论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1406-04

乙型肝炎病毒感染原代培养人绒毛膜滋养层细胞的实验研究

李俊男[1],王宇明[2],史常旭[1],梁志清[1],常 青[1],张 琴[1],陈 黎[1] (第三军医大学西南医院:[1]妇产科,[2]全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨原代培养的人绒毛膜滋养层细胞感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的可能性及规律。**方法** 采用胰酶/DNA酶序贯消化及Percoll密度梯度离心分离纯化人绒毛膜滋养层细胞后,采用血清直接感染法进行滋养层细胞的HBV感染,同时通过与对正常成人肝细胞株L02细胞的HBV感染后及转染HBV的肝癌细胞株(HepG2.2.15)的传代培养比较,实时荧光定量PCR检测培养上清的HBV DNA;并用透射电镜观察HBV感染后滋养层细胞的超微结构改变及其在滋养层细胞中的定位。**结果** 原代培养的滋养层细胞感染HBV后释放至培养上清中的HBV DNA于感染后48~72 h达高峰,而L02细胞则于感染后12~24 h达高峰,HepG2.2.15细胞株感染后则一直攀升。透射电镜观察HBV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,出现空泡状结构,并可观察到病毒样颗粒,主要定位于细胞核周。**结论** HBV可以感染滋养层细胞,定位于核周并导致滋养层细胞的超微结构改变。

关键词: 滋养层细胞;原代培养;乙型肝炎病毒

中图法分类号: R329.24;R373.21;R714.251 **文献标识码:** A

On HBV infection of trophoblastic cells in primary culture

LI Jun-nan[1], WANG Yu-ming[2], SHI Chang-xu[1], LIANG Zhi-qing[1], CHANG Qing[1], ZHANG Qin[1], CHEN Li[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possibility and regulation of that hepatitis B virus (HBV) infects trophoblastic cells in primary culture. **Methods** Trypsin and DNAse sequential digestion and Percoll density centrifugation were used to separate and purify human chorionic trophoblastic cells. The direct serum (HBV DNA positive) infection method was adopted to infect trophoblastic cells. The results of HBV infection of trophoblastic cells were compared with that of normal human adult liver cell line L02 and that of liver cancer cell line HepG2.2.15. Real-time PCR was used to detect HBV DNA in culture supernatant. Further, ultrastructural characteristics of infected trophoblastic cells were observed with transmission electron microscope. **Results** The HBV DNA in culture supernatant that released by HBV infected trophoblastic cells reached the peak in 48 – 72 h. For L02 cell, it occurred in 12 – 24 h and for HepG2.2.15 cell line, it kept increasing. The ultrastructure of infected HBV trophoblastic cells differed obviously from that of normal cells, and showed hyperplasia of lysosome, appearance of vacuoles and virus-like particles around the nucleus. **Conclusion** Trophoblastic cells could be infected by HBV, and the cellular ultrastructure changed dramatically following HBV infection.

Key words: trophoblastic cells; primary culture; hepatitis B virus

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的高发区,约有1.2亿人携带HBV。母婴传播是我国HBV传播的主要途径之一。母婴传播方式有3种:产前宫内传播、产时传播和产后传播。对于后两种传播方式运用乙肝疫苗和乙肝免疫球蛋白已基本可以阻断,而由宫内传播导致宫内感染的研究已成为控制乙肝流行的关键问题。宫内感染必须突破胎盘屏障而形成。胎盘涉及宫内传播的主要有3层细胞,从母体面至胎儿面,依次为滋养层细胞、间质细胞、微血管内皮细胞。滋养层细胞是胎盘屏障的第一道防线。本研究采用血清直接感染法进行原代培养人绒毛膜滋养层细胞的HBV感染,并用免疫双染及透射电镜观察滋养层细胞感染HBV后的特性,旨在为进一步研究HBV的

基金项目:国家自然科学基金(30230320,30400479)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230320, 30400479)

