织化学操作;鼠抗TIMP-1和TIMP-2单克隆抗体购自美国Maxim生物技术公司,产品编号分别为MAB-0 282、MAB-0 283.TIMP-1和TIMP-2原位杂交试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,试剂编号为MK 1 549.

1.2 免疫性肝纤维化模型制备 参照王宝恩 et al 应用的人血白蛋白免疫攻击方法制备并加以改良,抗大鼠IgG单克隆抗体购自法国Coulter公司.具体操作方法:将人血白蛋白用生理盐水稀释,与等量的不完全福氏佐剂乳化,每只大鼠皮下多点注射,每次注射0.5 mL(内含人血白蛋白4 mg),共4次,前2次间隔14 d,

第3,4次间隔10 d.末次免疫后10 d取血测抗体,取抗体阳性大鼠作实验,尾静脉攻击注射白蛋白,2次/wk,第1周2.5 mg/只,以后每次攻击增加0.5 mg/只直至4.5 mg/只.维持此剂量2-2.5 mo.

1.3 方法 A组10只为预防组 造模同时开始喂食双甲五灵冲剂,共3 mo,造模结束后存活8只;60只造模组共存活43只,随机分为4组,B组10只为治疗组1 在造模结束的同时开始喂食双甲五灵冲剂,共3 mo;C组10只为治疗组2 在造模结束3 mo后开始喂食双甲五灵冲剂,共3 mo;D组10只为秋水仙碱组 在造模结束的同时开始喂食秋水仙碱,共3 mo;E组模型组13只,以观察肝纤维化自然恢复情况,另设10只为正常对照组.常规HE染色观察肝组织学改变;Von Gieson 胶原纤维特殊颜色.

1.3.1 免疫组织化学染色 石蜡包埋4  $\mu$ m连续切片,采用SP法作免疫组织化学染色.主要步骤:脱腊至水;抗原修复;加10%正常血清封闭20 min;加TIMP-1或TIMP-2 McAb(一抗)或 型胶原单克隆抗体4 过夜;加生物素二抗37 ,恒温30-40 min;加亲和素-过氧化酶溶液37 ,20 min;加DAB显色10 min;苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片,镜检,并照像记录.免疫组织化学法对照实验:为保证实验结果的可靠性,特别是免疫组织化学的特异性,本实验采用省略一抗和二抗,分别用兔血清和磷酸盐缓冲液代替一抗;另设10例正常肝组织做对照.

1.3.2 肝组织原位杂交 按试剂盒说明书常规进行操作,基本步骤为石蜡包埋4  $\mu$ m连续切片,80 烤片后,二甲苯脱蜡,酒精逐级水化,加蛋白酶K消化30 min,酒精逐级脱水固定,37-40 水浴箱内预杂交2 h,将TIMP-1和TIMP-2 cDNA探针95 10 min变性后迅速放入-20 的冰箱内10 min,滴加在经过预杂交处理的肝组织切片上,置37 水浴箱内过夜,依次用2  $\times$  SSC,1  $\times$  SSC,0.2  $\times$  SSC等洗片,滴加Buff缓冲液,滴加封闭液,室温20 min,滴加兔抗地高辛,37 、60 min,滴加生物素化羊抗兔,37 ,30 min,滴加SABC,37 ,30 min,DAB显色,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片,镜检.原位杂交特异性验证实验:空白对照以预杂交液替代TIMP-1和TIMP-2cDNA探针对阳性肝组织切片进行原位杂交.阴性对照用TIMP-1和TIMP-2 cDNA探针对10例正常肝组织进行原位杂交试验.

1.3.3 免疫组织化学法和原位杂交法半定量判断指标 未见阳性细胞(-);阳性细胞占肝小叶全部肝细胞的1/3以下(+);1/3-2/3为(++);2/3以上为(+++).

## 2 结果

2.1 病理学结果 免疫反应休克致死的大鼠肝细胞呈明显空泡样变,肝细胞变性、坏死明显,造膜结束后大鼠的肝组织汇管区中可见纤维组织增生且向肝小叶

内延伸,同时,纤维组织于中央静脉周围增生并与汇管区纤维相连包绕形成假小叶,但纤维间隔较纤细,汇管区及中央静脉周围可见炎细胞浸润,沿界板及其他部位有肝细胞浓染、溶解及小双核细胞(图1).V-G染色 免疫反应致大鼠肝纤维化模型胶原纤维沿汇管区及中央静脉周围向肝小叶内延伸交联成网状结构(图2).

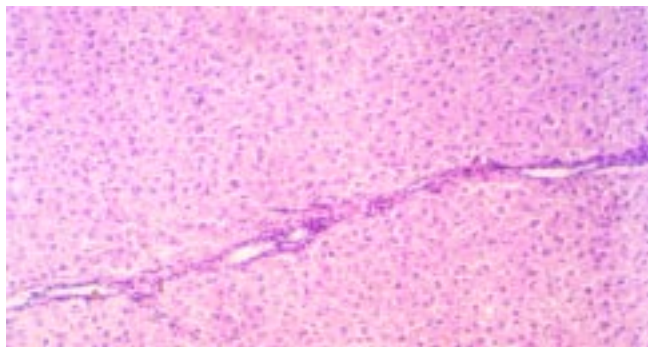


图1 肝纤维化大鼠模型 HE 染色结果( $\times 200$ ).

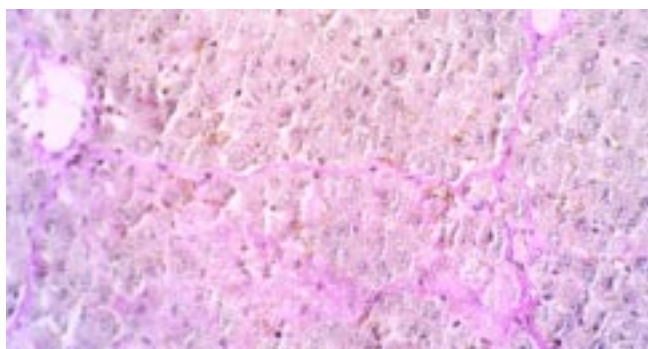


图2 肝纤维化大鼠模型 V-G 染色结果( $\times 200$ ).

表1 大鼠肝组织中 TIMP-1 和 TIMP-2 的免疫组化染色.

分组	n	TIMP-1		TIMP2	
		阴性	阳性	阴性	阳性
预防组	8	5	3	5	5
治疗组 1	10	1	9	2	8
治疗组 2	10	3	7	2	8
秋水仙碱	10	0	10	0	10
观察组	13	0	13	0	13

表2 大鼠肝组织中 TIMP-1 和 TIMP-2mRNA 表达.

分组	n	TIMP-1				TIMP2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
预防组 <sup>a</sup>	8	1	5	2	0	3	4	1	0
治疗组 1 <sup>a</sup>	10	1	3	6	0	2	3	5	0
治疗组 2 <sup>a</sup>	10	1	2	7	0	2	4	4	0
秋水仙碱 <sup>b</sup>	10	0	1	4	5	0	2	4	4
观察组	13	0	0	5	8	0	0	6	7

各组分别 vs 观察组对比<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P > 0.05.

2.2 肝组织原位杂交 原位杂交检测的阳性信号呈现为棕黄色颗粒状,分布在肝细胞质内,未见细胞核着色,呈散在或弥漫性分布(图3).8只预防组经治疗3mo后, TIMP-1 mRNA 的表达强度:弱阳性 5/8, 中等阳性 2/8, 阴性 1/8, TIMP-2mRNA 的表达强度弱阳性 4/8, 中等阳性 1/8, 阴性 3/8; 治疗组 1 经治疗 3mo 后, TIMP-1 mRNA 的表达强度:弱阳性 3/10, 中等阳性 6/10, 阴性 1/10, TIMP-2mRNA 的表达强度弱阳性 3/10, 中等阳性 5/10, 阴性 2/10; 治疗组 2 经治疗 3mo 后, TIMP-1 mRNA 的表达强度:弱阳性 2/10, 中等阳性 7/10, 阴性 1/10, TIMP-2mRNA 的表达强度为弱阳性 4/10, 中等阳性 4/10, 阴性 2/10; 秋水仙碱组经治疗 3mo 后, TIMP-1 mRNA 的表达强度:弱阳性 1/10, 中等阳性 4/10, 强阳性 5/10, TIMP-2mRNA 的表达强度:弱阳性 2/10, 中等阳性 4/10, 强阳性 4/10; 观察组, TIMP-1 mRNA 的表达强度中等阳性者 5/13, 强阳性者 8/13, TIMP-2mRNA 的表达强度中等阳性者 6/13, 强阳性者 7/13. 用预杂交液替代 TIMP-1 和 TIMP-2 cDNA 探针杂交后, 结果为阴性; 10例正常肝组织经过 TIMP-1 和 TIMP-2 cDNA 探针原位杂交后, 结果为阴性; 上述结果表明, TIMP-1 和 TIMP-2 cDNA 探针原位杂交结果是特异性的.

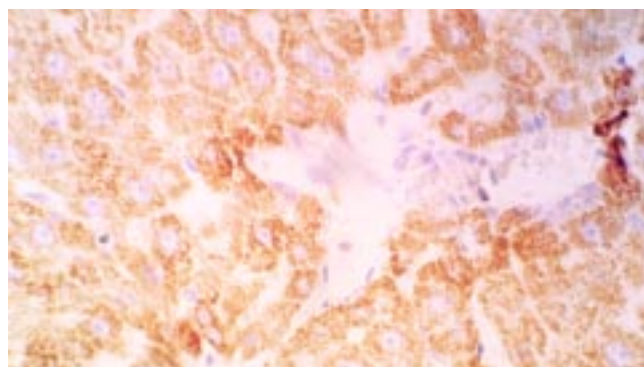


图3 肝纤维化大鼠模型肝组织 TIMP-1 原位杂交结果( $\times 400$ ).

2.3 肝组织免疫组化 免疫组化检测的阳性信号呈现为棕黄色颗粒状,分布在肝细胞质内,未见细胞核着色,呈散在或弥漫性分布.8只预防组经治疗3mo后,肝组织中TIMP-1和TIMP-2蛋白表达的阳性率分别为37.5%和62.5%;治疗组1经治疗3mo后,肝组织中TIMP-1和TIMP-2蛋白表达的阳性率分别为90%和80%;治疗组2经治疗3mo后,肝组织中TIMP-1和TIMP-2蛋白表达的阳性率分别为70%和80%;秋水仙碱组经治疗3mo后,肝组织中TIMP-1和TIMP-2蛋白表达的阳性率分别为100%和100%;观察组,肝组织中TIMP-1和TIMP-2蛋白表达的阳性率分别为100%和100%.省略一抗和二抗后阳性信号消失,分别用兔血清和磷酸盐缓冲液代替第一抗体,结果是阴性.实验证实此免疫组织化学检测结果是特异性的

统计学处理 采用秩和检验的Willcoxon法,各指标之间的相关性采用两因素的相关分析,当P < 0.05时认为有统计学意义.

### 3 讨论

我们采用人血白蛋白注射所致免疫诱导性大鼠肝纤维化模型,其病理学显示:肝脏纤维组织增生向肝小叶内延伸,形成纤维间隔分隔包绕,肝纤维化程度多数在Ⅱ-Ⅲ级。据文献报道此方法所造的免疫诱导性肝纤维化模型持续时间长,自然恢复时间可达280 d,我们在此基础上加以改良,观察肝纤维化病理改变可维持363 d,仍可见肝组织中少量结缔组织的存在,免疫诱导性肝纤维化模型持续时间明显长于肝毒性(如CCl<sub>4</sub>所制模型)诱导所致的肝纤维化模型<sup>[20]</sup>。由于人类的慢性乙、丙型肝炎所致的肝纤维化多为免疫性损伤,因此,此种方法所造模型更接近于慢性病毒性肝炎所致的肝纤维化,可以作为评估药物疗效较好的动物模型。

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础,是肝硬化的必经阶段。肝纤维化是肝细胞损伤后的修复机制,是可逆性病变<sup>[21,22]</sup>,一般认为,肝纤维化的形成过程主要取决于胶原的合成、沉积与降解和吸收的动态平衡,当胶原合成与沉积大于降解与吸收时则肝内胶原纤维增加,逐渐形成肝纤维化<sup>[23-29]</sup>。ECM的降解受一系列酶的催化,即MMPs, MMPs可特异性地分解ECM,对胶原的沉积和组织结构的改建起着重要作用, MMP家族至今已有20个成员被克隆和测序,而肝内发现了8种,肝纤维化早期, MMPs轻度增高,而肝纤维化中晚期MMPs活性则明显降低,以致ECM合成超过降解,引起ECM大量沉积。通过调节MMPs活性,有助于增加基质的降解,促进肝纤维化的逆转<sup>[3]</sup>, MMP1称为间质胶原酶,主要降解Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原; MMP-2(即Ⅱ型胶原酶)主要降解Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原和弹性硬蛋白、纤维连接蛋白以及变性的Ⅰ型胶原,Ⅰ型胶原是构成基底膜的主要成分<sup>[30-34]</sup>。TIMPs目前发现有4种亚型即TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4,而肝脏中仅有TIMP-1和TIMP-2二种亚型的存在,其中TIMP-1主要抑制间质胶原酶即MMP1。近年研究表明,肝纤维化过程中间质胶原酶活性明显下降,而TIMP-1持续超常表达则可能是间质胶原酶下降的主要原因<sup>[35-40]</sup>。

我们观察到:免疫损伤性肝纤维化大鼠在造膜结束后肝组织纤维化程度呈进行性加重之趋势, HE染色、V-G胶原染色均可见纤维组织自汇管区向肝小叶内延伸,交织成网状, TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白呈强阳性表达,以造膜结束后3 mo为著<sup>[20]</sup>,这可能是通过TIMP抑制了MMP的活性从而阻止ECM降解导致大鼠肝纤维化的一个诱因,而经双甲五灵冲剂治疗3 mo后, TIMP-1和TIMP-2 mRNA及蛋白表达与模型组相比均明显降低,提示双甲五灵冲剂抗肝纤维化作用机制可能是通过抑制TIMPs的表达,使其对MMP的抑制作用减弱,有利于MMP对ECM的降解,从而使得肝纤维化发生逆转,为中药在基因水平上抑制实验性肝纤维化大鼠提供了有利的科学依据。

祖国医学应用活血化瘀的原理治疗肝硬变取得了较

好的效果,提示某些中药具有抗纤维化作用。许多中药,如黄芪、丹参、冬虫夏草、桃仁等,已在实验性肝纤维化显示具有阻抑或抗纤维化作用,临床研究证明,长期应用活血化瘀药物,可阻抑肝纤维化发展,甚至使已形成的早期肝硬变逆转<sup>[41]</sup>。双甲五灵冲剂是在五灵丸活血化瘀基础上辅以软肝散结之中药而成,经我科实验室及临床多年研究证实,五灵丸是一保肝、降酶安全有效之良药,在此基础上配以软肝散结之中药,在促进肝细胞恢复的同时,抗肝纤维化可能通过抑制TIMP-1和TIMP-2 mRNA和蛋白的表达而降低对MMP的抑制,促进胶原降解从而有利于ECM的降解;其疗效是预防作用最好,治疗效果是用药越早越好。

### 4 参考文献

- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000;46:443-446
- Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:D26-32
- Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther* 2002;9:127-134
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;29:11069-11076
- Murawaki Y, Kawasaki H. Pathophysiology of hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:1143-1152
- Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002;99:353-364
- Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:76-85
- Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425
- Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372
- Yang H, Chen Y, Xu R, Shen W, Chen G. Clinical observation on the long-term therapeutic effects of traditional Chinese medicine for treatment of liver fibrosis. *J Tradit Chin Med* 2000;20:247-250
- Liu C, Chen W, Liu P, Wang Z, Hu Y, Liu C. Changes of lipid peroxidation in liver fibrogenesis induced by dimethylnitrosamine and drugs' intervention. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:18-20
- Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC. Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Am J Chin Med* 2000;28:175-185
- Huang ZG, Zhai WR, Zhang YE, Zhang XR. Study of heteroserum induced rat liver fibrosis model and its mechanism. *World J Gastroenterol* 1998;4:206-209
- Yang Q, Yan YC, Gao YX. Inhibitory effect of Quxianruangan Capsulae on liver fibrosis in rats and chronic hepatitis patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1246-1249

- 17 Yao X, Yao XX, Xiu HM, Gao JP, Zhang YZ. Blood-activating and stasis-eliminating Chinese herb concentrated Yigan decoction on hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10:544-548
- 18 Xu RY, Ling YB, Wang ZL, Qiu WS, Yang HZ. Therapeutic effect of gan xian fang on liver cirrhosis by hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:866
- 19 Sun YF, Tao XX, Jiang SL. Treatment of Chinese medicine in liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:686-687
- 20 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7: 363-369
- 21 Jiang HQ, Zhang XL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:687-689
- 22 Bai WY, Yao XX, Feng LY. The advance of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1267-1268
- 23 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- 24 Nie QH, Zhou YX, Xie YM. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 81:805-807
- 25 Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Arch Pediatr* 2002; 9:392-405
- 26 Housset C, Guehot J. Hepatic fibrosis: physiopathology and biological diagnosis. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47:886-894
- 27 Szantova M, Kupcova V. Biochemical markers of fibrogenesis in liver diseases. *Bratisl Lek Listy* 1999;100:28-35
- 28 Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002; 3:76-85
- 29 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 30 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372
- 31 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 32 Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
- 33 Wang Y, Gao Y, Yang JZ. Expression of interstitial collagenase in rats with experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:1004-1006
- 34 Gao Y, Wang Y, Yang JZ, Huang YQ. Dynamic expression of matrix metalloproteinases-2 in rats with experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1003-1004
- 35 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000;32:1248-1254
- 36 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:443-453
- 37 Xie YM, Nie QH, Zhou YX, Cheng YQ, Kang WZ. Detection of TIMP-1 and TIMP-2 RNA expressions in cirrhotic liver tissue of patients using digoxigenin labelled probe by in situ hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:251-254
- 38 Wang A, Yang X, Wang W, Zuo F, Wang Q, He F. Effect of recombinant human augmentor of liver regeneration on gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat with experimental liver fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:610-612
- 39 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshiji J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000;32:1248-1254
- 40 McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 2000; 15:1159-1168
- 41 Huang YQ, Gao Y, Yang JZ, Fang SG, Wang Y. Expression of matrix metalloproteinase and its tissue inhibitor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:795-796

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE, IM) 是世界上公认的重要的医学检索工具, 由世界上最大的医学信息中心 - 美国国立医学图书馆 (National Library of Medicine, NLM) 编辑出版. 2002 年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊 58 种, 分别为法医学杂志 (中), 湖南医科大学学报 (中), 华西口腔医学杂志 (中), 华西医科大学学报 (中) 环境科学 (中), 临床耳鼻咽喉科杂志 (中), 色谱 (中), 生理科学进展 (中), 生理学报 (中) 生物工程学报 (中), 生物化学与生物物理学报 (中), 生物医学工程学报 (中) 实验生物学报 (中), **世界胃肠病学杂志 (英)**, 同济医科大学学报 (英), 微生物学报 (中) 卫生研究 (中), 细胞研究 (英), 香港医学杂志 (英) 亚洲男科学杂志 (英文版), 亚洲太平洋公共健康杂志 (英), 眼科学报 (中), 药学报 (中), 遗传学报 (中), 应用生态学报 (中) 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 (中), 中国科学 (C 辑) (英), 中国修复重建外科杂志 (中) 中国药理学报 (英), 中国医疗器械杂志 (中), 中国医学科学院学报 (英), 中国医学科学院学报 (中), 中国应用生理学杂志 (中), 中国中西医结合杂志 (中), 中国中药杂志 (中) 中华病理学杂志 (中), 中华创伤杂志 (英), 中华妇产科杂志 (中), 中华肝脏病杂志 (中) 中华结核和呼吸杂志 (中), 中华口腔医学杂志 (中), 中华内科杂志 (中), 中华烧伤杂志 (中), 中华实验和临床病毒学杂志 (中), 中华外科杂志 (中), 中华血液学杂志 (中), 中华眼科学杂志 (中), 中华医学遗传学杂志 (中), 中华医学杂志 (英), 中华医学杂志 (中), 中华预防医学杂志 (中), 中华整形烧伤外科杂志 (中), 中药材 (中), 中医杂志 (英).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# 正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中的金属蛋白酶组织抑制因子 - 1

聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋

聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市, 710038.

聂青和, 男, 1961-01-07生, 江西省进贤县人, 汉族. 医学博士, 博士后. 副教授, 副主任医师. 从事传染病学临床与实验研究. 以第一作者发表论文100篇, 主编专著2部, 参加专著编写16部; 获军队科技进步二等奖1项, 军队科技进步三等奖2项; 获国家自然科学基金和中国博士后科学基金资助各1项.

中国博士后科学基金资助项目, 中博基[1999]10号

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话: 029-3377742

收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-20

## Expression of TIMP-1 in normal and fibrotic livers in rats

Qing-He Nie, Yu-Mei Xie, Yong-Xing Zhou, Yong-Qian Cheng, Hong Luo, Xin-Dong Luo

Qing-He Nie, Yu-Mei Xie, Yong-Xing Zhou, Yong-Qian Cheng, Hong Luo, Xin-Dong Luo, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038, Shaanxi Province, China.  
nieqinghe@hotmail.com

Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-20

## Abstract

AIM: To investigate the expression of TIMP-1 in normal and experimental fibrotic livers in rats.

METHODS: Hepatic fibrosis rat models were induced with human serum albumin, and normal rats were used as control. TIMP-1 mRNA and its related antigens in liver were examined with immunohistochemistry and in situ hybridization. Expression of TIMP-1 gene was detected with PCR.

RESULTS: The positive signal of TIMP-1 proteins was mainly located in cytoplasm rather than nucleus in hepatic myofibroblasts and fibroblasts, which dominated in portal areas and fibrous septums fibrotic rats. Such distribution of expression of TIMP-1 detected with immunohistochemistry was consistent with that in situ hybridization. The level of TIMP-1 expression in fibrotic rats was obviously higher than that in normal ones.

CONCLUSION: TIMP-1 was expressed dominantly in fibroblast and myofibroblast in fibrotic liver, the expression level increased with progression of liver injury and severity of hepatic fibrosis.

Nie QH, Xie YM, Zhou YX, Cheng YQ, Luo H, Luo XD. Expression of TIMP-1 in normal and fibrotic livers in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(2): 204-208

## 摘要

目的: 了解金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)在正常及实验性肝纤维化大鼠肝组织中的定位及表达状态.

方法: 用人血白蛋白免疫攻击的方法制备实验性免疫性肝纤维化大鼠模型, 以正常大鼠为对照. 采用免疫组化法及原位杂交技术分别检测肝脏中TIMP-1 mRNA和相关抗原表达, 同时用PCR技术检测肝脏中TIMP-1基因水平.

结果: 实验组肝脏中TIMP-1相关抗原表达在肌成纤维细胞、成纤维细胞, 以汇管区及纤维间隔中最明显, 阳性信号位于细胞胞质中, 未见细胞核表达. 原位杂交检测结果也展示了上述相同的分布和定位. 正常大鼠肝组织中可见TIMP-1基因表达, 但表达水平极低. 实验组肝组织中TIMP-1呈高水平表达.

结论: 在肝纤维化中, 成纤维细胞及肌成纤维细胞是TIMP表达的主要细胞. 随着病损肝脏中肝纤维化程度的加重, TIMP-1基因表达水平随之增高.

聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋. 正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中的金属蛋白酶组织抑制因子-1. *世界华人消化杂志* 2003; 11(2): 204-208  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/204.htm>

## 0 引言

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一, 其病理学基础是肝纤维化, 后者是各种损肝因素(如病毒性肝炎等)所致慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程<sup>[1-5]</sup>. 肝纤维化的主要病理变化就是肝细胞外基质(ECM)在肝脏中过多沉积<sup>[6-10]</sup>. 目前研究表明, 肝脏ECM的代谢主要由基质金属蛋白酶(MMPs)所调节, MMPs促进ECM的降解, 而TIMPs通过抑制MMPs阻止ECM的降解, 从而形成和促进肝纤维化<sup>[11-13]</sup>. 但在正常和纤维化肝脏中由哪些细胞表达和合成TIMP-1目前的认识还不尽一致. 为此, 我们应用TIMP-1单克隆抗体(McAb)为试剂, 采用免疫组织化学法, 同时应用TIMP-1 cDNA探针为试剂采用检测正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中TIMPs相关抗原和mRNA的定位及表达状态. 鉴于TIMP-1在肝纤维化形成机制中的重要地位我们还应用PCR技术对其肝脏中TIMP-1基因表达水平进行研究, 现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 动物模型制备 Wistar大鼠, 体重120-150 g, 40只

(购自本校动物中心).参照王宝恩 et al 人应用的人血白蛋白免疫攻击的方法制备大鼠实验性免疫性肝纤维化模型<sup>[14]</sup>, 抗大鼠 IgG 单克隆抗体购自法国 Coulter 公司.同等条件下饲养正常 Wistar 大鼠 20 只做正常对照组.具体选模过程如下:将人血白蛋白(购自卫生部兰州生物制品研究所)用无菌生理盐水稀释, 与等量的不完全福氏佐剂(Sigma 产品)乳化, 每只大鼠皮下多点注射, 每次注射 0.5 ml (内含人血白蛋白 4 mg), 共 4 次, 前 2 次间隔 14 d, 第 3、4 次间隔 10 d.末次免疫后 10 d 取血测抗体, 取抗体阳性大鼠作实验.尾静脉攻击注射人血白蛋白, 2 次/wk.第 1 周 2.5 mg/只, 以后再次攻击增加 0.5 mg, 直至 4.5 mg.维持此量 2 mo.所有动物麻醉后处死取肝脏标本, 一部分置于液氮中, 一部分置于 10 % 甲醛中固定统一备检, 一部分置于戊二醛中固定电镜观察之用.

## 1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 免疫组化染色 具体实验操作参照我们既往开展的 SP 法免疫组化染色法<sup>[15-17]</sup>.鼠抗 TIMP-1 McAb 购自美国 Maxim 生物技术公司, 产品编号为 MAB-0282.主要步骤: (1)石蜡包埋 4  $\mu$ m 连续切片, 脱蜡至水后; (2)抗原修复; (3)加 10 % 正常血清封闭 20 min; (4)加 TIMP-1 或 TIMP-2 McAb(一抗) 4 过夜; (5)加生物素二抗 37 , 恒温 30-40 min; (6)加亲和素-过氧化酶溶液 37 , 20 min; (7)加 DAB 显色 10 min; (8)苏木素复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 镜检并照像记录.

1.2.2 免疫组化对照实验 为保证实验结果的可靠性, 特别是免疫组织化学的特异性, 本实验采用省略一抗和二抗, 分别用兔血清和磷酸盐缓冲液代替一抗.另设 10 例正常肝组织做对照.

1.2.3 图像分析 每一玻片任选 5 个视野, 自动检测阳性细胞面密度, 取其平均值, 进行统计分析.利用本校统计学教研室的统计程序包进行方差分析.

## 1.3 肝组织原位杂交

1.3.1 肝组织原位杂交 具体实验操作参照我们既往开展的地高辛素标记探针原位杂交法<sup>[18-20]</sup>.TIMP-1 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 试剂号 MK1 549.基本步骤为石蜡包埋 4  $\mu$ m 连续切片, 80 烤片后, 二甲苯脱蜡, 酒精逐级水化, 盐酸酸化 30 min, 30 % 过氧化氢 3 ml 封闭 10 min, 加蛋白酶 K 消化 30 min, 酒精逐级脱水固定, 37-40 水浴箱内预杂交 2 h; 将 TIMP-1 或 TIMP-2 cDNA 探针 95 10 min 变性后迅速放入 -20 的冰箱内 10 min, 滴加在经过预杂交处理的肝组织切片上, 置 37 水浴箱内过夜, 依次用 2  $\times$  SSC、1  $\times$  SSC、0.2  $\times$  SSC 等洗片, 滴加 Buff 缓冲液, 滴加封闭液, 室温 20 min, 滴加兔抗地高辛, 37 、60 min, 滴加生物素化羊抗兔, 37 、30 min, 滴加 SABC, 37 、30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片, 镜检并照相记录.

1.3.2 图像结果判定 原位杂交法半定量判断指标:未见

阳性细胞(-);阳性细胞占肝小叶部分肝细胞的 1/3 以下(+);1/3-2/3 为(++);2/3 以上为(+++).

1.3.3 原位杂交特异性确证实验 (1)空白对照:以预杂交液替代 TIMP-1 和 TIMP-2 cDNA 探针对阳性肝组织切片进行杂交.(2)阴性对照:用 TIMP-1 和 TIMP-2 cDNA 探针对 10 例正常肝组织进行原位杂交试验.

## 1.4 TIMP-1 PCR 检测

1.4.1 TIMP-1 PCR 引物序列 见表 1.

表 1 TIMP-1、 $\beta$ -actin 引物序列

引物	核苷酸序列	产物位置(bp)
TIMP-1	正义链 5' -TTCGTGGGGACACCAGAAGTC-3'	482
	反义链 5' -TATCTGGGACCGCAGGGACTG-3'	
$\beta$ -actin	正义链 5' -GGAGAAGATGACCCAGATCA-3'	234
	反义链 5' -GATCTTCATGAGGTAGTCAG-3'	

1.4.2 PCR 反应 用 Promega 公司生产的 Total RNA Isolation System 提取肝组织总 RNA. PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 内含 cDNA 2  $\mu$ l, 10  $\times$  buffer 2  $\mu$ l, 4  $\times$  dNTP(2 mM) 2  $\mu$ l, TIMP-1、 $\beta$ -actin 引物(10 mM) 各 2  $\mu$ l, Taq 酶 1 U 超重水补至 20  $\mu$ l.反应参数为:97 预变性 2 min;94 变性 30 s, 56 退火 30 s, 72 延伸 50 s, 30 个循环;最后 72 延伸 7 min.

1.4.3 扩增产物定量分析 取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ l 加入 2 % 的琼脂糖凝胶孔中在 TAE 缓冲液 50V, 电压电泳 1 h, 溴化乙锭显色后成像定量分析, 用 TIMP-1/ $\beta$ -actin 比值表示 TIMP-1 表达水平.

1.5 病理形态学观察 常规 HE 染色观察肝组织学改变, Von Gieson、Masson 胶原纤维特殊染色观察胶原增生情况等.

1.6 电镜观察 取正常及实验性肝纤维化大鼠新鲜肝脏, 戊二醛固定电镜检查.

统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示.利用本校统计学教研室的统计程序包行方差分析.

## 2 结果

2.1 病理学结果 光镜下可见实验性肝纤维化大鼠肝组织中网状纤维及胶原纤维于汇管区增生, 且向外延伸.同时, 于中央静脉周围增生并沿肝窦散在分布, 互相连结, 纤维结缔组织围绕肝小叶, 可见假小叶形成(图 1).并可在汇管区及中央静脉周围有炎性细胞浸润.对照组肝脏呈正常结构.

2.2 电镜观察 早期可见肝星状细胞(HSC)增生活跃, 内有丰富的粗面内质网和脂质, HSC 周围可见较明显的胶原纤维(图 2).以后可见肌成纤维细胞形成, 分布于汇管区, 其周围有大量胶原沉积, 沉积的胶原形成较宽的分隔(图 3).Disse 间隙内大量胶原纤维沉积.变性的肝细胞中可见大量肿胀的线粒体和少量脂滴.

2.3 TIMP-1 的表达及定位 实验性肝纤维化大鼠肝脏中 TIMP-1 相关抗原表达在肌成纤维细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞中,以汇管区及纤维间隔中最明显.阳性信号呈棕黄色颗粒状,分布于上述细胞质内,未见细胞核着色(图4).正常大鼠肝脏仅在血管内皮细胞中有弱阳性表达.图像分析显示实验组显著高于正常组 ( $P < 0.001$ ),见表2.原位杂交检测结果也展示了上述相同的分布及定位(图5).

2.4 对照实验 为保证免疫组化实验结果的可靠性,本实验采用省略一抗和二抗,分别用鼠血清和磷酸盐缓冲液代替.检测结果均为阴性,实验证实此免疫组化实验结果是特异的.

2.5 原位杂交特异性确证试验 用预杂交液代替 TIMP-1 cDNA 探针杂交后,结果为阴性.

2.6 TIMP-1 基因表达水平 正常大鼠肝组织中可见 TIMP-1 基因表达,但表达水平极低.实验性肝纤维化大鼠肝组织中 TIMP-1 基因表达水平明显高于正常组 ( $P < 0.001$ ),见表3.

表2 大鼠肝脏中 TIMP-1 相关抗原表达

组别	<i>n</i>	TIMP-1
实验组	20	$482.50 \pm 65.00$
正常组	10	$59.80 \pm 20.31$

表3 大鼠肝脏中 TIMP-1 基因表达

组别	<i>n</i>	TIMP-1/ $\beta$ -actin
实验组	20	$1.86 \pm 0.47$
正常组	10	$0.36 \pm 0.08$

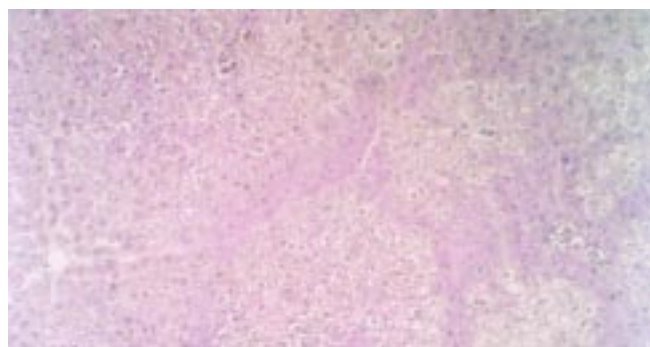


图1 大鼠肝组织 VG 染色(假小叶形成) ( $\times 100$ ).

