

· 研究综述 ·

人乙型肝炎病毒在树鼯的实验感染 及其与肝癌发生的关系^①

严端琪^{1,②} 苏建家² 黄定瑞² 甘友全²
杨春² 黄国华² 罗丹²

(1 中山医科大学肿瘤研究所,广州,510060 2 广西肿瘤防治研究所)

提 要 树鼯接种以人乙肝病毒(HBV)后,过半数动物获感染。HBV 感染量可低于 1 CID/ml。HBV 阳性树鼯血清能连续传代感染,并可用乙肝疫苗预防。用此动物模型进行 HBV 及(或)黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)诱癌研究。结果,肝癌及癌前病变诱发率在感染 HBV 并摄入 AFB₁ 的树鼯显著高于单暴露 AFB₁ 或 HBV 者;感染者肝组织及(或)肝癌中检出 HBV DNA 并可整合于宿主肝基因中。提示 HBV 和 AFB₁ 有协同致癌作用并支持 HBV 与肝癌的病因学联系。

主题词 乙型肝炎病毒;肝细胞瘤,实验性/病因学;树鼯属/微生物学

中图分类号 R373.21;735.7

人乙型肝炎病毒(HBV)感染是肝细胞癌(下简称肝癌)的重要危险因素,但病因发病学尚未阐明。确定病毒致癌的依据之一是病毒能在实验动物诱发肿瘤。1981 年以来,我们选用最低等灵长类树鼯(tree shrew),建立人 HBV 感染动物模型,研究感染 HBV 及(或)摄入黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的树鼯发生肝癌和癌前病变的情况,HBV DNA 在肝组织和癌组织存在状况,探讨肝癌的病毒病因及其与化学致癌的相互作用。现将此系列研究综合报告如下。

1 人 HBV 感染树鼯模型的建立^[1]

1.1 HBV 实验感染树鼯^[1~3]

用云南产的中緬树鼯滇西亚种(*Tupaia belangeri chinensis*),以 HBsAg 及 HBeAg 均

阳性、含 Dane 颗粒的乙肝感染者血清为感染源,经静脉和腹腔各接种 0.5ml。接种前后定期采血作血清学检测 HBV 抗原和抗体,斑点杂交法(dot-blot hybridization)检 HBV DNA,生化检测 ALT,电镜观察 Dane 及 HBsAg 颗粒。部份动物作肝活检病理检查,用免疫组化检肝细胞 HBsAg 和 HBcAg,原位分子杂交检 HBV DNA。实验观察至 137 周。

结果:①96 只树鼯接种 HBV 前和后 1 周,血 HBV 标志物均阴性,第 2 周后才逐渐出现阳性;血清和(或)肝组织出现 HBV 标志物 87 例,总阳性率 90.63%;②HBs 抗原血症者 46.88%(45/96),持续平均 7 周,可达 33~137 周;③斑点杂交法检出 HBV DNA 阳性率 51.04%(49/96),持续可长达 41 周以上;④以血 HBsAg 阳性及(或)HBV DNA 阳性为确定的感染指标统计,感染率为

① 省医药卫生研究基金及国家自然科学基金资助;

② 第一作者,1932 年出生,男,教授

55.21%(53/96);⑤电镜下,血清可查见 Dane 颗粒及 HBsAg 颗粒;⑥感染的树鼩血清 ALT 明显升高;⑦部份感染动物肝组织可见急、慢性病毒性肝炎病变;⑧免疫组化法可检见肝细胞内 HBsAg 及(或)HBcAg;⑨原位分子杂交检肝细胞内 HBV DNA 阳性率 66.67%;⑩DNA 印迹杂交(Southern blot hybridization)分析肝组织可检出复制型 HBV DNA。以上表明,树鼩可感染人 HBV,形成动物模型。

1.2 HBV 在树鼩的连续传代感染^[4]

取已感染人 HBV 的树鼩 HBsAg 及 HBeAg 阳性血清为传代感染源,接种于另一批树鼩为第二代,再取第二代感染的树鼩血清接种于第三代,如此连续传代接种,至第五代。用酶联免疫试验(ELISA)检血清 HBsAg,抗 HBs, HBeAg,抗 HBe 及抗 HBc;并测血清 ALT 及肝组织 HBsAg 阳和 HBcAg。

结果,各代树鼩于接种前,HBV 标志物均阴性。接种后每代观察平均 28 周。总计从第二至第五代 18 只树鼩,经传代接种获感染的共 17 只,感染率达 94.4%,均出现 HBs 抗原血症。血清 ALT 升高。肝组织可查见 HBV 抗原和不同程度肝炎病变。表明人 HBV 能在树鼩连续传代感染。

