

· 临床论著 ·

PBMCs HBV 逆转录酶 mRNA 表达与乙型肝炎的临床关系

周蓉蓉 王静 钱冬萌 王斌

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)逆转录酶 mRNA 在外周血单个核细胞(PBMCs)中的表达与乙型肝炎的临床关系。**方法** 选择 70 例乙型肝炎患者(包括急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝硬化)及 10 例 HBsAg 阴性的健康体检者。分别提取其 PBMCs 中的总 RNA,经无 RNA 酶的 DNA 酶 I 消化去除残存的基因组 DNA 后,逆转录合成 cDNA。以 HBV P 基因区设计合成逆转录酶引物进行 PCR 扩增,检测 HBV 逆转录酶的表达情况。对 1 例阳性标本进行了克隆和测序,将所得序列与 GenBank 数据库中已知核苷酸序列进行同源性分析。**结果** 所得基因序列为 379 个核苷酸,与实验设计相符。与 HBV adw2 亚型标准一级结构比较,同源性为 93.7%。对照组无 1 例 HBV 逆转录酶 mRNA 阳性表达;急性乙型肝炎组阳性表达率较低,为 5.3% (1/15);慢性乙型肝炎组阳性表达率为 33.3% (12/36),两组阳性率差异有显著统计学意义($P < 0.05$);肝硬化组阳性表达率为 26.7% (4/15),与慢性乙型肝炎组比较,阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。PBMCs 中 HBV 逆转录酶 mRNA 表达阳性组与阴性组肝功能比较,大部分指标差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。PBMCs 中 HBV 逆转录酶表达阳性率与血清 HBeAg、HBV DNA 阳性率之间无相关性($r = 0.164$ 、 $r = 0.07$),其差异均无显著统计学意义($P > 0.05$)。另外,乙型肝炎患者中,有家族史者的 PBMCs 逆转录酶 mRNA 阳性表达率占 37.0% (10/27),而无家族史者的仅占 16.3% (7/43),乙型肝炎患者的家族史与 PBMCs HBV 逆转录酶阳性表达有相关性($r = 0.229$),差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HBV 逆转录酶在 PBMCs 中可独立复制,其表达与乙型肝炎的慢性化、重度化及家族聚集性有密切相关性,可为早期诊断指标之一。

【关键词】 乙型肝炎;外周血单个核细胞;逆转录酶;聚合酶链反应

HBV reverse transcriptase expression in PBMCs of patients with viral hepatitis B

ZHOU Rong-rong, WANG Jing, QIAN Dong-meng, WANG Bin. Department of Gastroenterology, Qingdao Municipality Hospital, Qingdao 266071, China

Corresponding author: ZHOU Rong-rong, Email: yangzhq@qdstc.gov.cn

基金项目:山东省青岛市科技局基金项目(编号青科计字[2001]28号)

作者单位:266071 青岛市,青岛市立医院消化科(周蓉蓉);青岛大学医学院免疫学教研室(王静);青岛大学医学院山东省分子病毒重点实验室(钱冬萌、王斌)

通讯作者:周蓉蓉,Email:yangzhq@qdstc.gov.cn

【Abstract】 Objective To explore the clinical correlation of HBV reverse transcriptase expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and hepatitis B clinical progression. **Methods** Seventy cases with hepatitis B and 10 cases of healthy volunteers were selected. PBMCs were isolated from these patients' blood samples separately and total RNA were extracted from PBMCs. DNase I without RNase was used to eliminate the remained DNA and then reverse transcribed to cDNA. P gene primers were selected for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to determine HBV mRNA and explore HBV reverse transcriptase expression. One of the positive samples was cloned and sequenced. The gained sequences were submitted to GenBank database through Internet for homology analysis of nucleotide sequences with known sequences. **Results** The length of gene sequence was 379 bp, which was compared with the standard HBV adw2 genotype, the homology was 93.7% in nucleotide sequence. None of the healthy volunteers was positive. A lower positive rate of HBV mRNA was detected in PBMCs of acute hepatitis B group, which was 5.3% (1/19). The total positive rate of chronic hepatitis B group was 33.3% (12/36); which was significantly different from the acute and chronic hepatitis B groups ($P < 0.05$). In cirrhosis group, the positive rate was 26.7% (4/15), which was not significantly different from the chronic hepatitis B group. Liver function were significantly different between the positive group and negative group. Besides, the positive rate of HBV mRNA in PBMCs was not correlated with the positive rate of HBeAg and HBV DNA ($r = 0.164$, $P > 0.05$; $r = 0.39$, $P > 0.05$, respectively), but it was correlated with family history of hepatitis B patients ($r = 0.229$, $P < 0.05$). **Conclusions** HBV can replicate in PBMCs independently. HBV reverse transcriptase mRNA expression in PBMCs may be related to the chronicity and seriousness of hepatitis B and has a close relationship with family history of hepatitis B patients. To quantify HBV mRNA in PBMCs may be useful in early evaluation of disease progression.

