

# 单细胞凝胶电泳法检测 HBV 患者外周血淋巴细胞 DNA 损伤

黄金梅, 曾小云, 仇小强

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30860247); 广西自然科学基金项目(桂科青 0728066)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学教研室(黄金梅, 曾小云); 541001 广西, 桂林医学院(仇小强)

作者简介: 黄金梅(1984-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 慢性病预防与控制。E-mail: huangjinmei530@yahoo.cn

通讯作者: 曾小云(1971-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 慢性病预防与控制。E-mail: zxyxjw@21cn.com

**[摘要]** **目的** 探讨乙型肝炎病毒与 DNA 损伤的关系以及不同感染模式慢性乙型肝炎患者(大三阳和小三阳患者)DNA 损伤情况。**方法** 应用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术检测对照组和不同感染模式慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞 DNA 的损伤情况, 采用彗星分析软件对实验结果进行淋巴细胞损伤率、彗星尾长(Tail Extent)、彗星尾 DNA 百分含量(Tail % DNA)、彗星尾惯量(Tail Inertia)、Olive 尾距(Olive Tail Moment)等指标进行分析。**结果** 经 SCGE 技术后得 HBV 感染与 DNA 损伤断裂关系有统计学意义( $P < 0.05$ ); 大小三阳组间 DNA 损伤断裂有统计学差异( $P < 0.05$ )。小三阳组经 SCGE 技术后所得彗星图像可见有少量彗星尾。大三阳组经 SCGE 技术后所得彗星图像可见有明显彗星尾。慢性乙型肝炎组外周血淋巴细胞 DNA 损伤与对照组比较彗星尾长、尾惯量在统计学上有显著性差异( $P < 0.05$ ); 不同感染模式的乙型肝炎外周血淋巴细胞 DNA 损伤比较, 尾长、尾 DNA 百分含量和尾惯量在统计学上有统计学差异( $P < 0.05$ )。**结论** HBV 感染可能造成外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 且不同感染模式的损伤情况不同。

**[关键词]** 单细胞凝胶电泳; 乙型肝炎病毒; DNA 损伤

**[中图分类号]** R 512.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)08-0697-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.08.01

**Detection of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of HBV-infected patients with single-cell gel electrophoresis** HUANG Jin-mei, ZENG Xiao-yun, QIU Xiao-qiang. *Public Health College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China*

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between the hepatitis B virus and DNA damage, and explore DNA damage situation around the different mode of infection of HBV-infected patients. **Methods** Single-cell gel electrophoresis (SCGE) technique was adopted in measuring DNA damage in peripheral blood lymphocytes of controls, different models of chronic HBV-infected patients and the comet analysis software was used for analyzing the results. The degree of DNA damage was judged by the comet tail length (tail extent), the percentage of the comet tail DNA (Tail% DNA), the comet tail of inertia (tail inertia), olive tail moment. **Results** There were significantly differences between infection of HBV and DNA damage( $P < 0.05$ ), and also significantly differences between the different mode of infection of HBV-infected patients( $P < 0.05$ ) after the SCGE. There were a few comet tail images in lymphocytes of xiaosanyang group and obviously comet tail images in lymphocytes of dasanyang group. The tail extent, tail % DNA in lymphocytes of chronic hepatitis B patients were aggravated significantly than in lymphocytes of controls ( $P < 0.05$ ), and there were significantly differences between the tail extent, tail % DNA, tail inertia of the different mode of infection in HBV-infected patients( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hepatitis B virus is likely to be the main cause of resulting DNA damage in peripheral blood lymphocytes. And different mode of infection of HBV-infected patients have the different damage situation.

