DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.016
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0549-04

论著

体外培养人肝癌细胞系7721中HCV复制和表达特性

宋志强,郝 飞,闵 峰,马巧玉,王宇明,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 建立支持HCV体外长期复制的细胞培养体系,研究其体外复制和表达特性。方法 将HCV感染血清接种人肝癌细胞系7721后,以逆转录-聚合酶链反应、免疫组化、原位杂交检测细胞内HCV的感染和复制情况。结果 细胞内和培养上清中在孵育后的3月余均可间断地检测出HCV正链和/或负链RNA,多种HCV抗原在细胞内能稳定表达;HCV RNA和抗原多位于胞浆中。结论 HCV在7721细胞系中的复制和表达与体内感染状态接近,此长期培养体系将是深入研究HCV的有效工具。

关键词:丙型肝炎病毒;7721细胞系;细胞培养;细胞体系;复制
中图法分类号:R394-3;R512.63 文献标识码:A

Characteristics of replication and expression of HCV cultured in a human liver cancer cell line *in vitro*

SONG Zhi-qiang, HAO Fei, MIN Feng, MA Qiao-yu, WANG Yu-ming, LIU Guo-dong (Clinical Center of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a long-term cell culture system in order to study the characteristics of HCV replication and expression *in vitro*. Methods Human liver cancer cell line 7721 was incubated in HCV-positive serum for 8 hours and then the infection and replication of HCV in 7721 cells were observed with RT-PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Results The plus- and minus-strand of HCV RNA was intermittently detected in the cells and the supernatant of the culture medium over a period of more than three months after incubation. Various antigen against HCV were expressed in cells. HCV RNA and the antigens were mainly located in the cytoplasm. Conclusion Our findings suggest that the replication and expression of HCV in the liver cancer cell line are similar to HCV infection of human body and this long-term cell culture system can serve as a valuable tool for the further study of HCV infection.

Key words: hepatitis C virus; cell line 7721; cell culture; cell model; replication

建立HCV体外长期培养体系是深入、系统研究HCV的前提。近年来国内外学者的探讨表明,多种细胞均可不同程度地支持HV的体外复制,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[1~5],但这些培养体系多以非肝细胞为主,且迄今国内尚未见HCV体外培养的报道。我们在前期的研究中利用HCV感染血清体外感染培养中的人肝癌细胞系7721获得了成功[6],为了研究体外长期培养人肝细胞中HCV复制和表达特性,我们对培养3月余的7721细胞内及其培养上清中的HCV病毒基因和/或抗原作了检测,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验血清 研究所用的感染血清均来自重庆地区丙型肝炎患者,所有血清均用Ortho抗HCV第二代ELISA试剂及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测证实抗HCV和HCV RNA为阳性。正常血清来自我院输血科健康献血员。血清无菌采

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,医师,主要从事分子病毒学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754187
收稿日期:1999-11-30;修回日期:2000-03-07

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

集后分装并冻存于－20℃，用前经56℃ 30 min灭活补体。

1.1.2 免疫组化试剂 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 NS_3 及 NS_5 单克隆抗体由北京医科大学肝病研究所提供[7]，HCV CP_{10} 单克隆抗体由本室制备[8]。

1.1.3 RT-PCR检测HCV正、负链RNA试剂盒 由北京医科大学肝炎试剂中心提供。

1.1.4 原位杂交试剂 Dig标记的HCV正链寡核苷酸探针序列位于HCV 5′非编码区，即(－95～－56 nt)5′-CTGCTAGCC-GACTAGTGTTGGGTCCGCGAAACCGCTTGTGG-3′，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(工作浓度1∶500)、封闭试剂和NBT/BCIP液均为德国宝灵曼公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 HCV感染血清接种细胞 同时设立感染组和对照组。取细胞生长良好的培养瓶/板，移去培养基，加入HCV感染血清(感染组，感染血清终浓度为10%)或等量的正常人血清(正常对照组)或等量的生理盐水(空白对照组)，再加入适量完全培养基(含10%小牛血清)，轻轻摇匀，置入培养箱37℃孵育8 h后，弃上清，以PRMI-1640充分洗涤4～6次，并留取最后1次洗液以待检，然后再加入培养基继续培养。感染后每5 d收集部分培养上清、细胞或长有细胞的玻片(细胞爬片)。

