

乙型肝炎病毒对精子染色体的影响

黄建民¹ 黄天华¹ 邱焕英² 邱杰文³ 方小武¹ 陈晓红¹ 庄天罡¹ 蔡树深¹ 王永华² 刘鸿禧¹ 杨风霞² 刘卫东²

¹汕头大学医学院生殖生物学研究室 汕头 515063 ²汕头大学校医院 ³汕头大学医学院附属第二医院传染科

摘要 乙型肝炎病毒感染者的精子与去透明带金黄地鼠卵受精制备染色体,并以 HBV 全长 DNA 作探针对精子染色体进行荧光原位杂交。结果发现慢性迁延型肝炎患者、慢性活动型肝炎患者和 HBV 携带者的精子染色体畸变率分别为 12.33% (9/73)、16.18% (11/68) 和 15.48% (13/48),均显著高于健康对照者精子畸变率(4.35%,5/115)。进一步 FISH 显示,在 1 例慢性迁延型肝炎患者的精子染色体上有特异荧光信号。研究结果表明,HBV 能导致精子染色体不稳定性,并在患者精子染色体上整合,其整合特点是:整合位点是随机的,且大多为多位点整合。

关键词 乙型肝炎病毒;人精子染色体;去透明带地鼠卵;荧光原位杂交;染色体畸变;DNA 整合;垂直传播

THE EFFECT OF HEPATITIS B VIRUS ON HUMAN SPERM CHROMOSOME

Huang Jianmin¹, Huang Tianhua¹, Qiu Huanying², Qiu Jiewen³, Fang Xiaowu¹, Chen Xiaohong¹, Zhong Tiangang¹, Cai Shushen¹, Wang Yonghua², Liu Hongxi¹, Yang Fengxia², Liu Weidong²

¹Laboratory of Reproductive Biology, Shantou University Medical College, Shantou 515063, ²Shantou University Hospital, ³The Infectious Department of the Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College

Abstract Sperm chromosome of subjects with hepatitis B virus infection were prepared using interspecific in vitro fertilization with zona-free hamster eggs. Fluorescence in situ hybridization (FISH) to sperm chromosome spreads was carried out with biotin-labelled full length HBV DNA. There was significant difference in the frequencies of sperms with chromosome aberrations between subjects with HBV infection and control. FISH showed that HBV DNA integrated into sperm chromosomes, and that multisite and nonspecific integrations were the features of HBV in sperm chromosomes. These results indicate that HBV infection affects on the sperm chromosome broadly.

Key words hepatitis B virus, human sperm chromosome, zona-free hamster egg; FISH; chromosome aberration; DNA integration, vertical transmission

乙型肝炎病毒(HBV)感染是严重的公共卫生问题,与肝硬化和肝细胞癌(HCC)密切相关⁽¹⁾。HBV在宿主肝细胞基因组整合,导致染色体不稳定性增加是HBV致癌的病理基础⁽²⁾。大量遗传学研究表明,HBV有诱发体细胞染色体畸变的作用,除在肝细胞整合外,也可在精子染色体上整合⁽³⁻⁷⁾。本文以去透明带金黄地鼠卵异种体外受精技术制备精子染色

体,结合荧光原位杂交技术,探讨HBV感染者精子染色体的畸变率变化及HBV在精子染色体上的整合特点。

材料与方法

1 研究对象 1例慢性迁延型肝炎(慢迁肝)患者,27岁,病程7年,肝功能异常,HBsAg、HBeAg和An-

广东省自然科学基金资助项目 (No. 940567)

ti-HBc 阳性。1 例慢性活动型肝炎(慢活肝)患者,25 岁,病程 5 年,肝功能广泛异常,HBsAg、HBeAg 和 Anti-HBc 阳性。1 例 HBV 携带者,24 岁,HBsAg、HBeAg 阳性,肝功能多次检查均正常。1 例健康男性,32 岁,HBV 各项血清学指标均阴性,作对照。受试者均为在校学生或老师,无射线和化学药物接触史。

2 精子染色体制备 受试者精液标本处理;金黄地鼠超排卵、去透明带、受精;受精后异合卵培养及精子染色体制片见参考文献⁽⁸⁾。

3 精子染色体畸变观察 制片用 10% Giemsa 染液(磷酸盐缓冲液配制,pH6.8)染色 20-30min,盖盖片,镜检,计数畸变精子数(包括数目异常;染色单体断裂、射体、裂隙;染色体断片、环状染色体、双着丝粒染色体)。观察后-70℃保存留作原位杂交用。

4 荧光原位杂交

4.1 HBV DNA 探针制备及生物素标记 含 HBV 全长 3.2kb DNA 的重组体质粒 pHBV-1 总长 6.2kb。质粒扩增、提取、纯化、定量按常规方法进行。缺口翻译法掺入 biotin-4-dATP 标记探针(未酶切的完整质粒)。

