DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.030
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0069-04

论著

多抗原肽免疫血清体外阻断丙型肝炎病毒感染树鼩肝细胞的初步研究

闵 峰[1],郝 飞[1],刘 冰[2],刘国栋[1],王宇明[1],宋志强[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]解放军第520医院传染科,绵阳 621000)

提 要:目的 探讨多抗原肽(MAP)免疫血清在体外能否阻断丙型肝炎病毒(HCV)感染树鼩肝细胞,为研制HCV分子疫苗提供实验基础。方法 用兔抗MAP血清分别与两份感染血清按一定比例混合后接种于原代培养的树鼩肝细胞中,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组化、原位杂交分别检测细胞内或上清中正负链RNA,细胞内HCV NS3抗原的表达情况,以及原位检测细胞内HCV负链RNA。结果 1份HCV RNA阳性血清与兔抗MAP血清按1∶1混合后接种于培养的树鼩肝细胞中,细胞内可检出HCV正负链RNA,并有HCV NS3抗原的表达,而另外1份HCV RNA阳性血清与兔抗MAP血清按1∶1、5∶1、10∶1混合后接种于培养的树鼩肝细胞中,细胞内未检测出HCV正负链RNA,也未见特异性抗原表达。结论 兔抗MAP血清在体外能部分阻断HCV感染。

关键词:丙型肝炎病毒;细胞培养;多抗原肽;免疫血清;体外阻断
中图法分类号:R322.47;R373.21;R392.7 文献标识码:A

Hyperimmune rabbit serum against multiple antigen peptides corresponding to the hypervariable region 1 of HCV prevents viral infection in primary cultured adult tupaia hepatocytes

MIN Feng, HAO Fei, LIU Bing, LIU Guo-dong, WANG Yu-ming, SONG Zhi-qiang (Department of infectious diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether an anti-multiple antigen peptide (MAP) rabbit serum against hypervariable region 1 of HCV can block viral infection in cell culture. Methods Anti-MAP rabbit sera were respectively mixed in some series of proportions with the first and second samples of HCV RNA positive serum obtained from same patient but at different time. The liver cells of tupaiae were isolated and cultured in the medium with or without positive serum. The cells and supernatant were harvested at various time points during the culturing periods. Both the plus and minus strands of HCV RNA in infected cells or supernatant were examined with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The HCV NS_3 antigens in infected cells were detected with the monoclonal antibodies of them by using immunohistochemical assay. The minus strand of HCV RNA in infected cells was localized with *in situ* hybridization. Results When the anti-MAP rabbit serum were mixed with the second infectious serum, both the plus and minus strands of HCV RNA were detected in culture cells, and the positive signals of NS_3 antigens were found in the cytoplasm of infected cells. But when the anti-MAP rabbit serum was added into the first infectious serum (1∶1, 5∶1 and 10∶1), no strand of HCV RNA was detected in culture cells and no positive signals of NS_3 antigens in the cytoplasm. Conclusion The anti-MAP rabbit serum could prevent the cultured cells from being infected by HCV infectious sera.

Key words: hepatitis C virus; cell culture; multiple antigen peptide; hyperimmune serum; blocking; *in vitro*

丙型肝炎病毒(HCV)感染呈世界性分布,据估计目前全球HCV感染者达1.7亿[1]。HCV感染人体后极易慢性化,且与肝硬化、肝癌发生密切相关,对人类健康造成严重威协。HCV包膜糖蛋白高变区一直是人们关注的焦点。一方面,高变区存在中和抗原表位,此表位能诱导机体产生保护性抗体,并阻止HCV感染;另一方面高变区呈高度变异,易发生抗原漂移,逃避机体免疫系统识别,使其能在宿主细胞内持续复制,而呈慢性化发展。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670672)
作者简介:闵 峰(1970-),男,安徽省无为县人,硕士,医师,主要从事病毒性肝炎体外感染细胞模型建立方面的研究,发表论文10篇。现在解放军第174医院传染科,厦门 361003,电话:(0592)8890632
收稿日期:2001-02-25;修回日期:2001-12-06