**[Key words]** Single-cell gel electrophoresis; Hepatitis B virus; DNA damage

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染呈世界性分布, 是威胁人类健康的重要传染病。据统计全球共有 3.5 亿人感染 HBV。大部分 HBV 携带者都在亚洲和非洲, HBV 感染率为 8% ~ 15%。我国是 HBV 感染的高发地区<sup>[1]</sup>。由于 HBV 是一种独特的、不严格的嗜肝病毒, 即是一种泛嗜性病毒。除了侵犯肝细胞外, 还可以在肝外组织如外周血淋巴细胞中发现。HBV DNA 在这些细胞中可能以整合型、游离型或混合型的形式存在。由于细胞内 HBV DNA 的存在, 可造成染色体、DNA 的损伤。这种损伤可引起宿主病情的发展甚至肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生, 乙型肝炎病毒的存在可能是淋巴细胞 DNA 损伤的主要原因<sup>[2]</sup>。我们采用 SCGE 技术对对照者、不同感染模式慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞 DNA 的损伤进行检测, 以探讨 HBV 患者外周血淋巴细胞 DNA 损伤情况, 为 HBV 感染引起 HCC 的机理及 HCC 的一级预防提供参考。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 采用病例-对照研究方法, 受检淋巴细胞来源于 30 例慢性乙型肝炎病人和 30 例健康自愿者。病例和对照以性别、年龄为配对条件进行 1:1 配对。对符合条件的研究对象均采集静脉血 3 ml, 提取淋巴细胞培养<sup>[3]</sup>后进行单细胞凝胶电泳。

**1.2 仪器与试剂** 超净工作台, 低速台式离心机 TDL-50c (上海安亭科学仪器厂), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Galaxy S), EV265 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司 型号: Ti-S), 人淋巴细胞分离液 (天津灏洋科技责任有限公司), 正常熔点琼脂糖, 低熔点琼脂糖, 溴乙啶 (Sigma)。

### 1.3 单细胞凝胶电泳<sup>[4]</sup>

**1.3.1 胶片的制作** 分作 3 层。第 1 层为正常熔点琼脂糖 (NMA) 层, 第 2 层为含有细胞的低熔点琼脂糖 (LMA) 层, 第 3 层又为 LMA 层 (第三层可省)。第 1 层凝胶的制备: 将浸泡于 50% 酒精中的磨砂载玻片拿出, 磨砂面向上, 晾干, 将 1 ml NMA 均匀铺在载玻片上, 置室温晾干, 待第 2 天使用。第 2 层凝胶的制备: 将 60 μl 含有 1 × 10<sup>6</sup> 个以上 (用计数板计数: 弃去上清液, 加 0.5 ml 的 PBS 置于含细胞的离心管中, 混匀。用尖滴管吸取一滴置于载玻片, 然后用微量移液器吸取 20 μl 细胞悬液滴于细胞计数板上计数) 受检人血淋巴细胞的 PBS 和 60 μl 含 0.8% LMA 的无钙镁的 PBS 分别在 37 °C 下预热并

相混。继之, 迅速将含细胞的 LMA 滴到第 1 层琼脂糖上, 立即盖上另一干净盖玻片, 置 4 °C 20 min 使第 2 层 LMA 凝固。第 3 层凝胶的制备: 第 2 层 LMA 凝固后, 在室温下小心移去盖玻片, 滴加预热至 37 °C 的 75 μl 含 0.5% LMA 的无钙镁 PBS, 盖上盖玻片, 4 °C 下 20 min 使之凝固。

**1.3.2 细胞裂解** 移去盖玻片, 将载玻片水平浸入新配制的预冷的 4 °C 细胞裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na-EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 10, 1% 肌氨酸钠, 用前加 1% TritonX-100, 10% 二甲基亚砜) 中 2.5 h。

**1.3.3 DNA 碱解旋** 取出载玻片, 用吸水纸吸干裂解液, 并水平列置于水平电泳槽的阳极端。电泳槽中盛有新配制的碱性电泳缓冲液 (1 mmol/L Na-EDTA, 300 mmol/L NaOH), 约覆过载玻片胶面 0.25 cm 左右, 放置 20 min, 以便使 DNA 在碱性条件下解螺旋, 使 DNA 断链在电场中易于迁移。