1.2.2 细胞内及培养上清中HCV正、负链RNA的检测 采用RT-PCR方法，按操作说明书进行。简要步骤：提取HCV RNA，加入逆转录反应体系(检测正链RNA时选择负链引物，检测负链RNA时选择正链引物)，37℃ 60 min，95℃ 5 min；在逆录产物中加入PCR反应缓冲液(含聚合酶及HCV正链或负链外引物)94℃ 1 min，55℃ 1.5 min，72℃ 2 min，60个循环后，72℃继续反应10 min，取扩增产物10 μl与1 μl载样缓冲液混合，加样于含溴化乙锭的2%琼脂糖，于1×TAE缓冲液中，在5 V/cm的电压下电泳30 min。在紫外灯下观察145 bp处有荧光带者即为阳性。

1.2.3 免疫组化检测细胞内HCV抗原 取制备好的细胞爬片(或淋巴细胞涂片)，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 2 min，20%的正常羊血清37℃孵育10 min，吸去多余的液体；加入HCV NS_3、NS_5 或 CP_{10} 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，照相。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。

1.2.4 原位杂交 细胞爬片(涂片)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 细胞生长和表型变化

培养中的7721细胞多呈椭圆形或梭形，连接成片状。接种和未接种感染血清的细胞生长均良好，细胞生长速度无明显区别，感染后细胞形态光镜下未见明显的变化。

2.2 HCV RNA的检出结果

细胞内HCV正链和负链RNA的首次检出时间分别在感染后第2天和第3天，二者的检出率接近。培养上清中正链RNA从感染后的第2天一直到第95天均可间断地检测到；培养上清中未检出负链RNA，见表1。最后1次洗液、加正常人血清的正常对照组和未加任何人血清的空白对照组均阴性。

表1 细胞内和培养上清中HCV正、负RNA的检测

Tab 1 Detection of plus-and minus-strand of HCV RNA in cultured cells and supernatant

Time after infection (d)	Cells		Supernatant	
	Plus-strand	Minus-strand	Plus-strand	Minus-strand
1	－	－	－	－
2	++	－	++	－
3	++	+	++	－
5	－	－	+	－
15	++	++	++	－
20	++	++	++	－
30	++	+	++	－
40	－	－	－	－
45	++	++	++	－
52	++	+	－	－
62	++	++	++	－
66	+	++	+	－
70	－	+	－	－
80	+	+	+	－
85	+	－	+	－
95	+	－	－	ND

+: weakly positive; ++: positive; －: negative; ND: not detected

2.3 细胞内HCV抗原的表达

在细胞接种感染血清及传代后用S-P法检测细胞内的不同抗原的表达，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；阳性物质呈细小颗粒，多呈胞浆均质型，少数呈胞浆不均质型；少数细胞核内亦可见阳性表达。光镜下

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

阳性细胞未见形态的变化。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　感染细胞内 HCV 负链 RNA 的定位

在细胞接种感染血清后不同时间的杂交片中, 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。空白对照组、正常对照组未见杂交信号。

2.5　细胞传代对 HCV 复制的影响

在感染后每隔 3～5 d 将细胞消化后进行传代。发现传代多次后细胞内和/或培养上清中仍可检测到 HCV RNA; 免疫组化证实传代细胞内有 HCV 抗原的表达; 原位杂交可见蓝色着色的杂交阳性细胞。

2.6　感染细胞分泌成熟病毒颗粒的验证

为证实 7721 细胞感染 HCV 后能分泌具有感染性的成熟病毒颗粒, 我们在实验中采取了两种方案: ① 不同细胞的共孵育: 先彻底洗去已感染 HCV 的 7721 培养体系中的培养上清, 然后加入健康人的淋巴细胞及培养基继续培养, 2～3 d 后收集淋巴细胞做 HCV 感染指标的检测。结果发现淋巴细胞内可检出 HCV RNA 和抗原表达。② 用培养上清感染新鲜细胞: 将 7721 细胞感染后的培养上清与新鲜的 7721 细胞共同孵育后, 如前彻底洗去培养上清, 收集标本检测新鲜细胞感染情况。结果显示新鲜的 7721 细胞及其培养上清中 HCV RNA 阳性, 细胞内可见 HCV 抗原表达。

3　讨论

HCV 分子生物学方面的研究已有很大进步, 但其感染的机制、复制的方式及疫苗研制等尚未完全明确和解决, 这主要是因为迄今一直缺乏适宜 HCV 感染和复制的细胞和动物模型。发展有效的体外培养体系是深入研究 HCV 的前提。尽管目前的研究已证实 HCV 可在人 T 细胞中长期复制, 但 HCV 感染非肝细胞的方式和途径是否类似体内感染肝细胞, 以及在非肝细胞细胞中的长期培养的 HCV, 其生物学特性是否已经发生改变, 尚存在许多疑问[4]。