在前期工作中,我们针对HCV高变区(HVR1:390~411 aa)设计并合成了多抗原肽(MAP)序列,并用MAP免疫家兔后获得高效价(1∶40960)免疫血清,证实其具有良好的免疫原性和反应原性[2]。本研究在建立HCV细胞感染模型的基础上,用抗MAP免疫血清在体外进行阻断实验,观察抗MAP免疫血清在体外能否阻断HCV感染树鼩肝细胞,为研制HCV分子疫苗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 野生成年树鼩购自中国科学院昆明动物研究所,5~8月龄,体重110~140 g,雌雄不限,双只关养。

1.1.2 实验血清 实验所用的2份感染血清(HCV RNA阳性)是同一病人不同时期的血清,第1份1996年5月份,第2份

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

1999 年 5 月份,均经逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)法检测证实 HCV RNA 为阳性,用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测抗 HCV-IgG 阳性,其它肝炎病毒标志物均阴性,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常。兔抗 MAP 血清:前期已制备的多抗原肽(MAP)高效价(1∶40 960)免疫血清,显示良好的免疫原性和反应原性[2]。无菌采集后分装并冻存于-80 ℃冰箱,用前经 56 ℃ 30 min 灭活补体。

1.1.3 主要试剂 细胞分离和培养试剂:Ⅳ型胶原酶、L15 培养基均为美国 Sigma 公司产品;免疫组化试剂:免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;抗 HCV NS5 单克隆抗体,由北京医科大学肝病研究所提供;抗 HCV CP10 单克隆抗体由本室制备;原位杂交试剂:Dig 标记的 HCV 正链寡核苷酸探针,参照 Bukh 等[3] 的 HCV5′ 非编码区探针序列(-95~-56nt) 5′ CTGCTAGCCGACTAGTGTTGG GTCCGCGAAACCGCTTGTGG-3′,本科室王小红博士后惠赠,由军事医学科学院二所制备和纯化;碱性磷酸酶标记的地高辛抗体、杂交液、封闭剂和 NBT/BCIP 溶液,均为德国宝灵曼(Boehringer Manheim)公司产品;HCV RNA 逆转录套式 PCR(RT-PCR)试剂:引物由上海生物工程有限公司合成并纯化,其序列为:

外引物:F 外(493~518)5′-GCAACAGGGAACCTTCCTGG-TTGCTC-3′

R 外(987~964)5′-CGTAGGGGCCAGTTCAT CATCATCAT CAT-3′

内引物:F 内(502~527)5′-AACCTTCCTGGTTGCTCTTT-CTCTAT-3′

R 内(975~952)5′-GTTCATCATCATATCCCATGCCAT-3′ 由内引物扩增 HCV cDNA 长度为 474 bp。裂解液 Tripure 为德国宝灵曼(Boehringer Manheim)公司产品;逆转录酶(AMV)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、无 RNA 酶、Taq 酶、dNTP、$MgCl_2$ 等为美国 Promega 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 树鼩肝细胞分离和培养:基本细胞培养技术参照文献[4]。具体操作过程参见文献[5]略。

1.2.2 兔抗 MAP 血清体外阻断 HCV 感染 设立感染组、阻断组、对照组。

1.2.2.1 感染组 用 2 份 HCV RNA 阳性血清直接接种原代培养的肝细胞,具体过程如下:将感染血清与完全培养基按照 1∶2 比例稀释,接种于细胞生长旺盛期(即培养第 3 天),25 ml 培养瓶每瓶 3 ml,12 孔培养板每孔 1 ml,轻轻摇匀,置入 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养,16~18 h 后,弃去培养上清,并用培养基反复冲洗 3 次,留取最后 1 次洗涤液待检,然后再加入等体积新鲜完全培养液,每 1~2 d 更换培养基,在培养过程中始终保持总体积不变。

1.2.2.2 阻断组 兔抗 MAP 血清分别与 2 份 HCVRNA 阳性血清按照 1∶1、5∶1、10∶1 比例混合后接种细胞生长良好的 12 孔培养板中,每孔终体积为 1 ml,16~18 h 后,弃去培养上清,并用培养基反复冲洗 3 次,留取最后 1 次洗涤液待检,然后再加入等体积新鲜完全培养基,每 1~2 d 更换培养基,在培养过程中始终保持总体积不变。

