DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.038
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1216 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1216-03

HCV体外感染正常成人肝细胞的研究

马巧玉,郝 飞,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 为进一步研究丙型肝炎免疫发病机制、临床治疗和疫苗研制提供最接近自然感染状态的理想细胞模型。方法 体外二步灌流法分离正常成人肝细胞并维持培养1月以上,丙型肝炎患者血清感染上述肝细胞并用免疫组化和逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR法)检测被感染肝细胞HCV抗原表达及HCV RNA。结果 正常成人肝细胞可在体外存活1月以上,加丙肝患者血清4~36 d后免疫组化法可检测到肝细胞内HCVNS3、NS5抗原表达,感染后2~36 d,RT-PCR法可在感染肝细胞培养上清和细胞悬液中间断检测出HCV RNA。结论 正常成人肝细胞可在体外存活1月余并被HCV感染者血清感染。

关键词:正常成人肝细胞;细胞模型;丙型肝炎病毒
中图法分类号:R322.47;R373.21 文献标识码:A

Study on the infection of nomal adult hepatocytes with HCV *in vitro*

MA Qiao-yu, HAO Fei, WAN Yu-ming (Center of Infectious Disease of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To provide a better cell model of closely nature infectious state for further understanding the immunopathogenesis, clinical treatment and vaccine development of hepatitis C. Methods Normal adult hepatocytes were isolated according to the two-step perfusion method and cultured *in vitro* more than 1 month. The hepatocytes were then infected with serum of patients with hepatitis C. The expression of HCV antigen and HCV RNA in cells were detected with immunohistochemical method and RT-PCR. Results Normal adult hepatocytes survived more than 1 month *in vitro*. In this experiment the normal adult hepatocytes could be infected by serum containing HCV from patients with hepatitis C. The expression of HCV NS3, NS5 antigen in cells could be detected by immunohistochemical method, HCV RNA was discontinuously detected in cells and supernatant with RT-PCR. Conclusion Normal adult hepatocytes may survive more than one month *in vitro* and can be infected by serum of patients with hepatitis C.

Key words: normal adult hepatocytes; cell model; hepatitics C virus

丙型肝炎病毒(HCV)是引起输血后肝炎的重要原因,其感染慢性化发生率高(>80%),易进展成肝硬化和原发性肝细胞癌,且目前无有效疫苗及可靠治疗方法[1]。因此,迫切需要寻找预防和治疗HCV感染的有效方法。近年来,国内外有许多关于HCV转染、感染细胞模型的报道,但所建立的细胞模型与自然感染状态的人肝细胞存在较大差别。我们用丙型肝炎病人血清中存在的HCV体外感染正常成人肝细胞,以期建立与自然感染状态最为接近、更适宜于进行免疫发病机制和防治等研究的细胞模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 标本及血清 ①正常成人肝组织标本:取意外死亡之3例成年男性(19、24、35岁),1例成年女性(27岁)肝脏,均无肝病史,临床生化和病理检查无异常发现,各种肝炎病毒标志物检测均阴性。②感染血清:实验用感染血清来自于重庆地区经ELASA法和RT-PCR检测证实抗HCV抗体及HCV RNA阳性的HCV感染者。血清无菌采集后分装,冻存于-80 ℃,用前56 ℃×30min灭活补体。③正常血清:来自我院健康献血员,无菌采集后分装,-80 ℃冻存用前56 ℃×30 min灭活补体。④小牛血清:由本校试剂中心提供,用前56 ℃×30 min灭活补体。

1.1.2 主要试剂:①RPMI-1640细胞培养基:购自美国GIBCO公司。②胶原酶、胰蛋白酶抑制剂:由美国SIGMA公司提供。③分散酶:购自德国宝灵曼公司。④链霉素抗生物蛋白-过氧化酶免疫组化试剂盒:购自福州迈新生物技术开发公司。⑤RT-PCR检测HCV RNA试剂盒:由北京医科大学肝病研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 正常成人肝细胞分离培养 采用体外灌流法分离正常成人肝细胞[2,3]。取意外死亡之成年人肝脏100 g,将肝组织置于培养皿中,用37 ℃前灌流液自残存血管中反复灌注,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)反复注入残存血管,剪碎肝组织,37 ℃震荡,消化30 min,三层无菌沙布过滤,450 r/min×4 min离心,弃上清,加入PRMI-1640培养液混匀,450 r/min×4 min离心,弃上清,反复3次,最后用含10%小牛血清1640培养液(完全培养液)按细胞密度1×10^6/ml稀释后接种至25 ml培养瓶和加爬片的24孔培养板,置于37 ℃、5%CO_2培养箱孵育,2~3 d更换完全培养液1次,维持培养1月以上。

