DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.009

论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0224-03

HDV/HBV体外感染原代培养人胎肝细胞的实验研究

蒋业贵,李奇芬,毛青,王宇明,顾长海 (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:建立HDV/HBV感染人胎肝细胞体外培养系统。方法:利用HDV/HBV阳性血清同时感染体外培养的人胎肝细胞;应用ELISA、免疫组化法、原位杂交法和斑点法检测上清液和细胞中HBsAg、HDAg、HBV DNA和HDV cDNA。结果:上清液和细胞中HBsAg、HDAg、HBV DNA和HDV cDNA在感染后第2天至第16天均可测出,其中上清液中HBsAg、HDAg以感染后第4天至第12天达高峰。结论:HDV在原代培养人胎肝细胞中能稳定复制和表达至少达12 d。

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

In vitro infection of HDV/HBV in primary human fetal hepatocytes

JIANG Ye-gui, LI Qi-fen, MAO Qing, WANG Yu-ming, GU Chang-hai (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective: To establish an *in vitro* culture system of HDV/HBV-infected primary human fetal hepatocytes. Methods: The cultured primary human fetal heptocytes were simultaneously infected with HDV/HBV positive serum *in vitro*. HDAg, HBsAg, HDV cDNA and HBV DNA were detected with ELISA, immunohistochemistry, *in situ* hybridization and dot blot hybridization in supernatant and cells. Results: HDAg, HBsAg, HDV cDNA and HBV DNA were detected from the 2nd day to the 16th day after infection in supernatant and cells. Secretion of HDAg and HBsAg reached peaks from the 4th day to the 12th day after the infection in the supernatant. Conclusion: Primary human fetal hepatocytes are competent for infection with HDV/HBV. HDV and HBV can steadily replicate and express in HDV/HBV-infected human fetal hepatocytes and the replication and expression can at least last for 12 days.

Key words hepatitis B virus; HDV/HBV co-infection; human fetal hepatocyte; cell culture

目前,有关HDV的研究,主要是利用HDV基因转染细胞株,但这些细胞株不能完全模拟人体内肝细胞的生物学功能,用于研究HDV时,不能完全代表体内的情况。用人胎肝细胞作为感染对象,建立HDV/HBV感染人胎肝细胞培养系统,可很好解决上述不足。本研究应用HDV/HBV同时感染的方式感染人胎肝细胞,初步建立了HDV/HBV感染人胎肝细胞体外培养系统。

1 材料与方法

1.1 人胎肝细胞

人工流产22周龄胎儿肝脏,经体外两步灌流法分离肝细胞,台盼蓝染色细胞成活率达90%以上。

1.2 HDV/HBV感染血清

HBV感染血清取自本科一慢性乙型肝炎患者,ELISA检测HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗-HBc(+),血清斑点杂交HBV DNA(+),甲、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒标志均为阴性。HDV感染血清取自本科一丁型肝炎患者,ELISA检测HDAg(+)、抗-HD(+),血清斑点杂交HDV cDNA(+)。

1.3 实验方法

采用王宇明等[1]设计的体外两步灌注法首先分离出总肝脏细胞悬液,再以差速离心方法分离、纯化肝细胞。将分离的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570166)

作者简介:蒋业贵(1966.12),男,安徽省巢湖市人,博士研究生,住院医师,主要从事病毒肝炎的发病机制及治疗,发表论文10篇。电话:(023)68754217

收稿日期:1999-06-28;修回日期:1999-12-22

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

人胎肝细胞用含 10% 小牛血清(FBS)的 1640 培养液调整细胞浓度为 4× 10^5/ ml, 接种于 24 孔塑料培养板内, 每孔含培养液 0. 5 ml(即每孔含细胞数为 2× 10^5 个), 每 24 h 更换培养液。培养 48 h 后, 于培养液中同时加入 HBV、HDV 感染血清(终浓度均为 10%), 并在培养液中加入 4% 聚乙二醇(PEG)。37°C 培养 16 h(过夜)后, 弃去上清液, 细胞用 1640 培养液洗涤 3 次后(最后一次洗涤液留样待检), 加入含 10% FBS 和 2% 二甲基亚砜(DMSO)的新鲜 1640 培养液(不含 PEG)。每 48 h 更换培养液(培养液组成同前)。每 48 h 收集上清液和肝细胞。实验分为 HDV/ HBV 同时感染组和空白对照组(无 HDV/ HBV 感染)。

1. 4　检测指标及方法

培养人胎肝细胞于培养后每隔 2 d 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。培养上清液中 HBsAg、HDAg 检测, 采用 ELISA 法。细胞中 HBsAg、HDAg 检测, 采用免疫组化 S-P 法。细胞中 HBV DNA、HDV RNA 检测, 采用原位杂交法。培养上清液中 HBV DNA HDV RNA 检测, 采用斑点杂交法。同时设阳性对照、阴性对照、空白对照和替代对照。

