

HCV 感染实验探讨人胎盘滋养层细胞分子生物性及侵袭力

聂青和, 张亚飞, 程勇前, 罗新栋, 杨 洁, 杨艳红

(第四军医大学唐都医院, 陕西 西安 710038)

[摘要] **目的** 探讨持续感染丙型肝炎病毒(HCV)对体外培养人胎盘合体滋养层细胞分子生物学性状及其金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 合成及分泌的影响。**方法** 分别采用 Matrigel 人工重建基底膜侵袭实验、MTT 法细胞黏附实验、细胞移动实验, 研究 HCV RNA 阳性患者血清感染的体外培养人胎盘滋养层细胞(感染组)侵袭能力以及侵袭相关的黏附、移动能力的改变; 检测培养上清中人绒毛膜促性腺激素(HCG)浓度以评估感染对细胞激素合成、分泌能力的影响。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养上清 MMP-2 和 MMP-9 水平, 分析感染组和对照组(健康体检者血清培养)数据间的差异, 并用明胶酶谱进一步验证 ELISA 结果。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法分析感染对细胞 proMMP-2 和 proMMP-9 mRNA 表达的影响。**结果** 感染组细胞侵袭、黏附、移动以及激素合成、分泌能力较对照组细胞均显著下降($P < 0.05$)。感染组细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 能力明显下降(与对照组比较, MMP-2: $t = 4.186, P < 0.05$; MMP-9: $t = 2.325, P < 0.05$); RT-PCR 结果显示感染组细胞 proMMP-2 和 proMMP-9 mRNA 表达弱于对照组, 但差异无显著性(proMMP-2: $t = 1.196, P > 0.05$; proMMP-9: $t = 1.417, P > 0.05$)。**结论** 持续 HCV 感染的体外培养人胎盘合体滋养层细胞 MMP-2 和 MMP-9 合成、分泌能力下降。持续感染 HCV 可抑制体外培养人胎盘合体滋养层细胞包括侵袭能力和激素合成、分泌能力在内的多种生物学功能。

[关键词] 丙型肝炎病毒; 胎盘; 合体滋养层细胞; 分子生物学; 金属蛋白酶-2; 金属蛋白酶-9; 体外实验

[中图分类号] R512.6⁺3 R321.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)02-0076-05

Effect of HCV persistent infection on molecular biological characteristics and invasiveness of human placental trophoblast

NIE Qing-he, ZHANG Ya-fei, CHENG Yong-qian, LUO Xin-dong, YANG Jie, YANG Yan-hong (Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710038, China)

[Abstract] **Objective** To explore hepatitis C virus (HCV) persistent infection on biological characteristics, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 synthesis and secretion of cultured human placental syncytiotrophoblast (HPS). **Methods** The artificial reconstruction basement membrane Matrigel invasion assay, MTT cell adhesion and cell motility experiments were used to study the change in invasion, invasion-related adhesion and mobility of HPS(infected group) infected by serum of HCV RNA positive patients in vitro; concentrations of human chorionic gonadotropin (HCG) cultured in supernatant was detected to assess the impact of infection on cell hormone synthesis and secretion. MMP-2 and MMP-9 levels in cell culture supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), the differences between data of infected and control group(serum culture of healthy persons) was compared, the results of ELISA was further validated by gelatin zymography, impact of infection on cell proMMP-2 and proMMP-9 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. **Results** The cell invasion, adhesion, motility as well as the ability of synthesis and secretion of hormone in infected group decreased significantly than those of control group ($P < 0.05$). Secretion of MMP-2 and MMP-9 in infected group decreased obviously compared with control group (MMP-2: $t = 4.186, P < 0.05$; MMP-9: $t = 2.325, P < 0.05$); RT-PCR results showed that expression of proMMP-2 and proMMP-9 mRNA in infected group was lower than control group, but the difference was not

[收稿日期] 2009-12-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30771891)

[作者简介] 聂青和(1961-),男(汉族),江西省进贤县人,教授、主任医师、博士生导师,主要从事丙型肝炎与肝纤维化研究。

[通讯作者] 聂青和 E-mail: nieqinghe@163.com

significant (proMMP-2; $t = 1.196$, $P > 0.05$; proMMP-9; $t = 1.417$, $P > 0.05$). **Conclusion** The capacity of HCV persistent infected HPS to synthesize and secrete MMP-2 and MMP-9 reduced. Persistent infection with HCV can inhibit a variety of biological functions, including invasiveness and hormone synthesis and secretion of HPS cultured in vitro.