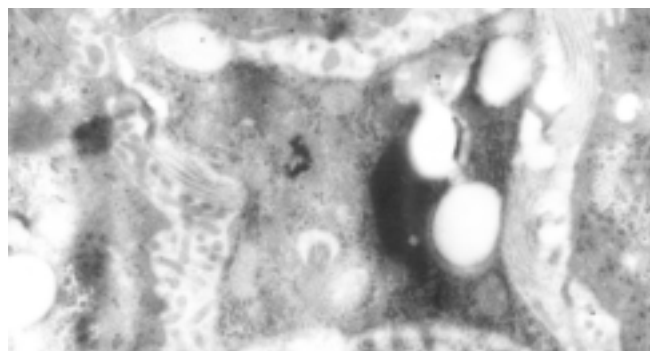


图2 大鼠模型肝脏中激活的肝星状细胞及周围大量胶原纤维(电镜10 K).

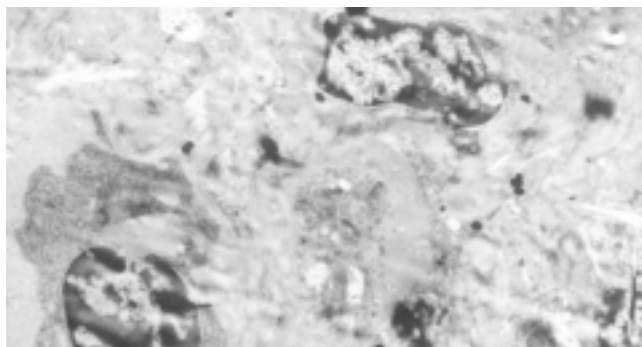


图3 汇管区变大,胶原纤维增生明显,并可见大量成纤维细胞(电镜3 K).

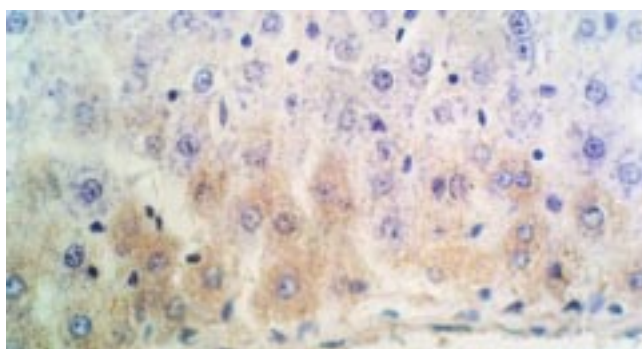


图4 大鼠肝组织中 TIMP-1 免疫组化( $\times 400$ ).

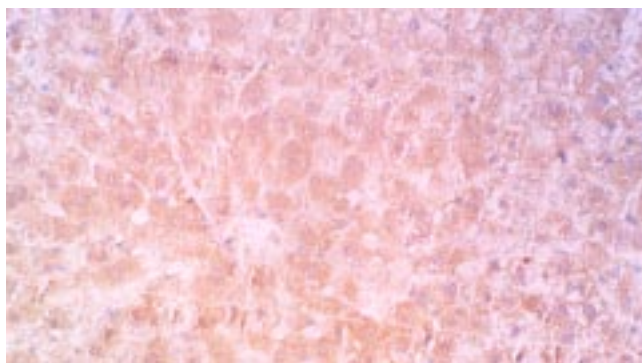


图5 大鼠肝组织中 TIMP-1 原位杂交( $\times 400$ ).

### 3 讨论

选择和建立理想的动物模型是肝纤维化研究的必要条件之一,因为可对其相关病因,重要发病机制,诊断条件的摸索以及研究行之有效的治疗方法并筛选评价抗肝纤维化药物均具有重要意义.理想的动物模型应当是:(1)与人类疾病特征相似;(2)病变有一定发展过程,即明显分期;(3)形成率高,死亡率低;(4)造模方法简便易行;(5)动物易获得,经济实用.

早在1960年代Paronetto和Popper就证明了免疫反应能引起肝损伤<sup>[21]</sup>.抗原可用猪、牛、马血清,猪血白蛋白,血清球蛋白等反复注射,5 wk引起肝纤维化,10 wk引起肝硬化,但由于过敏反应动物死亡率较高.我们在国内王宝恩 et al<sup>[14]</sup>介绍的实验性免疫性肝纤维化模型的基础上,参考多种肝纤维动物模型成功的经验,加以改良,即在造模过程中第1、2次尾静脉攻击时给大鼠注射小剂量地塞米松,使造模过程中

动物死亡率明显下降, 成功率提高. 病理学诊断为肝纤维化, 而且肝纤维化持续时间长达363 d. 此模型形式机制为白蛋白免疫复合物所致的Ⅲ型变态反应. 电镜所见提示上述病理过程激发了静止的肝星状细胞(HSC)增生, 并向肌成纤维细胞转化, 进而分泌大量胶原.

MMPs活性组织抑制物TIMPs, 广泛存在于许多组织中. 目前发现有4种TIMP, 仅有TIMP-1、TIMP-2存在于肝组织中, 他与活性MMPs以1:1浓度结合形成复合体, 从而抑制MMPs的活性, 这种结合是不可逆转的<sup>[22-26]</sup>. TIMPs对MMPs的抑制活性, 由于MMPs的种类不同, 其敏感性存在着差异, 如TIMP-1对MMP-1、前MMP-9; TIMP-2对MMP-2、MMP-9、前MMP-2均显示出较强的抑制活性. 目前发现在病损肝脏中TIMP-1明显增高, 出现的时间较早, 幅度较大, 因此有较多学者把他看作是肝纤维化发生过程中一个非常重要的促发因素, TIMP-1通过对MMP-1等金属蛋白酶活性的抑制促进ECM的沉积, 其中TIMP-1较TIMP-2升高明显. 故而TIMP-1的高表达严重抑制了MMP而反映了肝纤维化的严重程度. 我们进行免疫组化观察发现实验性免疫性肝纤维化大鼠肝脏中仅肌成纤维细胞、成纤维细胞有TIMP-1蛋白的高表达, 以汇管区及纤维间隔中最明显. 而正常大鼠肝仅在血管内皮细胞中有弱阳性表达. 原位杂交检测结果一致.

1997年Roeb et al<sup>[27]</sup>通过原位杂交显示在CC1<sub>4</sub>和胆管结扎大鼠肝损伤模型中, 肝细胞和几乎所有间质细胞均有TIMP-1 mRNA的表达, 以炎症区域中的脂肪样细胞中表达最明显. 而我们观察仅有肌成纤维细胞, 成纤维细胞, 血管内皮细胞中有TIMP-1 mRNA的高表达, 以汇管区及纤维间隔中最为明显, 免疫组化也展示了相同的结果. 这种差异的原因是动物模型不同所致, 还是其他什么因素, 有待进一步研究证实.

TIMP-1基因表达结果分析, 随着肝纤维化程度的加重, 肝组织TIMP-1基因表达水平增强, 这是由于TIMP基因表达增强, 抑制了MMP-1对胶原纤维的降解, 使胶原纤维在肝脏中不断沉积, 导致肝纤维化. TIMP-1基因表达增加, 其表达产物也相应增高, 其血清TIMP-1水平也相应发生改变. 1996年Iredale et al<sup>[28]</sup>从实验性肝纤维化肝脏中分离出肝细胞、肝星状细胞(HSC)、Kupffer细胞, 并行细胞总RNA的Northern杂交发现肝细胞并不表达TIMP-1 mRNA. 我们应用PCR技术检测大鼠肝脏中TIMP-1基因表达, 因取材为肝脏, 包含了肝细胞、HSC、Kupffer细胞等肝脏中存在的细胞群. 正常大鼠肝脏中TIMP-1基因水平表达水平较低, 而肝纤维化大鼠肝脏中TIMP-1基因呈高水平表达. 是否肝细胞不表达TIMP-1有待实验的进一步研究确证. 肝纤维化过程中TIMP-1表达明显增加, 且主要为成纤维细胞, 肌成纤维细胞产生, 这可能是激活HSC的结果, 肝纤维化实质上是慢性肝损伤的修复反应, 主要是由于细胞因子介导的细胞-细胞相互作用, 以及基质细胞相互作用引起的HSC激

活, 反复的肝损伤引起HSC活化的持续. 因此, HSC的激活是肝纤维化过程中的主要病理过程. 有趣的是, 急性肝损伤并不引起肝纤维化. 体外实验也证实, 静止的HSC未见凋亡现象存在<sup>[29]</sup>. 这说明肝纤维化的发生机制较为复杂<sup>[30-38]</sup>, 仍有不少问题有待进一步研究和阐明.

虽然MMPs、TIMPs与肝纤维化的发病机制密切相关, 但对TIMPs的研究只是刚刚开始, 肝纤维化时TIMP-1表达增强的机制尚不十分清楚, 仍有许多问题尚在探索之中<sup>[38-43]</sup>. 加强TIMPs的研究对肝纤维化的诊治及其发病机制的研究具有重要意义.

#### 4 参考文献

- Nie QH, Zhou YX, Xie YM. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *National Med J China* 2001;81:805-807
- George DK, Ramm GA, Walker NI, Powell LW, Crawford DH. Elevated serum type IV collagen: a sensitive indicator of the presence of cirrhosis in haemochromatosis. *J Hepatol* 1999;31:47-52
- Wang FS, Wu ZZ. Current situation in studies of gene therapy for liver cirrhosis and liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:371-373
- Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:S33-38
- Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I and collagen synthesis and distribution of collagen producing cells in carbontetrachloride induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:940-943
- Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol* 1999;34:376-377
- Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:138-145
- Zhu YH, Hu DR, Nie QH, Liu GD, Tan ZX. Study on activation and c-fos, c-jun expression of in vitro cultured human hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:299-302
- Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabblar AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
- Nie QH, Zhou YX, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- Alcolado R, Arthur MIP, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997;92:103-112
- Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998;29:836-842
- Wang BE, Wang ZF, Yin WY. Study on experimental immunity model of hepatic fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1989;69:503-505
- Nie QH, Hu DR, Li MD, Xie Q. The expression of HGV/GBV-C or HCV related antigens in the liver tissue of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:114-115
- Nie QH, Li MD, Hu DR, Li L. The expression of hepatitis G virus-related antigens in the liver tissues of with hepatitis patients. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 2000;18:173-175
- Nie QH, Xie Q, Hu DR, Li MD, Li L. The expression of hepatitis G virus-related antigens in the liver tissue of patients with HGV/GBV-C infection. *Di-san Junyi Daxue Xuebao* 1997;19:394-396
- Nie QH, Hu DR, Li MD, Li L, Zhu YH. Detection of hepatitis G virus RNA in liver tissue using digoxigenin labelled probe by in situ hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:771-774

- 19 Nie QH, Li L, Li MD, Hu DR, Zhu YH. Clinical and immunopathological study on GB virus B (GBV-B) infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:775-781
- 20 Nie QH, Li MD, Hu DR. Detection of GB virus C (GBV-C) RNA in liver tissue using digoxigenin labelled probe by in situ hybridization. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:A365
- 21 Paronetto F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunology reactions. *Am J Pathol* 1966;40:1087-1094
- 22 Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:43-54
- 23 Torres L, Garcia-Trevijano ER, Rodriguez JA, Carretero MV, Bustos M, Fernandez E, Eguinoa E, Mato JM, Avila MA. Induction of TIMP-1 expression in rat hepatic stellate cells and hepatocytes: a new role for homocysteine in liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:12-22
- 24 Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120
- 25 Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabber AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
- 26 Nie QH, Zhou YX, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. The inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMPs in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 27 Roeb E, Puracker E, Breuer B. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997;27:535-542
- 28 Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJP. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase mRNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184
- 29 Pinari M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 30 Liu F, Liu JX, Cao ZC, Li BS, Zhao CY, Kong L, Zhen ZR. Relationship between TGF  $\beta$ 1, serum indexes of liver fibrosis and hepatic tissue pathology in patients with chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:519-521
- 31 Nie QH, Li MD, Hu DR, Chen GZ. Study on the cause of human protective immunodeficiency after HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:28-30
- 32 Wu YA, Kong XT. Anti-hepatic fibrosis effect of pentoxifylling. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:265-266
- 33 Wang GQ, Kong XT. Action of cell factor and Decorin in tissue fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:458-460
- 34 Liu F, Wang XM, Liu JX, Wei MX. Relationship between serum TGF  $\beta$ 1 of chronic hepatitis B and hepatic tissue pathology and hepatic fibrosis quantity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:528-531
- 35 Gu SW, Luo KX, Zhang L, Wu AH, He HT, Weng JY. Relationship between ductule proliferation and liver fibrosis of chronic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:845-847
- 36 Wang Y, Gao Y, Huang YQ, Yu JL, Fang SG. Gelatinase A proenzyme expression in the process of experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:165-167
- 37 Yao XX. Diagnosis and treatment of liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:681-689
- 38 Nie QH, Zhou YX, Xie YM. The localization and expression of TIMP-2 in experiment hepatic fibrosis in rat. *Med J Chin PLA* 2002;27:208-209
- 39 Herbst H, Wege T, Milani S. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659
- 40 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453
- 41 Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Watanabe A. Expression of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in acute liver injury. *J Hepatol* 1999;30:419-424
- 42 Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Jin B, Watanabe A. Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;30:425-432
- 43 Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001;115:725-735

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*®)申报的 2002 年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会务会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801).资助期限 2 年,2003 - 2004 年,资助强度每年 8 万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英)、计算数学(英)、理论物理通讯(英)、中国物理快报(英)、力学学报(英)、分析化学、高等学校化学学报、化学学报、化学通报、中国化学工程学报(英)、世界胃肠病学杂志(英)、作物学报、中国农业科学、中国中西医结合杂志、中国药理学(英)、生物化学与生物物理学报、细胞研究(英)、植物学报(英)、大气科学进展(英)、地球物理学报、地质学报(英)、金属学报、稀土学报(英)、材料科学技术(英)、稀有金属材料与工程、电力系统自动化、计算机科学技术学报(英)、管理科学学报、中国科学(中、英)、科学通报(中、英)。

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

# 肝细胞生长因子抗肝纤维化作用及对MMP-1,TIMP-1表达的影响

宋刘来,罗和生,余保平

宋刘来,罗和生,余保平,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
宋刘来,男,1972-10-22生,安徽省安庆市人,汉族.1996年安徽蚌埠医学院本科毕业,现为武汉大学人民医院硕士研究生,研究方向为消化系统疾病的诊治.  
项目负责人:罗和生,430060,湖北省武汉市,武汉大学人民医院消化内科.  
luotang@public.wh.hb.cn  
收稿日期:2002-07-12 接受日期:2002-07-29

## Effects of hepatocyte growth factor on fibrosis and hepatic expression of MMP-1 andTIMP-1

Liu-Lai Song,He-Sheng Luo,Bao-Ping Yu

Liu-Lai Song, He-Sheng Luo,Bao-Ping Yu,The Devison of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Correspondence to: He-Sheng Luo,The Devison of gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn  
Received:2002-07-12 Accepted:2002-07-29

### Abstract

AIM:To investigate the effect of hepatocyte growth factor (HGF) on severity of liver fibrosis and hepatic expressions of MMP-1,TIMP-1 and to explore the mechanism of HGF in preventing liver fibrosis in rats.

METHODS:Eighty male Wistar rats were randomly divided into normal control group (Group A, 16 rats), liver fibrosis model group (Group B, 54 rats) and HGF therapy group (Group C, 10 rats). The liver fibrosis model was induced by administration CCl<sub>4</sub> intraperitoneally.Rats in Group C had been administered HGF for six weeks and were sacrificed afterwards. Eight rats from each of group A and B were randomly sacrificed on week 6 simultaneously as that in group C. The remaining rats in-group B were randomly further subdivided into liver fibrosis model group (Group D, 12 rats) and HGF therapy group (Group E, 10 rats),HGF was administered to rats in group E on week.7.All rats in group D and E were sacrificed on week 10. Liver function and levels of serum hyaluronic acid (HA), mucin (LN), collagen type IV (CIV), procollagen III (PCIII) were tested; the expression of MMP-1 and TIMP-1 were determined by immunohistochemical staining and analyzed by computer.

RESULTS:Compared with Group B, the serum levels of ALT, AST, HA, LN, CIV, PCIII in Group C were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), MMP-1 activity was slightly increased ( $0.25 \pm 0.02$ , vs  $0.22 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),TIMP-1 activity was markedly reduced ( $0.34 \pm 0.05$ , vs  $0.45 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).TIMP-1 activity in Group E ( $0.31 \pm 0.07$ ) was also markedly reduced in comparison with Group D ( $0.42 \pm 0.06$ ) ( $P < 0.01$ ).

CONCLUSIONS:HGF has obvious effect in preventing development of liver fibrosis; it might facilitate degradation of hepatic fibrotic tissue via increasing the MMP-1 activity and or inhibiting TIMP-1 activity.

Song LL, Luo HS, Yu BP. Effects of hepatocyte growth factor on fibrosis and hepatic expression of MMP-1 andTIMP-1. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):209-213

### 摘要

目的:研究肝细胞生长因子对实验性大鼠肝纤维化的防治作用,及其对大鼠肝脏基质金属蛋白酶1(MMP-1)抑制因子1(TIMP-1)表达的影响,探讨HGF抗肝纤维化作用的可能机制.

方法:将Wistar大鼠80只随机分为正常对照组(A组,16只),肝纤维化模型组I(B组,54只),HGF治疗组I(C组,10只),采用CCl<sub>4</sub>复合因素造模,治疗组于造模同时予HGF 0.5 μg/Kg,ip,qd,6 wk末造模成功处死C组大鼠,同时随机处死A组及B组大鼠各6只;对B组剩下大鼠行二次随机分组为模型对照组II(D组,12只),HGF治疗组II(E组,10只),E组于第7周开始给予HGF治疗,10 wk末处死大鼠.检测大鼠肝功能,血清透明质酸(HA),层粘蛋白(LN),III型前胶原(PCIII),IV型胶原(CIV);免疫组化法检测肝组织MMP-1,TIMP-1的表达.

结果:C组与B组比较,ALT,AST,HA,LN,CIV,PCIII均显著降低( $P < 0.01$ ),MMP-1活性升高( $0.25 \pm 0.02$ , vs  $0.22 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),TIMP-1活性明显降低( $0.34 \pm 0.05$ , vs  $0.45 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ )E组与D组相较,MMP-1活性变化无显著性,TIMP-1活性有明显降低( $0.31 \pm 0.07$ , vs  $0.42 \pm 0.06$ ,  $P < 0.01$ ).

结论:肝细胞生长因子对肝纤维化有明显的防治作用,并可能通过促进MMP-1的活性或抑制TIMP-1活性而促进肝纤维化降解.

宋刘来,罗和生,余保平.肝细胞生长因子抗肝纤维化作用及对MMP-1,TIMP-1表达的影响.世界华人消化杂志 2003;11(2):209-213  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/209.htm>

### 0 引言

肝纤维化是慢性肝病发展到肝硬化的必经病理过程.肝

纤维化进程是可以控制,甚至可以逆转的<sup>[1-13]</sup>.肝纤维化发展的机制和抗肝纤维化治疗一直是国内外研究的热点.近年来肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)抗肝纤维化作用引起关注.国外有文献[14-19]报道应用HGF基因治疗已形成肝纤维化的大鼠模型,可使肝纤维化消散.但关于HGF抗肝纤维化作用的具体机制,尤其是HGF对肝纤维化降解系统的影响尚未见相关报道.我们通过预防性和治疗性给予HGF研究其对实验性大鼠肝纤维化的防治作用,及对肝组织中MMP-1和TIMP-1表达的影响,旨在进一步揭示HGF抗肝纤维化作用的机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 80 只, 体重 120-140 g, 由湖北省动物实验协会提供; HGF 制剂获赠于威海赛洛金药业有限公司, 批号: 国药准字 20 010 003, 国家一类新药; MMP-1, TIMP-1 一抗和二抗均购自北京中山生物技术公司, 为美国山道士公司产品; 透明质酸(HA), 层粘蛋白(LN), III 型前胶原(PcIII), IV 型胶原(CIV)放免试剂盒购自南京建成生物公司; CCl<sub>4</sub> 分析纯, 郑州试剂二厂生产.

1.2 方法 将实验大鼠随机分为正常对照组(A组, 16 只), 肝纤维化模型组 I(B组, 54 只), HGF 治疗组 I(C组, 10 只), 模型制备方法参照文献[20], B组及C组用 1 ml 注射器 ip 0.025 ml CCl<sub>4</sub>+0.15 ml 花生油, 3 次/wk; A组以 0.025 ml NS+0.15 ml 花生油 ip, 3 次/wk, 所有大鼠均自由饮水, 进食条杆状动物饲料. C组于造模同时予 HGF 0.5 μg/Kg, 0.5 ml, ip, qd. 每周给各组大鼠称重以调整用药量. 2, 4 wk 末 B 组随机处死 2-3 只大鼠作病理检查以确定造模情况及了解肝纤维化分期. 6 wk 末造模成功处死 C 组大鼠, 同时随机处死 A, B 组大鼠各 8 只. 对剩下的 B 组大鼠行二次随机分组为模型组 II(D组, 12 只), HGF 治疗组 II(E组, 10 只), E 组大鼠于 7 wk 予 HGF 治疗, 剂量同前, D 组则注射等量生理盐水, 10 wk 末处死所有大鼠. (1) 血清学检测: 将大鼠血清即时送武汉大学人民医院检验科检验肝功能指标. 血清 HA, LN, CIV, PcIII 用 SN-628 放射免疫计数器测定. (2) 免疫组化检测: 肝组织经中性甲

醛固定, 石蜡包埋, 连续切片厚度 4-6 μm, 作 HE 染色, 光镜下作病理学检查, 肝纤维化分期采用 Scheuer 法. 免疫组织化学法测定肝组织 MMP1 和 TIMP1 的表达, 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法(即 S-P 法)染色, DAB 显色, 操作按试剂盒说明进行. 染色结果以棕黄色为阳性, 应用高清晰彩色病理图像免疫组化测量系统(HPLAS-100)进行图像分析, 经标准灰度校正后, 随机取 5 个视野, 测定 MMP1, TIMP1 的平均积分光密度值(IDP).

统计学处理 计量资料用 t 检验, 计数资料 Ridit 检验, P < 0.05 为差异有显著性. (实验中途死亡大鼠均不列入统计)

## 2 结果

实验中 B 组先后有 7 只大鼠死亡, D 组死亡 3 只, E 组死亡 2 只, 其余均存活. 病理学检查, A 组: 肝小叶结构完整, 中央静脉窦周围肝细胞索放射状排列, 肝细胞未见坏死, 汇管区清晰可辨, 无明显炎性细胞浸润. B 组: 可见多个坏死区, 纤维组织明显增生, 肝小叶结构破坏, 有假小叶形成(图 1). C 组: 肝小叶结构基本完整, 偶见小的坏死灶, 纤维间隔略有增宽, 汇管区有轻度炎细胞浸润. D 组所见基本同 B 组, E 组纤维化情况较 D 为轻. Scheuer 分期(见表 1)可见 C 组肝纤维化程度明显低于 B 组, E 组肝纤维化轻于 D 组.

表 1 各组大鼠肝组织肝纤维化 Scheuer 分期

分组	n	S0	S1	S2	S3	S4
A	8	8	0	0	0	0
B	8	0	0	1	2	5
C <sup>b</sup>	10	0	4	5	1	0
D	9	0	0	0	6	3
E <sup>a</sup>	8	0	0	3	4	1

<sup>a</sup>P < 0.05, vs D; <sup>b</sup>P < 0.01, vs B.

2.1 肝功能及肝纤维化指标检测 经 HGF 治疗的 C, E 组 ALT, AST 值较相应的 B, D 组明显降低(P < 0.01). C, E 组肝纤维化 4 项指标较相应模型对照组有显著降低(P < 0.01)(表 2).

2.2 免疫组化检查结果 MMP1 和 TIMP1 在 A 组(正常对照组)仅有微弱表达, 其余各组表达比 A 组均有不同程

表 2 各组大鼠肝功能肝纤维化指标变化及肝组织 MMP-1, TIMP-1 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	肝功能指标				肝纤维化指标(μg/L)				免疫组化检测(IDP)	
		AST(nkat/L)	ALT(nkat/L)	ALB(g/L)	TP(g/L)	HA	LN	PcIII	CIV	MMP-1	TIMP-1
A	8	1380±256	693±167	29.3±1.6	57.9±2.7	83±21	103±18	96±14	42±11	0.07±0.03	0.13±0.04
B	8	3220±674	1869±179	27.4±0.9	57.1±1.1	332±47	167±11	279±32	138±20	0.22±0.05	0.45±0.05 <sup>a</sup>
C	10	1396±174 <sup>b</sup>	920±203 <sup>b</sup>	27.8±1.3	57.4±1.8	125±31 <sup>b</sup>	109±23 <sup>b</sup>	144±24 <sup>b</sup>	56±18 <sup>b</sup>	0.25±0.02 <sup>a</sup>	0.34±0.05
D	9	2942±542	1235±110	26.9±1.2	57.2±0.7	362±58	171±18	275±43	153±29	0.18±0.03	0.42±0.06
E	8	1963±398 <sup>b</sup>	977±193 <sup>b</sup>	27.2±2.4	57.6±2.3	289±37 <sup>b</sup>	135±20 <sup>b</sup>	177±30 <sup>b</sup>	98±23 <sup>b</sup>	0.18±0.04	0.31±0.07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, vs B; <sup>b</sup>P < 0.01, C vs B, E vs D.

度增强(图2-7).HPLAS-1 000图像分析结果(表2)示C组MMP1较B组升高( $P < 0.05$ ), E组与D组差异无显著性;TIMP1活性C组明显低于B组, E组明显低于D组( $P < 0.01$ ).

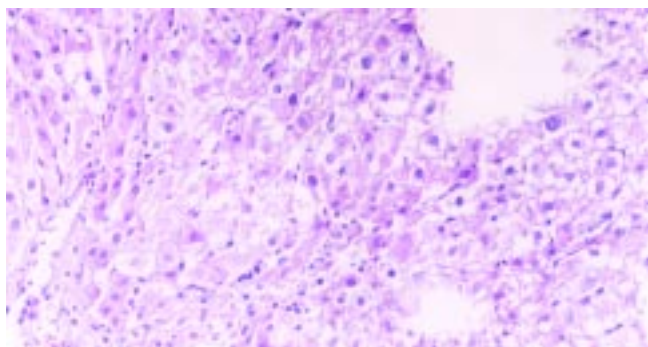


图1 肝纤维化模型组(B组)HE切片:可见若干肝细胞坏死区;小叶间隔增宽,有假小叶形成.

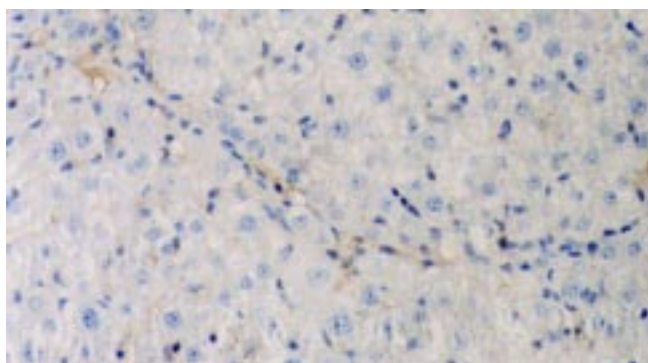


图2 正常肝组织(A组)TIMP-1表达活性很微弱.

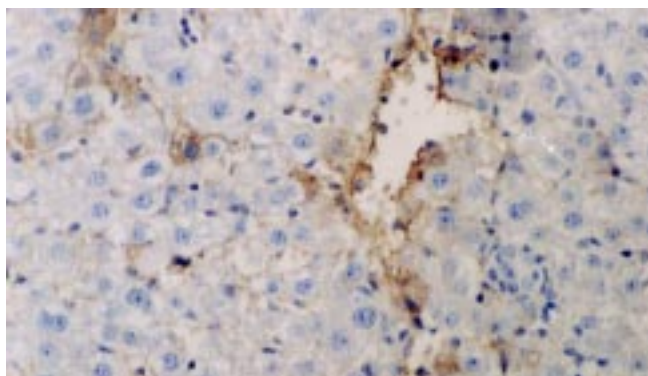


图3 B组MMP-1表达,经HPLAS分析,其活性略低于C组( $P < 0.05$ )

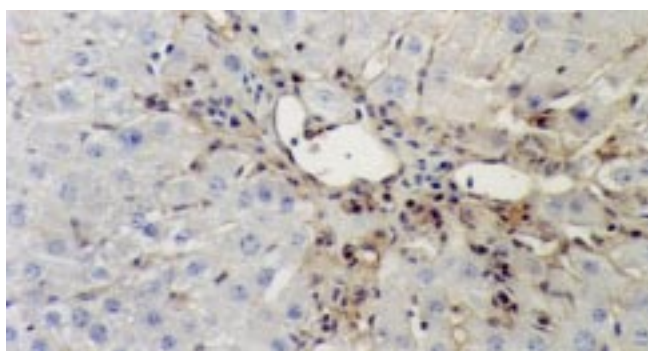


图4 C组MMP-1表达.

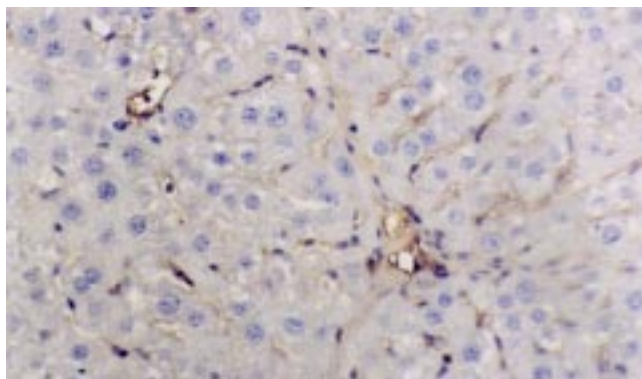


图5 C组TIMP-1表达经分析其活性低于B组( $P < 0.01$ )

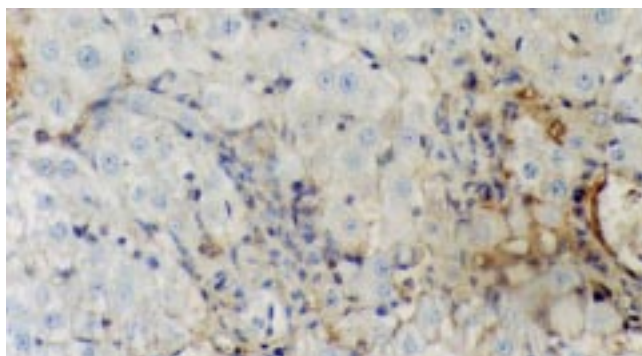


图6 D组TIMP-1表达,经分析其活性明显高于E组( $P < 0.01$ ).

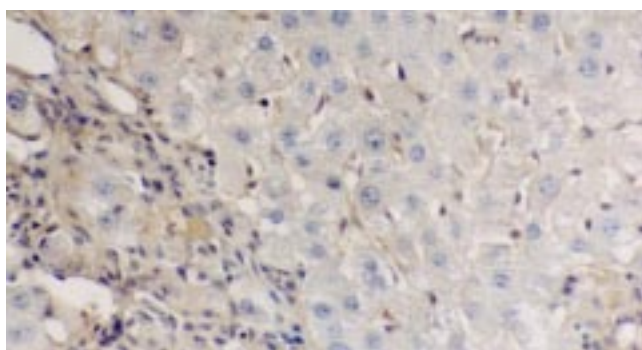


图7 E组TIMP-1表达.以上切片均为 $\times 200$ .