1.2.2.3 对照组 包括替代对照组和正常对照组。替代对照组:用 HCV CP10 单克隆抗体分别与 2 份 HCVRNA 阳性血清按照 1∶1、5∶1、10∶1 比例混合后接种于细胞生长良好的培养板中,其它过程同阻断组;正常对照组:未免疫的正常兔血清分别与 2 份 HCVRNA 阳性血清按照 1∶1、5∶1、10∶1 比例混合后接种细胞生长良好的培养板中,其它过程同阻断组。

1.2.3 检测指标及方法

1.2.3.1 RT-PCR 法检测细胞内或培养上清中 HCV 正负链 RNA 病毒 RNA 提取试剂由军事医学科学院二所五室提供。引物序列为:外引物:F 外(493~518)5′-GCAACAGGGAACCT-TCCTGGTTGCTC-3′,R 外(987~964)5′ CGTAGG GGCC AGTTCAT-CATCATCATCAT-3′。内引物:F 内(502~527) 5′-AACCTTCCTG-GTTGCTCTTTCTCTA T-3′,R 内(975~952)5′-GTTCATCATCA-TATCCCATGCCAT-3′。检测正链 HCN RNA 在逆转录体系中加入外引物负链,检测负链加入外引物正链。第 1 次 PCR 循环参数:94 ℃1 min,54 ℃1 min,72 ℃1 min,35 个循环;第 2 次 PCR 循环参数:94 ℃ 1 min,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环。由内引物扩增 HCVcDNA 长度为 474 bp。结果分析:取 PCR 扩增液 10 μl 与 1 μl 加样缓冲液(0.25% 溴酚蓝,40% 蔗糖)混合,上样于含溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶,于 1TAE 缓冲液中,在 5 V/cm 电压下电泳 30~60 min,紫外线灯下观察 474 bp 处有荧光带者即为阳性。

1.2.3.2 免疫组化、原位杂交分别检测检测细胞内 HCV NS_3、NS5、CP10 特异性抗原表达,以及原位检测 HCV 负链 RNA;具体操作过程参照文献[6,7]和试剂说明书并作部分改动略。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测细胞内或培养上清中正负链 RNA

2.1.1 感染组 第 1 份 HCV RNA 阳性血清在感染后第 5 天细胞内首次检出负链 RNA,至第 17 天仍可间断检出,细胞内正链首次检出是感染后第 3 天,至第 13 天仍可间断检出,培养上清中正链 RNA 首次检出是感染后第 5 天,至第 13 天仍可间断检出,见表 1、图 1。对照组和第 2 份 HCVRNA 阳性血清感染后细胞内或培养上清中正负链 RNA 检出均与第 1 份 HCVRNA 阳性血清感染结果相接近。

表 1 第 1 份血清加入后培养细胞和上清中 **HCV RNA** 检测

Tab 1 Detection of HCV RNA in cultured cells and supernatant after the first serum addition with RT-PCR

Days after infection	Cells		Supernatant	
	Plus-strand RNA	Minus-strand RNA	Plus-strand RNA	Minus-strand RNA
1	-	-	-	-
3	+	-	-	-
5	+	+	+	-
7	+	+	+	-
9	+	+	-	-
13	+	-	+	ND
15	-	+	-	-
17	-	±	-	ND
18	-	-	ND	ND

±: weakly positive; +: positive; -: negative; ND: not detection

2.1.2 阻断组第 2 份血清按 1∶1 阻断,细胞内正负链 RNA 首次检出是感染后第 5 天,至第 10 天仍可间断检出,培养上清正链 RNA 仅在感染后第 9 天可检出,见表 2、图 2;第 2 份血清按 5∶1、10∶1 以及第 1 份血清按 1∶1、5∶1、10∶1 阻断,细胞内和上清中均未检出 HCV 正负链 RNA。