[**Key words**] hepatitis C virus; placenta; syncytiotrophoblast; molecular biology; MMP-2; MMP-9; in vitro test

[Chin Infect Control, 2010, 9(2): 76-80]

我们在前期研究工作中发现,人胎盘滋养层细胞可以感染丙型肝炎病毒(HCV),而且持久感染可导致超微结构的明显改变。体外培养的人胎盘滋养层细胞持续感染 HCV 后可出现多种类似黄病毒科病毒感染后的超微结构改变,主要表现为溶酶体大量增生,粗面内质网增生,脂滴减少,出现空泡状结构等^[1-4]。一般而言,细胞超微结构的改变理论上可以直接影响其细胞的生物性状。因此,我们采用 Matrigel 人工重建基底膜侵袭实验来研究 HCV 感染对体外培养人胎盘滋养层细胞侵袭能力的影响,探讨 HCV 持续感染对体外培养人胎盘合体滋养层细胞分子生物学性状的影响,并了解 HCV 感染抑制合体滋养层细胞侵袭能力的具体分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 HCV 阳性血清及正常人血清 实验用 HCV 感染阳性血清采集自本院传染病科丙型肝炎住院患者,其血清抗 HCV 检测阳性,其他肝炎病毒标志物(HBV-M、抗 HAV、抗 HEV、抗 CMV、抗 EBV)均阴性,抗 HIV 阴性,肝脏生化检验正常。扩增敏感试验定量检测 HCV RNA 5.2×10^6 copies/L,基因分型 HCV-1b 亚型。正常人血清采集自门诊健康体检人员,经检测,其乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、抗 HCV 均阴性,肝脏生化检验正常。血清为无菌采集,分装后 -20°C 冻存,用前经 56°C , 30 min 灭活补体,备用。

1.1.2 试剂 Percoll 细胞分离液为 Pharmacia 公司产品;免疫组化染色用 ABC 试剂盒购自华美生物工程公司,所用细胞角蛋白及波形蛋白抗体购自宝泰克生物工程公司;QIAmp viral RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品;HCV RNA 定性检测试剂盒购自 Acegene 公司;Matrigel 人工重建基底膜材料购自 BD 公司;Transwell 小室(8 μm)为 Millipore 公司产品;金属蛋白酶(MMP)-2(Ab2)和 MMP-9(Ab1)鼠抗人多抗为 Lab Vision 产品;RNA 提取试

剂盒和 RNA PCR 试剂盒均为 Promega 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 人胎盘滋养层细胞的分离、纯化、培养及鉴定 应用我们改良的分离、纯化方法取得人胎盘滋养层细胞^[5-6],胎盘绒毛组织取自第 10 周手术流产胎儿。

1.2.2 HCV 体外感染实验 培养瓶中滋养层细胞于 37°C , 5% CO_2 孵箱内培养 24 h 后进行第 1 次换液。其中感染组培养基为含 20% 丙型肝炎患者血清和 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液;正常对照组培养基为含 20% 正常人血清和 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液。此后每 24 h 换液一次,共 6 次。

1.2.3 体外侵袭实验及细胞移动实验 将 Matrigel 包被好的 Transwell 小室放入 24 孔培养板中,小室外加入 400 μL 按 1:1 混合的条件培养液(无血清培养 24 h 的 NIH3T3 细胞上清液)和完全培养液(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液)。用 0.25% 的胰酶消化培养于培养瓶中的细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,然后将细胞悬液加至 Transwell 小室中,每小室 100 μL ,含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液为培养基。感染组和对照组每组各 6 份样本。第 6 次换液时,培养于培养瓶中的细胞更换同样培养基,培养 24 h 后胰酶消化细胞;培养于 12 孔培养板中的细胞换无血清 DMEM 培养液,培养 24 h 后取上清为检测标本。 37°C 5% CO_2 温箱孵育 24 h 后,取膜,甲醛固定,HE 常规染色,用棉签将未穿过膜的细胞擦掉,封片。每张滤膜于 100 倍光镜下随机挑取 8 个视野计数穿膜的细胞,取均值。细胞移动实验:除 Transwell 小室膜不铺 Matrigel 外,其余步骤同侵袭实验。

