DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.039
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
204 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0204-04

人肝癌细胞系7721与原代人胎肝细胞用于体外培养HCV的对比研究

宋志强,郝 飞,闵 峰,马巧玉,刘国栋 (第三军医大学附属西南医院感染病科、全军传染病专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)在体外培养原代人胎肝细胞和人肝癌细胞系7721中复制和表达的异同,探讨HCV体外培养条件。方法 原代人胎肝细胞和人肝癌细胞系7721分别与HCV感染血清共孵育后,用逆转录-聚合酶链反应、原位杂交、免疫组化检测细胞和培养上清中的HCV RNA和抗原表达。结果 从孵育的第2~3天,即可在细胞内和/或培养上清中间断地检出HCV RNA(其中HCV在7721细胞株中的复制至少可达66 d,HCV在人胎肝细胞中的复制持续25 d);HCV抗原可在感染细胞内得到稳定表达,感染细胞内存在HCV负链RNA杂交信号,且多位于细胞浆。结论 两种肝细胞对HCV易感,尤其是7721细胞可以稳定地支持HCV体外复制,可用于HCV体外长期培养的靶细胞。

关键词:丙型肝炎病毒;人胎肝细胞;7721细胞;细胞培养;细胞模型
中图法分类号:R322.47;R373.21;R394.2 文献标识码:A

Comparative study on hepatoma cell line 7721 and human fetal hepatocytes for *in vitro* culture of hepatitis C virus

SONG Zhi-qiang, HAO Fei, MIN Feng, MA Qiao-yu, LIN Guo-dong (Center for Infectious Diseases of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the similarities and differences on *in vitro* replication and expression of hepatitis C virus (HCV) between human fetal hepatocytes (HFH) and 7721 cell line. Methods Human fetal hepatocytes and a hepatoma cell line 7721 were incubated with a serum from hepatitis C patient. After incubation, the presence of HCV RNA, the expression of HCV NS_3 antigens in cells and/or supernatant were examined by RT-PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry, respectively. Results It was found that: ①The intracellular HCV RNA was first detected on d 2~3 post-incubation and then could be intermittently detected in cells and/or supernatant subsequently (HCV RNA could be detected in 7721 cells during a period of at least 66 days. In HFH, HCV RNA could be detected up to 25 days after incubation); ②HCV-NS_3 antigen could be expressed in infected cells; ③Minus-strand RNA of HCV was mainly located within cytoplasm by *in situ* hybridization. Conclusion The results suggest that both the fetal hpatocytes and the hepatoma cell line 7721 are susceptible to HCV, and especially 7721 cell line can stably support HCV replication *in vitro* and may be used as the target cell for long-term cultures of HCV.

Key words: hepatitis C virus; human fetal hepatocytes; hepatoma cell line; cell culture; cell model

建立理想的丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染模型是深入研究HCV的前提。我们在前期的研究中利用HCV感染血清体外感染培养中的原代人胎肝细胞和人肝癌细胞系7721获得了成功[1,2],为了观察原代肝细胞和能反复传代的肝癌细胞系在支持HCV体外复制的异同,我们同时进行两种肝细胞的体外感染研究,旨在进一步研究HCV体外复制特性,并探讨HCV的体外长期培养条件。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验血清 实验所用的感染血清来自重庆地区一慢性丙型肝炎患者,经RT-PCR法检测证实HCV RNA为阳性。正常血清来自我院输血科健康献血员。细胞培养所用的小牛血清由本校试剂中心提供。血清无菌采集后分装并冻存于-20 ℃。所有血清使用前均经56 ℃ 30 min灭活补体。

1.1.2 主要试剂 链霉菌亲生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P法)免疫组化试剂盒及3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;HCV NS3单克隆抗体由北京医科大学肝病研究所提供[3]。RT-PCR法检测HCV正、负链RNA的试剂盒由北京医科大学肝炎试剂中心提供。Dig标记的HCV正链寡核苷酸探针参照Bukh等[4]的HCV 5′非编码区探针序列,即[(-95)~(-56) nt] 5′-CTGCTAGCCGACTAGTGTTGGGTCCGCGAAACCGCTTGTGG-3′,由军事医学科学院二所制备和纯化。碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(工作浓度1∶500)、封闭剂和NBT/BCIP显色液为德国宝灵曼公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 原代胎肝细胞培养 采用体外筒易两步灌流法[5]分离胎肝细胞后,用完全培养基将细胞稀释至2×10^6/ml,接种5 ml的培养瓶和已加盖玻片的12孔培养板,置37 ℃含5%的CO_2培养箱,每2~3 d部分更换培养基。7721细胞株为本科自存,细胞复苏后,制成浓度为5×10^5的细胞悬液并接种和培养。