4.2 荧光原位杂交过程 镜检后的部分精子染色体片进行荧光原位杂交。精子染色体和 HBV DNA 标记探针的变性及杂交;杂交后洗涤和免疫化学检测;荧光显微镜观察和照相等参照文献⁽⁹⁾,并作适当改进。

结果

1 精子染色体畸变比较 慢迁肝、慢活肝和 HBV 携带者的精子染色体畸变率分别为 12.33%、16.18%和 15.48%,与健康对照者(4.35%)比较,均有显著统计学意义(表 1)。

表 1 受试对象精子染色体畸变比较

	观察精子数	染色体畸变精子数	畸变率
慢迁肝	73	9	12.33 ^a
慢活肝	68	11	16.18 ^b
携带者	84	13	15.48 ^c
对照	115	5	4.35

注:与对照比较,a²=4.126, P<0.05; b²=7.494, P<0.01;

c²=7.037, P<0.01

2 精子染色体 HBV DNA 荧光原位杂交结果 对慢

迁肝观察 42 套荧光原位杂交后的精子染色体,其中 9 套有明显的黄绿色荧光信号点,最多的 1 套染色体中有 5 条杂交信号阳性,其余 8 套有 2 至 4 个信号点,而且在分散不佳的分裂相中也可见到阳性杂交结果。阳性精子中的信号强度有明显差异,各精子间未见一致性染色体阳性信号分布(附图)。其他 3 例标本杂交后的精子染色体均无阳性信号显现(表 2)。

表 2 受试对象精子染色体 FISH 结果

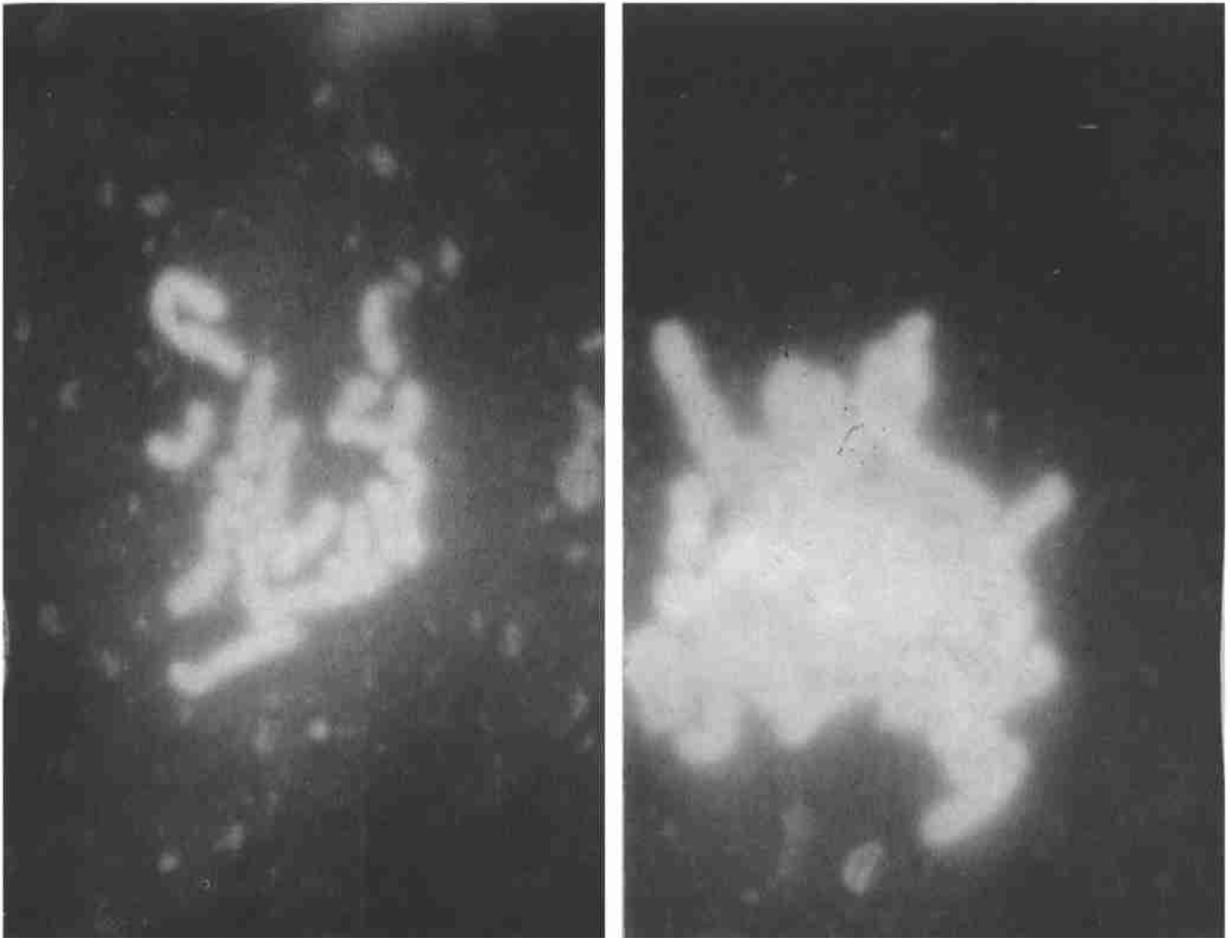
	慢迁肝	慢活肝	携带者	对照
分析精子数	42	37	54	35
阳性精子数	9	0	0	0