### 3 讨论

肝细胞生长因子(HGF)最初是从血浆和血小板中分离纯化出来并被认为是具有刺激肝细胞再生活性的物质.以后的研究发现HGF是具有多种生物学活性的细胞因子.HGF有刺激肝细胞增生的活性,并可抑制受损肝细胞的凋亡,故有一定的抗肝损伤和预防肝纤维化作用.但HGF抗肝纤维化作用可能是多环节的.沈敏 et al<sup>[21]</sup>报道HGF能显著抑制从大鼠肝脏星状细胞建株的肌成纤维样细胞增生及细胞外基质(ECM)的产生.Ueki et al<sup>[14,16]</sup>应用HGF基因治疗用二甲基亚硝胺制造的肝纤维化大鼠,发现他可使已形成的肝纤维化完全消散,提示HGF抗肝纤维化作用可能还与促进细胞外基质的降解有关.我们的研究表明HGF预防性给药组(C组)和治疗性给药组(E组),肝功能及肝纤维化指标较相应对照组均有明显改善(见表1,2).此外从实验结果还可以看出,

HGF可能促进MMP1的活性,并明显抑制TIMP1活性(表2)。MMP1,TIMP1在ECM的降解中起重要作用<sup>[22-33]</sup>,TIMP-1活性的超常表达或MMP-1活性受抑制被认为是肝纤维化进展的重要因素,因此HGF对MMP-1和TIMP-1的作用可能是其抗肝纤维化的机制之一。总之HGF抗肝纤维化的作用可能有以下几方面:促进肝细胞再生,减少肝细胞凋亡,从而减少肝细胞的坏死与损伤,减轻炎性刺激;抑制肝星状细胞(HSC)的活化与增生,抑制细胞外基质的产生;通过促进基质蛋白酶活性或降低其抑制因子活性表达而促进细胞外基质的降解。

肝纤维化是慢性肝病共同病理基础,他持续发展的中心环节在于肝细胞损伤或坏死引起的炎性反应不断刺激肝组织非实质细胞(主要是HSC)<sup>[34-39]</sup>,导致细胞外基质大量合成与沉积,并超过其降解速度。由于肝纤维化是肝硬变的必经病理过程,多年来一直是研究的热点。目前对肝纤维化机制的研究已由病理组织学发展到细胞学,分子学乃至基因水平。从理论上说,任何可以作用于肝纤维化发生发展的某一环节的药物都可能有抗肝纤维化作用。但迄今为止,人们尚未发现理想的抗肝纤维化药物。已报道的多种抗肝纤维化药物或由于疗效不佳,或由于毒副作用大,其临床应用效果均不甚满意。

HGF有着较为肯定的抗肝纤维化作用,对肝功能有一定保护作用,在实验或临床应用中,尚未发现有明显的毒副反应,因此进一步探讨其抗肝纤维化作用机制,研究新的疗法(如基因治疗),仍具有潜在的科研和临床价值。

#### 4 参考文献

- 张盈涛,裴新明,李欣,李恒力. 螺内酯对纤维化大鼠I/III型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:1120-1124
- 姚希贤,唐有为,姚冬梅,修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠I,III型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:263-267
- 王宇,高毅,俞金龙,黄宇琦,蒋晓青. IFN- $\alpha$ 对大鼠纤维化间质胶原酶基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2001;9:20-23
- 伍严安,高春芳,王伟东,王皓,孔宪涛. 全反式视黄酸对人(I)前胶原启动子活性的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:47-49
- 黄新,李定国,王志荣,魏红山,程计林,展玉涛,徐芹芳,陆汉明. 卵白抑素对肝纤维化大鼠细胞增生及激活素A的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:993-997
- 王全楚,申德林,张成道,许丽芝,聂青和,谢玉梅,周永兴. 中药软肝缩脾丸对肝纤维化大鼠TIMP-1/2蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:379-382
- Liu W, Zhao W, Lu X. Clinical pathological study of treatment of chronic hepatitis with hyperbaric oxygenation. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1153-1157
- Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- Guo MZ, Li XS, Xu HR, Mei ZC, Shen W, Ye XF. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:739-744
- Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- Wojcik JP, Speechley MR, Kertesz AE, Chakrabarti S, Adams PC. Natural history of C282Y homozygotes for hemochromatosis. *Can J Gastroenterol* 2002;16:297-302
- Kang KW, Choi SH, Ha JR, Kim CW, Kim SG. Inhibition of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] (oltipraz) in rats: suppression of transforming growth factor-beta1 and tumor necrosis factor-alpha expression. *Chem Biol Interact* 2002;139:61-77
- Sansoe G, Ferrari A, Castellana CN, Bonardi L, Villa E, Manenti F. Cimetidine administration and tubular creatinine secretion in patients with compensated cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:91-98
- Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-230
- Ozaki I, Zhao G, Mizuta T, Ogawa Y, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase-1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. *J Hepatol* 2002;36:169-178
- Ueki T, Okamoto E, Takeuchi M, Fujimoto J. Perspectives on postgenome medicine: Gene therapy for liver cirrhosis. *Nippon Rinsho* 2001;59:152-156
- Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D33-36
- Yamashita K, Matsuoka H, Ochiai T, Matsushita R, Kubuki Y, Suzuki M, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:83-90
- Sato M, Kakubari M, Kawamura M, Sugimoto J, Matsumoto K, Ishii T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 2000;59:681-690
- 吕鹏,罗和生,余保平. 大鼠肝纤维化模型中肝细胞凋亡及其调控基因的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:165-169
- 沈敏,邱德凯,陈颖,熊伍军. 重组肝细胞再生增强因子丹参苦参对大鼠纤维细胞的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:1129-1133
- Kobayashi H, Li ZX, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Clinical evaluation of serum levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases as predictors of progressive fibrosis in postoperative biliary atresia patients. *J Pediatr Surg* 2002;37:1030-1033
- Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Dilinoleoylphosphatidylcholine prevents transforming growth factor-beta1-mediated collagen accumulation in cultured rat hepatic stellate cells. *J Lab Clin Med* 2002;139:202-210
- Ponomarenko Y, Leo MA, Kroll W, Liebers CS. Effects of alcohol consumption on eight circulating markers of liver fibrosis. *Alcohol* 2002;37:252-255
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- Nie QH, Zhou YN, Xie YM. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:805-807
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247
- Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers for liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81
- Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425
- Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the thresponse: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase. *J Immunol* 2001;167:7017-7026
- Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EQ,

- Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1 (I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001;35:392-398
- 33 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 34 王晓玲, 刘平, 刘成海, 刘成. 拆方扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:663-665
- 35 Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- 36 Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- 37 Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- 38 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- 39 Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:93-101

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到2002年7月,中国被著名检索系统SCI收录的科技期刊数从63种增加到了67种.从制作SCI的美国ISI(美国科学情报所)发布的JCR(期刊引证报告)上的数据看,有指标数据的59种我国科技期刊中,80%以上的期刊影响因子呈上升趋势;约90%的总被引频次都提高了.

在2001年的JCR中,总被引频次超过1000次的中国科技期刊有4个,他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959次),《科学通报》(1628次),《物理学报》(中文版)(1227次),《中国物理快报》(1215次).

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过1,他们是《细胞研究》(2.102)和《世界胃肠病学杂志》(1.445),这两种期刊均为中国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看,进入SCIE的我国科技期刊,有8个期刊排在本学科的中上水平,他们是《力学学报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国物理》,《中国物理快报》,《科学通报》,《中国科学B》,《中国科学E》,《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中,我国有10个期刊被引频次位于中上水平的.他们是:《科学通报》,《高等学校化学学报》(中文版),《中国科学A》,《物理学报》(中文版),《中华医学杂志》,《化学学报》(中文版),《中国物理快报》,《中国有色金属学报》(英文版),《中国科学B》,《中国药理学报》.

在SCI网络版收录的中国科技期刊中,有25个期刊是由中国科学出版社出版的,其中在JCR中有指标的期刊有18个.

另外,除SCI系统外,中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势.例如,在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统EI(工程索引)中,中国被收录的科技期刊从最少时的40种,增加到了2000年的104种.这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部中国科技信息研究所,每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析,定期出版《中国科技期刊引证报告》.以2000年数据看,我国科技期刊的平均影响因子由上一年的0.208上升到0.240,其中影响因子超过1的有20个;总被引频次的平均值达到了192.2次,总被引频次超过1000次的期刊有25个,其中《科学通报》的总被引频次达到了2979次.

目前,我国科技期刊数量已达到4600余种,已经形成了一定的规模,而且门类相对齐全,为我国基础研究的发展和科研成果转化为生产力做出了重要的贡献,但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距.随着中国加入WTO,对于中国的科技期刊,既是机遇又是挑战.我们相信,通过我国学术界和编辑部门的共同努力,一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)

# 核因子- $\kappa$ B 在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义

李军华,于皆平,何小飞,徐细明

李军华,于皆平,徐细明,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
何小飞,咸宁医学院附属医院消化内科 湖北省咸宁市 437100  
李军华,男,1976-07-25生,湖北省天门市人,汉族.武汉大学人民医院消化内科  
硕士研究生,主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究.  
项目负责人:李军华,430060,湖北省武汉市,武汉大学人民医院消化内科.  
lihard@163.com  
电话:02788041911-2135  
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-09-03

## Expression of NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced ulcerative colitis

Jun-Hua Li, Jie-Ping Yu, Xiao-Fei He, Xi-Ming Xu

Jun-Hua Li, Jie-Ping Yu, Xi-Ming Xu, Department of Gastroenterology,  
The Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, HuBei  
Province, China  
Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital  
of Xianning Medical College, Xianning 430071, HuBei Province, China  
Correspondence to: Dr. Jun-Hua Li, Department of Gastroenterology,  
The Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, HuBei  
Province, China. lihard@163.com  
Received: 2002-08-10 Accepted: 2002-09-03

### Abstract

AIM: To investigate the role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats.

METHODS: Ulcerative colitis model in rat was induced by TNBS. The expression of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and ICAM-1 protein in colon tissues were detected by immunohistochemistry. The myeloperoxidase (MPO) activity in colon mucosa was detected by biochemistry. The pathological changes in the colon were examined, the relationships among the activity of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, and MPO were evaluated.

RESULTS: The activity of NF- $\kappa$ B and the expression of TNF- $\alpha$ , ICAM-1 in rats with TNBS-induced colitis was higher than that in normal control ( $P < 0.01$ ), a very significant correlation between the expression of NF- $\kappa$ B:  $52.14 \pm 9.81$ ,  $30.26 \pm 10.20$ ,  $60.73 \pm 13.41$ ,  $45.24 \pm 10.86$  vs  $13.31 \pm 4.76$ ,  $16.95 \pm 6.83$ ,  $11.61 \pm 4.85$ ,  $14.10 \pm 5.76$ ; with TNF- $\alpha$ :  $74.50 \pm 11.20$ ,  $48.11 \pm 5.95$ ,  $84.09 \pm 14.52$ ,  $53.40 \pm 8.79$  vs  $16.99 \pm 5.48$ ,  $20.04 \pm 6.76$ ,  $10.13 \pm 1.79$ ,  $16.03 \pm 6.21$ ; ICAM-1:  $68.15 \pm 7.25$ ,  $44.34 \pm 7.54$ ,  $77.69 \pm 8.09$ ,  $47.01 \pm 8.82$  vs  $15.34 \pm 4.03$ ,  $17.50 \pm 6.95$ ,  $10.33 \pm 2.38$ ,  $13.41 \pm 4.91$ ; MPO:  $1.69 \pm 0.11$ ,  $0.71 \pm 0.06$  vs  $0.39 \pm 0.07$ ,  $0.31 \pm 0.08$ ; ICAM-1, MPO activity, macroscopic and histological changes in TNBS-induced colitis was found, respectively ( $r = 0.9304$ ,  $0.8680$ ,  $0.6865$ ,  $0.9292$ ,  $0.8462$ ;  $P < 0.001$  or  $P < 0.005$ ).

CONCLUSION: NF- $\kappa$ B may play an important role in the pathogenesis of ulcerative colitis in rats.

Li JH, Yu JP, He XF, Xu XM. Expression of NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):214-218

### 摘要

目的: 观察大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织核因子- $\kappa$ B (NF-

$\kappa$ B)及 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 的表达, 探讨 NF- $\kappa$ B 在溃疡性结肠炎发病过程中的作用。

方法: 采用三硝基苯磺酸(TNBS)制备大鼠溃疡性结肠炎模型, 设正常组、生理盐水组及轻、重模型组共4组。采用免疫组织化学染色检测肠组织NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 和ICAM-1表达, 生化方法检测MPO含量, 并分析NF- $\kappa$ B活性与肠道病理损伤指数、MPO含量、TNF- $\alpha$ 及ICAM-1表达的关系。

结果: 溃疡性结肠炎大鼠肠组织中NF- $\kappa$ B活性, TNF- $\alpha$ 、ICAM-1表达及MPO含量较正常组及生理盐水组显著增高(NF- $\kappa$ B:  $52.14 \pm 9.81$ 、 $30.26 \pm 10.20$ 、 $60.73 \pm 13.41$ 、 $45.24 \pm 10.86$  vs  $13.31 \pm 4.76$ 、 $16.95 \pm 6.83$ 、 $11.61 \pm 4.85$ 、 $14.10 \pm 5.76$ ; TNF- $\alpha$ :  $74.50 \pm 11.20$ 、 $48.11 \pm 5.95$ 、 $84.09 \pm 14.52$ 、 $53.40 \pm 8.79$  vs  $16.99 \pm 5.48$ 、 $20.04 \pm 6.76$ 、 $10.13 \pm 1.79$ 、 $16.03 \pm 6.21$ ; ICAM-1:  $68.15 \pm 7.25$ 、 $44.34 \pm 7.54$ 、 $77.69 \pm 8.09$ 、 $47.01 \pm 8.82$  vs  $15.34 \pm 4.03$ 、 $17.50 \pm 6.95$ 、 $10.33 \pm 2.38$ 、 $13.41 \pm 4.91$ ; MPO:  $1.69 \pm 0.11$ 、 $0.71 \pm 0.06$  vs  $0.39 \pm 0.07$ 、 $0.31 \pm 0.08$ ;  $P < 0.01$ ), 且在病情严重组增高尤为明显。NF- $\kappa$ B表达水平与TNF- $\alpha$ 和ICAM-1阳性细胞密度、MPO含量、肠道病理损伤指数呈显著正相关关系( $r$ 分别为 $0.9304$ 、 $0.8680$ 、 $0.6865$ 、 $0.9292$ 、 $0.8462$ ;  $P < 0.001$  或  $P < 0.005$ )。

结论: NF- $\kappa$ B在溃疡性结肠炎发病过程中可能起重要作用。

李军华,于皆平,何小飞,徐细明. 核因子- $\kappa$ B在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2003;11(2):214-218

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/214.htm>

### 0 引言

溃疡性结肠炎(UC)为慢性非特异性的肠道炎症性疾病, 近年来, 国内报道逐渐增多<sup>[1]</sup>, 但其病因、发病机制尚未完全明确<sup>[2-4]</sup>。一般认为, 免疫异常是其发病的主要原因<sup>[5-7]</sup>。近年研究表明细胞因子, 黏附分子及其他炎性递质表达异常与UC免疫病理机制关系密切<sup>[8-16]</sup>。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是一具有多向性转录调节作用的核蛋白因子, 广泛参与多种基因特别是免疫炎症反应相关基因的表达调控<sup>[17-23]</sup>, 在机体炎症反应过程中发挥重要作用。目前有关NF- $\kappa$ B与溃疡性结肠炎关系的研究尚未见报道。本研究通过观察大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织中NF- $\kappa$ B活性变化及其与肠组织病理改变、炎性损伤之间的关系, 探讨NF- $\kappa$ B与溃疡性结肠

炎发病关系及在其发生发展中的作用, 进一步阐明溃疡性结肠炎的发病机制, 为临床治疗开辟新的途径.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** (1)动物:SPF 级健康成年 SD 大鼠 32 只, 雌雄不拘, 体重 150-200 g, 正常喂养.由湖北省医学科学院实验动物中心提供.(2)主要试剂:2、4、6-三硝基苯磺酸(TNBS)(Sigma USA); NF- $\kappa$ B P<sub>65</sub>、TNF- 和 ICAM-1 单克隆抗体(santa cruz biotechnology 公司);SP 试剂盒为北京中山公司产品;MPO 检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;其他试剂为进口或国产分析纯.

**1.2 方法** 32 只 SD 大鼠随机分为正常组、生理盐水组、模型组、组共 4 组, 正常组不作任何处理, 生理盐水组(NS 组)以 0.9 % 生理盐水溶液代替三硝基苯磺酸(TNBS)作阴性对照.模型组以 TNBS 灌肠制备溃疡性结肠炎模型.大鼠溃疡性结肠炎模型制备,实验大鼠术前禁食 24 h,自由饮水.实验时乙醚麻醉后,用一直径 2.0 mm, 长约 12 cm 的硅胶管由肛门轻缓插入深约 8 cm, 生理盐水组以 1 ml/ 只的 0.9 % 生理盐水溶液, 模型组、组分别以含 50 mg/kg、150 mg/kg TNBS 的 50 % 乙醇溶液缓缓推入结肠, 诱导轻重不同的溃疡性结肠炎形成.动物保持平躺自然清醒.模型建立 3 wk 后处死动物, 取肛门至盲肠段结肠(约 8 cm), 沿肠系膜纵轴剪开, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态评分.肠组织一部分以 4.0 % 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 连续切片,HE 染色镜下评价炎症和溃疡,另一部分 -20 冻存,用以 MPO 检测.肠组织 NF- $\kappa$ B、TNF- 和 ICAM-1 的表达, 采用免疫组织化学 SP 法,取石蜡切片(4  $\mu$ m)常规脱蜡、水化, 置 0.05 M 柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复, 凉至室温; 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,滴加 10 % 正常血清封闭非特异性抗原,倾去血清,滴加 1:100 稀释的 NF- $\kappa$ B、TNF- 和 ICAM-1 抗体; 4 放置过夜, PBS 冲洗 3  $\times$  5 min, 滴加生物素化二抗, 37 孵育 10 min, PBS 冲洗 3  $\times$  5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的卵白素工作液,37 孵育 15 min; DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片.阳性对照为已知的 TNF- 和 ICAM-1 蛋白, 以 PBS 代替一抗作阴性对照.每张切片随机选取 5 个高倍视野, 计数 1 000 个细胞, 计算阳性细胞百分比; 以 16 D 目镜测微网(面积为 0.1 024 mm<sup>2</sup>) 在 400 倍放大下计数阳性细胞数, 每张切片计算 10 个网格取平均值为阳性细胞密度.结肠组织 MPO 含量测定, 采用生化方法, 具体操作按试剂盒说明书进行.结肠组织损伤大体形态和组织学形态评分方法<sup>[24,25]</sup>:大体形态损伤评分指标包括粘连、局部充血、溃疡及炎症.粘连及充血按有无及轻重分别计 0、1、2 分, 出现炎症、溃疡数目增加 1 个、溃疡面积 > 2 cm 时范围每增加 1 cm 计分均加 1.组织学指标包括溃疡、炎症、肉芽肿、纤维化及病变深度, 按有无及轻重分别计 0、1、2 分, 病变深度达黏膜

下层、肌层、浆膜层分别计 1、2、3 分, 各项相加得总分.

统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 组间差异采用 q 检验, 相关关系分析采用直线相关分析.以  $P < 0.01$  为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 肠组织损伤大体形态及组织学评分结果** 模型组大鼠结肠标本表现为黏膜充血水肿、溃疡形成, 结肠组织与周围组织粘连, 可见近端肠腔扩张.溃疡呈线状和灶状, 周围可见黏膜增厚, 肠腔狭窄.炎症及溃疡位于盲肠部与肛门之间.光镜下可见溃疡及炎性渗出物, 有淋巴组织增生, 大量中性粒细胞浸润, 可见数量不等的单个核细胞和嗜酸性粒细胞, 同时可见增生的纤维母细胞;与模型组相比, 模型组大鼠肠组织损伤的大体形态及组织学评分明显增高( $P < 0.01$ ), 见图 1, 表 1.

表 1 各组大鼠结肠大体形态和组织学损伤评分及 MPO 活性( $\bar{x} \pm s$ ).

组别	大体形态评分	组织学评分	MPO 含量(U/g 组织)
正常组	0.75 $\pm$ 0.71	1.13 $\pm$ 0.83	0.31 $\pm$ 0.08
生理盐水组	1.63 $\pm$ 0.74	1.38 $\pm$ 0.52	0.39 $\pm$ 0.07
模型组	2.00 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	3.88 $\pm$ 0.99 <sup>bd</sup>	0.71 $\pm$ 0.06 <sup>bd</sup>
模型组	6.25 $\pm$ 1.39 <sup>bdf</sup>	6.24 $\pm$ 1.04 <sup>bdf</sup>	1.69 $\pm$ 0.11 <sup>bdf</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 正常组; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs 生理盐水组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs 模型组.

**2.2 NF- $\kappa$ B P<sub>65</sub> 在肠组织中的表达** NF- $\kappa$ B 阳性表达细胞胞核和胞质都有着色, 以胞核为主, 阳性着色细胞主要为黏膜固有层单核细胞, 肠上皮细胞也有少量着色.正常组及生理盐水组仅见微弱的 NF- $\kappa$ B 表达(14.10  $\pm$  5.76, 16.95  $\pm$  6.38), 模型组、组 NF- $\kappa$ B 表达水平明显增高(45.24  $\pm$  10.86, 60.73  $\pm$  13.41  $P < 0.01$ ), 尤其以模型组更为明显( $P < 0.01$ ), 见表 2、图 2.

**2.3 TNF- 和 ICAM-1 免疫组织化学染色结果** TNF- 和 ICAM-1 阳性表达细胞表现以胞质呈棕褐色为主, 胞核也有少量着色.阳性表达细胞有中性粒细胞、单个核细胞等, 多集中于靠近肌层的黏膜固有层内, 肠上皮细胞仅有少量阳性表达, 黏膜内小血管内皮细胞也可见 ICAM-1 阳性表达.见图 3、4.正常组及生理盐水组肠组织仅见极少量的 TNF- 及 ICAM-1 蛋白表达, 模型组有不同程度的阳性染色, 阳性率和阳性细胞密度明显高于正常组及生理盐水组( $P < 0.01$ ), 模型组中组阳性表达明显高于组( $P < 0.01$ ), 见表 2.

**2.4 肠组织 MPO 含量结果** 模型组与正常组及生理盐水组相比, 肠组织 MPO 含量显著上升(0.71  $\pm$  0.06, 1.69  $\pm$  0.11 vs 0.31  $\pm$  0.08, 0.39  $\pm$  0.07,  $P < 0.01$ ), 模型组组则明显高于模型组( $P < 0.01$ ), 见表 1.

**2.5 溃疡性结肠炎大鼠肠组织 NF- $\kappa$ B 表达与肠组织病理损伤指数相关分析** 溃疡性结肠炎大鼠肠组织 NF- $\kappa$ B

阳性细胞密度与肠组织损伤大体形态及组织学评分及 MPO 含量呈显著正相关关系( $r$  分别为 0.9 292, 0.8 462, 0.6 865  $P < 0.005$ ).

## 2.6 溃疡性结肠炎大鼠肠组织 NF- $\kappa$ B 表达与 TNF-

和 ICAM-1 蛋白表达的相关分析 溃疡性结肠炎大鼠肠组织 NF- $\kappa$ B 阳性细胞密度与 TNF- 和 ICAM-1 蛋白阳性细胞密度呈显著正相关关系( $r$  分别为 0.9 304, 0.8 680  $P < 0.001$ ).

表 2 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 在各组大鼠肠组织的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	NF- $\kappa$ B		TNF- $\alpha$		ICAM-1	
	阳性率(%)	阳性密度	阳性率(%)	阳性密度	阳性率(%)	阳性密度
正常组	11.61 $\pm$ 4.85	14.10 $\pm$ 5.76	10.13 $\pm$ 1.79	16.03 $\pm$ 6.21	10.33 $\pm$ 2.38	13.41 $\pm$ 4.91
NS 组	13.31 $\pm$ 4.76	16.95 $\pm$ 6.83	16.99 $\pm$ 5.48	20.04 $\pm$ 6.76	15.34 $\pm$ 4.03	17.50 $\pm$ 6.95
模型 组	30.26 $\pm$ 10.20 <sup>bd</sup>	45.24 $\pm$ 10.86 <sup>bd</sup>	48.11 $\pm$ 5.95 <sup>bd</sup>	53.40 $\pm$ 8.79 <sup>bd</sup>	44.34 $\pm$ 7.54 <sup>bd</sup>	47.01 $\pm$ 8.82 <sup>bd</sup>
模型 组	52.14 $\pm$ 9.81 <sup>bdf</sup>	60.73 $\pm$ 13.41 <sup>bdf</sup>	74.50 $\pm$ 11.20 <sup>bdf</sup>	84.09 $\pm$ 14.52 <sup>bdf</sup>	68.15 $\pm$ 7.25 <sup>bdf</sup>	77.69 $\pm$ 8.09 <sup>bdf</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 正常组; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , vs 生理盐水组; <sup>f</sup> $P < 0.01$ , vs 模型 组

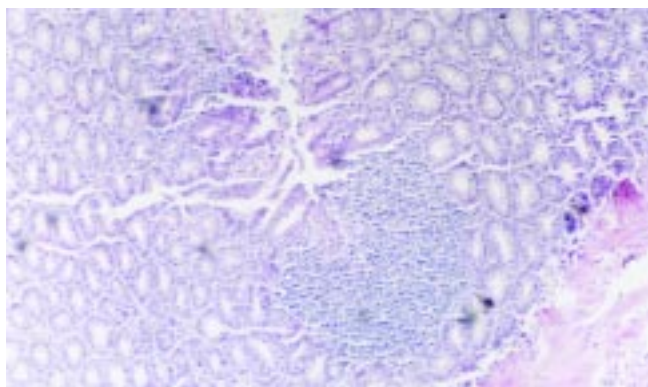


图 1 大鼠 UC 肠组织炎性浸润, 溃疡形成(HE 染色 200 $\times$ ).

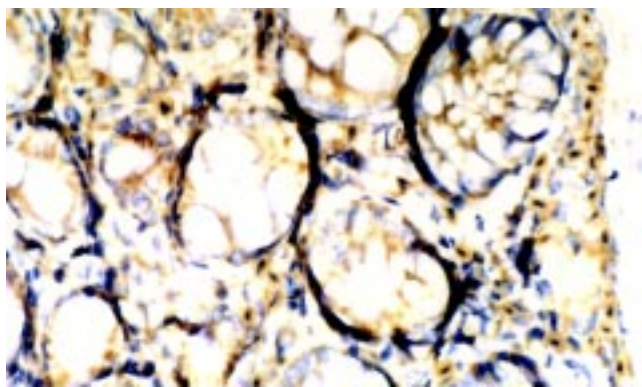


图 4 ICAM-1 在大鼠 UC 肠组织的阳性表达(免疫组化 S-P 法 400 $\times$ ).

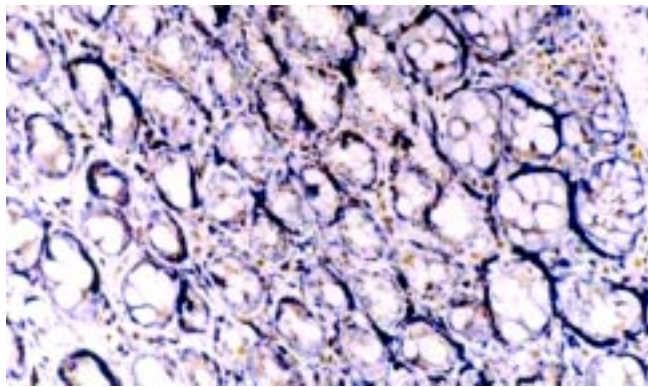


图 2 NF- $\kappa$ B 在大鼠 UC 肠组织的阳性表达(免疫组化 S-P 法 200 $\times$ ).

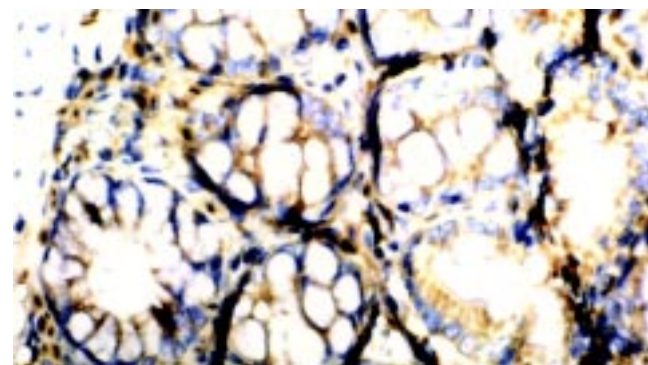


图 3 TNF- $\alpha$  在大鼠 UC 肠组织的阳性表达(免疫组化 S-P 法 400 $\times$ ).

## 3 讨论

核因子- $\kappa$ B 作为调节细胞基因转录的关键因子,具有广泛的生物学活性,在机体免疫应答、炎症反应及细胞的生长调控等方面发挥重要的作用<sup>[17-22]</sup>,已成为众多领域研究的热点.但其与溃疡性结肠炎关系的研究国内尚未见报道.我们采用三硝基苯磺酸(TNBS)诱导形成大鼠溃疡性结肠炎,并以不同剂量 TNBS 制备病情轻重不一的疾病模型,通过免疫组化染色检测 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达,结果发现,在大鼠溃疡性结肠炎模型组中, NF- $\kappa$ B 的表达水平明显增强,且在大剂量 TNBS 的模型 组尤为明显.提示 NF- $\kappa$ B 可能在溃疡性结肠炎的发病机制中起重要作用.

溃疡性结肠炎是肠道炎性疾病,肠道局部炎性损伤是其重要病理改变,以大量炎性细胞浸润肠壁和持续活化其特征.现已证实<sup>[9-15]</sup>,多种炎性因子表达异常参与了溃疡性结肠炎的病理损伤过程,而 TNF- 和 ICAM-1 则是较受关注的因子之一,且在 TNF- 和 ICAM-1 基因序列上均含有 NF- $\kappa$ B 的结合位点. TNF- 是来源于单核巨噬细胞的细胞因子,具有广泛的前炎性活性,能诱导黏附分子在上皮细胞及淋巴细胞的表达,诱导趋化因子产生,介导炎性白细胞向炎症局部聚集<sup>[26,27]</sup>; ICAM-1 可介导炎性白细胞与血管内皮细胞、上皮细

胞稳定黏附,使炎性细胞定位于炎症部位<sup>[28-30]</sup>。二者在炎性细胞浸润及肠道炎症形成过程中起重要作用。我们的研究表明,与正常组和生理盐水组大鼠相比,模型组大鼠肠组织中 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 阳性表达率和阳性细胞密度显著增高( $P < 0.01$ ),且模型组高于模型组,说明 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的异常与溃疡性结肠炎的发病有关,且其表达与疾病病情严重程度也有关系,这与过去的结论一致<sup>[8,31-34]</sup>。

NF- $\kappa$ B 最常见的形式是由 P<sub>50</sub> 与 P<sub>65</sub> 亚基组成的异二聚体,在静息状态下, NF- $\kappa$ B 与抑制因子 I $\kappa$ B 单体耦联,以无活性的形式存在于细胞质中,在外界多种因素刺激下, I $\kappa$ B 磷酸化后降解, NF- $\kappa$ B 得以释放并移入核内与靶基因序列上特定的结合位点结合,启动或调节基因转录<sup>[22,35]</sup>;其参与多种与机体免疫炎症反应密切相关的基因转录,如细胞因子(IL-2、IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$  等)、黏附分子(ICAM-1、VCAM、ELAM、E-selection 等)以及 T 细胞受体和 INF- $\gamma$  等<sup>[17-23]</sup>。这些因子在炎性细胞的活化、趋化、浸润等过程中有重要作用。Jobin et al<sup>[36]</sup> 在大鼠肠上皮细胞系 CEI-6 细胞中发现 TNF- $\alpha$  可以激活 NF- $\kappa$ B 而促使 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达上升,而采用蛋白酶抑制剂 MG-132 或 ALLN 阻断 I $\kappa$ B 降解过程,可明显降低 NF- $\kappa$ B 活性和 ICAM-1 基因表达。有研究证实,脂多糖刺激 NF- $\kappa$ B 活化后可促进单核细胞分泌 IL-1、TNF- $\alpha$  增多,后者通过正反馈作用又激活单核细胞的 NF- $\kappa$ B 使自身分泌量进一步增加,引起级联反应<sup>[37]</sup>。我们的结果发现,在大鼠溃疡性结肠炎肠组织中 NF- $\kappa$ B 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 阳性表达呈正相关关系,因此我们推测, NF- $\kappa$ B 可能通过调控炎性因子 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 基因转录,参与了溃疡性结肠炎的炎性损害过程。

本实验结果还显示,溃疡性结肠炎大鼠肠组织 NF- $\kappa$ B 表达水平与肠道病理损害的大体形态和组织学评分指数及髓过氧化物酶(MPO)含量呈显著性正相关关系,而 MPO 是中性粒细胞中含量较高的一种酶,在单核细胞和巨噬细胞中也少量存在,其含量可间接反映组织炎性细胞的浸润程度<sup>[38,39]</sup>,提示溃疡性结肠炎肠组织 NF- $\kappa$ B 表达量可反映肠组织的病理损害程度,对于溃疡性结肠炎病情的评估及治疗效果的判断,可能具有潜在的指导意义。

总之,我们的研究提示,NF- $\kappa$ B 与溃疡性结肠炎的发病关系密切,对肠组织中炎性因子 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 等基因转录的调控可能是其作用的机制之一,其表达量也可作为评价肠道病理损害的指标之一。但 NF- $\kappa$ B 在溃疡性结肠炎中活化机制以及对炎性因子表达调控的具体过程等均有待于进一步的研究。

#### 4 参考文献

- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- Xu G, Tian KL, Liu GP, Zhong XJ, Tang SL, Sun YP. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:575-576

- Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- Salupere R. Inflammatory bowel disease in Estonia: a prospective epidemiologic study 1993-1998. *World J Gastroenterol* 2001;7:387-388
- Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000;6:861-865
- MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9
- Xia B, Guo HJ, Crusius J, Deng CS, Meuwissen S, Pena A. In vitro production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and sIL-2R in Chinese patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4:252-255
- Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2000;32:552-560
- Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, Bannai H, Ishizuka K, Asakura H. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion* 1998;59:73-78
- Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999;5:515-517
- Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2441-2446
- Brown KA, Back SJ, Ruchelli ED, Markowitz J, Mascarenhas M, Verma R, Piccoli DA, Baldassano RN. Lamina propria and circulating interleukin-6 in newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2603-2608
- Vainer B, Nielsen OH. Changed colonic profile of P-selectin, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000;121:242-247
- Kolios G, Petoumenos C, Nakos A. Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1601-1609
- Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002;104:185-192
- May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B. *J Immunol Today* 1998;19:80-88
- Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA. *J Nature* 1998;391:410-413
- Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998;38:981-993
- Baldwin AS Jr. The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3-6
- Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of the immune response. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260
- Neurath MF, Becker K, Barbusescu K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-860
- Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996;38:568-573
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-391
- Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Scholmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999;116:238-245

- 27 Lampinen M, Carlson M, Sangfelt P, Taha Y, Thorn M, Loof L, Raab Y, Venge P. IL-5 and TNF-alpha participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:2004-2009
- 28 Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:267-276
- 29 Sans M, Panes J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, Palacin A, Fernandez-Checa JC, Anderson DC, Lobb R, Pique JM. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999;116:874-883
- 30 Wu RQ, Xu YX, Song XH, Chen LJ, Meng XJ. Adhesion molecule and proinflammatory cytokine gene expression in hepatic sinusoidal endothelial cells following cecal ligation and puncture. *World J Gastroenterol* 2001;7:128-130
- 31 Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999;34:66-74
- 32 Louis E. The immuno-inflammatory reaction in Crohn's disease and ulcerative colitis: characterisation, genetics and clinical application. Focus on TNF alpha. *Acta Gastroenterol Belg* 2001;64:1-5
- 33 Brandtzaeg P. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogenesis? *Acta Odontol Scand* 2001;59:235-243
- 34 Vainer B, Nielsen OH, Horn T. Comparative studies of the colonic in situ expression of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, and -3), beta2 integrins (LFA-1, Mac-1, and p150, 95), and PECAM-1 in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1115-1124
- 35 Cong B, Li SJ, Yao YX, Zhu GJ, Ling YL. Effect of cholecystokinin octapeptide on tumor necrosis factor alpha transcription and nuclear factor-kappaB activity induced by lipopolysaccharide in rat pulmonary interstitial macrophages. *World J Gastroenterol* 2002;8:718-723
- 36 Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB. Mediation by NF-kB of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* 1998;42:779-787
- 37 Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappaB in cytokine gene regulation. *AM J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:3-9
- 38 Zhu F, Qian J, Pan G, Quan S. The effect of interleukin-1 beta interleukin-8 in the pathogenesis of experimental colitis and evaluation of interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Zhongguo Yixuekexueyuan Xuebao* 1998;20:388-394
- 39 Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152

## 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中。综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分。通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号

# 小鼠骨髓树突状细胞改良培养及体外生物学特性的比较

王全楚,冯志华,周永兴,聂青和,郝春秋,王九平

王全楚,冯志华,周永兴,聂青和,郝春秋,王九平,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
王全楚,男,1966-11-13生,湖北省云梦县人,汉族,主治医师,博士研究生,1990年第一军医大学军医系本科毕业,1997 硕士,2001 年始在导师周永兴教授指导下从事病毒性肝炎基因治疗的研究,共发表论文 30 篇,参加编写医学专著 9 部,国家自然科学基金课题, No. 30170822  
项目负责人:冯志华,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. quanchuwang998@hotmail.com  
电话:029-3577595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-19

## Comparative research of dendritic cells cultured from mice bone marrow with different ways

Quan-Chu Wang,Zhi-Hua Feng,Yong-Xing Zhou,Qing-He Nie,  
Chu-Qiou Hao, Jiou-Ping Wang

Quan-Chu Wang,Zhi-Hua Feng,Rong-Xing Zhou,Qing-He Nie,  
Chu-Qiou Hao, Jiou-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Affiliated Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.39800122  
Correspondence to: Zhi-Hua Feng, The Center of Diagnosis and Treatment of infection diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. quanchuwang998@hotmail.com  
Received:2002-10-25 Accepted:2002-11-19

## Abstract

AIM:To compare the biological characteristics of cultured mice bone marrow dendritic cell (BM-DC) in cultural media with peritoneum or with growth stimulating factor.