【Key words】 Hepatitis B; Peripheral blood mononuclear cell; Reverse transcriptase; Polymerase chain reaction

乙型病毒性肝炎的慢性化、重症化及其与肝癌的密切相关性是目前对该病防治工作的一大棘手问题。虽然多种因素决定了乙型肝炎病毒(HBV)的感染机制和临床过程,但近年来研究发现肝外细胞 HBV 的存在和复制是导致乙型肝炎慢性化及恶化的重要因素。有研究表明,HBV 有泛嗜性,尤其在外周血单个核细胞(PBMCs)中的存在和复制,可能是导致感染持续及再发的原因之一^[1,2]。血清中病毒被清除后,HBV DNA 可单独存在于 PBMCs 中^[3],作为疾病复发的根源。本研究通过聚合酶链反应(PCR),以 HBV P 基因区逆转录酶高保守序列设计引物检测 PBMCs 中 HBV 逆转录酶的表达情况,探讨其在 PBMCs 复制状态、与乙型

肝炎慢性化、重症化及家族史的关系,有望为乙型肝炎慢性化的早期诊断、治疗及预后提供理论依据。现将实验结果报告如下。

资料与方法

一、研究对象

选择住院确诊患者 70 例。其中,急性乙型肝炎组 19 例;慢性乙型肝炎轻度组 12 例,中度组 13 例,重度组 11 例;肝炎肝硬化组 15 例。诊断均符合北京第五次全国传染病寄生虫病学术会议讨论分型标准。男性 47 例,女性 23 例。年龄 26 ~ 73 岁,平均年龄 43.1 岁。另外,随机选取 10 例 HBsAg 阴性的健康体检者作为对照组。

二、仪器与方法

1. 标本的采集及处理:分别无菌抽取外周静脉血 5 ml,用 EDTA 抗凝(1.5 mg/ml)。使用低渗溶红细胞法提取 PBMCs。

2. 相关试剂:Trizol 试剂盒为 Gibco BRL 公司产品;无 RNA 酶的 DNA 酶 I 为 Sigma 公司产品;反转录试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、pGEM-T Vector Systems 均为 Promega 公司产品;HBV DNA 半定量 PCR 检测试剂盒为北京大学医学部肝病研究所北京肝炎试剂研制中心产品;乙型肝炎病毒 e 抗原酶联免疫诊断试剂盒为厦门新创科技有限公司产品。

3. PBMCs 总 RNA 的提取及残存基因组 DNA 的消除:使用 Trizol 试剂盒从 PBMCs 中提取总 RNA。并用无 RNA 酶的 DNA 酶 I 消化残存基因组 DNA 及 PBMCs 中 HBV DNA。

4. 反转录合成 HBV cDNA:将模板 RNA 5 μ l 加入总反应体积为 20 μ l 的反转录反应混合液[RT 10 \times buffer 2 μ l, MgCl₂ 4 μ l, 4 \times dNTP 2 μ l, Oligo(dT) 1 μ l, RNA 酶抑制剂 0.5 μ l, AMV 0.5 μ l, RNase-free water 5 μ l]中,42 $^{\circ}$ C 温育 1 小时,迅速插入冰水中 2 分钟,产物为 HBV cDNA。

5. PCR 反应:(1)引物的设计与合成:本研究通过 GenBank 数据库查询,其他逆转录病毒聚合酶多肽序列比较,推测 HBV DNA 聚合酶 510 ~ 600 个氨基酸多肽段有逆转录酶的生物学活性。选取编码该肽段的基因为目的基因,用 DNA STAR 软件分析并设计合成 HBV 逆转录酶 DNA 的上下游引物,引物序列及其在 HBV 基因组上的相应位置见表 1。引物由上海生物工程技术公司合成;(2)PCR 扩增:取合成的 cDNA 模板 2 μ l,用 Taq DNA 聚合酶和 P1、P2 上下游引物进行 HBV 逆转录酶的 PCR 扩增,循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟,同时用内参照 GAPDH 引物、水对照及阳性对照进行 PCR,以验证反转录反应的成功。扩增片段长度为 379 bp,见表 2;(3)PCR 扩增产物的鉴定:PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,在紫外灯下鉴定,与 PCR marker(100 bp DNA Ladder Plus)比较。每次检测均设有阴性、阳性对照,重复两次阳性者定为阳性;(4)序列测定和分析:使用由 Promega 公司生产的 Wizard PCR preps DNA purification system PCR 产物纯化试剂