1.2.4 MTT 法细胞黏附实验 取 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液 100 μL 分别接种于已包被 IV 型胶原的 24 孔板内,于 37°C 保温 30 min、60 min 和 2 h 后,轻轻弃去未粘着细胞,加 200 $\mu\text{L}/$ 孔的 DMEM 培养液及 20 $\mu\text{L}/$ 孔 MTT 液, 37°C 孵育 4 h 后吸除各孔上清液,加 200 $\mu\text{L}/$ 孔 DMSO,在自动酶标读数仪上以 490 μm 波长测定各孔 OD 值。感染组和对

对照组各 6 份样本,每份样本设 3 个平行孔,取均值。以 30 min、60 min 的 OD 值比 2 h OD 值计算得出各时间组的细胞黏附率,进行统计检验。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测培养细胞 proMMP-2 和 proMMP-9 mRNA 的表达
用 Promega 公司的 Total RNA Isolation System 提取培养于 12 孔板内的细胞总 RNA,操作按说明书进行(引物序列见表 1)。取 PCR 扩增产物 10 μ L 加入 2% 琼脂糖凝胶孔中电泳,溴化乙锭显色后成像定量分析,用 MMP/ β -actin 比值表示 MMP 表达水平。感染组和对照组均设 6 份平行标本。

表 1 proMMP-2、proMMP-9、 β -actin 引物序列

Table 1 Primer sequences of proMMP-2, proMMP-9 and β -actin

引物	核苷酸序列	产物大小 (bp)
proMMP-2	正义链 5'-ACCTGGATGCCGTCGTGGAC-3'	450
	反义链 5'-TGTGGCAGCACCAAGGCAGC-3'	
proMMP-9	正义链 5'-GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCT-3'	350
	反义链 5'-GTCGCCCTCAAAGTTGGAA-3'	
β -actin	正义链 5'-ACCCCACTGAAAAA-3'	120
	反义链 5'-ATCTCAAACCTCCATGATG-3'	

1.2.6 培养上清 MMP-2 和 MMP-9 的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 留取 12 孔板内最后一次培养上清为检测样本。双夹心酶联 ELISA 法测定 MMP-2 和 MMP-9 水平,包被浓度 20 μ g/mL。ELISA 读数仪(ELx800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC, USA)450 nm 波长处测吸光度 A 值(OD 值)。

1.2.7 明胶酶谱分析^[7] 将培养于培养瓶中的感染组和对照组胰酶消化后细胞 100 μ L(细胞浓度为 1×10^6 /mL)重新接种于 96 孔培养板,完全 DMEM 培养液培养 24 h,弃去培养上清,用 PBS 清洗 2 次后,换无血清 DMEM 培养液培养 24 h。收集无血清培养上清,低速离心(200 g)去除细胞碎片后进行 SDS-PAGE 电泳,结束后以凝胶洗脱液洗脱 1 h,接着将凝胶置于孵育液 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,考马斯亮蓝染色 4 h,脱色至蓝色背景出现透亮带。光密度扫描下摄片。

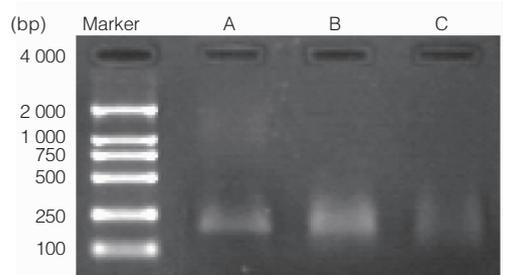
1.2.8 培养上清人绒毛膜促性腺激素(HCG)浓度的检测 细胞培养 7 d 后,以全自动化学发光免疫分析系统(Beckman ACCESS)检测培养瓶上清液 β -HCG 浓度,单位 ng/mL。

