DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.028
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
74 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0074-04

HBV体外感染人胎肝细胞的鉴定方法研究

王 方,王宇明,汤 勃,刘 俊,刘国栋,王小红 (第三军医大学西南医院全军传染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过HBV体外感染22周龄原代培养人胎肝细胞,比较常用检测指标的敏感性和特异性。方法 利用HBV阳性血清感染体外培养的原代人胎肝细胞。应用ELISA法检测培养上清中的HBsAg和HBeAg,免疫组化法检测细胞核中的HBcAg,荧光定量PCR法检测上清和细胞中HBV DNA,巢式PCR法检测细胞中cccDNA。结果 胎肝细胞核中的HBcAg于感染后第2天出现阳性,培养上清和细胞中HBV DNA定量自第4天起检出,上清中HBsAg和HBeAg于第5~6天出现阳性;细胞中HBV cccDNA自第8~9天出现阳性。结论 HBV在原代培养人22周龄的胎肝细胞中能够稳定复制和表达,各种检测指标的灵敏性和特异性不一,免疫组化法检测细胞核中的HBcAg敏感性好,特异性可。

关键词:乙型肝炎病毒;HBV感染;人胎肝细胞;细胞培养
中图法分类号:R322.47;R373.21;R446 文献标识码:A

Assays for HBV infection in primary human fetal hepatocytes cultured *in vitro*

WANG Fang, WANG Yu-ming, TANG Bo, LIU Jun, LIU Guo-dong, WANG Xiao-hong (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To infect primary cultured human fetal hepatocytes with hepatitis B virus (HBV) *in vitro* in order to compare the sensitivity and specificity of the conventional assays for infection. Methods The primary cultured 22-week human fetal hepatocytes were incubated with HBV-positive serum *in vitro*. HBsAg and HBeAg in the supernatant were detected by ELISA, HBcAg in nuclei by immunohistochemistry, HBV DNA in supernatant and cells by quantitative fluorescence PCR, and cccDNA in cultured cells by nest PCR. Results HBcAg in nuclei were positive on day 2 after incubation. HBV DNA in supernatants and cells was detected on day 4. HBsAg and HBeAg in supernatants were positive on day 5—6, and cccDNA was positive in cells on day 8—9. Conclusion Stable replication and expression of HBV are observed in HBV infected 22-week human fetal hepatocytes. The sensitivity and specificity of the assays are different. Immunohistochemistry for the detection of HBcAg in nuclei is sensitive and specific, and can be regarded as an easy and convenient method for the detection of HBV infection at the early stage.

Key words: hepatitis B virus; HBV infection; human fetal hepatocytes; cell culture

乙型肝炎是目前广泛流行于世界的传染病。据推测全球HBV携带者数量超过3.5亿,其中5%发生肝癌,每年死于HBV相关性疾病的患者达1 000~2 000万。到目前为止,乙型肝炎的分子发病机制尚不明确,在治疗上也未获得突破性进展。目前控制乙型肝炎流行的最主要手段是用乙型肝炎疫苗进行预防接种。随着乙型肝炎疫苗的普遍使用,乙型肝炎的出生后感染已基本得到控制,而宫内感染,即HBV经胎盘传播给胎儿引起的感染,新生儿出生后用乙肝疫苗和特异性高效价免疫球蛋白不能阻断其传播[1],因而成为我们国家乙型肝炎传播的主要途径。近几十年来,关于HBV宫内感染发生率的报道较多,然而对其具体机制研究较少[2~5]。本实验尝试HBV感染离体培养的胎肝细胞,比较各种检测指标的敏感性和特异性,以期为进一步研究宫内感染的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 人胎肝细胞

取血清HBsAg阴性母亲人工流产的22周龄胎儿肝脏(沙坪坝区妇幼保健院提供),经体外两步灌流法分离肝细胞。台盼蓝染色确定肝细胞存活率。

1.2 HBV感染血清

HBV感染血清取自本科慢性乙型肝炎患者,ELISA检测

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170847)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170847)
作者简介:王 方(1969-),女,甘肃省武威市人,博士研究生,主治医师,主要从事乙型肝炎发病机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754289
收稿日期:2003-03-30;修回日期:2003-07-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗 HBc(+), 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 为 5×10^8 拷贝/ml 以上, 甲、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒标志均为阴性。