肝细胞是体内 HCV 感染的自然靶细胞, 用自然存在于血液中的 HCV 直接感染培养人肝细胞建立的细胞模型可能会更接近自然感染状态, 可为系统地研究 HCV 感染、复制、抗原表达及病毒颗粒的蛋白形成, 为 HCV 病原学、发病机制及尤其是疫苗的筛选等方面的研究打下基础。

本研究中, 我们将 HCV 感染血清接种 7721 细胞后, 从细胞和/或培养上清中检出 HCV 的正链 RNA 及负链 RNA(复制中间体)。我们认为细胞及培养上清中检出的 HCV RNA 是新复制的, 而不是感染血清残留的, 因为所用的感染血清中未检出负链 RNA, 且感染血清与细胞共同孵育 8 h 后经 4～6 次洗涤留取的最后一次洗液经 RT-PCR 检测证实为阴性。

我们研究发现, 细胞接种感染血清后的 HCV 正、负 RNA 的出现似乎并无规律可循。正链和负链 RNA 在培养细胞内并非持续阳性, 而是间断检出; HCV 正、负链 RNA 可单独或同时阳性或在一段时间内均为阴性, 说明 HCV 在体外培养细胞中的复制是间歇性的。这与丙型肝炎患者病毒血症及其他细胞培养体系的结果相似[1～4]。

Ikeda 等[5] 对 MT-2 和 PH5CH 细胞(人非肝肿瘤细胞系)对不同基因类型的 HCV 易感性所作的对比研究中发现, HCV 感染某种细胞并在其中能够得到长期复制能力与细胞类型有关, 即具有细胞嗜性(Cell tropism), 表现在 HCV 感染和复制进程中 HVR1 的准株逐渐转变同源性, 并且仅仅是血清中一种占少数的 HCV 株被选择和适应在细胞内复制。我们目前正在对此培养体系做上述现象的研究。

有关 HCV 患者肝组织中 HCV 抗原和 HCV RNA 原位杂交的报道较多, 而有关培养细胞中 HCV 抗原的表达和 HCV RNA 的定位研究报道不多。我们的结果显示, 表达 HCV 三种抗原的细胞多呈点状和散在分布, 弥漫性分布少见; 抗原在细胞内的表达多呈全胞浆型和局灶型, 少数细胞核亦可见阳性表达; 感染细胞内存在 HCV 负链 RNA 的杂交信号呈蓝紫色细小颗粒, 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, 这些现象与其他细胞培养体系及丙型肝炎患者肝组织的检测结果相似[1,2,4,9,10], 提示 HCV 在体外培养 7721 细胞中的复制及表达特征可能和体内十分接近。

培养细胞能分泌具有感染性的病毒颗粒是体外 HCV 培养成功的重要标志。我们在研究中证实, 已感染 HCV 的 7721 与健康人的淋巴细胞共孵育后能使后者亦感染上 HCV, 且前者的培养上清可以再次感染新鲜的 7721 细胞, 提示 7721 细胞感染 HCV 后可分泌具有感染性的病毒颗粒, 这对进一步研究 HCV 病毒颗粒性状乃至可能的病毒纯化都有着重要意义。

人肝癌细胞系 7721 来源较易, 细胞纯度好, 7721 细胞感染 HCV 后经数次传代后仍可间断地检出 HCV 复制和抗原表达, 说明 HCV 在本培养体系中的复制和表达具有良好的稳定性, 此细胞培养体系对深入、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良好的应用前景。

参考文献:

[1] 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.

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

[2] Shimizy Y K, Iwamoto A, Hijikata M, *et al*. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(12): 5 477—5 481.
[3] Zibert A, Schreier E, Rkggendorf M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment[J]. Virology, 1995, 208(2): 653—661.
[4] Iacovacci S, Manzin A, Barca S, *et al*. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected *in vitro*[J]. Hepatology, 1997, 26(5): 1 238—1 337.
[5] Ikeda M, Kato N, Mizutani T, *et al*. Anlysis of cell tropism of HCV by using *in vitro* HCV-infected human lymphocytes and hepa-tocytes[J]. J Hepatol, 1997, 27(3): 445—454.
[6] 宋志强, 郝 飞, 王宇明, 等. 人肝癌细胞株 HCV 体外感染模型的建立[J]. 华人消化杂志, 1999, 7(2): 179.
[7] 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.
[8] 王 阁, 李梦东, 郝 飞, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立和初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(4): 289—291.
[9] 赵西平, 杨东亮, 程玉芳, 等. 丙型肝炎病毒感染者肝组织中病毒抗原的表达[J]. 中华传染病杂志, 1996, 14(2): 81—84.
[10] 黄德庄, 闫惠平, 郎振为, 等. 地高辛标记探针原位杂交法检测肝组织中丙型肝炎病毒 RNA[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10(4): 262—266.