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



Number: Days after infection (d); M: Marker

图 1　第 1 份血清加入后培养细胞中 **HCV RNA** 正链(**A**)、负链(**B**)和上清中正链(**C**)检出情况

Fig 1　Detection of plus strand (A) and minus strand (B) of HCV RNA in cultured cells, and the plus strand of the RNA (C) in the supernatant after the first serum addition

表 2　第 2 份血清和抗 **MAP** 总血清按 **1∶1** 混合加入后培养细胞和上清中 **HCV RNA** 检出情况

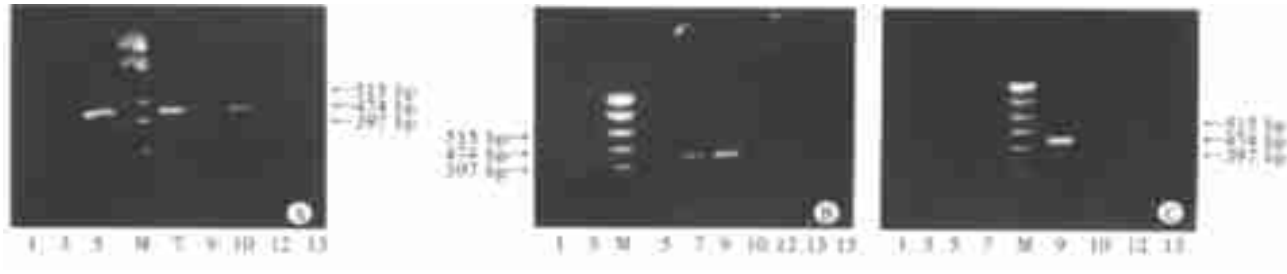
Tab 2　Detection of HCV RNA in cultured cells and supernatant after the addition of 1∶1 mixture of the second serum and anti-MAP rabbit serum with RT-PCR

	Cells		Supernatant	
Days after infection	Plus strand RNA	Minus strand RNA	Plus strand RNA	Minus strand RNA
1	−	−	−	−
3	−	−	−	−
5	+	−	−	−
7	+	+	−	ND
9	−	+	+	−
10	+	−	−	ND
12	−	−	−	−
13	−	−	−	−

Note: ±: weakly positive, +: positive, −: negative, ND: not detection

2.1.3　免疫组化检测细胞内抗原表达　　感染组、对照组、阻断组第 2 份血清按 1∶1 阻断, 接种后第 3～5 天细胞内可见 HCV NS_3 抗原的表达, 阳性细胞呈点状和散在分布, 弥漫性分布少见, 阳性物质在细胞内表达均呈胞浆型, 未见胞核型, 见图 3; 阻断组第 2 份血清按 5∶1、10∶1 及第 1 份血清按 1∶1、5∶1、10∶1 阻断, 细胞内未见阳性物质表达。

2.1.4　原位杂交定位检测细胞内 HCV 负链 RNA　　感染组、对照组、阻断组第 2 份血清按 1∶1 阻断, 接种后第 3～5 天细胞内可见蓝紫色或浅蓝色杂交信号, 阳性细胞也呈散在或点状分布, 阳性物质呈蓝紫色颗粒, 表现形式呈胞浆型, 见图 4; 阻断组第 2 份血清按 5∶1、10∶1 及第 1 份血清按 1∶1、5∶1、10∶1 阻断, 细胞内均未见蓝紫色杂交信号。



Number: Days after infection (d); M: Marker

图 2　第 2 份血清与抗 **MAP** 兔血清按 **1∶1** 混合加入后培养细胞中 **HCV RNA** 正链(**A**)、负链(**B**)和上清中正链(**C**)检出情况

Fig 2　Detection of plus strand (A) and minus strand (B) of HCV RNA in cultured cells, and the plus strand of the RNA (C) in the supernatant after the addition of 1∶1 mixture of the second serum and anti-MAP rabbit serum