**1.3.4 单细胞电泳** 在电压 25 V、电流 300 mA 下, 电泳 30 min。电压、电流可用改变缓冲液面高低来调节。

**1.3.5 中和与染色** 将电泳后的载玻片凝胶平置于小瓷盘内, 中和凝胶中的碱液: 缓缓沿壁加入 0.4 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液, 将载玻片淹没 5 min, 反复 2 次, 再将 Tris-HCl 缓冲液吸去, 用滤纸将盘内液体吸干。每张载玻片滴加 20 μg/ml 溴化乙啶 (EB) 水溶液 20 μl, 再盖上盖玻片染色 10 min。

**1.4 图像分析** 染色后的样本尽快置于荧光显微镜下, 观察 DNA 图像。选择 515 ~ 560 nm 波长激发光照射样本, DNA 图像呈橙红色。显微镜下可清楚地观察到彗星状荧光图像。每个样本随机选择 30 个细胞拍摄, 用彗星分析软件测定各研究组的彗星尾参数: 彗星尾长 (Tail Extent)、彗星尾 DNA 百分含量 (Tail % DNA)、彗星尾惯量 (Tail Inertia)、Olive 尾矩 (Olive Tail Moment)<sup>[5]</sup>、DNA 断裂分级<sup>[6]</sup>。

**1.5 数据处理及统计分析** 所有数据均采用 SPSS11.0 for Windows 软件包建库并进行统计分析, 尾长和尾惯量符合正态分布, 两样本比较采用 *t* 检验, 数据表达为均值 ± 标准差。尾 DNA% 不符合正态分布, 对数转换后经检验符合正态分布, 两样本比较采用 *t* 检验, 数据表达为几何均数。尾矩不符合正态分布, 两样本比较用非参数 Mann-Whitney U 检验, 数据表达为中位数。样本率比较采用 χ<sup>2</sup> 检验, 检验水准 α 定为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 典型彗星图表现 对照组 SCGE 图(见图 1),

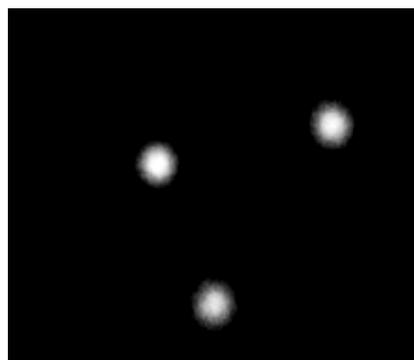


图1 对照组 SCGE 图

小三阳组 SCGE 图(见图 2),大三阳组 SCGE 图(见图 3)。

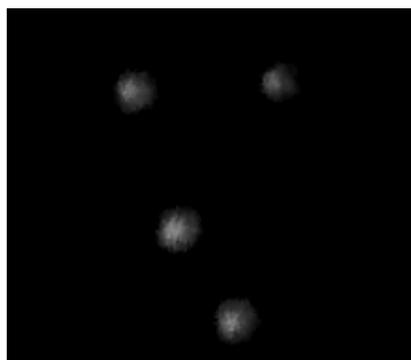


图2 小三阳组 SCGE 图

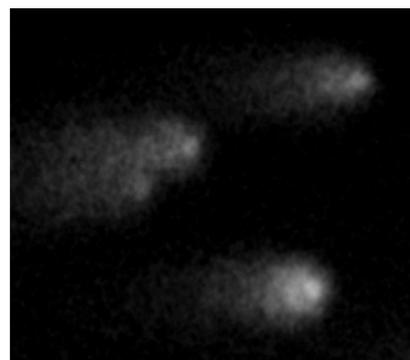


图3 大三阳组 SCGE 图

2.2 淋巴细胞损伤率及 DNA 断裂分级 对照组和不同感染模式慢性乙型肝炎患者(大三阳和小三阳患者)DNA 断裂分级见表 1。DNA 损伤从对照组、小三阳组至大三阳组三组间呈损伤递增趋势。