1.2.2 HCV体外感染细胞 同时设立感染组和对照组,感染组:取细胞生长良好的培养瓶/板,移去培养基,加入适量的HCV感染血清(5 ml的培养瓶中加0.4 ml;12孔培养板每孔加0.1 ml),然后加入适量的完全培养基(5 ml培养瓶、12孔培养板

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670672)
作者简介:宋志强(1972-),男,河南省上蔡县人,博士研究生,主治医师,主要从事病毒感染及细胞生物学方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753298
收稿日期:2000-04-05;修回日期:2000-07-20

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

中的终体积分别为 2、0.5 ml), 轻轻摇匀, 置入培养箱 37 ℃ 8 h 后, 弃上清, 以 1640 充分洗涤 6～8 次, 并留取最后一次洗液以待检, 然后再加入 2 ml 完全培养基继续培养。对照组: 取细胞生长良好的培养瓶/板, 加入与感染血清等量的正常人血清(正常对照)或等量的等渗盐水(空白对照)。

1.2.3　标本收集　①培养上清: 吸取 1ml 培养上清置经 DEPC 水处理并高温的 Eppendorf 管中, 1 000× g 离心 5 min 后取上清并移入另一管中(以除掉细胞碎片), 置入－20 ℃冰箱冻存, 备 RT-PCR 检测 HCV 正、负链 RNA。②细胞收集: 弃去培养上清后, 以 1640 洗涤 6 次后, 用 0.25%胰蛋白酶消化部分细胞制成细胞悬液, 以 50× g 离心 5 min, 弃上清, 重悬于 PBS 滤浮后再离心, 如此反复 6 次(以排除来自培养上清的干扰); 将细胞沉淀于－20 ℃冰箱冻存, 备 RT-PCR 检测 HCV 正、负链 RNA。③细胞爬片: 用镊子从培养板中取出细胞爬片, 立即用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次, 每次 30 s。然后用 4%多聚甲醛固定 15 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 置－20 ℃保存, 备免疫组化检测细胞内的 HCV 抗原表达或用原位杂交对细胞内的 HCV RNA 进行定位。

1.2.4　细胞及培养上清中 HCV 正、负链 RNA 的检测　操作步骤按说明书进行。

1.2.5　免疫组化(S-P 法)检测细胞内的 HCV 抗原　取制备好的细胞爬片, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min(下同); 用 0.03% H_2O_2-甲醇溶液 37 ℃孵育 10 min; PBS 漂洗, 移入含 0.02% Tween－20 的 PBS 中 2 min; 20%的正常羊血清 37 ℃孵育 10 min 后, 吸去多余的液体, 加入抗 HCV NS_3 单克隆抗体, 4 ℃冰箱中孵育 12～24 h; PBS 漂洗, 加生物素标记的第二抗体, 37 ℃孵育 30 min; PBS 中漂洗, 加入 S-P 液, 37 ℃孵育 30 min; PBS 漂洗; DAB 显色 3～5 min, PBS 漂洗终止显色, 苏木素衬染, 透明, 封片, 显微镜下观察胞内出现棕黄色着者为阳性。对照实验: 分别用 1%小牛血清白蛋白(第一抗体稀释液)、PBS 替代第一抗体做第一抗体替代对照; 用 PBS 分别替代生物素标记的第二抗体和 S-P 液作试剂替代对照。