METHODS:DC progenitors of were isolated from bone marrow of Balb/C mice, and transformed into DC cell by culturing with secretary fluid of peritoneum, mGM-CSF, and mIL-4, respectively. The biological features and immunity of the DC cells were studied with mixed lymphocyte reaction, immunohistochemistry staining, light microscope and scanning electronic microscope.

RESULTS:After culturing for 6-8 days, the number of BM-DC ( $6 \times 10^6$ ) released from proliferating colony in media containing mGM-CSF and mIL-4 was higher than that in media containing peritoneum without significant difference. High level of expressed CD86 on BM-DC was demonstrated on day 7 in culture, MLR results indicated that the stimulating ability for proliferation of T cell was higher in media with mGM-CSF, mIL-4 than that with peritoneum, while the control media without stimulating factors showed no ability to stimulate the growth of T cells

CONCLUSION:These observations demonstrated that auto-peritoneum can substitute for cytokines in media and stimulate the growth of bone marrow-derived DCs, which possess the corresponding cellular biological features and cellular immunity.

Wang QC,Feng ZH,Zhou YX, Nie QH,Hao CQ,Wang JP.Comparative research of dendritic cells cultured from mice bone marrow with different ways.Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):219-223

## 摘要

目的:探讨小鼠骨髓树突状细胞体外生物学特性及用自体腹膜培养基代替细胞因子刺激树突状细胞体外生长的可能性。

方法:无菌取小鼠的骨髓分离、培养 DC 前体,分别以小鼠腹膜分泌液和重组细胞因子 mGM-CSF,mIL-4 刺激培养使 DC 前体转化为 DC,再用混合淋巴细胞增生反应 (MLR)、细胞免疫组织化学染色及光镜、扫描电镜观察二种 DC 生物特性及免疫活性的差异。

结果:培养 6-8 d,二种方法培养的骨髓 DC (BM-DC)均有大量细胞从集落中释放,并呈成熟状态,重组 mGM-CSF, mIL-4 刺激培养的 DC 得率稍高 ( $6 \times 10^6$ ) 于腹膜培养组 ( $3 \times 10^6$ ),但无显著性差异;培养 7 d BM-DC 的 B7-2 表达较高,呈强阳性,混合淋巴细胞反应 (MLR) 中均表现出有强烈刺激同种 T 细胞增生的能力;尤以重组 mGM-CSF, mIL-4 组明显高于腹膜培养组,未加任何处理的空白对照组中 DC 前体具有非成熟 DC 的形态及功能特征,且无刺激同种 T 细胞增生的能力。

结论:实验结果提示用自体腹膜培养基代替细胞因子刺激树突状细胞体外生长可获得一定数量的树突状细胞并具有相应的生物学特性及功能,基本能满足实验研究的需要,为基层单位开展树突状细胞的研究提供了可能性。

王全楚,冯志华,周永兴,聂青和,郝春秋,王九平.小鼠骨髓树突状细胞改良培养及体外生物学特性的比较.世界华人消化杂志 2003;11(2):219-223  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/219.htm>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的专职抗原递呈细胞,在免疫反应中起着举足轻重的作用,因此备受重视<sup>[1,2]</sup>。1990 年以来,人们在体外诱导扩增 DC 成功之后,克服了以往由于 DC 在组织中含量少、难以获取的困难,使 DC 研究取得了许多突破性的进展,为人们探索新的疾病防治手段开辟了新的天地<sup>[3-11]</sup>。体外诱生 DC 有许多不同的方案。骨髓、脐血和外周血干细胞、外周血单核细胞,都可以作为前体来诱导分化为 DC,尽管用不同的前体细胞扩增 DC 的方法各不相同,但 GM-CSF 似乎是必不可少的<sup>[12-22]</sup>。IL-4 往往与 GM-CSF 同时使用,特别是将外周血单个核细胞或单核细胞作为前体时。但重组细胞因子存在价格昂贵、保存时间短等缺点,我们根据小鼠自体腹膜可以分泌 GM-CSF 的特点,用腹膜分泌液培养基代替细胞因子

刺激树突状细胞体外生长的可能性.那么这两种细胞的生物特性之间存在什么样的差异?为此,我们将相同来源的DC在不同条件下进行体外培养<sup>[23-28]</sup>,对二种DC的生长发育、生物学特征及免疫学功能进行初步探讨.

## 1 材料和方法

1.1 材料 8-10 wk Balb/c 小鼠(H-2 Kd),购自第四军医大学实验动物中心.红细胞裂解液(139.6 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,16.96 mmol/L Tris,用1 mol/L HCl调pH至7.2)本室配制;GNK缓冲液(8 g/L NaCl,0.4 g/LKCl,1.77 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,0.6 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,0.2 g/L葡萄糖,0.01 g/L酚红)本室配制,这两种缓冲液均高压灭菌,4℃保存.RPMI 1640完全培养基:由RPMI 1640干粉10.4 g/L(购自GIBCO公司),HEPES  $2 \times 10^{-2}$  mol/L、L-谷氨酰胺  $2 \times 10^{-3}$  mol/L、2-巯基乙醇0.05 mol/L、非必需氨基酸0.1 mol/L、丙酮酸钠1 mol/L、双抗(青霉素100 KU/L、链霉素0.1 g/L)和100 mL/L灭活的胎牛血清(购自GIBCO公司)构成.鼠重组GM-CSF(mrGM-CSF)为GIBCOL公司产品,MTT试剂为华美生物技术公司产品.大鼠抗小鼠H-2<sup>b</sup>,I-A<sup>b</sup>,B7-2等单抗、羊抗大鼠二抗及FITC标记的羊抗大鼠二抗购自Pharmingen公司.腹膜培养基的制备:Balb/c 小鼠10只,颈椎脱臼处死,无菌取腹膜4×5 cm大小用Hanks液冲洗3次,接种于加有RPMI 1640完全培养液+20%FBS的90 mm培养皿中,于37℃,50 mL/L  $\text{CO}_2$  孵箱内培养3 d后,即可自动分泌GM-CSF等细胞因子,培养基过滤除菌,将此分泌液分次加入BM-DC的培养基中.

1.2 方法 Balb/c 小鼠10只,颈椎脱臼处死,无菌取双侧股骨和胫骨,用GKN液冲洗出骨髓,制成细胞悬液,清洗后1:10的体积比加入37℃预温的红细胞裂解液,反复吹打混匀,室温,2-4 min,加GKN10 mL终止反应,离心洗涤后,用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /L,接种于6孔培养板,每孔2 mL,加入细胞因子mrGM-CSF,IL-4各20 μg/L或腹膜培养液1 mL隔天筛选换液.分别在不同天数收取以上两种细胞,制成细胞甩片或细胞涂片,-20℃保存备用,并作部分Gimesa染色片.取-20℃冷藏细胞甩片或细胞涂片,复温后用冷丙酮固定10 min,干燥后用0.01 mol/L PBS洗2次,5 min/次,按常规免疫组织化学染色方法依次用0.3 mL/L的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,Avidin液,Biotin液、10 g/LBSA封闭;加一抗B7-2和相应Biotin化的二抗,再加ABC复合物及DAB显色,以上各步骤间均以PBS液洗3次,最后脱水封片.以相应的同型抗体染色作阴性对照.取Balb/c 小鼠6只,无菌开腹取脾细胞,清洗破血去红细胞膜后,制成1 mL细胞悬液,尼龙毛柱分离T细胞,调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$ /L备用.收集培养4,7,10 d的BM-DC,丝裂霉素C处理后(25 g/L,37℃水浴30 min),RPMI 1640洗3次,调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /L备用.取DC和T细胞各0.1 mL,加入96孔培

养板作混合培养,同时设单一T细胞孔和单一DC孔作对照,培养72 h.加入四甲基偶氮唑盐(MTT)10 μg,37℃继续孵育4 h,弃去孔内培养液,每孔加入DMSO150 μL,振荡10 min,使结晶物充分溶解,在酶免疫检测仪上测各孔A490值,计算刺激指数(stimulatory index),SI=实验孔A值/对照孔A值.

## 2 结果

2.1 DC的光镜和扫描电镜观察 每只小鼠能分离出骨髓细胞约 $(3.5-4.0) \times 10^7$ 个,包括造血干细胞及内皮细胞、成纤维细胞等.经24 h培养后,在贴壁细胞表面有许多集落出现,以粒细胞集落居多,48 h后筛选吸弃悬浮的集落细胞,剩小部分半贴壁半悬浮的DC集落存在,到第4天时,此类半贴壁集落数量剧增,集落表面的细胞可见有长短不一的突起(图1,2).继续培养至6-8 d,集落丰富,并开始有大量细胞从集落中释放出来(图2),释放的细胞突起较长.细胞涂片Gimesa染色可见细胞核偏位,突起较多.每只小鼠在mGM-CSF和mIL-4培养7-8 d DC的得率约为  $6 \times 10^6$ 个.每只小鼠腹膜培养24-48 h后,有大量贴壁细胞贴壁生长,少量DC前体细胞半贴壁状散在分布,经筛选、扩增培养,4 d时DC数量增多,但只形成小集落(图3).7-8 d,DC数量较多,并有部分细胞悬浮,悬浮细胞有小的突起,同时在此阶段细胞有一明显的增生高峰,出现大量半贴壁半悬浮的集落,集落表面的细胞有小的突起(图4).10 d起,集落依然大量存在,并有部分细胞从集落上缓慢释放,细胞涂片Gimesa染色见细胞核偏位,胞质内有大量的囊泡结构.每只小鼠在7-8 d DC的得率约为 $(2-3) \times 10^6$ 个.用扫描电镜检测细胞表面突起,显示了DC的基本形态,从细胞表面伸出许多的翼状突起,突起表面几乎没有肌动蛋白,表现为典型的树突状特征.这一形态特征与DC的功能有密切关系,这使其能有效地摄取抗原并选择性地作用于体内数量极少的抗原特异性淋巴细胞.4 d免疫组织化学染色BM-DC仅MHC和B7-2呈弱阳性,7 d BM-DC的MHC、B7-2表达较高,呈强阳性(图6).

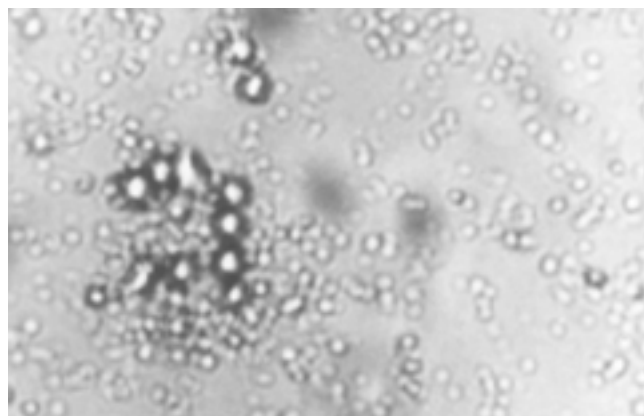


图1 GM-CSF+IL-4培养4 d BM-DC,有细胞集落形成,×100.

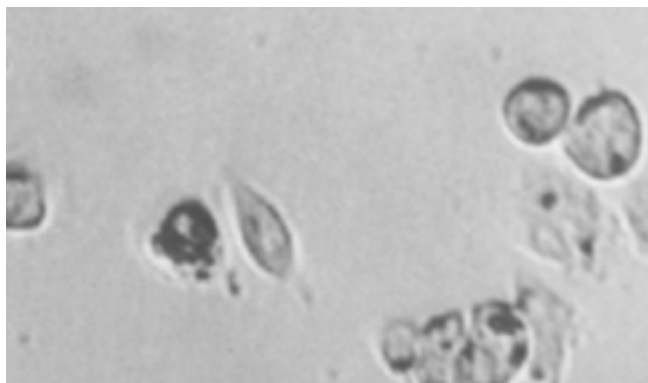


图2 GM-CSF+IL-4 培养 7 d BM-DC,细胞聚集,大集落形成,× 200.

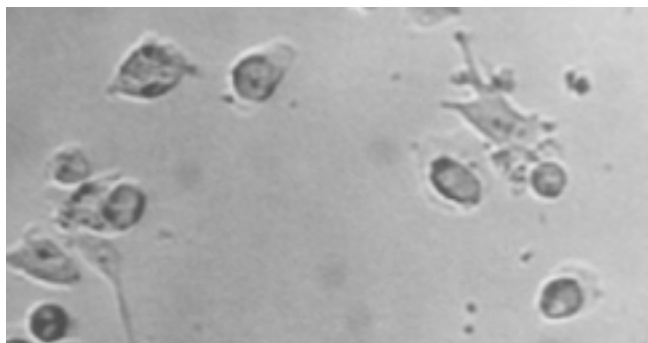


图3 腹膜分泌液培养 4 d BM-DC,细胞增生,开始形成小集落,× 200.

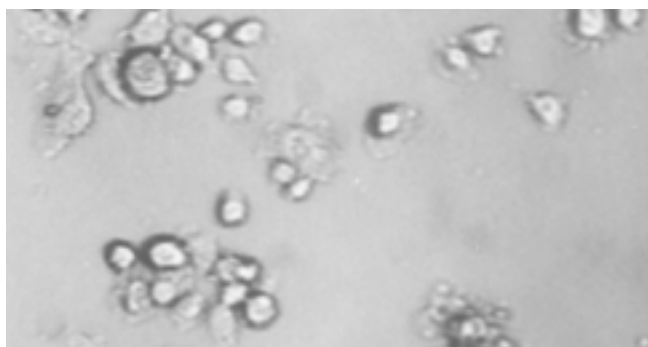


图4 腹膜分泌液培养 7 d BM-DC,增生高峰期,有大量集落生成,× 200.

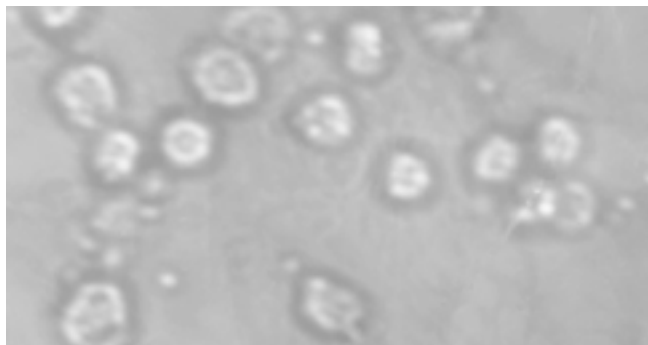


图5 培养 7 d BM-DC,细胞表面形成棘突样标志,× 400

2.2 混合淋巴细胞增生反应(MLR) 培养 4 d 细胞因子组 Balb/c 小鼠的 BM-DC 仅轻度促进 Balb/c 小鼠 T 细胞的增生,第 7 天 BM-DC 刺激 T 细胞增生的能力增强,刺激指数约为 2-3 倍;培养 7 d 腹膜组 DC 无刺激 T 细胞增生的能力,但培养第 10 天 DC 却表现出

一定的刺激 T 细胞增生的能力(图 7).数据经 t 检验 ( $P < 0.05$ )有统计学意义(表 1).

表 1 小鼠脾细胞对 BM-DC 增生反应的刺激指数( $n=5$ )

分组	4 d	7 d	10 d
1 细胞因子组	2.685 <sup>a</sup>	2.935 <sup>ac</sup>	2.234 <sup>a</sup>
2 腹膜刺激组	2.138 <sup>a</sup>	1.803 <sup>a</sup>	2.457 <sup>a</sup>
3T 细胞对照	1.216	1.178	1.018

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组, <sup>c</sup> $P < 0.05$  1 组 vs 2 组.



图6 培养 7 d BM-DC,B7-2 免疫组织化学染色呈强阳性,× 400.

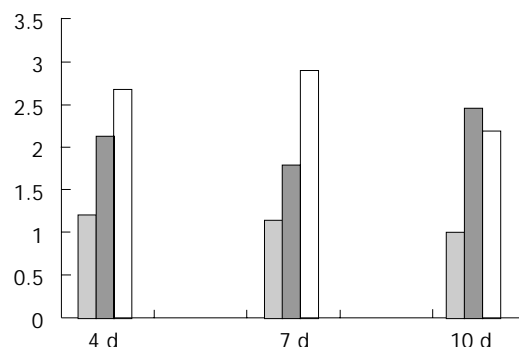


图7 不同培养时间的二组 BM-DC 刺激同种异体小鼠 T 细胞增生.

### 3 讨论

自 1993 年 Inaba et al 用 GM-CSF 体外成功扩增 DC 以来,DC 的研究得到迅速发展.骨髓中造血干细胞接种培养后,在 GM-CSF、IL-4 等的作用下能向 DC 方向分化,经历了一个由未成熟向成熟 DC 发育的过程.早期未成熟 DC 的突起少, MHC 分子及共刺激分子 B7-1、B7-2 的表达非常低,无刺激 T 细胞增生的能力.成熟后,细胞突起增多, MHC 分子及共刺激分子的表达明显升高,能强烈刺激 T 细胞的增生<sup>[29-32]</sup>.这与我们观察到的实验结果完全符合,即培养 6-8 d 后 BM-DC 已基本成熟.分离得到的 DC 前体细胞较少, DC 生长发育非常缓慢,开始时仅少量的 DC 前体细胞在贴壁细胞的表面散在分布.培养 4 d,DC 前体细胞才开始出现小的集落.至 6-8 d, DC 前体细胞数量增多,并出现一增生高峰,有大量的半贴壁半悬浮集落生成;少量悬浮细胞有小的突起.此时 DC 细胞表面分子 MHC class I,II 和共刺激分子 B7-1,B7-2 的表达都极低,几乎没有刺激同种异体 T 细胞增生的能

力.这种 DC 的生物免疫特性与未成熟 DC 非常相似,可能是诱导 T 细胞甚至凋亡的原因.在培养中我们发现;在 7-8 d 的增生高峰期,DC 有丰富的半贴壁集落生成;并且从 10 d 起开始有部分细胞从集落中释放出来.此时 DC 细胞表面分子表达有一定程度的升高,以 MHC class II 和 B7-2 为明显,并且其刺激 T 细胞增生的能力也有增强.

目前尚无非常理想的能用于鉴定 DC 的特异性分子标志,若要鉴定所得到的细胞是否为 DC 时,往往是通过形态学、组合性细胞表面标志、混合淋巴细胞反应 (MLR) 中刺激初始 T 细胞增生三个方面加以综合判断,即具有典型树突状形态、膜表面高表达 MHC 类分子、能移行至淋巴器官和刺激初始型 T 细胞增生活化,并具有一些相对特异性表面标志的一类细胞,方能称之为 DC.当然,也有数种 DC 相对特异性标志得到公认和应用,例如 33D1 和 NLDC145 是小鼠 DC 比较特异性的标志;OX62 是大鼠 DC 比较特异性的标志,而人 DC 的主要特征性标志为 CD1a 和 CD83.最近,陆续一些新的 DC 特异性标志的报道,如新西兰学者 Hart 所在的实验室制备一株鼠抗人 DC 的 CMRF-44 单抗,他们利用此单抗动态地观察了从外周血单核细胞来源的人 DC 分化发育过程,发现该单抗识别的是处于分化中期和成熟期的人 DC.可以预见,若能寻找到更特异的 DC 标志、甚至不同状态或不同亚群 DC 的特异性标志,将大大有利于 DC 工作的开展<sup>[33-35]</sup>.

#### 4 参考文献

- Buonocore S, Van Meirvenne S, Demoor FX, Paulart F, Thielemans K, Goldman M, Flamand V. Dendritic cells transduced with viral interleukin 10 or Fas ligand: no evidence for induction of allotolerance in vivo. *Transplantation* 2002;73:S27-30
- Brisette-Storkus CS, Kettel JC, Whitham TF, Giezeman-Smits KM, Villa LA, Potter DM, Chambers WH. Flt-3 ligand (FL) drives differentiation of rat bone marrow-derived dendritic cells expressing OX62 and/or CD161 (NKR-P1). *J Leukoc Biol* 2002;71:941-949
- Wu MT, Huang ST. CXCR5-transduced bone marrow-derived dendritic cells traffic to B cell zones of lymph nodes and modify antigen-specific immune responses. *J Immunol* 2002;168:5096-5102
- Steptoe RJ, Ritchie JM, Harrison LC. Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2002;168:5032-5041
- Son YI, Egawa S, Tatsumi T, Redlinger RE Jr, Kalinski P, Kanto T. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 2002;262:145-157
- Basak SK, Harui A, Stolina M, Sharma S, Mitani K, Dubinett SM, Roth MD. Increased dendritic cell number and function following continuous in vivo infusion of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 2002;99:2869-2879
- Gilliet M, Boonstra A, Paturel C, Antonenko S, Xu XL, Trinchieri G, O'Garra A, Liu YJ. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 2002;195:953-958
- Poloso NJ, Nagarajan S, Mejia-Oneta JM, Selvaraj P. GPI-anchoring of GM-CSF results in active membrane-bound and partially shed cytokine. *Mol Immunol* 2002;38:803-816
- Stober D, Trobonjaca Z, Reimann J, Schirmbeck R. Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:1099-1108
- Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 2002;168:2255-2263
- Asavaroengchai W, Kotera Y, Mule JJ. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:931-936
- Xie Z, Cao X, Zhang W, Ye X, Yu B, Zheng Z. Endocytic routes of exogenous antigen in murine dendritic cells and macrophages. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:93-96
- Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpennig A, Mattei MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebecque S, Saeland S. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 2002;168:782-792
- Eggert AO, Becker JC, Ammon M, McLellan AD, Renner G, Merkel A, Brocker EB, Kampgen E. Specific peptide-mediated immunity against established melanoma tumors with dendritic cells requires IL-2 and fetal calf serum-free cell culture. *Eur J Immunol* 2002;32:122-127
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171-178
- Kanazawa N, Okazaki T, Nishimura H, Tashiro K, Inaba K, Miyachi Y. DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Invest Dermatol* 2002;118:261-266
- Zarei S, Leuba F, Arrighi JF, Hauser C, Piguet V. Transduction of dendritic cells by antigen-encoding lentiviral vectors permits antigen processing and MHC class I-dependent presentation. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:988-994
- Machy P, Serre K, Baillet M, Leserman L. Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains. *J Immunol* 2002;168:1172-1180
- Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umansky V, Schirmacher V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocytederived cells. *Int J Oncol* 2002;20:247-253
- Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpennig A, Mattei MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebecque S, Saeland S. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 2002;168:782-792
- Eggert AO, Becker JC, Ammon M, McLellan AD, Renner G, Merkel A, Brocker EB, Kampgen E. Specific peptide-mediated immunity against established melanoma tumors with dendritic cells requires IL-2 and fetal calf serum-free cell culture. *Eur J Immunol* 2002;32:122-127
- Kucharzik T, Hudson JT 3rd, Waikel RL, Martin WD, Williams IR. CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse. *Eur J Immunol* 2002;32:104-112
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171-178
- O'Connell PJ, Li W, Wang Z, Specht SM, Logar AJ, Thomson AW. Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 2002;168:143-154
- Hasel T, Yoshimura R, Wada S, Chargui J. Dendritic cells, generated in vitro, are immunocompetent and very useful in the induction of specific cytotoxic T lymphocyte activity. *Transplant Proc* 2001;33:3814-3815
- Bruno L, Seidl T, Lanzavecchia A. Mouse pre-immunocytes as non-proliferating multipotent precursors of macrophages, interferon-producing cells, CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3403-3412
- Björck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 2001;98:3520-3526
- Zuberbier T, Welker P, Grabbe J, Henz BM. Effect of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in a patient with benign

- systemic mastocytosis. *Br J Dermatol* 2001;145:661-666
- 29 Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, Kiyokawa T, Tsukamoto A, Sanada I, Kawano F. Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 2001;42:357-369
- 30 Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S, Takamatsu H, Berton G, McCullough KC, Summerfield A. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 2001;104:175-184
- 31 Oki M, Ando K, Hagihara M, Miyatake H, Shimizu T, Miyoshi H, Nakamura Y, Matsuzawa H, Sato T, Ueda Y, Gansuud B, Kato S, Hotta T. Efficient lentiviral transduction of human cord blood CD34(+) cells followed by their expansion and differentiation into dendritic cells. *Exp Hematol* 2001;29:1210-1217
- 32 Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2001;2:1010-1017
- 33 Ni K, O'Neill HC. Development of dendritic cells from GM-CSF-/- mice in vitro: GM-CSF enhances production and survival of cells. *Dev Immunol* 2001;8:133-146
- 34 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 谭晓华, 朴英杰. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增生. *世界华人消化杂志* 2000;8:56-58
- 35 邢利和, 王福生, 刘明旭, 朱传琳. 树突状细胞与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2000;8:1276-1279
- 36 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 张亚历, 周殿元. 大肠癌患者外周血树突状细胞免疫功能研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:429

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 新书介绍 •

## 《抗体分子与肿瘤》出版发行

本刊讯 自 19 世纪末发现抗毒素即第一代抗体以来, 随着现代免疫学、细胞生物学和分子生物学的不断发展, 第二代抗体即单克隆抗体, 以及第三代抗体即基因工程抗体分别于 1975 年和 1984 年相继问世. 一个多世纪来, 抗体作为体内最奇妙的蛋白质分子一直是生命科学, 尤其是生物医学领域的研究热点, 为人类多种疾病的预防、诊断和治疗做出了巨大贡献.

在人类疾病中, 恶性肿瘤是威胁人们健康的常见病和多发病, 也是人类生命的主要“杀手”之一. 在肿瘤免疫中, 抗体分子既是重要的效应分子, 也是抗原识别分子.

近 20 多年来, 随着单克隆抗体和基因工程抗体的两次重要发展, 至今全球已报道的单克隆抗体达 10 万余种, 基因工程抗体近千种, 人源抗体(human antibodies) 200 多种. 目前, 国际上已有 500 余种诊断和治疗用的单抗投放市场, 100 多种已进入临床研究. 虽然我国也有抗体已获准进入临床研究或上市, 但品种还不全, 规模还不小, 未能产生应有的经济效益和社会效益, 每年需进口至少 800 克单克隆抗体用于各种放免、酶标及病理诊断等, 每克的价格高达 50 - 150 万元人民币. 其中与癌症的检测和治疗有关的抗体占大多数.

为了总结和反映国内外在抗体分子与肿瘤研究方面的新理论、新技术和新方法, 促进和提高我国在该领域中有关高新技术的研究水平, 我们在参阅国内外文献的基础上, 并结合从事抗肿瘤抗体研究近 20 年的有关经验和体会, 编著成《抗体分子与肿瘤》一书, 奉献给广大的读者.

本书共分 3 篇 15 章, 分别就抗体分子的基础理论及其三代不同抗体的制备和标记等技术, 抗体分子与肿瘤的有关研究和应用, 工程抗体产业化的有关问题等作了全面而系统的介绍, 并力求新颖实用. 全书贯穿“基础研究 - 应用研究 - 产业化”的基本思路, 尽力把当前国内外有关研究的主要现状和进展显示出来. 本书由人民军医出版社出版(北京市复兴路 22 号甲 3 号, 邮编: 100842 电话: 010-68222916 定价: 85.00 元)

(2002-11-08)

# 肠外高营养对重症溃疡性结肠炎患者血清胃动素,肽YY, IgG 和糖蛋白含量的影响

郭学刚,孙安华,李彩宁,张宏博,周新民,许昌泰,潘伯荣

郭学刚,孙安华,李彩宁,张宏博,周新民,中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032  
许昌泰,中国人民解放军第四军医大学学报编辑部 陕西省西安市 720032  
潘伯荣,中国人民解放军第四军医大学西京医院肿瘤中心 陕西省西安市 710032  
郭学刚,男,1962-04-28生,汉族,黑龙江省哈尔滨市人.医学博士,副教授,副主任医师.  
项目负责人:许昌泰,710032,陕西省西安市长乐西路169号,中国人民解放军第四军医大学学报编辑部. xuct2001@163.com  
电话:029-3373804 传真:029-3374499  
收稿日期:2002-09-13 接受日期:2002-10-03

## Effects of parenteral hyperalimentation on serum motilin, peptide YY, IgG and glycoproteins in severe ulcerative colitis

Xue-Gang Guo, An-Hua Sun, Cai-Ning Li, Hong-Bo Zhang, Xing-Min Zhou, Chang-Tai Xu, Bo-Rong Pan

Xue-Gang Guo, An-Hua Sun, Cai-Ning Li, Hong-Bo Zhang, Xing-Min Zhou, Chinese PLA Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Chang-Tai Xu, Editorial Department of Journal of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Bo-Rong Pan, Oncology Center, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Correspondence to: Chang-Tai Xu, Editorial Department of Journal of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. xuct2001@163.com  
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

## Abstract

**AIM:** To study the effects and clinical significance of parenteral hyperalimentation on levels of serum motilin, peptide YY, IgG and glycoproteins in patients with severe ulcerative colitis.

**METHODS:** Eighty-nine patients (males 51, females 38, age 23-57 years) with severe ulcerative colitis were examined with colonoscopy, barium enema, the diagnosis was confirmed histologically. Bacterial infection was excluded through twice consecutive stool cultures. And ameba, schistosomiasis, gastroenteric cancer and endocrine diseases were also excluded. Ulcerative colitis was found in sigmoid ( $n=45$ ), descending colon ( $n=21$ ), colon splenic flexure ( $n=15$ ) and transverse colon ( $n=8$ ). Its clinical categories included relapse ( $n=44$ ), persistent ( $n=30$ ) and initial ( $n=15$ ). Parenteral hyperalimentation was applied to patients once diagnosis was made; three days later, fasting venous blood was drawn to test serum motilin (MTL), peptide YY (PYY) and IgG by radioimmunoassay, and serum  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and  $\gamma$  glycoproteins by electrophoresis.

**RESULTS:** After 4-week period therapy with parental hypernutrition, 27 cases (30%) recovered completely, 48 (54%) improved, and 14 (16%) failed to therapy, the total

effective rate was 84%. Level of serum MTL, PYY, IgG, and  $\alpha_1$ -glycoprotein in colitis patients were significant higher than those in control,  $\alpha_2$ -glycoprotein was lower than that in control ( $P<0.05$ ). All these abnormal data became normal after treatment. However, no difference of these parameters was observed between patients who were effective to therapy and those who failed to therapy ( $P<0.05$ ). No obvious change in serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glycoprotein was existed in all patients ( $P>0.05$ ). Level of serum albumin was increased ( $P<0.05$ ), and the histological change in ulcerative colitis was significantly improved after treatment.

**CONCLUSION:** The parenteral hyperalimentation therapy improved effectively serum levels of motilin, PYY, IgG and glycoproteins in patients with severe ulcerative colitis.