1.3　主要试剂

胶原酶为 Sigma 公司生产, 胰酶和 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自 HIGHCLONE 公司, ELISA 试剂为上海科华公司产品, 免疫组化试剂盒为福州迈新公司产品, PCR 引物由上海生工合成, Taq 酶为 Promega 公司产品, 荧光定量 PCR 试剂盒购自上海复兴公司。

1.4　实验方法

采用王宇明等[6]设计的体外两步灌注法首先分离出总肝脏细胞悬液。将肝组织置于培养皿中, 用37 ℃含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的前灌流液自血管中反复灌注, 至大部分肝脏呈现灰白色, 用 37 ℃、0.05%的胶原酶(含 0.1%分散酶)反复注入血管, 剪碎肝组织, 37 ℃震荡, 消化 30 min, 3 层无菌沙布过滤, 50× g 离心 3 min, 连续 3 次, 离心纯化肝细胞。将分离的人胎肝细胞用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液调整细胞浓度为 2×10^5/ml, 接种于未包被的 9.6 cm^2 的 6 孔塑料培养板内, 每孔含培养液 2 ml(即每孔含细胞数为 4×10^5 个)。内加 HEPES、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素, 置于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱内培养。24 h 后更换培养液, 每孔内加 100 μl HBV DNA 阳性的患者血清, HBV 病毒颗粒与细胞数量比约为 100∶1。37 ℃孵育培养 16 h(过夜)后, 弃去上清液, 用 pH 约 7.4 的 PBS 液冲洗 6 遍(第 6 遍洗液留检)。然后用含 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养, 冲洗当天作为感染后 0 d。HBV 感染后每 24 h 留上清检测 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA, 感染后第 1~10 天每 24 h 用含 0.05%胰酶、0.03%EDTA 的消化液消化收集 2 孔细胞, 多聚甲醛固定 1 孔后用做免疫组化, −70 ℃冻存 1 孔留待提取 DNA。不加感染血清的细胞作为空白对照。

1.5　检测指标及方法

培养人胎肝细胞于培养后每隔 24 h 以倒置生物相差显微镜观察细胞形态变化过程及贴壁生长情况。用 ELISA 法检测上清液中 HBsAg 和 HBeAg。免疫组化法检测细胞核中的 HBcAg。用荧光定量 PCR 法检测培养上清液 HBV DNA。细胞中 HBV DNA 的提取用经典的蛋白酶 K 消化, 酚、氯仿、异戊醇抽提, 乙醇沉淀法。细胞中 HBV DNA 的检测采用荧光定量 PCR 法, 细胞中 HBV cccDNA 检测采用巢式 PCR 法[7]。巢式 PCR 外缘引物的设计跨越了 HBV 基因组的缺口。绿豆芽核酸酶(Mung bean nuclease)在低浓度时对单链 DNA 敏感, 而对双链 DNA 不敏感, 故用该酶鉴定 cccDNA。不加感染血清的细胞作为空白对照, HepG2.2.15 细胞做为阳性对照。

2　结果

2.1　培养人胎肝细胞形态的动态变化

分离培养的人胎肝细胞生长良好, 肝细胞体积大, 形态为扁平不规则多角形, 细胞核清晰可见, 肝细胞增殖活跃。实验组和空白对照组人胎肝细胞在培养后 14 d 内能维持正常的形态结构, 但自第 7 天起部分胎肝细胞失去正常形态, 14 d 后胎肝细胞大部分死亡, 代之以其它杂细胞过度生长。

2.2　HBV 在人胎肝细胞中的复制表达

2.2.1　ELISA 检测上清中 HBsAg 和 HBeAg 留存最后一次洗涤液经荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 呈阴性(结果未列出)。感染后所有留存系列上清液中用 ELISA 法检测到 HBsAg 自第 1 天出现阳性, 第 2 天转阴, 随后 HBsAg 的 S/CO 值逐渐升高, 第 5~6 天再次出现阳性, 之后又转阴, S/CO 值逐渐下降(图 1), lg S/CO> 1 时定性为阳性)。上清中 HBeAg 的变化规律和 HBsAg 基本相同。