盒,将鉴定后的 PCR 扩增产物纯化,转化于大肠埃希菌 DH5 α 菌株中。提取与 pGEM-T Easy Vector 连接的阳性重组克隆,寄往上海生物工程技术有限公司进行序列测定;(5)同期常规半定量 PCR 法检测 HBV DNA 和酶联免疫吸附法检测 HBeAg。

表1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5' - 3')	碱基数(bp)	位置
P1	CTGCGGCGTTTATCATCTTCCT	23	385 ~ 407 nt
P2	GCCTCCAATACCACATCATCC	21	743 ~ 763 nt

表2 PCR 反应体系(体积 25 μ l)

试剂名称	标本(μ l)	水对照(μ l)	内参照(μ l)	阳性对照(μ l)
模板	2	2	2	1
(合成的 cDNA)	(血样之一)	(ddH ₂ O)	(标本相同血样)	(1/50 稀释阳性质粒)
Mg ²⁺	2.5	2.5	2.5	2.5
10 \times buffer	2.5	2.5	2.5	2.5
4 \times dNTP	2	2	2	2
10 \times P1	2	2		1
10 \times P2	2	2		1
GAPDH 引物 1			1	
GAPDH 引物 2			1	
Taq DNA 聚合酶	0.4	0.4	0.4	0.4
ddH ₂ O	11.6	11.6	13.6	14.6

三、统计学处理

采用卡方检验、四格表相关性分析、*t* 检验。

结 果

一、RT-PCR 扩增目的基因凝胶电泳结果(图1)

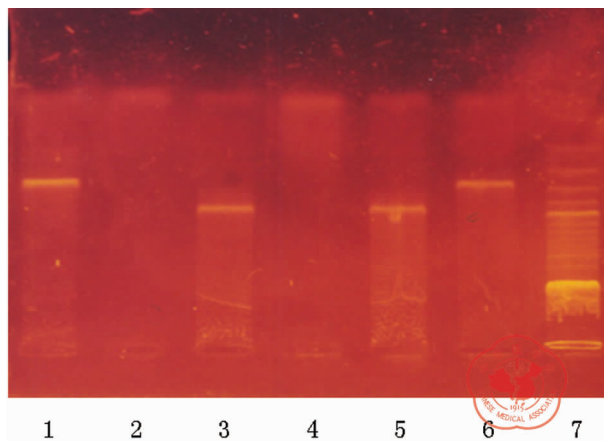


图1 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳结果

1. 阳性对照;2. 水对照;3. 阴性标本内参照 GAPDH PCR 扩增产物;4. 阴性标本 PCR 扩增产物;5. 阳性标本内参照 GAPDH PCR 扩增产物 6. 阳性标本 PCR 扩增产物;7. 100 bp DNA Ladder Plus marker

二、RT-PCR 扩增目的基因结果分析

1. 不同临床类型的乙型肝炎患者 PBMCs 中 HBV 逆转录酶的表达:10 例 HBsAg 阴性健康体检者对照组无 1 例 HBV 逆转录酶阳性表达。70 例乙型肝炎患者 PBMCs 中 HBV 逆转录酶的阳性表达率为 24.3% (17/70), 其中急性乙型肝炎组阳性表达率为 5.3% (1/19); 慢性乙型肝炎组总阳性表达率为 33.3% (12/36), 两组之间经卡方检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。肝硬化组阳性表达率为 26.7% (4/15), 与慢性乙型肝炎组之间比较, 差异无显著统计学意义 ($P > 0.05$)。PBMCs 中 HBV 逆转录酶的阳性表达组与阴性组肝功能比较, 差异有统计学意义(见表 3)。

表 3 PBMCs 中 HBV 逆转录酶阳性表达组与阴性组肝功能比较($\bar{x} \pm s$)

逆转录酶	例数	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil($\mu\text{mol/L}$)
阳性组	17	184.3 \pm 52.45	167.3 \pm 40.32	51.97 \pm 11.55
阴性组	53	156.2 \pm 37.03	146.2 \pm 35.01	45.01 \pm 12.14
<i>P</i>		< 0.05	< 0.05	< 0.05

2. 乙型肝炎患者 PBMCs 中 HBV 逆转录酶表达阳性率与 HBV 血清标志物的关系, 见表 4。

表 4 乙型肝炎患者 PBMCs 中 HBV 逆转录酶表达阳性率与 HBV 血清标志物关系(例)