Guo XG, Sun AH, Li CN, Zhang HB, Zhou XM, Xu CT, Pan BR. Effects of parenteral hyperalimentation on serum motilin, peptide YY, IgG and glycoproteins in severe ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2003;11(2):224-228

## 摘要

**目的:** 肠外高营养对重症溃疡性结肠炎患者血清胃动素,肽YY, IgG和糖蛋白含量的影响并讨论其变化的临床意义。

**方法:** 重症溃疡性结肠炎患者 89 例, 男 51 例, 女 38 例, 年龄 23-57 (平均  $38 \pm 13$ ) 岁, 均经电子结肠镜检查 and X 线钡灌肠检查, 以及组织学检查确诊, 并连续粪培养 2 次排除细菌感染, 同时排除阿米巴肠病, 血吸虫病, 肠道肿瘤和内分泌疾病。病变部位包括乙状结肠 45 例, 降结肠 21 例, 结肠脾曲 15 例和横结肠 8 例; 临床类型包括复发型 44 例, 持续型 30 例和初发型 15 例。采取肠外静脉补充足够的营养, 完全胃肠道休息。并于确诊后 3 d 内和治疗缓解后的上午 07:00 空腹采血, 用放射免疫法 (RIA) 测定血清胃动素 (MTL), 肽 YY (PYY) 和 IgG, 用血清电泳法测定  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  和  $\gamma$  糖蛋白。

**结果:** 经过 4 wk 治疗后痊愈 27 例 (30%), 好转 48 例 (54%), 无效 14 例 (16%), 总有效率 84%。与对照比较, 重症溃疡性结肠炎患者血清 MTL (ng/L,  $311.6 \pm 99.8$  vs  $207.3 \pm 98.4$ ,  $P<0.01$ ), PYY (pmol/L,  $1.6 \pm 0.8$  vs  $1.1 \pm 0.6$ ,  $P<0.05$ ), IgG (g/L,  $23.6 \pm 10.2$  vs  $13.1 \pm 6.9$ ,  $P<0.01$ ) 和  $\alpha_1$  球蛋白 (g/L,  $2.7 \pm 1.2$  vs  $1.5 \pm 0.9$ ,  $P<0.01$ ) 明显升高, 而  $\alpha_2$  球蛋白 (g/L,  $4.2 \pm 2.6$  vs  $6.8 \pm 2.3$ ,  $P<0.05$ ) 则降低, 但经过治疗后可恢复, 治疗有效和无效患者间上述变化无明显差异 ( $P>0.05$ )。全部患者血清 AST, ALT 在正

常范围,血清白蛋白治疗后明显好转(g/L,  $34.2 \pm 9.6$  vs  $21.4 \pm 8.7$ ,  $P < 0.05$ ), 组织学也明显改善。

结论:重症溃疡性结肠炎肠外静脉高营养疗法是一种有效可行的方法,且可以改善血清 MTL, PYY, IgG 和 1, 2 糖蛋白水平。

郭学刚,孙安华,李彩宁,张宏博,周新民,许昌泰,潘伯荣. 肠外高营养对重症溃疡性结肠炎患者血清胃动素,肽YY,IgG和糖蛋白含量的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(2):224-228

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/130.htm>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种,其病因不明,是以浅表性、非特异性炎症病变为主的肠道疾病,主要累及乙状结肠,也可累及其他部分或全部结肠<sup>[1-5]</sup>;少数病变严重者可出现 10 cm 以内的反流性回肠炎。临床症状以黏液脓血便、腹痛、腹泻或里急后重为主;急性危重病例,有全身症状,并常伴有肠道外疾病和肝损害、关节炎、皮肤损害、心肌病变、口腔溃疡、虹膜睫状体炎及内分泌病症<sup>[3-8]</sup>。对溃疡性结肠炎的治疗方法包括激素、磺胺类、免疫抑制等,但效果均欠佳<sup>[4,9-17]</sup>。我们研究肠外高营养对重症溃疡性结肠炎的治疗效果及其对血清胃动素,肽 YY, IgG, 1(1-Gly), 2(2-Gly)和 糖蛋白(α-Gly)的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1998-01/2001-12 住院溃疡性结肠炎患者 207 例,其中属重症的 89 例,男 51 例,女 38 例,年龄 23-57(平均  $38 \pm 13$ ) 岁。全部患者均经电子结肠镜检查 and X 线钡灌肠检查,以及组织学检查确诊,并连续粪培养 2 次排除细菌感染,同时排除阿米巴肠病、血吸虫病、肠道肿瘤和内分泌疾病。病变部位包括乙状结肠 45 例,降结肠 21 例,结肠脾曲 15 例和横结肠 8 例;临床类型包括复发型 44 例,持续型 30 例和初发型 15 例。另选健康对照 23 例,男 16 名,女 7 名,年龄 22-58(平均  $37 \pm 12$ ) 岁,排除胃肠道和内分泌疾病。

1.2 方法 治疗原则是在发作期间,主要采取对症治疗,纠正营养缺乏,恢复血容量,纠正贫血,控制合并症等处理。我们主要采取肠外高营养,其治疗方案是:静脉补充足够的营养,完全胃肠道休息,待病情缓解后逐步恢复饮食,以保持长久的缓解状态。所用药物为:肠外高营养配方:200 g/L 脂肪乳 250 mL;氨基酸 500 mL;支链氨基酸 250 mL;250 g/L 葡萄糖 250 mL(必要时);100 g/L 葡萄糖 500-1 000 mL;生理盐水 500 mL;100 g/L 氯化钾 30-50 mL;维他得匹特 10 mL;水乐维他 10 mL;胰岛素

20-30 U;安达美 10 mL。上述混入 3 000 mL 袋中深静脉滴注,1 次/d,4 wk。治疗 1 wk 后无效患者则加用少量激素,有发热者( $> 38.5$ ) 给予抗生素。全部患者都经治疗 4 wk 后进行结果分析:痊愈好转-临床症状减轻,肠镜等检查,肠黏膜检查恢复正常;好转-临床症状减轻,肠镜检查,肠黏膜病变较前明显改善,大便常规检查有少量红、白细胞;无效-治疗后,临床症状和肠镜等检查,无改善或无明显改善。研究对象还于确诊后 3 d 内和静脉高营养治疗缓解后的上午 07-00 空腹采血,用放射免疫法(RIA)测定血清胃动素(MTL),肽 YY(PYY)和 IgG,用血清电泳法测定 1, 2 和 糖蛋白。

统计学处理 测定结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,与对照组比较用非配对学生 t 检验。

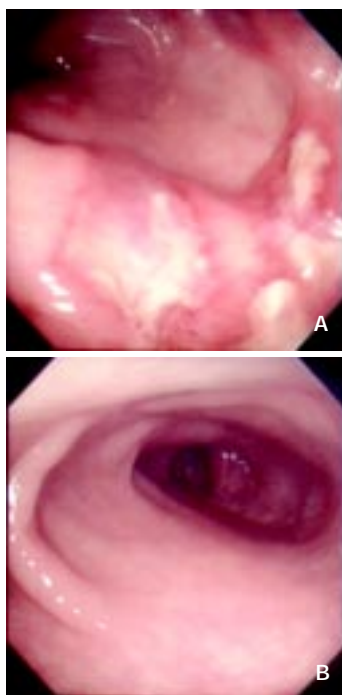
## 2 结果

经过 4 wk 治疗后痊愈 27 例(30%),好转 48 例(54%),无效 14 例(16%),总有效率 84%。重症溃疡性结肠炎患者血清 MTL, PYY, IgG 和 1 糖蛋白明显高于对照组,但经过治疗后可恢复(表 1),治疗有效和无效患者间上述变化无明显差异( $P > 0.05$ )。全部患者血清 AST, ALT 在正常范围,糖蛋白变化不明显(g/L,  $9.7 \pm 4.6$ ),血清白蛋白明显好转(g/L,  $34.2 \pm 9.6$  vs  $21.4 \pm 8.7$ ,  $P < 0.05$ )。治疗无效的 14 例上述各指标治疗前后无明显改变( $P > 0.05$ )。所有患者均为急性期重症,其黏膜充血、水肿更显著,镜下病变部位基本无正常黏膜(图 1A),与治愈后形成明显对比(图 1B)。黏膜呈粗细不等的颗粒状。或溃疡明显增多并融合成片,有黏膜桥形成。极易接触出血或黏膜糜烂结肠自发出血,有假膜或黏液脓血性渗出物覆盖,有时见岛状或类假息肉样黏膜再生。重症溃疡性结肠炎治疗前病理组织可见中性细胞浸润,淋巴细胞,浆细胞也较多及假性息肉(图 2A);腺上皮间中性炎细胞浸润,杯状细胞减少;隐窝炎症或脓肿形成和他固有膜血管的炎症(图 2B)。经治疗病情缓解后病变明显改善,取代上述的是肠腺细胞排列不规则,隐窝数减少,既有瘢痕组织又有基底膜增厚;杯状细胞增多,黏膜下层纤维化加重,可见淋巴管扩张;固有膜层圆细胞浸润明显或大淋巴滤泡出现。

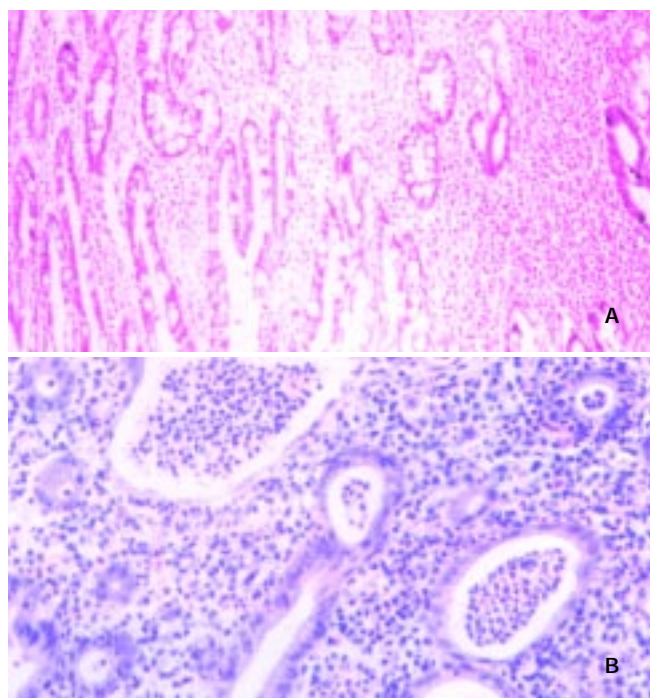
表 1 重症溃疡性结肠炎患者治疗前后 MTL, PYY, IgG, α1 和 α2 糖蛋白变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	MTL(ng/L)	PYY(pmol/L)	IgG(g/L)	1-Gly(g/L)	2-Gly(g/L)
对照	26	$207.3 \pm 98.4$	$1.1 \pm 0.6$	$13.1 \pm 6.9$	$1.5 \pm 0.9$	$6.8 \pm 2.3$
治疗前	89	$311.6 \pm 99.8^a$	$1.6 \pm 0.8^a$	$23.6 \pm 10.2^b$	$2.7 \pm 1.2^b$	$4.2 \pm 2.6^a$
治疗后	75	$225.2 \pm 89.4$	$1.2 \pm 0.7$	$15.3 \pm 8.2$	$1.8 \pm 1.1$	$7.5 \pm 3.4$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照。



A:治疗前 B:治愈后  
图1 镜下溃疡性结肠炎.



A:结肠炎息肉 B:隐窝脓肿形成  
图2 溃疡性结肠炎病理学改变.

### 3 讨论

溃疡性结肠炎为一病程经历甚为悬殊而又无特异治疗的疾病.在发作期间,主要采取对症治疗,纠正营养缺乏,恢复血容量,纠正贫血,控制合并症等处理,并应鼓励患者增强治病信心,坚持合理必要的治疗,多数患者可达到完全缓解<sup>[5-7,10-15,18-25]</sup>.缓解期治疗则基于力争和保持缓解状态.减少发作次数,减轻发作程度和缩短发作期限.我们主要采取肠外静脉补充足够的营养,完全休

息胃肠道,待病情缓解后逐步恢复饮食,以保持长久的缓解状态,结果收到满意的效果,且患者血清胃动素,肽YY, IgG, 1和 2糖蛋白含量基本恢复<sup>[22-28]</sup>.溃疡性结肠炎初起病情较轻或疾病较平稳恢复期,可采用中医辨证治疗,可口服或直肠给药.当暴发型,危重病证以及较为严重的并发症,宜采用西药治疗以及激素治疗,待病情平稳时,可结合中医药治疗<sup>[29-35]</sup>.

血清蛋白电泳 1糖蛋白升高是溃疡性结肠炎活动期的可靠指标,我们研究结果也说明这一点. 2糖蛋白升高则反应病情缓解, 球蛋白下降为预后不良的征兆,低蛋白血症说明病变范围广,通常已越过乙状结肠<sup>[17-21]</sup>.

溃疡性结肠患者发病的解剖和生理基础可能是肠黏膜屏障或他的通透性存在某些缺陷,细胞因子是炎症反应的必需中介物(如白介素,肿瘤坏死因子和干扰素等),这些细胞因子具有类似激素对全身的作用,同时伴有严重的和潜在的危险作用<sup>[21-25,36-42]</sup>.我们的研究中患者血清 MTL, PYY, IgG 和 1糖蛋白均有改变,且临床治愈或好转后血清 IgG 和 1糖蛋白下降,提示溃疡性结肠炎的发生可能与细胞因子的作用有关,这一结果与以往研究类似<sup>[23,29-34]</sup>.我们采用肠外高营养疗法,使患者的胃肠道得以完全休息,这样可能通过减少对肠道刺激从而改善体内炎症反应,以达到治疗目的.胃动素是22个氨基酸残基组成的多肽,正常情况影响血中胃动素水平与进餐和进餐的种类,胃肠道的消化过程和消化期间,胃容量的扩大,小肠活动状态和十二指肠内酸度,其他消化道激素的作用等因素有关<sup>[24-28,43-46]</sup>.溃疡性结肠炎患者血清 MTL 升高可能由于结肠黏膜炎症作用使下消化道蠕动增快,机体为调节内外平衡,胃小肠以适应结肠运动,故血清 MTL 分泌和释放增加. PYY 的主要作用为收缩血管,抑制胰腺外分泌,抑制胃肠蠕动及胃酸分泌.我们研究中血清 PYY 升高可能系结肠炎症刺激所致. IgG 主要作用是参与免疫,溃疡性结肠炎作为一种与免疫相关的疾病,必然有体内 IgG 的改变,本文结果也证实这一点.

治疗重症溃疡性结肠炎通常用柳氮磺胺吡啶类药物,如 5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid)<sup>[28]</sup>,利多格雷(ridogrel)<sup>[29]</sup>等,但有时效果不理想.严重患者在内科多次治疗无效时可考虑外科治疗<sup>[11]</sup>.溃疡结肠炎原因不明,尚无具体的预防措施,对于反复发作或持续的患者,保持心情舒畅恬静,注意饮食有节,起居有常,避免劳累,预防肠道感染,对阻止复发或病情进一步发展有一定作用<sup>[40-47]</sup>.此外还应注意心理调节和注意控制饮食,对腹痛腹泻者,宜食少渣,易消化,低脂肪,高蛋白饮食,对有或可疑不耐受的食物,如虾,蝎,蟹,牛奶,花生等应尽量避免食用,应忌食辣椒,冰冻,生冷食品,戒除烟酒.

## 4 参考文献

- 1 Welters CF, Heineman E, Thunnissen FB, van den Bogaard AE, Soeters PB, Baeten CG. Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2002;45:621-627
- 2 Kurbegow AC, Ferry GD. Guided self-management and patient-directed follow-up of ulcerative colitis: a randomised trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:428-429
- 3 Bariol C, Meagher AP, Vickers CR, Byrnes DJ, Edwards PD, Hing M, Wettstein AR, Field A. Early studies on the safety and efficacy of thalidomide for symptomatic inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:135-139
- 4 van Bergeijk JD, Wilson JH, Nielsen OH, von Tirpitz C, Karvonen AL, Lygren I, Radler A, Waldum HL, Mulder CJ, Friis S, Tefera S, Hoogkamer JF. Octreotide in patients with active ulcerative colitis treated with high dose corticosteroids (OPUS 1). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:243-248
- 5 Ben-Josef E, Han S, Tobi M, Vargas BJ, Stamos B, Kelly L, Biggar S, Kaplan I. Intrarectal application of amifostine for the prevention of radiation-induced rectal injury. *Semin Radiat Oncol* 2002;12(Suppl 1):81-85
- 6 Malchow H, Gertz B. A new mesalazine foam enema (Claversal Foam) compared with a standard liquid enema in patients with active distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:415-423
- 7 Tremaine WJ, Brzezinski A, Katz JA, Wolf DC, Fleming TJ, Mordenti J, Strenkoski-Nix LC, Kurth MC. Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:407-413
- 8 Sood A, Midha V, Sood N, Kaushal V, Awasthi G. Methylprednisolone acetate versus oral prednisolone in moderately active ulcerative colitis. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:11-13
- 9 Kayazawa M, Saitoh O, Kojima K, Nakagawa K, Tanaka S, Tabata K, Matsuse R, Uchida K, Hoshimoto M, Hirata I, Katsu K. Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am J Gastroenterol* 2002;97:360-369
- 10 Xu CT, Pan BR. Current medical therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1999;5: 64-72
- 11 Zhang Y, Wang ZH, Huang MT. Relationship between electrogastric dysrhythmia and leucin-enkephalin in rats. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:969-971
- 12 Mansfield JC, Gaffner MH, Cann PA, McKenna D, Thornton PC, Holdsworth CD. A double-blind comparison of balsalazide, 6.75 g, and sulfasalazine, 3 g, as sole therapy in the management of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:69-77
- 13 Green JR, Mansfield JC, Gibson JA, Kerr GD, Thornton PC. A double-blind comparison of balsalazide, 6.75 g daily, and sulfasalazine, 3 g daily, in patients with newly diagnosed or relapsed active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:61-68
- 14 Skelly MM, Logan RF, Jenkins D, Mahida YR, Hawkey CJ. Toxicity of mycophenolate mofetil in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:93-97
- 15 Rizzello F, Gionchetti P, Galeazzi R, Novelli G, Valpiani D, D'Arienzo A, Manguso F, Castiglione G, Varoli G, Campieri M. Oral beclomethasone dipropionate in patients with mild to moderate ulcerative colitis: a dose-finding study. *Adv Ther* 2001;18:261-271
- 16 Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002;50:196-200
- 17 Vrij AA, Jansen JM, Schoon EJ, de Bruine A, Hemker HC, Stockbrugger RW. Low molecular weight heparin treatment in steroid refractory ulcerative colitis: clinical outcome and influence on mucosal capillary thrombi. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; 234:41-47
- 18 Shen B, Achkar JP, Lashner BA, Ormsby AH, Remzi FH, Brzezinski A, Bevins CL, Bambrick ML, Seidner DL, Fazio VW. A randomized clinical trial of ciprofloxacin and metronidazole to treat acute pouchitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:301-305
- 19 Kruis W, Schreiber S, Theuer D, Brandes JW, Schutz E, Howaldt S, Krakamp B, Hamling J, Monnikes H, Koop I, Stolte M, Pallant D, Ewald U. Low dose balsalazide (1.5 g twice daily) and mesalazine (0.5 g three times daily) maintained remission of ulcerative colitis but high dose balsalazide (3.0g twice daily) was superior in preventing relapses. *Gut* 2001; 49:783-789
- 20 Joelsson M, Andersson M, Bark T, Gullberg K, Hallgren T, Jiborn H, Magnusson I, Raab Y, Sjodahl R, Ojerskog B, Oresland T. Allopurinol as prophylaxis against pouchitis following ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. A randomized placebo-controlled double-blind study. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1179-1184
- 21 Robinson A, Thompson DG, Wilkin D, Roberts C. Guided self-management and patient-directed follow-up of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:976-981
- 22 Maender RG, Esplen MJ. Supportive-expressive group psychotherapy for persons with inflammatory bowel disease. *Can J Psychiatry* 2001; 46:622-626
- 23 Xu CT, Wang RL, Ma LS. Alterations of serum motilin, peptide YY, IgG and ferritin in patients with ulcerative colitis. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:247-248
- 24 Mantzaris GJ, Petraki K, Archavlis E, Amberiadis P, Kourteasas D, Christidou A, Triantafyllou G. A prospective randomized controlled trial of intravenous ciprofloxacin as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:971-974
- 25 Farup PG, Hinterleitner TA, Lukas M, Hebuterne X, Rachmilewitz D, Campieri M, Meier R, Keller R, Rathbone B, Oddsson E. Mesalazine 4 g daily given as prolonged-release granules twice daily and four times daily is at least as effective as prolonged-release tablets four times daily in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:237-242
- 26 Shen B, Achkar JP, Lashner BA, Ormsby AH, Remzi FH, Bevins CL, Brzezinski A, Petras RE, Fazio VW. Endoscopic and histologic evaluation together with symptom assessment are required to diagnose pouchitis. *Gastroenterology* 2001;121:261-267
- 27 Bouma G, Kaushiva A, Strober W. Experimental murine colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses. *Gastroenterology* 2002;123:554-565
- 28 Mahmud N, O'Toole D, O'Hare N, Freyne PJ, Weir DG, Kelleher D. Evaluation of renal function following treatment with 5-aminosalicylic acid derivatives in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:207-215
- 29 Tytgat GN, Van Nueten L, Van De Velde I, Joslyn A, Hanauer SB. Efficacy and safety of oral ridogrel in the treatment of ulcerative colitis: two multicentre, randomized, double-blind studies. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:87-99
- 30 Jugde F, Alizadeh M, Boissier C, Chantry D, Siproudhis L, Corbinais S, Quelvennec E, Dyard F, Campion JP, Gosselin M, Bretagne JF, Semana G, Heresbach D. Quantitation of chemokines (MDC, TARC) expression in mucosa from Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:468-477
- 31 Zhang ZY, Hou ZJ, Guo JY. Gastrointestinal hormones and their clinic application. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:447-448
- 32 Yi SX, Lin YP, Yan J, Chang XR, Yang Y. Effect of electroacupuncture on gastric motility, substance P (SP) and motilin (MTL) in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:284-287
- 33 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- 34 Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999; 5:515-517
- 35 Gao W, Huang YX, Chen H, Zhao NX, Sun DY, Zhang HX, Wang QL. Regulatory mechanism of electroacupuncture on the stomach channel brain gut peptide immune network. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:279-283
- 36 Zhang K, Deng CS, Zhu YQ, Yang YP, Zhang YM. Significance of nuclear factor- $\kappa$ B, cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human ulcerative colitis tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:575-578

- 37 Xia B. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:245-250
- 38 Xu MQ, Xue L, Gong JP. Significance of Kupffer cell NF- $\kappa$ B activation during hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1250-1253
- 39 Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L. The effect of melatonin on the immunological function of colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:193-196
- 40 Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DAF, Ward SG. Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF- $\kappa$ -induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120: 1117-1127
- 41 Qi JM, Zhang YD. Expression of eNOS and iNOS in rats of acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1003-1007
- 42 Wu HP, Wu KC, Li L, Yao LP, Lan M, Wang X, Fan DM. Cloning of human cyclooxygenase 2(COX-2) encoding gene and study of gastric cancer cell transfected with its antisense vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1211-1217
- 43 Sun DY, Huang YX, Cu ZH, Gao W, Wang QL. Effect of electro-puncture on gastric antral pressure and relationship with brain gut peptides level of gastric mucus in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7: 997-998
- 44 Sun DY, Huang YX, Cu ZH, Gao W, Wang QL, Liu GS. Effects of electroacupuncture on gastric mucosal blood flow and plasma gut hormone level in dogs. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:936-938
- 45 Peng ZS, Hu PJ, Lin HL, Cui Y, Chen W. Evaluation of biopsy pathology in diagnosis of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1269-1273
- 46 Chen ZY, Yan MX, Xiang BK, Zhan HW. Alterations of gut hormones of blood and colonic mucosa in rats with chronic stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:59-61
- 47 Xu CT, Pan BR. Gene therapy in gastrointestinal diseases. *Ross Gastroenterol Zh* 2001;2:5-25

## 《中华影像医学·消化分册》出版发行

本刊讯 我国著名胃肠放射学家尚克中教授主编的《中华影像医学·消化分册》已于今年6月由人民卫生出版社出版。该书是《中华影像医学》系列丛书中的消化部分，也是总结我国消化影像医学成果，反映当今国际消化影像医学发展最新动态的一本高级参考书。

该书由全国22位著名的老专家、知名中青年专家共同编写，主要反映当代消化影像学发展的新水平，对于已经或即将用于临床的各种成像技术、检查方法、新征象、新理论以及新治疗方法，则以我国学者自己的资料为主加以较为详尽的介绍。在叙述消化疾病的影像学表现时，考虑疾病的共性和个性的关系，以使读者能正确地把握疾病的影像学一般规律。该书在介绍常见病、多发病的基础上，对罕见、少见病也作简要介绍。全书25万字，近400幅图；文字简明、扼要、通顺，叙述层次结构合理，具有逻辑性、连贯性；名词术语规范统一，具有较强的可读性。该书的内容具有科学性、先进性、权威性和实用性的特点，是一本高层次、高品位和高水平的消化影像医学重点参考书。特此推荐给消化内科、消化外科、胃肠专科、放射科等临床各级医师，同时也适合实习同学、进修医师、研究生等各类人员作为学习用的教科书或参考书。需要该书者请到全国各大新华书店购买（程英升 2002-11-08）

# COX-2 在胰腺癌组织中的表达及其与 p53 的相关性研究

刘江伟, 李开宗, 窦科峰

刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科  
陕西省西安市 710032  
刘江伟, 男, 1970-12-10 生, 新疆五家渠人, 汉族, 第四军医大学西京医院肝胆外科  
博士研究生。

项目负责人: 李开宗, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京  
医院肝胆外科。ljw273@sohu.com  
电话: 029-3375561

收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-29

## Expression of cyclooxygenase-2 in pancreatic cancer and its correlation with p53

Jiang-Wei Liu, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou

Jiang-Wei Liu, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary  
Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an  
710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Kai-Zong Li, Department of Hepatobiliary Surgery,  
Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032,  
Shaanxi Province, China. ljw273@sohu.com

Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-29

### Abstract

**AIM:** To investigate the expressions of COX-2 and p53 in human pancreatic cancer and their correlation with biological behaviors of pancreatic cancer.

**METHODS:** The expressions of COX-2 and p53 in 51 specimens of human pancreatic ductal adenocarcinoma and 11 specimens of normal tissues adjacent human pancreatic ductal adenocarcinoma were detected with immunohistochemistry by Envision.

**RESULTS:** The detectable rate of COX-2 and p53 in pancreatic ductal adenocarcinoma were 74.5 % and 60.8 %, respectively; but none in adjacent normal tissues. The expression of COX-2 was significantly associated with the clinical stages and metastasis status of lymph nodes ( $P=0.022, 0.036$ ), but not with histological grade ( $P=0.152$ ). The expression of p53 was significantly correlated with the lymph node metastasis status ( $P=0.035$ ), but not with their histological grades and clinical stages ( $P=0.131, 0.078$ ). There was a significant correlation between the expression of COX-2 and p53 ( $r=0.452, P=0.001$ ). Conditions such as age, sex, tumor size and location had no relation with expression of COX-2 or p53.

**CONCLUSION:** The cooperation of COX-2 and p53 may play a pivotal role in the carcinogenesis and the progression in pancreatic cancer. They may provide new targets for the therapy of pancreatic cancer.

Liu JW, Li KZ, Dou KF. Expression of cyclooxygenase-2 in pancreatic cancer and its correlation with p53. *Shijie Huanren Xiaohuan Zazhi* 2003;11(2):229-232

### 摘要

**目的:** 探讨环氧化酶-2(COX-2)和p53在胰腺癌组织中的表达与生物学行为之间的关系并探讨二者的相关性及其可能机制。

**方法:** 用免疫组织化学 Envision 法对 51 例胰腺导管癌和 11 例癌旁非肿瘤胰腺组织的 COX-2 和 p53 的表达进行检测。

**结果:** 51 例胰腺导管癌中 COX-2 和 p53 蛋白的表达率分别为 74.5 % 和 60.8 %; 二者在 11 例癌旁非肿瘤胰腺组织中均未发现阳性表达。COX-2 的表达与临床分期和淋巴结转移有关 ( $P=0.022, 0.036$ ), 而与组织学分级关系不大 ( $P=0.152$ ); p53 的表达与淋巴结转移有关 ( $P=0.035$ ), 而与组织学分级、临床分期关系不大 ( $P=0.131, 0.078$ ); COX-2 的表达与 p53 的表达密切相关 ( $r=0.452, P=0.001$ ), 二者的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、部位均无关。

**结论:** COX-2 和 p53 的协同作用可能在胰腺癌的发生发展过程中起重要作用, 可能为胰腺癌的治疗提供了新的靶点。

刘江伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2 在胰腺癌组织中的表达及其与 p53 的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):229-232

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/229.htm>

### 0 引言

环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是炎症过程中催化前列腺素合成的一个关键诱导酶。近年研究发现, COX-2 参与了多种肿瘤特别是消化系统肿瘤的细胞增生、抗凋亡和血管生成, 与肿瘤的发生、发展和预后密切相关<sup>[1-12]</sup>。p53 是迄今发现的最重要的肿瘤抑制基因, 在许多消化系肿瘤组织中均存在基因突变, 参与肿瘤的发生、发展<sup>[13-34]</sup>。COX-2 与 p53 之间关系的研究目前尚存争议; 而胰腺癌组织中 COX-2 的表达与突变型 p53 表达关系的研究, 国内外尚未见文献报道。本研究旨在探讨 COX-2 和 p53 在胰腺癌中的表达和临床病理特征之间的关系, 并探讨二者之间的相互关系及可能的机制。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用第四军医大学西京医院病理科 1995-2000 年胰腺癌根治术后存档蜡块 51 例, 均经组织病理学诊断为导管腺癌, 男 30 例, 女 21 例; 年龄 39-75 岁, 平均 59.2 岁。按 Klossner 组织学分级标准, Ⅰ级 19 例, Ⅱ级 17 例, Ⅲ级 15 例。按 Hemreck 临床分期标准, Ⅰ期 7 例, Ⅱ期 11 例, Ⅲ期 20 例, Ⅳ期 13 例。有淋巴结转移者 32 例。另取 11 例癌旁非肿瘤胰腺组织标本做对照。COX-2 兔抗人多克隆抗体、p53 鼠抗人单克隆抗体, 均系 Santa Cruz 公司产品。Envision 二步法免疫组化试剂盒、DAB 显色剂系 DAKO 公司产品。

1.2 方法 免疫组织化学检测步骤如下:组织切片常规脱蜡至水,离子水冲洗5 min;置枸橼酸盐抗原修复液中用微波炉进行抗原修复15 min,自然冷却至室温,PBS冲洗;3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡20 min,PBS冲洗;正常山羊血清37℃封闭30 min,滴加兔抗人多克隆抗体COX-2(工作浓度1:50)和鼠抗人单克隆抗体p53(工作浓度1:100),37℃放置2 h;PBS冲洗后加入Envision二抗-酶标多聚物37℃放置30 min,DAB显色,自来水冲洗,苏木素复染,封片.同时用PBS代替一抗作染色的阴性对照,用已知的染色阳性切片作阳性对照.COX-2以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞(图1);p53以肿瘤细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞(图2);二者采取统一的评价标准.在400倍光镜下至少观察5个视野,肿瘤阳性细胞>5%定义为阳性表达,≤5%为阴性表达<sup>[35]</sup>.

统计学处理 采用SPSS10.0统计学软件,采用 $\chi^2$ 检验和Spearman等级相关分析.

## 2 结果

2.1 COX-2、p53蛋白表达与胰腺癌组织学特征之间的关系(表1) 胰腺癌组织COX-2蛋白阳性表达率为74.5%,p53蛋白阳性表达率为60.8%.在11例癌旁胰腺组织中未见COX-2、p53蛋白的阳性表达.COX-2蛋白表达率在临床I期为55.6%(10/18),在II期为84.8%(28/33),差异具有显著性( $\chi^2=5.262$ ,  $P<0.05$ );在淋巴结转移阳性组为84.4%(27/32),淋巴结转移阴性组为57.9%(11/19),差异具有显著性( $\chi^2=4.401$ ,  $P<0.05$ );COX-2的表达在组织学分级之间无显著性差异( $P>0.05$ ).p53蛋白表达在淋巴结转移阳性组明显高于淋巴结转移阴性组,差异具有显著性( $\chi^2=4.432$ ,  $P<0.05$ );在组织学分级、临床分期之间均无显著性差异( $P>0.05$ ).COX-2、p53的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、部位无明显关系( $P>0.05$ ).

2.2 COX-2蛋白表达与突变型P53蛋白表达的关系 在COX-2阳性表达组中,p53的阳性表达率为73.7%(28/38);在COX-2阴性表达组中p53阳性表达率为23.1%(3/13),差异有显著性( $\chi^2=10.407$ ,  $P=0.001$ ).Spearman等级相关分析表明二者有相关性( $r=0.452$ ,  $P=0.001$ ).

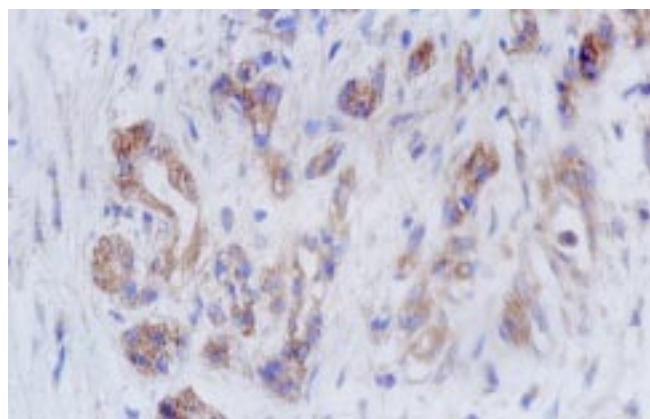


图1 COX-2在胰腺癌中的阳性表达(Envision法×400).

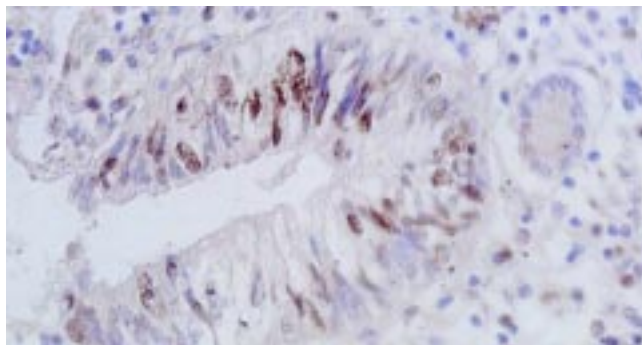


图2 p53在胰腺癌中的阳性表达(Envision法×400).