1.2.2 建立细胞模型 ①感染组:加适量感染血清至培养瓶(0.25 ml/瓶)、板(0.1 ml/孔)中,混均,置于37 ℃、5%CO_2培养箱16 h,弃上清,用1640液充分洗涤6次,留取最后1次洗液待检。感染后每2~4 d从培养瓶中收集部分上清,细胞及从培

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770682)
作者简介:马巧玉(1963-),女,上海市人,硕士,主治医师,主要从事病毒性肝炎方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754141
收稿日期:2001-04-13;修回日期:2001-07-05

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

养板中收集细胞爬片。②对照组: 加入与感染组等量的正常人血清, 生理盐水至培养瓶、板中, 建立正常和空白对照组, 每 4 d 收集上清、细胞、细胞爬片。

1.3　标本收集

1.3.1　培养上清　　吸取 1 ml 培养上清至离心管中, 8 000 r/min× 5 min 离心去除细胞碎片, 吸上清至 DEPC 处理的冻存管中, －20℃冰箱冻存待检。

1.3.2　收集细胞　　1640 液洗涤 6 次, 用 0.25%胰蛋白酶消化约 2× 10^6 个细胞, 400 r/min× 5 min 离心, 弃上清, 再用 PBS 悬浮后离心, 反复 4 次, 最后成 1 ml 细胞悬液置－20 ℃冰箱冻存待检。

1.3.3　细胞爬片　　用镊子从培养板中取出细胞爬片, 10 mmol/ L 的 PBS 漂洗 30 s× 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 置－20℃冰箱冻存待检。

1.4　标本 HCV 感染检测

1.4.1　免疫组化检测细胞内抗原表达　　方法按试剂盒说明书进行。第一抗体用鼠抗 HCVNS3、NS5 单克隆抗体。

1.4.2　细胞和培养上清中 HCV RNA 检测　　采用 RT-PCR 方法, 按试剂盒说明书操作。

2　结　果

2.1　细胞培养

分离细胞后用台盼蓝染色, 肝细胞存活率约 90%, 24 h 后约 70% ~ 80% 细胞贴壁, 贴壁细胞前呈圆形, 后呈多角形, 单核, 生长良好, 加感染血清组与对照组细胞形态无明显差异。

2.2　HCV 体外感染正常成人肝细胞检测

2.2.1　细胞内 HCV 抗原表达　　用免疫组化法检测加入 HCV 感染血清后 2、4、8、12、16、20、24、28、32、36 d 的正常成人肝细胞内 HCVNS3、NS5 抗原表达, 可见自感染血清加入 4 d 起, 有呈棕色的阳性细胞出现, 呈散在或集中分布, 主要抗原表达在胞浆, 偶见细胞核阳性表达, 阳性细胞无明显形态改变, 见图 1。阴性对照及空白对照无表达 HCV NS3、NS5 抗原的阳性细胞, 见图 2。