作者简介:李俊男(1970-),女,湖北省竹溪县人,博士研究生,医师,主要从事围生期感染性疾病方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68773145

通讯作者:王宇明,电话:(023)68754141,E-mail:wym417@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-03-23;修回日期:2007-04-24

宫内传播机制提供相关的实验基础。

1　材料与方法

1.1　绒毛标本来源

来自本科门诊无菌留取妊娠 8～10 周、发育正常、自愿流产的刮宫绒毛 15～20 g，置于预冷的生理盐水中，保存于 4 ℃冰箱或立即行细胞培养。

1.2　主要试剂

高糖型 DMEM 细胞培养基干粉（美国 Gibco 公司），胰蛋白酶、胶原酶Ⅰ、Dispase 酶Ⅱ、胎牛血清（美国 Hyclone 公司），DNA 酶Ⅰ（华美生物工程公司产品），Percoll 分离液（美国 Pharmacia 公司），抗 CK18 单抗（美国 Santa Cruz），抗 HBcAg 单抗（北京中杉金桥生物技术有限公司），双染试剂盒（福州迈新生物技术有限公司），HBsAg、HBeAg 诊断试剂盒（英科新创科技有限公司），乙型肝炎病毒核酸扩增荧光定量试剂盒（上海克隆生物高技术有限公司）等。

1.3　细胞培养

1.3.1　人绒毛膜滋养层细胞的原代培养　　参考文献[1]进行。

1.3.2　L02 细胞的分离、培养　　参考文献[2]进行。

1.3.3　HepG2.2.15 细胞株的复苏与培养　　参考文献[3]进行。

1.4　HBV 体外感染试验

细胞接种于 12 孔（部分预先置有盖玻片）培养板，调整细胞接种密度为 10^5/ml，当细胞融合至 60% ～70% 时，首先用新鲜培养基进行换液处理，先留取感染前细胞上清，然后每孔加入 800 μl 新鲜高糖型 DMEM 培养基，再加入 200 μl HBV 感染血清。同时对照孔加 200 μl 的胎牛血清为阴性对照[4]。37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱孵育培养，24 h 后倒置相差显微镜下观察，并进行第 1 次换液，弃去感染血清，用无菌的 0.01 mol/L PBS 或 DMEM 培养基充分洗涤 3 次后加入新鲜的培养基 800 μl 及 200 μl 的胎牛血清，留取第 3 次洗涤液待检。以后每 24 小时换液 1 次，并留取培养上清待检。留取感染前后的培养上清及洗涤液均保存于 -20 ℃一并送检，进行 HBsAg、HBeAg 的定性检测及 HBV DNA 的荧光定量检测[5,6]。

1.5　培养上清的 HBsAg、HBeAg 定性及 HBV DNA 实时荧光定量检测

ELISA 法定性检测培养上清中 HBsAg、HBeAg，具体步骤按操作说明书进行。参考文献[7]对培养上清中的 HBV DNA 实时荧光定量检测。

1.6　感染后的滋养层细胞行免疫双染

采用免疫双染试剂盒，自 12 孔培养板无菌挑取感染 HBV 后 72 h 滋养层细胞的细胞爬片（8 mm×8 mm），用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后，再用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次后行双染。按试剂盒说明步骤进行双染。

1.7　感染后滋养层细胞的透射电镜观察

感染 HBV 后第 19 天的滋养层细胞消化后收集，用 2.5% 戊二醛固定液固定，送本校电镜室制样，观察。

2　结果

2.1　培养细胞感染前后形态结构观察

原代培养刚消化接种的滋养层细胞呈球形，以单个核细胞为主，接种 2～3 h 后开始贴壁，24 h 全部贴壁，在细胞较稀疏时呈多角形，有突起，卵圆形，形态多样（图 1）。感染组与阴性对照组细胞光镜下观察未见明显不同，在 L02 细胞也是如此（图 2）。透射电镜下，未感染 HBV 的原代培养滋养层细胞细胞质中见较多的脂滴，核大，核内异染色质少，染色浅（图 3）；感染 HBV 后的滋养层细胞超微结构发生了一些变化，主要是溶酶体大量增生，出现空泡状结构，并可观察到病毒样颗粒（图 4），有明确的外膜，直径 40 nm 左右，主要定位于细胞核周。