1.2.6　原位杂交　参照文献[6], 细胞爬片在 PBS 中漂洗 1 min, 25 mg/L 的蛋白酶 K 消化 30 min, 4%的多聚甲醛室温下固定 10 min, PBS 漂洗 1 min, 2× SSC 溶液漂洗 15 min, 50%、75%、90%、100%的乙醇序列脱水各 1 min, 自然风干; 将含有探针的杂交液(85 ℃, 1 ng/μl)滴加在细胞爬片上, 每片约 20～40 μl, 用封口膜覆盖, 放入湿盒内(先用 50%甲酰胺浸湿的纸餐巾垫好)37 ℃下杂交 16 h; 50 ℃ 2× SSC 溶液轻轻洗掉封口膜, 42 ℃ 2× SSC 溶液漂洗 20 min, 37 ℃ 1× SSC 溶液漂洗 15 min, 37 ℃ 0.1× SSC 溶液中漂洗 10 min, 1 号 Dig 缓冲液室温下 5 min, 含 1.5%的 1 号 Dig 缓冲液 37 ℃下 60 min, 加入 1∶500 稀释的 Dig 抗体, 37 ℃下孵育 30 min, 1 号 Dig 缓冲液漂洗 5 min, 2 号 Dig 缓冲液漂洗 3 min, NBT/BCIP 显色, 显微镜下观察确认充分显色后, PBS 漂洗终止显色, 50%、75%、90%、100%的乙醇系列脱水, 透明, 中性树胶封片, 照相。替代对照: 分别用不加探针的杂交液和不加抗 Dig 抗体的 1 号 Dig 缓冲液做对照。

2　结果

2.1　细胞培养

采用体外简易两步灌流法分离胎肝细胞后, 经台盼蓝排除法测定, 分离的胎肝细胞的存活率均在 95%以上, 细胞接种 24 h 后由圆球形转变为多边形, 细胞相互连接呈串状, 2～4 d 时肝细胞间相互接触、满布培养瓶, 这种状态可维持 3 周余; 以后肝细胞逐渐出现形态不规则, 胞浆明显颗粒化, 并有空泡形成, 培养至 1 月左右胎肝细胞逐渐从培养瓶壁上脱落。体外培养中的 7721 细胞生长良好, 细胞多呈椭圆形或梭形, 连接成片状。

2.2　细胞内及培养上清中 HCV RNA 的检出结果

7721 细胞内在感染后第 2～66 天可检出 HCV 正、负链 RNA, 其培养上清中可间断检出正链 RNA, 未检出负链 RNA。原代人胎肝细胞内 HCV 正、负链 RNA 在感染后第 3～25 d 时可检出。正常对照组、空白对照组及最后一次洗液均为阴性, 见表 1、2。

表 1　原代人胎肝细胞内和培养上清中 **HCV RNA** 的检测结果

Tab 1　Detection of HCV RNA in HFHs and supernatant by RT-PCR

After infection (t/d)	Cells		Supernatant	
	Plus-stand RNA	Minus-strand RNA	Plus-stand RNA	Minus-strand RNA
1	－	－	－	－
2	－	－	－	－
3	++	+	－	－
5	+	+	+	－
8	++	++	－	－
12	++	++	++	－
15	+	+	－	－
18	++	－	+	－
20	++	++	++	－
23	－	+	－	－
25	+	－	－	－
27	－	－	+	－
30	－	－	－	－

+: Weakly positive; ++: Positive; －: Negative

表 2　7721 细胞内和培养上清中 **HCV RNA** 的检测结果

Tab 2　Detection of HCV RNA in 7721 cells and supernatant by RT-PCR

After infection (t/d)	Cells		Supernatant	
	Plus-stand RNA	Minus-strand RNA	Plus-stand RNA	Minus-strand RNA
1	－	－	－	－
2	++	－	++	－
3	++	+	++	－
5	－	－	+	－
15	++	++	++	－
20	++	++	++	－
30	++	+	++	－
40	－	－	－	－
45	++	++	++	－
52	++	+	－	－
62	++	++	++	－
66	+	+	－	－
68	－	－	－	－

+: Weakly positive; ++: Positive; －: Negative

2.3　细胞内 HCV 抗原的表达

在两种肝细胞接种感染血清后及 7721 细胞传代后用 S-P 法检测细胞内的 HCV NS3 抗原, 可见棕黄色着色的阳性细胞多呈点状和散在分布, 弥漫性分布少见, HCV 抗原在两种细胞内的分布多位于细胞胞浆, 少数细胞核亦可见阳性表达, 见图 1、2。正常对照和空白对照、免疫组化对照实验均未表达 HCV 抗原的阳性细胞。