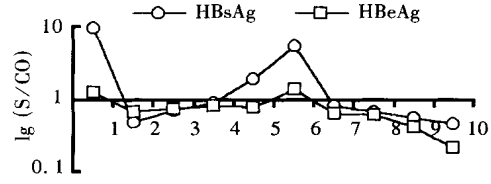
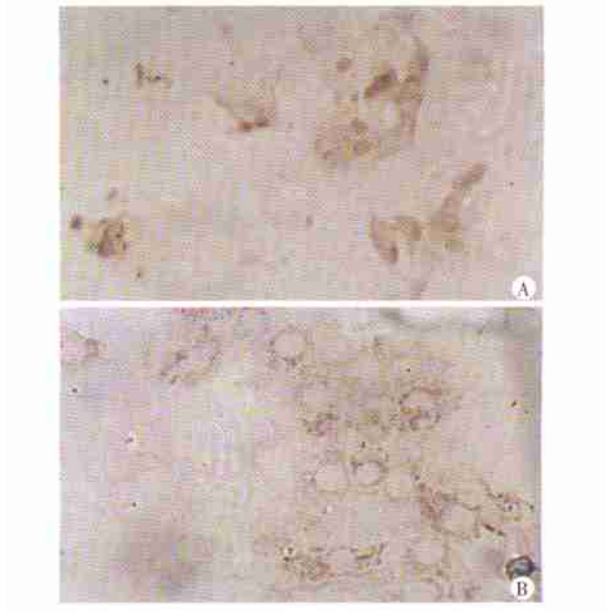


图 1　ELISA 法检测上清中 HBs Ag 和 HBe Ag

Fig 1　HBsAg and HBeAg in supernatant detected by ELISA

2.2.2　免疫组化法检测细胞核中的 HBcAg 第 1 天时可见细胞间质中存在较多阳性的棕褐色颗粒, 但细胞核内未见明显阳性颗粒, 自第 2 天起细胞核内出现阳性颗粒, 阳性率约 15%(图 2), 主要表现为细胞核着色, 部分胞浆也着色, 感染后 1~10 d 均可检出, 但随感染时间的延长感染的细胞数量未见明显增加。



A: Two days after infection; B: Negtive control

图 2　免疫组化法检测细胞核中 HBcAg 的表达　(S-P×200)

Fig 2　HBcAg in nuclei detected by immunohistochemistry　(S-P×200)

2.2.3　荧光定量 PCR 法检测培养上清中 HBV DNA 第 1 天可以检出, 第 2 日消失, 第 4 天起再次检出, 拷贝数逐渐升高, 第 7 天开始下降, 第 10 天消失, 见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

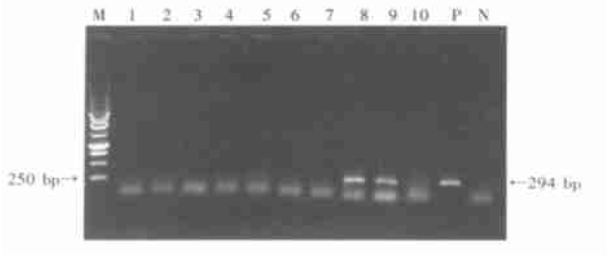
表 1 荧光定量 PCR 检测上清和细胞中的 HBV DNA

Tab 1 HBV DNA in supernatant and cells quantified by quantitative fluorescence PCR

Infection day	HBV DNA(copy/ml)	
	In supernatant	In cells
1	4.231×10^{4}	0
2	0	0
3	0	0
4	3.459×10^{3}	9.991×10^{2}
5	2.312×10^{4}	1.636×10^{4}
6	7.117×10^{4}	4.757×10^{3}
7	1.983×10^{4}	1.312×10^{4}
8	6.233×10^{3}	1.596×10^{4}
9	1.573×10^{3}	4.160×10^{5}
10	0	4.551×10^{2}

2.2.4 荧光定量 PCR 法检测培养细胞中 HBV DNA 自第 4 天起可以检出，拷贝数逐渐增加，第 9 天达高峰，第 10 天开始下降，见表 1。

2.2.5 巢式 PCR 法检测细胞中 HBV cccDNA 自第 8 天起出现阳性，第 10 天转阴(图 3)。绿豆芽核酸酶作用于模板后不影响 cccDNA 的检出。



M: Marker; 1—10: Infection days; P: Positive control; N: Negative control; 294 bp: ccc DNA

图 3 巢式 PCR 法检测胎肝细胞内 HBV cccDNA

Fig 3 HBV cccDNA in fetal hepatocytes detected by nest PCR

3 讨论

目前国内外有关乙型肝炎宫内感染机制的研究较少，且均为在体研究。但在体的研究受到诸多的限制，无法从细胞、分子水平上更深入地研究 HBV 宫内感染发生的机制。为此，我们试图通过 HBV 离体感染胎肝细胞以期为进一步深入研究宫内感染的分子机制奠定基础。