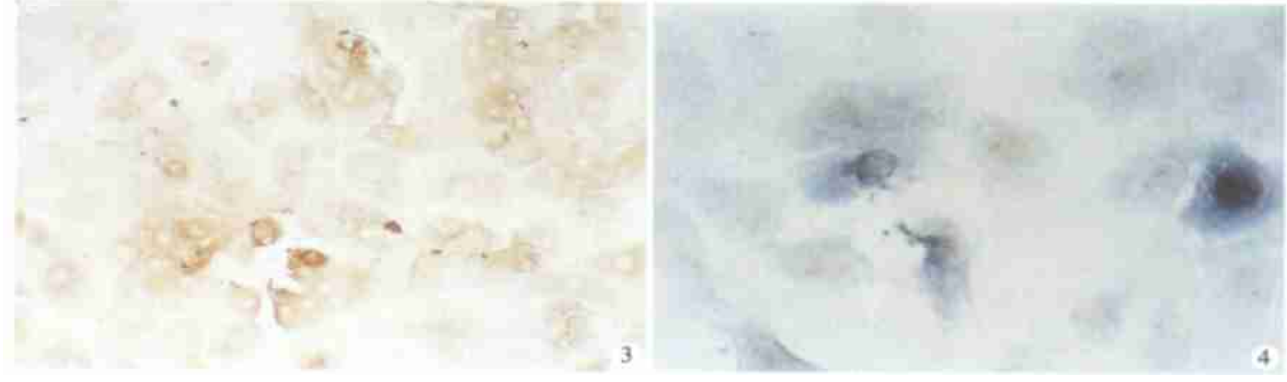


图 3　第 2 份血清与抗 **MAP** 血清按 **1∶1** 混合加入后培养细胞胞浆中 NS_3 抗原阳性信号　　(× 100)

Fig 3　Positive signals of NS_3 antigens expressing in the cytoplasm of the cultured cells after the addition of 1∶1 mixture of the second serum and anti-MAP rabbit serum　　(× 100)

图 4　混合血清加入后原位杂交在胞浆中 **HCV RNA** 蓝紫色负链杂交信号　　(× 200)

Fig 4　Purple stained minus strand of HCV RNA in the cytoplasm with in situ hybridization after the mixture addition　　(× 200)

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

3 讨论

HCV 感染机体后能否产生保护性免疫一直是人们争论的问题，也是目前 HCV 分子疫苗研究的难点和热点。研究表明 HCV 包膜糖蛋白 E2/NS1 的高变区(Hypervariable region，HVR)确实含有重要的 B 细胞线形表位，此表位编码的蛋白质能诱导机体产生保护性抗体[8~9]，但由于 HVR1 高度变异易产生众多的突变株或准种，逃避机体先前产生的抗 HVR1 识别，使其抗 HVR1 部分或不具有中和作用。

研究表明 HCV 感染者早期血清中含有抗 HVR1 或兔抗 HVR1 免疫血清能部分阻断 HCV 感染培养细胞[10~11]。本研究在建立细胞感染模型基础上，用抗兔 MAP 血清分别与两份血清按照一定比例(1∶1、5∶1、10∶1)混合后接种培养细胞，并检测感染后 HCV 复制指标。结果发现抗 MAP 血清与第 1 份血清按(1∶1、5∶1、10∶1)混合后，细胞内和上清中均未检出 HCVRNA，同时细胞内无 HCV NS_3 抗原的表达，细胞内也未见蓝紫色杂交信号，提示抗 MAP 血清能完全阻断第 1 份 HCV RNA 阳性血清。同时也发现抗 MAP 血清与第 2 份血清按(5∶1、10∶1)混合后，细胞内和上清中均未检出 HCV RNA，同时细胞内无 HCV NS_3 抗原的表达，细胞内也未见蓝紫色杂交信号，而抗 MAP 血清与第 2 份血清按(1∶1)混合后细胞内和上清中可检出正负链 RNA，同时细胞内可见 HCV NS_3 抗原的表达，细胞内可见蓝紫色杂交信号。说明了抗 MAP 血清针对第 2 份血清仅有部分阻断作用，且呈剂量依赖关系。分析其原因可能是第 1 份 HCV 感染早期血清与 HVR1 合成肽同源性相近，故抗 MAP 血清能中和 HCV，使其不具有感染性；第 2 份血清为 HCV 感染后期血清，HCV 在体内受体液免疫和细胞免疫双重识别监视作用，为逃避机体免疫压力的作用，产生众多的突变株和准种，而这些突变株和准种与抗 MAP 血清仅有部分交叉中和作用，剂量较大时，易形成抗原抗体复合物，使其不具有感染性，小剂量时不足以形成抗原抗体复合物，仍具有感染性。