2.4　原位杂交

在两种细胞接种感染血清后及 7721 细胞传代后的杂交片中, 可见蓝色着色的杂交阳性细胞, 阳性细胞呈散在分布/点状分布, 阳性物质呈蓝紫色细小颗粒, 其表现形式可分为浆型、核型和核浆混合型, 以胞浆型为多见, 见图 3。空白对照组、正常对照组未见杂交信号。

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

2.5 7721 细胞传代对HCV 复制的影响

在 7721 细胞感染后每隔 3～5 d 将细胞消化后进行传代培养，发现传代 6 次后细胞内和/或培养上清中仍可检测到 HCV RNA，免疫组化证实细胞内有 HCV 抗原的表达，见图 4，杂交片亦可见蓝色着色的杂交阳性细胞。

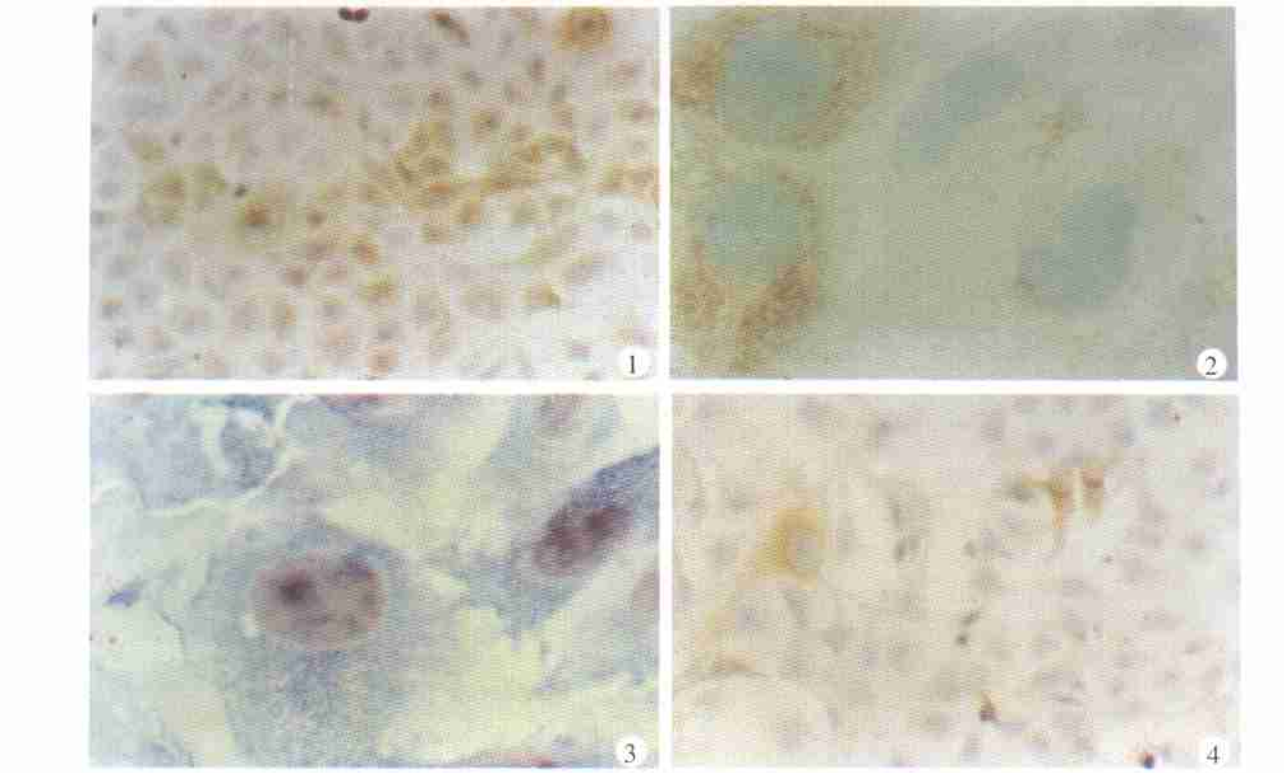


图 1 免疫组化检测表达 **HCV NS_3** 抗原阳性的 **7721** 细胞 阳性细胞多散在分布 (S-P× 200)