HBV 体外感染肝细胞尤其是成人肝细胞培养系统的建立，国内外有较多报道[8~12]。为了使 HBV 在肝细胞内能稳定复制和表达，Rumin 等[12] 设计了一种条件培养液，添加各种激素、细胞因子和微量元素，能够模拟肝细胞生长的环境，使原代培养的肝细胞维持良好的分化和增殖功能达 50 d 以上。本研究在不添加任何维持和促进肝细胞生长的特异因子的条件下成功地培养人胎肝细胞达 14 d 以上。

既往报道的 HBV 感染肝细胞的文献中鉴定 HBV 是否感染成功的方法以 ELISA 法检测上清中 HBsAg 和 HBeAg、PCR 法及 Southern 和 Northern 印记检测细胞中的 HBV 复制中间体为多见，但 Southern 和 Northern 印记操作步骤繁琐，且存在同位素污染的问题，故在鉴定 HBV 感染时选择一种敏感、特异且简便易行的方法是必要的。本研究显示，胎肝细胞分离培养 24 h 后用含 HBV 病毒的血清感染，免疫组化检测细胞核中 HBcAg 自感染后第 2 天起出现阳性，阳性率约 15%，随感染时间延长感染的细胞数量无明显增加，和文献[9] 报道一致；荧光定量检测细胞和上清中 HBV DNA 自第 4 天起可以检出；感染后第 5~6 天用 ELISA 法检出可检出培养上清中的 HBsAg，HBeAg 的分泌与 HBsAg 基本一致，与国外文献[8~10] 报道的结果一致；巢式 PCR 法肝细胞中 cccDNA 自第 8~9 天出现阳性，至第 10 天转阴。

本实验显示，HBV 感染胎肝细胞后第 1 天的上清液中也检出了 HBsAg 和 HBeAg 及 HBV DNA，第 2 天转阴，说明虽然经过 6 遍冲洗，最后一遍洗液中 HBV DNA 的定量检测也是阴性，但胎肝细胞的表面仍粘附了少量的病毒颗粒，经过培养后逐渐释放而出现感染后第 1 天的上清液中 HBsAg 和 HBeAg 及 HBV DNA 阳性，但并非已感染的结果，这和文献[7, 9, 10] 报道是一致的。随时间延长胎肝细胞感染性丧失，分析其可能原因是由于培养早期细胞增殖较快，因细胞有接触抑制特性，细胞增殖到一定程度，增殖速度变慢，最后完全停止增殖，维持一定时间后，细胞开始死亡、脱落，病毒感染的细胞数量减少而检测不出来。本实验中 24 周龄的胎儿培养后当天即可以感染上 HBV，这和 Takahiro 等[9] 报道的 24 周龄的胎儿肝细胞 0~4 d 无感染性不同，而感染后持续的时间也没有 Takahiro 等报道的 16 d 长，原因可能和本实验中没有添加 DMSO、生长因子等维持胎肝细胞正常形态和促进胎肝细胞分泌病毒颗粒的物质有关。

本实验显示，不同方法检测 HBV 感染胎肝细胞的敏感性和特异性不一，免疫组化较其它方法敏感，有利于感染的早期发现，而空白对照组染色始终为阴性，可见其特异性也可，可以做为一种简便易行的鉴定早期感染的方法；细胞中 HBV DNA 的定量检出的时间相对也较早，特异性可，可以和免疫组化结合进行；上清中 HBV DNA 的定量检出的时间相对较早，但存在假阳性，特异性差，ELISA 法检测上清中 HBsAg 和 HBeAg 也存在同样的缺陷；而感染的肝细胞中 cccDNA 可能因为量较低，检出时间晚，敏感性差，但经过绿豆芽核酸酶鉴定，特异性高。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本研究认为 HBV 在人胎肝细胞中能稳定复制表达。免疫组化检测细胞核中 HBcAg 出现的时间最早，特异性可，可以做为一种敏感且简便易行的鉴定早期感染的方法。几种方法联用可以提高感染检出的敏感性和特异性。HBV 体外感染人胎肝细胞的研究虽属一初步研究，但却为进一步研究 HBV 宫内感染的分子机制奠定了基础。