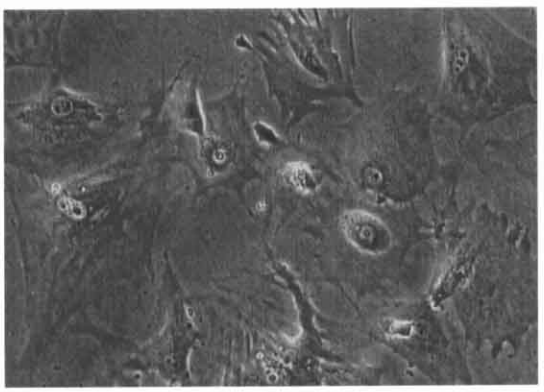


图 1　原代培养第 10 天的滋养层细胞　（倒置相差显微镜×200）

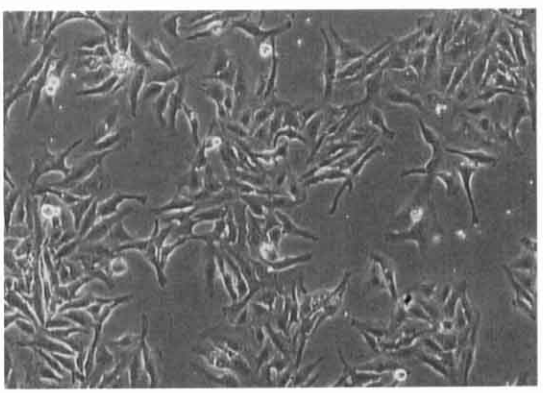


图 2　传代培养第 2 天的 L02 细胞　（倒置相差显微镜×100）

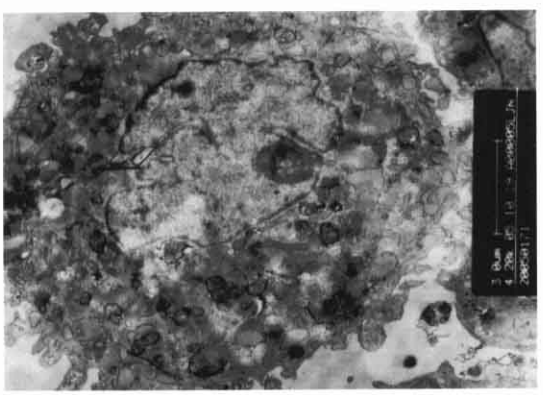


图 3　原代培养滋养层细胞透射电镜观察　（×4 200）

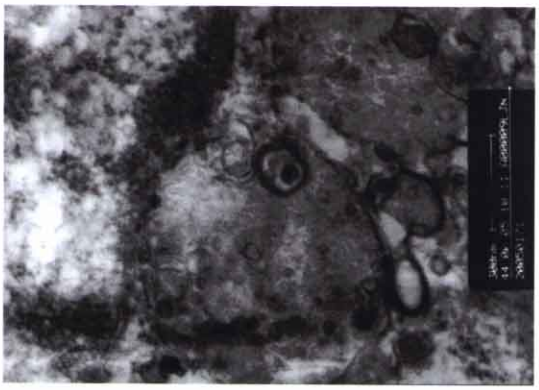


图4 感染 HBV 后第 19 天原代培养滋养层细胞透射电镜观察 (×4 400)

2.2 培养上清中的 HBV DNA 及 HBsAg、HBeAg 的检测结果

原代培养的滋养层细胞感染 HBV 后释放至培养上清中的 HBV DNA 于感染后 48～72 h 达高峰，而 L02 细胞则于感染后 12～24 h 达高峰(图 5)，HepG2.2.15 细胞株的上清中检测的 HBV DNA 则一直攀升(图 6)。