Fig 1 Detection of HCV NS_3 antigen in infected 7721 cells by immuno-histochemistry Positive cells scattered (S-P× 200)

图 2 免疫组化检测人胎肝细胞内的 **HCV NS_3** 抗原 阳性物质位于胞浆中 (S-P× 1 000)

Fig 2 Detection of HCV NS_3 antigen in infected HFHs by immuno-histochemistry Postive substances located in cytoplasm (S-P× 1 000)

图 3 原位杂交法检测人胎肝细胞内的 **HCV** 负链 **RNA** 阳性物质位于细胞浆中 (ISH× 1 000)

Fig 3 Detection of minus-strand of HCV RNA in HFHs by *in situ* hybridization HCV-RNA mostly in cytoplasm (ISH× 1 000)

图 4 传代 **6** 次后的 **7721** 阳性细胞仍可表达 **HCV NS_3** 抗原 (S-P× 200)

Fig 4 Detection of HCV NS_3 antigen in 6th subcultured 7721 cells by immuno-histochemistry (S-P× 200)

3 讨论

近年来的研究表明，HCV 在体外可感染多种细胞，并建立了部分能稳定复制的细胞模型[6～8]，这些细胞模型的建立极大开拓了人们研究 HCV 的策略和途径的选择。然而须注意的是，肝细胞才是 HCV 在体内感染的主要细胞，病毒感染非肝细胞的方式和途径是否类似体内感染肝细胞以及 HCV 在非肝细胞中的复制和表达是否与体内类似尚无从考证。特别是当非肝细胞的 HCV 感染模型用于预防性疫苗的筛选时其结果缺乏应有的说服力。我们认为原代人胎肝细胞及人肝癌细胞系 7721 与 HCV 感染血清共孵育后，HCV 确在两种肝细胞中进行了复制和表达，根据有：①感染血清中未检测到 HCV 负链 RNA，而细胞和培养上清中却可间断地检出；②我们在实验中发现，感染血清在 37 ℃ 孵箱下放置 3 d 后再用 RT-PCR 检测时其结果由阳性转为阴性，说明 HCV RNA 在体外不能长时间存在；③细胞接种感染血清 8 h 后均经 6 次洗涤，并且留取的最后一次洗液经 RT-PCR 检测证实为阴性；④在接种后培养第 1～2 d 细胞内未检测到负链 RNA，而此后负链 RNA 信号却可间断地检出；⑤原位杂交和 RT-PCR 均证实两种细胞内存在 HCV 复制中间体(负链 RNA)；⑥免疫组化证实两种细胞内有均 HCV NS_3 抗原表达。

我们的研究表明，原代人胎肝细胞及人肝癌细胞系 7721 体外不但可以感染 HCV 而且均可在不同程度上支持 HCV 的复制(限于时间和经费，我们对 7721 细胞只培养了 70 d)。但是，用原代人胎肝细胞体外培养 HCV 还存在不尽人意之处：首先，人胎肝来源不易；其次，分离胎肝细胞的步骤较烦琐，分离后细胞的存活率对分离的时间早晚和操作步骤依赖性较大，在一般实验室较难成功，而且分离后的细胞若不充分离心、洗涤则其中易混有非肝实质细胞和淋巴细胞，这些细胞体外也可感染 HCV 从而影响结果的准确性；最后，胎肝

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

细胞的长期和传代培养的技术难题目前国内外均未得到很好解决。

人肝癌细胞系 7721 来源较易，细胞纯度好，可以长期传代培养和反复冻存，因此用人肝癌细胞系 7721 建立 HCV 体外长期培养体系对深入、系统地研究 HCV 体外复制机制及预防性疫苗和抗病毒药物的筛选有着明显优势。

参考文献：

[1] 宋志强，郝 飞. 人肝癌细胞株 7721HCV 体外感染模型的建立[J]. 中华传染病杂志，1999，17(4)：224－227.

[2] 宋志强，郝 飞，王英杰，等. 丙型肝炎病毒体外感染原代人胎肝细胞的初步研究[J]. 中华微生物与临床免疫学杂志，2000，20(5)：427－430.