表 1 对照组与不同模式肝炎的 DNA 断裂分级

组别	人数	细胞数	DNA 断裂分级(细胞数)				细胞损伤率(%)
			0	1	2	3	
对照组	30	900	834	48	16	2	7.33
小三阳	10	300	249	33	15	3	17.0
大三阳	20	600	439	122	33	6	26.83

注:慢乙肝组(大、小三阳组)与对照组比较,  $\chi^2 = 90.682, P < 0.05$ ;大小三阳两组间比较,  $\chi^2 = 10.740, P < 0.05$

2.3 对照组和慢乙肝组外周血淋巴细胞 DNA 损伤情况比较 对照组和慢乙肝组分别测得的彗星参数结果,尾长和尾惯量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而尾 DNA 百分含量和尾矩,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

2.4 不同感染模式乙型肝炎患者 DNA 损伤情况比较 不同感染模式乙型肝炎患者 DNA 损伤情况两组数据比较,尾长、尾 DNA 百分含量和尾惯量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );尾矩,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 2 慢乙肝组和对照组外周血淋巴细胞 DNA 损伤情况比较

组别	尾长( $\bar{x} \pm s$ )	尾 DNA 百分含量(几何均数)	尾惯量( $\bar{x} \pm s$ )	尾矩(中位数,范围)
对照组	0.77 ± 0.45	0.41	32.55 ± 7.84	0.28(0.10 ~ 3.52)
慢乙肝组	2.19 ± 1.87	0.39	98.80 ± 32.02	0.35(0.08 ~ 4.85)
<i>t</i>	-10.79	-1.9	-31.34	-1.515(Z)
<i>P</i>	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05

表 3 不同感染模式乙型肝炎患者 DNA 损伤情况比较

组别	尾长( $\bar{x} \pm s$ )	尾 DNA 百分含量(几何均数)	尾惯量( $\bar{x} \pm s$ )	尾矩(中位数,范围)
小三阳组	1.02 ± 0.83	0.0010	88.13 ± 21.24	0.31(0.07 ~ 4.14)
大三阳组	3.34 ± 2.02	0.0024	111.11 ± 37.54	0.36(0.09 ~ 5.08)
<i>t</i>	-10.97	-3.567	-7.062	-0.243(Z)
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

## 3 讨论

3.1 单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星实验(comet assay),是一种检测哺乳动物单个有核细胞 DNA 损伤和修复的方法。当 DNA 存在损伤时,在电场的作用下,断裂损伤的 DNA 会离开细胞核向正极泳动,形成拖尾, DNA 损伤越重,拖尾越长,通过测定尾巴的长短和光密度就可知 DNA 损伤的程度<sup>[7]</sup>。

3.2 本实验应用单细胞凝胶电泳法检测 HBV 患者外周血淋巴细胞的 DNA 损伤情况,结果显示,HBV 感染对外周血淋巴细胞 DNA 可造成断裂损伤,损伤率达 17.0% 和 26.83%。经统计学分析,慢乙肝组与健康对照组外周血淋巴细胞 DNA 损伤比较,不同模式的 HBV 感染者外周血淋巴细胞 DNA 损伤程度比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。从彗星结果图片中显示,对照组所得彗星图像未见明显彗星