1.3 用乙肝疫苗预防树鼩实验感染 HBV^[5]

20 只树鼩分两组。疫苗组用乙肝疫苗免疫后再接种 HBV,对照组只接种 HBV。乙肝疫苗为卫生部生物制品所的血源性疫苗。实验前后采血用放免法(RIA)检 HBsAg,抗 HBs 和抗 HBc 等标志物。观察至 51 周。

结果,接种乙肝疫苗的 10 只树鼩,9 只血清出现抗 HBs,注射人 HBV 后,其中只有 1 只血清出现短暂的 HBsAg,保护率为 88.88%;其血清抗 HBc 始终阴性。未接种疫苗的 10 只树鼩,注射人 HBV 后,5 只血清 HBsAg 阳性,8 只抗 HBc 阳性。疫苗组 HBV 感染率(11.11%)显著低于对照组(80%), $P < 0.01$,抗 HBs 活性(cpm 值)显著高于对照组。结果表明,树鼩实验感染 HBV 能被乙肝

疫苗阻断,反证 HBV 感染树鼩模型的可靠性。

1.4 树鼩对人 HBV 的可感染量^[6]

目前国际上多以 CID_{50} (chimpanzee infection dose) 作为衡量动物对 HBV 感受性的标准。其定义为能引起至少 50% 的黑猩猩感染的 HBV 血清的最大稀释度,其 1ml 所含的 HBV 量称为 1 个黑猩猩感染单位(1 CID/ml)。本研究用美国 NIH(National Institute of Health)提供的 HBV 标准血清(No. 311982),每 ml 的 HBV 量为 10^8 CID,当 10^{-8} 稀释度时为 1 CID/ml。实验用 50 只树鼩,分 5 组,将标准的 HBV 血清顺序地作 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 个稀释度,经静脉和腹腔接种 0.5ml 各一次,合共 1ml。实验观察至 16 周,用血清学及免疫组化检测血及肝组织的感染指标。结果:5 组树鼩的 HBV 感染率按 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 稀释度依次为 80.0%, 88.8%, 66.6%, 55.5% 及 42.8%;被感染树鼩出现血 ALT 升高和程度不一的肝炎病变。表明树鼩感染 HBV 的感受性较高,是可供应用的动物模型。

2 人 HBV 和 AFB₁ 诱发树鼩肝癌^[1,7~12]

80 只树鼩,接种以人 HBV,用血清学及斑点杂交法检测感染指标。把感染者和未感染者各分为两组,分别摄入或不摄入 AFB₁,即共有 4 组:(A)HBV+, AFB₁+;(B)HBV-, AFB₁+;(C)HBV+, AFB₁-;(D)HBV-, AFB₁-。AFB₁ 口服,每次 200~400 μ g/kg,每周 5 次,总剂量控制在 15~16mg/只。实验观察至 158 周。各器官及肿瘤除常规病理检验外,肝切片作免疫组化检查 HBsAg 和 HBcAg,原位分子杂交检 HBV DNA,组织化学检测 Gamma-谷氨酰转肽酶(GGT)阳性肝细胞增生灶,并观察肝细胞异型增生。部分肝组织作 DNA 印迹杂交分析 HBV

DNA 存在状态。结果如下:

2.1 肝癌发生情况^[7-9]

以实验第83周出现第1例肝癌时存活的56只树鼩为有效统计动物数,实验至158周,共发生肝癌13例。肝癌诱发率在感染HBV并摄入AFB₁的A组(52.94%,9/17)显著高于单摄入AFB₁的B组(12.5%,3/24)和单感染HBV的C组(11.11%,1/9), $P < 0.05$ 。AFB₁摄入量(mg/只)在A组(13.40 ± 2.55)和B组(12.51 ± 2.08)没有明显差异,但感染HBV的A组不但肝癌诱发率显著高于未感染的B组,且肝癌出现较早(平均周数129对145),癌结数也较多(2.55对1.33/只)。用原位分子杂交检测树鼩肝组织HBV DNA作回顾性研究,肝癌发生率在摄入AFB₁的树鼩中,肝组织HBV DNA阳性者为45.45%(10/22),阴性者10.52%(2/19);在无摄入AFB₁的树鼩中,肝组织HBV DNA阳性者为12.50%(1/8),阴性者为0/6。此与上述以血清HBV标志物为感染指标所得出的肝癌诱发率相接近。C组的1例树鼩接种HBV后,斑点杂交检测血清HBV DNA持续阳性,于83周出现肝癌,癌外肝组织呈慢活肝改变,原位分子杂交检出HBV DNA。该动物从未暴露于AFB₁;HBV是在无附加致癌因子的条件下起作用的。