2　结果

2. 1　培养人胎肝细胞形态的动态变化

实验前(即培养后 48 h)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, 基本铺满培养板孔底。实验组和对照组人胎肝细胞在培养后第 18 天一直维持正常的形态结构, 自培养后第 20 天开始, 人胎肝细胞逐渐死亡, 脱落于培养液中。

2. 2　HDV、HBV 在人胎肝细胞中稳定复制表达

留存洗涤液中 HBsAg、HDAg 均呈阴性, 感染后所有留存系列上清液中 HBsAg、HDAg 均呈阳性, HBsAg、HDAg 在感染后第 2 天至第 16 天均可测出, 以第 4 天至第 12 天达高峰, 见图 1。免疫组化检测细胞中 HBsAg、HDAg 均呈阳性表达, 见图 2、3, 空白对照组均呈阴性表达。双重染色显示 HBsAg 表达较 HDAg 稍广泛, HBsAg、HDAg 可在同一肝细胞中表达。原位杂交 HBV DNA、HDV cDNA 均呈阳性表达。上清中 HBV DNA 和 HDV cDNA 斑点杂交也均呈阳性表达。

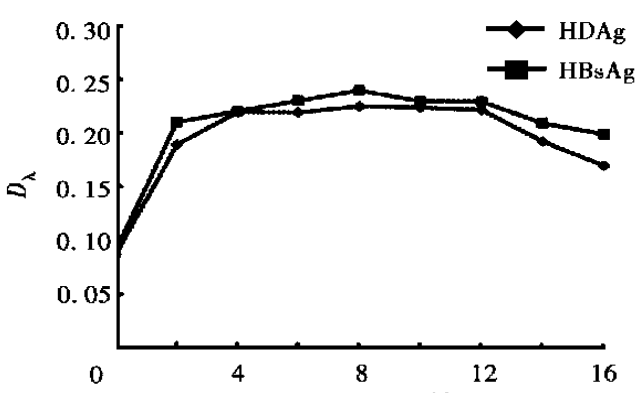


图 1　**HDV/ HBV** 感染人胎肝细胞培养上清中 **HBsAg** 和 **HDAg** 含量的动态曲线

Fig 1　Dynamic curves of HBsAg and HDAg content in supernatant

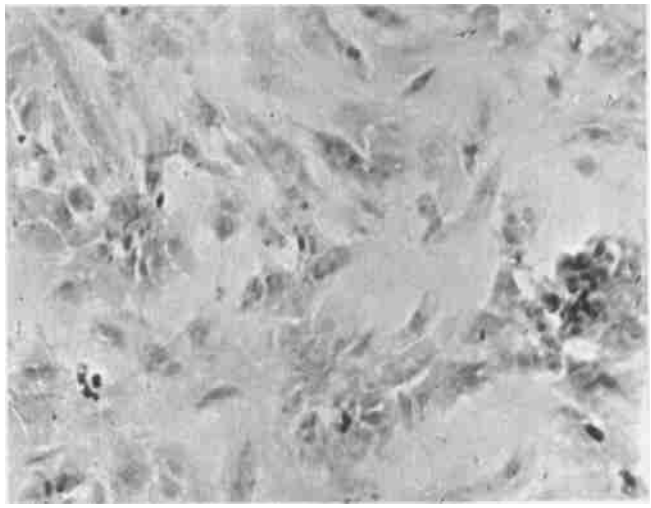


图 2　**HDV/ HBV** 感染后人胎肝细胞中有 **HBsAg** 表达　(S-P× 200)

Fig 2　Expression of HBsAg in the fetal hepatocytes after HDV/ HBV infection　(S-P× 200)

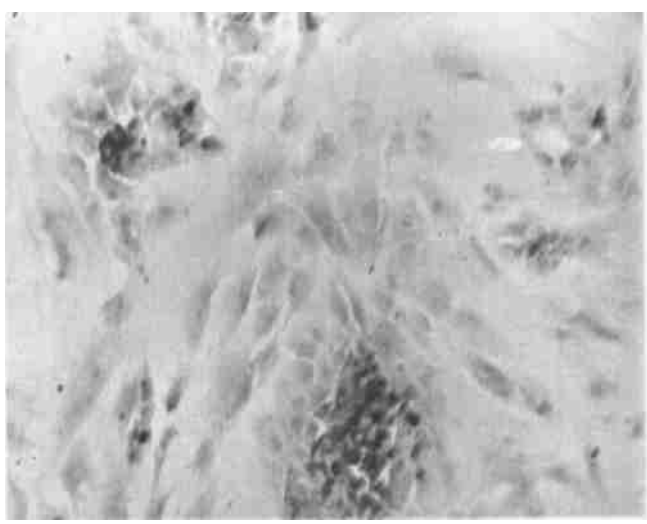


图 3　**HDV/ HBV** 感染后人胎肝细胞中有 **HDAg** 表达　(S-P× 200)