1.3 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表

示,采用两样本 *t* 检验(two-sample t-test)分析两组间数据差异。上述检验均采用 SPSS13.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 细胞的生物行为观察及鉴定 细胞染色结果显示,分离纯化后培养的细胞中细胞角蛋白染色阳性而波形蛋白染色阴性的细胞占绝大多数,少见波形蛋白染色阳性的血管内皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞。证实培养细胞为滋养层细胞。细胞培养 12 h 后,可见由滋养层细胞相互融合而成的合体滋养层细胞,并随时间推移逐渐增多。细胞培养 7 d 后,光镜下培养细胞多见形态不规则的细胞(合体滋养层细胞)。感染组细胞与对照组细胞镜下观察相比,体积多较小。滋养层细胞内 HCV RNA 定性检测结果(图 1)显示感染组细胞感染实验成功。



Marker:DL 2000;A:感染组;B:阳性血清对照;C:对照组

图 1 RT-PCR 检测滋养层细胞内 HCV RNA 结果

Figure 1 PT-PCR products of HCV RNA in syncytiotrophoblast

2.2 体外侵袭实验结果 Matrigel 人工重建基底膜侵袭实验显示,对照组和感染组均有细胞穿过铺有 Matrigel 胶的滤膜,穿膜细胞数分别为 65.00 ± 4.91 和 34.83 ± 3.93 ,感染组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。镜下可见形态不规则的合体滋养层细胞穿膜后多呈梭形,也有部分细胞恢复不规则形态(图 2)。对照组形态不规则,细胞核较大的细胞数相对较多。

2.3 细胞黏附实验结果 MTT 法细胞黏附实验测定结果显示(表 2),感染组 30 min 和 60 min 细胞黏附率均低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.4 细胞移动实验结果 感染组细胞移动能力显著低于对照组 ($P < 0.05$)。穿微孔细胞数,感染组为 47.50 ± 4.28 ,显著低于对照组的 88.50 ± 6.21 。

2.5 MMP-2 和 MMP-9 的 RT-PCR 检测结果 感

染组细胞 proMMP-2 和 proMMP-9 mRNA 表达水平弱于对照组(图 3),但差异不明显,无统计学意义 (proMMP-2: $t = 1.196, P > 0.05$; proMMP-9: $t = 1.417, P > 0.05$)。

2.6 MMP-2 和 MMP-9 水平的 ELISA 检测结果

所选抗体均可识别培养上清中酶原形式以及特异性蛋白酶水解后的 MMP-2 和 MMP-9。ELISA 检测结果显示(图 4),感染组细胞培养上清 MMP-2 和 MMP-9 水平均显著低于对照组 (MMP-2: $t = 4.186, P < 0.05$; MMP-9: $t = 2.325, P < 0.05$)。

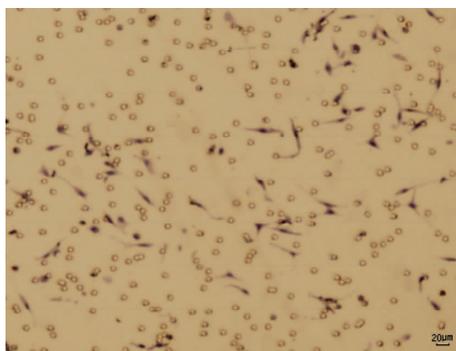


图 2 感染组体外侵袭实验结果

Figure 2 Result of Matrigel invasion assay

表 2 细胞黏附实验结果(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Result of cell adhesion experiment(%, $\bar{x} \pm s$)

时间	细胞黏附率		P
	感染组	对照组	
30 min	22.61 ± 3.24	32.46 ± 2.97	<0.05
60 min	52.63 ± 4.78	78.46 ± 3.69	<0.05

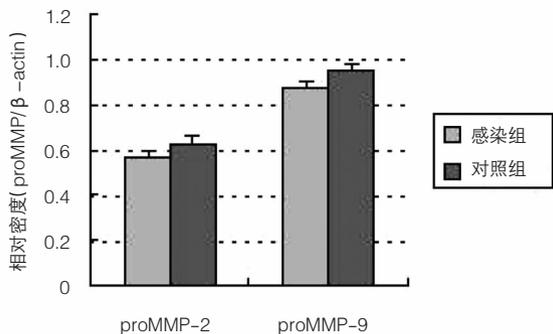


图 3 MMP-2 和 MMP-9 的 RT-PCR 检测结果

Figure 3 RT-PCR results of MMP-2 and MMP-9

2.7 酶谱分析结果 细胞培养上清中 MMPs 主要以酶原形式存在,且感染组 92 kD(proMMP-9)和 72 kD(proMMP-2)处条带均弱于对照组(图 5),表明感染组细胞培养上清中 MMP-9 和 MMP-2 的酶活性均低于对照组,进一步证实了 ELISA 检测的结果。