表1 胰腺癌组织中COX-2、p53的表达与临床及病理学特征之间的关系

病理参数	n	COX-2		p53	
		阳性	阴性	阳性	阴性
性别					
男	30	24	6	19	11
女	21	14	7	12	9
年龄(岁)					
60	20	15	5	10	10
>60	31	23	8	21	10
肿瘤大小(cm)					
5	38	27	11	22	16
>5	13	11	2	9	4
肿瘤部位					
胰头部	34	26	8	20	14
胰体尾部	17	12	5	11	6
组织学分级					
G <sub>1</sub>	19	12	7	9	10
G <sub>2</sub> -G <sub>3</sub>	32	26	6	22	10
临床分期					
I	18	10	8 <sup>a</sup>	8	10
II	33	28	5	23	10
淋巴结转移					
阳性	32	27	5 <sup>a</sup>	23	9 <sup>a</sup>
阴性	19	11	8	8	11

<sup>a</sup> $P<0.05$ .

## 3 讨论

流行病学和实验研究发现,非甾体类抗炎药物(NSAIDs)能够有效地预防肿瘤,NSAIDs主要作用于环氧化酶.环氧化酶是前列腺素合成过程中的重要限速酶,已发现有两种同工酶COX-1和COX-2.COX-1被认为是“看家基因”,在大多数正常细胞中都呈稳定表达,与正常的生理功能有关,如保护胃黏膜和维持肾脏的正常血流量等.COX-2在大多数正常组织中不表达,但在细胞受到各种刺激如炎症因子、生长因子、促癌剂等诱导下迅速合成,参与炎症过程和肿瘤的发生<sup>[36]</sup>.COX-2在大多数人类肿瘤中过表达,其过表达与结肠癌、头

颈部肿瘤、肺癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤的浸润、淋巴结转移和预后不良有关<sup>[37]</sup>。本研究发现, COX-2 在胰腺癌中的表达率为 74.5%, 而在癌旁的非肿瘤胰腺组织中未见表达; COX-2 的表达与病理学分级、患者的性别、年龄、肿瘤的大小、部位无关 ( $P > 0.05$ ), 而与临床分期和淋巴结转移呈密切正相关 ( $P < 0.05$ )。由此可见, COX-2 可能在胰腺癌的发生、发展、肿瘤的浸润和转移中起重要作用, COX-2 的过表达可能是反映胰腺癌预后的有用指标。最近研究表明, COX-2 可能通过以下机制参与肿瘤形成, 如促进前列腺素的合成, 促进血管生成, 抑制机体免疫监视功能, 阻止细胞凋亡等<sup>[38]</sup>。至于哪种机制在胰腺癌的形成中起重要作用尚需进一步研究。

野生型 p53 (wt p53) 是细胞生长的负调控基因, 通过调控细胞的生长和凋亡而起抑癌作用。当细胞在理化因素作用下 DNA 发生损伤时, 他能使细胞分裂停止在 G<sub>1</sub>/S 期, 使细胞修复损伤而恢复正常, 如果损伤不能恢复, wtP53 能促使细胞凋亡, 从而保证有癌变倾向的细胞的自我消亡; 其突变或缺失引起的突变型 p53 则失去此“肿瘤抑制”效应而对细胞的增生和转化起促进作用。p53 突变后, 半衰期延长, 因而用免疫组化可检测到突变的 p53。在许多肿瘤中都可检测到高水平的突变型 p53 表达, 而其表达往往与肿瘤的分级、分期、预后密切相关, 常常是肿瘤术后复发、治疗失败的关键<sup>[39-44]</sup>。本研究发现, p53 在胰腺癌组织中的突变率达 60.8%, 在癌旁组织未检测到突变型 p53, 其表达与淋巴结转移呈正相关趋势, 表明 p53 的突变在胰腺癌的肿瘤发生、发展中起重要作用。

关于 COX-2 和 p53 之间的关系的研究尚存争议, Ristimaki et al<sup>[36,45,46]</sup> 研究发现, 在有突变型 p53 的肿瘤组织中比没有 p53 突变的肿瘤组织中表达更多的 COX-2。Costa et al<sup>[37,47]</sup> 研究认为, COX-2 的表达与突变型 p53 的表达无关。我们对胰腺癌组织中 COX-2 和突变型 p53 的表达进行相关性分析发现二者密切相关。有研究认为野生型 p53 能够与 TATA- 结合蛋白竞争 COX-2 启动子上的结合位点从而抑制 COX-2 的表达<sup>[48]</sup>。在 p53 缺陷的鼠胚胎纤维母细胞中重新置入 p53 可阻止 COX-2 的表达, 因而认为在 p53 和 COX-2 之间存在着调节环路<sup>[49]</sup>。因肿瘤的发生发展是受多基因多步骤调控的, 我们认为, 野生型 p53 可能是 COX-2 上游的其中一个调控基因; 野生型 p53 的突变可能丧失了对 COX-2 的抑制而使 COX-2 表达增加, p53 的突变和 COX-2 在肿瘤的发生、发展中可能起协同作用, 其机制尚需进一步阐明。

随着对 COX-2 参与肿瘤发生、发展机制的进一步研究, 加之选择性 COX-2 抑制剂的不断开发上市, COX-2 在胰腺癌的预防、增加化疗、放疗敏感性, 减少治疗的毒副作用方面存在潜在的实用价值。

#### 4 参考文献

- Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:193-220
- Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 郝恒骏, 于连珍, 孙亮, 缪琨, 白剑峰, 张小勇, 吕秀珍, 赵志泉. 胃癌及癌旁组织中 COX-2 基因蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:578-579
- 吴汉平, 吴开春, 李玲, 幺立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧化酶-2 (hCOX-2) 编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1211-1217
- Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: H. pylori infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 吴清明, 李胜保, 王强, 王德华, 李晓斌, 刘重贞. 食管癌环氧化酶-2 高表达与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:11-14
- 孙波, 吴云林, 张学军, 王升年, 贺恒益, 乔敏敏, 章永平, 钟捷. 舒林酸抑制人胃腺癌细胞增生及诱导凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:997-1002
- 庄则豪, 王立东. 非甾体类抗炎药与消化道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2001;9:1050-1053
- 沈志祥, 曹歌, 孙军. 结直肠癌组织 COX-2 mRNA 表达的临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1082-1084
- Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- Wang X, Lan M, Wu HP, Shi YQ, Lu J, Ding J, Wu KC, Jin JP, Fan DM. Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:103-107
- 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 黄杰安. 非甾体类抗炎药对胃癌 SGC7901 细胞增生及环氧化酶活性的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:262-265
- 周晓东, 于皆平, 冉宗学, 罗和生, 余保平. 结肠肿瘤 cFLIP 基因表达与 p53 突变的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:536-539
- 郭洁, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 李海霞, 冯志强, 杨军. MDM2、P53 与 P14ARF 在结肠肿瘤中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:540-543
- 季代金, 曹燕, 张亚历, 姜泊, 余宁, 冯福才, 周殿元. 大肠癌 HT-29, Lovo 细胞 p53 转录表达差异同步研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:77-79
- 刘节, 苏勤, 张伟. 人乳头状瘤病毒 HPV-E6 及 P53 蛋白与食管鳞癌关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:494-496
- 王东旭, 房殿春, 刘为纹. 胃黏膜肠化及异型增生和胃癌组织中多基因异常. *世界华人消化杂志* 2000;8:855-859
- 黄致治, 吴贤英, 梁英锐, 李乔山, 沈健. 食管基底细胞样鳞状细胞癌免疫组化研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1097-1100
- 刘节, 陈素兰, 张伟, 苏勤. 食管癌 P21<sup>WAF1</sup> 表达与 P53 突变的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:1350-1353
- 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱晴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:302-307
- 魏子白, 王丽冰, 田步生, 王金龙, 孙旭芳, 魏建平, 刘娜, 王敬弘. 内镜下卢戈液染色与 P53 蛋白检测诊断早期食管癌. *世界华人消化杂志* 2001;9:495-498
- 范如英, 李世荣, 武子涛, 吴霞. 散发性大肠癌组织及粪便 P53 蛋白、K-ras 及 APC 基因的检测. *世界华人消化杂志* 2001;9:771-775
- Wang DX, Fang DC, Li W, Du QX, Liu WW. A study on relationship between infection of Helicobacter pylori and inactivation of antioncogenes in cancer and pre-cancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:984-987
- Zhang L, Fu HM, Jin SZ, Huang R, Zhou CG. Overexpression of P53 and relationship between extracellular matrix and differentiation, invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:992-996
- Zhang ZY, Dou KF, Liu ZC. Relationship between p73 and p53 expression in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1147-1151
- Liu HF, Liu WW, Fang DC, Gao JH, Wang ZH. Apoptosis and proliferation induced by Helicobacter pylori and its association with p53 protein expression in gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1265-1268
- Liu H, Wang Y, Zhou Q, Gui SY, Li X. The point mutation of p53 gene exon7 in hepatocellular carcinoma from Anhui Province, a non HCC prevalent area in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:480-482

- 28 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 29 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001;7:779-782
- 30 Wang LP, Liang K, Shen Y, Yin WB, Hans G, Zeng YJ. Neutron-induced apoptosis of HR8348 cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:435-439
- 31 Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, Li TZ, Quan JS, Jin ZN. Effect of Boschniakia rossica on expression of GST-P, p53 and p21ras proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:812-818
- 32 Wang XJ, Yuan SL, Li CP, Iida N, Oda H, Aiso S, Ishikawa T. Infrequent p53 gene mutation and expression of the cardia adenocarcinomas from a high-incidence area of Southwest China. *World J Gastroenterol* 2000;6:750-753
- 33 Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
- 34 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF-1, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 35 Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999;59:4356-4362
- 36 Ristimäki A, Sivula A, Lundin J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:632-635
- 37 Costa C, Soares R, Reis-Filho JS. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:429-434
- 38 Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127-137
- 39 Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002;21:2613-2622
- 40 Liu JW, Li KZ. Pancreatic cancer, oncogene and anti-oncogene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:72-73
- 41 Qin LX, Tang ZY, Ma ZC, Wu ZQ, Zhou XD, Ye QH, Ji Y, Huang LW, Jia HL, Sun HC, Wang L. P53 immunohistochemical scoring: an independent prognostic marker for patients after hepatocellular carcinoma resection. *World J Gastroenterol* 2002;8:459-463
- 42 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lü YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- $\kappa$ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 43 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor- $\beta$ , p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 44 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 45 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Yamasaki S, Kato M, Hashimoto Y, Ohshio G, Matsumoto M, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, Helicobacter pylori infection, and vascular endothelial growth factor expression. *J Surg Oncol* 2002;80:79-88
- 46 Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002;160:1129-1141
- 47 Sepehr A, Taniere P, Martel-Planche G, Zia'ee AA, Rastgar-Jazii F, Yazdanbod M, Etemad-Moghadam G, Kamangar F, Saidi F, Hainaut P. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene* 2001;20:7368-7374
- 48 Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999;274:10911-10915
- 49 Zahner G, Wolf G, Ayoub M, Reinking R, Panzer U, Shankland SJ, Stahl RA. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *J Biol Chem* 2002;277:9763-9771

## 《胃肠道 CT 诊断学》出版发行

本刊讯 本刊编委张晓鹏教授编著的《胃肠道 CT 诊断学》于 2001 年由辽宁科学技术出版社出版,全国新华书店发行。

自 1972 年 CT 应用于临床以来,影像诊断学发生了巨大变化.新技术设备的开发与应用为我们提供了探求、获得和更新知识的有利条件。

胃肠道 X 线造影检查经历了由单对比向双对比发展的变化过程,双对比造影理论与实践研究,为胃肠道影像学发展奠定了坚实基础。

利用 CT 进行胃肠道影像诊断学研究,有助于提高我们的认识,对于进一步丰富胃肠道影像学内容也能起到一定作用。

本书是在总结我们工作经验的基础上,参考国内外先进经验编写而成.书中 CT 照片均为我们临床工作中的病例,考虑到胃肠道解剖与病理学特点,尽可能将重点病例连续层面图像展示给读者,以便客观、全面、立体地理解胃肠道 CT 影像学表现。

# 丙型肝炎病毒超微结构研究进展

程勇前,聂青和,周永兴

程勇前,聂青和,周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
国家自然科学基金资助课题, No.39970767  
项目负责人:聂青和,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2003-11-20

## 摘要

丙型肝炎病毒(HCV)基因组克隆成功后,人们对其基因组的研究已十分深入,但由于HCV病毒颗粒在感染者血中、肝脏中含量很低,血中HCV又往往与免疫复合物和脂蛋白包裹存在,以及缺乏有效的HCV体外培养体系和小动物模型,形态结构研究难度极大而相对滞后,有关HCV超微结构和病毒装配过程还知之甚少,多数研究认为HCV病毒颗粒由外膜及核心组成,外膜表面有钉状突起.HCV感染后的细胞多数可见扩大的胞质囊腔,病毒颗粒多存在胞质囊腔内,这些胞质囊腔认为来自扩大的细胞内质网.细胞核内、胞质、血清、体外培养细胞中HCV颗粒的大小、形式有差异,目前尚无统一认识,其在感染细胞内的形态结构和定位尚不清楚.本文就近年来有关HCV超微结构研究的相关文献进行回顾.

程勇前,聂青和,周永兴.丙型肝炎病毒超微结构研究进展.世界华人消化杂志 2003;11(2):233-237

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/233.htm>

## 0 引言

自1989年丙型肝炎病毒(HCV)基因组克隆成功后,人们对其基因组的研究已十分深入<sup>[1-19]</sup>,然而,尽管许多学者曾对HCV患者和实验感染HCV的黑猩猩肝组织和血清、体外感染HCV的细胞等进行电镜研究,试图揭示HCV超微结构特征,但由于HCV病毒颗粒在感染者血中、肝脏中含量很低,血中HCV又往往与免疫复合物和脂蛋白包裹存在,以及缺乏有效的HCV体外培养体系和小动物模型,形态结构研究难度极大而相对滞后,有关HCV超微结构和病毒装配过程还知之甚少<sup>[20-30]</sup>,其在感染细胞内的形态结构和定位尚不清楚.本文就近年来有关HCV超微结构研究的相关文献进行回顾.

## 1 HCV动物模型肝脏组织标本中HCV颗粒及超微结构改变

Shimizu et al<sup>[31]</sup>给黑猩猩输入非甲非乙(NANB)肝炎患者血浆或血清制造急性肝炎模型,取其肝组织进行电镜观察.在其中1例供体引起的肝炎中发现了肝细胞核内

病毒样颗粒,直径20-27 nm.这些病毒样颗粒外观上类似于病毒,但与通常所见病毒颗粒不同.作者认为虽然不能排除这种结果可能是肝细胞对损伤的一种非特异反应,但与NANB肝炎有关,可作为与病毒感染有关的有意义的标志.随后Bradley et al<sup>[32]</sup>与Tsiquaye et al<sup>[33]</sup>在实验性黑猩猩急性输血后NANB肝炎中相继证实了这种颗粒的存在.

Burk et al<sup>[34]</sup>对感染人NANB肝炎的黑猩猩肝细胞中的病毒样颗粒进行了进一步研究,详细描述了核内病毒样颗粒的特点.发现颗粒直径约22 nm,在核中形成单一同源性颗粒簇.这些颗粒并非正常核内成分,与浓缩的核染色质不同,也不是周边染色质颗粒.因其平均直径在几何上更为一致,且周边无“晕”;而周边染色质颗粒的直径为30-50 nm,周边常有“晕”.至于核小体平均直径只有8-10 nm,比病毒样颗粒小;HBV的核型颗粒平均直径27 nm,较大,且有特殊的颗粒形态.可见这些病毒样颗粒的出现与NANB肝炎的感染有关,该颗粒可能就是NANB肝炎的一种特异性标志,尽管当时还不能完全排除这是肝细胞损伤的一种非特异性反应.

1981年Burk et al<sup>[34]</sup>在观察到核内病毒样颗粒的同时意外发现在其中1例黑猩猩肝细胞胞质内有病毒样颗粒簇.这种胞质内病毒样颗粒平均直径为 $37 \pm 2$  nm,呈高度规则晶体状排列,形态一致,由核心和外壳两部分组成,外观很像病毒.这种颗粒的大小和对称性很像与HBV有关的Dane颗粒,但比后者小.这样小的病毒也否定了其他常见的过客病毒,如呼吸道肠道病毒的可能性.尽管这种颗粒形态类似病毒,但其晶体排列方式相似于微管.

## 2 HCV患者肝脏、血清、外周血单个核细胞中HCV颗粒及超微结构改变

2.1 HCV患者肝脏中病毒样颗粒 Grimaud et al<sup>[35]</sup>在NANB肝炎患者的肝穿刺标本电镜观察中也发现肝细胞核内类似颗粒,50-100个圆形棒状病毒样颗粒成簇存在.这些小簇由50-100个圆形棒状颗粒构成,颗粒的直径为22-27 nm.Hantz et al<sup>[36]</sup>也有同样发现,并与Shimizu及Bradley et al在黑猩猩肝脏组织中所见病毒样颗粒一致.

De Vos et al<sup>[37]</sup>报告电镜观察90例肝炎患者和10例黑猩猩肝组织标本结果,患者包括NANB肝炎,非肝炎病毒性肝炎及乙型、甲型肝炎患者,黑猩猩中部分HBsAg阴性,部分HBsAg阳性.在上述标本中均

发现了病毒样颗粒簇.并根据核内病毒样颗粒的聚集密度分为3种类型: 型(密集型),多位于核中央,由直径20-29 nm的圆形或棒状颗粒密集组成,颗粒之间的间隙小且规则,颗粒簇电子密度小于核染色质中间染色质颗粒及周边染色质颗粒; 型(中间密度型),由与型相同的圆形或棒状颗粒组成,但颗粒间有规则且较宽的间隙; 型(疏松型),由均一的短棒状核内颗粒构成,颗粒间有宽窄不一的间隙,与、型者不同,这种类型的颗粒簇主要位于核周边.上述3种类型间无明显分界.型最常见,出现于94%的标本;型为4%;

型为31%.他们认为不同型颗粒及其分布方式可能只代表了颗粒簇形成的不同阶段,对诊断NANB肝炎缺乏特异性.Busachi et al<sup>[38]</sup>指出, Shimizu et al在感染的NANB肝炎黑猩猩血中及随后其他作者在患者肝组织中见到的病毒样颗粒主要是直径20-27 nm的颗粒,类似于De Vos描述的型颗粒.因而认为准确区分颗粒簇的不同类型有一定意义,不同意De Vos提出的型、型仅代表同一种颗粒在聚集过程中的不同阶段的假说. Shimizu发现高度选择NANB肝炎黑猩猩(即无A、B型肝炎感染中)型颗粒的检出率达74%,而在HBsAg阳性肝组织中该颗粒阳性率为15%,对照组则为0.应该指出,HBsAg阳性组中也存在NANB肝炎交叉感染的可能性.这些结果支持上述核内颗粒为NANB肝炎超微结构标记的假说.

1989年确认HCV是一种RNA病毒,是NANB输血后肝炎和散发性肝炎的主要病原体.Balercia et al<sup>[39]</sup>于1993年报道电镜观察6例由HCV引起的慢性活动性肝炎肝组织标本,其中2例有核内病毒样颗粒,呈不规则圆形,或无定形结构,直径为18-22 nm.显然他与HBV的规则圆形结构和大小相异.这些与HCV感染有关的核内颗粒与HCV肝炎被认定为独立疾病之前称为NANB肝炎的肝组织核内颗粒相似.这种颗粒的特性尚未被阐明,仅代表一个与HCV感染有关的形态.

Prince et al<sup>[40]</sup>, Iwarsones et al<sup>[44]</sup>相继在NANB肝炎患者或黑猩猩肝细胞胞质中发现了“胞质病毒”,其直径在85-90 nm,核心40-45 nm. Feinstone et al<sup>[42]</sup>、Bradley et al<sup>[43]</sup>分别报道,NANB肝炎的致病因子呈管状结构,因此把NANB肝炎的致病因子称为管状形成因子(tubule forming agent, TFA). TFA直径<80 nm,对氯仿敏感,提示该结构中存在必需的脂质结构.但有人认为,肝细胞质中所见的特有管状结构,只是NANB肝炎致病因子造成的特殊病理改变,而不是致病因子本身的特性及结构.1987、1989年Fagan et al<sup>[44,45]</sup>先后报道了几例散发性亚急性重症NANB肝炎病例,其肝组织塌陷区内再生肝细胞胞质中有病毒样颗粒,后者具有双层外壳,直径60-80 nm.但这些颗粒是否就是NANB肝炎病毒胞质颗粒,还有待于高度敏感、特异的免疫细胞化学等方法探明.

1998年, Bosman et al<sup>[46]</sup>通过透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)在血清HCV RNA阳性的2例

成年人及4例患儿的肝组织中检测到颗粒大小为45 nm的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP),分布于内质网囊腔及感染的肝细胞质中.但到目前为止,在丙型肝炎患者肝组织中直接检测HCV阳性颗粒还很困难,其主要原因可能是肝组织中HCV颗粒含量极少.

2.2 HCV患者血清中病毒样颗粒 Takahashi et al<sup>[47]</sup>曾用电镜和固相免疫电镜观察了患者血中HCV.他们采集4名抗-HCV核心抗体强阳性志愿者血浆720 ml,以溴化钾密度梯度法纯化病毒,取密度 $1.150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组分做DEM法观察,见直径55 nm球形病毒样颗粒,但背景存在较多脂蛋白等杂质,影响观察和对病毒的正确辨认.因而用0.05% Tween80处理阳性组分,并以抗-HCV核心蛋白抗体包被电镜载网膜,以黏附经Tween80处理的病毒标本,结果显示,经较长时间(1 h)处理的标本可见缺乏病毒外膜,直径33 nm的核心颗粒,而仅经15 min处理的标本则可见直径55 nm、部分外膜破裂并含核样结构的病毒颗粒.这些结果表明,Tween80处理可裂解病毒脂蛋白外膜,从而暴露HCV核心颗粒的抗原性,因而被特异抗体黏附.

Kaito et al<sup>[48]</sup>首次用特异性的抗假定HCV包膜蛋白的多克隆抗体及单克隆抗体,对含高效价HCV RNA,而HBsAg、抗-HTLV<sub>1</sub>和HIV均阴性的血浆标本经反复超速离心并经连续蔗糖密度梯度分离,结果,在密度 $1.140-1.160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组分中电镜见到55-65 nm球形病毒样颗粒,有棘状突起,形态特性与其他黄病毒相似.进行间接免疫电镜鉴定,发现病毒外膜为胶体金颗粒特异标记,证明所见确为HCV颗粒.关于病毒颗粒的大小,论文作者描述为直径55-65 nm,但陈良标 et al<sup>[49]</sup>根据论文照片提供的标尺测量,病毒的实际大小是:含包膜的完整病毒直径110-130 nm,内含直径55-65 nm圆球形核心或核壳体.核壳体表面6 nm长的细钉状突起,可能是病毒核壳体的子粒结构.病毒包膜与核心之间间距25-35 nm,类似疱疹病毒形态.病毒包膜不稳定,纯化过程中易破裂丢失,故不少报告HCV直径55-65 nm,实际可能是指病毒的核心结构.

Choo et al<sup>[50]</sup>发现在密度梯度离心后,血清中出现二种不同的颗粒,分别为 $1.186-1.213 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1.099-1.127 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,但当血清中的Ig被黏附后,再离心则很少能见到高密度颗粒,而低密度颗粒则无明显变化,提示高密度颗粒是HCV黏附Ig等成分形成的,低密度颗粒才是真正的HCV颗粒.病毒颗粒与免疫球蛋白黏附,可使HCV的致病性减弱,并可能有中和HCV的作用.另外,他们还发现这二种不同颗粒中的HCV高变区核苷酸有差异,以低密度颗粒中高变区的变异更大,可能是免疫压力选择的结果.

Watson et al<sup>[51]</sup>研究发现,约75%的急性感染者血中出现低密度颗粒,而高密度颗粒可见于急性感染后的慢性期及几乎所有的HCV RNA阳性的慢性感染患者.免疫缺陷患者HCV颗粒浓度明显升高,但其滴度与病

情无显著相关性.在抗-HCV及HCV RNA阳性的供血者中, ALT正常者的HCV密度为1.08-1.11 g/ml,而异常者则有1 090-1 100 g·L<sup>-1</sup>及1 220-1 250 g·L<sup>-1</sup>二种密度,提示HCV的颗粒状态与肝炎活动状态相关.1998年, Trestard et al<sup>[52]</sup>通过电镜观察,在密度为1 130 g·L<sup>-1</sup>的梯度中发现了直径为45 nm的核心样颗粒,在1 060-1 070 g·L<sup>-1</sup>梯度中发现了直径60 nm的颗粒,与黄病毒属颗粒相似,支持低密度颗粒层中的病毒样颗粒为HCV颗粒的观点.

HCV核心蛋白除了构成病毒核衣壳外,还在宿主细胞转录、调亡、细胞转化、脂质代谢中有多种调节功能,并且在抑制宿主免疫反应中起作用.HCV核心蛋白被认为以感染性核衣壳包被的病毒体出现在HCV感染宿主的血流中, Maillard et al<sup>[53]</sup>发现在HCV感染者血浆中存在具有病毒颗粒理化、形态、抗原特性的HCV无包膜核衣壳,这些颗粒的CsCl漂浮密度为1 320-1 340 g·L<sup>-1</sup>,大小相异,电镜下直径以38-43 nm和54-62 nm二种为主.用这些病毒颗粒制备的单克隆抗体在血HCV抗原阳性的实验感染HCV的急性期黑猩猩肝细胞胞质中染色阳性.提示无包膜核衣壳的过量产生和释放入血是HCV的形态发生学特性,血液中循环核心颗粒的存在和其在感染早期肝细胞中聚集可能是HCV持续存在和许多免疫病理改变的原因.

2.3 HCV患者外周血单个核细胞中病毒样颗粒 陈良标 et al<sup>[54-56]</sup>在对慢性丙型肝炎患者PBMCs的PCR和免疫组化检测基础上,对强阳性病例标本重点进行了常规和免疫电镜研究.结果,在10例HCV Ag强阳性PBMCs标本中发现了形态结构均一致的病毒颗粒.病毒颗粒呈圆球形,有双层外膜,定位于胞质空泡或内质网池内,大小形态均一,具有病毒结构特征,且不难观察到显示病毒复制形态特征的病毒芽生现象.据所见病毒形态结构分析,直径65 nm的型颗粒可能为型完整病毒的核心颗粒,相当于乙型肝炎病毒Dane颗粒的核心抗原颗粒;而直径100-120 nm,内含65 nm核心的型颗粒可能为完整病毒.

### 3 HCV体外感染细胞中病毒样颗粒及超微结构改变

Serafino et al<sup>[57]</sup>在研究HCV感染后的人TOFE淋巴细胞的超微结构改变时观察到,胞质小囊泡中的病毒样颗粒主要定位于感染细胞的核周区,在此区域可见增生的高尔基体和内质网,富集的小囊和溶酶体结构.而且只在此区域观察到了细胞病毒性效应(cytopathic effect, CPE)样改变,扩大的胞质空泡中充满了退化的无定形物质和病毒样颗粒.最后胞质中充满了这些退化的空泡,这可能是这些受染细胞的终末状态.

1996年, Shimizu et al<sup>[58]</sup>用HCV感染Daudi细胞, 4-24 d后,用RT-PCR检测HCV复制中间体,加入抗C及抗E McAb,通过免疫荧光法及酶标记免疫电镜法观察,于第12天时检测到胞质中的C蛋白及E蛋白,至第15天阳性率为20%阳性染色呈颗粒状,主要分布

于核周.第10天起可见胞质内有成簇的小管状结构,至第15天时数量增多,并出现网状小管结构.第8天培养液中可检测到有抗病毒活性的IFN,提示小管结构可能由IFN所诱生.在第15天,胞质小泡内可见有直径约50 nm的病毒颗粒,用抗C及抗E进行免疫酶染色,抗体可与颗粒特异结合,从而证实这些颗粒含有HCV抗原.在10只HCV感染黑猩猩中,1只E蛋白阳性,经电镜检测发现了与培养细胞中相似的病毒样颗粒,但8例AHC患者中则未观察到相同的结果.

Steffan et al<sup>[59]</sup>用HCV阳性血清感染Daudi细胞,在不同时间点电镜下观察,感染后2 d可以观察到类似黄热病毒在肝细胞瘤细胞系中的改变:(1)可见一些病毒颗粒,直径大约42 nm,球形,直径30 nm电子致密的核衣壳,被膜包绕,与黄热病毒在已经显示典型的调亡早期阶段细胞中大小、结构一致;(2)大量富膜细胞器,尤其是内质网和囊泡结构;(3)膜增生;(4)胞质内电子致密包涵体与其他黄病毒的核衣壳相似.一些细胞在充满了无定型物质的内质网中可见直径30 nm圆形电子致密结构,突出的细胞病变特点为空泡状改变,尤其是扩大的囊泡和调亡改变常在含有富集病毒样颗粒细胞中发现,免疫杂交证实这些扩大的细胞中含有HCV RNA. HCV感染的Daudi细胞似乎很快激发细胞调亡,但并无病毒颗粒的有效释放.

Iacovacci et al<sup>[60]</sup>用HCV阳性血清感染体外培养的人胎肝细胞在感染后30 d的细胞质中观察到直径41-45 nm富集的病毒样颗粒.

Serafino et al<sup>[61]</sup>在HCV感染的TOFE细胞胞质中观察到平均直径45 nm的病毒样颗粒,多位于扩张的内质网中,由电子致密的核心和带突起的外膜组成,并见到类似于HCV感染的人和黑猩猩肝脏中所观察到的管状结构.有些病毒样颗粒外膜与内质网膜相连,提示病毒样颗粒可能从内质网出芽到胞质,在这些感染HCV的细胞扩大的胞质囊泡中充满无定形物质,类似黄病毒科病毒感染后改变.

### 4 HCV基因转染细胞中病毒样颗粒及超微结构改变

由于在感染HCV的人体、动物模型、细胞中直接观察HCV病毒样颗粒十分困难,许多学者开始采用HCV重组基因组转染细胞的方法进行研究.

Mizuno et al<sup>[62]</sup>曾把HCV-1b全基因组重组到带T7多聚酶的痘苗表达载体中,并转染HeLa G细胞,用免疫组化法证实这些细胞中可表达HCV C、E、NS<sub>3</sub>及NS<sub>5</sub>等病毒抗原.免疫电镜发现抗原主要定位于内质网膜上,而30 nm的核心颗粒存在于胞质中,用抗C McAb确证为C蛋白,提示C蛋白在胞质中装配后形成包被颗粒.而普通电镜在内质网池中也发现一直径为45 nm的带有包膜的病毒颗粒.该结果在COS细胞中可以重复.