讨论

已证实,病毒感染可以导致宿主细胞染色体畸变。有人对乙肝患者体细胞(外周血细胞)培养研究发现,染色体畸变率,姊妹染色单体互换(SCE)率明显增高^(4,5)。病理研究揭示,乙型肝炎患者的体液和组织中广泛存在 HBV,而且可以在宿主肝细胞中整合^(10,11)。我们的研究结果发现,3 例 HBV 感染者的精子染色体畸变率均显著高于健康对照者,表明 HBV 对精子染色体也有明显的致畸变遗传学效应。进一步荧光原位杂交显示,1 例慢迁肝患者的精子染色体有 HBV DNA 整合,其中 9 个杂交结果阳性的精子,最多的 1 套染色体有 5 个荧光信号,另外 8 个均有 2 致 4 个信号点,阳性精子中的荧光信号强度存在明显差异,阳性信号在染色体上无一致性分布。表明 HBV 在精子染色体上整合有其特点:即整合位点是随机的、非特异性的,且大多为多位点整合。

一般认为病毒基因组在宿主细胞中整合,会增加宿主细胞染色体的不稳定性⁽²⁾。许成文等⁽³⁾报道正常人外周血淋巴细胞在 HBsAg 阳性血清诱导下 SCE 频率增高,我们在并无 HBV DNA 整合的 2 例感染者中,也发现精子染色体畸变显著增多,表明非整合型 HBV 对精子染色体同样具有畸变作用。

HBV 在精子染色体中整合,并导致染色体畸变,此类精子如受精,其后代将难免成为遗传病的受累者。由于 HBV 具有与逆转录病毒相似的特点^(12,13)。若全长 HBV DNA 整合入精子染色体并与卵受精,婴儿体内势必会在某些组织形成病毒颗粒,使婴儿一出生就成为带毒者,这将是真正意义上的父婴垂直传播。因此 HBV 对精子染色体的影响在遗传学和流行病学上都是长远的。



附图 生物素标记的 HBV DNA 探针对精子染色体 FISH 检测结果。1. 有 3 条染色体荧光信号阳性;2. 一套染色体分散不佳的分裂相中有 5 个明显信号点。

参考文献

- 1 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: A prospective study of 27,707 men in Taiwan. *Lancet*, 1981;2:1129
- 2 王洛权, 阚秀, 吴秉铨. 肝炎病毒与肝癌癌变的分子病理学进展. *中华病理学杂志*, 1995;24(6):393
- 3 许成文, 吴瑞庭, 盛兰敏, 等. 肝炎病毒对淋巴细胞姊妹染色单体交换的影响. *中华传染病杂志*, 1984;2(4):226
- 4 李梦东, 计雪文. 乙型肝炎患者淋巴细胞染色体异常的初步观察. *解放军医学杂志*, 1980;5(1):51
- 5 Ghosh PK. Sister-chromatid exchange in patients with hepatitis. *Mutat Res*, 1982;103:303
- 6 Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: A possible vertical transmission of HBV via the germ line. *J Med Virol*, 1985;16(1):61
- 7 Peng HW, Su TS, Han SH, et al. Assessment of HBV persistent infection in an adult population in Taiwan. *J Med Virol*, 1988;24:405
- 8 黄天华, 崔晓, 漆著, 等. 平阳霉素诱发精子染色体畸变. *遗传*, 1991;13(6):24
- 9 黄建民, 黄天华, 方小武, 等. 用荧光原位杂交技术检测人精子核非整倍性. *中华医学遗传学杂志*, 1997;14(4):248
- 10 Dejean A. Detection of hepatitis B virus DNA in pancreas, kidney and skin of two human carriers of the virus. *J Gen Virol*, 1984;65(3):63
- 11 Hino O, Shows TB, Rogler CE. Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma a chromosome 17, 18 translocation. *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 1986;83:8338
- 12 Summers J, Mason WS. Properties of the hepatitis B-like viruses related to their taxonomic classification. *Hepatology*, 1982;2:61
- 13 Araki K, Miyazaki JI, Hino O, et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 1989;86(2):207

(1998 - 09 - 15 收稿;1998 - 11 - 20 修回)