所诱发的13例肝癌全部为肝细胞癌。其中11例在实验早期接种过HBV而获感染,血清HBsAg和(或)HBV DNA存在于肝癌发生之前。实验结束时,用血清学和免疫组化仍可在5例有肝癌的树鼩中检出血清HBsAg和(或)抗HBc,以及肝细胞中HBsAg和(或)HBcAg,在2例癌细胞中检出HBsAg。原位分子杂交法在已感染HBV后发生的肝癌中,全部可在癌内及(或)癌周肝组织检出HBV DNA,这些树鼩携带HBV的时间,最短83周,最长142周。

以上结果表明HBV感染与肝癌发生存在病因学联系以及HBV与AFB₁的协同致

癌作用。

2.2 肝癌前病变GGT阳性肝细胞增生灶情况^[10]

在实验138周内,感染HBV树鼩与未感染者的GGT灶的个数(0.5对0.34个/cm²)和面积(0.04对0.03mm²/cm²)略有差异,但不显著。HBV和AFB₁,共同作用下,GGT灶的数量(29.33个/cm²)显著高于只摄入AFB₁者(9.03)和只感染HBV者(0.5),与肝癌诱发率相关。在摄入AFB₁的树鼩中,感染HBV与未感染者相比,早期(60周内)和中期(60~80周),GGT灶数和面积均无显著差异;晚期(83~100周),感染者GGT灶数(46.10个/cm²)和面积(7.10mm²/cm²)则明显高于未感染者(7.92个/cm²)和1.86mm²/cm²)($P < 0.05$)。结果表明,AFB₁和HBV都有诱发树鼩GGT灶的作用,二者有协同作用,但HBV的作用相对比较缓慢。

2.3 肝癌前病变肝细胞异型增生的情况^[11]

于实验第60周出现第1例肝细胞异型增生(liver cell dysplasia, LCD)。在摄入AFB₁的树鼩中,HBV阳性者LCD发生率(61.53%)略高于阴性者(52.94%),但在这些有LCD的动物中发生肝癌的频率,HBV阳性者(56.25%)却明显高于阴性者(16.66%)。在未接触过AFB₁的动物中,HBV阳性组LCD发生率(46.15%)也显著高于阴性者(0/9)。对照组无1例LCD和肝癌发生。总计LCD阳性者肝癌发生率(30.0%)显著高于阴性者(2.38%)。免疫组化检测,在HBV阳性而发生LCD的树鼩中41.66%在肝细胞内检出HBsAg及(或)HBcAg。本研究中LCD出现在肝癌之前,与其后肝癌发生率相关,进一步证明LCD是肝癌前病变;并表明HBV和AFB₁都能诱发LCD,HBV在LCD向肝癌发展中起作用。

2.4 HBV DNA在肝癌及肝组织存在情况^[9,12]

原位分子杂交检查,在感染HBV的树

胸中,66.67%在肝细胞浆及(或)核检见HBV DNA。在感染HBV后发生的11例肝癌中,全部癌周肝组织均检见肝细胞浆内HBV DNA,其中5例同时见于核内;5例在肝癌细胞浆中检见HBV DNA,其中2例同时见于癌细胞核内。DNA印迹杂交分析,在感染HBV的树鼩肝中可检出复制型和(或)整合型HBV DNA。后者有1例在病理上同时检见肝细胞增生结节和LCD等癌前病变。表明HBV不仅已在树鼩肝中复制,而且在肝癌前病变发生时及之前已可有HBV DNA整合入树鼩肝细胞基因中。

3 结 语

本研究建立了人HBV感染树鼩动物模型,进行了HBV和(或)AFB₁诱癌实验,显示:HBV在肝癌前病变和肝癌发生中起重要作用,与AFB₁有协同致癌作用。在HBV感染、HBV DNA整合、肝癌前病变和肝细胞癌之间存在密切联系,支持HBV与肝癌的病因学关系。