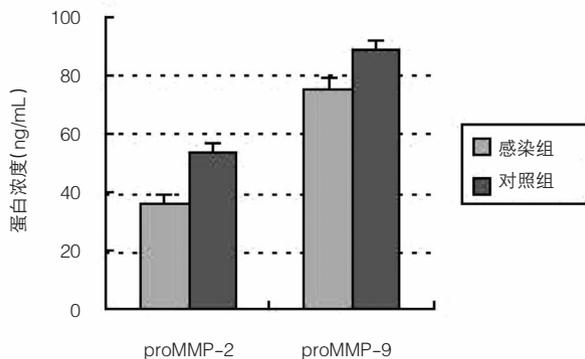


图 4 MMP-2 和 MMP-9 水平的 ELISA 检测结果

Figure 4 Levels of MMP-2 and MMP-9 detected by ELISA

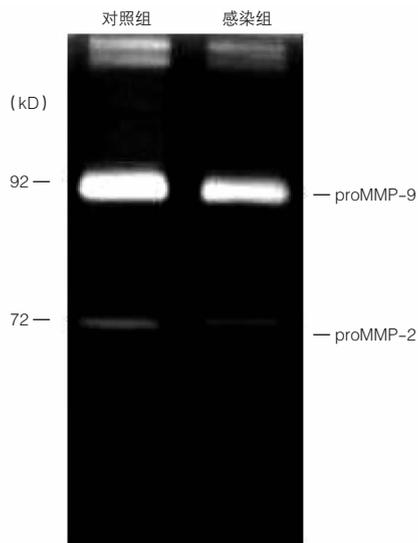


图 5 明胶酶谱分析结果

Figure 5 Result of gelatin zymography

2.8 HCG 浓度测定结果 感染组细胞培养上清 HCG 浓度为 (1.57 ± 0.14) ng/mL, 低于对照组的 (2.10 ± 0.12) ng/mL, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

合体滋养层细胞类似于肿瘤细胞,具有一定的侵袭能力,这种能力对受精卵着床以及胎盘的形成为十分重要的意义,其可侵入母体子宫蜕膜,并浸润子宫螺旋动脉,建立母体/胎儿的交互式循环,为胚胎的发育提供营养^[8]。我们的研究表明,持续的 HCV 感染可抑制合体滋养层细胞的侵袭能力,侵袭能力的降低可导致合体滋养层细胞对子宫螺旋动脉浸润不足,影响妊娠生理性胎盘床血管重铸,使胎盘血流灌注不足,导致胎盘缺血缺氧,影响胎儿发育,甚至导致自然流产^[9]。这一结果也与一项涉及 3 491 名孕妇的流行病学调查结果相符^[10],该调查

认为 HCV 感染孕妇自然流产率高于普通人群,且在 HCV-1b 型感染孕妇中更为显著。

合成、分泌激素是合体滋养层细胞的另一项重要生物学功能,其分泌的 HCG、HPL、妊娠特异性 β_1 糖蛋白(PS β_1 G)、雌激素、缩宫素酶、耐热性碱性磷酸酶等对胎盘的生成、妊娠的维持以及胎儿的发育等有重要的意义^[9]。根据研究结果,我们认为持续 HCV 感染抑制了合体滋养层细胞的激素合成能力,推测这与内质网形态改变及脂滴减少等超微结构改变有关。此外,HCG、雌激素等对滋养层细胞的分化以及合体滋养层细胞的形成等也有十分重要的意义,此类激素的分泌减少也可能是 HCV 感染后合体滋养层细胞侵袭能力下降的部分原因。

联合细胞黏附以及移动实验结果,可以推论出 HCV 持续感染可抑制合体滋养层细胞的多种生物学性状。我们在实验中观察到感染组合体滋养层细胞的形成较对照组为慢,且体积较小,这是否是 HCV 持续感染抑制合体滋养层细胞的生物学性状的上游原因,尚需进一步实验研究确定。