尾。小三阳组、大三阳组的彗尾长明显,而且长度明显不同,从健康组到小三阳组,再到大三阳组,可能有递增趋势。表2慢乙肝组(大、小三阳两组)与对照组的数据用 *t* 检验和秩和检验分析,尾长和尾惯量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),显示慢乙肝组与对照组 DNA 损伤有统计学差异,乙型肝炎病毒可导致 DNA 的损伤。可能与 HBV 感染后,机体通过 Tc 细胞的直接作用及释放因子间接造成肝细胞损伤,诱发免疫病理反应时产生的中间产物活性氧( $O_2$ 、 $H_2O_2$  等)有关。已知活性氧自由基可与 DNA 分子中嘌呤碱基、嘧啶碱基作用,诱导 DNA 断裂,氧化性造成外周血淋巴细胞 DNA 损伤。所以 HBV 的存在可能是淋巴细胞 DNA 损伤的主要原因。尾 DNA 百分含量和尾矩,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),显示慢乙肝组与对照组 DNA 损伤无统计学差异。大、小三阳两组间 *t* 检验和秩和检验分析,尾长、彗星尾 DNA 百分含量和彗星尾惯量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),显示不同乙肝感染模式患者其淋巴细胞 DNA 损伤程度可能不同,可能乙肝病毒载量和状态对其有一定的影响;尾矩差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**3.3 慢乙肝是乙型肝炎中一种严重危害人类身体健康的常见病和多发病。**40%以上慢乙肝患者成年后死于肝硬变和原发性肝细胞癌,慢乙肝与肝硬变和原发性肝细胞癌密切相关。有研究表明,引起慢乙肝的乙型肝炎病毒(HBV)可以整合到人类细胞基因组中,HBV 的整合可以损伤人类的遗传物质。研究慢性乙型肝炎患者 DNA 损伤情况,可以为肝硬化和原发性肝细胞癌预防和治疗提供依据和参考。陈锦生等<sup>[8]</sup>应用单细胞凝胶电泳法对 56 位 HBV 感染者和 82 位健康者的外周血淋巴细胞进行细胞

DNA 损伤检测,证明 HBV 感染对外周血淋巴细胞 DNA 可造成断裂损伤,损伤率达 24.1%,本实验的结果与之相一致。

**3.4 单细胞凝胶电泳技术是检测慢乙肝患者外周血淋巴细胞 DNA 损伤的灵敏方法,**是在单细胞水平上检测有核细胞 DNA 断裂的技术,在一定条件下, DNA 迁移的距离(表现为彗星长度)、受损 DNA 的含量(表现为彗星荧光强度)分布、尾惯量可能与 DNA 损伤程度正相关,而尾距可能与 DNA 损伤程度没有一定的关联。是否可应用这种方法来预测慢乙肝病情的发展,尚需进一步深入研究。

**参考文献**

- 1 张春燕,黄天壬,张振权. 广西肝癌高发区防癌筛查对象 HBV 感染的现况调查研究[C]. 第四届中国肿瘤学术大会暨第五届海峡两岸肿瘤学术会议论文集,2006:185 - 186.
- 2 龚晓兵,唐永煌,张立伐,等. 单细胞凝胶电泳技术检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞 DNA 的损伤[J]. 广东医学,2003,24(1):21 - 22.
- 3 鄂 征,主编. 组织培养技术及其在医学研究中的应用[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:150 - 152.
- 4 张显忠,苗 苗,李艳玲,等. 改良单细胞凝胶电泳技术在 DNA 损伤与修复检测中的应用[J]. 泰山医学院学报,2005,26(3):206 - 208.
- 5 Ostling O, Johanson KJ. Microelectronphoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,1984,123(1):291 - 298.
- 6 邢彩虹,李桂兰,李玉英,等. 单细胞凝胶电泳法检测苯作业工人淋巴细胞 DNA 损伤[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2000,18(5):257 - 259.
- 7 Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review[J]. Mutat Res,1995,339(1):37 - 59.
- 8 陈锦生,葛 明,侯梦芹,等. HBV 感染者外周血淋巴细胞 DNA 损伤的监测[J]. 海峡预防医学杂志,2003,9(3):12 - 13.

[收稿日期 2010-04-07][本文编辑 谭 毅 黄晓红]

**《中国临床新医学》杂志投稿须知**

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、性别、出生年月、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。