(本研究曾获上海市肿瘤研究所顾健人教授、上海医科大学翟为溶教授、北京医科大学肝病研究所王宇教授、中国医科院输血研究所王憬惺教授和日本自治医科大学岡本宏明教授等帮助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 严瑞琪,苏建家,黄定瑞,等. 人乙型肝炎病毒感染与原发性肝癌——在树鼩的实验研究. 肝脏病杂志, 1994, 2(4): 196
- 2 Yan RQ, Su JJ, Gan YC, et al. Experimental infection of human hepatitis B virus in tree shrews. Hepa Rap Liter Rev, 1987, 17: 12
- 3 苏建家,严瑞琪,甘友全,等. 成年树鼩实验感染人乙型肝炎病毒的研究. 中华病理学杂志, 1987, 6: 103
- 4 黄定瑞,苏建家,杨春,等. 人乙型肝炎病毒在树鼩中传代感染的研究. 广西医学院学报, 1990, 7: 1
- 5 苏建家,杨春,黄定瑞,等. 供乙型肝炎疫苗质检用的新动物模型——乙型肝炎疫苗预防树鼩感染HBV的研究. 上海实验动物科学, 1990, 10: 69
- 6 苏建家,王憬惺,严瑞琪,等. 树鼩对人乙型肝炎病毒感染量反应的研究. 见:王宝恩主编. 世界华人肝病学术研讨会论文集. 北京:中华医学会肝病学会,1994: 108
- 7 严瑞琪,苏建家,黄定瑞,等. 乙型肝炎病毒与黄曲霉毒素B₁诱发树鼩原发性肝癌的研究. 中华病理学杂志, 1989, 18: 19
- 8 Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Experimental primary liver cancer in tree shrews exposed to human hepatitis B virus and aflatoxin B₁. Chin J Cancer Res, 1989, 1: 1
- 9 苏建家,罗丹,黄定瑞,等. 用原位杂交对树鼩肝组织乙型肝炎病毒DNA定位及其与黄曲霉毒素B₁在肝癌发生中的作用. 肿瘤, 1993, 13: 251
- 10 苏建家,严瑞琪,黄定瑞,等. 乙型肝炎病毒与黄曲霉毒素B₁在树鼩肝癌前病变发生的作用. 肿瘤, 1989, 9: 241
- 11 苏建家,严瑞琪,黄定瑞,等. 肝细胞异型增生的产生及其与肝细胞癌发生关系的实验研究. 临床与实验病理学杂志, 1993, 9: 137
- 12 苏建家,严瑞琪,王宇,等. 人HBV DNA能整合入树鼩肝细胞基因. 中华病理学杂志, 1992, 21: 308

(1994-10-12 收稿 1994-12-14 修回)

EXPERIMENTAL INFECTION OF HUMAN HEPATITIS B VIRUS IN TREE SHREWS AND ITS RELATION TO HEPATOCARCINOGENESIS

Yan Ruiqi¹ Su Jianjia² Huang Dingrui² Gan Youchuan²
Yang Chun² Huang Guohua² Luo Dan²

(1 Cancer Institute, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060;

2 Guangxi Institute for Research on Cancer)

Tree shrews were inoculated with human hepatitis B virus (HBV). More than half of the experimental animals were infected. Successive generative infection with the sera of HBV-infected tree shrews had been conducted and was prevented by hepatitis B vaccine. Experimental infection with standard HBV serum revealed that tree shrews are sensitive to HBV infection. By using this animal model, hepatocarcinogenic action of HBV and/or aflatoxin B₁ (AFB₁) was investigated. The incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) and pre-cancerous lesion was significantly higher in the animals both infected with HBV and exposed to AFB₁ than those either HBV-infected or AFB₁-ingested alone. The integration of HBV DNA into the host hepatocyte gene was found during hepatocarcinogenesis among the tree shrews infected by HBV. These results suggest that exposure to HBV and AFB₁ may play a synergistic role in the occurrence of HCC, and support the viewpoint of etiological relationship between HBV and HCC.

Subject headings hepatitis B virus; hepatoma, experimental/etiology; Tupaia/microbiology

· 新成果 ·

血管平滑肌 α 肾上腺素受体触发 Ca^{2+} 运动的研究

课题负责 关永源

(中山医科大学药理学教研室, 广州, 510089)

该项研究采用离体血管条收缩, Ca^{2+} 内流子外溢及 Fura-2 荧光测定胞浆 Ca^{2+} 瞬即变化等技术, 研究血管平滑肌 α 肾上腺素受体触发 Ca^{2+} 运动的特点及机理。研究发现 α_1 和 α_2 受体均可引起胞内 Ca^{2+} 释放及胞外 Ca^{2+} 内流。 α_1 受体引发的 Ca^{2+} 内流包含对电压依赖性 Ca^{2+} 通道拮抗药硝苯吡啶敏感与非敏感 2 种成分, 前者与蛋白激酶 C 激活相关, 后者受胞内 Ca^{2+} 释放所调控。在此基础上, 提出血管平滑肌的 α_1 与 α_2 受体支配其兴奋-收缩偶联的同一功能区, α_1 、 α_2 受体之间存在变构激活等新的学术观点。研究为国内首创, 并具国际先进水平, 1994 年获国家教委科技进步一等奖。

(陈丽芳)