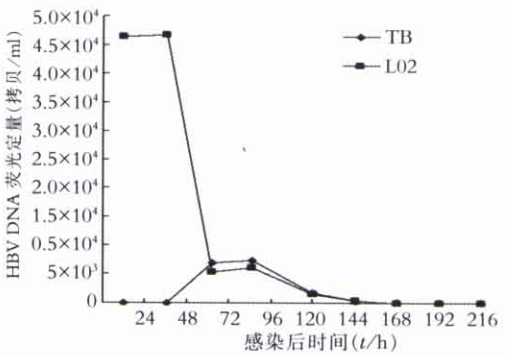


图5 L02 细胞及滋养层细胞感染 HBV 后上清中 HBV DNA 的变化

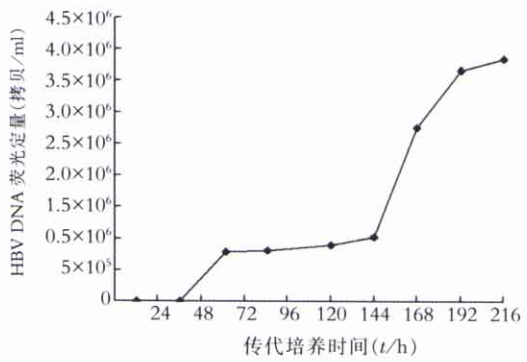


图6 HepG2.2.15 细胞传代培养上清中 HBV DNA 的变化

原代培养的滋养层细胞于感染后 48～72 h 其上清中的 HBV DNA 量达 3 个拷贝数(6.958×10^3 拷贝/ml)，维持到第 5 天(1.717×10^3 拷贝/ml)，其后开始下降，于感染后第 8 天结果为 HBV DNA 荧光定量检测范围的下限 2 个拷贝数(本实验所用试剂盒有效定量范围 4.2×10^2～4.2×10^8 拷贝/ml)，但其对应感染后第 8 天的细胞经消化后行细胞内 HBV DNA PCR 扩增，对扩增产物行荧光定量则为 4 个拷贝数(2.388×10^4 拷贝/ml)，上清中 HBV DNA 较细胞内低 2 个拷贝数。于第 15、19 天检测均为阴性，但第 19 天的细胞内经透射电镜观察仍有 HBV 病毒样颗粒(图 4)。

L02 细胞于感染 HBV 后 12～24 h 上清中的 HBV DNA 量达 4 个拷贝数(4.636×10^4 拷贝/ml)，于感染后第 8 天仍维持 3 个拷贝数。

HepG2.2.15 细胞株分泌于上清的 HBV DNA 则随着培养时间的延长，一直递增，于培养第 13 天高达 8 个拷贝数(2.317×10^8 拷贝/ml)。

当 HBV DNA 为 3 个拷贝数或以上时 HBsAg 的定性结果则均为阳性，当 HBV DNA 为 5 个拷贝数以上时 HBeAg 才为阳性，在本实验中感染后的滋养层细胞与 L02 细胞的上清中 HBeAg 均未检测出阳性，而 HepG2.2.15 细胞的上清则较容易检测出 HBeAg 阳性结果。

HBV 感染前细胞上清、感染后洗涤液及阴性对照组培养上清中，HBV DNA 定量及 HBsAg、HBeAg 定性结果均为阴性。

2.3 免疫双染结果

两种一抗顺序依次为抗 HBcAg、抗 CK18，HBcAg 阳性着色于细胞核，呈蓝紫色，CK18 阳性着色于细胞质，呈红色(图 7)，双染结果证明所染细胞是滋养层细胞，而且被感染上 HBV。