PBMCs HBV 逆转录酶 mRNA	例数	血清 HBeAg		血清 HBV DNA	
		阳性	阴性	阳性	阴性
阳性组	17	10 [*]	7	9 [#]	7
阴性组	53	21	32	35	19
合计	70	31	39	44	26

注: * : $r = 0.164, \chi^2 = 1.923, P > 0.05$; # : $r = 0.07, \chi^2 = 0.39, P > 0.05$ 。

3. 乙型肝炎家族史与 PBMCs HBV 逆转录酶阳性表达的关系, 见表 5。

表 5 乙型肝炎家族史与 PBMCs 中 HBV 逆转录酶阳性表达的关系(例)

乙型肝炎家族史	例数	PBMCs HBV mRNA	
		阳性组	阴性组
有	27	10	17
无	43	7	36
合计	70	17	53

注: $r = 0.229, \chi^2 = 3.887, P = 0.049 (P < 0.05)$ 。

三、所得克隆与已知序列的同源性分析

根据上海生物工程技术公司结果分析, 所测 HBV 基因序列为 379 个核苷酸, 位置在 385 ~ 763 nt, 与本实验设计相符; 上下游引物的基因序列、碱基数和位置

均相符合;与 GenBank 数据库中已知核苷酸序列(HBV adw2 亚型)进行同源性分析,表明 379 个核苷酸中有 93.7% 相同。

讨 论

HBV DNA 复制非常独特,需经复制中间体 RNA 反转录这一独特的复制方式^[4]。在反转录过程中起重要作用的是 HBV P 基因区,逆转录酶(RT)区是 HBV P 的主要功能区,RT 是病毒复制的关键^[5]。Wang 等^[6]利用体外转录系统证实了 HBV P 中的 TP 蛋白在 HBV 负链 DNA 合成中的重要引物作用,其后的反转录过程则是在 P 区基因编码的 RT 酶作用下完成。充分说明了 HBV 基因中 P 基因区在该病毒生活周期中的重要作用,阻断 HBV P 基因编码的逆转录酶对乙型肝炎的防治具有重要的应用意义。

发生在肝细胞中的病毒复制周期也可发生在某些肝外细胞中。HBV 肝外复制组织可作为病毒的储存场所,对慢性感染状态的持续发展、感染的再活动和抗病毒治疗后的复发,都可能起重要作用。有资料^[1]显示,单个核细胞中的不同亚群都可感染 HBV,感染率依次为单核细胞、B 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞和 CD4⁺T 细胞。所有亚群中 HBV(+)细胞在慢性乙型肝炎的检出率是急性乙型肝炎的 50~500 倍。在部分潜伏期病例中,病毒复制中间体只能在 PBMCs 中检出,而不能在血清中检出^[7]。

本研究选择不同感染时期的乙型肝炎患者,采用 PCR 方法,以 HBV P 基因逆转录酶区设计引物检测病毒 mRNA,以观察 HBV RT 表达情况,不仅能灵敏地测定 HBV 在 PBMCs 中存在及 HBV 的微量复制状态,并进一步探讨机体病变与病毒 RT mRNA 表达的相互关系。为进一步研究和治疗乙型肝炎奠定良好的基础。本实验已将所得阳性结果克隆并进行序列测定,证明本实验结果真实可靠。

PBMCs HBV RT 酶 mRNA 阳性率与血清 HBeAg 阳性率及血清 HBV DNA 阳性率比较无相关性($r = 0.164$, $\chi^2 = 1.923$, $P > 0.05$; $r = 0.07$, $\chi^2 = 0.39$, $P > 0.05$)。HBV RT 酶 mRNA 与 HBeAg、HBV DNA 均为乙型肝炎病毒复制的指标,表明 PBMCs 中 HBV 非来源于肝脏,而在 PBMCs 中独立存在并复制。Shen 等^[8]认为对于血清 HBV DNA 阴性患者,其肝脏内可能并无活动性病毒复制,但在 PBMCs 中有潜在的病毒复制,可作为疾病复发的根源,应引起重视。

本研究显示 19 例急性乙型肝炎患者 PBMCs 中有 1 例 HBV 逆转录酶表达阳性,阳性率为 5.3% (1/19),急性乙型肝炎组与慢性乙型肝炎组相比,有显著性差异($P < 0.05$)。提示 PBMCs 中 HBV 逆转录酶表达活跃可能是乙型肝炎的慢性化和慢性乙型肝炎迁延不愈的原因之一,与有关文献报道相符^[1,2]。有资料显示^[9],HBV 在淋巴样细胞中引起感染,可减少细胞因子和抗体的产生,从而避免免疫清除。HBV 在 PBMCs 和淋巴样组织中潜藏,可能是感染持续和再发的来源。另有文献报道^[10]PBMCs 中的 HBV 感染,可能意味着表面上已经从肝脏清除 HBV 的患者肝炎病情的再活动。故 PBMCs 中 HBV 的存在可能与疾病的传播与复发有关。