参考文献：

[1] 孟金来. HBV 母婴传播致新生儿免疫接种失败的原因[J]. 国外医学妇幼保健分册, 2001, 12(2): 73－76.
[2] Ohto H, Lin H H, Kawana T, *et al*. Intrauterine transmission of hepatitis B virus is closely related to placental leakage[J]. J Med Virol, 1987, 21(1): 1－6.
[3] Xu D Z, Yan YP, Zou S, *et al*. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(4): 981－987.
[4] Xu D Z, Yan Y P, Choi B C, *et al*. Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study[J]. J Med Virol, 2002, 67(1): 20－26.
[5] 刘颖琳, 邝健全, 张 睿, 等. 胎儿感染乙型肝炎病毒的临床研究[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(8): 465－468.
[6] 王宇明, 陈国致, 董家鸿, 等. 分离肝细胞的一种体外灌流法[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(1): 175－178.
[7] Lu X, Block T M, Gerlich W H. Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line[J]. J Virol, 1996, 70(4): 2277－2285.
[8] Mabit H, Vons C, Dubanchet S, *et al*. Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies[J]. J Hepatol, 1996, 24(4): 403－412.
[9] Galle P R, Hagelstein J, Kommerell B, *et al*. An *in vitro* system for infection with hepatitis B *virus* that uses primary human fetal hepatocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(6): 1875－1879.
[10] Ochiya T, Tsurimoto T, Ueda K, *et al*. *In vitro* experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus[J]. Gastroenterology, 1994, 106(3): 664－673.
[11] 蒋业贵, 李奇芬, 毛 青, 等. HDV/HBV 体外感染原代培养人胎肝细胞的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 224－226.
[12] Rumin S, Gripon P, Le Seyec J, *et al*. Long term productive episomal hepatitis B virus replication in primary cultures of adult human hepatocytes infected *in vitro*[J]. J Virol Hepati, 1996, 3(5): 227－238.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2004)01-0077-01

个案与短篇

庆大霉素脊髓鞘内注射致下肢功能障碍 1 例

A case report of functional disturbance of lower limb caused by intrathecal injection of gentamycin

姚 一，吴家阳，江建东，欧阳玲 （解放军第 174 医院神经外科，厦门 361003）

患者，男，35 岁，因重型颅脑损伤伴脑积水脑室腹腔分流术后感染入院。脑脊液 RBC 10×10^6/L，WBC 120×10^6/L，Pro 1.73 g/L，Glu 2.2 mmol/L，Cl^- 107 mmol/L，培养鉴定为金黄色葡萄球菌，CT 见脑室系统明显扩大。经拔除腹腔段分流管，脑室段外置引流，意识逐渐清醒，能言语，左侧肢体肌力Ⅴ$^-$级，右侧Ⅳ级，10 d 后拔除脑室段分流管，改为腰穿置管持续引流，因脑脊液 WBC 和蛋白仍高，故鞘内注射生理盐水 20 ml＋庆大霉素 2 万 U[1]。4 h 后尿潴留，双下肢能活动，7 h 脐下浅、深感觉消失，双下肢肌张力低，肌力 0 级。考虑系庆大霉素毒性反应所致，经置管注射生理盐水作 CSF 置换，并静脉注射地塞米松 30 mg、纳络酮及改善微循环药物。9 h 后查体：患者感觉平面降到双侧腹股沟，但双下肢肌张力和肌力仍无改善。于 12 h 再次作脑脊液置换并持续引流，术毕双侧下肢肌张力增加，但肌力和感觉平面无进一步改善。次日检查双下肢浅、深感觉恢复，左下肢肌力恢复到Ⅳ级，右下肢Ⅱ级，继续上述处理，肌力于第 4 天恢复到原水平。

讨论

庆大霉素致瘫可能机制为庆大霉素膜毒理效应和局部的刺激作用[2]，故经作脑脊液置换，降低局部庆大霉素浓度，祛除损害因子，全身使用激素、纳络酮和改善微循环药物等处理后，改善脊髓局部微循环和细胞能量代谢，增加神经元膜稳定性，减轻继发性损害的发生、发展，脊髓功能得以恢复。

关键词：庆大霉素；鞘内注射
中图法分类号：R978.12 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈 覃，施 辉，陈 军，等. 脑脊液置换法在开颅术后严重颅内感染中的应用[J]. 中国神经精神疾病杂志，1997，23(6)：354－356.
[2] 黄巨恩，徐志文，陈 纡，等. 庆大霉素毒性作用及防治新进展[J]. 医学综述，2002，8(9)：555－557.

（编辑 张大春）

作者简介：姚 一（1966－），男，贵州省息烽县人，硕士，主治医师。电话：(0592)2535710

收稿日期：2002-05-26；修回日期：2003-09-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net