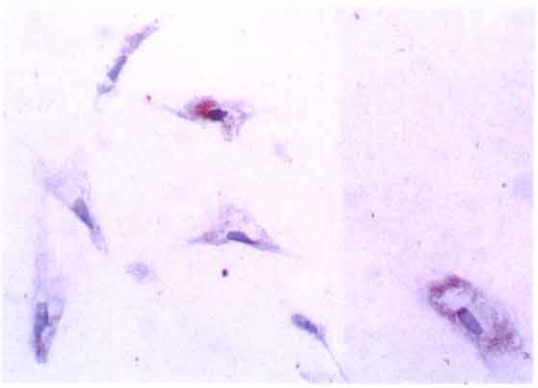


图7 感染 HBV 后 72 h 的滋养层细胞免疫双染结果 (×400)

3 讨论

HBV 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[8]。直接感染法是 HBV 感染细胞的主要方法，也是最接近自然状态，模拟了滋养层细胞浸泡于含有病毒的母血中的密切接触生理过程，即把乙型肝炎患者血清直接加到培养细胞中感染，37 ℃孵育不同时间后，更换新鲜培养液，在不同时相检测细胞及其培养上清中的 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 等感染性指标，实时荧光定量 PCR 用于直接检测培养上清及细胞中 HBV DNA，可初步反映 HBV 在感染细胞中的复制情况，该方法特异性及敏感性好，但培养液中残留的 HBV 感染

物可能会出现假阳性结果。

本研究采用血清直接感染法，对原代培养的滋养层细胞进行感染试验，经定性（HBsAg、HBeAg 及免疫双染）、实时荧光定量 PCR 及形态学观察（透射电镜）多重检测，证明了试验的可靠性。结果表明，感染前及感染后洗涤液及对照组中 HBV DNA 检测均为阴性，排除了标本来源及 HBV 感染试验时培养上清中残留 HBV 感染物污染的可能[1]。

原代培养的滋养层细胞感染 HBV 后释放至培养上清中的 HBV DNA 于感染后 48 ~ 72 h 达高峰，而 L02 细胞则与感染后 12 ~ 24 h 达高峰。毕竟滋养层细胞并非 HBV 的靶细胞，故在接受 HBV 的过程中并不如肝细胞易感，尽管二者均为上皮细胞，理论上来源于同一胚层——外胚层，但因处不同的微环境则出现了各自的特性。从二者感染 HBV 后的趋势看，滋养层细胞接受 HBV 较 L02 细胞不易感，接受后释放于上清中的病毒量较 L02 细胞少，而且消退的快，但并不能由此推断滋养层细胞感染 HBV 是一过性的。实验中观察到于感染后第 19 天透射电镜观察其内仍有病毒残留，这可能为病毒在滋养层细胞内蓄积，为最终宫内感染的隐患所在。

传代培养 HepG2.2.15 上清中的 HBV DNA 则随着培养时间的延长，一直攀升。HepG2.2.15 细胞株是转染了 HBV 的肝癌细胞株[8]，其释放 HBV 为永久性的，这也提示若滋养层细胞或正常的肝细胞能永无休止释放 HBV 的话，那么一定有 HBV 基因整合于该细胞的基因组中。

本研究采用透射电镜观察 HBV 感染后滋养层细胞的超微结构发生明显改变，主要表现为溶酶体大量增生，出现空泡状结构，并可观察到病毒样颗粒（图 4），有明确的外膜，直径 40 nm 左右，主要定位于细胞核周。这些改变为 HBV 感染滋养层细胞提供了形态学依据，提示 HBV 可以感染滋养层细胞，并有可能因此导致 HBV 的宫内传播，但 HBV 感染后滋养层细胞中的病毒样颗粒尚有待免疫电镜、原位杂交等方法进一步证实，HBV 能否在滋养层细胞中复制并产生有感染性的病毒颗粒并释放于胎儿面尚在后续的研究中。

参考文献：

[1] 张　琴，李俊男，陈　黎，等. 人绒毛膜滋养层细胞的分离培养及 DC-SIGN 的表达研究[J]. 中华围产医学杂志，2006，9(4)：245 - 247.