PBMCs 中 HBV 逆转录酶的阳性表达组与阴性组肝功能比较,大部分指标差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 HBV 逆转录酶 mRNA 的表达可能与病情重度化有关,或许是慢性乙型肝炎反复发作并向重度化发展的因素之一。这方面有待于跟踪随访,以进一步证实。有资料表明^[9],HBV DNA 主要存在于 PBMCs 或肝外组织中。Laskus 等^[11]和 Iwai 等^[12]认为,PBMCs 中的 HBV 可能是变异的病毒,而血清中则是野生毒株,当存在野生型病毒聚合酶时,缺陷型病毒仍可复制,引起肝组织的严重损伤。病毒变异也是暴发性肝功能衰竭的重要原因之一。另外^[12]暴发型乙型肝炎可因静息的慢性肝炎或基于慢性无症状感染的病毒再活动(re-activation,指 HBV 复制低水平转换为高水平)而发生。

实验结果显示 PBMCs mRNA 与乙型肝炎家族史有一定关系($r = 0.229, \chi^2 = 3.89, P < 0.05$),这可能与宿主的免疫耐受和遗传背景有关。有家族史的患者多数有较长的既往感染史(尽管许多患者不能追溯其自然病史),胎儿宫内感染 HBV 可诱导完全性免疫耐受,而围产期或儿童期感染 HBV 可诱导部分免疫耐受,这可能由于胚胎期或新生儿期感染 HBV,处于未成熟阶段的免疫组织或细胞接触 HBV 抗原,对 HBV 抗原敏感的 Th 细胞消失,从而形成免疫耐受,对 HBV 抗原不产生体液和(或)细胞免疫,或只产生有限的免疫反应,而免疫低下易导致 HBV 广泛感染。

本实验多方位探讨了 PBMCs 中 HBV 逆转录酶的表达与乙型肝炎发展、转归等方面的关系,有望为病情进展提供部分实验依据。另外,由于测定 HBV 复制中间体 mRNA,是病毒复制的早期现象,或许对于乙型肝炎慢性化的早期发现、重度化倾向的早期预见、静止病变再活动的预测等有进一步研究的价值。

参 考 文 献

- 1 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.
- 2 Nagaraju K, Naik S. Chronic hepatitis B virus carriers have low lymphoproliferative responses to HBsAg and reduced interleukin-2 synthesis. *Indian J Gastroenterol*, 1998, 17:83-86.
- 3 Leung NW, Tam JS, Lau G, et al. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood leukocytes. A comparison between hepatocellular carcinoma and other hepatitis B virus-related chronic liver diseases. *Cancer*, 1994, 73:1143-1148.
- 4 Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 1982, 29:403-415.
- 5 Oadri I, Siddiqui A. Expression of hepatitis B virus polymerase in Ty1-his3AI retroelement of *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1999, 274:31359-31365.
- 6 Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell*, 1992, 71:663-670.
- 7 Ilan Y, Galun E, Nagler A, et al. Sanctuary of hepatitis B virus in bone-marrow cells of patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl Surg*, 1996, 2:206-210.
- 8 Shen HD, Choo KB, Lee SD, et al. Hepatitis B virus DNA in leukocytes of patients with hepatitis B virus-associated liver disease. *J Med Virol*, 1986, 18:201-211.
- 9 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2001. 119-447.
- 10 Harrison T. Hepatitis B virus DNA in peripheral blood leukocytes: a brief review. *J Med Virol*, 1990, 31:33-35.

- 11 Laskus T, Radkowski M, Vargas H, et al. Comparison of hepatitis B virus core promoter sequences in peripheral blood mononuclear cells and serum from patients with hepatitis B. J Gen Virol, 1997, 78: 649-653.
- 12 Iwai K, Tashima M, Itoh M, et al. Fulminant hepatitis B following bone marrow transplantation in an HBsAg-negative, HBsAb-positive recipient; reactivation of dormant virus during the immunosuppressive period. Bone Marrow Transplant, 2000, 25: 105-108.

(收稿日期: 2008-12-25)

(本文编辑: 李卓)

周蓉蓉, 王静, 钱冬萌, 等. PBMCs HBV 逆转录酶 mRNA 表达与乙型肝炎的临床关系[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(4): 383-390.