Fig 3　Expression of HDAg in the fetal hepatocytes after HDV/ HBV infection　(S-P× 200)

3　讨论

由于丁型病毒性肝炎(HD)及其相关疾病的复杂性, 对该病的多数研究必须借助体外实验进行。事实上, 目前获得的有关 HDV 感染及复制机制、HDV 基因调控、基因产物的功能、HDV 与 HBV 相互作用机制等均得益于 HDV 基因转移或转染细胞株[2, 3]。但有关研究尚存在许多不足, 如细胞株不能完全模拟人体内肝细胞的生物学功能, 用于研究 HDV 与肝细胞相互作用时, 不能真实反映体内情况。用人胎肝细胞作

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

为感染对象，建立HDV/HBV感染的人胎肝细胞体外培养系统，可很好解决上述不足。

要建立HDV/HBV感染人胎肝细胞体外培养系统，必须满足三个基本条件：①肝细胞体外培养达20 d以上；②肝细胞维持良好的增殖和分化功能；③HDV能在人胎肝细胞中稳定复制表达。肝细胞在体内受到来自门静脉血流的各种激素和细胞因子的调控，其中包括表皮生长因子、肝细胞生长因子、生长激素等，这些称为门脉嗜肝因子，能够促进和维持肝细胞的增殖和分化，有学者据此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，称为激素限量培养液(Hormone defined medium，HDM)，模拟肝细胞生长的环境，能够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[4]。本研究采用该方法成功地培养人胎肝细胞达20 d以上。HBV体外感染肝细胞培养系统的建立，国内外有较多报道[5,6]，而HDV/HBV体外感染肝细胞培养系统的建立，目前尚未见报道。本研究按照有关文献介绍的方法，成功地建立了HDV/HBV感染人胎肝细胞培养系统。鉴于长期体外培养人胎肝细胞有一定难度，故采用HBV、HDV同时感染方式感染人胎肝细胞，并在培养液中加入PEG以利HBV、HDV进入肝细胞。HDV的包装需HBsAg，故在培养液中加入DMSO以促进HBsAg的表达。

本研究发现，感染后第2天至第16天培养上清中可检出HBsAg，第4天至第12天达高峰，与国外有关文献报道一致，HDAg分泌与HBsAg相一致，以后HBsAg和HDAg分泌逐渐下降。分析其可能原因：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。

本研究认为HBV、HDV在人胎肝细胞中能稳定复制表达，其根据：①留存洗涤液标本中HBsAg和HDAg均呈阴性，斑点杂交示HBV DNA和HDV RNA也呈阴性，基本排除感染血清残留对实验造成的干扰；②细胞中HBsAg、HDAg、HBV DNA和HDV RNA均呈阳性，说明HBV和HDV已进入肝细胞；③由于每隔48 h更换培养液，系列培养上清中HBsAg、HDAg、HBV DNA和HDV RNA均呈阳性，且维持较前相同或稍高水平，有一分泌高峰，说明HBV和HDV及其表达的抗原持续分泌至培养液中。

HDV/HBV感染人胎肝细胞培养系统的建立虽是一初步研究，但却为HDV相关疾病的研究奠定了基础。

参考文献

[1] 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.

[2] Wang C，Suny S Y，Chen D S，*et al*. N-linked glycosylation of hepatitis B surface antigens is involved but not essential in the assembly of hepatitis delta virus[J]. Virology，1996，220(1)：28－36.

[3] Wu T T，Netter H J，Lazinski D W，*et al*. Effect of nucleotide changes on the ability of hepatitis delta virus to transcribe，process，and accumulate unit-length，circular RNA[J]. J Virol，1997，71(7)：5 408－5 414.

[4] Rumin S，Gripon P，Seyec J L，*et al*. Long-term productive episomal hepatitis B virus replication in primary cultures of adult human hepatocytes infected in *vitro*[J]. J Virol Hepatol，1996，3(5)：227－238.

[5] Jens H，Farideh F，Wolfgang S，*et al*. PH-independent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes[J]. Virology，1997，229(2)：292－294.

[6] Lu X，Block T M，Gerlich W H. Prolease induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line[J]. J Virol，1996，70(4)：2 277－2 285.

（编辑 王 红）

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