虽然抗 MAP 血清对后期感染血清仅有部分阻断作用，且呈剂量依赖关系。但启示以此为基础继续筛选 HVR1 区中和抗原表位，结合 HVR1 区 C 端保守氨基酸位点，重新设计并合成多抗原肽并进行量化，为深入研究 HCV 分子疫苗奠定基础。

参考文献：

[1] Anonymos. Hepatitis C: global prevalence[J]. Wkly Epidemiol Rec, 1997, 72(46): 341－34.

[2] 王永刚，郝飞，黄燕平，等. HCV 包膜糖蛋白区多抗原肽的设计、合成及反应原性[J]. 中华肝脏病杂志，2000，8(4)：48－50.

[3] Bukh J, Purcel R H, Miller R H. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(1): 187－189.

[4] 鄂 征主编.组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1997. 78－111.

[5] 闵 峰，郝 飞，刘国栋，等. 体外培养树鼩肝细胞的初步观察[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：647－649.

[6] 蔡文琴，王伯彝 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406－421.

[7] 路建平，主编. 非放射性杂交技术[M]. 海口：南海出版社，1996. 70－75.

[8] Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, *et al*. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 1 759－1 763.

[9] Shimizu Y K, Igarashi H, Kiyohara T, *et al*. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures[J]. Virology, 1996, 233(2): 409－412.

[10] Farci P, Alter H J, Wong D, *et al*. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1of the envelope 2 protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26): 15 394－15 399.

[11] Zibert A, Meisel H, Kraas W, *et al*. Early antibody respons against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infection of hepatitis C virus[J]. Hepatology, 1997, 25(5): 1 245－1 249.

(编辑 薛国文)

(上接 68 页)

80%，有效率分别为 91.45% 及 88.58%，经统计学分析无显著性差异($P>0.05$)

细菌清除率评价：治疗组分离培养出致病菌 33 株，细菌清除率 96.97%和转阴率为 100%。经统计学分析两组无显著性差异($P>0.05$)

不良反应：治疗组中出现轻度恶心 1 例，经给予吗叮啉对症治疗，症状消失，1 例表现为用药后 2~3 d 出现全身皮疹，以躯干为主，被迫停药，不良反应发生率为 5.71%，治疗组与对照组不良反应发生率经统计学分析无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

国内外临床应用的结果表明，氟喹诺酮类药物在治疗肺部感染中获得了较好的疗效[1]，本试验使用利复星治疗肺部感染，无论在临床疗效还是在细菌清除两方面都取得了令人满意的效果，说明本品对葡萄球菌属肺炎链球菌、β-溶血性链球菌、卡他球菌、大肠杆菌、克雷伯菌属、变形杆菌属、肠杆菌属、费劳地枸橼酸杆菌、铜绿假单孢菌均显示很强的抑菌和杀菌作用[2]不良反应主要表现为胃肠道反应，引起胃肠道反应的主要原因是，该类药物对胃粘膜有直接的刺激作用[3~4]，经对症处理可完成疗程，其他不良反应在停药后可以自然消失，从而说明本品安全可靠。

关键词：利复星；肺部感染；疗效
中图法分类号：R563.053 文献标识码：B

参考文献：

[1] Finch R G. The role of new quinolones in the treatment of respiratory tract infection[J]. Drugs, 1995, 49(Suppl 2): s144－s151.

[2] 崔德健，抗菌药物的临床应用[J]. 中华内科杂志，2000，39(10)：712－714.

[3] 方向群，刘又宁，新氟喹诺酮类药物及其在肺部感染中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志，2000，23(2)：124－126.

[4] 戚建军，氟喹诺酮类药物的副作用[J]. 国外医药：抗生素分册，1995，16(2)：122－130.

(编辑 王 红)

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