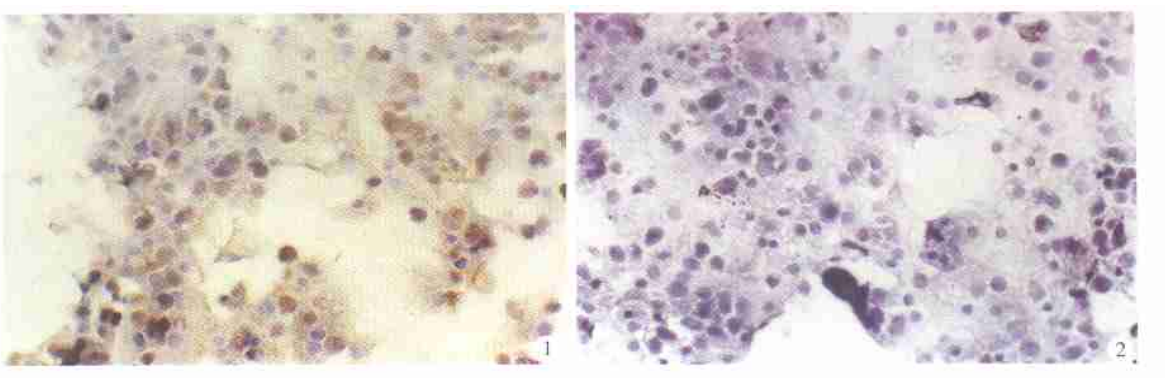


图 **1**　感染组肝细胞内 **HCV** 抗原表达　(S-P× 200)

Fig 1　Expression of HCV antigen in hepatocytes of infection group　(S-P× 200)

图 **2**　对照组肝细胞内无 **HCV** 抗原表达　(S-P× 200)

Fig 2　No expression of HCV antigen in hepatocytes of control group　(S-P× 200)

2.2.2　RT-PCR 检测 HCV RNA　　自加入 HCV 感染血清后 2 d, 正常成人肝细胞培养上清和细胞悬液可间断检测出 HCV RNA, 见表 1。最后一次洗液, 正常对照组, 空白对照组上清, 细胞悬液均未检测到 HCV RNA。

表 **1**　正常成人肝细胞内和培养上清中 **HCV RNA** 检测

Tab 1　Detection of HCV RNA in the adult hepatocyte and supernatant

Time after infection	No. 1 liver sample		No. 2 liver sample		No. 3 liver sample		No. 4 liver sample	
	Supernatant	Hepatocyte	Supernatant	Hepatocyte	Supernatant	Hepatocyte	Supernatant	Hepatocyte
2 d	+	－	+	+	+	+	－	－
4 d	－	+	－	+	+	－	+	+
6 d	－	－	－	+	－	+	+	－
8 d	+	－	+	－	－	－	－	－
10 d	+	+	+	+	+	－	－	+
12 d	－	+	+	+	+	+	+	+
16 d	+	+	－	－	－	+	+	+
20 d	+	－	+	+	－	－	+	－
24 d	－	－	+	+	+	+	－	－
28 d	+	－	+	－	+	+	+	－
32 d			+	+	+	－	+	+
36 d					+	+	+	－

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

3 讨论

自1989年发现HCV后，有关HCV感染方面的研究有很大进展，但感染机制、治疗方法、疫苗制备方面仍困难重重，其主要原因之一就是缺乏适宜的HCV感染的细胞或动物模型。因此，我们建立了HCV感染正常成人肝细胞的细胞模型，以期在最接近自然感染状况的情况下进一步明确HCV感染的免疫机制、药物及疫苗效果。

目前分离肝细胞多采用二步灌流法。因为我们所取用肝组织为非全小叶标本，灌注时有肝组织不能到达，加之用胶原酶分离正常成人肝细胞效率较分离胎肝细胞、动物肝细胞低，加入分散酶后可提高分离效率，所用消化酶最好新鲜配制，在最初24 h，有部分细胞不贴壁，需弃去，因此，要求每毫升细胞浓度略高于其它肝细胞培养。正常成人肝细胞体外培养时间约1月，为延长肝细胞存活时间，有人提出采取胶原凝胶夹层培养和多细胞球状体方式培养[3,4]。近年来，国外有人将兔肝细胞移植到切除90%肝脏、严重肝功障碍的兔肝或脾上，证实形态完好的移植肝细胞可存活15个月，并能起良好的代偿作用[5]。目前在治疗各种严重肝病时，肝移植已成为必不可少的方法之一，但供肝严重缺乏，如能将人肝细胞分离后移植在腹膜、脾脏或胰腺上，并发挥其生物作用，在肝病治疗史上将是一个突破性进展。