（编辑 郭建秀）

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)06-0552-01

28 例原发髓外硬膜下肿瘤的 MRI 诊断

MRI of primary intradural extramedullary tumor

陆 明, 杜义 （第三军医大学附属西南医院放射科, 重庆 400038）

MRI 对于脊柱和脊髓病变的诊断具有极大的优越性。本研究对 28 例髓外硬膜下肿瘤的 MR 诊断进行回顾性分析, 探讨 MR 的定位定性诊断价值。报告如下。

1 临床资料

28 例髓外硬膜下肿瘤均经手术病理证实, 其中男性 16 例, 女性 12 例。年龄 16～65 岁, 平均 46.4 岁。28 例肿瘤中神经鞘瘤 9 例, 神经纤维瘤 7 例, 脊膜瘤 5 例, 表皮样囊肿 3 例, 脂肪瘤 2 例, 皮样囊肿和畸胎瘤各 1 例。

采用 Siemens 公司 Magnetom Open 型 0.2 T 磁共振成像系统。常规检查序列为矢状位 SE 序列 T_1WI, Turbo SE 序列 T_2WI, 横断位 SE 序列 T_1WI。另有 8 例同时做了冠状位扫描。层厚为 4～5 mm, 层距为 2～4 mm。FOV 为 200～250 mm。采集次数为 3～6 次。其中 22 例做了 Gd-DTPA 增强, 剂量为 0.1 mmol/kg, 检查均在静脉注射后即刻开始。

2 结果

所有病例定位准确率 96.4%（27/28 例）, 定性准确率 71.4%（20/28 例）。

神经鞘瘤 9 例, 男 7 例, 女 2 例, 26～63 岁。颈段 2 例, 胸段 7 例。位于后侧方的 6 例, 余 3 例位于前侧方。大小 1 cm× 1.2 cm～1.6 cm× 3.5 cm。均边界清楚锐利。T_1WI 显示病灶多呈等信号, T_2WI 显示病灶多呈高信号（与脊髓信号比）, 内部信号可从相当均匀（2/9）到几乎完全囊变（1/9）, 可见斑点状出血（2/9）。增强后呈明显强化, 囊变者呈外周环状强化。7 例局限于椎管内, 2 例呈哑铃形向椎管外生长, 伴椎弓根破坏。

神经纤维瘤 7 例, 男 3 例, 女 4 例, 23～65 岁。胸段 6 例, 颈段 1 例。大小 1.5 cm× 2.0 cm～5.3 cm× 6.3 cm。位于前侧方 5 例, 后侧方 2 例。4 例局限于椎管内, 其中 3 例有囊变, 均无出血, T_1WI 病灶呈等或低信号, T_2WI 呈等或高信号, 增强后表现为外周环状强化。3 例呈哑铃形, 伴同侧椎弓根和椎板等破坏, 在 T_1WI 呈等信号, T_2WI 呈高信号, 信号略有不均, 增强后有明显强化。其中有 1 例因与脊髓粘连紧密且纵行生长而误诊为髓内肿瘤。

脊膜瘤 5 例, 男 1 例, 女 4 例, 40～58 岁。均位于胸段。4 例在脊髓侧后方, 1 例在左前方。大小 1.5 cm× 1.7 cm～1.9 cm× 3.2 cm。边界清楚锐利。病灶在 T_1WI 和 T_2WI 上均呈等信号, 信号多均匀, 个别信号不均（1/5 例）。增强后有明显均匀强化。

表皮样囊肿 3 例, 均为男性, 16～42 岁。胸段 1 例, 腰段 2 例。均表现为腊肠状肿块, 纵径较长, 在 10 cm 左右。局限于椎管内, 边界清楚锐利。T_1WI 为低或等低混杂信号, T_2WI 为显著高信号。增强后均无强化。

脂肪瘤 2 例, 均在颈段, 其中 1 例伴有脊髓低位及原发栓系综合征。T_1WI 和 T_2WI 均表现为高信号。

（下转 556 页）

作者简介: 陆 明（1966—）, 男, 河北省沧州市人, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事 MRI 诊断方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68754172

收稿日期: 1999-02-25; 修回日期: 1999-12-22

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