Baumert et al<sup>[63,64]</sup>用包含HCV结构蛋白cDNA的重组HCV杆状病毒转染昆虫细胞,在扩大的胞质囊腔中

可见由重组基因表达的结构蛋白装配而成的病毒样颗粒,直径约40-60 nm,这些胞质囊腔可能来自内质网,CsCl及蔗糖密度梯度离心提示这些病毒样颗粒的与从HCV患者血中分离的病毒样颗粒生物物理特性相似,并且可以在小鼠体内介导体液和细胞免疫反应<sup>[66]</sup>。这个重组病毒表达系统中不含HCV P7多肽,说明不含P7多肽的HCV核心及包膜蛋白足以形成病毒颗粒<sup>[64]</sup>。

Blanchard et al<sup>[66]</sup>用表达编码HCV结构蛋白基因的重组Semliki森林病毒复制子,在哺乳动物细胞中装配成HCV病毒样颗粒。Liu et al<sup>[67]</sup>用分子克隆技术构建HCV核心蛋白基因重组质粒,并用脂质体转染法转染入QBC939细胞,重组质粒能够在此细胞中有效表达HCV-C蛋白,电镜下在胞质中发现了球型,有外膜,直径50-80 nm的HCV病毒样颗粒。Falcon et al<sup>[68]</sup>在表达HCV C及E1多肽的毕氏酵母菌中也用透射电镜观察到了病毒样颗粒,直径20-30 nm,沿内质网膜出现,但多定位于小囊泡中或自噬小体内,串珠状、链状、高密度网状结构或结晶状。结晶状病毒样颗粒由有序排列的直径20 nm的颗粒组成。这些病毒样颗粒在绵羊体内可诱导较强的体液免疫反应<sup>[69]</sup>。

总之,现研究认为,HCV在体内的存在形式包括(1)完整的独立HCV颗粒;(2)不完整的HCV颗粒(如核心颗粒);(3)与免疫球蛋白或脂蛋白结合的颗粒;(4)由感染细胞释放的含HCV成分的小泡。报道HCV颗粒直径在40-60 nm的较多,也有较小(20-30 nm)和较大(80-120 nm)的报道。多数研究认为HCV病毒颗粒由外膜及核心组成,外膜表面有钉状突起。HCV感染后的细胞多数可见扩大的胞质囊腔,病毒颗粒多存在胞质囊腔内,这些胞质囊腔认为来自扩大的细胞内质网。细胞核内、胞质、血清、体外培养细胞中HCV颗粒的大小、形式有差异,目前尚无统一认识。

## 5 参考文献

- Liu XF, Zou SQ, Qiu FZ. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:135-138
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 2002;76:7672-7682
- Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A. The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 2001;7:661-670
- Kalkeri G, Khalap N, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* 2001;282:26-37
- Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 2001;291:1959-1962
- Chen S, Wang YM. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. *World J Gastroenterol* 2002;8:686-693
- Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002;8:499-504
- Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
- Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS (3) protein on p53 protein expression in hep atocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- Zhu FL, Lu HY, Li Z, Qi ZT. Cloning and expression of NS3 cDNA fragment of HCV genome of Hebei isolate in E.coli. *World J Gastroenterol* 1998;4:165-168
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Inoue K, Yoshida M. Overview of hepatitis C virus from its discovery to now. *Rinsho Byori* 2001;49:733-740
- Steinkuhler C, Koch U, Narjes F, Matassa VG. Hepatitis C virus protease inhibitors: current progress and future challenges. *Curr Med Chem* 2001;8:919-932
- Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999;3:693-716
- Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000;5:129-151
- Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- De Francesco R, Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P, Folgori A. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. *Semin Liver Dis* 2000;20:69-83
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254
- Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* 2002;76:4073-4079
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 2002;76:7672-7682
- Wellnitz S, Klumpp B, Barth H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 2002;76:1181-1193
- Flint M, Quinn ER, Levy S. In search of hepatitis C virus receptor (s). *Clin Liver Dis* 2001;5:873-893
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- Feitelson MA, Larkin JD. New animal models of hepatitis B and C. *ILAR J* 2001;42:127-138
- Germi R, Crance JM, Garin D, Zarski JP, Drouet E. Hepatitis C virus culture systems. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:255-261
- Lechmann M, Liang TJ. Vaccine development for hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000;20:211-226
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:241-254
- Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979;205:197-200
- Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Ebert JW, Dolana GH, Petzel RA, Kantor RJ, Heilbrunn A, Fields HA, Murphy BL. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979;3:253-269
- Tsiquaye KN, Bird RG, Tovey G, Wyke RJ, Williams R, Zuckerman AJ. Further evidence of cellular changes associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1980;5:63-71
- Burk KH, Cabral GA, Dreesman GR, Peters RL, Alter HJ. Ultrastructural changes and virus-like particles localized in liver hepatocytes of chimpanzees infected with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1981;7:1-19
- Grimaud JA, Peyrol S, Vitvitski L, Chevallier-Queyron P, Trepo C. Hepatic intranuclear particles in patients with non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1980;303:818-819

- 36 Hantz O, Vitvitski L, Trepo C. Non-a, non-b hepatitis: identification of hepatitis-B-like virus particles in serum and liver. *J Med Virol* 1980;5:73-86
- 37 De Vos R, Vanstapel MJ, Desmyter J, De Wolf-Peeters C, De Groote G, Colaert J, Mortelmans J, De Groote J, Fevery J, Desmet V. Are nuclear particles specific for non-A, non-B hepatitis? *Hepatology* 1983;3:532-544
- 38 Busachi CA, Badiali de Giorgi L, Alberti A, Tremolada F, Laschi R, Realdi G, Pisi E. Intranuclear particles in non-A, non-B hepatitis. *Hepatology* 1984;4:571-573
- 39 Balercia G, Accordini C, Di Piramo D, Martella F, Tomezzoli A. An ultrastructural study of six cases of chronic active C hepatitis. A comparison with chronic active B hepatitis. *Ultrastruct Pathol* 1993;17:477-482
- 40 Prince AM, Huima T, Williams BA, Bardina L, Brotman B. Isolation of a virus from chimpanzee liver cell cultures inoculated with sera containing the agent of non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1984;2:1071-1075
- 41 Iwarson S, Schaff Z, Seto B, Norkrans G, Gerety RJ. Retrovirus-like particles in hepatocytes of patients with transfusion-acquired non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1985;16:37-45
- 42 Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983;41:816-821
- 43 Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985;88:773-779
- 44 Fagan EA, Ellis DS, Portmann B, Tovey GM, Williams R, Zuckerman AJ. Microbial structures in a patient with sporadic non-A, non-B fulminant hepatitis treated by liver transplantation. *J Med Virol* 1987;22:189-198
- 45 Fagan EA, Ellis DS, Tovey GM, Portmann B, Williams R, Zuckerman AJ. Viruslike particles in liver in sporadic non-A, non-B fulminant hepatitis. *J Med Virol* 1989;27:76-80
- 46 Bosman C, Valli MB, Bertolini L, Serafino A, Boldrini R, Marcellini M, Carloni G. Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. *Res Virol* 1998;149:311-314
- 47 Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, Munekata E, Tachibana K, Akahane Y, Yoshizawa H, Mishiro S. Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J Gen Virol* 1992;73:667-672
- 48 Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75:1755-1760
- 49 陈良标. 电镜技术在病毒性肝炎诊断和研究上的应用. 电子显微学报 1997;16:574-587
- 50 Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 1995;76:2337-2341
- 51 Watson JP, Bevitt DJ, Spickett GP, Toms GL, Bassendine MF. Hepatitis C virus density heterogeneity and viral titre in acute and chronic infection: a comparison of immunodeficient and immunocompetent patients. *J Hepatol* 1996;25:599-607
- 52 Trestard A, Bacq Y, Buzelay L, Dubois F, Barin F, Goudeau A, Roingeard P. Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Arch Virol* 1998;143:2241-2245
- 53 Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001;75:8240-8250
- 54 安萍, 陈良标, 田惠英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞丙型肝炎病毒检测及其意义. 中华内科杂志 1999;38:737-739
- 55 陈良标, 陈佩兰, 刘超英. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)HCV感染的电镜研究. 中国医学影像学杂志 1999;7: 110-111
- 56 Yao P, Chan LB, Hu X, Chen PL, Hu D. Hepatitis C virus infection and morphologic study in B lymphocytes of patient with hepatitis C. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:31-33
- 57 Serafino A, Valli MB, Andreola F, Carloni G, Bertolini L. Morphological modifications induced by HCV infection in the TOFE human lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1998;149:299-305
- 58 Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-209
- 59 Steffan A, Marianneau P, Caussin-Schwemling C, Royer C, Schmitt C, Jaek D, Wolf P, Gendralut J, Stoll-Keller F. Ultrastructural observations in hepatitis C virus-infected lymphoid cells. *Microbes Infect* 2001;3:193-202
- 60 Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 1997;26:1328-1337
- 61 Serafino A, Valli MB, Alessandrini A, Ponzetto A, Carloni G, Bertolini L. Ultrastructural observations of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line. *Res Virol* 1997;148:153-159
- 62 Mizuno M, Yamada G, Tanaka T, Shimotohno K, Takatani M, Tsuji T. Virion-like structures in HeLa G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1995;109:1933-1940
- 63 Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998;72:3827-3836
- 64 Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 1999;117:1397-1407
- 65 Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001;34:417-423
- 66 Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* 2002;76:4073-4079
- 67 Liu XF, Zou SQ, Qiu FZ. Construction of HCV-core gene vector and its expression in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:135-138
- 68 Falcon V, Garcia C, de la Rosa MC, Menendez I, Seoane J, Grillo JM. Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). *Tissue Cell* 1999;31:117-125
- 69 Acosta-Rivero N, Alvarez-Obregon JC, Musacchio A, Falcon V, Duenas-Carrera S, Marante J, Menendez I, Morales J. In vitro self-assembled HCV core virus-like particles induce a strong antibody immune response in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:300-304

# 抗乙型肝炎病毒核酶的研究进展

李谨革, 聂青和, 黄长形

李谨革, 聂青和, 黄长形, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
项目负责人: 李谨革, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. ban211@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3374311  
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-20

## 摘要

全世界大约有3.5亿乙型肝炎病毒(HBV)携带者, 这种感染者集中分布于包括我国在内的东南亚、东亚及非洲的撒哈拉地区。HBV的持续存在可导致肝硬化以及肝癌, 对于已感染HBV者, 目前常用的化学及免疫疗法通常无效。因此, 寻找新的抗HBV感染的手段成为热点。核酶作为一种成熟的、可剪切特异性RNA的分子生物学方法受到广泛重视。由于核酶有严格的序列特异性, 长期使用对细胞无副作用, 并且结构简单, 可人工设计, 因此, 很有希望成为治疗HBV感染的新方法。目前, 核酶已广泛用于抗病毒及抗肿瘤的研究, 尤其对HIV的研究, 已进入临床工作阶段。本文将从核酶的构成、核酶研究的热点以及抗HBV感染等方面进行阐述。

李谨革, 聂青和, 黄长形. 抗乙型肝炎病毒核酶的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(2):238-241

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/238.htm>

## 0 引言

RNA具有酶的活性, 首先是在四膜虫及大肠杆菌RNase P组分研究中发现的。1981年Cech研究组首先报道了四膜虫rRNA前体的间插序列(IVS)具有催化功能, 他能催化前体自我剪接得到成熟的rRNA, 进而发现, 游离的间插序列又能自我反应产生一个环状分子并释放一寡核苷酸片段, 这些结果证明某些RNA确实具有特异的催化功能。Cech称此具有酶性质的RNA分子为核酶(ribozyme)。到目前为止, 已发现并证实的主要核酶有六大类型, 包括 I类内含子; RNase P的RNA亚基; 锤头状核酶; 发夹状核酶; 丁型肝炎病毒核酶和链孢霉线粒体核酶<sup>[1-8]</sup>。

由于人们对核酶的生化及生物学特性有了深入了解, 核酶具有分子小, 比较容易通过多种途径获得, 如化学合成, 体外转录和体内表达, 所以利用核酶可序列特异性地结合并切割靶RNA的特点, 人们通过合理的化学或分子操作, 便可破坏靶基因的生物功能。由于核酶含有较传统药物高得多的信息量、高效无毒, 因此成为抗HBV研究中的一个亮点。目前已将核酶用于HIV感染的二期临床试验, 随着研究的深入, 核酶必将给HBV感染的治疗带来新希望<sup>[9-32]</sup>。

## 1 核酶发展过程中的热点

核酶最突出的优点在于可选择性地阻断特异基因的表达, 因而成为分子生物学研究中的一种工具, 可能对人类疾病的治疗产生深远的影响。但在实际研究当中, 发现核酶尚有许多方面有待进一步深入研究。如何提高其细胞内的稳定性, 提高切割活性, 都是核酶研究当中的热点问题。

**1.1 提高核酶的稳定性** 由于细胞内含有大量内切核酸酶和外切核酸酶, 使核酶在细胞内很容易被降解。研究发现核酶水解RNA需要借助被切点邻位的2'-OH的参与, 因此目前的很多工作主要是对核酶2'-OH进行修饰, 如2'-脱氧, 2'-氟代, 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-O-CO<sub>3</sub>及2'-O-烯丙基等。这类修饰物在用核酶或细胞粗提液处理时, 其稳定性比原始的核酶高2-3数量级, 其K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>值降低5-100倍。有人将锤头型核酶的嘧啶(U4和U7, 除外)的2'-OH用氟取代, 发现其在血清中的降解速率降低了上千倍, 而催化活性并没有太大的改变。Taylor et al用2'-脱氧核糖核苷酸只对核酶的茎区进行修饰, 发现切割活力增加了6倍。陆长德 et al研究表明, 茎区用DNA代替RNA, 可影响切割效率和最适反应温度。Heidenreich et al用脱氧尿嘧啶取代核酶保守区的第4,7位碱基, 在核酶的末端用四个硫化磷酸二酯键取代磷酸二酯键, 这样的核酶依旧保持有原始的活性, 而且在不稀释小牛血清中可稳定存在至少24 h。2'-OH的甲基化、烷基化和脱氧都已经成功地用于核苷酸的保护。因此适当地选择对核酶某些核苷酸的修饰不仅能保留或提高其切割活力, 也能提高其抗核酸酶的能力。随着核苷酸化学的发展, 为核酶的稳定性和体内应用提供了解决问题的基础<sup>[33-42]</sup>。

**1.2 提高核酶的切割效率** 具有应用价值的核酶, 一般是根据已经知道的核酶的二级结构, 人工设计而成的, 切割效率远远低于天然核酶。目前借助于现代分子生物学技术, 人们已经能够在离体模拟分子进化, 离体筛选高效核酶。借助核酶的随机文库反复筛选, 亦可得到高活性的核酶。Beaudry和Toyce对四膜虫型核酶进行了10代突变选择, 结果使核酶剪切活性提高了100倍。Joseph用体外筛选方法对抗HIV的发夹状核酶进行了突变筛选, 结果证明此方法是提高核酶活性的有效方法。多个核酶的联合切割, 由一组不同特性的核酶组成, 可分别针对靶RNA分子的不同位点, 并在多个不同的位点破坏靶RNA, 从而进一步提高核酶阻断靶基因的速率<sup>[43-47]</sup>, 我们的研究工作也证实了这一点<sup>[46]</sup>。

1.3 核酶的靶细胞导入及活性提高 核酶分子如同药物分子一样,必须通过物理的或化学的手段直接导入细胞,方可发生剪切作用.阳离子脂质体转染试剂已经商品化,且操作方便,被广泛用于做导入 DNA 和 RNA 的载体.Sioud et al 证实用脂质体介导,每个细胞中可导入 30 万个核酶分子.感染的方法也是一种有效的方式,即将核酶基因构建在合适的表达载体上,在细胞内表达发挥活性.目前最常见的是逆转录病毒载体系统,腺病毒载体及腺相关病毒.腺病毒载体在细胞中能够高拷贝地自主复制,并不整合到人的染色体上,因而得到了人们广泛重视<sup>[48-50]</sup>.

## 2 核酶在抗人肝炎病毒中的应用

核酶在抗 HBV 及 HCV 研究中有广泛应用.Weinberg et al<sup>[51]</sup>报道,用双位点核酶的真核表达载体,在细胞中表达针对 HBV 的 X 基因的核酶,结果表明不但使 HBV X 蛋白大为下降,而且使 S 抗原亦有下降,实验中用对照组的办法排除反义核酸的作用.提示这是一个潜在的治疗慢性肝炎的方法.韩国学者 Yim et al<sup>[52]</sup>则在研究中发现,不论是野生型核酶,还有突变的锤头状结构核酶,如 G5 突变为 A 或 U、T 突变为 G,都具有同样的核酶功能,同时他发现锤头样结构不论是三茎环还是两茎环结构,只要在起始区都可有效抑制转录作用.同是韩国学者, Kim et al<sup>[53]</sup>则报道,使用二个抗 HBV X 基因锤头结构核酶,在 Hep G2 细胞使 HBV X mRNA 下降 40-57%,而突变的核酶则无活性.Passman et al<sup>[54]</sup>报道在乙型肝炎病毒质粒的 S 区用绿色荧光蛋白来替代,将抗 HBV X 基因核酶与其共转染细胞,通过绿色荧光蛋白直接反应核酶对 HBV mRNA 的抑制作用,结果表明,核酶确是一种非常有效的方法.Putlitz et al<sup>[55]</sup>则选用随机文库( $5 \times 10^5$  突变体)寻找合适的靶位点,在四种亚型中选用的 17 个保守区域,使用聚合酶 或 做启动子来表达发夹状核酶.与 HBV 共转染 HCC 细胞,四种不同的核酶抑制率可达 80%,69%,66% 及 49%,其无活性的突变体抑制率分别为 36%,28%,0%,0%.他们结果提示,抑制 HBV 表达的主要活性来源于核酶.Werner et al<sup>[56]</sup>则尝试使用 RNase P 中的 13 碱基的 EGS 对 HBV 的转录进行抑制,结果提示也是一种可行的方法.国内亦有报道采用丁肝核酶对 HBV 表达进行抑制的报道.本实验室对 HBV 核酶亦较为深入,发现在细胞水平、双位点核酶对 HBV 的抑制率在 50-69% 之间<sup>[57-59]</sup>.

Ohkawa 在体外研究中,选择了 3 个抗 HCV C 区的锤头状核酶,证实了三个核酶都可有效剪切病毒的 mRNA,其效率最高的位点最近起始区,其抑制率可达 70-80%.Macejak et al 设计了 15 个锤头状核酶,针对 HCV 的 5' UTR 区域,在以荧光素酶为报道基因的细胞研究系统中,这 15 个核酶都有抑制活性,从 40-80% 不等,个别的可达 90% 以上,提示这是一个潜在的治疗 HCV 感染的方法.国内学者(包括我科)都有类似报道<sup>[60-62]</sup>.Lee et al<sup>[63]</sup>,则研究了抗 HCV

核酶的药代动力学,用  $^{32}\text{P}$  标记或罗丹明,经皮下或静脉,剂量为 10 mg/kg 或 30 mg/kg,注射 CS781/6 小鼠,研究表明核酶可持续在小鼠肝细胞表达,支持抗 HCV 核酶是一种潜在的治疗慢性 HCV 感染的方法.国外已有较多报道<sup>[64-66]</sup>.

## 3 核酶的新特性和展望

通常情况核酸的序列相同的二个 RNA 分子应该有大致相同的功能及结构.结果却并非这样,2000 年的《科学》杂志报道:同一 RNA 序列有个相反的功能<sup>[67]</sup>.研究人员采用了二个具有活性 HDV 核酶,一个是具有剪切活性,另一个则是通过试管进化后具有连接酶活性,二个序列相同,作用机制却不同,进一步研究空间结构的差异,发现其碱基配对区域不同可能是造成功能相反的根本原因.因此 Schultes 和 Bartel 提出“内插片段”理论.为验证他们的理论,他们采用突变的方法,改变 HDV 核酶的配对区域,如果空间结构为型连接核酶则其连接速度提高 750 倍,如果为 DHDV 核酶,则剪切速度提高 70 倍.

此外,人们也发现核酶也有毒性作用,Levitz R 在研究抗 HIV-1 的 tat 区域核酶时,采用的是锤头状核酶,由 mRNA 文库中筛选出的合适的靶位点.在研究中发现核酶抑制  $\text{recA}^+ \text{recA}^+ \text{lexA}_3$  等细胞生长,具有明显的细胞毒性作用<sup>[68]</sup>.

目前核酶的体内应用研究已经取得了很大的进展,但要使核酶真正应用于人类疾病的防治,仍需得到更多信息.尽管抗 HIV 核酶在进行了 期临床试验,但是仍需要人们持之以恒的探索.相信随着基因疗法的研究进一步深入,核酶用于临床是可以预见的.

## 4 参考文献

- 1 Lustig B, Jeang KT. Biological applications of hammerhead ribozymes as anti-viral molecules. *Curr Med Chem* 2001;8:1181-1187
- 2 Duzgunes N, Simoes S, Slepishkin V, Pretzer E, Rossi JJ, De Clercq E, Antao VP, Collins ML, de Lima MC. Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH-sensitive liposomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:515-523
- 3 Klein SA, Klebba C, Engels JW. An assay system to detect the selective advantage of anti-HIV ribozyme expressing CD4+ T-lymphocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:629-634
- 4 Habu Y, Miyano-Kurosaki N, Takeuchi H, Matsumoto N, Tamura Y, Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication by the Cre-loxP hammerhead ribozyme. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:723-726
- 5 Michienzi A, Rossi JJ. Intracellular applications of ribozymes. *Methods Enzymol* 2001;341:581-596
- 6 Statham S, Morgan RA. Gene therapy clinical trials for HIV. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:430-436
- 7 Rossi JJ. The application of ribozymes to HIV infection. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:316-322
- 8 Feldman AR, Sen D. A new and efficient DNA enzyme for the sequence-specific cleavage of RNA. *J Mol Biol* 2001;313:283-294
- 9 Ramezani A, Ma XZ, Nazari R, Joshi S. Development and testing of retroviral vectors expressing multimeric hammerhead ribozymes targeted against all major clades of HIV-1. *Front Biosci* 2002;7:a29-36

- 10 Eubank TD, Biswas R, Jovanovic M, Litovchick A, Lapidot A, Gopalan V. Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates. *FEBS Lett* 2002;511:107-112
- 11 Hnatyszyn H, Spruill G, Young A, Seivright R, Kraus G. Long-term RNase P-mediated inhibition of HIV-1 replication and pathogenesis. *Gene Ther* 2001;8:1863-1871
- 12 Kraus G, Geffin R, Spruill G, Young AK, Seivright R, Cardona D, Burzawa J, Hnatyszyn HJ. Cross-clade inhibition of HIV-1 replication and cytopathology by using RNase P-associated external guide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3406-34011
- 13 Wang DY, Sen D. Rationally designed allosteric variants of hammerhead ribozymes responsive to the HIV-1 Tat protein. *Comb Chem High Through Screen* 2002;5:301-312
- 14 Mautino MR. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther* 2002;2:23-43
- 15 Werner M, Rosa E, George ST. Design of short external guide sequences (EGSs) for cleavage of target molecules with RNase P. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997;36:19-21
- 16 Karayiannis P. Hepatitis D virus. *Rev Med Virol* 1998;8:13-24
- 17 Yim SH, Park I, Ahn JK, Kang C. Translational suppression by hammerhead ribozymes and inactive variants in *S. cerevisiae*. *Biomol Eng* 2000;16:183-189
- 18 Pan WH, Devlin HF, Kelley C, Isom HC, Clawson GA. A selection system for identifying accessible sites in target RNAs. *RNA* 2001;7:610-621
- 19 Joyce GF. RNA structure. Ribozyme evolution at the crossroads [comment]. *Science* 2000;289:444-448
- 20 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 21 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- $\alpha$ 1 versus interferon—treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 22 Li JG, Zhou YX, Lian JQ. Intracellular application of two-unit ribozyme gene against hepatitis B virus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2000; 39: 27-30
- 23 Shan Y, Xiong SS, Liu X, Zhao M, Ba QJ, Zhou LJ. Comparison of human leukocyte interferon and recombinant interferon alpha 1 in the treatment of chronic hepatitis B. *Xin Xiaohuabingxue Za Zhi* 1996;4:40-41
- 24 Liu WE, Tan DM, Fan XG, Ouyang K, Zhang Z. Role of autoimmune reaction in pathogenesis of patients with chronic HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 1999;7:120-121
- 25 Xie Q, Guo Q, Zhou XQ, Gu RY. Effect of adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human serum albumin on duck hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 1999;7:125-126
- 26 Xu KC, Wei BH, Yao XX, Zhang WD. Recent therapy for chronic hepatitis B by combined traditional Chinese and Western medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 1999;7:970-974
- 27 Pan X, Ke CW, Pan W, Wu WB, Zhang B, He X, Cao GW, Qi ZT. Construction of eukaryotic expression vector carrying IFN- $\gamma$  gene under control of human HBV promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 2000;8:520-523
- 28 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 29 Zhong S, Wen SM, Zhang DF, Wang QL, Wang SQ, Ren H. Sequencing of PCR amplified HBV DNA pre-c and c regions in the 2.2.15 cells and antiviral action by targeted antisense oligonucleotide directed against sequence. *World J Gastroenterol* 1998;4:434-436
- 30 Yang SM, Zhou H, Chen RC, Wang YF, Chen F, Zhang CG, Zhen Y, Yan JH, Su JH. Sequencing of p53 mutation in established human hepatocellular carcinoma cell line of HHC4 and HHC15 in nude mice. *World J Gastroenterol* 1998;4:506-510
- 31 Shi JJ, Miao F, Liu FL. Therapeutic effect of medicinal herbs and western drugs on hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):61-62
- 32 Qiu AG, Qiu RB, Miao Y, Fu ZL, Zhang YR, Zheng YQ, Hong YS, Wu BS, Jiang YP, Qian CF. Clinical study on therapeutic effect of three cycle natural therapy on chronic hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):82
- 33 Zhu Y, Wang YL, Shi L. Clinical analysis of the efficacy of interferon alpha treatment of hepatitis. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):85-86
- 34 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 35 Ma CH, Sun WS, Zhang LN, Ding PF. Inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides complementary to HBV on HepG2.2.15 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):72
- 36 Gao XW, Jia SY, Liu XM. BCG vaccine combined with dipyridamole in the treatment of HBV infection. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):76
- 37 Bo AH, Tian CS, Xue GP, Du JH, Xu YL. Morphology of immune and alcoholic liver diseases in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 2001;9:157-160
- 38 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV $\alpha$ C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 2001;9:635-639
- 39 Tu SP, Wu YL, Sun J, He Q, Ke YM, Fu H, Yuan YZ, Jiang SH. Disinfecting effect of electrolyzed acid water on gastroendoscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 2001;9:874-876
- 40 Tang ZY. Hepatocellular Carcinoma Cause, Treatment and Metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 41 Ghaneh P, Slavin J, Sutton R, Hartley M, Neoptolemos JP. Adjuvant therapy in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7:482-489
- 42 Spangenberg HC, Wands JR. Ribozymes and hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1084-1085
- 43 Feng Y, Kong Y, Wang Y, Qi G. Antiviral Activity of a Hammerhead Ribozyme against HBV in HepG2.2.15 Cells. *Shengwu Xue Yu Shengwu Wuli Xue Bao (Shanghai)* 2002;34:204-208
- 44 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
- 45 Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibitory effect of ribozyme on HBeAg in human HCC cells. *Shijie Huaren Xiaohua Za Zhi* 1999;7:28-30
- 46 Zheng WC, Lu CD, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Hammerhead Ribozymes Suppress HBV(adr) in HepG2 Cells. *Shengwu Xue Yu Shengwu Wuli Xue Bao (Shanghai)* 2001;33:25-29
- 47 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 48 Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- 49 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Intracellular inhibition of the replication of hepatitis B virus by hammerhead ribozymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1125-1130
- 50 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Inhibition of hepatitis B virus by hammerhead ribozyme targeted to the poly(A) signal sequence in cultured cells. *Biol Chem* 2001;382:655-660
- 51 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
- 52 Yim SH, Park I, Ahn JK, Kang C. Translational suppression by hammerhead ribozymes and inactive variants in *S. cerevisiae*. *Biomol Eng* 2000;16:183-189
- 53 Kim YK, Junn E, Park I, Lee Y, Kang C, Ahn JK. Repression of hepatitis B virus X gene expression by hammerhead ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:231
- 54 Passman M, Weinberg M, Kew M, Arbuthnot P. In situ demonstration of inhibitory effects of hammerhead ribozymes that are targeted to the hepatitis Bx sequence in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:728-733
- 55 zu Putlitz J, Yu Q, Burke JM, Wands JR. Combinatorial screening and intracellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus. *J Virol* 1999;73:5381-5387
- 56 Werner M, Rosa E, Al Emran O, Goldberg AR, George ST. Targeted cleavage of RNA molecules by human RNase P using minimized external guide sequences. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999;9:81-88

- 57 李谨革,周永兴,连建奇.核酶对乙肝病毒细胞内抑制作用.中华内科杂志 2000;39:27-31
- 58 李谨革,周永兴,连建奇.核酶对细胞内 HBeAg 表达抑制作用的共聚焦定量分析.中华传染病杂志 1999;17:152-155
- 59 李谨革,周永兴,连建奇.双位点核酶对2.2.15细胞内HBeAg表达抑制作用.中华肝病杂志 1999;7:181
- 60 连建奇,周永兴,金由辛.双位点核酶对 HBVC 基因的体外剪切作用.生物物理与生物化学进展 1999;26:566-569
- 61 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华,李谨革,焦成松,李光玉,张文斌.锤头结构核酶在人肝癌细胞内对丙型肝炎病毒基因表达的抑制作用.中华医学杂志 1999;79:631-632
- 62 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华,李谨革,焦成松,李光玉,张文斌.抗 HCV5' 非编码区核酶对病毒基因表达翻译启动的抑制作用.中华传染杂志 2000;18:10-12
- 63 Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology* 2000; 32:640-646
- 64 Wen S, Qi X, Zhou R. Study of transcription and cleavage in vitro of HDV with HBV-specific hammerhead ribozyme. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:11-12
- 65 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, Blatt LM. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
- 66 Kruger M, Beger C, Li QX, Welch PJ, Tritz R, Leavitt M, Barber JR, Wong-Staal F. Identification of eIF2Bgamma and eIF2gamma as cofactors of hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation using a functional genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8566-8571
- 67 Schultes EA, Bartel DP. One sequence, two ribozymes: implications for the emergence of new ribozyme folds. *Science* 2000; 289: 448-452
- 68 Levitz R, Dong Y, Wang JY, Jeng SW, Chen CR, Wang JW, Zhao X, Zhou J, Lu T, Drlica K. Cytotoxic hammerhead ribozymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999;9:117-123

## 《胃癌癌前病变基础与临床》出版

本刊讯 著名胃肠病学专家劳绍贤教授主编的《胃癌癌前病变基础与临床》于2002年8月由广东人民出版社出版。

胃癌是临床常见的恶性肿瘤之一,发病率与死亡率在我国居恶性肿瘤之首.然而胃癌的形成需要经过相当长时间的演变过程,对癌前期病变的研究,无疑对胃癌的防治具有重要意义.近二十多年来,国内外学者对胃癌癌前病变的基础与临床及中西医结合治疗进行了广泛深入的研究,为防治胃癌研究开辟了新的天地.为了全面反映近年来胃癌癌前病变领域的研究成果,我们编写这本专著,希冀能较为全面反映这一领域研究概况和进展,为从事相关学科研究的同道,提供有益的参考.

本书就胃癌癌前病变的概念、病因、病理、诊断与治疗等基础与临床知识进行较全面的介绍.同时本书也对胃癌癌前疾病慢性萎缩性胃炎、胃溃疡、胃息肉、残胃炎、巨大胃黏膜肥厚症,以及胃癌的中西医结合治疗作了相关的介绍.

本书的编写者均是参与“胃炎消治疗胃癌癌前病变的临床与实验研究”系列课题的主要科研骨干,该课题系列得到包括国家科学技术委员会、广东省自然科学基金委员会、广东省中医药管理局等多项科研基金的资助.作者将十多年来的临床与实验方面的阶段性结论进行了认真的总结,使本书具有一定的特色(每本定价 18.00 元,欲购买者请汇款至:100023 北京市 2345 信箱,世界胃肠病学杂志社收)

# IRES 特异性 IRNA 在丙型肝炎抗病毒治疗中作用

梁雪松, 连建奇, 周永兴

梁雪松, 连建奇, 周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 710038  
国家自然科学基金资助课题, No. 3000147  
项目负责人: 连建奇, 710038, 陕西省西安市霸桥路新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. lianjq@yahoo.com  
电话: 029-3377595  
收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-20

## 摘要

丙型肝炎基因治疗是目前研究的热点, HCV IRES 是丙肝病毒核酸复制和蛋白翻译的关键结构. 目前针对 IRES 结构的治疗策略主要包括反义核酸、核酶、抑制性 RNA 等. 现就抑制性 RNA 在 HCV 感染基因治疗中作用研究进展作简要综述.

梁雪松, 连建奇, 周永兴. IRES 特异性 IRNA 在丙型肝炎抗病毒治疗中作用. 世界华人消化杂志 2003;11(2):242-245  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/130.htm>

## 0 引言

到目前为止, 抗 HCV 感染的治疗效果远不尽人意, 其重要原因之一是不能快速、有效地抑制 HCV 基因在宿主体内的表达, 并清除病毒<sup>[1-18]</sup>. 近年来一些学者提出了基因治疗的思路, 主要包括反义核酸策略、核酶策略、细胞内干扰性多肽或蛋白策略、抑制性 RNA 策略等, 后者具有高效、特异和安全等优点, 现就其研究进展综述如下.

## 1 HCV 因结构及翻译机制

1.1 HCV 基因结构 HCV 是黄病毒属成员, 单股正链 RNA 病毒, 全长约 9 400 核苷酸(nt)组成, 含有一大的开放读码框(ORF), ORF 几乎跨越 HCV 全基因组. HCV 基因组 5' 末端为非编码区(NCR), 位于 ORF 上游. 3' 末端也为 NCR 区, 位于 ORF 的下游, 可含 poly (A) 或 poly (U) 尾. 5' NCR 和 3' NCR 在病毒的复制和稳定病毒的生物学性状等方面起重要作用<sup>[19-29]</sup>. 采用基因克隆方法可以检出 HCV 5' NCR 区的完整序列. 首先报道的从原型株获得的 5' NCR 长为 341 nt, 以后报道的该区长短略有不同, 为 319 nt 或 324 nt, 这些短的 5' NCR 可能是 HCV 基因组在体内被切割或基因变异的结果. 5' NCR 在 HCV 基因组中最为保守. 在 5' NCR 中存在三个高度保守的结构区域, 分别位于 3-65、178-199 和 246-263 位, 后二个区域与病毒的进化有关, 前一个区域毗邻病毒蛋白前体翻译的真实启动子 AUG, 故认为这一结构对 HCV 基因组的翻译至关重要, 这一假设在以后的

体内外实验研究中得到了证实. 通过热力学模拟试验和使用特异性 RNA 酶裂解试验分析 HCV 5' NCR 二级结构证实: 5' NCR 二级结构可分为 4 个结构域, 结构域 I 呈发夹状, 可能有阻止病毒翻译启动的作用; 结构域 II 是一个大的茎-环结构, 可能存在一辅助结合位点, 当核糖体或其他未知因子与其结合后会对 HCV 5' NCR 空间结构起稳定作用, 从而消除结构域 I 的负性作用, 保证病毒蛋白前体的有效翻译; 结构域 III 和结构域 IV 对 HCV RNA 有效启动和 5' NCR 翻译调控至关重要<sup>[30-35]</sup>.

1.2 HCV 蛋白翻译机制 迄今为止, 真核细胞中 mRNA 翻译机制有二种不同的形式. 第一种为核糖体扫描机制, 该机制涉及核糖体 40S 亚单位和 5' 帽状结构结合, 然后核糖体从 5' 端向 3' 端扫描, 直至碰到合适的起始密码子 AUG; 第二种机制为内部启动, 特定病毒和细胞 mRNA 在 5' NCR 含有一定的序列, 可以介导非帽状结构形成依赖性蛋白翻译机制, 这一序列已被定为 IRES, 位于 5' 端下游约 100 nt 左右处, 主要介导核糖体与 mRNA 结合. 这种机制最早在小核糖核酸病毒属中发现. 进一步研究发现, 宿主细胞性蛋白多肽和具有一定二级结构的病毒 5' NCR 结合是这种机制的关键. 现已确定的蛋白多肽包括 La 自身抗体、聚嘧啶束蛋白 (PTB) 及核仁素等, 这些蛋白多肽与 IRES 结合可便于核糖体与 mRNA 结合. HCV 5' NCR 结构与瘟病毒和微小 RNA 病毒相似, 在 HCV 5' NCR 存在同微小 RNA 病毒相似的富嘧啶区即 IRES 结构. Wang et al 以 CAT 作为报道基因, 应用 PCR 技术构建了一系列 HCV 5' NCR 控制突变型表达载体, 体外翻译和细胞转染实验证明, HCV 基因组的翻译机制为非帽状结构形成依赖性的, 且证明 IRES 结构的存在和完整性是 HCV 蛋白翻译正常进行的结构基础<sup>[36-52]</sup>. 以这种机制进行蛋白翻译的病毒还有脊髓灰质炎病毒(PV)、口蹄疫病毒、鸭乙型肝炎病毒等.