日本有学者认为部分HCV RNA阳性血清感染能力低或不具感染性[6]，应选择HCV RNA含量高，HCV抗体低或检不出的血清感染效率较高，本实验中，为保证HCV感染效率，我们用2~3个丙肝患者血清混合使用，孵育16 h，洗涤时需多次充分洗涤，避免遗留HCV阳性血清，影响下一步鉴定检测结果。

收集培养上清时离心速度宜高，以便去除细胞碎片；收集被HCV感染肝细胞时需多次充分洗涤，以排除上清干扰，离心速度以(45~50)×g为宜，达到即可有效沉降肝细胞，又可去除细胞碎片及非实质细胞的目的；4%多聚甲醛固定细胞时应根据室温调整固定时间，室温低时应适当延长固定时间，以免下一步进行细胞内HCV抗原检测漂洗时细胞脱落。

感染后2 d至培养结束，正常成人肝细胞、培养上清均可间断检测到HCV RNA，而最后一次洗液和正常对照、空白对照组的细胞上清中无HCV RNA阳性，免疫组化也证实从感染后4 d起细胞中有HCVNS3、NS5抗原表达，说明HCV感者者血清能够感染正常成人肝细胞，国内外研究也证实体外人肝细胞培养可支持HCV复制[7,8]。

HCV体外感染正常成人肝细胞的细胞模型虽然有价格低廉、操作简便与自然感染状态接近，利于开展关于HCV各项研究的优点，但肝细胞来源有一定困难，细胞培养时间不够长，不能传代等均为此细胞模型的缺点，需要进一步研究解决。

参考文献：

[1] Yanagi M, Purcell R H, Emerson S U, *et al*. Transcripts from a single full length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(8): 8 738—8 743.

[2] 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(3): 175.

[3] Kono Y, Yang S, Letarte M, *et al*. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary cultrue in a collagen gel sandwich culture system [J]. Exp Cell Res, 1995, 221(2): 478—485.

[4] Li A P, Susan M, Colburn, *et al*. A simplified method for the culturing of primary adult rat and human hepatocytes as muliticellular spheroids[J]. *In Vitro* Cell Der Biol, 1992, 28A(6): 673—677.

[5] Moshage H, Yap S H. Primary cultures of human hepatocytes: a unique system for studies in toxicology, virology. parasitology and liver pathophysiology in man[J]. J Hepatol, 1992, 15(3): 404—413.

[6] Shimizu Y K, Purcell R H, Yoshikura H. Correlation between the inffectivity of hepatitis C virus *in vivo* and its infectivity *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(13): 6 037—6 041.

[7] Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, *et al*. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infecious virus[J]. J Gen Virol, 1996, 77(Pt 5): 1 042—1 054.

[8] 宋志强，郝 飞，刘国栋，等. 丙型肝炎病毒体外感染人胎肝细胞的初步研究[J]. 中华传染病杂志，1999, 17(4): 224—227.

（编辑 谢义霞）

（上接1215页）

确诊断的唯一依据。只有做到准确诊断，才能制定出最佳治疗方案。多原发癌与转移癌、复发癌的治疗有原则上的区别，前者可行根治性治疗，后者的治疗多为姑息性的。至于多原发癌的发病原因，目前尚不清楚，多数学者认为生物学因素起主要作用，Wanen等认为曾患癌者易再次患癌，可能是原癌降低了宿主对次癌的抵抗能力，强烈的抗癌治疗引起机体的免疫能力下降也是抗癌治疗后又出现第二癌的因素之一，但该患者基本可除外后一种情况。

关键词：子宫颈癌；牙龈癌；多原发癌

中图法分类号：R737.33；R739.82 文献标识码：B

参考文献：

[1] 周际昌 主编. 实用肿瘤内科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1999. 562—564.

[2] 王 平. 子宫颈小细胞癌3例[J]. 临床实验病理学杂志，1999, 15(2): 145.

[3] 张天泽，徐光炜 主编. 肿瘤学(中册)[M]. 天津：天津科学技术出版社，1996. 1 062.

[4] 范开度. 肝、食管双原发癌1例[J]. 肿瘤防治研究，1999, 41(01): 27.

（编辑 汪勤俭）

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