[3] 高建恩，郭建平，纪和平，等. 丙型肝炎病毒 NS_3 蛋白单克隆杂交瘤细胞株的建立及初步鉴定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志，1995，9(3)：209－212.

[4] 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): 187－191.

[5] 王英杰，王宇明，李梦东. 培养人胎肝细胞的形态与功能研究[J]. 新消化病学杂志，1997，5(5)：291－292.

[6] Cribier B, Schmitt C, Bingen A, *et al*. *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus[J]. J Gen Virol, 1995, 76(10): 2 485－2 491.

[7] Mizutani T, Kato N, Ikeda M, *et al*. Long-term human T-cell culture system supporting hepatitis C virus replication[J]. Biochem Biophy Res, 1996, 227(3): 822－826.

[8] Tagawa M, Kato N, Yokosuka O, *et al*. Infection of human hepatocyte cells lines with hepatitis C virus *in vitro*[J]. J Gastrol Hepatol, 1995, 10(5): 523－527.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2001)02-0207-01

经验与短篇

妥泰加用治疗难治性部分性癫痫 14 例疗效观察

Clinical study of Topiramate add-on to cure 14 cases of partial intractable epilepsy

史树贵，邵淑琴，张 帆，陈康宁 （第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆，400038）

我科 1999 年 3 月参加中华医学会组织的“多中心妥泰加用治疗部分性发作开放研究计划”项目，观察难治性癫痫病人 14 例，报告如下。

1 材料与方法

入选者为我科门诊或住院病人，男 10 例，女 4 例，年龄 12～51 岁，平均(33.71±15.82)岁，病程 2.5～25 年，平均(9.46±8.35)年，诊断部分性发作(PS)6 例，继发全面性发作(SGS)8 例；经 1 种以上一线抗癫痫药物治疗无效。病人入组标准、排除标准和研究方案均按“计划”进行。

统计学处理：采用 Wilcoxon 两样本秩和检验。

2 结果

所有病人均达目标剂量，月平均发作率下降百分数中位值：部分性发作：加量期 4 周末为 60.5%，8 周末为 63.5%，稳定期 4 周末为 88.5%，8 周末为 96%；SGS 组：加量期 4 周末为 23%，8 周末为 71.5%，稳定期 4 周末为 65.6%，8 周末为 73%。至稳定期时有效 8 例(发作次数下降率＞50%为有效)，占 57.1%。治疗前后差异显著($P<0.01$)。

3 讨论

妥泰是一种新型的单糖磺基衍生物，具有多种作用机制，对全面性发作、部分性发作、Lennox-Gastaut 综合征和肌阵挛发作等各种原发性癫痫均有不同疗效，疗效优于加巴喷丁和拉莫三嗪。其血浆结合率仅 13%～17%[1]，不需监测血药浓度。本研究参照“计划”选择 200 mg/d 为标准剂量。观察 4 个月发现其对部分性难治性癫痫的有效率为 57.1%(8/14)。文献报道该药的不良反应为头昏、疲劳，嗜睡、感觉异常、共济失调等，并可能引起肾结石。本观察发现主要副作用为嗜睡(28.4%)、头昏(50%)、肢体麻木(21.4%)，疲劳(7.1%)，个别患者粒细胞减少，但上述副作用均可耐受。此外，本研究中有 1 例患者在服药后第 12 周出现数次晕厥，是否与血压降低有关尚不明确，目前尚无该药引起血压变化的报道。本研究未发现因副作用而停药的患者。说明该药耐受性良好，是难治性癫痫加用治疗的有效手段。

关键词：癫痫；治疗
中图法分类号：R742.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ben Meuachem E, Henriksen O, Dam M, *et al*. Double-blind, placebo-controlled of topiramate (600 μg daily) for the treatment of refractory partial epilepsy[J]. Epilepsia, 1996, 37(3): 539－540.

（编辑 陈聪连）

作者简介：史树贵(1968－)，男，云南省陆良县人，博士研究生，主治医师，主要从事脑血管病和局限性肌张力障碍方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023)68753786

收稿日期：2000-02-24；修回日期：2000-08-13

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