## 2 IRNA 的结构

1992 年 Coward 和 Dasgupta 在研究 PV 时, 发现酵母细胞的一段 60 nt 的片段对 PV 病毒的复制和表达具有较强的抑制作用, 被称为抑制性 RNA (IRNA). IRNA 为一种核酸物质, 其一级结构和空间结构对其活性均有重要意义. Das et al 采用缺失突变方法获得不同 IRNA 突变体 (mutant IRNA, mIRNA), 并以 mIRNA 对含 PV IRES 的 p2CAT 体内外表达的抑制作用进行了检测. 结果缺失

31-45 nt 的 miRNA 完全失去了抑制活性, 含 30-40 nt 的 miRNA 保留了大部分的抑制活性, 而另一含 30-45 nt 的 miRNA 表现出较高的体内抑制活性, 这说明序列 30-40 nt 是维持 IRNA 活性的必须序列。此后, Venkatesan et al.<sup>[53]</sup> 依据能量级最低原则, 应用计算机软件 MFOLD 预测了 IRNA 及其互补体 (complete IRNA, cIRNA) 的二级结构, 发现二者具有大体相似的结构, 即二个环、一个茎和一个大的膨出。为了证实此结果和确立其结构, 作者应用酶学方法和化学修饰法对 IRNA 及 cIRNA 二级结构进行了探索。具体的方法是: 第 1 步以 RNases T<sub>1</sub>、核酸酶 S<sub>1</sub> 和 RNases ONE 消化体外转录的 IRNA, 确立单链部分, RNases V<sub>1</sub> 消化 IRNA, 确立双链部分; 第 2 步在先行与寡核苷酸杂交后用 RNases H 切割; 第 3 步应用 DMS 化学法改变腺苷和胞苷。结果发现 IRNA 结构为: 20-27 nt 与 62-69 nt 配对形成一茎, 二个环位于 6-15 nt、36-43 nt, 膨出位于 46-61 nt 之间。cIRNA 结构为二个位于 20-28 nt 和 49-57 nt 的环, 位于 42-48 nt 的茎和位于 61-64 nt 间的 2 nt 大小的膨出。他们还证实 IRNA 和 cIRNA 结合相同的蛋白多肽, 具有相似的抑制活性, 上述结果提示二级结构对 IRNA 的抑制活性具有重要的意义。他们进一步依据能量级最低化原则建立了 m1IRNA 和 m2IRNA, 前者将 44-46 nt 5' GCA 3' 变为 5' UUC 3', 结果是位于 36 nt 和 43 nt 间的发夹样环状结构消失了, 使 m1IRNA 与 IRNA 结构相比发生了改变。m2IRNA 是通过将 24-26 nt 的碱基与 63-65 nt 的碱基互换而成, 结构与 IRNA 大相径庭。对上述二种突变体活性检测的结果表明, 其完全失去了抑制活性, 这反过来进一步证明维持 IRNA 的二级结构对其活性是十分重要的。总之, IRNA 为一 60 nt 的小分子 RNA, 可特异性抑制 IRES 介导蛋白翻译, 其二级结构是维持其抑制活性的关键。

### 3 IRNA 的功能

**3.1 IRNA 抑制 IRES 介导蛋白翻译机制** 据目前的研究结果分析, IRNA 可特异性抑制 IRES 介导蛋白翻译。从理论上推测 IRNA 作用机制有二种可能: (1) 作为反义核酸与 5' NCR 特定序列结合; (2) 与 IRES 介导蛋白翻译过程中宿主因子结合而阻断核糖体与 IRES 结合<sup>[54-61]</sup>。目前的研究结果均不支持前一种情况, 其原因是: 早在分离提纯 IRNA 的过程中就见纯化的 IRNA 序列与病毒 5' NCR 序列无互补性, 且也不与其相杂交。另外, 过量的 Hela 细胞裂解液可逆转 IRNA 抑制活性, 而过量的病毒 RNA 或 5' NCR 却无此作用, 这进一步说明 IRNA 并非通过与病毒直接作用而发挥抑制活性。研究者们为了探讨 IRNA 作用机制, 而在纯化、克隆 IRNA 的基础上使用竞争性实验、UV- 交叉连接实验等方法进行研究发现, Hela 细胞裂解液中蛋白多肽 P52 与 PV 5' NCR 特异性环状结构相结合, IRNA 可竞争性阻断这种结合, 经对 IRNA 二级结构与病毒 5' NCR 二级结构相比发现二者具有相似的环状结构, 这一发现证实

IRNA 是通过与病毒基因的 5' NCR 竞争结合相同的宿主蛋白多肽而发挥抑制活性的。研究还发现, 真核细胞中 La 自身抗原可以明显逆转 IRNA 的抑制活性, 抗 La 抗体可以将 P52 与 IRNA 或 5' NCR 探针复合体免疫共沉淀, 从而证实 Hela 细胞裂解液成份 P52 与 La 抗原相同。从目前的结果可见, IRNA 抑制机制为通过与 IRES 竞争结合宿主蛋白多肽而阻止核糖体与病毒 IRES 结合, 抑制病毒蛋白翻译, 对真核细胞帽状结构形成依赖性蛋白合成无抑制作用, 这为其在真核细胞中抑制病毒的复制奠定了理论基础。

**3.2 IRNA 对 HCV 蛋白翻译抑制作用** 如前所述 HCV 病毒 5' NCR 结构与微小 RNA 病毒 5' NCR 结构相似, 且已证实 HCV 蛋白翻译启动机制为 IRES 介导的内部启动机制。在 HCV 蛋白翻译过程中 IRES 与一些细胞性蛋白多肽, 如 La 抗原、PTB、P25、P84、P120 等相结合而便于核糖体与 IRES 结合并激发 HCV 翻译过程。由于 HCV 与 PV 蛋白翻译中均结合相同的蛋白多肽, 而推测 IRNA 可能对 HCV 蛋白翻译具相似的抑制活性。为了证实这种推断, Das 等使用三种表达质粒: 表达 HCV IRES 与荧光素酶 (Luciferase, luc) 融合体的 pCDHCV-luc、pSV40/β-gal 和表达 IRNA 的 pCDIR.Rib T7 共转染人肝癌细胞系 (Huh-7)。结果发现, 同对照组相比, 最低浓度的 IRNA 可抑制 pCDHCV-luc 表达物 50% 的荧光素酶活性, 最高浓度的抑制活性 90%, 这提示 IRNA 能特异性抑制 HCV IRES 介导的蛋白翻译。他们进一步构建了含有 HCV IRES 的双顺反子体外转录载体, 进行体外转录, 结果是 1 μg IRNA 对由 HCV IRES 介导的荧光素酶合成的抑制率为 20%, 2 μg 时抑制率为 76%, 而对以帽状结构形成依赖性机制进行的 CAT 基因蛋白合成抑制性很低, 这证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白体外翻译同样具抑制性。研究上发现 PV-HCV IRES 嵌合体在 IRNA 表达细胞株中不能复制。

### 4 存在的问题和展望

IRNA 作为一种 HCV 感染的基因治疗方法还存在许多问题。例如 IRNA 进行抗 HCV 治疗有二种方法: 一种为体外合成 IRNA 片段, 把这种 IRNA 作为一种药物来使用, 这就存在 IRNA 体内稳定性等问题; 另一种方法是将 IRNA 的重组体导入细胞内进行基因治疗, 这种方法可能有广泛的应用前景, 但同时也存在导入方法等问题。现阶段需要的是大量有关载体和靶细胞生物学的基础研究, 以及价廉易得的 HCV 感染动物模型的建立。

丙型肝炎作为一种危害较大的病毒性疾病, 基因治疗能在不同水平影响病毒的复制, 因此是一种很有潜力的治疗方法。IRNA 通过阻断病毒蛋白翻译而抑制病毒感染过程, 同时对宿主细胞繁殖代谢物影响, 这为 HCV 感染基因治疗提供了新思路和新前景, 也许在不久的将来, IRNA 治疗能真正成为治疗 HCV 感染的突破口。

## 5 参考文献

- 1 Yu YC, Mao Q, Gu CH, Li QF, Wang YM. Activity of HDV ribozymes to trans-cleave HCV RNA. *World J Gastroenterol* 2002;8:694-698
- 2 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 3 Wu HB, Li ZW, Li Y. Clinical significance of detection of positive and negative strands of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:220-221
- 4 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computerized design of hepatitis C virus RNA-directed hammerhead ribozymes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- 5 Zhao XP, Shen HX, Tian DY, Zhang DS, Peng ZH, Yang DL, Hao LJ. Expression and significance of HCV RNA and HCV NS5 antigen in liver tissues of patients with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:516-518
- 6 Fan XG, Tang FQ, Ou ZM, Zhang JX, Liu GC, Hu GL. Lymphoproliferative response to hepatitis C virus (HCV) antigens in patients with chronic HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1038-1040
- 7 Nie QH, Li MD, Hu DR, Chen GZ. Study on the cause of human protective immunodeficiency after HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:28-30
- 8 Song ZQ, Hao F, Wang YG, Min F, Wang YM. Blocking effect of hyperimmune rabbit serum against MAP containing HVR1 sequences on HCV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:171-174
- 9 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 10 Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- 11 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 12 Dai YM, Shou ZP, Ni CR, Wang NJ, Zhang SP. Localization of HCV RNA and capsid protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:136-137
- 13 Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
- 14 Michielsen P, Brenard R, Reynaert H. Treatment of hepatitis C: impact on the virus, quality of life and the natural history. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:90-94
- 15 Nishiguchi S, Enomoto M, Tanaka M, Fukuda K, Tamori A, Habu D, Takeda T, Shiomi S, Tanaka T, Yano Y, Otani S. Accurate prediction of response to interferon therapy by repeated measurement of hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *Intervirology* 2002;45:105-110
- 16 Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis* 2002;186:155-163
- 17 Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, Pawlotsky JM. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002;76:8189-8199
- 18 Chayama K. Management of chronic hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002;37 (Suppl 13):69-73
- 19 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 20 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 21 Odreman-Macchioli F, Baralle FE, Buratti E. Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J Biol Chem* 2001;276:41648-41655
- 22 Wiklund L, Spangberg K, Goobar-Larsson L, Schwartz S. Cap and polyA tail enhance translation initiation at the hepatitis C virus internal ribosome entry site by a discontinuous scanning, or shunting, mechanism. *J Hum Virol* 2001;4:74-84
- 23 Spangberg K, Wiklund L, Schwartz S. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol* 2001;82:113-120
- 24 Hellen CU, Pestova TV. Translation of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 1999;6:79-87
- 25 Sergi C, Arnold JC, Rau W, Otto HF, Hofmann WJ. Single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus with clearance of the viral RNA in a liver transplant recipient during acute hepatitis B virus superinfection. *Liver* 2002;22:79-82
- 26 Zhang J, Yamada O, Ito T, Akiyama M, Hashimoto Y, Yoshida H, Makino R, Masago A, Uemura H, Araki H. A single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus leads to enhanced cap-independent translation. *Virology* 1999;261:263-270
- 27 Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM. Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol* 1999;73:4941-4951
- 28 Tang S, Collier AJ, Elliott RM. Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5'UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5'UTR sequence. *J Virol* 1999;73:2359-2364
- 29 Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999;73:1165-1174
- 30 Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:105-112
- 31 Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Manns MP, Wong-Staal F. Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 2001;21:8357-8364
- 32 Jubin R, Murray MG, Howe AY, Butkiewicz N, Hong Z, Lau JY. Amantadine and rimantadine have no direct inhibitory effects against hepatitis C viral protease, helicase, ATPase, polymerase, and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Infect Dis* 2000;181:331-334
- 33 Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ, Harrison GP, Aboul-Ela F, Varani G, Walker S. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 2002;9:375-380
- 34 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 35 Michielsen P, Brenard R, Reynaert H. Treatment of hepatitis C: impact on the virus, quality of life and the natural history. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:90-94
- 36 Kim I, Lukavsky PJ, Puglisi JD. NMR Study of 100 kDa HCV IRES RNA Using Segmental Isotope Labeling. *J Am Chem Soc* 2002;124:9338-9339
- 37 Otto GA, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40 S interaction. *RNA* 2002;8:913-923
- 38 Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. *J Infect Dis* 2002;186:155-163
- 39 Soler M, Pellerin M, Malnou CE, Dhumeaux D, Kean KM, Pawlotsky JM. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002;298:160-173
- 40 Koev G, Duncan RF, Lai MM. Hepatitis C virus IRES-dependent translation is insensitive to an eIF2alpha-independent mechanism of inhibition by interferon in hepatocyte cell lines. *Virology* 2002;297:195-202

- 41 Kashiwagi T, Hara K, Kohara M, Iwahashi J, Hamada N, Honda-Yoshino H, Toyoda T. Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome. *J Biol Chem* 2002;277:28700-28705
- 42 Gallego J, Varani G. The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *G. Biochem Soc Trans* 2002;30:140-146
- 43 Lafuente E, Ramos R, Martinez-Salas E. Long-range RNA-RNA interactions between distant regions of the hepatitis C virus internal ribosome entry site element. *J Gen Virol* 2002;83:1113-1121
- 44 Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Iwai T, Araki H. Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 2002;293:141-150
- 45 Kalliampakou KI, Psaridi-Linardaki L, Mavromara P. Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett* 2002;511:79-84
- 46 Shimazaki T, Honda M, Kaneko S, Kobayashi K. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN- $\alpha$  correlates with a reduced La protein. *Hepatology* 2002;35:199-208
- 47 Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66:187-199
- 48 Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 2000;275:27531-27540
- 49 Isoyama T, Kamoshita N, Yasui K, Iwai A, Shiroki K, Toyoda H, Yamada A, Takasaki Y, Nomoto A. Lower concentration of La protein required for internal ribosome entry on hepatitis C virus RNA than on poliovirus RNA. *J Gen Virol* 1999;80:2319-2327
- 50 Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001;76:17-29
- 51 Anwar A, Ali N, Tanveer R, Siddiqui A. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J Biol Chem* 2000;275:34231-34235
- 52 Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol* 2000;74:10430-10437
- 53 Venkatesan A, Das S, Dasgupta A. Structure and function of a small RNA that selectively inhibits internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;27:563-572
- 54 Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU. Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. *RNA* 2000;6:1791-1807
- 55 Saleh L, Rust RC, Fullkrug R, Beck E, Bassili G, Ochs K, Niepmann M. Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J Gen Virol* 2001;82:757-763
- 56 Fernandez J, Yaman I, Mishra R, Merrick WC, Snider MD, Lamers WH, Hatzoglou M. Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *J Biol Chem* 2001;276:12285-12291
- 57 Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 2000;7:1105-1110
- 58 Owens GC, Chappell SA, Mauro VP, Edelman GM. Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1471-1476
- 59 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-Ela F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 60 Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJ, Lemon SM. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 2001;7:585-597
- 61 Kim YK, Jang SK. La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *J Gen Virol* 1999;80:3159-3166

## 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001071 号。

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001158 号。

# 隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁

周永兴

周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心  
陕西省西安市 710038  
项目负责人:周永兴,710038,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. zyxdx@fmmu.edu.cn  
电话:029-3537377 传真:029-3537377  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-20

## 摘要

HAV-HEV 5种嗜肝病毒发现和采取严格的预防措施后仍有不明原因的肝炎发生和流行, 10 a 来进行了大量寻找新肝炎病毒的工作, 但对其致病性至今仍为定论. 于是近年又有不少学者深入研究了HBV的血清学谱, 发现一部分未明原因肝炎实际由HBV引起. 本文就HBsAg阴性HB存在的证据, 机制以及如何定义和诊断综述如下.

周永兴. 隐匿性HBV感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11(2): 246-248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/246.htm>

## 0 引言

这个标题是美国密执安大学卫生系胃肠病学科 Conjeevaram et al<sup>[1]</sup>博士为 Hepatology 杂志所写评述的题目. 这个标题并非骇人听闻, 就我国而言人群HBV感染率约50-60%, 单HBsAg阳性者就有1.2亿多, 加上其他肝炎病毒感染, 确实是一个肝炎大国, 严重危害人民生命健康. 特别是临床上还存在大量肝炎病毒血清学阴性的肝炎, 据报道1989年发现HCV后, 输血后肝炎发病率仍高达10-12%; 散发性肝炎中约5-20%检不出病因; 30%的慢性肝炎病因不明<sup>[2]</sup>; 40%的暴发型肝炎患者无明确病因<sup>[3]</sup>; 肝炎相关再生障碍性贫血患者在发生骨髓功能衰竭前有典型肝炎表现, 但大多未检出已知肝炎病毒<sup>[4]</sup>. 由于此1990年代来国内外学者竭力寻找新型肝炎病毒, 但研究发现的HGV、TTV、SENV是不是嗜肝病毒还有待定论; 于是近年又有不少学者深入研究了HBV的血清学谱.

通常急性乙型肝炎恢复的指针是: 患者血清HBV-DNA的消失; 血清HBeAg转换、HBsAg转换; 血清转氨酶正常<sup>[5]</sup>. 这些变化意味着乙型肝炎病毒的清除和疾病的康复. 然而临床观察显示, 一些急性乙型肝炎恢复者可发生HBV自发的再活动或使用免疫抑制剂后再现<sup>[6-8]</sup>. 随着对病毒抗原更敏感方法的建立; HBV-DNA基因检测方法的引入<sup>[9]</sup>; 以及对HBV基因变异认识意识的增强; 更导致了上述观念的部分修正, 尤其是对HBV感染者明显恢复后十多年的人应用PCR方法检测血清、肝、和外周血单个核细胞仍可检出HBV-DNA<sup>[11,12]</sup>, 提示急性乙

型肝炎恢复不能导致病毒的完全清除, 而是免疫系统致使病毒维持在非常低的水平, 且仍可发生进行性肝脏病变. 从而提出了隐匿型(occult)乙型肝炎病毒感染的概念, 即血清HBsAg阴性、HBV-DNA持续的HBV感染<sup>[13]</sup>.

## 1 隐匿型乙型肝炎病毒感染存在的证据

法国巴斯德研究所Brecht博士复习了大量文献并结合自己的研究提供了隐匿型乙型肝炎病毒感染存在的强有力的证据<sup>[13]</sup>, 根据感染个体HBV血清学检测结果分为: (1)抗-HBc和抗-HBs阳性组. 对本组的急性HBV感染, 慢性肝炎和HCC不同类型的患者多截面研究, 明确表明有HBV-DNA的持续存在; 一般HBV-DNA的阳性率在肝组织里显著高于血清中; (2)在抗-HBc和抗-HBs均阴性而有肝炎的临床和生化表现组. 也证实有HBV-DNA持续阳性; 但HBV-DNA的阳性率以抗-HBc和抗-HBs阳性组最高; (3)HBsAg阴性的急性、尤其暴发性肝炎患者HBV-DNA检测阳性率低, 血和肝内分别为10%与6%<sup>[14,15]</sup>; HBsAg阴性伴有或不伴HCC的慢性肝炎患者30-35%血清HBV-DNA阳性(范围在5-55%); (4)在对HBV高暴露的人群中阳性率在7-60%; 这类人肝组织里的阳性率也显著高于血清中, 40-50%对13-71%, 与伴不伴HCC无关; (5)随访急性HBV感染康复者, 临床生化持续10-30a均正常, 但其中55%的患者血清HBV-DNA持续阳性(共检45份标本); Blackberg et al<sup>[16]</sup>对急性乙型肝炎恢复后30a患者的肝组织检出了病毒基因; (6)随访自发的或抗病毒治疗后HBsAg转为阴性的慢性肝炎患者在血和肝组织中HBV-DNA的检出率分别高达28%和94%; 这些患者在HBsAg转换后HBV-DNA的水平 and 抗-HBc与抗-HBs滴度明显低; (7)自限性肝病患者及肝血清学指标正常的献血和捐器官者HBV-DNA检测均阴性<sup>[17-19]</sup>; (8)许多实验及临床研究也证实HBsAg阴性血液的传染性<sup>[20-22]</sup>. Michalak et al<sup>[23]</sup>报道鸭急性感染WHV恢复后, WHV-DNA在血、肝和PBMC里持续终生; Thiers et al<sup>[24]</sup>用HBsAg阴性HBV-DNA阳性血清给猩猩注射, 结果猩猩感染了HBV; 输HBsAg阴性的血和母亲为HBsAg阴性结果发生了输血后肝炎和母婴HBV-DNA的传染<sup>[24,25]</sup>; HBsAg阴性肝硬化行肝移植后发生植入肝的再感染<sup>[26-28]</sup>; 来自HBsAg阴性的器官致受者发生了感染<sup>[30-32]</sup>; 这些观察均系通过检测患者肝组织中病毒的RNA(包括病毒的基因组)和cccDNA证实<sup>[35,36]</sup>. 因此HBV血清标志的缺乏不能除外HBV-DNA(含有传染性病毒颗粒)在血清中循环, 该类血清的传染和HBsAg阳性血

的传染是相同的.用土拔鼠的研究也有同样的结论.在人和土拔鼠通过对 PBMC 系和在肝标本中鉴定 HBV 基因组的研究也证实 HBsAg 阳性和阴性 HBV 感染具相同的细胞向性<sup>[29]</sup>.由于各作者的 PCR 方法未能标准化, 采用标本量及试剂的不同, HBV-DNA 检测差异变化在  $10^1$ - $10^3$  copies/ml; 总之, 这些研究共同确认了 HBV 感染是一个长期持续的感染, 甚至在对病毒免疫反应明显有效时仍有 HBV 存在.

## 2 HBsAg 阴性患者 HBV 持续的分子基础

业已证明 HBsAg 阴性患者 HBV 持续的分子基础是病毒和宿主两方面.

### 2.1 关于病毒

2.1.1. 病毒保持极低度复制<sup>[1,33,34,37]</sup> 对 HBsAg 阴性而 HBV-DNA 阳性的肝炎患者检测发现, HBV 感染的重要特征是循环病毒 DNA 的水平非常低及肝标本里每个细胞中病毒基因组的拷贝数低, 这与在这些患者体内病毒增生水平极低不易检出相一致.对于这种情况有的研究者曾提出该类患者检出的 HBV 是否为远亲的新病毒, 但按低严格杂交实验不支持这一假设, 且 PCR 技术已在这些标本里明确显示 HBV 基因组存在<sup>[18]</sup>.另外 HBV 的动物模型研究的证明: 由带有高病毒颗粒滴度的血清传染导致急性肝炎期多数肝细胞受染, 相反, 由低感染性 HBV 颗粒的传染仅能感染有限的肝细胞, 并且使血中可检测蛋白的缺乏而有利于病毒持续.

2.1.2 HBV 基因变异 多个研究均证明存在 HBV 的基因变异<sup>[38-42]</sup>.S 基因的突变可致 HBsAg 检测阴性, 这在 HBV 疫苗接种后发生逃脱突变(escape variants) 中早已报道; 最近德国汉堡大学病毒与免疫研究所报道肝移植时注射大量 HBIG 致 HBV 的 S 基因变异, 表达 S 蛋白基因发生氨基酸联合突变, 如 G145R 频繁出现, 结果诱导内质网分泌 S 蛋白停滞, 血中 HBsAg 阴性; 前 S1 序列的突变新近也有报道, 前 S1 突变也可降低 HBsAg 的表达; 对 S 基因突变的还可以改变病毒聚合酶(通过一个重迭读码框架编码的)的活性, 并且聚合酶编码基因突变的影响也有其他新增证据. 另外有报道前 S 和 S 序列突变后在 HBsAg 阴性患者可能影响病毒包膜的其他区域; 且不同的 HBV 基因型在血清有或无可检 HBsAg 的患者中均存在. X 基因读码框架的突变也被描述, 通过改变 HBx 和/或重迭核心启动子功能可减少 HBV 的复制, 此可解释 HBV 病毒血症的低水平; 其他报道也强调了前 C/C 序列可能的重要性, 包括 encapsidation 信号, 且这些设想已通过关键证据证实了.

尽管这些观察是相当重要的, 但仅少数研究者注意到这一问题, 并且仅显示病毒结构蛋白编码序列少数氨基酸突变, 这种突变不好解释血清学反应缺乏; 而作者研究用重组一个全长 HBV 基因, 在传染猩猩后, 从 HBsAg、抗-HBs 阴性患者和抗-HBc 阴性的 HCC 患者的血清中去分离; 然后在体外行 S 基因的表达, 同时伴有

HBsAg 合成, HBsAg 应用常规方法检测, 结果作者认为不排除某些病例 HBV-DNA 突变后, 可能改变病毒蛋白的抗原性<sup>[13]</sup>.但大量文献复习又表明 HBV 基因组的分离, 不管是急性 HB 期还是明显缓解后 30 a 都未表现出序列的偏差<sup>[15]</sup>.还有证据表明用标准的 HBV 疫苗对 HBsAg 阴性 HBV-DNA 阳性的传染有保护作用. Teo et al<sup>[15]</sup> 新近总结了美国一大系列的 HBsAg 阴性患急性暴发性肝炎的病因, 认为美国不存在隐匿性急性暴发性肝炎, HBV 前 C 和 C 基因变异是常见现象, 暴发性肝炎患者未见特别类型基因变异. 因此是否因基因变异而表现为 HBsAg 阴性其原因还值得深入研究.

2.2 宿主及相关因素<sup>[1,13]</sup> (1) HBV 基因组复制的低水平可能取决于在肝内细胞因子合成情况, 已有充分的证据证实细胞因子, 如 TNF- 和 INF- 在转录后对 HBV 基因组的表达低调上起着重要作用. 细胞因子合成又依赖于 HBV 特异的 CTL, 他们的表达可能通过 HBV-DNA 激发. 可以想像不管是自发的还是抗病毒治疗的结果, 最后使病毒确立了与宿主免疫系统的平衡 “equilibrium” 在那里他刺激免疫反应, 免疫反应反过来维持 HBV 在极低水平增生. 这些现象及推论导致细胞内 HBV 基因组表达的非活动概念的产生. (2) 感染时的年龄可能也影响免疫反应的模式. (3) 免疫遗传可以干扰对 HBV 的免疫反应和该类患者体内对 HBV 蛋白成低的或缺乏体液免疫反应. 另外形成免疫复合物致 HBVM 不能检出也可能是原因. (4) 慢性酒精的积累可低调 HBV 抗原的表达. (5) HBV 和 HCV 同时感染可降低两个病毒中其中一个的增生. Squadrito 报道了一组 HBV 和 HCV 同时感染的患者的病毒学谱, 82 例抗-HCV 阳性患者中 24 例为隐匿性 HBV 感染. 可能 HCV 的核心蛋白对 HBV 有抑制作用. (6) 还可能环境因素, 例如伴随病, 药物, 化学致癌物等, 都可发挥使病毒蛋白低表达的类似作用<sup>[10]</sup>.

## 3 研究的重要性

隐匿性 HBV 感染发生的地理差别的调查研究结论是: 隐匿性 HBV 感染最常见于高流行区, 在高流行区有 70-90 % 的人暴露于 HBV, 低流行区暴露率仅 5-20 %. 这种长期反复的暴露是形成大量隐匿性 HBV 感染的重要原因之一<sup>[13]</sup>. 在我国临床上常见到大量不明原因的肝病患者, 我们曾行肝组织活检, 并行 HBV 抗原的免疫组化和原位杂交检测发现血清 HBVM 全阴性或抗-HBs、抗-HBc 阳性患者可呈阳性; 但由于肝组织是采用石蜡包埋所以阳性率不高(15.5 %), 如采用冰冻切片或检测外周血单个核细胞或用新的灵敏的方法可能获得很高的阳性率. 这些文献提示临床出现的 HBVM 阴性或抗-HBs、抗-HBc 阳性患者困扰临床医师, 可能是对隐匿性 HBV 感染认识的不足.

总之, Conjeevaram 建议隐匿性乙型肝炎的定义是: 在 HBsAg 阴性的个体用 PCR 或其他基因扩增方法检出了 HBV-DNA. 隐匿性 HBV 感染的发生率似乎在 HB 流行区

和HBV血清学抗-HBc阳性个体,不论伴或不伴抗-HBs阳性.尽管隐匿性HBV感染肯定存在,但当前对于他的准确定义;他的流行病学情况;诊断方法;临床意义;抗病毒治疗;与肝癌的关系及对献血员、器官捐赠者条件的影响等均需进行深入研究<sup>[1]</sup>.以更新血清HBVM阴性或抗-HBs、抗-HBc阳性肝炎的认识.

#### 4 参考文献

- Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: A hidden menace? *Hepatology* 2001;34:204-206
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, Mecks EL, Beack MJ. The Natural history of community-acquired hepatitis C in unites. *N Engl J Med* 1992; 327:1899-1905
- Chemin I, Zoulim F, Merle P. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol* 2001;34:447-452
- Brown N, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-Associated aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;336:1059
- Perrillo RP. Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. *Sastroenterology* 2001;120:1009-1022
- Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DE, Jenes EA, Micetich KC, Young RC, Costa J. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med* 1982;96:447-449
- Lok ASF, Liang RHS, Chiu EKW, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100:182-188
- Yeo W, Chan PK, Chan HL, Mo FK, Johnson PJ. Hepatitis B virus reactivation during cytotoxic chemotherapy-enhanced viral replication precedes overt hepatitis. *J Med Virol* 2001;65:473-477
- Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995;21:313-321
- Paulotsky JM, Bestie A, Hezode C, Lonjon I, Darthuy F, Remire J, Dhumeau D. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *J Virol Methods* 2000;85:11-21
- Pol S, Thiers V, Nalpas B, Degos F, Gazengel C, Carnot F, Tiollais P. Monoclonal IgM radioimmunoassay and serum HBV-DNA hybridization as diagnostic tools of HBV infection: relative prevalence among HbsAg-negative alcoholics, patients with chronic hepatitis or hepatocellular carcinomas and blood donors. *Eur J Clin Invest* 1987;17:515-521
- Brechot C. Applications of molecular biology to the diagnosis of viral hepatitis. In: Zuckerman A, Thomas H (eds). *Viral Hepatitis*. Thirded. London Churchill Living 1998:585-604
- Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Brechot PP. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely 'occult'? *Hepatology* 2001;34:194-203
- Chemin I, Jeantet D, Kay A, Trepo C. Role of silent hepatitis B virus in chronic hepatitis B surface antigen(-) liver disease. *Antiviral Res* 2001; 52:117-123
- Teo EK, Ostapowicz G, Hussain M, Lee WM, Fontana RJ, Lok ASF. Hepatitis B infection in patients with acute liver failure in the United States. *Hepatology* 2001;33:972-976
- Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000;33:992-997
- Dow BC, Peterkin MA, Green RH, Caeron SO. Hepatitis B virus transmission by blood donation negative for hepatitis B surface antigen, antibody to HbsAg, antibody to hepatitis B core antigen and HBV DNA. *Vox Sang* 2001;81:140
- Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T, Ikeda H. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of serologic HbsAg assay. *Transfusion* 2001; 41:1107-1113
- Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Fuji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Kimura S, Ino S, Koike K. Frequent presence of HBV in the sera of HbsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001;41:1093-1099
- Wands JR, Fujita YK, Isselbacher KJ, Dazza MC, Thiers V, Tiollais P. Identification and transmission of a hepatitis B virus-related variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6608-6612
- Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth G. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985;312:270-276
- Coursaget P, Bourdil C, Adamowicz P, Chotard J, Diop Mar I, Yvonnet B, Mevelec MN. HbsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet* 1987;12:1354-1357
- Michalak TI. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis B virus infection: in sights from the woodchuck virus hepatitis model. *Immunol Rev* 2000;174:98-111
- Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, Goudeau A. Transmission of hepatitis from hepatitis-B-seronegative subjects. *Lancet* 1988;ii:1273-1276
- Baginski I, Chemin I, Hantz O. Transmission of serologically silent hepatitis B virus along with hepatitis C virus in two cases posttransfusion hepatitis. *Transfusion* 1992;32:215-220
- Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, Carey K, Ferrell L, Roberts JP, Ascher NL. Occult hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994;343:142-146
- Roche B, Samuel D, Gigou M, Feray C, Virot V, Schmets L, David MF. De novo and apparent de novo hepatitis B virus infection after liver transplantation. *J Hepatol* 1997;26:517-526
- Tokeshi S, Sata M, Tanikawa K. Detection of serum HBV DNA and anti-HCV antibody in HbsAg seronegative patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 1996;70:103-107
- Cabrero M, Bartolome J, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear by a defective hepatitis B virus with deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 2002;9:265-271
- Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Serberg EC, Wiesner RH, Zetterman RK. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The national institute of diabetes and digestive and kidney diseases liver transplantation database. *Gastroenterology* 1997;113:1668-1674
- Uemoto S, Sugiyama K, Marusawa H, Inomata Y, Asonuma K, Egawa H, Kiuchi T. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants. *Transplantation* 1998;65:494-499
- Ko WJ, Chou NK, Hsu RB, Chen YS, Wang SS, Chu SH, Lai MY. Hepatitis B virus infection in heart transplant recipients in a hepatitis B endemic area. *J Heart Lung Transpl* 2001;20:865-875
- Mason A, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo R. Molecular basis for persistent hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 1998;6:1736-1742
- Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimothono K, Chiba T. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000;31:488-495
- Laure F, Zaguri D, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH, Brechot C. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS related complex. *Science* 1985;229:561-563
- Pasquinelli C, Laure F, Chatenaud L, Beauvin G, Gazengue C, Bismuth H, Degos F. Hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *J Hepatol* 1986;3:95-103
- Babrero M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:1
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997;26:786-791
- Carman W, Thomas H, Domingo E. Virus genetic variation hepatitis B virus a clinical example. *Lancet* 1993; 341:349-353
- Brunetto M, Rodriguez U, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 1999;42:69-80
- Zuckerman AJ, Zuckerman JN. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants. *J Med Virol* 1999;58:193-195
- Kalinina T, Riu A, Fischer L, Will H, Sternick M. A dominant hepatitis B virus population defective in virus secretion because of several S-gene mutation from a patient with fulminant hepatitis. *Hepatology* 2001;34:385-394