MMPs 是一类能降解细胞外基质(ECM)的锌离子依赖性内肽酶,到目前为止,已发现有 29 个家族成员^[11],其中 MMP-2(pro-form, 72 kD; active form, 66 kD)和 MMP-9(pro-form, 92 kD; active form, 86 kD)又称 IV 型胶原酶或明胶酶(gelatinases),是参与合体滋养层细胞侵袭的关键酶^[12]。在囊胚植入内膜,胎盘尚未形成前(7~11 周),人合体滋养层细胞同时分泌酶原形式的 proMMP-2 和 proMMP-9,随后其被特异性蛋白酶分解为 MMP-2 和 MMP-9,参与胚胎的植入过程及胎盘(胎盘屏障)的形成^[13]。合体滋养层细胞的侵袭能力依赖于 MMP-2 和 MMP-9 的正常合成分泌。

我们以培养上清 HCG 为检测因子,评估感染细胞激素合成能力的变化,发现 HCV 持续感染可明显抑制细胞激素的合成能力。而合成能力下降所致培养上清激素水平的降低可直接导致细胞分化成熟障碍,加之前期研究发现 HCV 持续感染可致细胞超微结构出现脂滴减少等变化^[1-4]。因此,提出细胞激素合成、分泌能力下降所致细胞分化成熟障碍是细胞侵袭能力以及侵袭相关的黏附、运动能力下降的主要原因。

本研究发现,HCV 可持续感染体外培养的人胎盘滋养层细胞且可导致合体滋养层细胞侵袭能力以及侵袭相关的黏附、运动能力的下降。本实验应用 ELISA 和明胶酶谱分析等方法研究 HCV 持续

感染对体外培养滋养层细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌影响,证实 HCV 感染能抑制细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌。在实验中,发现感染组 proMMP-2 和 proMMP-9 mRNA 表达水平虽低于对照组,但差异无显著性。根据这一结果,认为体外培养人胎盘合体滋养层细胞侵袭能力下降是合体滋养层细胞分化不成熟的结果,RT-PCR 实验结果的差异可能为感染组存在相对多数不具备合成分泌 MMP-2 和 MMP-9 能力的细胞滋养层细胞所致。HCV 持续感染并不能特异性抑制细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌能力。

[参 考 文 献]

- [1] 程勇前,聂青和,周永兴,等.透射电镜及激光共聚焦技术观察体外丙型肝炎病毒感染的胎盘滋养层细胞[J].世界华人消化杂志,2003,11(2):151-156.
- [2] 程勇前,聂青和,周永兴,等.体外感染丙型肝炎病毒的滋养层细胞超微结构变化[J].中华妇产科杂志,2003,38(1):28-29.
- [3] 聂青和,张亚飞,罗新栋,等.体外培养人胎盘滋养层细胞内吞丙型肝炎病毒过程的电镜观察[J].中华传染病杂志,2005,23(6):364-367.
- [4] 张亚飞,聂青和,罗新栋,等.免疫电镜形态学研究人滋养层细胞内丙型肝炎病毒样颗粒[J].医学研究生学报,2005,18(8):674-676.
- [5] 程勇前,聂青和,周永兴,等.人胎盘滋养层细胞的分离培养及 IgGFc γ RⅢ在人胎盘组织中的表达[J].医学研究生学报,2002,15(2):105-107.
- [6] 程勇前,聂青和,周永兴,等.人胎盘滋养层细胞的分离培养及 HCV 体外感染试验[J].第四军医大学学报,2002,23(17):1544-1547.
- [7] 寿爱荣,高澎,李郁,等. HAb18G/CD147 拮抗抗肝癌转移作用的体外实验[J].世界华人消化杂志,2003,11(3):255-259.
- [8] Anin S A, Vince G, Quenby S. Trophoblast invasion[J]. Hum Fertil (Camb), 2004,7(3):169-174.
- [9] Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review[J]. Endocrine, 2002,19(1):3-11.
- [10] Al-Kubaisy W A, Niazi A D, Kubba K. History of miscarriage as a risk factor for hepatitis C virus infection in pregnant Iraqi women [J]. East Mediterr Health J, 2002,8(2-3):239-244.
- [11] Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications[J]. Bratisl Lek Listy, 2005,106(3):127-132.
- [12] Bischof P. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases[J]. Early Pregnancy, 2001,5(1):30-31.
- [13] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002,187(1-2):233-238.