[2] 林　沪，毛　青，王宇明，等. L02 细胞在 2-乙酰氨基芴处理大鼠肝中的增殖[J]. 世界华人消化杂志，2006，14(23)：2281 - 2287.

[3] 于俊岩，兰　林，王宇明. 用 PCA 方法选择 HBV DNA 多聚酶 TP 区 VH 抗体[J]. 世界华人消化杂志，2005，13(20)：2427 - 2430.

[4] Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Desoye G, *et al*. Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human Cytomegalovirus[J]. J Virol, 1998, 72(9): 7598 - 7602.

[5] 程勇前，聂青和，周永兴，等. 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[J]. 世界华人消化杂志，2003，11(2)：151 - 156.

[6] 李富军，王雪萍，徐德忠，等. TNFα 对 HBV 体外感染人绒毛膜癌 JEG Ⅲ细胞的促进作用[J]. 世界华人消化杂志，2005，13(1)：31 - 34.

[7] 黄燕萍，王宇明. 荧光定量 PCR 与普通 PCR 检测 HBV DNA 的对照分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(8)：992 - 993.

[8] Spector S A. Mother-to-infant transmission of HIV-1: the placenta fights back[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 267 - 269.

（编辑　王　红）

（上接 1405 页）

形，各种畸形以不同形式组合，每例均为独特的异常。病例 1 中胎儿严重的颅面部及四肢多发畸形，临床上尚属罕见。胎儿畸形严重程度与羊膜早破发生时间及受累的部位有关，时间越早、畸形越严重[2]。孕早期羊膜破裂可引起颅面畸形，而晚期羊膜破裂可造成各种各样的肢体残缺。此 2 例胎儿均有严重的颅面畸形，推测其羊膜破裂时间较早。

但 ABS 早孕期不易诊断。其产前诊断主要手段为超声诊断[2]。超声下可在羊水中见到漂浮的带状回声，羊膜带粘连处的胎儿部分可出现畸形。如果检查者仅注意到胎儿畸形，而忽略了羊水中的带状结构，则会造成 ABS 的漏诊。另外，羊水中的带状结构来源不同，形态结构也各异，并非都是羊膜带。如仅见亮光带而不伴胎儿畸形，或光带游离未附着于胎体，则不能确定为 ABS。如高度怀疑为羊膜带，应严密随诊。

妊娠期 ABS 的预后是多种多样的。由于胎儿发生畸形的部位、程度不同，其处理也不尽相同。如为小的粘连带及手指、脚趾的淋巴水肿则预后较好；如存在四肢截肢畸形则较为严重；而多发畸形往往会致死。近年来，有较多报道应用胎儿镜松解肢体羊膜带后该肢体可恢复正常发育[3-7]，提示只要能及早诊断，某些 ABS 胎儿畸形有可能通过宫内手术加以矫正。

ABS 重在预防，应提醒孕妇做好围生期保健，尽量防止宫内感染，如有外伤或医学诊断羊膜腔穿刺后应定期进行超声检查。如能在妊娠中期常规进行超生检查，并加强对此病的识别，早做诊断、处理，将对提高围生儿质量有重要意义。

关键词：羊膜带综合征；胎儿畸形
中图法分类号：R714.53　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Muraskas J K, McDonnell J F, Chudik B J, *et al*. Amniotic band syndrome with significant orofacial clefts and disruptions and distortions of craniofacial structures[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(4): 635 - 638.

[2] Seruibles L, Verspyck E, Patrier S, *et al*. Amniotic band syndrome: pathogenesis, prenatal diagnosis and neonatal management[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2003, 32(8 Pt 1): 693 - 704.

[3] Keswani S G, Johnson M P, Adzick N S, *et al*. In utero limb salvage: fetoscopic release of amniotic bands for threatened limb amputation[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(6): 848 - 851.

（编辑　邓强庭）